

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Miglė Janulaitienė

Lyties takų bakterijos *Gardnerella*
virulentiškumo veiksniai ir jų sąsajos su
bakterine vaginoze

DAKTARO DISERTACIJA

Technologijos mokslai,
chemijos inžinerija (T 005)

VILNIUS 2026

Disertacija rengta 2013–2017 m. studijuojant doktorantūroje Vilniaus universitete Gyvybės mokslų centre Biotechnologijos institute ir **ginama eksternu**.

Mokslinė konsultantė – dr. Milda Plečkaitytė (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005).

Gynimo taryba:

Pirmininkė – prof. dr. Julija Armalytė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004).

Nariai:

Dr. Laura Kalinienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

Dr. Saulius Kulakauskas (Prancūzijos nacionalinis žemės ūkio, maisto ir aplinkos institutas, Prancūzija, gamtos mokslai, biochemija – N 004),

Dr. Inga Matijošytė (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005),

Dr. Milda Norkienė (Vilniaus universitetas, technologijos mokslai, chemijos inžinerija – T 005).

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2026 m. gegužės mėn. 6 d. 13:00 val. Gyvybės mokslų centro R401 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva

VILNIUS UNIVERSITY

Miglė Janulaitienė

Virulence Factors of Vaginal Bacteria *Gardnerella* and their Association with Bacterial Vaginosis

DOCTORAL DISSERTATION

Technological Sciences,
Chemical Engineering (T 005)

VILNIUS 2026

The dissertation was prepared between 2013 and 2017 during doctoral studies at Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biotechnology and is defended on **an external basis**.

Academic Consultant – Dr. Milda Plečkaitytė (Vilnius University, Technological Sciences, Chemical Engineering – T 005).

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defense Panel:

Chairman – Prof. Dr. Julija Armalytė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004).

Members:

Dr. Laura Kalinienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Dr. Saulius Kulakauskas (French National Institute for Agriculture, Food, and Environment, France, Natural Sciences, Biochemistry – N 004),

Dr. Inga Matijošytė (Vilnius University, Technological Sciences, Chemical Engineering – T 005),

Dr. Milda Norkienė (Vilnius University, Technological Sciences, Chemical Engineering – T 005).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defense Panel at 13:00 on 6 May 2026 in Room R401 of the Life Sciences Center.

Address: Sauletekio Ave. 7, Vilnius, Lithuania

TURINYS

SANTRUMPOS.....	8
ĮVADAS	9
MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ NAUDA.....	11
GINAMIEJI TEIGINIAI.....	12
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1. Žmogaus mikrobiota	13
1.2. Moterų lyties takai.....	14
1.3. Makšties mikrobiota.....	16
1.4. Laktobacilų reikšmė makšties mikrobiotoje.....	18
1.5. Makšties mikrobiotos disbiozės	20
1.6. Bakterinė vaginozė ir jos diagnostika	21
1.7. Bakterinės vaginozės komplikacijos	24
1.8. Bakterinės vaginozės gydymas	25
1.9. Bakterija <i>Gardnerella</i>	26
1.10. <i>Gardnerella</i> genties nevienalytiškumas.....	28
1.11. Pagrindiniai <i>Gardnerella</i> virulentiniai veiksniai.....	29
1.11.1. Bioplėvelės	29
1.11.2. Sialidazės.....	33
1.11.3. Toksinas vaginolizinas	34
1.12. <i>Gardnerella</i> vaidmuo BV patogenezėje: modeliai ir hipotezės	35
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	39
2.1. Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą.....	39
2.2. Klinikinių ėminių surinkimas	39
2.3. Makšties išskyrų tepinėlio dažymas, Nugent vertės nustatymas ir Amsel kriterijai	39
2.4. Pagamintos mitybinės terpės ir jų komponentai.....	40
2.5. Bakterijų izoliavimas ir identifikavimas.....	41
2.5.1. Genominės DNR išgryninimas iš makšties ėminių	41

2.5.2.	DNR elektroforezė.....	42
2.5.3.	<i>Bifidobacterium</i> spp. ir <i>Lactobacillus</i> spp. kamienų išskyrimas	42
2.5.4.	Mikroorganizmų nustatymas makšties ėminyje	42
2.6.	<i>Gardnerella</i> izoliavimas, auginimas ir genotipavimas	44
2.6.1.	<i>Gardnerella</i> kamienų išskyrimas.....	44
2.6.2.	<i>Gardnerella</i> identifikavimas	44
2.6.3.	<i>Gardnerella</i> kamienų ilgalaikis saugojimas ir kultivavimas skystoje terpėje .	45
2.6.4.	<i>Gardnerella</i> potipių nustatymas	45
2.6.5.	<i>Gardnerella</i> izoliatų RAPD analizė	46
2.7.	<i>Gardnerella</i> virulentinių veiksnių analizė	47
2.7.1.	Toksina vaginolizina koduojančio geno ir jį supančių sekų aptikimas...	47
2.7.2.	Toksino vaginolizino kiekio nustatymas ELISA	47
2.7.3.	β -galaktozidazės aktyvumo nustatymas <i>Gardnerella</i> izoliatuose ...	48
2.7.4.	Sialidazės koduojančių genų aptikimas <i>Gardnerella</i> izoliatuose	48
2.7.5.	Kokybinis ir kiekybinis sialidazės aktyvumo nustatymas	49
2.7.6.	Bioplėvelių formavimas	49
2.8.	Statistinė analizė	50
3.	REZULTATAI	53
3.1.	Tiriamoji moterų grupė ir ėminiai	53
3.2.	Makšties ėminių mikrobiotos apibūdinimas pagal bakterijų rūšis	54
3.3.	<i>Gardnerella</i> aptikimas makšties ėminiuose	56
3.4.	<i>Gardnerella</i> potipių nustatymas makšties ėminiuose	57
3.5.	<i>Gardnerella</i> kamienų išskyrimas iš makšties mėginių ir jų genotipavimas į potipius	58
3.6.	<i>Gardnerella</i> kamienų suskirstymas į potipius bei rūšis	59
3.7.	<i>Gardnerella</i> virulentiniai veiksniai ir jų pasiskirstymas potipiuose	63
3.7.1.	β -galaktozidazės aktyvumas <i>Gardnerella</i> potipiuose.....	63
3.7.2.	<i>Gardnerella</i> kamienų augimo kreivės	63
3.7.3.	Toksino vaginolizino sekrecija <i>Gardnerella</i> potipiuose.....	65
3.7.4.	<i>Gardnerella</i> potipių formuojamos bioplėvelės.....	66

3.7.5. Sialidazės aktyvumas.....	69
3.8. Statistinė <i>Gardnerella</i> potipių fenotipinių savybių analizė	69
3.8.1. Fenotipinių savybių koreliacinė analizė	70
3.8.2. Klasifikacinė analizė pagal fenotipines savybes.....	71
3.8.3. Klasterinė ir pagrindinių komponentų analizės	72
4. REZULTATŲ APTARIMAS.....	75
IŠVADOS.....	82
LITERATŪROS SĄRAŠAS	83
PRIEDAI.....	100
SUMMARY	116
PADĖKA	122
PUBLIKACIJŲ, SUSIJUSIŲ SU DISERTACINIU DARBU, SĄRAŠAS ...	123
KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS.....	124
GYVENIMO APRAŠYMAS	125
UŽRAŠAMS	127

SANTRUMPOS

- AV – aerobinis vaginitas
BV – bakterinė vaginozė
BVAB – su bakterine vaginoze siejamos bakterijos (*angl.* bacterial vaginosis associated bacteria)
CDC – nuo cholesterolio priklausomi citolizinais (*angl.* Cholesterol-dependent cytolytins)
CST – mikroorganizmų bendrijų grupė (*angl.* community state types)
FISH – fluorescencinė *in situ* hibridizacija (*angl.* fluorescence *in situ* hybridization)
GS – galimybių santykis (*angl.* odds ratio)
HC – hierarchinė klasterizacija (*angl.* hierarchical clustering)
KFV – kolonijas formuojantis vienetas
LPL – lytiškai plintanti liga
MAk – monokloninis antikūnas
MALDI-TOF - matricos lazerinės desorbcijos jonizacijos skrydžio laiko masių spektrometrija (*angl.* matrix assisted laser desorption ionization time of flight)
MUN – 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuraminės rūgšties natrio hidratas (*angl.* 2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate)
NGS – naujos kartos sekoskaita (*angl.* next generation sequencing)
NS – Nugent vertė (*angl.* Nugent score)
NVSPL – Nacionalinė visuomenės sveikatos priežiūros laboratorija, Žolyno g. 36, LT-10210, Vilnius
PCA – pagrindinių komponentų analizė (*angl.* principal component analysis)
PI – pasikliauties intervalas
RAPD – atsitiktinai amplifikuota polimorfinė DNR (*angl.* random amplified polymorphic DNA)
SN – standartinis nuokrypis
SP – standartinė paklaida
VMC – makšties mikroorganizmų bendrija (*angl.* vaginal microbial community)
WGS – viso genomo sekoskaita (*angl.* whole genome sequencing)
VU GMC BTI – Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biotechnologijos institutas

IVADAS

Mikroorganizmų bendrijos, gyvuojančios įvairiose žmogaus anatomicinėse vietose, įtakoja žmogaus sveikatą, veikdamos gyvybiškai svarbius procesus susijusius su metabolizmu, imuniniu atsaku ir reprodukcija (Cho & Blaser, 2012). Moterų apatiniuose lyties takuose – makštyje ir gimdos kaklelyje – aptinkamos gausios bakterijų bendrijos (mikrobiota), yra svarbios ne tik reprodukcinei moterų, bet ir jų naujagimių sveikatai (Ma et al., 2012; Ferrante et al., 2025). Sveikų vaisingo amžiaus moterų makštis yra kolonizuota *Lactobacillus* rūšių bakterijomis (Boris & Barbés, 2000) ir dažniausiai kokia nors viena iš šių *Lactobacillus* rūšių, *L. iners*, *L. gasseri*, *L. crispatus* ar *L. jensenii*, yra vyraujanti. (Ravel et al., 2011).

Bakterinė vaginozė (BV) yra pasaulyje itin paplitusi vaisingo amžiaus moterų makšties mikrobiotos disbalanso, vadinamo disbioze, forma, charakterizuojama laktobacilų sumažėjimu ir bendrijų, sudarytų iš įvairių anaerobinių bakterijų (*Gardnerella*, *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp. ir *Bacteroides* spp.), pagausėjimu (Srinivasan et al., 2012). Nemalonūs klinikiniai BV simptomai apkartina moterų gyvenimą (Bilardi et al., 2013). Be to, BV siejama su trumpalaikėmis ir ilgalaikėmis ginekologinėmis ir reprodukcinėmis pasekmėmis (Zhu et al., 2022). BV bent kartą gyvenime patiria nuo 23 iki 29% vaisingo amžiaus moterų pasaulyje, priklausomai nuo regiono (Peebles et al., 2019).

Kultivavimo ir naujos kartos DNR sekoskaitos metodais buvo identifikuoti makšties mikrobiotos mikroorganizmai (Ravel et al., 2011; Srinivasan et al. 2016), tačiau mažai žinoma apie jų funkcijas ir poveikį žmogaus sveikatai. Moterų, kurioms diagnozuota BV, 95-100% makšties ėminių aptinkama bakterija *Gardnerella* (Ravel et al., 2011; Cerca et al., 2019). *Gardnerella* taip pat randama, dažniausiai mažesniais kiekiais, nuo 25 iki 80% sveikų moterų makšties ėminių (Ravel et al., 2011; Schwebke et al., 2014; Munch et al., 2024). Palyginus su kitomis BV mikrobiotos bakterijomis, *Gardnerella* turi išskirtinį virulentinį potencialą: sudaro bioplėveles ant atplyšusių makšties epitelio ląstelių, kurios aptinkamos tik sergant BV (Swidsinski et al., 2005), gamina toksiną vaginoliziną, kuris geba lizuoti žmogaus ląsteles (Gelber et al., 2008), sekretuoja sialidazes, kurios ardo apsauginio makšties gleivių glikozilintus baltymus mucinus (Lewis et al., 2013).

Gardnerella izoliatai iš moterų lyties takų pasižymi didele genetinė ir fenotipine įvairove (Santiago et al., 2011b; Pleckaityte et al., 2012), todėl vyrauja hipotezė, jog egzistuoja komensaliniai ir patogeniniai kamieniai, kurių vaidmuo BV patogenezėje yra skirtingas (Schwebke et al., 2014; Cerca et al.,

2019). *Gardnerella* izoliatų viso genomo sekų palyginimas leido išskirti *Gardnerella* į genetinius potipius (*angl.* clades) (Ahmed ir kt; 2012), vėliau į rūšis (*angl.* species) ir genomo rūšis (*angl.* genome species) (Vaneechoutte et al., 2019). Manoma, kad potipiai/rūšys gali skirtis savo virulentiškumu, santykiu su kitais mikrobiotos nariais bei vaidmeniu sveikoje ir disbiotinėje makšties mikrobiotoje.

Ši disertacija apima iš Lietuvoje gyvenančių moterų makšties ėminių išskirtų *Gardnerella* izoliatų virulentinių savybių, siejamų su BV patogenezė, tyrimus.

Darbo tikslas: Iš charakterizuotų makšties ėminių išskirti *Gardnerella* kamienus, apibūdinti jų virulentinius veiksnius bei pasiskirstymą *Gardnerella* potipiuose/rūšyse.

Darbo uždaviniai:

1. Charakterizuoti moterų makšties ėminius, atskiriant sveiką ir BV mikrobiotą.
2. Nustatyti *Gardnerella* potipius sveikos ir BV mikrobiotos makšties mėginiuose.
3. Iš moterų makšties mėginių išskirti *Gardnerella* kamienus ir nustatyti jų potipį/rūšį.
4. Ištirti *Gardnerella* izoliatų virulentinių veiksnių raišką: sekretuojamo toksino vaginolizino raiškos lygį, gebėjimą formuoti bioplėveles ir sialidazės aktyvumą.
5. Nustatyti virulentinių veiksnių pasiskirstymą tarp *Gardnerella* potipių/rūšių ir jų sąryšį su BV patogenezė.

MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ NAUDA

Šiame darbe makšties ėminiuose iš Lietuvoje gyvenančių vaisingo amžiaus moterų pirmą kartą nustatytas bakterijos *Gardnerella* paplitimas: sveikų moterų makštyje aptiktas didelis 87%, o su BV diagnoze 100% šios bakterijos paplitimas. Aptiktas didelis bakterijos ir *Ureaplasma parvum*, kuri siejama su nėštumo komplikacijomis, paplitimas. Būtent infekcija *U. parvum* ir *Mycoplasma hominis* statistiškai patikimai susijusi su BV būkle. Šis sąryšis įrodo, jog makšties mikrobiotos disbiozė negali būti ignoruojama ir turi būti gydoma.

Nustatyta, jog moterų, kurioms diagnozuota BV, makšties mikrobiotoje yra dauginiai *Gardnerella* potipiai/rūšys. Iš kelių ėminių pavyko išskirti kelių potipių kamienus arba kelis genetiškai skirtingus to paties potipio kamienus ir charakterizuoti jų virulentinius veiksnius. Kamienų charakteristikos padeda įvertinti galimą *Gardnerella* vaidmenį makšties mikrobiotoje.

Šiame darbe pirmą kartą pateiktos fenotipinės charakteristikos nemažos, 34 *Gardnerella* izoliatų, kurie priklauso skirtingiems potipiams/rūšims, kolekcijos. *Gardnerella* virulentiškumo veiksnius, tokius kaip bioplėvelės ir sialidazės tyrinėja kelios grupės mokslininkų, bet toksino vaginolizino sintezė analizuota tik šiame darbe. Pademonstruota, jog skirtingi *Gardnerella* potipiai/rūšys turi skirtingą patogeninį potencialą, o šie rezultatai paremia vyraujančią hipotezę, jog jų vaidmuo mikrobiotoje gali būti skirtingas.

Gardnerella izoliatų kolekcijas pasaulyje turi tik kelios mokslininkų grupės. Su disertaciniu darbu susijusių publikacijų autoriai gavo pasiūlymą iš kompanijos Bruker Daltonic GmbH (Vokietija), kuri kuria klinikinės mikrobiologinės laboratorijose plačiai naudojamus MALDI-TOF prietaisus mikroorganizmų identifikacijai, pasinaudoti Lietuvoje išskirtais skirtingų rūšių *Gardnerella* kamienais, kurie būtų naudojami, įdiegiant *Gardnerella* rūšių identifikaciją kompanijos prietaisais. Bendradarbiavimo su su Dr. Thomas Maier iš Bruker Daltonic GmbH rezultatai aprašyti Bulavaitė et al. (2021) publikacijoje.

Taip pat pasiūlymas pasidalinti skirtingų rūšių *Gardnerella* izoliatais buvo gautas ir iš American Type Culture Collection (ATCC, <https://www.atcc.org>), nes yra nemažas susidomėjimas skirtingomis šios bakterijoms rūšimis. Kamienai buvo išsiųsti ir yra ATCC kolekcijoje: *G. vaginalis* (<https://www.atcc.org/products/baa-3435>), *G. plovitii* (<https://www.atcc.org/products/baa-3433>), *G. leopoldii* (<https://www.atcc.org/products/baa-3434>) ir *G. swidsinskii* (<https://www.atcc.org/products/baa-3436>).

GINAMIEJI TEIGINIAI

- Kaip ir kitose šalyse atliktuose tyrimuose, sveikų vaisingo amžiaus moterų iš Lietuvos makšties ėminiuose nustatytas didelis bakterijos *Gardnerella* paplitimas.

- Gardnerella* potipių/rūšių paplitimas makšties mikrobiotoje yra nevienodas, rodantis jog jų vaidmuo BV patogenezėje gali skirtis.

- Dauginiai *Gardnerella* izoliatų potipiai aptikti BV mikrobiotos makšties mėginiuose, bet ne sveikos mikrobiotos mėginiuose.

- Didelis sialidazės aktyvumas nustatomas sergant BV, bet ne visiems *Gardnerella* potipiams būdingos sialidazės: potipio 4 kamienai neturi sialidazės aktyvumo.

- Gardnerella* potipiai/rūšys pasižymi skirtinga virulentinių veiksmų raiška.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Žmogaus mikrobiota

Pasiekimai DNR ir RNR, metabolitų tyrimuose bei nauji bioinformatiniai resursai leido ištirti mikroorganizmų ir jų bendrijų (*angl.* microbial communities), gyvuojančių žmogaus organizme, sudėtį ir kai kada funkcijas. Tapo aišku, kad žmogus, taip pat augalai ir gyvūnai, niekada nebuvo individas biologine prasme, nes egzistuoja kartu su mikroorganizmais (Gilbert et al., 2013; Younes et al., 2018). Žmonės, apibrėžiami kaip holobiontai, gyvenantys simbiozėje su savo mikroorganizmais, kurie gali būti tiek pastovūs, tiek nepastovūs bendrijų nariai. Atsirado naujų terminų poreikis, apibrėžiančių mikroorganizmų bendrijas aptinkamas įvairiose žmogaus kūno vietose, sukūrimui. Terminas „mikrobiota“ (*angl.* microbiota) apibrėžia mikroorganizmų visumą, kuri yra tam tikroje aplinkoje ar ekologinėje nišoje, ir pirmą kartą panaudotas 2001 m. mokslininkų Lederberg ir McCray (Lederberg & McCray, 2001). Terminas „mikrobioma“ (*angl.* microbiome) yra platesnis: tai ne tik mikroorganizmų (bakterijų, aukštesniųjų ir žemesniųjų eukariotų ir virusų) visuma, bet ir jų genomai, o taip pat sąlygos, kuriose šie genomai tarpsta (Marchesi & Ravel, 2015). Mokslinėje literatūroje dažnai nesilaikoma šių terminų atskirties.

Mikroorganizmų bendrijos aptinkamos įvairiose žmogaus kūno vietose: ant odos, žarnyne, burnoje, nosyje, šlapimo ir lyties takuose. Žmogaus kūnas turi tiek pat bakterijų ląstelių, kiek ir žmogaus ląstelių, t.y. apie 10^{13} (Sender et al., 2016). Mikroorganizmai, kurie sudaro bendrijas, gali būti komensalais, gaunančiais naudą iš simbiotinių ryšių su šeimininku, patobiontais, kurie būdami komensalais, tam tikromis sąlygomis gali sukelti ligą. Kiti mikroorganizmai yra ligas sukeliantys patogenai (Crucitti, 2017).

Mikrobioma kartu su žmogumi vystėsi tūkstančius metų ir yra gyvybiškai svarbi žmogaus išgyvenimui. Bakterijos yra būtinos žmogaus maisto medžiagų įsisavinimui ir įgimto imuninio atsako palaikymui bei yra pirmoji gynybinė organizmo apsauga nuo infekcijų (Cho & Blaser, 2012; Al-Nasiry et al., 2020; Silpe & Balskus, 2021). Manoma, jog žarnyno mikrobiota gali veikti net žmogaus elgesį (Hooper & Gordon, 2001). Moksliniai tyrimai atliekami, siekiant išsiaiškinti, kaip šios bendrijos skiriasi tarp individų savo sudėtimi ir funkcijomis, kaip tarpusavyje sąveikauja bendrijų nariai ir kaip sąveikauja su šeimininku, atliepdami į dinamiškai ekosistemai iškylančius pavojus. Nuo 2007 m. vykdomas Žmogaus mikrobiomos projektas (*angl.* Human Microbiome Project), kurio siekiama visapusiškai charakterizuoti žmogaus mikrobiomą įvairiose kūno vietose ir įvertinti jos vaidmenį žmogaus

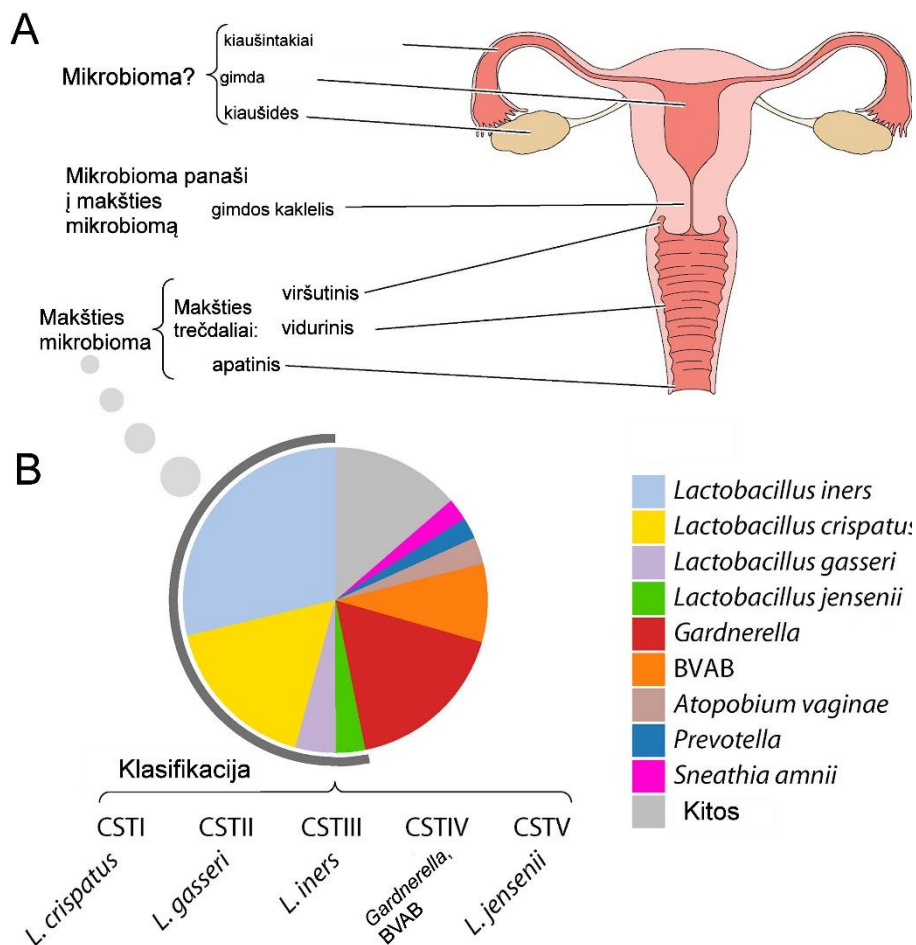
sveikatai (Proctor et al., 2019). Siekiama išsiaiškinti, kokios mikroorganizmų bendrijos sudaro „normalią“ sveikų individų mikrobiomą įvairiose žmogaus kūno vietose. Projektas išsiplėtė ir, panaudojant „multi-omic“ priemones, siekiama nustatyti šeimininko–bakterijų ryšį ir mikroorganizmų bendrijų dinamiką ligos ir sveikatos atvejais.

Mikrobiotos pusiausvyros sutrikimai, arba disbalansas, dar vadinamas disbioze (*angl.* dysbiosis), charakterizuojamas organizmui naudingų mikroorganizmų sumažėjimu ir pagausėjimu tų komensalininių, kurie paprastai aptinkami nedideliais kiekiais mikrobiotoje, ar patobiontų atsiradimu/pagausėjimu, galinčių grasinti žmogaus sveikatai ir net gyvybei (Crucitti, 2017).

Šiame darbe tiriamas moterų apatinių lyties takų (makšties) mikrobiotos narys – bakterija *Gardnerella* – todėl toliau bus pateikiamos žinios apie moterų apatinių lyties takų mikrobiota.

1.2. Moterų lyties takai

Moteriškos lyties placenta turinčių žinduolių ir žmogaus reprodukcinė sistema turi unikalias struktūras – makštį ir gimdą (1.1 pav. A) Reprodukcinio ciklo metu subrendę kiaušinėliai (oocitai) iš kiaušidžių patenka į pilvo ertmę ir kiaušintakiuose yra apvaisinami. Apvaisinti kiaušinėliai (zigotos) pernešami į gimdą implantacijai. Makštyje gausiausiai aptinkama bakterijų, o kiaušintakiai ir gimda bent jau teoriškai turėtų būti sterilūs. Gimdos kaklelis sujungia makštį su gimda ir yra tarsi barjeras tarp makšties ir pilvo ertmės. Reprodukcinio amžiaus moters makšties gleivinės epitelis užima didelį paviršiaus plotą (apie 360 cm²) ir yra pirmas gleivinės paviršius, kuris kontaktuoja su lytiniu keliu perduodamais patogenais (Anderson et al., 2014). Jis sudarytas iš neragėjančiojo plokščiojo epitelio ląstelių. Priešingai, gimdos kaklelio epitelis užima daug mažesnę plotą, sudarytas iš stulpiškojo epitelio ląstelių ir yra dažniausia patogenų *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* ir žmogaus papilomos viruso (ŽPV) infekcijos vieta (Anderson et al., 2014). Gimdos kaklelis sekretuoja gleives (*angl.* mucus), kurios užpildo atsidarantį gimdos kaklelį ir sudaro barjerą, kad patogenai nepatektų į gimdą. Gleivės sudarytos iš baltymų, lipidų, vandens ir glikoproteinų, vadinamų mucinais (Bansil & Turner, 2018).



1.1 pav. Moterų lyties takai ir jų mikrobioma. Moterų lyties takai (A) ir jų mikrobiomos suskirstymas į CST tipus (B). Skritulinėje diagramoje skirtingomis spalvomis pažymėta mikrobiomą sudarančios bakterijų gentys bei rūšys. *Lactobacillus* genties bakterijos išryškintos pilka, diagramą juosiančia juosta kairėje. Mikrobioma suklasifikuota į CST tipus ir nurodyta tipuose vyraujančios bakterijos. BVAB – su bakterine vaginoze siejamos bakterijos. Pagal Zhu et al., 2022.

Mucinai apsaugo makšties epitelį ir yra itin turtinga mikrobiotos maitinamoji terpė. Gleivės, sekretuojamos į makštį, tampa tarsi spąstai mikroorganizmams ir išstumia juos iš makšties taip apsaugodamos tiek gimdą, tiek makšties epitelį (Lacroix et al., 2020). Estrogenai stimuliuoja glikogeno kaupimąsi ir tuo pačiu makšties epitelio storėjimą (Dubé-Zinatelli et al., 2024). Makšties epitelis kinta su moters amžiumi: gimimo metu mergaitės turi panašų į suaugusios moters makšties epitelį, nes yra veikiamos motinos estrogenų. Ploniausias makšties epitelis yra mergaičių iki lytinio brendimo ir moterų po menopauzės, nes tuo metu nevyksta glikogeno gamyba gleivinės

ląstelėse. Vaisingo amžiaus moterų makšties epitelis sustorėja; hormonai veikia glikogeno sintezę ir jo kaupimąsi (Gregoire et al., 1971).

Makšties gleivinėje yra B limfocitų gaminami IgG ir IgA klasių antikūnai, kurie atpažįsta patogenus ir juos sunaikina nuo komplemento priklausiančiu mechanizmu arba opsonizacija. Šie antikūnai veikia greitai, lokaliai ir todėl kovai su patogenais neprireikia „įjungti“ sisteminio imuninio atsako. Makšties gleivinėje taip pat aptinkama didelė koncentracija antimikrobinių peptidų, priešuždegiminių citokinų ir matriksą ardančių fermentų (Muzny et al., 2020).

Anatomiškai yra skiriami viršutiniai (gimda, kiaušintakiai) ir apatiniai moters lyties takai (makštis, gimdos kaklelis). Henry Tissier 1900 m. paskelbtame darbe teigiama, jog gimda yra sterili, nes ją apsaugo gleivių kamštis gimdos kaklelyje (Tissier, 1900). Tačiau pasirodė, jog viršutiniai lyties takai nėra sterilūs ir publikacijose buvo aprašytos gimdos, kiaušintakių, placentos (Aagaard et al., 2014; Baker et al., 2018) ir net peritoninio skysčio mikroorganizmų bendrijos (Chen et al., 2017), nors kai kurie mokslininkai skeptiškai vertina mikrobiotos buvimą šiuose organuose (Zhu et al., 2022).

1.3. Makšties mikrobiota

Su moters reprodukcine sistema susijusios ligos yra vienos opiausių moterų sveikatos problemų, ir apima tiek infekcines, tiek neinfekcines ginekologines ir reprodukcinės ligas (Hoffman et al., 2020). Dalis šių sveikatos problemų yra susijusios su makšties mikrobiota.

Geriausiai žinomi ankstyvieji pranešimai iš Vakarų pasaulio apie makštyje gyvenančius mikroorganizmus yra datuojami 1892 m., kai Albert ir Gustav Döderlein aprašė mikroskopu stebėtas lazdelės formos Gram-teigiamas bakterijas makštyje, kurios neabejotinai veikė moterų sveikatą. Šios bakterijos buvo pavadintos Döderlein makšties bacilomis, gamino pieno rūgštį ir slopino stafilokokų augimą (Döderlein 1982; 1984). Gausėjant molekulinės biologijos žinioms bei vystantis DNR paremtomis identifikacijos, sekoskaitos ir metagenomikos technikoms, kaupėsi žinios apie makšties mikrobiotą (Ma et al., 2012; van de Wijkert et al., 2014).

Moterų lyties takų mikrobiota kinta bėgant laikui, taip pat veikiant įvairiems išoriniams ir vidiniams veiksniams (Crucitti, 2017; Dubé-Zinatelli et al., 2024). Vaisingo amžiaus moterų makšties mikrobiotos fiziologiniai pokyčiai laike būna trumpalaikiai ir susiję su menstruacijų ciklu (Santiago et al., 2011a), nėštumu (įvairūs nėštumo laikotarpiai) ir ponėštuminiu periodu (Avershina et al., 2017). Yra ir fiziologiniai ilgalaikiai mikrobiotos pokyčiai, kurie susiję su moterų amžiumi: mergaičių iki lytinio brendimo, laikotarpis

prieš pat lytinį brendimą, vaisingo amžiaus ir menopauzės periodas (Auriemma et al. 2021).

Makšties mikrobiotos sudėčiai turi reikšmę ir etninė moterų kilmė (Fettweis et al., 2014; Serrano et al., 2019). Seksualinis ir paprotinis moterų elgesys, higienos įpročiai, mityba, medikamentai ar žalingi įpročiai įtakoja makšties mikrobiotą (Bradshaw et al., 2013; Noyes et al., 2018).

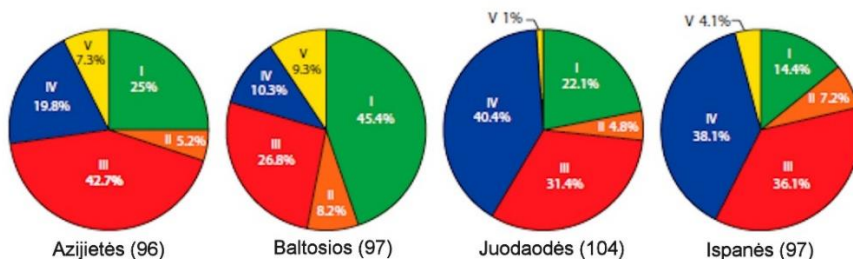
Vaisingas moters amžius yra ilgai trunkantis gyvenimo tarpsnis ir visuomenės sveikatos prasme jis yra svarbiausias, todėl šio periodo lyties takų mikrobiota yra geriausiai ištirta.

Kaip minėta, jau nuo XIX a. pabaigos žinoma, kad laktobacilos apsaugo moterų makštį nuo patogenų kolonizacijos ir kad sveikos makšties pH $\leq 4,5$ (Döderlein, 1894). Pamatinis darbas, charakterizuojantis vaisingo amžiaus moterų makšties mikroorganizmų bendrijas (*angl.* vaginal microbial community(ies), VMC) buvo paskelbtas 2011 m. Ravel ir kolegų (Ravel et al., 2011). Autoriai charakterizavo 396 sveikų, vaisingo amžiaus, skirtingų rasių (baltosios rasės, juodosios rasės, azijiečių ir ispanų kilmės) Š. Amerikos moterų makšties mėginius, panaudojant 16s rRNR geno amplikono sekoskaitą. Taip pat buvo paimtas ėminys mikroskopiniam makšties mikrobiotos įvertinimui ir makšties išskyrų pH nustatymui. Išanalizavus mėginius, VMC buvo suskirstytos į penkis mikroorganizmų bendrijų tipus (*angl.* community state types, CST). Buvo nustatyta, jog besimptominių sveikų moterų makšties mikroorganizmų bendrijas galima suskirstyti į penkis CST tipus pagal vyraujančią bakterijų rūšį: CST I (26,6% moterų) dominuoja *Lactobacillus crispatus*, CST II (6,3%) gausiausiai aptinkama *Lactobacillus gassieri*, CST III (34,1%) – *Lactobacillus iners*, CST V (5,3%) – *Lactobacillus jensenii* (1.1 pav. B). Šių CST tipų daugiausia buvo nustatytos baltųjų ir Azijos kilmės moterų makšties mėginiuose (1.2 pav.). *Lactobacillus* spp. nevyravo CST IV; šis tipas pasižymėjo dideliu heterogeniškumu: tai vairių fakultatyvių ir obligatinių anaerobinių bakterijų mišinys, tokių kaip *Prevotella*, *Gardnerella*, *Atopobium vaginae* (dabar vadinama *Fannyhessea vaginae*), *Sneathia*, *Megashpera* ir nekultivuojamos *Clostridiales* bakterijomis, pavadintos BVAB1 ir BVAB2 (*angl.* bacterial vaginosis associated bacteria). Dauguma šių anaerobinių bakterijų yra nekultivuojamos arba sunkiai kultivuojamos. CST IV būdingas juodosios rasės ir ispanų kilmės moterims (atitinkamai 40% ir 38%).

CST I-V klasifikacija tapo visuotinai priimta ir naudojama mokslinėje bendruomenėje (France et al., 2022).

Vėlesniuose tyrimuose buvo analizuotas dar didesnis JAV gyvenančių vaisingo amžiaus moterų makšties ėminių kiekis (1268 juodaodžių ir 416 baltosios rasės), o CST IV buvo diferencijuotas į smulkesnius pogrupius. CST

IV–B dominavo *Gardnerella*, *Atopobium* ir *Prevotella*, o CST IV–A – daugiausia kitos anerobinės bakterijos, įskaitant *Streptococcus* ir *Prevotella* (Fettweis et al., 2014). Dar vėliau klasifikacija išsiplėtė iki septynių CST tipų ir 13 CST potipių (France et al., 2020). Autoriai taip pat patvirtino, kad makšties VMC skiriasi priklausomai nuo moterų etninės kilmės: daugumos baltosios rasės europietiškos kilmės sveikų moterų lyties takuose vyrauja laktobacilos, o afroamerikiečių moterų – mikrobiotos profilis yra įvairesnis (Fettweis et al., 2014; Serrano et al., 2019). Gimdos kaklelio mikrobiotos sudėtis panaši į makšties mikrobiotos sudėtį (Smith et al., 2014).



1.2 pav. Mikrobiotos suskirstymas į CST tipus ir jų pasiskirstymas tarp moterų etninių grupių. Skritulinėse diagramose CST numeris pažymėtas graikišku skaitmeniu. Žalia spalva pažymėta CST I (vyrauja *L. crispatus*), CST II (vyrauja *L. gasseri*) – oranžinė spalva, CST III (vyrauja *L. iners*) – raudona spalva, CST IV (įvairių anaerobinių bakterijų bendrijos, laktobacilos nevyrauja) – mėlyna spalva, CST V (vyrauja *L. jensenii*) – geltona spalva. Moterų skaičius % kiekvienoje etninėje grupėje pateiktas skliausteliuose. Pagal Ravel et al., 2011.

Laktobacilų vyravimas sveikuose lyties takuose nereiškia, kad kitų bakterijų ten neaptinkama. Makšties mikrobiotą sudaro šimtai bakterijų rūšių (Srinivasan et al., 2016). Didžioji jų dauguma aptinkama itin mažais kiekiais, todėl kalbama apie vyraujančias arba dominuojančias bakterijas, kurių kiekiai yra didžiausi (Ravel et al., 2011; Fettweis et al., 2014).

1.4. Laktobacilų reikšmė makšties mikrobiotoje

XIX a. pabaigoje aprašytos makšties Gram-teigiamos pieno rūgštį gaminančios bakterijos, kurios gali slopinti patogeninių bakterijų augimą *in vitro* ir *in vivo*, buvo pavadintos jas aprašiusio vokiečių ginekologo Albert Döderlein garbei – Dederleino lazdelės. Vėliau Dederleino bacilos buvo identifikuotos kaip *Lactobacillus acidophilus* (Thomas, 1928). Šiuo metu yra identifikuota apie 300 *Lactobacillus* rūšių, daugiau kaip 25 gentys aptinkamos žmogaus mikrobiotoje (Mejía-Caballero & Marco, 2025). Tai fakultatyvinės anaerobinės arba mikroaerofilinės, katalazė-neigiamos, sporų

neformuojančios lazdelės, fermentuojančios angliavandenius iki pieno rūgšties. Skirtingos rūšys morfologiškai sunkiai atskiriamos, todėl identifikuojamos molekuliniiais metodais (Goldstein et al., 2015).

Laktobacilos, būtent *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* ir *L. jensenii*, yra gausiausiai aptinkamos bakterijos vaisingo amžiaus moterų makštyje (Ravel et al., 2011). Kitose rūšyse, įskaitant ne žmogaus kilmės moteriškos lyties primatus, laktobacilos nėra vyraujanti bakterijų rūšis makštyje (Yildirim et al., 2014).

Dėl estrogenų poveikio glikogenas kaupiasi moterų makšties epitelyje. Makštyje esantis fermentas α -amilazė skaldo glikogeną iki maltozės, maltotriozės ir dekstrinų. Laktobacilos naudoja šiuos produktus pieno rūgšties sintezei. Dėl pieno rūgšties sintezės makšties pH yra rūgštinis (pH 3-4,5), todėl slopinamas kitų bakterijų augimas (Witkin & Linhares, 2017). Antrasis apsauginis laktobacilų mechanizmas yra barjerinis/konkurencinis – kolonizuodamos makšties gleivinę jos konkuruoja su kitomis bakterijomis ir tuo būdu blokuoja patogeninių bakterijų prisijungimą prie makšties epitelio ląstelių (Boris & Barbés, 2000). Be to, laktobacilos sintetina tirpius junginius bei bakteriocinus, kurie neleidžia kitoms bakterijoms prikibti prie epitelio arba jas nužudo (Boris & Barbés, 2000; Li et al., 2023).

Manoma, jog tų nedaugelio moterų, kurių makštyje vyrauja ne laktobacilos, pieno rūgšties gamintojai gali būti kitos bakterijos, būtent *F. vaginae*, *Megasphaera* ir *Leptotrichia*. Ne tik bakterinės kilmės pieno rūgštis yra makštyje: veikiant hormonui estrogenui sąlyginai anaerobinėse sąlygose makšties epitelio ląstelėse gliukozės metabolizmo produktas yra pieno rūgštis. Tačiau žmogaus organizme, su nedidelėmis išimtimis, susidaro tiksliai L-izomeras, tuo tarpu, laktobacilos išskiria abu D- ir L- chiralinius pieno rūgšties izomeras. Ištyrus D- ir L- izomerų santykį makšties išskyrose, nustatyta, kad bakterijos pagamina reikšmingai didesnę pieno rūgšties kiekį nei epitelio ląstelės (Boskey et al., 2001). Vienintelė laktobacilų rūšis *L. iners* negamina D-izomero, o išimtina gamina L-izomerą (Mendes-Soares et al., 2014). Abu izomerai veikia biocidiškai prieš ŽIV ir su BV siejamas bakterijas *in vitro* (O'Hanlon et al., 2011; Aldunate et al., 2013). Pieno rūgšties D-izomeras mažina metaloproteazės (MMP)-8 sintezę. MMP-8 aktyvumas siejamas su gleivių kamščio, kuris apsaugo viršutinius lyties takus nuo bakterijų, destrukcija (Rahkonen et al., 2009). Taigi, dideli pieno rūgšties D-izomero kiekiai makštyje gali sumažinti bakterijų patekimą į gimdą, o tai teigiamai veikia nėštumą bei moterų lyties takų sveikatą.

Ilgą laiką buvo manoma, kad laktobacilų savybė gaminti H_2O_2 nulemia jų bakteriocidines savybes ir lyties takuose. Tačiau buvo parodyta, kad H_2O_2 , kurį *in vitro* aerobinėmis sąlygomis gamina laktobacilos, negali veikti kaip

apsauginis veiksnys makšties gleivinėje. Pirmiausiai dėl to, kad makšties aplinka yra anaerobinė, kur yra nedidelis ištirpusio deguonies kiekis. Todėl mažai tikėtina, kad laktobacilos galėtų makštyje išskirti ir sukaupti pakankamą H_2O_2 kiekį, kuris toksiškai paveiktų kitas bakterijas. Be to, makšties išskyros pasižymi stipriomis antioksidacinėmis savybėmis, kurios gali blokuoti bakteriocidinį H_2O_2 poveikį. Nustatyta, kad H_2O_2 veikia toksiškai pačias laktobacilas, net labiau nei kitas tirtas su BV siejamas bakterijas (O'Hanlon et al., 2011).

Pradėjus taikyti nuo kultivavimo nepriklausomus metodus, 1999 m. aptikta nauja itin paplitusi laktobacilų rūšis *L. iners*. Ji nepateko anksčiau į tyrėjų akiratį, nes neauga ant įprastinio laktobaciloms kultivuoti naudojamo agaro, o tik ant agaro su krauju. Tai nedidelės Gram-teigiamos nepigmentuotos lazdelės, augančios kaip pavienės ląstelės ar nedidelėmis grandinėlėmis. *L. iners* yra bene dažniausias VMC narys ir unikali tarp makšties laktobacilų. Kaip minėta, šios rūšies bakterijos negamina pieno rūgšties D-izomero, nors makšties, kurioje dominuoja *L. iners* (CST III) pH<4.5, nes gaminamas L-izomeras. *L. iners* taip pat negamina H_2O_2 . Bakterija sekretuoja toksiną ineroliziną, kuris lizuoja eukariotines ląsteles, sudarydamas jose poras (Rampersaud et al., 2011). Be to, šis toksinas yra aktyvus, esant rūgštiniam pH, kuris būdingas mikrobiotai, kurioje vyrauja laktobacilos (Ragaliauskas et al., 2019). *L. iners* genomas yra mažiausias tarp laktobacilų (apie 1,3 Mbp), kuris greičiausiai taip evoliucionavo, jog neteko daugelio genų, bet įgijo naujus, kurie reikalingi bakterijos išlikimui (Holm et al., 2023). Tyrimai parodė, jog VMC, kuriose vyrauja *L. iners* (CST III), yra mažiau stabilios nei VMC, kuriose vyrauja kitos laktobacilos. CST III linkusi pereiti į CST IV, kurioje vyrauja ne laktobacilos ir kurios nesiejamos su sveika makšties mikrobiota (Gajer et al., 2012). Manoma, jog *L. iners* yra tarsi tarpininkas tarp makšties mikrobiotos, kurioje vyrauja laktobacilos ir disbiotinės mikrobiotos.

1.5. Makšties mikrobiotos disbiozės

Daugumoje žmogaus kūno sričių, pvz. žarnyne, didelė mikrobinė įvairovė yra laikoma sveikatos požymiu, tačiau vaisingo amžiaus moters lyties takų sveika mikrobiota yra siejama su nedidele mikrobine įvairove, kai dominuoja kuri nors *Lactobacillus* rūšis (Ravel et al., 2011). Tyrimai parodė, jog makšties mikrobiotos sudėties pokyčiai yra susiję su moters ginekologine ir reprodukine sveikata. Makšties mikrobiotos balanso sutrikdymas, charakterizuojamas laktobacilų sumažėjimu, vadinamas disbioze. Kaupiantis žinioms apie lyties takų mikrobiotos sudėtį, disbiozės klasifikacija kinta,

įgauna naujus pavadinimus. Šiuo metu yra skiriama dvi pagrindinės disbiozės formos: bakterinė vaginozė (BV) ir aerobinis vaginitas (AV) (Donders, 2007; Zhu et al., 2022). Disbiozės formos ir jų pavadinimai siejami su tuo, kokie mikroorganizmai pradeda vyrauti, sumažėjus laktobacilų kiekiui. BV būdinga laktobacilų sumažėjimas ir anaerobinių bakterijų pagausėjimas (Srinivasan & Fredricks, 2008). Tuo tarpu AV charakterizuojamas aerobinių bakterijų pagausėjimu, tokių kaip *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* (Donders, 2007).

Kai kurie tyrėjai disbiozės formoms priskiria *Candida* vaginitą ir *Trichomonas* vaginitą (Donders & Sobel, 2017). Kai kurie autoriai išskiria ir citolitinę vaginozę – tai tarsi priešingas BV ir AV susirgimas, kuris pasireiškia laktobacilų pagausėjimu, todėl makšties pH itin parūgštėja (pH<4) ir prasideda epitelio ląstelių lizė (Donders, 2007; Zhu et al., 2022). Disbiozės formų pavadinimai „vaginitas“ ir „vaginozė“ siejami su klinikiniais požymiais. Esant vaginitui pasireiškia uždegimo simptomai, o klasikinės vaginozės atveju uždegimo požymių nėra (Donders, 2007). Klinikinėje praktikoje retai būna viena „gryna“ disbiozės forma. Dažnai disbiozę lydi kokia nors infekcija, dažnai perduodama lytiniu keliu, pvz. *C. trachomatis* arba kolonizacija/infekcija *Candida* rūšies mielėmis (Sobel et al., 2013). Tokiais atvejais būna nelengva diagnozuoti klinikinių požymių sukėlėją (-jus) ir paskirti atitinkamą gydymą (Sobel et al., 2013).

1.6. Bakterinė vaginozė ir jos diagnostika

BV apibūdinama sveikai mikrobiotai būdingų vyraujančių makštyje laktobacilų skaičiaus sumažėjimu ir polimikrobinės fakultatyvinių ir obligatinių anaerobinių bakterijų bendrijos pagausėjimu (Srinivasan & Fredricks, 2008; Ma et al., 2012; Zhu et al., 2022). Tokių anaerobinių bakterijų bendrijos nariai yra *Gardnerella*, *Fannyhessea vaginiae*, *Mobiluncus*, *Prevotella* spp., *Sneathia amnii*, *Megasphaera*, *Dialister*. Klasikiniu supratimu BV nėra uždegimas: stebimas tik interleukino 1 (IL-1 β) padidėjimas, rodantis įgimtojo (*angl.* innate) imuniteto aktyvumą, o interleukino 8 (IL-8) lygis paprastai būna nepakitęs (Schwebke & Weiss, 2002). Pagrindinis BV klinikinis simptomas yra gausios vandeningos nemalonaus žuvies kvapo makšties išskyros. Gali būti kai kurie uždegiminiai simptomai – gleivinės pakitimai, makšties išskyros, niežulys ir deginimo jausmas, tačiau be leukocitų eksudato, paraudimo ir patinimo (Donders, 2007).

BV yra viena dažniausiai diagnozuojamų vaisingo amžiaus moterų makšties mikrobiotos disbiozių, kurios paplitimas yra apie 26% bendroje

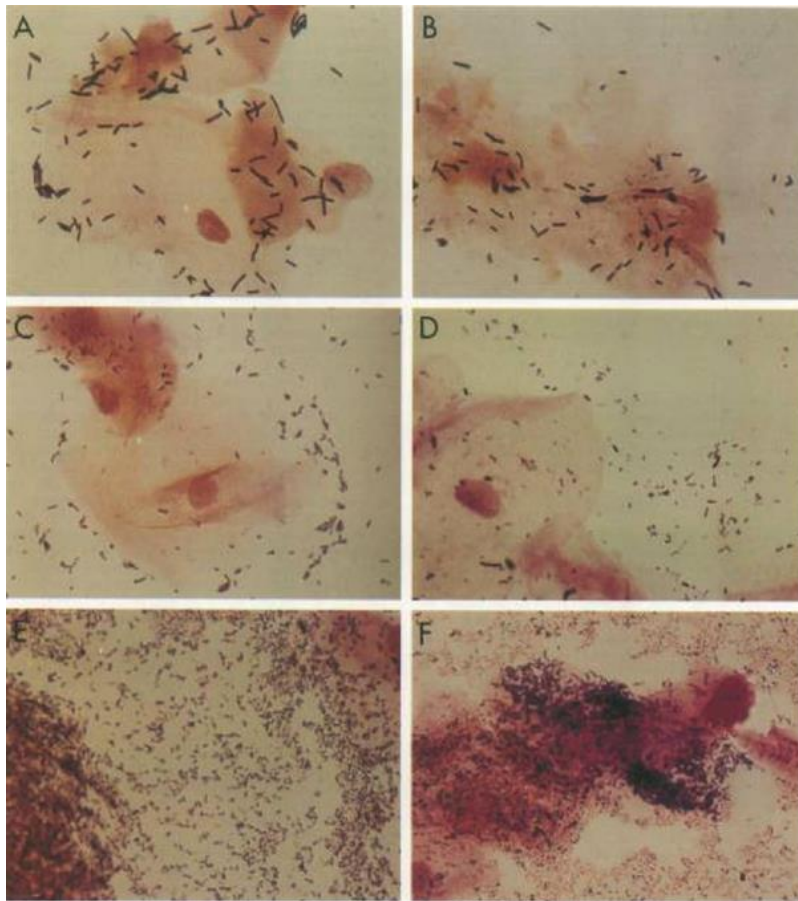
populiacijoje su tam tikrais regioniniais skirtumais (Peebles et al., 2019). BV epidemiologija Š. ir P. Amerikose skelbiama pagal moterų priklausomybę etninėms grupėms: Š. Amerijoje bendroje moterų populiacijoje BV paplitimas yra apie 27%, tarp juodaodžių moterų yra didesnis ir siekia apie 33%, tarp ispanų kilmės apie 31%, tarp baltosios rasės moterų 23% ir 11% tarp azijiečių moterų (Bradshaw et al., 2025). Europoje ir Centrinėje Azijoje BV paplitimas bendroje moterų populiacijoje yra apie 23% (Ravel et al., 2011; Peebles et al., 2019). Rytiniuose, pietiniuose, vakariniuose ir centrinuose Afrikos rajonuose BV paplitimas yra 25%, nors tarp rajonų su dideliu ŽIV infekcijos paplitimu, BV siekia apie 50% (Torrone et al., 2018).

BV diagnostika yra daugialypė ir komplikuota, remiasi JAV Ligų kontrolės ir prevencijos centru (Muzny et al., 2022) ir ES (Sherrard et al., 2023) lytiškai plintančių ligų diagnostikos, gydymo ir prevencijos rekomendacijomis. BV gali būti diagnozuojama pagal Amsel kriterijus (Amsel et al., 1983) arba mikroskopiškai įvertinus Gramo būdu dažytą makšties tepinėlį (Nugent et al., 1991).

Reikalingi trys iš keturių požymių, kad būtų nustatyta BV pagal Amsel kriterijus: 1) makšties išskyry pH>4,5; 2) homogeniškos vandeningos makšties išskyros; 3) žuvies kvapo makšties išskyros. Kvapas atsiranda arba sustiprėja, paveikus išskyras 10% KOH tirpalu; 4) indikatorinės ląstelės (*angl.* „clue cells“) – tai atitrūkusios/atplyšusios plokščiojo epitelio ląstelės, padengtos bakterijomis, matomos makšties išskyry tepinėlyje mikroskopu.

Makšties pH didėja dėl pieno rūgštį gaminančių bakterijų skaičiaus sumažėjimo. Kvapas, kuris įvardinamas kaip „žuvies“, atsiranda dėl anaerobų metabolizmo produktų (putrescino, dietilamino, kadaverino) pagausėjimo (Lee et al., 2025). Amsel klinikiniai kriterijai, nors plačiai taikomi, tačiau yra gana subjektyvūs.

Gramo būdu dažytų makšties išskyry tepinėlių vertinimas pagal Nugent yra laikomas BV diagnozės auksiniu standartu (Nugent et al., 1991). Jis remiasi pusiau kiekybiniu Gram-teigiamų lazdelių įvertinimu (nuo 0 iki 4+), mažų Gram-kintamų ir Gram-neigiamų lazdelių įvertinimu (nuo 0 iki 4+) ir lenktų, „*Mobiluncus*“ tipo lazdelių (nuo 0 iki 2+). Remiantis šia sistema, tepinėlių Nugent vertė arba balai (*angl.* Nugent score, NS) nuo 7 iki 10, rodo BV, nuo 4 iki 6 – tarpinė būseną, o nuo 0 iki 3 – normalią, sveiką būklę, kuriose vyrauja laktobacilos (1.3 pav.). Sunkiausiai kliniškai įvertinti būseną, žymimą NS 4–7. Tai jau ne sveika mikrobiota, kurioje vyrauja laktobacilos, bet ir ne tipiška BV (*angl.* full-blown BV). Būseną vadinama daline BV (*angl.* partial BV), nes mikroskopiškai matosi tipiškos BV zonos pakaitomis su normalios mikrobiotos zonomis (Donders, 2007).



1.3 pav. Makšties tepinėliai nudažyti Gram'o būdu. A (NS 0) ir B (NS 2) – sveika makšties mikrobiota. C (NS 4) ir D (NS 6) – dalinė BV. E (NS 8) ir F (NS 10) – BV, nuotraukų centre – indikatorinė ląstelė (*angl.* clue cell). Pagal Donders, 2007.

Paprastai iš dalinės BV pereinama į pilną/tipišką BV (NS 7–10) arba grįžtama į normalios mikrobiotos būseną (NS 0–3). BV nustatymas pagal Nugent yra gana sudėtingas: nors laktobacilos yra Gram-teigiamos, *L. iners* detekcija mikroskopiškai gali būti sudėtinga dėl jos plonesnės ląstelės sienelės (Kim et al., 2020), todėl gali būti klaidingai diagnozuota BV. Nežiūrint trūkumų, mikroskopinis vertinimas vis dar išlieka „auksiniu standartu“ BV diagnostikoje.

Yra sukurti kokybiniai ir kiekybiniai DNR nustatymu paremti metodai, skirti aptikti įvairias su BV siejamas bakterijas (Muzny et al., 2023; Amerson-Brown, 2025), kurių panaudojimas klinikinėje praktikoje kol kas ribotas.

1.7. Bakterinės vaginozės komplikacijos

Šalia nemalonių klinikinių BV požymių, kurie veikia moterų emocinį ir seksualinį gyvenimą (Bilardi et al., 2013), disbiozės taip pat siejamos su ilgalaikėmis sveikatos problemomis. Viena pagrindinių BV komplikacijų yra didesnė rizika įgyti lytiniu keliu plintančias tiek virusines, tiek bakterines infekcijas (Borgdorff et al., 2014; Bautista et al., 2017; Gilbert et al., 2025). Žmogaus papilomos viruso (ŽPV) didelės rizikos genotipo sukeliama gimdos kaklelio vėžio galimybė taip pat siejama su disbioze. Manoma, jog sumažėjus laktobacilų, ŽPV iš lyties takų efektyviai nepasišalina (*angl.* clearance), todėl virusas persistuoja ilgus metus (Di Paola et al., 2017). BV, dėl sutrikusios makšties ir gimdos kaklelio gleivinių barjerinės funkcijos, siejama su padidinta rizika užsikrėsti ir kitais lytiškai plintančiais mikroorganizmais, tokiais kaip *Herpes simplex 2* tipo, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis* ir *C. trachomatis* (Bautista et al., 2017).

BV taip pat siejama su šlapimo takų infekcijomis (Stapleton, 2016), endometritu (Lozano et al., 2021) ir dubens uždegimine liga (DUL). DUL – tai gimdos, kiaušintakių ir aplinkui esančių audinių infekcinis uždegimas. Mikroorganizmai, sukėlę uždegimą, dažniausiai patenka iš makšties ir gimdos kaklelio į endometriumą ir išplinta toliau. Anksčiau buvo manyta, kad pagrindiniai DUL sukėlėjai yra lytiniu keliu plintantys *C. trachomatis* ir *N. gonorrhoeae*. Tačiau gerėjant laboratorinei diagnostikai aiškėja, kad su BV ir AV susijusios bakterijos sukelia iki 70% DUL atvejų (van de Wijgert & Jaspers, 2017; Ravel et al., 2021).

Pakitusi lyties takų mikrobiota siejama su nėštumo metu kylančiomis komplikacijomis: priešlaikiniu gimdymu (PTB), savaiminiais abortais ir naujagimio infekcijomis. Priešlaikiniai gimdymai (iki 37 nėštumo savaitės) sudaro 7-15% gimdymų pasaulyje ir sukelia apie 80% naujagimių mirčių (MacDorman et al., 2014). Įvairios infekcijos, įskaitant ir amniotinio skysčio, gali sukelti priešlaikinį gimdymą. Yra nemažai tyrimų, įrodančių makšties mikrobiotos disbiozės, tiek ir atskirų VMC bakterijų sąryšį su PTB (Avershina et al., 2017; Elovitz et al., 2019; Ferrante et al., 2025), tačiau duomenys apie nėštumo komplikacijas ir VMC sąryšį yra gana kontraversiški, nes PTB yra itin kompleksinė problema, veikiama daugybės veiksnių, įskaitant kultūrinius ir socialinius, be to, iki šiol ne visai yra žinomas bakterijų poveikio mechanizmas (DiGiulio et al., 2015).

1.8. Bakterinės vaginozės gydymas

Kaip ir pati BV diagnostika, taip ir BV gydymas dažnai sukelia sunkumų. Standartinis rekomenduojamas gydymas peroraliniais antibiotikais, veikiančiais anaerobines bakterijas (metronidazolis, 400 mg x 2, 7 dienas), dažnai sukelia tik laikiną simptomų palengvėjimą. Tyrimai parodė, kad praėjus mėnesiui po gydymo BV būklė pasikartoja net 71–89% atvejų (Bradshaw et al., 2006). Intravaginalinė trumpalaikė metronidazolio arba klindamicino terapija turi panašų efektyvumą (Verwijs et al., 2020). Todėl pasikartojantiems BV epizodams gydyti gali būti rekomenduojamas ilgalaikis minėtų antibiotikų gelių naudojimas. Toks gydymo būdas nėra patrauklus pacientėms, todėl bandoma sukurti alternatyvias terapijas, kurios būtų efektyvios ir neturėtų antibiotikams būdingo šalutinio poveikio. Viena jų galėtų būti laktobacilų kaip vaginalinių probiotikų naudojimas, siekiant atkurti makšties mikrobiotą po antibiotikų gydymo bei kaip profilaktika nuo pasikartojančios BV (Bradshaw & Brotman, 2015; Recine et al., 2016). Tačiau JAV Federalinė maisto ir vaistų administracija (*angl.* The Food and Drug Administration, FDA), įskaitant ir Europos maisto saugos agentūrą (EFSA, *angl.* European Food Safety Authority) laikosi nuomonės, jog maistas ir įvairūs priedai negali būti naudojami makšties ligoms gydyti, nes tokiam gydymui nėra pakankamai mokslinio pagrindo. Tikrai Kanadoje, kai kurie intravaginaliniai probiotikai yra patvirtinti naudojimui (www.probioticchart.ca). Daugelis tyrėjų ir gydytojų kritikuoja tokį atsakingų institucijų požiūrį į vaginalinius probiotikus (Reid, 2018).

Remiantis BV diagnostika tik pagal Nugent kriterijus, BV atitiktų VMC tipą, kurį Ravel et al. (2011) pavadino CST IV, t.y. kai makšties mikrobiotoje dominuoja ne laktobacilos, o įvairios anaerobinės bakterijos ir makšties pH>4.5. Makšties mikrobiotos CST IV tipą turi nemaža vaisingo amžiaus moterų populiacijos dalis, o tarp afrikiečių moterų ir afroamerikiečių ši dalis dar didesnė (Zhou et al., 2007; Fettweiss et al., 2014). Pagal paradigmą, jog sveika vaisingo amžiaus moterų makšties mikrobiota yra kolonizuota laktobacilomis, reikėtų, jog šios moterys serga BV. Tačiau ar visos šios moterys turi klinikinius BV simptomus, įskaitant gausias žuvies kvapo išskyras, kuris verčia moteris kreiptis į gydytojus? Pasirodė, kad didelė dalis moterų, kurių makšties mikrobiota yra CST IV tipo, yra besimptomės: BV yra diagnozuota, remiantis tik Nugent kriterijais, bet nėra klinikinių makšties simptomų (France et al., 2022).

Taigi, mikrobiologiniu požiūriu, ryšys tarp BV ir CST IV yra aiškus – abi būsenos apibūdinamos laktobacilų trūkumu ir didesniu makšties pH. Tačiau moterys su CST IV makšties mikrobiotos tipu ne visada turi klinikinius

simptomus, todėl būseną apibrėžiama kaip besimptomę BV arba Nugent-BV. Nugent-BV reiškia, kad BV buvo nustatyta iš Gramo būdu dažyto makšties tepinėlio, iš kurio nustatoma Nugent vertė, bet nėra klinikinių požymių (pagal Amsel kriterijus), arba Amsel kriterijai nebuvo taikyti būklės įvertinimui (Ma et al., 2012). Kitaip tariant, CST IV kai kurioms moterims yra normali makšties mikrobiota, kurios sudėtį pakeisti yra sudėtinga (Woodman, 2016). Turbūt tai būtų vienas paaiškinimų, kodėl BV gydymas antibiotikais dažnai yra neefektyvus arba gydymo rezultatas yra trumpalaikis (Ma et al., 2012).

Klausimas ar gydyti besimptomę BV tebėra kontraversiškas, nors daugelis tyrimų sieja besimptomę BV su ginekologinėmis ir reprodukcinėmis sveikatos problemomis (Muzny & Schwebke, 2020). Reikalingos tolesnės BV patogenezės studijos, kurios tiesiogiai paveiks diagnostikos, gydymo ir prevencijos metodus.

1.9. Bakterija *Gardnerella*

BV dėl jos svarbos moterų ir visuomenės sveikatai tyrinėjama daugiau nei 60 metų, tačiau jos patogenezė išlieka neaiški. BV, kaip susirgimo forma, dažnai vadinama infekcija, tačiau BV yra vienas aiškiausių ryšio tarp mikrobiotos pokyčio ir ligos pavyzdžių.

BV patogenezės tyrimuose buvo sutelktas dėmesys į anaerobines bakterijas aptinkamas BV mikrobiotoje. Apskritai, apie žmogaus makšties mikrobiotos bakterijas nedaug žinoma. Nors naujos kartos sekoskaitos metodai išsibūlėjo ir atpigo, atsirado metagenomika, kurios pagalba galima tyrinėti mikroorganizmų bendrijas tiesiai iš ėminio, tačiau nepakeičiama medžiaga tyrimams išlieka mikroorganizmų kamienai, išskirti iš žmogaus ėminio. Makšties bakterijos, o ypač BV mikrobiotos, buvo mažai tyrinėtos dėl sudėtingo kultivavimo arba bakterijos yra nekultivuojamos (Srinivasan et al., 2016). BV tyrimams nėra tinkamo gyvūnų modelio, nes, kaip minėta, moteriškos lyties primatų makšties mikrobiota skiriasi nuo žmogaus – jose nevyrauja laktobacilos.

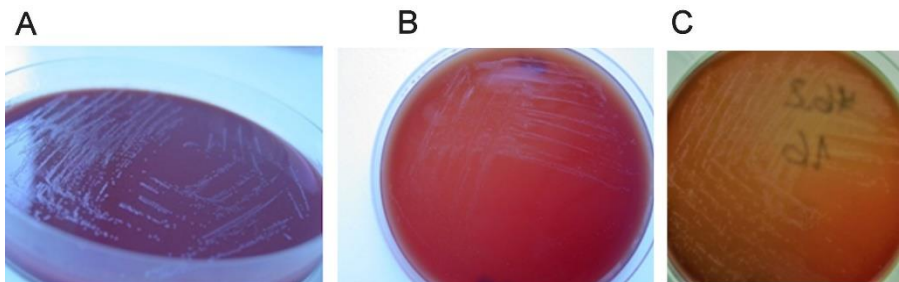
Bakterija, į kurią atkreiptas dėmesys tiriant BV mikrobiotą, yra *Gardnerella*, gausiai aptinkama 95-100% BV atvejų. Be to, bakterija pasižymi virulentiniu potencialu, kuris ją išskiria iš kitų BV mikrobiotos bakterijų: sekretuoja toksiną vaginoliziną, kuris eukariotines ląsteles veikia citotoksiškai (Gelber et al., 2008; Zilnyte et al., 2015), sekretuoja sialidazes, kurių aktyvumas, manoma, yra susijęs su BV komplikacijomis, nes šie fermentai degraduoja makšties gleives (Lewis et al., 2013; Robinson et al., 2019). *Gardnerella* prisikabina (*angl. adhere*) prie makšties epitelio ir formuoja

bioplėveles, kurios aptinkamos makšties ėminiuose tik esant BV (Swidsinski et al., 2005; Patterson et al., 2007).

Gardnerella bakterija pirmą kartą aprašyta 1953 m. Leopold: tai mažos pleomorfinės Gram-neigiamos lazdelės formos bakterijos, išskirtos iš prostatitu sergančių vyrų ir cervicitu sergančių moterų. Buvo manoma, kad tai galėtų būti *Haemophilus* genties bakterijos (Leopold, 1953). Praėjus dvejiems metams, Gardner ir Dukes, tyrinėdami lytiškai plintančias ligas, kurių itin pagausėjo po II Pasaulinio karo, pasėlio būdu ant kraujo turinčio agaro išaugino vienos rūšies bakteriją, kurią pavadino *Haemophilus vaginalis*. Buvo manoma, jog ši bakterija yra „nespecifinio vaginito“ sukėlėjas (Gardner & Dukes, 1955). Vėliau buvo nustatyti akivaizdūs neatitikimai pasiūlytai taksonomijai: bakterija buvo išskirta kaip atskiros genties atstovė ir pavadinta *Gardnerella* (pagal H. L. Gardner), vėliau pervadinta į *G. vaginalis* (Greenwood ir Pickett, 1980). Iki 2019 m. vienintelė *Gardnerella* genčiai priklausanti rūšis buvo *G. vaginalis*:

Karalystė:	<i>Bacteria</i>
Tipas:	<i>Actinobacteria</i>
Klasė:	<i>Actinobacteria</i>
Eilė:	<i>Bifidobacteriales</i>
Šeima:	<i>Bifidobacteriaceae</i>
Gentis:	<i>Gardnerella</i>
Rūšis:	<i>G. vaginalis</i>

Gardnerella ląstelės yra mažos (0,4 µm iki 1,5 µm), nejudrios, be žiuželių, endosporų ir tipinės kapsulės lazdelės. Nors *G. vaginalis* buvo aprašyta kaip Gram-neigiama arba Gram-kintama, vėliau mikroskopiniais ir cheminiais metodais parodyta, jog ji yra Gram-teigiama bakterija (Sadhu et al., 1989). Optimaliausios šios bakterijos augimo sąlygos yra 35-37°C, esant 5-10% CO₂ (Catlin, 1992). Tarp *Gardnerella* kamienų buvo nustatytų obligatinių anaerobų, bet jie nėra dažni. Augimui reikalingas kraujas (arklio, avies) arba arklio serumas. Kolonijos po 48 val. auginimo yra mažos, smeigtuko galvutės formos, apvalios, išgaubtos, nepermatomos, 0,1–0,5 mm skersmens. Ant šokolado agaro (agaro su lizuotu krauju) būna pilkos spalvos, iki 1 mm skersmens. *Gardnerella* kolonijoms yra būdinga β-hemolizė (pilna hemolizė) ant kietos mitybinės terpės su žmogaus ir triušio krauju, bet ne su avies krauju (1.4 pav.).



1.4 pav. *Gardnerella* kolonijos po 48 val inkubacijos 37°C ir 5% CO₂ ant (A) šokolado agaro, (B) agaro su avies krauju hemolizės nėra, (C) agaro su žmogaus krauju yra pilna β-hemolizė. M. Janulaitienės nuotraukos.

Kultivuojant ant įvairių auginimo terpių, ypač BHI (*angl.* brain heart infusion) su arklio serumu, kai kurie *Gardnerella* kamienai formuoja dviejų dydžių (mažas ir dideles) skirtingo skaidrumo kolonijas. Buvo parodyta, jog skirtingo dydžio kolonijose skiriasi augimu ir gyvybingumu, taip pat skiriasi kai kurių genų raiška dėl fazių pokyčio (*angl.* phase variation). Ši *Gardnerella* savybė gali vaidinti skirtingą vaidmenį BV patogenezėje (Garcia et al., 2024).

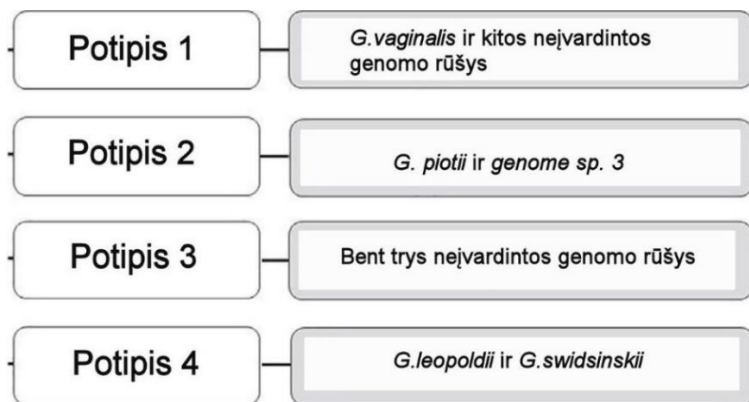
1.10. *Gardnerella* genties nevienalytiškumas

Fenotipiniai skirtumai tarp *Gardnerella* izoliatų buvo pastebėti Piot et al. (1984). Izoliatai iš makšties išskyrų buvo išskirstyti į 8 biotipus pagal β-galaktozidazės, lipazės ir hipurato hidrolizės reakcijas. Kiti autoriai modifikavo pasiūlytą schemą, pridėdami ir angliavandenių fermentavimo testus (arabinozė, galaktozė ir ksilozė), ir išanalizavę 197 *Gardnerella* kamienus, išskyrė 17 biotipų (Benito et al., 1986). Kai kurie biotipai buvo aptinkami dažniau tarp BV sergančiųjų (Aroutcheva et al., 2001).

Buvo pradėta ieškoti genetinių, o ne tik fenotipinių kamienų skirtumų: ARDRA metodas (*angl.* amplified ribosomal DNA restriction analysis), paremtas 16s rRNR amplifikavimu ir gauto produkto suskaldymu restrikcijos endonukleaze, leido išskirti 3-4 *Gardnerella* genotipus (Ingianni et al., 1997; Pleckaityte et al., 2012), bet buvo nepakankamas bakterijos įvairovės reprezentacijai. Panaudojus *Gardnerella* izoliatų WGS rezultatus, Ahmed et al. (2012) diferencijavo *Gardnerella* į keturis izoliuotus nerekombinuojančius potipius (*angl.* clades), o Balashov et al. (2014) sukūrė PGR schemas šių potipių identifikacijai. Panaudojant *cpn60* geno sekos analizę, Schellenberg et al. (2016) patvirtino bakterijos suskirstymą į keturis potipius (*angl.* clades arba subtypes), aprašytą Ahmed et al. (2012). Pirmieji palyginamieji genetiniai ir fenotipiniai tyrimai parodė, kad *Gardnerella* kamienai pasižymi skirtingu virulentiškumu, be to, ši bakterija aptinkama ir sveikų moterų

makšties mikrobiotoje (Harwitch et al., 2010; Santiago et al., 2011b; Pleckaityte et al., 2012), todėl jų vaidmuo ligos ar sveikatos atvejais gali būti skirtingas. Vyrauja hipotezė, jog yra komensaliniai ir patogeniniai *Gardnerella* potipiai (Schellenberg et al., 2017; Cerca et al., 2020).

Remiantis 81 *Gardnerella* kamienų WGS analize, panaudojant skaitmeninius DNR-DNR hibridizacijos ir vidutinio nukleotidų identiškumo (*angl.* average nucleotide identity) metodus, Vaneechoutte et al. (2019) išskyrė *Gardnerella* gentyje bent 13 skirtingų taksonų. Buvo pasiūlyta įnešti pataisas *Gardnerella* taksonomijoje, atskiriant keturias rūšis, kurios pavadintos *G. vaginalis*, *G. piovii*, *G. leopoldii*, *G. swidsinskii*. Kitos rūšys, kurioms nesuteiktas pavadinimas, įvardinamos kaip genomo rūšys (*angl.* genome species, genome sp.), pridodant numerį, pvz. genome sp. 7 (Vaneechoutte et al., 2019). Potipių ir naujų taksonominių vienetų, rūšių ir genomo rūšių, santykis pavaizduotas 1.5 pav.



1.5 pav. *Gardnerella* klasifikacija į potipius ir rūšis. Pagal Castro et al., 2020.

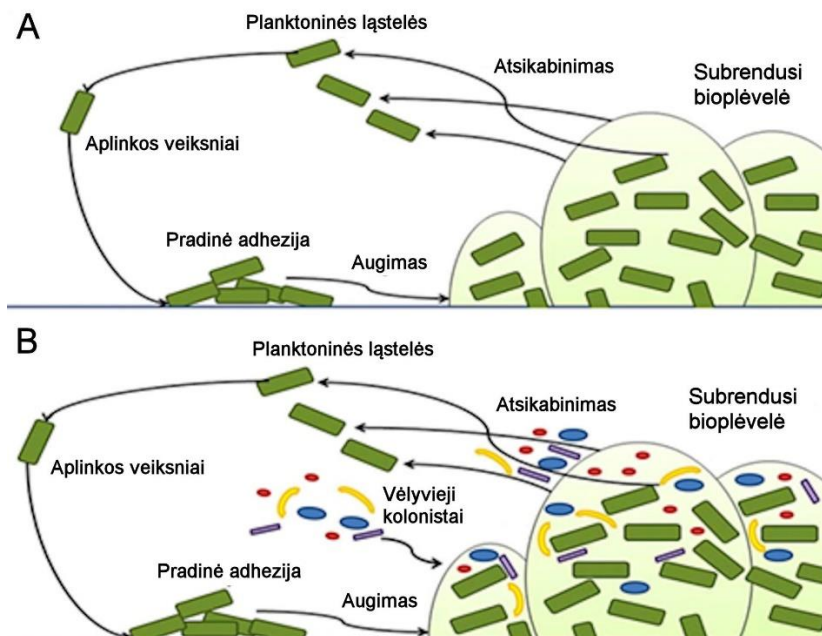
Sousa et al. (2023) išskyrė dar dvi rūšis, kurias pavadino *G. pickettii* (buvusi genome sp. 3) ir *G. greenwoodii* (buvusi genome sp. 8). Kiti tyrėjai mano, jog dabartinė taksonomija yra ne visai tinkama ir siūlo įvesti papildomas rūšis ir porūšius (Bouzek et al., 2025). Bet ne visi pripažįsta naujas rūšis ir nurodo tik gentį *Gardnerella* ar *Gardnerella* spp.

1.11. Pagrindiniai *Gardnerella* virulentiniai veiksniai

1.11.1. Bioplėvelės

Bioplėvelės yra mikroorganizmų bendrijos, prisikabinusios prie paviršiaus ir apjungtos polimeriniu matriksu, sudarytu iš polisacharidų, baltymų ir nukleino rūgščių. Bioplėvelėje esančios bakterijos yra šeimininko

imuninės sistemos neefektyviai pašalinamos arba antibiotikų poveikis būna ribotas, todėl su bioplėvelės susiformavimu siejamos infekcijos yra persistuojančios arba turi tendenciją atsinaujinti. Bioplėvelės gyvavimo ciklas susideda iš kelių stadijų: prisikabinimas (*angl.* attachment) prie substrato, ekstraląstelinį polimerinių medžiagų gamyba, subrendusios bioplėvelės struktūros susiformavimas, agregatų pasiskirstymas (*angl.* dispersal), atsikabinusių nuo bioplėvelės arba atskirų ląstelių pasiskirstymas (1.6 pav.). Atsikabinusios ląstelės ar jų grupės gali vėl pradėti naują bioplėvelės ciklą kitoje vietoje (O'Toole et al., 2000; Machado & Cerca, 2015).



1.6 pav. Bioplėvelės ciklas. (A) Bioplėvelė, sudaryta iš vienos rūšies bakterijų. (B) Polimikrobinėse bioplėvelėse (BV atvejis), antrinės bakterijos inkorporuojasi į bioplėvelę po to, kai pagrindinės kolonizuojančios rūšys jau prisikabino prie paviršiaus. Susiformuoja tarprūšinė sinergija, kuri leidžia bioplėvelei vežėti. Pagal Machado & Cerca, 2015.

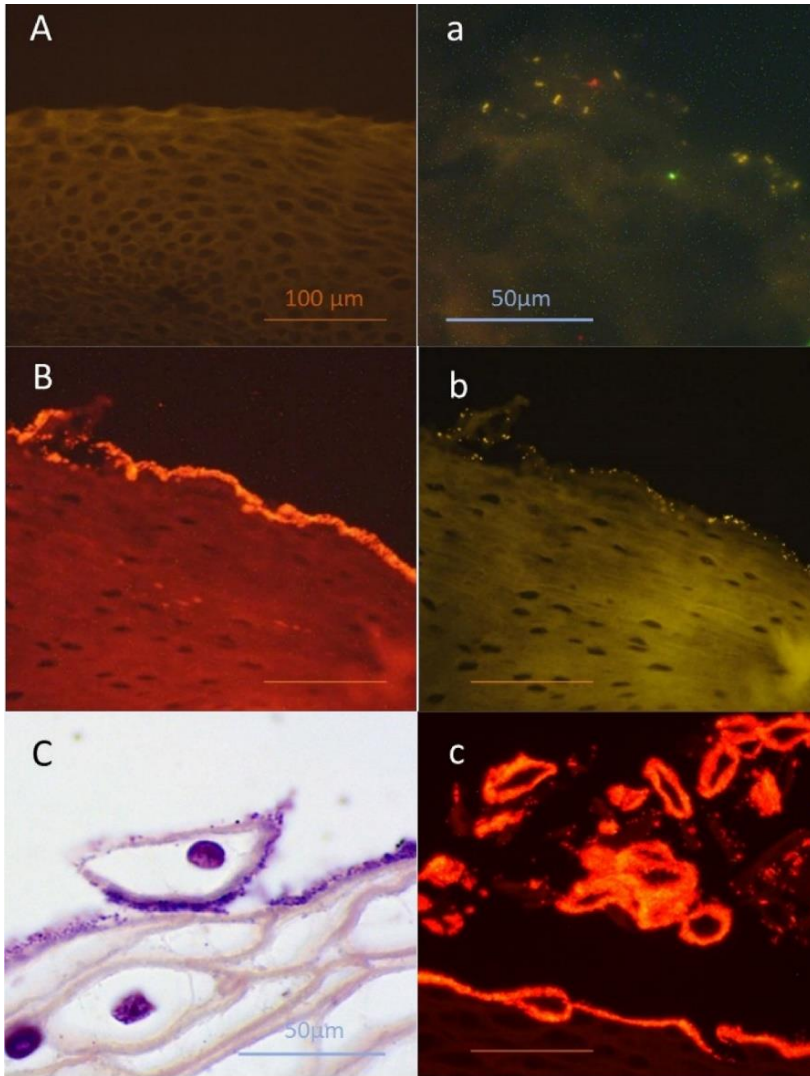
Yra žinoma, jog bioplėvelėse bakterijų bendrijos yra mažiau aktyvios, t.y. daugelio genų raiška yra sumažėjusi (*angl.* downregulated). Bakterija *Streptococcus pneumoniae* bioplėvelėse yra nevirulentiška ir dažnai kolonizuoja žmogaus nosies ertmę būtent bioplėvelių pavidalu (Gilley & Orihuela, 2014). Ši bakterija bioplėvelėse sukelia mažesnę šeimininko citokinų raišką, o pneumokokų invazija vyksta planktoninėje formoje, o ne bioplėvelių pavidalu (Blanchette-Cain et al., 2013). Tačiau *Gardnerella* atveju yra kitaip: lyties takų biopsijose ir šlapimo nuosėdose bioplėvelių aptikta tik

sergant BV, o sveikų moterų makštyje bioplėvelių nėra (1.7 pav.). Vienas iš Amsel kriterijų, diagnozuojant BV, vadinamosios „clue cells“, yra ne kas kita, kaip atplyšusios/atšilupusios makšties plokščiojo epitelio ląstelės, kurių paviršius gausiai padengtas bakterijomis (Swidsinki et al., 2005). Daugelis bakterijų sudaro daugiarūšes bioplėveles, komunikuodamos su kitomis bakterijomis, sunaudodamos jų metabolitus arba sudarydamos deguonies gradientą, kuris leidžia anaerobinėms bakterijoms išgyventi bioplėvelėse. Ne išimtis yra ir *Gardnerella*, kuri sudaro polimikrobinės bioplėveles su *F. vaginae* ir kitomis makšties bakterijomis.

Panaudojant FISH metodus, buvo parodyta, jog BV sergančių moterų makštyje pagrindinę bioplėvelės masę (apie 60%) arba matriksą sudaro būtent *Gardnerella* (1.7 pav.). Bakterijos bioplėvelėse yra labai tankiai supakuotos, nepaliekant erdvės tarp atskirų mikroorganizmų, ir yra prikibusios prie makšties epitelio. Biopsijos ėminiuose iš lyties takų bioplėvelės išimtinai yra polimikrobinės ir yra panašios struktūros visame ėminyje. Atskiros bakterijų grupės, sudarančios bioplėveles, neauga izoliuotomis salelėmis, bet yra organizuotos. Swidsinski et al. (2014) siūlo vadinti BV bioplėveles struktūrizuotomis polimikrobinėmis bioplėvelėmis (*angl.* structured polymicrobial, StPM) dėl homogeniškai atrodančios struktūros. Bioplėvelėse matriksas, sudarytas iš *Gardnerella*, viduje inkorporuotos gausios bakterijų grupės, kurios gali kai kada pasiekti dideles koncentracijas. Bioplėvelėse aptinkama bakterijų, kurios nerandamos sveikų moterų makštyje (Swidsinski et al., 2014). Taigi, *Gardnerella* formuojamos bioplėvelės yra puiki niša įvairiems kitiems patogenams, kurie vieni negalėtų prisijungti prie epitelio ir išgyventi nepalankioje makšties aplinkoje. Tai padaro organizmą jautresniu ir įvairioms antrinėms infekcijoms (Schwebke ir kt., 2014a).

Gardnerella aptinkama ir sveikų moterų makštyje, bet jos neformuoja bioplėvelės, o yra dispersinėje formoje (1.7 pav. A) ir nesitransformuoja į bioplėveles (Swidsinski et al., 2014). Ne visi *Gardnerella* kamienai geba formuoti bioplėveles (Castro et al., 2016), todėl manoma, kad komensaliniai *Gardnerella* kamienai neformuoja bioplėvelių ir egzistuoja tik planktoniniu pavidalu. *Gardnerella* transkriptominė analizė parodė, jog daugelio genų raiška bioplėvelėse yra pakitusi: nustatytas mažesnis metabolinis aktyvumas, bet genų, suteikiančių atsparumą antibiotikams, raiška yra padidėjusi (Castro et al., 2017). Autoriai mano, jog transkriptomos profilio pokyčiai yra svarbūs biofilmo gajumui ir tuo pačiu bakterijos virulentiškumui.

Gardnerella adhezija prie makšties epitelio ląstelių yra pradinė bakterinės invazijos stadija. Po pradinės adhezijos bakterija dalinasi ir gali formuoti bioplėvelės mikroorganizmų bendriją. Tai kritinis etapas, lemiantis



1.7 pav. Makšties biopsijų mikrofotografijos (Swidsinski et al., 2024). Mėginiai hibridizuoti su FISH zondais: *Gardnerella* (tamsiai raudona fluorescencija) ir *Lactobacillus* (geltona fluorescencija). x400 (A) ir x1000 (a) padidinimas: biopsija iš sveikos moters. Bakterijų prikibusių prie paviršiaus nėra. Srityje, kuri padengta išskyromis (a), bakterijos aptinkamos išskirtinai gleivėse ir nekontaktuoja su paviršiumi. Laktobacilos vyrauja, yra pavienių *Gardnerella* ląstelių. (B, b), x400 padidinimas: biopsija iš BV sergančios moters makšties. (B): *Gardnerella* bioplėvelė prikibusi prie mėginio paviršiaus; bioplėvelėje gausu laktobacilų, prikibusių prie makšties epitelio. (C, c), atplyšusios epitelio ląstelės yra padegtos bioplėvele, išskyrose formuojasi „clue cells (c). (C) Bioplėvelė gerai matoma, nudažius pagal Gramą (x1000).

tolimesnį *Gardnerella* išgyvenimą ir atsparumą nepalankiam aplinkos poveikiui makštyje (Machado & Cerca, 2015). *Gardnerella* gebėjimas formuoti bioplėveles, kolonizuoti makštį, išstumiant laktobacilas (Alves et al., 2014) reiškia didelį bakterijos adhezinį potencialą, kuris realizuojamas, dalyvaujant determinantėms, vadinamiesiems adheziniams. Vienas tokių adhezinų, manoma, yra baltymas Grd Cna, esantis ląstelių paviršiuje (Marín et al., 2018), ir kuris rišasi su žmogaus fibrinogenu, aptinkamu ant daugelio ląstelių, įskaitant makšties, paviršiuje (Bulavaitė et al., 2025).

Įdomu tai, jog *Gardnerella* polimikrobinės bioplėvelės yra ne tik biopsijose, įskaitant gimdos ir kiaušintakių iš savaiminį abortą patyrusių moterų, iš lyties takų, bet taip pat moterų ir vyrų šlapime (Swidsinski et al., 2014). Manoma, kad atplyšusios indikatorinės ląstelės, ant kurių yra organizuota polimikrobinė struktūra, yra tinkamiausias kandidatas bakterijos pernešimui. Užsikrėsti galima lytinio akto metu ar net per intrauterinei inseminacijai naudojamą donorinę spermą (Swidsinski et al., 2010; Swidsinski et al., 2014). Nustatyta, kad tokia struktūra gali plisti į distalinę šlaplės dalį, kilti į gimdą ar net į kiaušintakius. Kitaip tariant, *Gardnerella* bioplėvelės gali būti perduodama lytiniu keliu kaip bet kuri kita LPL. Tačiau autoriai pabrėžia, jog taip perduodama bioplėvelė turi išlaikyti savo integralumą ir tokiu būdu perduodama ne pavienė bakterija, o polimikrobinė bioplėvelė.

1.11.2. Sialidazės

Sialidazės arba neuramidazės yra fermentai, kurie nuskelia sialo rūgšties liekanas nuo glikolipidų, glikoproteinų ir kitų junginių. Šie fermentai yra gaminami daugelio patogeninių bakterijų ir laikomi virulentiniais veiksniais (Wiggins et al., 2001). Nepatogeninėse bakterijose sialidazės atlieka maisto tiekimo funkciją. Nors sialidazių vaidmuo infekcijų patogenezėje nėra pilnai išaiškintas, manoma, jog šie fermentai ardo sialintus baltymus mucinus, kurie yra gleivių komponentai, tuo būdu atidengiamos epitelio ląstelės ir jų receptoriai kitų mikroorganizmų adhezijai ir bioplėvelių formavimuisi (Schellenberg et al., 2016; Chen et al., 2024). Sergant BV makšties išskyrose aptinkamas itin didelis sialidazės aktyvumas (Cauci & Culhane, 2011), kuris siejamas su bioplėvelės formavimuisi makštyje (Hardy et al., 2017). Be to, BV specifinės skystos konsistencijos makšties išskyros siejamos su gleivių degradacija sialidazių poveikyje (Olmsted et al., 2003).

Vienas didžiausių sialidazės šaltinių BV mikrobiotoje yra *Gardnerella* (Robinson et al., 2019) ir *Prevotella* (Pelayo et al., 2024) bakterijos. *Gardnerella* aptiktos trys sialidazės: NanH1, dar vadinama sialidaze A

(Santiago et al., 2011b), NanH2 ir NanH3 (Robinson et al., 2019). Manoma, jog NanH2 ir NanH3 yra pagrindiniai fermentai, suteikiantys sialidazinį aktyvumą *Gardnerella* kultūroms, ir jos efektyviai nuskelia acetilintus sialo rūgšties substratus *in vitro*. Anot Robinsosn et al. (2019), NanH1 aktyvumas ant įvairių sialo rūgšties substratų yra nedidelis. Paprastai bakterijose sialidazės yra sekretuojamos arba būna susijusios su bakterijos ląstelių paviršiumi. NanH2 ir NanH3 tikriausiai yra sekretuojamos, o NanH1 neturi signalinės sekos ir greičiausiai yra viduląstelinis fermentas, nors šios sialidazės vaidmuo dar nėra iki šiol aiškus (Chen et al., 2024). Kokios sialidazės aptinkamos *Gardnerella* kamienuose ir koks jų ryšys su sialidaziniu aktyvumu, tyrinėjama šiame disertaciniame darbe.

1.11.3. Toksinas vaginolizinas

Didžioji dauguma *Gardnerella* kamienų sekretuoja toksiną, kuris priskiriamas nuo cholesterolio priklausomų citolizinių (*angl.* cholesterol-dependent cytolytins, CDC) klasei (Rottini et al., 1990; Gelber et al., 2008). CDC toksinus sekretuoja daugelis Gram-teigiamų patogeninių bakterijų, tokių kaip *Streptococcus pneumoniae*, *Lysteria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Clostridium perfringens*, tačiau juos sintetina ir kai kurios Gram-neigiamos nepatogeninės bakterijos, pvz. *Lactobacillus iners*, taip pat dirvožemio bakterijos, kurios nekolonizuoja nei žmonių, nei gyvūnų (Christie et al., 2018). CDC yra citotoksiški eukariotinėms ląstelėms, įskaitant eritrocitus, todėl dar vadinami citolizinais.

CDC laikomi virulentiniais veiksniais, nes dalyvauja įvairiose ligų vystymosi stadijose (Los et al., 2013). CDC aktyvumui yra būtinas cholesterolis, kuris yra eukariotinių ląstelių membranose (Christie et al., 2018). Šie toksinai ląstelių membranose padaro poras ir ląstelės suardomos. CDC padeda bakterijoms, sukeliančioms invazines infekcijas, kolonizuoti šeimininką, būtent suardydami ląsteles ir pažeisdami barjerus, pvz.: epitelines ląsteles ar neuronus. CDC vaidmuo įvairiose infekcijų patogenezės stadijose labai priklauso nuo toksino kiekio: nėra visai aišku, kokį vaidmenį vaidina sublitiniai toksinų kiekiai ir koks yra ląstelės atsakas į membranos integralumo suardymą (Los et al., 2013), nes įvertinti šiuos poveikius *in vitro* tyrimuose gana sudėtinga.

Gardnerella sekretuojamas CDC toksinas vadinamas vaginolizinu (VLY); koduojamas *vly* geno, kurio viena kopija aptinkama daugumoje *Gardnerella* kamienų (Pleckaityte et al., 2012; Bohr et al., 2020). VLY aktyvumui reikalingas ne tik cholesterolis, bet ir žmogaus komplemento baltymas CD59 (Gelber et al., 2008; Zilnyte et al., 2015). VLY sukelia ląstelių

lizė yra matoma, kai *Gardnerella* kultivuojama ant agarizuotos terpės su žmogaus krauju: β -hemolizė aplink kolonijas reiškia, kad žmogaus eritrocitai terpėse sulizuoti (1.4 pav. C). Koks VLY vaidmuo BV patogenezėje nėra visai aišku. VLY kiekis vienintelį kartą buvo nustatytas ELISA sergančių BV ir sveikų moterų makšties ėminiuose (Nowak et al., 2018). Vidutinė VLY koncentracija (1 ng/ml), kai mikrobiotoje dominavo *L. crispatus*, buvo apie 3-kartus mažesnė nei disbiozės atvejais. VLY aktyvumas priklauso nuo pH: kai vyrauja laktobacilos, makšties pH yra rūgštus ir toksinas yra beveik neaktyvus, o esant BV, kai pH >4.5, VLY aktyvumas išauga (Ragaliauskas et al., 2019).

Sublitiniai VLY kiekiai sąveikoje su CD59 turinčiomis makšties ir gimdos kaklelio epitelinėmis ląstelėmis indukuoja ląstelių pūslėjimą (*angl.* blebbing) (Randis et al., 2013). Nors pūslėjimas yra gerai žinomas apoptozės požymis, CDC poveikyje pūslėjimas yra ląstelės apsauginio mechanizmo dalis: pažeistos ląstelių membranos atskiriamos, pašalinamos pažeistos membranos, indukuojami membranų integralumą atstatantys nuo Ca^{2+} jonų priklausomi mechanizmai (Babiychuk et al., 2011). Toks ląstelių atsakas gali būti siejamas su epitelinių ląstelių eksfoliacija, pasireišianti BV indikatorinių ląstelių, vadinamųjų „clue cells“ atsiradimu (Randis et al., 2013).

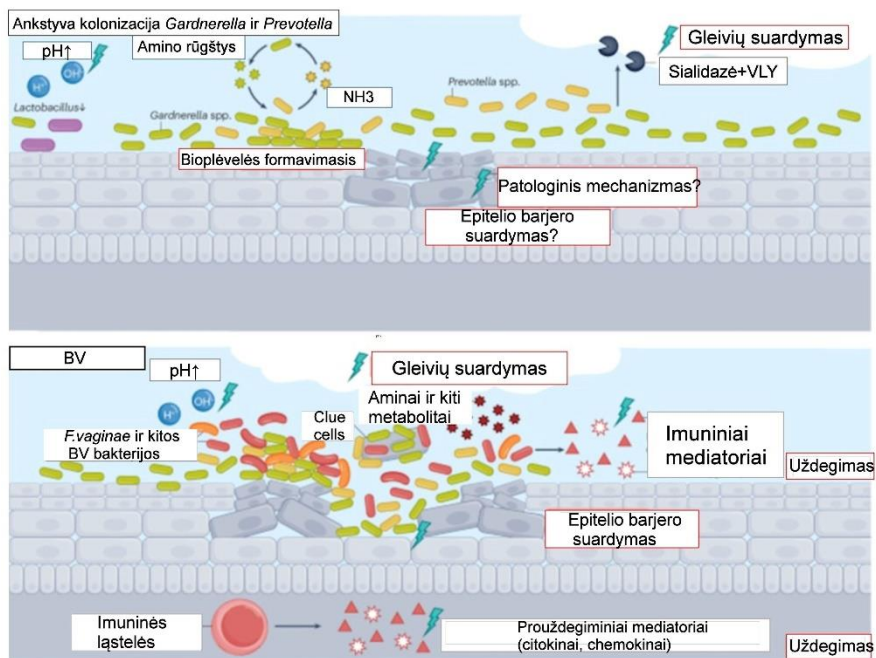
Nežinoma, koks vly geno paplitimas ir kokia jo raiška skirtinguose *Gardnerella* potipiuose/rūšyse.

1.12. *Gardnerella* vaidmuo BV patogenezėje: modeliai ir hipotezės

Kaupiantis žinioms apie moterų lyties takų mikrobiotą, buvo pasiūlyti BV patogenezės modeliai, tačiau tikslus patologinio proceso mechanizmas nėra iki šiol aiškus (Ma et al., 2012; Muzny & Schwebke, 2013; Muzny et al., 2019; Shvartsman et al., 2023; Bradshaw et al., 2025). Neaišku ar BV sukelia vieno patogeno ar mikroorganizmų bendrijų, kurios išstumia ir pakeičia makšties laktobacilas, ar laktobacilų sumažėjimas yra pirminė priežastis, dėl kurios gali daugintis su BV siejamos anaerobinės bakterijos (Muzny & Schwebke, 2016).

Vienas pasiūlytų BV patogenezės modelių, kuris yra labiausiai eksperimentiškai pagrįstas, teigia, jog disbiozė prasideda, kai virulentiniai *Gardnerella* kamienai, ypač sekretuojantys VLY ir sialidazes, kolonizuoja (pirminiai kolonistai) makštį po lytinių kontaktų (Schwebke et al., 2014b; Muzny et al., 2019; Łaniewski et al., 2020; Shvartsman et al., 2023). *Gardnerella*, skirtingai, nei kitos su BV siejamos bakterijos, toleruoja oksiduojančią aplinką, kurią sukuria makštyje laktobacilos. *Gardnerella* pakeičia apsaugines laktobacilas, prisikabina prie makšties epitelinių ląstelių,

kurios tampa „prieinamos“ dėl sialidazių ir VLY poveikio. Kai pakankamai padidėja virulentinių *Gardnerella* kamienų, prasideda bioplėvelių formavimasis (1.8 pav. A). *Prevotella* spp. inkorporuojamos į kartu su *Gardnerella* formuojamas bioplėveles. Proteolizės, kurią atlieka *Gardnerella*, rezultatas yra amino rūgštys, skatinančios *P. bivia* dauginimąsi. Amoniakas, gaminamas *P. bivia*, stimuliuoja *Gardnerella* augimą. Be to, *Prevotella* ir *Gardnerella* sialidazės, ardo makšties epitelio gleives. Vadinamieji pirminiai kolonistai gali inhibuoti šeimininko epitelio uždegiminį atsaką, ir apeinama žmogaus imuninė sistema. Tuo pačiu metu kolonistai formuoja apatinius bioplėvelės sluoksnius, nesukeliant aiškaus priešūždegiminių mediatorių susidarymo.



1.8 pav. BV patogenezės modelis. (A) Disbiozė prasideda, kai makštis kolonizuojama, dažniausiai po lytinio kontakto, virulentiniais *Gardnerella* amienais, kurie pakeičia laktobacilas ir prasideda bioplėvelės formavimasis. *Prevotella* spp. įtraukiamos į bioplėvelės formavimą ir stimuliuoja viena kitos augimą dėl amoniako ir amino rūgščių metabolizmo. Abi bakterijų rūšys gamina sialidazes, kurios prisideda prie gleivių degradacijos ir epitelio barjero ardymo. Akivaizdaus uždegimo nėra. (B) Kiti antriniai kolonistai (*F. vaginae*), įtraukiami į bioplėvelę. Vyksta makšties epitelio ląstelių, kurios padegtos polimikrobine bioplėvele (paveiksle „clue cells“), eksfoliacija. Epitelinės ląstelės ir paveiktos imuninės ląstelės gamina prouždegiminius citokinus ir chemokinus, vedančius prie lyties takų uždegimo ir epitelio barjero suardymo. Su BV siejamos bakterijos gamina metabolitus, kurie pakelia pH ir prisideda prie klinikinių BV simptomų atsiradimo. Pagal Bradshaw et al., 2025.

Kitas, vadinamųjų antrinių kolonistų, modelis teigia, jog gleivių makštyje suardymas skatina kitų su BV siejamų bakterijų (antrinių kolonistų) adheziją (1.8 pav. B), kurie įsijungia į bioplėvelę ir sukuria pilnavertę polimikrobinę struktūrą. Kai kurie antriniai kolonistai, ypač *F. vaginae*, *Sneathia*, stimuliuoja stiprų epitelinių ląstelių imuninį atsaką, todėl pasigamina citokinai ir beta-defensinas (Libby et al., 2008). *In vitro* ir *in vitro* tyrimuose šios bakterijų gentys pakeičia imuninę ir metabolinę mikroaplinką, o šie pokyčiai gali apspręsti BV simptomus ir ilgalaikes BV pasekmes. Antrinių kolonistų sintetinami aminorai ir antriniai metabolitai padidina makšties pH ir prisideda prie nemalonaus išskyrų kvapo atsiradimo (Srinivasan et al., 2015).

Nors gana seniai buvo keliams klausimas apie BV perdavimo būdą, pastaruoju metu daugėja įrodymų, jog BV perduodama lytiniu keliu (Swidsinski et al., 2010; Muzny et al., 2019; Bradshaw et al., 2025). Todėl šiuo metu siūloma nuo simptominės BV, o ypač besikartojančios, gydyti ne tik moterį, bet ir jos lytinį partnerį (Vodstrcil et al., 2025; Yazdy et al., 2025).

Jei *Gardnerella* perduodama lytiniu keliu bioplėvelių pavidalu ir jei BV yra infekcija, tai pagal klasikinį apibrėžimą, turi būti sukėlėjo, t.y. *Gardnerella* bakterijos, atitikimas Koch'o postulatams (paskelbti 1884 m.), kurie sako, jog ryšys tarp sukėlėjo ir ligos yra tada, kai 1) mikroorganizmas turi būti gausiai aptinkamas visuose sergančiuose organizmuose ir neaptinkamas sveikuose organizmuose; 2) mikroorganizmas turi būti išskirtas iš sergančio organizmo ir augti gryna kultūra; 3) kultivuotas mikroorganizmas turi sukelti ligą, kai patenka į organizmą; 4) inokuliuotas mikroorganizmas vėl gali būti išskirtas iš užkrėsto organizmo ir identifikuotas kaip tiesioginis ligos sukėlėjas.

Eksperimentai atlikti dar Gardner ir Dukes parodė, jog inokuliuojus lyties takų išskyras iš BV sergančiųjų sveikoms moterims, BV buvo sukurta daug sėkmingiau nei užkrėtus gryna *Gardnerella* kultūra. Tai rodė, jog svarbi ne tik ši bakterija, bet ir kiti veiksniai. Be to, *Gardnerella* bakterijos aptinkamos ne tik sergančių BV makšties mikrobiotoje, bet ir sveikų moterų, nors mažesniais kiekiais mikrobiotoje. Todėl Swidsinski et al. (2014) teigia, jog BV neatsiranda be *Gardnerella*, bet *Gardnerella* moterų makštyje yra ne BV.

Diskusijose dėl BV patogenezės modelio, primenama, jog koreliacija nebūtinai rodo priežastinį ryšį. Daug skirtingų bakterijų rūšių siejamos su BV simptomais, bet nėra vienintelės rūšies, kuri būtų aptinkama visais atvejais. Todėl siūloma apsvastyti alternatyvias hipotezes: 1) genetiniai skirtumai tarp *Gardnerella* kamienų rodo, kad vieni kamieniai gali sukelti vieną ar daugiau BV simptomų, o kiti kamieniai, aptinkami sveikuose individuose, yra komensaliniai; 2) visi *Gardnerella* kamieniai koduoja tam tikrus virulentinius

veiksnius, kurių raiška, esant skirtingoms sąlygoms, skiriasi; 3) veiksmų raiška yra visuose *Gardnerella* kamienuose, tik vieni individai yra jiems jautrūs arba yra generuojamas organizmo atsakas į šiuos veiksmus. Juk kai kurie individai besimptomiai nešioja bakterinių infekcijų sukėlėjus (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *N. meningitidis*), todėl tikėtina, kad ir nešiojama *Gardnerella* besimptomiai (Hickey & Forney, 2014; Schellenberg et al., 2017; Cerca et al., 2019).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Leidimas atlikti biomedicininį tyrimą

Klinikiniai ėminiai buvo surinkti, atliekant biomedicininį tyrimą „Bakterijos *Gardnerella vaginalis* virulentiškumo veiksnių tyrimas“ ir gavus Vilniaus regioninio biomedicininių tyrimų etikos komiteto leidimą (leidimo Nr. 158200-13-697-223, išduotas 2013-11-12; papildymas Nr. 158200-697-PP2-57, išduotas 2015-12-08).

2.2. Klinikinių ėminių surinkimas

Makšties tepinėliai (ėminiai) gydytojų akušerių-ginekologų V. Paliulytės (MD), Š. Grincevičienės (MD, PhD); J. Zakarevičienės (MD, PhD), A. Vladišauskienės (MD) ir A. Marcinkutės (MD) buvo surinkti iš 116 pacienčių, kurios apsilankė privačiose ginekologijos klinikose Vilniuje (UAB „Medicinos sprendimai“) ir Marijampolėje („Onos Gurevičienės šeimos klinika“).

Iš kiekvienos pacientės buvo imami trys ėminiai iš vidurinio makšties trečdalyo:

1. Tepinėlis su nailoniniu šepetėliu, merkiamas į mėgintuvėlį su skysta Amies terpe ESwab® (Copan, Italija). Mėgintuvėlis su ėminiu iki tyrimo atlikimo laikytas -20°C. Ėminys naudotas genomines DNR (gDNR) išskyrimui ir makšties bakterijų aptikimui molekuliniiais metodais.

2. Tepinėlis su vatos tamponėliu, įdėtas į mėgintuvėlį su pusiau kieta Amies terpe su anglimi (LP Italiana SPA, Italija). Iki tyrimo atlikimo ėminys laikytas 2-8°C. Ėminys buvo naudotas *Gardnerella* kamienų išskyrimui pasėlio metodu.

3. Makšties išskyrų tepinėlis vatos tamponėliu paskleistas ant mikroskopinio stiklelio. Ėminys skirtas makšties mikrobiotos įvertinimui mikroskopu.

2.3. Makšties išskyrų tepinėlio dažymas, Nugent vertės nustatymas ir Amsel kriterijai

Makšties išskyrų tepinėliai ant mikroskopinio stiklelio buvo džiovinti ore kambario temperatūroje ir perduoti M. Janulaitienei. Tepinėliai fiksuoti kaitinant ugnimi ir dažyti dažų rinkiniu Gram Stain Kit (Becton Dickinson, JAV) pagal gamintojo instrukcijas. Nudažytos Gram'o būdu bakterijos pagal ląstelių sienelės sudėtį yra diferencijuojamos į Gram-teigiamas (mėlynos spalvos) ir Gram-neigiamas (raudonos spalvos). Tepinėliai vertinti

mikroskopu su 1000x padidiniu. Bakterijų morfotipas ir pusiau kiekybinis įvertinimas atliktas kaip aprašyta Nugent et al. (1991):

- *Lactobacillus* spp. morfotipas – stambios, Gram-teigiamos lazdelės;
- *Gardnerella* ir *Bacteroides* spp. morfotipas – smulkios, Gram-neigiamos arba Gram-kintamosios lazdelės;
- *Mobiluncus* morfotipas – lenktos, Gram-kintamosios lazdelės.

Vertinamas vidutinis morfotipų skaičius matomas regėjimo lauke: 0 – nėra morfotipo; 1+ <1 morfotipas; 2+ nuo 1 iki 4 morfotipų; 3+ nuo 5 iki 30 morfotipų; 4+ daugiau kaip 30 morfotipų. Morfotipų aptikimas vertinamas balais (2.1 lentelė), kurie sumuojami taip: Nugent vertinimas = *Lactobacillus* + *Gardnerella* ir *Bacteroides* spp. + *Mobiluncus*.

2.1 lentelė. Nugent vertės nustatymas

Vertė	<i>Lactobacillus</i> morfotipas	<i>Gardnerella</i> ir <i>Bacteroides</i> spp. morfotipas	<i>Mobiluncus</i> morfotipas
0	4+	0	
1	3+	1+	1+ arba 2+
2	2+	2+	3+ arba 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

Nugent vertė (NS) paremta skaitine išraiška: jeigu vertės (arba balai) yra 0–3, tai makšties mikrobiota yra sveika, 4–6 dalinė BV arba tarpinės būsenos mikrobiota, 7–10 yra tipiška BV.

Gydytojai naudojo Amsel kriterijus/požymius BV diagnozės nustatymui (Amsel et al., 1983): 1) homogeniškos vandeningos makšties išskyros; 2) makšties išskyrų pH>4,5; 3) nemalonaus žuvies kvapo makšties išskyros; kvapas išryškėja, užlašinus ant išskyrų 10% KOH tirpalo; 4) atplyšusios makšties epitelio ląstelės padengtos bakterijomis, vadinamos „clue cells“ (mikroskopiškai nustatė M. Janulaitienė). BV diagnozė patvirtinama, jeigu yra bent trys iš keturių Amsel požymių.

2.4. Pagamintos mitybinės terpės ir jų komponentai

Mitybinės bakteriologinės terpės buvo paruoštos ir steriliai išpilstytos NVSPL pagal gamintojo instrukcijas arba remiantis literatūros šaltiniais.

Komponentų kilmė:

- Kraujo agarų pagrindas Nr.2 (Oxoid, JK)
- Arklio kraujas, defibrinuotas (Oxoid, JK)
- Triptono sojos sultinys (Liofilchem, Italija)

- Arklio serumas (Oxoid, JK)
- Smegenų širdies sultinys (Liofilchem® Italija)

2.2 lentelė. Iš komponentų pagamintų terpių receptūros

Terpės pavadinimas	Terpės komponentai
Kraujo agaras Petri lėkštelėse (<i>angl.</i> Horse Blood agar, HBA)	1. Kraujo agaro pagrindas Nr.2 2. 10% arklio kraujas, defibrinuotas
Šokolado agaras Petri lėkštelėse (<i>angl.</i> Chocolate agar)	1. Kraujo agaro pagrindas Nr.2 2. 10 % arklio kraujas, defibrinuotas, lizuotas kaitinant
Šaldymo terpė, skirta izoliatų ilgalaikiam saugojimui (po 1 ml) mėgintuvėliuose (<i>angl.</i> Tryptone Soya broth supplemented with 15% glycerol and 20% horse serum)	1. Triptono sojos sultinys 2. 15 % glicerinas 3. 20 % arklio serumas
Terpė bioplėvelėms su gliukoze, BHIs (<i>angl.</i> Brain Heart Infusion broth supplemented with 2% horse serum, 0.15% soluble starch and 1% glucose, BHIs)	1. Smegenų širdies sultinys 2. 2% arklio serumas 3. 0,15% tirpus krakmolai 4. 1% gliukozė
Triptono sojos sultinys, TSS (su priedais) (<i>angl.</i> Tryptone Soya broth supplemented with 2% horse serum and 0,15% soluble starch)	1. Triptono sojos sultinys 2. 2% arklio serumas 3. 0,15% tirpus krakmolai

2.5. Bakterijų izoliavimas ir identifikavimas

2.5.1. Genominės DNR išgryninimas iš makšties ėminių

Skysta Amies terpė iš ESwab® mėgintuvėlio, kurioje buvo surinkti ėminiai, po atšildymo padalinta į kelias dalis gDNR išgryninimui ir mikroorganizmų identifikavimui PGR metodu. Dalis mėginio nucentrifuguota 10000 x g 5 min. 22°C ir iš nuosėdų išskirta gDNR, panaudojus GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher, Scientific, Lietuva) pagal gamintojo rekomendacijas. DNR koncentracija nustatyta, spektrofotometru *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific), kurio kompiuterinė programa pateikia DNR koncentraciją ng/μl. Įvertinamas gDNR grynumas (sugerties santykis 260 nm/280 nm ≥ 1,8; 260 nm/230 nm ≥ 2,0). gDNR tirpalas praskiedžiamas iki koncentracijos 5-10 ng/μl.

Iš kitos terpės dalies gDNR išgryninta automatizuotu MICROLAB NIMBUS IVD (Hamilton Company) prietaisu ir rinkiniu STARMag Universal Cartridge Kit (Seegen, P. Korėja), gDNR grynimui naudojant

magnetines daleles. Išgryninta gDNR panaudota lytiškai plintančių mikroorganizmų nustatymui.

2.5.2.DNR elektroforezė

Priklausomai nuo eksperimento, DNR elektroforezė buvo atlikta 1-1,7% agarozės gelyje 1xTAE buferiniame tirpale (40 mM Tris; 40 mM Na acetato, 1 mM EDTA, pH 8,3) esant 10 V/cm² įtampai. Dažas RedSafe™ (Intron Biotechnology, Japonija) arba etidžio bromidas (Roth, Vokietija) naudoti DNR vizualizacijai UV šviesoje. DNR fragmentų analizei gelyje panaudoti GeneRuler DNR Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific) DNR ilgio standartai.

2.5.3.*Bifidobacterium* spp. ir *Lactobacillus* spp. kamienų išskyrimas

Bifidobacterium bifidum 20456 DSM įsigyta iš Leibniz Institute DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Culture GmbH, Braunschweig, Vokietija) ir auginta anaerobinėmis sąlygomis, naudojant AnaeroGen (Oxoid, JK) paketus ant RCM agaro (Oxoid) 37°C 48 val.

Makšties ėminys iš Amies terpės su anglimi išsėtas ant MRS agaro (BD Difco, JAV) laktobacilų išskyrimui ir kraujo agaro (*L. iners* išskyrimui) lėkštelės inkubuotos 37°C, 5% CO₂ 48 val Heracell™ 150i CO₂ inkubatoriuje (Thermo Fisher Scientific).

L. gasseri, *L. crispatus*, *L. jensenii* ir *L. iners* identifikacija atlikta pagal 16s rRNR koduojančio geno seką. Šis genas buvo padaugintas, panaudojus universalius pradmenis fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ir rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3') (Weisburg et al., 1991).

Gautų PGR fragmentų nukleotidų seka nustatyta VU BTI Sekoskaitos centre ir rūšinė mikroorganizmo priklausomybė nustatyta, pateikus amplifikuotas 16s rDNR sekas į NCBI Nucleotide BLAST, pasirinkus rRNA/ITS databases.

Šių mikroorganizmų kamienų gDNR buvo panaudota teigiamai kontrolei makšties mikroorganizmų nustatymo reakcijose.

2.5.4.Mikroorganizmų nustatymas makšties ėminyje

PGR būdu, panaudojus bakterijų rūšiai būdingus pradmenis (1S lentelė prieduose), makšties ėminiuose buvo nustatyti šie mikroorganizmai: 1) keturios *Lactobacillus* rūšys; 2) septynios su BV siejamos bakterijos; 3) keturios *Candida* rūšys. *Gardnerella* papildomai identifikuota, panaudojus dar tris pradmenų poras (2.3 lentelė).

2.3 lentelė. Pradmenys ir PGR sąlygos *Gardnerella* nustatymui makšties mėginiuose

Pradmuo	Pradmens seka (5'-3')	Šaltinis	Lydimosi temp. (°C)	Amplikono ilgis (bp)
GV1	TTACTGGTGTATCACT GTAAGG	Zariffard et al., 2002	55	334
GV3	CCGTCACAGGCTGAAC AGT			
cpn-For	CGCATCTGCTAAGGAT GTTG	Menard et al., 2008	58	72
cpn-Rev	CCAGGCATGTAAGCCC AAA			
Gvag-644F	GGGCGGGCTAGAGTGC A	Fredricks et al., 2007	62	207
Gvag-851R	GAACCCGTGGAATGGG CC			

Vidine kontrole, rodančia ar gDNR buvo tinkamai išskirta iš ėminių ir ar reakcijos mišinyje nėra PGR inhibitorių, buvo naudotas žmogaus apolipoproteiną E koduojančio geno (*apoE*) 557 bp ilgio fragmentas, kuris, atliekant bakterijų nustatymą makšties ėminiuose, buvo lygiagrečiai padaugintas, panaudojus pradmenis ApoF2 (5'-GCATTGCAGGCAGATAGTGA) ir ApoR (5'-CCTGTGTGGAACAAGTTCAAG), kurie sukurti bendradarbiaujant su Dr. V. Popendikyte („UAB Sorpo“).

PGR kontroliniais kamienais naudoti iš NVSPL gauti septyniolika *Gardnerella* kamienų, *Lysteria monocytogenes*, *Streptococcus intermedius* ir *Streptococcus pneumoniae* kamieniai.

Bakterijų nustatymui ėminiuose PGR atliktos 25 µl reakcijos tūryje, kuriame buvo 1x Maxima Hot Start Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0,4 µM kiekvieno pradmens ir 5 µl (30-40 ng) gDNR. PGR naudotos sąlygos: pradinė denatūracija 5 min. 95°C, 38 amplifikacijos ciklai, susidedantys iš denatūracijos (30 s, 95°C), pradmenų prikabinimo (30 s, 54-62°C), pradmenų ilginimo (45 s, 72°C) ir paskutinio PGR žingsnio (72°C 5 min.).

Bifidobacterium rūšys identifikuotos, atlikus *tuf* geno fragmento amplifikaciją (1S lentelė prieduose) ir jo sekoskaitą. Geno *tuf* sekos buvo palygintos su sekomis duomenų bazėje Genbank, panaudojant programą BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Panaudojus gDNR iš makšties ėminių nustatyti šie lytiniu keliu plintantys patogenai: *Chlamydia trachomatis* (CT), *Neisseria gonorrhoeae* (NG), *Trichomonas vaginalis* (TV), *Mycoplasma hominis* (MH), *Mycoplasma genitalium* (MG), *Ureaplasma urealyticum* (UU) ir *Ureaplasma parvum* (UP)

tikro laiko PGR (qPCR) su Anyplex II STI-7 rinkiniu (Seegene, Pietų Korėja, Choe et al., 2013).

Lygiagrečiai PGR, pasėlio metodu buvo identifikuotos *Candida* spp.: ėminys iš Amies terpės su anglimi pasėtas ant Sabūro dekstrozės agarą (Oxoid, JK), inkubuota 37°C iki 120 val.

2.6. *Gardnerella* izoliavimas, auginimas ir genotipavimas

2.6.1. *Gardnerella* kamienų išskyrimas

Ėminys iš Amies terpės su anglimi sėjamas ant dviejų *Gardnerella* Agar (GAR) lėkštelių su žmogaus krauju (BioMérieux, Prancūzija), skirtų selektyviam *Gardnerella* auginimui iš klinikinių ėminių. Lėkštelės inkubuotos 37°C 48 val. dviem būdais: 5% CO₂ ir naudojant anaerobinių sąlygų sudarymo paketus AnaeroGen (Oxoid). Po inkubacijos atrinktos smulkios pilkšvos spalvos bakterijų kolonijos su charakteringa mažo skersmens β-hemolize (nuo 1 iki 15 kolonijų iš vieno mėginio) ir atskirai po vieną išsėtos ant šokolado agarą (2.2 lentelė) pagausinimui. Lėkštelės inkubuotos 37°C, 5% CO₂, 48 val.

2.6.2. *Gardnerella* identifikavimas

Kolonijos, formuojančios būdingą β-hemolizę ant GAR lėkštelių, buvo pagausintos ant šokolado agarą (37°C, 5% CO₂, 48 val.). Biomasė nurinkta ir suspenduota 300 μl PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 4,3 mM Na₂HPO₄, pH 7,4) tirpale. Centrifuguota 3 min. 10000 x g greičiu. Nupylus supernatantą, gDNR iš biomasės išskirta, panaudojus rinkinį GeneJET Genomic DNA Purification Kit. Atrinktų ir tolesnei analizei pasirinktų klinikinių izoliatų rūšinė priklausomybė patvirtinta, nustatant visą 16s rRNR koduojančio geno seką; nukleotidų seka turi būti 98,5% identiška referentinių *Gardnerella* kamienų atitinkamoms sekoms (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/?taxon=2701>). PGR atlikta 25 μl reakcijos mišinys, kurio sudėtyje buvo 0,5 vnt. Phusion HF polimerazės, 1x Phusion HF Green buferinio tirpalo (abu reagentai iš Thermo Fisher Scientific), 0,2 mM dNTP, 0,4 μM kiekvieno pradmens 5'-TTCGATTCTGGCTCAGG-3' ir 5'-CCATCCCAAAGGGTTAGGC-3' (Ingianni et al., 1997), 10-20 ng gDNR. Geno padauginimo sąlygos: 95°C 4 min. (pradinė denatūracija), 32 reakcijos ciklai: 95°C 30s (denatūracija), 60°C 30s (pradmenų prikabinimas), 72°C 1 min. (pradmenų ilginimas), paskutinio

ciklo metu pradmenų ilginimo stadija (72°C) truko 2 min. Pasibaigus reakcijoms PGR produktai analizuoti agarozės gelyje.

2.6.3. *Gardnerella* kamienų ilgalaikis saugojimas ir kultivavimas skystoje terpėje

Ilgalaikiam saugojimui *Gardnerella* kamienai (izoliatai) buvo auginti 48 val. ant šokolado agaro, biomasė surinkta nuo lėkštelės ir suspenduota šaldymo terpėje (2.2 lentelė); saugojama –80°C temperatūroje.

Iš šaldymo terpės kamienai auginimui buvo iššėti ant šokolado agaro ir inkubuoti 37°C, 5% CO₂, 48 val. *Gardnerella* kamienų kolonijos, buvo nurinktos nuo agaro ir persėtos į 7 ml skystą TSS su priedais terpę (2.2 lentelė). Mėgintuvėliai inkubuoti 24 val. 37°C 5% CO₂. Kultūra buvo skiesta iki OD₆₀₀=0,01 (2×10⁶ KfV/ml; KfV–kolonijas formuojantis vienetas) šviežia TSS terpe su priedais iki 7 ml arba 40 ml tūrio. Mėgintuvėliai su praskiesta kultūra iki 7 ml inkubuoti 24 valandas 37°C 5% CO₂. Pamatuotas paimto mėginio OD₆₀₀. Mėgintuvėliai su praskiesta kultūra iki 40 ml inkubuoti iki 44 val. 37°C 5% CO₂. Kur nurodyta, mėginiai iš kultūros paimti 0, 4, 8, 16, 20, 24, 28, 32, 40 ir 44 auginimo valandomis ir pamatuota OD₆₀₀. Ląstelės nusodintos centrifuguojant, o supernatantai filtruoti per 0,22 μm membraninius filtrus, padalinti porcijomis ir saugomi –25°C. Kiekvieno kamieno auginimas atliktas trimis nepriklausomais eksperimentais su dviem techniniais pakartojimais.

2.6.4. *Gardnerella* potipių nustatymas

Keturi *Gardnerella* potipiai buvo nustatyti, amplifikuojant potipiams būdingus genus su pradmenimis (2.4 lentelė) aprašytus Balashov et al. (2014). PGR buvo naudota gDNR, išskirta iš nekultivuotų makšties ėminių ir klinikinių *Gardnerella* izolatų.

Padauginimo reakcijų 25 μl tūryje buvo 1x Maxima Hot Start Green PCR Master Mix, 0,4 μM kiekvieno pradmens ir 10–40 ng gDNR. Siekiant išvengti nespecifinių reakcijų, į PGR mišinį buvo pridėta betaino: potipių 1 ir 4 nustatymui makšties ėminiuose skirtoms reakcijoms iki 1 M, o potipio 2 iki 0,75 M betaino. Visų potipių nustatymui naudotos šios PGR sąlygos: 95°C 5 min (pradinė denatūracija) ir 38 reakcijos ciklai, susidedantys iš šių stadijų: 95°C 30 s (denatūracija), 60°C 30 s (pradmenų prisikabinimas), 72°C 30 s (pradmenų ilginimas); pasibaigus reakcijoms ciklams, pridėta papildoma 1 min. pradmenų ilginimo stadija (72°C). Reakcijos produktai analizuoti 1,7% agarozės gelyje.

2.4 lentelė. Pradmenys *Gardnerella* potipių nustatymui

Potipis	Taikinys	Pradmens pavadinimas	Pradmens seka (5'-3')	Amplikono ilgis (bp)
1	α -L-fukosidazė (<i>fuc1</i>)	GV1-Fuc-For	CCAGTCATAAGTTTG CGTTTTACC	139
		GV1-Fuc-Dir	TGGCACTGGCAAAGT TTACAAC	
2	Hipotetinis baltymas (<i>hyp</i>)	GV2-hyp-For	GCAAAGCAGACTGA GCGTATTAG	124
		GV2-hyp-Rev	GTAATAATCAGGCTC CTCATCGC	
3	Tiorredoksinas (<i>thi</i>)	GV3-thi-For	TTCTGCTTCTTCTGCT ATTTGCTG	142
		GV3-thi-Rev	TTCGTTGACTTTTGG GCAACATG	
4	CIC šeimos chlorido jonų transporto baltymas (<i>cis</i>)	GV4-cis-For	CCTACGCAAGCTCCA GACGAC	74
		Gv4-cis-Rev	ACAAGTTGCACTCTT CGAGCTGG	

2.6.5. *Gardnerella* izoliatų RAPD analizė

RAPD (atsitiktinai amplifikuota polimorfinė DNR) analizė buvo panaudota to paties potipio *Gardnerella* kamienų, išskirtų iš to paties makšties mėgino, genetinio tapatumo įvertinimui. Potipių 1 ir 2 kamienų analizei naudoti du pradmenys G3-1F ir G5-1F (2.4 lentelė), o potipio 4 geriausia kamienų diferenciacija gauta tik su G5-1F pradmeniu.

2.4 lentelė. RAPD pradmenys

Pradmuo	Pradmens seka (5'-3')	Šaltinis
G3-1F	CAGATTAGCAGCAGCCGCC	Šis darbas
G5-1F	GCGAGTGGGCTTGGTG	

Padauginimo reakcijų 25 μ l tūryje buvo 1x Platinum Green Hot start PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), 0,4 μ M pradmens, 20 ng gDNR. PGR sąlygos buvo šios: 94°C 2 min (pradinė denatūracija) ir 35 reakcijos ciklai, susidedantys iš šių stadijų: 94°C 30s (denatūracija), 38°C 30s (pradmenų prisikabinimas), 72°C 45s (pradmenų ilginimas); paskutinė pradmenų ilginimo stadija pailginta papildomai 5 min. (72°C). PGR produktai analizuoti 1,2% agarozės gelyje.

2.7. *Gardnerella* virulentinių veiksnių analizė

2.7.1. Toksiną vaginoliziną koduojančio geno ir jį supančių sekų aptikimas

Visas *vly* genas (1460 bp) *Gardnerella* kamienuose buvo nustatytas, panaudojus VLY-For ir VLY-Rev pradmenis (2.5 lentelė). Pradmenų VLY-FL-F ir VLY-FL-R, kurių taikiniai buvo gretimai *vly* geno esančios sekos (*angl.* flanking regions), sekos pateiktos 2.5 lentelėje. PGR sąlygos, kaip aprašytos 2.6.4 sk., tik be betaino.

2.5 lentelė. Pradmenys viso *vly* geno ir jį supančių sekų padauginimui

Pradmuo	Pradmens seka (5'-3')	Šaltinis
VLY-For	GCTAGCCAGCGAAGCATGCCATGC	Zvirbliene et al., 2010
VLY-Rev	GGATCCTTAGTCGTTCTTTACAGTTTCA	
VLY-FL-F	CATCTTCGCCAGCAACTCC	Castro et al. , 2016
VLY-FL-R	GGCGGAATTATGTGCGTTATTGG	

2.7.2. Toksino vaginolizino kiekio nustatymas ELISA

VLY kiekio nustatymui panaudoti šie ELISA tirpalai ir reagentai:

- Monokloniniai antikūnai (MAk) 12E1 ir 9B4, gauti iš VU GMC BTI
- Rekombinantinis vaginolizinas (VLY) gautas iš VU GMC BTI
- Fosfatinis buferinis tirpalas (PBS) su 0,1% Tween 20
- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidino (TMB) substratas (Sigma-Aldrich, Vokietija).

VLY kiekio nustatymus *Gardnerella* izoliatų supernatantuose ELISA būdu atliko R. Lasickienė ir Dr. M. Simanavičius (VU GMC BTI). 96 šulinėlių mikroplokštelės buvo padengtos 5 µg/ml MAk 12E1 (Zvirbliene et al., 2010), blokuota inkubuojant su Roti-Block (Carl Roth, Vokietija) tirpalu. Kalibracinės kreivės sudarymui naudotas išgrynintas rekombinantinis VLY (Zvirbliene et al., 2010), kurio šulinėliuose buvo nuo 1 ng/ml iki 1 µg/ml. *Gardnerella* supernatantai, atšildyti, serijomis praskiesti PBS su 0,1% Tween 20 ir išpilstyti į mikroplokštelių šulinėlius. Po inkubacijos ir plovimo žingsnių, plokštelės inkubuotos su MAk 9B4 (Zvirbliene et al., 2010), konjuguotais su krienų peroksidaze (skiedimas 1:4000). Fermentinė reakcija stebėta, naudojant TMB ir sustabdyta 3,6% H₂SO₄. OD matuotas mikroplokštelineiu spektrofotometru Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific) ir apskaičiuotas kaip 450 nm ir 620 nm verčių skirtumas. VLY koncentracija supernatantuose

apskaičiuota pagal linijinę kalibracinės kreivės dalį. Kur nurodyta, VLY koncentracija buvo normalizuota pagal bakterijų kultūros OD₆₀₀.

2.7.3. β -galaktozidazės aktyvumo nustatymas *Gardnerella* izoliatuose

Kalorimetrinis metodas, panaudojant o-nitrophenol-beta-D-galactosidase (ONPG) diskus (Sigma Aldrich) buvo panaudotas *Gardnerella* izoliatų β -galaktozidazės aktyvumo nustatymui. ONPG diskas buvo įdėtas į sterilų mėgintuvėlį su 0,2 ml PBS (pH 7,4) tirpalo. Su 1 μ l inokuliacine kilpele paimta *Gardnerella* biomasės ir suspenduota tirpale su ONPG disku. Po 1 ir 2 val. inkubacijos 37°C temperatūroje stebėta ar tirpalo spalva mėgintuvėlyje tapo geltona, o tai rodytų β -galaktozidazės aktyvumą. Jei spalva nesikeičia, mėgintuvėliai paliekami 37°C temperatūroje iki 6-18 val. Teigiamai kontrolei naudota *E. coli* DH10B kamieno, transformuoto plazmide pUC57, mėlynos spalvos kolonijos, ir į PBS tirpalą įdėta iki 1 mM IPTG.

2.7.4. Sialidazės koduojančių genų aptikimas *Gardnerella* izoliatuose

Sialidazę A (NanH1) koduojantis genas (*sld A*) nustatytas PGR būdu, panaudojus kelias pradmenų poras (2.6 lentelė).

2.6 lentelė. Pradmenys sialidazės koduojančių genų aptikimui

Sialidazė	Pradmuo	Pradmens seka (5'-3')	Amplikono ilgis (bp)	Šaltinis
NanH1 (Sld A)	Sia1F	ATGGAACGTCGTTCA ACGAAG	682	Pleckaityte et al., 2010
	Sia1R	GATACGCGTTTTATG TCTCTTGC		
	Sia2F	CACGTGGAACATATG GAAATCG	988	Šis darbas
	Sia3R	TAAATGTCTCTTCCAT GTTGGCT		
NanH2	G. vag nanH2 qPCR F	AGGAGTGCGTATGCG TAGAAG	348	Robinson et al., 2019
	G. vag nanH2 qPCR R	CCGCACTGCTGAGTT TCAC		
	G. vag nanH3 qPCR F	CAGTTCCAATGGAAG TGTGC		
	G. vag nanH3 qPCR R	AGCATCTGGGAATGC TCTTG		
NanH3			322	

PGR reakcijos, panaudojus Dream Taq polimerazę (Thermo Fisher Scientific), atliktos šiomis sąlygomis: pradinė denatūracija 94°C 3 min, 28 ciklai: 94°C 30 s (denatūracija), 52°C 30 s (pradmenų prisikabinimas),

72°C 50 s (pradmenų ilginimas); ir papildoma 2 min. pradmenų ilginimo stadija (72°C).

2.7.5. Kiekybinis ir kiekybinis sialidazės aktyvumo nustatymas

Sialidazės aktyvumas *Gardnerella* kamienuose nustatytas, kaip aprašyta Moncla & Braham (1989). Paruoštas 110 mM 2'-(4-metilumbeliferil)- α -D-N-acetilneuraminės rūgšties natrio hidratas (*angl.* 2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminic acid sodium salt hydrate) (MUN, Sigma-Aldrich) vandeninis tirpalas išpilstytas po 180 μ l ir užšaldytas. Prieš naudojimą, atšildžius, į MUN tirpalą įpilta 20 μ l 1,0 M natrio acetato buferinio tirpalo (pH 4,6). Tirpalu sudrėkinta 90x6 mm dydžio Watman filtrinio popieriaus juostelė. *Gardnerella* biomasė nuo lėkštelės buvo įtrinta į filtrinio popieriaus juostelę. Juostelės inkubuotos 37°C 5 ir 15 min. kambario temperatūroje ir UV šviesoje stebėta reakcija. Sialidazės aktyvumas stebimas kaip ryški mėlyna fluorescencuojanti dėmė. Po 5 min. inkubacijos matoma fluorescencija laikoma teigiama reakcija, o matoma tik po 15 min. – silpnai teigiama reakcija. Kontrolėmis naudoti šie bakterijų kamienai: neigiama kontrolė *E. coli* (n=2) ir *L. monocytogenes* (n=1); teigiama kontrolė *S. intermedius* (n=1) ir *S. pneumoniae* (n=1).

Kiekybinį sialidazės aktyvumo nustatymą atliko Dr. L. Baranauskienė (VU GMC BTI). *Gardnerella* izoliatų supernatantai buvo 20 kartų skiesti su 50 mM natrio acetatu (pH 5,5), kuriame buvo 200 mM MUN. Reakcijos mišinys buvo išpilstytas į juodo polistireno mikroplokšteles po 100 μ l į šulinėlį. Plokštelės užklijuotos optiškai pralaidžia plėvele. MUN hidrolizė nustatyta, matuojant fluorescenciją, kai sužadinimo bangos ilgis yra 365 nm (pralaidumas 9 nm), emisijos bangos ilgis 440 nm (pralaidumas 20 nm) kas 2 minutes 30°C purtant 17 Hz (Synenergy H4 hybrid multi-mode mikroplokštelių skaitytuvas, Biotek JAV). Kiekvieno supernatanto fluorescencija matuota po du kartus. Santykinis sialidazės aktyvumas nustatytas, vertinant fluorescencijos intensyvumo kreivės pradinio tiesinio intervalo pokrypį kampą. Sialidazės aktyvumas normalizuotas pagal bakterijų kultūros OD.

2.7.6. Bioplėvelių formavimas

Gardnerella kolonijos po 48 val. auginimo ant šokoladinio agaro persėtos į 10 ml bioplevelės augimo terpę BHIs (2.2 lentelė). Inkubuota 24 val 37°C temperatūroje ir 5% CO₂. Po inkubacijos bakterijų suspensija atskiesta iki OD₆₀₀=0,2 (3×10⁷ KfV/ml) ir išpilstyta po 150 μ l į 96 šulinėlių

plokščiadugnę mikroplokštelę. Bakterijų suspensija taip pat išsėta kontrolei ant šokolado agaro galimos taršos kitomis bakterijomis ar grybais nustatymui; plokštelė inkubuota 37°C, 5% CO₂, 24 val. Teigiamą kontrolę naudotas *G. vaginalis* kamienas ATCC 14018; neigiamą kontrolę buvo terpė BHIs be bakterijų. Po inkubacijos mikroploštelės šulinėliai plauti 150 µl PBS tirpalu 3 kartus, siekiant pašalinti neprilipusias/nesudariusias bioplėvelės bakterijas. Plokštelės džiovintos 24 val. kambario temperatūroje. Į plokštelės šulinėlius pripilta 150 µl safranino tirpalo (Sigma-Aldrich) ir dažyta 15 min. kambario temperatūroje. Po to šulinėliai plauti 150 µl PBS tirpalu 3 kartus. Plokštelės džiovintos tamsoje 24 val. kambario temperatūroje. Safraninas tirpintas 150 µl 33% acto rūgšties tirpale 15 min. maišant ir pipetuojant. 75 µl tirpalo perkelta į naują mikroplokštelę ir išmatuotas OD₅₉₅ spektrofotometru Anthos 2020 (Biochrom Ltd). Kiekvienam *Gardnerella* kamienui daryti nepriklausomi keturi eksperimentai, kiekvienas su 8 techniniais pakartojimais, iš kurių skaičiuotas OD₄₉₂ vidurkis. Neigiamą ir teigiamą kontrolės (po keturis pakartojimus) įtrauktos į kiekvieną mikroplokštelę.

Kamienai, remiantis OD₄₉₂ rezultatais, buvo suskirstyti į kategorijas, kaip aprašyta Stepanović et al. (2000). Ribinė OD reikšmė (OD_r) (*angl.* cut-off) buvo nustatyta kaip 3 standartiniai nuokrypiai (SN) nuo neigiamos kontrolės OD vidurkio. Išskirtos 4 kategorijos: neformuojantys bioplėvelės OD ≤ OD_r, formuojantys silpną bioplėvelę OD_r < OD ≤ 2 × OD_r, formuojantys vidutinę bioplėvelę 2 × OD_r < OD ≤ 4 × OD_r, formuojantys stiprią bioplėvelę 4 × OD_r < OD.

2.8. Statistinė analizė

Statistinę analizę atliko V. Gegžna (VU GMC, Biomokslų institutas). GraphPad Prism 6 programa (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, JAV) naudota apskaičiuoti mikroorganizmų ir *Gardnerella* potipių aptikimo mėginiuose jautrumo (*angl.* sensitivity), specifiskumo, GS (95% PI) (*angl.* odds ratio) nustatymui. PGR sistemų, skirtų nustatyti *Gardnerella* mėginiuose palyginimui buvo apskaičiuotas koeficientas κ (kappa). Kai kappa reikšmė gauta < 0,20 sistemų atitikimas vertintas kaip blogas, 0,21-0,40 – silpnas, 0,41-0,60 – vidutinis, 0,61-0,80 – geras atitikimas, 0,81-1,00 – puikus atitikimas (Fletcher & Fletcher, 2005). Skirtumai tarp grupių, naudojant GraphPad Prism 6, buvo įvertinti Fišerio testu (*angl.* two-tailed Fisher's exact test) (Fletcher & Fletcher, 2005), kai reikšmingumo lygmuo $p < 0,05$.

Gardnerella virulentinių veiksmų raiškos rezultatai trijuose potipiuose buvo analizuoti statistine kompiuterine programa „R“, versija 3.4.3. Analizuoti duomenys buvo fenotipinės charakteristikos (VLY produkcija, bioplėvelės kiekis, išreikštas kaip OD, ir sialidazės aktyvumas), išreikštos

skaitinių reikšmių logaritmais ir potipiai. Logaritminė transformacija buvo taikoma tokiu būdu: (i) $x' = \log(x)$, kur x yra bioplėvelės kiekis arba (ii) $y' = \log(y + 1)$, kur y yra arba sialidazės aktyvumas, arba VLY kiekis (vertė „1“ turėjo būti pridėta, jei charakteristika turėjo reikšmių, lygių „0“). Fenotipinių savybių raiškos skirtumai tarp potipių buvo įvertinti arba (a) Welch F kriterijumi ir Games-Howell *post hoc* procedūra palyginimui poromis, esant normaliai pasiskirsčiusiems duomenims, kurių dispersijos skyrėsi statistiškai reikšmingai (tikrinta Brown-Forsythe kriterijumi) arba (b) Kruskal-Wallis kriterijumi ir Conover-Iman *post hoc* procedūra palyginimui poromis, taikant Holm korekciją p reikšmėms, kai duomenų normalumo prielaida buvo smarkiai pažeidžiama (Field et al., 2012). Statistinio palyginimo rezultatai pateikti kaip kriterijaus statistika (pvz., H , F , t), šalia kurios skliaustuose pateikti parametrai bei p reikšmė. Reikšmingumo lygmuo $\alpha = 0,05$: kai $p < 0,05$ rezultatas buvo vertinamas kaip statistiškai reikšmingas. *Post hoc* porų palyginimo rezultatai buvo apibendrinti kompaktiniu raidiniu žymėjimu (CLD) (Gramm et al., 2007). Jei kelios grupės buvo pažymėtos ta pačia CLD raide, tai rodė, kad tarp raide pažymėtų grupių nėra statistiškai reikšmingo skirtumo ($p \geq 0,05$). Normalumo prielaidos tikrinimui naudotas Shapiro-Wilk kriterijus, kuriam pasirinktas reikšmingumo lygmuo buvo 0,01.

Ryšys tarp skaitinių fenotipinių požymių porų buvo tirtas naudojant Spearman koreliacijos analizę. Buvo apskaičiuojamas koreliacijos koeficientas, tirtas statistinis koreliacijos reikšmingumas (daugybinių lyginamų p vertės buvo koreguojamos Holm procedūra) ir koeficiento 95% pasikliautinis intervalas (PI) buvo apskaičiuojamas koreguotųjų procentilių (BCa, *angl.* bias corrected and accelerated) savirankos metodu (Di Ciccio & Efron, 1996) pagal 10^4 savirankos imčių rezultatus.

Kiekvienos skaitinės charakteristikos (prognozuotojo) klasifikavimo savybės ir kiekvienas prognozuotojų derinys, norint nustatyti tris *Gardnerella* potipius, buvo išanalizuotas naudojant atsitiktinių miškų (*angl.* Random Forests) algoritmą („R“ paketas „ranger“, Wright & Ziegler, 2017), naudojant 10^4 medžių. Hiperparametrų ir geriausio modelio pasirinkimas buvo pagrįstas 100 kartų pakartota pagal trijų potipius stratifikuotų dalių kryžminio patvirtinimo procedūra (*angl.* 100-times repeated 3-fold cross-validation), vykdoma naudojant „R„ paketą „caret“ (Kuhn, 2008). Klasifikavimo tikslumas vertintas Cohen'o κ (kapa) koeficientu (Khrapovich & Pomeransky, 1998) (κ verčių interpretacija: 1 – ideali klasifikacija, 0 – visiško atsitiktinumo lygio (bevertė) klasifikacija). Modeliavimas atliktas kiekvienai galimai fenotipinių savybių (prediktorių) kombinacijai. Rezultatai pateikti kaip 300 pakartojimų (3 dalys $\times$ 100 kartų) κ reikšmių vidurkis ir jo pasikliautinis intervalas. Poriniai modelių palyginimai atlikti, naudojant

priklausomų imčių Student t kriterijų (Field et al., 2012), p reikšmėms taikyta Bonferroni korekcija.

Kiti galimi ryšiai tarp potipių ir fenotipinių charakteristikų buvo tirti, taikant principinių komponentų (PCA) (Field et al., 2012) ir hierarchinio klasterizavimo (HC) analizes. Prieš atliekant šias procedūras duomenys buvo standartizuoti (atlikta z transformacija) norint išvengti matavimo vienetų įtakos. HC analizė grįsta Euklido atstumu ir Ward'o jungimo metodu (Murtagh & Legendre, 2014). Rezultatai vizualizuoti dendrograma ir PCA rezultatų grafiku, kuriame pirmų dviejų principinių komponentų (PC) erdvėje rodyklėmis atidėtos fenotipinės savybės, o taškais konkretūs atvejai (*angl.* PCA biplot). Buvo trys *Gardnerella* potipiai, todėl pasirinkta duomenis suskirstyti į tris klasterius. Klasteriai buvo sudaryti pasirenkant tris stambiausias dendrogramos šakas. Calinski-Harabasz (CH) indeksas (Arbelaitz et al., 2013) buvo naudojamas, kaip papildomas klasterinės analizės kokybės kriterijus (didesnė CH vertė rodo geresnį suklasterizavimą, mažesnė – prastesnį).

3. REZULTATAI

Vaisingo amžiaus moterų makšties mikrobiota gali skirtis dėl moterų priklausomybės skirtingoms rasėms bei etninėms grupėms ir dėl tam tikrų kultūrinių įpročių (Brotman et al., 2008; Ravel et al., 2011; Fettweis et al., 2014). Todėl tyrimai, įtraukiantys kuo daugiau makšties mikrobiotos bakterijų kamienų iš moterų, gyvenančių skirtinguose žemynuose, regionuose ar šalyse, yra itin vertingi (Condori-Catachura et al., 2025).

Šiame darbe buvo siekiama aptikti *Gardnerella* potipius makšties ėminiuose iš sveikų ir sergančių BV Lietuvos moterų. Išskirti iš mėginių *Gardnerella* kamienus, nustatyti jų virulentinius veiksnius bei veiksmų raiškos skirtumus molekuliniuose šios bakterijos potipiuose ir įvertinti galimą potipių sąsają su sveika ir BV būkle.

3.1. Tiriamoji moterų grupė ir ėminiai

Makšties ėminiai buvo surinkti iš 116 moterų, kurios kreipėsi į ginekologijos klinikas Vilniuje ir Marijampolėje. Visos dalyvės pasirašė rašytinį sutikimą dalyvauti biomedicininame tyrime. Tyrimo dalyvės buvo pilnametės, amžius nuo 22 iki 53 metų, vidurkis 30,8 metai. Moterys kreipėsi į klinikas profilaktiniam patikrinimui (neturėjo skundų dėl lyties takų) arba dėl atsiradusių nusiskundimų, tokių kaip neįprastos, blogo kvapo, pagausėjusios makšties išskyros, niežulys, deginimo jausmas ir pan. Visos dalyvės užpildė klausimynus apie vartojamas kontraceptines priemones, menstruacinio ciklo dieną ir makšties infekcijų dažnumą. Moterys nebuvo įtrauktos į tyrimą, jeigu kraujavo, nustatyta ŽIV infekcija, buvo gydytos antibiotikais mažiau nei 14 dienų iki ėminių paėmimo. Gydytojas akušeris–ginekologas apžiūros metu stebėjo ir užrašė klinikinius simptomus bei tyrimo dalyvių nusiskundimus.

Iš viso buvo surinktas 121 makšties ėminių komplektas: iš 111 moterų po vieną ir iš 5 moterų po du (su 3–6 mėnesių pertrauka). Buvo surinkti šie ėminiai: 1) DNR išskyrimui, 2) *Gardnerella* izoliavimui pasėlio metodu ir 3) makšties tepinėlis ant mikroskopinio stiklelio Nugent vertės (NS) nustatymui mikroskopuojant. Dviejų moterų ėminiai dėl jų nepakankamos kokybės mikroskopiniam vertinimui buvo atmesti.

Keturios tyrimo dalyvės buvo nėščios (nuo 16 iki 34 savaitės). Iš 106 moterų, praneusių apie menstruacinį ciklą, 45 (42,5%) buvo folikulinėje menstruacijų fazėje. Trys moterys pranešė, kad turi premenopauzinius ciklo sutrikimus. Šešiasdešimt šešios moterys pranešė, kad makšties infekcijos joms kartojasi dažnai, 11 moterų jog infekcijos yra retos. Geriamus kontraceptikus

vartojo 21 tyrimo dalyvė, intrauterines spirales turėjo 3 dalyvės, 1 naudojo makšties kontraceptinį žiedą.

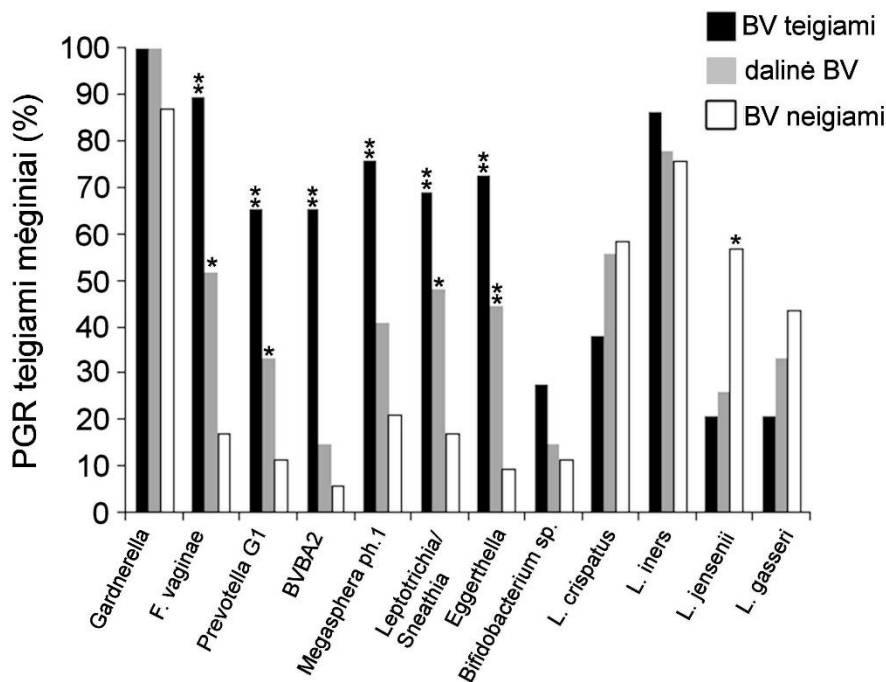
3.2. Makšties ėminių mikrobiotos apibūdinimas pagal bakterijų rūšis

Norint įvertinti bakterijos *Gardnerella* ir jos potipių genetines bei fenotipines savybes, svarbu charakterizuoti bakterijos šaltinį – makšties mikrobiotą – atskiriant sveiką ir BV būklės. Šiame darbe BV buvo diagnozuota, remiantis Amsel kriterijais (Amsel et al., 1983) ir makšties išskyrų mikroskopiniu vertinimu pagal Nugent et al. (1991) bei JAV CDC (Muzny et al., 2022) ir Europos IUSTI/WHO (Sherrard et al., 2023) rekomendacijomis. Iš 119 ėminių, 10 ėminių buvo neįtraukti į tolimesnę analizę, nes pagal Amsel kriterijus ir tepinėlio NS vertę, makšties mikrobiotos pokyčių nebuvo galima priskirti BV. Moterų makšties mėginiai taip pat charakterizuoti aptinkant PGR būdu su BV siejamas septynias anaerobines bakterijas ir keturias laktobacilų rūšis, kaip aprašyta Fredricks et al. (2007). Kadangi mišrios infekcijos gali maskuoti arba imituoti BV būklę (Sobel et al., 2013), mėginiuose buvo nustatyta *Candida* kolonizacija/infekcija pasėlio metodu ir PGR, taip pat septyni lytiškai plintantys patogenai kokybine qPGR. *Gardnerella* priklauso *Bifidobacteriaceae* šeimai ir siekiant išvengti klaidingai teigiamų PGR rezultatų, *Bifidobacterium* spp. papildomai nustatyta pagal *tuf* geno seką.

Iš 109 makšties mėginių 29 (24,4%) buvo klasifikuoti BV teigiamais, remiantis Amsel kriterijais ir Nugent verte (NS 7-10). BV teigiamuose mėginiuose, atliekant 7-ias nepriklausomas kokybines PGR reakcijas, kiekvienam mėginiui gautos vidutiniškai 5,7 teigiamos reakcijos, kurių taikiniai su BV siejamos anaerobinės bakterijos ir 1,7 teigiamos reakcijos keturioms *Lactobacillus* rūšims (3.1 pav.). *F. vaginae* buvo nustatyta 89,7% ir *Gardnerella* 100% BV teigiamų mėginių, kai specifiškumas atitinkamai buvo 83% (95% PI 70,2–91,9) ir 13,2% (95% PI 5,5–25,3). *Eggerthella*-tipo (GS 25,20; 95% PI, 7,37–86,19; $p < 0,001$), *Leptotrichia/Sneathia* (GS 10,86; 95% PI 3,75–31,51; $p < 0,001$) ir *Megasphaera ph.1* (GS 12; 95% PI, 4,08–35,31; $p < 0,001$) rūšys buvo susijusios su didele NS verte (7–10) (2S lentelė prieduose).

Iš keturių *Lactobacillus* rūšių, *L. jensenii* buvo rečiausiai aptinkama BV teigiamuose mėginiuose (GS, 0,2; 95% PI 0,07–0,57). Iš 29 BV teigiamų mėginių, aštuoniuose pasėlio metodu buvo išauginta *C. albicans*. Tokios pacientės, kurioms buvo nustatyta BV ir kandidozė, pranešė apie neįprastas makšties išskyras (8/8) ir niežulį (3/8). Trys iš 29 BV teigiamų moterų neįautė jokių simptomų.

BV neigiami (NS 0–3) buvo 53 (44,5%) mėginiai. Juose kiekvienam mėginiui, priešingai nei BV teigiamuose, buvo nustatyta vidutiniškai 1,8 teigiamų reakcijų anaerobinėms bakterijoms ir 2,3 teigiamų reakcijų *Lactobacillus* rūšims. Sveikoms pacientėms dažniausiai nustatomos bakterijų rūšys buvo *L. iners* (75,5%) ir *Gardnerella* (86,8%), ir *L. crispatus* (58,5%), *L. jensenii* (56,6%) ir *L. gasseri* (43,3%) (3.1 pav., 2S lentelė prieduose). Tarp BV neigiamų mėginių 18,9% (10 iš 53) pasėlio metodu buvo nustatyta kolonizacija *Candida*. Trys iš 10 minėtų moterų, nepranešė apie jokių simptomus, o 7 iš jų įvardino neįprastas makšties išskyras ir niežulį.

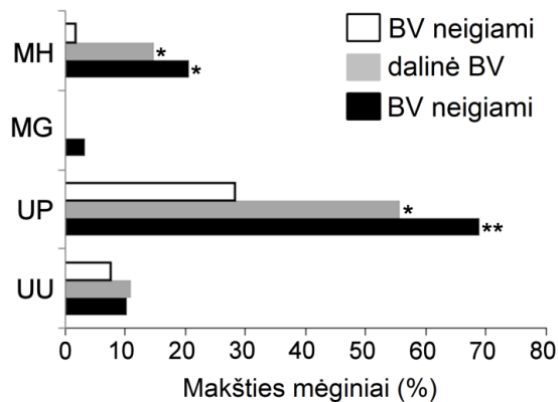


3.1 pav. Makšties mėginių (n=109) kiekis (%), kuriuose PGR būdu aptiktos bakterijų rūšys. BV teigiami (n=29), dalinė BV (n=27), BV neigiami (n=53) mėginiai. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Iš 109 tirtų ėminių, 27 (22,7%) priskirti daliai BV (NS 4–6). Juose mėginiui gauta vidutiniškai 3,5 teigiamų reakcijų anaerobinėms bakterijoms ir 1,9 teigiamų reakcijų laktobaciloms. Dažniausia aptinkamos bakterijos buvo *Gardnerella* (100%), *L. iners* (77,8%), *L. crispatus* (55,6%), *F. vaginae* (51,9%) ir *Leptotrichia/Sneathia* (48,2%). Kolonizacija *Candida* pasėlio metodu aptikta 2 (7,7%) ėminiuose.

Iš septynių lytinių kelių plintančių patogenų, *Ch. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *T. vaginalis*, *M. hominis* (MH), *M. genitalium* (MG), *U. urealyticum* (UU) ir *U. parvum* (UP), mėginiuose buvo aptiktos tik

Mollicutes bakterijos: MH, MG, UU ir UP. UP buvo nustatyta 46% visų mėginių. MH, UU ir MG buvo mažiau paplitę (atitinkamai 10,1%, 9,2% ir 0,92%). UP aptikimo dažnis statistiškai patikimai susijęs su NS 7–10 (GS 5,63; 95% PI 2,10–15,12; $p < 0,001$) (3.2 pav.). Didesnis UP paplitimas taip pat buvo aptiktas ir dalinės BV ėminiuose palyginus su BV neigiamais ėminiais (GS 3,17; 95% PI 1,21–8,32; $p = 0,027$). MH dažniau aptikta BV teigiamuose ėminiuose ($p = 0,007$). UU aptikimo dažnis buvo nesusijęs su didele NS verte (GS 1,41; 95% PCI 0,29–6,80; $p = 0,694$) (3.2 pav., 2S lentelė prieduose).



3.2 pav. *M. hominis* (MH), *M. genitalium* (MG), *U. parvum* (UP) ir *U. urealyticum* (UU) paplitimas BV teigiamuose ($n=29$), dalinės BV ($n=27$) ir BV neigiamuose ($n=53$) makšties mėginiuose * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$.

Tolimesnis *Gardnerella* potipių nustatymas atliktas šiuose charakterizuotuose makšties mėginiuose ($n = 109$): BV teigiami ($n = 29$), dalinės BV ($n = 27$) ir BV neigiami ($n = 53$).

3.3. *Gardnerella* aptikimas makšties ėminiuose

Žinios apie *Gardnerella* paplitimą sveikų ir sergančių BV moterų lyties takuose, taip pat daugėjantis skaičius BV diagnostikai naudojamų PGR metodų, paskatino įvertinti skirtingų PGR pradmenų, skirtų aptikti *Gardnerella* lyties takų mėginiuose, specifiškumą. Šios bakterijos nustatymui dažniausiai naudotos pradmenų poros: pradmenų GV1 ir GV3 taikinyje yra 23S rRNR koduojantis genas (Zariffard et al., 2002), pradmenų cpn-For ir cpn-Rev taikinyje yra *cpn60* genas (Menard et al., 2008), o pradmenų Gvag 644F ir Gvag 851R taikinyje yra 16S rRNR koduojantis genas (Fredricks et al., 2007). Šiame darbe *Gardnerella* nustatymui buvo sukurti pradmenys (VLY-

585F ir VLY-1334R) skirti geno *vly*, koduojančio toksiną vaginoliziną, fragmento (749 bp) amplifikavimui. Pradmenų, kurių taikinyis yra *vly*, specifiškumas buvo tikrintas, naudojant gDNR, išskirtą iš 17 *Gardnerella* kamienų, *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *B. bifidum*, *S. intermedius*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* ir žmogaus chromosominės DNR. Kryžminių reakcijų su negiminingais *Gardnerella* kamienais nebuvo aptikta. PGR produktas buvo nustatytas visuose *Gardnerella* kamienuose, taip pat ir ATCC 14018 kamienne. Tyrimo specifiškumas buvo patvirtintas amplifikuoto PGR produkto sekoskaita.

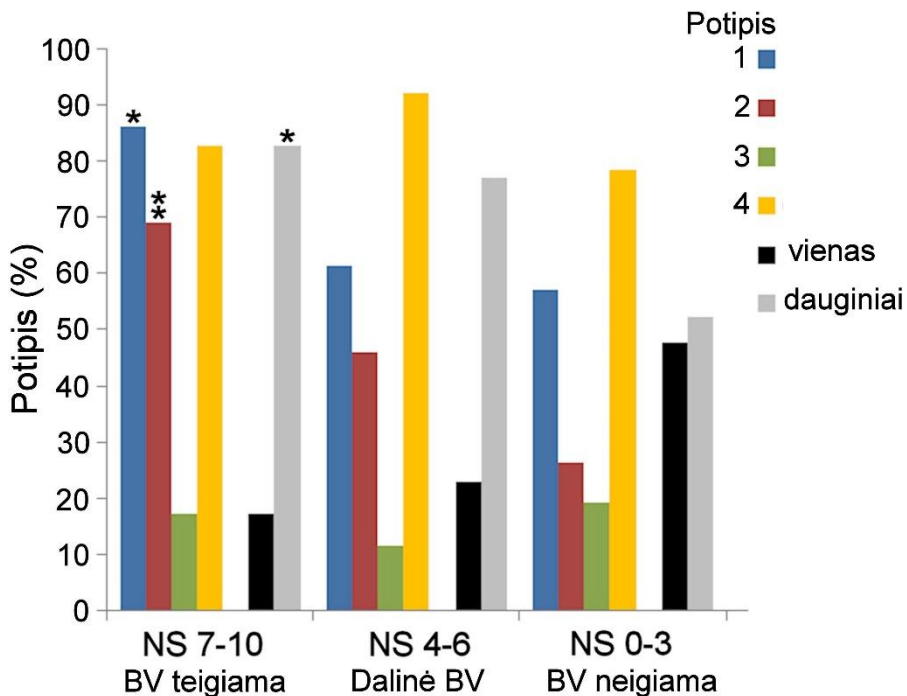
gDNR, išskirta iš 91 makšties mėginio (001S1–064S1, 093S1–0116S1, 005S2, 008S2 ir 028S2), buvo panaudota *Gardnerella* aptikimui, panaudojant keturias pradmenų poras. Iš šių mėginių, 59 (64,8%) buvo teigiami, panaudojus *cpn60* PGR, 42 (46,2%) mėginių – 23S rRNR PGR, 83 (91,2%) mėginių – 16S rRNR PGR ir 79 (86,8%) mėginių – *vly* PGR (3S lentelė prieduose). Atitikimas tarp *vly* PGR ir 16S rRNR PGR buvo vidutinis ($\kappa = 0,55$), o *vly* PGR ir 23S rRNR PGR buvo silpnas ($\kappa = 0,23$). Be to, 75 iš 91 (82,4%) makšties ėminio buvo identifikuoti *Gardnerella* potipiai. Taigi, *Gardnerella* nustatymas, panaudojant įvairius pradmenis rodo, kad kai kuriuose tyrimuose aptiktas nedidelis *Gardnerella* paplitimas sveikų moterų lyties takuose PGR metodu (Zariffard et al., 2002; Vitali et al., 2015) gali priklausyti ne tik nuo moterų etninės kilmės ar pacienčių grupės/kohortos, bet ir nuo pasirinkto PGR taikinio.

3.4. *Gardnerella* potipių nustatymas makšties ėminiuose

Gardnerella potipių (Ahmed et al., 2012) identifikavimui nekultivuotuose makšties mėginiuose buvo panaudotas PGR, kurio taikiniai yra potipiui (*angl.* clade) būdingi genai, kaip aprašyta Balashov et al. (2016).

Iš visų 102 *Gardnerella* teigiamų mėginių, penki buvo neigiami visoms potipiui būdingoms PGR reakcijoms. Iš šių mėginių išauginti *Gardnerella* kamienų taip pat nepavyko. Didžioji dauguma mėginių turėjo daugiau kaip vieną *Gardnerella* potipį įvairiais deriniais (3.3 pav., 4S lentelė prieduose).

Trys potipiai (1, 3 ir 4) buvo aptikti kaip mėginyje esantis vienintelis (*angl.* single) potapis. Potapis 2 buvo rastas tik dauginėse (*angl.* multiple) potipių bendrijose, išskyrus vienintelį 093S1mėginį, kurio NS 2. Potapis 4 (79,4%) ir 1 (63,7%) buvo aptinkami dažniausiai, potapis 2 aptiktas 42,2% ir potapis 3 – 15,7% ėminių. Dauginiai *Gardnerella* potipiai makšties ėminiuose buvo statistškai reikšmingai susiję su $NS \geq 4$ (GS 3,64; 95% PI 1,48–8,91; $p = 0,005$) (3.3 pav.).



3.3 pav. *Gardnerella* potipių pasiskirstymas, nurodant vieno ir dauginių potipių kiekius procentais BV teigiamuose (n=29), dalinės BV (n=27) ir BV neigiamuose (n=46) makšties mėginiuose. * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$.

Rečiausiai aptinkamas potipis 3 (15,7%) yra beveik tolygiai pasiskirstęs tarp BV teigiamų, dalinės BV ir BV neigiamų ėminių (3.3 pav.). Daugiausiai paplitęs potipis 4 nebuvo statistiškai reikšmingais susijęs su BV (NS 7–10) (GS 1,31; 95% PI 0,39–4,41; $p = 0,767$), o potipis 2 buvo dažniausiai aptinkamas mėginiuose, kurių NS 7–10 (GS 6,26; 95% PI 2,20–17,81; $p < 0,001$). Buvo nustatyta statistiškai reikšminga ir potipio 1 sąsaja su BV (NS 7–10) (GS 4,69; 95% PI 1,38–15,88; $p = 0,010$), nors jis buvo nustatytas atitinkamai 61,5% ir 57,1% dalinės BV ir BV neigiamuose ėminiuose (3.3 pav., 5S lentelė prieduose.).

3.5. *Gardnerella* kamienų išskyrimas iš makšties mėginių ir jų genotipavimas į potipius

Gardnerella kamienai iš makšties ėminių buvo išskirti pasėlio metodu. Ėminys iš Amies terpės su anglimi buvo sėjamas ant dviejų GAR lėkštelių, kurios buvo inkubuojamos 5% CO₂ ir anaerobinėje atmosferoje. Toks dvigubas išsėjimas neleidžia prarasti bakterijos kamienų, kurių tolerancija deguoniui gali būti skirtinga. Auginant anaerobinėmis sąlygomis aiškiau

matoma β -hemolizė ant GAR lėkštelių. Inkubacija 5% CO₂ atmosferoje svarbi dėl galimo gausaus kitų anaerobinių bakterijų augimo griežtai anaerobinėmis sąlygomis, kuris užmaskuotų *Gardnerella* kolonijas.

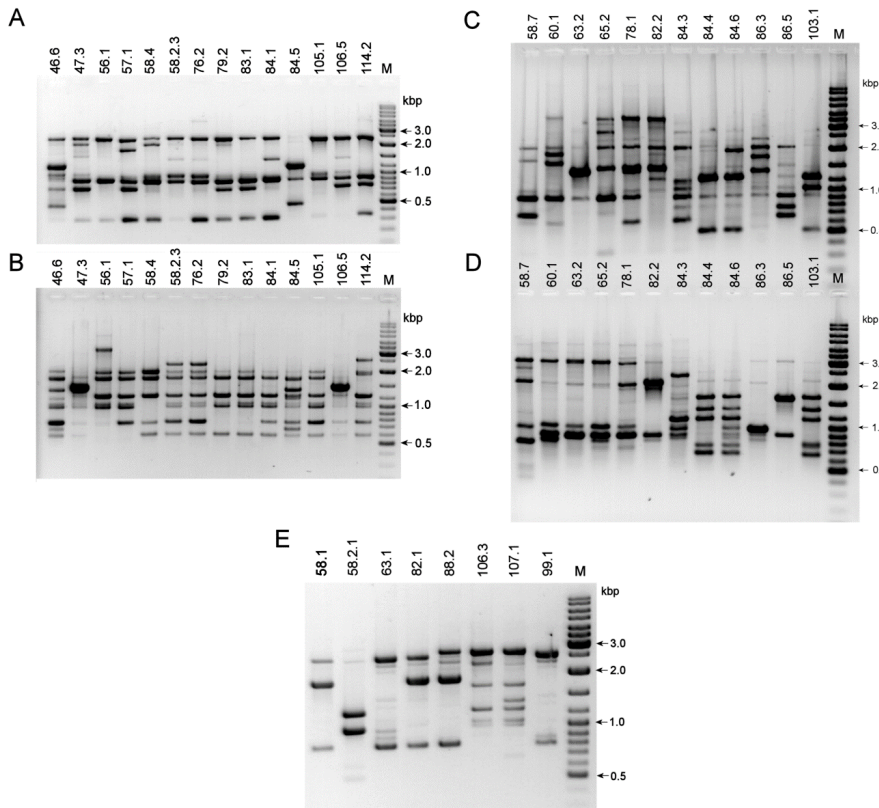
Gardnerella kamienai buvo išauginti iš 27 makšties mėginių su įvairia NS verte. Kamienai atrinkti iš vienos atskiros kolonijos. *Gardnerella* identifiikuota pagal kolonijų morfologiją, β -hemolizę ir 16S rRNR geną koduojančią seką (tapatumas referentinių kamienų atitinkamo geno nukleotidų sekai $\geq 98,5\%$). Kamienai iš atskirų kolonijų buvo genotipuoti, panaudojant potipiams būdingus pradmenis PGR būdu. Iš mėginių buvo išskirti potipių 1, 2 ir 4 kamienai. Potipio 3 kamienų išauginti nepavyko. Iš devynių makšties mėginių buvo išauginti keliems potipiams priklausantys kamienai (6S lentelė prieduose). Nustatyti potipiai, atitiko tiesiogiai ėminyje nustatytų potipių derinius su dviem išimtimis: i) potipis 1 buvo aptiktas 070S1 ėminyje, bet keturi kamienai išauginti iš šio mėginio priklausė potipiui 2; ii) iš 058S2 mėginio išskirtas potipio 2 kamienas, tačiau šis potipis nebuvo nustatytas mėginyje.

Kai kuriems *Gardnerella* kamienams potipio nustatyti nepavyko. Ėminyje 086S1 (NS 6) buvo nustatyti visi keturi potipiai ir vienas nežinomo potipio kamienas. Tai reiškia, kad potipių yra daugiau nei manyta (Ahmed et al., 2012; Malki et al., 2016).

3.6. *Gardnerella* kamienų suskirstymas į potipius bei rūšis

Buvo išskirta virš 60 *Gardnerella* kamienų iš 27 makšties mėginių, tačiau ne visi kamienai buvo gyvybingi. Tolimesniam tyrimui buvo pasirinkti iš 23 mėginių išauginti 34 *Gardnerella* kamienai: keturiolika priklausančių potipiui 1, vienuolika – potipiui 2, aštuoni – potipiui 4 ir vienas nežinomo potipio kamienas (Nr. 86.1).

Skirtingų potipių kamienai buvo išauginti iš septynių makšties ėminių (6S lentelė prieduose). Iš 058S1 ėminio pavyko išauginti kamienus, kurie priklausė trimis potipiams, aptiktiems tiesiogiai nekultivuotame makšties mėginyje PGR metodu. Iš 084S1 (potipio 1: 84.1 ir 84.5; potipio 2: 84.4 ir 84.6) ir 086S1 (potipio 2: 86.3 ir 86.5) mėginių buvo išauginta po kelis to paties potipio kamienus, o RAPD analizė patvirtino, kad tai genetiškai skirtingi kamienai (3.4 pav.).



3.4 pav. *Gardnerella* kamienų RAPD profiliai. Potipis 1 (A ir B); potipis 2 (C ir D); potipis 4 (E). Profiliai gauti, naudojant pradmenis 3G-1F (A, C) ir G5-1F (B, D, E). Nuotraukų viršuje nurodyti kamienų numeriai. M – DNR fragmentų ilgio standartas (Gene Ruler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific).

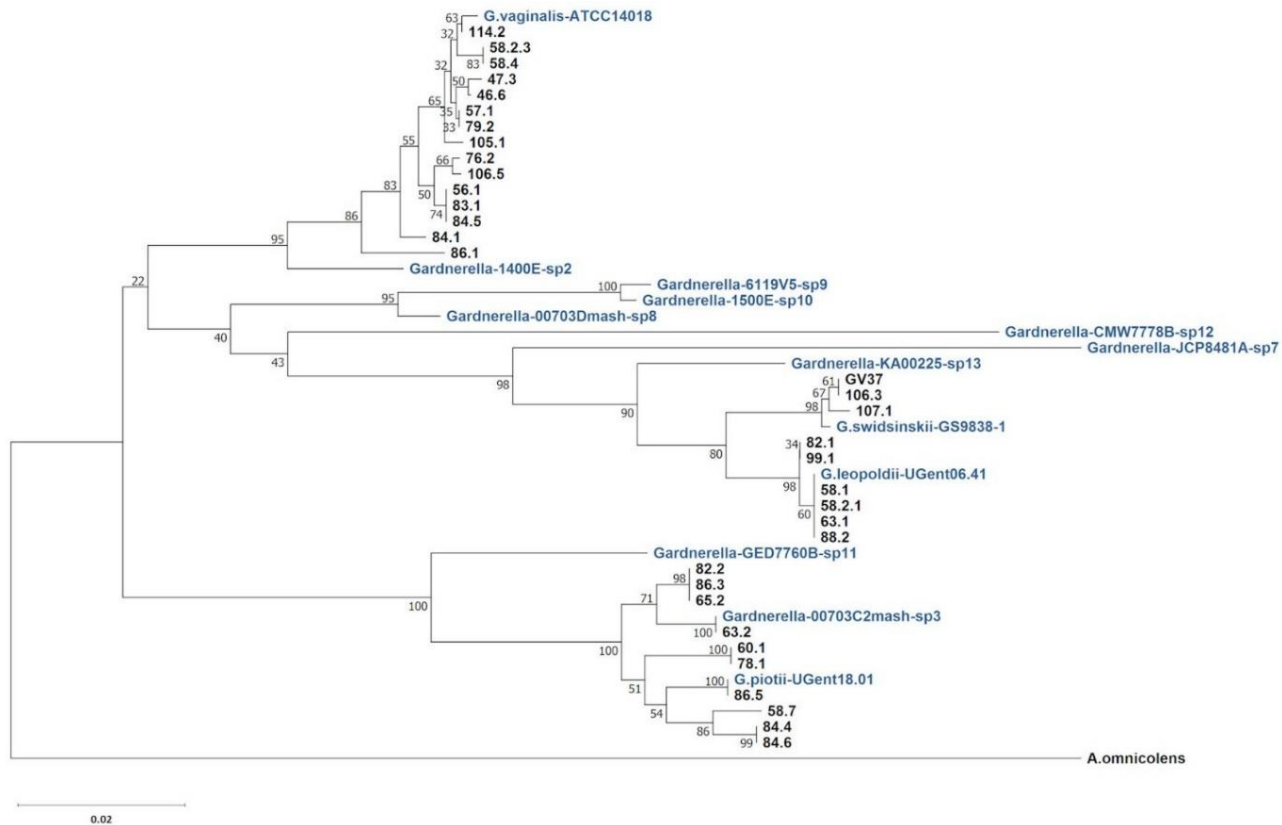
Visų kamienų priklausymas *Gardnerella* buvo patvirtintas 16s rRNA koduojančio geno sekoskaita. Du kamieniai (99.1 ir 105.1) buvo išskirti iš sveikų moterų makšties ėminių (NS 3). Kiti kamieniai buvo iš ėminių, kurių $NS \geq 4$ (6S lentelė prieduose).

Į *Gardnerella* kamienų kolekciją, siekiant padidinti potipo 4 kamienų skaičių, buvo įtrauktas GV37 kamienas, gautas iš Dr. Jacques Tankovic (Paryžiaus Saint-Antoine ligoninė, Mikrobiologijos skyrius). Tačiau šis kamienas nebuvo įtrauktas į statistinę analizę, skirtą sugrupuoti kamienus į klasterius pagal jų fenotipines savybes. GV37 kamienas buvo išskirtas iš devyniolikmetės pacientės kraujo pasėlio, kuriai diagnozuota encefalopatija. Gydytojai aiškinosi staigios encefalopatijos priežastis, bet neaptiko nei metabolinių ar imunologinių nukrypimų, nei virusinės infekcijos, todėl manytina, jog ligos priežastis buvo *Gardnerella* infekcija, ypač kai prieš patenkant į ligoninę pacientė turėjo nusiskundimus dėl lyties takų. Siekiant

įsitikinti, jog iš Saint-Antoine ligoninės atsiųsta bakterija yra *Gardnerella*, kamienas buvo padaugintas ir nustatyta 16S rRNR koduojanti seka, kuri buvo 100% identiška *G. vaginalis* 409-05 (Gene bank No. NC_013721). Buvo atlikta šio kamieno viso genomo sekoskaita, sekoskaitos duomenys buvo išanalizuoti Dr. A. Timinsko (VU GMC BTI), ir seka paskelbta Genų banke (Gene bank no. CP019058). *Gardnerella* bakteremijos su neurologiniais simptomais atvejis, įskaitant izoliato charakterizavimą buvo aprašytas kartu su su prancūzų kolegomis kaip atvejo analizė (*angl.* Case report, Tankovic et al., 2017).

Kintant *Gardnerella* taksonomijai ir skirstant gentį jau ne tik į potipius, bet ir į rūšis ir genomo rūšis (Vaneechoute et al., 2019), buvo ieškoma būdų, kokiais nesudėtingais metodais šias rūšis identifikuoti. Atskyrimas pagal 16s rRNR sekas yra nepakankamas dėl jų didelio panašumo (>98,5%) tarp rūšių. Hill et al. (2019) panaudojo dalinę (552 bp) šaperonino *cpn60* seką (*cpn60* UT) kaip paprastą ir greitą *Gardnerella* suskirstymo į rūšis metodą. Šiame darbe, prisitaikant prie taksonomijos pokyčių, buvo nustatytos tiriamųjų *Gardnerella* kamienų *cpn60* UT sekos ir sudarytas šių kamienų filogenetinio giminingumo medis (darbą atliko Dr. A. Bulavaitė, VU GMC BTI), įtraukiant referentinius skirtingų rūšių ir vadinamųjų genomo rūšių (*angl.* genome species) kamienus (Vaneechoute et al., 2019), kaip aprašyta Hill et al. (2019) (3.5 pav.).

Keturiolika kamienų, kurie priklausė potypiui 1, ir referentinis *G. vaginalis* (ATCC 14018) kamienas buvo toje pačioje medžio šakoje. Potipio 2 kamienai sugrupuoti su referentiniu *G. piovii* kamieniu, nors keturi (63.3, 65.2, 82.2 ir 86.3) šios grupės kamienai ir genomo rūšis 3 sudarė atskirą pogrupį. Potipio 2 kamienų diferencijacija į *G. piovii* rūšį ir genomo rūšį 3 atitiko Hill et al. (2019) ir Vaneechoute et al. (2019) rezultatus. Šeši potipio 4 kamienai sugrupuoti su referentiniu *G. leopoldii* kamieniu (UGent 06.41), o trys kamienai (106.3, 107.1 ir GV37) sugrupuoti su *G. swidsinskii* referentiniu kamieniu. Nenustatyto potipio izoliatas 86.1 pagal *cpn60* UT analizę priskirtas *G. vaginalis* rūšiai. 3.1 lentelėje pateikta kamienų priskyrimas potypiui ir rūšiai. Kitos rūšys/genomo rūšys tarp išaugintų kamienų nebuvo aptiktos. Kamienų rūšinė priklausomybė vėliau nustatyta MALDI-TOF masių spektrometrijos būdu, kurį atliko kolega T. Maier iš Brukers Daltonik GmbH (Bulavaite et al., 2021). MALDI-TOF metodu buvo galima atskirti tik filogenetiškai skirtingas rūšis, sudarytas iš *G. vaginalis/G. piovii* ir *G. leopoldii/G. swidsinskii*.



3.5 pav. Filogenetinis *Gardnerella* kamienų sąryšys pagal *cpn60* UT sekas. Įtraukti referentiniai *G. vaginalis*, *G. piovii*, *G. swidsinskii*, *G. leopoldii* rūšių, devynių genomo rūšių kamieniai ir *Alloscardovia omnicolens* kamienas (pagal Bulavaite et al., 2021).

Gardnerella rūšių nustatymas ir jų aptikimas ėminiuose pagal *cpn60* seką išlieka populiariausiu metodu (Hill et al., 2019; Munch et al., 2024), nors jo skiriamoji geba nėra pakankama, ypač atskiriant panašias (pvz. *G. piovii*/genome sp. 3) ar rečiau aptinkamas rūšis (Munch et al., 2024). Nors Vannechoute et al. (2019) teigė, jog MALDI-TOF pavyko atskirti panašias rūšis, tokias kaip *G. swidsinskii* ir *G. leopoldii*, tačiau, kaip aprašyta anksčiau, Dr. T. Maiers, panaudojant MALDI-TOF iš Brukers Daltonik GmbH, atskirti šių rūšių nepavyko.

Toliau šiame darbe trisdešimt keturi skirtingų potipių *Gardnerella* kamienai buvo apibūdinti pagal jų virulentinį potencialą.

3.7. *Gardnerella* virulentiniai veiksniai ir jų pasiskirstymas potipiuose

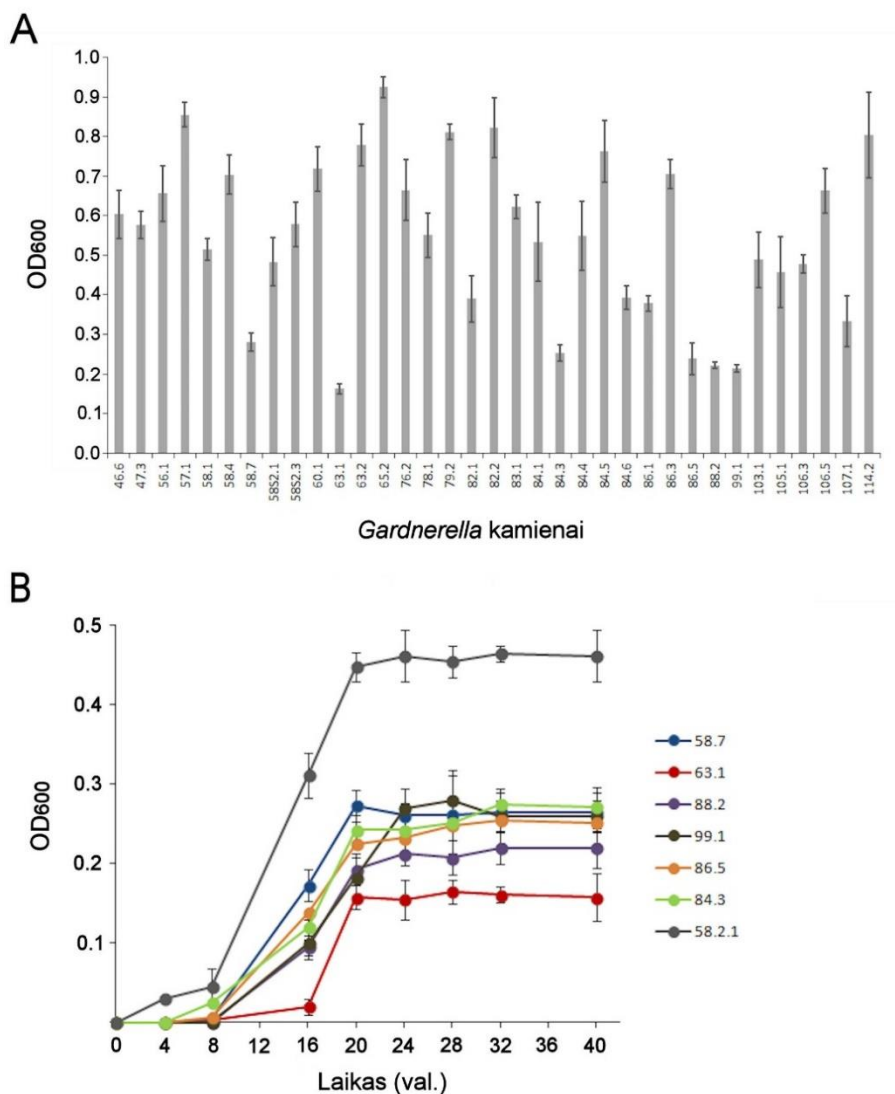
3.7.1. β -galaktozidazės aktyvumas *Gardnerella* potipiuose

β -galaktozidazė yra fermentas, kuris bakterijose dalyvauja laktozės skaldyme į paprastesnės struktūros cukrus, gliukozę ir galaktozę, kurie savo ruožtu skaldomi įvairiais metaboliniais keliais, ir taip gaunama ląstelėms reikalinga energija. β -galaktozidazės aktyvumas buvo nustatytas kalorimetriniu būdu, panaudojus ONPG substratą. Tik potipio 1 kamienai (*G. vaginalis*) turėjo šį fermentinį aktyvumą (3.1 lentelė). Nė vienas potipis 2 ir 4 kamienas neturėjo β -galaktozidazės aktyvumo, o tai atitinka Vannechoute et al. (2019) gautus duomenis.

Laktozė nėra β -galaktozidazės substratas makštyje. Šio fermento funkcija makštyje gali būti siejama su β -galaktozido (β -gal) jungčių mucinuose ir kituose šeimininko glikokonjugatuose skaldymu ir galaktozės gamyba. Tokiu būdu *Gardnerella* gauna prieigą prie gliukozės ir galaktozės, kurias suskaldžius gaunama energija. Taip prisidedama prie bakterijos augimo, naudojant šeimininko angliavandenius, ir skatinama šeimininko mucinų degradacija. Tuo tarpu *Gardnerella* potipiai, kurie neturi šio aktyvumo, priklauso nuo paprastųjų cukrų, gaunamų kaip kitų bakterijų veiklos produktų, ir pasižymi mažesniu mucinų degradacijos potencialu.

3.7.2. *Gardnerella* kamienų augimo kreivės

Inokuliuotą standartizuotą bakterijų KfV/ml kiekį ir po 24 val. inkubavimo pamatavus skystos terpės optinį tankį (OD_{600}), kamienų 58.7, 84.3 ir 86.5 (potipis 2), 63.1, 88.2 ir 99.1 (potipis 4) bakterijų kultūrų OD_{600} buvo mažesnis palyginus su kitais kamienais (3.6 pav. A).

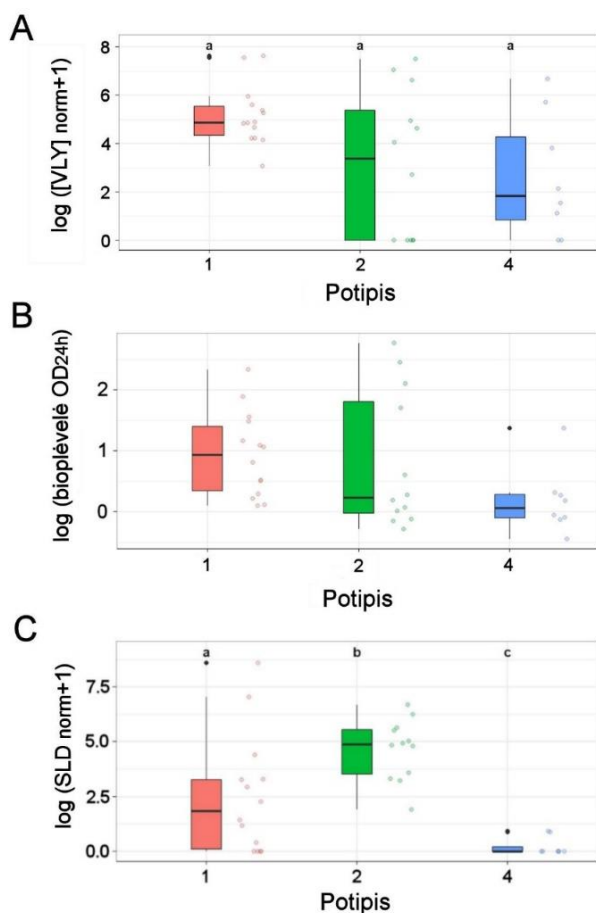


3.6 pav. (A) *Gardnerella* kamienų kultūros optinis tankis (OD₆₀₀) po 24 val. inkubacijos. Kiekvieno kamieno auginimas buvo atliktas tris kartus (nepriklausomi eksperimentai) su dviem techniniais pakartojimais. Paveiksle pateikti rezultatų vidurkiai ±SN. (B) Kamienų 58.7, 63.1, 86.5, 88.2 ir 99.1 augimo kreivės. 84.3 – kontrolinis kamienas. Augimo kreivės buvo gautos, atlikus du nepriklausomus eksperimentus su dviem techniniais pakartojimais. Paveiksle pateikti rezultatų vidurkiai ±SN.

Norint atmesti prielaidą, jog šiems kamienams reikia daugiau laiko, kad pasiektų stacionariąją augimo fazę, buvo gautos kamienų augimo kreivės (3.6 pav. B). Stacionariąją augimo fazę šie izoliatai pasiekdavo kaip ir kiti 20-24 augimo valandą (3.6 pav. B).

3.7.3. Toksino vaginolizino sekrecija *Gardnerella* potipiuose

Vaginoliziną koduojantis genas *vly* buvo aptiktas visuose potipio 1 ir 4 kamienuose (3.1 lentelė). Šio geno neturėjo penki iš vienuolikos potipio 2 (tik *G. piovii* rūšies) kamienų ir 86.1 nenustatyto potipio kamienas, kuris pagal *cpn 60* UT seką buvo įvardintas priklausantis *G. vaginalis* rūšiai. Siekiant išvengti klaidingai neigiamų *vly* aptikimo PGR būdu rezultatų, buvo amplifikuotos ir gretimos (*angl.* flanking) *vly* genui sekos (1S pav. prieduose).



3.7 pav. *Gardnerella* kamienų fenotipinių savybių analizė. (A) VLY koncentracija buvo normalizuota pagal kultūrų OD_{600} ir pažymėta log skalėje. (B) Bioplėvelių OD_{492} po 24 val. inkubavimo yra išreiškiamas kaip log OD. Sialidazės aktyvumas (C) normalizuotas pagal OD_{600} ir pažymėtas log skalėje. Individualias vertes žymi spalvoti apskritimai (atsitiktinai sudėlioti lygiagrečiai X ašiai kryptimi, siekiant išvengti persidengimo) ir apibendrinti kaip Tukey stiliaus stačiakampė diagrama. Diagrama riboja interkvartilės intervalą nuo 25 iki 75 procentilių. Diagramose esančios horizontalios linijos rodo medianą,

spalvota dėžutė apriboja atstumą nuo pirmojo (Q1) iki trečiojo (Q3) kvartilio dar vadinamą IQR. Nuokrypio smailės (*angl.* error bars) rodo diapazoną iki verčių, kurios nėra mažesnės nei $Q-1,5$ IQR ir ne didesnės nei $Q3+1,5$ IQR. Vertės, užeinančios už šių ribų, vaizduojamos juodais taškais. CLD raidės (*a*, *b*, *c*), kur nurodyta, virš stačiakampių diagramų yra apibendrinti porinių palyginimų rezultatai, gauti naudojant Games-Howell (A) ir Conover-Iman kriterijus (C). Bendra CLD raidė rodo, kad skirtumai tarp grupių, pažymėtų šia raide, yra statistiškai nereikšmingi.

Kamienų sekretuojamas VLY kiekis ELISA metodu buvo nustatyta supernatantuose po 24 val. augimo skystoje terpėje. Gautos VLY koncentracijos normalizuotos pagal bakterijų kultūrų OD₆₀₀ ir santykiniai VLY kiekiai palyginti tarp skirtingų potipių (3.7 pav. A). Bendras statistiškai reikšmingas santykinis VLY kiekio skirtumas tarp potipių buvo nustatytas naudojant *Welch F* testą ($F(2, 14.10) = 5,00, p = 0,023$). Tačiau vėlesnė *post-hoc* analizė neparodė jokių reikšmingų skirtumų tarp potipių porų (*Games-Howell* testas, potipis 1 vs. potipis 2: $t(14,15) = 2,16, p = 0,112$, vidutinis skirtumas 2,04, 95% PI -0,42 - +4,50); potipis 1 vs. potipis 4: $t(9,00) = 2,66, p = 0,026$, vidutinis skirtumas 2,54, 95% PI -0,13 - +5,20; potipis 2 vs. potipis 4: $t(16,98) = 0,40, p = 0,916$, vidutinis skirtumas 0,50, 95% PI -2,72 - +3,72). Individualių *Gardnerella* kamienų VLY sintezės lygis pateiktas 3.1 lentelėje.

3.7.4. *Gardnerella* potipių formuojamos bioplėvelės

Buvo parodyta, jog kai kurių *Gardnerella* kamienų bioplėvelių susidarymas gali priklausyti nuo inkubacijos laiko (Machado & Cerca, 2015), todėl izoliatų gebėjimas formuoti bioplėveles vertintas BHIs terpėje po 24 ir 48 val. inkubacijos 96 šulinėlių plokštelėje. Tačiau gebėjimas formuoti bioplėvelę statistiškai reikšmingai nesiskyrė (porinių mėginių *t*-testas, $t(35) = 0,057, p = 0,955$). Lyginant suformavimo skirtumus tarp skirtingų potipių, reikšmingų skirtumų taip pat nebuvo nustatyta, nei po 24 val. (*Kruskal-Wallis* testas, $H(2) = 6,50, p = 0,059$), nei po 48 val. ($H(2) = 3,34, p = 0,188$) inkubavimo (3.7 pav. B). Individualių kamienų gebėjimas formuoti bioplėveles pateiktas 7S lentelėje Prieduose ir 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. *Gardnerella* kamienų charakteristikos

Izoliato Nr.	Potipis	Vaginolizinas		Bioplėvelės formuotojas	Sialidazės aktyvumas		Sialidazės genai			Rūšis (pagal <i>cpn 60</i> UT)
		<i>vly</i> genas	Sintezės lygis		Kokybiniu metodu	Kiekybiniu metodu	<i>nanH1</i> (<i>sldA</i>)	<i>nanH2</i>	<i>nanH3</i>	
46.6	1	+	132,7±20,9	Silpnas	–	0	+	–	–	<i>G. vaginalis</i>
47.3	1	+	125,6±7,9	Silpnas	+	9450±305	+	–	+	<i>G. vaginalis</i>
56.1	1	+	270,3±6,6	Stiprus	–	0	+	–	–	<i>G. vaginalis</i>
57.1	1	+	381,2±36,6	Silpnas	–	30±6	+	–	–	<i>G. vaginalis</i>
58.2.3	1	+	2062,5±147,9	Vidutinis	–	0	+	–	+	<i>G. vaginalis</i>
58.4	1	+	1900,8±89,7	Vidutinis	+	1628±70	+	–	+	<i>G. vaginalis</i>
76.2	1	+	61,9±2,9	Stiprus	–	13±2	+	–	–	<i>G. vaginalis</i>
79.2	1	+	20,7±4,5	Vidutinis	–	0	+	–	–	<i>G. vaginalis</i>
83.1	1	+	126,8±25,4	Silpnas	–	5±1	+	–	–	<i>G. vaginalis</i>
84.1	1	+	105,0±24,9	Silpnas	–	4±1	+	–	–	<i>G. vaginalis</i>
84.5	1	+	67,4±9,8	Vidutinis	–	24±4	+	–	–	<i>G. vaginalis</i>
86.1	–	–	0	Vidutinis	–	0	+	–	–	<i>G. vaginalis</i>
105.1	1	+	68,0±5,3	Silpnas	–	0	+	–	–	<i>G. vaginalis</i>
106.5	1	+	213,6±21,5	Stiprus	+	121±7	+	–	+	<i>G. vaginalis</i>
114.2	1	+	192,2±25,2	Stiprus	–	36±2	+	–	–	<i>G. vaginalis</i>
58.7	2	–	0	Neformuoja	+	525±28	+	+	+	<i>G. piovii</i>
60.1	2	+	101,5±5,1	Stiprus	–	34±3	+	–	+	<i>G. piovii</i>
63.2	2	+	1809,8±161,3	Stiprus	+	362±158	+	–	+	<i>genome sp. 3</i>
65.2	2	+	1151,6±12,7	Neformuoja	+	867±54	+	–	+	<i>genome sp. 3</i>
78.1	2	+	141,0±32,6	Silpnas	+	250±68	+	–	+	<i>G. piovii</i>
82.2	2	+	56,6±4,7	Stiprus	+	43±18	+	–	+	<i>genome sp. 3</i>
84.4	2	–	0	Silpnas	+	455±126	+	+	+	<i>G. piovii</i>

Izoliato Nr.	Potipis	Vaginolizinas		Bioplēvelēs formuotojas	Sialidazēs aktyvumas		Sialidazēs genai			Rūšis (pagal <i>cpn 60</i> UT)
		<i>vly</i> genas	Sintezēs lygis		Kokybiniu metodu	Kiekybiniu metodu	<i>nanH1</i> (<i>sldA</i>)	<i>nanH2</i>	<i>nanH3</i>	
84.6	2	–	0	Silpnas	+	317±40	+	+	+	<i>G. piovii</i>
86.3	2	+	743,8±49,2	Stiprus	+	727±41	+	–	+	<i>genome sp. 3</i>
86.5	2	–	0	Silpnas	+	550±24	+	+	–	<i>G. piovii</i>
58.1	4	+	3,71±0,33	Neformuoja	–	0	–	–	–	<i>G. leopoldii</i>
58.2.1	4	+	2,0±0,2	Neformuoja	–	0	–	–	–	<i>G. leopoldii</i>
63.1	4	+	0	Neformuoja	–	0	–	–	–	<i>G. leopoldii</i>
82.1	4	+	7,6±0,5	Neformuoja	–	0	–	–	–	<i>G. leopoldii</i>
88.2	4	+	0	Silpnas	–	0	–	–	–	<i>G. leopoldii</i>
99.1	4	+	44,1±12,3	Silpnas	–	0	–	–	–	<i>G. leopoldii</i>
106.3	4	+	797,8±90,9	Neformuoja	–	0	–	–	–	<i>G. swidsinskii</i>
107.1	4	+	298,8±28,5	Silpnas	–	0	–	–	–	<i>G. swidsinskii</i>
GV37	4	+	>800	nenustatyta	–	0	–	–	–	<i>G. swidsinskii</i>

3.7.5. Sialidazės aktyvumas

Dvi pradmenų poros buvo panaudotos NanH1(sialidazę A) koduojančio geno (*sld A*) aptikimui *Gardnerella* kamienuose. Visi potipio 4 kamienai (*G. leopoldii* ir *G. swidsinskii*) neturėjo *sld (nanH1)* geno, o kitų potipių/rūšių kamienai buvo *sld A* teigiami (3.1 lentelė). Daugėjant žinių apie *Gardnerella* sialidazes (Robinson et al., 2019), buvo nustatyti kitas dvi sialidazes, NanH2 ir NanH3, koduojantys genai. Potipio 4 (*G. swidsinskii* ir *G. leopoldii*) kamienai neturėjo *nanH2* ir *nanH3* genų (3.1 lentelė). Potipio 1 (*G. vaginalis*) kamienai neturėjo *nanH2* geno. Genas *nanH3* aptiktas beveik visuose potipio 2 ir nedidelėje dalyje potipio 1 kamienų.

Gardnerella sialidazės būna susijusios su bakterijos ląstelių paviršiumi arba sekretuojamos (Lewis et al., 2013), todėl, panaudojant fluorogeninį substratą MUN, buvo atliktas kokybinis, kai analizuojama ląstelių biomasė (*angl.* filter-spot test), ir kiekybinis sialidazės aktyvumo nustatymas kamienų supernatantuose.

Potipio 4 kamienai, kurie neturėjo *nanH1-nanH2-nanH3* genų, nerodė ir sialidazės aktyvumo, panaudojus kokybinį bei kiekybinį nustatymo metodus (3.1 lentelė). Nors *nanH1* buvo aptiktas visuose potipio 1 kamienuose, sialidazės aktyvumas buvo nustatytas tik kamienuose ($n=3$), kurie kodavo NanH3, išskyrus kamieną 58.2.3, kuris turėjo *nanH3* geną. Nė vienas šio potipio kamienų neturėjo *nanH2* geno. Visi potipio 2 kamienai, išskyrus 86.5, kurie pasižymėjo sialidazės aktyvumu, turėjo ir *nanH2* ir/arba *nanH3* genus.

Sialidazės aktyvumo skirtumai tarp potipių, nustatyti pagal *Kruskal-Wallis* kriterijus, yra statistiškai reikšmingi, $H(2) = 17.60, p < 0.001$ (3.7 pav. C). Tolesnė *post hoc* analizė, naudojant *Conover-Iman* kriterijus patvirtino, kad sialidazės aktyvumas skiriasi tarp visų trijų potipių (potipis 1 vs. potipis 2: $t = 3.37, p = 0.004$; potipis 1 vs. Potipis 4: $t = 2.92, p = 0.006$; potipis 2 vs. Potipis 4: $t = 5.74, p < 0.001$). Duomenys, pateikti 3.7 pav. C, parodė, kad 2 potipio sialidazės aktyvumas yra didžiausias.

3.8. Statistinė *Gardnerella* potipių fenotipinių savybių analizė

Siekiant aptikti *Gardnerella* potipiams būdingas (arba nebūdingas) fenotipines charakteristikas (savybes, požymius), kurios tyrinėtoms šiame darbe, buvo naudojamos skirtingos statistinės analizės, kurios atsakė į skirtingus klausimus. Koreliacinė analizė (Spearman) ieškojo ryšio tarp fenotipinių savybių (požymių), siekiant atsakyti į klausimą: jei vienos fenotipinės savybės raiška yra didelė, tai kitos raiška taip pat didelė (ar maža).

Ši analizė parodo ar savybės yra tarpusavyje biologiškai susijusios (pvz. šios savybės dažnai pasireiškia kartu, nepriklausomai nuo rūšies), bet nenurodo, kuri savybė apibrėžia kurią rūšį.

Klasifikacinė analizė, naudojant atsitiktinių miškų algoritmą (*angl.* random forests algorithm), kelia klausimą: ar gali fenotipinės savybės numatyti potipį: jei žinomas fenotipas ar galima teisingai atspėti potipį. Šioje analizėje savybės yra prediktoriai, o potipiai kaip rezultatas. Atsakoma į klausimus ar potipiai yra fenotipiškai atskiriami, kurios fenotipinės savybės yra naudingos atskyrimui (diskriminacijai) ir ar fenotipas apibrėžia aiškias potipių ribas. Atsitiktinių miškų algoritmas nurodo, kaip gerai galima klasifikuoti potipius pagal šias fenotipines savybes, bet ne kaip savybės yra tarpusavyje susijusios. Cohen κ (kappa) koeficientas atsako ar fenotipiniai modeliai sutampa su potipių grupavimu ne tik atsitiktinai (neatsitiktinai). Kadangi fenotipinės savybės turi lygius (pvz. bioplėvelių formuotojas – silpnas, vidutinis, stiprus; įvairaus lygio VLY raiška), o potipiai yra kategorijos, κ koeficiento naudojimas kaip tik tinkamas. Kuo didesnė κ reikšmė, tuo didesnė tikimybė, jog šis fenotipas linkęs pasitaikyti kartu su šiuo potipiu dažniau nei atsitiktinai tikėtasi.

Aglomeracinė hierarchinė klasterizacija (*angl.* hierarchical clustering, HC) sugrupuoja į natūralias grupes: potipius, fenotipo modelius, mišrias grupes. Jei į klasterį patenka potipis, tai fenotipinės savybės yra potipiui specifinės. Jei į klasterį patenka ne vienas potipis, tai fenotipas persikloja. Pagrindinių komponentų analizė (*angl.* principal component analysis, PCA) sumažina dauginius fenotipus iki 2-3 ir parodo, kurios fenotipinės savybės geriausiai paaiškina skirtumus tarp potipių. Jei potipis yra toli nuo PC1 kraštinės – tai su PC1 siejamas fenotipas yra svarbus šiam potipiui. Jei potipiai persikloja, tai rodo, jog fenotipas yra bendras abiem potipiams.

Taigi, apibendrinant, kiekvienas statistinės analizės komponentų atsako į šiuos klausimus:

- Spearman koreliacinė analizė: ar fenotipai tarpusavyje skiriasi.
- Atsitiktinių miškų algoritmas: ar fenotipas gali numatyti potipį.
- Cohen κ : ar fenotipas atitinka potipį neatsitiktinai.
- HC ir PCA: ar savybės natūraliai grupuojasi į klasterius ir koks fenotipas lemia skirtumus tarp potipių.

3.8.1. Fenotipinių savybių koreliacinė analizė

Buvo atlikta *Spearman's rank* koreliacinė analizė, siekiant nustatyti ryšį (*angl.* relationship arba association) tarp dviejų kintamųjų, kai kintamieji yra *Gardnerella* fenotipiniai požymiai: VLY produkcija, bioplėvelės formavimas

po 24 ir 48 val. inkubacijos ir sialidazės aktyvumas. Bioplėvelės (24 ir 48 val.) ir VLY kiekiai koreliavo statistiškai reikšmingai ($p < 0.05$, 3.2 lentelė). Sialidazės aktyvumas statistiškai reikšmingai nekoreliavo su kitomis savybėmis ($p \geq 0.05$, 3.2 lentelė).

3.2 lentelė. Spearman'o koreliacijos analizės rezultatai

Tirti požymiai	r_s^c	95%	95%	p
		PI _{apatinis}	PI _{viršutinis}	
Biolėvelė 24 h ^a vs. 48 h ^b	0,75	0,47	0,90	<0,001*
Biolėvelė 24 h vs. VLY produkcija	0,50	0,12	0,72	0,010*
Biolėvelė 48 h vs. VLY produkcija	0,43	0,02	0,69	0,039*
Biolėvelė 48 h vs. sialidazės aktyvumas	0,13	-0,26	0,47	>0,999
Biolėvelė 24 h vs. sialidazės aktyvumas	0,12	-0,22	0,42	>0,999
Sialidazės aktyvumas vs. VLY produkcija	0,10	-0,30	0,48	>0,999

Lentelėje eilės išdėliotos mažėjančia Spearman'o koreliacijos koeficiento tvarka

^aBioplėvelės storis matuotas OD₄₉₂ po 24 val. inkubavimo

^bBioplėvelės storis matuotas OD₄₉₂ po 48 val. inkubavimo

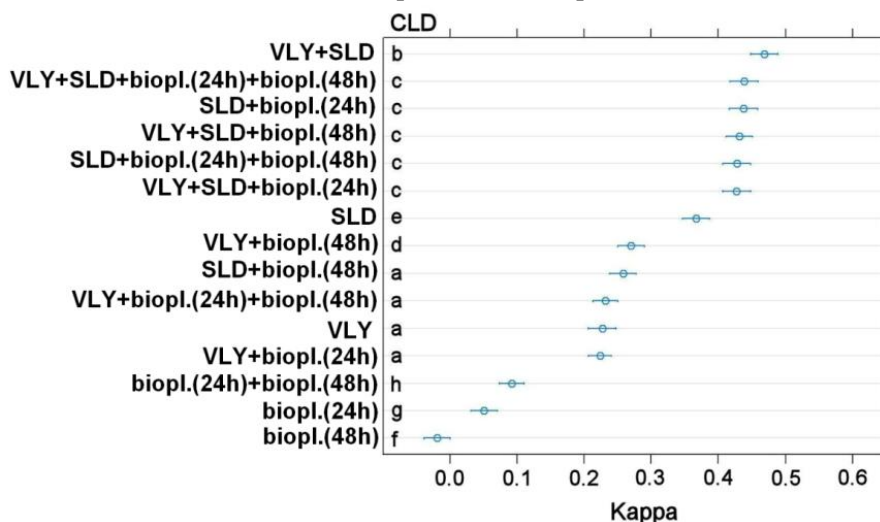
^cSpearman'o koreliacijos koeficientas.

*Statistiškai reikšminga koreliacija

3.8.2. Klasifikacinė analizė pagal fenotipines savybes

Ketrios fenotipinės savybės buvo ištirtos, kaip prognozuojančios *Gardnerella* potipį, naudojant atsitiktinių miškų algoritmą. Modelių, kuriose naudotas tik vienas prediktorius, klasifikacija buvo įvertinta taip: kai prediktorius – sialidazės aktyvumas, $\kappa = 0,37$ (95% PI 0,35-0,39), prediktorius – VLY kiekis, $\kappa = 0,23$ (95% PI 0,21-0,25), prediktorius – bioplėvelė po 24 val., $\kappa = 0,05$ (95% PI 0,03-0,07), prediktorius – bioplėvelė po 48 val. – $\kappa = -0,02$ (95% PI -0,04-0,00). Lyginant šiuos keturis modelius, κ verčių skirtumai tarp modelių porų buvo statistiškai reikšmingi (priklausomų imčių t kriterijus, $p < 0,05$). Visi modeliai, kuriuose sialidazės aktyvumas buvo įtrauktas kaip prediktorius, rodė geriausius rezultatus (žr. viršutinės eilutės 3.8 pav.). Didžiausia κ vertė (0,47, 95% PI 0,45-0,49) buvo gauta, naudojant VLY kiekio ir sialidazės aktyvumo kombinaciją. Naudojant šį prediktorių derinį, κ vertė statistiškai reikšmingai skiriasi nuo kitų kombinacijų, nes ji neturi bendrų CLD raidžių 3.8 pav. (priklausomų imčių t

kriterijus, $p < 0,05$ visais atvejais, kai nėra bendrų CLD raidžių). Klasifikacinės analizės rezultatai apibendrinti 3.8 pav.



3.8 pav. Klasifikacijos tikslumas išreikštas Cohen κ koeficientu. Modeliai išrikiuoti vidutinio κ koeficiento mažėjimo tvarka. Mėlyni apskritimai rodo vidutines reikšmes, paklaidų linijos -- 95% PI. VLY – vaginolizino kiekis; SLD – sialidazės aktyvumas; biopl. (24 h) – bioplėvelės po 24 val. inkubavimo; biopl. (48 h) – bioplėvelės po 48 val. inkubavimo. Porinių lyginimų priklausomų imčių Student t kriterijumi rezultatai apibendrinti kompaktiniu raidiniu žymėjimu (CLD).

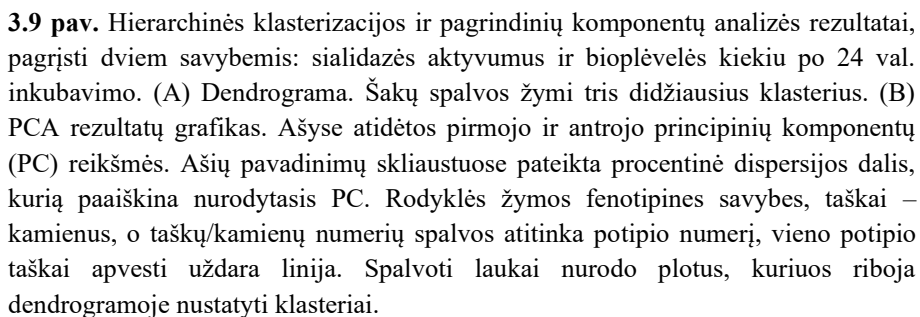
3.8.3. Klasterinė ir pagrindinių komponentų analizės

Fenotipinių savybių klasifikavimo analizės rezultatai tik iš dalies atspindi *Gardnerella* kamienų grupavimą. Todėl siekiant ištirti šios bakterijos kamienų susiskirstymo struktūrą pagal fenotipinius požymius, buvo atlikta aglomeracinė hierarchinė klasterizacija (HC) ir pagrindinių komponentų analizė (PCA). Pirmiausia, HC ir PCA buvo pagrįsta visomis keturiomis fenotipinėmis (skaitinėmis) savybėmis (1S aprašymas ir 2S pav. prieduose).

Tikėtina, kad atliekant klasterizaciją, trijų tarpusavyje susijusių savybių (bioplėvelė po 24 ir 48 val. inkubavimo bei santykinis VLY kiekis) teikiamos informacijos poveikis yra pervertintas (skaičiuojant Euklido atstumą laikoma, kad visi požymiai yra ortogonalūs, t. y. nepriklausomi, nors iš tiesų savybės koreliuoja), palyginus su informacija apie sialidazės aktyvumą, todėl pateiktas klasterizavimas nėra optimalus.

Siekiant išlyginti dviejų informacijos šaltinių poveikį, dvi iš trijų susietų savybių buvo atmestos ir buvo pasirinkta savybė, kuri derinyje su sialidazės aktyvumu, davė didžiausią *Calinski-Harabasz* (CH) indekso vertę. Taigi, paskutinis susiskirstymas buvo pagrįstas sialidazės aktyvumu ir bioplėvelės

A



Santykinės klasterių pozicijos pagal rodyklių kryptį analizė, pateikta 3.9 pav. parodė, kad klasteris C pasižymi mažu sialidazės aktyvumu, skirtingai nuo klasterių A ir B. Be to, klasteris B pasižymi mažesniu gebėjimu formuoti bioplėvelę nei klasteris A. Visi potipio 4 kamienai buvo klasteryje C, tuo tarpu potipio 1 kamienai pasiskirstė per visus tris klasterius. Visi potipio 2 kamienai priklauso klasteriams A ir B, išskyrus kamieną 84.3, kuris priklauso klasteriui C.

Gardnerella genotipinė įvairovė, kuri leido suskirstyti kamienus bent jau į keturis potipius ar trylika (genomo) rūšių, leidžia manyti, kad egzistuoja ir skirtumai tarp potipių virulentiškumo, kurio analizė iškėlė klausimą ar galima suskirstyti *Gardnerella* izoliatus pagal fenotipines savybes. Palyginus vieno prediktoriaus modelius pasirodė, kad trys potipiai gali būti geriausiai identifikuojami pagal sialidazės aktyvumą ($\kappa = 0,37$). Kitas geriausias požymis yra VLY produkcija ($\kappa = 0,23$). Bioplėvelės formavimo po 24 ir 48 val. klasifikavimo tikslumas artimas nuliui. Sialidazės aktyvumo ir santykinio VLY sekretuojamo kiekio kombinacija reikšmingai padidina klasifikavimo į potipius tikslumą ($\kappa = 0,47$). Tikslumo padidėjimas gali būti susijęs su tuo, kad koreliacija tarp VLY kiekio ir sialidazės aktyvumo yra statistiškai nereikšminga ($r_s = 0,10$, $p > 0,999$) ir dėl to galima manyti, kad šios dvi savybės perduoda skirtingo tipo informaciją apie *Gardnerella* potipius.

Tolimesnė statistinė duomenų analizė parodė, kad pagal tirtas fenotipines savybes potipiai 2 ir 4 yra labiausiai besiskiriantys. Potipis 4 yra labiausiai homogeniškas: visi šio potipio kamienai buvo rasti tame pačiame klasteryje, kuriam būdinga mažiausia visų fenotipinių savybių raiška. Priešingai, potipiai 1 ir 2 buvo heterogeniški: potipio 2 kamienai buvo daugiausia pasiskirstę tarp dviejų klasterių, o potipio 1 kamienai buvo aptikti visuose trijuose klasteriuose, kurie apibūdinami skirtingais fenotipinių savybių profiliais.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Pastaraisiais dešimtmečiais, naudojant nuo kultivavimo nepriklausomus naujos kartos sekoskaitos metodus ir specializuotas duomenų bazės (Ma et al., 2012; France et al., 2020; Lebeer et al., 2023), padaugėjo žinių apie moterų makšties mikrobiotos sudėtį, identifikuoti net nedideliais kiekiais aptinkami mikroorganizmai (France et al. 2022). Tačiau lieka neatsakytas klausimas, kokią funkcinę vaidmenį ekologinėje nišoje vaidina individualios bakterijos ar jų grupės. Nepakeičiamais objektais tokiuose tyrimuose išlieka kultivuoti bakterijų kamienai, jų fenotipinių ir genetinių savybių analizė bei bakterijų gyvavimo nišos, ėminio, charakteristika.

Po pirmųjų pamatinių tyrimų apie BV mikrobiotos bakteriją *Gardnerella* (Piot et al., 1982; Catlin, 1992), sekė darbai, kuriuose buvo identifikuojami jos virulentiniai veiksniai (Rottini et al., 1990; Cauci et al., 2003; Harwich et al., 2010). Tačiau nedaug buvo žinoma apie šios bakterijos genetiką, fiziologiją, kamienų skirtumus, įskaitant skirtumus tarp kamienų, aptinkamų BV ir sveikoje makšties mikrobiotoje. Pirmieji fenotipiniai ir genetiniai *Gardnerella* izoliatų tyrimai iš sveikų ir BV pacienčių makšties ėminių parodė, kad kamienai skiriasi β -galaktozidazės ir lipazės aktyvumu, gebėjimu hidrolizuoti hipurata (Piot et al., 1984; Briselden & Hillier, 1990), sialidazės aktyvumu (Santiago et al., 2011b), bioplėvelių formavimu (Patterson et al., 2010; Castro et al., 2016), toksino vaginolizino produkcijos lygiu (Pleckaityte et al., 2012). Buvo bandoma genetiškai diferencijuoti *Gardnerella* izolatus ir aptikti kamienus, pasižyminčius skirtingu virulentiniu potencialu (Ingianni et al., 1997; Aroutcheva et al., 2001; Pleckaityte et al., 2012; Jayaprakash et al., 2012; Schellenberg et al., 2016). Vėlesni viso genomo tyrimai parodė, jog *Gardnerella* gali būti suskirstoma į keturis skirtingus filogenetinius potipius (*angl.* clades/subtypes) (Ahmed et al. 2012; Malki et al., 2016). Neseniai buvo pasiūlyta *Gardnerella* suskirstyti į rūšis ir genomo rūšis (Vanechoutte et al., 2019). Tyrimai analizuojantys, kokie *Gardnerella* potipiai/rūšys gali būti sveikos ar BV mikrobiotos žymuo, rodė gana prieštaringus rezultatus (Balashov et al., 2014; Hill et al., 2019; Plummer et al., 2020; Munch et al., 2024). Todėl atskirų šios bakterijos potipių/rūšių virulentinio potencialo analizė leistų geriau suprasti jį vaidmenį makšties mikrobiotoje ligos ir sveikatos atvejais.

Gardnerella bakterijos vaidmuo makšties mikrobiotoje yra kontraversiškas, nes bakterija aptinkama tiek sveikų, tiek sergančių BV moterų makštyje. Šiame darbe buvo išskirti *Gardnerella* kamienai iš vaisingo amžiaus moterų, gyvenančių Lietuvoje, makšties mėginių, o patys mėginiai buvo charakterizuoti pagal šiuolaikinėje klinikinėje praktikoje naudojamus

Amsel kriterijus ir Nugent metodą, siekiant diskriminuoti normalią ir BV mikrobiotą. Mikrobiotos charakterizavimui taip pat buvo pasitelktas PGR, nutaikytas į keturias laktobacilų rūšis ir septynias anaerobines bakterijas, siejamas su BV (Fredricks et al., 2007; Srinivasan & Fredricks, 2008). Dauginės laktobacilų rūšys aptiktos daugumoje sveikų makšties ėminių, tuo tarpu *L. iners* arba kartu su *L. crispatus* nustatyta tik BV ir dalinės BV mėginiuose. Tik *L. jensenii*, bet ne *L. crispatus* (Dols et al., 2016) siejama su NS 0-3. Penkios su BV siejamos bakterijų rūšys (*F. vaginae*, *Gardnerella*, *Eggerthella*, *Megasphaera ph. 1* ir *Leptotricha/Sneathia*), buvo nustatytos BV teigiamuose makšties mėginiuose. Makšties koinfekcijos ir mišrios infekcijos gali imituoti ar maskuoti BV, todėl mėginiai papildomai buvo ištirti dėl *Candida* ir septynių LPL. Tyrimai įvairiose šalyse rodo, jog apie 30% moterų su BV diagnoze patiria koinfekciją *Candida* spp. (Sobel et al., 2013; Sobel & Vempati, 2024). Šiame tyrime 27,5% BV teigiamų ėminių nustatyta koinfekcija *Candida* spp., o tarp BV neigiamų mėginių koinfekcija buvo mažesnė ir siekė 18,9%. Vyraujanti rūšis buvo *C. albicans*. Pažymėtina, jog klinikiniai simptomai tik pavieniais atvejais atspindėjo kelių patogenų poveikį, kaip ir būdinga mišrioms infekcijoms (Sobel et al., 2013). Koinfekcijos svarbiais žmogaus patogenais nustatymas parodė galimą sinergiją su BV būkle. *U. parvum* ir *M. hominis* paplitimas statistiškai patikimai siejamas su BV, bet infekcija *U. urealyticum* nerodė tokios sąsajos. Pažymėtina, jog Lietuvos moterų makšties mėginiuose nustatytas didelis *U. parvum* bakterijos paplitimas, kuri, manoma, susijusi su nėštumo komplikacijomis (Jonduo et al., 2022).

Bakterija *Gardnerella* buvo aptikta 100% BV (NS 7-10) atvejų, o tai atitiko kitų tyrėjų rezultatus (Srinivasan et al., 2012; Balashov et al., 2014; Onderdonk et al., 2016; Munch et al., 2024). Makšties ėminiuose, kurių NS 0-3, *L. iners* (75,5%) ir *Gardnerella* (86,6%) buvo dažniausiai aptinkamos bakterijos. *Gardnerella* paplitimas nuo 40 iki 74,7% besimptomų sveikų moterų (NS 0-3) makšties mėginiuose aptiktas ir kituose tyrimuose (Ravel et al., 2011; Schwebke et al., 2014; Munch et al., 2024), pažymint, jog makšties mikrobiotos sudėtis priklauso ir nuo etninės grupės (Srinivasan et al., 2012). *Gardnerella* aptinkama didesniais kiekiais, esant BV ar daliai BV, palyginus su sveika mikrobiota (Ravel et al., 2011; Srinivasan et al., 2012). *Gardnerella*, kaip individualaus taksono, buvimas mikrobiotoje nereiškia, jog ji savaime yra patogeniška. Daugelis ją laiko komensaline makšties bakterija, nors pastebi, jog dalies sveikų moterų makšties mikrobiotoje ji neaptinkama (Schwebke et al., 2014b). Kai kurie tyrėjai teigia, jog *Gardnerella* pagausėjimas nereiškia, jog ši bakterija savaime yra patogeninė, bet tai greičiau atspindi skirtingus bakterijų tarpusavio ryšius mikrobiotoje ir/arba

šeimininko būsenas (Lebeer et al., 2023). Tyrėjai mano, jog *Gardnerella* vaidmuo gali būti interpretuojamas tik sąveikos su kitomis mikrobiotos bakterijomis ir šeimininko hormoninės bei imunologinės būsenų kontekste.

Makšties mikrobiotos charakterizavimui naudojamas NGS metodas, paremtas 16s rRNR dalies ar viso koduojančio geno sekoskaita, neatskiria *Gardnerella* potipių/rūšių (Brochu et al., 2025). Metagenominė sekoskaita (*angl.* shotgun metagenomic sequencing) diferencijuoja *Gardnerella* į potipius (Berman et al., 2024). Tačiau ši NGS rūšis nėra plačiai naudojama makšties mikrobiotos tyrimams dėl sąlyginai mažo mikroorganizmų kiekio (*angl.* load) ir didelio kiekio šeimininko DNR mėginiuose (Fettweis et al., 2019; Berman et al., 2024). Metodas išlieka brangus ir reikalauja nepalyginamai daugiau bioinformatinių įrankių bei naujų resursų makšties bakterijų identifikacijai ir diferenciacijai, kurie atsirado tik apie 2020 m. (Ma et al., 2020; Huang et al., 2024).

Šiame darbe naudoti PGR metodai *Gardnerella* potipių aptikimui makšties mėginiuose, parodė, jog dauginiai šios bakterijos potipiai statistiškai reikšmingai siejami su $NS \geq 4$, o tai derinasi su kitų darbų rezultatais (Balashov et al., 2014; Hilbert et al., 2017). Vienas šio darbo trūkumų, jog nebuvo kiekybiškai nustatytas kiekvieno *Gardnerella* potipio paplitimas makšties mikrobiotoje. Vėlesniuose kiekybiniuose tyrimuose parodyta, jog kiekvieno potipio/rūšies koncentracija buvo didesnė BV atveju nei BV neigiamoje mikrobiotoje (Hill et al., 2019; Munch et al., 2024). Munch et al. (2024) taip pat patvirtino šiame darbe gautus rezultatus: moterų, kurioms diagnozuota BV, makšties mikrobiotoje aptikta ≥ 3 *Gardnerella* potipiai/rūšys nei nesant BV (91% vs. 32%). Be to, šių dauginių potipių buvimas buvo susijęs su BV atsiradimu per 100 dienų nuo tyrimo pradžios, kai moterims dar nebuvo diagnozuota BV (Munch et al., 2024). Kitaip tariant, vieno *Gardnerella* potipio/rūšies buvimas yra nepakankamas BV išsivystymui, o makšties kolonizacija dauginiais potipiais yra rizikos veiksnys simptominės BV atsiradimui. Reikalingi papildomai tyrimai, siekiant išsiaiškinti kiekvieno *Gardnerella* potipio/rūšies indėlį BV išsivystymui.

Makšties mėginiuose, kuriose buvo *Gardnerella* vieno potipio ($n = 31$), potipis 4 ($n = 19$) ir potipis 1 ($n = 9$) buvo aptinkami dažniausiai, nepriklausomai nuo NS vertės. Daug rečiau aptinkamas potipis 3 sąsajos su BV nerodė. Nedidelis potipio 3 paplitimas (ir turbūt nedideliais kiekiais) makšties mėginiuose iš Lietuvos moterų, gali būti viena priežasčių, kodėl šio potipio kamienų išauginti nepavyko. Gausiau potipis 3 aptiktas mėginiuose iš Kenijos moterų ir šio potipio kamienus mokslininkams pavyko išauginti (Schellenberg et al., 2016). Potipis 4 buvo nustatytas dažniausiai Lietuvos moterų makšties mikrobiotoje ir jis nesiejamas su BV, o tai atitinka kitų

autorių tyrimus (Balashov et al., 2014; Plummer et al., 2020; Severgnini et al., 2022). Aptikta statistiškai reikšminga potipio 1 sąsaja su BV atitinka ankstesnio darbo rezultatus (Balashov et al., 2014). Šiame darbe potipis 2 statistiškai patikimai dažniausiai aptinkamas BV mikrobiotoje, o Balashov ir kolegos, analizuodami makšties ėminių iš JAV moterų, šį potipį sieja su daline BV (NS 4-7).

Gana prieštaringi duomenys gauti apie konkrečių *Gardnerella* potipių/rūšių sąsają su BV tyrimuose: Shipitsyna et al. (2019) ir Vodstreil et al. (2017) potipį 4 sieja su BV būkle, o ne su sveika makšties mikrobiota. Munch et al. (2024) neaptiko *Gardnerella* potipio, kuris būtų BV žymuo. Tačiau tyrėjai pažymi, jog dažniausiai aptinkami potipiai/rūšys makšties mikrobiotoje yra potipis 1 (*G. vaginalis* rūšis, 69%), potipis 2 (*G. piotii/genome sp. 3*, 63%), potipis 4 (*G. swidsinskii/genome sp. 8*, 58%, ir *G. leopoldii*, 41%) (Shipitsyna et al., 2019; Munch et al., 2024). Kiti potipiai, pavadinti Vaneechoute et al. (2019) genomo rūšimis (genome sp. 2 ir 7, 9-13) aptikti $\leq 10\%$ makšties mėginių (Hill et al., 2019; Shipitsyna et al., 2019).

Siekiant prisitaikyti prie naujai pasiūlytos *Gardnerella* taksonomijos, šiame darbe kamienai pagal *cpn60* UT seką (Hill et al., 2019) buvo suskirstyti į rūšis (3.1 lentelė). Visi potipio 1 kamienai priklausė *G. vaginalis*, potipio 2 priklausė *G. piotii/genome sp. 3*, potipio 4 izoliatai – *G. swidsinskii* ir *G. leopoldii* rūšims.

Kaip minėta, *Gardnerella* bakterijai priskiriamas pagrindinis vaidmuo BV patogenezėje, tačiau ši bakterija, nors ir nedideliais kiekiais, dažnai aptinkama ir moterų, kurių makšties mikrobiotoje vyrauja laktobacilos. Todėl kyla klausimas ar yra genetiniai ir fenotipiniai skirtumai tarp *Gardnerella* kamienų, kurie leistų atskirti patogenus nuo komensalų. Šiame darbe buvo išskirti *Gardnerella* skirtingų potipių kamienai iš makšties ėminių ir ištirtos jų fenotipinės su virulentiškumu siejamos savybės: sialidazės aktyvumas, toksino VLY sekrecijos lygis ir gebėjimas formuoti bioplėveles.

Dauguma *Gardnerella* kamienų buvo išauginta iš ėminių, kurių NS ≥ 4 ir tik du (potipių 1 ir 4) iš ėminių, kurių NS 0-3. Dėl tokio nedidelio kamienų skaičiaus iš sveikų moterų makšties ėminių, šiame darbe netyrinėti virulentinio potencialo skirtumai tarp BV ir kamienų, išskirtų iš sveikos mikrobiotos.

Sekretuojamas VLY yra nuo cholesterolio priklausomas citolizinas, kurio aktyvumas priklauso ne tik nuo ląstelės membranos cholesterolio, bet ir nuo žmogaus komplemento baltymo CD59 (Gelber et al., 2008; Zilnyte et al., 2015). Nėra tiesioginių duomenų apie VLY vaidmenį *in vivo*, bet manoma, jog šio citolizino aktyvumas yra susijęs su citotoksiškumu epitelinėms ląstelėms, nors kiti mano, jog VLY taikinyne yra imuninės ląstelės

(polimorfonukleariniai leukocitai), todėl šeimininko imuninis atsakas tampa netvarus (Gelber et al., 2008; Garcia et al., 2019). Potipis 2 buvo heterogeniškiausias *vly* geno atžvilgiu – dalis kamienų neturėjo šio geno. *In silico* VLY koduojantis genas buvo aptiktas 83% *Gardnerella* kamienų ir jis nelaikomas šerdinio genomo (*angl.* core genome) dalimi (Bohr et al., 2020). Teigiama, jog *vly* genas *Gardnerella* bakterijų yra prarandamas ir įgyjamas bei patiria evoliucinį spaudimą. Manoma, kad VLY atlieka svarbią funkciją, bet bakterija geba adaptuotis, kai netenka *vly* geno (Bohr et al., 2020). Šiame darbe buvo nustatyti statistiškai reikšmingi sekretuojamo VLY kiekio skirtumai tarp potipių, bet galutinė *post-hoc* analizė neaptiko statistiškai skirtingų potipių porų. Didžiausias VLY kiekio skirtumas buvo tarp potipių 2 ir 4 kamienų; homogeniškiausias buvo potipis 1.

Atplyšusios makšties epitelinės ląstelės (*angl.* clue cells), padengtos polimikrobine bioplėvele, kurios matriksą sudaro *Gardnerella*, aptinkamos tik esant BV (Swidsinski et al., 2005; Swidsinski et al., 2014). *Gardnerella* gebėjimas formuoti bioplėveles parodo, jog ši bakterija vaidina svarbų vaidmenį BV patogenezėje (Machado & Cerca, 2015). Įdomu tai, jog makšties laktobacilos neformuoja bioplėvelių (Swidsinski et al., 2014). Be to, polimikrobinės bioplėvelės susijusios su didesniu antimikrobiniu atsparumu ir BV atsinaujinimu (*angl.* recurrence), o taip pat numanomu BV perdavimu per lytinius santykius. *Gardnerella* potipio 1 kamienai pasižymėjo didžiausiu gebėjimo formuoti bioplėveles variantiškumu, tuo tarpu didžioji dauguma potipio 4 izoliatų buvo prasti bioplėvelės formuotojai arba visai jos neformavo, tačiau skirtumai tarp potipių nesiekė statistinio reikšmingumo.

Apsauginių makšties gleivių komponentų degradaciją sukelia fermentai sialidazės, kurių padidintas aktyvumas stebimas moterų su BV makšties išskyrose ir net naudojama diagnostiniu BV indikatoriumi (Myziuk et al., 2003; Lewis et al., 2013). Sialidazės taip pat prisideda prie epitelinių ląstelių eksfoliacijos ir atplyšimo nuo makšties epitelio (Lewis & Lewis, 2012). Žinomi trys *Gardnerella* sialidazės koduojantys genai: *nanH1*, *nanH2* ir *nanH3*. Robinson et al. (2019) parodė, jog NanH2 ir NanH3 yra pagrindinis sialidazės aktyvumo šaltinis *Gardnerella* kamienuose. Rekombinantinė sialidazė NanH1 buvo aktyvi ant dirbtinio substrato MUN (Janulaitienė et al., 2018), bet Robinson et al. (2019) parodė, jog NanH1, palyginus su NanH2 ir NanH3, pasižymėjo palyginus nedideliu aktyvumu ant daugelio substratų, turinčių sialo rūgštį. Dauguma bakterinių sialidazių yra sekretuojamos už ląstelės ribų, arba sekretuojamos, bet lieka susietos su ląstelės paviršiumi, nes tokiu būdu geriau pasiekiami šeimininko sialoglikanai (Robinson et al., 2019). Todėl sekretuojamos(ų) sialidazės(ių) aktyvumas (kiekybiškai) buvo nustatytas *Gardnerella* kamienų supernatante ir panaudojant biomasę

(kokybiškai). *Gardnerella* kamienai, kurie pasižymėjo sialidaziniu aktyvumu, turėjo *nanH2* ar *nanH3* genus, arba abu genus, o kamienai, kurie turėjo tik *nanH1*, neturėjo sialidazinio aktyvumo (3.1 lentelė). Gauti rezultatai atitinka Robinson et al. (2019) išvadas, kad *NanH2* ir *NanH3* yra pagrindinės *Gardnerella* sialidazės. Visi, išskyrus vieną, potipio 2 izoliatą rodė sialidazės aktyvumą, o dauguma potipio 1 (*G. vaginalis*) izoliatų neturėjo šio aktyvumo. Sialidazės aktyvumą potipio 1 izoliatuose užtikrino genas *nanH3*, nes visi šie izoliatai neturėjo *NanH2* koduojančio geno. Įdomu tai, jog potipio 4 (*G. swidsinskii* ir *G. leopoldii* rūšys) kamienai neturėjo nė vieno minėtų sialidazės genų ir nerodė sialidazinio aktyvumo. Robinson et al. (2019) iškėlė prielaidą, jog *NanH1* yra nesekretuojamas fermentas, kuris vaidina metabolinį vaidmenį – skaldo oligosacharidus, kai jie nutransportuojami į citoplazmą. Neaišku, kas atlieka *NanH1* vaidmenį potipio 4 kamienuose. Šiame darbe statistiškai reikšmingi sialidazės aktyvumo skirtumai buvo aptikti tarp trijų potipių. Vidutiniškai potipio 2 izoliatai *in vitro* rodė maždaug 2 kartus didesnę aktyvumą nei kitų potipių, o tai atitinka Schellenberg et al. (2016) rezultatus. Sialidazės aktyvumas pagal statistinę klasifikacinę analizę yra geriausias potipių prediktorius.

Statistiniais metodais sugrupavus *Gardnerella* kamienus į klasterius, nustatyta, jog potapis 4 yra homogeniškas: visi šio potipio kamienai yra klasteryje, kuris pasižymi maža virulentiškumo veiksmų raiška (3.9 pav.). Potipio 2 kamienai yra išsidėstę tarp dviejų klasterių, o potipio 1 kamienai buvo aptikti visuose trijuose klasteriuose, pasižyminčiuose skirtinga virulentiškumo veiksmų raiška. Ištirtų potipio 4 kamienų yra nedaug, ypač priskiriamų skirtingoms, *G. swidsinskii* ir *G. leopoldii* rūšims, o tai šio tyrimo trūkumas.

Šiame darbe pirmą kartą ištirti nemažos *Gardnerella* kamienų kolekcijos virulentiniai veiksniai ir jų raiška. Pademonstruota, jog *Gardnerella* potipiai/rūšys turi skirtingą virulentiškumo potencialą ir jų vaidmuo mikrobiotoje gali būti skirtingas. Šie rezultatai taip pat paremia iniciatyvas, jog *Gardnerella* gali būti suskirstyta į atskiras rūšis/porūšius. *Gardnerella* tampa viena geriausiai ištirtų moterų makšties mikrobiotos bakterijų, bet labai nedaug žinoma apie kitas makšties bakterijas. Šiame darbe taip pat buvo išskirti *Gardnerella* skirtingų potipių/rūšių kamienai iš to paties makšties mėginio (6S lentelė prieduose), pvz. iš BV mėginio 058S1 išauginta *G. vaginalis*, *G. ploverii* ir *G. leopoldii* kamienai, kurių virulentiškumo veiksmų raiška *in vitro* yra skirtinga. Be to, to paties potipio/rūšies kamienai, išskirti iš to paties mėginio (BV teigiamas mėginys 084S1, 6S lentelė prieduose), buvo genetiškai skirtingi. Vėlesniuose tyrimuose buvo analizuojama, kurie *Gardnerella* potipiai/rūšys gyvuoja toje pačioje ekologinėje nišoje (*angl.*

cooccurrence), o kurie konkuruoja (Hill et al. 2019; Berman et al., 2025). *G. vaginalis*, *G. plovii* ir *G. swidsinskii* rūšys dažniausiai aptinkamos toje pačioje nišoje, o *G. leopoldii* ir *G. swidsinskii* neaptinkamos kartu, nors manoma, jog kai kurios rūšys atsiranda kartu atsitiktinai (Hill et al., 2019). Ypač svarbu, kokie potipiai gali gyvuoti su kitomis makšties mikrobiotos bakterijų rūšimis (Berman et al., 2025.) Šiandien nėra žinoma, kurie *Gardnerella* potipiai yra pirminiai, sukuriantys tinkamą gyvavimo aplinką tarpti ir daugintis kitiems potipiams ir kitoms bakterijų rūšims, formuojančioms mikrobiotą. Ateities tyrimai turėtų koncentruotis ties *Gardnerella* skirtingų potipių kamienų genų raiškos skirtumais mikrobiotoje. Taip pat analizuojami mechanizmai, kuriais *Gardnerella* potipiai/rūšys sąveikauja su kitais mikrobiomos nariais ir kurių sąveikos rezultatas yra konkreti sveikatos būklė, išaiškinant ar tam tikri potipiai yra patogeniniai.

IŠVADOS

1. Panaudojant tradicinius mikrobiologinius ir molekulinis metodus, atskirta moterų makšties sveika ir BV mikrobiota; *Gardnerella* aptikta visuose BV mikrobiotos ir 87% sveikos mikrobiotos ėminių.

2. Makšties mikrobiotoje dažniausiai nustatyti *Gardnerella* potipiai 1 (*G. vaginalis* rūšis) ir 4 (*G. swidsinski* ir *G. leopoldii* rūšys), kurie taip pat yra tarp dažniausiai aptinkamų kitose šalyse atliktuose tyrimuose.

3. Dauginiai *Gardnerella* potipiai siejami su BV mikrobiota, o vieno potipio kamienai būdingi sveikai makšties mikrobiotai.

4. Iš makšties ėminių išskirti trijų potipių, 1, 2 ir 4, kamienai, retai aptinkamo potipio 3 kamienų išskirti nepavyko.

5. Potipio 4 kamienai neturi sialidazes koduojančių genų ir su BV patogenoze siejamo sialidazės aktyvumo; galbūt dėl to šis potipis dažnai aptinkamas sveikoje makšties mikrobiomoje.

6. *Gardnerella* potipiai pasižymi skirtingu virulentiniu potencialu, kuris gali būti siejamas su jų vaidmeniu ligos ir sveikatos atvejais: potipis 4 yra homogeniškas, pasižymintis nedidele tirtų virulentinių veiksnių raiška, o potipiai 1 ir 2 yra heterogeniški, apibūdinami skirtingais fenotipinių savybių profiliais

LITERATŪROS ŠARŠAS

1. Aagaard K, Ma J, Antony KM, et al. (2014). The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 6: 237–265. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599.
2. Ahmed A, Earl J, Retchless A, et al. (2012). Comparative genomic analyses of 17 clinical isolates of *Gardnerella vaginalis* provide evidence of multiple genetically isolated clades consistent with subspeciation into genovars. *J Bacteriol.* 194:3922–3937. doi: 10.1128/JB.00056-12.
3. Aldunate M, Tyssen D, Johnson A, et al. (2013). Vaginal concentrations of lactic acid potentially inactivate HIV. *J Antimicrob Chemother.* 68:2015–2025. doi: 10.1093/jac/dkt156.
4. Al-Nasiry S, Ambrosino E, Schlaepfer M, et al. (2020). The interplay between reproductive tract microbiota and immunological system in human reproduction. *Front Immunol.* 11:378, doi: 10.3389/fimmu.2020.00378.
5. Alves P, Castro J, Sousa C, et al. (2014). *Gardnerella vaginalis* outcompetes 29 other bacterial species isolated from patients with bacterial vaginosis, using an in vitro biofilm formation model. *J Infect Dis.* 210, 593–596. doi: 10.1093/infdis/jiu131.
6. Amerson-Brown MH. (2025). From microscopy to molecular diagnostics: identifying the complexities of clinical diagnostics for vaginal infections. *Microbiol Spect.* 20:e0025125. doi: 10.1128/spectrum.00251-25.
7. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, et al. (1983). Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med.* 74:14–22. doi: 10.1016/0002-9343(83)91112-9.
8. Anderson DJ, Marathe J, Pudney J. (2014). The structure of the human vaginal stratum corneum and its role in immune defense. *Am J Reprod Immunol.* 71:618-23. <https://doi.org/10.1111/aji.12230>
9. Arbelaitz O, Gurrutxaga I, Muguerza J, et al. (2013). An extensive comparative study of cluster validity indices. *Pattern Recognit.* 46: 243–256.
10. Aroutcheva AA, Simoes JA, Behbakht K, et al. (2001). *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. *Clin Infect Dis.* 33:1022–1027. doi: 10.1086/323030.
11. Auriemma RS, Scairati R, Del Vecchio G, et al. (2021). The vaginal microbiome: A long urogenital colonization throughout woman life. *Front Cell Infect Microbiol.* 11:686167. doi: 10.3389/fcimb.2021.686167.
12. Avershina E, Slangsvold S, Simpson MR, et al. (2017). Diversity of vaginal microbiota increases by the time of labor onset. *Sci Rep.* 7:17558. doi: 10.1038/s41598-017-17972-0.

13. Babiychuk EB, Monastyrskajaya K, Potez S, et al. (2011). Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death Differ.* 8:80-9. doi: 10.1038/cdd.2010.81
14. Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine microbiota: residents, tourists, or invaders? *Front Immunol.* 9:208. doi: 10.3389/fimmu.2018.00208.
15. Balashov SV, Mordechai E, Adelson ME, et al. (2014). Identification, quantification and subtyping of *Gardnerella vaginalis* in noncultured clinical vaginal samples by quantitative PCR. *J Med Microbiol.* 63:162–175. doi: 10.1099/jmm.0.066407-0.
16. Bansil R & Turner BS. (2018). The biology of mucus: Composition, synthesis and organization. *Adv Drug Deliv Rev.* 15:124:3-15. doi: 10.1016/j.addr.2017.09.023.
17. Bautista CT, Wurapa EK, Sateren WB, et al. (2017). Association of bacterial vaginosis with chlamydia and gonorrhea among women in the U.S. Army. *Am J Prev Med* 2017; 52:632–639. doi: 10.1016/j.amepre.2016.09.016.
18. Benito R, Vazquez J, Berron S, et al. (1986). A modified scheme for biotyping *Gardnerella vaginalis*. *J Med Microbiol.* 21, 357–359. doi: 10.1099/00222615-21-4-357.
19. Berman HJ, Goltsman DSA, Anderson M, et al. (2024). *Gardnerella* diversity and ecology in pregnancy and preterm birth. *mSystems.* 9:e0133923. doi: 10.1128/msystems.01339-23.
20. Bilardi JE, Walker S, Temple-Smith M, et al. (2013). The burden of bacterial vaginosis: women's experience of the physical, emotional, sexual and social impact of living with recurrent bacterial vaginosis. *PLoS One.* 8:e74378.
21. Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, et al. (2004). Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol.* 42:3128–36. doi: 10.1128/JCM.42.7.3128-3136.2004.
22. Blanchette-Cain K, Hinojosa CA, Akula Suresh Babu R, et al. (2013). *Streptococcus pneumoniae* biofilm formation is strain dependent, multifactorial, and associated with reduced invasiveness and immunoreactivity during colonization. *MBio.* 4:e00745-13. doi: 10.1128/mBio.00745-13.
23. Bohr LL, Mortimer TD, Pepperell CS (2020). Lateral gene transfer shapes diversity of *Gardnerella* spp. *Front Cell Infect Microbiol.* 10:293. doi: 10.3389/fcimb.2020.00293
24. Borgdorff H, Tsivtsivadze E, Verhelst R, et al. (2014). *Lactobacillus*-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in African women. *ISME J.* 2014; 8:1781-1793. doi: 10.1038/ismej.2014.26.

25. Boris S & Barbés C. (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect.* 2:543-546. doi: 10.1016/s1286-4579(00)00313-0.
26. Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ, et al. (2001). Origins of vaginal acidity: high d/l lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod.* 16:1809–1813. doi: 10.1093/humrep/16.9.1809.
27. Bouzek H, Srinivasan S, Jones DS, et al. (2025). A Syntenic pangenome for *Gardnerella* reveals taxonomic boundaries and stratification of metabolic and virulence potential across species. *bioRxiv.* Feb 19:2025.02.19.636902. doi: 10.1101/2025.02.19.636902.
28. Bradshaw CS & Brotman RM. (2015). Making inroads into improving treatment of bacterial vaginosis – striving for long-term cure. *BMC Infect Dis.* 29:15:292. doi: 10.1186/s12879-015-1027-4.
29. Bradshaw CS, Morton AN, Hocking J, et al. (2006). High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. *J Infect Dis.* 193:1478-86. doi: 10.1086/503780.
30. Bradshaw CS, Walker J, Fairley CK, et al. (2013). Prevalent and incident bacterial vaginosis are associated with sexual and contraceptive behaviours in young Australian women. *PLoS One.* 8:e57688. doi: 10.1371/journal.pone.0057688.
31. Bradshaw CS, Plummer EL, Muzny CA, et al. (2025). Bacterial vaginosis. *Nat Rev Dis Primers.* 11:43. doi: 10.1038/s41572-025-00626-1.
32. Briselden AM & Hillier SL. (1990). Longitudinal study of the biotypes of *Gardnerella vaginalis*. *J Clin Microbiol.* 28:2761-2764. doi: 10.1128/jcm.28.12.2761-2764.1990.
33. Brochu HN, Zhang Q, Song K, et al. (2025). Characterization of vaginal microbiomes in clinician-collected bacterial vaginosis diagnosed samples. *Microbiol Spectr.* 13:e0258224. doi: 10.1128/spectrum.02582-24.
34. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, et al. (2008). A longitudinal study of vaginal douching and bacterial vaginosis - a marginal structural modeling analysis. *Am J Epidemiol.* 168:188-196. doi: 10.1093/aje/kwn103
35. Bulavaite A, Dapkūnas J, Reškevičiūtė R, et al. (2025). *Gardnerella* fibrinogen-binding protein as a candidate adherence factor. *Front Cell Infect Microbiol.* 15:1556232. doi: 10.3389/fcimb.2025.1556232.
36. Bulavaite A, Maier T, Pleckaityte M. (2021). Discrimination of *Gardnerella* species by combining MALDI-TOF protein profile, chaperonin cpn60 sequences, and phenotypic characteristics. *Pathogens* 10, 277. doi: 10.3390/pathogens10030277.
37. Castro J, Alves P, Sousa C, et al. (2016). Using an in-vitro biofilm model to assess the virulence potential of bacterial vaginosis or non-bacterial vaginosis *Gardnerella vaginalis* isolates. *Sci Rep.* 5:11640. doi: 10.1038/srep11640.

38. Castro J, França A, Bradwell KR, et al. (2017). Comparative transcriptomic analysis of *Gardnerella vaginalis* biofilms vs. planktonic cultures using RNA-seq. *NPJ Biofilms and Microbiomes*.2: 3:3. doi: 10.1038/s41522-017-0012-7.
39. Castro J, Jefferson KK, Cerca, N. (2020) Genetic heterogeneity and taxonomic diversity among *Gardnerella* species. *Trends Microbiol*. 28: 202–211. doi: 10.1016/j.tim.2019.10.002.
40. Catlin WB. (1992). *Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies. *Clin Microbiol Rev*. 5: 213–237. doi: 10.1128/CMR.5.3.213.
41. Cauci S, Thorsen P, Schendel DE, et al. (2003). Determination of immunoglobulin A against *Gardnerella vaginalis* hemolysin, sialidase, and prolidase activities in vaginal fluid: implications for adverse pregnancy outcomes. *J Clin Microbiol*. 41:435-8. doi: 10.1128/JCM.41.1.435-438.2003.
42. Cauci S & Culhane JF. (2011). High sialidase levels increase preterm birth risk among women who are bacterial vaginosis positive in early gestation. *Am J Obstet Gynecol*. 204: 42.e1–142.e9. doi: 10.1016/j.ajog.2010.08.061
43. Chen C, Song X, Wei W, et al. (2017). The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun*. 8:875. doi: 10.1038/s41467-017-00901-0.
44. Chen L, Li J, Xiao B (2024). The role of sialidases in the pathogenesis of bacterial vaginosis and their use as a promising pharmacological target in bacterial vaginosis. *Front Cell Infect Microbiol*. 14:1367233. doi:10.3389/fcimb.2024.1367233
45. Cho I & Blaser JM. (2012). The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet*. 13: 260–270. doi: 10.1038/nrg3182.
46. Choe HS, Lee DS, Lee SJ, et al. (2013). Performance of Anyplex™ II multiplex real-time PCR for the diagnosis of seven sexually transmitted infections: comparison with currently available methods. *Int J Inf Dis*. 17:e1134–1140. doi: 10.1016/j.ijid.2013.07.011.
47. Christie MP, Johnston, BA, Tweten RK et al. (2018). Cholesterol-dependent cytolysins: from water-soluble state to membrane pore. *Biophys Rev*. 10: 1337–1348. doi: 10.1007/s12551-018-0448-x.
48. Condori-Catachura S, Ahannach S, Ticlla M, et al. (2025). Diversity in women and their vaginal microbiota. *Trends Microbiol*. 20:S0966-842X(24)00328-7. doi: 10.1016/j.tim.2024.12.012.
49. Crucitti T. (2017). Eve's garden: myths, legends and secrets unmasked. *Res Microbiol*. 168:773-781. doi: 10.1016/j.resmic.2017.07.004
50. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, et al. (2007). Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. *BMC Microbiol*. 7:115. doi: 10.1186/1471-2180-7-115.

51. Di Paola M, Sani C, Clemente AM, et al. (2017). Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk human papillomavirus infection. *Sci Rep.* 31; 7:10200. doi: 10.1038/s41598-017-09842-6.
52. DiCiccio TJ & Efron B. Bootstrap confidence intervals. *Stat Sci.* 1996; 11: 189–212.
53. DiGiulio DB, Stevenson DK, Shaw G, et al. (2015). Reply to Keelan and Payne: Microbiota-related pathways for preterm birth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112:E6415. doi: 10.1073/pnas.1517939112.
54. Döderlein A. Das scheidensekret und seine bedeutung fur puerperalfieber. *Zbl Bakteriol*, 1892: 11:699.
55. Döderlein A. Die Scheidensekret Untersuchungen. *Zbl Gynaekol*, 1894: 18: 10-14.
56. Dols JM, Molenaar D, van der Helm, et al. (2016). Molecular assessment of bacterial vaginosis by *Lactobacillus* abundance and species diversity. *BMC Infect Dis.* 16:180. doi: 10.1186/s12879-016-1513-3.
57. Donders GG, Sobel JD. (2017). *Candida* vulvovaginitis: A store with a butterfly and a show window. *Mycoses.* 60:70-72. doi: 10.1111/myc.1257
58. Donders GG. (2007). Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 21:355-73. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2007.01.002.
59. Dubé-Zinatelli E, Cappelletti L, Ismail N. (2024). Vaginal microbiome: Environmental, biological, and racial influences on gynecological health across the lifespan. *Am J Reprod Immunol.* 92:e70026. doi: 10.1111/aji.70026.
60. Elovitz MA, Gajer P, Riis V, et al. (2019). Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery. *Nat Commun.* 10:1305. doi: 10.1038/s41467-019-09285-9.
61. Ferrante M, Conti GO, Pulvirenti E, et al. (2025). The vaginal microbiota and preterm birth: A systematic review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 311:114007. doi: 10.1016/j.ejogrb.2025.114007.
62. Fettweis JM, Brooks JP, Serrano MG, et al. (2014). Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. *Microbiology (Reading).* 160:2272-2282. doi: 10.1099/mic.0.081034-0.
63. Fettweis JM, Serrano MG, Brooks JP, et al. (2019). The vaginal microbiome and preterm birth. *Nat Med.* 25:1012-1021. doi: 10.1038/s41591-019-0450-2.
64. Field A, Miles J, Field Z. *Discovering statistics using R.* London: SAGE; 2012.
65. Fletcher RH & Fletcher SW. *Clinical epidemiology: the essentials.* Baltimore (MD). Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

66. France M, Alizadeh M, Brown S, et al. (2022). Towards a deeper understanding of the vaginal microbiota. *Nat Microbiol.* 7:367-378. doi: 10.1038/s41564-022-01083-2.
67. France MT, Ma B, Gajer P, et al. (2020). VALENCIA: a nearest centroid classification method for vaginal microbial communities based on composition. *Microbiome.* 8:166. doi: 10.1186/s40168-020-00934-6.
68. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, et al. (2007). Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 45:3270-6. doi: 10.1128/JCM.01272-07.
69. Frigge M, Hoaglin DC, Iglewicz B. (1989). Some implementations of the boxplot. *Am Stat.* 43: 50–54.
70. Gajer P, Brotman RM, Bai G, et al. (2012). Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med.* 4:132ra52. doi: 10.1126/scitranslmed.3003605.
71. Garcia EM, Klimowicz AK, Edupuganti L, et al. (2024). Phase variable colony variants are conserved across *Gardnerella* spp. and exhibit different virulence-associated phenotypes. *mSphere.* 9:e0045024. doi: 10.1128/msphere.00450-24.
72. Garcia EM, Kraskauskienė V, Koblinski JE, et al. (2019). Interaction of *Gardnerella vaginalis* and vaginolysin with the apical versus basolateral face of a three-dimensional model of vaginal epithelium. *Infect Immun.* 87:e00646-18. doi: 10.1128/IAI.00646-18.
73. Gardner HL & Dukes CD. (1955). *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified "nonspecific" vaginitis. *Am J Obstet Gynecol.* 69:962- 976.
74. Gelber SE, Aguilar JL, Lewis KL, et al. (2008). Functional and phylogenetic characterization of Vaginolysin, the human-specific cytotoxin from *Gardnerella vaginalis*. *J Bacteriol.* 190:3896-903. doi: 10.1128/JB.01965-07.
75. Gilbert NM, Ramirez Fernandes LA, Berman D, et al. (2025). Social, microbial, and immune factors linking bacterial vaginosis and infectious diseases. *J Clin Invest.* 135:e184322. doi: 10.1172/JCI184322.
76. Gilbert SF, Sapp J, Tauber AI. (2013). A symbiotic view of life: we have never been individuals. *Q Rev Biol.* 87:325-341. doi: 10.1086/668166.
77. Gilley RP, Orihuela CJ. Pneumococci in biofilms are non-invasive: implications on nasopharyngeal colonization. *Front Cell Infect Microbiol.* 6:4:163. doi: 10.3389/fcimb.2014.00163.
78. Goldstein EJC, Tyrrell KL, Citron DM. (2015). *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clin Infect Dis.* 60 Suppl 2:S98-107. doi: 10.1093/cid/civ072.
79. Gramm J, Guo J, Hüffner F, et al. (2007). Algorithms for compact letter displays: comparison and evaluation. *Comput Stat Data Anal.* 52: 725–736.

80. Greenwood JR, Pickett MJ. (1980). Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes). comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 30:170-178.
81. Gregoire AT, Kandil O, Ledger WJ. (1971). The glycogen content of human vaginal epithelial tissue. *Fertil Steril.* 22:64–68. doi:10.1016/s0015-0282(16)37989-4.
82. Hardy L, Jaspers V, Van den Bulck, et al. (2017). The presence of the putative *Gardnerella vaginalis* sialidase A gene in vaginal specimens is associated with bacterial vaginosis biofilm. *PLoS One* 12, e0172522. doi: 10.1371/journal.pone.0172522.
83. Harwich MD Jr, Alves JM, Buck GA, et al. (2010). Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. *BMC Genomics.* 11;11:375. doi: 10.1186/1471-2164-11-375.
84. Hickey RJ & Forney LJ.(2014). *Gardnerella vaginalis* does not always cause bacterial vaginosis. *J Infect Dis.* 210:1682-1683. doi: 10.1093/infdis/jiu303.
85. Hilbert DW, Schuyler JA, Adelson ME, et al. (2017). *Gardnerella vaginalis* population dynamics in bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 36:1269-1278. doi: 10.1007/s10096-017-2933-8.
86. Hill JE, Albert AYK, VOGUE Research Group. (2019). Resolution and cooccurrence patterns of *Gardnerella leopoldii*, *G. swidsinskii*, *G. piovii*, and *G. vaginalis* within the vaginal microbiome. *Infect Immun.* 87:e00532-19. doi: 10.1128/IAI.00532-19.
87. Hoffman SR, Farland LV, Doll KM, et al. (2020). The epidemiology of gynaecologic health: contemporary opportunities and challenges. *J Epidemiol Community Health.* 27: jech-2019-213149. doi: 10.1136/jech-2019-213149.
88. Holm JB, Carter KA, Ravel J, et al. (2023). *Lactobacillus iners* and genital health: molecular clues to an enigmatic vaginal species. *Curr Infect Dis Rep.* 25:67-75. doi: 10.1007/s11908-023-00798-5.
89. Hooper LV & Gordon JI. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science.* 292:1115-1118. doi: 10.1126/science.1058709.
90. Huang L, Guo R, Li S, et al. (2024). A multi-kingdom collection of 33,804 reference genomes for the human vaginal microbiome. *Nat Microbiol.* 9:2185–2200. doi: 10.1038/s41564-024-01751-5.
91. Yildirim S, Yeoman CJ, Janga SC, R, et al. (2014). Primate vaginal microbiomes exhibit species specificity without universal *Lactobacillus* dominance. *ISME J.* 8:2431–2444. doi: 10.1038/ismej.2014.90.
92. Ingiani A, Petruzzelli S, Morandotti G, et al. (1997). Genotypic differentiation of *Gardnerella vaginalis* by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Immunol Med Microbiol.* 18: 61–66. doi: 10.1111/j.1574-695X.1997.tb01028.x.

93. Jayaprakash TP, Schellenberg JJ, Hill JE.(2012). Resolution and characterization of distinct cpn60-based subgroups of *Gardnerella vaginalis* in the vaginal microbiota. PLoS One. 7:e43009. doi: 10.1371/journal.pone.0043009.
94. Jonduo ME, Valley LM, Wand H, et al. (2022). Adverse pregnancy and birth outcomes associated with *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum*: a systematic review and meta-analysis. BMJ Open. 12:e062990. doi: 10.1136/bmjopen-2022-062990.
95. Khriplovich IB & Pomeransky AA. (1998). Equations of motion of spinning relativistic particle in electromagnetic and gravitational fields. J Exp Theor Phys. 86: 839–849. doi: 10.1103/physrevd.48.2797.
96. Kim H, Kim T, Kang J, et al. (2020). Is *Lactobacillus* Gram-positive? A case study of *Lactobacillus iners*. Microorganisms. 8:969. doi: 10.3390/microorganisms8070969.
97. Kuhn M. Building predictive models in R using the caret package. J Stat Softw. 2008; 28: 1-26. <https://doi.org/10.18637/jss.v028.i07>.
98. Lacroix G, Gouyer V, Gottrand F, et al. (2020). The cervovaginal mucus barrier. Int J Mol Sci. 21:8266. doi: 10.3390/ijms21218266.
99. Łaniewski P, İlhan ZE, Herbst-Kralovetz MM (2020). The microbiome and gynaecological cancer development, prevention and therapy. Nat Rev Urol. 17:232-250. doi: 10.1038/s41585-020-0286-z
100. Lebeer S, Ahannach S, Gehrmann T, et al. (2023). A citizen-science-enabled catalogue of the vaginal microbiome and associated factors. Nat Microbiol. 8:2183-2195. doi: 10.1038/s41564-023-01500-0.
101. Lederberg J & McCray AT. (2001) 'Ome Sweet 'Omics - a genealogical treasury of words. Scientist. 15:8.
102. Lee EM, Srinivasan S, Purvine SO, et al. (2025). Syntrophic bacterial and host–microbe interactions in bacterial vaginosis. ISME J. 19:wraf055. doi:10.1093/ismejo/wraf055.
103. Leopold S. (1953). Heretofore undescribed organism isolated from the genitourinary system. US Armed Forces Med. J. 4:263-266.
104. Lewis AL & Lewis WG (2012). Host sialoglycans and bacterial sialidases: a mucosal perspective. Cell Microbiol, 14:1174-1182. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01807.x.
105. Lewis WG, Robinson LS, Perry J, et al. (2012). Hydrolysis of secreted sialoglycoprotein immunoglobulin A (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis. J Biol Chem. 287:2079–2089. doi: 10.1074/jbc.M111.278135.
106. Lewis WG, Robinson LS, Perry JC, et al. (2013). Degradation, foraging, and depletion of mucus sialoglycans by the vagina-adapted *Actinobacterium Gardnerella vaginalis*. J Biol Chem. 288:12067–12079. doi: 10.1074/jbc.M113.453654.

- 107.Li L, Zhang J, Zhou , et al. (2023). The first lanthipeptide from *Lactobacillus iners*, Inecin L, exerts high antimicrobial activity against human vaginal pathogens. *Appl Environ Microbiol.* 89:e0212322. doi: 10.1128/aem.02123-22.
- 108.Libby EK, Pascal KE, Mordechai E, et al. (2008). *Atopobium vaginae* triggers an innate immune response in an in vitro model of bacterial vaginosis. *Microbes Infect.* 10:439–446. doi: 10.1016/j.micinf.2008.01.004.
- 109.Los FCO, Randis TM, Aroian RV, et al. (2013). Role of pore-forming toxins in bacterial infectious diseases. *Microbiol Mol Bio. Rev.* 77: 173–207. doi: 10.1128/MMBR.00052-12.
- 110.Lozano FM, Bernabeu A, Lledo B, et al. (2021). Characterization of the vaginal and endometrial microbiome in patients with chronic endometritis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 263:25-32. doi: 10.1016/j.ejogrb.2021.05.045.
- 111.Luo G & Mitchell TG. (2002). Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 40:2860–2865. doi: 10.1128/JCM.40.8.2860-2865.2002.
- 112.Ma B, Forney LJ, Ravel J. (2012). The vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annu Rev Microbiol.* 66:371–389. doi: 10.1146/annurev-micro-092611-150157.
- 113.Ma B, France MT, Crabtree J, et al. (2020). A comprehensive non-redundant gene catalog reveals extensive within-community intraspecies diversity in the human vagina. *Nat Commun.* 11:940. doi: 10.1038/s41467-020-14677-3.
- 114.MacDorman MF, Matthews TJ, Mohangoo AD et al. (2014). International comparisons of infant mortality and related factors: United States and Europe, 2010. *Natl. Vital. Stat. Rep.* 63, 1–6.
- 115.Machado A & Cerca N (2015). Influence of biofilm formation by *Gardnerella vaginalis* and other anaerobes on bacterial vaginosis. *J Infect Dis.* 212:1856-1861. doi: 10.1093/infdis/jiv338.
- 116.Malki K, Shapiro JW, Price TK, et al. . (2016). Genomes of *Gardnerella* strains reveal an abundance of prophages within the bladder microbiome. *PLoS One* 11:e0166757. doi: 10.1371/journal.pone.0166757
- 117.Marchesi JR & Ravel J.(2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome.* 3:31. doi: 10.1186/s40168-015-0094-5
- 118.Marín E, Haesaert A, Padilla L, et al. (2018). Unraveling *Gardnerella vaginalis* surface proteins using cell shaving proteomics. *Front Microbiol.* 9:975. doi: 10.3389/fmicb.2018.00975
- 119.Mejía-Caballero A. & Marco ML (2025). *Lactobacilli* biology, applications and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 23. doi: 10.1038/s41579-025-01205-7.

120. Menard JP, Fenollar F, Henry M, et al. (2008). Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis*. 47:33–43. doi: 10.1086/588661.
121. Mendes-Soares H, Suzuki H, Hickey RJ, et al. (2014). Comparative functional genomics of *Lactobacillus* spp. reveals possible mechanisms for specialization of vaginal lactobacilli to their environment. *J Bacteriol*. 196:1458–1470. doi: 10.1128/JB.01439-13.
122. Myziuk L, Romanowski B, Johnson SC. (2003). BVBlue test for diagnosis of bacterial vaginosis 41:1925-1928. doi: 10.1128/JCM.41.5.1925-1928.2003.
123. Moncla & Braham (1989). Detection of sialidase (neuraminidase) activity in *Actinomyces* species by using 2'-(4-methylumbelliferyl)alpha-D-N-acetylneuraminic acid in a filter paper spot test. *J Clin Microbiol*. 27:182-184. doi: 10.1128/jcm.27.1.182-184.1989.
124. Munch M, Strenk SM, Srinivasan S, et al. (2024). *Gardnerella* species and their association with bacterial vaginosis. *J Infect Dis*. 230:e171-e181. doi: 10.1093/infdis/jiae026.
125. Murtagh F & Legendre P. (2014) Ward's hierarchical agglomerative clustering method: which algorithms implement Ward's criterion? *J Classif*. 31: 274–295.
126. Muzny CA, Łaniewski P, Schwebke JR, et al. (2020). Host–vaginal microbiota interactions in the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Curr Opin Infect Dis*. 3:59-65. doi: 10.1097/QCO.0000000000000620.
127. Muzny CA & Schwebke JR. (2013). *Gardnerella vaginalis*: Still a prime suspect in the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Curr Infect Dis Rep*. 15:130-135. doi: 10.1007/s11908-013-0318-4.
128. Muzny CA & Schwebke JR. (2016). Pathogenesis of bacterial vaginosis: Discussion of current hypothesis. *J Infect Dis*. 2014: S1-5. doi: 10.1093/infdis/jiw121.
129. Muzny C, Taylor CM, Swords, et al. (2019). An updated conceptual model on the pathogenesis of bacterial vaginosis. *J Infect Dis*. 220:1399-1405. doi: 10.1093/infdis/jiz342.
130. Muzny CA & Schwebke JR. (2020). Asymptomatic bacterial vaginosis: To treat or not to treat? *Curr Infect Dis Rep* 22:32. doi: 10.1007/s11908-020-00740-z.
131. Muzny CA, Balkus J, Mitchell C, et al. (2022). Diagnosis and management of bacterial vaginosis: Summary of evidence reviewed for the 2021 Centers for Disease Control and Prevention Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines. *Clin Infect Dis*. 74:S144-S151. doi: 10.1093/cid/ciac021.
132. Muzny CA, Cerca N, Elnaggar JH, et al. (2023). State of the art for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*. 61:e0083722. <https://doi.org/10.1128/jcm.00837-22>.

133. Noyes N, Cho KC, Ravel J, et al. (2018). Associations between sexual habits, menstrual hygiene practices, demographics and the vaginal microbiome as revealed by Bayesian network analysis. *PLoS One*. 13:e0191625. doi: 10.1371/journal.pone.0191625.
134. Nowak RG, Randis TM, Desai P, et al. (2018). Higher levels of a cytotoxic protein, vaginolysin, in *Lactobacillus*-deficient community state types at the vaginal mucosa. *Sex Transm Dis*. 45, e14–e17. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000774.
135. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. (1991). Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol*. 29:297–301. doi: 10.1128/jcm.29.2.297-301.1991
136. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. (2011). In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect Dis*. 11: 200. doi: 10.1186/1471-2334-11-200.
137. Olmsted SS, Meyn LA, Rohan LC et al. (2003). Glycosidase and proteinase activity of anaerobic Gram-negative bacteria isolated from women with bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis*. 30: 257-261. doi: 10.1097/00007435-200303000-00016.
138. 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.
139. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*. 54:49-79. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.49.
140. Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, et al. (2010). Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology*. 156:392-399. doi: 10.1099/mic.0.034280-0
141. Peebles K, Vellozo J, Balkus JE, et al. (2019). High global burden and costs of bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *Sex Transm Dis*. 46:304–311. doi: 10.1097/OLQ.0000000000000972.
142. Pelayo P, Hussain FA, Werlang CA, et al. (2024). *Prevotella* are major contributors of sialidases in the human vaginal microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 121, e2400341121. doi: 10.1073/pnas.2400341121
143. Pybus VS & Onderdonk AB. (1997). Evidence for a commensal, symbiotic relationship between *Gardnerella vaginalis* and *Prevotella bivia* involving ammonia: potential significance for bacterial vaginosis. *J Infect Dis*. 175:406-413. doi: 10.1093/infdis/175.2.406.
144. Piot P, van Dyck E, Totten PA, et al. (1982). Identification of *Gardnerella* (*Haemophilus*) *vaginalis*. *J Clin Microbiol*. 15:19-24. doi: 10.1128/jcm.15.1.19-24.1982.

145. Piot P, van Dyke E, Peeters M, et al. (1984). Biotypes of *Gardnerella vaginalis*. J Clin Microbiol. 20:667–679. doi: 10.1128/jcm.20.4.677-679.1984.
146. Pleckaityte M, Janulaitiene M, Lasickiene R, et al. (2012). Genetic and biochemical diversity of *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 65:69-77. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00940.x.
147. Plummer EL, Vodstrcil LA, Murray GL, et al. (2020). *Gardnerella vaginalis* clade distribution is associated with behavioral practices and Nugent score in women who have sex with women. J Infect Dis. 221:454–463. doi: 10.1093/infdis/jiz474.
148. Proctor LM, Creasy HH, Fettweis JM, et al. (2019). The integrative human microbiome project. Nature. 569:641-648. doi: 10.1038/s41586-019-1238-8.
149. Ragaliauskas T, Plečkaitytė M, Jankunec M, et al. (2019). Inerolysin and vaginolysin, the cytolysins implicated in vaginal dysbiosis, differently impair molecular integrity of phospholipid membranes. Sci Rep. 9:10606. doi: 10.1038/s41598-019-47043-5.
150. Rahkonen L, Rutanen EM, Unkila-Kallio L, et al. (2009). Factors affecting matrix metalloproteinase-8 levels in the vaginal and cervical fluids in the first and second trimester of pregnancy. Hum Reprod. 24:2693-2702. doi: 10.1093/humrep/dep284.
151. Rampersaud R, Planet PJ, Randis TM, et al. (2011). Inerolysin, a cholesterol-dependent cytolysin produced by *Lactobacillus iners*. J Bacteriol 193:1034–1041. doi: 10.1128/JB.00694-10.
152. Randis TM, Zaklama J, LaRocca TJ, et al. (2013). Vaginolysin drives epithelial ultrastructural responses to *Gardnerella vaginalis*. Infect Immun. 81:4544–4550. doi: 10.1128/IAI.00627-13.
153. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. (2011) Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci U S A. 108 Suppl 1:4680–4687. doi: 10.1073/pnas.1002611107.
154. Ravel J, Moreno I, Simón. (2021). Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease. Am J Obstet Gynecol. 224:251-257. doi: 10.1016/j.ajog.2020.10.019.
155. Recine N, Palma E, Domenici L, et al. (2016). Restoring vaginal microbiota: biological control of bacterial vaginosis. A prospective case-control study using *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 as adjuvant treatment against bacterial vaginosis. Arch Gynecol Obstet. 293:101-7. doi: 10.1007/s00404-015-3810-2.
156. Reid G. (2018). Is bacterial vaginosis a disease? Appl Microbiol Biotechnol. 102:553-558. doi: 10.1007/s00253-017-8659-9.
157. Robinson LS, Schwebke J, Lewis WG, et al. (2019). Identification and characterization of NanH2 and NanH3, enzymes responsible for sialidase

activity in the vaginal bacterium *Gardnerella vaginalis*. *J Biol Chem*. 294:5230-5245. doi: 10.1074/jbc.RA118.006221.

158.Rottini G, Dobrina A, Forgiarini O, et al. (1990). Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. *Infect Immun*. 58:3751–3758. doi: 10.1128/iai.58.11.3751-3758.1990.

159.Sadhu K, Domingue PA., Chowt AW, et al. (1989). *Gardnerella vaginalis* has a gram-positive cell-wall ultrastructure and lacks classical cell-wall lipopolysaccharide. *J Med Microbiol*. 29:229–235. doi: 10.1099/00222615-29-3-229.

160.Santiago GL, Cools P, Verstraelen H, et al. (2011a). Longitudinal study of the dynamics of vaginal microflora during two consecutive menstrual cycles. *PLoS One*. 6:e28180. doi: 10.1371/journal.pone.0028180.

161.Santiago GL, Deschaght P, El Aila N, et al. (2011b). *Gardnerella vaginalis* comprises three distinct genotypes of which only two produce sialidase. *Am J Obstet Gynecol*. 204:450.e1-7. doi: 10.1016/j.ajog.2010.12.061.

162.Schellenberg JJ, Paramel Jayaprakash T, Withana Gamage N, et al. (2016). *Gardnerella vaginalis* subgroups defined by *cpn60* sequencing and sialidase activity in isolates from Canada, Belgium and Kenya. *PLoS One*. 11:e0146510. doi: 10.1371/journal.pone.0146510.

163.Schellenberg JJ, Patterson MH, Hill JE. (2017) *Gardnerella vaginalis* diversity and ecology in relation to vaginal symptoms. *Res Microbiol*. 168:837-844. doi: 10.1016/j.resmic.2017.02.011.

164.Schwebke JR & Weiss HL. (2002). Interrelationships of bacterial vaginosis and cervical inflammation. *Sex Transm Dis* . 29:59–64. doi: 10.1097/00007435-200201000-00010.

165.Schwebke JR, Muzny CA, Josey WE (2014a). Role of *Gardnerella vaginalis* in the pathogenesis of bacterial vaginosis: A conceptual model. *J Infect Dis*. 2010: 338–343. doi: 10.1093/infdis/jiu089.

166.Schwebke JR, Flynn MS, Rivers CA. (2014b). Prevalence of *Gardnerella vaginalis* among women with lactobacillus-predominant vaginal flora. *Sex Transm Infect*. 90:61-63. doi: 10.1136/sextrans-2013-051232.

167.Sender R, Fuchs S, Milo R. (2016). Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*. 164:337-340. doi: 10.1016/j.cell.2016.01.013.

168.Serrano MG, Parikh HI, Brook JP, et al. (2019). Racioethnic diversity in the dynamics of the vaginal microbiome during pregnancy. *Nat Med*. 25:1001-1011. doi: 10.1038/s41591-019-0465-8.

169.Sherrard J, Wilson J, Donders G, et al. (2023). 2023 update to 2018 European (IUSTI/WHO) guideline on the management of vaginal discharge. *Int J STD AIDS*. 34:745. doi: 10.1177/09564624231179277.

170.Shipitsyna E, Krysanova A, Khayrullina G, et al. (2019). Quantitation of all four *Gardnerella vaginalis* clades detects abnormal vaginal

microbiota characteristic of bacterial vaginosis more accurately than putative *G. vaginalis* sialidase A gene count. *Mol Diagn Ther.* 23:139-147. doi: 10.1007/s40291-019-00382-5.

171. Shvartsman E, Hill JE, Sandstrom P, et al. (2023). *Gardnerella* revisited: Species heterogeneity, virulence factors, mucosal immune responses, and contributions to bacterial vaginosis. *Infect Immun.* 91:e0039022. doi: 10.1128/iai.00390-22.

172. Silpe JE & Balskus EP. (2021). Deciphering human microbiota-host chemical interactions. *ACS Cent Sci.* 7: 20-29. doi: 10.1021/acscentsci.0c01030.

173. Severgini M, Morselli S, Camboni, et al. (2022). *Gardnerella vaginalis* clades in pregnancy: New insights into interactions with vaginal microbiome. *PLoS One.* 7:e0269590. doi: 10.1371/journal.pone.0269590 .

174. Smith WL, Hedges SR, Mordechai E, et al. (2014). Cervical and vaginal flora specimens are highly concordant with respect to bacterial vaginosis-associated organisms and commensal *Lactobacillus* species in women of reproductive age. *J Clin Microbiol.* 52:3078-3081. doi: 10.1128/JCM.00795-14.

175. Sobel JD, Subramanian C, Foxman B, et al. (2013). Mixed vaginitis—more than coinfection and with therapeutic implications. *Curr Infect Dis Rep.* 15:104-108. doi: 10.1007/s11908-013-0325-5.

176. Sobel JD & Vempati YS. (2024). Bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis pathophysiologic interrelationship. *Microorganisms.* 2:108. doi: 10.3390/microorganisms12010108.

177. Sousa M, Ksiezarek M, Perovic SU, et al. (2023). *Gardnerella pickettii* sp. nov. (formerly *Gardnerella* genomic species 3) and *Gardnerella greenwoodii* sp. nov. (formerly *Gardnerella* genomic species 8) isolated from female urinary microbiome. *Int J Syst Evol Microbiol.* 73. doi: 10.1099/ijsem.0.006140.

178. Srinivasan S & Fredricks DN. (2008). The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2008:750479. doi: 10.1155/2008/750479.

179. Srinivasan S, Morgan MT, Fiedler TL, et al. (2015). Metabolic signatures of bacterial vaginosis. *mBio.* 6:e00204-15. doi: 10.1128/mBio.00204-15.

180. Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, et al. (2012). Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One.* 7:e37818. doi: 10.1371/journal.pone.0037818.

181. Srinivasan S, Munch MM, Sizova MV, et al. (2016). More easily cultivated than identified: Classical isolation with molecular identification of vaginal bacteria. *J Infect Dis.* 214:S21-8. doi: 10.1093/infdis/jiw192.

182. Stapleton AE. (2016). The vaginal microbiota and urinary tract infection. *Microbiol Spectr.* 4:10.1128/microbiolspec.UTI-0025-2016.

183. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, et al. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 40:175–179. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00122-6.
184. Swidsinski A, Amann R, Guschin A, et al. (2024). Polymicrobial consortia in the pathogenesis of biofilm vaginosis visualized by FISH. Historic review outlining the basic principles of the polymicrobial infection theory. *Microbes Infect*. 26:105403. doi: 10.1016/j.micinf.2024.105403.
185. Swidsinski A, Doerfel Y, Loening-Baucke V, et al. (2010). *Gardnerella* biofilm involves females and males and is transmitted sexually. *Gynecol Obstet Invest*. 70:256–263. doi: 10.1159/000314015.
186. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Mendling W, et al. (2014). Infection through structured polymicrobial *Gardnerella* biofilms (StPM-GB). *Histol Histopathol*. 29:567–87. doi: 10.14670/HH-29.10.567.
187. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, et al. (2005). Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol*. 106:1013–1023. doi: 10.1097/01.AOG.0000183594.45524.d2.
188. Tankovic J, Timinskas A, Janulaitiene M, et al. (2017). *Gardnerella vaginalis* bacteremia associated with severe acute encephalopathy in a young female patient. *Anaerobe*. 47:132–134. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.05.010.
189. Thomas S. (1928). Doderlein's Bacillus: *Lactobacillus Acidophilus*. *J Infect Dis*. 43:218–227.
190. Tissier, H. Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Paris: Dissertation, 1900.
191. Torrone EA, Morrison CS, Chen PL, et al. (2018). Prevalence of sexually transmitted infections and bacterial vaginosis among women in sub-Saharan Africa: an individual participant data meta-analysis of 18 HIV prevention studies. *PLoS Med*. 15. e1002511. doi: 10.1371/journal.pmed.1002511.
192. Yazdy GM, Workowski KA, Ghanem KG, et al. (2025). Male partner treatment and the potential sexual transmission of bacterial vaginosis: considerations for patient counseling and clinical application in the United States. S0002-9378(25)00822-1. doi: 10.1016/j.ajog.2025.11.001.
193. Younes JA, Lievens E, Hummelen R, et al. (2018). Women and their microbes: The unexpected friendship. *Trends Microbiol*. 26:16–32. doi: 10.1016/j.tim.2017.07.008.
194. Van de Wiggert JHMM, Borgdorff H, Verhelst R, et al. (2014). The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One* 9:e105998. doi: 10.1371/journal.pone.0105998
195. Van de Wiggert JH & Jaspers V. (2017). The global health impact of vaginal dysbiosis. *Res Microbiol*. 168:859–864. doi: 10.1016/j.resmic.2017.02.003.
196. Vaneechoutte M, Guschin A, Van Simaey L, et al. (2019). Emended description of *Gardnerella vaginalis* and description of *Gardnerella leopoldii*

sp. nov., *Gardnerella piotii* sp. nov. and *Gardnerella swidsinskii* sp. nov., with delineation of 13 genomic species within the genus *Gardnerella*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 69:679–687. doi: 10.1099/ijsem.0.003200

197. Ventura M, Canchaya C, Meyland V, et al. (2003). Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species and their direct application for species identification. *Appl Environ Microbiol*. 69:6908–6922. doi: 10.1128/AEM.69.11.6908-6922.2003.

198. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, et al. (2004). Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol*. 4:16. doi: 10.1186/1471-2180-4-16.

199. Verwijns MC, Agaba SK, Darby AC, et al. (2020). Impact of oral metronidazole treatment on the vaginal microbiota and correlates of treatment failure. *Am J Obstet Gynecol*. 222:157 e151–157 e113. doi: 10.1016/j.ajog.2019.08.008.

200. Vitali B, Cruciani F, Picone G, et al. (2015). Vaginal microbiome and metabolome highlight specific signatures of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 34:2367–2376. doi: 10.1007/s10096-015-2490-y.

201. Vodstrcil LA, Plummer EL, Fairley CK, et al. (2025). Male-partner treatment to prevent recurrence of bacterial vaginosis. *N Engl J Med*. 392:947–957. doi: 10.1056/NEJMoa2405404.

202. Vodstrcil LA, Twin J, Garland SM, et al. (2017). The influence of sexual activity on the vaginal microbiota and *Gardnerella vaginalis* clade diversity in young women. *PLoS One*. 12:e0171856. doi: 10.1371/journal.pone.0171856.

203. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*. 173:697-703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.

204. Wiggins R, Hicks SJ, Soothill P, et al. (2001). Mucinases and sialidases: Their role in the pathogenesis of sexually transmitted infections in the female genital tract. *Sex Transm Infect*. 77:402–408. doi: 10.1136/sti.77.6.402.

205. Witkin SS & Linhares IM. (2017). Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG*. 124:606–611. doi: 10.1111/1471-0528.14390.

206. Woodman Z. (2016). Can one size fit all? Approach to bacterial vaginosis in sub-Saharan Africa. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 15:16. doi: 10.1186/s12941-016-0132-6.

207. Wright MN & Ziegler A. (2017). Ranger: a fast implementation of random forests for high dimensional data in C++ and R. *J Stat Softw*. 77: 1–17.

208. Zariffard MR, Saiffudin M, Sha BE, et al. (2002). Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for *Lactobacilli*,

Gardnerella vaginalis, and *Mycoplasma hominis*. FEMS Immunol Med Microbiol. 34:277–281. doi: 10.1111/j.1574-695X.2002.tb00634.x.

209.Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, et al. (2007). Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. ISME J. 1:121–133.doi: 10.1038/ismej.2007.12.

210.Zhu B, Tao, Z, Edupuganti L., et al. (2022). Roles of the microbiota of the female reproductive tract in gynecological and reproductive health. Microbiol Mol Biol Rev. 86:e0018121. doi: 10.1128/mmbr.00181-21.

211.Zilnyte M, Venclovas Č, Zvirbliene A, et al. (2015). The cytolytic activity of vaginolysin strictly depends on cholesterol and is potentiated by human CD59. Toxins (Basel). 7:110– 28. doi: 10.3390/toxins7010110.

212.Zvirbliene A, Pleckaityte M, Lasickiene R, et al. (2010). Production and characterization of monoclonal antibodies neutralizing the cytolytic activity of vaginolysin. Toxicon. 56:19–28. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.03.007.

PRIEDAI

1S lentelė. Pradmenų sekos ir PGR sąlygos, naudotos bakterijų ir *Candida* nustatymui makšties mėginiuose

Specifiškumas	Pradmuo	Pradmens seka (5'-3')	Šaltinis	Lydimosi temp. (°C)	Amplikono ilgis (bp)
<i>Prevotella G1</i>	PrevG1-468R	GTCCCTTATTGCATGTACCATAC	Fredricks et al., 2007	55	389
	PrevG1-857R	GCCGCTAACACTAGGTGCTA			
<i>Megasphaera filotipas 1</i>	MegaE-456F	GATGCCAACAGTATCCGTCCG	Fredricks et al., 2007	55	211
	MegaE-667R	CCTCTCCGACACTCAAGTTCGA			
<i>Leptotrichia/Sneathia</i> spp.	Lepto-359F	CAATTCTGTGTGTGTGAAGAAG	Fredricks et al., 2007	55	287
	Lepto-646R	ACAGTTTTGTAGGCAAGCCTAT			
<i>Eggerthella</i> spp.	Egger-621F	AACCTCGAGCCGGGTTC	Fredricks et al., 2007	55	238
	Egger-859R	TCGGCACGGAAGATGTAATCT			
<i>BVBA2</i>	BVBA2-619F	TTAACCTGGGGTTCATTACAA	Fredricks et al., 2007	55	405
	BVBA2-1024R	AATTCAGTCTCCTGAATCGTCAGA			
<i>Atopobium vaginae</i> (dabar <i>Fannyhessea</i> <i>vagiane</i>)	Ato-154F	ATATTTGTCGCATGGCGAAT	Verhelst et al., 2004	58	433
	Ato-587R	GAGCGGATAGGGGTTGAGC			
<i>Gardnerella</i>	VLY-585F	GTACGATTCTGCAAGCGCACAAAGC	Šis darbas	60	749
	VLY-1334R	CCTTCCCAAGCGCGAGAACGC			
<i>Lactobacillus crispatus</i>	Lcrisp-452F	GATAGAGGTAGTAACTGGCCTTTA	Fredricks et al., 2007	54	571

Specifiškumas	Pradmuo	Pradmens seka (5'-3')	Šaltinis	Lydimosi temp. (°C)	Amplikono ilgis (bp)
	Lcrisp-1023R	CTTTGTATCTCTACAAATGGCACTA			
<i>Lactobacillus jensenii</i>	JenTR2F	CCTTAAGTCTGGGATACCATT	De Backer et al., 2007	58	90
	JenTR2R	ACGCCGCCTTTTAAACTTCTT			
<i>Lactobacillus gasseri</i>	LactoF	TGGAACAGRTGCTAATACCG	Byun et al., 2004	60	322
	LgassR	CAGTTACTACCTCTATCTTTCTTCACTAC			
<i>Lactobacillus iners</i>	Liners-452L	ACAGGGGTAGTAACTGACCTTTG	Fredricks et al., 2007	55	569
	Liners-1022R	ATCTAATCTCTTAGACTGGCTATG			
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Bif.tuf-1	GAGTACGACTTCAACCAG	Ventura et al., 2003	60	1000
	Bif.tuf-2	CAGGCGAGGATCTTGGT			
<i>Candida albicans</i>	CALB1	TTTATCAACTTGTCACACCAGA	Luo & Mitchell, 2002	58	~273
	CALB2	ATCCCGCCTTACCACTACCG			
<i>Candida glabrata</i>	CGL1	TTATCACACGACTCGACACT	Luo & Mitchell, 2002	58	~423
	CGL2	CCCACATACTGATATGGCCTACAA			
<i>Candida parapsilosis</i>	CPA1	TTGGTAGGCCTTCTATATGGG	Luo & Mitchell, 2002	58	~320
	CPA3	GCCAGAGATTAACTCAACCAA			
<i>Candida tropicalis</i>	CTR1	CAATCCTACCGCCAGAGGTTAT	Luo & Mitchell, 2002	58	~357
	CTR2	TGGCCACTAGCAAAATAAGCGT			

2S lentelė. Mikroorganizmų aptikimo dažnis PGR metodu BV teigiamuose, dalinės BV ir BV neigiamuose mėginiuose

Mikroorganizmas	Dalinė BV vs BV neigiama				BV teigiama vs BV neigiama			
	Jautrumas (%, 95% PI)	Specifiškumas (%, 95% PI)	<i>p</i>	GS (95% PI)	Jautrumas (%, 95% PI)	Specifiškumas (%, 95% PI)	<i>p</i>	GS (95% PI)
<i>G. vaginalis</i>	100 (87.2-100)	13.2 (5.5-25.3)	0.088	8.87 (0.49-61.54)	100 (88.1-100)	13.2 (5.5-25.3)	0.048	9.52 (0.52-173.01)
<i>F. vagiane (ex-A. vaginae)</i>	51.9 (32.0-71.4)	83.0 (70.2-91.9)	0.002	5.27 (1.86-14.92)	89.7 (72.6-97.8)	83.0 (70.2-91.9)	<0.001	42.37 (10.51-170.80)
<i>Prevotella G1</i>	33.3 (16.5-54.0)	88.7 (77.0-95.7)	0.031	3.917 (1.22-12.59)	65.5 (45.6-82.1)	88.7 (76.9-95.7)	<0.001	14.88 (4.74-46.73)
<i>BVAB2</i>	14.8 (4.2-33.7)	94.3 (84.3-98.8)	0.218	2.90 (0.60-14.03)	65.5 (45.6-82.1)	94.3 (84.3-98.8)	<0.001	31.67 (7.85-127.70)
<i>Megasphaera ph. 1</i>	40.7 (22.4-61.2)	79.2 (65.9-89.2)	0.069	2.62 (0.95-7.24)	75.8 (56.5-89.7)	79.2 (65.9-89.2)	<0.001	12.00 (4.08-35.31)
<i>Leptotrichia/ Sneathia</i> spp.	48.2 (28.6- 68.0)	83.0 (70.2-91.9)	0.007	4.54 (1.60-12.86)	68.9 (49.2-84.7)	83.0 (70.2-91.9)	<0.001	10.86 (3.75-31.51)
<i>Eggerthella</i> tipo	44.4 (25.5-64.7)	90.6 (79.4-96.8)	<0.001	7.68 (2.33-25.34)	72.4 (52.7-87.2)	90.6 (79.4-96.9)	<0.001	25.20 (7.37-86.19)
<i>L. crispatus</i>	55.6 (35.3-74.5)	41.5 (28.2-55.9)	0.816	0.88 (0.35-2.26)	37.9 (20.7-57.8)	41.5 (28.1-55.9)	0.106	0.43 (0.17-1.09)
<i>L. inners</i>	77.8 (57.8-91.4)	24.5 (13.7-38.2)	1.000	1.14 (0.38-3.42)	86.2 (68.3-96.1)	24.5 (13.8-38.2)	0.393	2.03 (0.59-6.93)
<i>L. jensenii</i>	25.9 (11.1-46.3)	43.4 (29.8-57.7)	0.010	0.27 (0.10-0.74)	20.7 (8.0-39.8)	43.4 (29.8-57.7)	0.002	0.20 (0.07-0.57)
<i>L. gasseri</i>	33.3 (16.5-54.0)	56.6 (42.3-70.2)	0.472	0.65 (0.25-1.72)	20.7 (8.0-39.8)	56.6 (42.3-70.2)	0.054	0.34 (0.12-0.97)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	14.8 (4.2-33.7)	88.7 (77.0-95.7)	0.726	1.36 (0.35-5.31)	27.6 (12.8-47.2)	88.7 (76.9-95.7)	0.073	2.98 (0.92-9.68)
<i>U. urealiticum</i> (UU)	11.1 (2.4-29.2)	92.4 (81.8-97.9)	0.683	1.53 (0.32-7.40)	10.3 (2.2-27.4)	92.4 (81.8-97.9)	0.694	1.41 (0.29-6.80)
<i>U. parvum</i> (UP)	55.6 (35.3-74.5)	71.7 (57.6-83.2)	0.027	3.17 (1.21-8.32)	69.0 (49.2-84.7)	71.7 (57.6-83.2)	<0.001	5.63 (2.10-15.12)
<i>M. genitalium</i> (MG)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. hominis</i> (MH)	14.8 (4.2-33.7)	98.1 (90.0-99.9)	0.042	9.04 (0.96-85.48)	20.7 (8.0-39.8)	98.1 (89.9-99.9)	0.007	13.56 (1.54-119.2)
<i>N.gonorrhoeae</i> (NG)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chl. trachomatis</i> (CT)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>T. vaginalis</i> (TV)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida</i> pasėlis	7.7 (0.9-25.1)	81.1 (68.0-90.6)	0.318	0.36 (0.07-1.77)	27.6 (12.8-47.2)	81.1 (68.0-90.6)	0.409	1.64 (0.56-4.76)
<i>Candida</i> PGR	30.8 (14.3-51.8)	77.4 (63.8-87.7)	0.583	1.52 (0.53-4.35)	37.9 (20.7-57.8)	81.1 (68.0-90.6)	0.069	2.63 (0.95-7.27)

3S lentelė. Atitikimas tarp įvairių genui specifinių PGR, skirtų bakterijos *Gardnerella* nustatymui makšties mėginiuose

PGR metodai	Kappa (κ) vertė (interpretacija)	
vly PGR vs 16S rRNR PGR	$\kappa = 0,55$ (vidutinis)	Eksperimentinių atvejų skaičius: 83 (91.21% atvejų) Tikimybiniai atvejai: 73.1 (80.34% atvejų) κ standartinė paklaida (SP) = 0.14 95% PI: 0.28-0.87
vly PGR vs cpn60 PGR	$\kappa = 0,44$ (vidutinis)	Eksperimentinių atvejų skaičius: 71 (78.02% atvejų) Tikimybiniai atvejai: 55.4 (60.92% atvejų) κ SP = 0.09 95% PI: 0.26-0.62
vly PGR vs 23S rRNR PGR	$\kappa = 0,23$ (silpnas)	Eksperimentinių atvejų skaičius: 54 (59.34% atvejų) Tikimybiniai atvejai: 42.9 (47.17% atvejų) κ SP = 0.06 95%PI: 0.11-0.35
16S rRNR PGR vs 23S rRNR PGR	$\kappa = 0,15$ (silpnas)	Eksperimentinių atvejų skaičius: 50 (54.95% atvejų) Tikimybiniai atvejai: 42.6 (46.83% atvejų) κ SP = 0.05 95%PI: 0.05-0.26
16S rRNR PGR vs cpn60 PGR	$\kappa = 0,24$ (silpnas)	Eksperimentinių atvejų skaičius: 65 (71.43% atvejų) Tikimybiniai atvejai: 56.6 (62.23% atvejų) κ SP = 0.09 95% PI: 0.07-0.41
23S rRNR PGR vs cpn60 PGR	$\kappa = 0,64$ (geras)	Eksperimentinių atvejų skaičius: 74 (81.32% atvejų) Tikimybiniai atvejai: 44.5 (48.86% atvejų) κ SP = 0.07 95% PI: 0.49-0.78

4S lentelė. *Gardnerella* ir jos potipiai makšties mėginiuose (n=109)

Eilės Nr.	Mėginio Nr.	Nugent vertė	<i>Gardnerella</i> mėginys	
			Yra (+) /nėra (-)	Potipis(iai)
1	001S1	9	+	1+2
2	002S1	8	+	1+2+4
3	003S1	1	–	–
4	004S1	1	–	–
5	005S1	3	+	2+4
6	006S1	4	+	1+4
7	007S1	8	+	1+2+4
8	008S1	6	+	4
9	009S1	3	+	4
10	011S1	9	+	1+4
11	012S1	0	–	–
12	013S1	1	–	–
13	014S1	9	+	2+4
14	015S1	9	+	1
15	017S1	4	+	1+2+4
16	019S1	8	+	4
17	020S1	4	+	2+4
18	021S1	3	–	–
19	022S1	0	–	–
20	023S1	2	+	1
21	005S2	2	+	4
22	024S1	4	+	1+2+4
23	025S1	3	+	4
24	026S1	8	+	1+2+3
25	027S1	4	+	1+3

Eilės Nr.	Mėginio Nr.	Nugent vertė	<i>Gardnerella</i> mėginys	
			Yra (+) /nėra (-)	Potipis(iai)
26	028S1	2	+	3
27	029S1	5	+	2+3+4
28	030S1	1	+	3
29	031S1	3	+	4
30	032S1	1	+	1+4
31	033S1	1	+	ND
32	034S1	3	+	1
33	035S1	1	+	ND
34	036S1	0	+	ND
35	037S1	0	+	4
36	038S1	2	+	4
37	039S1	3	+	1+4
38	040S1	4	+	1+4
39	042S1	0	+	1+4
40	028S2	1	+	1+4
41	044S1	4	+	ND
42	045S1	0	+	4
43	046S1	7	+	1+2+4
44	047S1	10	+	1+4
45	048S1	4	+	4
46	049S1	2	+	4
47	050S1	1	+	ND
48	051S1	4	+	1+2+4
49	052S1	4	+	1+4
50	053S1	10	+	4

Eilès Nr.	Mèginio Nr.	Nugent vertè	<i>Gardnerella</i> mèginyje	
			Yra (+) /nèra (-)	Potipis(iai)
51	054S1	1	+	4
52	056S1	6	+	1+4
53	057S1	10	+	1
54	058S1	9	+	1+2+4
55	059S1	10	+	1
56	060S1	10	+	2+4
57	063S1	8	+	1+2+4
58	064S1	7	+	1+2+4
59	065S1	9	+	1+2+4
60	066S1	2	+	1+3
61	067S1	1	+	1+2+4
62	068S1	4	+	4
62	069S1	3	+	4
64	070S1	2	+	1
65	071S1	4	+	2+4
66	072S1	0	+	1
67	073S1	0	+	4
68	074S1	0	+	1+4
69	076S1	6	+	1+2+4
70	077S1	4	+	4
71	078S1	5	+	2+4
72	079S1	4	+	1
73	080S1	1	+	1
74	081S1	2	+	1+4
75	082S1	9	+	1+2+4
76	030S2	0	+	1+2+4
77	058S2	5	+	4

Eilès Nr.	Mèginio Nr.	Nugent vertè	<i>Gardnerella</i> mèginyje	
			Yra (+) /nèra (-)	Potipis(iai)
78	084S1	9	+	1+2+4
79	085S1	2	+	1+4
80	086S1	6	+	1+2+3+4
81	087S1	7	+	1+2+4
82	088S1	10	+	1+2+3+4
83	089S1	8	+	1+4
84	090S1	5	+	1+2+4
85	091S1	1	+	2+4
86	092S1	3	+	1+2+3+4
87	093S1	3	+	2
88	094S1	2	+	1+2+3+4
89	095S1	3	+	1+2+3+4
90	096S1	7	+	1+2+3+4
91	097S1	0	–	–
92	098S1	8	+	1+2+3+4
93	099S1	3	+	1+2+3+4
94	101S1	1	+	1+2+3+4
95	102S1	5	+	1+2+4
96	103S1	5	+	2+4
97	104S1	1	+	2+4
98	105S1	3	+	1+4
99	106S1	9	+	1+2+3+4
100	107S1	10	+	1+2+4
101	108S1	4	+	1+4
102	109S1	5	+	1+4
103	110S1	5	+	1+4
104	111S1	0	+	1+4

Eilēs Nr.	Mēginio Nr.	Nugent vertē	<i>Gardnerella</i> mēginyje	
			Yra (+) /nēra (-)	Potipis(iai)
105	112S1	0	+	4
106	113S1	1	+	1+4
107	114S1	10	+	1+2+4
108	115S1	10	+	1+4
109	116S1	0	+	1+4

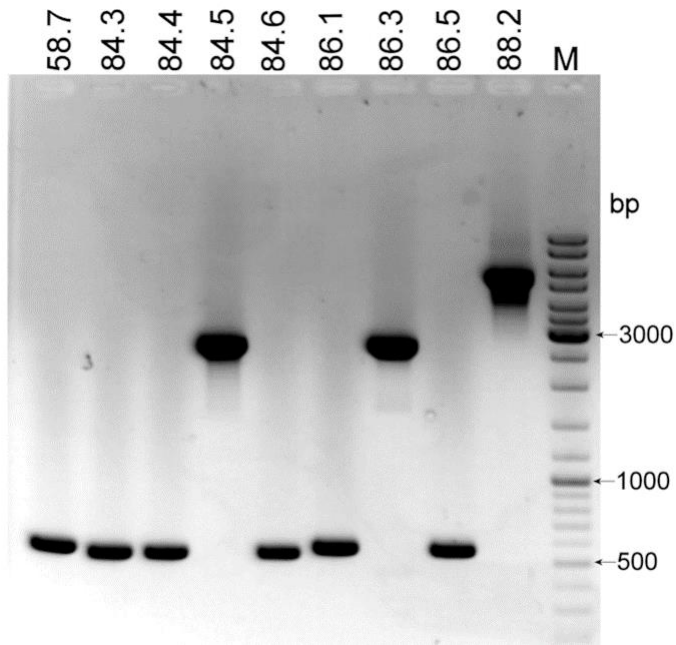
5S lentelė. Keturių *Gardnerella* potipių aptikimo dažnis, panaudojant potipiui būdingas PGR, BV neigiamuose, dalinės BV ir BV neigiamuose mėginiuose

	Jautrumas (% , 95% PI)	Specifiškumas (% , 95% PI)	<i>p</i>	GS (95% PI)
Dauginiai potipis vs vienas potipis				
BV teigiamas vs BV neigiamas	82.7 (64.2-94.2)	47.6 (32.0-63.6)	0.011	4.36 (1.40-13.62)
Dalinė BV vs BV neigiamas	76.9 (56.3-91.0)	47.6 (32.0-63.6)	0.071	3.03 (1.013-9.06)
BV teigiamas+dalinė BV vs BV neigiamas	80.0 (67.1-89.6)	47.6 (32.0-63.6)	0.005	3.64 (1.48-8.91)
Potipis 1 vs bet kuris kitas potipis				
BV teigiamas vs BV neigiamas	86.2 (68.3-96.1)	42.9 (27.7-59.1)	0.010	4.69 (1.38-15.88)
Dalinė BV vs BV neigiamas	61.5 (40.6-79.8)	42.9 (27.7-59.1)	0.803	1.2 (0.44-3.26)
BV teigiamas+dalinė BV vs BV neigiamas	74.6 (61.0-85.4)	42.9 (27.7-59.1)	0.084	2.20 (0.93-5.20)
Potipis 2 vs bet kuris kitas potipis				
BV teigiamas vs BV neigiamas	69.0 (49.2-84.7)	73.8 (58.0-86.1)	<0.001	6.26 (2.20-17.81)
Dalinė BV vs BV neigiamas	46.1 (26.6-66.7)	73.8 (58.0-86.1)	0.117	2.42 (0.86-6.79)
BV teigiamas+dalinė BV vs BV neigiamas	58.2 (44.1-71.4)	73.8 (58.0-86.1)	0.002	3.92 (1.64-9.38)
Potipis 3 vs bet kuris kitas potipis				
BV teigiamas vs BV neigiamas	17.2 (5.8-35.8)	80.9 (65.9-91.4)	1.00	0.88 (0.26-3.04)
Dalinė BV vs BV neigiamas	11.5 (2.4-30.1)	80.9 (65.9-91.4)	0.512	0.55 (0.13-2.31)
BV teigiamas+dalinė BV vs BV neigiamas	14.5 (6.5-26.7)	80.9 (65.9-91.4)	0.590	0.72 (0.25-2.12)
Potipis 4 vs bet kuris kitas potipis				
BV teigiamas vs BV neigiamas	82.8 (64,2-94,2)	21.4 (10.3-36.8)	0.767	1.31 (0.39-4.41)
Dalinė BV vs BV neigiamas	92.3 (74.9-99.0)	21.4 (10.3-36.8)	0.184	3.27 (0.65-16.54)
BV teigiamas+dalinė BV vs BV neigiamas	87.3 (75.6-947)	21.4 (10.3-36.8)	0.281	1.87 (0.63-5.52)

6S lentelė. *Gardnerella* potipiai nekultivuotuose makšties mėginiuose ir potipiai/rūšys kultivuotuose mėginiuose

Eil. Nr.	Makšties mėginys	Nugent vertė	Potipiai mėginyje	<i>Gardnerella</i> izoliatas		
				Nr.	Potipis	Rūšis (pagal <i>cpn 60</i> UT)
1	046S1	7	1+2+4	46.6	1	<i>G. vaginalis</i>
2	047S1	10	1+4	47.3	1	<i>G. vaginalis</i>
3	056S1	6	1+4	56.1	1	<i>G. vaginalis</i>
4	057S1	10	1	57.1	1	<i>G. vaginalis</i>
5	058S1	9	1+2+4	58.1	4	<i>G. leopoldii</i>
6				58.4	1	<i>G. vaginalis</i>
7				58.7	2	<i>G. piovii</i>
8	058S2	5	4	58.2.1	4	<i>G. leopoldii</i>
9				58.2.3	1	<i>G. vaginalis</i>
10	060S1	10	2+4	60.1	2	<i>G. piovii</i>
11	063S1	8	1+2+4	63.1	4	<i>G. leopoldii</i>
12				63.2	2	<i>genome sp. 3</i>
13	065S1	9	1+2+4	65.2	2	<i>genome sp. 3</i>
14	076S1	6	1+2+4	76.2	1	<i>G. vaginalis</i>
15	078S1	5	2+4	78.1	2	<i>G. piovii</i>
16	079S1	4	1	79.2	1	<i>G. vaginalis</i>
17	082S1	9	1+2+4	82.1	4	<i>G. leopoldii</i>
18				82.2	2	<i>genome sp. 3</i>
19	083S1	6	1+2	83.1	1	<i>G. vaginalis</i>
20	084S1	9	1+2+4	84.1	1	<i>G. vaginalis</i>

Eil. Nr.	Makšties mėginys	Nugent vertė	Potipiai mėginyje	<i>Gardnerella izoliatas</i>		
				Nr.	Potipis	Rūšis (pagal <i>cpn 60</i> UT)
21				84.3	2	<i>G. piovii</i>
22				84.4	2	<i>G. piovii</i>
23				84.5	1	<i>G. vaginalis</i>
24				84.6	2	<i>G. piovii</i>
25	086S1	6	1+2+3+4	86.1	nežinomas	<i>G. vaginalis</i>
26				86.3	2	<i>genome sp. 3</i>
27				86.5	2	<i>G. piovii</i>
28	088S1	10	1+2+3+4	88.2	4	<i>G. leopoldii</i>
29	099S1	3	1+2+3+4	99.1	4	<i>G. leopoldii</i>
30	105S1	3	1+4	105.1	1	<i>G. vaginalis</i>
31	106S1	9	1+2+3+4	106.3	4	<i>G. swidsinskii</i>
32				106.5	1	<i>G. vaginalis</i>
33	107S1	10	1+2+4	107.1	4	<i>G. swidsinskii</i>
34	114S1	10	1+2+4	114.2	1	<i>G. vaginalis</i>



1S pav. vly geno ir jam gretimų sekų padauginimas. Jei PGR produktas >2500 bp ilgio DNR fragmentas, tai *Gardnerella* kamienai turi vly (84.5, 86.3 ir 88.2). Jei PGR produktas apie 600 bp fragmentas, tai kamienai vly geno neturi (58.7, 84.3, 84.4, 84.6, 86.1 ir 86.5). M – DNR fragmentų ilgio standartas (Gene Ruler DNA Ladder Mix).

7S lentelė. *Gardnerella* kamienų formuojamos bioplėvelės

Kamienas	Potip is	24 val. inkubavimas						48 val. inkubavimas					
		OD ^a	ODr ^b	2xODr	4xODr	OD biopl. ^c	Biopl. form ^d	OD ^a	ODr ^b	2xODr	4xODr	OD biopl. ^c	Biopl. form. ^d
46.6	1	0.047 ± 0.004	0.061	0.121	0.243	0.068± 0.005	Silpnas	0.059 ± 0.007	0.079	0.157	0.314	0.075± 0.003	Neformuoja
47.3	1	0.090 ± 0.006	0.109	0.219	0.438	0.184 ± 0.010	Silpnas	0.047 ± 0.004	0.061	0.121	0.243	0.146 ± 0.015	Vidutinis
56.1	1	0.064 ± 0.004	0.077	0.153	0.306	0.507 ± 0.043	Stiprus	0.058 ± 0.012	0.095	0.191	0.381	0.106 ± 0.007	Silpnas
57.1	1	0.088 ± 0.006	0.107	0.214	0.429	0.118 ± 0.007	Silpnas	0.047 ± 0.004	0.061	0.121	0.243	0.074 ± 0.009	Silpnas
58.1	4	0.057 ± 0.022	0.124	0.248	0.496	0.079 ± 0.017	Neformuoja	0.050 ± 0.013	0.090	0.180	0.360	0.067 ± 0.002	Neformuoja
58.4	1	0.04 ± 0.003	0.046	0.093	0.185	0.104 ± 0.005	Vidutinis	0.059 ± 0.028	0.143	0.286	0.572	0.130 ± 0.013	Neformuoja
58.7	2	0.076 ± 0.012	0.111	0.223	0.446	0.098 ± 0.011	Neformuoja	0.056 ± 0.01	0.086	0.172	0.343	0.078 ± 0.008	Neformuoja
58S2.1	4	0.061 ± 0.011	0.095	0.189	0.379	0.083 ± 0.005	Neformuoja	0.059 ± 0.005	0.074	0.149	0.298	0.075 ± 0.003	Silpnas
58S2.3	1	0.058 ± 0.004	0.072	0.143	0.286	0.208 ± 0.011	Vidutinis	0.060 ± 0.001	0.064	0.128	0.257	0.175 ± 0.012	Vidutinis
60.1	2	0.059 ± 0.008	0.084	0.169	0.338	0.691 ± 0.031	Stiprus	0.063 ± 0.004	0.075	0.151	0.302	0.830 ± 0.056	Stiprus
63.1	4	0.061 ± 0.005	0.076	0.152	0.303	0.069 ± 0.007	Neformuoja	0.063 ± 0.004	0.075	0.150	0.300	0.067 ± 0.004	Neformuoja
63.2	2	0.055 ± 0.014	0.097	0.195	0.390	0.537 ± 0.046	Stiprus	0.063 ± 0.015	0.107	0.214	0.428	1.187 ± 0.197	Stiprus
65.2	2	0.052 ± 0.014	0.094	0.188	0.376	0.070 ± 0.009	Neformuoja	0.061 ± 0.015	0.105	0.210	0.420	0.091 ± 0.008	Neformuoja

Kamienas	Potip is	24 val. inkubavimas						48 val. inkubavimas					
		OD ^a	ODr ^b	2xODr	4xODr	OD biopl. ^f	Biopl. form ^d	OD ^a	ODr ^b	2xODr	4xODr	OD biopl. ^c	Biopl. form. ^d
76.2	1	0.056 ± 0.014	0.098	0.196	0.392	1.009 ± 0.082	Stiprus	0.053 ± 0.014	0.094	0.187	0.374	0.897 ± 0.048	Stiprus
78.1	2	0.045 ± 0.005	0.060	0.119	0.239	0.109 ± 0.035	Silpnas	0.063 ± 0.003	0.073	0.146	0.292	0.406 ± 0.036	Stiprus
79.2	1	0.07 ± 0.012	0.106	0.213	0.426	0.342 ± 0.047	Vidutinis	0.069 ± 0.003	0.077	0.154	0.308	0.070 ± 0.01	Neformuoja
82.1	4	0.066 ± 0.003	0.075	0.150	0.299	0.071 ± 0.007	Neformuoja	0.058 ± 0.004	0.070	0.141	0.282	0.080 ± 0.008	Silpnas
82.2	2	0.059 ± 0.018	0.112	0.224	0.448	1.299 ± 0.10	Stiprus	0.058 ± 0.004	0.069	0.139	0.278	1.453 ± 0.061	Stiprus
83.1	1	0.049 ± 0.005	0.063	0.127	0.254	0.105 ± 0.009	Silpnas	0.064 ± 0.006	0.082	0.164	0.328	0.146 ± 0.013	Silpnas
84.1	1	0.053 ± 0.011	0.085	0.170	0.340	0.114 ± 0.048	Silpnas	0.048 ± 0.014	0.089	0.177	0.355	0.117 ± 0.053	Silpnas
84.3	2	0.058 ± 0.005	0.074	0.148	0.296	0.063 ± 0.010	non	0.062 ± 0.004	0.07	0.149	0.297	0.087 ± 0.007	weak
84.4	2	0.052 ± 0.001	0.054	0.107	0.214	0.065 ± 0.016	Silpnas	0.061 ± 0.004	0.072	0.144	0.289	0.070 ± 0.009	Neformuoja
84.5	1	0.058 ± 0.006	0.074	0.149	0.297	0.222 ± 0.032	Vidutinis	0.059 ± 0.004	0.072	0.144	0.287	0.109 ± 0.013	Silpnas
84.6	2	0.054 ± 0.003	0.062	0.123	0.246	0.066 ± 0.021	Silpnas	0.058 ± 0.003	0.067	0.134	0.268	0.063 ± 0.007	Neformuoja
86.1	X	0.058 ± 0.006	0.075	0.149	0.299	0.177 ± 0.082	Vidutinis	0.060 ± 0.002	0.067	0.134	0.269	0.106 ± 0.014	Silpnas
86.3	2	0.058 ± 0.001	0.063	0.126	0.252	1.006 ± 0.335	Stiprus	0.062 ± 0.002	0.068	0.136	0.272	1.198 ± 0.103	Stiprus
86.5	2	0.054 ± 0.003	0.062	0.123	0.246	0.081 ± 0.007	Silpnas	0.060 ± 0.005	0.074	0.149	0.298	0.076 ± 0.006	Silpnas

Kamienas	Potip is	24 val. inkubavimas						48 val. inkubavimas					
		OD ^a	ODr ^b	2xODr	4xODr	OD biopl. ^c	Biopl. form ^d	OD ^a	ODr ^b	2xODr	4xODr	OD biopl. ^c	Biopl. form. ^d
88.2	4	0.059 ± 0.006	0.078	0.155	0.310	0.102 ± 0.006	Silpnas	0.060 ± 0.005	0.074	0.149	0.298	0.075 ± 0.019	Silpnas
99.1	4	0.059 ± 0.001	0.062	0.123	0.247	0.074 ± 0.016	Silpnas	0.060 ± 0.005	0.076	0.151	0.303	0.069 ± 0.020	Neformuoja
105.1	1	0.058 ± 0.005	0.073	0.146	0.292	0.091 ± 0.019	Silpnas	0.058 ± 0.005	0.073	0.146	0.291	0.327 ± 0.052	Stiprus
106.3	4	0.058 ± 0.005	0.073	0.146	0.292	0.288 ± 0.069	Vidutinis	0.0064 ± 0.008	0.088	0.175	0.351	0.323 ± 0.109	Vidutinis
106.5	1	0.063 ± 0.012	0.100	0.199	0.399	0.472 ± 0.068	Stiprus	0.065 ± 0.002	0.070	0.141	0.281	0.430 ± 0.070	Stiprus
107.1	4	0.063 ± 0.009	0.089	0.179	0.358	0.122 ± 0.017	Silpnas	0.058 ± 0.004	0.070	0.141	0.282	0.148 ± 0.008	Vidutinis
114.2	1	0.058 ± 0.007	0.080	0.159	0.319	0.350 ± 0.091	Stiprus	0.062 ± 0.008	0.084	0.169	0.338	0.584 ± 0.128	Stiprus
ATCC14018	1	0.06 ± 0.006	0.077	0.153	0.306	0.689 ± 0.084	Stiprus	0.041 ± 0.003	0.050	0.099	0.198	1.088 ± 0.222	Stiprus

^a Neigiamos kontrolės OD₄₉₂ buvo apskaičiuotas kaip keturių nepriklausomų pakartojimų (su keturiais techniniais pakartojimais) vidurkis ± SN.

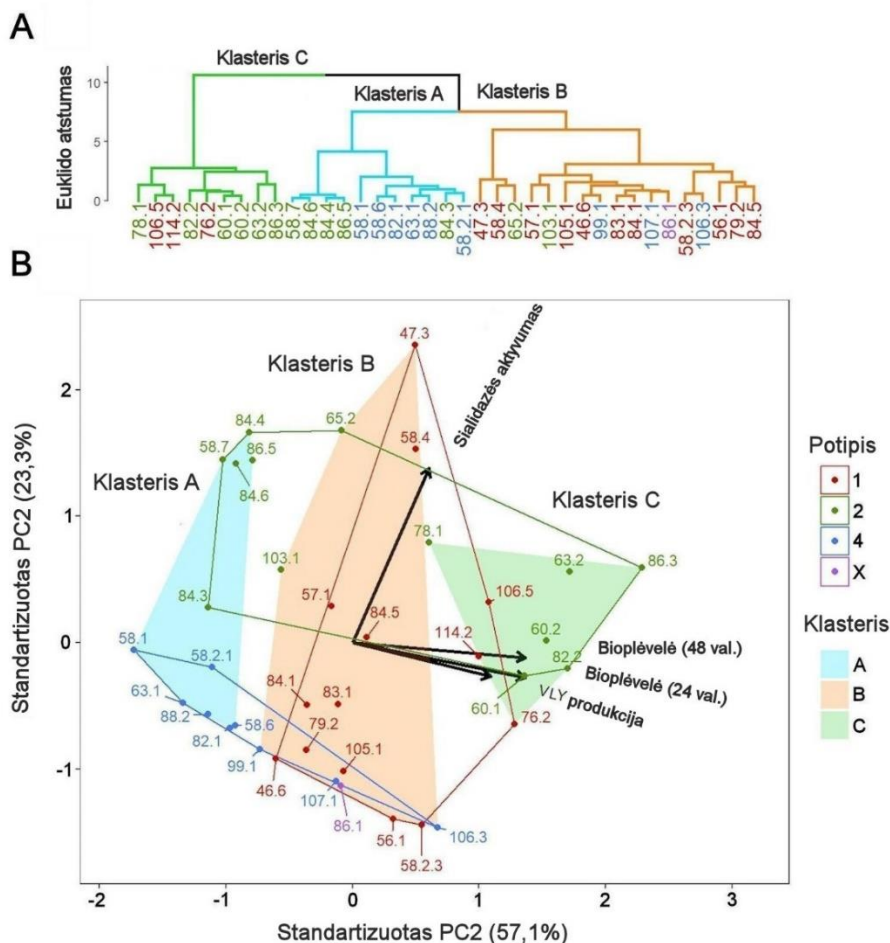
^bRibinė OD vertė (ODr) buvo apskaičiuota kaip trys SN virš neigiamos kontrolės OD vidurkio.

^c OD biopl. – bioplėvėlės OD₄₉₂ kiekvienam kamienui buvo apskaičiuotos kaip keturių biologiniai pakartojimai su aštuoniais techniniais pakartojimais (n = 32) vidurkis ± SN.

^dKamienai buvo suskirstyti pagal jų gebėjimą formuoti bioplėvelę: neformuojantys bioplėvėlės OD ≤ ODr, formuojantys silpną bioplėvelę ODr < OD ≤ 2 × ODr, formuojantys vidutinę bioplėvelę 2 × ODr < OD ≤ 4 × ODr, formuojantys stiprią bioplėvelę 4 × ODr < OD (Stepanović et al., 2000).

1S aprašymas. *Gardnerella* kamienų klasterinė ir pagrindinių komponentų analizė pagal keturias fenotipines savybes

Pirmieji du pagrindiniai komponentai (PC) sudarė 80,4% bendros dispersijos, todėl nuspręsta, kad duomenų atvaizdavimas šių dviejų komponentų erdvėje yra pakankamai reprezentatyvus (2S pav. B). Tikrųjų potipių pasiskirstymas PC erdvėje parodė, kad plotai, kuriuos užima 2 ir 4 potipiai, nepersidengia, todėl galima teigti, kad šie potipiai yra labiausiai nepanašūs. Tai sutampa su skirtumu pagal sialidazės aktyvumą ir atitiko klasifikacinės analizės rezultatus. Trys susietos savybės: bioplėvelė po 24 ir 48 val. inkubavimo bei santykinis VLY kiekis grafike buvo pavaizduotos rodyklėmis, kurios ir buvo nukreiptos beveik ta pačia kryptimi (2S pav. B). Tarp šių rodyklių esantys maži kampai rodo, kad savybės pateikia panašią informaciją. Be to, galima interpretuoti, kad šios trys savybės apsprendžia klasterių struktūrą (spalvoti plotai), nes klasteriai išsidėstę beveik statmenai rodyklių kryptims. Priešingai, beveik statmena rodyklė, rodanti sialidazės aktyvumą, nurodo, kad ši savybė teikia skirtingą informaciją nei bioplėvelės storis ar VLY kiekis ir ji turėjo mažiau įtakos klasterio struktūrai.



2S pav. Hierarchinės klasterizacijos (HC) ir pagrindinių komponentų (PC) analizės rezultatai, pagrįsti keturiomis savybėmis: sialidazės aktyvumu, VLY kiekiu ir bioplėvelės formavimu po 24 ir 48 val. inkubavimo. (A) Dendrograma. Šakų spalvos žymi tris didžiausius klasterius. (B) PCA rezultatų grafikas. Ašyse atidėtos pirmojo ir antrojo principinių komponentų (PC) reikšmės. Ašių pavadinimų skliaustuose pateikta procentinė dispersijos dalis, kurią paaiškina nurodytasis PC. Rodyklės žymi fenotipines savybes, taškai – kamienus, o taškų/kamienų numerių spalvos atitinka potipio numerį, vieno potipio taškai apvesti uždara linija. Spalvoti laukai nurodo plotus, kuriuos riboja dendrogramoje nustatyti klasteriai.

SUMMARY

It is generally assumed that the healthy vaginal microbiota of reproductive-aged women is dominated by lactobacilli with low bacterial diversity. Lactobacilli dominance during reproductive years has been attributed to high levels of oestrogen and vaginal glycogen. Products of glycogen catabolism are metabolized by lactobacilli to produce lactic acid, which lowers the vaginal pH to ≥ 3.8 , thereby inhibiting the growth of potential pathogens. Moreover, other protective properties of lactobacilli include the production of bacteriocins, adhesion to vaginal epithelial cells, and immunomodulatory activity (Witkin & Linhares, 2017).

A decrease in lactobacilli is associated with an increase in microbiota diversity, a condition referred to as vaginal dysbiosis. Bacterial vaginosis (BV) is a form of vaginal dysbiosis, microbiologically characterized by a reduction in beneficial lactobacilli, such as *Lactobacillus crispatus*, and an increase in facultative and strict anaerobic bacteria, including *Gardnerella* and *Fannyhessea vaginiae* (formerly *Atopobium vaginiae*), *Prevotella* spp., and other bacteria (Fredriks et al., 2005; Ravel et al., 2011). BV has been associated with gynaecological and reproductive health issues in women, including preterm birth, increased risk of HIV and sexually transmitted infections (Borgdorff et al., 2014; Fetweiss et al., 2019). BV is diagnosed using the four Amsel criteria (Amsel et al., 1983), which include an elevated vaginal pH (>4.5), watery, thin, white discharge, an amine odor, and microscopically detected clue cells, which signify adherence of the bacteria to detached epithelial cells. The gold standard in BV diagnosis remains the Nugent scoring (NS) system, which is based on the semi-quantification of three bacterial morphotypes in Gram-stained vaginal fluid. NS 0-3 indicates BV-negative lactobacilli-dominated vaginal microbiota, NS 4-6 is considered intermediate microbiota, and a score of 7-10 signifies BV.

Bacterium *Gardnerella vaginalis*, a facultative gram-positive anaerobe that resides within the human urogenital microbiota, was originally considered to be the etiological agent of BV (Gardner & Dukes, 1955). *G. vaginalis* has been detected in the vaginal microbiota of 95-100% of women with BV (Muzny & Schwebke, 2016); however, it was found in 30-50% of BV-negative women, albeit in lower quantities (Aroutcheva et al., 2001; Shipitsyna et al., 2019). *Gardnerella* has attracted attention due to its exceptional virulence potential compared to other BV-associated bacteria (Patterson et al., 2010). *Gardnerella* secretes the cholesterol-dependent toxin vaginolysin (VLY), which pore-forming activity is associated with

cytotoxicity (Gelber et al., 2008). Sialidases produced by *Gardnerella* participate in the degradation of protective vaginal mucus (Lewis et al., 2013; Robinson et al., 2019). *Gardnerella* strongly adheres to vaginal epithelial cells and produces a biofilm (Patterson et al., 2010). A structured polymicrobial biofilm consisting of a numerically predominant *Gardnerella* and other incorporated bacterial species was detected in BV patients, but not in BV-negative individuals (Swidsinski et al., 2005).

The history of *Gardnerella* taxonomy reflects the evolving understanding of the bacterium, its role in human health, and advancements in microbiological classification. The genus of *Gardnerella* was established by Greenwood and Pickett in 1980, with *G. vaginalis* as the sole species. Molecular typing divided *Gardnerella* into up to 17 biotypes (Piot et al., 1984). The DNA-based methods revealed significant genetic diversity among *G. vaginalis* strains (Pleckaityte et al., 2012), resulting in their classification into four distinct clades, such as clades 1, 2, 3, and 4 (Ahmed et al., 2014; Balashov et al., 2016). Profound genomic analyses and phylogenetic studies have identified at least 13 distinct genomic species that were previously named *G. vaginalis*. *Gardnerella* was split into multiple species, including *G. vaginalis*, *G. piotii*, *G. leopoldii*, and *G. swidsinskii* (Vaneechoutte et al., 2019).

Like a history of *Gardnerella* nomenclature, the understanding of the relationship between this bacterium, health, and disease has evolved since its assignment as the causative agent of BV. The presence of *Gardnerella* in the vagina, even at high levels, is not always associated with BV symptoms (Ma et al., 2012). This observation led to the prevailing hypothesis that different *Gardnerella* clades or strains differ in their pathogenic potential with different role in health and disease.

This study aims to isolate *Gardnerella* strains from characterized vaginal samples, evaluate virulence-associated characteristics, and assess the distribution of virulence factors across *Gardnerella* clades/species.

The objectives:

1. Characterize the vaginal samples as BV-positive and BV-negative.
2. Determine *Gardnerella* clades in noncultured vaginal samples with non-BV and BV microbiota.
3. Isolate *Gardnerella* strains from vaginal samples and subtype them into clades/species.
4. To evaluate virulence factors of *Gardnerella*, as follows: the ability to produce toxin vaginolysin, grow as a biofilm, and express sialidase activity.

5. To assess the distribution of virulence factors across *Gardnerella* clades/species and their association with BV pathogenesis.

Prevalence and distribution of *Gardnerella* clades in non-cultured vaginal samples

All vaginal samples were subjected to Gram-staining and microscopy to assess their Nugent score (NS), which has been used as a gold standard for BV diagnosis (Nugent et al., 1991). The diagnosis was also defined by the clinician and included the mandatory presence of three Amsel criteria (Amsel et al., 1983). Ten samples were excluded from further analysis due to discrepancies in classification using the Amsel criteria and Nugent scoring. To characterize the vaginal microbiota of healthy and BV-affected women, the presence of pertinent bacterial species was detected by PCR assays. Of the 119 vaginal samples, 53 (44.5%) were BV-negative, 29 (24.4%) were classified as BV positive, and 27 (22.7%) were designated as partial BV. *Gardnerella* was found in 87% of women without BV and in 100% of BV-positive samples. The vast majority of vaginal samples contained multiple *Gardnerella* clades in different combinations. Clade 4 was the most frequently detected (79.4%), followed by clade 1 (63.7%), clade 2 (42.2%), and clade 3 (15.7%). Multi-clade *Gardnerella* communities were positively associated with $NS \geq 4$ (OR 3.64; 95% CI 1.48–8.91; $p = 0.005$). This finding aligns with the results of a previous study (Balashov et al., 2014) and subsequent studies (Hill et al., 2019; Hilbert et al., 2017; Munch et al., 2024). Within the vaginal samples with single-clade communities ($n = 31$), clade 4 ($n = 19$) and clade 1 ($n = 9$) were most prevalent, regardless of the BV status. The prevalence of each of the four *Gardnerella* clades showed a distinct association with BV status. The less often detected clade 3 demonstrated no association with the disorder. The most ubiquitous clade 4 showed no association with BV (OR 1.31; 95% CI 0.39–4.41; $p = 0.767$), whereas clade 2 was the most frequently observed in women with both high NS (OR 6.26; 95% CI 2.20–17.81; $p < 0.001$). Clade 1 showed a positive association with BV (OR 4.69; 95% CI 1.38–15.88; $p = 0.010$), but was also found in 61.5% and 57.1% of partial BV and BV-negative samples, respectively. There are contradictory data on *Gardnerella* clades' specificity for BV (Balashov et al., 2014; Shipitsyna et al. 2019; Munch et al., 2024). The presence of multiple *Gardnerella* clades was the marker of BV in our study population. The later studies confirmed these findings and demonstrated that vaginal colonization with multiple *Gardnerella* clades is a risk factor for the development of BV (Munch et al., 2024).

***Gardnerella* isolates and their subtyping into clades and species**

The majority of *Gardnerella* strains were isolated from vaginal samples with NS $\geq$ 4. Isolates were subtyped by clade-specific PCR (Balashov et al., 2014). A total of 34 *Gardnerella* strains were selected for further analysis: 14 strains were of clade 1, 11 of clade 2, 8 belonged to clade 4, and one isolate of unknown clade. Multiple *Gardnerella* clades were isolated from 7 vaginal samples.

To adjust the updated *Gardnerella* taxonomy (Vaneechoutte et al., 2019), all isolates were distributed into species based on the *cpn60* universal target (UT) sequences (Schellenberg et al., 2016). The species were resolved in the *cpn60* phylogenetic tree based on the alignment of the UT sequence (this work was done by Dr. A. Bulavaitė, VU GMC BTI). The reference sequences from the type strains of four named species and nine genome species were included. Fifteen isolates that corresponded to the previously determined clade 1 were identified as *G. vaginalis*. The isolate with an undetermined clade was assigned to *G. vaginalis*. Isolates of clade 2 were differentiated into *G. piovii* and genome species 3, which was consistent with the phylogenetic relationship described in Hill et al. (2019). The isolates corresponding to clade 4 were separated into *G. swidsinskii* and *G. leopoldii*.

Virulence potential of different *Gardnerella* clades/species

A total of 34 *Gardnerella* strains, which resolved into clades/species, were analyzed with respect to their ability to produce toxin VLY, form a biofilm, and express sialidase activity.

The gene coding for VLY was found in nearly all isolates of clade 1 (*G. vaginalis*) and in all isolates of clade 4; however, clade 2 was the most variable, with the presence of the *vly* gene. Specifically, 5 of 11 strains (all *G. piovii*) lacked the gene. VLY production by *Gardnerella* isolates in liquid medium was measured after 24 h of growth. VLY was quantified using a monoclonal antibody (Mab)-based sandwich ELISA as described previously (Pleckaityte et al., 2012). Statistically significant differences in VLY production were detected among the clades; however, the subsequent post-hoc analysis revealed no significantly different pairs of clades. Regarding the VLY amount, relatively high strain-to-strain variability was observed among isolates of clades 2 and 4, whereas clade 1 exhibited greater homogeneity. Although there is no direct evidence describing the role of VLY *in vivo*, the concentration of this toxin detected in BV-positive vaginal samples (Nowak et al., 2018) was sufficient to affect vaginal squamous cells, which are

subsequently exfoliated and form a part of the BV-characteristic vaginal discharge (Bradshaw et al., 2025).

Desquamated vaginal epithelial cells covered with a polymicrobial bacterial biofilm, mainly composed of *Gardnerella*, were detected in BV patients (Swidsinski et al., 2014). Biofilm formation is also associated with increased antimicrobial resistance and the recurrence of BV, and biofilm creates the possibility for transmission through sexual contact. All isolates were cultured in BHIs medium in 96-well plates for 24 and 48 h to evaluate biofilm formation *in vitro*. Differences among isolates in biofilm amount after different periods of incubation were not statistically significant. Clade 1 (*G. vaginalis*) exhibited greater internal variability with respect to biofilm amount, whereas the vast majority of clade 4 (*G. swidsinskii* and *G. leopoldii*) formed either little or no biofilm. However, differences in biofilm amount among the clades did not reach statistical significance.

Elevated activities of sialidases and other glycosylases were detected in vaginal fluids of BV patients (Cauci & Culhane, 2011). Three sialidases were detected in *Gardnerella*: NanH1, NanH2, and NanH3 (Lewis et al., 2012; Robinsosn et al., 2019). It is believed that NanH1 (formerly Sialidase A) is not responsible for the sialidase activity observed in *Gardnerella*, whereas NanH2 and NanH3 are the major contributors to sialidase activity (Robinson et al., 2019). Sialidase degrades the mucins of vaginal epithelial cells by releasing sialic acid. Degradation of protective mucus layer by sialidases leads to exfoliation and detachment of epithelial cells, enabling bacterial adhesion to the vaginal epithelium. Clade 4 (*G. swidsinskii* and *G. leopoldii*) strains lacked the *nanH1-nanH2-nanH3* genes and did not exhibit sialidase activity in both qualitative and quantitative assays using the fluorogenic substrate MUN. Indeed, the strains coding for NanH1 but lacking genes coding for NanH2/NanH3 were sialidase activity-negative. Clade 2 (*G. piovii* and genome sp.3) demonstrated sialidase activity, except for one isolate, in culture supernatants. Despite the fact that all clade 1 (*G. vaginalis*) isolates possessed *nanH1*, only three isolates that coded for NanH3 were sialidase activity positive. The *post hoc* analysis confirmed that all three clades differed significantly in terms of sialidase activity. Clade 2 had the highest, clade 1 intermediate, and clade 4 the lowest sialidase activity.

Classification analysis demonstrated that the *Gardnerella* clades could be best defined based on the profiles of two phenotypic characteristics: sialidase activity and VLY production. These profiles enabled the correct identification of clades only in a fraction of *Gardnerella* isolates. Further statistical exploratory data analysis of phenotypic characteristics revealed that clades 2 and 4 are the most dissimilar subgroups. Furthermore, it showed that

clade 4 is the most homogeneous subgroup, as all isolates were found in the same cluster, characterized by low production levels of all studied virulence factors. By contrast, both clades 1 and 2 exhibited greater internal variability. Clade 2 isolates were mainly distributed between two clusters, which virtually confirms the presence of two species, *G. piovii* and genome sp. 3, in this clade. However, the small number of genome sp. 3 isolates precludes confirmation of this presumption.

Conclusions:

1. Using traditional and molecular methods, differentiation was made between healthy and BV microbiota in women; *Gardnerella* were detected in all BV microbiota and in 87% of healthy microbiota samples.

2. The most frequently detected *Gardnerella* clades in the vaginal microbiota were clade 1 (*G. vaginalis* species) and clade 4 (*G. swidsinski* and *G. leopoldii*), which were also frequently detected in studies conducted in other countries.

3. The presence of multiple *Gardnerella* clades was associated with BV, whereas single-clade colonization was characteristic of healthy vaginal microbiota.

4. Strains of clades 1, 2, and 4 were isolated from vaginal samples, whereas strains of less often detected clade 3 could not be isolated.

5. Clade 4 *Gardnerella* strains lacked sialidase-encoding genes and sialidase activity associated with the pathogenesis of BV, possibly because this subtype is frequently found in healthy vaginal microbiota.

6. *Gardnerella* clades exhibited different virulence potentials, which may underlie their distinct roles in health and disease: clade 4 was the most homogenous group characterized by low production of all studied virulence factors, whereas clades 1 and 2 were heterogeneous characterized by a distinct profile of phenotypic characteristics.

PADĖKA

Pirmiausiai noriu padėkoti mokslinei konsultantei ir ilgametei mokslinių diskusijų ir darbų vadovei bei įkvepėjai dr. Mildai Plečkaitytei. Esu nuoširdžiai dėkingą už neįkainuojamą jos indėlį į mano profesinį augimą, nuolatinį skatinimą ir naujų idėjų generavimą.

Dėkoju Biotechnologijos instituto bendruomenei, o ypač prof. dr. Aurelijai Žvirblienei už suteiktą galimybę būti bendruomenės dalimi ir palaikymą.

Dėkoju savo šeimai ir artimiesiems tiesiogiai ir netiesiogiai prisidėjusiems prie palaikymo šio darbo rengimo laikotarpiu.

PUBLIKACIJŲ, SUSIJUSIŲ SU DISERTACINIŲ DARBU,
SĄRAŠAS

1. **Janulaitiene M**, Gegzna V, Baranauskiene L, Bulavaitė A, Simanavicius M, Pleckaityte M. Phenotypic characterization of *Gardnerella vaginalis* subgroups suggests differences in their virulence potential. *PLoS ONE*, 2018: 13(7): e0200625. doi: 10.1371/journal.pone.0200625.
2. **Janulaitiene M**, Paliulyte V, Grinceviciene S, Zakareviciene J, Vladisauskiene A, Marcinkute A, Pleckaityte M. Prevalence and distribution of *Gardnerella vaginalis* subgroups in women with and without bacterial vaginosis. *BMC Infectious Diseases*, 2017: 17:394. doi: 10.1186/s12879-017-2501-y.
3. Tankovic J, Timinskas A, **Janulaitiene M**, Zilnyte M, Baudel JL, Maury E, Zvirbliene A, Pleckaityte M. *Gardnerella vaginalis* bacteremia associated with severe acute encephalopathy in a young female patient. *Anaerobe*, 2017: 47:132-134. doi: 10.1016/j.anaerobe.2017.05.010.

KONFERENCIJŲ SĄRAŠAS

1. Žodinis pranešimas “Polyclonality of *Gardnerella vaginalis* is positively associated with its high vaginal loads”. Konferencijoje “The 9th ESIDOG/1st ISIDOD (International Society for Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology) European Conference”, 2015 m. spalio mėn. 29 d.-lapkričio mėn. 1 d., Ryga, Latvija.
2. Žodinis pranešimas: “Distribution of *Gardnerella vaginalis* subtypes in characterized vaginal samples of Lithuanian women”. 3rd Congress of Baltic Microbiologist, 2016 m. spalio mėn. 18-21 d. Vilnius.
3. Žodinis ir standinis pranešimas: “Prevalence and distribution of *Gardnerella vaginalis* subgroups in women with and without bacterial vaginosis”. 2nd Vilnius Summit on Communicable Diseases/14th Congress of the BADV (Baltic Association of Dermatovenerologists), 2017 m. spalio mėn. 4-7 d., Vilnius, Lietuva.

GYVENIMO APRAŠYMAS

Miglė Janulaitienė

Išsilavinimas

- 1999–2003 m. Vilniaus universitetas, Gamtos mokslų fakultetas, Molekulinė biologija, Biologijos bakalauro laipsnis
- 2003–2005 m. Vilniaus universitetas, Medicinos mokslų fakultetas, Medicinos biologija, Biologijos magistro laipsnis
- 2013–2017 m. Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biotechnologijos institutas, Chemijos inžinerijos doktorantūros studijos

Darbovietės

- Nacionalinė visuomenės sveikatos priežiūros laboratorija. Žolyno g. 36, Vilnius
Medicinos mikrobiologė Klinikinių tyrimų poskyris 2007-01 – 2008-01
Medicinos mikrobiologė Retų ir pavojingų užkrečiamųjų ligų sukėlėjų tyrimų poskyris 2008-01 – 2008-11
Retų ir pavojingų užkrečiamųjų ligų sukėlėjų tyrimų poskyrio vedėja 2008-11 – 2022-01
- Infekcinių ligų ir tuberkuliozės ligoninė, Santaros klinikos, Tuberkuliozės laboratorija. P. Širvio g. 5, Vilnius
Medicinos biologė 2012-11 – 2013-11
- Vilniaus universitetas, Gyvybės mokslų centras, Biotechnologijos institutas
Jaunesnioji mokslo darbuotoja 2013-2014; 2017-2019

Moksliniai projektai

Lietuvos mokslo tarybos finansuoti projektai

- Terapinės ir diagnostinės paskirties baltymų (antikūnų), neutralizuojančių bakterinius citolizinus, technologijos kūrimas (LVMSF, pramoninės biotechnologijos plėtros programa, Nr. N-08002) 2008-2010. Dalyvis
- Mokslininkų grupių projektas “Bakterijos *Gardnerella vaginalis* kamienų patogeniškumo analizė” MIP-70, 2010-2011. Dalyvis

- Bakterinio toksino vaginolizino citolitinio veikimo mechanizmo tyrimas (Mokslininkų grupių projektas MIP-114/2012), 2012-2014. Dalyvis
- Lyties takų bakterijos *Gardnerella vaginalis* pogrupių ir jiems būdingų virulentiškumo veiksnių tyrimai S-MIP-17-49, 2017-2020. Dalyvis

Biomedicininiai tyrimai

- Nikotinamido adenino dinukleotido (NAD) koncentracijos kraujyje dinamika skirtingo amžiaus grupėse ir priklausomybė nuo lyties, 2023/6-1516-980, 2023-2025. Pagrindinė tyrėja

Bakalauro baigiamųjų darbų vadovė ir konsultantė

B. Šocik (2015, VU GMF); D. Račkauskienė (2017, VU GMC, BI).

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p. info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
bookshop.vu.lt, journals.vu.lt
Tiražas 15 egz.