

# BROJ I VIJABILNOST VAGINALNIH POLIMORFONUKEARA KAO POKAZATELJ RIZIKA ZA PREVREMENI POROĐAJ



Ppk dr med. mr sc. med DANE NENADIĆ

UNIVERZITET ODBRANE  
VOJNOMEDICINSKA AKADEMIJA

*Ppk dr med. mr sc. med.*

DANE NENADIĆ

BROJ I VIJABILNOST VAGINALNIH POLIMORFONUKLEARA KAO POKAZATELJ  
RIZIKA ZA PREVREMENI POROĐAJ

DOKTORSKA TEZA

mentor Brigadni general akademik Miodrag Čolić

Beograd, 14.11.2014. god.



SADRŽAJ	
DOKTORSKA TEZA .....	2
SAŽETAK.....	6
ABSTRACT .....	8
1. UVOD .....	10
1.1 PREVREMENI POROĐAJ.....	11
1.2 ZAPALJENJSKI PROCES KAO SREDIŠNJI DOGAĐAJ TERMINSKOG I PP ..	14
1.3 INFEKCIJE I PREVREMENI POROĐAJ.....	16
1.4 VAGINALNE INFEKCIJE.....	23
1.5 MIKROBIOM VAGINE .....	26
1.6 LOKALNI IMUNSKI SISTEM IPOLIMORFONUKEARI .....	33
1.7 APOPTOZA .....	36
1.8 BROJ POLIMORFONUKEARA U VAGINALNOM SEKRETU .....	38
1.9 CERVIKOMETRIJA.....	40
2 RADNE HIPOTEZE .....	45
2.1 CILJEVI.....	45
2.2 PACIJENTKINJE I METODI.....	47
2.3 PROCENA STANJA VAGINALNE FLORE - MIKROSKOPSKI NALAZ.....	48
2.3.1 Mikroskopski pregled nativnog preparata ( X400 ) .....	48
2.3.2 Bojenje po Gramu .....	52
2.4 ODREĐIVANJE BROJA VAGINALNIH POLIMORFONUKEARA .....	87
2.5 ODREĐIVANJE VIJABILNOSTI VAGINALNIH POLIMORFONUKEARA ..	94
2.6 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJA ISPITIVANIH CITOKINA .....	97
2.7 MERENJE DUŽINE GRLIĆA MATERICE .....	98
2.8 STATISTIČKA ANALIZA.....	98
3 REZULTATI I DISKUSIJA .....	100
3.1 UPOREDNI REZULTATI - POSTOJEĆI DIJAGNOSTIČKI KRITERIJUMI U ODNOSU NA NOVU PODELU .....	100
3.1.1 Poređenje rezultata–Nugentovi kriterijumi i NOVA PODELA.....	100
3.1.2 Poređenje rezultata - Amselovi kriterijumi i NOVA PODELA.....	105
3.1.3 Poređenje rezultata - kriterijumi po Nugentu, Ison/Hayu i NOVA PODELA	107
3.1.4 Poređenje rezultata – Claeyasu, Nugentu; Ison/Hayu i Nova Podela .....	113
3.2 MOGUĆI OMETAJUĆI ČINIOCI U DIJAGNOZI STANJA MIKROFLORE VAGINE.....	121
3.2.1 KVASNICE IZ RODA KANDIDA ( <i>Candida spp.</i> ).....	121
3.2.2 MORFOTIP KOKA .....	144
3.2.3 MORFOTIP LEPTO .....	150
3.2.4 MORFOTIP BIFIDO .....	155

3.3	BROJ, VIJABILNOST I APOPTOZA VAGINALNIH POLIMORFONUKLEARA	161
3.3.1	BROJ POLIMORFONUKLEARA- SEMIKVANTITATIVNE METODE	162
3.3.2	BROJ POLIMORFONUKLEARA- KVANTITATIVNE METODE	170
3.3.3	APOPTOZA I VIJABILNOST VAGINALNIH POLIMORFONUKLEARA	187
3.4	UKUPNA PROCENA STANJA VAGINALNOG EKOSISTEMA	205
3.5	pH VAGINE U PROCENI STANJA VAGINALNOG EKOSISTEMA	243
3.6	VREDNOST NALAZA KULTURE CERVIKOVAGINALNOG BRISA	253
3.7	KONCENTRACIJE ISPITIVANIH CITOKINA	257
3.7.1	IL-1 $\beta$	265
3.7.2	IL-6	266
3.7.3	IL-12 p70	269
3.7.4	KONCENTRACIJE CITOKINA PO GRUPAMA NA OSNOVU RAZLIČITIH DIJAGNOSTIČKIH KRITERIJUMA	272
3.8	BIFIDO FORME I PREVREMENI POROĐAJ	291
3.9	DUŽINA GRLIĆA I PREVREMENI POROĐAJ	306
4	ZAKLJUČCI	321
	LITERATURA	324
	PRILOG 1	365
	PRILOG 2	375
	PRILOG 3	380
	PRILOG 4	398

## SAŽETAK

**Uvod:** Prevremeni porođaj (PP) je glavni uzrok perinatalnog morbiditeta i mortaliteta. Učestalost PP nije se bitnije menjala poslednjih nekoliko decenija, a u Srbiji je između 6-9%. Promene u sastavu vaginalne flore i posledično zapaljenje su početni i najvažniji događaj u etiopatogenezi prevremenog porođaja (PP) udruženog s infekcijom, a polimorfonuklearni leukociti (PMN) kao primarne efektorske i imunoregulatorne ćelije igraju značajnu ulogu u ovim zbivanjima.

**Cilj:** Utvrditi međusobnu povezanost broja, vijabilnosti i apoptoze vaginalnih PMN sa rezultatima mikroskopskih, mikrobioloških, ultrazvučnih nalaza i koncentracija različitih citokina, a potom i utvrditi vrednost svih ovih parametara u proceni rizika za PP.

**Pacijentkinje i metodi:** Prospektivna studija, 732 trudnice bez znakova i simptoma PP, u periodu između 24. i 28. nedelje trudnoće. Određivana je vijabilnost i apoptoza PMN i kvantitativno određivan broj PMN (n=217). Mikroskopske analize su obuhvatale semikvantitativno određivanje broja PMN i pregled brisa vaginalnog sekreta nativnog preparata i preparata bojenog po Gramu na osnovu standardnih dijagnostičkih kriterijuma i mikroskopskih uvećanja na x400 i x1000 i dve nove metodologije mikroskopsko pregleda (NMMP) na uvećanju x200 za procenu stanja vaginalne flore i za semikvantitativno određivanje broja PMN. Ispitivane su i koncentracije 13 citokina i merena dužina grlića transvaginalnim ultrazvukom.

**Rezultati:** NMMP daje bolje rezultate u proceni stanja vaginalne flore i određivanju broja PMN u odnosu na standardne i kvantitativne metode. Ovakvim pristupom detektovana grupa pacijentkinja (n=50) sa mikroskopskim nalazom BIFIDO formi imala je 9,8 puta veći relativni rizik (RR=9,8; 95% CI 2,7-34,6) za PP u odnosu na pacijentkinje sa normalnim nalazom ili BV. U ovoj grupi procenat apoptoze i koncentracije antiinflamatornog IL-10 bile su statistički značajno niže ( $p<0,001$  i  $p<0,05$ ), a vaginalni pH>4,5. Pacijentkinje sa BV imale su povećan stepen apoptoze, ali i povećane koncentracije IL-1 $\beta$  i IL-6. Utvrđeno je postojanje negativne korelacije između broja PMN stepena apoptoze i dužine grlića materice. Procenat apoptoze je bio manji kod pacijentkinja sa povećanim broj PMN. Samo su pacijentkinje sa povećanim brojem PMN na uvećanju x200 imale značajno kraći grlić ( $p<0,05$ ), a kraći grlić je bio povezan sa povećanim rizikom za PP. Drugi poremećaji vaginalne flore i koncentracije ispitivanih citokina nisu pokazali povezanost sa incidencijom ili rizikom od PP. Pre 37 n.g se porodilo se 3,4% (21/619) pacijentkinja, od kojih se preko polovine (n=11) porodilo posle 35 n.g.

**Zaključak:** Različiti bakterijski morfotipovi daju slične mikroskopske nalaze na preparatu bojenom po Gramu, a trenutni dijagnostički kriterijumi uvažavaju samo tri bakterijska morfotipa i dijagnostikuju BV. Za bolju procenu rizika za PP potrebna je pažljivija analiza bakterijskih morfotipova, njihova semikvantitativna procena i istovremena primena drugih jednostavnih metoda poput pH vagine koji, primenjeni zajedno, obezbeđuju veću senzitivnost u otkrivanju vaginalne disbioze. Asimptomatske trudnice između 24-28 n.g. kod kojih NMMP detektujemo BIFIDO forme i povećan broj PMN, a imaju i manji procenat apoptoze, povišen pH vagine i kraći grlić materice predstavljaju grupu sa visokim rizikom za PP. NMMP kao jednostavna, jeftina i brza procedura omogućava precizniju procenu broja vaginalnih PMN i kvantitativni i kvalitativni biodiverzitet vaginalne mikroflore i tako bolje prepoznavanje pacijentkinja sa rizikom za PP. Zajedno sa još dva jednostavna testa (pH i KOH) i cervikometrijom, NMMP možemo iz populacije asimptomatskih trudnica izdvojiti najveći broj onih sa povećanim rizikom za PP i adekvatnim lečenjem značajno smanjiti učestalost PP (3,4%) kao što je to pokazano u ovom ispitivanju.

## ABSTRACT

**Introduction:** Preterm birth (PB) is a major cause of perinatal morbidity and mortality. Incidence of PB has not substantially changed over the past decades, and in Serbia ranges from 6 to 9%. Alterations in the composition of vaginal microflora and accompanying inflammation are initial and most important events in etiopathogenesis of PB associated with infection. Polymorphonuclear leukocytes (PMN) as primary effector and immunoregulatory cells play a prominent role in the process.

**Aim:** Determine possible relationships between numbers, viability and apoptosis of vaginal PMN, and cytokines' levels, results of microscopic, microbiologic and ultrasonographic findings. Establish the value of the parameters in the PB risk prediction.

**Patients and methods:** The prospective study enrolled 732 pregnant women without signs and symptoms of PB, examined between weeks 24 and 28 of gestation. Viability, apoptosis and numbers of PMN were determined in a quantitative fashion (n=217). Microscopic analyses comprised semiquantitative PMN determination, native and Gram-stained vaginal smear analysis according to standard diagnostic criteria at magnifications x400 and x1000, and two newly described methods at a magnification of x200. Concentrations of 13 cytokines were measured and length of uterine cervix was assessed by transvaginal ultrasound.

**Results:** Microscopic examination of Gram-stained samples at x200 offers better results in vaginal microflora assessment and PMN quantification than standard and quantitative methods, respectively. This approach enabled us to detect a group of patients (n=50) with a microscopic finding of BIFIDO forms which had a 9.8 higher relative risk (RR=9.8; 95% CI 2.7-34.6) for PB in comparison to patients with normal findings or bacterial vaginosis (BV). In this group of pregnant women the percentage of apoptosis of PMN and levels of IL-10 were significantly lower ( $p<0.001$  and  $p<0.05$ ), and vaginal pH was  $>4.5$ . Women with BV had higher apoptosis of PMN and elevated levels of IL-1 $\beta$  and IL-6. Patients with elevated PMN numbers, determined at a magnification x200, had significantly shorter cervix ( $p<0.05$ ). Apoptosis and number of PMN were inversely correlated. The shorter cervix means a higher risk for PB. Other disorders of vaginal microflora and cytokines' concentrations have not shown any association with the incidence or risks for PB. PB was registered in 3.4% of our women (21/619) with more than a half (n=11) gave birth after week 35.

**Conclusion:** Diverse bacterial morphotypes produce similar microscopic images on Gram-stained samples but presently widely used diagnostic criteria take into account only three



morphotypes primarily to diagnose BV. For a better assessment of risks for PB, a careful analysis of more bacterial morphotypes and their semiquantitative determination are required along with the use of other simple tests like vaginal pH which, used together, offer higher sensitivity in detection of vaginal dysbiosis. Pregnant women with BIFIDO forms, elevated PMN numbers and decreased apoptosis, higher vaginal pH and shorter cervix represent a group with a high risk for PB. The newly described method of microscopic analysis of vaginal smears is cheap, simple and rapid procedure to estimate numbers of PMN, and quantitative and qualitative biodiversity of vaginal microflora, and thus better identification of women with higher risks for PB. Along with two simple screening tests (vaginal pH and KOH) and cervicometry, this microscopic method enables us to select from the population of asymptomatic pregnant women most of those in risk for PB. Consequently, appropriate treatment may result in decreased incidence of PB (3, 4%) as we showed in this study.

# 1. UVOD

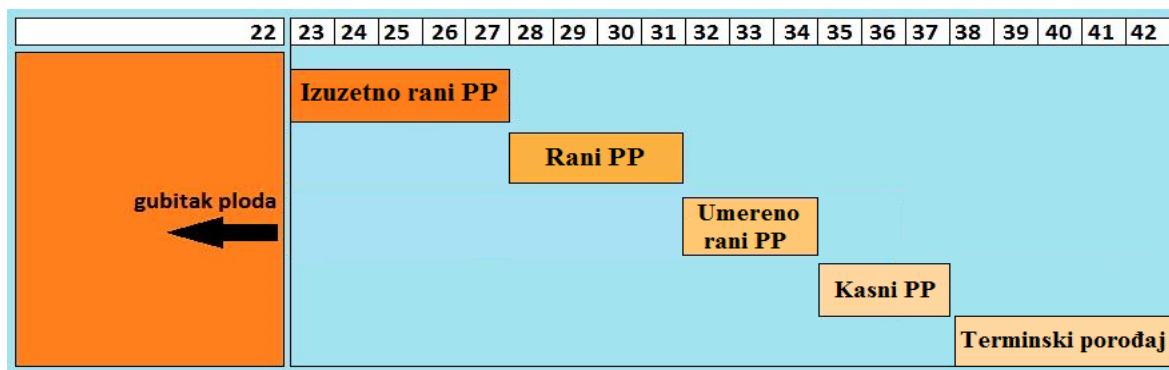
Prevremeni porođaj (PP) je vodeći uzrok perinatalnog morbiditeta i mortaliteta, čija se učestalost uprkos napretku dijagnostičkih i terapijskih postupaka nije značajnije menjala u poslednjih trideset godina. Nepotpuno razumevanje mehanizama koji dovode do terminskog i prevremenog porođaja svakako su jedan od osnovnih razloga slabih rezultata na polju prevencije, predviđanja, rane dijagnoze i lečenja ovog sindroma. Klinički i eksperimentalni podaci pokazuju da infekcija i/ili zapaljenje igraju središnju ulogu u mehanizmu PP i predstavljaju jedan od najvažnijih faktora rizika za oštećenje fetusa. U najvećem broju slučajeva, početni korak je promena normalne u patološku vaginalnu mikrofloru, koja onda ascendentnim putem može da dovede do intrauterne infekcije (IUI). Polimorfonukleari (PMN) kao deo urođenog imunskog sistema prva su linija odbrane protiv najvećeg broja patogena, a pokazano je da oni, pored efektorskih, imaju i regulatornu ulogu u pokretanju imunskog odgovora domaćina. Prepoznavanje patogena i vezivanje za „uzbunjivačke“ receptore (TLR; engl. *toll-like receptors*) koji prepoznaju molekularne uzorke tipične za mikroorganizme, dovodi do aktivacije unutarćelijskih signalnih puteva i transkripcionih faktora koji pokreću ekspresiju grupa gena, i oslobađanje brojnih proinflamatornih medijatora, među kojima citokini igraju veoma važnu ulogu. Adekvatan zapaljenjski odgovor domaćina podrazumeva niz mehanizama u kojima će patogen biti savladan, a domaćin će pretrpeti najmanju moguću štetu. U konkretnom slučaju to podrazumeva kontrolu imunskog odgovora tokom njegovog trajanja, kako u kvalitativnom tako i kvalitativnom smislu tako da ne dođe do pojačanog oslobađanja prostaglandina i drugih faktora koji bi uzrokovali kontrakcije uterusa, promene na grliću i aktivaciju fetalnih membrana, odnosno PP. Da bi se sve povoljno završilo po domaćina odgovor na patogen treba pravovremeno da se pokrene, ali ništa manje nije važno da se ovaj proces pravovremeno i zaustavi i tako spreče negativne posledice po domaćina. U imunskom odgovoru domaćina apoptoza PMN je svakako jedan od važnih mehanizama koji upravlja njegovim početkom, trajanjem i završetkom.

Imajući u vidu ove činjenice naše ispitivanje je imalo za cilj da otkrije promene u vaginalnoj mikroflori, sa posebnim osvrtom na PMN kao najvažnije imunske ćelije u odgovoru na infekciju različitim mikroorganizmima, da detektuje promene u lokalnim koncentracijama citokina, kao i da utvrdi stepen apoptoze vaginalnih PMN. Naime, po našem mišljenju je paradoksalno da je u poslednjih tridesetak godina napravljen veliki broj studija koji ispituju koncentracije različitih proinflamatornih ili antiinflamatornih medijatora, dok se broj PMN

najčešće i ne pominje, uprkos činjenici da je takav pristup jeftin i brz i pacijenti ga dobro prihvataju. Danas se ne zna koliki je fiziološki broj PMN u vaginalnom sekretu, a raspon u broju PMN koji neki autori smatraju normalnim ili patološkim ponekad je zapanjujući. Zbog toga je primarni cilj našeg ispitivanja da, korišćenjem nekoliko različitih metoda, pokušamo da definišemo fiziološki broj PMN, a onda da utvrdimo njegov odnos sa rezultatima mikroskopskih i mikrobioloških ispitivanja vaginalne flore, lokalnim koncentracijama 13 različitih citokina, vijabilnosti i apoptozom vaginalnih PMN.

## 1.1 PREVREMENI POROĐAJ

Kod većine vrsta interval između začeća i porođaja varira vrlo malo, za razliku od ljudi gde do porođaja može doći nedeljama pre očekivanog datuma. Kompleksna povezanost i međusobnu zavisnost signala koji dolaze od majke, ploda i posteljice svakako su razlog što još nemamo odgovor na pitanje kako započinje normalan porođaj [1, 2].



Slika 1.1: Shema termina porođaja po preporuci Svetske zdravstvene organizacije

Po preporuci Svetske zdravstvene organizacije prevremeni porođaj se definiše kao porođaj koji se događa pre napunjene 37. nedelje gestacije ili pre 259. dana od prvog dana poslednje menstruacije (WHO 1993). Završetak trudnoće pre navršene 23. n. g. smatramo abortusom.

Nije jednostavno precizno odrediti gestacionu starost. Sigurno je da je ultrazvučni (UZ) pregled u ranoj trudnoći najprecizniji parametar za određivanje gestacione starosti, i da je UZ gestaciona starost u proseku niža od gestacione starosti određene na osnovu prvog dana poslednje menstruacije što dovodi do povećanja učestalosti PP i smanjenja učestalosti prenesenih trudnoća. Tako studija Yanga i sar. [3] ukazuje na značajan porast prevalencije PP kada se gestaciona starost određuje UZ, i potvrđuje da je kasna ovulacija češća od rane. Jasno je da ovi podaci mogu bitno da utiču na učestalost PP u različitim zemljama ili istim zemljama u različitim vremenskim periodima (pre korišćenja UZ).

U okviru PP razlikujemo nekoliko podgrupa u odnosu na period kada je do PP došlo:

- kasni PP (34-36,6. n.g.)
- umereno rani PP (31-33,6. n.g)
- rani, pre 28-30,6. n.g.
- izuzetno rani, pre 27. n.g.

Dalje, PP ne predstavlja homogeno stanje nego je posledica sadejstva različitih faktora koji utiču na etiopatogenezu, terapiju i krajnji ishod. Tako je PP kod pacijentkinje sa teškom preeklampsijom u 30. nedelji gestacije bitno različit u etiologiji, obstetričkom pristupu i krajnjem ishodu od prevremenog prskanja vodenjaka u 36. n. g. ili PP u 27. n.g. zbog antepartalnog krvarenja. Smatra se da se oko 10% PP dešava između 20-27.n.g., drugih 10% između 28-33.n.g., a oko 80% između 34-36.n.g. Oko 5% ekstremno ranih PP čine više od 40% mrtvorodenosti ili neonatalne smrtnosti, dok preko 50% rođenih posle 35. n.g. čine manje od 10% perinatalne smrtnosti. PP može da bude spontan ili se radi o elektivnom porođaju zbog komplikacija kod majke ili ploda (eklampsija ili intrauterinog zastoja u rastu). Kada govorimo o spontanim PP, opet je bitno da li je do njega došlo zbog razvoja prevremenih kontrakcija, prevremenog prskanja plodovih ovojaka (PPPO) ili antepartalnog krvarenja. Dalje, kada se govori o PP vrlo je važno razlučiti tri grupe: 1) pacijentkinje sa višeplođnim trudnoćama; 2) pacijentkinje sa urođenim anomalijama i intrauterinom smrću ploda i 3) jedноплодне trudnoće sa vitalnim plodom.

Klinički kriterijum PP podrazumevaju dokumentovane uterusne kontrakcije (4 za 20 minuta ili 8 za 1 čas), intaktne plodove ovojke, skraćenje grlića za oko 80% i dilatacija cerviksa najmanje 2 cm. Prevremenim porođajem se smatraju i oni slučajevi kod kojih je došlo do PPPO bez obzira na aktivnost materice i stanje grlića. Uterine kontrakcije koje mogu da dovedu do promena na cerviksu traju 40-60 sekundi sa uterusom koji je tvrd na palpaciju. Dilatacija se odnosi na nivo unutrašnjeg materičnog ušća ili cervikalnog kanala, odnosno moguća je palpacija fetalnih membrana. Faktori udruženi sa PP dele se najčešće u tri grupe: sociobiološke, ranija obstetrička istorija i komplikacije u aktuelnoj trudnoći. Sociobiološki faktori obuhvataju: starost majke i broj prethodnih porođaja, bračno stanje, rasnu i etničku pripadnost, posao, ishranu, stres, gojaznost, pušenje, konzumiranje kafe, alkohola ili droga, interval između trudnoća. Meta-analitička studija Shaha i Brackena [4] je pokazala da pušenje može imati uzročnu ulogu u nastanku PP. Ranija obstetrička istorija obuhvata podatke o toku i ishodu prethodnih trudnoća a najvažniji je podatak o ranijim PP i spontanim abortusima, što su pokazali Mercer i sar. [5]. Naime oni su našli značajnu udruženost ranijeg spontanog PP i

ponovnog prevremenog porođaja u aktuelnoj trudnoći, kao i veću verovatnoću ponovnog PP sa manjom gestacijskom starosti prethodnog PP. Raniji PP uzrokovan PPPO, skraćen grlič i pozitivan fetalni fibronektinski test (FFT) pokazuju visoku udruženost sa PP uzrokovanim PPPO i u aktualnoj trudnoći [6]. Raniji PP, uz FFT i skraćen grlič, predstavljaju najznačajnije prediktore PP [7]. Komplikacije u tekućoj trudnoći podrazumevaju elektivni PP zbog komplikacija kod majke ili fetusa, zatim multiple trudnoće, kongenitalne anomalije i infekcije [8]. Tako su Meis i sar. [9] našli da je najbolji način za prevenciju PP pronalazak boljih načina prevencije i terapije hipertenzivne bolesti u trudnoći. Pokušaji da se na osnovu ovih faktor rizika izgrade bodovni sistemi za određivanje stepena rizika za PP pokazali su se neuspešnim jer se ovakvim pristupom nije mogao identifikovati veliki broj žena koje su se porodile pre vremena. Više od 50% svih PP dešava se kod žena kod kojih se ne mogu ustanoviti faktori rizika [10, 11]. Tako su Mercer i sar [12] u studiji rađenoj u 10 centara ukupno 2929 žena našli da ovakav sistem skora može identifikovati mali broj žena koje će se poroditi pre vremena (senzitivnost 24,2%, PPV 28,6%).

Morbiditet i mortalitet ploda i rane i kasne sekvele u obrnutoj su korelaciji sa vremenom u kome je došlo do PP. U etiološkom smislu PP se najčešće dele u tri kategorije: 1) indukovani zbog komplikacija kod majke ili ploda u trudnoći (25%), 2) PP koji započinju prskanjem plodovih ovojaka (25%) i 3) idiopatski PP, odnosno oni u kojima je početni događaj spontano započinjanje porođaja uz očuvane plodove ovojke (50%). Ipak kako su dve poslednje kategorije veoma slične, suštinska razlika postoji između indukovanog (25%) i spontanog PP (75%) [14]. PP je najvažniji pojedinačni uzrok perinatalnog morbiditeta (75%) i neonatalnog mortaliteta (85%). Učestalost PP u svetu kreće se od 5-12%, a u Srbiji je ovaj procenat između 6- 8% [15 - 19]. Godišnje se oko 15 miliona beba rodi pre vremena, a oko 1 milion umre zbog komplikacija, a PP je najčešći pojedinačni uzrok smrtnosti prevremeno rođene dece [15]. Poslednjih nekoliko decenija značajno je smanjen procenat smrtnosti prevremeno rođene dece, što je, pre svega, posledica napretka u postnatalnoj nezi prevremeno rođenih [16, 17]. S druge strane, povećano preživljavanje, posebno onih koji su rođeni pre 32. n. g. dovelo je do veće prevalencije sindroma respiratornog distresa, periventrikularne hemoragije i leukomalacije, hroničnih plućnih bolesti, nekrotizujućeg enterokolitisa, retinopatije nedonoščadi, povećane osetljivosti na infekcije (septikemija), kao i različitih kasnih neuroloških i psiholoških sekvela kao što su cerebralna paraliza, problemi sa vidom i sluhom, epilepsija i smanjena inteligencija [20 - 22]. Pretpostavlja se da je bar 10% PP potencijalno preventabilno, što bi smanjilo broj prevremeno rođene dece za oko 1,5 miliona [23 - 25]. Nažalost, u poslednjih nekoliko decenija učestalost PP nije se bitnije menjala, a u nekim razvijenim zapadnim zemljama imala je i trend

porasta. Veliki broj ispitivanja i pokušaji da se izdvoje žene koje bi imale povećan rizik za PP, uglavnom su ostali neuspešni [26 - 32].

U poslednjih tridesetak godina ispitivano je preko 200 različitih biomarkera u predviđanju PP, ali ni jedan od njih za sada nije našao širu primenu u kliničkoj praksi. Preko polovine žena koje se porode pre vremena, nemaju ni jedan nama poznati činilac rizika za PP [32 - 35]. Većina autora se slaže da PP nije nikada uzrokovan jednim etiološkim faktorom, nego da različiti patološki procesi i stanja majke, ploda i posteljice dovode do aktivacije plodovih ovojaka, promena na grliću materice i miometrijum i otpočinjanja PP [36 -38].

## **1.2 ZAPALJENJSKI PROCES KAO SREDIŠNJI DOGAĐAJ TERMINSKOG I PP**

Kao i kod većine vrsta i kod čoveka je materica u većem delu trudnoće u fazi mirovanja. Povremene kontrakcije su kratkog trajanja, slabo sinhronizovane, niskih amplituda tako da ne dovode do značajnijeg porasta intrauterinog pritiska. Ovakva aktivnost se kod životinja naziva kontrakturama, a kod čoveka su poznate kao Braxton-Hicksove kontrakcije. Ova faza obuhvata oko 95% trajanja trudnoće i to je faza u kojoj se uterus nalazi u stanju mirovanja koje je omogućeno aktivnošću jednog ili više inhibitornih sistema. Ovi inhibitori uključuju pre svega progesteron, zatim prostaciklin i azot oksid kao i mnoge druge supstance. Dakle, miometrijalna aktivnost tokom trudnoće prigušena je supstancama koje deluju preko različitih mehanizama, mada uopšteno dovode do povećanja unutarćelijskog nivoa cikličnih nukleotida koji inhibišu oslobađanje  $Ca^{2+}$  iz unutarćelijskih depoa, ili smanjuju aktivnost kinaze lakog lanca miozina. Prestanak delovanja jednog ili više takvih činilaca može da dovede do započinjanja bilo terminskog bilo PP. Okidač za prevagu kontrakcija nad kontrakturama dešava se kao normalan fiziološki proces u terminu ili može da bude pokrenut različitim patološkim stanjima. Od značaja je i činjenica da se ovaj prelaz sa kontraktura na kontrakcije najčešće dešava noću i da mu prethodi obrazac povećane noćne materične aktivnosti u smislu kontrakcija. Ciklični dnevno-noćni obrazac ukazuje na činjenicu da se materična aktivnost nalazi i pod kontrolom neuromehanizama, jer su neuroni jedine ćelije za koje je poznato da imaju ovakav nezavisan cirkadijalni ritam. Danas još nemamo odgovor na pitanje da li pad u koncentraciji relaksirajućih supstanci ili porast supstanci koje stimulišu uterusnu aktivnost dovode do započinjanja porođaja, a najverovatnije je da porođaj nastaje kada dođe do prevage jednih ili drugih supstanci koji se tokom trudnoće nalaze u stanju dinamičke ravnoteže. S kliničkog aspekta započinjanje porođaja obuhvata tri različita elementa: 1) promenu obrasca kontraktilnosti miometrijuma od kontraktura (kratkotrajne kontrakcije, niskih amplituda i male frekvencije) do kontrakcija (dužeg trajanja, viših amplituda i veće učestalosti), 2) skraćivanje i širenje grlića, i 3) prskanje

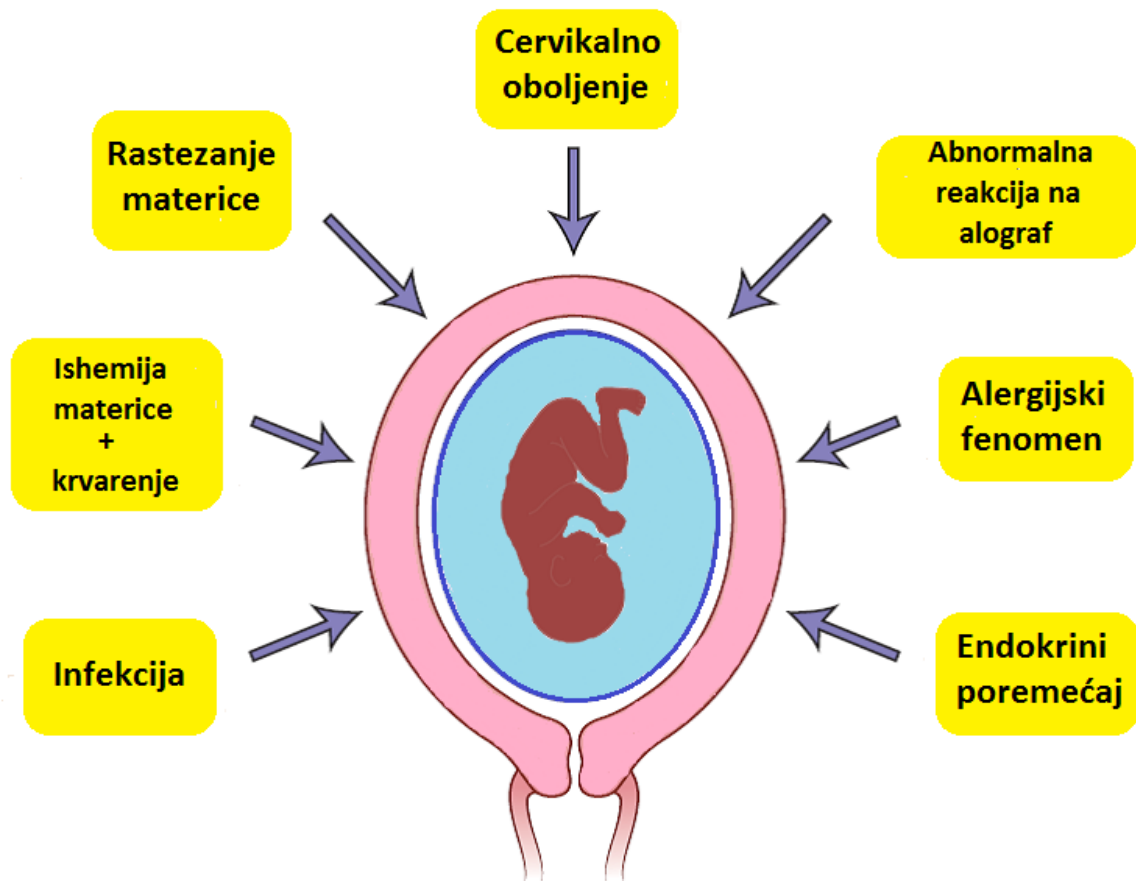
plodovih ovojaka. Osim toga, u najvećem broju slučajeva, postoji vremenski određena zavisnost između ovih događaja i biohemijske promene u tkivu grlića obično prethode kontrakcijama materice koje onda dovode do dilatacije grlića. Ovi događaji najčešće prethode prskanju plodovih ovojaka i smatra se da u svega oko 10% slučajeva dolazi do spontanog prskanja ovojaka pre započinjanja materične aktivnosti.

Većina autora se slaže da i terminski PP suštinski predstavljaju zapaljenjski proces [43 - 47]. Na osnovu dosadašnjih ispitivanja većina autoriteta na polju prevremenog porođaja slaže se da se PL i TL dva fundamentalno ista događaja koji se dešavaju u različitim periodima trudnoće. U oba slučaja mehanizam je isti i podrazumeva uterine kontrakcije, dilataciju cerviksa i aktiviranje fetalnih membrana. Dakle, osnovna razlika između ova dva procesa je ta što je terminski porođaj rezultat fiziološke aktivacije mehanizma porođaja, dok PL nastaje kao posledica nekog patološkog stanja koje dovodi do aktivacije jedne ili više komponenti koji onda pokreću porođajni mehanizam pre vremena

Postoji veliki broj podataka koji ukazuju da je terminski porođaj udružen sa aktivacijom zapaljenjskog procesa u plodovim ovojcima, decidui i grliću, i da zapaljenjski medijatori igraju ključnu ulogu u humanom porođaju [48, 49]. Tako je sazrevanje grlica, koje predstavlja rani događaj u normalnom porođaju, poređeno sa zapaljenjskim procesom koji se karakteriše infiltracijom leukocita u stromi grlića [50, 51]. Thomson i sar. [53] su pokazali da neutrofili i makrofagi infiltrišu i miometrijum, predominantno donji uterusi segment tokom terminskog porođaja. Aktivisani neutrofili i makrofagi su bogat izvor zapaljenjskih medijatora kao što su aktivator plazminogena, eikosanoidi, kolagenaze, elastaze i proinflamatorni citokini. Ovaj inflamatorni infiltrat ima različitu ulogu u različitim regijama uterusa. Tako bi u donjem materičnom segmentu učestvovao u remodeliranju tkiva i sazrevanju grlića, dok bi u gornjim partijama preko pomenutih medijatora direktno ili indirektno podsticao kontraktilnost uterusa [55]. Winkler i sar. [56] su pokazali da infiltracija cervikalne strome neutrofilima posredovana IL-8 igra važnu ulogu u porođaju. Dakle, razlika je u tome što kod terminskog porođaja zapaljenjski proces biva pokrenut fiziološkim mehanizmima posle 37. n.g, dok kod PP zapaljenje biva pokrenuto nekim od patoloških mehanizama i pre 37. n. g.

U fiziološkim uslovima najčešće uterusi kontrakcije prethode promenama na cerviksu i aktivaciji plodovih ovojaka, da bi u jednom sinhronom, precizno kontrolisanom procesu došlo do normalnog porođaja [57]. Kod PP se obično izolovano, neusklađeno aktiviraju jedan od ovih mehanizama (dilatacija grlića, pucanje plodovih ovojaka, uterusi kontrakcije) i uzrokuje PP. Prelazak uterusa iz stanja mirovanja u stanje aktivnih kontrakcija i sledstvenog PP može biti pokrenuto različitim patološkim mehanizmima kao što su: 1) infekcije; 2) uteroplacenta

ishemija i decidualna krvarenja, 3) prerastegnutost uterusa, 4) alergijski fenomeni, 5) poremećaji u imunološkoj toleranciji ploda („fetus kao alograft“), 6) cervikalni faktor, insuficijencija grlića, 7) stres majke i/ili fetusa, 8) hormonski poremećaji (misli se pre svega na progesteron i hormon koji oslobađa kortikotropin i genetski i/ili epigenetski faktori).



**Slika 1.2:** Shematski prikaz patoloških mehanizama koji mogu dovesti do prevremenog porođaja

Dakle, mogli bismo reći da svaki od navedenih etioloških faktora, sam ili više njih, može da predstavlja okidač koji će uterusnu sredinu iz antiinflamatornog prevesti u proinflamatorno stanje i dovesti do PP. Pošto infekcije predstavljaju najčešći uzrok PP, onda je to najbolji primer za suštinski ista inflamatorna zbivanja koja se dešavaju i kod PP uzrokovanih drugim etiološkim faktorima.

### **1.3 INFEKCIJE I PREVREMENI POROĐAJ**

Od 25-40% svih PP dešava se kod trudnica sa IUI, a ovaj procenat raste sa manjom gestacionom starošću i dostiže 80% ukoliko je do PP došlo pre 30. n.g [56, 57]. Infekcije predstavljaju ne samo najčešći, nego i jedini etiološki faktor, za koji je utvrđena kauzalna povezanost sa PP [58-60]. Na ovakvu uzročnu povezanost ukazuju mnogobrojni rezultati eksperimentalnih i kliničkih ispitivanja. IUI ili sistemska primena mikrobioloških produkata kod gravidnih životinja dovodi do PP [61-64]. Fetus i placenta miševa predstavljaju najbogatiji izvor antiinflamatornog

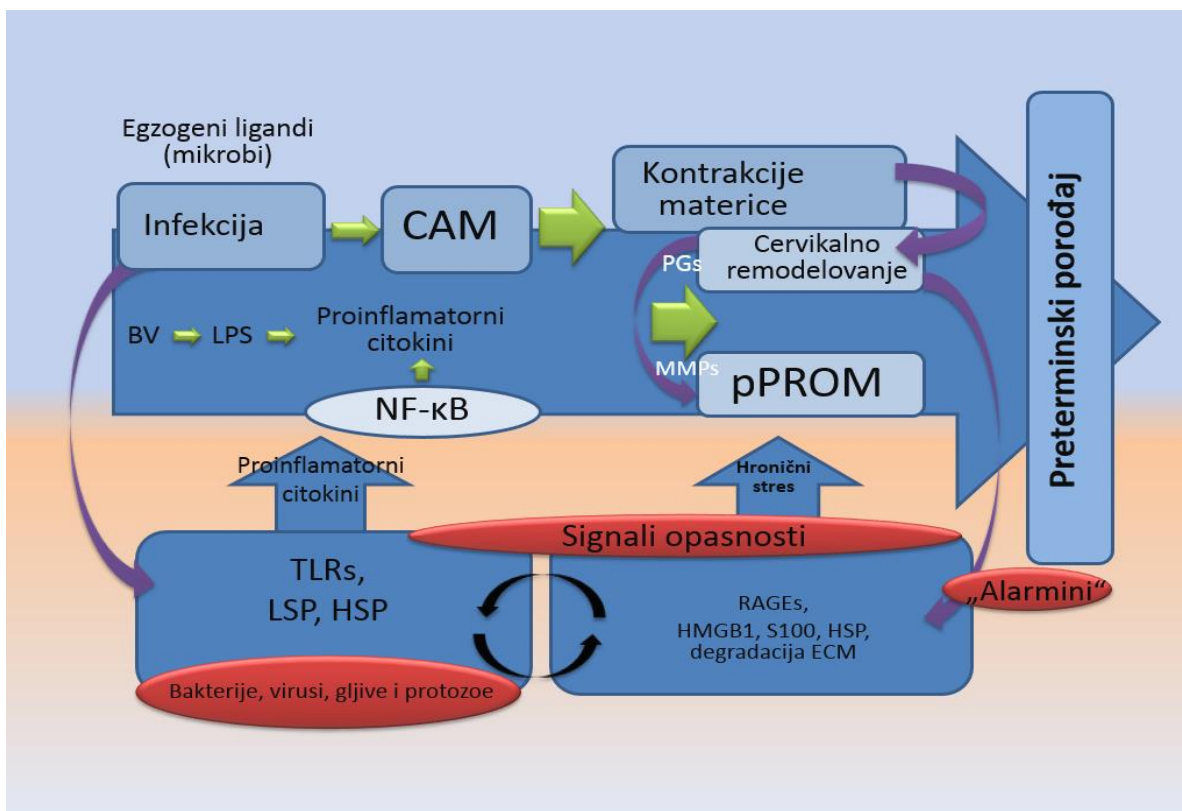


citokina IL-1ra, dok je uterus važan izvor proinflammatoryh citokina IL-1, IL-6 i TNF- $\alpha$ , međutim nivo IL-1ra u uterusu nedovoljno je visok da bi mogao da poništi dejstva IL-1 tokom infekcije [64-67]. Infekcije na udaljenim organima (paradontitis, pijelonefritis, pneumonija, malarija, infekcije urinarnog trakta) često su udružene sa PP [68-71].

Kod ljudi je pokazano da je supklinička IUI udružena je sa PP [72-77]. Pacijentkinje sa intraamnijskom infekcijom ili zapaljenjem (na osnovu povećanih koncentracija proinflammatoryh medijatora u amnijskoj tečnosti) u drugom tromesečju imaju povećan rizik za PP [78-83]. Lečenje bakterijske vaginoze (BV) i asimptomatske bakteriurije smanjuje učestalost PP [84-89]. U eksperimentalnom modelu lečenje antibioticima horioamnionitisa izazvanog ascendentnom intrauterinom infekcijom može da spreči PP [90].

Mikroorganizmi mogu da stignu do amnijske šupljine i ploda i dovedu do IUI različitim putevima: ascendentno iz vagine preko cerviksa, hematogena diseminacija kroz placentu, transplacentarno, retrogradno iz peritonealne duplje preko jajovoda ili jatrogeno tokom medicinskih procedura (amniocenteza). Svakako da je ascendentni put infekcije najčešći i one su u preko 50% slučajeva početni događaj kod PP udruženog sa infekcijom, a ovaj procenat je veći što je gestaciona starost manja [91]. Pretpostavlja se da postoji 5 faza procesa koji dovodi do nastanak IUI. U prvoj fazi dolazi do poremećaja vaginalne flore, naseljavanja pojedinačnih mikroorganizama i/ili polimikrobne infekcije u kome normalna preodominantna laktobacilarna flora biva zamenjena patološkom florom (BV). Iz vagine ascendentnim putem preko grlića mikroorganizmi dolaze do decidue i horiona, odakle infekcija može da prodre u fetalne sudove ili kroz amnion u amnijsku šupljinu i dovede do intraamnijske infekcije. Iz amnijske tečnosti, na različite načine, bakterije mogu da dospeju u plod [92]. Još jedan mogući put koji može dovesti do fetalne sepsa je širenje infekcije lokalizovane u parijetalnoj i bazalnoj decidui odakle može direktno (preko horionskih čupica) dopreti u krvotok ploda. Bez obzira na put, svaki prodor mikroorganizama dovodi do imunskog odgovora majke i/ili fetusa. Kada patogen savlada fizičko-hemijske barijere na sluznicama, pokreće se više različitih signalnih puteva koji aktiviraju druge komponente imunskog odbrambene mreže i sledstvenog akutnog zapaljenjskog odgovora. Dolazi do povećanja propustljivosti krvnih sudova, ekstravazacije proteina akutne faze i proteina komplementa i influksa velikog broja PMN. Svi ovi procesi odigravaju se kontrolisano, a jedan od najznačajnijih kontrolnih mehanizama su različiti citokini koje proizvode epitelne ćelije, PMN i druge ćelije, a dok ovi procesi napreduju, makrofagi i dendritične ćelije prezentuju patogen T ćelijama, pokrećući tako i adaptivni imunski odgovor [93]. Ukratko, uloga urođenog imunskog sistema je da brzo reaguje na patogen, započne zapaljenjski i odgovor adaptivnog imunskog sistema. Najvažniju ulogu u aktivaciji urođenog

imunskog sistema imaju *receptori koji prepoznaju uzorke* (RPU) (engl. *pattern-recognition receptors*, ) [94]. Ove receptore iskazuju različite ćelije i predstavljaju prvi korak u aktivaciji urođenog imunskog sistema [95]. Na osnovu funkcije i lokalizacije mogu da se podele u tri grupe: solubilni RPU koji uključuju proteine akutne faze kao što je C reaktivni protein koji deluje kao opsonin i pomaže da se patogen eliminiše u saradnji sa sistemom komplementa i fagocitima, transmembranski RPU (receptori za uzbunjivanje, TLR, receptori čistači (engl. *scavenger receptors*, SR) i lecitin tipa C), i unutarćelijski RPU kao što su NOD1 i NOD2 koji prepoznaju unutarćelijske patogene [96-98]. TLR su odgovorni za prepoznavanje molekulskih obrazaca patogena (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) i danas je poznato 11 članova porodice TLR koji su specifični za različite komponente mikroorganizama i/ili njihovih toksina [99-101]. RPU prepoznaju i druge opasne signale u oštećenim tkivima, takozvane molekularne obrasce oštećenog tkiva (engl. *damage associated molecular patterns*, DAMP) [102, 103]. Ova oštećenja mogu biti prouzrokovana različitim unutrašnjim fizičkim faktorima, npr. blizanačke trudnoće ili polihidroamnion, odnosno kada je prerastegnutost uterusa pokretač PP. S druge strane su činioci iz spoljašnje sredine: različita hemijska jedinjenja i toksini. Ovakvi produkti mogu nastati u stanju hipoksije u vezi sa trombozama ili krvarenjem, što takođe ukazuje da bi ovi receptori mogli imati značajnu ulogu u PP izazvanim decidualnim hemoragijam i trombozama [104].



Slika 1.3: Inflamatorni biomarker ii etiopatogeneza preveremenog porođaja

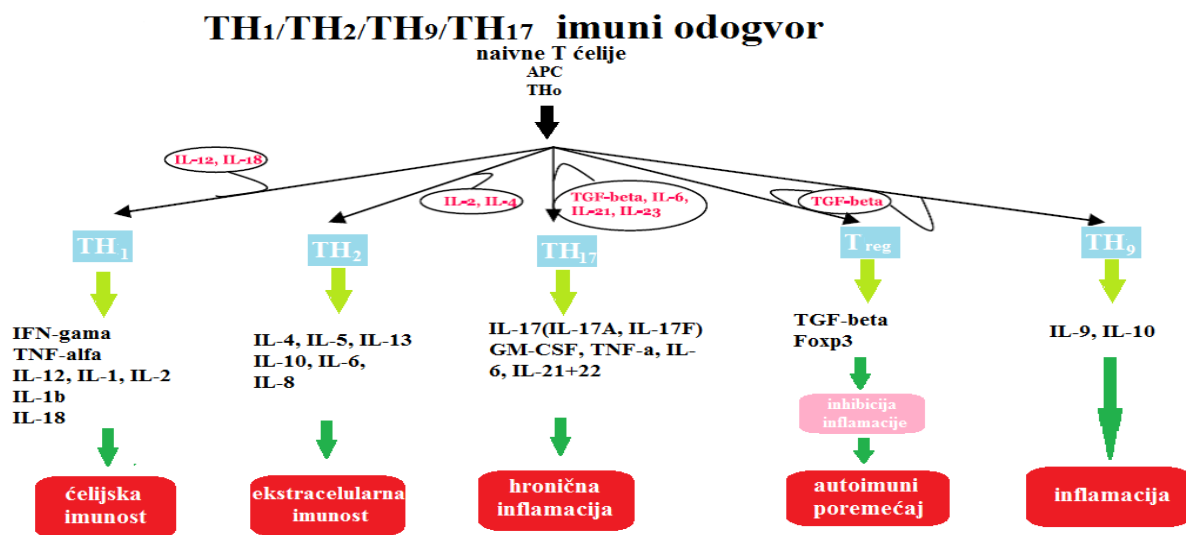
Neodgovarajući imunski odgovor, bilo u smislu prekomernog ili nedovoljnog i aktivacija sistema komplementa (alergijski fenomeni) takođe mogu dovesti do stvaranja produkata koji mogu da aktiviraju DAMP i pokrenu zapaljenjski proces. Dakle DAMP bi mogli da posmatramo kao receptore koji igraju veoma važnu ulogu u započinjanju “sterilnog” zapaljenjskog odgovora koji bi mogao da bude od značaja u etiopatogenezi PP koji nije udružen sa infekcijom [105-108]. Zapaljenjski biomarker od značaja u etiopatogenezi PP udruženog sa infekcijom prikazani su na Slici 1-3. Iz slike je jasno da većina patogena potiče iz vaginalne flore (ascendntni put najčešći), TLR2 and TLR4 vežu se za komponente Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterija ali i drugih endogenih liganda i najznačajniji su faktor u inicijaciji imunskog odgovora, a svaki član porodice TLR prepoznaje specifične patogene komponente. Aktivacija TLR dovodi do signalne kaskade u kojoj dolazi do produkcije proinflamatornih citokina i aktivacije ne samo urođenog nego i stečenog imunskog sistema. Različiti mikroorganizmi (bakterije, viruse, gljivice, paraziti) i njihove komponente i produkti (liposaharidi i peptidoglikani) aktiviraju TLR, koji onda pokreće transkripcione faktore od kojih je najvažniji NF- $\kappa$ B, što rezultira u pojačanoj ekspresiji proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, i TNF- $\alpha$ ) u tkivima majke, fetusa i placente, koji dovode do pojačane sinteze PG i različitih matriksnih metaloproteinaza (MMP), što sve može dovesti do PP. Ova zbivanja suštinski objašnjavaju etiopatogenezu PP udruženu sa infekcijom. Alarmini, kao hronični inflamatorni biomarkeri verovatno igraju važnu ulogu u zbivanjima u kojima je PP izazavan drugim ili nepoznatim etiološkim faktorima. Vezivanje TLR dovod do aktivacije intracelijskih signalanih puteva, aktivacije transkripcionih faktora koji pokreću ekspresiju seta gena umešanih u imunski odgovor i zapaljenje, a pre svega transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B [109]. On je uključen u regulisanje transkripcije brojnih gena ključnih za zapaljenje i imunski odgovor. *In vitro* studije su pokazale važnu ulogu NF- $\kappa$ B u regulaciji nekoliko zapaljenjskih gena povezanih sa porođajem [110-112]. Ovi geni prvenstveno regulišu proizvodnju zapaljenjskih citokina i hemokina. Pored toga oni regulišu produkciju enzima cikloksigenaze-2 pod čijim se dejstvom iz arahidonske kiseline sintetišu prostaglandini, koji su ključni medijatori u otpočinjanja porođaja [113-116]. Njihova ključna uloga proizilazi iz činjenice da prostaglandini pokreću kontraktilnost miometrijuma, dovode do promena i sazrevanja grlića materice, kao i aktivacije decidue i plodovih ovojnica. U stanjima blokade NF- $\kappa$ B smanjena je ekspersija cikloksigenaze-2, produkcija prostaglandina u amnionskim i miometrijalnim ćelijama i aktivnost MMP u amnionskom i horiodecidualnom tkivu [117,118]. NF- $\kappa$ B može biti aktivisan proinflamatornim citokinima kao što su TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i drugim što može dovesti do produženog intrauterinog zapaljenjskog odgovora [119-121]. Važno je napomenuti da stvaranje ovakvog proinflamatornog intrauterinog miljea ima još jednu

važnu posledicu, a to je da je u ovakvim uslovima značajno slabiji odgovor na antiinflamatorne učinke progesterona [122-125]. Progesteron je, kao što je poznato, hormon odgovoran za održavanje materice u stanju mirovanja, a kod mnogih vrsta pred sam porođaj detektuje se značajan pad u koncentracijama progesterona [126]. Ovakav pad progesterona u serumu se ne detektuje kod ljudi, ali se veruje da dolazi do takozvanog "funkcionalnog smanjenja progesterona" odnosno izmena u koncentracijama različitih progesteronskih receptora i njegovog lokalnog metabolizma, kao i pomenutog negativnog uticaja koji može imati zapaljenjski proces, odnosno aktivacija NF- $\kappa$ B na progesteronske receptore [127-129]. *In vitro* studije na ćelijama humanog miometrijuma pokazale su da je jedan od najvažnijih mehanizama preko kojih progesteron ostvaruje svoju antiinflamatornu ulogu inhibicija NF- $\kappa$ B [130].

Ukratko, TLR prepoznaje mikroorganizam, aktivira transkripcioni faktor NF- $\kappa$ B koji dovodi do sinteze proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-8) i PG koji pokreću zapaljenjsku kaskadu koja dovodi do PP. Pored toga TLR aktivira ćelije koje prerađuju i predstavljaju antigene, pojačava njihovu ekspresiju MHC i kostimulatornih molekula (CD40, CD89, CD86 i CD70) sa krajnim ciljem da dovede do aktivacije i diferencijacije specifičnih limfocita T. Poznato je da u drugoj fazi menstrualnog ciklusa, pod uticajem progesterona, dolazi do značajnog smanjenja odnosa Th1/Th2 ćelija u pripremi za implantaciju oplodene jajne ćelije. U ranoj trudnoći dominantan je Th2 tip imunskog odgovora što dovodi do pojačane produkcije antiinflamatornih citokina (IL-4, IL-6, IL-13) koji indukuju oslobađanje humanog horionskog gonadotropina iz trofoblasta čija je uloga da spreči apoptozu žutog tela i stimuliše proizvodnju progesterona u jajnicima. Progesteron dovodi do stimulacije trofoblastne sekrecije Th2 citokina i uspostavljanja pozitivne povratne sprege, koja povoljno deluje na trudnoću [131]. Zapaljenje uzrokovano infekcijom može dovesti do proizvodnje proinflamatornih citokina i nastanka sredine koji vodi trudnoću u neželjen ishod. Trudnoća se smatra klasičnim primerom stanja u kome dolazi do prevlade Th2 tipa imunskog odgovora. Ovakav zaključak proizilazi iz eksperimenata na životinjama i bazira se na blagotvornom uticaju Th2 citokina na fetoplacentni rast i štetnom efektu Th1 citokina kao što su IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  tokom istog perioda gestacije [132, 133]. Mnogobrojni su primeri i za ostale citokine koji jasno ukazuju da je u različitim periodima trudnoće optimalna (fiziološka) ravnoteža Th1/Th2 tipa imunskog odgovora bitan uslov za održavanje i napredovanje trudnoće [134, 135]. Najnovija ispitivanja ukazuju da su ovakva shvatanja pojednostavljena, jer neke novootkrivene subpopulacije pomoćničkih ćelija (Th17, Th9, TREGs) svakako imaju značajnu, ali za sada nedovoljno istraženu i definisanu, ulogu u ovim zbivanjima. Citokini imaju odlučujuću ulogu u procesu diferencijacije naivnih ćelija [136]. Tako su IL-12 i IL-18 ključni citokini diferencijaciju Th1,

odnosno u promociji ćelijskog imunskog odgovora koji je najznačajniji odbrani od bakterija, intracelularnih parazita, gljivica i nekih virusa [137]. Pomenuti mikroorganizmi ujedno predstavljaju glavne induktore sinteze IL-12 u infekciji. IFN- $\gamma$  je najmoćniji stimulator produkcije IL-12 koji povratno stimuliše proizvodnju IFN- $\gamma$ . S druge strane, inhibitori produkcije IL-12 su IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  i IL-13. U Th1 subpopulaciji limfocita IL-12 indukuje sintezu IFN- $\gamma$ , IL-2 i TNF- $\alpha$ . Pozitivni povratna sprega između IL-12 i IFN- $\gamma$  je jedan od mehanizama koji može da dovede do prekomernog zapaljenjskog odgovora i ima značajnu ulogu u etiopatogenezi autoimunskih bolesti. Kao što je naglašeno, Th2 citokini su inhibitori produkcije IL-12, ali u određenim okolnostima mogu dovesti i do povećanja koncentracije ovog citokina, što govori da je proizvodnja IL-12 različito regulisana na različitim krakovima imunskog odgovora. Iako IL-12 može da preusmeri Th2 u Th1 tip imunskog odgovora, IL-4 je dominantan u odnosu na njega i u uslovima značajnih koncentracija oba citokina diferencijacija se odvija pravcu Th2 tipa imunskog odgovora. Fiziološki izvor IL-12, *in vivo*, primarno su antigen prezentirajuće ćelije, makrofagi, PMN, dendritične ćelije, keratinociti i B-ćelije [138]. Drugi važan član proinflamatornih citokina je IFN- $\gamma$  koga proizvode aktivisane NK-ćelije makrofagi i B-ćelije, dok Th2 subpopulacija ne luči IFN- $\gamma$ . Antiinflamatorni citokini kao što su IL-4, IL-10 i TGF- $\beta$  su inhibitori produkcije IFN- $\gamma$ . Moglo bi se reći da je osnovna uloga IFN- $\gamma$  imunomodulatorna jer on stimuliše aktivaciju PMN, fagocitozu, reguliše produkciju drugih proinflanatornih i antiinflamatornih citokina kao i proces apoptoze [139-141]. IFN- $\gamma$  ima važnu ulogu u odbrani od intracelularnih patogena i, kao što smo rekli, regulaciji Th1 tipa imunskog odgovora [142-144]. Dakle subpopulacija Th1 luči uglavnom proinflatatorne citokine kao što su INF- $\gamma$ , TNF-  $\alpha$ , IL-12, IL-1, IL-2, IL-1 $\beta$  i IL-18. Diferencijacija u Th2 smeru dešava se u prisustvu IL-4 i IL-2 i ova subpopulacija luči IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-6 i IL-8. Slično, Th17 efektorne ćelije mogu dovesti do zapaljenja i autoimunih bolesti. Funkcionalna uloga Th17 ćelija je u odbrani domaćina od vanćelijskih patogena tako što dovodi do nakupljanja PMN i makrofaga u inficiranim tkivima, a poremećaji u regulaciji ovih ćelija imaju značajnu ulogu u etiopatogenezi mnogih autoimunskih i zapaljenjskih bolesti. Produkcija Th-17 citokina, IL-17A, regulisana je uglavnom IL-23, ali i IL-6, IL-21 i TGF- $\beta$ . Th17 ćelije sintetizuju IL-17A, IL-17F, GM-CSF, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-21 i IL-22. Ova populacija imala bi značaja kod hroničnih zapaljenjskih bolesti, a kako neki autori smatraju da je PP hronični zapaljenjski događaj, ova subpopulacija bi mogla biti od posebnog značaja [36].

Nedavno je otkrivena i Th9 subpopulacija T-pomoćničkih ćelija. Razvijaju se nezavisno od Th1, Th2 i Th17 ćelijske linije. TGF- $\beta$ , koji je od presudne važnosti za diferencijaciju regulatornih ćelija T (TREGs) i Th17 ćelije indukuju usmeravanje Th2 u Th9 ćelije koje se karakterišu lučenjem IL-9. Ćelije Th9 mogu da nastanu i diferencijacijom iz naivnih CD4+ T ćelija pod uticajem TGF- $\beta$  i IL-4. IL-9 je član familije citokina koja uključuje IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 i IL-21. IL-22 je član IL-10 familije citokina, i primarno ga luče Th17 ćelije. IL-23 i IL-6 mogu direktno da stimulišu naivne T ćelije da luče IL-22. Pored IL-9, ove ćelije (Th9) proizvode i IL-10, koji je najjači antiinflamatorni citokin koji inhibira produkciju proinflamatornih Th1 citokina, što bi teoretski takođe moglo biti od velikog značaja i uticaja na etiopatogenezu PP.



Slika 1.4: Shematski prikaz TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub>/TH<sub>9</sub>/TH<sub>17</sub> imunskog odgovora

Danas postoji veliki broj podataka koji ukazuju da je terminski porođaj udružen sa aktivacijom zapaljenja u fetalnim mebranama, decidui i grliću i da citokini i drugi zapaljenjski medijatori igraju ključnu ulogu u humanom porođaju.

Najvažniju ulogu u PP udruženim sa infekcijom imaju IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$  [145-147]. Pokazano je da većina proinflamatornih citokina dovodi do manjeg ili većeg porasta sinteze PG, kako u plodovim ovojcima tako i decidui i miometriju [148-150]. Humana decidua u odgovoru na bakterijske produkte proizvodi ove citokine [151-154]. Koncentracije IL-1, TNF- $\alpha$  i IL-6 u amnionskoj tečnosti su povišene kod žena sa PP i IUI i dobro korelišu sa nalazom histološkog horioamnionitisa i kulture. Mnogi eksperimenti na životinjama pokazali su da ovi citokini mogu da indukuju PP [155, 156]. TNF- $\alpha$  stimuliše produkciju MMP i njegova primena

dovodi do sazrevanja grlića materice, a oba pojačavaju ekspresiju IL-8 na decidualnim ćelijama tako da ovaj hemokin ima značajnu ulogu u etiopatogenetskim zbivanjima vezanim za normalan porođaj, kao i PP udružen sa infekcijom [157-159]. Od posebnog značaja je uloga IL-8 u promjenama na grliću materice koje i u normalnom i patološkom porođaju verovatno prethode pojačanoj kontraktilnosti uterusa, a koje suštinski takođe imaju karakteristike zapaljenjskog procesa [160]. Novija ispitivanja pokazuju da su u ova molekularna zbivanja umešani i drugi proinflamatorni i antiinflamatorni citokini kao i drugi medijatori zapaljenja samo što je njihova uloga mnogo manje ispitana. Od citokina pomenućemo samo najvažnije: IL-6, IL-10, IL-16, IL-18, CSF, MMIF i RANTES. Dakle, na osnovu podataka kojima danas raspolažemo, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8 igraju najvažniju ulogu u etiopatogenetskim zbivanjima vezanim za PP udružen sa infekcijom

Međutim, ispitivanja su pokazala da „isključivanje“ gena za određene citokine, ne dovodi do „zaustavljanja“ bioloških efekata na koje oni značajno utiču što potvrđuje da su u pravu oni koji ukazuju na značaj sadejstva ovih zapaljenjskih medijatora, odnosno mreže citokina (MC). U ovakvoj mreži svaki član povezan sa drugim članovima uz mogućnost postojanja brojnih signala koji regulišu međusobne interakcije, a sve to u jednom dinamičnom sistemu, promenljivom i vremenskom, kvantitativnom i kvalitativnom smislu, koji opet ne funkcioniše izdvojeno nego je kako pod uticajem lokalnih, tako i pod uticajem sistemskih neuroendokrinih, imunskih, genetskih i epigenetskih mehanizama, i naravno bakterija i bakterijskih zajednica. Znajući ovo ne čudi da i pored velikog broja ispitivanih citokina nijedan od njih se nije izborio za „status“ koji bi preporučio njegovu primenu u kliničkoj praksi u prevenciji ili predviđanju zbivanja vezanih za infekcije i PP.

#### **1.4 VAGINALNE INFEKCIJE**

U najvećem broju slučajeva početni događaj kod PP udruženog sa infekcijom predstavlja promena normalne u patološku vaginalnu floru. Međutim, problem je u tome što mi danas ne znamo pouzdano šta je to „normalana“, a šta „patološka“ vaginalna mikroflora. Istorijski gledano, prvi uvid u sastav vaginalne mikroflore omogućio je mikroskop, i još 1892. god. profesor Albert Döderlein je podelio ispitivane trudnice u dve grupe, one sa normalnom vaginalnom florom u kojoj dominiraju vaginalni bacili, i one sa patološkom vaginalnom florom koja sadrži brojne druge mikroorganizme. Schroder 1920. god. govori o tri vrste vaginalnog sekreta u zavisnosti od količine sekreta, odnosno stepena vaginalne čistoće. On je pokazao da je prva grupa najmanje patogena i da sadrži pretežno Döderleinove bacile, druga grupa ima

mešanu floru sa malim brojem laktobacila, i treća grupa sa mešanom laktobacilarnom florom i potpuno odsutnim laktobacilima. Harris i Brown su 1928. godine objavili rad u kome su našli da 26 od 30 zdravih žena posle porođaja ima anaerobe kao deo vaginalne mikroflore, a studija Weinsteina iz 1938. pokazala je da 93% trudnih i 90% žena koje nisu trudne imaju anaerobe u vaginalnoj flori i pretpostavio da oni imaju najveći značaj i karakterišu normalnu floru vagine. Naravno, nedostatak adekvatnih mikrobioloških metoda i nemogućnost da se kulturom preciznije utvrdi i prisustvo obligatornih anaeroba imala je za posledicu i pogrešne zaključke. Tek 1950. god. Weaver i sar. [161] ponovo ukazuju na značaj odsustva laktobacila i prisustva anaeroba kod takozvanog nespecifičnog vaginitisa. Kada su Gardner i Dukes 1955. godine pokazali jasnu udruženost *Gardnerelle vaginalis* i nespecifičnog vaginitisa, zaključeno je da je *Gardnerella vaginalis* uzročnik nespecifičnog vaginitisa [162]. Iako pogrešan, ovaj zaključak je narednih 25 godina bio glavni razlog što je ignorisana uloga i značaj drugih mikroorganizama u nastanku nespecifičnog vaginitisa. Konfuzija koja je vladala oko etiologije dovela je do toga da entitet danas poznat kao bakterijska vaginoza (BV) dobije veliki broj imena. Neki autori smatraju da bi vaginalna bakterioza bio lingvistički adekvatniji termin. Tek je napretkom mirobioloških metoda sedamdestih godina prošlog veka uneseno više svetla, a najviše naravno razvoju tehnika kultura kao i drugih metoda. Međutim, danas znamo da preko 99% postojećih mikroorganizama ne možemo da kultiviramo, o čemu ćemo kasnije više govoriti. I danas mnogi kliničari mikrobiološki nalaz tumače tako što određenu vrstu bakterija klasifikuje kao normalnu (saprofitnu), a druge kao patogene, poštujući tako jedan od Kochovih postulata. Tako je Koch ustanovio da za uzročnika neke zarazne bolesti može da se smatra samo onaj mikroorganizam koji je kod bolesnika izolovan u čistoj kulturi, koji, inokulisan eksperimentalnim životinjama, kod njih izaziva isto oboljenje kao i kod bolesnika kod koga je izolovan, i koji se iz tako zaražene životinje opet može dobiti u čistoj kulturi. Ovako rigorozni kriterijumi imali su kao posledicu usredsređenost na patogene bakterije, a samo sporadično na one koje pripadaju nepatogenoj, odnosno normalnoj flori. Često u praksi kliničar i mikrobiolog pokušavaju da izoluju određenu vrstu bakterija da bi objasnili kliničke simptome bolesti i postavili dijagnozu, ali su neretko razočarani izolacijom samo normalne flore. Ovakav isključiv stav previđa postojanje potencijalne patogenosti kombinacije različitih mikroorganizama i između ostalog zanemaruje i ključnu ulogu faktora domaćina i njegove imunokompetentnosti. Najbolji primer za to je *G. vaginalis* koja je jedan od najvažnijih mikroorganizama u etiopatogenezi BV. I ranija ispitivanja (kultura) pokazala su da kod velikog broja žena koje nemaju BV, možemo izolovati ovaj mikroorganizam, a najnovije molekularno biološke studije taj »veliki broj žena« definišu sa preko 50-90% prisustva različitih sojeva ovog mikroorganizma [163, 164]. I studije



mikrobioma vagine su pokazale da su *G. vaginalis* i *L.iners* dva najčešće izolovana mikroorganizma iz vagine [165, 166].

U razlikovanju normalne od patološke flore trebalo bi razlikovati mikroorganizme koji su stalno prisutni, one koji su povremeno prisutni i prolazno naseljavaju određene regije od onih koji su patogeni. To je i jedan od ciljeva projekta humanog mikrobioma. Najveći problem u definisanju vaginalne flore svakako predstavlja činjenica da je to veoma dinamičan ekosistem koji u kratkom vremenu može da se bitno promeni, pod uticajem mnogobrojnih faktora. Uvek treba imati u vidu činjenicu da vaginalni bris koji uzimamo, bilo za preparat po Gramu bilo za molekularno biološka ispitivanja, predstavlja trenutni odraz stanja vaginalne mikroflore. Mnogobrojni faktori kao što su stres, godine, faze ciklusa, hormonski statusa, seksualne navika, upotreba kontraceptiva ili drugih lekova mogu bitno da utiču na sastav i fluktuacije u vaginalnoj mikroflori. Na ove činjenice ukazano je u longitudinalnim studijama (tada ograničenim na analizu uzoraka kulturom) pri čemu je kod 78% žena došlo da značajnih promena u vaginalnoj flori, kao da su te promene vezane za mesečni ciklus [167, 168]. Ove rezultate potvrdila su i najnovija molekularnobiološka ispitivanja [169].

Danas, posle više od jednog veka, mogli bismo reći da je podela koju je uspostavio Döderlein i dalje važeća i aktuelna. Da je to tako najbolje ukazuje činjenica da i danas u najvećem broju studija koje se bave ispitivanjem vaginalne flore Nugentovi kriterijumi predstavljaju zlatni standard, a po ovim kriterijumima se žene dele u iste te dve grupe, samo što ovu sa „brojnim drugim mikroorganizmima“ definišemo kao BV, a imamo i treću grupu koja je po Nugentu intermedijarna, odnosno predstavlja „nešto između“ ova dva stanja.

Shvatajući koliki značaj imaju mikroorganizmi, Američki nacionalni institut za zdravlje je 2008. godine pokrenuo veliki projekat određivanja ljudskog mikrobioma čiji je cilj otkriti i definisati mikrobne zajednice koje se nalaze na različitim delovima ljudskog tela (vagina, usna šupljina, creva, koža.) i otkriti kako promene u mikrobiomu utiču na ljudsko zdravlje [170, 171]. Mikrobiom je pojam koji obuhvata sve mikroorganizme, njihov celokupan genom, te međusobne interakcije mikroorganizama i domaćina. Kako čovek ima 10 puta više mikroorganizama nego ćelija, jasno je da se radi o veoma kompleksnim zajednicama koje mogu značajno uticati na zdravlje i bolest kod čoveka. Naše trenutno razumevanje interakcija između mikroba i domaćina je veoma oskudno jer danas znamo da se većina mikrobioloških vrsta ne može kultivisati u laboratoriji. Ovi autohtoni mikroorganizmi postoje i opstaju u zajedničkoj, međusobnoj vezi sa svojim domaćinom, iako su neki od njih oportunistički patogeni koji mogu da izazovu i hronične infekcije, a ponekad i bolesti opasne po život. Veruje se da ove zajednice

mikroba predstavljaju prvu liniju odbrane od infekcije konkurentnim, stranim, invazivnim mikroorganizmima koji mogu da izazovu bolesti [172].

## 1.5 MIKROBIOM VAGINE

Među odbrambenim mehanizmima, jedan od najvažnijih je svakako sastav mikrobiološke zajednice koja kolonizuje vaginu. Mikroorganizmi koji naseljavaju vaginu predstavljaju fino uravnotežen ekosistem u kome vaginalna sredina kontroliše kolonizaciju bakterija, a mikrobioti onda kontrolišu vaginalnu sredinu [173]. Ova dinamična zajednica mikroorganizama ima ključnu ulogu u sprečavanju kolonizacije vagine neželjenim mikroorganizmima, a homeostaza je rezultat obostrano korisnih interakcija između domaćina i velikog broja različitih mikroorganizama koja, opet, može biti poremećena mnogobrojnim unutrašnjim i spoljašnjim faktorima [174]. Ovo su ujedno i glavni razlozi što ne možemo preciznije da definišemo pojmove i jasno povučemo granicu između onoga što bi definisali kao fiziološku ili patološku vaginalnu floru. Veći deo našeg znanja o sastavu vaginalne mikrobiološke zajednice potiče iz kvalitativnih i kvantitativnih studija, koje u metodologiji koriste kulturu, a ovakvim pristupom može da se izoluje samo manji broj (3-5%) od sveukupnog broja mikroorganizama koji se nalaze u vagini [175-177]. Razvoj i uvođenje novih molekularnobioloških metoda uneli su pravu revoluciju u definisanju vaginalne mikroflore, otkrivanju novih bakterija, kao i obezbeđivanju novih informacija o filogenetskoj raznovrsnosti mikroorganizama koji sačinjavaju vaginalnu mikrofloru. Jedan od ciljeva projekta vaginalnog mikrobioma bio je da se utvrdi da li u vagini većine zdravih premenopauzalnih žena postoji jezgro (eng. *core microbiom*) vaginalnog mikrobioma, i da li i kako promene u tom jezgru mikrobioma koreliraju sa zdravljem ili bolesti. Rezultati dosadašnjih molekularno bioloških studija sugerišu da u vagini žene ne postoji takvo jezgro, nego bi pre mogli govoriti o više jezgara [178, 179].

Ova jezgra su najbolje definisali i podelili u 5 grupa Ravel i sar [180]. U svom istraživanju asimptomatskih žena 4 najveće etničke grupe u SAD utvrdili su 5 glavnih bakterijskih zajednica: u četiri od njih dominira jedna ili više vrsta roda *Lactobacillus* (1. grupa: *L. crispatus*; 2. grupa: *L. Gasseri*, 3. grupa: *L. iners*; i 4. grupa: *L. jensenii*); dok u 5. grupi nisu dominantni laktobacili, nego je čini raznolika zajednica bakterija sa prevagom striktnih anaeroba kao što su *Prevotella*, *Megasphaera*, *Atopobium*, *Finegoldia*, *Peptoniphilus*, *Eggerthella* i *Mobiluncus*, a ovu grupu čini oko jedne četvrtine ispitanica. Otkriće Ravela i sar. [180]. da laktobacili nisu dominantna vrsta kod 27% ispitanica važan je i zanimljiv podatak pošto su one bile bez ikakvih simptoma, a sastav vaginalne flore bio je sličan onome kod žena sa klinički ili mikroskopski

dijagnostikovanom BV. Ova studija je pokazala da su kod najvećeg broja belkinja i azijatkinja predominantni laktobacili, dok je mali broj laktobacila znatno češći kod crnkinja i latinoameričke populacije, koje između ostalog karakteriše i povišen pH vagine preko 4,5. Takođe je pokazano da, pored laktobacila, mlečnu kiselinu proizvode i *Streptococcus*, *Megasphaera*, *Leptorichia* i *Atopobium* i da su ove bakterije prisutne kod gotovo svih pacijentkinja, tako da je stvaranje mlečne kiseline često očuvano uprkos razlikama u sastavu mikroorganizama [181]. Dakle, raniji postulat po kome prevaga laktobacila i vaginalni pH ispod 4,5 znače zdravu vaginalnu floru po Ravelu i sar. ne može se primeniti bar na četvrtinu, odnosno jednu polovinu ( $\text{pH} \geq 4,5$ ) žena [180]. Kako laktobacili predstavljaju osnov Nugentovog zbira za zdravo, a vaginalni pH je jedan od četiri Amselova klinička znaka, postavlja se pitanje koliko su ovi dijagnostički kriterijumi verodostojni. Pri tome su Nugentovi kriterijumi “zlatni standard” u laboratoriji i istraživačkim radovima (i u projektu mikrobioma vagine), a Amselovi kriterijumi predstavljaju klinički “zlatni standard” u dijagnozi BV. Opisani nalazi naročito su važni jer objašnjavaju prilično kontradiktorne podatke koji se odnose na BV i PP. Tako nemamo jasne odgovore na pitanja kao što su: 1) da li je potreban skrining na BV u trudnoći? 2) da li, kada i kako lečiti BV u trudnoći? 3) da li lečenje antibioticima dovodi do smanjenja broja PP? Ako se složimo sa hipotezama Ravela i sar. [180] u prošlosti smo ne mali broj zdravih žena lečili antibioticima, i obrnuto. Jasno je zbog čega se, između ostalog, razlikuju rezultati dosadašnjih ispitivanja. Ova saznanja u pitanje dovode i dosadašnje epidemiološke studija koje se odnose na učestalost BV [182]. Ako, dakle, znamo da je određen broj pacijentkinja bez laktobacila i bez BV lečen, najčešće metronidazolom, onda se moramo upitati i da li je ova terapija bila štetna? Naime, *Atopobim vaginae*, mikroorganizam za koji je nedavno pokazano da ima značajnu ulogu u etiopatogenezi BV, rezistentan je na metronidazol [183]. Dakle, lečenje metronidazolom može da dovede do promene vaginalne mikroflore i stvaranja boljih uslova za rast i razvoj ovog mikroorganizma nego što je to bilo pre terapije i tako, možda, dovede do većeg rizika za pokretanje PP. Ova i mnoga druga pitanja koja indirektno otvara Ravelova [180] studija, jasno ukazuju da su potrebna nova istraživanja koja će u svojoj metodologiji, pored kulture i mikroskopskog pregleda, imati i nove molekularnobiološke tehnike. Ovakav pristup pokazaće nam da li će mikroskopski pregled nativnog preparata i preparata po Gramu, zajedno sa kulturom otići u istoriju, i da li će primena novih metoda biti neophodna za svakodnevnu kliničku praksu, podrazumevajući individualan dijagnostički i terapijski pristup u prevenciji i lečenju poremećene vaginalne flore i štetnih posledica do kojih ona može dovesti. Svakako da najveći značaj u onome što zovemo poremećaj vaginalne flore ima BV.

BV je poremećaj vaginalnog ekosistema u kome normalno predominantnu laktobacilarnu mikrofloru zamenjuju brojne anaerobne bakterije (*G.vaginalis*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Megasphaera*, *Eggerthella*, *Mobiluncus*, *M. hominis*, *Porphyromonas*, *Bacteroides spp.*, *Finegoldia*, *Peptoniphilus*, *Peptostreptococcus spp.*, i druge koke) pri čemu ostaje nejasno da li je smanjenje broja laktobacila ili povećanje broja anaeroba početni događaj u ovoj tranziciji [184]. Treba napomenuti da u ove bakterije spada i čitav niz mikroorganizama koji još nisu kultivisani, a koji se u literaturi imenuju sa bakterijskom vaginozom udružena flora“ BVAB1, BVAB2 i BVAB3 (*bacterial vaginosis associated bacteria*) pri čemu treba da znamo da se ovaj naziv često koristi za sve mikroorganizme udružene sa BV (BVAB) što ćemo i mi najčešće koristiti [185]. Masivan porast BVAB udružen je sa porastom protelitičkih karboksilnih enzima koji dovode do smanjenja i pretvaranja vaginalnih peptida u amine (putrescina, kadaverina i tiramina) koji u sa porastom pH postaju isparljivi i uzrokuju neprijatan miris [186]. Porast amina dovodi do pojačane transudacije i ćelijske ekfolijacije uzrokujući tipičnu homogenu, mlečno beličastu sekreciju. U uslovima povišenog pH, *G. vaginalis* mnogo lakše adherira za epitelne ćelije i tako obrazuje patognomonične ćelije poznate pod engleskim nazivom *clue cells*. (CC). Pored toga, amini obezbeđuju povoljnu sredinu za razvoj nekih mikroorganizama, npr. *M. hominis*. Učestalost BV u opštoj populaciji kreće se od 10 do 50% [187], a u populaciji trudnica od 12 do 50%, u zavisnosti od ispitivane populacije [188]. BV je udružena sa gubitkom trudnoće u prvom tromesečju [189, 190], 2-7 puta većim rizikom od PP, prevremenog prskanja plodovih ovojaka, nastankom horioamnionitisa, manjom porođajnom težinom nastankom postpartalnog endometritisa [191-201]. Neke studije su pokazale da čak oko 50% žena sa BV nema nikakvih simptoma [202, 203]. Dakle, mogli bismo reći da veći broj do sada objavljenih studija ukazuje da je BV udružena sa povećanim rizikom za PP, ali interventne studije u kojima su pacijentkinje sa BV lečene različitim antibioticima nisu pokazale dobit od toga [204-206]. Nedavna metaanaliza [207] zaključuje da terapija antibioticima dovodi do eradikacije BV u trudnoći ali da se ukupni rizik od PP ne smanjuje značajnije, zbog čega neki autori smatraju da za sada nema osnova za skrining i lečenje BV kod trudnica. Ukoliko se skrining kriterijumi prošire na žene sa patološkom vaginalnom florom onda se broj PP smanjuje za oko 47% (ograničeno na dve studije). Dakle, danas u svetu ne postoji opšta saglasnost o potrebi skrininga i lečenja BV u trudnoći, a većina smatra da je najbolje da odluku o tome donese lekar u odnosu na svaku pacijentkinju pojedinačno. Različiti genetski, imunski i epigenetski faktori delimično mogu objasniti zašto neke žene sa BV imaju PP, a druge ne ili zašto je kod nekih terapija efikasna, a kod drugih nije, ili je čak štetna. Kontradiktorni rezultati dosadašnjih studija posledica su metodoloških problema u dosadašnjim

studijama, kao što su značajna heterogenost (etnička) ispitivanih grupa, različite stope PP, različiti metodološki pristupi u skriningu i lečenju BV. Svakako da je najvažniji metodološki faktor nedostatak jedinstvenih i preciznijih kriterijuma za dijagnozu BV, kao i drugih stanja, odnosno “mikroskopski slika” koji nisu BV, ali nisu ni normalna vaginalna flora. U većini ovih studija dijagnostički kriterijumi za razlikovanje normalne od patološke vaginalne flore suštinski podrazumevaju mikroskopski pregled preparata bojenog po Gramu i/ili nativnog preparata. Preparat po Gramu nam otkriva koliko je u uzorku prisutno gram-pozitivnih štapića (laktobacili), gram-negativnih i gram-varijabilnih štapića i koka (*G.vaginalis*, *Peptostreptococcus*, *Porphyrromonas*, *Prevotella*) i zakrivljenih gram-negativnih štapića (*Mobiluncus*) i po njemu su pacijentkinje razvrstane u tri grupe: 1. normalan nalaz; 2.intermedijaran nalaz i 3.pacijentkinje sa BV. Ipak, ovaj zbir po Nugentu uzima u obzir samo tri bakterijska morfotipa tako da ne može u potpunosti precizno da definiše raznovrsnost i kompleksnost vaginalne mikroflore i ne uključuje prisustvo drugih bakterijskih i nebakterijskih tipova ćelija koje mogu da budu od značaja u proceni statusa vaginalne flore [208]. Još važnije, ova podela dobro definiše pacijentkinje sa normalnim nalazom i BV, ali pacijentkinje sa intermedijarnim nalazom su u najvećem broju studija nedefinisane u epidemiološkom, kliničkom i terapijskom pogledu. Da je takav pristup neodgovarajući pokazala su i ispitivanja u kojima su žene sa intermedijarnom bakterijskom florom i BV imala značajno veće koncentracije sijaalidaza i prolidaza, u odnosu na pacijentkinje sa normalnom florom, kao i da je u ovoj populaciji pacijentkinja značajno veća učestalost ranog PP [209-212]. Najvažnija praktična posledica ovakvog pristupa jeste da je preparat po Gramu i danas uglavnom ograničen na dijagnozu BV, a što je još važnije, ovako se veliki broj žena sa vrlo različitom vaginalnom florom svrstava u jednu kategoriju. Na primer, *L. iners* jedan od najčešćih mikroorganizama izolovanih kod zdravih asimptomatskih žena i *G. vaginalis* najvažniji mikroorganizam u etiopatogenezi BV, na preparatu po Gramu vide se kao mali gram-pozitivni ili gram-varijabilni štapić, zbog čega ih je teško razlikovati, što može imati za posledicu da se određen broj asimptomatskih, zdravih žena na osnovu Nugentovog zbira, svrsta u grupu sa BV, i obrnuto [213]. Pošto je najveći broj studija u poslednjih 20 godina kao zlatni standard za dijagnozu BV koristio zbir po Nugentu, jasno je koliko je samo ova činjenica mogla da utiče na rezultate ovih studija. Posle Nugentovih kriterijuma najčešće korišćeni kriterijumi za dijagnozu BV bili su oni po Amselu i sar. koji podrazumevaju pozitivna tri od četiri znaka: 1) homogena sivobeličasta sekrecija, 2.) vaginalni pH preko 4,5; 3.) pozitivna proba sa 10% KOH i 4.) prisutne CC na nativnom preparatu [214]. Neki autori koji smatraju da najmanje 20% ćelija na nativnom preparatu treba da imaju osobine CC da bi se postavila dijagnoza BV, a naše mišljenje je da

mali broj laktobacila i odsustvo polimorfonukleara na nativnom preparatu predstavljaju još dva bitna faktora u dijagnozi BV. Slična Nugentovoj je podela po Isonu i Hayu koja se na zasniva na zbiru bodova nego na semikvantitativnoj proceni odnosa pomenuta tri bakterijska morfotipa i pored tri grupe identične Nugentovoj podeli (normalni, intermedijarni i BV), ima još dve grupe, jedna u kojoj dominiraju koke i druga u kojoj se vide samo epitelne ćelije bez bakterijskih formi [215]. Nova klasifikacija Verhelst i sar. [216], koja se naziva i klasifikacija po Claeyasu, uvođenjem novih kategorija na bolji način odražava kompleksnost i različitost vaginalne flore i razlikovanje normalnog od patološkog na preparatu po Gramu. Na osnovu detaljnog posmatranja preparata bojenih po Gram i u kombinaciji sa specifičnim PCR tehnologijama i kulture Claeyas i sar. su napravili novu podelu u kojoj ima 6 grupa: I grupu karakteriše prisustvo G+ štapićastih formi, a na osnovu njihovih morfoloških karakteristika ove pacijentkinje su podeljene u tri podgrupe. Grupu Ia definisali su kao grupu u kojoj su prisutni G+, debeli uglavnom kratki štapići za koje je na osnovu kombinovanih tehnika (PCR/kultura) pokazano da predstavljaju *L. crispatus*. Grupu Ib karakteriše prisustvo laktobacilarnih formi koje su manje ili više izduženi i tanji; prisustvo i jednih i drugih formi definisali su kao Grupu Iab. Posebnu grupu pacijentkinja nazvali su Grupa slična I koju karakteriše prisustvo Gram pozitivnih oblika, koji mogu biti sasvim mali i kratki, ili izrazito dugački, ali nepravilnih oblika sa tendencijom grananja, i obično širokim i debelim, zatupastim krajevima (*clubbing*) i zakrivljenim ivicama, a često se i neregularne bojenja, raspoređeni tako da često prave oblike slične kineskom pismu. U ovoj studiji autori su pokazali da je u ovoj grupi diverzitet bakterijskih vrsta bio bliži grupi II (intermedijarne) nego Grupama Ia, Ib i Iab, gotovo potpun nedostatak *L. crispatusa* i značajno veći broj *Bifidobacteria* u odnosu na druge grupe

Donders i sar. [217] su sačinili kriterijume za dijagnozu aerobnog vaginitisa (AV), stanja koje se za razliku od BV odlikuje prevagom aeroba, pojavom PMN, dok i jedan i drugi entitet imaju manje ili više smanjen broj laktobacila i povećan broj sitnih bakterijskih formi. Pojačana vaginalna sekrecija je žućkasta nehomogena, vaginalni pH je preko 4,5, a neprijatan miris prisutan je i bez probe sa 10% KOH. Ovakav pristup sa preciznijim i sveobuhvatnijim dijagnostičkim kriterijumima treba da nam omogući tačnije podatke o učestalosti, kliničkom značaju i terapijskim opcijama kod stanja koja nisu "čista" BV, ali verovatno jesu neki oblik patološke vaginalne flore. Verovatno, jer u ovom trenutku ne možemo da isključimo ni mogućnost da se radi o "različitoj" ali normalnoj flori kod određene grupe pacijentkinja, zbog čega su neophodna dalja ispitivanja koja bi preciznije definisala ovu kategoriju pacijentkinja. Ovaj interesantan poremećaj vaginalne flore gotovo i da se ne pominje u najnovijim molekularnobiološkim ispitivanjima.

**Tabela 1.1: Kriterijumi za postavljanje dijagnoze aerobnog vaginitisa (NPVS, uvećanje X400 na fazno kontrastnom mikroskopu)**

<b>AV skor</b>	<b>LBG</b>	<b>Broj PMN</b>	<b>Procenat toksičnih PMN</b>	<b>Bakterijska flora</b>	<b>Procenat parabazalnih ćelija (PBC)</b>
<b>0</b>	I i IIa	<10/VVP*	sporadično	Beznačajan ili prisutna citoliza	Odsutne ili manje od 1% PBC
<b>1</b>	IIb	>10/VVP* i <10/EC**	<50% PMN	Mali koliformni bacili	Manje od 10% PBC
<b>2</b>	III	>10/EC**	>50% PMN	Koke ili lanci	Preko 10% PBC

\*VVP: Veliko Vidno Polje X400; Leukociti (polimorfonukleari PMN); \*\*EC: epitelna ćelija; LBG-laktobacilarna flora

Iz samog naziva jasno je da se ovaj entitet razlikuje od BV u dva suštinska elementa: vrsti bakterijske flore (aerobi ili anaerobi) i prisustvu odnosno odsustvu elemenata zapaljenjskog procesa (vaginitis ili vaginoza). Prema dijagnostičkim kriterijumima Dondersa i sar. pacijentkinje koje bi imale ukupan zbir 1-2 boda imale bi normalan nalaz; zbir 3-4 ukazivao bi na blage forme AV; zbir od 5-6 bodova predstavljao bi srednje teške forme AV, dok bi pacijentkinje sa zbirom preko 6 bodova (do maksimalno 10) predstavljale teške oblike AV. U praksi bi zbir od 8-10 bodova odgovarao onome što je ranije opisivano kao deskvamativni inflamatorni vaginitis. S obzirom da su PMN jedna od glavnih mikroskopskih karakteristika ovog poremećaja vaginalne flore, kao i činjenicu da su PMN u centru našeg interesovanja u ovom ispitivanju smatramo da je korisno ukazati na neke kliničke i mikroskopske aspekte AV. Mada u svojim radovima Donders i saradnici ukazuju na činjenicu da se parabazalne ćelije kao i toksični leukociti veoma teško raspoznaju na preparatu bojenom po Gramu, odnosno da je njihova identifikacija mnogo lakša na nativnom preparatu, mi više nismo sigurni u takve tvrdnje. Tako posle 20 godina iskustva u gledanju NPVS, na svim vrstama mikroskopa, ovo ispitivanje nas je po prvi put primoralo da u poslednje dve godine intenzivno gledamo i preparat bojene po Gramu. Tako, prvo nam nisu jasni razlozi zbog kojih bi lakše prepoznavali parabazalne ćelije na NPVS nego na preparatu po Gramu. drugo, prisustvo ovih ćelija na preparatu po Gramu i na NPVS, je veoma retko. Tako od 700 naših pacijentkinja (većina preparata je još uvek sačuvana) mi imamo svega desetak pacijentkinja sa ovakvim nalazom. Ove ćelije nalazili smo samo kod pacijentkinja (nismo ih imali među ispitivanim trudnicama) sa slikom teškog AV, odnosno poremećaja koji je Sobel opisao kao deskvamativni inflamatorni vaginitis. Tako da bih ja danas prihvatio samo postojanje takvog entiteta, dok je prisustvo

ostalnih formi AV koje je opisao Donders, u najmanju ruku vrlo diskutabilno. Naime svoj laktobacilarne grupe (LBG) autor definiše na sledeći način: Laktobacilarnu grupu I (LBG I) karakteriše prisustvo velikog broja laktobacila različite veličine i potpuno odsutnim ili vrlo malim brojem sitnih bakterijskih formi (SBF); LBG IIa čine pacijentkinje kod kojih su LB dominantna bakterijska flora, ali su pomešani sa većim brojem SBF nego u prethodnoj grupi; U LBG IIb broj SBF je podjednak ili veći od broja LB; LBG III karakteriše predominacija SBF uz mali broj ili potpuno odsustvo LB, a ovakav nalaz ima suštinski iste karakteristike kao nalaz pacijentkinja sa BV, izuzev što su kod AV prisutni PMN. Ovakvu podelu odnosa LB i SBF smatramo svakako jednom od najboljih, preciznije podelom koja na najbolji način odražava odnos LB i SBF. Ova podela je na neki način inkorporisana u našu metodologiju gledanja NPVS, koja se suštinski i zasniva na odnosu broja LB i SBF, tako da smo pacijentkinje sa Dondersovim nalazom LBG I i LBG IIa uvek svrstavali u normalne, bez obzira na rezultat pH ili KOH test, kod pacijentkinja koje su imale Dondersovu grupu LBG IIb postavljali smo dijagnozu normalnog nalaza ukoliko su oba testa bila negativna, a dijagnozu BV ukoliko je jedan od dva testa bio pozitivan. Dondersova podela je na kraju bila i osnovni poticaj da u ovome ispitivanju prisustvo cllue cels ne smatramo „obaveznim“ mikroskopskim parametrom u dijagnozi BV. Dakle prisustvo PMN bio bio najvažniji pojedinačni parametar na osnovu koga bi mogli razlikovati BV i AV. Međutim na osnovu naših novih iskustava, rekli bi da je u takvim mikroskopskim nalazima najvažnije da ne kažemo imperativno isključiti prisustvo pre svega CA, a zatim i *T. vaginalisa*. Kako mi u našem ispitivanju nismo imali nijednu pacijentkinju sa infekcijom trihomonasom, fotografija je prikazana da se vidi koliko nalaz može da liči na AV.

Uvođenje savremenih molekularnobioloških tehnika unelo je pravu revoluciju u definisanju vaginalne mikroflore, dovelo do otkrivanja novih bakterija i novih informacija o filogenetskoj raznovrsnosti mikroorganizama, i sigurno će u skoroj budućnosti omogućiti precizniju diferencijaciju u definisanju i razgraničavanju normalne od patološke vaginalne flore [218-220]. Da ovaj zadatak neće biti nimalo lak i da će zahtevati još dosta napora, pokazali su dosadašnji rezultati, od kojih ćemo navesti samo najvažnije: a) Mikrobiom vagine je mnogo raznovrsniji i sa većim fluktuacijama nego što smo to ranije pretpostavljali; b) ne postoji jedno jezgro mikrobioma vagine nego brojne bakterijske zajednice različitog sastava i stabilnosti koje su prisutne kod potpuno zdravih žena, te se ove varijacije mogu definisati kao normalno stanje; c) kod nekih žena vrsta i broj vaginalnih mikroba značajno se menja u kratkom vremenskom periodu, dok se kod drugih vrlo malo ili gotovo nimalo ne menja, mikrobiom je izgleda jedinstven za svaku ženu, a na njega značajno utiču rasa, navike, godine, faze menstruacionog ciklusa, trudnoća, okruženje, stres i mnogi drugi faktori; d) kod oko četvrtine žena laktobacili



nisu predominantni u vaginalnom ekosistemu, i mogu biti zamenjeni drugim bakterijama koje proizvode mlečnu kiselinu, kao što su *Atopobium vaginae*, *Megasphaera spp* i *Leptotrichia spp* [180]. Dakle, mikrobiom vagine se pokazao kao znatno dinamičniji i složeniji nego što se pretpostavljalo, a primena ovih novih metoda svakako će dovesti do novih saznanja o prisustvu, promenljivosti, međusobnim interakcijama, značaju i ulozi pojedinih mikroorganizama u održavanju zdravog vaginalnog sistema i/ili nastanka patoloških stanja, kao i redefinisaju pojmova normalnog i patološkog u vaginalnom ekosistemu [221]. Velike varijacije među pojedinim ženama i u kratkom vremenskom periodu, u sastavu mikrobima zdrave vagine ukazuju na teškoće sa kojima ćemo biti suočeni u budućim studijama, koje bi trebalo da preciznije definišu ove varijacije i njihov značaj u nastanku određenih patoloških stanja [222, 223].

## **1.6 LOKALNI IMUNSKI SISTEM IPOLIMORFONUKLEARI**

Funkcija imunog sistema je da obezbedi odgovarajuće mehanizme odbrane od patogena. Zaštita počinje na površinskim barijerama sastavljenim od mehaničkih, hemijskih i ćelijskih komponenti. Mehaničke komponente podrazumevaju epitel i sluznice reproduktivnog trakta koji obezbeđuju zaštitu od ulaska patogena [224-227]. Imunski sistem sluznica je sastavljen od limfoidnog tkiva koje, za razliku od sistemskog limfoidnog tkiva, luče sekretorna IgA antitela, sadrže T-ćelije sa specifičnim regulatornim osobinama i efektorskim kapacitetom i imaju specifično organizovan ćelijski sistem koji dozvoljava limfocitima, aktivisanim u folikulima sluznice, da selektivno migriraju u mukozno limfno tkivo. Funkcija ovih limfnih tkiva mukoze (MALT, *mucosa associated lymphoid tissue*) je da obezbedi odbranu na sluzničnim površinama i oni suštinski predstavljaju prvu liniju odbrane od stranih patogena [228, 229]. Odbrambenu ulogu MALT obavlja u saradnji sa drugim neimunološkim faktorima, kao što su dominacija laktobacila i kiseli pH<4,5, mukozna motorna aktivnost cilija, stvaranjem sekrecijskih barijera i produkcija različitih supstanci (laktoferin, lizozom, defensin i sl.) koji smanjuju mogućnost nastanka infekcije [230, 231]. Cervikalne i vaginalne epitelne ćelije su jedan od važnih izvora različitih citokina. Drugu, hemijsku, komponentu mukoznog sistema čine solubilni ili ćelijski receptori koji usklađuju imunski odgovor domaćina. Treća, ćelijska komponenta urođenog imunskog sistema podrazumeva epitelne ćelije, fibroblaste strome i različite vrste inflamatornih leukocita, od kojih su najvažniji PMN [232, 233]. Urođeni imunski sistem deluje nespecifično tokom rane faze imunskog odgovora. On ostvaruje prvi kontakt sa antigenom i eliminiše ga ili ga predstavlja ćelijama adaptivnog imunskog sistema, odnosno

dovodi do aktivacije T i B limfocita. Funkcioniše neprestano i bez ikakvih posebnih priprema, dakle nespecifično, ali nema sposobnost imunološke memorije o ranijem susretu sa patogenom. Kada govorimo o sistemu urođene imunosti mislimo na imunske i neimunske mehanizme odbrane. Imunski podrazumevaju ćelije koje čine sistem urođene imunosti, kao što su fagociti (PMN, makrofagi i monociti), NK ćelije, dendritične ćelije i mastociti. Urođeni imunski sistem dakle predstavlja prvu liniju odbrane od mikroorganizama, i integriše različite organske sisteme ne samo u borbi protiv stranih mikroorganizama. Suštinski, urođeni imunski sistem je taj koji određuje prirodu stečenog imunskog odgovora tako što oslobađa različite proinflatorne i antiinflatorne medijatore. Najčešća komponenta zida bakterija je LPS i on je najčešći signal domaćinu koji ukazuje na prisustvo infektivnog agensa. Fagociti su svakako najvažnija i prva linija odbrane i oni podrazumevaju PMN, monocite u krvi, odnosno prelaskom u tkiva postaju tkivni makrofagi. PMN svakako predstavljaju najbrojniju i najvažniju ćelijsku populaciju i najvažniju komponentu urođenog imunog sistema.

Hematopoetske ćelije kostne srži su prethodnica PMN koji prolaze različite morfološke faze tokom sazrevanja i diferencijacije. Zreli neutrofili su krajnje diferentovane ćelije koje se ne mogu više deliti i koje se razvijaju iz CD34<sup>+</sup> pluripotentnih matičnih ćelije u koštanoj srži. U odsustvu infekcije telo proizvodi 1-2 x 10<sup>11</sup> neutrofila dnevno. Međutim, infekcija može da dovede do desetostrukog povećanja u proizvodnji neutrofila. Istovremeno u koštanoj srži pod uticajem i kontrolom faktora rasta i različitih citokina iz pluripotentnih ćelija sazrevaju neutrofili, polimorfonukleari (PMN). PMN se “naoružavaju” u koštanoj srži, a arsenal oružja pakuju u granule. Oslobađanje neutrofila iz koštane srži regulisano je uglavnom hemokinima. Zanimljivo je da su PMN u grupi ćelija sa najkraćim životnim vekom (6-8 h), mada evolucijski razlozi ovome nisu jasni. Jedan od mogućih razloga je da sa tako sačuva integritet ovih ćelija i spreči nekontrolisano oslobađanje njihovog sadržaja koji može biti opasan i po domaćina. Kako onda PMN lociraju i identifikuju infekciju? Proces tranzicije, tokom koga neutrofili dobijaju i integrišu veliki broj signala iz svoje okoline, poznat je pod nazivom aktivacija neutrofila. Signali neutrofilima stižu od domaćina ali i od samog patogena. Da bi neutrofili pronašli patogene oni moraju da pokrenu veliki broj ćelijskih mehanizama. Tako dolazi do mobilizacije sekretornih vezikula i granula, identifikacije hemotaktičnog gradijenta (puta) kojim se kreću dovodeći do reorganizacije aktinskog citoskeleta, penetriraju kroz endotelnu barijeru i usmaravaju se prema bazalnoj membrani, te započinju transkripciju gena za citokine koji će dovesti do regrutovanja novih imunskih ćelija. Kada dođu na mesto infekcije neutrofili prepoznaju patogene i oslobađaju svoj smrtonosni sadržaj. Dakle, pokretanje ovih procesa počinje u krvotoku, gde neutrofili predstavljaju stražare koji prate potencijalne opasnosti za

domaćina. Signal PMN može doći različitim putevima, npr. preko krvi ako je mikroorganizam prisutan u njoj aktivira se sistem komplementa koji šalje signale PMN. Ipak najčešći slučaj je da aktivirane i oštećene ćelije dovode do oslobađanja hemokina uz različite hemijske supstance koje oslobađa mikroorganizam (LPS) i koji su najčešći i najpotentniji aktivatori PMN. Dakle, na mestu zapaljenja postoji obilje signala koji dolaze kako od mikroorganizama tako i od samog domaćina i stimulišu endotelne ćelije. Stimulansi kao što su LPS, klasični hemoatraktanti i citokini (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-17) pokreću produkciju adhezivnih molekula, za koje se vezuju PMN i monociti, napuštaju krvne sudove i stižu na mesto infekcije već posle nekoliko minuta. Svakako da je od najpotentnijih hemoatraktana IL-8, citokina koji ima najvažniju ulogu u regulaciji zapaljenjskog ćelijskog "saobraćaja" [234, 235]. Interleukin-8 produkuje PMN, makrofagi, monociti, limfociti, NK-ćelije, endotelne i druge ćelije, a proinflamatorni citokini (IL-1 TNF- $\alpha$ ) podstiču, dok antiinflamatorni (IL-10, IL-4 i TGF- $\beta$ ) slabe njegovu sintezu. Spada u proinflamatorne citokine i sposoban je da indukuje selektivnu hemotaksiju i aktivaciju PMN. PMN, koji su migrirali na mesto infekcije, mogu da budu aktivisani i drugim lokalno produkovanim citokinima da oslobađaju i druge medijatore zapaljenja i pokrenu citokinsku kaskadu. Izbegavanje ranog kontakta sa PMN mehanizmima inhibicije hemotaksije PMN i monocita smatra se jednim od osnovnih mehanizama koji je odgovoran za nedostatak PMN kod pacientkinja sa BV, jednom masivnom polimikrobnom infekcijom. Pretpostavlja se BVAB sinergistički dovode do inhibicije hemotaksije, najverovatnije tako što produkuju određene supstance kao što su sukcinati i velike količine masnih kiselina kratkih lanaca (MKKL, *short chain fatty acids*). Tako su sukcinati detektovani u povišenim koncentracijama kod žena sa BV, a *Prevotella* spp. i *Mobiluncus* spp. su imali najjači inhibicioni uticaj na hemotaksu [236]. Takođe je pokazano da se MKKL nalaze u velikim koncentracijama kod pacientkinja sa BV, i da svojim antiinflamatornim i proapoptičnim efektima dovode do odsustva PMN kod pacientkinja sa BV [237]. Naravno, logično je pretpostaviti da sukcinati i MKKL predstavljaju samo neke od mnogih leukotoksičnih faktora koje produkuju BVAB.

Hemoatraktanti se vežu za receptore na PMN (najčešće G-proteini) koji pokreću signalnu kaskadu MAPK/ERK. Dolazi do aktiviranja mašinerije koja dovodi do oksidativnog praska koji je i glavno obeležje aktivacije PMN. Istovremeno se aktiviraju RPU i vežu za molekule na membrani patogena od kojih su, kao što smo rekli, najvažniji TLR. Ekspresija svih članova familije TLR prisutna je i na PMN, ali je za oksidativni prasak najvažnija ekspresija TLR3. Često se aktivacija PMN poistovećuje sa oksidativnim praskom i fagocitozom. Međutim, mora se imati na umu ogroman broj interakcija i kompleksnih signala koji se dešavaju na putu PMN na mesto infekcije tako da se tokom toga putovanja odigravaju pripreme koje će

postepeno dovesti do kompletne aktivacije PMN, koji onda mehanizmima, kao što su fagocitoza i degranulacija, uništavaju patogen [238]. PMN imaju karakteristike ne samo efektorskih nego i imunoregulatornih ćelija. Ukratko, PMN brzo dolaze na mesto infekcije gde oslobađaju svoj arsenal toksičnih produkata da ubiju i odstrane patogen procesima fagocitoze, degranulacije i stvaranja reaktivnih kiseoničnih metabolita. Da se ne radi o nemilosrdnim »egzekutorima« ukazuju podaci da PMN posle uspešno obavljenog zadatka menjaju svoj fenotip i počinju sa podsticanjem antiinflamatornog miljea tako što produkuju i oslobađaju antiinflamatorne medijatore (npr. lipokini). Oni takođe šalju signale okolnim makrofagima da ih lakše nađu i uklone (engl. *find me and eat me signals*) [239-241]. Posle izvršenog zadatka započinje proces gašenja zapaljenja koji je veoma važan za održavanje tkivne homeostaze. U ovom procesu kolateralna šteta je neizbežna, ali mora da bude svedena na najmanju moguću meru, zbog čega neutrofil moraju pažljivo biti uklonjeni. Ovaj proces neophodan za tkivnu homeostazu podrazumeva niz kontrolisanih mehanizama u procesu gušenja zapaljenja. To je kompleksan proces koji uključuje produkciju antiinflamatornih medijatora i apoptozu PMN.

## **1.7 APOPTOZA**

Apoptoza predstavlja važan mehanizam regulisanja ćelijske homeostaze i u fiziološkim uslovima, dakle u odsustvu aktivacionih mehanizama PMN ulaze u proces takozvane spontane apoptoze. Dakle, kada se fiziološka funkcija PMN u tkivima ispuni (npr. uništavanje mikroorganizama), oni prolaze kroz proces apoptoze, programirane ćelijske smrti, koja se javlja da bi se očuvao integritet ćelijske membrane neutrofila i sprečilo nekontrolisano oslobađanje štetnih toksičnih supstanci iz ćelije [242]. Apoptoza ili programirana smrt ćelije je aktivan, strogo kontrolisani genski regulisan proces koji ima vodeću ulogu u mnogim biološkim procesima, a njeni poremećaji mogu dovesti do raznih oboljenja. Ključnu ulogu u procesu apoptoze ima porodica enzima kaspaza koje izvršavaju program apoptoze. Postoje dva osnovna puta koji dovode do aktivacije kaspaza, spoljašnji i unutrašnji. U procesu apoptoze učestvuje i niz regulatornih protein (npr. Bcl-2). Pokretanje apoptoze je kompleksan proces koji se odlikuje specifičnim morfološkim promenama. Kako ove promene često variraju u zavisnosti od tipa ćelija i uslova u kojima ćelija raste, jedan od ciljeva našeg rada bio je da utvrdimo da li se vijabilnost vaginalnih PMN, odnosno stepen apoptoze, razlikuje kod pacijentkinja sa normalnom vaginalnom florom (predominacija laktobacila) u odnosu na pacijentkinje sa patološkom vaginalnom florom (BV, CA, TV). U ovom aktivnom i dobro kontrolisanom procesu ćelija prolazi kroz niz morfoloških promena, kao što su zgušnjavanje citoplazme i

unutarćelijskih organela, smanjenje zapremine ćelija, kondenzacija hromatina u jedru, nakon čega dolazi do fragmentacije ćelije na apoptotična tela okružena membranom. Suština je da se opasni sadržaj koji PMN nose ne oslobodi u okolinu i izazove zapaljenjsku reakciju koja može da bude štetna po domaćina. Ovaj balans između preživljavanja i smrti PMN precizno je regulisan mnogobrojnim mehanizmima koji potiču i od domaćina, a i od patogena [243-245]. Gubitak važnih funkcija neutrofila kao što su hemotaksija, fagocitoza, oksidativni prasak ili degranulacija, posledica je pre svega promena na receptorskom nivou koji različitim mehanizmima (smanjena ekspresija receptora, nemogućnost vezivanja, poremećaji postreceptorskih signala i sl.) smanjuju ili onemogućavaju ove procese. Pored toga, pokazano je da PMN mogu aktivno da proizvode i oslobađaju antiinflamatorne medijatore (lipoksin) koji onda započinju ograničavanje intenziteta i trajanja zapaljenjskog odgovora. U zavisnosti od uslova mikrosredine, životni vek neutrofila može biti produžen ili skraćen. Normalno, ostareli PMN bivaju podvrgnuti procesu spontane apoptoze u odsustvu citokina i drugih inflamatornih medijatora. Tako tokom zapaljenja životni vek PMN se produžava pod dejstvom različitih agenasa, a sve u cilju poboljšanja antimikrobnog dejstva neutrofila. Mnogobrojne *in vitro* studije pokazale su da zapaljenjski citokini kao što su IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-8, IL-15, INF- $\gamma$ , G-CSF, GM-CSF i LPS mogu da produže opstanak neutrofila. Uloga IL-6 je kontradiktorna, dok je za TNF- $\alpha$  pokazano da u zavisnosti od vremena i uslova okoline može imati i pro- i antiapoptotičko delovanje. Pored ovog "direktnog" uticaja citokina na proces apoptoze pokazano je da IL-10, koji nema direktan uticaj na apoptozu, može blokirati anti-apoptotično delovanje LPS i tako voditi ka apoptozi.

Dakle, ovaj proces "rađanja" i "umiranja" je stalan u fiziološkim uslovima kao deo homeostatskih mehanizama organizma. Tako će kod većine bakterijskih ili autoimunskih oboljenja, doći do npr. pojačane produkcije citokina (GM-CSF i G-CSF), odlaganja apoptoze i nagomilavanja PMN. Pad koncentracija citokina u fazi rezolucije zapaljenja indukovaće apoptozu [246, 247]. Mnogi proinflamatorni medijatori produžavaju vek PMN odlažući ili smanjujući stepen apoptoze, a među njima su najvažniji: G-CSF, GM-CSF, LPS, C5a, fMLP, ATP, leukotrijen B<sub>4</sub>, IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-15 i interferon- $\gamma$  [248-257]. Dakle broj PMN ne zavisi samo od njihove produkcije u koštanoj srži nego je u značajnoj meri regulisan stepenom apoptoze. Tako kod zapaljenja okolne ćelije ili sami PMN (autokrino) dovode do produkcije proinflamatornih citokina i tako odlažu svoju apoptozu. Zanimljivo, kortikosteroidi blokiraju apoptozu PMN, a indukuju ovaj proces kod većine drugih ćelija. Pored domaćina i samih PMN, još jedan značajan faktor može da utiče na apoptozu PMN, a to su različiti patogeni [258-261]. I dok ova patogenima indukovana apoptoza makrofaga može negativno da utiče na

imunski odgovor domaćina i ishod infekcije, kada je reč o patogenom indukovanoj apoptozi PMN ovakav događaj je generalno povoljan za domaćina i ključan u okončanju infekcije [262]. Zbog toga se smatra da bakterije i njihovi produkti u najvećem broju slučajeva dovode do indukcije apoptoze PMN, dok patogeni koji ometaju fagocitozom indukovanu apoptozu PMN i produžavaju njihov vek mogu dovesti do bolesti. U odnosu ili borbi domaćina i patogena principijelno imamo dva ishoda: prvi u kome PMN posle fagocitoze i uništenja patogena bivaju podvrgnuti apoptozi i odstranjeni od strane makrofaga, i drugi, ređi, u kome neki patogeni ometaju apoptozu PMN ina taj način prouzrokuju bolest. Uopšteno je prihvaćen stav po kome u uslovima infekcije i/ili zapaljenja PMN duže opstaju jer se smatra da se produženjem životnog veka i njihove aktivnosti smanjuje mogućnost da patogen nanese štetu domaćinu. Međutim, kada se “neprijatelj” savlada aktivnišu se mehanizmi rezolucije i apoptoze da bi se izbegle štetne posledice po domaćina. S obzirom na navedene činjenice hteli smo da utvrdimo da li se stepen apoptoze razlikuje kod pacijentkinja sa normalnom i patološkom vaginalnom florom, i da li i kako korelira sa brojem PMN, kao i koncentracijama ispitivanih citokina.

## **1.8 BROJ POLIMORFONUKLEARA U VAGINALNOM SEKRETU**

Kao što smo već opisali, centralni događaj i terminskog i prevremenog porođaja je zapaljenje u kome PMN igraju jednu od najvažnijih uloga. Ispitivanja su pokazala da je infiltracija PMN prisutna ne samo na lokalnom (grlič, miometriju, horioiddecidui, amnion) nego i na sistemskom (prajming i aktivacija PMN u krvi majke) nivou. PMN i makrofagi imaju značajniju ulogu u prevremenom nego u terminskom porođaju. S druge strane prisustvo PMN u vaginalnom sekretu je jedan od najjednostavnijih i najjevtinijih postupaka koji bi mogao da bude marker prisustva zapaljenja ne samo u vagini nego i u gornjim partijama genitalnog trakta, u našem slučaju grlića i gravidne materice. Teoretski, povećan broj PMN kod pacijentkinja pre 37. nedelje gestacije (bez obzira na njihovo poreklo i uzrok) ukazuju na zapaljenje, a kako je porođaj suštinski inflamatorni događaj, u ovom slučaju bi se to moglo tumačiti kao povećan rizik za PP. Znamo da PMN igraju veoma važnu ulogu u urođenom i stečenom imunskom odgovoru i odbrani domaćina od patogena i da utiču na koncentracije citokina i drugih zapaljenjskih medijatora, a jedan su od najvažnijih faktora u rezolucije zapaljenjskog procesa i apoptoze. Pored toga PMN su jedan od najznačajnijih pojedinačnih faktora u sva tri osnovna procesa (sazrevanju grlića, kontrakcije uterusa, aktivacija fetalnih membrana) vezana za započinjanje porođaja. Zato je čudno koliko je malo studija koje ispituju ovu povezanost ako to, na primer, uporedimo sa brojem studija koje se odnose na vaginalne infekcije (BV), lokalne

koncentracije citokina i drugih inflamatornih medijatora i rizika za PP. Ovi podaci su još čudniji kada se uzme u obzir činjenica da se dijagnoza BV zasniva na mikroskopskom pregledu nativnog preparata (Amselovi kriterijumi) i/ili preparata bojenog po Gramu (Nugentovi kriterijumi), a mikroskop je osnovno oruđe i da se utvrdi broj PMN u vagini ili grliću materice. Jedan od najvažnijih parametara u histološkoj dijagnozi horioamnionitisa i uspostavljanju kauzalne povezanosti infekcije i PP, takođe je broj PMN. Pitanje zašto u najvećem broju studija u kojima se u dijagnozi vaginalnih infekcija koristi mikroskop, nemamo podatak o broju PMN, ostaje otvoreno. Kada se radi o mikroskopskom pregledu nativnog preparata, činjenica da je veoma mali broj ginekologa obučen da gleda nativni preparat verovatno je glavni razlog što ovaj podatak najčešće nedostaje. S druge strane preparat po Gramu je "sveden" na Nugentov skor i dijagnozu BV, tako da većina mikrobiologa, a i studija, prenebegava PMN kao relevantan faktor u proceni stanja vaginalne flore. Dalje, već i letimičan pogled na studije koje se bave brojem PMN u vaginalnom sekretu i/ili grliću materice ukazuje na značajne metodološke razlike, od kojih su svakako najvažniji one koje se odnose na broj PMN. Na osnovu dosada korišćenih metodoloških postupaka možemo zaključiti da danas ne postoje ni približno definisani dijagnostički kriterijumi i granične vrednosti za normalan ili patološki broj PMN u vaginalnom sekretu. Tako, na preparatu bojenom po Gramu, raspon normalnog broja PMN kreće od 5 do 32 na 1 vidnom polju i uvećanju x1000 (imerzija). Još drastičnije razlike se odnose na iste granične vrednosti pri različitim mikroskopskim uvećanjima. Tako npr. Hitii [263] u svojoj studiji pregledom preparata na x 400 ima istu graničnu vrednost (preko 5 PMN) kao i većina drugih na uvećanju x 1000. Zbog toga je jedan od ciljeva našeg rada bio da u određivanju broja PMN, pored semikvantitativnih metoda koje podrazumevaju mikroskopski pregled nativnog preparata vaginalnog sekreta (NPVS) ili preparat bojenog po Gramu, koristimo i kvantitativne metode, ne bismo li preciznije definisali šta je to normalan, a šta patološki broj vaginalnih PMN. S obzirom na značaj i ulogu PMN u zapaljenju smatrali smo da bi bilo korisno ispitati kako broj vaginalnih PMN koreliše sa koncentracijama ispitivanih citokina, stepenom apoptoze ili dužinom grlića materice merene transvaginalnom sonografijom.

## 1.9 CERVIKOMETRIJA

U fiziološkim uslovima grlić 37 nedelja ostaje zatvoren kako bi fetusu omogućio rast, razvoj i sazrevanje organskih i funkcionalnih sistema i nesmetanu adaptaciju na vanmaterične uslove. Mikrostrukturne promene u tkivu grlića materice pre 37.n. g. mogu dovesti do PP, a ukoliko se ne dese do 42. n.g. uzrok su posterminskog porođaja. Dakle potpuno je fascinantno kako to grlić materice, u najvećem broju slučajeva, „zna“ i može da se u tih 5 nedelja transformiše iz jednog fibroznog, tvrdog, zatvorenog cilindra dužine 2-3 cm, sa kanalom prečnika 2-3 mm, u elastičnu i meku formaciju dužine 2-3 mm i prečnika preko 10 cm. Uprkos velikom broju ispitivanja koja su do danas urađena još nemamo odgovor na ovo pitanje. Naravno, ovo je potpuno razumljivo jer ne znamo kako započinje normalan porođaj, a promene na grliću su samo jedan od velikog broja događaja koji se dešavaju na gotovo svim organskim i funkcionalnim sistemima u „projektu“ pripreme organizma za porođaj. Sigurno je da su promene na grliću dinamične i kontinuirane i da se dešavaju tokom čitave trudnoće. Većina ovih promena dešava se na molekularno-biološkom nivou i najveći broj izmiče rutinskim kliničkim procedurama, kao što je ginekološki pregled ili transvaginalna sonografija. Ipak, promene na grliću i donjem uterinom segmentu (razmekšanje vrha grlića i cerviko-uterusnog spoja) mogu kliničkim pregledom da se detektuju već između 4. i 6.n.g., i pre pojave UZ bili su najvažniji klinički parametri u dijagnozi rane trudnoće. Ovo samo potvrđuje rezultate molekularnobioloških i histopatoloških ispitivanja koja su pokazala da se već od samog početka trudnoće na grliću dešavaju velike mikrostrukturne promene (povećanje kolagena, hijaluronske kiseline, vode), kao i da su grlić materice i donji materični segment tokom cele trudnoće jedan funkcionalni segment. Ovaj segment sa centralnom osom grlića (cervikalnim kanalom) ima oblik slova »T« i karakterističan je za ranu trudnoću, koji sa početkom porođaja dobija izgled slova »V« i na kraju slova »U«. Ovo samo pokazuje da grlić na nivou unutrašnjeg materičnog ušća i donji uterini segment predstavljaju dve anatomske zasebne dela, ali da su funkcionalno jedna celina.

Grlić materice je uglavnom vezivno tkivni organ, koji ima oko 10% mišićnog tkiva, 2% elastina, a ostalo čine kolagen i proteoaminoglikani i drugi različiti glikoproteini kao što je fibronektin [264]. Dakle, sposobnost grlića da ostane zatvoren tokom trudnoće nije vezana za mišićno sfinkterske mehanizme, nego prvenstveno zavisi od regulacije fibrozno vezivnog tkiva grlića. Još jedna od bitnih karakteristika tkiva grlića je da se u njemu nalazi velika količina vanćelijskog matriksa (VCM), čija je glavna komponenta kolegen, i promene u količini i metabolizmu kolagena su najvažnija komponenta koja utiče na stanje grlića tokom trudnoće.



Tkivo grlića odlikuje se velikom količinom VCM koji okružuje pojedinačne ćelije. Glavna makromolekularna komponenta VCM je kolagen i on određuje tenziona sile fibroznog vezivnog tkiva. Promene karakteristika cerviksa u trudnoći odraz su promena u količini i metabolizmu kolagena. Proteoglikani takođe učestvuju u fiziološkim zbivanjima u grliću matrice, i tako jedan od proteoglikana decorin koji ima veliki afinitet za kolagen stabilizuje molekularnu strukturu grlića, dok drugi proteoglikan biglikan, može dovesti do dezorganizacije kolagenih fibrila [265-267]. Biohemijski događaji koji karakterišu sazrevanje grlića materice su pad u ukupnoj količini sadržaju kolagena i povećanje njegove solubilnosti, uz pojačanu kolagenolitička aktivnost i kolagenaza i leukocitnih elastaza. Promene u VCM grlića materice suštinski imaju karakteristike zapaljenjskog procesa jer tokom sazrevanja grlića materice dolazi do influksa zapaljenjskih ćelija (makrofaga, PMN, mast ćelija, eozinofila i dr.) u stromu grlića materice. Ovo dovodi do povećanih koncentracija hemokina i drugih proinflamatornih citokina, zatim pojačane produkcije PG, što sve dovodi do promena u VCM grlića materice, njegovog sazrevanja i pripreme za porođaj [268-272]. Lokalno povećanje koncentracije hijaluronske kiseline pojačava migraciju inflamatornih ćelija (PMN) i posledično povećanje proinflamatornih citokina i hemokina (IL-1, TNF- $\beta$  i IL-8), koji pozitivnom povratnom spregom dovode do daljeg povećanja hijaluronske kiseline pojačane kolagenolitičke aktivnosti i značajnog smanjenja količine kolagena u grliću. IL-1 podstiče proizvodnju kolagenaza, IL-8 privlači PMN koji oslobađaju elastaze koje imaju važnu ulogu u razgradnji kolagena, što sve dovodi do daljeg sazrevanja grlića i pripreme za porođaj [273-278]. Svakako da i drugi mehanizmi imaju uticaj na sazrevanje grlića materice, a pomenućemo samo neke. MMP su familija potentnih enzima koji razgrađuju molekule VCM, uključujući i kolagen. Aktivnost MMP je regulisana njihovim specifičnim tkivnim inhibitorima. MMP-1 i MMP-8 deluju na prirodni, nedenaturisani kolagen i razgrađuju ga na manje fragmente, dok MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, i MMP-10 primarno cepaju denaturisani kolagen, proteoglikane i različite komponente bazalne membrane. Ova proteoliza igra važnu ulogu tokom cele trudnoće, a počevši od implantacije [279-281]. Poznato je da povećan broj i aktivnost makrofaga u cerviksu dovode do dalje amplifikacije zapaljenjskog procesa, nagomilavanje PMN, pojačane sinteze imunskih aktivatora kao što su inducibilne forme sintetaze azot monoksida (NO), prostaglandina i proinflamatornih citokina, povećanja koncentracija MMP što sve može dovesti do promena na grliću materice, uterinih kontrakcija i porođaja [282-285]. Preliminarni rezultati dobijeni biopsijom grlića materice pokazali su da dolazi do nagomilavanja PMN u blizini kapilara i malih vena u grliću žena pred kraj trudnoće. Aktivacija njihovih enzima koji razaraju VCM dovodi do remodeliranja grlića materice neophodnog za porođaj. Najnovija ispitivanja

su pokazala da se promene u grliću materice dešavaju polako i nedeljama pre očekivanog terminskog porođaja [286]. Da li ovakav »pripremni period« postoji i kod pacijentkinja sa PP za sada nemamo precizan odgovor. Wood i sar. su bili prvi koji su primetili da skraćen grlič predstavlja faktor rizika za PP, što je kasnije i potvrđeno mnogobrojnim ispitivanjima dužine grlića, naročito onim u kojima je korištena transvaginalna sonografija [287-289]. Kako su promene u cerviksu trudnica u terminu udružene s migracijom leukocita, logično je pretpostaviti da povećan broj PMN kod pacijentkinja sa cervikovaginalnim infekcijama može imati uticaja u etiopatogenezi PP udruženog sa infekcijom [290-298]. Povećan broj makrofaga koreliše sa povećanom produkcijom proinflammatoryh citokina od kojih su najznačajniji IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ , dakle onih citokina za koja su dosadašnja ispitivanja pokazala da imaju najznačajniju ulogu u etiopatogenezi PP udruženog sa infekcijom. Proinflammatory citokini dovode do aktivacije transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B koji onda između ostalog dovodi do blokiranja efekata progesterona, što je jedan od centralnih mehanizama započinjanja i terminskog i pretermanskog porođaja. Dakle isti ovaj signalni put se pokazao kao veoma važan i molekularnim zbivanjima koja se odnose i na grliću materice, i to kako u terminskim, tako i PP.

Takođe je pokazano da hormoni imaju značajnu ulogu u regulisanju promena na grliću materice. Tako je poznato da estradiol (razgradnja kolagena) indukuje sazrevanje grlića, dok progesteron ima suprotne efekte. Prostaglandini (PG) se godinama koriste u praksi za sazrevanje grlića materice pre indukcije porođaja ili abortusa. Međutim ono što poslednjih godina zaokuplja pažnju istraživača svakako su dejstva progesterona na grlič jer se prethodnih godina pod dejstvom progesterona uglavnom mislilo na miometrijum. Na značaj progesterona ukazuju mnogobrojne studije koje su pokazale da antiprogesteronski preparati ili blokatori progesteronskih receptora dovode do sazrevanja grlića materice, kao i da su ova dejstva izraženija ukoliko je gestacijska starost veća. Progesteronska aktivnost dovodi do povećane sinteze NO koji je jedan od glavnih faktora mirovanja materice, smanjuje produkciju PG kao i formiranje Ca<sup>++</sup> kanala i oksitocinskih receptora. U cerviksu progesteron dovodi do porasta tkivnog inhibitora MMP 1 (TIMP-1) inhibirajući tako kolegenolizu [299]. U eksperimentu na pacovima inhibicija sinteze azot monoksida potencira sposobnost antiprogesteronskih supstanci da dovedu do PP [300]. Pokazano je da progesteron inhibira, a mifepriston stimuliše produkciju IL-8 koji je najvažniji hemoatraktant [301]. Najnovija ispitivanja pokazuju da su dejstva progesterone na grlič i uterus odvojena, što potvrđuju rezultati ispitivanja da antiprogestini dovode do sazrevanja grlića materice ali ne i porođaja. Ovo smatramo važnim jer je nekoliko randomizovanih kliničkih studija pokazalo da progesteron može značajno da

smanji učestalost PP kod pacijentkinja kod kojih se UZ transvaginalnom sonografijom nađe skraćen grlić [301-315]. Danas bi mogli reći da progesteron predstavlja glavni faktor održavanja miometrijuma u mirovanju i očuvanja integriteta grlića materice i da faktori koji dovode do porođaja moraju da nadjačaju efekte progesterona.

Do pojave UZ digitalni pregled je bio jedini način da se proceni dužina grlića materice, a celokupan nalaz je procenjivan takozvanim Bishopovim skorom, kasnih devedesetih od prvih radova Iamsa i sar. [322] urađen je veliki broj ispitivanja koja su trebala da pokažu vrednost UZ u predviđanju PP. Studije koje su poredile digitalni pregled i transvaginalnu sonografiju (TVS), takođe su pokazale da je TVS superiorna u odnosu na klinički pregled u predviđanju PP. Ovo je razumljivo ako znamo da digitalnom pregledu »izmiče« stanje unutrašnjeg materičnog ušća i donjeg uterusnog segmenta koji nesumnjivo imaju najveći značaj [316, 317].

Prosečna dužina grlića materice pre 28. n.g. iznosi od 40-60 mm. Tačnije, percentili za dužinu grlića između 22-30. n.g. su: 2,0 cm: 5. percentil; 2,5 cm: 10. percentil; 3,5 cm: 50. percentil; 4,5 cm: 90. percentil. Dužina grlića smanjuje se sa napredovanjem trudnoće tako da je između 16. i 20. n.g. 4,0 – 4,5 cm; 24-28. n.g. 3,5 – 4,0 cm; 32-36. n.g. 3,0 – 3,5 cm. Dosadašnja ispitivanja pokazala su da dužina grlića u prvom trimestru trudnoće ne može da se koristi u predviđanju PP. Dakle, počevši od Iamsove studije [322], veliki broj autora merio je dužinu grlića tokom trudnoće i došao do zaključka da je dužina grlića u obrnutoj korelaciji sa trajanjem trudnoće, odnosno da kratak grlić predstavlja rizik za PP. Naravno, ne treba izvući zaključak da se pre vremena porode sve žene koje imaju kratak grlić [318-321]. Uopšteno, trudnice čija je dužina grlića do 24. n.g. manja od 25 mm imaju veći rizik za PP [322]. Pomenuta studija Iams i sar. [322] iz 1996. je pokazala obrnut odnos između dužine grlića materice i rizika za PP. To je ujedno bio i podsticaj za veliki broj ispitivanja koja su imala za cilj da utvrde da li bi se ultrazvučni pregled grlića materice mogao koristiti kao skrining metoda u prevenciji PP. Naime, merenje dužine grlića materice predstavlja brz, relativno jednostavan i jeftin dijagnostički metod koji se bez rizika može primeniti kod najvećeg broja pacijentkinja. Danas je transvaginalna sonografija jedini pristup kojim na adekvatan i precizan način možemo izmeriti dužinu grlića materice i tako proceniti rizik. I najvažnije, izdvajanjem rizične grupe trudnica otvorena je mogućnost za primenu terapijskih procedura, kao što su terapija progesteronom ili aplikacija serklaža. Brojna istraživanja ispitivala su mogućnost da dužinu grlića koristimo kao skrining u prevenciji PP [322]. Skraćen grlić meren TVS predstavlja najpouzdaniji pojedinačni markera u predviđanju PP [323-327]. Tako su ova ispitivanja pokazala da će se oko 15% trudnica čija je dužina grlića manja od 15 mm poroditi pre 32. nedelje trudnoće [325, 328]. Trudnice koje prethodno nisu imale PP, a čija je dužina grlića pre

20. n.g. kraća od 25 mm imaju 4 puta veći rizik od PP. U populaciji trudnica koje su već imale PP ovaj rizik je značajno veći (RR-11,3) [329]. Kada je dužina grlića preko 25 mm negativna prediktivna vrednost je preko 95% za porođaj pre 32.n.g [330]. Ako je u blizanačkoj trudnoći dužina grlića između 20 i 24.n.g. veća od 25 mm, NPV je takođe preko 95% [331]. Kombinacija TVS i FFT daje najbolje rezultate u predviđanju PP [332]. Naravno da se i neki drugi faktori moraju uračunati jer se rizik povećava kod pacijentkinja koje su imale prethodni PP [333]. Generalno možemo reći da grlič duži od 25 mm i negativan FFT u periodu između 24. i 32. n. g. znači da je mala verovatnoća porođaja pre 37. n.g [334]. Terapija progesteronom ili stavljanje serklaža značajno smanjuje učestalost PP [335-339]. Fonseca i sar. [340] su pokazali da primena vaginalnog progesterona kod trudnica sa dužinom grlića <15 mm, smanjuje rizik od PP za oko 44%. Druga randomizovana klinička studija kod pacijentkinja čija je dužina grlića bila između 10-20 mm i koje su lečene vaginalnom primenom progesterona pokazala je smanjenu učestalost PP pre 33. n.g. za 45%, za 38% smanjen je procenat PP pre 35. n.g., dok je ovaj procenat za PP pre 28. n.g. iznosio 50%. Metaanaliza pet randomizovanih kliničkih ispitivanja pokazala je da vaginalna primena progesterona ne smanjuje samo učestalost PP nego i ukazuje na smanjenu učestalost respiratornog distress sindroma i mnogo manje komplikacija u postnatalnom periodu [341-351]. Dosadašnja ispitivanja (ne uzimajući u obzir fetalni fibronektin) nisu pokazala nikakvu značajniju udruženost ili bolje rezultate kada se TVS kombinuje sa drugim prediktorima PP. Poslednjih decenija uloženi su ogromni naponi i urađena brojna ispitivanja u pokušajima da se pronađe biohemijski marker koji bi mogao predvideti PP. Svakako da po broju prednjače različiti markeri infekcije i/ili zapaljenja s obzirom na epidemiološke podatke i infekciju kao najvažniji faktor rizika za PP. Ipak interesantno je da se u tom „moru“ različitih supstanci veoma retko, bolje rečeno sporadično, pojavljuju PMN za koje smo videli da su jedan od najznačajnijih faktora u svakom zapaljenskom odgovoru. Tako smo našli samo jednu studiju koja se odnosi na broj PMN u grliću materice i TVS, a nekoliko drugih studija koje upoređuju ova dva parametra odnose se na broj PMN u amnionskoj tečnosti kod pacijentkinja kojima je rađena amniocenteza [352-355].

## 2 RADNE HIPOTEZE

1. Novi metod mikroskopskog pregleda preparata vaginalnog sekreta bojenog po Gramu na uvećanju x200 omogućava preciznije određivanje broja i vrsta ćelijskih morfotipova u odnosu na trenutne metode na mikroskopskim uvećanjima x400 (Amsel) i x1000 (Nugent, Ison/Hay i Claeys), a time bolje rezultate u proceni stanja vaginalne flore i rizika od PP.
2. Povećano preživljavanje vaginalnih PMN, zbog smanjene apoptoze kod trudnica između 24. i 28. nedelje trudnoće, pozitivno koreliše sa prisustvom vaginalne infekcije i/ili zapaljenja, koncentracijama prozapaljenjskih citokina (IL-1 $\beta$  i TNF $\alpha$ ) i lokalnog Th17 (IL-17A, IL-22) i Th9 (IL-9) imunskog odgovora, a u negativnoj je korelaciji sa nivoom imunoregulatornog citokina IL-10.
3. Metodologija semikvantitativnog određivanja broja PMN na preparatu bojenom po Gramu i mikroskopskom uvećanju x200 je bolji metod u proceni broja PMN u brisu vaginalnog sekreta od semikvantitativnih metoda na uvećanjima x400 i x1000 i dve kvantitativne metode.
4. Broj i vijabilnost vaginalnih PMN bolji su pokazatelji rizika za PP od dijagnostikovanih poremećaja vaginalne flore, koncentracije ispitivanih citokina i dužine grlića materice

### 2.1 CILJEVI

1. Na osnovu nalaza novog metoda mikroskopskog pregleda preparata vaginalnog sekreta bojenog po Gramu na uvećanju x200 i semikvantitativne procene prisustva, broja i odnosa različitih bakterijskih morfotipova, predložiti novu klasifikaciju vaginalne mikroflore i uporediti je sa postojećim dijagnostičkim kriterijumima i podelama po Amsel-u, Nugent-u, Ison/Hay-u i Claeys-u.
2. Utvrditi i uporediti broj PMN u vaginalnom sekretu trudnica između 24. i 28. nedelje trudnoće pomoću semikvantitativnih metoda na mikroskopskim uvećanjima x200, x400 i x1000 i dve kvantitativne metode.
3. Utvrditi i uporediti vijabilnost, apoptozu i broj vaginalnih PMN dobijen različitim kvantitativnim i semikvantitativnim metodama.
4. Utvrditi povezanost između stepena apoptoze vaginalnih PMN i grupa pacijentkinja sa različitim stanjima vaginalne mikroflore definisanih na osnovu standardnih i novopredloženih kriterijuma.

5. Izmeriti koncentracije Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12 p70), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13), Th17 (IL-17A, IL-22), Th9 (IL-9), proinflamacijskih citokina (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) i imunoregulatornog IL-10.
6. Utvrditi međusobnu povezanost broja, vijabilnosti i apoptoze vaginalnih PMN sa koncentracijama ispitivanih citokina i rezultatima mikroskopskih ispitivanja preparata vaginalnog sekreta i ultrazvučnog merenja dužine grlića materice.
7. Utvrditi međusobnu povezanost broja, vijabilnosti i apoptoze vaginalnih PMN, koncentracija ispitivanih citokina, rezultata mikroskopskih ispitivanja preparata vaginalnog sekreta i ultrazvučnog merenja dužine grlića materice sa učestalošću PP u ispitivanoj populaciji trudnica.

## 2.2 PACIJENTKINJE I METODI

Prospektivna studija u koju su bile uključene 732 trudnica između 24. i 28. nedelje trudnoće. Svim pacijentkinjama pregled smo zakazivali jedan do dva meseca unapred i sve pacijentkinje su bile bez znakova i simptoma PP ili drugih tegoba. U studiju nisu uključivane trudnice mlađe od 18 i starije od 40 godina, trudnice sa multiplom trudnoćom, anomalijama uterusa, prethodnom konizacijom ni one koje su već imale jedan ili više PP, one koje su koristile bilo kakvu terapiju dve nedelje pre uzimanja uzoraka ili imale seksualne odnose 7 dana pre uzimanja uzorka. Pre bilo kakvog vaginalnog pregleda u vaginu smo stavljali sterilan spekulom bez upotrebe lubrikansa i kliničkim pregledom konstatovali količinu, konzistenciju i boju vaginalnog sekreta i površinu ektopije grlića materice. Odmah posle uvođenja spekuluma u početni deo cervikalnog kanala stavljali smo štapić sa dakronom tokom 1 min do saturacije. Sa bočnog vaginalnog zida uzimali smo 3 uzorka

- Prvi uzorak nanosili smo na mikroskopsku pločicu dimenzija 76,2x25,4 mm blagim kotrljanjem štapića po dužini, stavljali jednu kap fiziološkog rastvora i preko nje pokrovno staklo, posle čega smo preparat pregledali pod faznokontrastnim mikroskopom na uvećanju x400. Po završetku mikroskopskog pregleda na isti preparat dodavali smo kap 10% KOH u cilju lakše vizuelizacije spora i/ili hifa gljivica. Pri istovremenom stavljanju fiziološkog rastvora i 10% KOH na dva kraja pločice sa dva pokrovna stakalaca, u najvećem broju slučajeva 10% KOH prolazio i do drugog dela pločice i činio preparat neupotrebljivim za dalje ispitivanje.
- Drugi uzorak smo na isti način razmazivali na pločicu, sušili na vazduhu, bojili po Gramu i arhivirali.
- Treći uzorak sa bočnog vaginalnog zida smo stavljali u epruvetu sa 1 ml fiziološkog rastvora i odnosili u citološku laboratoriju radi kvantifikativnog određivanja broja PMN (QPMN-B)

- **Proba sa 10% KOH:** Kod svih pacijentkinja radili smo probu sa 10% KOH tako što smo na štapić sa uzorkom sa bočnog vaginalnog zida stavljali 1 kap KOH i konstatovali ili isključili prisustvo mirisa pokvarene ribe.

- **Vaginalni pH** određivali smo papirnim testovima (Merck pH raspona od 4,0 do 7,0).

Saturisani dakronski štapić iz grlića stavljali smo u 1 ml odgovarajućeg medijuma i najduže posle 2 časa odnosili u imunološku laboratoriju, centrifugirali i zamrzavali na temperaturi –80 do određivanja koncentracija citokina.

Potom smo uzimali bris iz grlića istim štapićem sa bočnog vaginalnog zida i u roku od najduže 3 časa odnosili u mikrobiološku laboratoriju gde su ga zasejali na podlogu sa krvnim agrom, a sa istog uzoraka pravi razmaz na mikroskopskoj pločici sušili na vazduhu i bojili po Gramu, posle čega ga je tumačio nadležni mikrobiolog.

Na kraju, posle uzimanja vaginalnih i cervikalnih briseva, u vaginu smo ubrizgali 20 ml sterilnog fiziološkog rastvora, ostavili 5-10 s i potom aspirirali delom infuzionog seta napravljenim za ovo ispitivanje, stavljali u veliku epruvetu i najduže posle 3 h slali u nadležnu imunološku laboratoriju radi kvantitativnog određivanja broja PMN (QPMN-A) i procenta apoptoze, odnosno vijabilnost PMN.

Po završenom pregledu kod svih pacijentkinja je urađen ultrazvučni pregled radi određivanja gestacione starosti trudnoće, kao i pregled vaginalnom sondom radi merenja dužine grlića materice.

## **2.3 PROCENA STANJA VAGINALNE FLORE - MIKROSKOPSKI NALAZ**

### **2.3.1 Mikroskopski pregled nativnog preparata ( X400 )**

Preparat razblažen jednom kapi fiziološkog rastvora posmatran je pod faznokontrastnim (FK) mikroskopom na uvećanju x400 tako što je na preparatu gledano najmanje 50 vidnih polja (VP), na sredini i dva kraja preparata i procenjivan odnos između broja laktobacilarnih i sitnih bakterijskih formi i detektovano prisustvo specifičnih uzročnika infekcije kao što su *T. vaginalis* i *C. albicans*, citolize, parabazalnih ćelija, eritrocita, i broj polimorfonukleara (PMN). Preparat NPVS smatrali smo odgovarajućim ako je najmanje 8 epitelnih ćelija (EĆ) prisutno u VP na uvećanju x400.

- *Laktobacilarne forme* (LBF): Forme koje se na faznokontrastnom mikroskopu vide kao ravni ili blago zakrivljeni štapići, ravnih krajeva, nepokretni, različite širine ili dužine, koji ponekad adheriraju ili su smešteni u obliku palisada definisali smo kao štapićaste forme (ŠF) i oni odgovaraju laktobacilima ili laktobacilarnoj flori drugih autora.

- *Sitne bakterijske forme* (SBF): Ovaj termin smo koristili da opišemo prisustvo različitih morfoloških formi sitnih bakterija, kao što su kokobacili, vrlo mali bacili (engl. *tiny rods*) i pokretni zakrivljeni bacili (engl. *mobile curved rods*) koji se često nalaze zajedno. One su znatno manje od laktobacila i često prijanjaju jedni za druge formirajući grudvice ili splavu slične formacije koje plutaju između epitelnih ćelija. Vaginalne EĆ čije se ivice ne vide jasno



jer su prekrivene velikim brojem kokobacila koji adheriraju za njihovu površinu identifikovali smo kao *clue* ćelije (engl. *clue cells*, CC). Sitne zakrivljene bakterije, koje se kreću praveći spiralne putanje pretpostavljali smo da predstavljaju *Mobilincus species*.

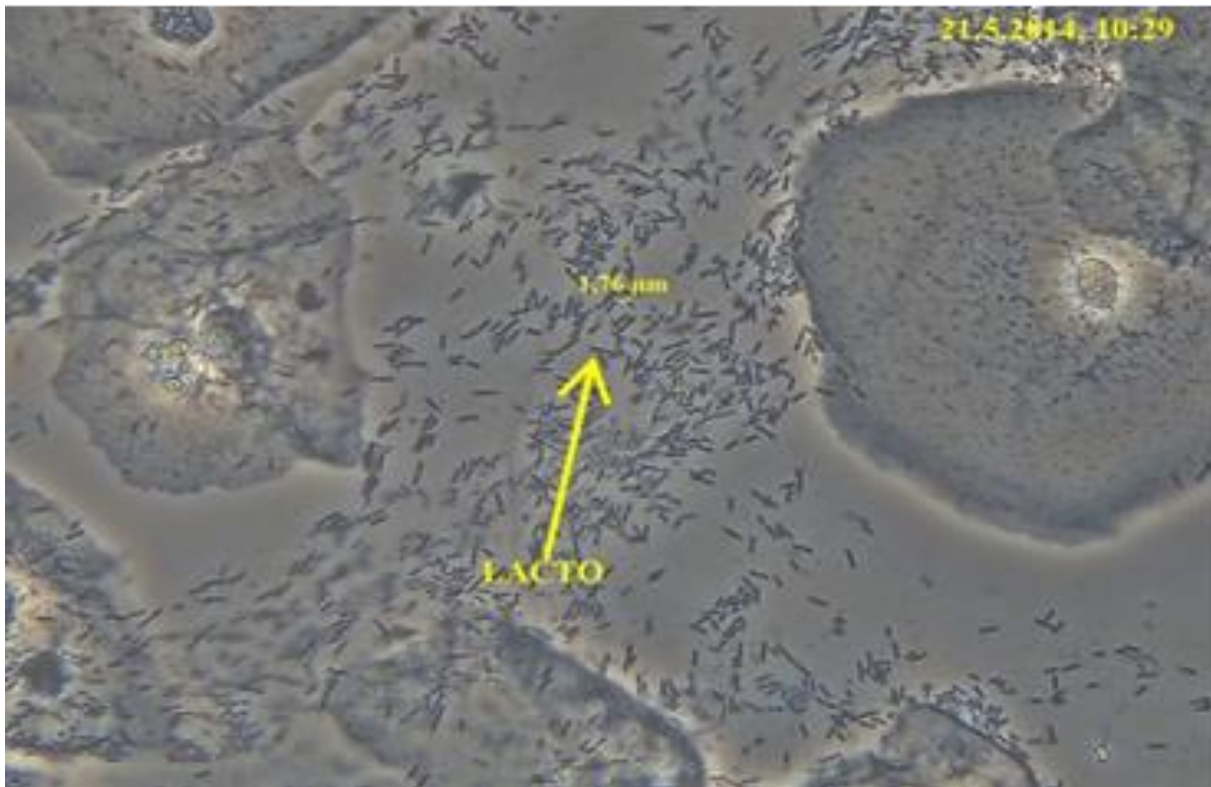
NORMALAN NALAZ – Predominaciju LBF u odnosu na SBF uvek smo svrstavali u normalan nalaz i u slučajevima kada je jedan od dva testa (KOH test, pH>4,5) bio pozitivan, nismo imali slučajeve sa oba pozitivna testa i predominantnom laktobacilarnom florom (Slika 2.1).

BAKTERIJSKA VAGINOZA - Dijagnozu BV postavljali smo na osnovu modifikovanih Amselovih kriterijuma. Originalni Amselovi [214] kriterijumi podrazumevaju pozitivna tri od četiri znaka: 1) pojačana, homogena sivo beličasta sekrecija; 2) pozitivan test sa 10% KOH (neprijatan miris ribe); 3) vaginalni pH preko 4,5; 4) mikroskopski nalaz: najveći broj autora podrazumeva prisustvo CC, a neki smatraju da broj CC treba da bude veći od 20% posmatranih ćelija (najmanje jedna od pet ćelija, na najmanje četiri vidna polja), da bi se postavila dijagnoza BV (Slika 2.2). S obzirom na višegodišnje iskustvo u gledanju NPVS odavno smo primetili da se značajan procenat pacijentkinja (20-30%) nalazi između ova dva nalaza, definisanih kao predominantna LBF ili prisutne CC. Ove pacijentkinje bi mogli da podelimo u dve grupe.

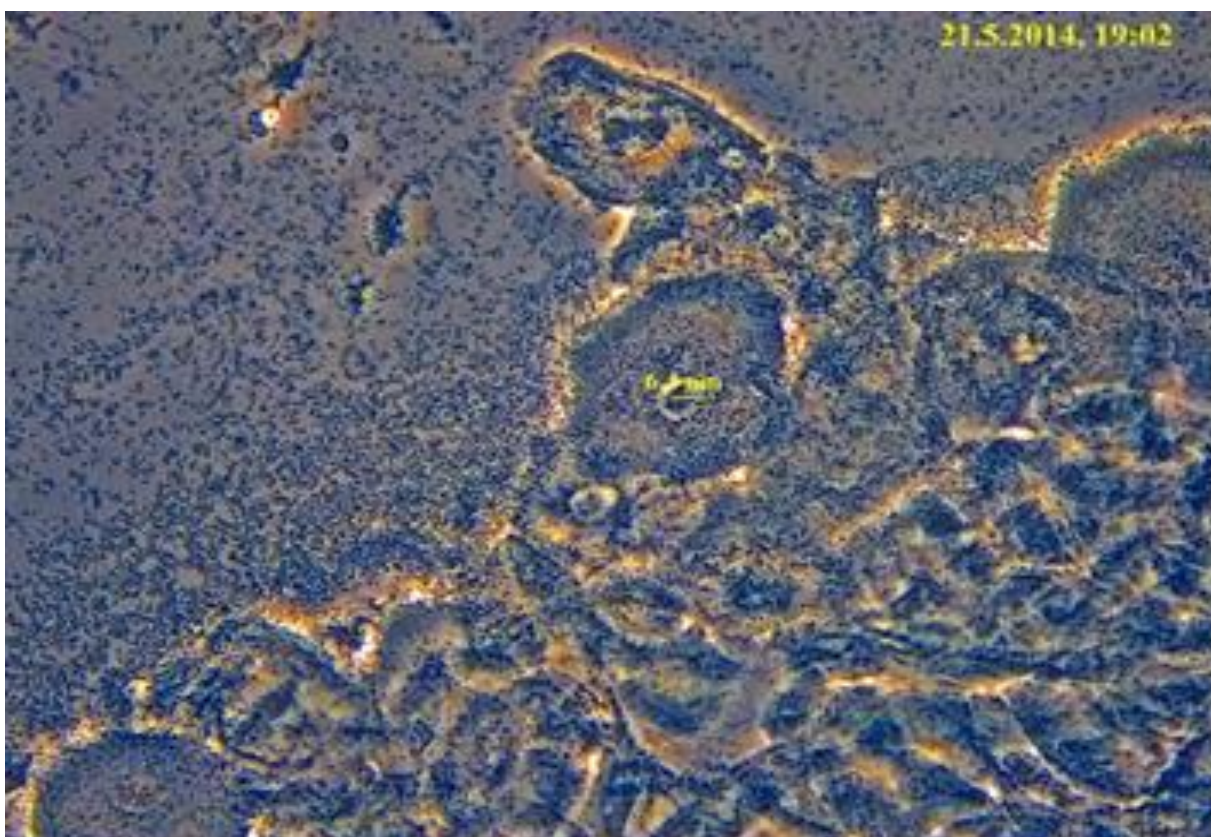
Prvoj bi pripadale one koje imaju manji broj LB i SBF, obično podjednak ili sa malo većim brojem jednih ili drugih formi (Slika 2.3).

Drugoj grupi bi pripadale pacijentkinje sa izrazito smanjenim brojem i LBF i SBF tako da preparat deluje kao ispran fiziološkim rastvorom, čist, samo sa EĆ (hipocelularan nalaz), sa vrlo malim brojem laktobacila i sitnih bakterijskih formi.

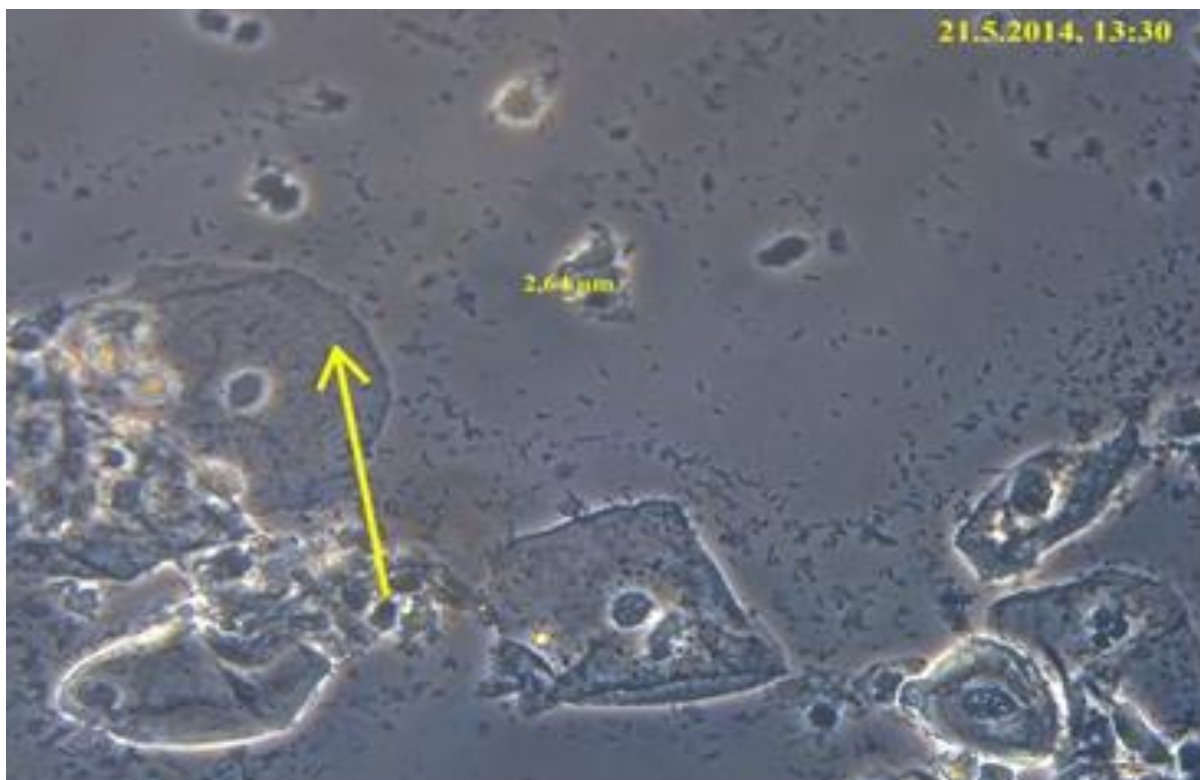
U slučajevima kad su SBF brojnije ili čak podjednake sa LBF, ili kada je preparat hipocelularan (mali broj ili potpuno odsutna LBF, kao i mali broj SBF), a pacijentkinja ima druga dva pozitivna testa, vaginalni pH>4,5 i pozitivna KOH test, postavljali smo dijagnozu BV, bez obzira što nije bilo CC ili pojačane homogene sivobeličaste sekrecije. Dakle, prisustvo CC na NPVS i pojačana homogena sivobeličasta sekrecije nisu bili deo našeg dijagnostičkog skora za dijagnozu BV. Sve pacijentkinje su na osnovu nalaza NPVS dobijale odgovarajuću terapiju. Tako su pacijentkinje sa BV i prisutnim clue cells lečene metronidazolom 2x500 mg 7 dana uz istovremenu lokalnu primenu prebiotika + acidifikant, dok su pacijentkinje bez clue cells i hipocelularnim nalazom bez obzira na dva pozitivna ili negativna testa (pH i KOH) takođe dobijale prebiotik sa acidifikantom. Pacijentkinje kod kojih su na NPVS sa 10% KOH detektovane spore ili hife gljivica tretirane su antimikotičkom terapijom.



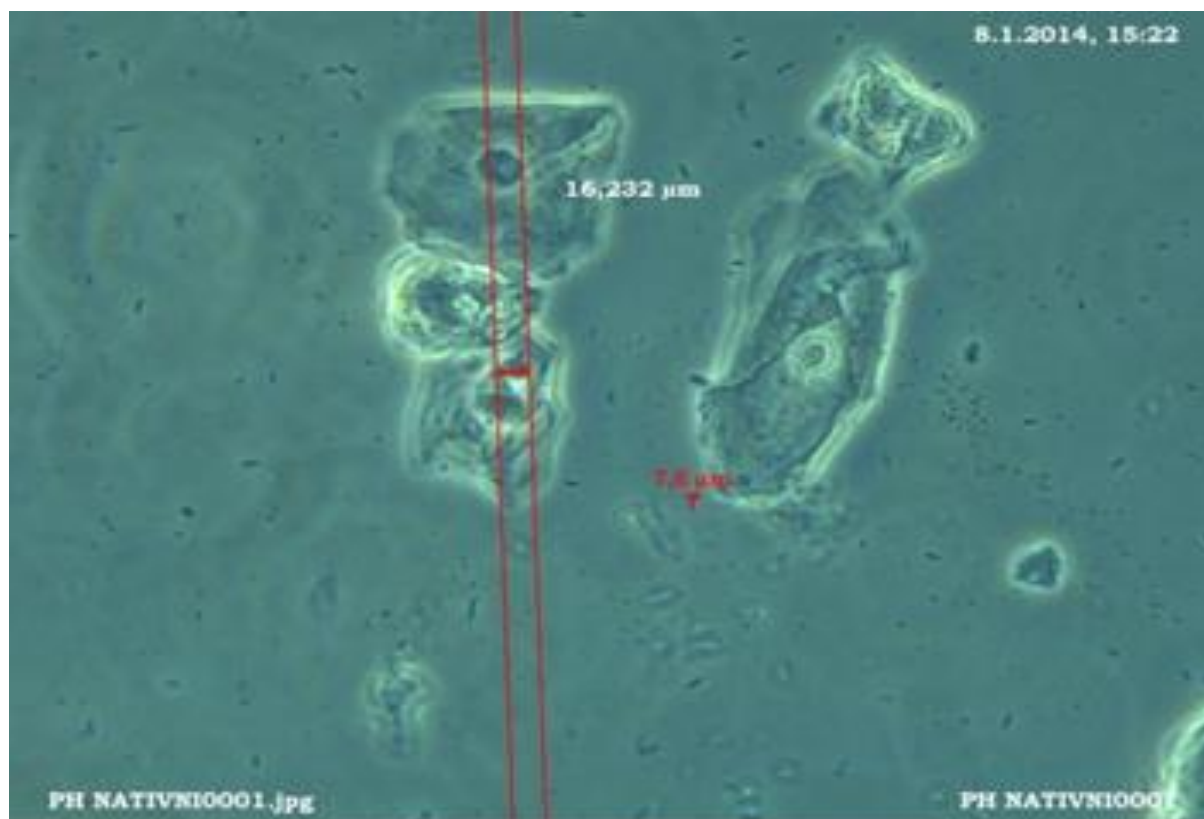
Slika 2.1: Predominatna laktobacilarna flora, nalaz normalan (NPVS, FK X400)



Slika 2.2: Tipične clue cells (CC), nema laktobacila, bakterijska vaginoze (NPVS, FK X400)



Slika 2.3: Podjednak broj laktobacila i sitnih bakterijskih formi, nalaz graničan i dijagnoza zavisi od rezultata pH i KOH testa (NPVS, FK X400)



Slika 2.4: Hipocelularan preparat sa malim brojem bakterijskih formi, izgleda kao ispran, čist; dijagnoza zavisi od rezultata pH i KOH testa (NPVS, FK X400)

Pacijentkinje sa povećanim brojem PMN kod kojih nismo detektovali gljivice a kod kojih smo mikroskopski našli predominaciju SBF ili podjednak broj laktobacila i sitnih bakterijskih formi dobijale su terapiju Eritromicin 500 mg 4x1 7 dana jer smo smatrali da se kod ovih pacijentkinja radi o aerobnom vaginitisu (AV).

### 2.3.2 Bojenje po Gramu

Preparat osušen na vazduhu fiksirali smo u metanolu ili na plamenu, potom na preparat stavljali kristal violet (1 min), isprali ga blagim mlazom destilovane vode, pa naneli Lugolov rastvor (1 min), isprali pod blagim mlazom vode, zatim obezbojili acetonom ili 96% alkoholom (5-15 s), isprali vodom, stavili sarfarin (1 min), isprali vodom i osušili. Pregled mikroskopskog preparata bojenog po Gramu na uvećanju x1000 rađen je na osnovu kriterijuma po Nugentu, Ison-Hayu i Claeyesu.

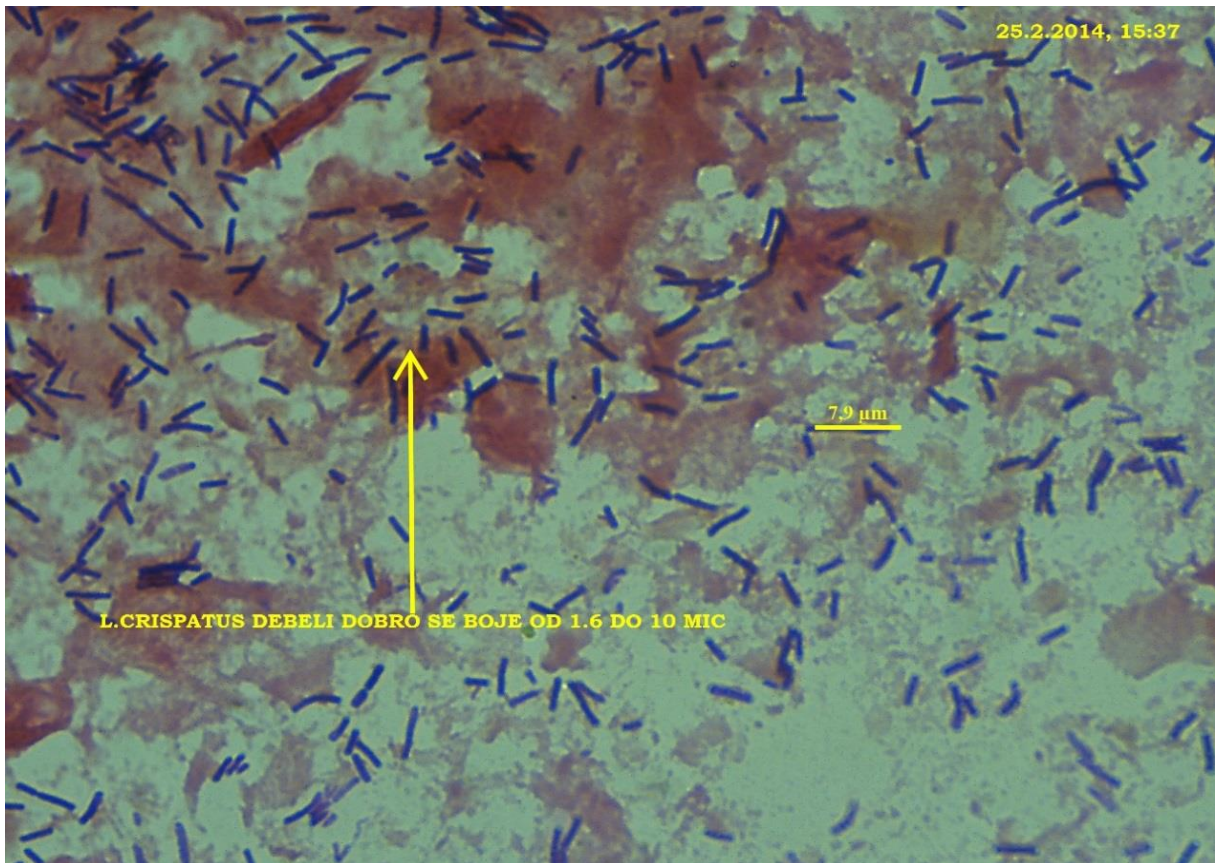
#### 2.3.2.1 Metodologija po Nugentu

Pod imerzijom (uvećanje x1000) gledali smo 5 nesusednih, slučajno odabranih VP na kojima smo beležili prisustvo i broj štapićastih Gram pozitivnih morfotipova (laktobacili), zatim Gram negativnih ili Gram varijabilnih kokobacilarnih morfotipova (*Gardnerella*, *Bacteroides* morfotip) kao i broj zakrivljenih Gram varijabilnih formi (*Mobiluncus* morfotip). Površina VP mikroskopa na kome smo gledali preparate (Leica DM 2000 LED, okular 10x22, sočivo 100x1,25, prečnik 0,21mm) iznosi 0,035 mm<sup>2</sup>. Broj bakterijskih morfotipova razlikuje se u odnosu na originalnu Nugentovu podelu [208] jer je određivan za površinu vidnog polja od 0,035 mm<sup>2</sup> kako je to predloženo od strane Larssona i sar. [356] (Tabela 2.1). Gleda se 5 VP, i na osnovu broja morfotipova određuje broj bodova, da bi u konačnom zbiru pacijentkinje bile podeljene u tri grupe: Normalan nalaz (0-3 bodova); Intermedijaran nalaz ( 4-6 bodova) i Bakterijska vaginoza (7-10 bodova) (Slike 2.5 - 2.8).

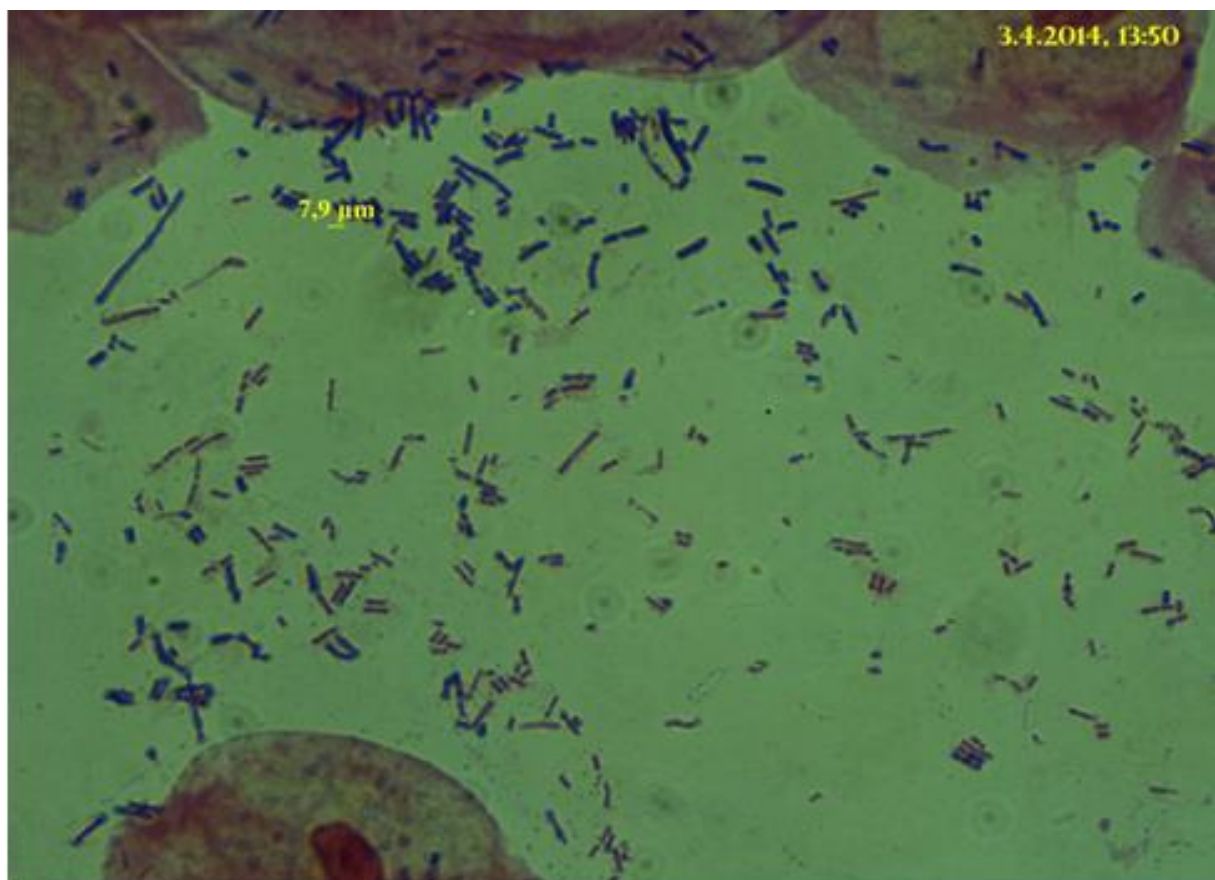
**Tabela 2.1: Nugentov skor sa brojem morfotipova za površinu vidnog polja 0,035 mm<sup>2</sup>, adaptirano na osnovu Larssona i sar. [356]**

Broj <i>Laktobacili</i>	Bodovi	Broj <i>Gardnerella</i> <i>Bacteroides</i>	Bodovi	Broj <i>Mobiluncus</i>	bodovi	Nugentov zbir	Dijagnoza
0	4	>50	4	>10	2	10	
0-2	3	10-49	3	2-10	1	8	BV= 7-10
2-8	2	2-8	2	0	0	5	INT= 4-6
10-49	1	0-2	1			3	
>50	0	0	0			0	NOR= 0-3

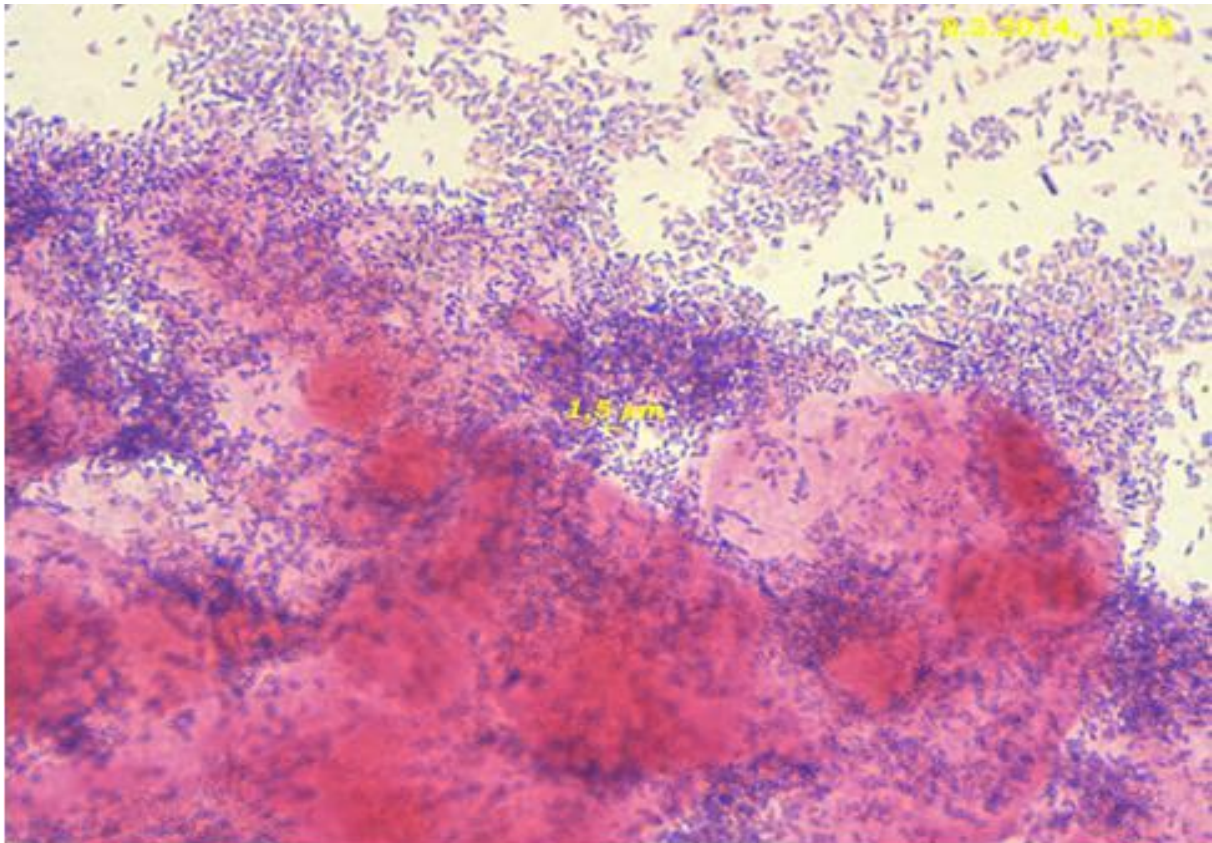
LB: Gram pozitivne štapićaste forme, laktobacilarna flora; GV: *Gardnerella vaginalis*; BS: *Bacteroides* spp; MB: *Mobiluncus* spp., zakrivljeni Gram varijabilni morfotip



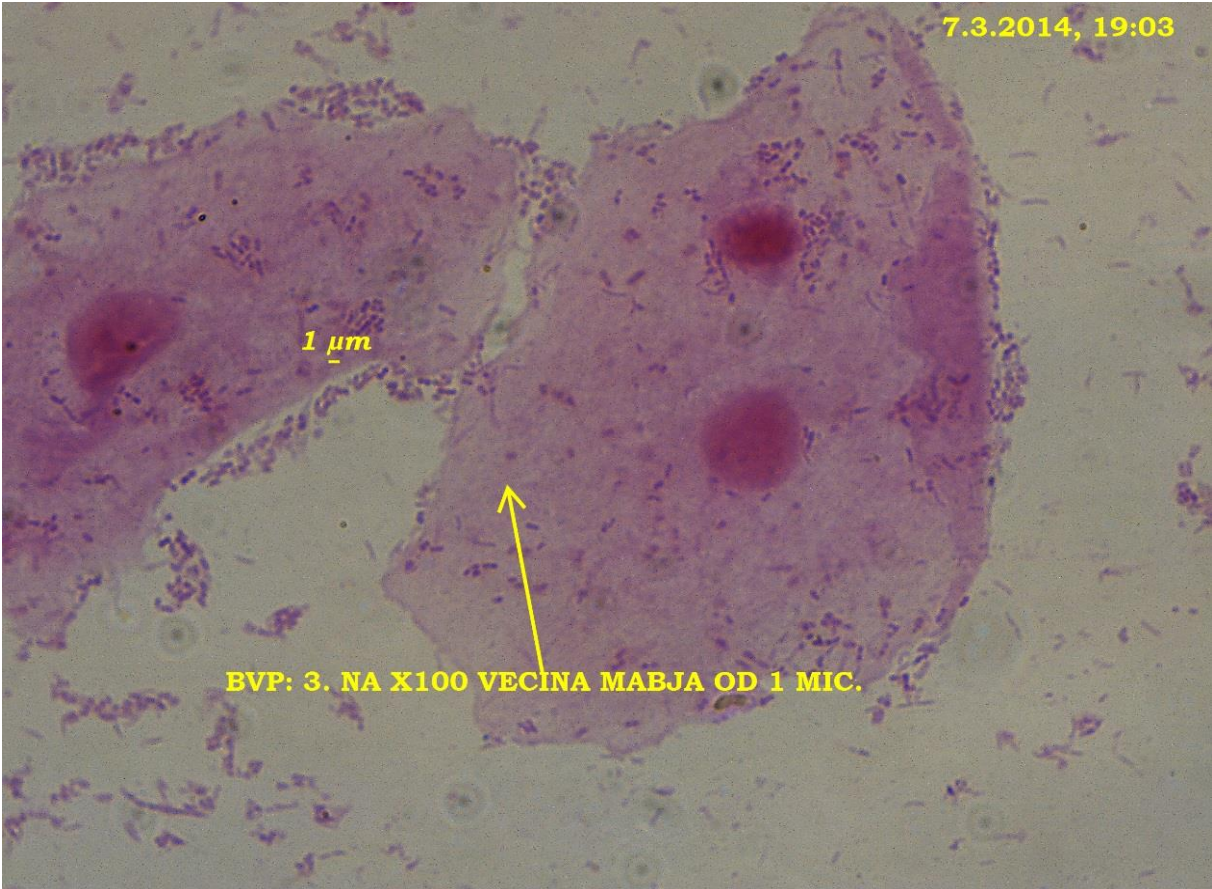
Slika 2.5: Predominantna laktobacilarna flora, zbir po Nugentu = 0, nalaz normalana (Gram X1000)



Slika 2.6: Zbir po Nugentu = 6, nalaz intermedijaran (Gram X1000)



Slika 2.7: BV full



Slika 2.8: Nugentov zbir=9;Bakterijska vaginoza, bez clue cells

### 2.3.2.2 Metodologija po Ison i Hayu

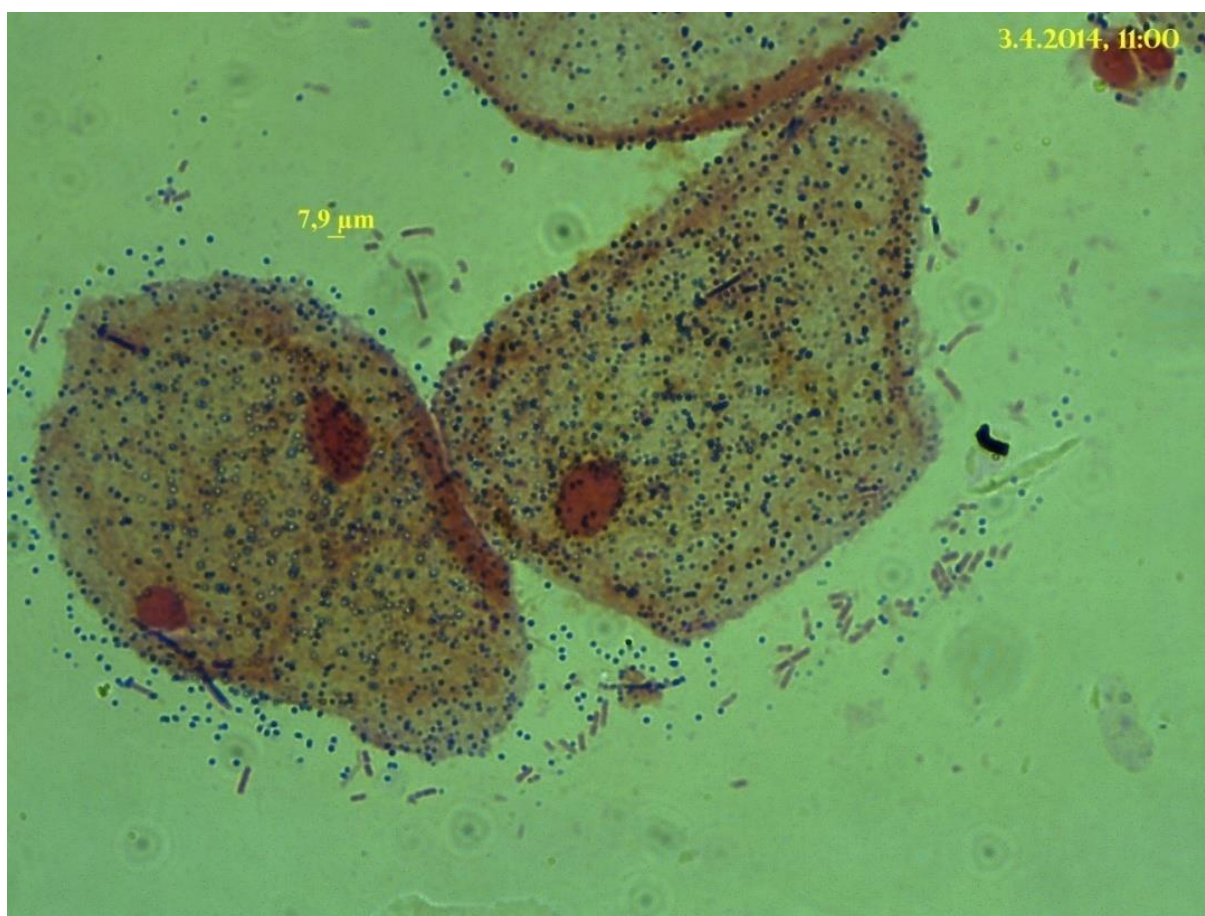
Metodologija po Ison i Hayu [357] slična Nugentovoj kada se radi o ćelijskim morfotipovima samo se ovde oni ne broje nego se radi o semikvantitativnoj proceni odnosa pomenuta tri bakterijska morfotipa. Pored tri kategorije koje su identične Nugentovoj podeli (normalan, intermedijaran i BV), autori su dodali još dve: jedna definisana kao nulta (*grade 0*) koja se karakteriše prisustvom samo EĆ bez bakterija u našim tabelama „ČIST NALAZ“. Druga (*grade IV*) koju opisuju kao grupu kod koje su EĆ prekrivene samo G+ kokama, u našim tabelama „KOKE“ (Slike 2.9 i 2.10).

### 2.3.2.3 Metodologija po Claeyasu

Verhelst i sar. [216] su napravili novu podelu poznatu i kao klasifikacija po Claeyasu koja ima 6 grupa. Ova klasifikacija suštinski predstavlja modifikaciju klasifikacije po Ison i Hayu, u kojoj su je izostavljena grupa pacijentkinja koju su Ison i Hay definisali kao *grade 0*, a uspostavljene su i dve nove grupe. Prva, koja originalno nosi naziv grupa I PMN ili grupa I-like, a koja je u našim tabelama označena kao “SLIČAN NORMALNOM” a koja se karakteriše prisustvo Gram pozitivnih oblika, koji mogu biti sasvim mali i kratki, ili izrazito dugački, ali nepravilnih oblika sa tendencijom grananja, i obično širokim i debelim, zatupastim krajevima (*clubbing*) i zakrivljenim ivicama, a često se i neregularno boje, raspoređeni tako da često prave oblike slične kineskom pismu (Slika 2.11). Druga grupa se karakteriše prisustvom velikog broja PMN uz istovremeno prisustvo normalnog broja laktobacila, koju autori nazivaju i idiopatskom leukorejom, a koja je u našim tabelama obeležena kao “LEUKOREJA”. Da bi pacijentkinju svrstali u ovu Grupu neophodno je isključiti gljivičnu infekciju (Slika 2.12)

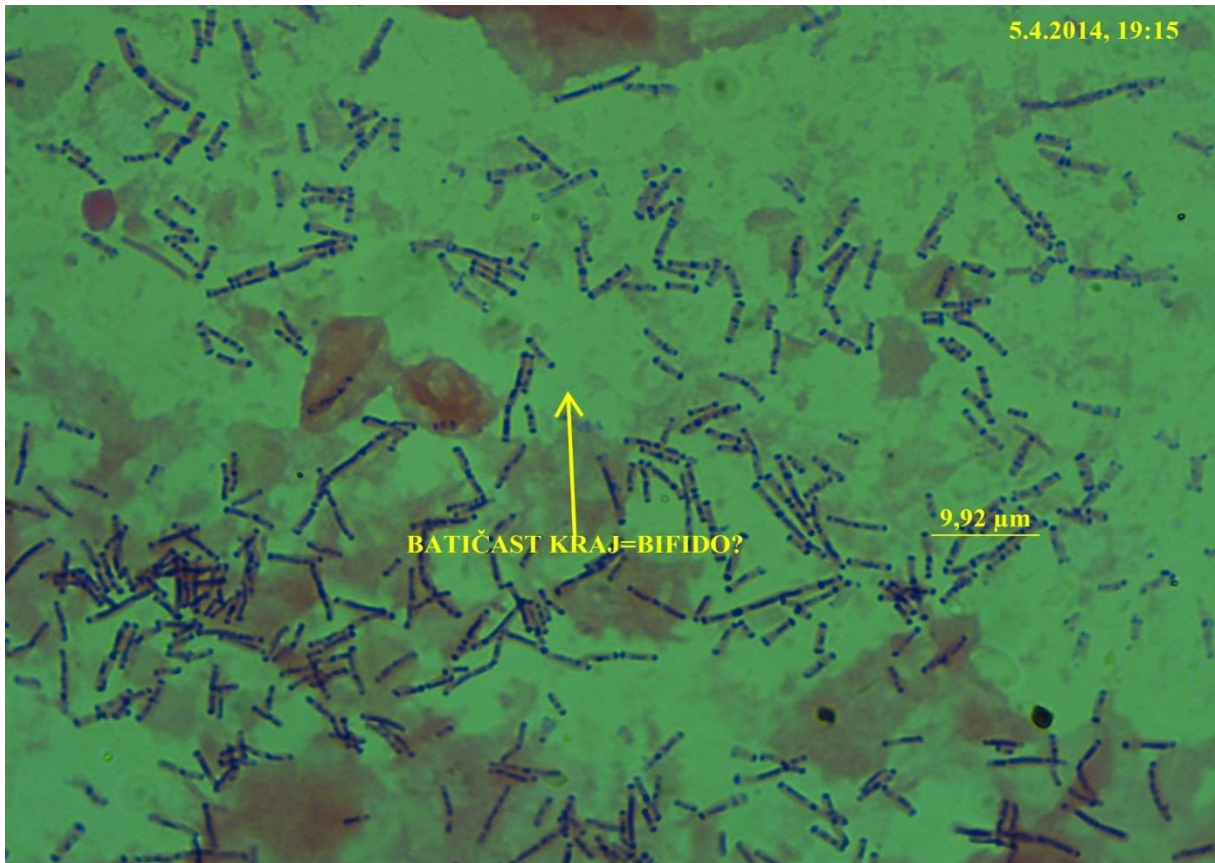


Slika 2.9: Podela po Ison/Hayu originalno Grade 0, u našem ispitivanju i tabelama "ČIST NALAZ"

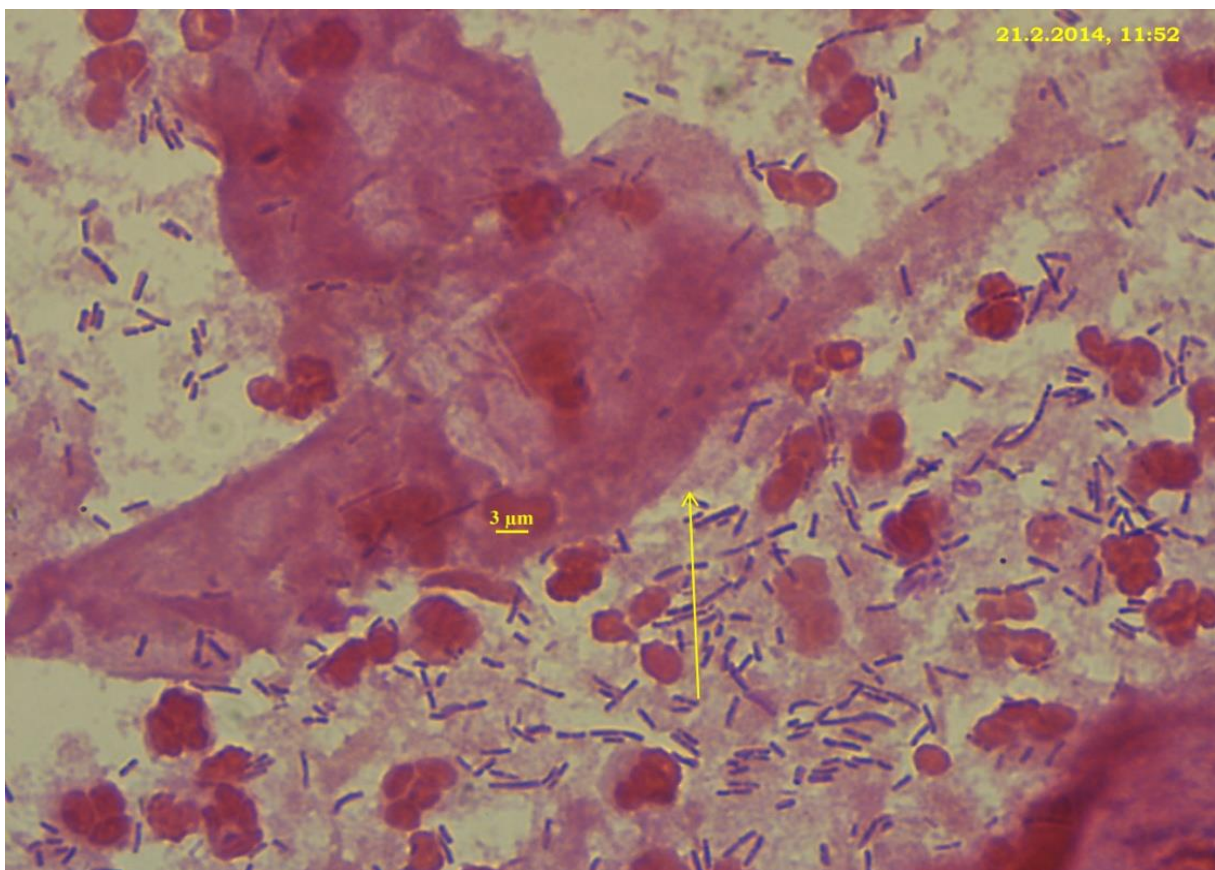


Slika 2.10: : Podela po Ison/Hayu originalno Grade IV, u našem ispitivanju i tabelama "KOKE"





Slika 2.11: Podela po Claeyesu- Originalno Grupa I-like, u našem ispitivanju ; “sličan normalnom” i BIFIDO forme; štapičaste forme sa zatupastim (batičastim krajevima koje se neravnomerno boje (x1000)

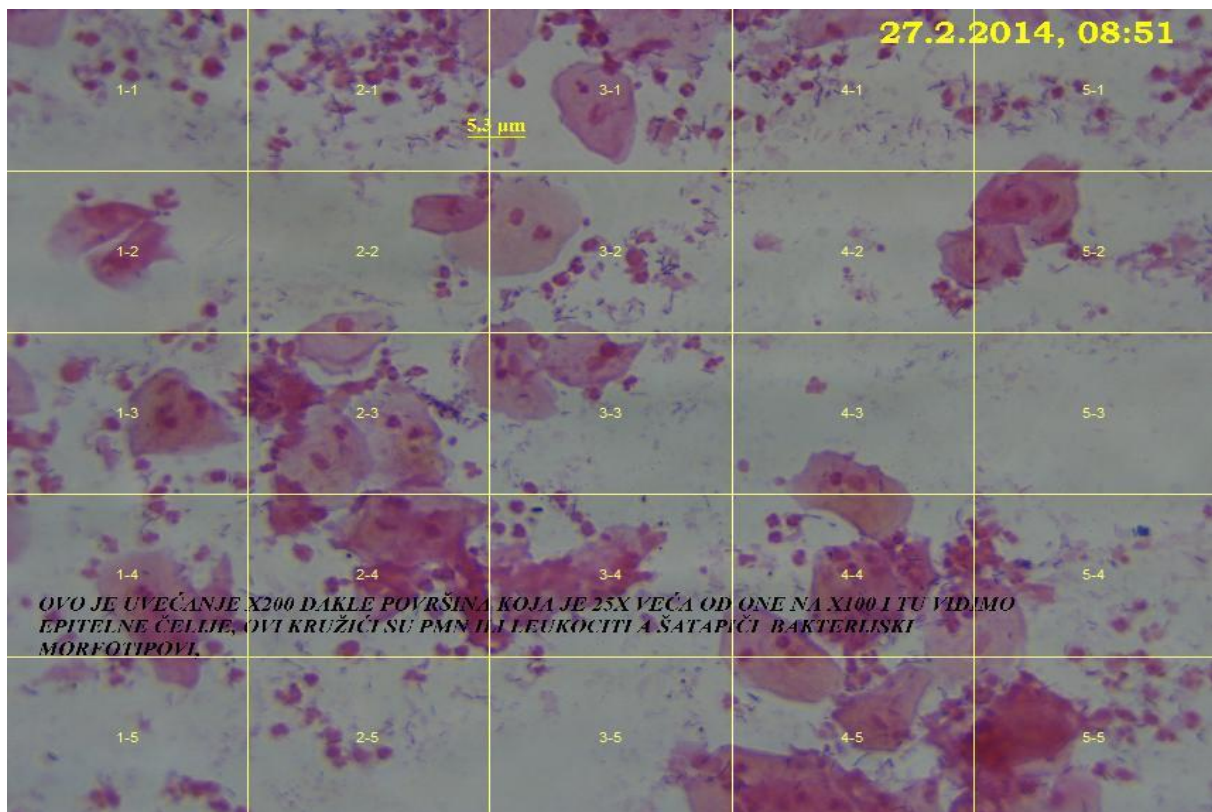


Slika 2.12: Podela po Claeyesu- Originalno Grupa I-PMN, u našem ispitivanju i tabelama “LEUKOREJA”

## Mikroskopski pregled preparata po Gramu (X200) – nova podela (NP)

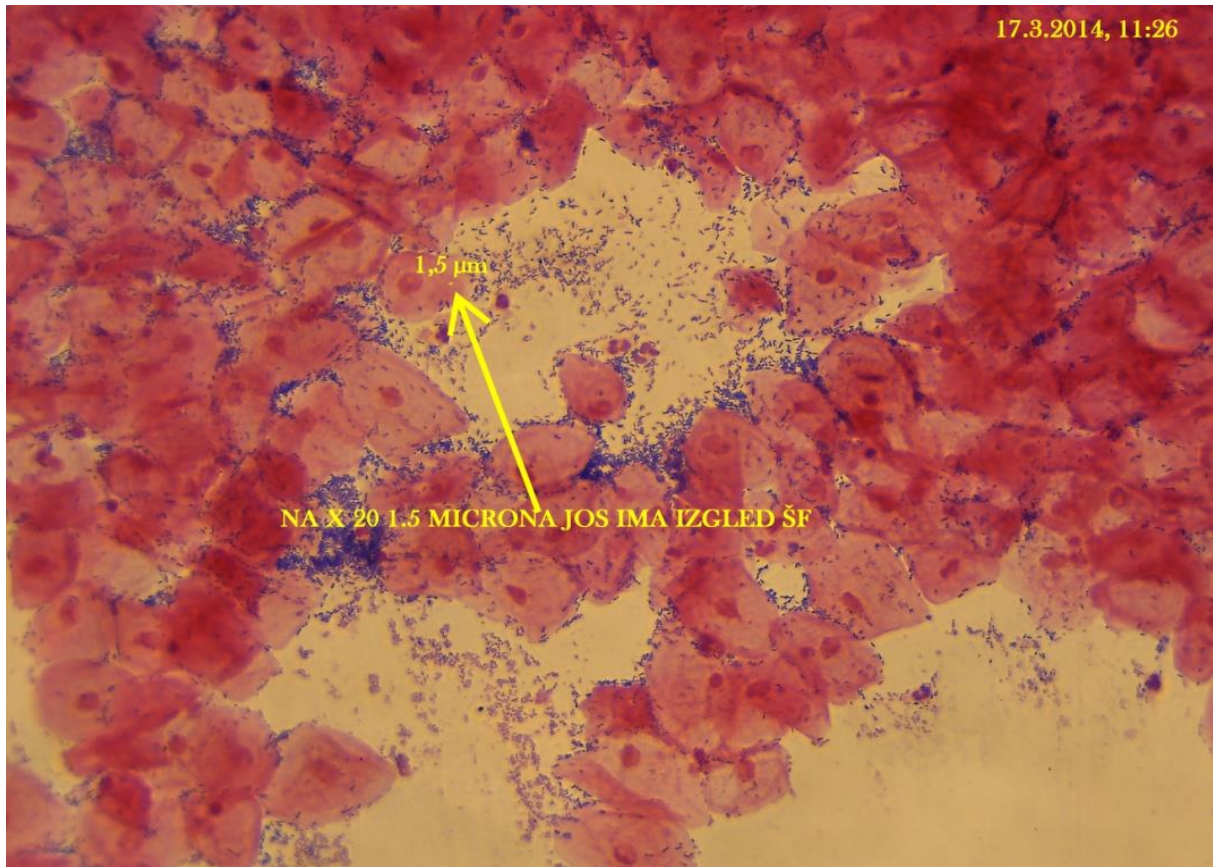
Svakako najznačajnija razlika naše metodologije u odnosu na postojeće je činjenica da se preparat bojen po Gramu posmatra na uvećanju od x200 za razliku od pomenutih metodologija koje koriste uvećanje x1000. Površinu naše mikroskopske pločice na koju razmazujemo vaginalni bris je 1935 mm<sup>2</sup> (25,4x76,2 mm). Ako pretpostavimo da je prosečno najmanja obojena površine na takvoj pločici oko 1/3 njene ukupne površine, onda je to oko 600 mm<sup>2</sup>. Druge merne podatke koje smo izračunali, a za koje smo smatrali da bi mogli biti korisni za naše ispitivanje prikazali smo u Tabeli 1.2.

Pošto su svi preparati nekoliko puta (3-5 puta) gledani pod imerzijom, radi dobijanja adekvatne mikroskopske slike i na uvećanju x200 stavljali smo imerziju i onda mikroskopirali. Imerzija nije neophodna ukoliko se preparat po Gramu gleda prvi put, ali mi je stavljamo i u takvim slučajevima jer tokom pregleda uvek određen broj VP gledamo i na uvećanju x1000. Na dva kraja i sredini preparata gledali smo 50-70 VP, dakle ukupno oko 150-200 VP ( $200/700 = 0,28\%$ ), što je oko 286x veći broj VP nego kada gledamo 20 VP na uvećanju x1000 ( $20/17000 = 0,001\%$ ). Dakle, površina obojenog dela preparata koju gledamo ovom metodologijom je za oko 200 do 300 x veća od površine na uvećanju x1000. (Slika 2.13)

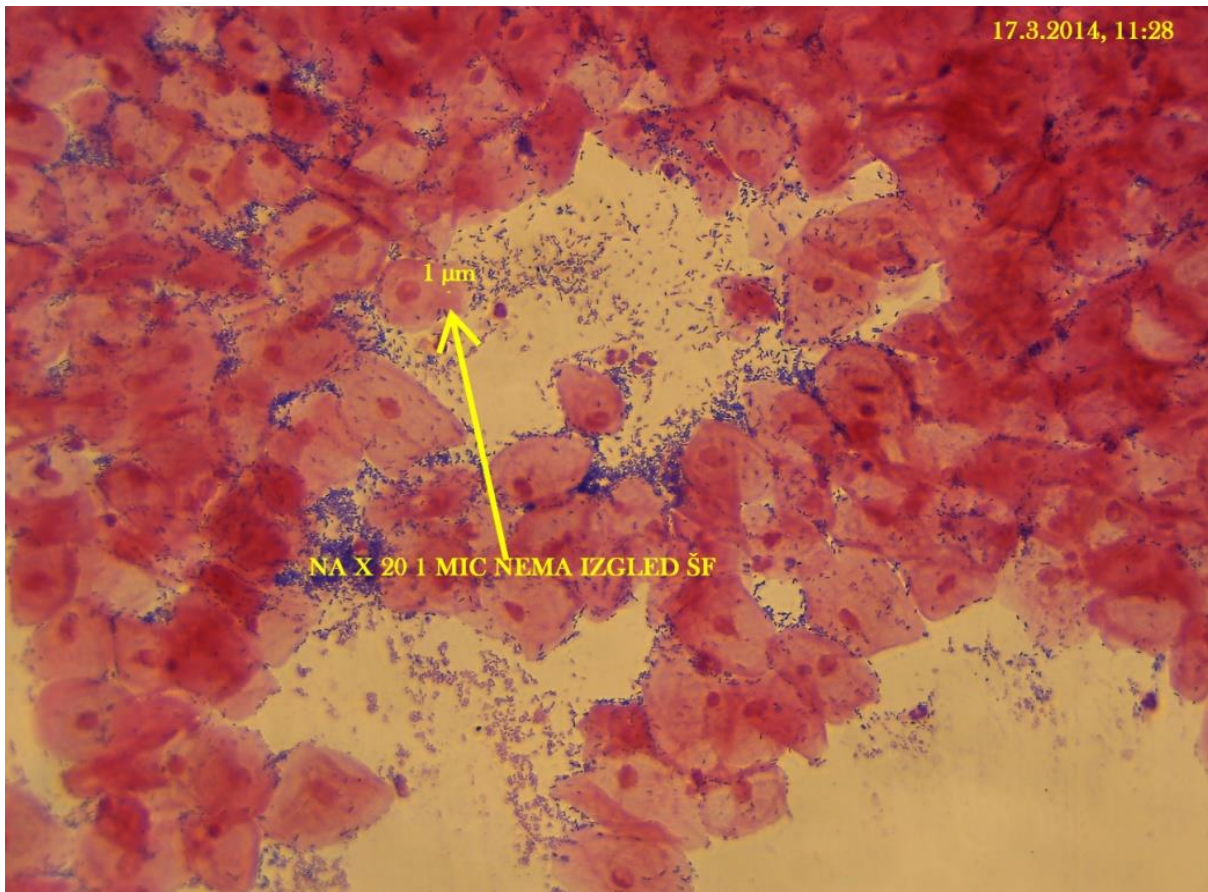


**Slika 2.13: Površina jednog vidnog polja uvećanja X200 odgovara površini 25 vidnih polja uvećanja X1000**

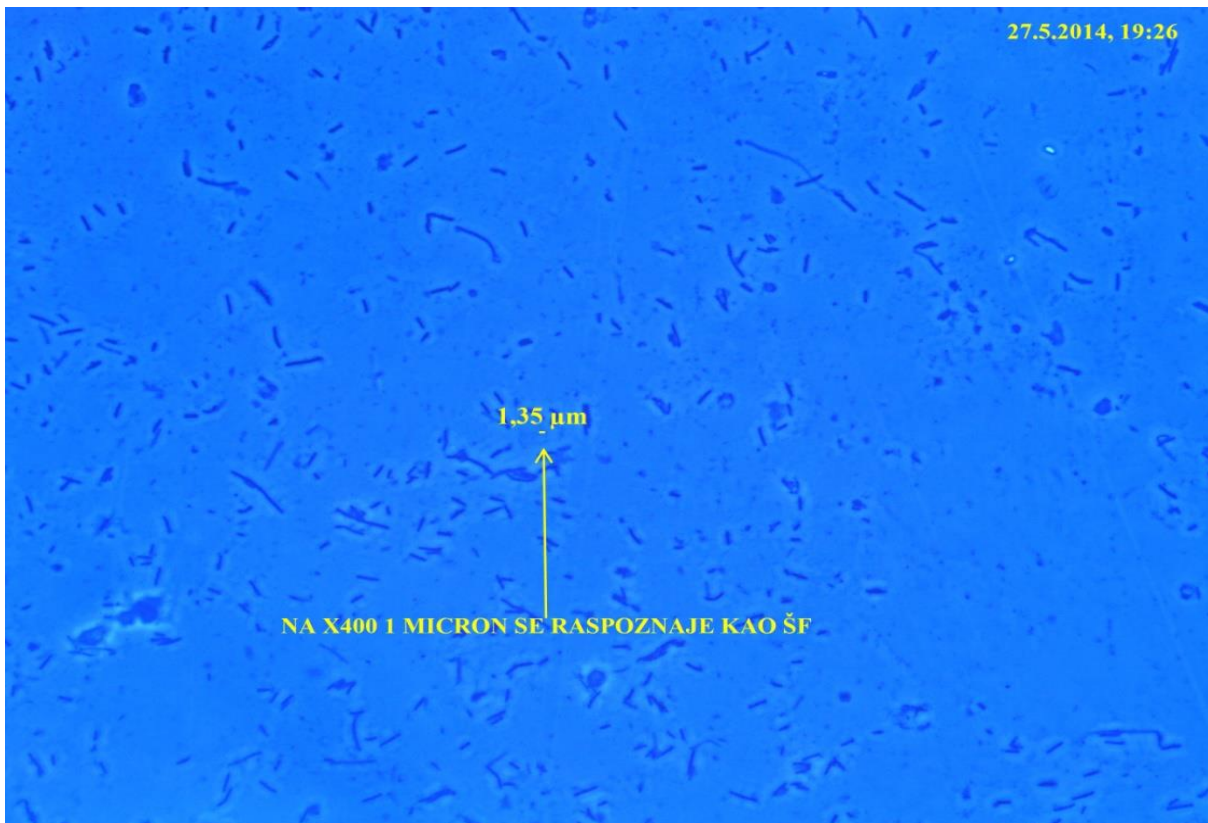
Daljim ispitivanjima i morfometrijskim analizama na 50 preparata bojenih po Gramu došli smo do zaključka da je najmanja dužina koja se na mikroskopskom uvećanju x200 još može raspoznati kao štapićasta forma (ŠF) iznosi 1,5  $\mu\text{m}$  (Slika 2.14 i 2.15). Na različitim uvećanjima granica da li se nešto vidi ili ne vidi kao štapić je različita i ona je na x200 oko 1,5  $\mu\text{m}$ , na x400 je oko 1  $\mu\text{m}$ , a na uvećanju x1000 oko 0,5  $\mu\text{m}$  (Slike 2.16 i 2.18).



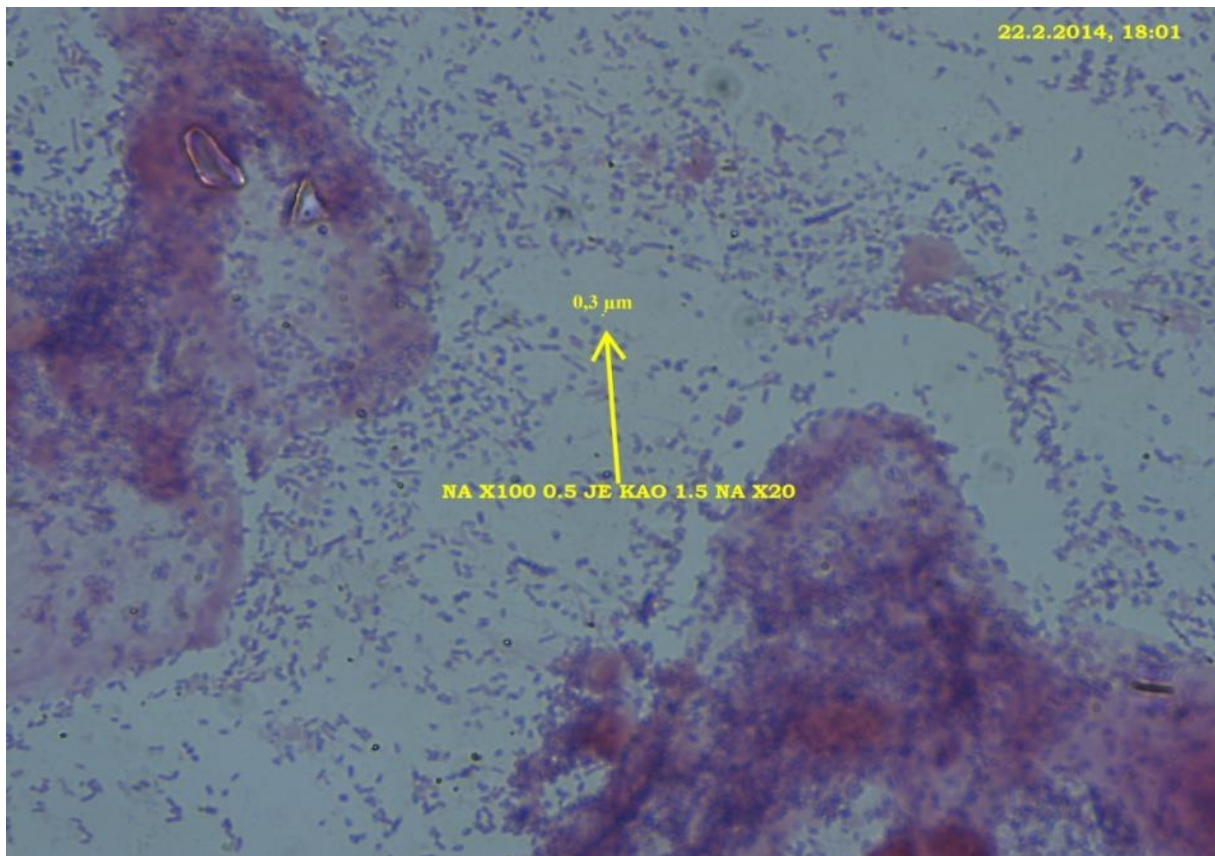
**Slika 2.14:** Na uvećanju X200 forme dužine do 1,5 mikrona se raspoznaju kao štapićaste (vidi kursor)



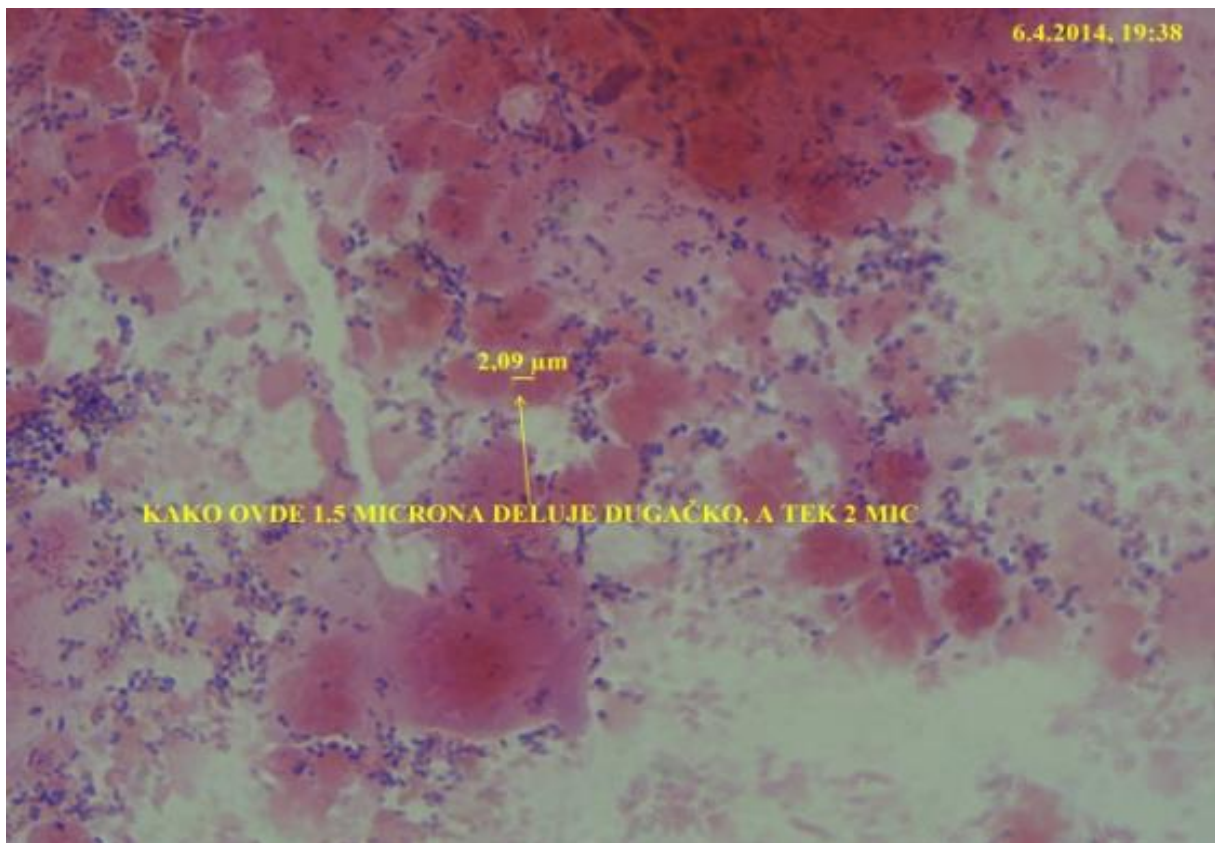
Slika 2.15: Na uvećanju X200 forme manje od 1,5 mikrona se ne raspoznaju kao štapićaste već kao neštapićaste forme (NŠF) (vidi kursor)



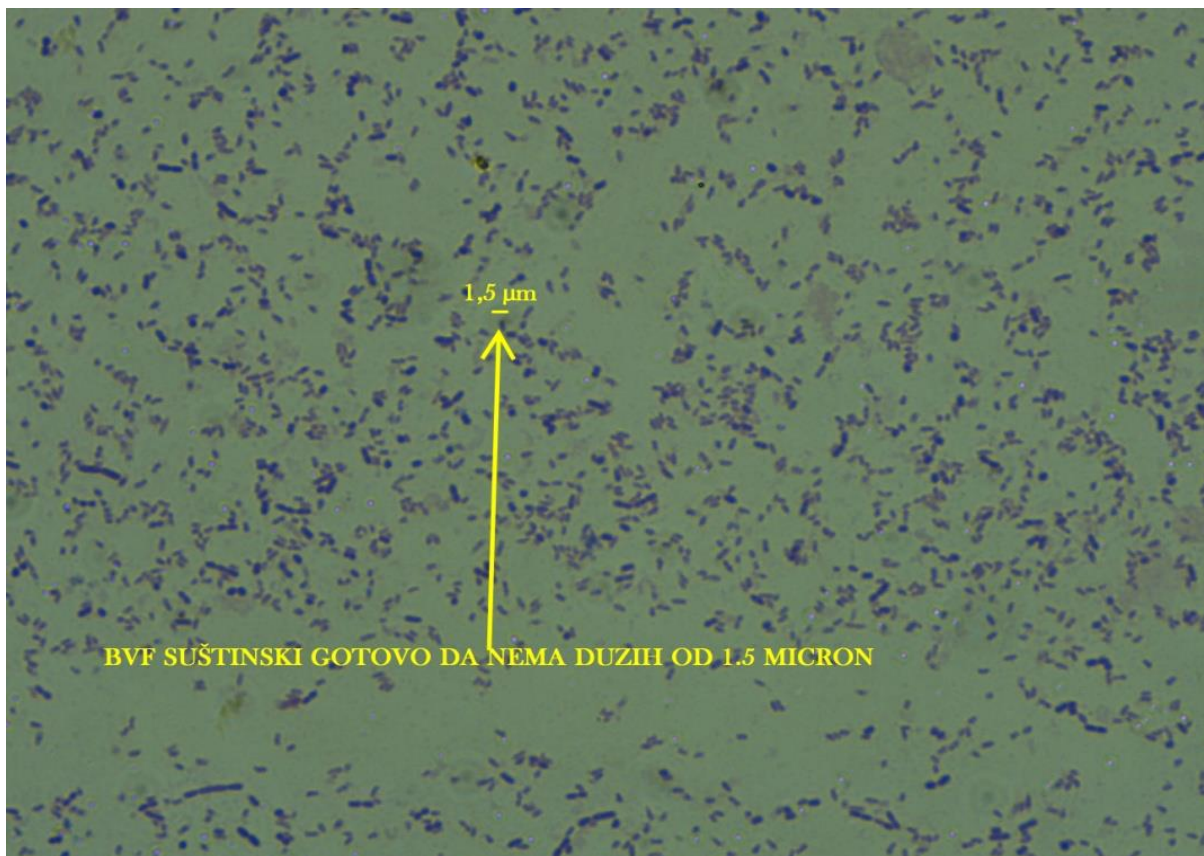
Slika 2.16: Na uvećanju X400 i forme dužine do 1 mikrona se vide kao štapićaste tako da je na ovom uvećanju generalno teža diferencijacija štapićastih od neštapićastih formi (vidi kursor)



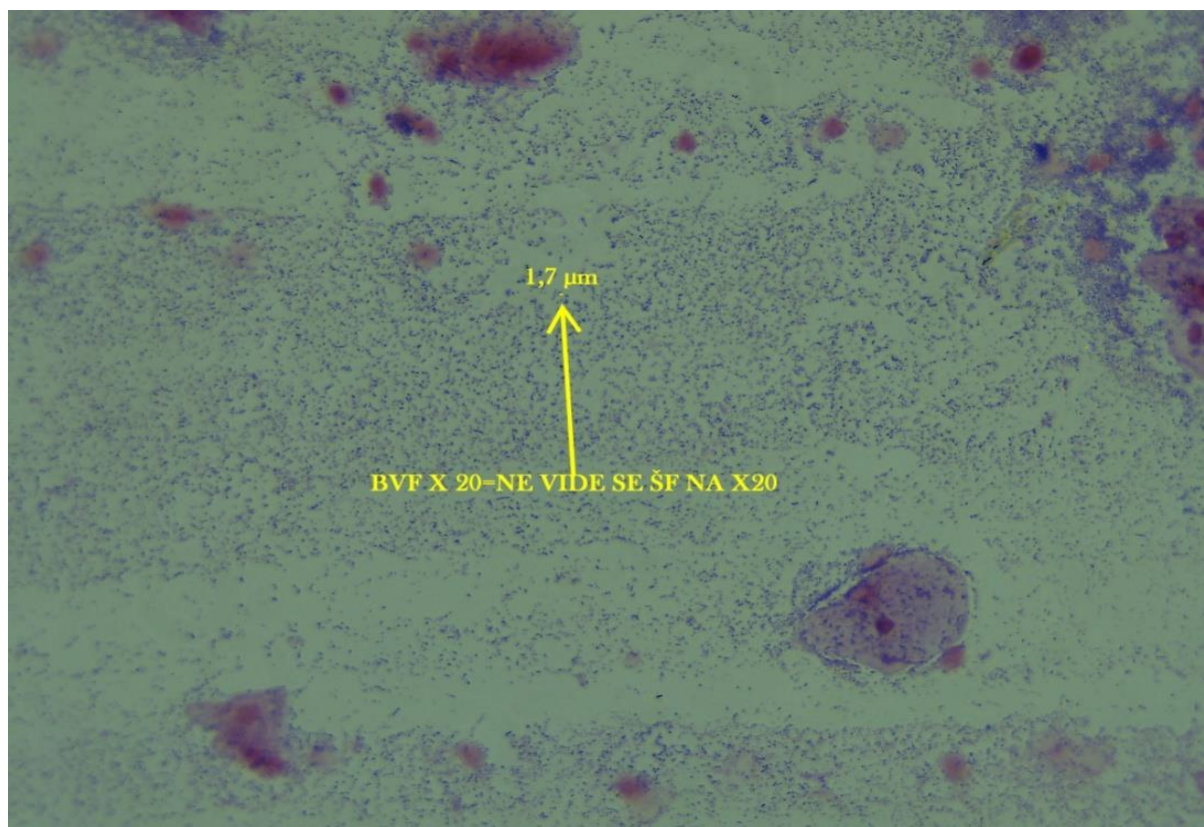
Slika 2.17: Na uvećanju X1000 i forme dužine 0,5 mikrona se raspoznaju kao štapići (vidi kursor)



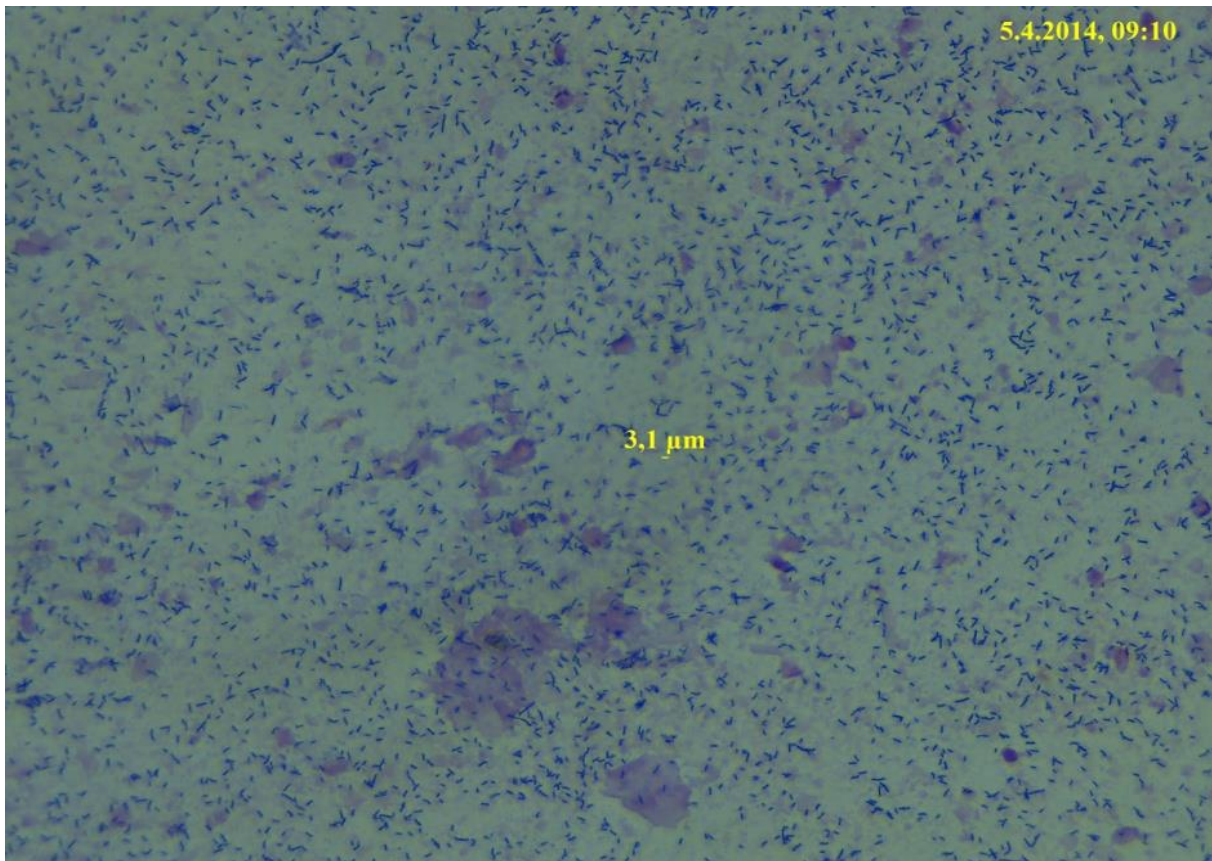
Slika 2.18: Na uvećanju X1000 i forme dužine 0,5 mikrona se raspoznaju kao vrlo kratki štapići , a dužina oko 2 mikrona kao duže štanićaste forme (vidi kursor)



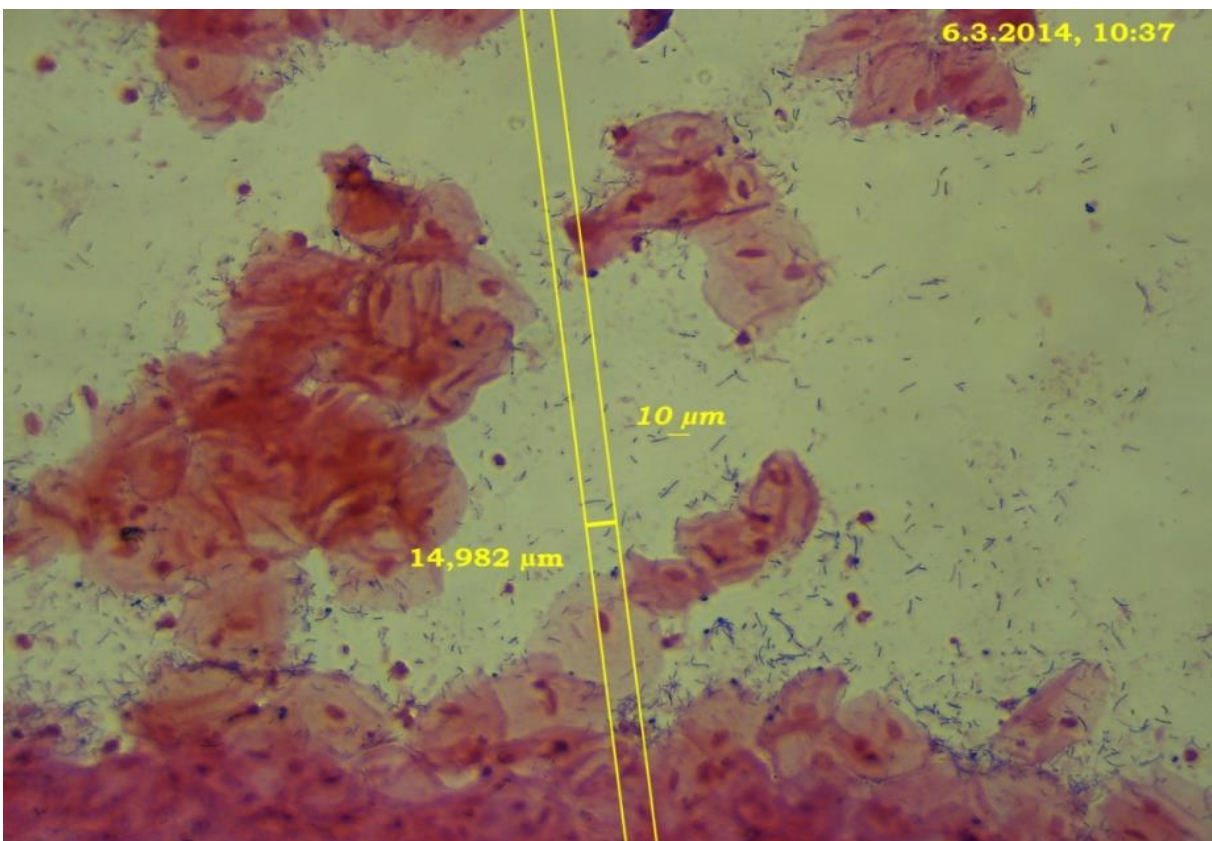
Slika 2.19: Flora udružena sa bakterijskom vaginozom (BVAB) većina formi je manja od 1,5 mikrona (Gram preparat, X1000)



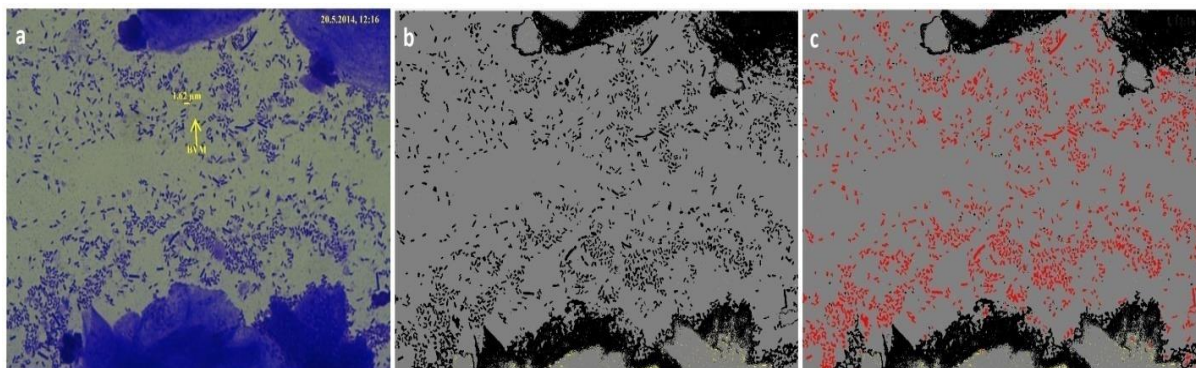
Slika 2.20: Preparat po Gramu uvećanje X200: ne vide se štapićaste forme ili su retke, većina manja od 1,5 mikrona, prdominacija NSF - nalaz karakterističan za BV-FULL



Slika 2.21: Uvećanje X200 vidi se dosta Grampozitivnih štapićastih formi, nalaz odgovara Normal FULL



Slika 2.22: Uvećanje X200 vidi se nešto manje Grampozitivnih štapićastih formi, nalaz odgovara Normal MID



**Slika 2.25: Kompjuterska analiza slike i merenje dužine bakterijskih morfotipova kod pacijentkinja sa bakterijskom vaginozom (GSA Image Analyser (GSA Gesellschaft für Softwareentwicklung und Analytik mbH, Germany))**



**Slika 2.24: Kompjuterska analiza slike i merenje dužine bakterijskih morfotipova kod pacijentkinja sa normalnim nalazom (GSA Image Analyser (GSA Gesellschaft für Softwareentwicklung und Analytik mbH, Germany))**

```
Classify object surfaces in lane size. Printout objects per class:
Object surface larger than 0.0000 Qrd.μm and smaller than 735.2251 Qrd.μm :649
Object surface larger than 735.2251 Qrd.μm and smaller than 1470.4501 Qrd.μm :458
Object surface larger than 1470.4501 Qrd.μm and smaller than 2205.6752 Qrd.μm :87
Object surface larger than 2205.6752 Qrd.μm and smaller than 2940.9003 Qrd.μm :31
Object surface larger than 2940.9003 Qrd.μm and smaller than 3676.1254 Qrd.μm :17
Object surface larger than 3676.1254 Qrd.μm and smaller than 4411.3504 Qrd.μm :8
Object surface larger than 4411.3504 Qrd.μm and smaller than 5146.5755 Qrd.μm :5
Object surface larger than 5146.5755 Qrd.μm and smaller than 5881.8006 Qrd.μm :2
Object surface larger than 5881.8006 Qrd.μm and smaller than 6617.0256 Qrd.μm :3
Object surface larger than 6617.0256 Qrd.μm and smaller than 7352.2507 Qrd.μm :0
Object surface larger than 7352.2507 Qrd.μm and smaller than 8087.4758 Qrd.μm :1
Object surface larger than 8087.4758 Qrd.μm and smaller than 8822.7009 Qrd.μm :2
```

---

```
Cut through area of objects: 941.0881 Qrd. μm
Area median of objects: 713.1683 Qrd. μm
Area size of smallest object: 294.09 Qrd. μm
Area size of biggest object: 8528.6108 Qrd. μm
Total area of all objects: 1190417.6173 Qrd. μm
```

---

Maximum object size:

Vertical dimention|Horizontal dimention|Diagonal dimention

Object 2	0.7381 μm	0.7815 μm	1.0750 μm
Object 13	0.8250 μm	0.4342 μm	0.9322 μm
Object 93	0.4342 μm	0.8250 μm	0.9322 μm
Object 112	0.6513 μm	0.7815 μm	1.0173 μm
.....			
Object 14170	1.6933 μm	1.3460 μm	2.1631 μm
Object 14359	0.6513 μm	1.0855 μm	1.2659 μm
Object 14465	0.4776 μm	0.6947 μm	0.8430 μm
Object 14502	0.6947 μm	0.6079 μm	0.9231 μm
Object 14503	0.5210 μm	4.1248 μm	4.1576 μm
Object 14514	0.9986 μm	3.1696 μm	3.3232 μm

---

Number of objects: 1789

---

**Slika 2.23: Deo izveštaja dobijen nakon analize slike primenom GSA Image Analysera**



Morfometrijskim i uporednim ispitivanjima na uvećanjima x200 i x1000 merili smo dužinu bakterijskih morfotipova kod pacijentkinja s normalnim nalazom i pacijentkinja sa BV, i utvrdili da je prosečna dužina bakterijskih formi kod pacijentkinja sa normalnim nalazom oko 3  $\mu\text{m}$ , dok je kod pacijentkinja sa BV dužina manja od 1  $\mu\text{m}$  (Slike 2.19 – 2.22).

Mada je merenje na mikroskopu precizno da bi isključili faktor subjektivnosti odlučili smo se za kompjutersku analizu slike kod pacijentkinja sa normalnim nalazom i onih sa BV. U ispitivanju smo koristili softver GSA Image Analyser (GSA Gesellschaft für Softwareentwicklung und Analytik mbH, Germany). Analizirane su fotografije 10 pacijentkinja kod kojih je na osnovu Amselovih kliničkih kriterijuma i Nugentovih kriterijuma postavljena dijagnoza BV ili normalnog nalaza. Naši rezultati su pokazali da je dužina bakterijskih formi kod pacijentkinja sa normalnim nalazom uvek preko 2  $\mu\text{m}$ , dok kod pacijentkinja sa BV nikada nije bila veća od 1,3  $\mu\text{m}$  – još jedna potvrda da dužina može biti jedini parametar u razlikovanu normalne (laktobacilarne) od patološke vaginalne flore (BVAB). Ovi rezultati su takođe potvrdili važnost činjenice da se na mikroskopskom uvećanju x200 forme duže od 1,5  $\mu\text{m}$  prepoznaju kao štapići, dok gledanjem na uvećanju x400 forme dužine 1  $\mu\text{m}$  se vide kao štapići što onda otežava razlikovanje laktobacila od BVAB (Slike 2.23 – 2.25).

**Tabela 2.2: Površina VP mikroskopa na kome smo mi radili na različitim uvećanjima i površine od značaja za naše ispitivanje**

Leica DM 2000 LED	P kruga= $r^2\pi$ ( $\text{mm}^2$ )	Broj EC/ VP	Broj PMN/VP	Broj VP/ 600 $\text{mm}^2$	Prečnik R (mm)	Površine
X1000	0,035	3-17/4	700/4	$\approx 17\ 500$	0,21	Pločica= $1935\ \text{mm}^2$
X 400	0,22	20-110/24	4/400	$\approx 2\ 800$	0,53	EĆ $\approx 0,002\ \text{mm}^2$
X 200	0,88	70-425/100		$\approx 700$	1,06	PMN $\approx 0,00005\ \text{mm}^2$

Kako smo na osnovu merenja i kompjuterske analize mikroskopskih fotografija utvrdili da dužina bakterijskih formi može biti jedini, i dovoljan, parametar u razlikovanju zdrave i patološke flore sve pacijentkinje su podeljene u dve kategorije:

**Štapićaste forme (ŠF)**- Forme koje se na uvećanju x200 prikazuju kao štapićaste i lako zakrivljene forme, različite dužine (podrazumeva se da je dužina veća od 1,5  $\mu\text{m}$ ) debljine, i intenziteta bojenja, tumačili smo kao zdravu vaginalnu floru, odnosno laktobacile. Dakle, iako verujemo da u najvećem broju slučajeva ove forme predstavljaju različite sojeve laktobacila, namerno smo izbegli naziv laktobacilarna flora, jer na osnovu mikroskopskog nalaza ne možemo, tvrditi da sve ove štapićaste forme predstavljaju laktobacile, zbog čega smo mislili da je korektnije koristiti naziv ŠF.

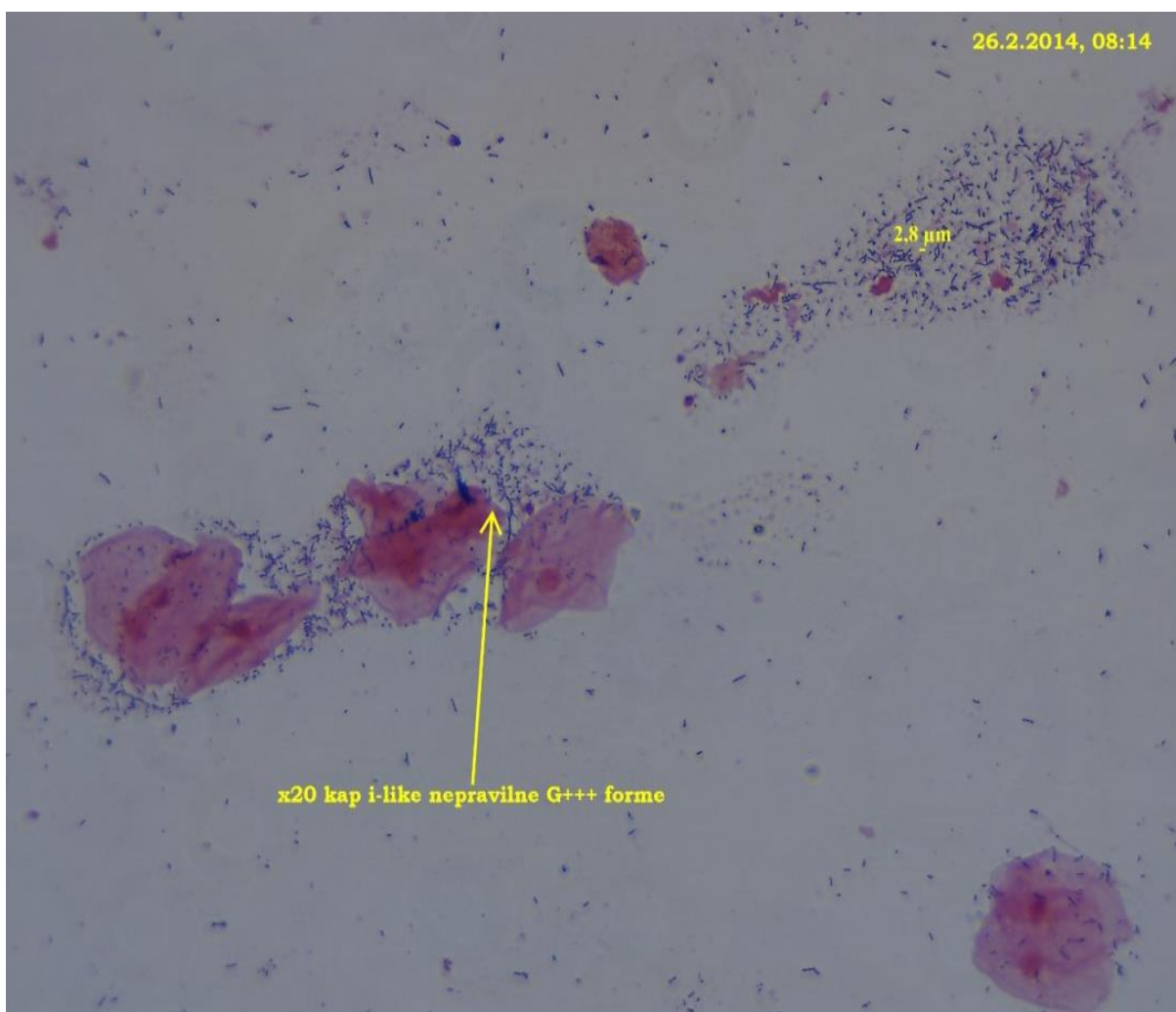
**Neštapićaste forme – (NŠF)** Forme koje se na uvećanju na x200 ne prikazuju kao štapići, nego su kokobacilarnog ili kokoidnog oblika, a čija je dužina kao što smo rekli manja od 1,5  $\mu\text{m}$ , nazvali smo neštapićaste forme (NŠF), i pod ovim uglavnom podrazumevamo bakterijsku floru udruženu sa BV (BVAB) ali ne i koke (vidi kasnije, koke).

Ova podela na ŠF i NŠF može da se primeni samo na mikroskopskom uvećanju x200, ali ne i na x400 i x1000, jer se tamo i kraće bakterijske forme prikazuju kao štapići, tako da se mikroskopski kriterijumi na ovim uvećanjima drugačiji.

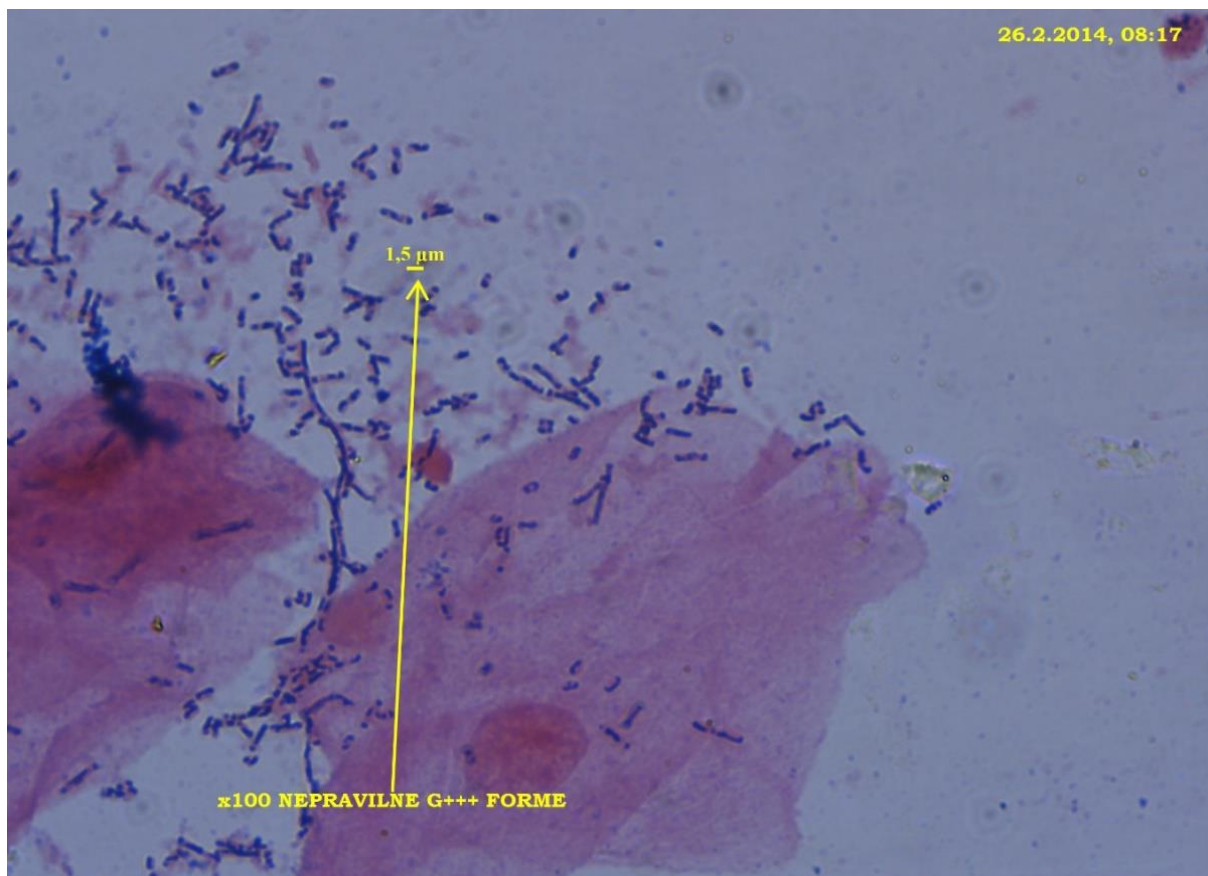
Dakle odnos ove dve forme na neki način predstavlja podlogu ili pozadinu svakog mikroskopskog preparata i na ovaj način razlikujemo dva entiteta, normalan nalaz i BV, a sve ostale bakterijske forme ili ćelijski elementi nalaze se kao „nadgradnja“ ovoj podlozi. Tako spore i/ili hife gljivica možemo naći na svakoj od naših 6 „pozadina“, a zajedno sa gljivicama se može naći veći ili manji broj PMN i time imamo značajan problem u pokušaju da pacijentkinje razvrstamo u homogene grupe. Pored ove dve osnovne forme tokom mikroskopskog pregleda beležili smo prisustvo još tri bakterijska morfotipa koji su se nametnuli tokom ispitivanja svojom učestalošću i/ili karakterističnom mikroskopskom slikom:

**MORFOTIP BIFIDO** – Ove mikroskopske forme najbliže su mikroskopskom nalazu koje su Verhelst i sar. [216] u svom ispitivanju definisali kao grupu I-like (vidi podela po Claeyssu). Kako su autori u svom radu [216] pokazali da je u ovoj grupi nađen značajno veći broj

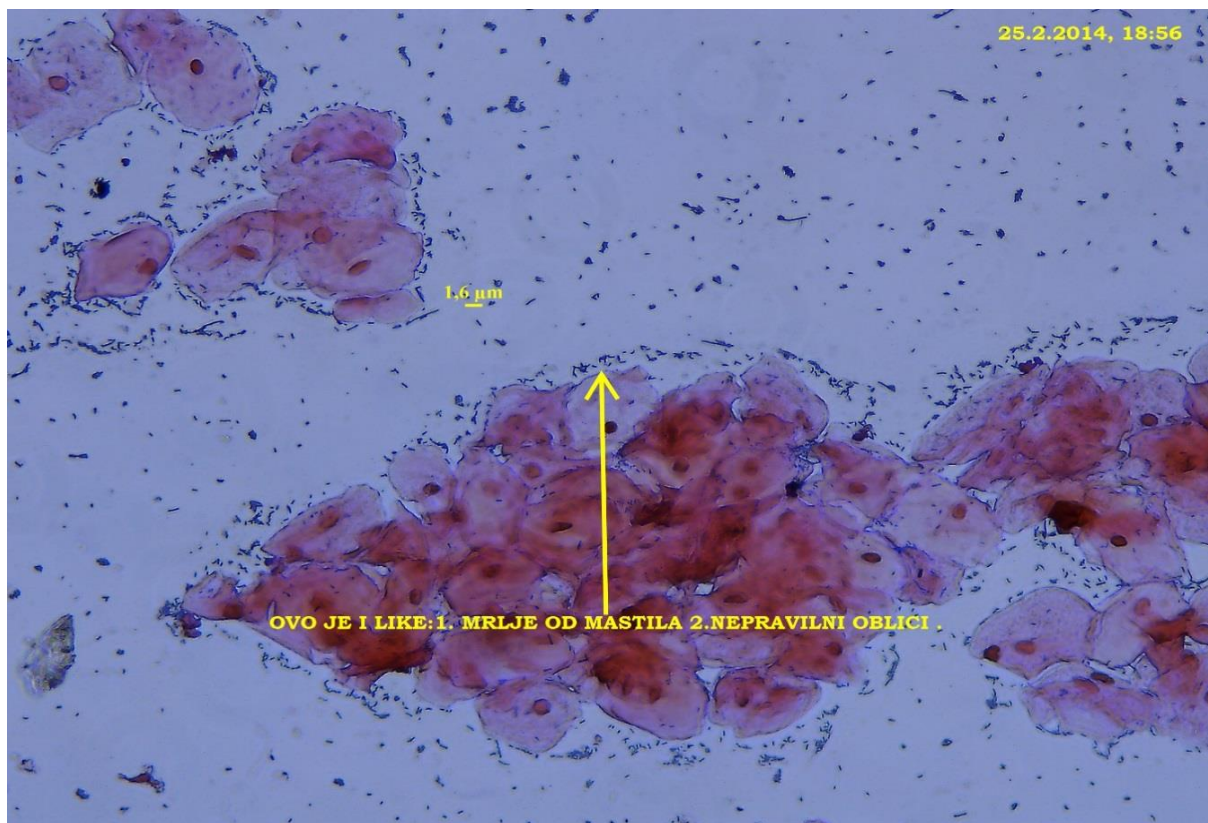
*Bifidobacteria* (preko 50% u odnosu na druge grupe, mi smo u našem ispitivanju pacijentkinja sa ovakvim ili sličnim nalazom definisali kao „BIFIDO“ grupu (Slike 2.27- 2.36)



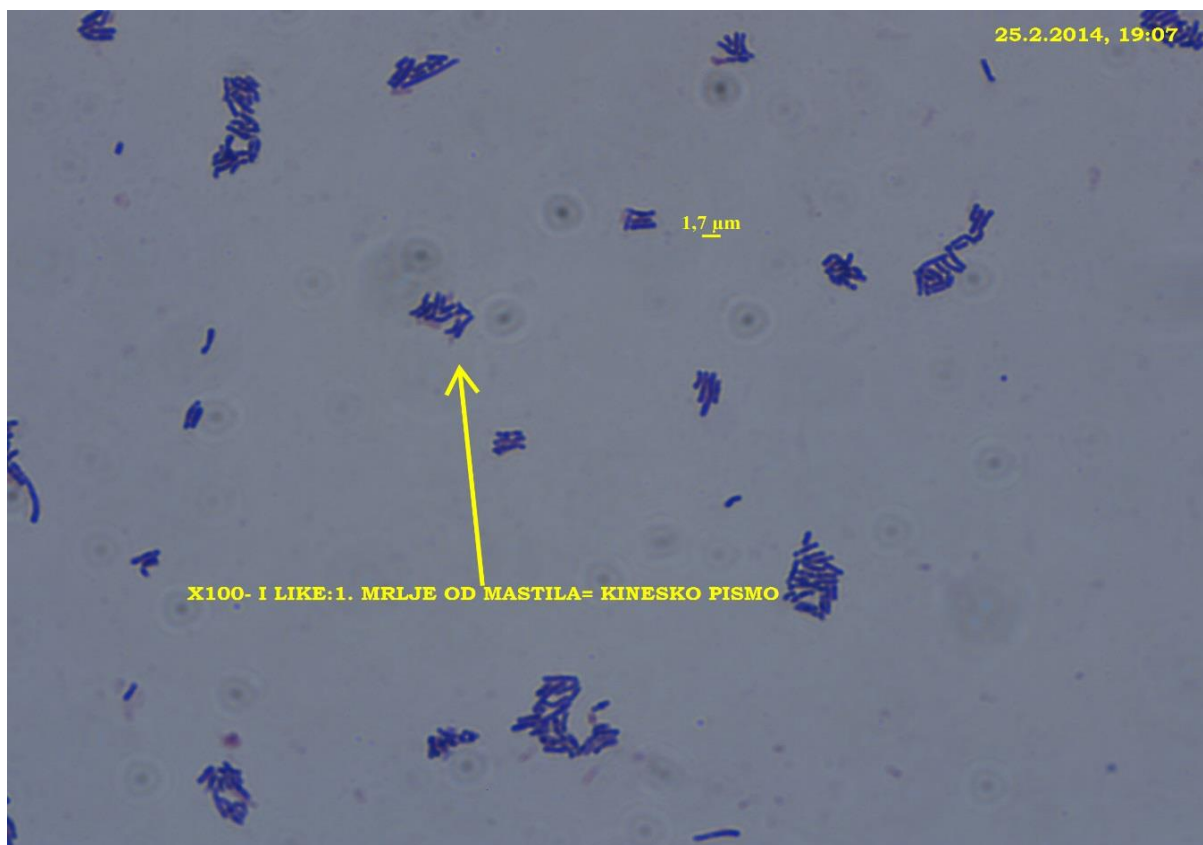
Slika 2.26: I na uvećanju x200 vide se Gram pozitivne forme različite veličine i oblika, od koka do dužih štapića, utisak grananja, zakrivljen, oblici V, T, Z, X, mrljaste forme tako da je čitava slika polimorfna



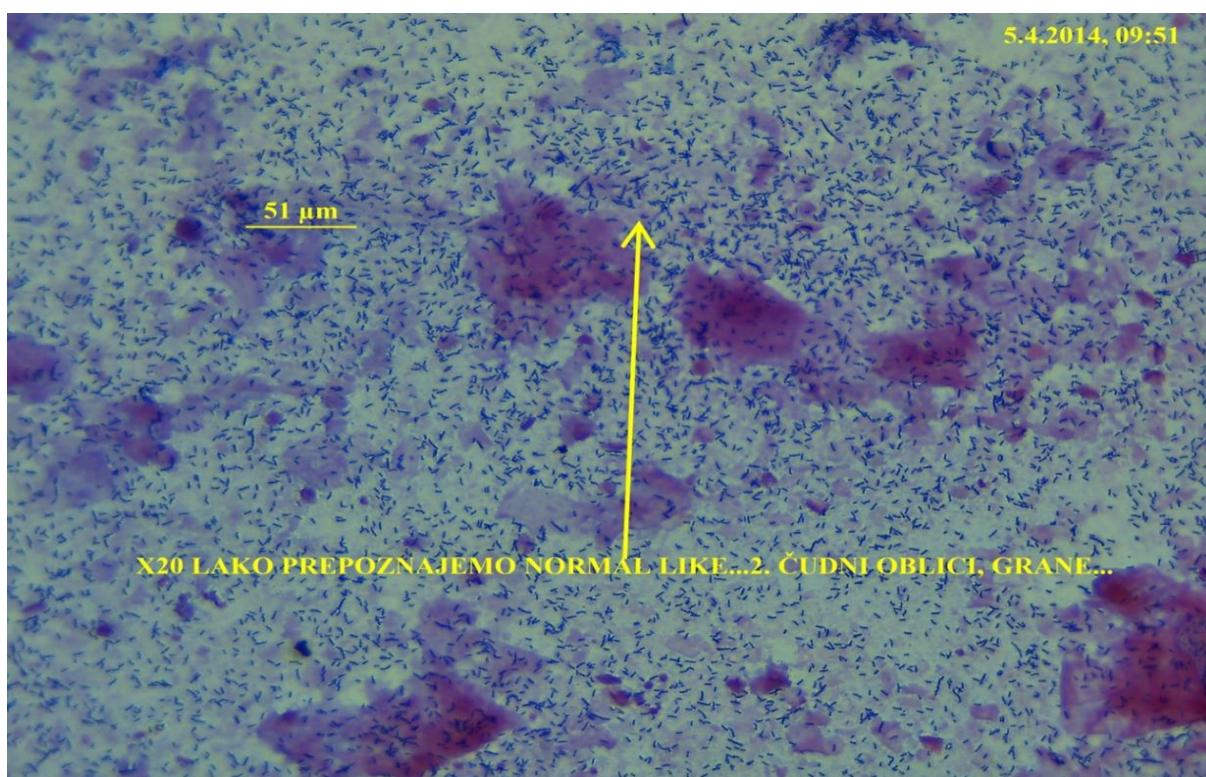
Slika 2.27: Uvećanje X1000 forme nepravilnog oblika, neravnomerno se boje, sa zatupastim (batičastim) krajevima, neke oblici formiraju lance



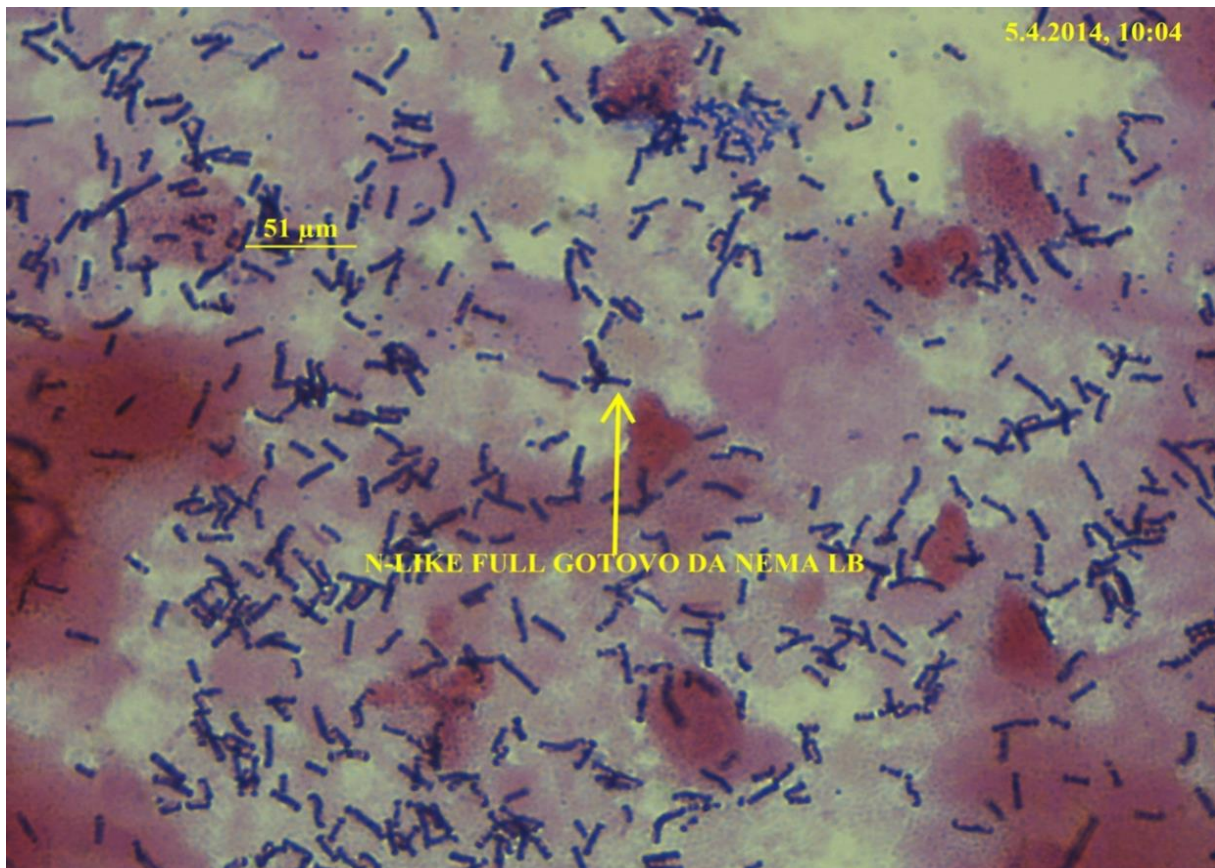
Slika 2.28: Uvećanje X 200 polimorfana nalaz sa Gram pozitivnim formama različitih veličina i oblika, polimorfana nalaz koji ukazuje na prisustvo Bifido ili Coryneobacteria



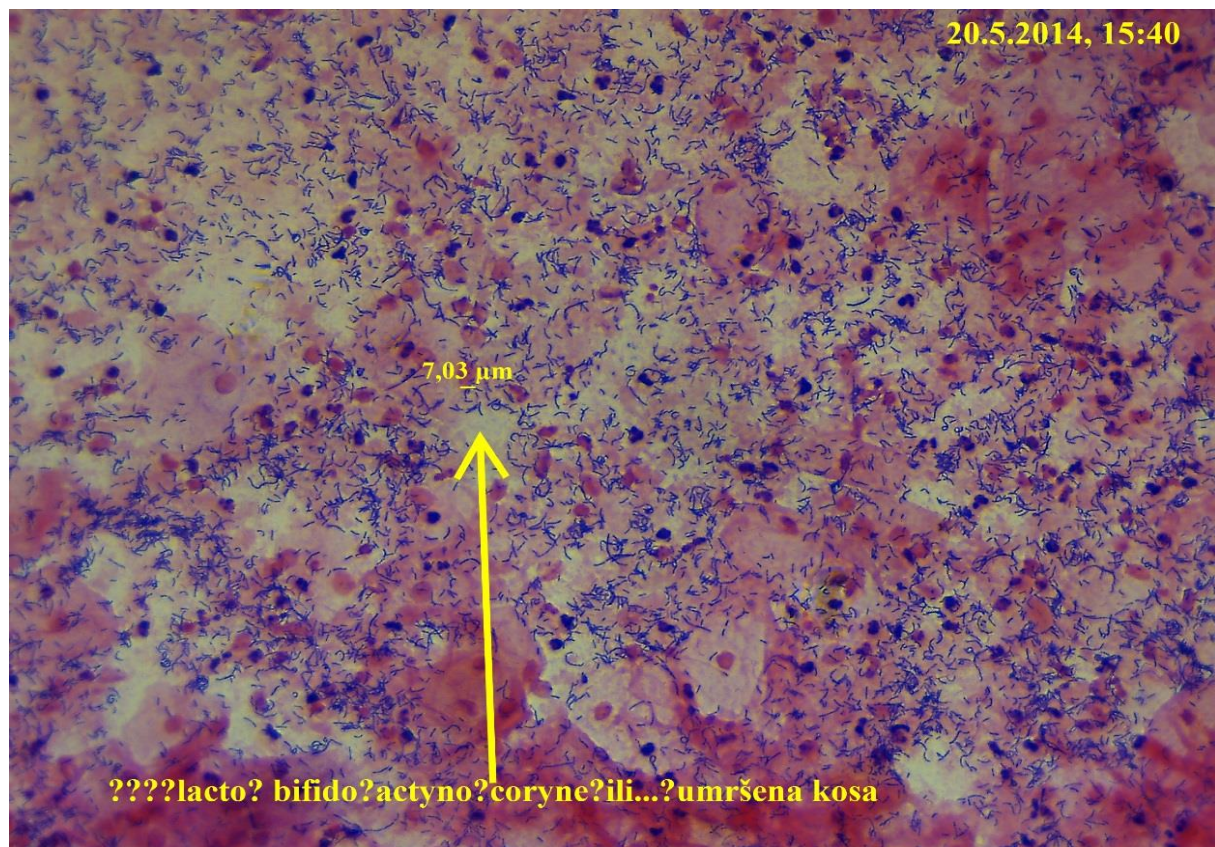
Slika 2.30: Kinesko pismo” Bifidobacteria ili Corynebacteria



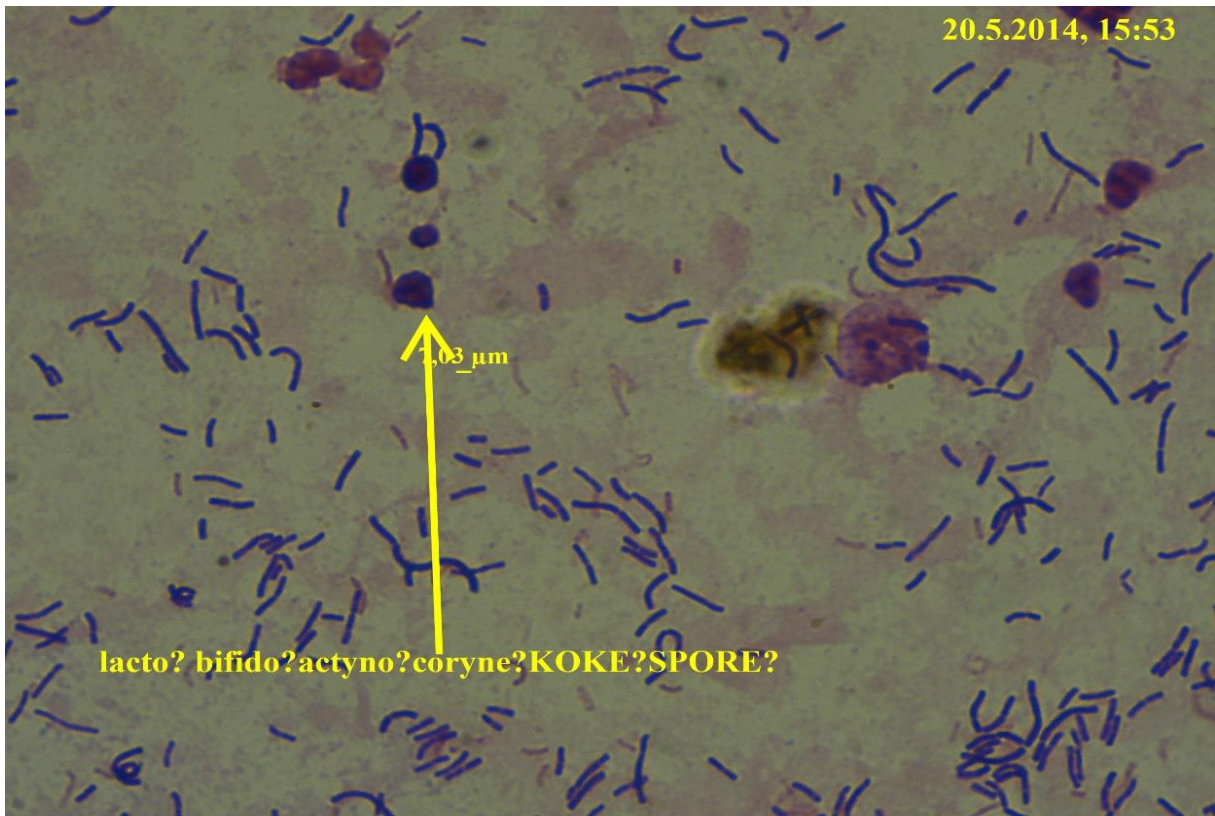
Slika 2.29: Nalaz “sličan normalnom” , dominiraju Gram pozitivne ŠF; može se uočiti da je čitava slika polimorfna (Gram X200), ali se razlika može uvideti tek na uvećanju x 1000 “



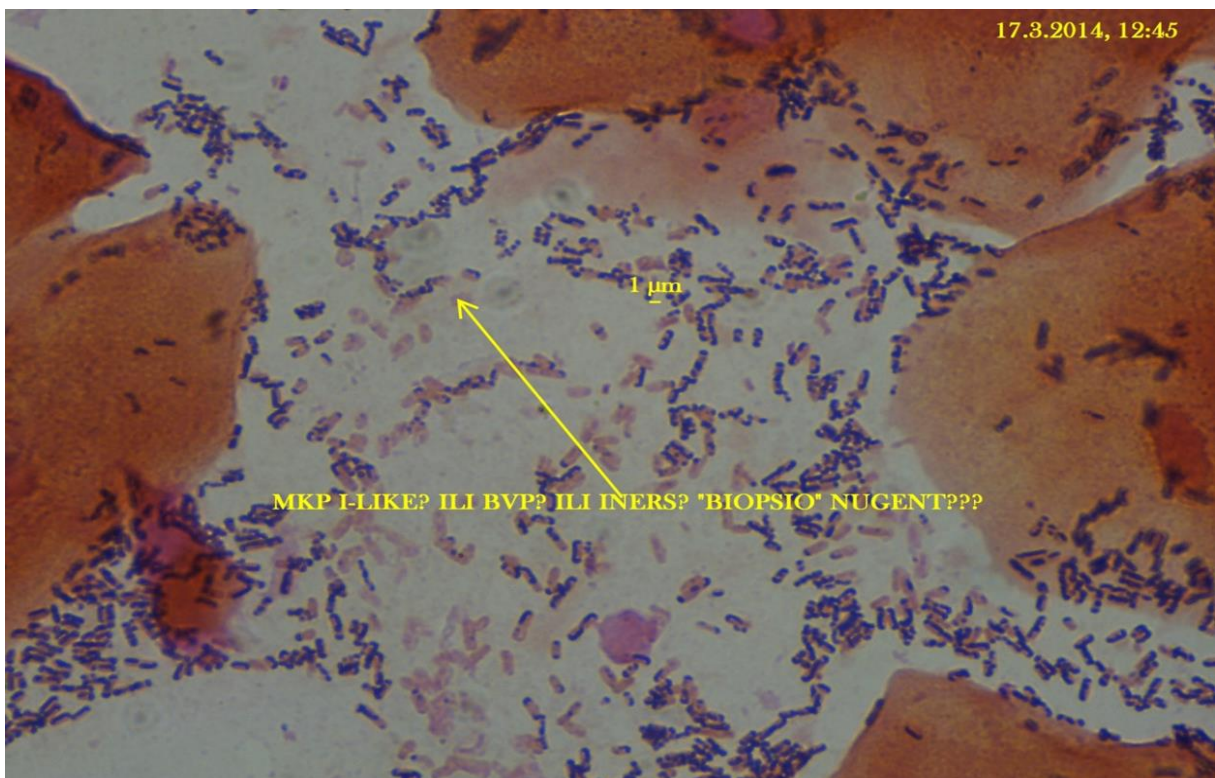
Slika 2.31: Isti nalaz na uvećanju X1000 štapičaste Gram pozitivne forme sa batičastim krajevima koje se neravnomerno boje



Slika 2.32: I na uvećanju x200 i X1000 tesko je razlikovati laktobacile od bifidobakterija, korinebakterija, aktinomiceta. Dosta PMN. (Gram x200)

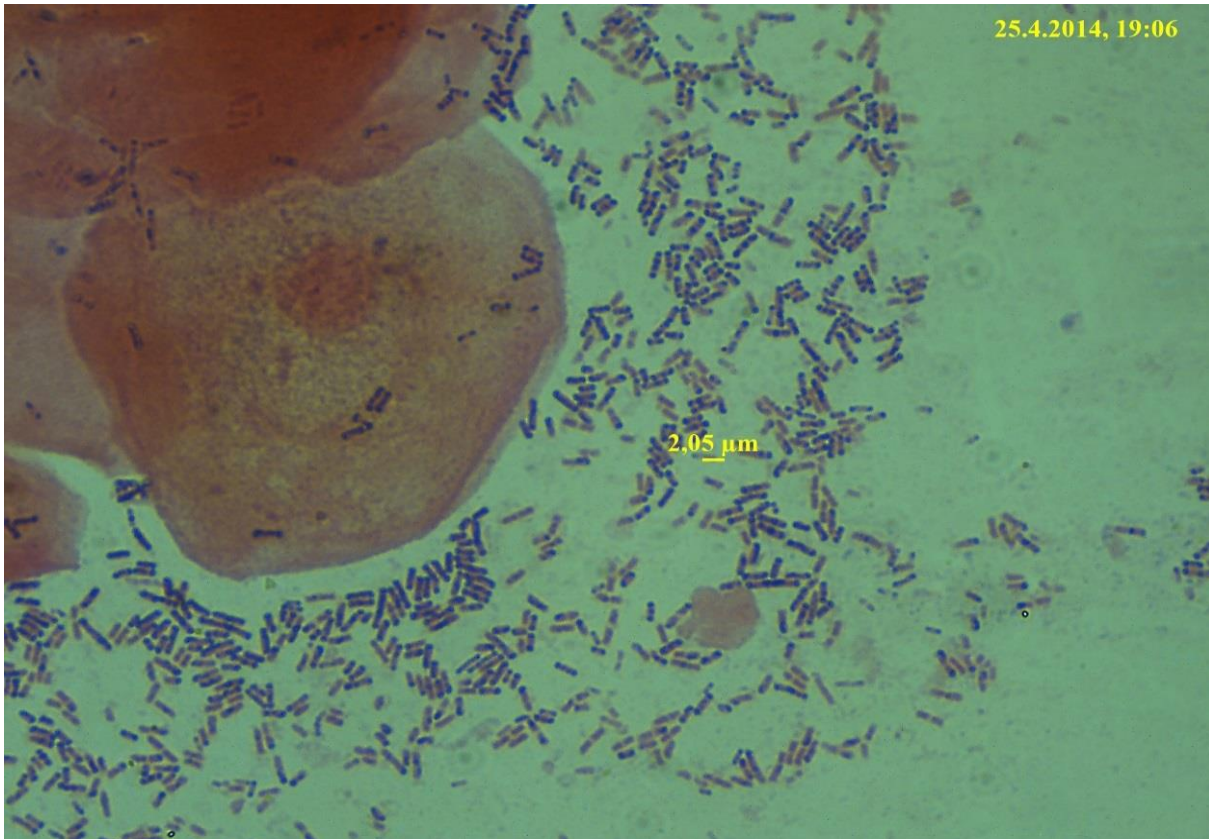


Slika 2.34: Isti nalaz na uvećanju X1000 štapičaste i zakrivljene Gram pozitivne forme ravnih krajeva koje ukazuju na laktobacilarnu floru



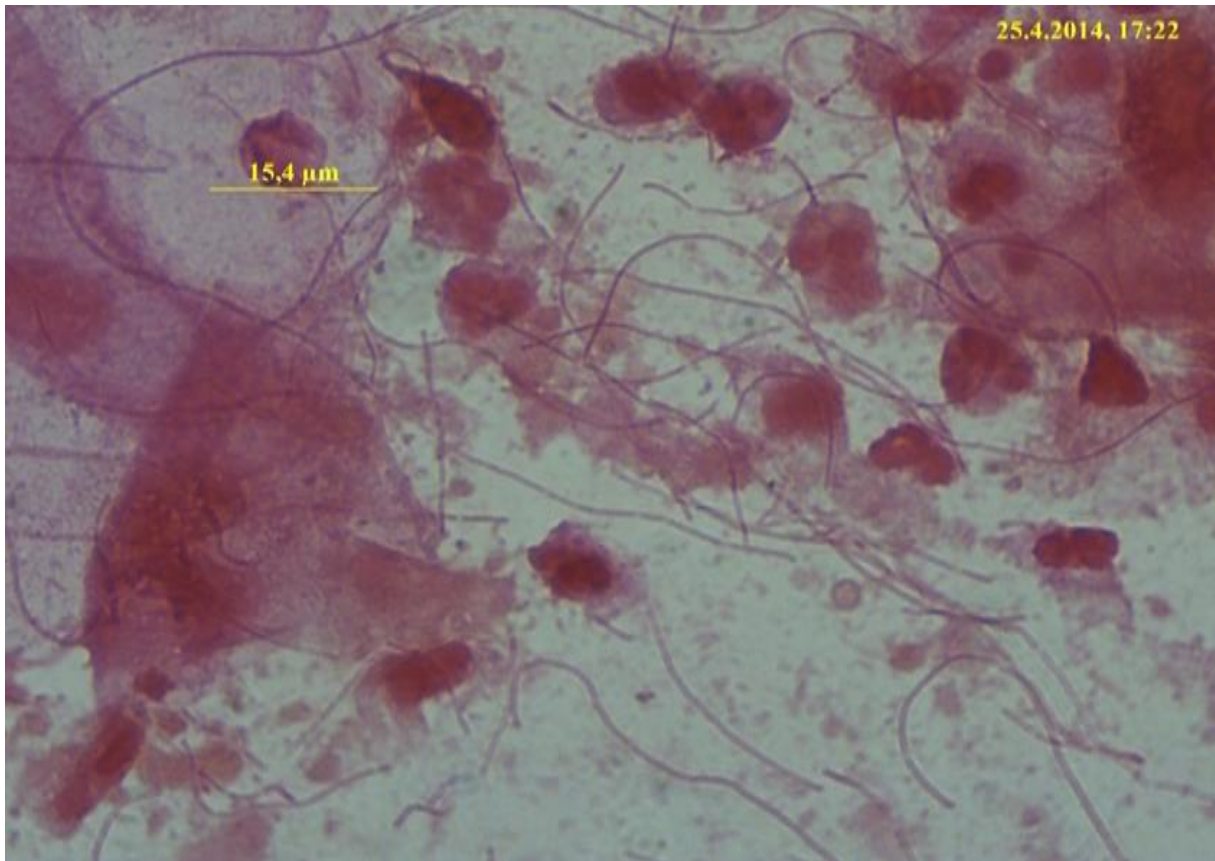
Slika 2.33: Izrazito Gram pozitivne forme, sa tendencijom grananja, nepravilnih oblika, zakrivljeni, polimorfnog izgleda (X1000)

**MORFOTIP LEPTO** Štapićaste ili manje ili više zakrivljene forme, različite debljine i različitog bojenja po Gramu (G+ ili G-) čija je dužine preko 20  $\mu\text{m}$  (Slike 2.36-2.40).

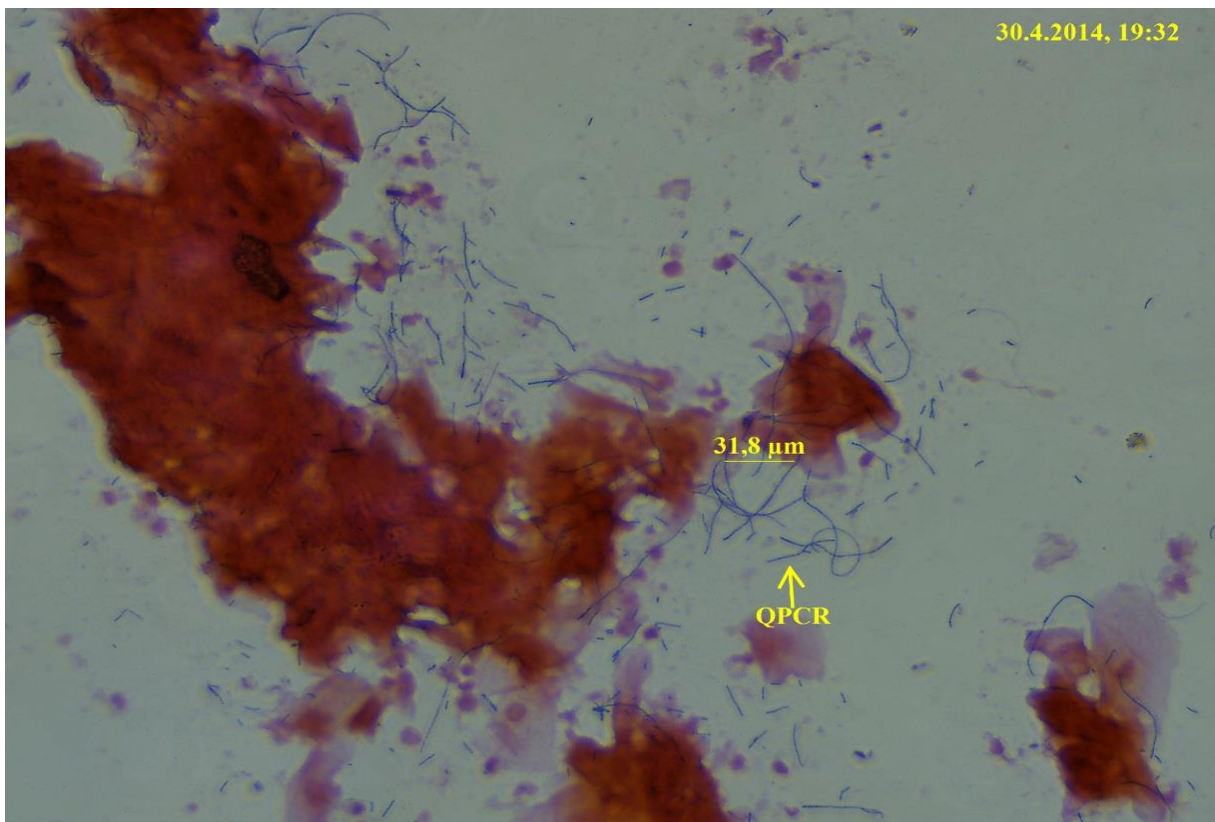


Slika 2.35: Ravne i blago zakrivljene forme koje se neravnomerno boje sa zatupastim krajevima raspoređene u parovima i palisadama (X1000)

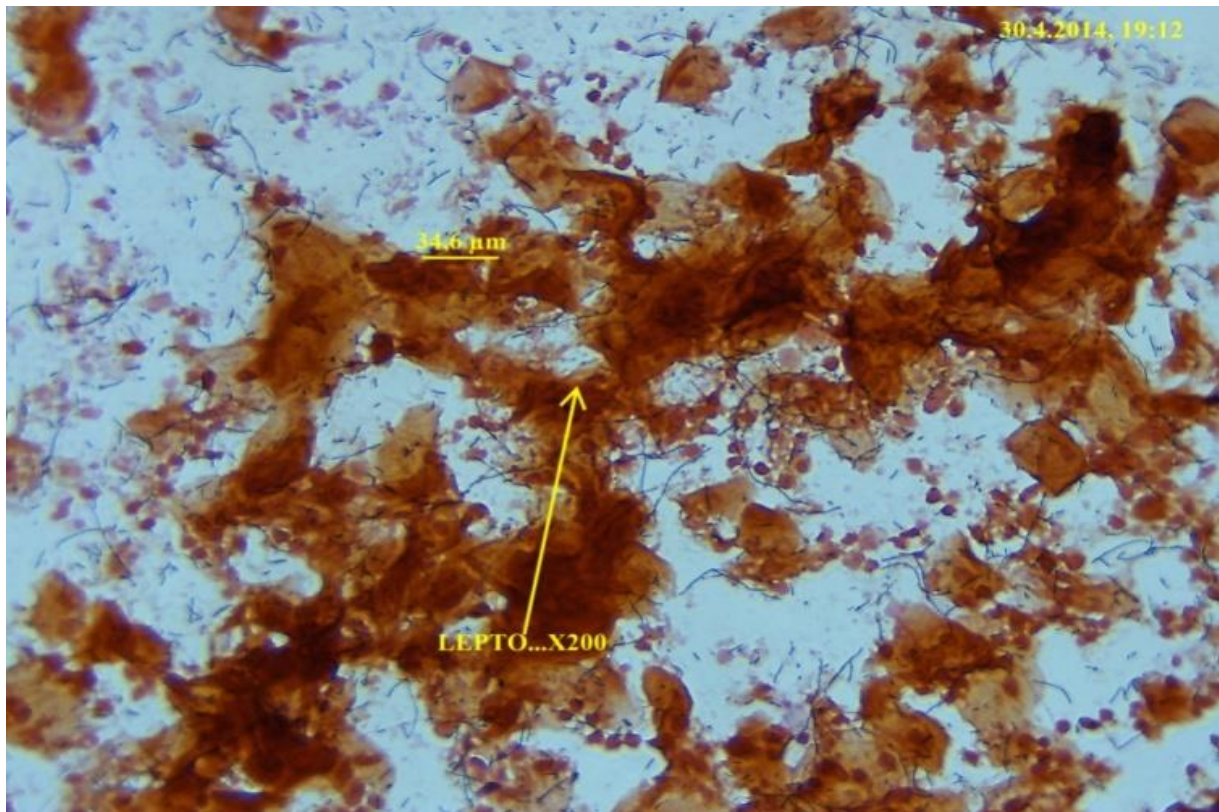




Slika 2.36: LEPTO forme (Gram X1000)

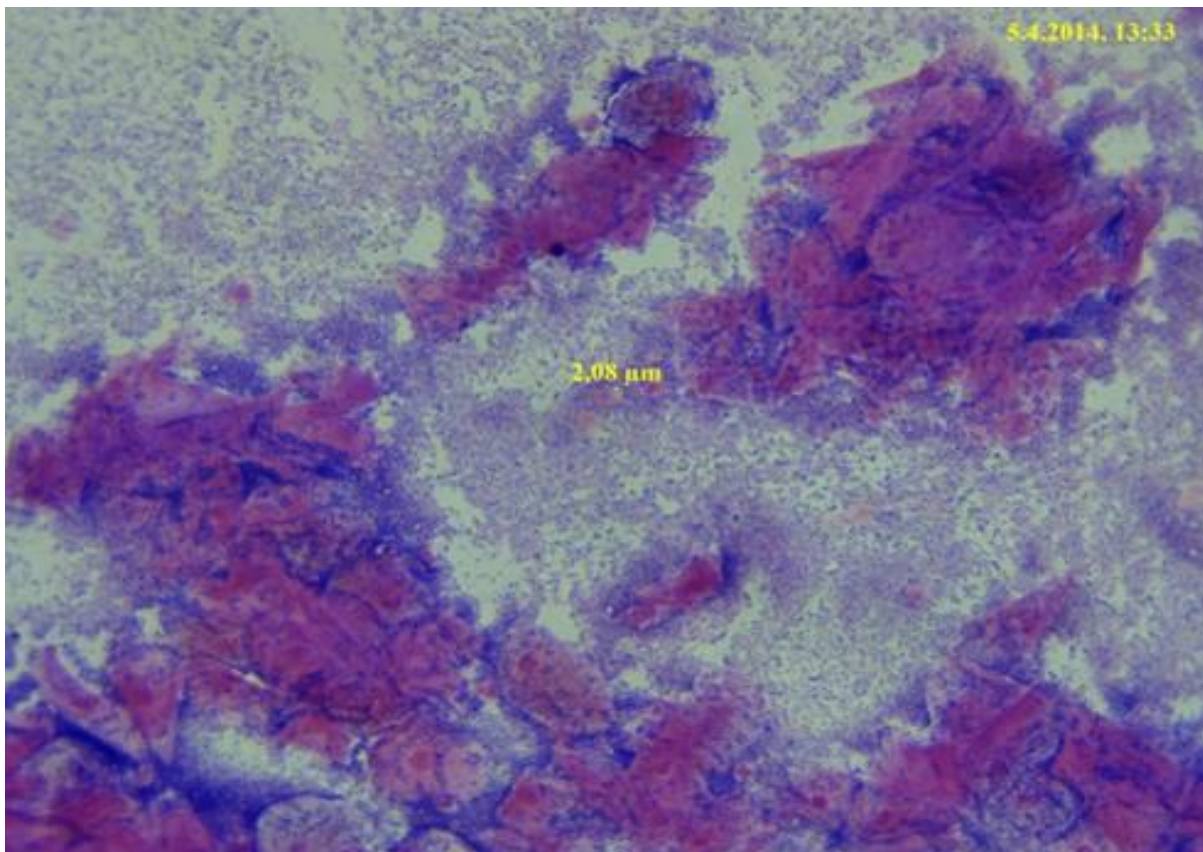


Slika 2.37: “Biopsija” preparata po Gramu i uzorak za PCR bi možda mogle da definišu šta vidimo? *Sneathia sanguinegens*, *Actinomyces*, *Fusobacterium* ili ekstremno dugačke laktobacile? (Gram X200)



Slika 2.38: “Biopsija” preparata po Gramu i uzorak za PCR bi možda mogle da definišu šta vidimo *Sneathia sanguinegens*, *Actinomyces*, *Fusobacterium*; vidi se i dosta PMN (Gram X200)

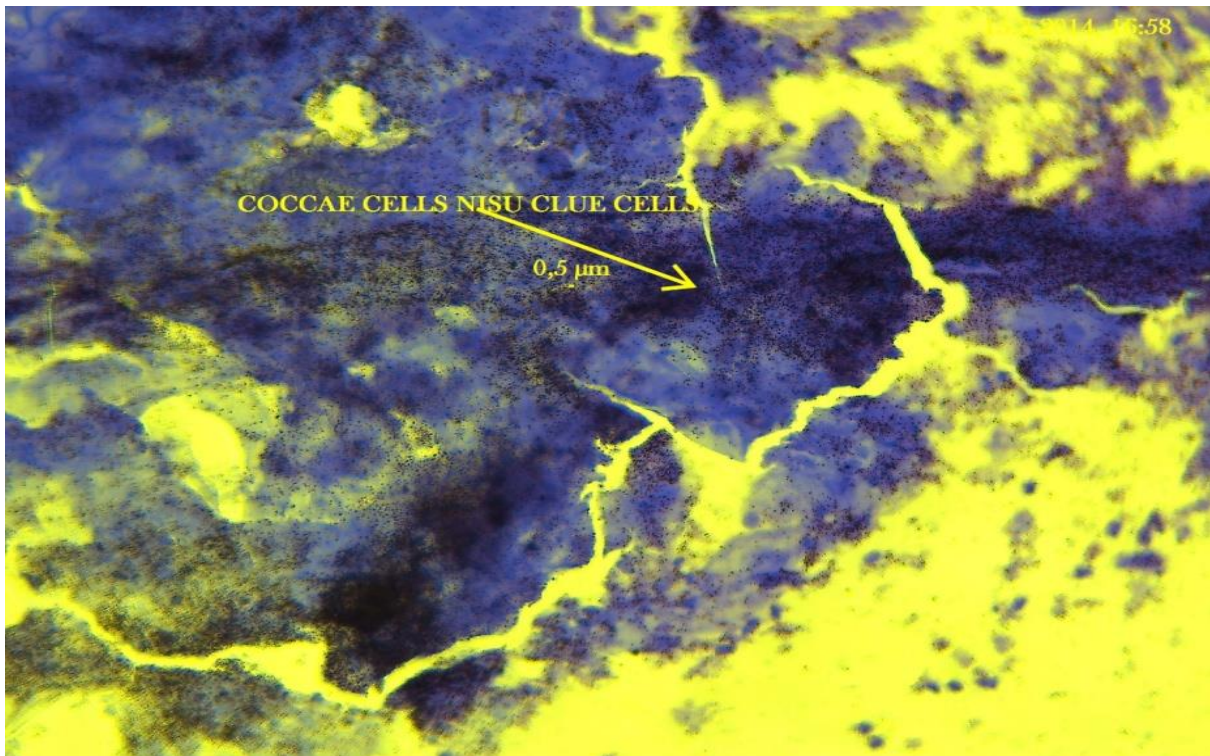
**MORFOTIP KOKE** Pod ovim morfotipom podrazumevali smo nalaz na kome vidimo izrazito Gram pozitivne, okrugle (tačkaste) forme, veličine od 0,2-1 $\mu$ m. Na uvećanju x200 vide se kao sitne, tačkaste forme, brojne, ali nisu slepljene, kao što je to slučaj sa BVAB (Slika 2.41 i 2.43). Na sledeće tri fotografije (Slika 2.44-2.46) vidimo kako u susednim “regionima” broj koka može bitno da se razlikuje. Čelije prekrivene kokama koje smo nazvali koka čelije (*coccae cells*) treba razlikovati od *clue cells* kod BV. Tokom ispitivanja primetili smo da se na uvećanju x200 mogu videti čelije koje su obojeno plavo koje smo nazvali plavim čelijama („blue cells”), a koje su patognomonične za prisustvo koka na uvećanju x200 preparata bojenog po Gramu. U ovom ispitivanju mikroskopskim nalazom pozitivnim na koke smatrali smo pacijentkinje kod kojih smo na oko 100 vidnih polja nalazili preko 5 regiona bogatim kokama.



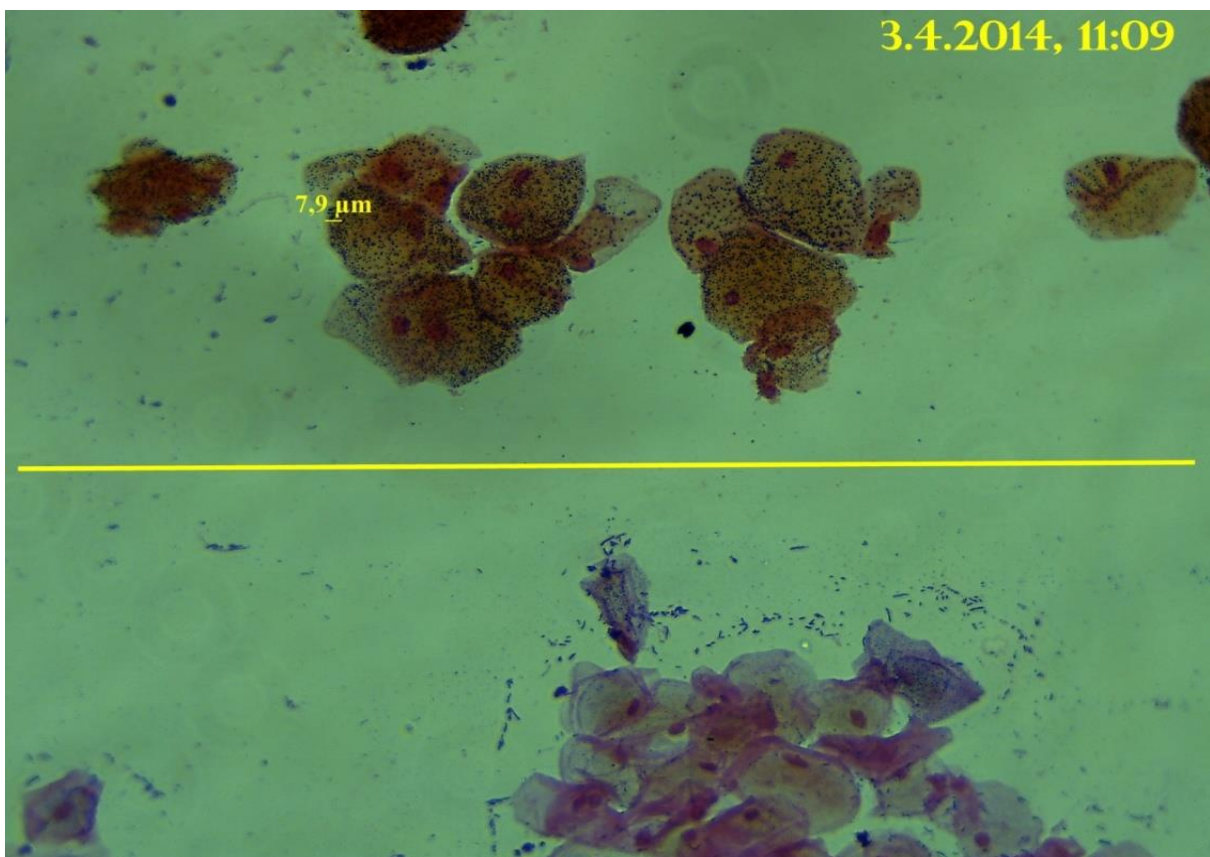
Slika 2.39: Bakterijska vaginoze sa tipičnim clue cells, tako da se rubovi epitelnih ćelija ne raspoznaju, a često se vidi



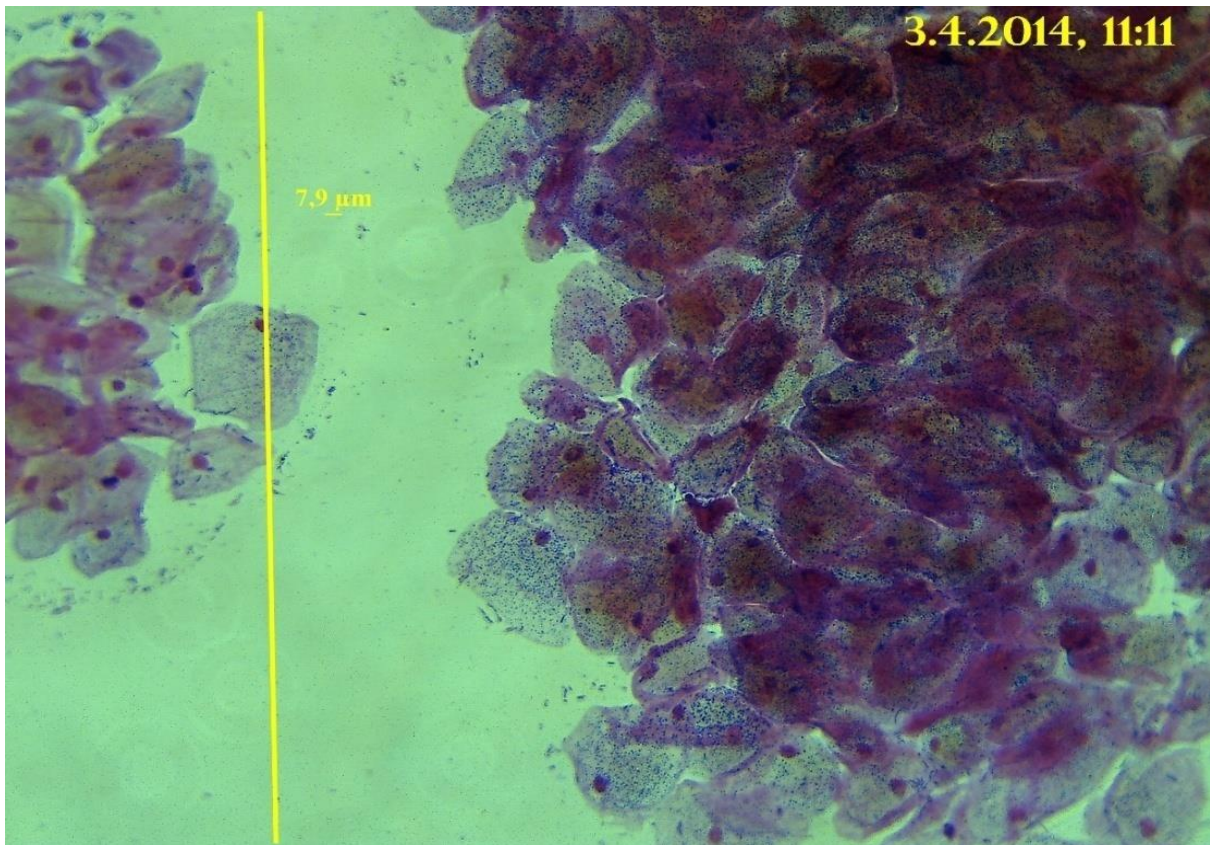
Slika 2.40: Veliki broj koka, ali se rubovi ćelija jasno vide, tako da treba razlikovati “clue cells” od koka ćelija (“coccae cells”) kako su nazvane u ovom radu



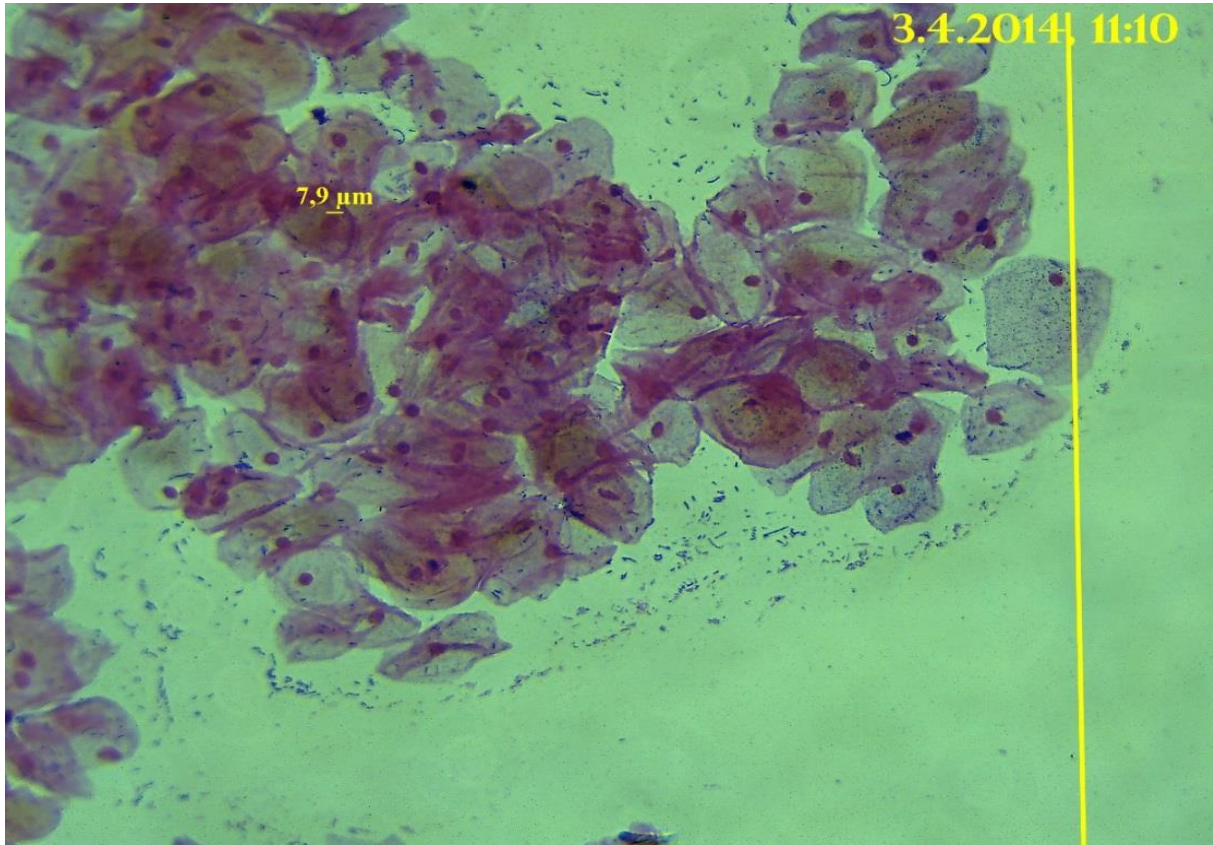
Slika 2.41: Veliki broj koka, ali se rubovi ćelija jasno vide, tako da treba razlikovati clue cells od koka ćelija (coccae cells) kako su nazvane u ovom radu



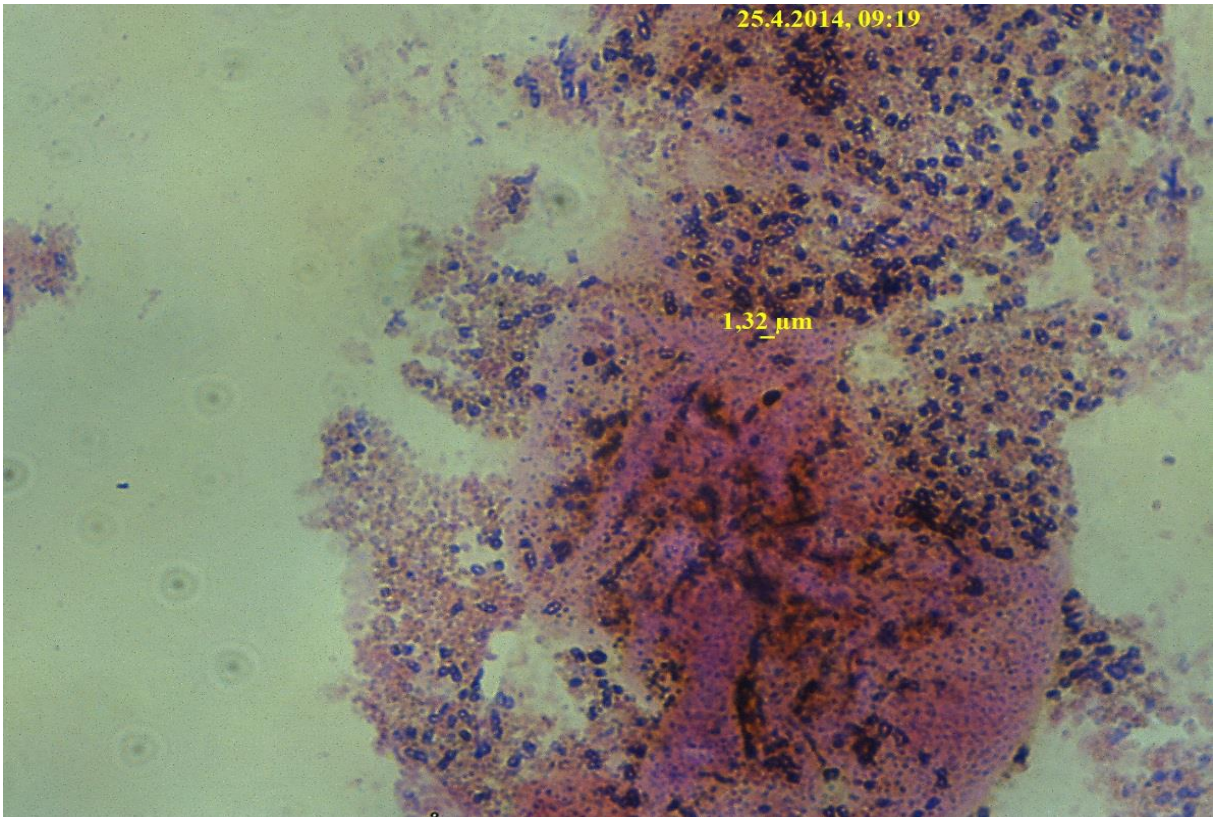
Slika 2.42: Veliki broj koka, ali se rubovi ćelija jasno vide, utisak o broju koka bolji na uvećanju x200, jer su koke često raspoređene po “regionima” (vidi dalje)



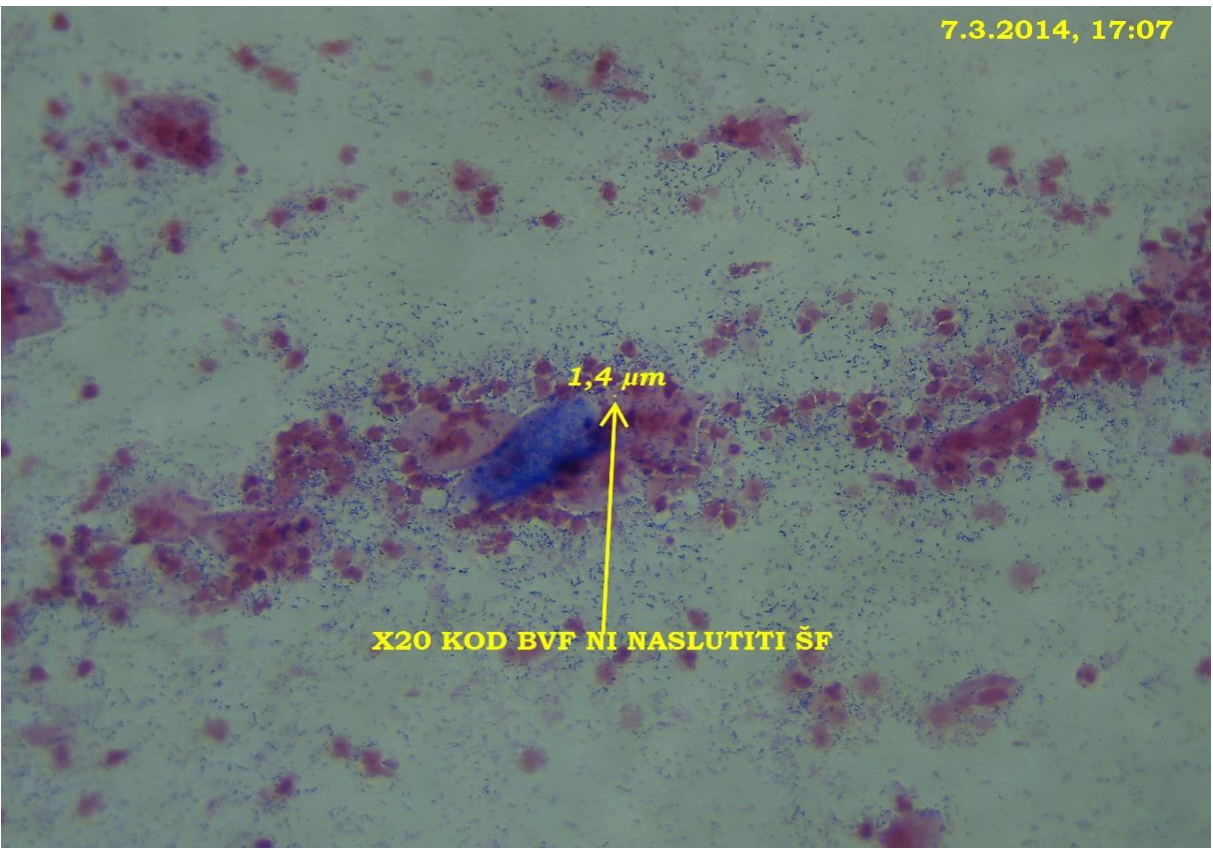
Slika 2.43: Vidno polje uvećanje x200: epitelne ćelije i Gram pozitivne štapićaste forme, koke retke ("region bez koka"), ali odmah do njega susedno vidno polje



Slika 2.44: ...susedno vidno polje sa velikim brojem koka, što objašnjava raspored koka po regionima i potvrđuje značaj gledanja preparata na manjem uvećanju



Slika 2.46: Koke se nekad veće nepravilnih oblika ili se ne boje, ali su najčešće izrazito Gram pozitivne



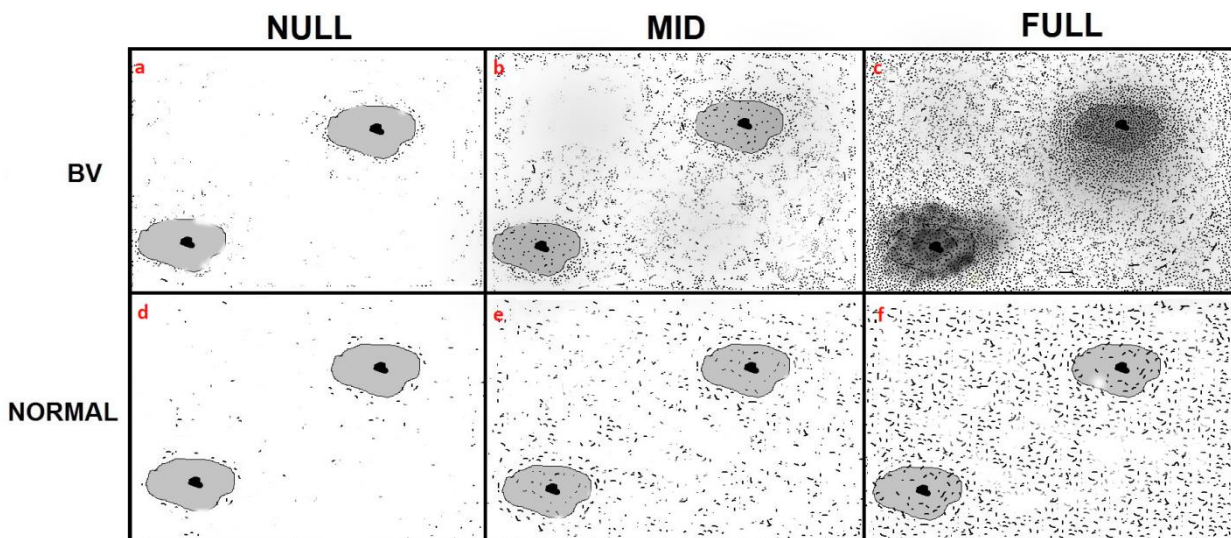
Slika 2.45: Plave ćelije (blue cells) patognomonične za prisustvo koka na preparatu, često idu sa povećanim brojem PMN i CA

Na osnovu semikvantitativne procene broja bakterijskih formi koje se na uvećanju x200 vide kao štapićaste forme (ŠF) i neštapićaste forme (NŠF) svi mikroskopski nalazi podeljeni su u 3 grupe, koje smo nazvali „FULL“, „MID“ i „NULL“ kao što je to prikazano na Slici 2.47.

„FULL“ - označava hipercelularni preparat, prisustvo velikog broja bakterijskih formi (ŠF ili NŠF) koje se nalaze na čitavom preparatu, dakle kako u međuprostorima epitelnih ćelija, oko EĆ, a i u samim nakupinama EĆ. (Slika 2.47:c i f).

„MID“ označava prisustvo manjeg broja ovih formi koje su ređe ili ih nema u međuprostorima EĆ, uglavnom se nalaze oko i u nakupinama EĆ, ali u značajno manjem broju nego kod prethodne grupe (Slika 2.47:b i e).

„NULL“ predstavlja hipocelularni preparata, kategoriju u kojoj on deluje kao “čist”, međuprostori su sa malo ili bez bakterijskih formi, a veoma mali broj se nalazi oko i u nakupinama EĆ (Slika 2.47: a i d).



Slika 2.47: Shema koja pokazuje razlike u semikvantitativnoj proceni različitih bakterijskih morfotipova u našem ispitivanju definisane kao NULL, MID i FULL

NOVA PODELA-6 GRUPA (NP-6G) - Kombinacijom ova dva kriterijuma pacijentkinje su razvrstane u 6 grupa, i ova podela nosi naziv NOVA PODELA-6 GRUPA (NP-6G), i od kojih su tri grupe normalne (N) i koje smo označili kao: normal full (NF), normal mid (NM) normal null (NN), a druge tri su sa patološkim nalazom koje smo iz praktičnih i didaktičkih razloga označili kao bakterijska vaginoza full (BVF), BV-MID i BV-NULL.

NF – Slike:2.50 i 2.51

NM – Slike:2.52 i 2.53

NM – Slike:2.54 i 2.55

BVF –Slike: 2.56 i 2.57

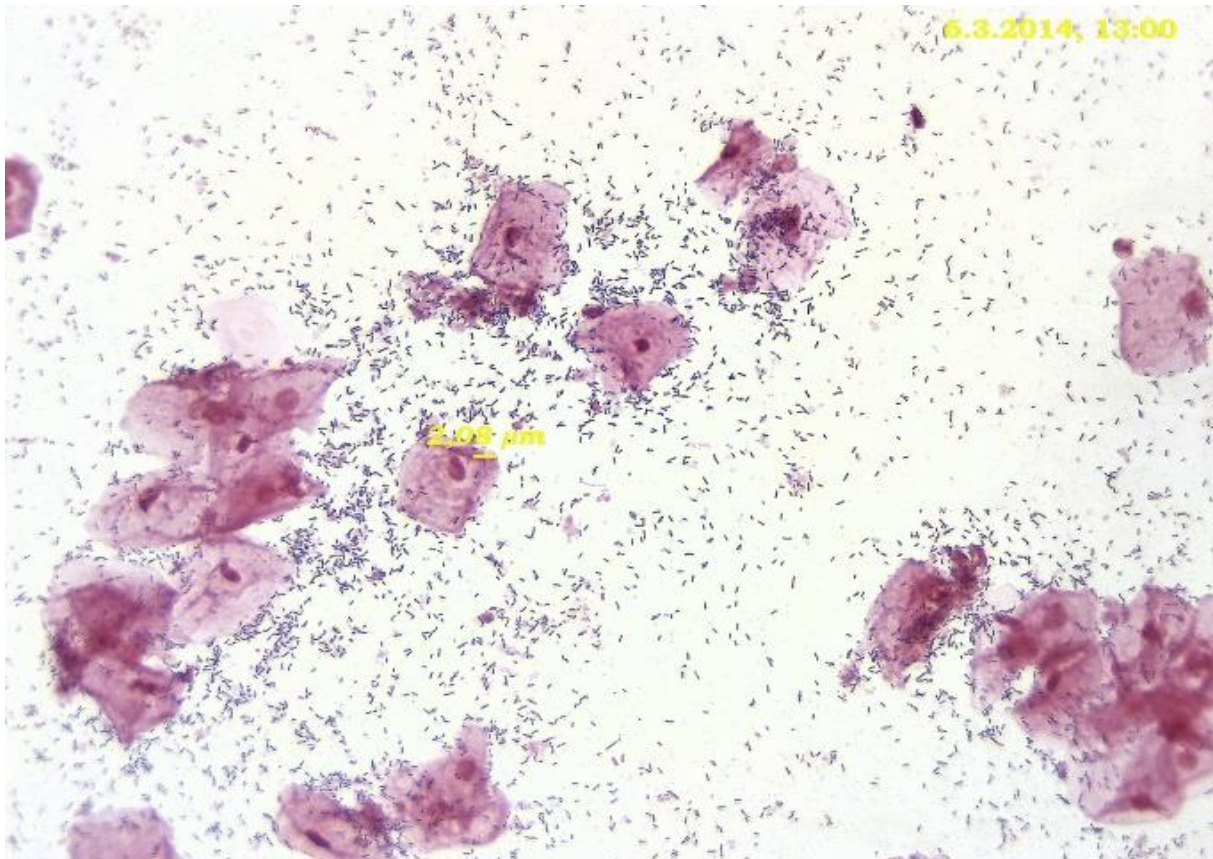
BVM – Slike: 2.58 i 2.59

BVN - Slike: 2.60 i 2.61

NOVA PODELA-3 GRUPE (NP-3G) - Koristili smo i podelu u tri grupe označenu u daljem radu kao NP-3G. U ovoj podeli pacijentkinje sa nalazom NF i NM čine grupu pacijentkinja sa normalnim nalazom, one sa nalazom BVF i BVM su grupa sa BV, dok pacijentkinje sa našim nalazom NN i BVN se spajaju u jednu grupu, koja bi suštinski odgovarala Nugentovoj intermedijarnoj grupi.

NOVA PODELA - 2 GRUPE (NP-2G) - S obzirom da se sve pacijentkinje dele na one sa normalnim nalazom i BV, koristili smo i podelu u dve grupe koja je u označena kao NOVA PODELA-2 grupe (NP-2G) i u ovakvoj podeli su pacijentkinje sa nalazom NF, NM i NN svrstavane u jednu grupu normalnih (NORMAL), a one sa nalazom BVF, BVM i BVN u grupu sa BV.

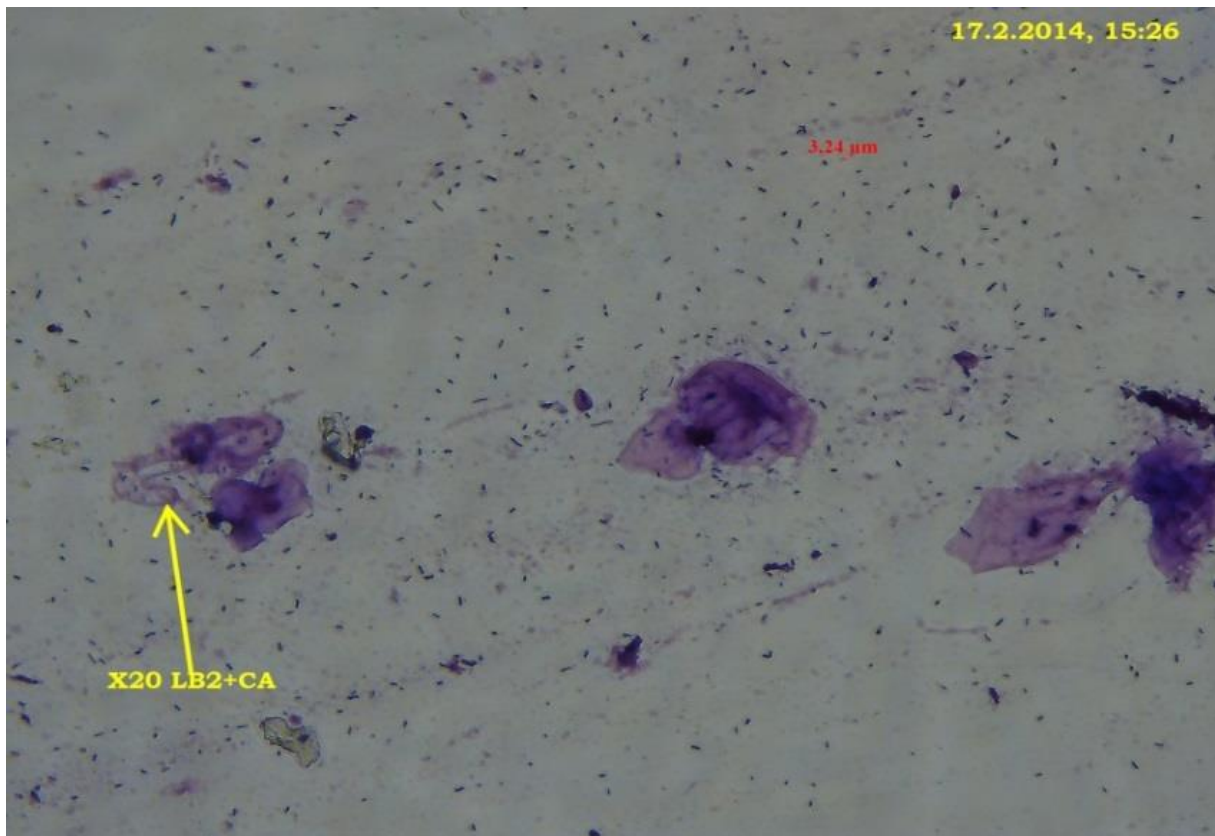




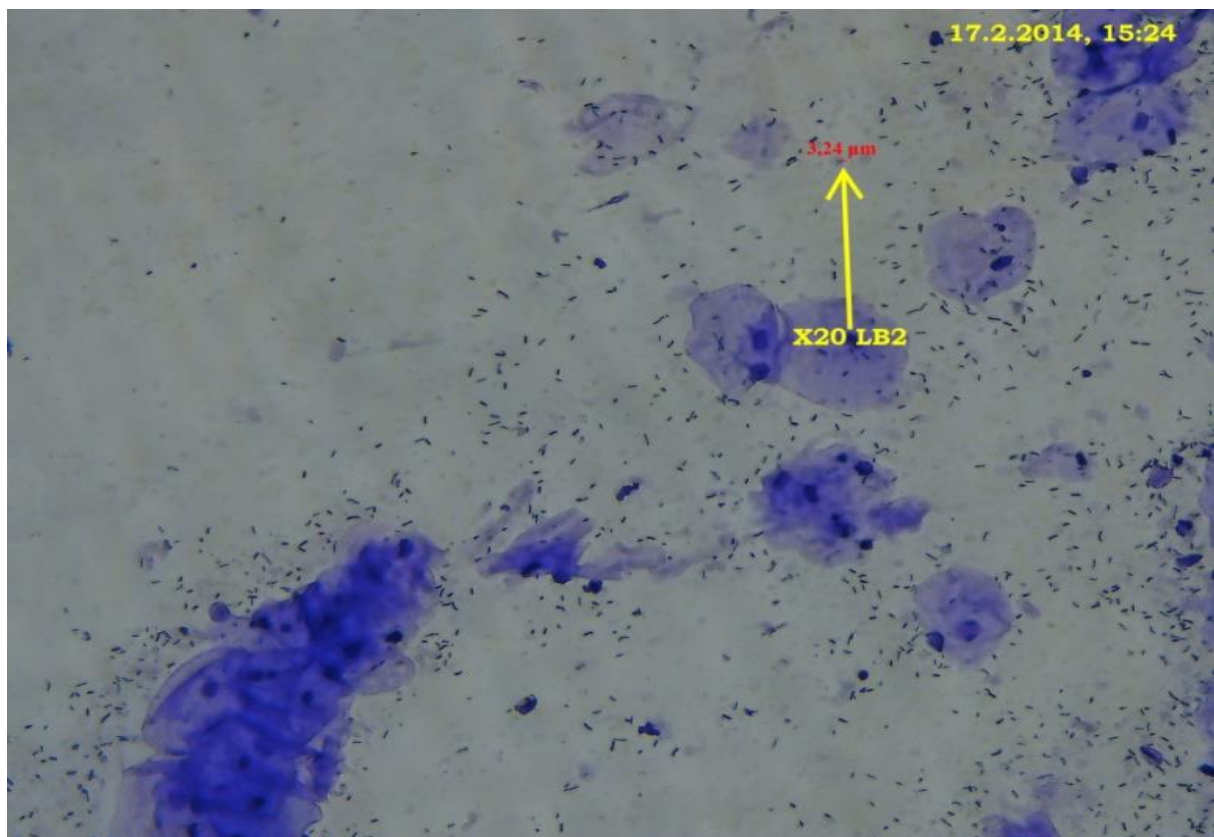
Slika 2.48: NORMAL FULL, predominacija štapićastih formi ( X200)



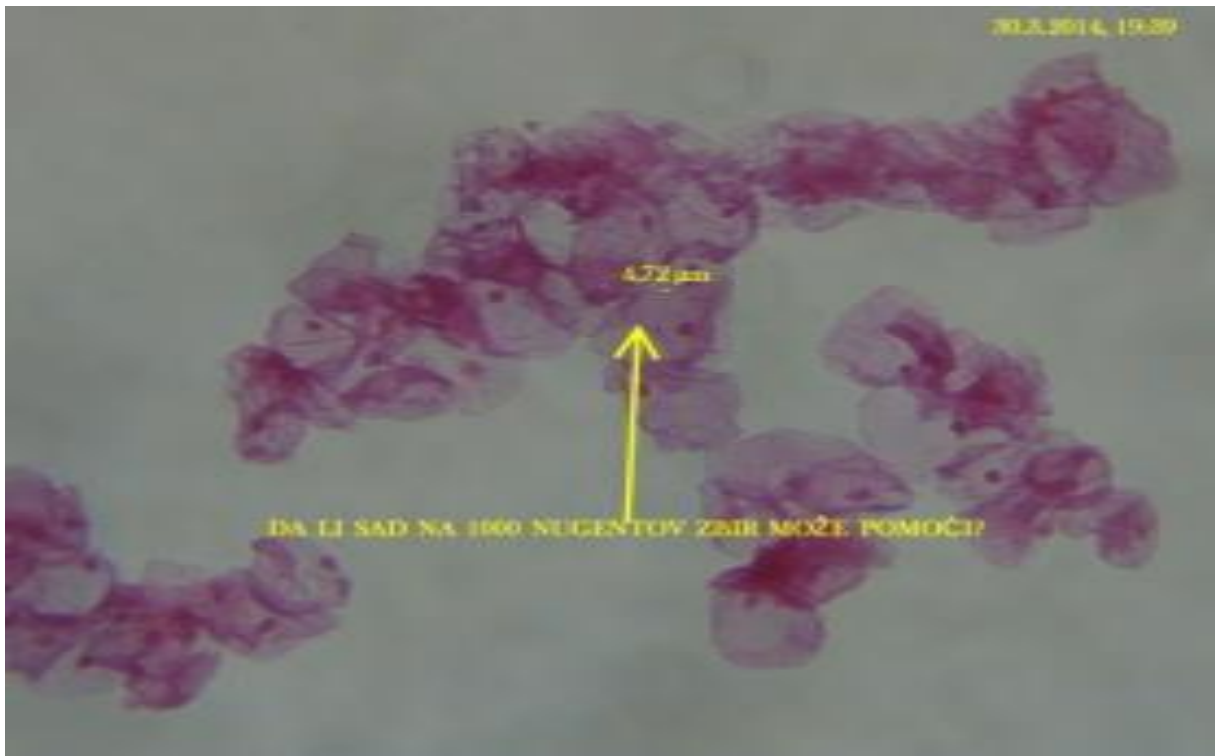
Slika 2.49: NORMAL FULL, predominacija štapićastih formi ( X200)



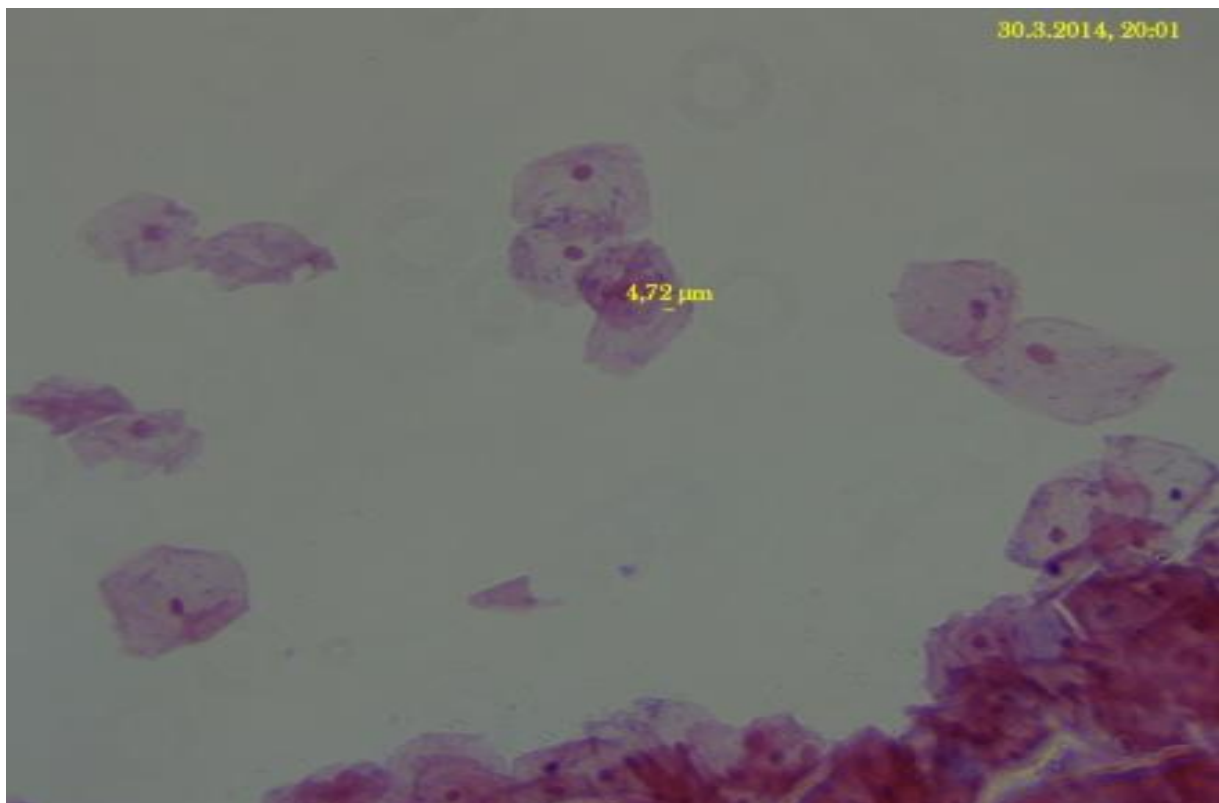
Slika 2.50: NORMAL MID predominacija štapićastih formi ali je njihov broj znatno manji nego kod pacijentkinja sa nalazom NORMAL FULL( X200)



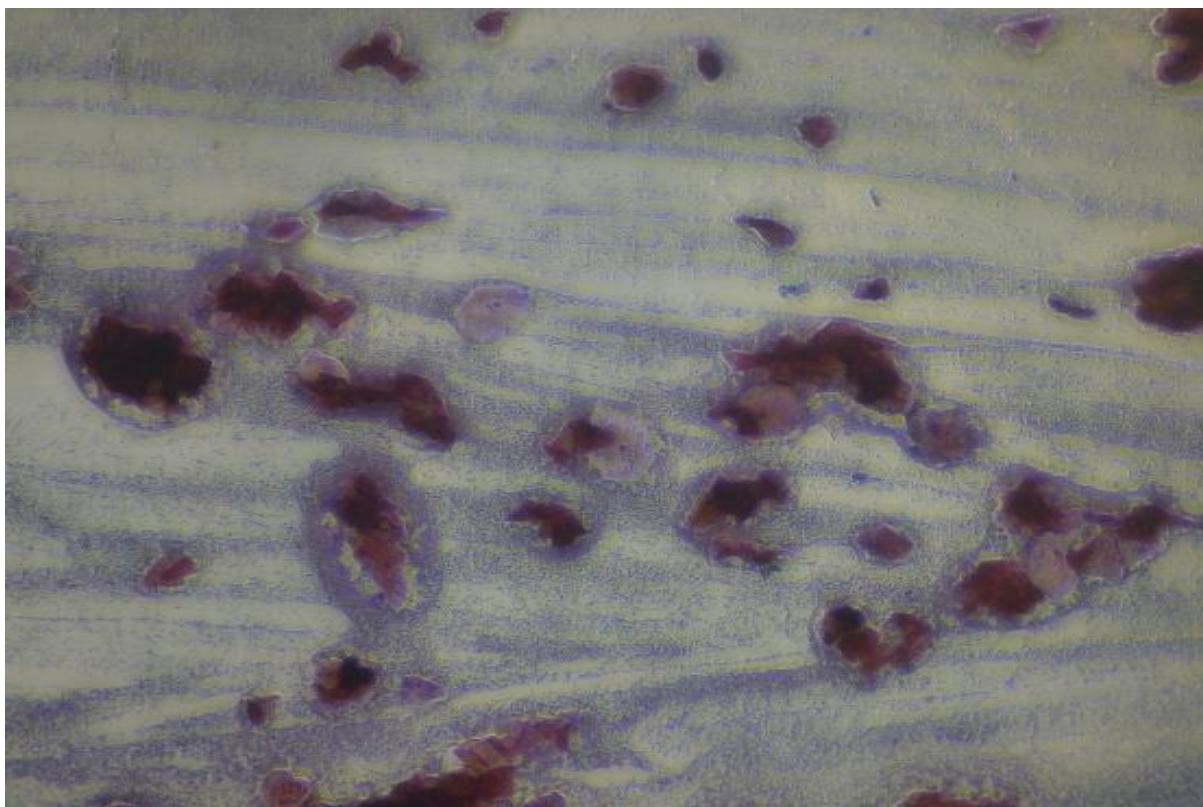
Slika 2.51: NORMAL MID predominacija štapićastih formi ali je njihov broj znatno manji nego kod pacijentkinja sa nalazom



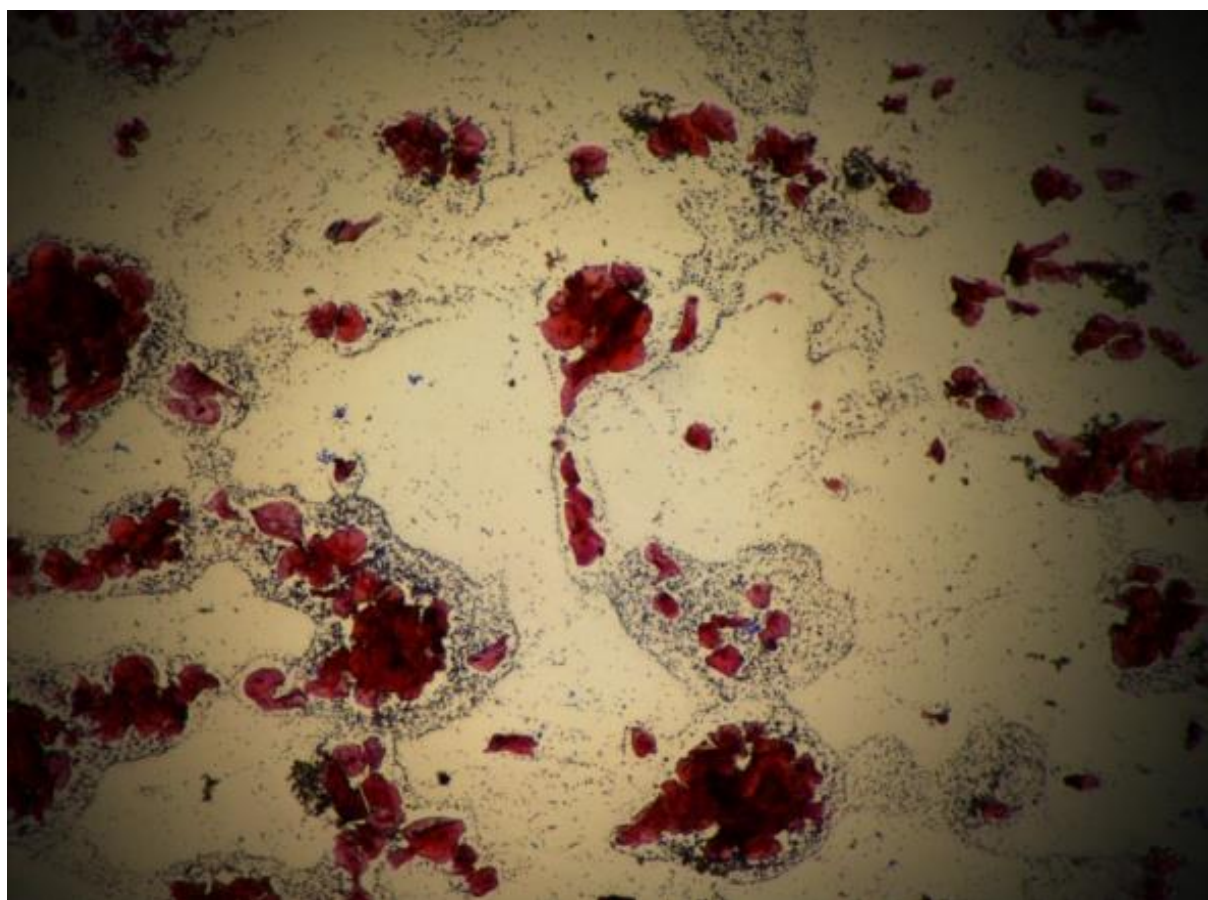
Slika 2.52: NORMAL NULL retke štapićaste forme ali ih je više nego neštapićastih formi, najteža diferencijacija između normalnog i patološkog nalaza (X200)



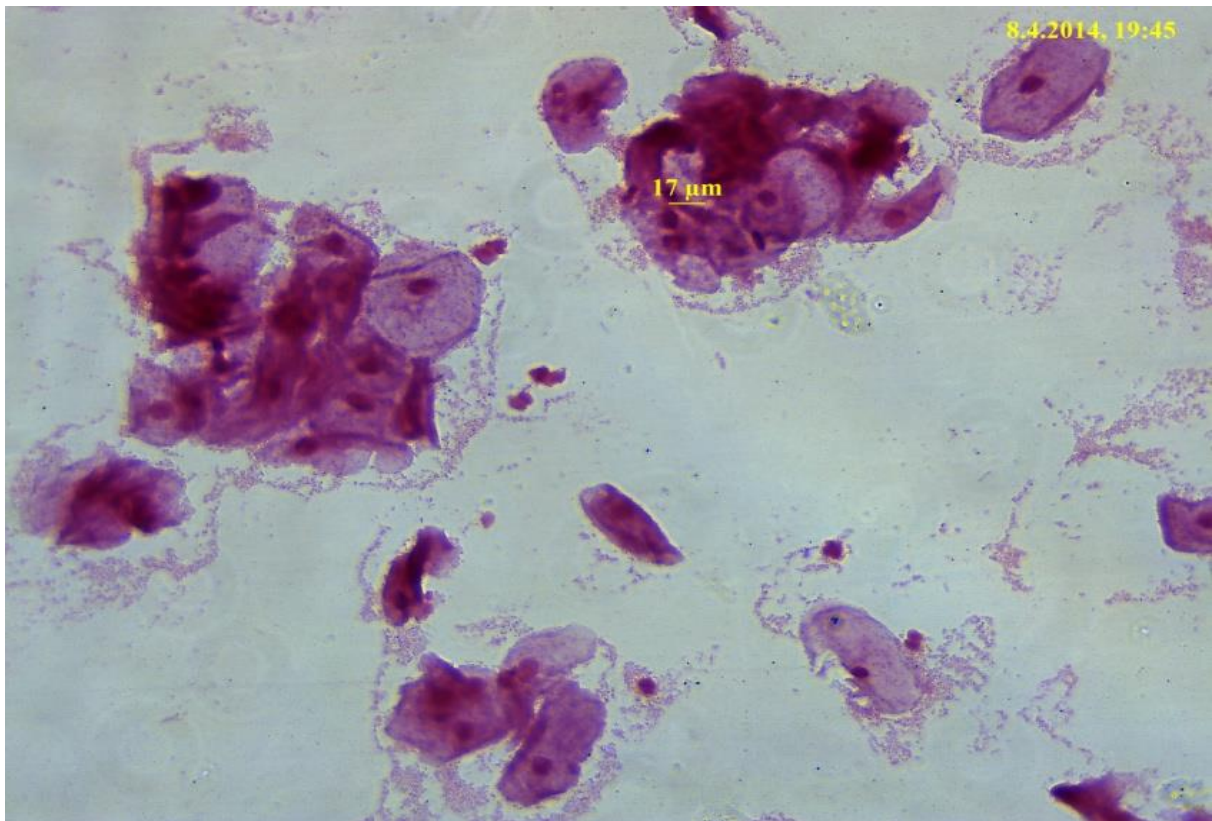
Slika 2.53: NORMAL NULL preparat izgleda kao potpuno čist retke ŠF i odsutne neštapićaste forme zbog čega je nalaz definisan kao NORMAL NULL



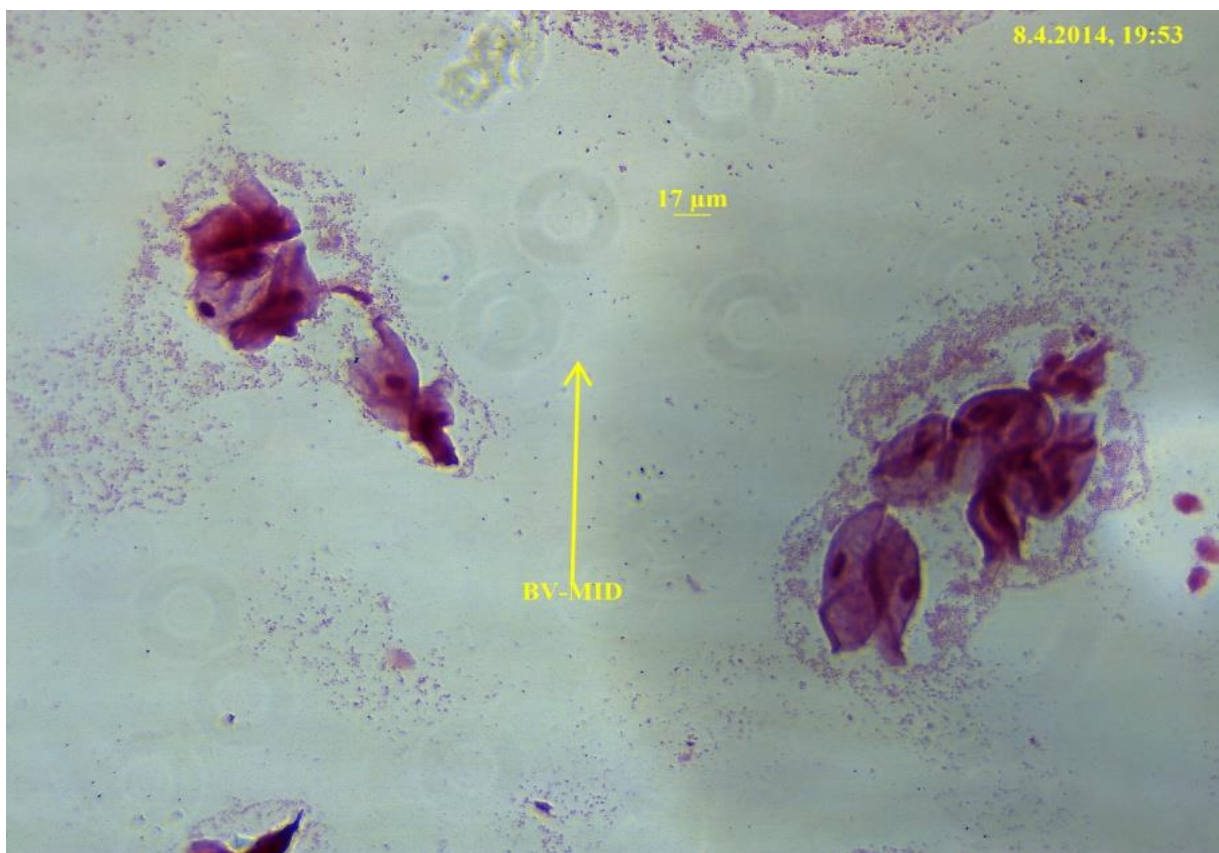
Slika 2.54: BV FULL sa tipičnim slikama “arhipelaga” i “peščanih staza” na uvećanju X200, štapčaste forme se ne vide



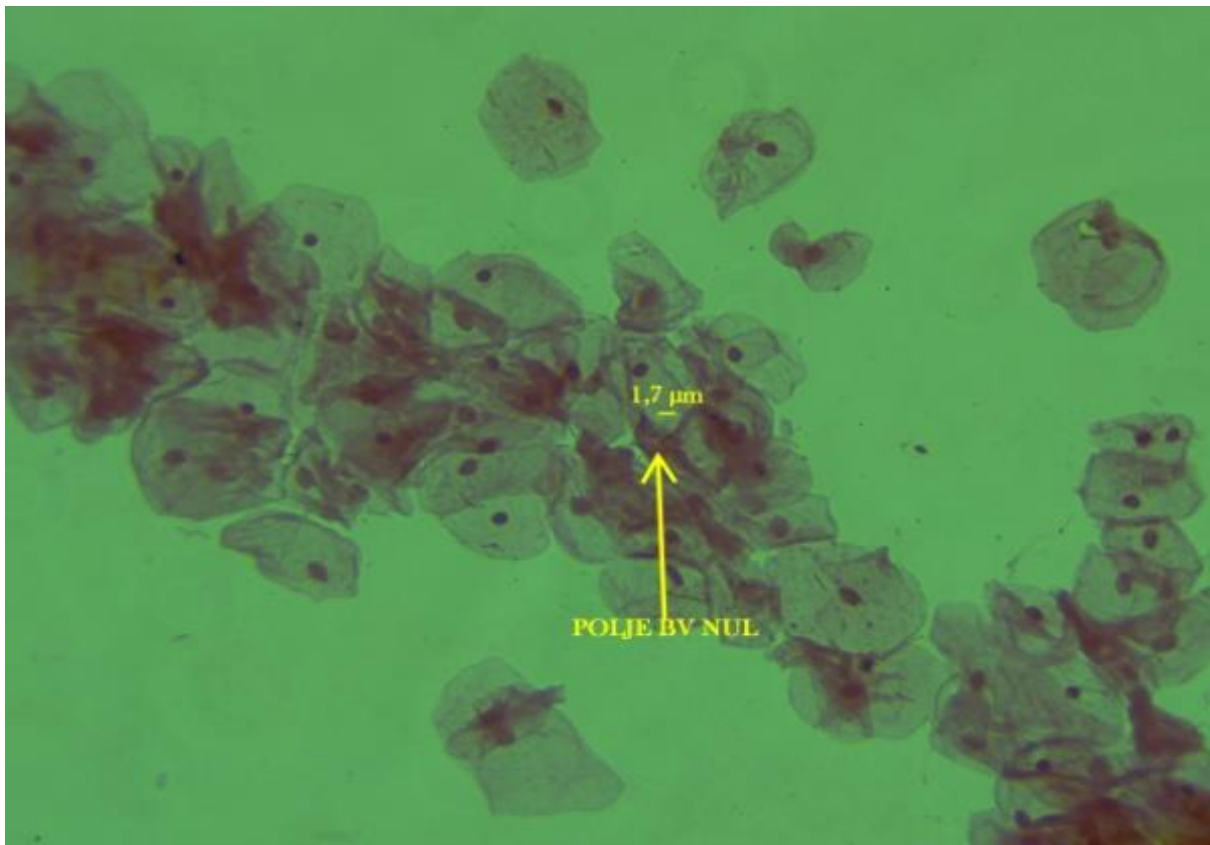
Slika 2.55: BV FULL uvećanje x 200



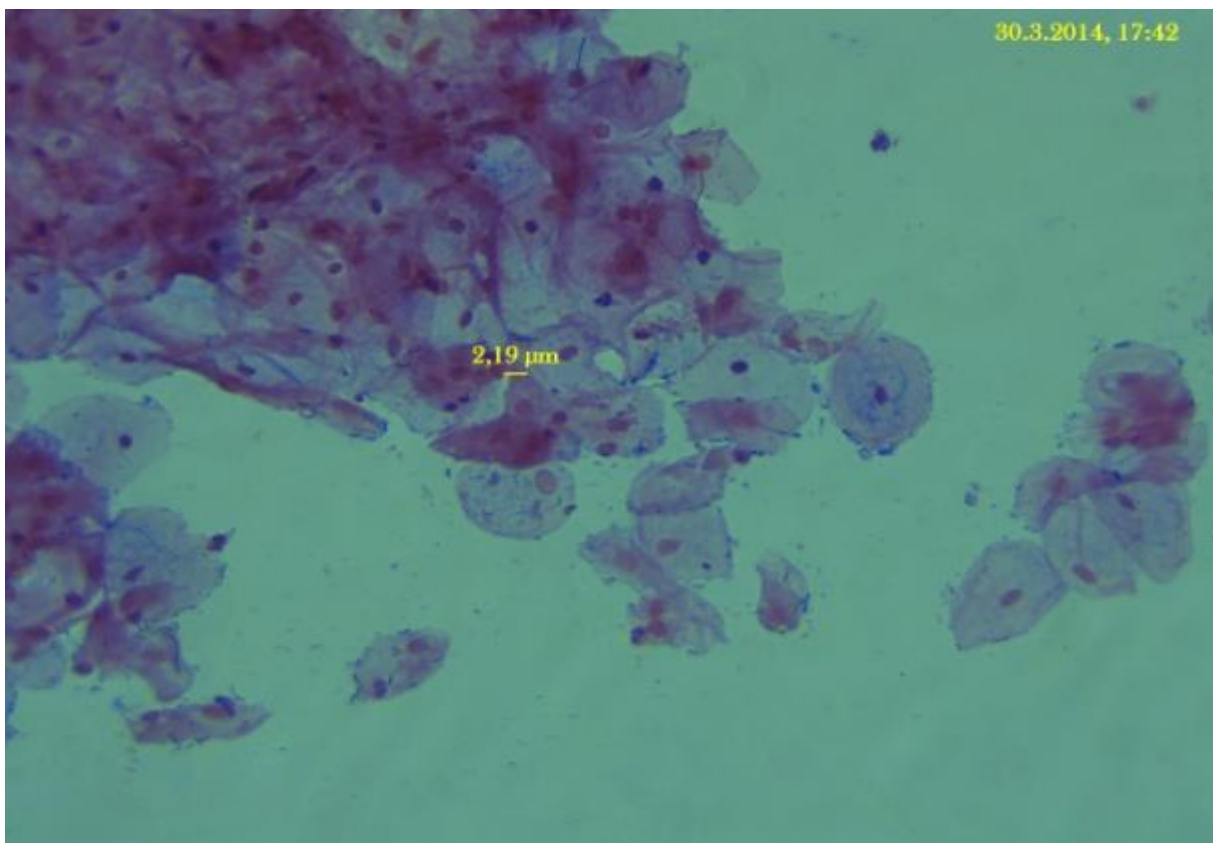
Slika 2.56: BV MID broj neštapićastih formi značajno manji nego kod pacijentkinja sa BV FULLL (x200)



Slika 2.57: BV MID broj neštapićastih formi značajno manji nego kod pacijentkinja sa BV FULLL (X200)



Slika 2.58: BV NULL više neštapićastih od štapićastih formi, sve bakterijske forme u vrlo malom broju, za precizniju diferencijaciju potreban nalaz kliničke slike, vrednosti pH i KOH testa (x200)



Slika 2.59: BV NULL štapićaste forme se ne vide, veći broj neštapićastih formi

## **2.4 ODREĐIVANJE BROJA VAGINALNIH POLIMORFONUKLEARA**

Broj PMN na NPVS i uvećanje x400

Na uvećanju x400 gledali smo najmanje 10 VP, na sredini i dva kraja preparat, i na osnovu semikvantitativnog nalaza sve pacijentkinje podelili u 4 grupe:

Grupa 0: na preparatu nema PMN ili je njihov broj značajno manji od broja EĆ.

Grupa 1: PMN su prisutni na preko 50% vidnih polja, ali je njihov broj manji od broja EĆ.

Grupa 2: PMN se vide na većini vidnih polja i njihov broj je jednak ili nešto veći od broja EĆ

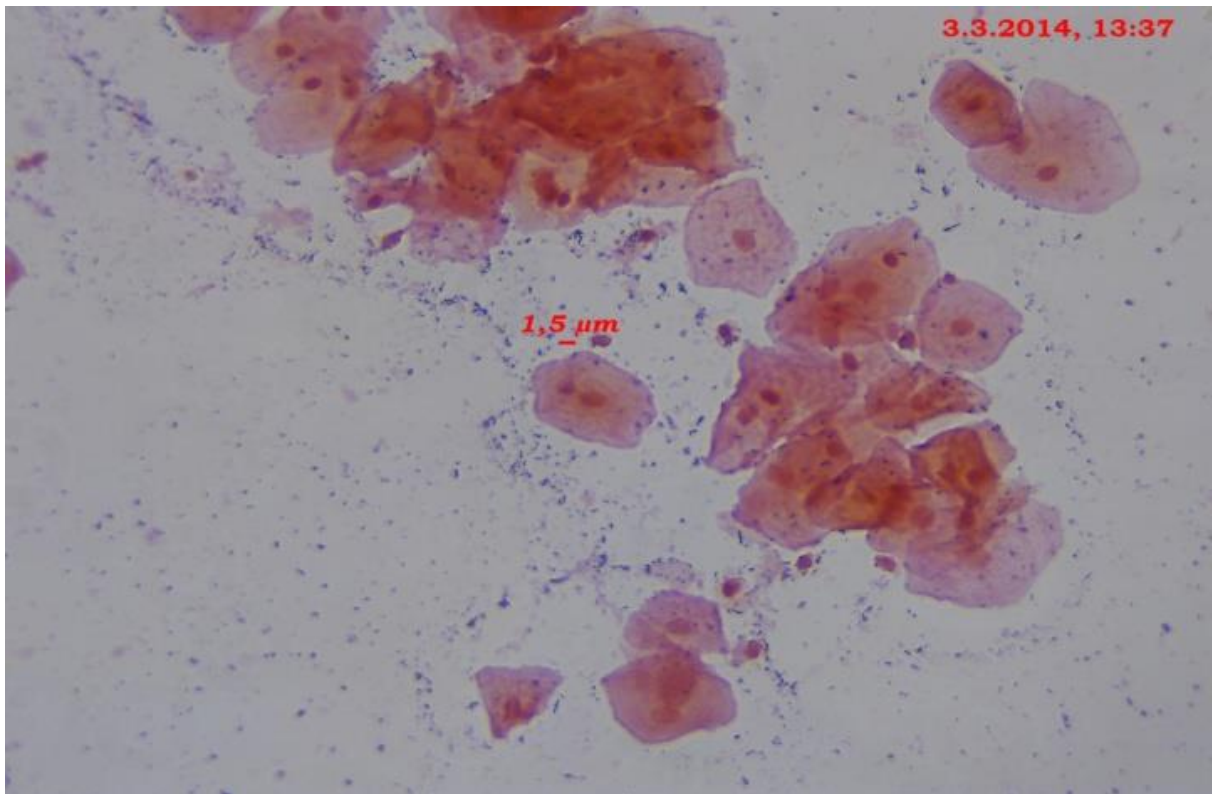
Grupa 3: PMN prisutni na većini vidnih polja i njihov broj je značajno veći od broja EĆ.

Grupe 0 i 1 smatrali smo normalnim nalazom, a grupe 2 i 3 patološkim nalazom.

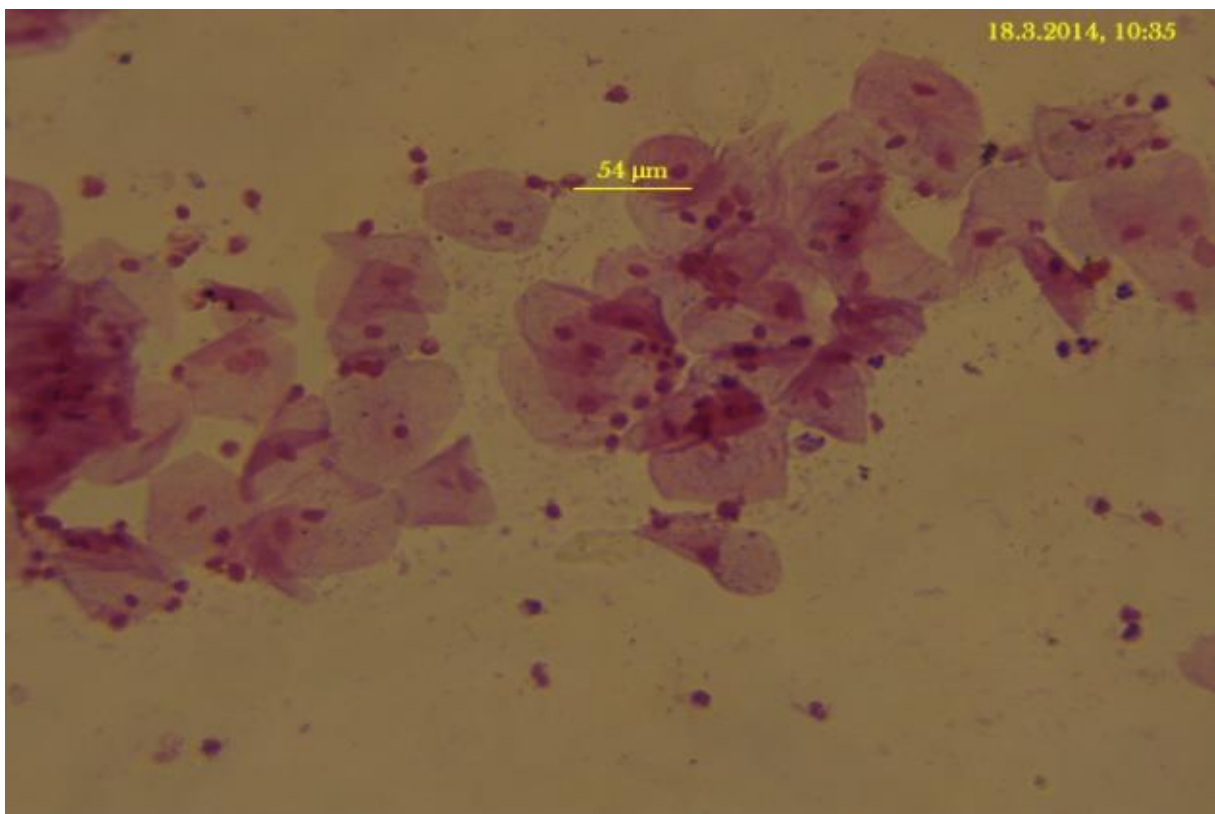
2) Broj PMN na preparatu bojenom po Gramu, na uvećanjima x1000 i x200, određivan je po istoj semikvantitativnoj formuli. Broj vidnih polja na uvećanju x1000 isti je kao kod Nugenta (10 nesusednih VP), a na x200 kao u NPVS (na dva kraja i sredini preparat 50-70 VP). Ovakav pristup zadržava isti proporcionalni odnos između EĆ i PMN, tako da su rezultati koje dobijemo na različitim mikroskopskim uvećanjima lakše međusobno uporedivi. U literaturi nismo našli podataka da je do sada broj vaginalnih PMN određivan na uvećanju x200.

Kvantifikacija CA

Činjenicu da su svi preparati po Gramu na uvećanju x1000 (3-4 puta) i x200 (2-3 puta) gledani više puta iskorišćena je da pacijentkinje kod kojih su viđene spore ili hife gljivica podelimo u tri kategorije full, mid i null. Podatak u kom gledanju smo videli CA na mikroskopskom preparatu je bio najvažniji parametar u ovakvoj semikvantitativnoj podeli. Tako su u najvećem broju slučajeva pacijentkinje kod kojih je CA viđena na uvećanju X1000 svrstane u kategoriju CA FULL (CAF) i CA MID (CAM), dok su pacijentkinje kod kojih je CA nađena tek na uvećanju x200 u najvećem broju slučajeva svrstane u grupu CA NULL (CAN). Pokušaji da na neki način standardizujemo ovakav semikvantitativni pristup ostali su bezuspešni, jer se pokazalo da je CA toliko neravnomerno raspoređena na mikroskopskom preparatu da ni broj vidnih polja, ni odnos sa EĆ, niti bilo šta drugo ne omogućava da se napravi prihvatljiv obrazac za semikvantifikaciju CA, kao što smo to uradili sa laktobacilima, BVAB ili PMN.

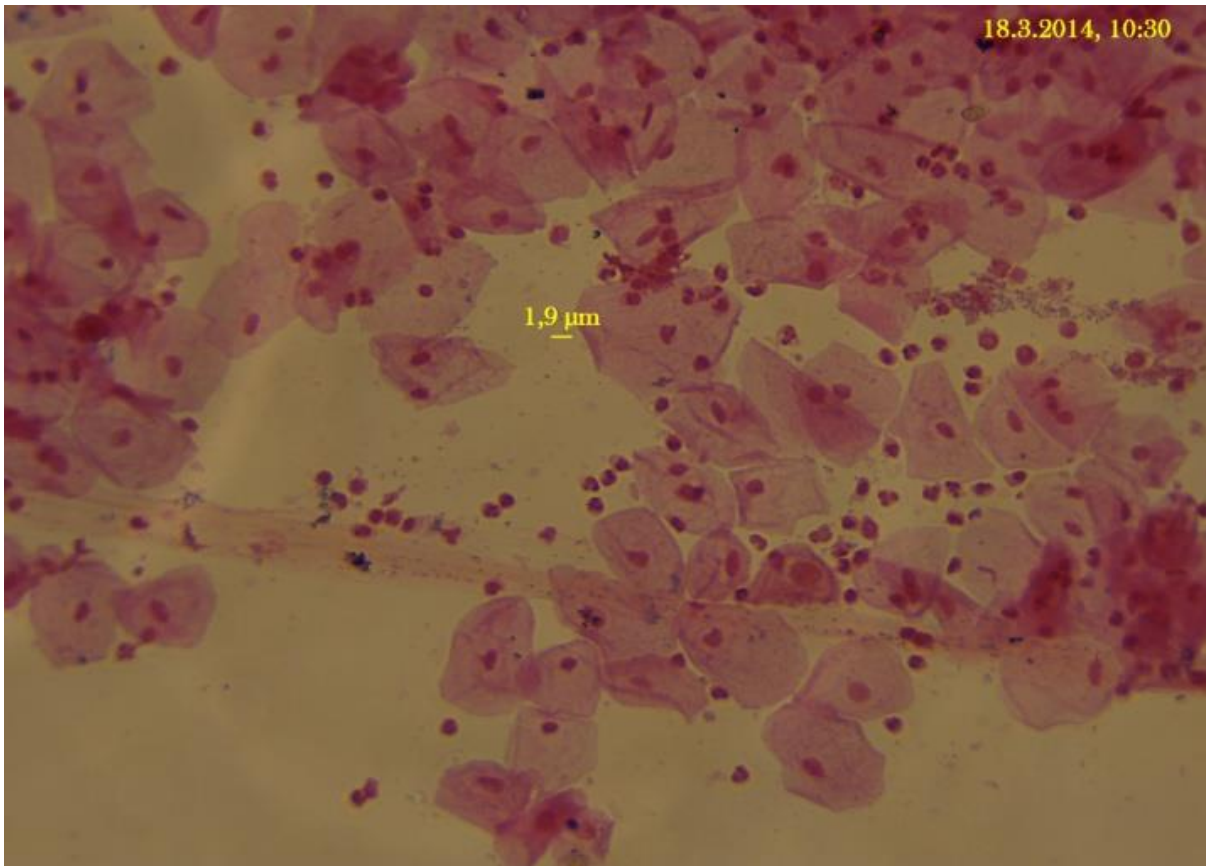


Slika 2.60: Polimorfonukleari grupa 0 ( PMN 0): na preparatu nema PMN ili je njihov broj značajno manji od broja epitelnih ćelija (Gram x200)

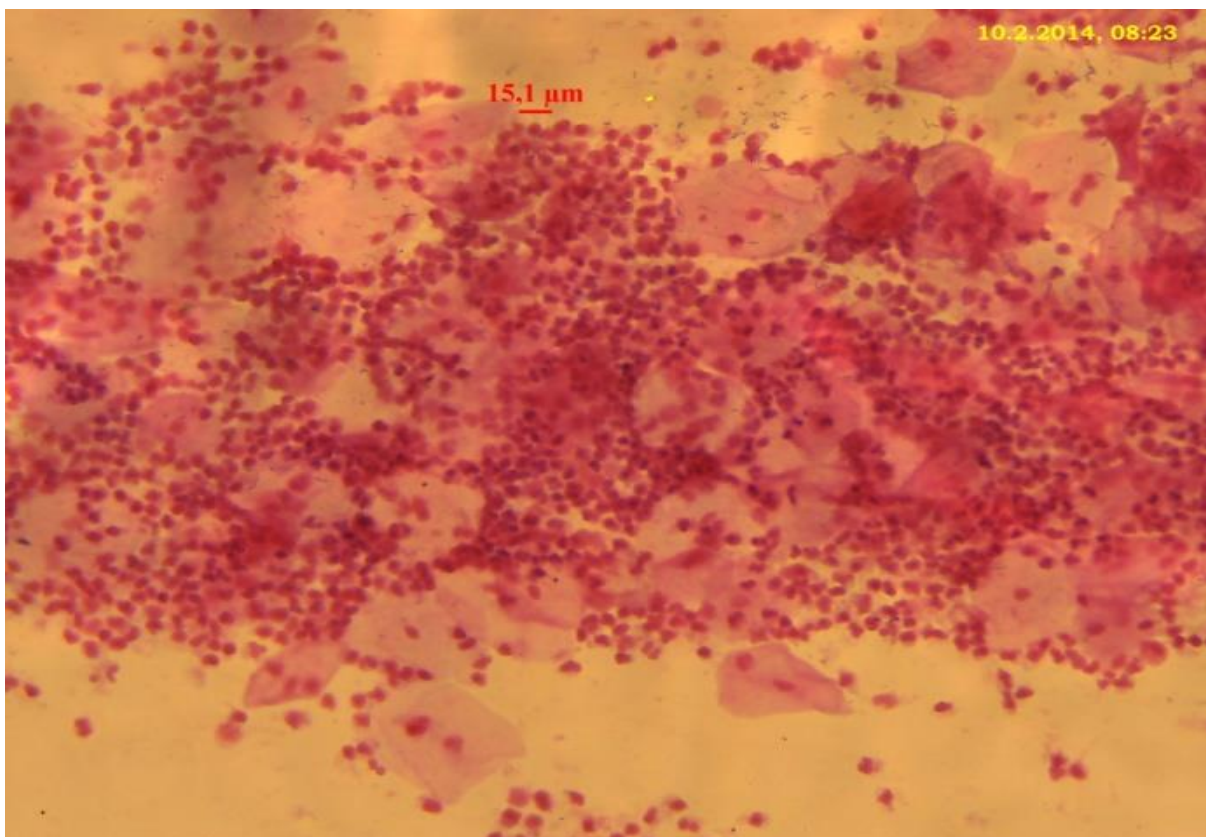


Slika 2.61: Polimorfonukleari grupa 1 ( PMN 1): PMN su prisutni na preko 50% vidnih polja, ali je njihov broj manji od broja epitelnih ćelija (Gram x200)

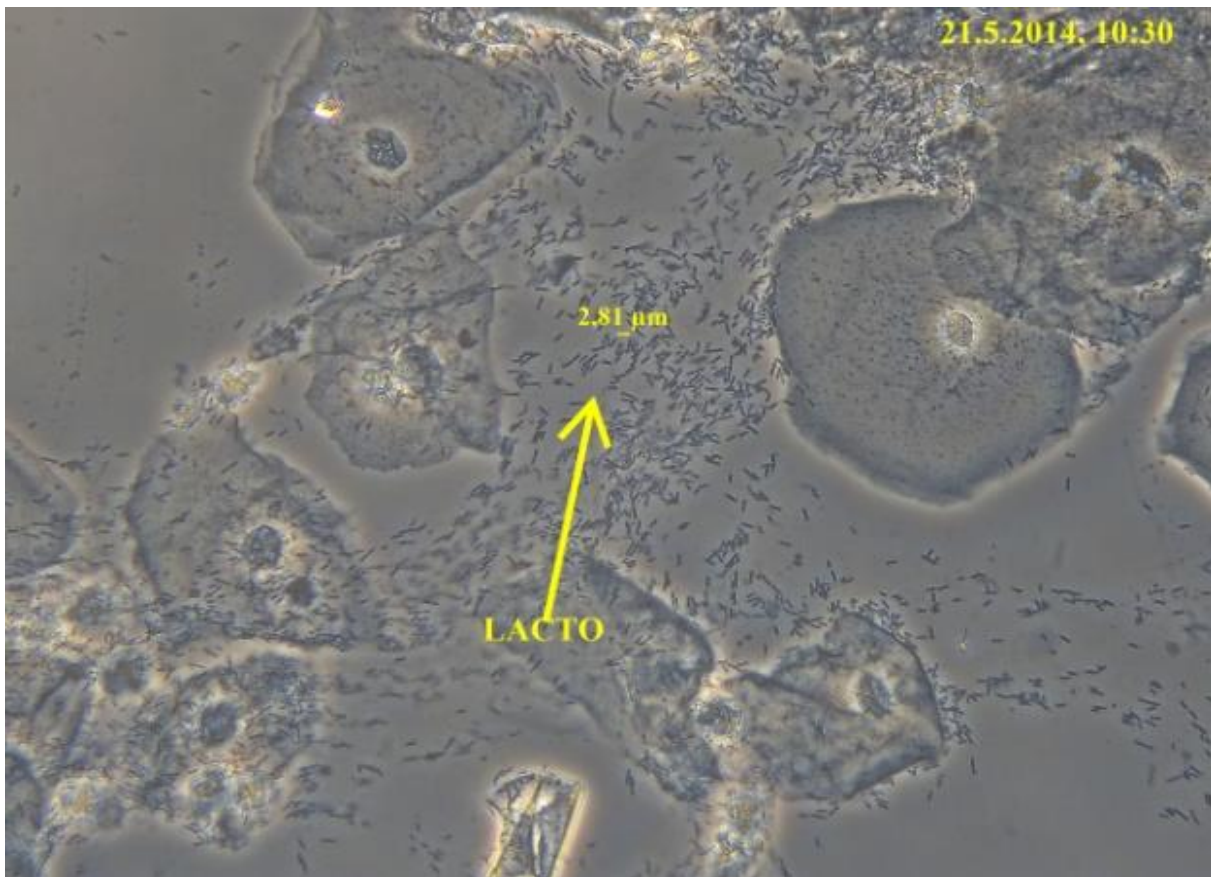




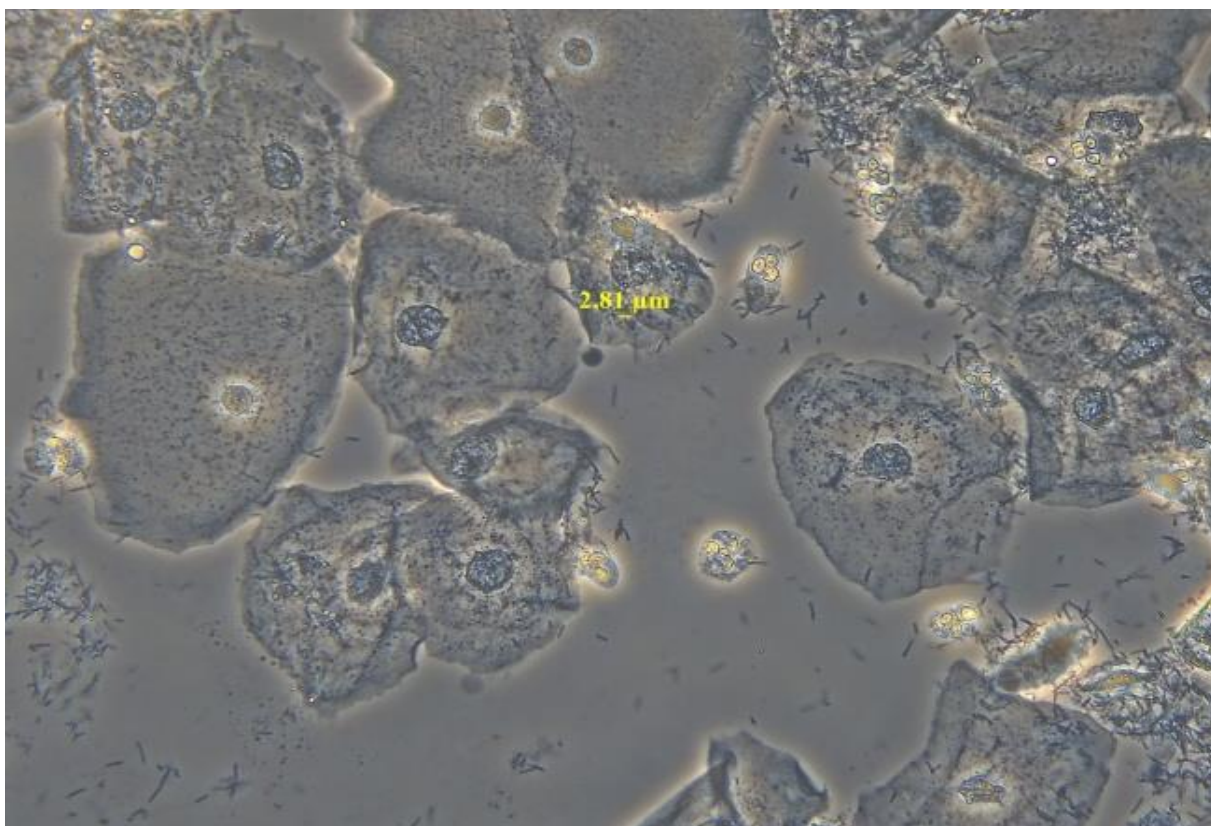
Slika 2.63: Polimorfonukleari grupa 2 ( PMN 2): PMN se vide na većini vidnih polja i njihov broj je jednak ili nešto veći od broja epitelnih ćelija (Gram x200)



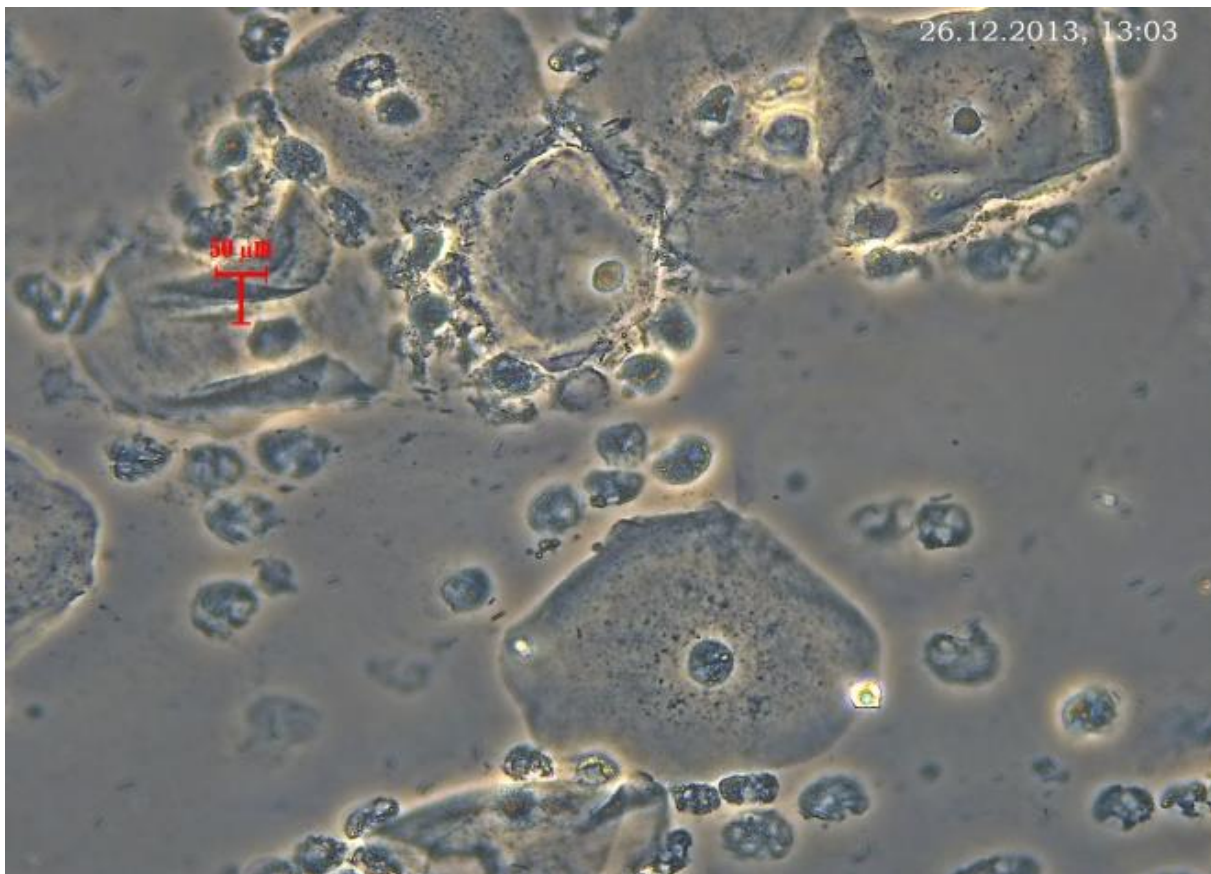
Slika 2.62: Polimorfonukleari grupa 3 ( PMN 3): PMN prisutni na većini vidnih polja i njihov broj je značajno veći od broja epitelnih ćelija (Gram x200)



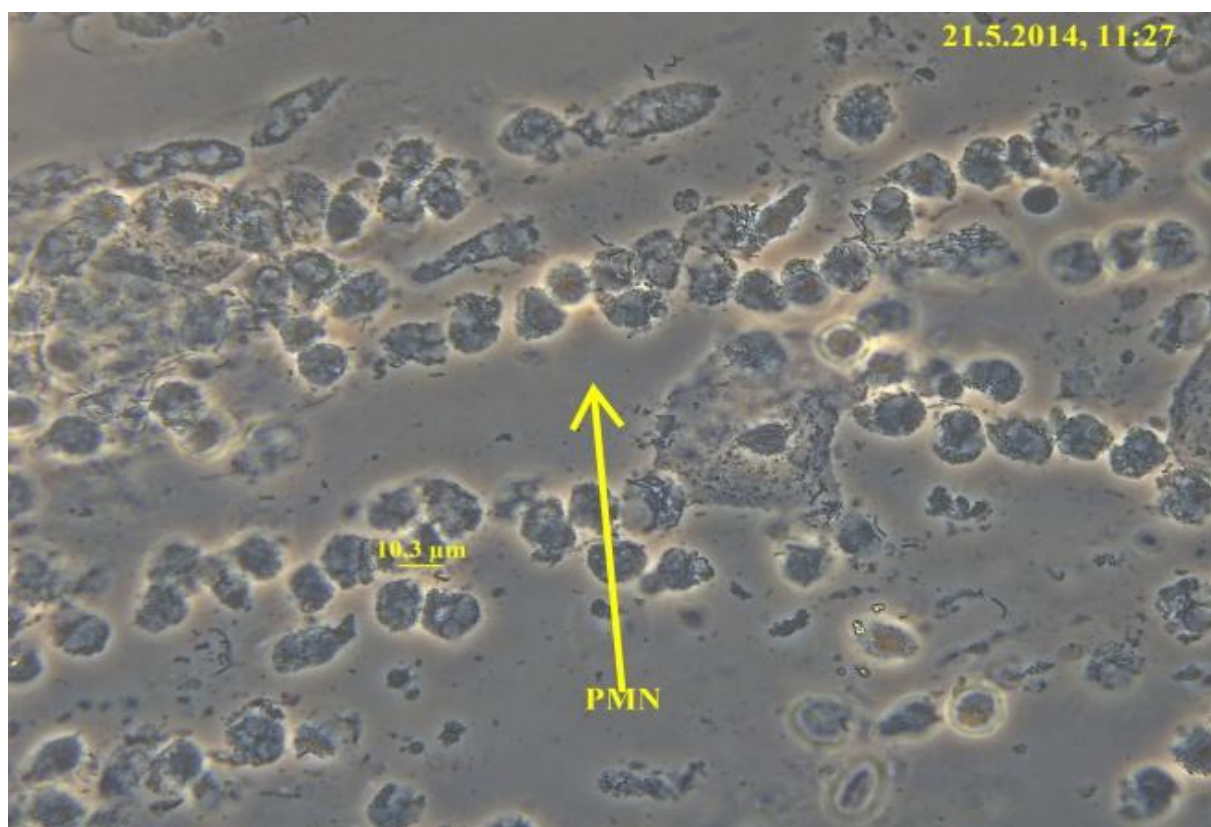
Slika 2.65: Polimorfonukleari grupa 1 (PMN 1): PMN su prisutni na preko 50% vidnih polja, ali je njihov broj manji od broja epitelnih ćelija (NPVS x400)



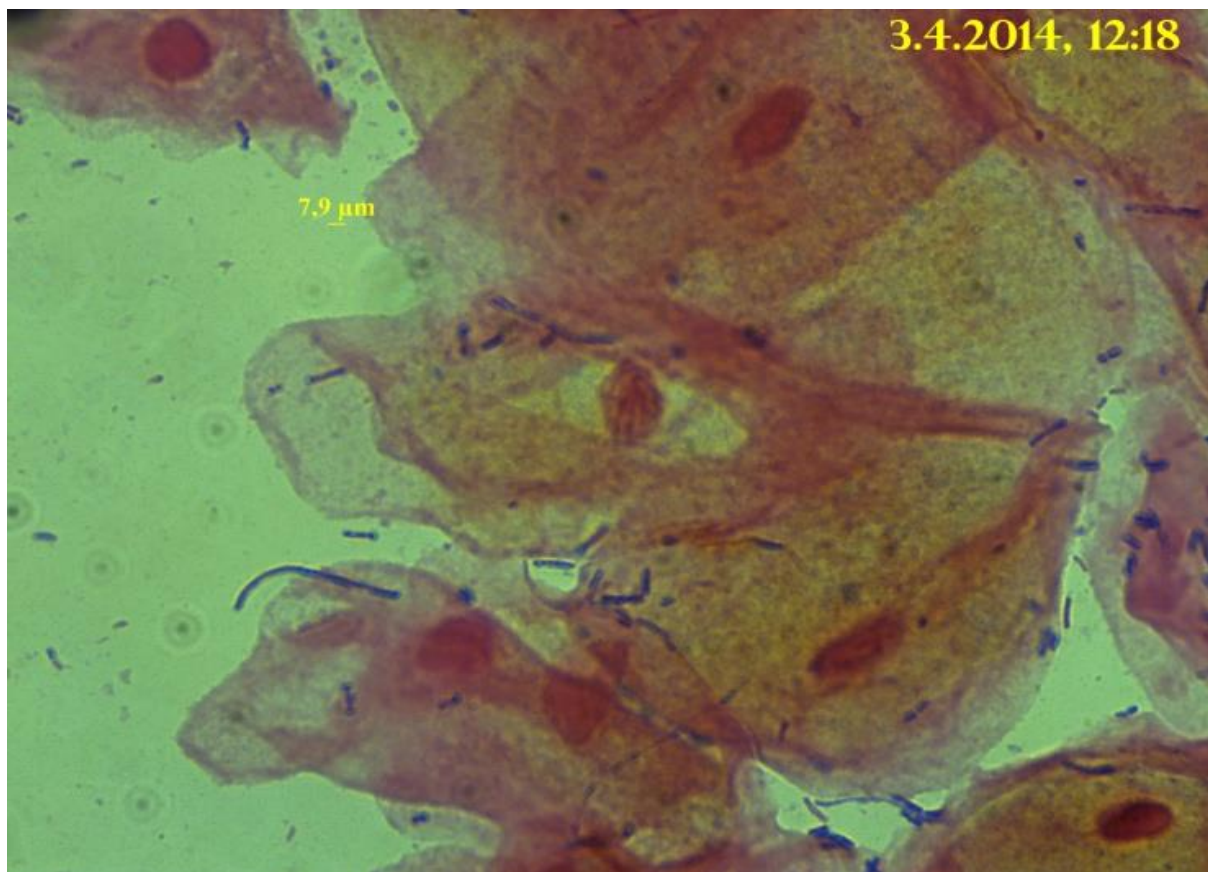
Slika 2.64: Polimorfonukleari grupa 0 (PMN 0): na preparatu nema PMN ili je njihov broj značajno manji od broja epitelnih ćelija (NPVS x400)



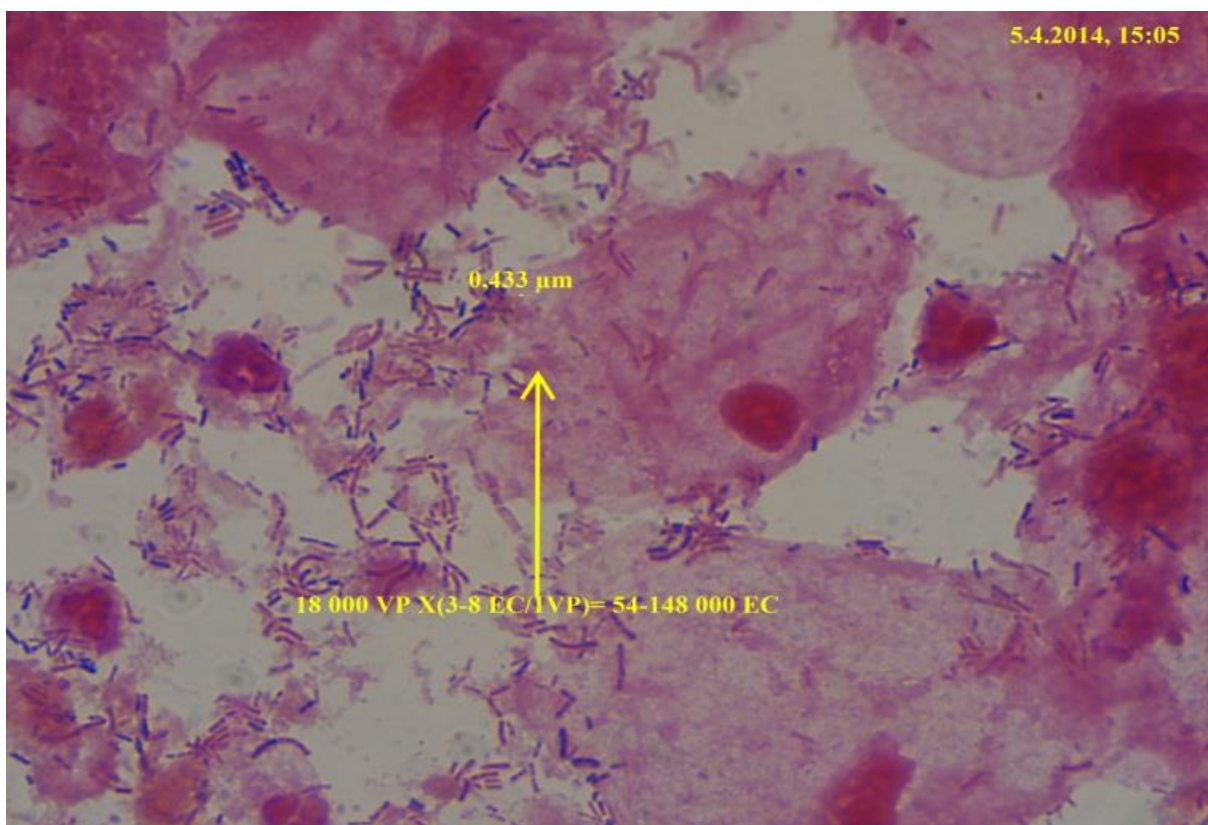
Slika 2.66 Polimorfonukleari grupa 2 (PMN 2):PMN se vide na većini vidnih polja i njihov broj je jednak ili nešto veći od broja epitelnih ćelija (NPVS x400)



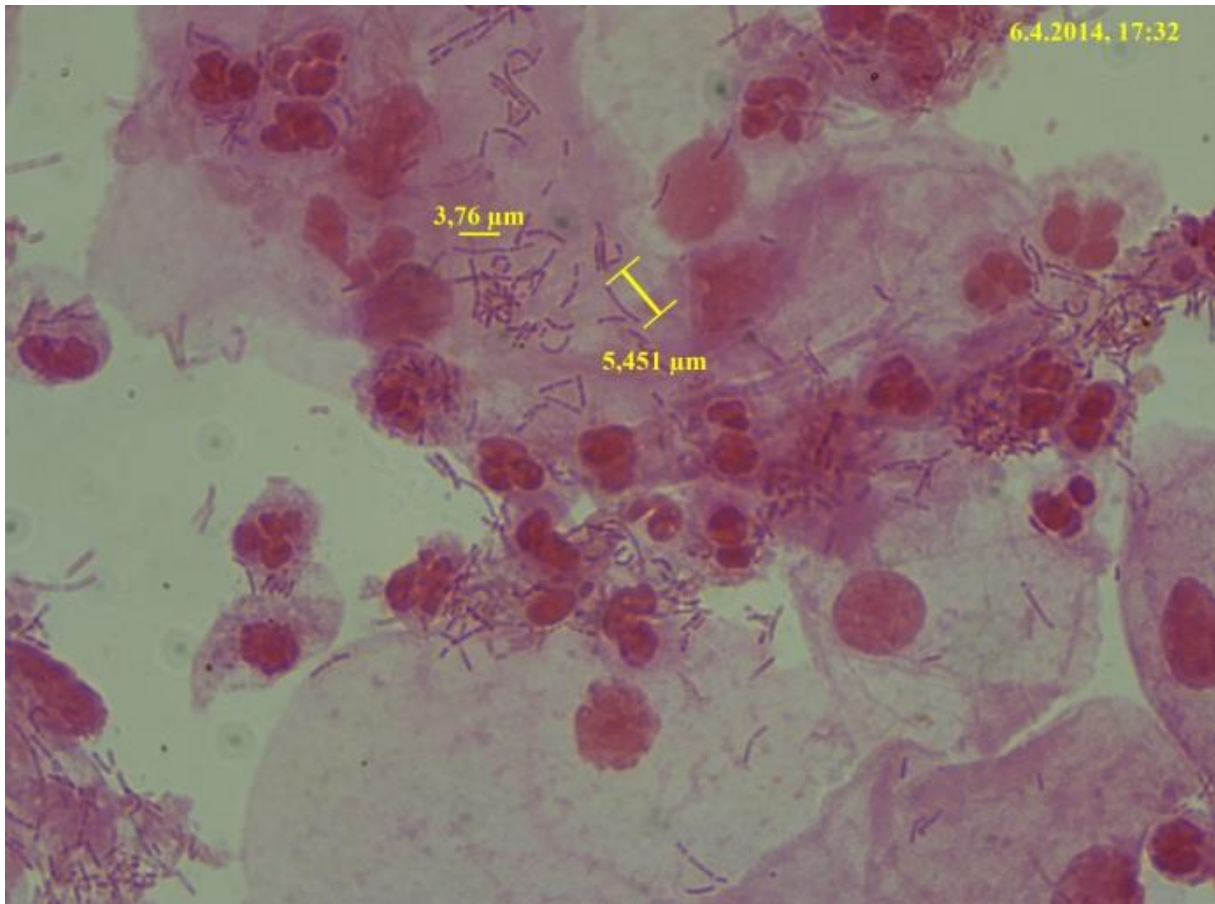
Slika 2.67 Polimorfonukleari grupa 3 (PMN 3):PMN prisutni na većini vidnih polja i njihov broj je značajno veći od broja epitelnih ćelija (NPVS x400)



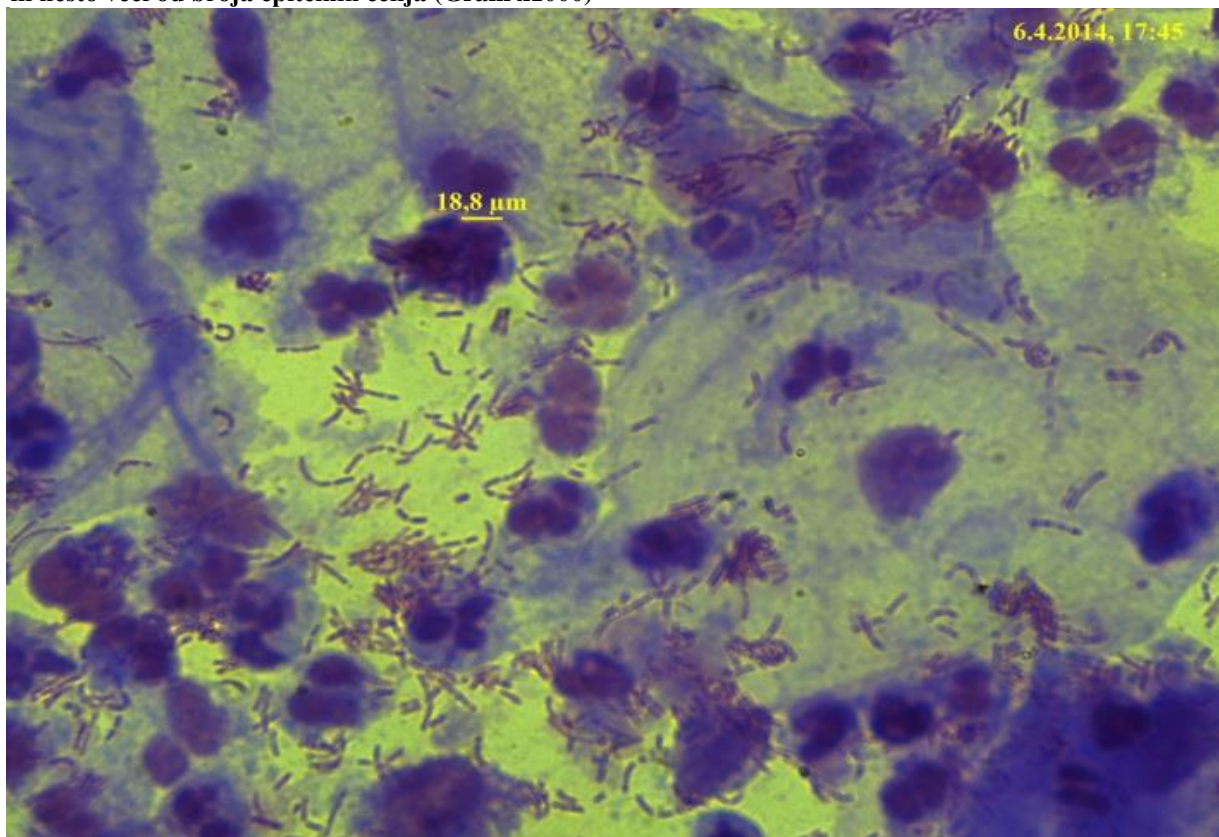
Slika 2.68: Polimorfonukleari grupa 0 ( PMN 0): na preparatu nema PMN ili je njihov broj značajno manji od broja epitelnih ćelija (Gram x1000)



Slika 2.69: Polimorfonukleari grupa 1 ( PMN 1): PMN su prisutni na preko 50% vidnih polja, ali je njihov broj manji od broja epitelnih ćelija (Gram x1000)



Slika 2.71: Polimorfonukleari grupa 2 (PMN 2): PMN se vide na većini vidnih polja i njihov broj je jednak ili nešto veći od broja epitelnih ćelija (Gram x1000)



Slika 2.70: Polimorfonukleari grupa 3 (PMN 3): PMN prisutni na većini vidnih polja i njihov broj je značajno veći od broja epitelnih ćelija (Gram x1000)

## 2.5 ODREĐIVANJE VIJABILNOSTI VAGINALNIH POLIMORFONUKLEARA

### Priprema uzoraka

Uzorci vaginalnih ispiraka su sakupljeni u fiziološkom rastvoru u konusne tube od 50 ml. Čelijski elementi uzoraka su sakupljeni centrifugiranjem na 1600 rpm 10 minuta a supernatant je odbačen. Na čelijski pelet je dodat 1ml kompletnog RPMI medijuma sa 2% fetalnog telećeg seruma (FCS, ICN, Costa Mesa, CA), Deo ćelija iz svakog uzorka je obojen 0.1% rastvorom tripan-plavog u PBS-u što je omogućilo brojanje ćelija u komori po Bürker-Türk-u na svetlosnom mikroskopu.

### Metode detekcije apoptoze vaginalnih PMN

Procenat apoptotskih PMN je određen na osnovu više metoda koje uključuju analize ćelija u ranom ili kasnom stadijumu apoptoze. Rani stadijumi apoptoze se odlikuju očuvanim membranskim potencijalom i ekternalizacijom fosfatidil serina. Krajnji stadijumi apoptoze se odlikuju kondenzacijom i fragmentacijom jedra kao i oslobađanjem apoptotskih tela. Stoga ćelije u krajnjem stadijumu imaju manju količinu DNK od vijabilnih, diploidnih ćelija.

### Metoda morfološke procene apoptoze

U prvom testu apoptoza PMN iz vaginalnog ispirka je određena morfološkom procenom na svetlosnom mikroskopu. Ova metoda uključuje bojenje ćelija rastvorom Turk-a u 0.1% sirćetnoj kiselini u fiziološkom rastvoru. Sirćetna kiselina fiksira i permeabilizuje ćelije, što omogućava boji da se interaguje sa hromatinom (kompleksom proteina i nukleinskih kiselina). Obojene ćelije su analizirane pod svetlosnim mikroskopom. Vijabilne ćelije su identifikovane na osnovu prisustva euhromatina a apoptotične na osnovu kondenzovanog heterohromatina i fragmentacije jedra.

Procenat apoptotičnih PMN je određen na osnovu ukupnog izbrojanih 500 ćelija po uzorku.

### Protočna citometrija

Druga metoda za određivanje procenta apoptotičnih PMN se zasniva na detekciji kasne faze apoptoze u kojoj ćelije formiraju apoptotska tela, te imaju hipodiploidnu količinu DNK u svom sastavu. Za detekciju ovog vida apoptoze korišćena je protočna citometrija, a ćelije su obojene propidijum jodidom (PI), fluorescentnom bojom koja se vezuje za DNK i na osnovu intenziteta fluorescence je moguće odrediti količinu DNK. Obzirom da su uzorke vaginalnih ispiraka činile različite ćelije (PMN, epitelne ćelije, mononukleari, bakterije i dr.), PMN su obeleženi pomoću anti-CD45 antitela i granuliranosti. Čelije su najpre isprane u PBS-u centrifugiranjem a na čelijski pelet je dodato anti-CD45-FITC antitelo (Invitrogen, USA) (1:10 u PBS), tokom narednih 45 minuta. Čelije su isprane, a zatim analizirane na protočnom citometru (Partec Cube

6). Na side scatter (SS)/CD45-FITC tačkastom dijagramu, PMN su obeleženi kao CD45 pozitivne ćelije, visoke granulozanosti. U cilju određivanja procenta apoptotičnih PMN, ćelijski pelet je resuspendovan u hipotonom rastvoru (0.1% Na-citrat, 0.1% Triton X u destilovanoj vodi) koji omogućava permeabilizaciju svih ćelija, živih i apoptotičnih. U 300 µl ćelijske suspenzije je dodat propidijum jodid (PI) (40 µg/ml) i uzorci su inkubirani 6 sati na sobnoj temperaturi ili preko noći u frižideru. Nakon inkubacije, ćelije su analizirane na protočnom citometru unutar regiona koji odgovara CD45<sup>+</sup>/SSlog<sup>jak</sup>o ćelijama. Unutar ove populacije ćelija analizirana je količina DNK, a ćelije sa hipodiploidnim nukleusom (sub-G0 pik) su identifikovane kao apoptotske ćelije.

Druga metoda za merenje apoptoze ćelija u najranijem stadijumu je određen pomoći Apoptosis Detection Kit (R&D Systems) koji omogućava detekciju eksternalizacije fosfatidil serina pomoću specifičnog solubilnog receptora Aneksina V. Pored toga dodat je i PI koji se vezuje za DNK, onda kada uđe u ćelije koje nemaju očuvan membranski potencijal. Na osnovu ovoga postupka je moguće proceniti procenat vijabilnih ćelija (Annexin V FITC-/PI-), rano apoptotskih (Annexin V FITC+/PI-), kasno apoptotskih/sekundarno nekrotičnih (Annexin V FITC\*/PI\*) i primarno nekrotičnih ćelija (Annexin V FITC-/PI\*). U ovoj metodi su ćelije su isprane u hladnom PBS-u i nakon toga resuspendovane u 1x vezujućem puferu (10mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>), a zatim centrifugirane 10 min na 1000 rpm. Nakon centrifugiranja, na 50µl ćelijske suspenzije je dodat propidijum jodid (40µg/ml) i Aneksin V FITC-a (10-100 µg/ml u skladu sa uputstvom proizvođača). Ćelije su zatim inkubirane u mraku na sobnoj temperaturi 15 min. Po isteku inkubacije, ćelijama je dodat vezujući pufer do ukupne zapremine od 300 µl, i uzorci su odmah analizirani na protočnom citometru. Kontrolne ćelije su bile obojene samo Annexin-V FITC-om ili samo PI u cilju određivanja prelivanja signala u susedne FL kanale.

#### Konfokalna mikroskopija

Pored toga, morfološka analiza apoptoze PMN je urađena konfokalnom mikroskopijom. Od ćelijske suspenzije su pripremljeni citospinovi pomoću citospin centrifuge, pri čemu je oko 1x10<sup>4</sup> resuspendovano u 100 µl PBS-a po uzorku. Nakon sušenja, ćelije su obojene pomoću anti-CD45-FITC antitela (1:10 razblaženje), inkubiranjem 1h u vodenom kupatilu. Ćelije su isprane u PBS, a zatim obojene PI. Nakon dvojnog obeležavanja ćelija, na uzorke je dodat medijum za sprečavanje fotoizbeljivanja i pokrovno stakalce. Uzorci su analizirani pod različitim uvećanjima skenirajućom laserskom konfokalnom mikroskopijom (Zeiss 510) koristeći podešavanja lasera i detektora karakteristična za FITC, odnosno PI. Osim toga, u cilju preciznije analize morfologije jedra, ćelije su u suspenziji obojeni PI, a zatim nakapani na

mikroskopsku pločicu i prekrivene pokrovnim stakalcem, nakon čega su direktno analizirane konfokalnom mikroskopijom.

Kvantitativno određivanje broja PMN u vaginalnom ispirku (QPMN-A).

U vaginalnom ispirku određivan je ukupan broj PMN tako što je najpre određen broj u 1 ml brojanjem ćelija u Neubarovoj komori nakon bojenja rastvorom Turka a zatim su dobijene vrednosti pomnožene sa 20 (ukupna zapremina vaginalnog ispirka). Pod mikroskopom polimorfonukleari (slobodni ili adherentni za epitelne ćelije) se morfološki jasno razlikuju od epitelnih ćelija i drugih elemenata. Srednji broj ćelija se izražava po  $\text{mm}^3$ .

Kvantitativno određivanje broja PMN iz vaginalnog brisa (QPMN-B)

Štapić kojim je uzet bris sa bočnog vaginalnog zida se stavlja u epruvetu sa 1 ml fiziološkog rastvora, ispere i iz epruvete se uzima 10  $\mu\text{l}$  tečnosti i dodaje u Neubaurovu fazno kontrastnu komoru za brojanje ćelija (dubina komore 0,01 mm) i uzorak odstoji 2-5 min. PMN se broje u svih 25 polja, u centralnom polju površine 1x1 mm ili dok se ne izbroji najmanje 100 PMN. Srednji broj ćelija se izražava po  $\text{mm}^3$ .

Mikrobiološke analize

Cervikalni bris na kulturu i antibiogram: sterilnim štapićem iz cervikalnog kanala uzima se bris koji se vraća u sterilnu suhu epruvetu (bez transportnog medijuma) i nosi u laboratoriju unutar 3 časa od uzimanja uzorka. Cervikalni bris za određivanje prisustva *M. hominis*, *U. urealyticum* i *C. trachomatis* uzima se sterilnim štapićem iz cervikalnog kanala, transportuje u laboratoriju unutar 2-3 h u odgovarajućoj podlozi. Kultivacija i identifikacija obavljena je na kulturi krvnog agra, na kojoj je identifikovana i *C. albicans* za čiju kultivaciju nije korišćena nikakva druga specijalna podloga.



## 2.6 ODREĐIVANJE KONCENTRACIJA ISPITIVANIH CITOKINA

Sterilni štapić se stavlja u cervikalni kanal, drži 60 s i potom vraća u sterilnu epruvetu tipa "Eppendorf", zapremine 1,5 ml, sa 1 ml RPMI medijuma (ICN, USA). Uzorak se transportuje u laboratoriju i po uklanjanju vrha štapića centrifugiran na 3000g, 15 min. na sobnoj temperaturi. Supernatant se do testiranja skladišti u sterilnoj suvoj epruveti, tipa "Eppendorf" zapremine 1,5 ml, na  $-70^{\circ}\text{C}$ . Prethodnim gravimetrijskim ispitivanjem na 20 trudnica utvrđeno je da je varijacija u količini sekreta grlića materice, uzetog na gore opisani način manja od 15%.

### **Određivanje koncentracije citokina citomiks testom**

Nivoi citokina IL-2, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 p70 i TNF $\alpha$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17a, IL-22 i IL-9 su određeni u uzorcima iz grlića materice korišćenjem Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22 13plex FlowCytomix Multiplex 96 tests (eBioscience, SanDiego CA, SAD). Pre početka obrade uzoraka pripremljeni su svi neophodni reagensi po uputstvu proizvođača. Esez pufer (assay buffer) je pripremljen rastvaranjem koncentrata sa destilovanom vodom u odnosu 1:10. Liofilizirani standardi su rekonstituisani dodavanjem destilovane vode čime je dobijena preporučena koncentracija za sve citokine, a potom su napravljena njihova dvostruka serijska razblaženja. Nakon pripreme standarda pripremljena je mešavina kuglica (bead mixture). Za analizu svakog citokina korišćena je određena vrsta imunofluorescentnih kuglica sa vezanim anti-citokinskim antitelima. Mešavina kuglica je pripremljena tako da ukupni volumen bude jednak proizvodu 25  $\mu\text{l}$  kuglica i ukupnog broja testova. Mešavina sekundarnih antitela konjugovanih biotinom spremljena je na sličan način kao i mešavina kuglica. Rastvor sa streptavidin-fikoeritriinom, koji se vezuje za biotinom-konjugovana sekundarna antitela, pripremljen je rastvaranjem u esej puferu. Nakon pripreme reagensa, u ploču od 96 mesta sa „V“-dnom (*Sardstedt*, Nemačka) dodavano je po 25  $\mu\text{l}$  standarda i uzoraka. Nakon toga dodato je po 25  $\mu\text{l}$  mešavine kuglica i po 50  $\mu\text{l}$  mešavine sekundarnih antitela konjugovanih biotinom. Usledila je inkubacija u trajanju od 2 sata na sobnoj temperaturi na mešalici. Po isteku inkubacije, u svaki bunarić je dodato po 100  $\mu\text{l}$  esej pufera i ploča je centrifugirana 5 minuta na 200xg. Nakon toga iz svakog bunara je uzeto po 150  $\mu\text{l}$  tečnosti. Potom je dodato po 150  $\mu\text{l}$  esej pufera i ploča je ponovo centrifugirana tokom 5 minuta na 200xg. Nakon uzimanja po 150  $\mu\text{l}$  tečnosti iz svakog bunara dodato je po 50  $\mu\text{l}$  rastvora sa streptavidin-fikoeritriinom i ploča je inkubirana 1 sat na sobnoj temperaturi na mešalici. Po isteku inkubacije ponovljen je prethodno opisan postupak ispiranja i sadržaj svakog bunarića je prebačen u epruvete za protočnu citofluorimetriju i svaka je dopunjena sa po 500  $\mu\text{l}$  esej pufera.

Uzorci su analizirani na protočnom citofluorimetru (EPICS XL-MCS, Coulter, Krefeld, Nemačka), a rezultati su obrađeni pratećim softverom (FlowCytomix Pro Software).

## **2.7 MERENJE DUŽINE GRLIĆA MATERICE**

Merenje dužine grlića materice rađeno je transvaginalnom sondom kod pacijentkinja sa praznom mokraćnom bešikom. Sonda se uvodi u prednji vaginalni forniks bez jačeg pritiska sondom na grlić materice, a ultrazvučna slika zauzima 75% ekrana. Debljina i ehogenost prednje i zadnje usne grlića su podjednake, vizualizuje se cervikalni kanal i meri dužina od unutrašnjeg do spoljašnjeg materičnog ušća. U slučaju proširenja unutrašnjeg materičnog ušća u obliku slova „V“ ili „U“ meri se njegova dužina („funnel length“), a posebno se beleži preostala dužina grlića materice, od dna slova „V“ ili „U“ pa do spoljašnjeg materičnog ušća. Tokom pregleda koji traje 2-3 minuta povremeno se pritisne fundus uterusa i procenjuje da li pri tome dolazi do dilatacije unutrašnjeg materičnog ušća. Vrše se tri merenja, a upisuje se najmanja vrednost. Nakon pregleda grlića materice radi su kompletan ultrazvučni pregled i utvrđuje starost trudnoće na osnovu biometrijskih parametara. Pacijentkinje sa grličem  $\leq 30$  mm smatrane su rizičnom grupom i svim pacijentkinjama je uvedena terapija 200 mg progesterona vaginalno 1 uveče, dok su pacijentkinje sa grličem  $\leq 20$  mm hospitalizovane u tercijarnu ginekološku ustanovu radi tokolitičke terapije i eventualne aplikacije serklaža.

## **2.8 STATISTIČKA ANALIZA**

Kompletna statistička analiza podataka izvršena je pomoću komercijalnog statističkog softvera IBM SPSS Statistics 17 (IBM, SAD). Veliki broj varijabli predstavljen je u vidu frekvencija pojedinih obeležja (kategorija), a statistička značajnost razlika proveravana je primenom Hi kvadrat testa.

Stepen slaganja između kategorijskih parametara (skala merenja) utvrđivan je putem indeksa *kapa*.

U slučaju kontinuiranih varijabli, podaci su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija (SD). Normalnost distribucije podataka utvrđivana je primenom Kolmogorov-Smirnov testa.

U zavisnosti od rezultata ovog testa, poređenja između grupa su vršena primenom analize varijanse u 1. pravcu (ANOVA) ili putem Kruskal-Walis testa. Naknadna *post hoc* poređenja izvedena su odgovarajućim testovima za poređenje parova.

Za procenu jačine povezanosti rizik faktora i klinički značajnih ishoda kao zavisnih varijabli, korišćena je binarna logistička regresija. Jačina povezanosti pojedinačnih rizik faktora i kliničkog ishoda prikazana je u vidu *odds* odnosa i njihovih 95%-nih granica poverenja.

Senzitivnost i specifičnost pojedinih parametara u diskriminaciji kliničkih ishoda određivana je tzv. ROC analizom.

Međusobna korelacija pojedinih bitnih parametara utvrđivana je primenom Spermanove korelacione analize.

Statistički značajna razlika procenjivana je na minimalnom nivou  $p < 0,05$ .

## 3 REZULTATI I DISKUSIJA

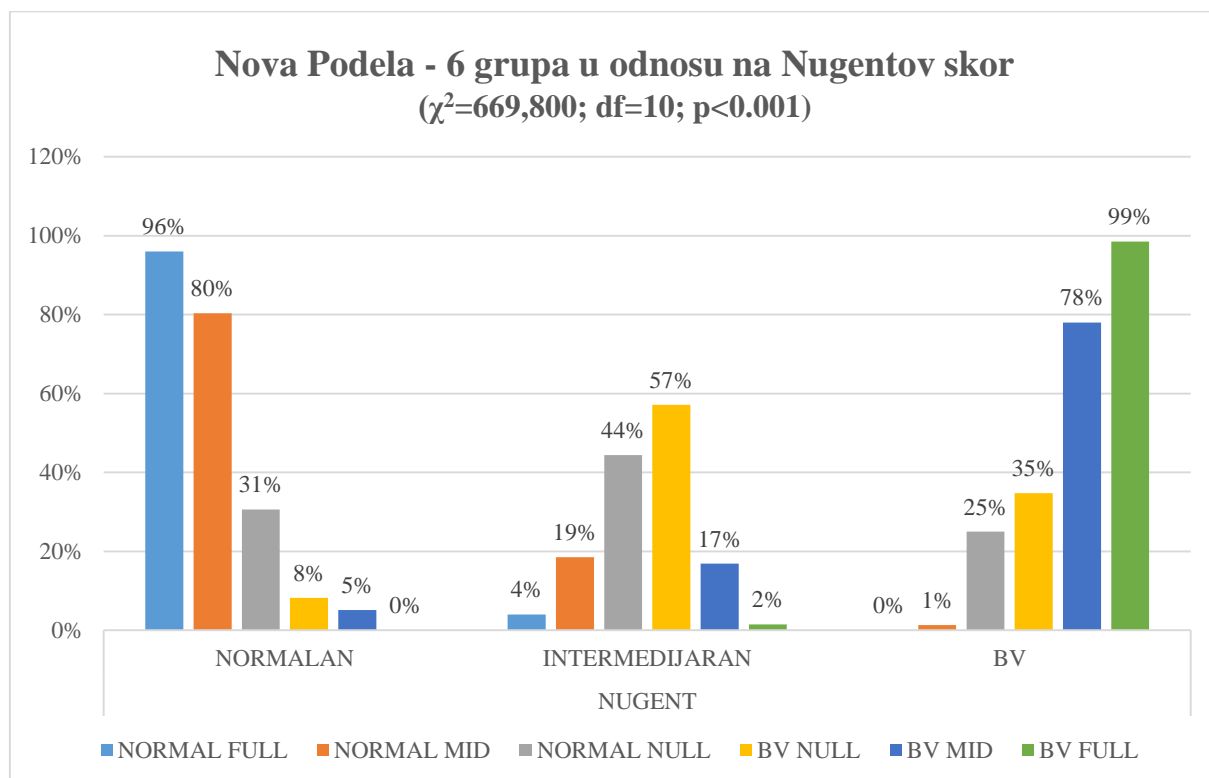
### 3.1 UPOREDNI REZULTATI - POSTOJEĆI DIJAGNOSTIČKI KRITERIJUMI U ODNOSU NA NOVU PODELU

#### 3.1.1 Poređenje rezultata–Nugentovi kriterijumi i NOVA PODELA

S obzirom da je u proceni stanja vaginalne flore korišten nova originalna metodologija smatrali smo da je najbolje da prvo proverimo njenu vrednost u odnosu na postojeće dijagnostičke kriterijume. Da još jednom posetimo da je suština i zajedničko za sve ove metode što se dijagnoza zdravo ili bolesno donosi na osnovu kvantitativnog ili semikvantitativnog odnosa laktobacilarnih i drugih bakterijskih morfotipova. Kako smo napomenuli u metodologiji NP-6G podela može da se transformiše u 2 ili 3 grupe (NP-2G i NP-3G) tako što se sve pacijentkinje iz grupa NF, NM i NN svrstaju u normalne, a pacijentkinje sa BVF, BVM i BVN u grupu BV. Tri grupe (NP-3G) dobijamo kad pacijentkinje iz grupe NN i BVN “proglasimo” intermedijarnim, a ostale četiri pretvorimo u normalne i BV. Kako su Nugentovi kriterijumi u najvećem broju studija zlatni standard u Tabeli 1 i Grafikonima 1 i 2 su prikazani uporedni rezultati dobijeni mikroskopskim pregledom preparata po Gramu na uvećanju x1000 na osnovu kriterijuma po Nugentu u odnosu na rezultate mikroskopskog pregleda preparata po Gramu na uvećanju x200 na osnovu nove podele na 6 grupa (NP-6G) i modifikacija i podele na tri (NP-3G) i dve grupe (NP-2G).

### 3.1.1.1 Uporedni rezultati – Nugentovi kriterijumi i NOVA PODELA - 6 grupa (NP-6G)

Na Grafikonu 3.1 (za detaljniji uvid pogledati Tabela 1, Prilog 1) prikazani su rezultati mikroskopskog pregleda (uvećanje X1000) na osnovu Nugentovih kriterijuma u kojima su sve pacijentkinje razvrstane u tri grupe normalan nalaz (NORMAL), intermedijaran nalaz (INTERMEDIJARAN) i bakterijska vaginoza (BV) i rezultati mikroskopskog pregleda preparata po Gramu (uvećanje X200) razvrstanih u 6 grupa.

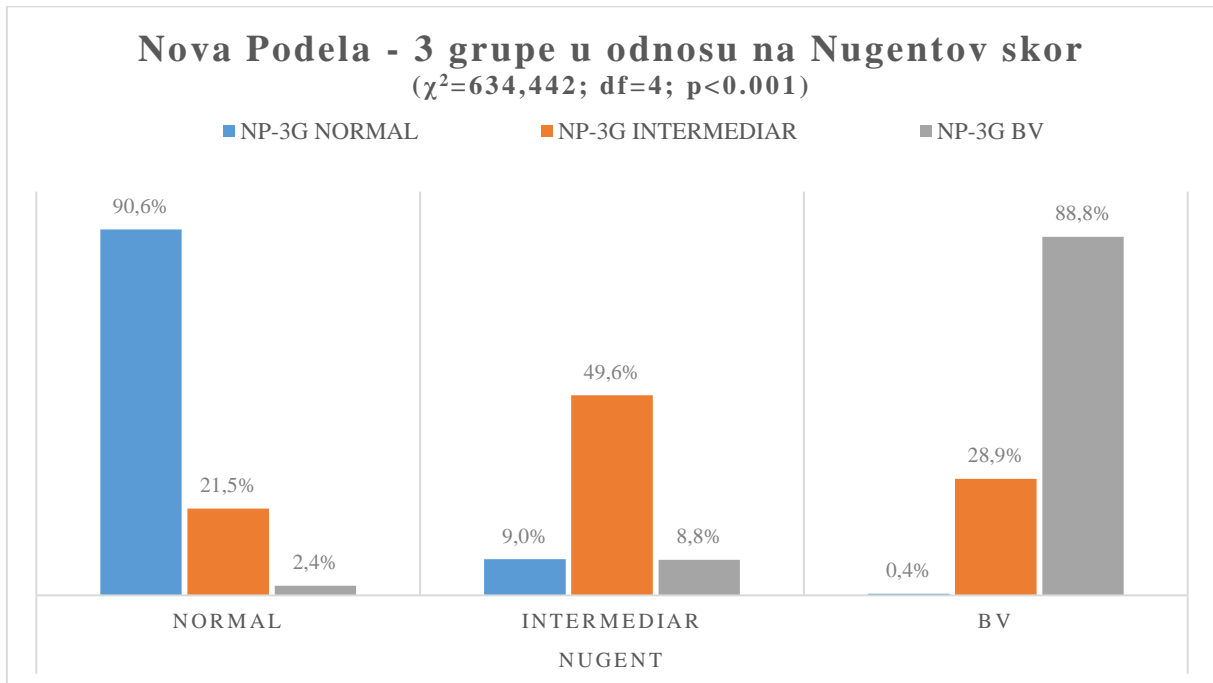


**Grafikon 3.1: Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Nugentu („zlatni standard“) i nove podele u 6 grupa (NP-6G)**

Primenom Hi kvadrat testa testirali smo asocijaciju između podele po Nugent i NP-6G. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je postojanje dobre asocijacije između rezultata dobijenih na osnovu Nugentovih kriterijuma i NP-6G ( $\chi^2=669,800$ ;  $df=10$ ;  $p<0.001$ ) (Grafikon 3.1; Tabela 1 Prilog 1). Ako posmatramo grupu sa normalnim nalazom, na očekivanih 61,1% najbolja asocijacija postoji između grupe sa normalnim nalazom (po Nugentu) i NF (NP-6G) 96,0% i NM 80,3%. Grupa sa intermedijarnim nalazom po Nugentu u odnosu na očekivanih 15,9% je dala značajnu asocijaciju sa BVN 57,1% i NN 44,4% respektivno. Grupa BV je u odnosu na očekivanih 21,0% najznačajniju asocijaciju pokazala sa BVF 98,5% i BVM 78,0%. Kao što smo već opisali u metodologija NP-6G pretvaramo u NP-3G tako što pacijentkinje iz BVN i NN grupe svrstavamo u grupu intermedijarnih, dok se NF i NM spajaju u NORMAL, a

BVF i BVM u BV. Iz Grafikona 3.1 se vidi da je preko 50% pacijentkinja iz Nugentove intermedijarne grupe na osnovu NP-6G svrstano u kategoriju NULL, hipocelularni (NN+BVN).

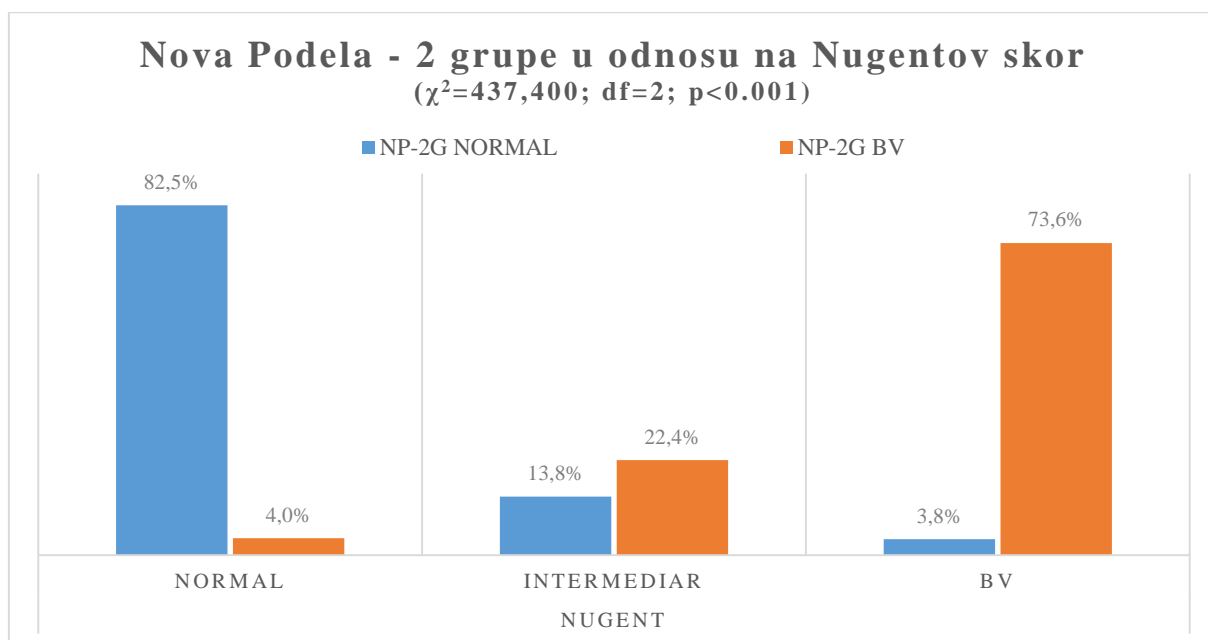
### 3.1.1.2 Uporedni rezultati – Nugentovi kriterijumi i NOVA PODELA - 3 grupe (NP-3G)



**Grafikon 3.2: Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Nugentu („zlatni standard“) i nove podele u 3 grupa (NP-3G)**

I ovde je najbolja asocijacija između pacijentkinja sa normalnim nalazom i onih sa bakterijskom vaginozom, a slabija kod pacijentkinja sa intermedijarnim nalazom (Grafikon 3.2; Tabela 2 Prilog 1).

### 3.1.1.3 Uporedni rezultati - Nugentovi kriterijumi i NOVA PODELA u 2 grupe (NP-2G)



**Grafikon 3.3:** Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Nugentu („zlatni standard“) i nove podele u 2 grupa (NP-2G)

Na Grafikonu 3.3 (Tabela 3, Prilog 1) su prikazani rezultati poređenja sa Nugentovim kriterijumima, kada se osnovna podela od 6 grupa svede na dve grupe, dakle samo pacijentkinje sa normalnim nalazom (NORMAL=NF+NM+NN) i bakterijskom vaginozom (BV=BVF+BVM+BVN). Na ovaj način se NP-6G na neki način svodi na Amselove dve grupe, normalne i BV. Ovo naglašavamo zbog činjenice da najveći broj do sada objavljenih studija poredi Nugentove i Amselove dijagnostičke kriterijume, a u tim poređenjima Nugentova intermedijarna grupa predstavlja njegovu veliku prednost. Ipak i pri ovakvoj podeli na samo dve grupe utvrđeno je postojanje dobre asocijacije. Ova slabija asocijacija i manja podudarnost nalaza upravo je posledica činjenice da Nugent ima intermedijarnu grupu i da se tako „rešava“ pacijentkinja sa graničnim nalazom, dok na osnovu Amselovih kriterijuma pacijentkinje definišemo ili kao normalne ili kao bolesne (BV). Ni isključivanje ovih pacijentkinja iz poređenja ne umanjuje Nugentovu prednost, jer tako isključujemo pacijentkinje koje su po Nugentu imale graničan nalaz, a ne neke druge koje bi po NP imale takav nalaz, odnosno koje bi svrstali u intermedijarnu grupu. Iz tabele se vidi da je 65% (73/112) pacijentkinja iz Nugentove intermedijarne grupe imalo normalan nalaz, a 35% BV na osnovu mikroskopskog pregleda preparata po Gramu na uvećanju X200. Ovi procenti su u skladu sa nalazima drugih autora koji smatraju da oko 30% pacijentkinja iz Nugentove intermedijarne grupe ima patološki nalaz.

Na osnovu iznesenih podataka možemo zaključiti da je statističkom obradom (Hi-kvadrat testa) pokazana dobra asocijacija nove metodologije (NP-6G, NP-3G i NP-2G) u odnosu na Nugentovu podelu (zlatni standard) i da se kao takva može uspešno koristiti u dijagnozi BV. Iz Tabele 2, Prilog 1 u kojoj su pacijentkinje podeljene u tri identične grupe (NP-3G) kao i kod Nugenta vidi se da je od 458 pacijentkinja sa normalnim nalazom nalaz bio podudaran kod njih 415 (90,6%) dok je kod 41 pacijentkinje na osnovu Nugentovih kriterijuma nalaz bio intermedijaran, a mi smo ih svrstali u grupu normalnih. Dve pacijentkinje sa BV po Nugentu, na osnovu mikroskopskog preparat po Gramu na uvećanju x200 imale normalan nalaz. Visoka podudarnost nađena je i u grupi pacijentkinja sa BV 88.8% (111/125), dok je najmanja podudarnost nađena u intermedijarnoj grupi(49.6%).

Tako ako pogledamo Tabelu 1, Prilog 1 i Grafikon 3.1 vidimo da su je podudarnost Nugentovih normalnih nalaza i grupe NF 96%, a u grupi BVF 98% i da ovaj procenat opada u grupama NM i BVM i iznosi 80 % i 78%, a da je najmanji u grupama NN i BVN 30% i 34%, respektivno. Ovakva podela (NP-6G) dozvoljava nam da zaključimo da su pacijentkinje sa NF i BVF jasno definisane kategorije, i da je nezavisno od toga koju metodologiju koristili teže je pogrešiti, nego postaviti tačnu dijagnozu. Ovo je najlakše shvatiti ukoliko pogledate fotografija na kojima su prikazane pacijentkinje sa BVF i NF preparat po Gramu ili NPVS. Kod pacijentkinja koje po metodologiji NP-6G imaju nalaz NM ili BVM podudarnost je nešto manja i kreće se oko 80%, što takođe govori da su i ove dve grupe pacijentkinja dobro definisane i da je podudarnost visoka.

Uzeto zajedno ovo nam govori da su ove dve grupe u kojima se u konkretnom slučaju nalazi 84% (592/704) pacijentkinja u stvari razlog što su rezultati visoko podudarni nezavisno od toga koju od pomenutih metoda koristite. Međutim ukoliko pogledamo grupu koju Nugent definiše kao intermedijaran nalaz, a kojoj po NP-6G pripadaju pacijentkinje NN i BVN, onda vidimo da je tu podudarnost značajno manja, i da je glavni izvor dijagnostičkih neslaganja. Ovaj zaključak je na prvi pogled isti kao onaj naveden u poređenju Nugenta i NP-3G, gde je intermedijarna grupa glavni izvor neslaganja, međutim da smo zadržali NP-3G, ne bi imali po nama najvažniji podatak, a to je da su pacijentkinje sa malim brojem bakterijskih formi (naša kategorija NULL), osnovni izvor dijagnostičkih neslaganja.

Dakle, na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da postoji dobra asocijacija između nove podele, bilo u njenoj osnovnoj varijanti (NP-6G) ili njenim modifikacijama (NP-3G i NP-2G), i Nugentovih kriterijuma kao zlatnog standarda u dijagnozi BV, odnosno da se NOVA PODELA može uspešno koristiti u dijagnozi BV. Ovako dobra asocijacija je rezultat visoke

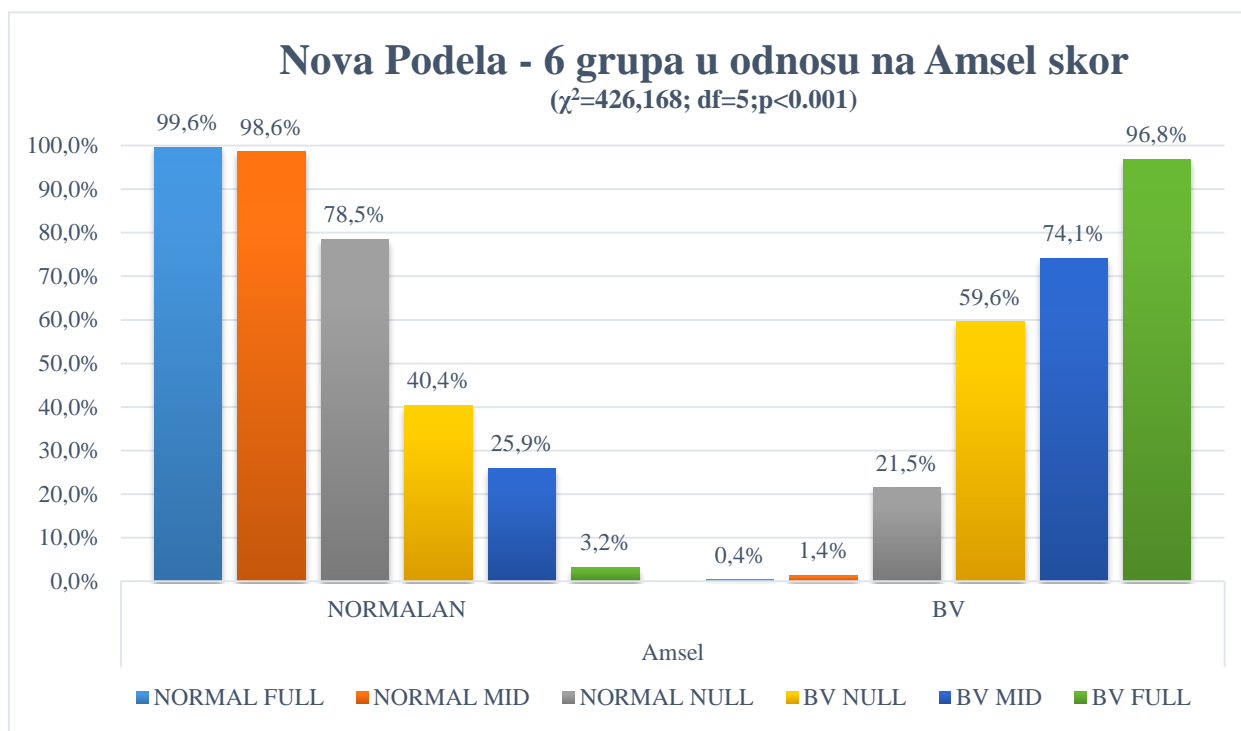


podudarnosti rezultata u grupama NN, NM, BVF i BVM i Nugentovih pacijentkinja sa normalnim nalazom i BV. S obzirom da ove grupe i čine najveći deo ispitivane populacije oni u ukupnoj statističkoj obradi “brišu” (skrivaju) podatke o značajnim neslaganjima kod pacijentkinja iz Nugentove intermedijarne grupe. I na kraju NP-6G je omogućila da ukažemo na činjenicu da najveći broj pacijentkinja iz Nugentove intermedijarne grupe su u stvari pacijentkinje sa malim brojem bakterijskih formi, te da su one suštinski osnovni izvor dijagnostičkih nepodudarnosti (o ovome ćemo detaljno raspravljati u poređenju podele po Ison/Hay-u i NP-6G).

### **3.1.2 Poređenje rezultata - Amselovi kriterijumi i NOVA PODELA**

Mislimo da će Amselovi kriterijumi uskoro postati obavezni u projektu mikrobioma vagine. Razlozi za takav naš stav su pre svega u činjenici da danas ni mikrobiolog ni molekularni biolog u najvećem broju slučajeva ne mogu postaviti dijagnozu BV, ukoliko ne znaju i klinički nalaz. Da je tako govore i rezultati iz Ravelove [180] studije u kojoj od 396 asimptomatskih pacijentkinja laktobacili nisu nađeni kao dominantna flora kod 27%, a na osnovu Nugentovih kriterijuma 24% je imalo BV. Pitanje je da li su one zdrave žene, bez dominacije laktobacila ili imaju asimptomatsku BV. U ispitivanju je određivan i pH vagine, ali nije rađena proba sa 10% KOH, niti klinički pregled pacijenta, odnosno nije mogla biti postavljena dijagnoza BV na osnovu Amselovih kliničkih kriterijuma (pozitivna tri od četiri znaka). Sigurni smo da bi ova dva znaka takođe značajno doprinela u raspoznavanju “zdrave” i “patološke” vaginalne flore i tako doprinela i boljem tumačenju rezultata molekularnobiloskih analiza. Tako je poznato da neki od članova vaginalne flore imaju značajan uticaj na vaginalni pH, dok su neke druge odgovorne za produkciju supstanci koje su uzrok neprijatnog mirisa ribe koji se intenzivira probom sa 10% KOH, ali takođe je poznato da neki drugi poremećaji vaginalne flore kao što je aerobni vaginitis (AV) uzrokuju neprijatan miris i bez probe sa 10% KOH. Tako bi na primer, AV mogao biti odgovoran za lažno pozitivan test sa 10% KOH kod pacijentkinja koje na mikroskopskom nalazu nemaju “sliku” BV [382]. Ipak, jedan najvećih nedostatak Amselovih dijagnostičkih kriterijuma je što pacijentkinje sa različitim poremećajima vaginalne flore svrstava samo u dve grupu.. Zato mislimo da bi budući nalazi NPVS trebali da razlikuju mikroskopski nalaz na osnovu sličnih metodoloških principa kao što je to urađeno u NP-6G, dakle semikvantitativna procena odnosa ŠF i NŠF, uz detekciju drugih bakterijskih morfotipova i PMN, i naravno promenu kriterijuma u kojima su CC preduslov za dijagnozu BV.

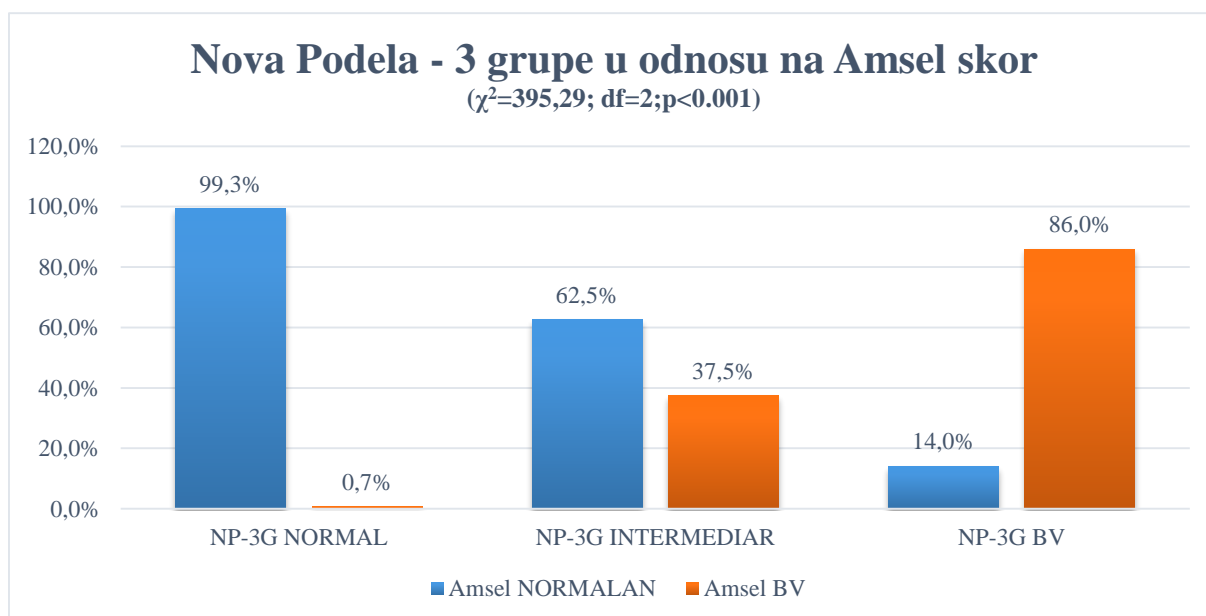
### 3.1.2.1 Uporedni rezultati - Amselovi kriterijumi i NOVA PODELA - 6 grupa (NP-6G)



**Grafikon 3.4:** Uporedni rezultati dijagnoze na osnovu Amselovih kliničkih kriterijuma (klinički „zlatni standard“) i nove podele u 6 grupa (NP-6G)

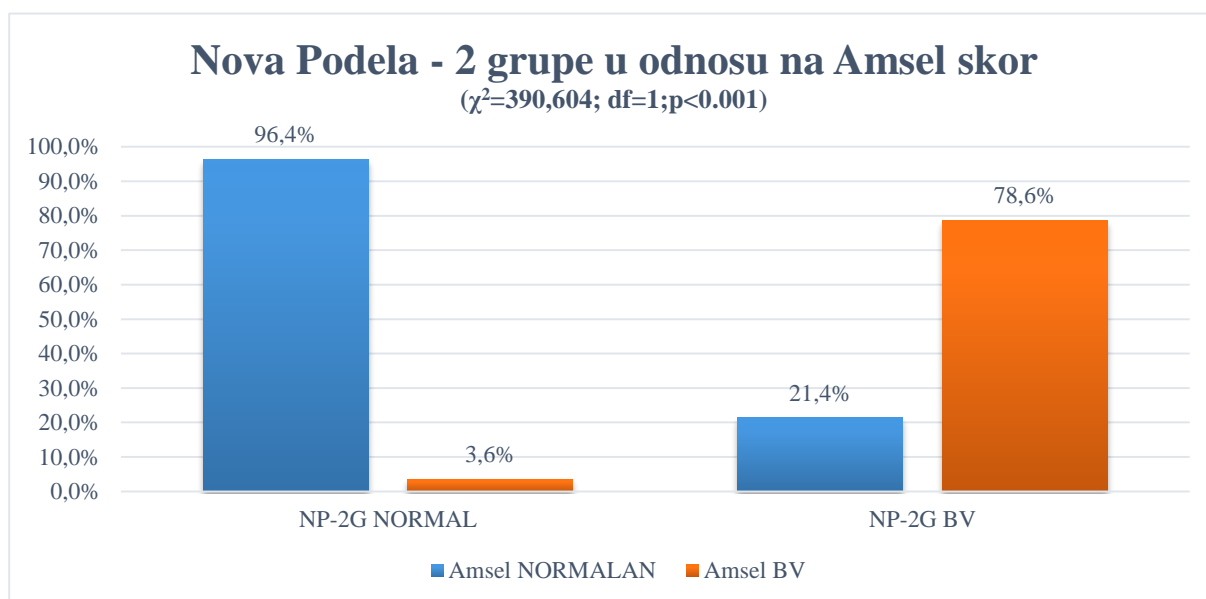
Na Grafikonu 3.4 (Tabela 4, Prilog 1) prikazani su uporedni rezultati dijagnoze na osnovu Amselovih kliničkih kriterijuma i NP-6G ( $\chi^2=426,168$ ;  $df=5$ ;  $p<0.001$ ).

### 3.1.2.2 Uporedni rezultati - Amselovi kriterijumi i NOVA PODELA - 3 grupe (NP-3G)



**Grafikon 3.5:** Uporedni rezultati dijagnoze na osnovu Amselovih kliničkih kriterijuma (klinički „zlatni standard“) i nove podele u 3 grupe (NP-3G)

Na Grafikonu 3.5 (Tabela 5, Prilog 1) prikazani su uporedni rezultati dijagnoze na osnovu Amselovih kliničkih kriterijuma i NP-3G ( $\chi^2=395,29$ ;  $df=2$ ;  $p<0.001$ ).



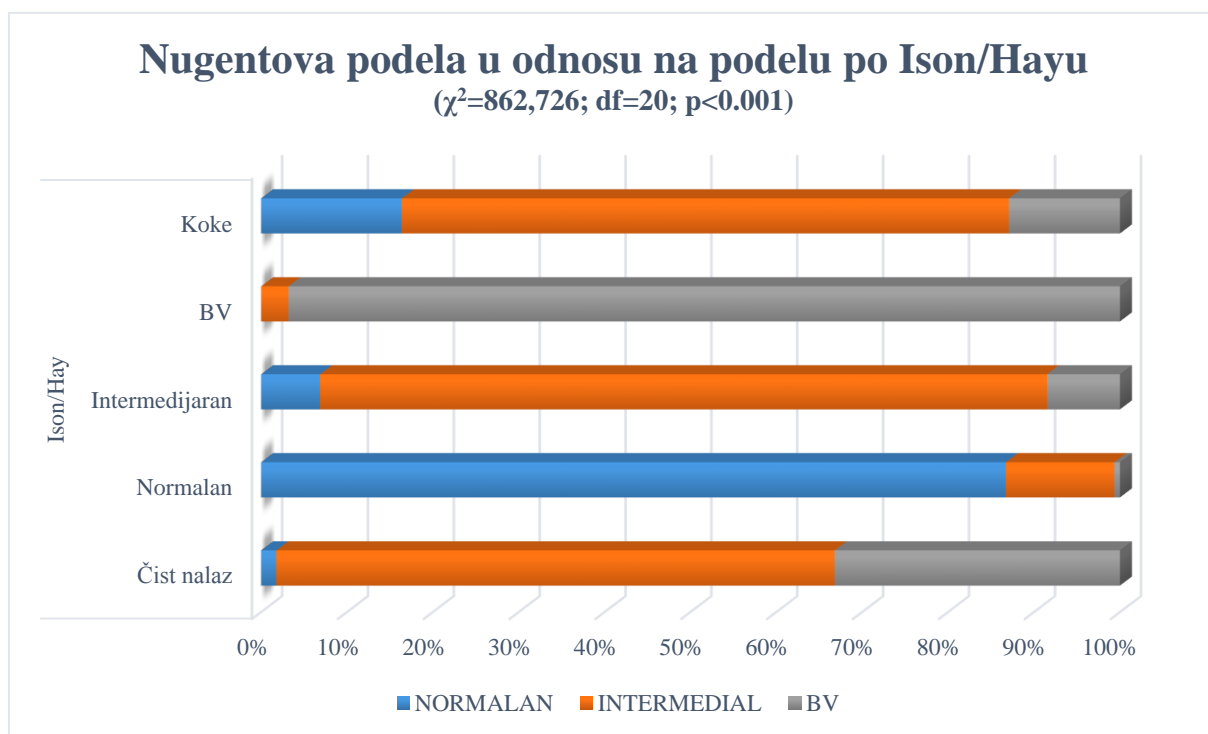
**Grafikon 3.6: Uporedni rezultati dijagnoze na osnovu Amselovih kliničkih kriterijuma (klinički „zlatni standard“) i nove podele u 2 grupa (NP-2G)**

Analizom Grafikona 3.6 i Tabele 6 (Prilog 1) se vidi da je od 641 pacijentkinje uključene u ovu analizu, kod njih 17 (3,6%) na osnovu Amselovih dijagnostičkih kriterijuma postavljena dijagnoza BV, a na osnovu NP-2G one su imale normalna nalaz (lažno negativne), a 36 (21,4%) pacijentkinja sa normalnim nalazom po Amselu, imalo BV na osnovu NP-2G (lažno pozitivne). Tako je senzitivnost: 88,6%,specifičnost: 92,6%;PPV:78,5%,NPV 96,4%, a sveukupna tačnost u odnosu na Amsela kao zlatni standard iznosila je 91,7%. Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da je NP-6G; NP-3G; NP-2G pokazala dobro slaganje i sa kliničkim zlatnim standardom i da se kao takva može koristiti u dijagnozi BV.

### 3.1.3 Poređenje rezultata - kriterijumi po Nugentu, Ison/Hayu i NOVA PODELA

#### 3.1.3.1 Uporedni rezultati - kriterijuma po Ison/Hayu i Nugentu

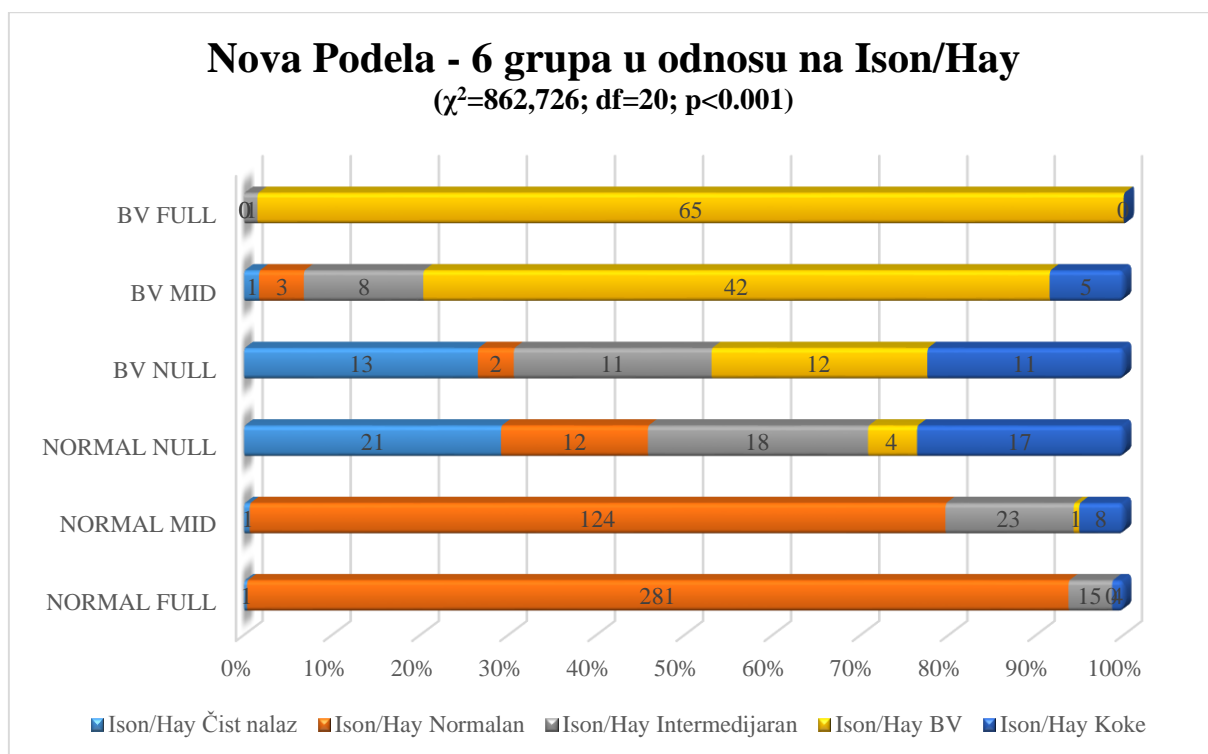
Podela po Ison/Hayu, pored Nugentove tri, ima još dve grupe pacijentkinja. Prve su pacijentkinje označene u tabeli kao “čist nalaz” i koje se karakterišu nedostatkom bakterijskih formi, a druga grupa su pacijentkinje u kome na preparatu predominiraju koke, pa su tako obeležene u tabeli (vidi Metodologiju).



**Grafikon 3.7: Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Ison/Hayu i Nugentu**

Ako pogledamo Grafikon 3.7 (Tabela 7, Prilog 1) videćemo da su neke od pacijentkinja iz Nugentovih grupa raspoređene u nove dve grupe (“čiste” i “koke”) kriterijuma po Isonu i Hayu. Ako bi, npr. u ovom ispitivanju određivali koncentracije citokina i pri tome koristili podelu po Nugentu rezultati koje bismo dobili mogli bi značajno da se razlikuju u odnosu na rezultate koje bi dobili kada bi iste pacijentkinje razvrstali na osnovu podele po Ison/Hayu jer bi na taj način oko 10% od ukupnog broja pacijentkinja za Nugenta bilo “nepoznato”, a po Ison/Hayu bi predstavljali dve nove grupe. Drugo, utvrđivanje podudarnosti ova dva metoda u dijagnostici BV na osnovu vrednosti kappa indeksa podrazumeva da se moramo “rešiti” ove dve grupe, tako što ćemo ih isključiti iz poređenja ili pripojiti pacijentkinjama koje nemaju BV, dakle ili normalnim ili intermedijarnim. Treće, treba uočiti da je polovina ovih pacijentkinja iz Nugentove intermedijarne grupe. Na kraju, nejasno je zašto ovakva podela koja je ne samo jednostavnija i brža od Nugentove, nego i ukazuje na dve nove grupe pacijentkinja nikada nije našla širu primenu ni u kliničkom radu, a ni u istraživačkim studijama. O ovome ćemo još diskutovati kada prikazemo uporedne rezultate podele po Ison/Hayu i NP-6 i 3G.

### 3.1.3.2 Usporedni rezultati - kriterijumi po Ison/Hayu i NP-6G



**Grafikon 3.8: Usporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Ison/Hayu i nove podele u 6 grupa (NP-6G)**

Važno je na Grafikonu 3.8 (Tabela 8, Prilog 1) uočiti da od 37 pacijentkinja koje su na osnovu kriterijuma po Ison/Hayu bile svrstane u grupu “čist nalaz” njih 34 (92%) nalaze u grupama NN (n=21) i BVN (n=13). Preostale tri pacijentkinje u grupama NF, NM i BVM možemo objasniti samo gledanjem male površine na uvećanju x1000 i da smo gledali deo preparata koji je siromašan bakterijskim formama odnosno čist, dok podatak da nijedna pacijentkinja nije nađena u grupi BVF samo potvrđuje činjenicu da je broj bakterijskih formi u ovakvim stanjima i 1000 puta veći, tako da je praktično nemoguće naći deo preparata koji je “čist”. U Grafikonu su prikazani isti rezultati kada je NP svedena na 3 grupe. Dakle, da smo se u našem ispitivanju iz praktičnih razloga odlučili da pacijentkinje podelimo u 3 grupe (lakše poređenje sa Nugentom) onda bi iz ovih tabela videli da su 34 pacijentkinje iz grupe čist nalaz po Ison/Hayu svrstane u intermedijarnu grupu na osnovu NP-3G. Na ovaj način nalaz intermedijarne grupe ostao bi na neki način nedefinisan, kao što je to slučaj kod Nugentove podele. Dakle mi znamo da se radi o pacijentkinjama sa nalazom koji je između normalnog i BV, ali nemamo pred očima mikroskopsku sliku takvog nalaza. Novom podelom na 6 grupa koja se zasniva na semikvantitativnoj proceni ŠF i NŠF mi definišemo ovu grupu pacijentkinja i sad znamo da su to u 92% slučajeva pacijentkinje iz grupa BVN i NN, dakle one sa malim brojem ŠF i NŠF, što odgovara čistom nalazu po Ison/Hayu. Međutim u NP-6G 72 pacijentkinje su svrstane u grupu

NN, a njih 49 u BVN, dakle ovakvom podelom je 121 pacijentkinja svrstana u grupu NULL, koja bi teoretski trebala da se slaže sa grupom “čist nalaz” u podeli po Ison Hayu. Trostruko veći broj pacijentkinja u NP-6G je verovatno posledica s jedne strane procene šta u originalnim kriterijumima podrazumeva autor kada kaže da su prisutne samo EĆ bez bakterijskih formi. Na osnovu našeg iskustva, mikroskopski preparat samo sa EĆ a bez bakterijskih formi praktično ne postoji. Moguće je, kada se gleda mala površina preparata, kao što je to slučaj sa uvećanjem na x1000, da se naiđe na deo preparata koji je stvarno bez bakterijskih morfotipova i potpuno čist, ali su ovakva vidna polja prava retkost. Gledanjem veće površine preparata uvek će biti više vidnih polja sa malim brojem bakterijskih formi u odnosu na polja na kojima uopšte nema bakterija. Ovih 37 pacijentkinja koje su svrstane u grupu čist nalaz u stvari su pacijentkinje kod kojih smo mi na 20 VP na uvećanju x1000 nalazili najmanji broj bakterija. S druge strane, kada bi umesto podele NP-6G koristili podelu po Ison-Hayu i gledali preparat na uvećanju x200 i x1000 onda bismo većinu pacijentkinja iz grupe NN i BVN definisali kao čist nalaz.

Dakle, Ison/Hay su poodavno ukazali na ovu grupu pacijentkinja koju godinama potpuno ignorišemo i mi nismo našli nijedan rad koji se ozbiljnije bavi ovakvim mikroskopskim nalazom. S druge strane, naše ispitivanja pokazuju da ovakva grupa pacijentkinja ne samo da postoji, nego čini oko 17,2% (121/704) od ukupnog broja pacijentkinja. Jedan od razloga što ova grupa pacijentkinja nikada nije ozbiljnije analizirana svakako je i činjenica da najveći broj studija koristi Nugentove kriterijume kao zlatni standard u dijagnozi BV. Ako pogledamo Tabelu 6 u kojoj su dati uporedni rezultati po Ison/Hayu i Nugentu, videćemo da je i tu najveći broj pacijentkinja sa čistim nalazom svrstan u intermedijarnu grupu (n=21) ili BV (n=14), dok su samo dve pacijentkinje bili u grupi normalnih nalaza. Iz ovih rezultata, kao i iz rezultata NP-6G, mogli bismo posredno da zaključimo da najveći broj pacijentkinja sa Nugentovim intermedijarnim nalazom u stvari pripada kategoriji pacijentkinja sa malim brojem bakterijskih formi. Ovo na neki način i objašnjava “nelogičnosti” i uske intervale u Nugentovom bodovanju i zbrajanju. Tako u originalnim Nugentovim kriterijuma (bez modifikacije zbog površine vidnog polja mikroskopa) :

0 bodova → prosečno = 0;

1 bod →  $0 < \text{prosečno} \leq 1$ ;

2 boda →  $1 < \text{prosečno} \leq 4$ ;

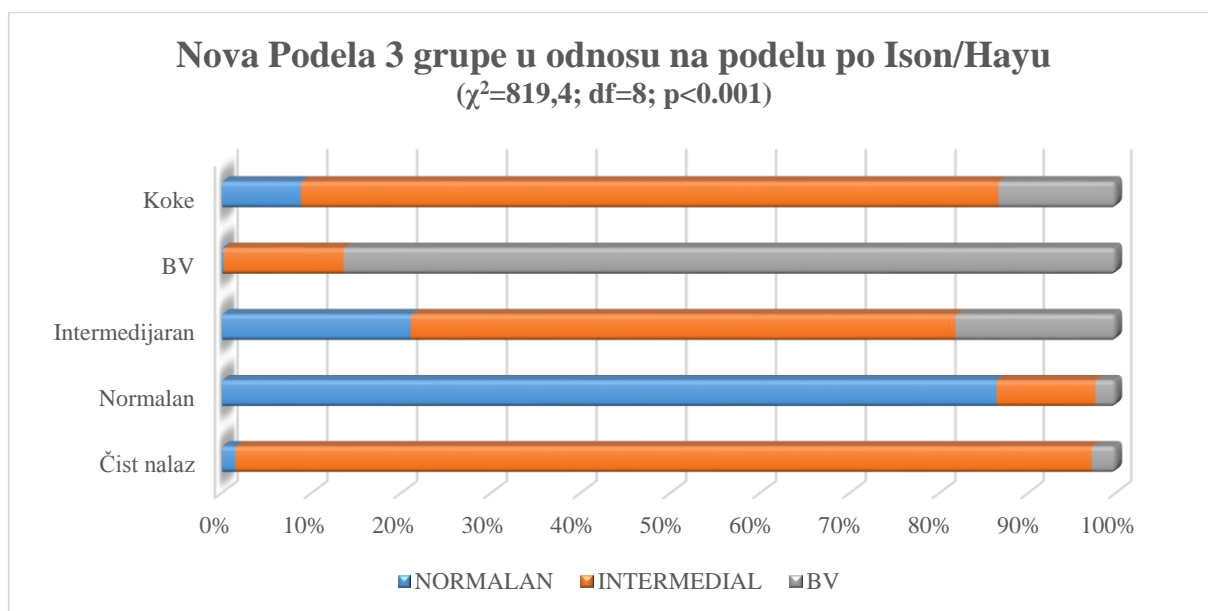
3 boda →  $4 < \text{prosečno} \leq 30$ ;

4 boda →  $> 30$ .

Brojanje se vrši na 5-10 vidnih polja uvećanja x1000 zabeleženo kao interval na ordinarnoj skali (raspona od 0-100 0000 bakterija po vidnom polju), a procena broja bakterija

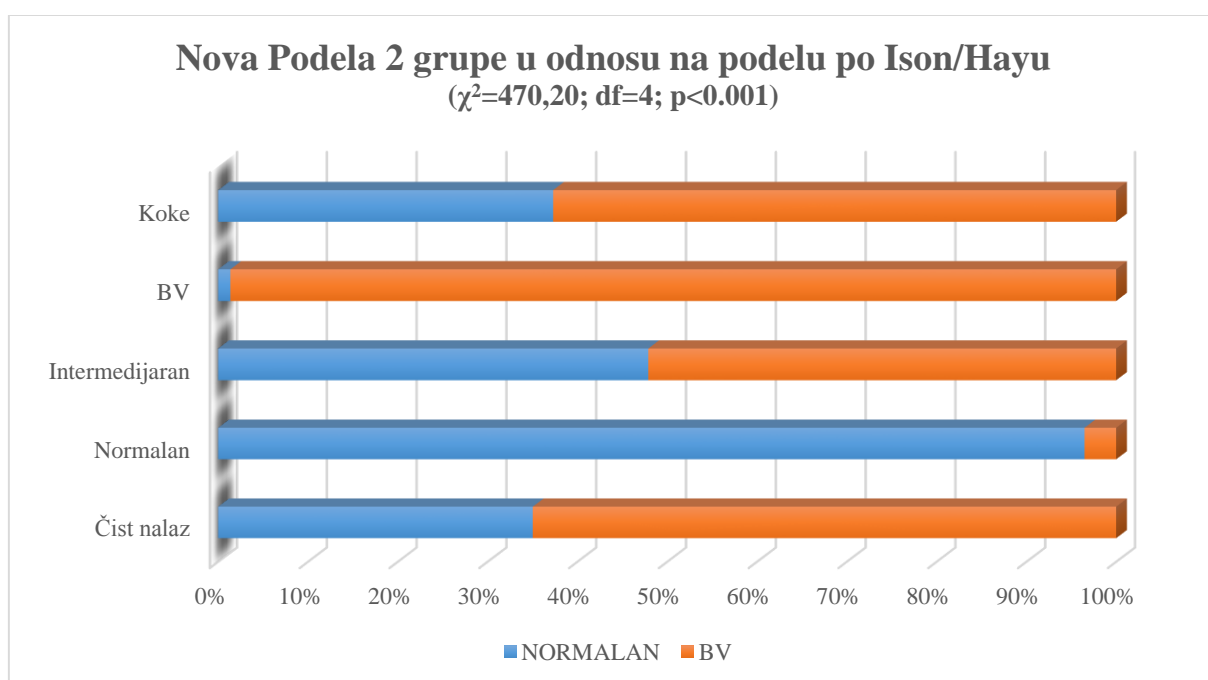
u intervalima rađena je pretpostavljajući da broj bakterija od 1-30 izbrojan na delu vidnog polja može da se koristi za približnu procenu broja bakterija na celom vidnom polju. Nelogično u ovoj Nugentovoj podeli je to što pacijentkinje sa 4 ili manje bakterijskih formi nose 0, 1 i 2 boda, dok se preko 4 i preko 30 dodeljuju 3 i 4 boda. Dakle, 0 bodova će dobiti samo ona pacijentkinja kod koje na 5 vidnih polja nismo našli ni jedan bakterijski morfotip: ako se radi o laktobacilima onda je to 4+, a ako se radi o drugim morfotipovima onda je to 0 u konačnom zbiru za Nugenta. Dakle, ako zamislimo nalaz koji Ison/Hay svrstavaju u grupu “čisti nalaz” i na 5 VP ne nađemo ni jedan laktobacil pacijentkinja će dobiti 4 boda, ako smo na tih 5 VP našli da je srednji broj morfotipa gardnerele veći od 4 (dakle ukupno 21 bakterijski morfotip;  $21/5=4,2$ ) pacijentkinja će dobiti još 3 boda, dakle ukupno 7 i po Nugentu će biti svrstane u grupu sa BV. Ukoliko smo opet izbrojali 20 bakterijskih morfotipova onda će srednja vrednost biti jednaka 4 i pacijentkinja će dobiti 2 boda i po Nugentu biti svrstana u intermedijarnu grupu. Ipak, glavna karakteristika ovakvih nalaza je mali broj bakterijskih morfotipova. Verujemo da je to mnogo važniji podatak od toga da li ćemo i koliko bakterijskih morfotipova izbrojati i postaviti dijagnozu normalan, intermedijaran ili BV jer u koju god od tih grupa da je svrstamo, dominantan mikroskopski nalaz je niska celularnost, odnosno mali broj bakterijskih formi. Ono što još više umanjuje vrednost ovakvog “brojanja” svakako su već nekoliko puta ponavljani podaci koji se odnose na nemogućnost mikroskopskog razlikovanja *G. vaginalis* i *L. inersa*, kao i podataka koji se odnose na malu površinu pregledanog preparata. Rezultati našeg ispitivanja ukazuju da grupa pacijentkinja koju su Ison/Hay definisali kao “čist nalaz”, a koja u NP obuhvata pacijentkinje iz grupa NN i BVN, u budućim ispitivanjima treba da se posmatra kao posebna grupa pacijentkinja.

### 3.1.3.3 Uporedni rezultati - kriterijumi po Ison/Hayu i NP-3G



**Grafikon 3.9: Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Ison/Hayu i nove podele u 3 grupe (NP-3G)**

Na Grafikonu 3.9 (Tabela 9, Prilog 1) prikazani su uporedni rezultati dijagnoze na osnovu Ison/Hay kliničkih kriterijuma i NP-3G ( $\chi^2= 819,4$ ;  $df=8$ ;  $p<0.001$ ).



**Grafikon 3.10: Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Ison/Hayu i nove podele u 2 grupa (NP-2G)**

Na Grafikonu 3.10 (Tabela 10, Prilog 1) prikazani su uporedni rezultati dijagnoze na osnovu Ison/Hay kliničkih kriterijuma i NP-2G ( $\chi^2=470,20$ ;  $df=4$ ;  $p<0.001$ ).



### 3.1.4 Poređenje rezultata – Claeyasu, Nugentu; Ison/Hayu i Nova Podela

Ako pogledamo Tabele i Grafikone i uporedimo ih sa podelom po Nugentu ili Ison/Hayu videćemo, iako sve tri podele imaju grupe sa BV, intermedijarnim i normalnim nalazom, da se broj pacijentkinja u tim grupama razlikuje jer podela po Ison/Hayu ima još dve, a po Claeyasu još tri nove grupe pacijentkinja. Takođe treba primetiti da u podeli po Claeyasu nema grupe koja bi odgovarala grupi sa čistim nalazom po Ison/Hayu, da su četiri grupe identične u odnosu na iste autore, a da su uvedene dve nove grupe, “sličan normalnom” i “leukoreja” (vidi Metodologiju).

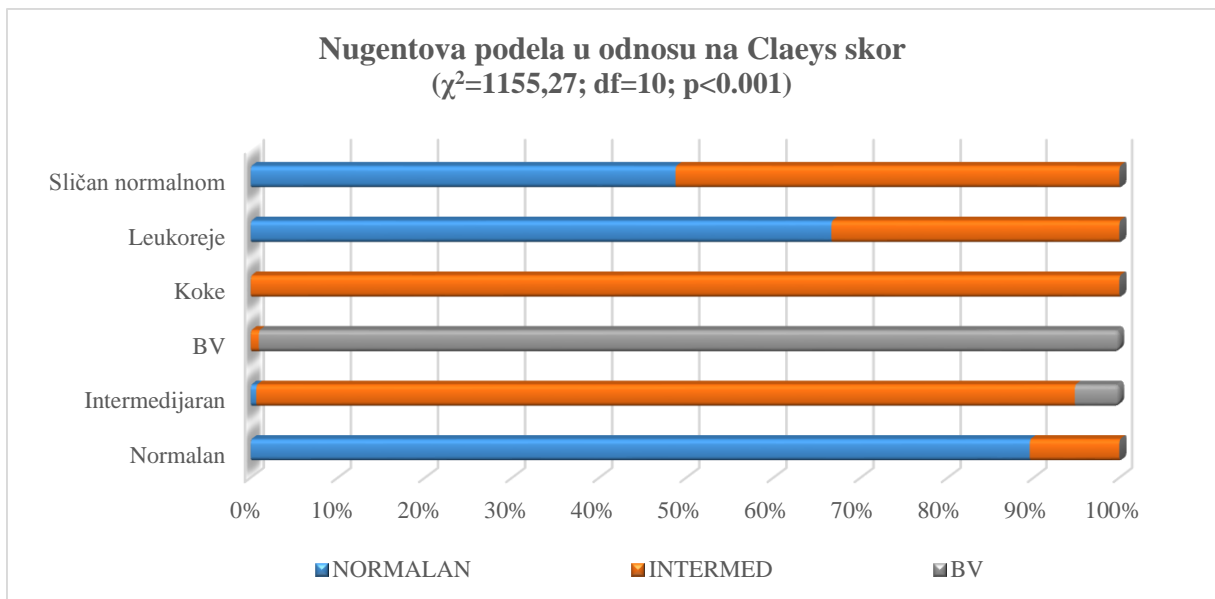
Ako pogledamo ove podatke, ono što „bode oči“ jeste da smo u podeli po Ison/Hayu imali 45 pacijentkinja sa nalazom koka, dok smo u podeli po Claeyasu samo 4 pacijentkinje svrstali u grupu koke. Napominjemo da je isti ispitivač gledao sve mikroskopske uzorke. Razlozi mogu da budu različiti, a pokušaćemo na praktičnim primerima da ukažemo na neke od njih. Na primer, ukoliko preparat po Gramu gledamo na uvećanju x1000 sa imerzijom na osnovu kriterijuma po Nugentu, na 10 slučajno odabranih VP, posle pregleda postavimo dijagnozu intermedijarnog nalaza, a na preparatu je bio viđen mali broj bakterijskih formi. Ukoliko nešto kasnije uzmemo isti preparat, verovatnoća da nađemo tih 10 polja je teoretska - gledaćemo 10 drugih vidnih polja na kojima će sada Nugentov zbir biti 7, dakle ne intermedijaran nalaz nego BV. Što je celularnost (broj bakterijskih formi) preparata manja, mogućnost da se pri svakom ponovljenom gledanju (ili ako isti uzorak analiziraju dve osobe) postavi drugačija dijagnoza je veća, jer pacijentkinje sa BVF ili NF gotovo na čitavom preparatu imaju ista polja na kojima dominiraju laktobacili ili BVAB. Ovde možemo da ukažemo i na još jednu mikroskopsku zakonitost koja bi se mogla definisati na sledeći način: “homogenost preparata je upravo srazmerna celularnosti”. Tako u grupama po NP-6G najveća homogenost preparata kod pacijentkinja sa BVF, čak značajno veća i od pacijentkinja sa NF jer je broj bakterijskih formi i do hiljadu puta veći, kao što se to jasno vidi na fotografijama. Dakle verovatnoća da ćemo kod pacijentkinje sa nalazom BVF naći polja BVN je veoma mala (do 5%), a na preparatu BVM nešto češće (10-15%). Grupa BVM i NF bili bi na drugom i trećem mestu po celularnosti, zatim dolazi NM, i na kraju BVN i NN.

Tokom ovog ispitivanja isti mikroskopski preparati su gledani više puta na osnovu različitih dijagnostičkih kriterijuma. U prvom analizama kada su korišćeni Nugentovih kriterijumi i određivan broj PMN na uvećanju x1000, koke nismo ni detektovali jer, jednostavno, nisu bile deo Nugentovog skora, a u literaturi nema rada koji govori o značaju koka za stanje vaginalne mikroflore. Kada smo kasnije sve preparate ponovo gledali na osnovu

kriterijuma po Ison/Hayu i Cleaysu počeli smo da “tražimo” koke, jer su one posebne grupe u podelama ovih autora.

Kako objasniti 45 pacijentkinja sa predominacijom koka u podeli po Ison/Hayu, a samo 4 pacijentkinje u podeli po Cleaysu? Jedan od razloga svakako je činjenica da podela po Cleaysu ima dve grupe pacijentkinja (LEUKOREJA i SLIČAN NORMALNOM) koje nema podela po Ison/Hayu, i u ove dve grupe pacijentkinja nalazi se 86 pacijentkinja. Podela po Ison/Hayu ima grupu pacijentkinja kod kojih je nalaz “čist” (n=37), koje nemamo u podeli po Cleaysu. Među ove 123 pacijentkinje nalazi se najveći broj od 41 pacijentkinje koje “nedostaju” u grupi KOKE u podeli po Cleaysu. Dakle, u takvim slučajevima smo nalaz povećanog broja PMN sa laktobacilima (LEUKOREJA), prisustvo BIFIDO formi (sličan normalnom) ili čist nalaz, smatrali “važnijim” od prisustva KOKA, i svrstavali pacijentkinje u odgovarajuće grupe. Svakako da je i prethodno navedena mogućnost da ste gledali 10 drugih vidnih polja na kojima nije bilo koka uticala u određenom broju slučajeva na ovu razliku. U ovo smo sada sigurniji jer smo tokom ispitivanja i pregleda preparata na uvećanju x200 primetili da su KOKE raspoređene po “regionima”, tako da su određeni delovi preparata bez koka, a na drugim su prisutne u velikom broju. U našem ispitivanju nismo naišli na preparat koji je ravnomerno prekriven kokama, kao što je to slučaj kod pacijentkinja sa BVF. Da smo ove pacijentkinje svrstali u grupu koke, onda bismo imali 41 pacijentkinju manje u nekim drugim grupama. Ovo je istovremeno dobar primer kako kategorizacija pacijentkinja može uticati na konačne rezultate što je, kako će se videti u daljoj diskusiji, veoma važan problem koji prati svaku statističku analizu i tumačenje dobijenih rezultata.

### 3.1.4.1 Uporedni rezultati - kriterijumi po Claeyssu i Nugentu

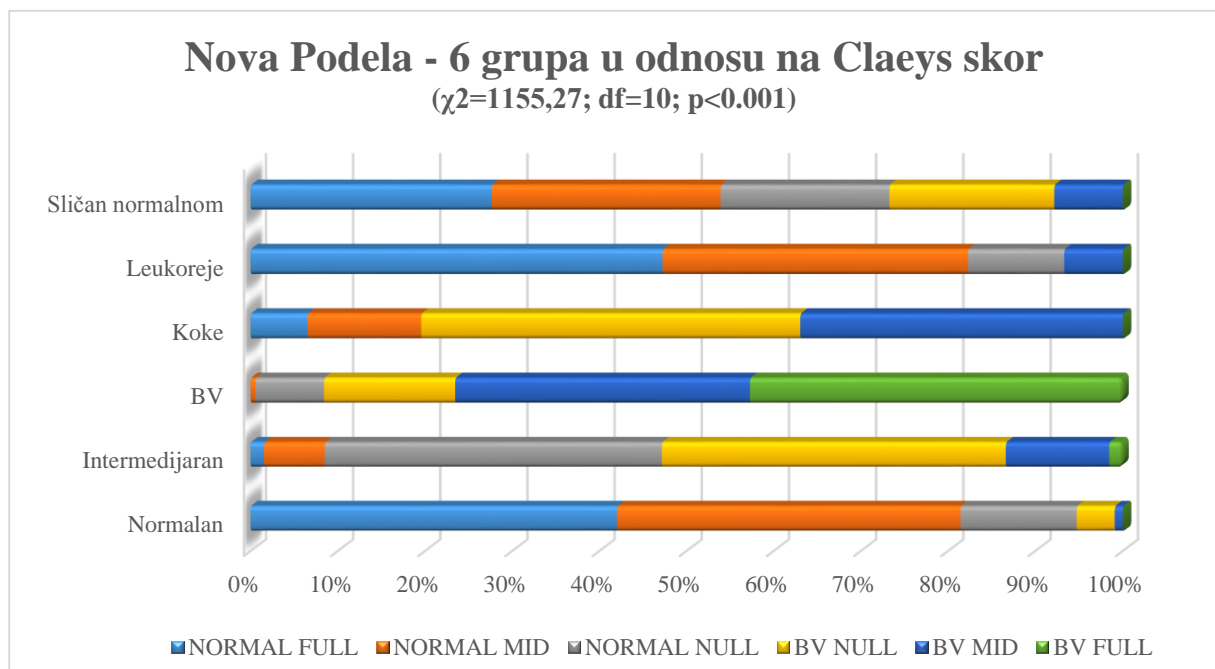


**Grafikon 3.11: Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Claeyssu i Nugentu**

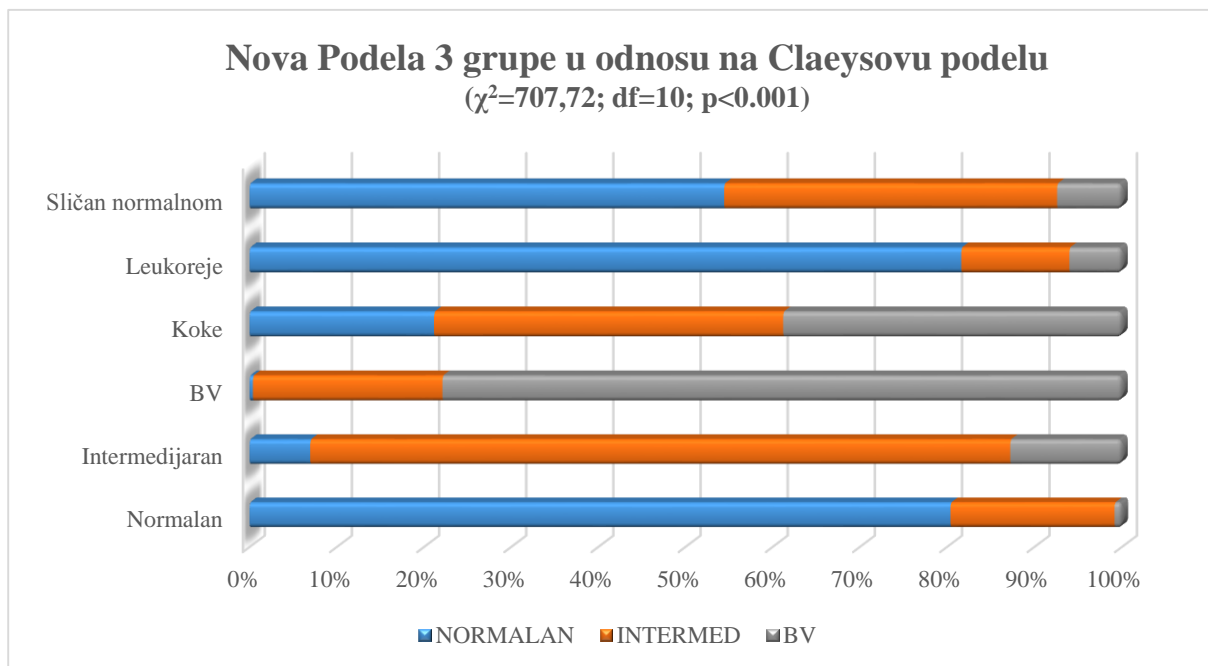
Primenom Hi kvadrat testa utvrđeno je postojanje dobre asocijacije između podele po Nugentu i podele po Claeyss-u ( $\chi^2=1155,27$ ;  $df=10$ ;  $p<0.001$ ) (Grafikon 3.11; Tabela 11, Prilog 1).

### 3.1.4.2 Uporedni rezultati kriterijumi po Claeyssu i NP-6, 3, 2G

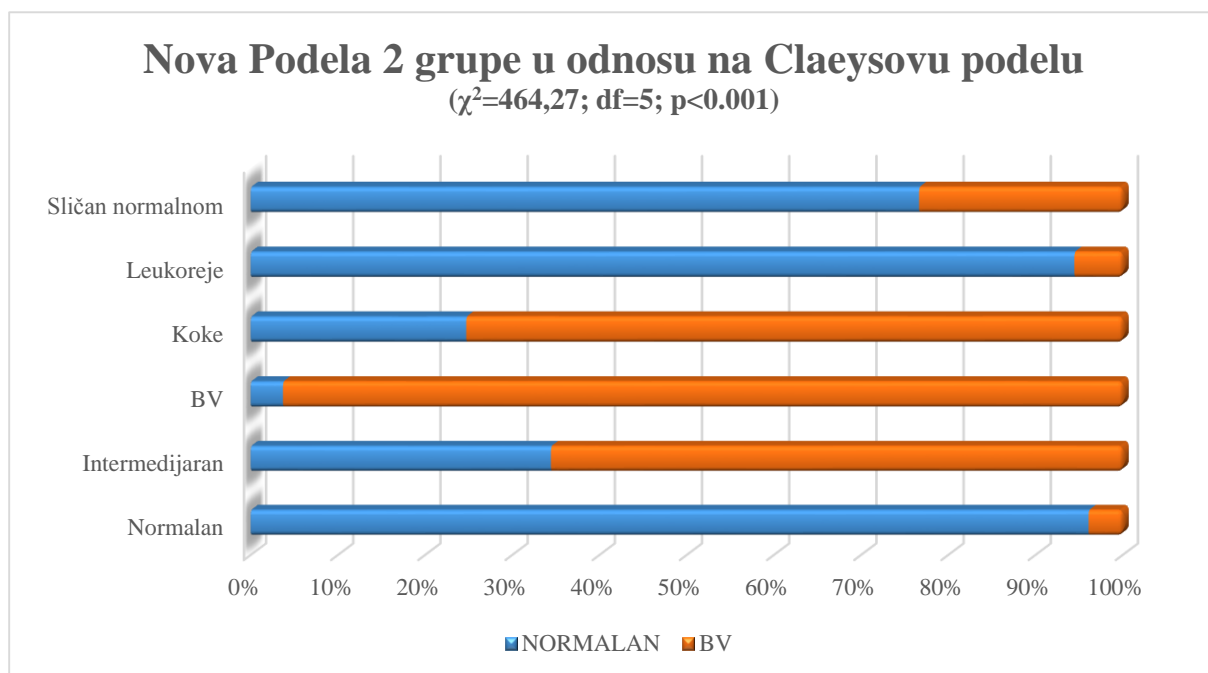
Na Grafikonima 3.12, 3.13 i 3.14 prikazani su rezultati koji, kao i prethodni, pokazuju dobru asocijaciju između NP-6G ( $\chi^2=734,47$ ;  $df=25$ ;  $p<0.001$ ); NP-3G ( $\chi^2=707,72$ ;  $df=10$ ;  $p<0.001$ ); NP-2G ( $\chi^2=464,27$ ;  $df=5$ ;  $p<0.001$ ) i podele po Claeyssu.



**Grafikon 3.12: Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Claeyssu i NP-6G**



**Grafikon 3.13:** Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Claeysu i NP-3G



**Grafikon 3.14:** Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Claeysu i NP-2G

U tabeli 3.1 su prikazane sve vrednosti Hi kvadrat testa u odnosu na sve poređene dijagnostičke procedure i kao što se iz tabele vidi sve ove metode mogu se uspešno koristiti u dijagnozi BV. Naravno za ovo ispitivanje je najvažnija činjenica da je NOVA PODELA i u osnovnoj varijanti (NP-6G), a i modifikovana (NP-3G i NP-2G) pokazala da može uspešno da se koristi u dijagnozi BV.

**Tabela 3.1: Vrednosti Hi kvadrata u odnosu na sve poređene dijagnostičke metode**

	Nugent	Ison/Hay	Claeys	Amsel	KOH	pH
NP-6G	669,80	862,73	734,47	426,17	259,40	257,67
NP-3G	634,44	819,41	707,72	395,29	232,72	239,72
NP-2G	437,40	470,27	481,25	390,60	232,23	227,37
Nugent	-	894,33	1155,27	379,15	234,23	246,43
p<0.001						

Da bi smo potvrdili ovu činjenicu tamo gde je to bilo moguće utvrđivali smo podudarnost NP u odnosu na postojeće na osnovu kappa indeksa , a rezultati su prikazani u Tabeli 3.2.

**Tabela 3.2: Podudarnost rezultata mikroskopskog pregleda vaginalnog sekrete različitih autora izražen u vrednostima Kappa indeksa**

		Nugent	Ison/Hay	Claeys
NP-3G	κ	0.68	0.56	0.73
	p	<0.001	<0.001	<0.001
		Ison/Hay (mod)*		Claeys**
Nugent	κ	0.70		0.90
	p	<0.001		<0.001
		Amsel		NP-2G
Nugent***	κ	0,83		0,83
	p	<0.001		<0.001

\*Grupe "čist" i "koke" pripojene normalnom nalazu

\*\* Grupe "koke", "leukoreja" i "sličan normalnom" pripojene normalnom nalazu

\*\*\*Iz podele po Nugent-u isključene pacijentkinje sa intermedijarnim nalazom

Rangiranje kapa testa izvršeno je na osnovu kategorizacije po Byrtu kao što je to prikazano u tabeli 3.3.

**Tabela 3.3: Rangiranje kapa testa na osnovu kategorizacije po Byrt-u**

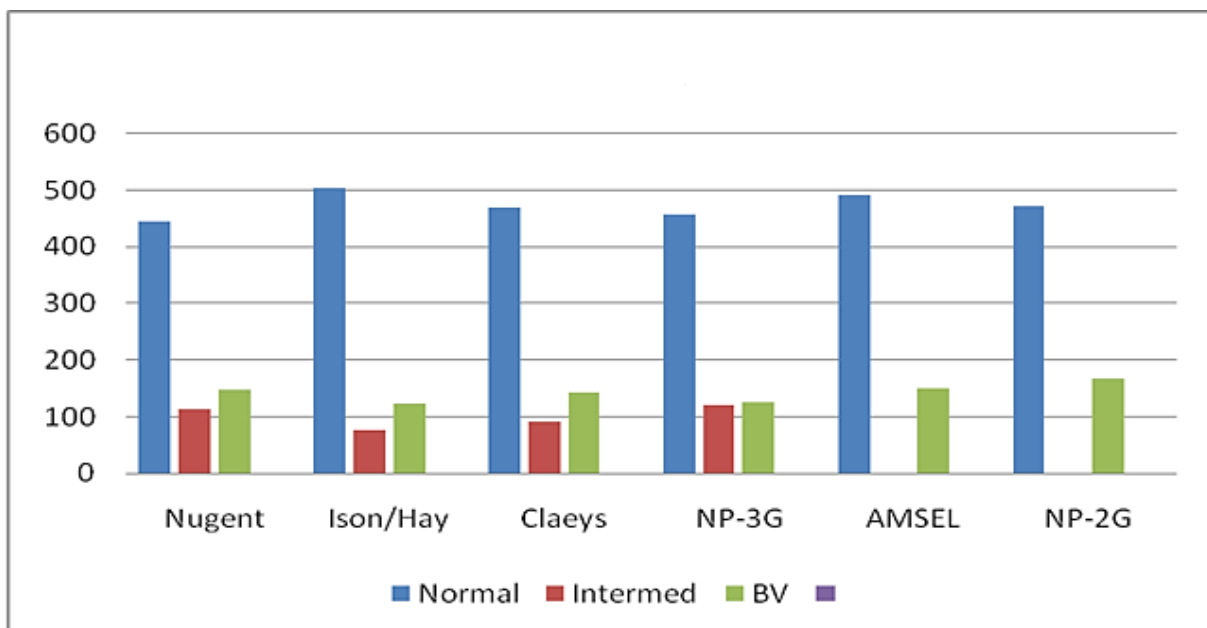
Rangiranje po Byrtu	Vrednost κ indeksa
Odlično slaganje	0,93-1
Veoma dobro slaganje	0,81-0,92
Dobro slaganje	0,61-0,80
Umereno slaganje	0,41-0,60
Slabo slaganje	0,41

Prema datom rangiranju dobili smo sledeće rezultate:

- Umereno slaganje
  - ✓ NP-3G/Ison/Hay(κ=0,56; p<0.001);
- Dobro slaganje

- ✓ NP-3G/Nugent: ( $\kappa=0,68$ ;  $p<0.001$ );
- ✓ NP3G/ Claey's: ( $\kappa=0,73$ ;  $p<0.001$ );
- ✓ Nugent/Ison/Hay: ( $\kappa=0,70$ ;  $p<0.001$ );
- Veoma dobro slaganje
  - ✓ Nugent/Claey's : ( $\kappa=0,90$ ;  $p<0.001$ );
  - ✓ Nugent / Amsel: ( $\kappa=0,83$ ;  $p<0.001$ );
  - ✓ Nugent/NP3G : ( $\kappa=0,83$ ;  $p<0.001$ ).

Dakle, i vrednosti  $\kappa$  indeksa potvrđuju da su nalazi koje dobijemo NP dobro slažu sa nalazima dijagnostičkih kriterijuma po Nugentu (zlatni standard), Ison/Hayu i Claey'su u dijagnozi BV. Na osnovu iznesenih podataka možemo da zaključimo da je nova metodologija, koja podrazumeva pregled mikroskopskog preparata na uvećanju x200, pokazala dobre rezultate u odnosu na postojeće i da se kao takva može koristiti u dijagnozi BV. Pored toga, rezultati ovog ispitivanja su pokazali da je NOVA PODELA (NP-6G) fleksibilna i da se može lako pretvoriti u tri (NP-3G) grupe, bez značajnijeg uticaja na rezultate u dijagnozi BV. Dakle, pacijentkinje iz NP-6G koje imaju mikroskopski nalaz NF i NM, kao i pacijentkinje sa nalazom BVF i BVM predstavljaju jasno definisane kategorije, koje se u praktičnom i svakodnevnom kliničkom radu mogu slobodno svesti u dve kategorije od kojih su jedne zdrave i ne zahtevaju terapiju, a druge bolesne (BV) i zahtevaju terapiju. Međutim, pacijentkinje sa nalazom NN i BVN su prilično nedefinisane u dijagnostičkom i terapijskom smislu i one zahtevaju dalja klinička ispitivanja. Grafikon 3.15 je vizuelna potvrda koja govori o dobroj podudarnosti postojećih dijagnostičkih kriterijuma u dijagnozi BV.



**Grafikon 3.15: Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda vaginalnog sekreta u dijagnozi bakterijske vaginoze na osnovu različitih dijagnostičkih kriterijuma**

Ali nam ovaj Grafikon ukazuje na još jednu važnu činjenicu, a to je da u svakom poređenju različitih dijagnostičkih procedura moramo da se prilagođavamo zlatnom standardu odnosno Nugentovoj podeli. Amselovi kriterijumi su klinički „zlatni standard i imaju dve grupe pacijentkinja, Nugent kao „istraživački“ zlatni standard ima tri grupe pacijentkinja, Ison /Hay pet, Claeys šest, a podela NP-G6 ima 6 grupa pacijentkinja i sve su, na ovaj ili onaj način, morale da se prilagode poređenju sa zlatnim standardom da bi njihova dijagnostička vrednost bila verifikovana. Uvođenje novih kategorija kao što su to uradili Ison/Hay i Claeys svakako je poželjno jer je jasno da Nugentova klasifikacija veliki broj žena sa različitom vaginalnom florom svrstava u tri grupe (zdrave/bolesne/neodređeno) i da je vaginalna flora, preciznije, mikroskopski nalaz vaginalnog sekreta, mnogo kompleksniji nego što bi se to moglo zaključiti iz Nugentovih kriterijuma koji uzimaju u obzir samo tri ćelijska morfortipa. Međutim, svako uvođenje novih grupa ograničeno je činjenicom da svaka nova metodologija mora da „preživi“ poređenje sa zlatnim standardom, što je svakako jedan od razloga zbog kojih ni podela po Ison/Hayu, a ni podela po Claeysu nisu našle širu primenu, ni u praktičnom ni u naučnoistraživačkom radu. Tako su Claeys i sar. pokazali da bi neke druge bakterije (njihova grupa „I-like“) i stanja vaginalne flore (leukoreja), različite od onih sadržanih u Nugentovom skoru, mogle imati veći značaj u zbivanjima vezanim za PP udružen sa infekcijom i/ili zapaljenjem. Uprkos tim činjenicama, veoma je mali broj radova koji je koristio Claeysovu podelu. Jedan od retkih je rad Martinez-Martinez i sar [383] i bavi se poređenjem različitih dijagnostičkih kriterijuma u dijagnozi BV.

Istovremeno, ovaj rad na najbolji način pokazuje probleme sa kojima se suočavamo u poređenju metoda koje imaju različite grupe pacijentkinja. Tako su Martinez-Martinez i sar. [383] u svome radu u dijagnozi BV koristili kriterijume po Amselu, Nugentu, Ison/Hayu i Claeysu, dakle kao što je rađeno i u našem ispitivanju, ali na manjem broju pacijentkinja (n=101). Da bi prevazišli pomenute probleme i „ispoštovali“ zlatni standard (Nugent), oni su podelu po Ison Hayu i Claeysu sveli na tri „Nugentove“ grupe tako što su pacijentkinje iz drugih grupa smatrali negativnim na BV. Ovakav pristup je prihvatljiv, posebno ako se mikroskopski nalaz svede samo na dijagnozu BV, ali bi i neki drugi pristupi bili svakako prihvatljivi, a možda i bolji. Iako se autor u svome radu ne bavi ovim pitanjima nego čitavu studiju svodi na ispitivanje podudarnosti različitih dijagnostičkih kriterijuma u dijagnozi BV, mi ovaj problem raspodele pacijentkinja i statističke analize smatramo veoma važnim za svaku studiju ovakvog tipa. Uvek treba imati na umu činjenicu da Nugent ima dve suštinske prednosti u odnosu na sve druge metodologije sa kojima se poredi. Prva je, kao što smo rekli, što je zlatni standard, a druga što

ima intermedijarnu grupu. Ako, na primer, poredite rezultate dobijene na osnovu Nugentovih (3 grupe) i Amselovih kriterijuma (2 grupe) lako ćete doći do zaključka da je Nugent uvek u prednosti. Već sama činjenica da ima intermedijarnu grupu je velika prednost, jer mu daje mogućnost da se „reši“ nekih nejasnih i graničnih nalaza, dok Amselovi kriterijumi ne dozvoljavaju takav „luksuz“ i pacijentkinja je ili zdrava ili ima BV. Svako ko ima imalo iskustva u gledanju NPVS potvrdiće da ovakva “intermedijarna” grupa postoji i kad na uvećanju x400 gledamo NPVS, te da bi u sličnom procentu (15-30%) bili veoma zadovoljni ukoliko bi imali mogućnost da takve pacijentkinje svrstamo u intermedijarnu grupu.

Mislimo da bi korektna statistička obrada podataka u ovakvim studijama podrazumevala statističke metode za nesavršeni zlatni standard ili, bolje, poređenje bez zlatnog standarda. Takođe Martinez-Martinez i sar. [383] u svome radu ne pominju pacijentkinje sa leukorejom (Claeys), što najverovatnije znači da ih u njihovom ispitivanju nije ni bilo, ili su kao u većini studija PMN „zaboravljeni“.



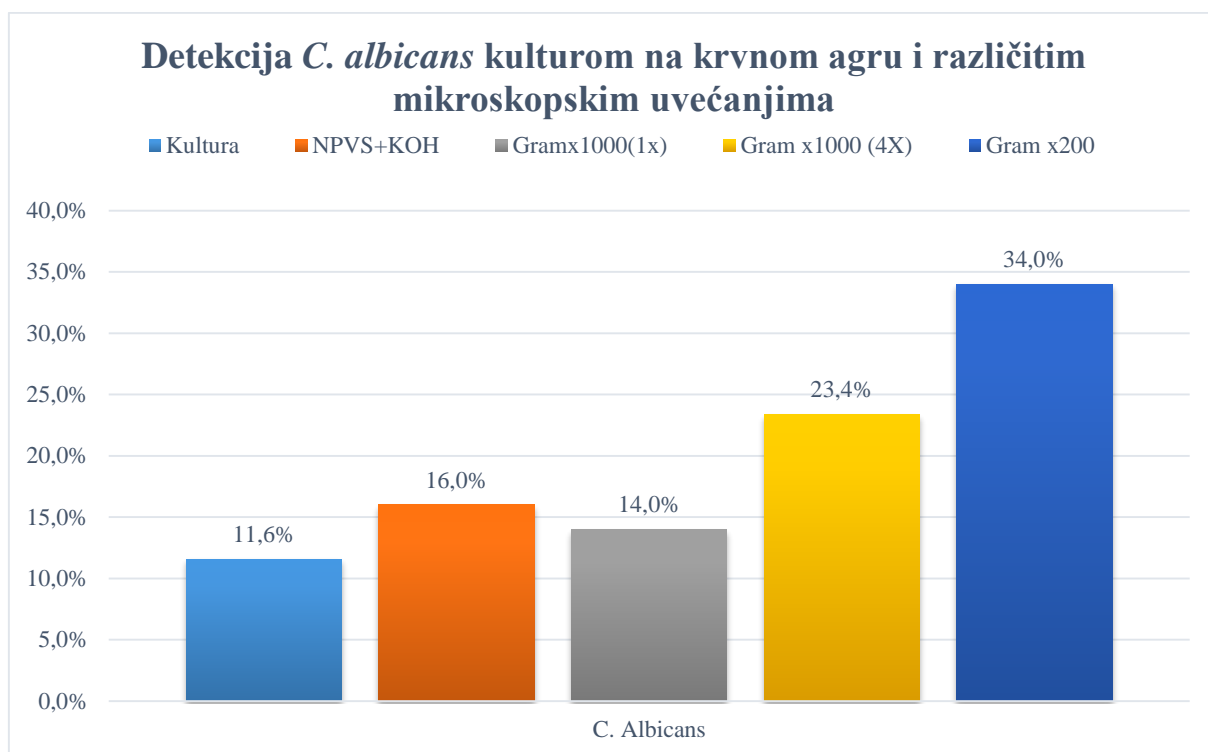
## **3.2 MOGUĆI OMETAJUĆI ČINIOCI U DIJAGNOZI STANJA MIKROFLORE VAGINE**

U ovom delu biće prikazani rezultati i diskusija koji se odnose na mikroskopske forme koje su se svojim fenotipskim karakteristikama ili učestalošću “nametnule” da budu uključene u ovo ispitivanje. Ove podatke nećemo detaljnije analizirati, a oni pre svega treba da ukažu na složenost u pokušajima da razgraničimo “normalan” od “patološkog” mikroskopskog nalaza uvođenjem još tri moguća ometajuća (konfauzing) činioca, KOKE, BIFIDO i LEPTO forme. Na Grafikonima 3.20 i 3.21 prikazana je njihova raspodela u odnosu na mikroskopski nalaz vaginalne flore (NP-6G) i broj PMN (normalan ili patološki).

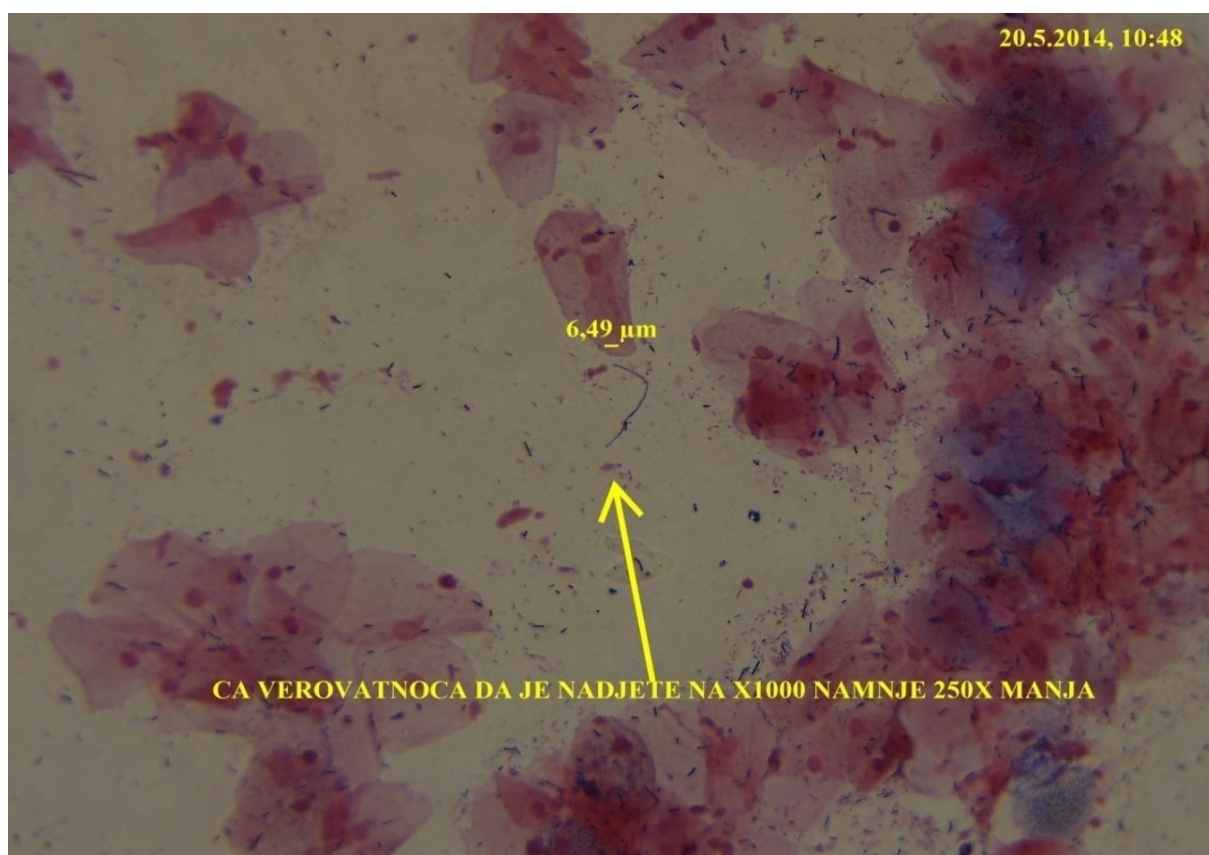
### **3.2.1 KVASNICE IZ RODA KANDIDA (*Candida spp.*)**

Tokom ovog ispitivanja nisu korišćene specijalne podloge za detekciju kvasnica iz roda *Candida* (CA). Najvažniji razlog zbog koga to nismo učinili jeste stav da izolacija CA kulturom ne znači i infekciju CA, odnosno da pacijentkinje kod kojih na NPVS sa 10% KOH mikroskopski detektujemo prisustvo hifa i/ili spora gljivica, najverovatnije znači prisustvo infekcije, odnosno da takvu pacijentkinju treba lečiti bez obzira na prisustvo simptoma. Detekcija CA na podlozi krvni agar bio je usputni nalaz koji je stizao kasnije, a kao što smo rekli osnovni način u dijagnozi i lečenju pacijentkinja bio je mikroskopski nalaz NPVS sa 10% KOH. Tako smo na osnovu ovog nalaza CA detektovali kod 115/704 (16,3%) pacijentkinja, a to su ujedno pacijentkinje koje su lečene zbog infekcije CA antimikoticima. Kulturom na krvnom agru CA je identifikovana kod 82/704 (11,6%). Mnogo interesantnija su podaci koje smo dobili pregledom preparata bojenog po Gramu. U prvom gledanju preparat po Gramu na uvećanju x1000 (Nugentova metodologija i broj PMN) CA je otkrivena kod 99/704 (14,0%) pacijentkinja, da bi svakim narednim gledanjem (Ison Hay, Claeys) na uvećanju x1000 taj broj rastao, tako da smo na kraju CA detektovali kod 165 od 704 (23,4%) pacijentkinja. Kako smo se tokom ispitivanja odlučili za metodologiju je po kojoj je preparat po Gramu gledan pod imerzijom na uvećanju x200, broj pacijentkinja kod kojih smo detektovali CA dostigao je 241 od 704 (34%) pacijentkinja (Grafikon 3.16).

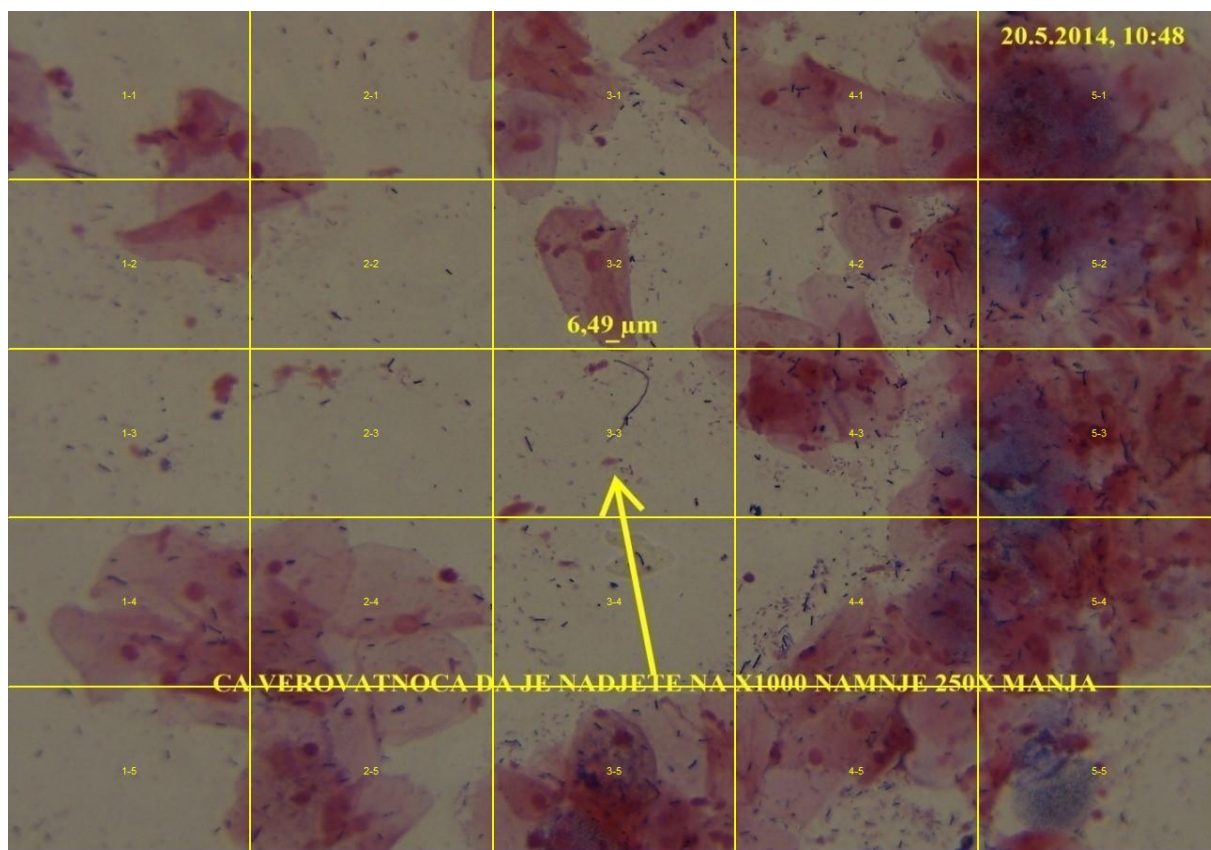
Dakle metodologija gledanja mikroskopskog preparata na uvećanju x200 omogućila je detekciju CA kod oko još jedne trećine pacijentkinja. Takođe, treba podsetiti da je površina vidnog polja na mikroskopskom uvećanju x200 oko 25 puta veća od površine vidnog polja na uvećanju x1000.



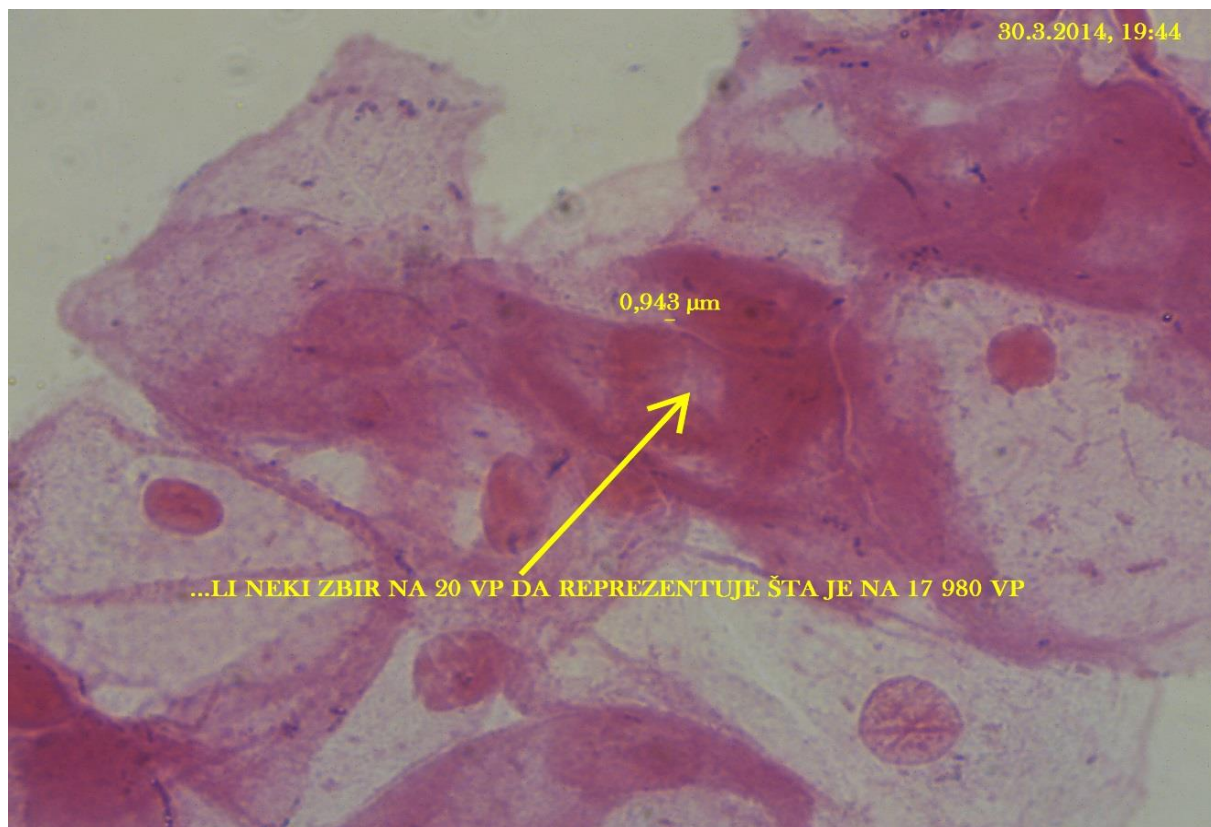
**Grafikon 3.16: Detekcija *C. albicans* kulturom na krvnom agru i različitim mikroskopskim uvećanjima**  
 (1X): prvo gledanje na uvećanju x1000; (4X): isti preparat po Gramu posle četiri gledanja na uvećanju x1000;



**Slika 3.1: *C. albicans* - hifa, PMN i "blue cells" (x200)**

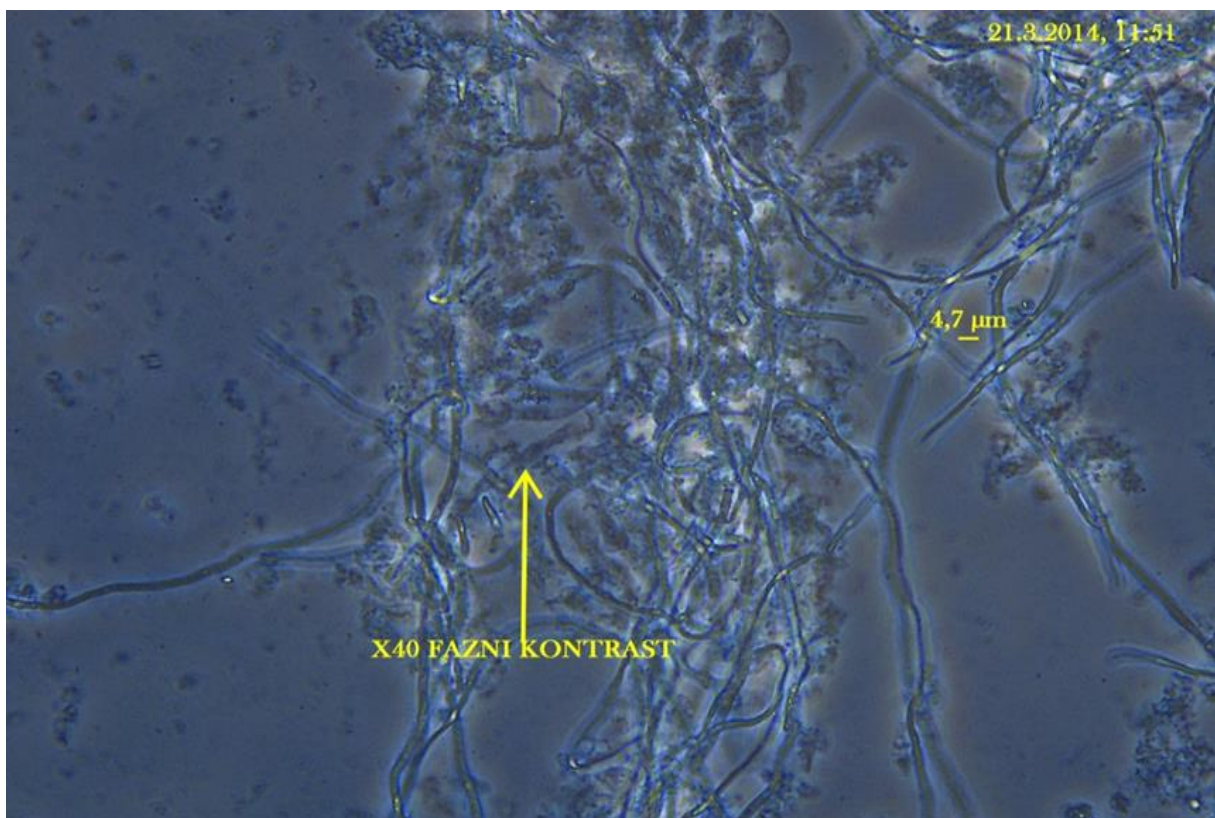


Slika 3.2: Podela na 25 jednakih polja



Slika 3.3: Da li na osnovu 20 VP na uvećanju X1000 možemo objektivno proceniti kakav je nalaz na preostalih 17 500 VP

Ako sliku. 3.1 podelimo na 25 jednakih polja (krugova) (Slika 3.2) onda površina jednog kruga odgovara površini 1 vidnog polja na uvećanju x1000. Znači ukoliko bismo ovaj preparat gledali na uvećanju x1000, hife gljivica videli bi na najviše 4 vidna polja. Ako dijagnostikujemo BV po Nugentovim kriterijumima obavezni smo da pregledamo 5-10 VP, dakle površinu koja je manja od ove na Slici 3.3. Ako pri tome znamo da brojanje, sabiranje, deljenje i konačno računanje Nugentovog zbira zahteva dosta vremena, onda je logično pretpostaviti da se u takvim ispitivanjima veoma retko pregleda i 20 VP. Ako bi, dakle, površinu naše fotografije gledali na uvećanju x1000 veća je verovatnoća da hifu ne nađemo. Pri tome ne treba zaboraviti da je površina slike, površina jednog od 700 VP na uvećanju x200 (pretpostavljena površina obojenog dela preparat je 600 mm<sup>2</sup>; Tabela 2-2, Metodologija), odnosno da na toj površini ima 17.500 VP na uvećanju x1000 (Slika 3.3). Ovi podaci, naša iskustva i rezultati dovode u pitanje opšteprihvaćeni stav po kome je pregled NPVS sa 10% KOH senzitivniji u detekciji CA u odnosu na preparat po Gramu ili PAPA testu [29]. Ono što je sigurno, 10% KOH značajno povećava osetljivost u otkrivanju CA u odnosu na NPVS sa fiziološkim rastvorom i da je 10% KOH glavni razlog za bolje rezultate u odnosu na preparat bojen po Gramu.



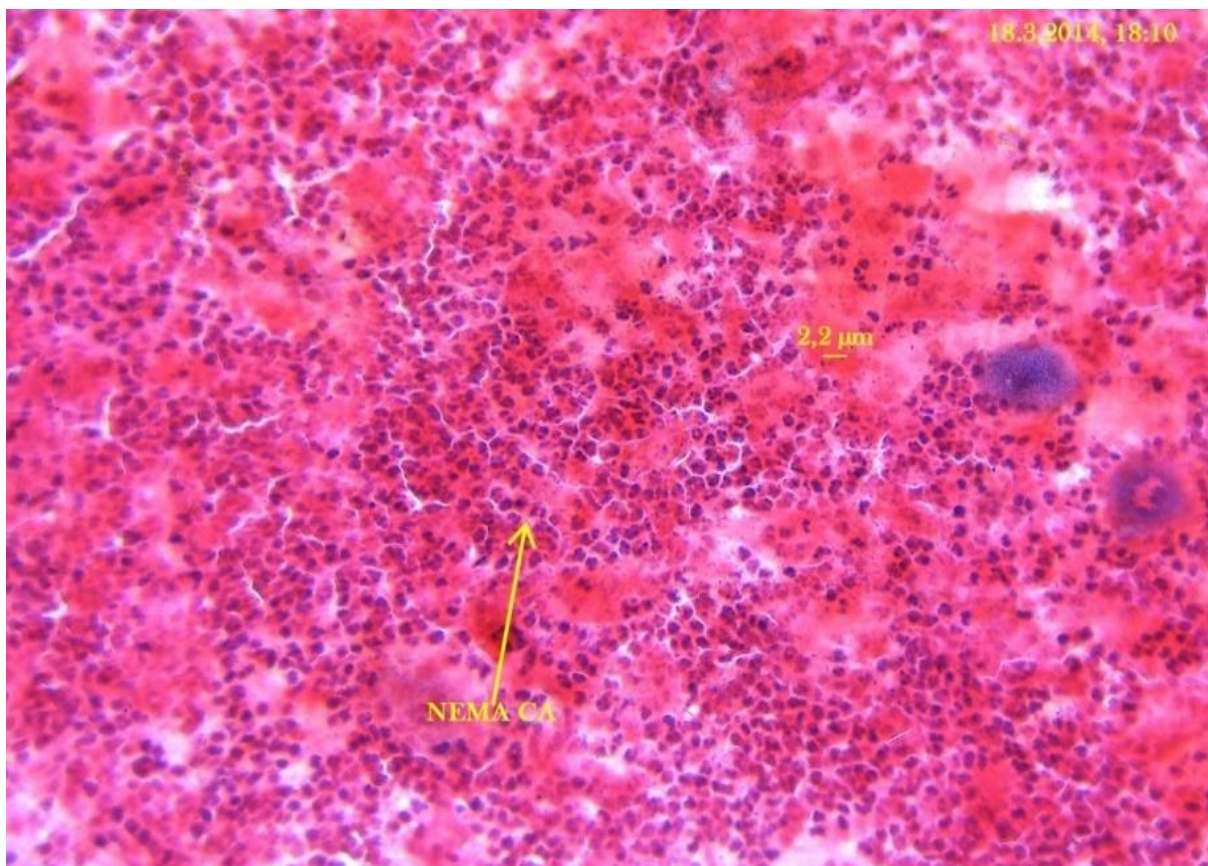
Slika 3.4: *C. albicans* – hife (FK, X400)

Međutim, treba imati u vidu da se nativni preparat uglavnom gleda na uvećanju x400, i načelno, na mnogo većem broju vidnih polja nego što je to slučaj sa Nugentovom metodologijom, a i kada se gleda isti broj vidnih polja površina vidnog polja na uvećanju x400 je 6,25 veća od one na x1000. Verujemo da je veća površina pregledanog preparat na NPVS jedan od važnijih faktora koji utiče na bolje rezultate u detekciji CA na NPVS u odnosu na druge metode na kojima se preparat gleda na većem uvećanju, odnosno na manjoj površini. U literaturi nismo našli ni jedno ispitivanje koje bi na ovaj način poredilo različite metode u dijagnozi CA. Uz podatak da 5-30% pacijentkinja ima asimptomatsku vaginalnu kandidozu jasno je od kakvog je značaja brza i jednostavna dijagnostika jedne od najčešćih vaginalnih infekcija. Svakako mislimo da je površina pregledanog preparata najvažniji faktor zbog koga smo dobili ovakve rezultata, ali mislimo da su još dva faktora tome značajno doprinela. Prvi se odnosi na primenu imerzije na uvećanju x200 koja, iz nama nepoznatih razloga (najverovatnije se radi o optičkim fenomenima), čini i spore i hife gljivica vidljivijim nego kada se radi pregled bez imerzije. To najbolje ilustruju Slike 3.5 i 3.6, jer na prvoj vidimo masu PMN i EĆ bez mikroskopskih elemenata koji bi ukazivali na prisustvo CA.

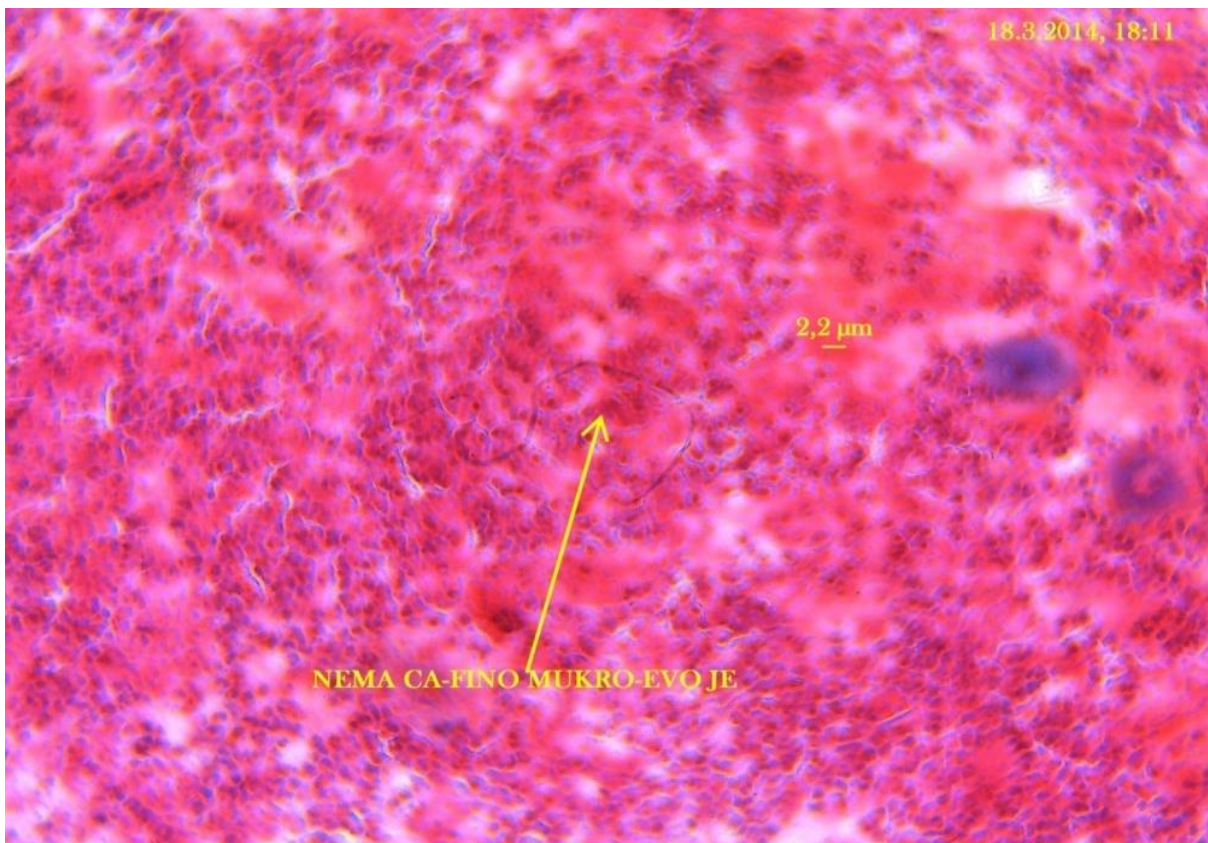
Međutim ukoliko na uvećanju x200 stavimo kap imerzije jasno se prikazuje hifa CA.

Drugi, možda još bitniji, faktor je činjenica da se CA najčešće „krije“ na delovima preparata gde se nalaze nakupine EĆ. Zbog metodologije koju su predložili Ramsey i sar. ove nakupine nismo ni gledali nego smo ih smatrali neadekvatnim za ispitivanje, a verujemo i da ih najveći broj mikrobiologa preskače i smatra neadekvatnim za pregled. Ubedeni smo da su nakupine EĆ ne samo mesto gde se najčešće nalaze spore i hife gljivica, nego da ovi delovi preparata predstavljaju važan, ako ne i najvažniji izvor informacija za odgovarajuću procenu preparata po Gramu. Dakle, pored CA, nakupine EĆ su često »mesto okupljanja« PMN i koka, a i druge mikroskopske forme i oblici se tu nalaze u većem broju. Ako imamo preparat sa dosta ŠF, onda je njihov broj u nakupinama EĆ, uopšteno, još veći, a isto važi i za NŠF odnosno pacijentkinje sa BV

Ovo napominjemo zato što je pregled određenog broja polja u kome se nalaze EĆ obavezni deo našeg protokola, radi preciznije kvantifikacije ŠF i NŠF. Tako neki preparati deluju kao prilično „čisti“, odnosno na njima nalazimo veoma mali broj celularnih elemenata, ali ako pogledamo nakupine EĆ u njima se može naći značajan broj i ŠF i NŠF, tako da su u ovom ispitivanju pacijentkinje iz grupe NULL, u stvari pacijentkinje kod kojih i u nakupinama EĆ, i u međuprostorima nalazimo vrlo mali broj ŠF i NŠF.



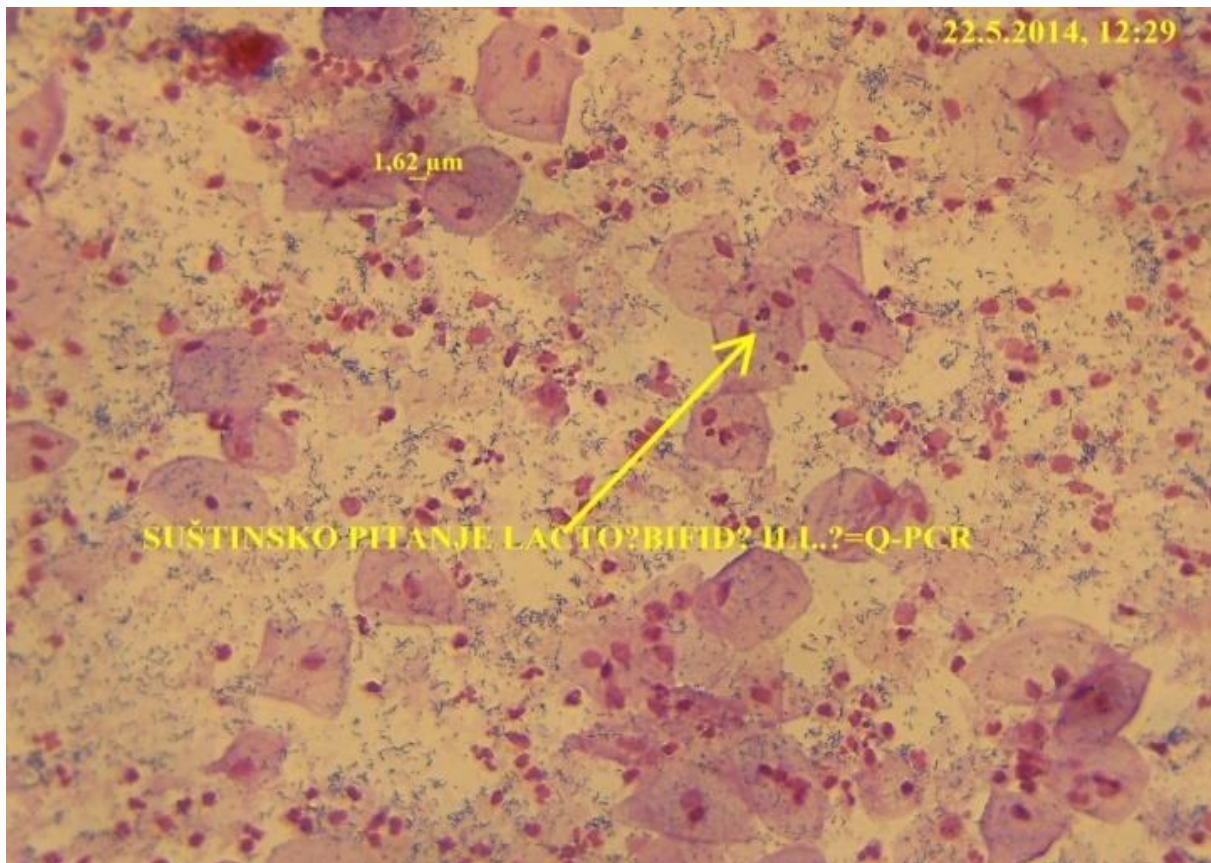
Slika 3.5: Masa PMN, “blue cells”, ne vidi se hifa CA (x200), skrivena u nakupinama EĆ i PMN



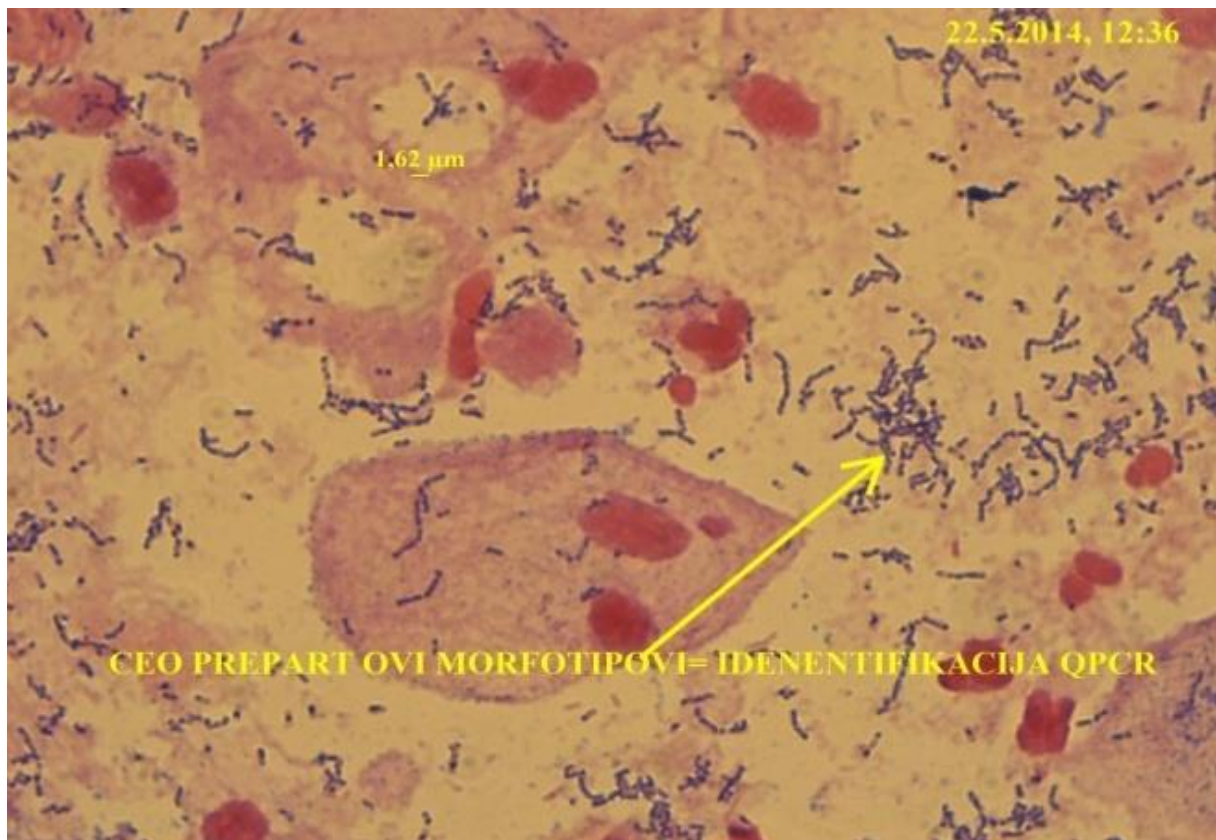
Slika 3.6: Fino pomeranje mikrometra +imerzija na uvećanju X200 “razotkrivaju” skrivenu hifu CA

Na osnovu preko 10.000 mikroskopskih pregleda u kratkom vremenskom periodu, protokol za otkrivanje CA izgledao bi ovako: pregled se počinje na uvećanju x200 sa imerzijom i, nezavisno od mikroskopske slika pozadine (NF, NN, NM, BVF, BVM, BVN), ukoliko na takvoj pozadini imamo patološki broj PMN (PMN2 i PMN3), onda verovatnoća da nađemo i CA iznosi oko 80%. U takvim slučajevima kreće se u „potragu“ za CA na različitim delovima preparata, dva kraja i sredina, na uvećanju x200 + imerzija. Što pređemo veći deo preparata verovatnoća da ćemo je naći raste, posebno u najgušćim (EĆ) delovima preparata. I zaista, u više od 90% slučajeva najveći broj spora i hifa gljivica nalazi se u ili oko nakupina EĆ. Treba reći da je (semi)kvantifikacija CA mnogo teži zadatak u odnosu na druge forme, kao i donošenje zaključaka na osnovu takvih nalaza (vidi kasnije).

Ako pogledamo fotografije 3.6 i 3.7 na njima dominira nalaz ogromnog broja PMN, u desnoj polovini vide se dve ćelije koje se boje plavo („blue cells“) i vrlo su česte kod infekcije CA. Ove dve pacijentkinje su i na preostalom delu preparata imala vrlo retke spore i hife gljivica. Da li je moguće da je ovako veliki broj PMN prouzrokovan prisustvom retkih spora i hifa gljivica, koje smo našli na preparatu, ili su možda spomenute koke mogući uzrok, ili, jednostavno, neka od onih 95% nekultivisanih i nama nepoznatih bakterija koju ne prepoznamo na mikroskopu predstavlja uzrok ovako velikom broju PMN. Dakle, ukoliko prihvatimo mogućnost da ovako mali broj spora i/ili hifa može da bude razlog patološkom broju PMN, onda je sasvim realno prihvatiti da deo pacijentkinja iz grupe „leukoreja“ (Claeys) zapravo ima infekciju CA koju ispitivač ne otkriva mikroskopskim pregledom. Takođe je moguće i koke smatrati uzrokom patološkog broja PMN. Međutim još jedna grupa pacijentkinja je verovatno mogući uzrok neslaganja u ovakvim situacijama, a jedan od primera pokušaćemo da objasnimo slikama 3.7 – 3.10. Ako pogledamo Sliku 3.7 (uvećanje x200) vidimo da pored velikog broja PMN imamo i veliki broj Gram pozitivnih ŠF, a nemamo CA, dakle pacijentkinja bi mogla da uđe u grupu sa idiopatskom leukorejom, ako bi radili metodologijom po Cleaysu. Ako ovaj nalaz pogledamo na uvećanju x1000 (Slika 3.8) ili na još većem (slika 3.9) onda vidimo dosta Gram pozitivnih ŠF koje smo na uvećanju x200 tumačili kao normalnu floru, odnosno laktobacile.

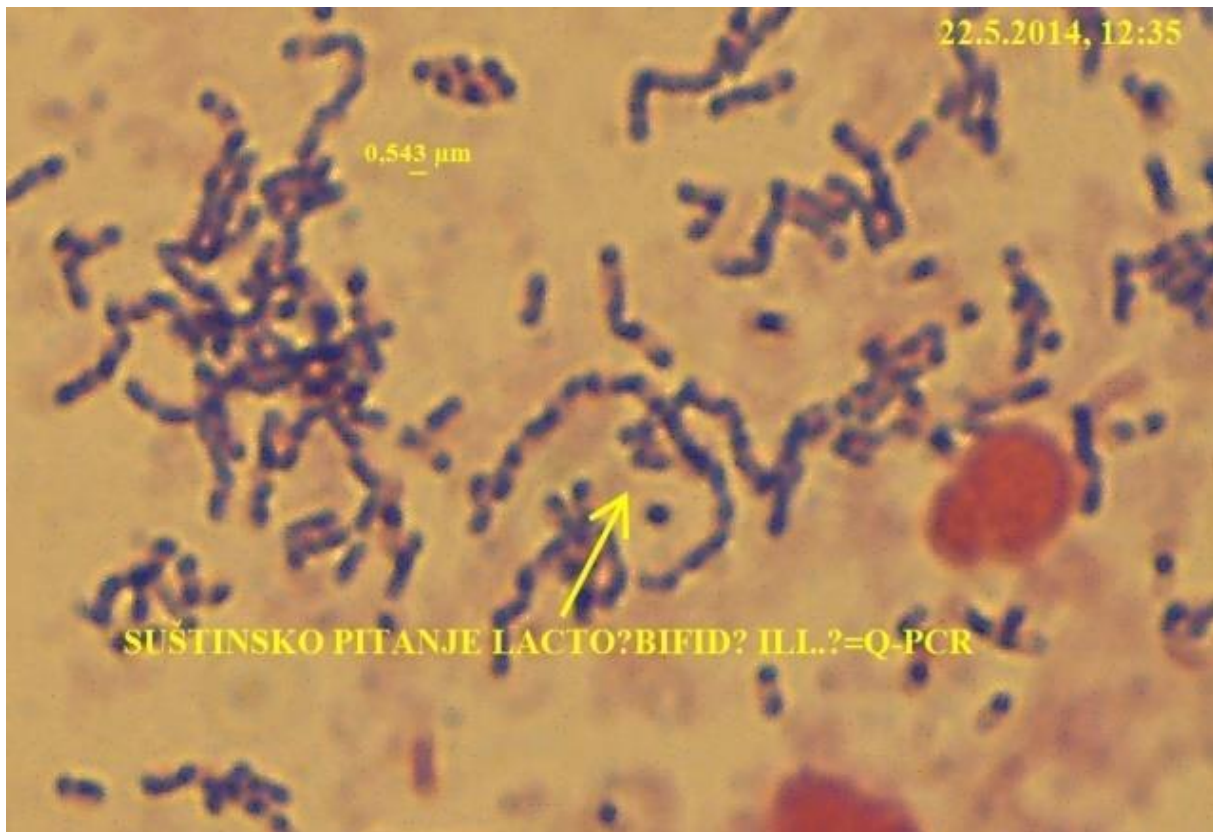


Slika 3.7: Uvećanje x200 Gram pozitivne štapićaste forme koje mogu odgovarati različitim sojevima laktobacila ili različitim sojevima korineoformnih ili bifido bakterija

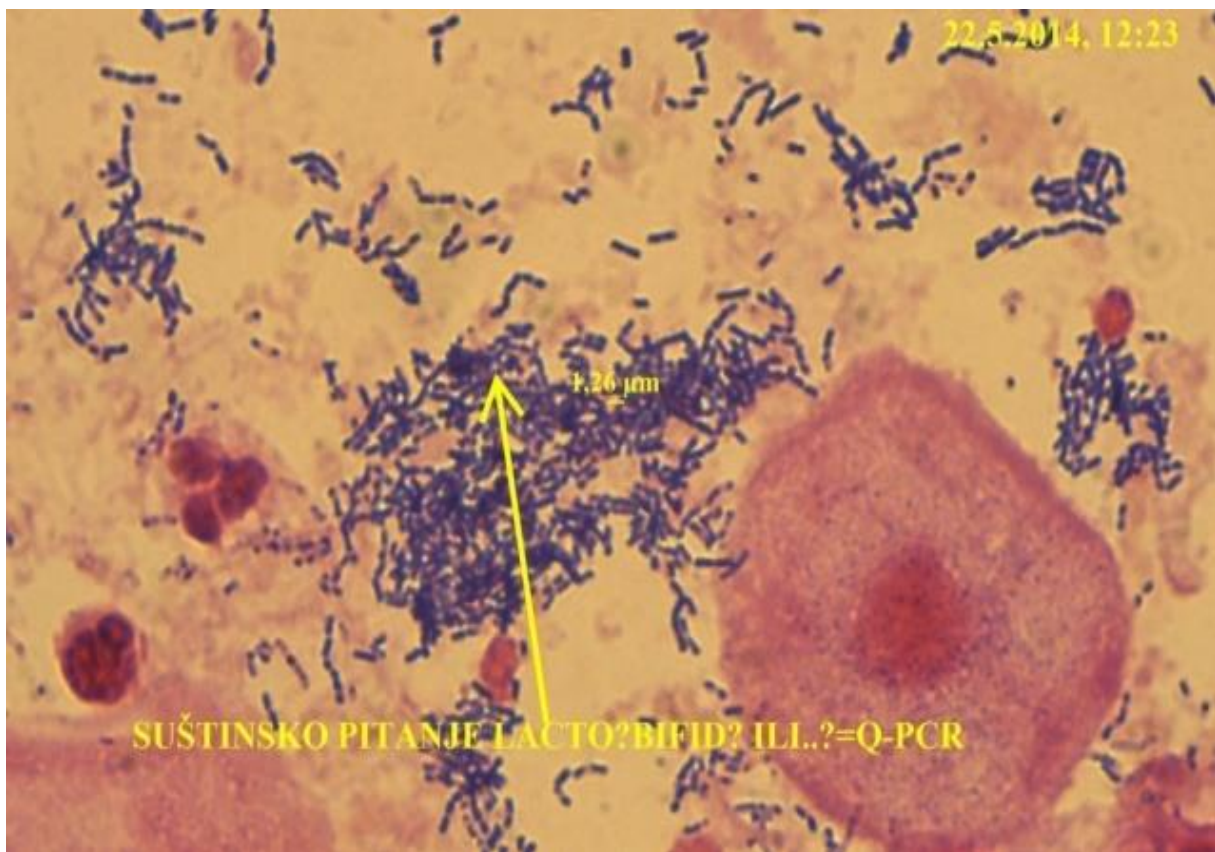


Slika 3.8: Ni na uvećanju x1000 ne možemo razlikovati Gram pozitivne forme: *Lactobacillus?* *Corynebacteria?* *Bifidobacteria?*; "Biopsija preparata" i QPCR bi možda bili od pomoći?





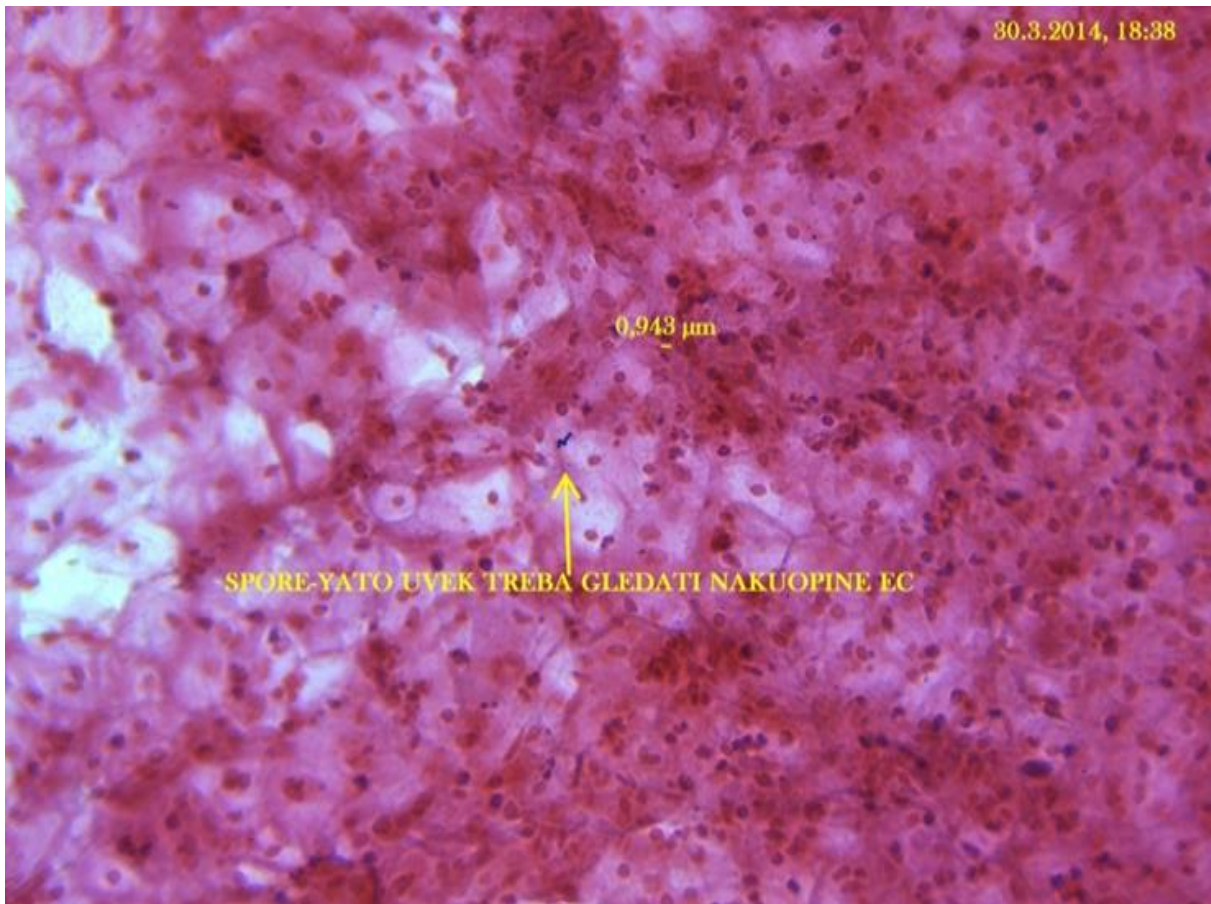
Slika 3.9: Ni na uvećanju preko x1000 ne znamo šta predstavljaju ove Gram pozitivne forme u lancima koje se neravnomerno boje, uz povećan broj PMN



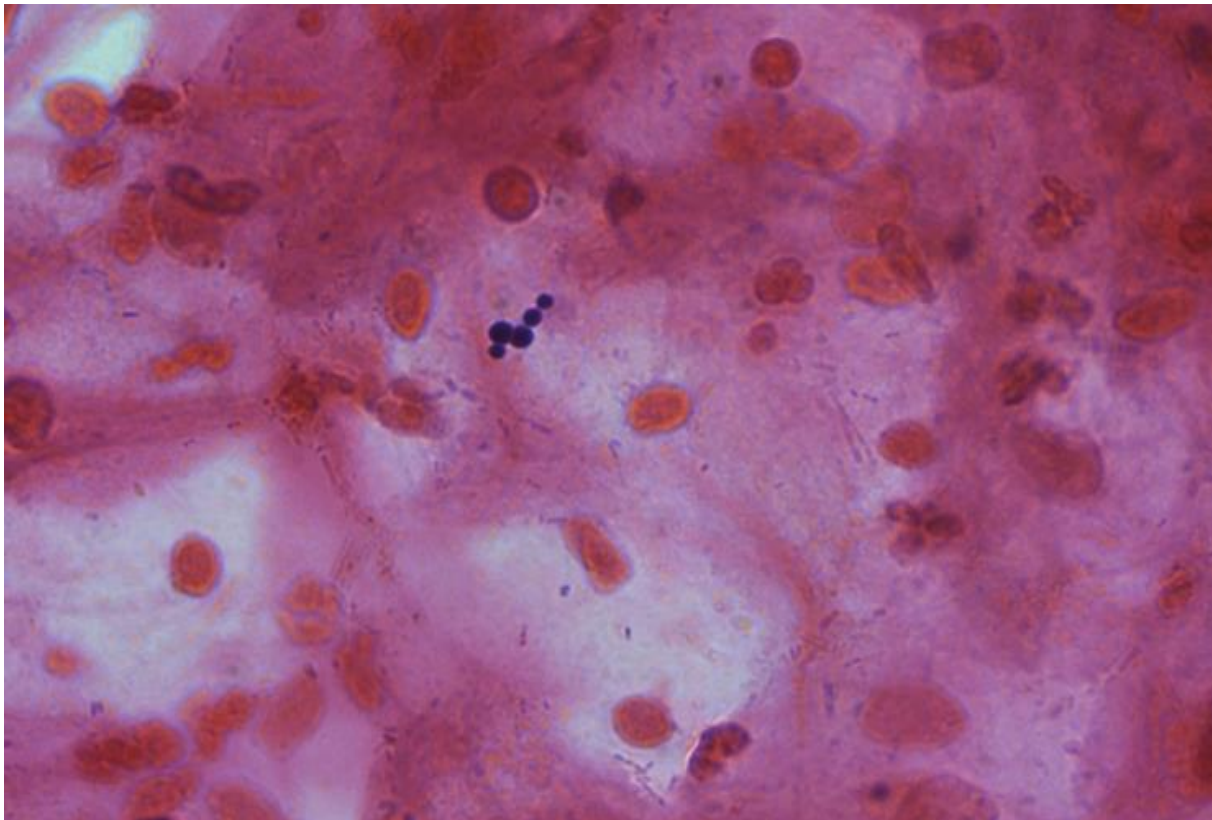
Slika 3.10: Na osnovu podataka iz literature i ličnog iskustva verujemo da se u najvećem broju ovakvih i sličnih nalaza koji liče na normalan radi o različitim sojevima *Corynebacteria* i *Bifidobacteria*

Kako smo i tada bili upoznati sa Claeys-ovom podelom u kojoj se debeli, uglavnom kratki Gram pozitivni štapići, smatraju za *L. crispatus*, a Gram pozitivne ŠF koje su tanje, manje ili više izduženi pripadaju drugim sojevima laktobacila (*L. jensenii*, *L. gasseri*, *L. iners* ili možda neki drugi), smatrali smo dakle da su ovo ti drugi laktobacili. Međutim, s iskustvom u gledanju mikroskopskog preparata (vidi tabelu 3 u Metodologiji) počeli smo da sumnjamo da se radi o »drugim« laktobacilima i da je moguće da se radi o nekoj drugoj vrsti bakterija. Kao što se vidi na uvećanju preko x1000 (Slika 3.9) ove Gram pozitivne forme se neravnomerno boje, kao da formiraju lance, kratki su, nemaju ravne nego češće čekičaste krajeve, ne granaju se. Naravno, nismo sigurni da li su ovo sojevi "nekih" laktobacili ili nisu, ali ipak mislimo da ove forme pripadaju nekoj drugoj vrsti bakterija (najverovatnije *Corynebacterium*, *Bifidobacterium*). Mi smo kod ovakvih nalaza pacijentkinje svrstavali u BIFIDO grupu, pre svega zbog ovog neravnomernog bojenja i čekičastih krajeva. Jedini način da se tako nešto utvrdi jesu uporedne studije preparata po Gramu i Q-PCR. Flora prikazana na fotografijama predominantna je na celom preparatu. Na pojedinim delovima preparata ona je veoma gusta i nagomilana, kao što se to vidi na Slici 3.10. Po našem mišljenju, mogla bi se načiniti svojevrsna ciljano »biopsija« preparata po Gramu, pod kontrolom mikroskopa, i uzorak podvrgnuti Q-PCR. Da preparat po Gramu može da se koristi u ovakvim retrospektivnim studijama pokazala je u svojoj izvanrednoj studiji Srinivasan sa sar. [410].

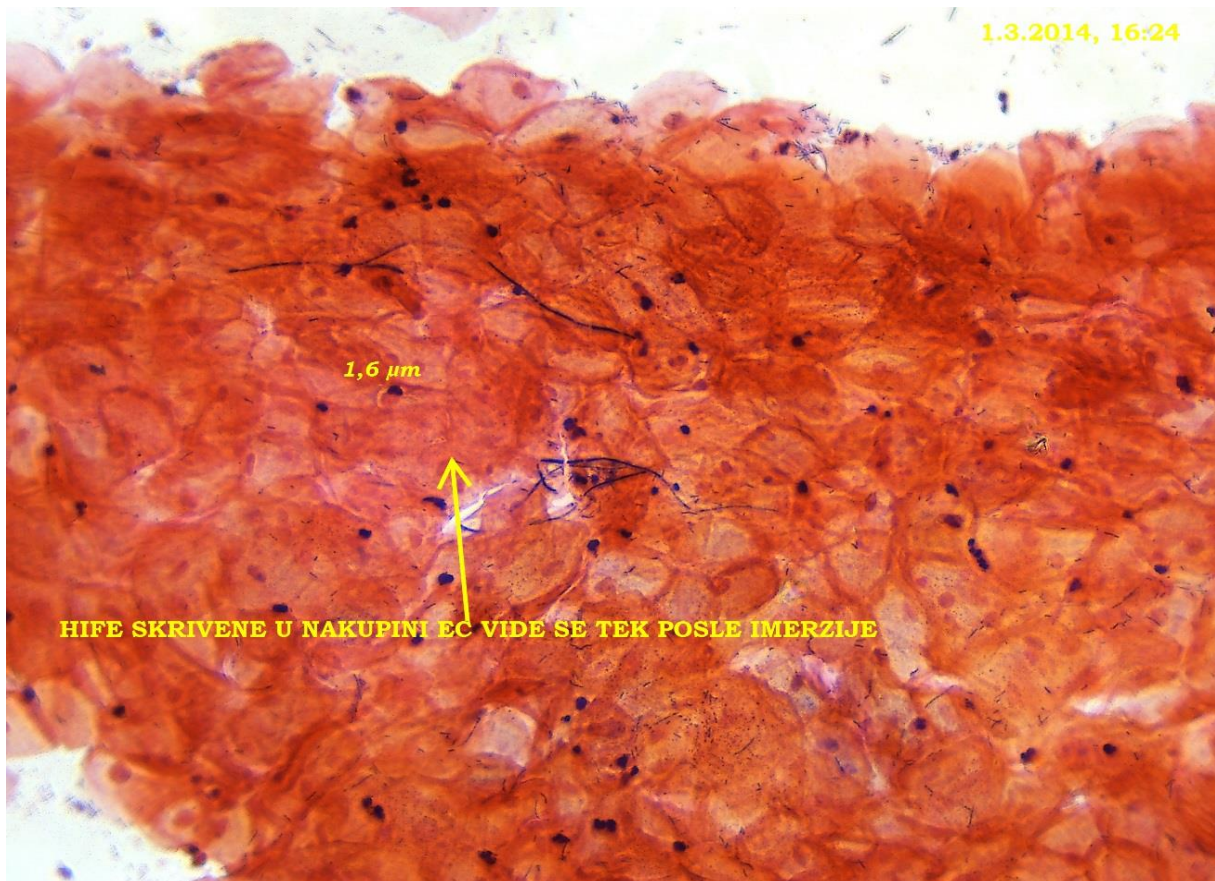
U našoj laboratoriji smo uzimali uzorak sa preparata po Gramu, ciljano sa površine oko 1 mm<sup>2</sup> i izolovali DNA (S. Jovandić), ali, naravno, nismo imali prajmere na osnovu kojih bi identifikovali poreklo DNK. Verujemo da će tehnika Q-PCR biti najvažnija u budućim ispitivanjima mikrobioma jer pored različitosti vrsta i njihov kvantitativni odnos igra vrlo važnu, a možda i važniju ulogu. Na kraju, BV predstavlja polimikrobni sindrom u kome dolazi do smanjenja broja jedne vrste bakterija i enormnog porasta (1000-10.000X) drugih bakterija, ili *G. vaginalis* je prisutna i kod pacijentkinja sa normalnim nalazom, i samo od njenog broja zavisi da li pacijentkinja ima normalnu floru ili BV. Zbog toga smo u ovom radu i napravili semikvantitativnu podelu kod pacijentkinja kod kojih smo pod mikroskopom detektovali CA. Svoje iskustvo smatramo interesantnim i ilustrativnim jer ukazuje na jednu važnu činjenicu koja se ne pominje u dosadašnjim istraživanjima. Otkrivanje CA na mikroskopskom preparatu upravo je srazmerno površini preparata koju pregledate, imerzija na uvećanju x200 olakšava taj postupak, a treba je tražiti u nakupinama EĆ gde se najčešće i "krije".



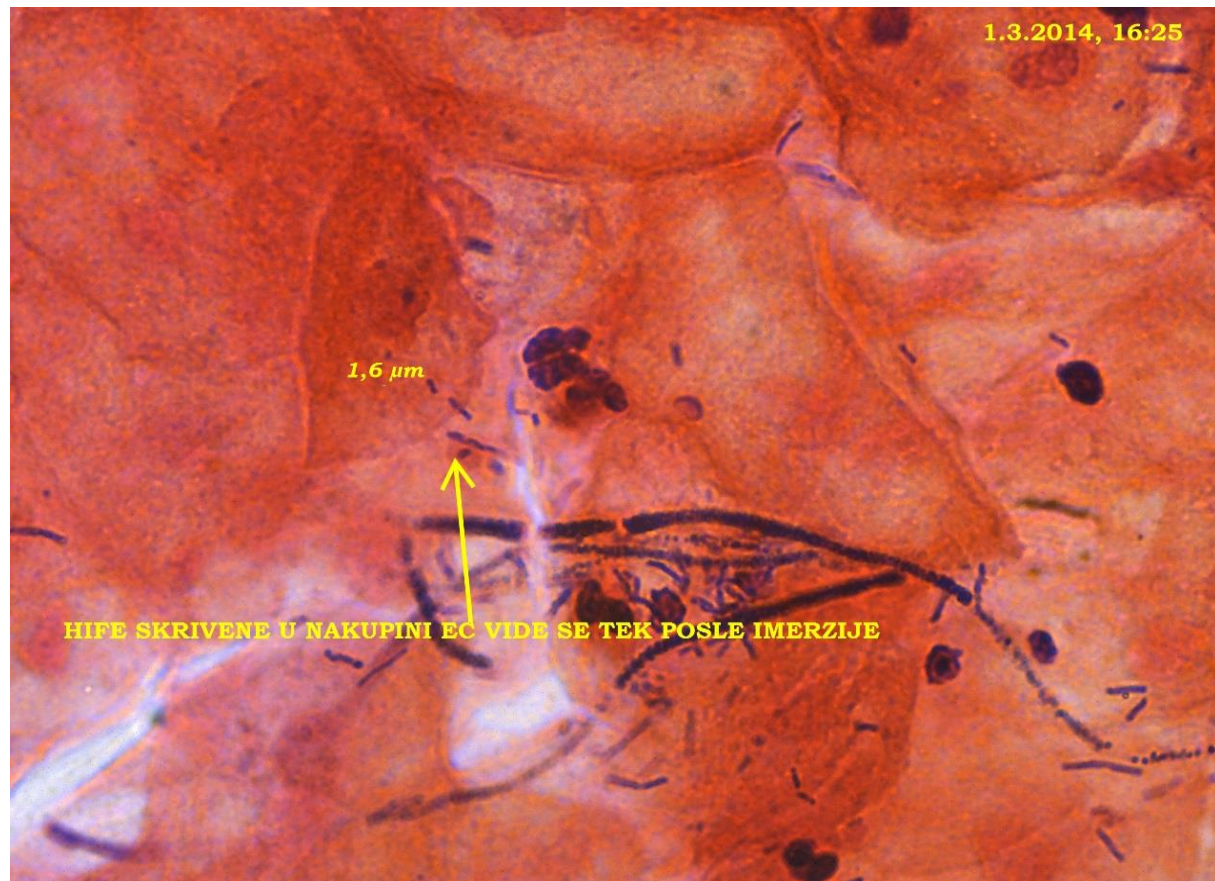
Slika 3.11: Fino pomeranje mikrometra +imerzija na uvećanju X1000 “razotkrivaju” skrivenu hifu CA



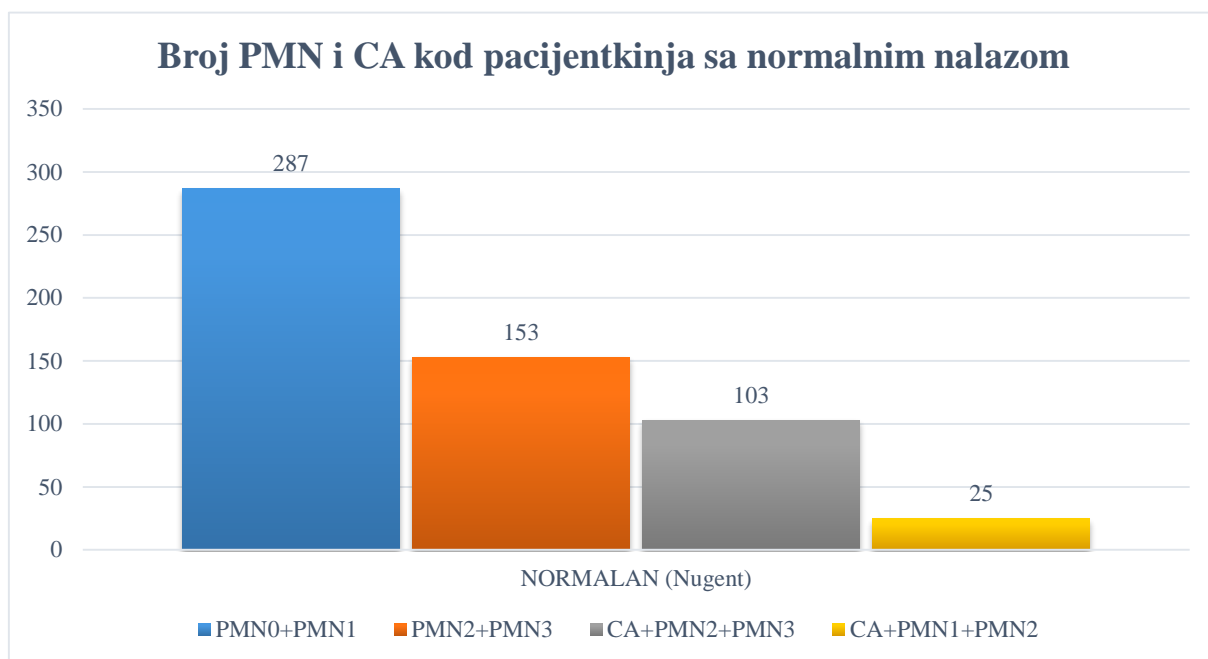
Slika 3.12: Fino pomeranje mikrometra +imerzija na uvećanju X200 “razotkrivaju” skrivenu hifu CA



Slika 3.13: Fino pomeranje mikrometra +imerzija na uvećanju X200 "razotkrivaju" skrivenu hifu CA



Slika 3.14: Fino pomeranje mikrometra +imerzija na uvećanju X200 "razotkrivaju" skrivenu hifu CA



**Grafikon 3.17: Broj PMN i CA kod pacijentkinja sa normalnim nalazom**

Na primeru podele po Nugent-u prikazaćemo kako bi izgledali rezultati, ako u Nugent-ovu podelu uključimo i nalaz CA. Kod 153 od 440 (34,7%) pacijentkinja sa Nugentovim normalnim nalazom nađen je patološki broj PMN, u grupi intermedijarnih 26,7% (36/112), a u grupi sa BV 44,5% (66/148), dale ukupno 255 pacijentkinja sa patološkim nalazom PMN. Kao što smo već rekli CA je najčešći uzrok povećanog broja PMN i sada ćemo prikazati kako bi ti rezultati izgledali, ako u analizu uključimo pored broja PMN („prvi konfauding faktor“) i mikroskopski nalaz CA („drugi konfauding faktor“).

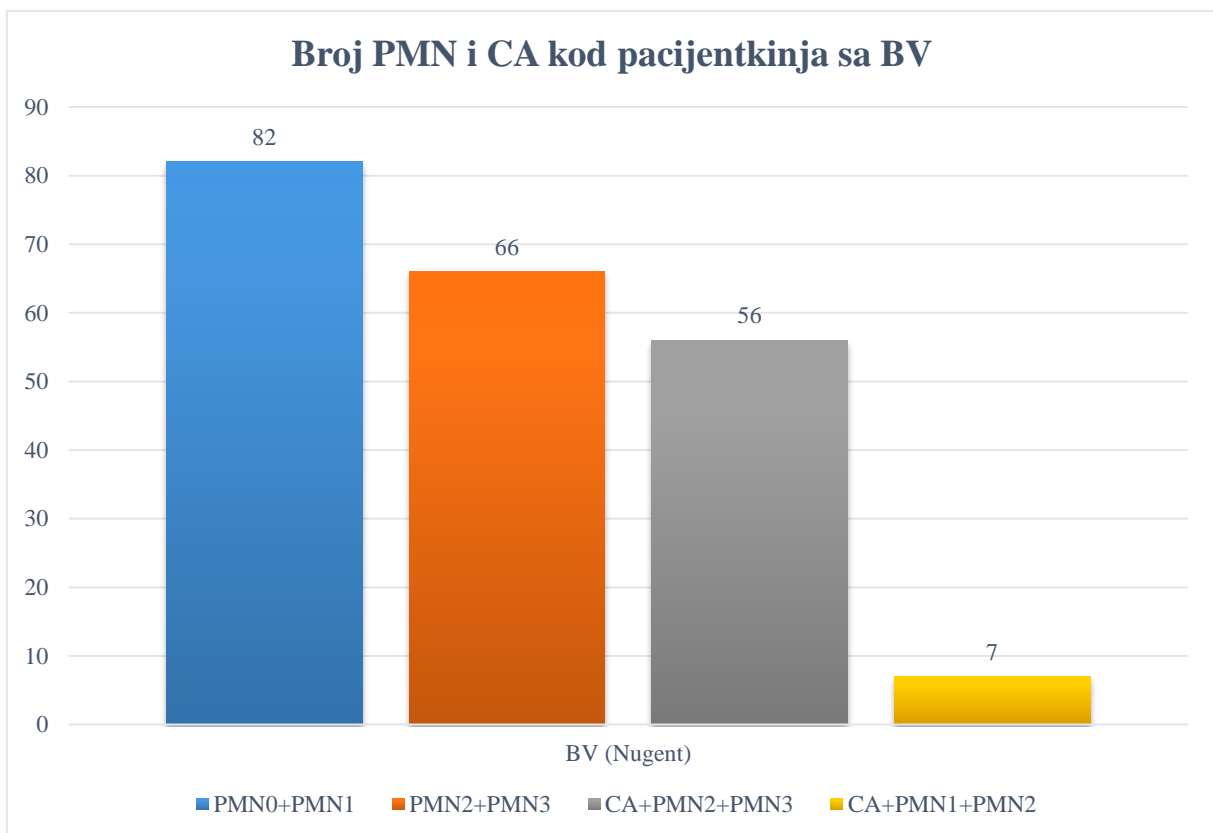
Na Grafikonu 3.2056 su prikazane pacijentkinje sa Nugentovim normalnim nalazom i raspodela u odnosu na broj PMN i detekciju CA. Tako je u ovoj grupi CA detektovana kod 29,0% (128/440), od kojih je 25 (19,5%) imalo normalan broj PMN, a 103 (80,5%) su imale patološki broj PMN. Imamo dva važna podatka: prvi, da 19,5% pacijentkinja sa CA nema povećan broj PMN, i drugi, i da kod 50/153 (32,6%) pacijentkinja CA nije nađena kao mogući uzrok povećanog broja PMN. Dakle u ovakvim slučajevima jedna je mogućnost da je uzrok patološkom broju PMN nepoznat i onda bi ove pacijentkinje mogle teoretski da pripadnu Claeyesovoj grupi sa idiopatskom leukorejom, što je oko 11% (50/440) pacijentkinja sa predominatnom laktobacilarnom florom. Druga je mogućnost da kod ovih pacijentkinja nismo detektovali CA mikroskopskim pregledom, što naravno ne može isključiti infekciju CA, ni mogućnost da je ona uzrok povećanom broju PMN. Međutim kao što smo već rekli oko 20% pacijentkinja sa infekcijom CA nije imalo povećan broj PMN, tako da CA sigurno nije jedini

uzrok patološkom broju PMN. S druge strane od . Kao što smo rekli u metodologiji u ovu grupu su svrstane i pacijentkinje kod kojih je na čitavom preparatu nađeno svega nekoliko spora, tako da smo tokom ispitivanja često postavljali pitanje da li je moguće da ovako mali broj spora ili hifa gljivica može biti razlog za tako veliki broj PMN, kao što se to vidi na fotografijama.

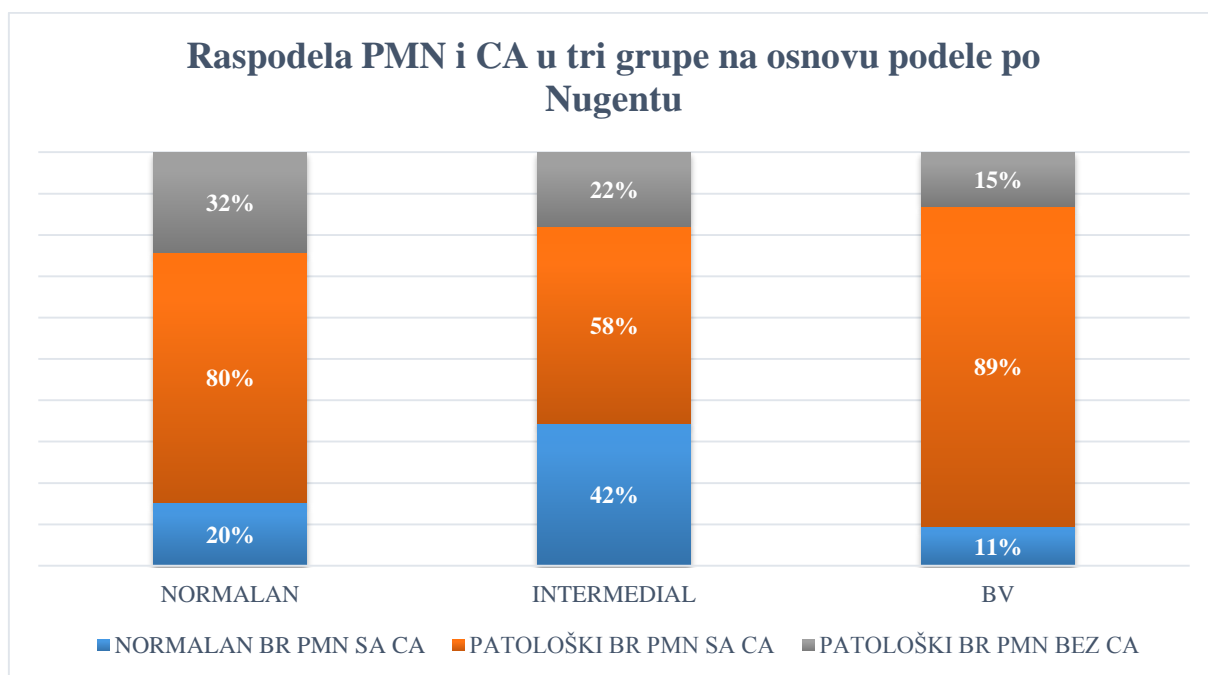
Ni danas nemamo odgovor na ovo pitanje, ali mislimo da ovi rezultati svakako ukazuju na potrebu daljih ispitivanja koja bi dala odgovor na ovo pitanje.

U Nugentovoj intermedijarnoj grupi 36/112 pacijentkinja imalo je patološki nalaz PMN, a kod 48/112 (42,8%) je mikroskopskim pregledom detektovana CA. Od njih 48 patološki broj PMN imalo je 28, a 20 je imalo normalan broj PMN, tako da u ovoj grupi 41,6% (20/48) pacijentkinja sa CA nije imala povećan broj PMN, a kod 8/36 (22,2%) pacijentkinja nije nađena CA kao mogući uzrok povećanog broja PMN.

Od 148 pacijentkinja kod kojih je na osnovu kriterijuma po Nugentu postavljena dijagnoza BV, 66 (44,5%) je imalo patološki broj PMN, a kod 63 (42,5%) je detektovana CA. Patološki broj PMN nađen je kod 56 (88,8%) od 63 pacijentkinje, dok je 7 pacijentkinja (11,2%) imalo nalaz CA i normalan broj PMN. Dakle u grupi BV 10 (15,1%) od 66 pacijentkinja nije imalo .



**Grafikon 3.18: Broj PMN i CA kod pacijentkinja sa BV**



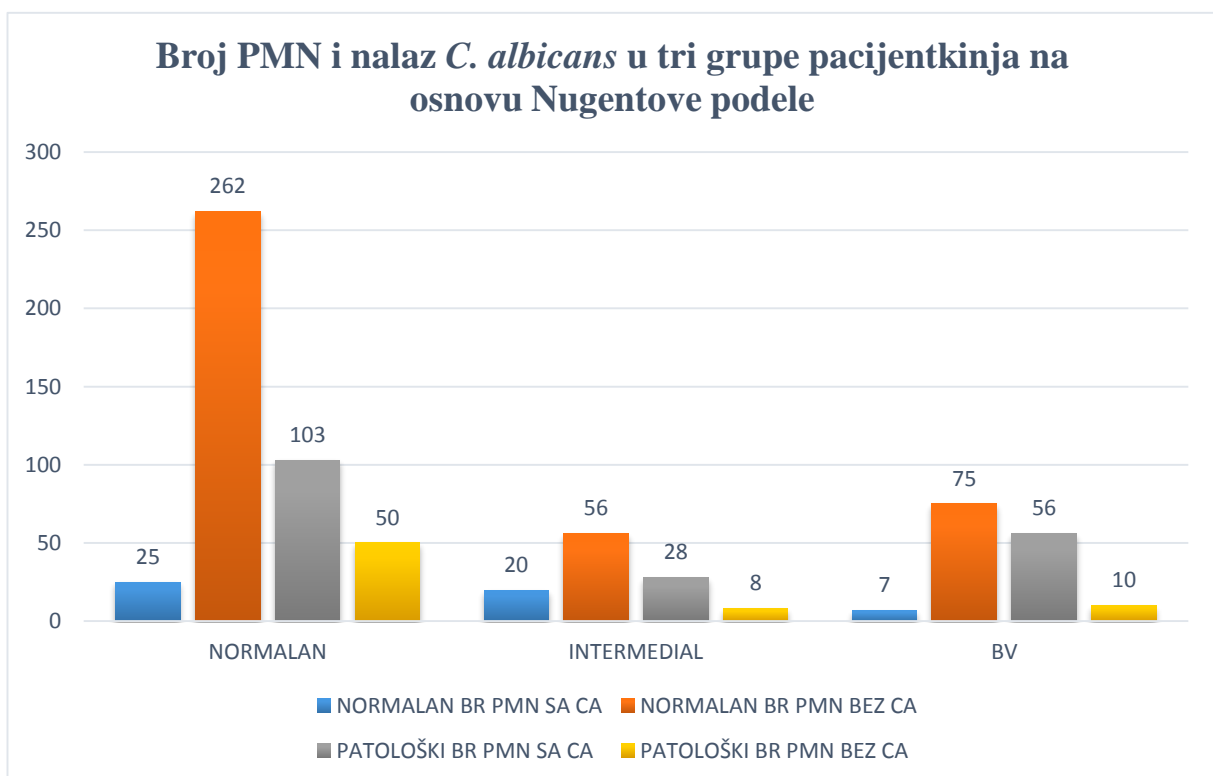
**Grafikon 3.19: Raspodela PMN i CA u tri grupe na osnovu podele po Nugentu**

Treba primeti da se broj pacijentkinja koje imaju mikroskopski nalaz CA i normalan broj PMN i pacijentkinja sa povećanim brojem PMN bez CA značajno razlikuje u ove tri grupe pacijentkinja što je prikazano na Grafikonu 3.19.

Kao što je rečeno, generalno je poznato da je infekcija CA jedan od najčešćih uzroka povećanog broj PMN u vaginalnom sekretu, ali nemamo precizniji odgovor na pitanje koliki je procenat pacijentkinja koje imaju infekciju CA i povećan broj PMN, a koliko ih ima infekciju i normalan broj PMN. U stvari morali bi preciznije postaviti ovo pitanje s obzirom na činjenicu da moramo razlikovati infekciju CA, od kolonizacije CA. Poznato je da izolacije CA kulturom, ne znači i infekciju CA, a sa druge strane većina autora veruje da detekcija CA mikroskopskim pregledom ukazuje na veću verovatnoću za infekciju nego za kolonizaciju CA. Ipak imajući pred očima mikroskopske slike i pacijentkinje iz grupe CA NULL, ponovićemo to opet, teško je poverovati da tako mali broj hifa i spora gljivica može biti razlog tako jakog inflamatornog odgovora. Dakle mi danas ne znamo zašto neke pacijentkinje, kod kojih smo kulturom izolovali ili mikroskopski detektovali CA, imaju povećan broj PMN, a kod drugih je taj broj normalan. Jedna od mogućih hipoteza bila bi da pacijentkinje sa povećanim brojem PMN imaju infekciju, dok bi odsustvo PMN govorilo u prilog kolonizacije CA, što bi opet moglo da bude u vezi sa simptomima i kliničkom slikom kod tih pacijentkinja, o čemu će se kasnije nešto više govoriti. Ali ako pogledamo Grafikon na kome se jasno vidi da su ove razlike značajne u odnosu na Nugentove tri grupe, ne možemo a da ne pretpostavimo da je druga bakterijska flora (laktobacili

ili BVAB) možda bitan faktor koji određuje stepen inflamatornog odgovora (broj PMN) na prisustvo CA.

Ono što je “nelogično” u ovako “logičnoj” pretpostavci je činjenica da je najviše pacijentkinja sa patološkim brojem PMN (44,5%) nađeno u grupi sa BV, u kojoj je i najveći procenat pacijentkinja su pacijentkinje sa CA (42,5%). Nelogično iz dva razloga, prvi jer je BV kao što smo rekli poremećaj koji se karakteriše odsustvom PMN, a drugi koji se odnosi na podatak da CA odgovara više kisela nego bazna sredina. Iz dobijenih rezultata mogli bi smo zaključiti da CA više odgovara bazna nego kisela sredina, a da oko 15% pacijentkinja sa BV ima povišen broj PMN, a da kod njih nismo identifikovali CA. Podatak da 29% pacijentkinja iz Nugentove normalne grupe ima CA, govori u prilog tome da CA, podjednako dobro “uspeva” i u baznoj i kiseloj sredini i da su neki drugu faktori koji nisu pH važniji za njen rast i razmnožavanje. Jedan, a verovatno i najvažniji od tih drugih faktora, je sastav mikrobiološke zajednice, odnosno potencijalni “protivnici” CA u borbi za hranu, kiseonik i druge faktore koji o(ne)moгуćavaju da ovaj komensal postane patogen, U prilog ovome govore podaci koji se odnose na intermedijarnu grupu, u kojoj je broj pacijentkinja sa CA i normalnim brojem PMN značajno veći od pacijentkinja sa normalnim nalazom i BV, što samo potvrđuje da bi ovu grupu pacijentkinja u budućim ispitivanjima trebalo mnogo detaljnije analizirati nego što je to do sada bio slučaj.



**Grafikon 3.20: Raspodela pacijentkinja sa patološkim i normalnim brojem PMN i pozitivnim ili negativnim mikroskopskim nalazom na CA u tri grupe podele po Nugent-u**

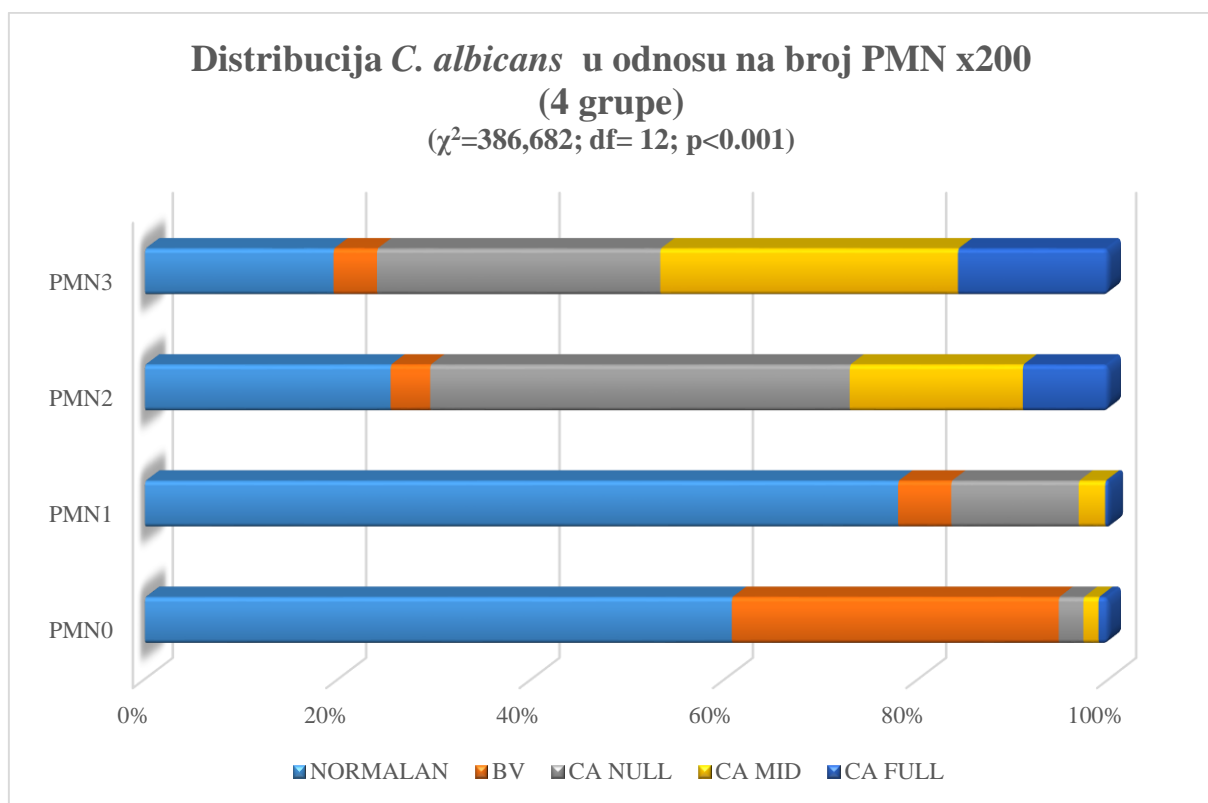


Dakle ako sad u svetlu prethodne diskusije o Nugentovim grupama i različitom broju PMN (prvi “konfounding faktor”) pogledamo kakvi su rezultati posle uvođenja u analizu i drugog “konfounding” faktora (CA), onda ćemo videti da teoretski više nemamo 6 grupa (normalne, intermedijarne i BV sa normalnim i patološkim brojem PMN) nego imamo 12 grupa. U svakoj od tri Nugentove grupe, možemo razlikovati pacijentkinje sa normalnim brojem PMN sa ili bez CA, i pacijentkinje sa patološkim brojem PMN, sa ili bez CA, kao što je to prikazano u Grafikonu 3.20.

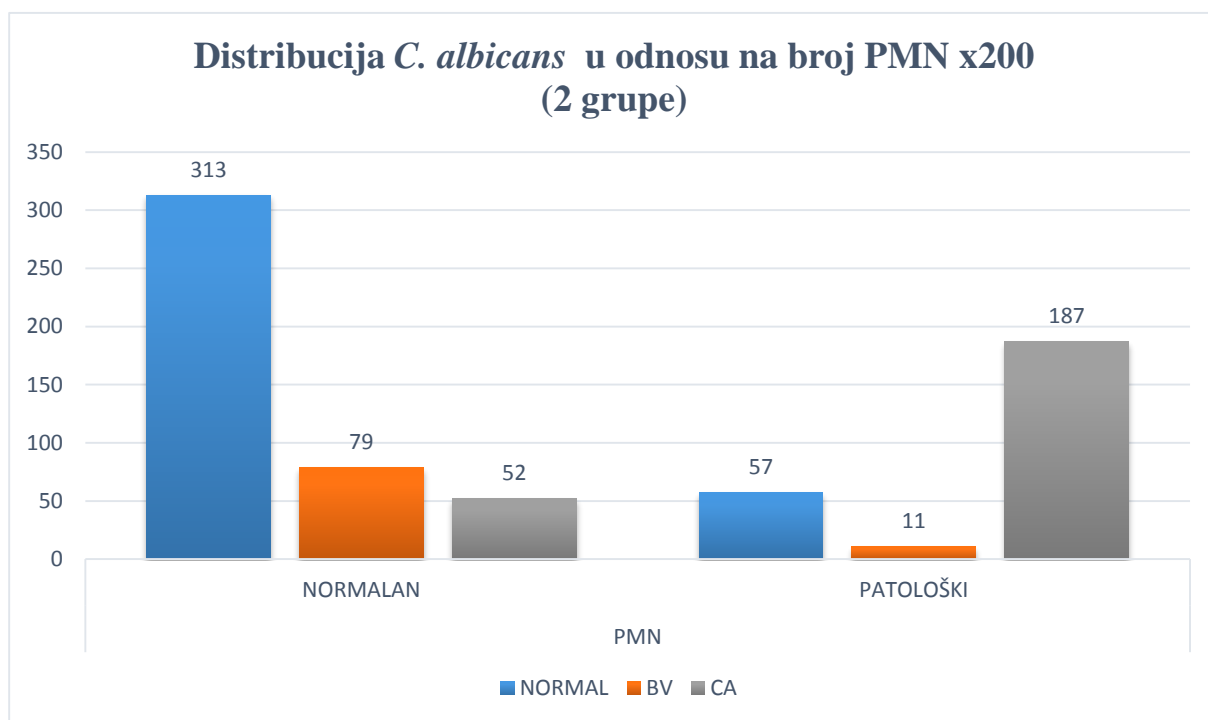
Ako prihvatimo činjenicu da PMN i CA, pojedinačno, mogu uticati, na primer, na koncentracije nekog inflamatornog medijatora onda se ovakva podela podrazumeva, ali je problem što smo od Nugentove tri grupe stigli do 12 grupa, od kojih pet ima 20 ili manje pacijentkinja, tako da bez obzira na ukupan broj pacijentkinja (n=700), ovo značajno otežava ili čini nemogućom statističku analizu ovako kategorisanih pacijentkinja. Ovo istovremeno govori koliko je teško donositi zaključke o koncentracijama inflamatornih medijatora, s obzirom da veliki broj faktora, koji na njih mogu uticati, a mi smo to pokazali samo uvođenjem dva (PMN i CA) u Nugentovu jednostavnu podelu (samo tri grupe pacijentkinja), a možemo zamisliti kako bi izgledala ovakva analiza u podelama po Ison/Hayu i Claeysu koji imaju 5 odnosno 6 grupa pacijentkinja.

S obzirom da NP ima 6 grupa, ali da se suštinski ovih 6 grupa mogu svesti samo na dve, kao i na razlike u odnosu na Nugentovu podelu o kojima smo već govorili odlučili smo se da istu ovakvu analizu uradimo kod pacijentkinja koje su podeljen u različite grupe na osnovu NP-6G. Na narednim grafikonima prikazana raspodela CA po različitim grupama na osnovu NP i semikvantitativne podele CA.

Na Grafikonu 3.21 prikazana je raspodela pacijentkinja u kojoj su pacijentkinje uz grupa NF, NM i NN stavljene u jednu grupu (NORMAL), a isto je urađeno sa pacijentkinjama BVF, BVM i BVN (BV), a u sledeće tri kolone je prikazana semikvantitativna raspodela CA (CAF, CAM i CAN) a sve to u odnosu na broj PMN, podela u četiri grupe kako je to objašnjeno u metodologiji i prethodnoj diskusiji.



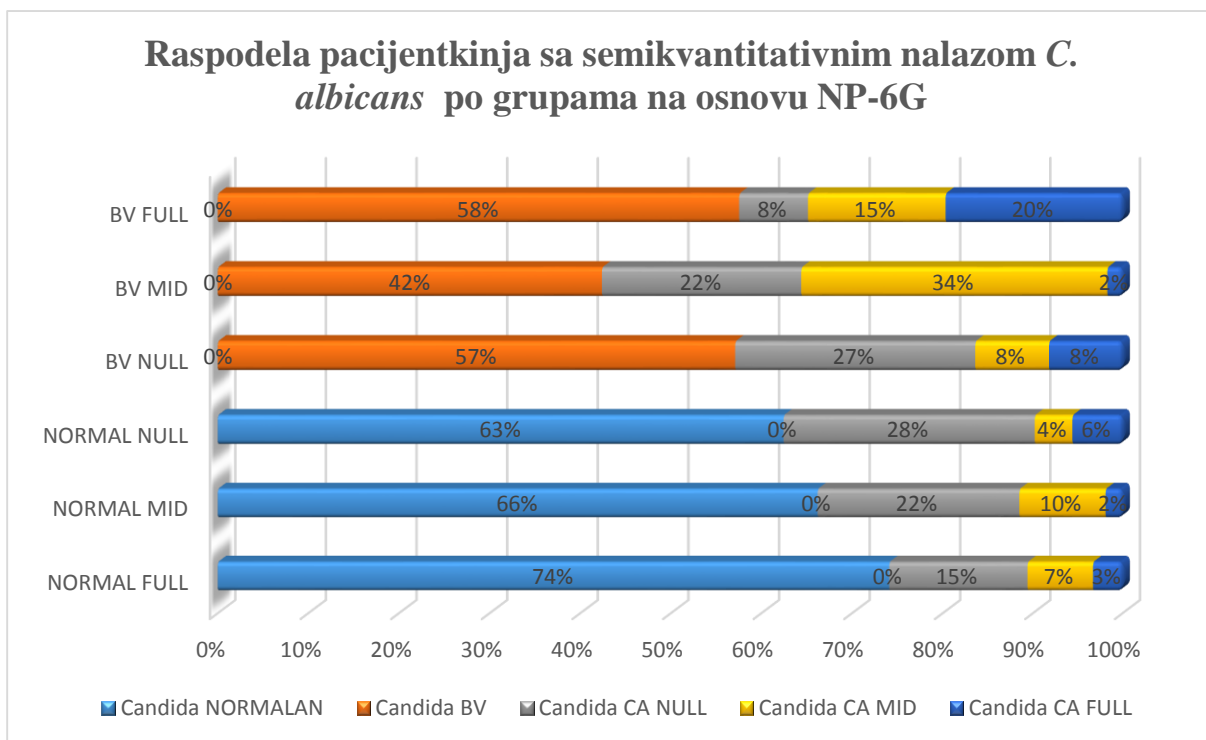
**Grafikon 3.21:** Raspodela pacijentkinja kod kojih je mikroskopskim pregledom x200 detektovana CA koja je na osnovu semikvantitativne podele razvrstana u tri podgrupe u odnosu na broj PMN



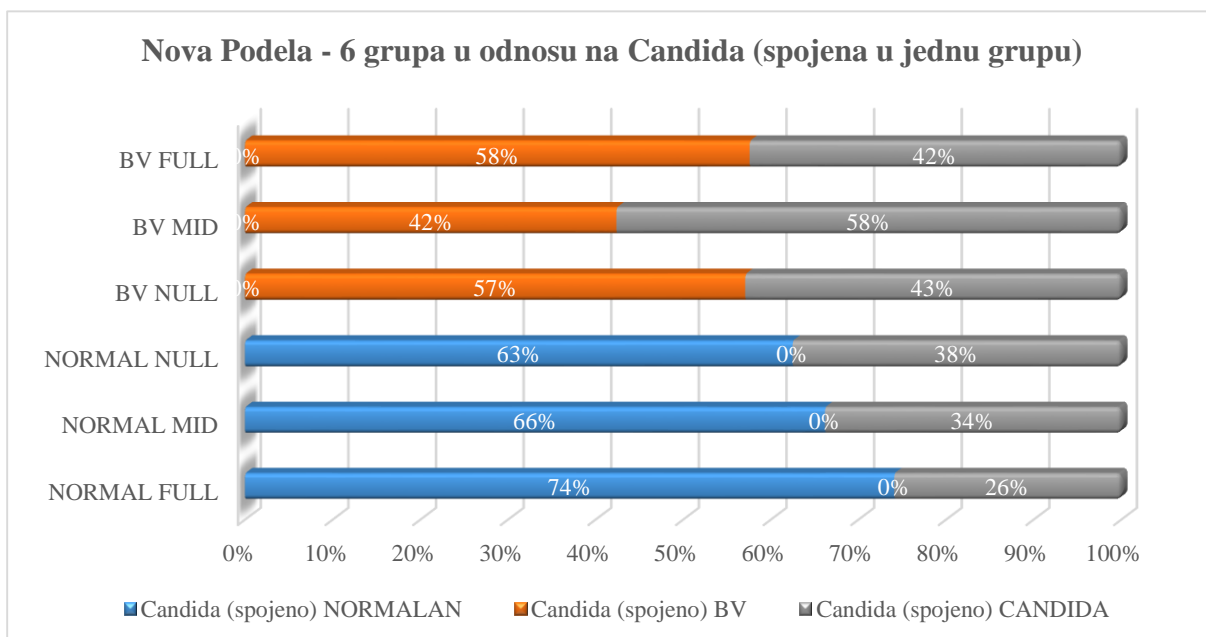
**Grafikon 3.22:** Raspodela pacijentkinja sa normalnim nalazom vaginalnog sekreta, BV i mikroskopskim nalazima CA u odnosu na grupe sa normalnim i patološkim broj PMN

Na Grafikonu 3.22 je prikazana ista podela samo što su sve pacijentkinje sa CA svrstane u jednu grupu, a 4 grupe PMN svedene na dve, one sa normalnim i patološkim brojem PMN.

Na Grafikonima 3.23 i 3.24 prikazana je raspodela pacijentkinja sa CA po grupama na osnovu NP-6G odnosno NP-2G, pri čemu su pacijentkinje sa nalazom CA prikazane semikvantitativno (tri grupe CAF, CAM i CAN) ili su spojene u jednu grupu CA.



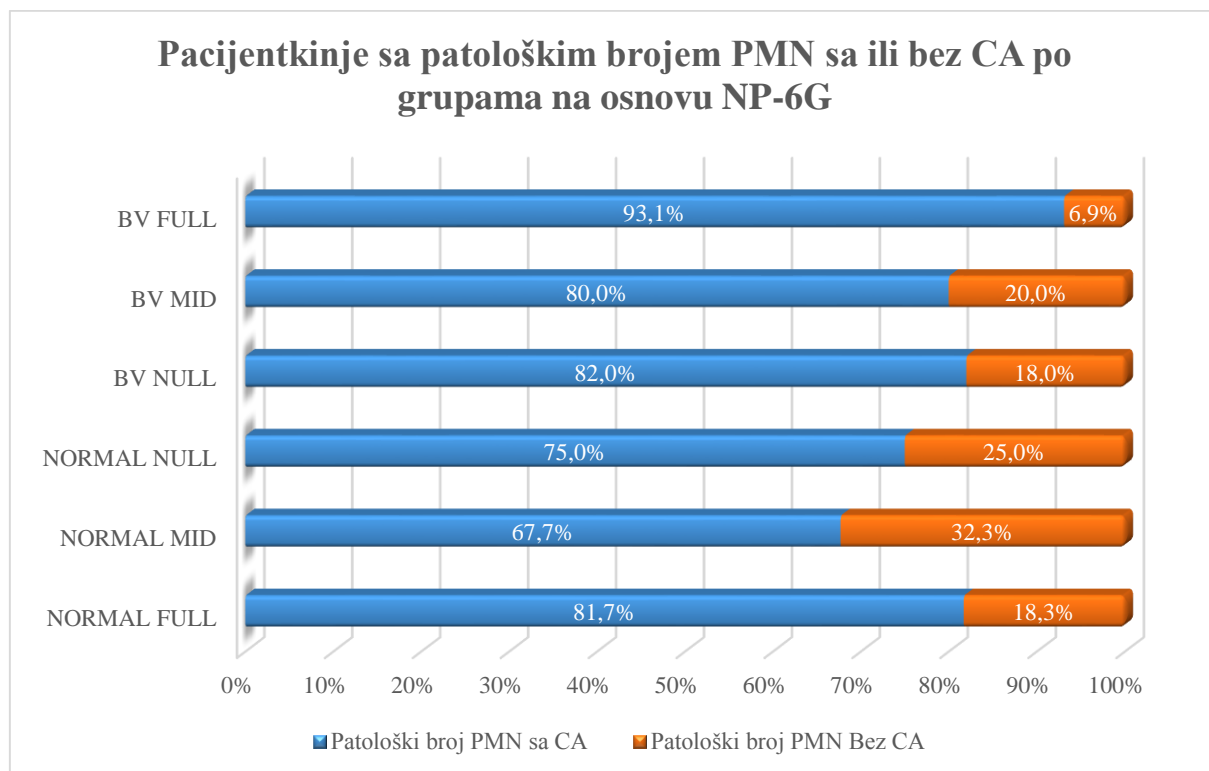
**Grafikon 3.23: Raspodela pacijentkinja sa semikvantitativnim nalazom CA (CAF, CAM, CAN) po grupama na osnovu NP-6G**



**Grafikon 3.24: Raspodela pacijentkinja sa semikvantitativnim nalazom CA (CAF, CAM, CAN) po grupama na osnovu NP-6G**

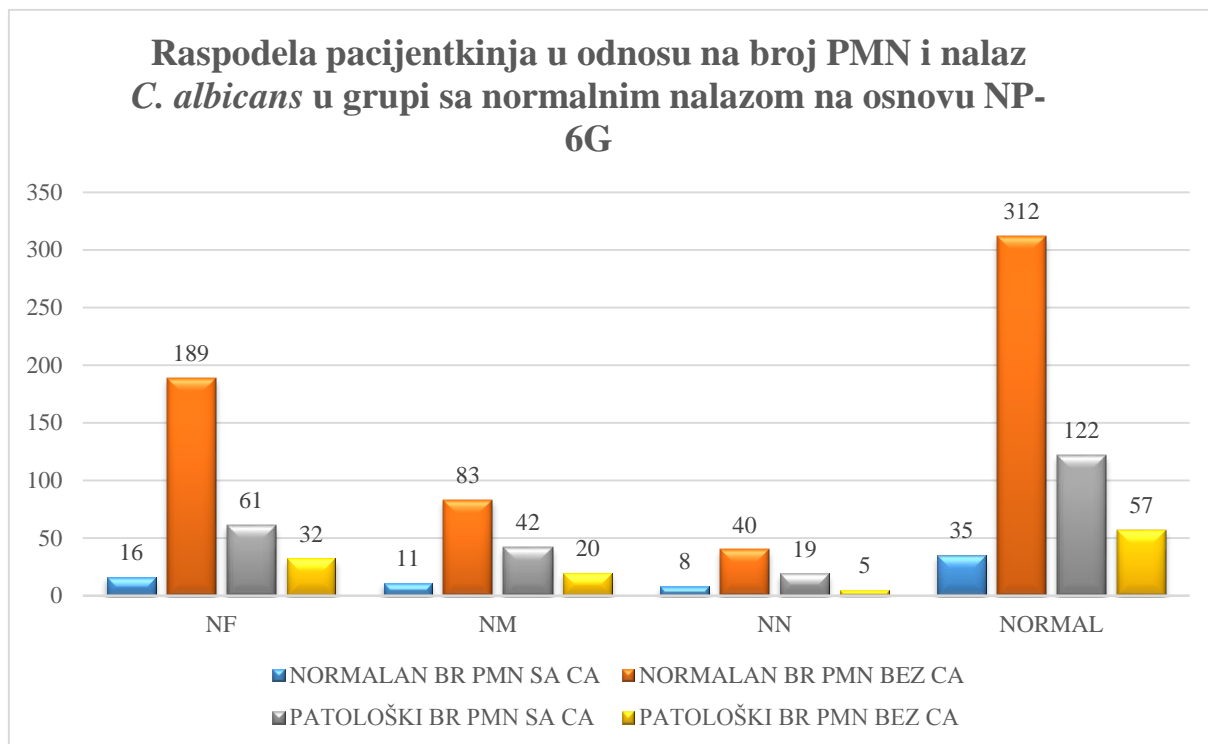
Iz ova dva grafikona se vidi da su pacijentkinje sa BV imala veću učestalost CA u odnosu na grupu sa normalnim nalazom. Tako su 83 (47,7%) pacijentkinje sa BV imale CA, a 29,8% (158/530) pacijentkinja sa normalnim nalazom imalo je CA.

Na Grafikonu 3.25 su pacijentkinje sa patološkim brojem PMN podeljene u dve grupe, one kod kojih su mikroskopskim pregledom na uvećanju x200 nađena CA i one kod kojih CA nije nađena, a sve to u po grupama na osnovu NP-6G.

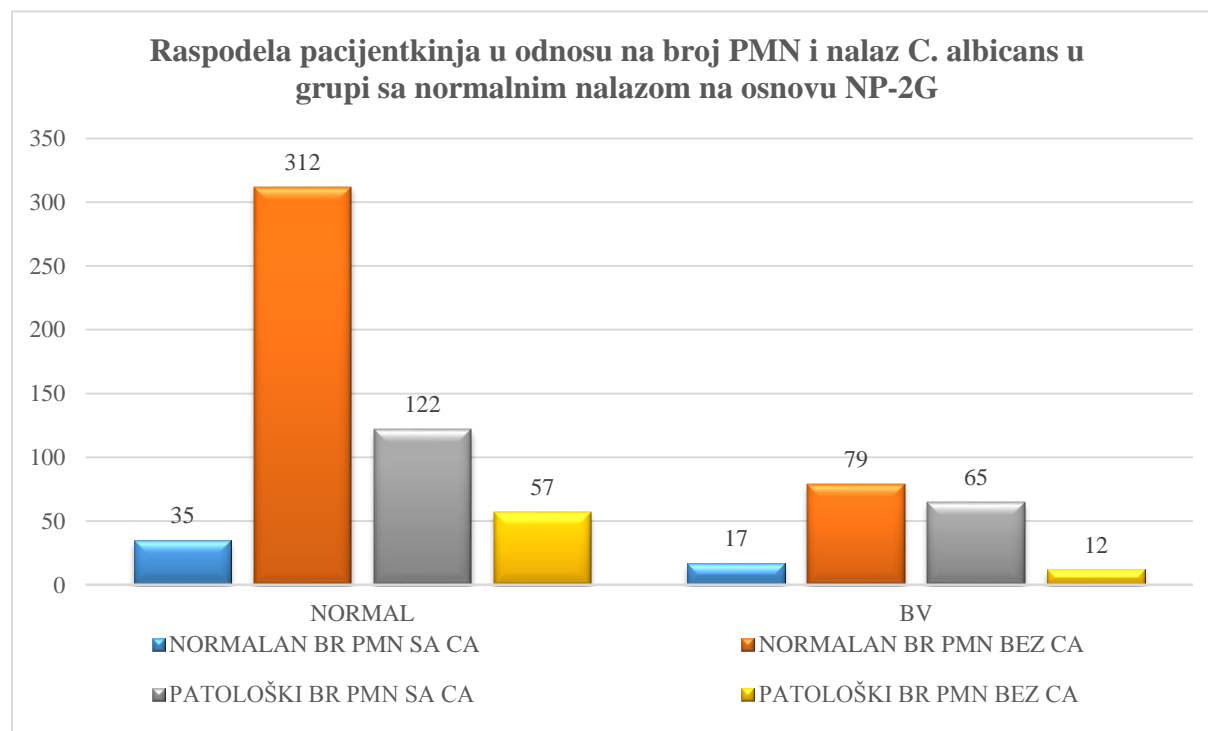


**Grafikon 3.25: Pacijentkinje sa patološkim brojem PMN sa ili bez CA po grupama na osnovu NP-6G**

Od 699 pacijentkinja 526 (75,2%) je imalo normalan nalaz (NF+NM+NN), a 173 (24,8%) pacijentkinje su imale BV (BVF+BVM+BVN). Posle toga smo analizirali rezultate semikvantitativnog određivanja broja PMN na različitim mikroskopskim uvećanjima, i zaključili da pregled na uvećanju x200 daje najbolje rezultate i na osnovu takve metodologije u našem ispitivanju od 699 pacijentkinja 445 (63,6%) je imalo normalan nalaz PMN, 254 (36,4%) patološki nalaz PMN. Sada u analizu uvodimo i mikroskopski nalaz CA na uvećanju x200 i rezultati pokazuju da smo takvim pristupom CA detektovali kod 34,1% pacijentkinja 239/699. Dakle sada znamo da je od 699 pacijentkinja 173 imale BV, 254 su imale patološki broj PMN, a kod 239 smo mikroskopskim pregledom detektovali CA. Najveći broj pacijentkinja sa CA pripada podgrupi CAN 54,8% (131/239), 73 (30,5%) podgrupi CAM i najmanji u grupi CAF 14,7% (35/239).



**Grafikon 3.27:** Raspodela pacijentkinja sa različitim brojem PMN i nalazom CA u grupi sa normalnim nalazom vaginalnog sekreta na osnovu NP-6G



**Grafikon 3.26:** Raspodela pacijentkinja sa različitim brojem PMN i nalazom CA kod pacijentkinja sa normalnim nalazom i BV na osnovu NP-2G

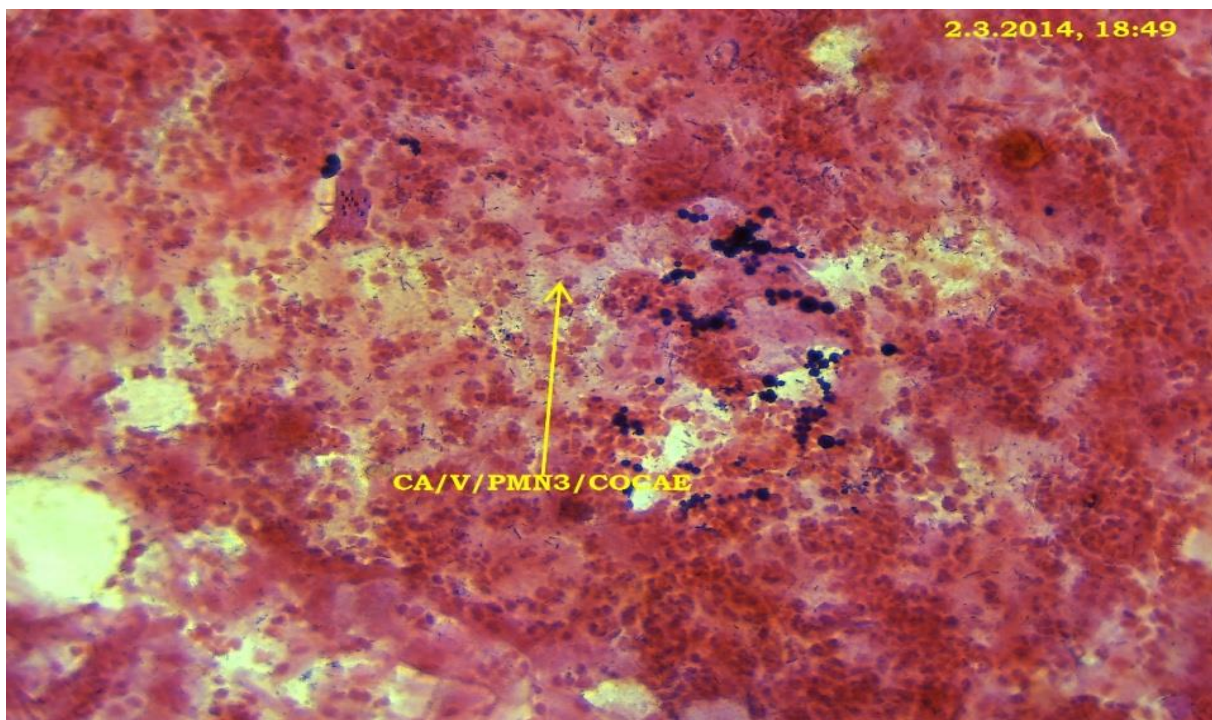
Kod 526 pacijentkinja sa normalnim nalazom vaginalne flore (NP-2G) kod 157(29,8%) je detektovana CA mikroskopskim pregledom, dakle 369 (70,2%) pacijentkinja je imalo normalan nalaz bez CA.

Od 369 pacijentkinja sa normalnim nalazom vaginalne flore, i bez CA, 312 (84,5%) je imalo normalan broj PMN, a 57 (15,5%) patološki broj PMN.

Grupa sa BV nije prikazana posebno ali je u Grafikonu 3.27 prikazan uporedni nalaz raspodele pacijentkinja u odnosu na mikroskopski nalaz broja PMN i detekcije CA, kod pacijentkinja sa normalnim nalazom i BV na osnovu podele NP-2G. Takođe, od 173 pacijentkinje sa BV kod 82(65+17; 47.9%) mikroskopski su viđene spore ili hife gljivica, dakle samo 52,1% (n=79+12=91) pacijentkinja imalo je BV bez CA. Ako sada analiziramo grupu sa BV onda vidimo da je 87,7% (79/91) imalo normalan broj PMN, dok je 12,3% (n=12) pacijentkinja imalo BV sa povećanim brojem PMN, ali bez CA. S druge strane od 239 pacijentkinja sa CA njih 187 (78,2%; 122+65) imalo je patološki broj PMN, dok su 52 (21,8%; 35+17) pacijentkinje sa CA imale normalan broj PMN.(Grafikon 3.27)

U Grafikonu 3.26 je prikazana raspodela u odnosu na broj PMN i nalaz CA kod pacijentkinja koje su na osnovu podele NP-6G imale normalan nalaz (NF+NM+NN). Ukupno gledajući, kod 57 od 179 (31,8%) pacijentkinja sa patološkim nalazom PMN nije nađena CA, dok je 35 pacijentkinja sa CA imalo normalan broj PMN. Dakle i ovde se 10,8% (57/526) pacijentkinja može svrstati u Claeysovu grupu sa idiopatskom leukorejom. Dakle sigurno je i da se ove dve grupe pacijentkinja (predominantna laktobacilarna flora i normalan ili patološki broj PMN) međusobno razlikuju, i da je logično pitanje da li bi ovih 10,8% pacijentkinja treba da posmatramo kao posebnu grupu, kao što su to predložili Claeys i sar. Dakle rezultati dobijeni u ovom ispitivanju samo su potvrda da u svim dosadašnjim studijama, izuzev naravno Claeys i sar., ova grupa pacijentkinja nije prepoznata. Ako se složimo da povećan broj PMN predstavlja patološki nalaz koji ukazuje na prisustvo infekcije i/ili inflamacije, onda smo dužni da pokušamo da nađemo uzrok ovakvog stanja, ako smo ga pre desetak godina nazvali idiopatskim. Naravno, kao što smo već rekli, podrazumeva se da se kod svakog nalaza sa patološkim brojem PMN isključi infekcija kandidom ili trihomonasom. Iako smo u našem ispitivanju nalaz spora i hifa gljivica semikvantifikovali nismo uspeli da nađemo korelaciju koja bi ukazivala da su pacijentkinje sa većim brojem spora ili hifa gljivica imale i veći broj PMN, naprotiv nalazili smo preparate na kojima bi smo naišli svega nekoliko spora ili hifa gljivica a kod kojih je broj PMN bio ogroman. Dobro je poznat stav da hife na neki način predstavljaju infektivni oblik CA i da njihovo prisustvo ukazuje na infekciju, dok prisustvo spora ukazuje na kolonizaciju CA. Mi u našem ispitivanju nismo mogli potvrditi takav stav bar kada je reč o broju PMN (asimptomatske pacijentkinje kojima je zakazivan pregled, a nemamo precizne kliničke podatke o simptomima pacijentkinja na dan pregleda), jer kao što je prikazano i na Slici 3.15 nekad smo na čitavom preparatu nalazili ogroman broj PMN i svega nekoliko spora

ili hifa gljivica, tako da je pitanje da li ovako mali broj spora ili hifa može dovesti do ovako velikog broja PMN ili je uzrok povećanog broja PMN nešto drugo. Za sada nismo mogli zaključiti kakva je stvarna uloga nalaza spora ili hifa gljivica, kao ni njihovog broja na preparatu po Gramu i potrebna su dalja ispitivanja koja bi preciznije korelirala klinički nalaz i simptome pacijentkinja sa mikroskopskim nalazom. Ono u šta smo svakako sigurni s obzirom na razliku detekciji CA na uvećanjima x200, x400 i x1000 jeste da. CA često ostaje nedijagnostikovana („skrivena“) ukoliko se ne pregleda velika površina preparata. Prethodni rezultati su pokazali kako podela pacijentkinja na osnovu različitih dijagnostičkih kriterijuma može da utiče na rezultate ispitivanja. Drugaćijim metodološkim pristupom mikroskopskom pregledu preparata po Gramu CA je nađena kod 239 (34,1%) pacijentkinja, što je više nego dvostruko u odnosu na 99 pacijentkinja kod kojih smo detektovali CA na uvećanju x1000 u jednom gledanju preparata. U budućim istraživanjima moralo bi da se vodi računa o standardizaciji metodoloških procedura koje podrazumevaju način i mesto sa koga se uzima uzorak, njegov transport, metodologiju mikroskopskog pregleda, i druga metodološka precizna uputstva radi bolje uporedivosti budućih ispitivanja. Podatak, da se broj PMN u forniksi, sredini ili vestibulumu vagine može značajno razlikovati, ili da se u projektu mikrobioma vagine uzorci uzimaju iz ova tri dela vagine samo potvrđuje ovakav stav.

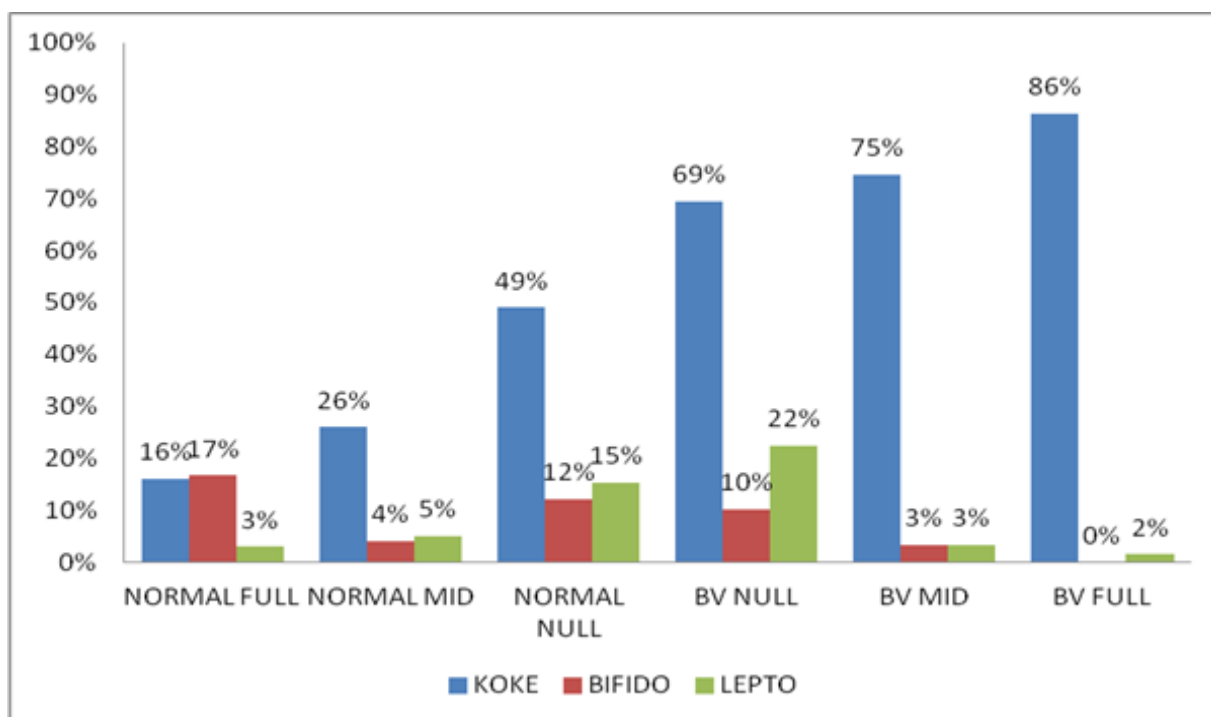


**Slika 3.15:** Na čitavom preparatu veliki broj PMN i samo spore koje se vide na slici, tako da je nejasno da li ovako malo spora može biti uzrok tako velikom broju PMN

### 3.2.2 MORFOTIP KOKA

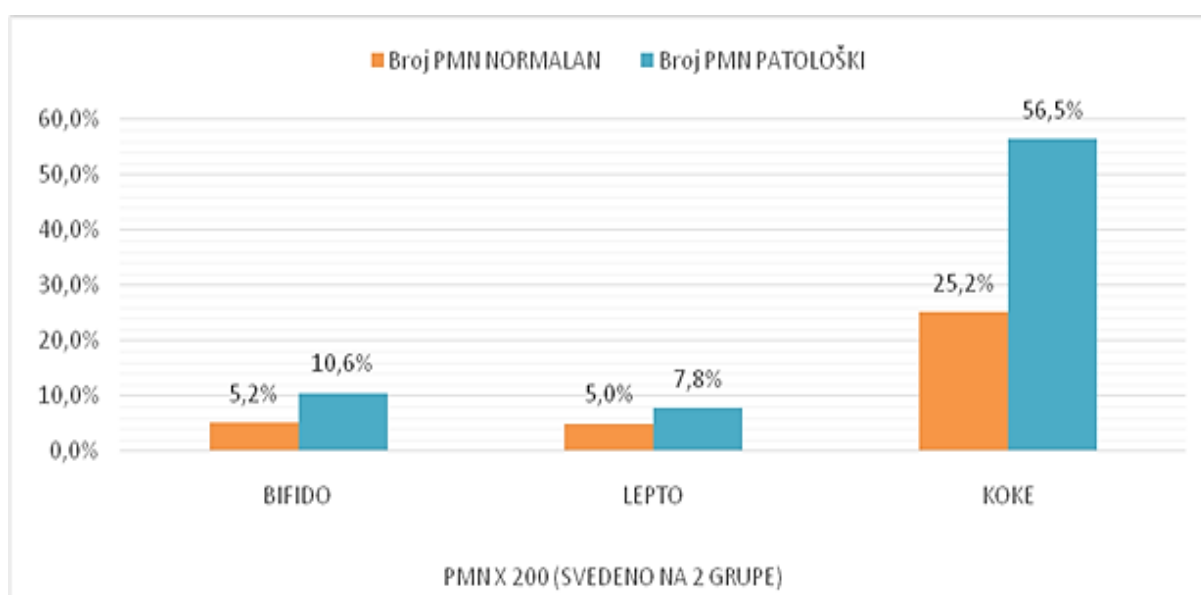
Naše zanimanje za koke posledica je odluke da pored Nugentovih dijagnostičkih kriterijuma u ispitivanje uključimo i dijagnostičke kriterijume po Ison/Hayu i kriterijume po Claeysu. Međutim, gledajući preparate na uvećanju x1000 ove bakterijske forme smo videli kod veoma malog broja pacijentkinja. Tek kada smo sve preparate počeli da gledamo pod imerzijom i na uvećanju x200 shvatili smo da su ove bakterijske forme češće prisutne na mikroskopskom preparatu znatno češće. Svakako da je najvažniji razlog za veliku razliku u broju pacijentkinja kod kojih smo detektovali koke činjenica da su koke na mikroskopskom preparatu raspoređene po “regionima” tako da na jednom mikroskopskom preparatu imamo polja koja pokazuju mikroskopsku sliku svih 6 grupa NP, dakle od onih NF do BVF, a u okviru svakog od njih polja sa dosta koka. Dakle, u ovom ispitivanju nisu nađeni preparati na kojim su koke pretežna bakterijska flora na čitavoj površini preparata uz smanjen ili odsutan broj drugih bakterijskih formi, nego je mikroskopska slika sa nekom od 6 pozadina i regionima u kojima dominiraju koke. Za grupu pacijentkinja koje imaju pretežno koke na preparatu po Gramu komentar je sličan prethodnom koji se odnosio na pacijentkinje sa čistim nalazom u podeli po Ison/Hayu. Dakle, iako su Ison/Hay poodavno ukazali na ovu grupu pacijentkinja kao i uprkos činjenici da su ovu kategoriju “prihvatili” i Claeys i sar. u literaturi gotovo i da nema podataka koji se na njih odnose. Nedavno je objavljena longitudinalna studija Santiago i sar. [411] koja se bavi promenama vaginalne flore kod 17 pacijentkinja u dva uzastopna menstrualna ciklusa. U definisanju stanja i dinamičnosti promena vaginalne flore pacijentkinje su svakodnevno same uzimale uzorak za bojenje preparata po Gramu, uzorci su kultivisani jedanput nedeljno, a od molekularnih metoda korišćen je DNK-PCR i 16 S rRNK sekvenciranje [411]. Pregled preparata po Gramu rađen je na osnovu kriterijuma po Claeysu i sar., s tim što u ovoj podeli nije bilo pacijentkinja iz originalnih grupa Gradus 0 (“čist nalaz” u ovom ispitivanju i pacijentkinja iz originalne Grupe I-PMN (“leukoreja” u ovom ispitivanju), a verovatno zbog malog broja pacijentkinja uključenih u ispitivanje.





**Grafikon 3.28: NP - 6 grupa u odnosu na Bifido, Lepto i Koke**

Tako su u ovom ispitivanju (kultura i PCR u odnosu na nalaz preparat po Gramu) kod 40% pacijentkinja sa normalnim nalazom (Ia, Ib, Iab) detektovane različite koke, dok su ti procenti bili 60%, 42%, 61% i 82% kod pacijentkinja koje su na osnovu preparata po Gramu definisane kao gradus I-like (slične normalnom), gradus II (intermedijaran), gradus III (BV) i gradus IV (koke).



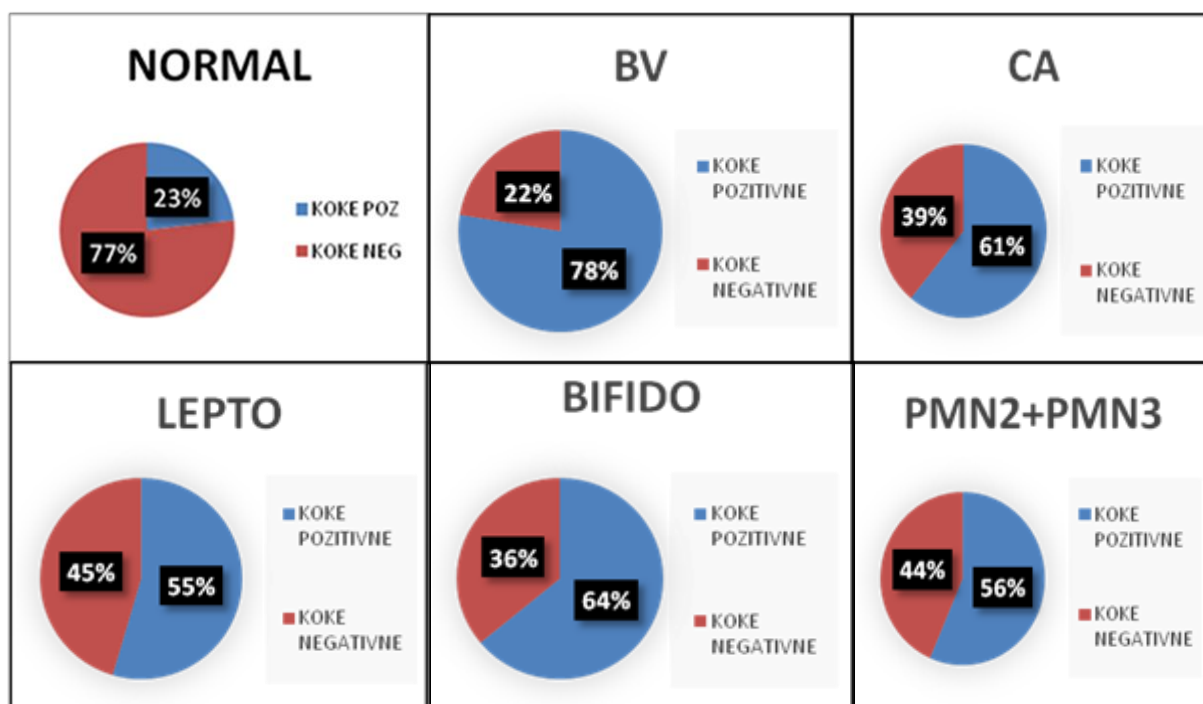
**Grafikon 3.29: Raspodela KOKA, BIFIDO i LEPTO formi kod pacijentkinja sa normalnim i patološkim brojem PMN**

Ako pogledamo rezultate koje smo dobili u ovom ispitivanju na osnovu pregleda preparata po Gramu i NP-6G (bez kulture i PCR), vidimo da su kod pacijentkinja sa normalnim nalazom (NF+NM+NN) koke mikroskopski nađene kod 23 % (Santiago i sar. [411] 40%) pacijentkinja, dok je u grupi sa BV taj procenat veći i iznosi oko 77% (Santiago i sar. [411] 60%). Dakle, podaci koji su dobijeni u ovom ispitivanju kod 732 pacijentkinje u saglasnosti su sa rezultatima studije koja je uključivala 17 pacijentkinja, u kojoj autori ukazuju na ogromne individualne razlike u sastavu vaginalne mikroflore. Savremeni molekularni metodi su nam omogućili da bolje upoznamo nove "članove" vaginalnog ekosistema i njihovu promenljivost u vremenu, a s druge strane su nam ta saznanja zapravo otežala pokušaje da razgraničimo "normalno" od "patološkog", ili bar definišemo šta je to što bi u ogromnoj individualnoj raznolikosti moglo da bude zajedničko. Santiago i sar. [411] u zaključuju da je značaj Gram pozitivnih koka u vaginalnoj mikroflori potcenjen. Navedeni rezultati su pokazali da su pacijentkinje sa patološkim nalazom vaginalne flore imale u značajno većoj meri prisutne KOKE u odnosu na pacijentkinje sa normalnom vaginalnom florom. Ako opet pogledamo grafikon videćemo da je najveća razlika između grupa NF 47/301 (15,6%) i BVF 57/66 (86%), i NM (26,1%) i BVM (74,6%) što je i shvatljivo, s obzirom na našu prethodnu diskusiju o ovim grupama pacijentkinja. Interesantno je da je od ovih 47 pacijentkinja samo kod 5 nismo detektovali CA i povećan broj PMN. Potvrda da je granica između pacijentkinja sa nalazom NN i BVN nejasna je što smo kod pacijentkinja sa nalazom BVN (69,4%) NN (48,6%) dobili slične rezultate. S obzirom da se koke nalaze u većem procentu kod pacijentkinja sa patološkim nalazom, njih uopšteno posmatramo kao patološki nalaz. NP-6G odlično razlikuje pacijentkinje sa normalnim ili patološkim nalazom. Ovo bi bio još jedan razlog da intermedijarnu grupu koju, da podsetimo, imaju i Ison/Hay i Claeys, uklonimo iz budućih ispitivanja, jer nam NP-6G omogućava da se ta grupa razdvoji na dve, sa normalnim (NN) i patološkim nalazom (BVN).

Ovi podaci, kao i veliki broj podataka u kojima procenti patološke vaginalne flore prelaze i 50%, pre ukazuju na nesavršenost naših dijagnostičkih postupaka. Dakle, potpuno je jasno da smo postavili neke "zlatne standarde" na osnovu kojih određujemo šta je zdravo, a šta patološko, ali je očigledno da je to različito od onoga što priroda na osnovu svojih "zlatnih standarda" definiše kao normalno ili patološko. Rezultati ove i drugih molekularnobioloških studija koje su objavljene u poslednjih desetak godina, i koje su nam pokazale koliko je vaginalna flora različitija i dinamičnija od onoga što smo pretpostavljali pre dvadesetak godina, još je jedna potvrda naših ograničenih mogućnosti da shvatimo njene zakonitosti. Uvažavajući najnovije rezultate iz projekta humanog mikrobioma koji se odnose na značaj mikrobne zajednice po zdravlje pojedinca, ne možemo više da se ne zapitamo da li ćemo lečenjem

(antibiotici) nečega što mislimo da je patološka vaginalna flora dovesti do takvih poremećaja u mikrobnj zajednici koji mogu imati veću štetu po zdravlje pacijenta. Pacijentkinje bez simptoma i sa graničnim kliničkim i mikroskopskim nalazom je verovatno bolje naručiti na kontrolni pregled nego započeti lečenje ili se odlučiti za terapiju prebioticima, kako to i radimo u svakodnevnoj praksi. Kod oko 23% pacijentkinja sa normalnim nalazom (NF+NM+NN) mikroskopskim pregledom pod imerzijom na uvećanju x200 detektovali smo koke.

Dakle, ove pacijentkinje su imale normalan nalaz u pogledu odnosa ŠF i NŠF. Međutim,



**Grafikon 3.30: Učestalost morfortipa koka po različitim grupama**

gotovo sve ove trudnice sa kokama imale su neki od drugih (uslovno) patoloških, odnosno ometajućih, činilaca: CA, patološki broj PMN, BIFIDO ili LEPTO forme. Pri tome (kao što su to uradili Santiago i sar. [362] mikroskopski nalaz I-like (u ovom radu grupa BIFIDO) smatramo patološkim. Što se tiče nalaza sa LEPTO formama, s obzirom na njihove osobene fenotipske karakteristike i činjenicu da su detektovane samo kod 6% (42/704) pacijentkinja, smatramo dovoljnim da ih uvrstimo u grupu sa patološkim nalazom. U grafikonima je prikazana učestalost nalaza koka na preparatu po Gramu i pregledom na uvećanju x200 sa imerzijom kod pacijentkinja sa različitim patološkim mikroskopskim nalazom.

Najveća učestalost nađena je kod pacijentkinja sa BV, zatim slede BIFIDO, CA, PMN2+PMN3 i LEPTO – 78%, 64%, 61%, 56% i 55%. Od 258 pacijentkinja kod kojih su nađene KOKE samo njih 34 nisu imale BV ili CA, odnosno BV+CA, što znači da je 87%

pacijentkinja kod kojih smo mikroskopski detektovali KOKE imalo i mikroskopski nalaz na kome su detektovane spore ili hife gljivica i/ili veći broj BVAB u odnosu na laktobacile. Kod preostale 34 pacijentkinje, kod 25 smo našli prisustvo BIFIDO i/ili LEPTO formi, odnosno samo 9 pacijentkinja kod kojih smo detektovali KOKE imale su normalan nalaz. Ako kao patološki nalaz uvažimo i povećan broj PMN, onda od 258 pacijentkinja sa KOKAMA samo 3 (1%) imaju “potpuno” normalan nalaz, odnosno predominaciju laktobacila bez CA, patološkog broja PMN, BIFIDO ili LEPTO formi, odnosno neku od različitih kombinacija, za koje je teško reći kada su koinfekcija a kada mešovita infekcija. Od njih tri, dve su bile iz grupe NN, a jedna iz grupe NF. Dakle ako bi koke posmatrali kao treći ometajući činilac one ne bi značajnije uticale na odnos “zdrave”-“bolesne” jer je 99% pacijentkinja imalo jedan ili više patoloških nalaza (BV,CA, BIFIDO, LEPTO, PMN2, 3). Sa druge strane sve ove pacijentkinje bi mogli razvrstati u grupe sa koinfekcijom ili mešovitom infekcijom. Takođe, njihova visoka učestalost kod pacijentkinja sa poremećenom vaginalnom florom jasno ukazuju da bi KOKE mogle biti odličan marker (obeleživač) “nekog” poremećaja vaginalne flore (Grafikon 3.30). Na osnovu ovih rezultata mogli bismo zaključiti da ukoliko mikroskopskim pregledom preparata po Gramu na uvećanju x200 sa imerzijom i po metodologiji predstavljenom u ovom radu, vidimo KOKE, onda sa 99% verovatnoće možemo pretpostaviti da ta pacijentkinja ima i neki od patoloških mikroskopskih nalaza (BV, CA, patološki broj PMN, LEPTO, BIFIDO).

Tako Santiago i sar. [411] u svojoj studiji ukazuju da su, uprkos prisustvu laktobacila, neke sojeve koka (*Streptococcus anginosus group*, *Peptostreptococcus anaerobius* i *P. asaccharolyticus*) izolovali kulturom u 20-40% slučajeva u svim grupama pacijentkinja, pozivajući se pri tome na radove Bartlett i sar. [626] i Johnson i sar. [612] koji su takođe pokazali da su koke značajan član vaginalne mikroflore. Takođe naglašavaju činjenicu da je, izuzev hemolitičkog streptokoka grupe B, značaj ostalih koka potcenjen. Zaključuju da je prisustvo Gram pozitivnih koka karakteristično za gotovo sve grupe sa poremećajima vaginalne flore i to objašnjavaju ili apsolutnim porastom u broju, količini koka (engl. *loads*), a kao drugu mogućnost navode činjenicu da, zbog smanjenog broja laktobacila kod poremećene vaginalne flore, koke postaju lakše vidljive. Mi takođe zaključujemo da se koke u većem procentu nalaze kod pacijentkinja sa poremećenom vaginalnom florom, ali da su prisutne i kod oko 20-30% pacijentkinja sa predominacijom laktobacila.

Veliki broj studija koje su u detekciji *G. vaginalis* koristili molekularnobiološke metode, pokazao je da ovaj mikroorganizam može da se nađe kod 50%-90% pacijentkinja sa normalnim mikroskopskim nalazom i da zajedno sa *L. iners* predstavlja najčešći mikroorganizam u vaginalnom mikrobiomu. Dakle, ako smo mikroskopskim pregledom postavili dijagnozu BV

kod 173 pacijentkinje (dakle, na mikroskopskom preparatu videli mikroorganizme koji odgovaraju *G. vaginalis*), a kulturom izolovali *G. vaginalis* kod svega 5 pacijentkinja, onda je to drastičan primer onoga što ekolozi zovu *great plate count anomaly*. Primer sa *G. vaginalis* se odnosi na mikroorganizam čije su fenotipske karakteristike dobro definisane, a možemo da se zapitamo šta je sa ostalih 95% bakterija za koje su nam fenotipske karakteristike potpuno nepoznate. Dakle, uzimajući u obzir rezultate ovog ispitivanja i činjenicu da je u citiranoj studiji [362] preparat po Gramu gledan na uvećanju x1000 (nije naveden broj vidnih polja, ali je verovatno veći od uobičajenih 5-10 VP, verujemo da bi primenom metodologije pregleda na uvećanju x200 broj pacijentkinja kod kojih su detektovane koke mikroskopskim pregledom bio veći od onih koji su izolovani kulturom. Naravno, ne mislimo da su sve pacijentkinje kod kojih smo mikroskopski detektovali koke bile i bolesne, jer se među njima nalaze i one (n=60) kod kojih smo detektovali retke spore i hife gljivica (CA NULL), kao i 35 pacijentkinja sa malim brojem bakterijskih formi (BVN+NN, a bez CA), kao i da pacijentkinje sa nalazom KOKA u ovom ispitivanju nismo podelili u grupe na osnovu semikvantitativnog nalaza koka na mikroskopskom preparatu. Smatramo da bi sve “značajnije” mikroskopski vidljive, a nama poznate mikroorganizme trebalo na neki način kvantifikovati jer bi to trebalo da bude odlučujuće u odluci da li ćemo neki nalaz smatrati kolonizacijom ili patološkim. Prethodno navedeni primer sa *G. vaginalis* je i najbolji primer jer ćemo ovaj mikroorganizam detektovati kod najvećeg broja pacijentkinja ukoliko koristimo adekvatne podloge za kulturu ili prajmere koje mogu identifikovati različite sojeve *G. vaginalis*, ali samo na osnovu kvantifikacije (Q-PCR) mogli bismo u budućnosti utvrditi neku graničnu koncentraciju za razlikovanje normalnog od patološkog i doći do formule za molekularnu dijagnozu BV.

Ono što je u ovom trenutku svakako jasno jeste da nijedan nalaz pojedinačno (klinički, mikroskopski, mikrobiološki, molekularnobiološki) ne može kod značajnog broja pacijenata povući jasnu granicu između fiziološkog i patološkog, a tako ni odgovoriti na pitanje da li i kako lečiti ove pacijente. Naši i rezultati Santiago i sar. [411] svakako ukazuju za potrebu za daljim ispitivanjima koja bi preciznije definisala značaj i uticaj koka na sve pomenute aspekte. Tako pitanje na koje treba dati odgovor jeste da li i kako KOKE utiču na kliničku sliku, odnosno u kojim se slučajevima radi o koinfekciji, u kojim o mešovitoj infekciji, a u kojim slučajevima KOKE mogu biti osnovni uzrok infekcije (deskvamativni inflamatorni vaginitis). Da li koke imaju uticaja na vrednosti pH ili probu sa 10% KOH? Da li pacijentkinje sa infekcijom CA i velikim brojem koka (ili sve druge moguće kombinacije BV / CA / PMN / BIFIDO / LEPTO / drugi članovi vaginalnog mikrobima) imaju istu simptomatologiju i kliničku sliku kao pacijentkinje sa CA, a bez koka? Dalje, da li koke povećavaju rizik za nastanak drugih

patoloških stanja (PP, PROM, HIV...), i da li pacijentkinja sa CA+KOKE zahtevaju drugačiji terapijski pristup? Koliko njihovo prisustvo utiče na sastav mikrobiološke zajednice vagine, odnosno da li su i u kojem broju komensali, a kada mogu da postanu patogeni? Da li njihovo prisustvo isključuje kolonizaciju nekim drugim članovima vaginalnog mikrobioma, a nekim olakšava? S obzirom da su koke u našem ispitivanju detektovane mikroskopskim pregledom kod trećine pacijentkinja bilo bi važno utvrditi da li nalaz koka na mikroskopskom pregledu srazmeran njihovom broju i kliničkim značajem. Naime, verovatno je da najveći broj koka predstavlja stalne stanovnike vaginalnog mikrobioma koji se nalaze u malom broju i nemaju klinički značaj. Primenom q-PCR mogli bi da odgovorimo na pitanje da li sam mikroskopski nalaz KOKA na neki način ukazuje na njihov patološki broj, slično onome što važi za CA. Sigurno je da njihovo prisustvo i koncentracije (*load*) mogu da utiču na koncentracije citokina, stepen apoptoze ili broj PMN, a da njihovo prisustvo na mikroskopskom preparatu sa velikom verovatnoćom ukazuje na “neki” poremećaj vaginalne flore.

### 3.2.3 MORFOTIP LEPTO

Kao što smo napomenuli u metodologiji ovog ispitivanja pod LEPTO formama ne podrazumevamo prisustvo nekog pojedinačnog mikroorganizma nego da se pod ovim podrazumevaju mikroorganizmi sličnih fenotipskih karakteristika kao što su *Leptotrichia amnionii*, *Leptorhrix*, *Sneathia sanguinegens*, *Actinomyces* i možda još neke druge bakterije iz roda *Fusobacterium* ili *Bacteroides*. Tevisan je uspostavio rod *Leptotrichia* još 1879 da bi razlučio filamentne mikroorganizme u usnoj duplji od slobodnoživećih vrsta *Leptothrix*. Glavni krajnji metabolički produkt *Leptotrichia* je mlečna kiselina [412] i to ga razdvaja od drugih filamentoznih bacteria kao što su *Fusobacterium* i *Bacteroides* Harwich i sar. [413] u svojoj studiji su iz vagine izolovali bakteriju koja filogenetski i fenotipski odgovara rodu *Sneathia*, i predlažu umesto naziva *L. amnii* naziv *Sneathia amnii* [414]. U svojoj studiji oni su pokazali da je *Sneathia* značajan oportunistički patogen koji može imati značajnu ulogu u reproduktivnom zdravlju žene, i u njihovom ispitivanju *Sneathia species* je nađena kod 43.3% (319 of 736) uzoraka, i pokazano da je ova vrsta veoma čest član mikrobioma vagine, a u nekim uzorcima predstavlja dominantnu bakterijsku vrstu. Najčešće je izolovana *S.amnii* (ranije *L.amnii*) u oko 77% uzoraka. U zaključku ove studije Harwich i sar. ukazuju da je *Sneathia* jedan od najčešće detektovanih mikroorganizama u amnionskoj tečnosti pacijentkinja sa PP, ukazujući na značaj ovog mikroorganizma u obstetričkoj populaciji. Činjenica da su oni u svojoj studiji detektovali *Sneathia species* kod preko 40% uzoraka iz srednje trećine vagine samo

potvrđuje mogući značaj ovog mikroorganizma u različitim ginekološkim i obstetričkim stanjima. Izbirljivi uslovi sredine koje zahteva *Sneathia* čine kultivaciju ovog mikroorganizma veoma teškom i nesigurnom, zbog čega se veoma malo zna o biologiji ili patogenom potencijalu ovih mikroorganizama. Nove molekularno biološke metode zajedno sa kulturom, a ovo ispitivanje ukazuje na potrebu da i mikroskopski pregled bude deo uporednih studija, trebalo bi u budućnosti da daju preciznije odgovore na značaj ovog mikroorganizma u ginekologiji i obstetriciji.

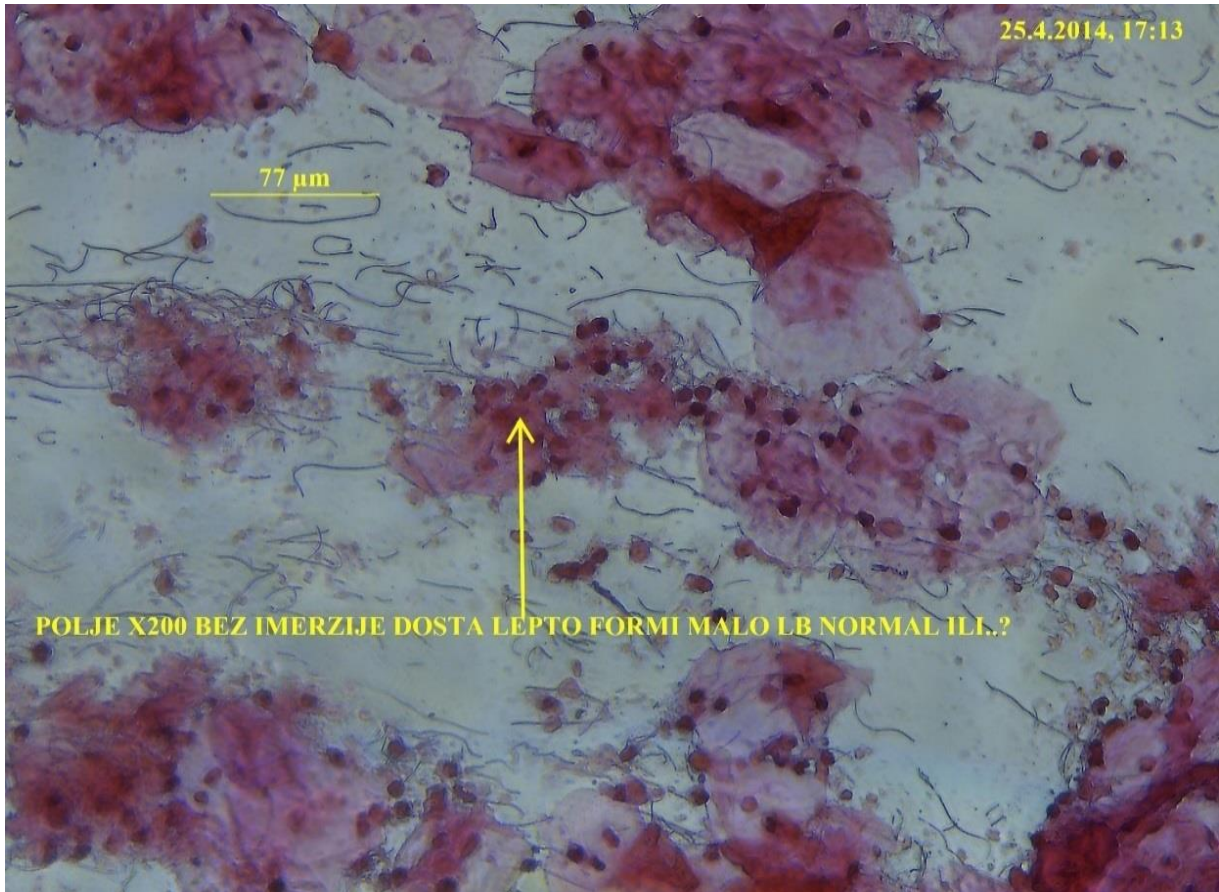
Na Grafikonu 3.28 je prikazana raspodela LEPTO formi po grupama na osnovu NP-6G. Ovo je još jedan primer koji govori u prilog podele NP-6G jer bi smo na osnovu, na primer Amselovih kriterijuma dobili podatak da se 32 pacijentkinje nalaze u grupi sa normalnim nalazom, a 10 u grupi sa BV. Na osnovu podele po Nugentu 26 pacijentkinja bi imalo normalan nalaz i LEPTO, 12 bi imalo intermedijaran, a 4 BV.

Ukoliko bi koristili podelu po Ison/Hayu onda bi tri pacijentkinje bili u grupi čist nalaz (Gradus 0), a 8 pacijentkinja u grupi KOKE (Gradus IV), dok bi u podeli po Claeysu 5 pacijentkinja bilo u grupi I-PMN (leukoreja). Ovo je još jedan u nizu primera koji jasno ukazuje kako NP-6G omogućava potpuno drugačije sagledavanje” istih” podataka. Dakle, samo na osnovu ovakve podele mi vidimo da su LEPTO forme u najvećem procentu prisutne kod pacijentkinja iz grupe NULL, odnosno da dominiraju LEPTO forme dok je broj drugih bakterijskih formi veoma mali (Slike 3.16 i 3.17; 2.33-2.36). Ovakve slike mogla bi objasniti gore navedeni podatak iz studije Harwich i sar. da *Sneathia* u nekim uzorcima predstavlja dominantnu bakterijsku vrstu. Molekularno biološke studije našle su značajnu udruženost ovog mikroorganizma sa BV. Na obe fotografije pored lepto formi drugih bakterijskih morfotipova gotovo i da nema, tako da možemo reći da je i ovaj preparat hipocelularan. Ovo je još jedan primer koji ponovno ukazuje da NP-6G za razliku od Nugentove ili drugih podela omogućava da izdvojimo posebnu grupu pacijentkinja koja se karakteriše nedostatkom i laktobacila i BVAB (NULL) i upozorava ili bolje rečeno postavlja ponovno isto pitanje : “Da li ovu grupu pacijentkinja u budućim ispitivanjima treba da posmatramo kao posebnu grupu?” Kao što smo već pomenuli osnovna karakteristika ove grupe bila bi značajno smanjen i diverzitet i kvantitet mikrobiološke zajednice vagine, ili ono što gastroenterolozi nazivaju disbiozama čija je glavna karakteristika gubitak diverziteta mikrobiološke zajednice. Ukoliko bi smo odlučili da ovu grupu definišemo kao posebnu što mislimo da je ispravno onda bi stvari izgledale mnogo drugačije.

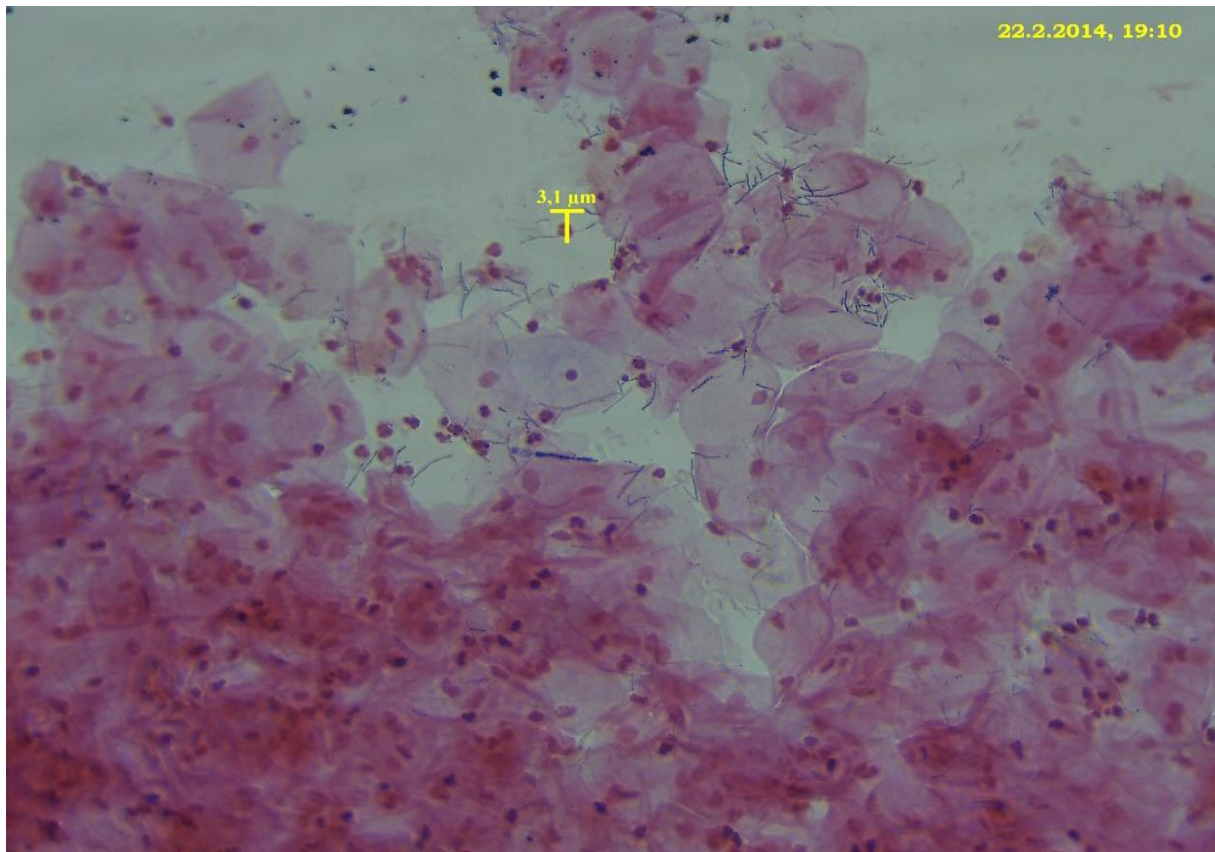
Naime, prethodno navedeni podaci koji govore da su molekularnobiološke studije omogućile detekciju nekoliko novih bakterijskih vrsta iz reda *Clostridia* i za koje su pokazale da su visoko specifični indikatori za BV, kao i da se vrste kao što su *Megasphaera*, *Leptotrichia*, *Atopobium*

i *Dialister* veoma često nalaze kod pacijentkinja sa BV, treba posmatrati kroz prizmu veoma važne činjenice a to je da su u većini ovih studija Nugentovi kriterijumi i/ili Amselovi kriterijumi zlatni standard u dijagnozi BV. Drugi bitan momenat koji želimo naglasiti jeste na neki način “opsednutost” BV, odnosno činjenica da se trenutno svi dijagnostički kriterijumi svode na pitanje da li pacijentkinja ima ili nema BV, i tu je početak i kraj svih poremećaja vaginalne flore. Ni NP-6G nije se oslobodila te “opsednutosti” jer se i ovde sve pacijentkinje suštinski svrstavaju na one sa BV i normalnim nalazom. Dakle pitanje, na koje treba da daju odgovor buduća ispitivanja, a na koje ova studija permanentno ukazuje glasilo bi : “ Da li pacijentkinje iz grupe NN i BVN treba svrstati u novu grupu poremećaja vaginalne flore?” U konkretnom slučaju ta grupa pacijentkinja izgubila bi iz naziva odrednicu BV i mogli bi smo je nazvati disbiozom sa smanjenim diverzitetom, grupom sa čistim nalazom kao što su to učinili Ison/Hay, grupom “null” ili “empty” ili nekim drugim nazivom koji ukazuje na njenu osnovnu karakteristiku smanjenje u diverzitetu (kvalitativno) i kvantitetu mikrobioma vagine. Ovo bi imalo smisla jer u definiciji BV kao najvažniji elementi navode se smanjenje ili potpuni gubitak laktobacila, a kao drugi važan momenat navodi se enorman porast u broju (1000 puta) anaeroba, a najnovije molekularnobiološke studije ukazuju a porast u diverzitetu mikrobiološke zajednice. Dakle suštinski bi mogli reći da se radi o dva potpuno suprotna poremećaja vaginalne flore, jednog u kome dolazi do enormnog porasta u kvantitetu i diverzitetu mikrobiološka zajednice, i drugog u kome dolazi do enormnog smanjenja u diverzitetu i kvantitetu mikrobiološke zajednice, a mi i jedan i drugi definišemo kao BV. Kao što smo rekli NP-6G, suštinski, kao svoj integralni deo podrazumeva i broj PMN i prisustvo drugih mikroorganizama koji se detektuju mikroskopskim pregledom (CA, KOKE, BIFIDO, LEPTO, *T. vaginalis*). Ovakav pristup može na neki način odraziti kompleksnost vaginalne flore, odnosno što je još važnije omogućiti da se proceni klinički značaj pojedinih mikrobioloških zajednica u zdravlju ili bolesti. Tako, ako pridružimo ove elemente onda ćemo videti da je 20 pacijentkinja imalo CA, 24 KOKE, 8 BIFIDO forme, 20 patološki broj PMN, odnosno da je kod svih pacijentkinja bar jedan od ovih nalaza bio patološki kako je to prikazano u Tabeli 3.4.





Slika 3.16: Lepto forme i hipocelularan nalaz (NULL) i PMN2



Slika 3.17: Lepto forme, hipocelularan nalaz i PMN2

**Tabela 3.4: Mikroskopski nalaz kod 42 pacijentkinje kod kojih su detektovane LEPTO forme a koji pokazuje i prisustvo drugih mikroskopskih nalaza relevantnih za procenu stanja vaginalne flore**

R.B.	NP-6G	CANDIDA	BIFIDO	LEPTO	KOKE	BROJ PMN X200	pH	KOH
1	BVF	CA MID	*	LEPTO		PMN3	4,4	neg
2	BVM			LEPTO	KOKE	NOR	4,4	neg
3	BVM			LEPTO		PMN3	5,5	neg
4	BVN	CA NULL		LEPTO	KOKE	PMN3	x	x§
5	BVN	CA MID		LEPTO		PMN2	x	x
6	BVN	CA NULL		LEPTO	KOKE	PMN2	5,5	poz
7	BVN			LEPTO		NOR	x	x
8	BVN	CA MID		LEPTO		PMN2	5	poz
9	BVN	CA NULL		LEPTO	KOKE	NOR	5,5	neg
10	BVN			LEPTO		NOR	5	neg
11	BVN			LEPTO		NOR	4,7	poz
12	BVN	CA MID		LEPTO		NOR	4,4	neg
13	BVN	CA NULL		LEPTO	KOKE	NOR	5	neg
14	BVN			LEPTO	KOKE	NOR	4,7	poz
15	NF	CA NULL		LEPTO	KOKE	PMN3	5,5	neg
16	NF	CA FULL	BIFIDO	LEPTO		PMN2	5,5	neg
17	NF	CA MID	BIFIDO	LEPTO	KOKE	NOR	5	neg
18	NF	CA NULL		LEPTO	KOKE	NOR	6	neg
19	NF			LEPTO		PMN3	5	neg
20	NF	CA NULL		LEPTO	KOKE	PMN2	7	neg
21	NF			LEPTO		NOR	6	neg
22	NF	CA MID	BIFIDO	LEPTO		PMN2	5	neg
23	NF			LEPTO		PMN2	5,5	neg
24	NM			LEPTO	KOKE	NOR	6	poz
25	NM			LEPTO	KOKE	NOR	4,7	neg
26	NM	CA NULL		LEPTO	KOKE	NOR	4	neg
27	NM	CA NULL	BIFIDO	LEPTO		NOR	6	neg
28	NM			LEPTO		PMN2	4,7	poz
29	NM			LEPTO	KOKE	PMN3	4,4	poz
30	NM	CA NULL		LEPTO	KOKE	PMN2	x	x
31	NM			LEPTO	KOKE	PMN2	5,5	neg
32	NN	CA NULL		LEPTO		NOR	5	poz
33	NN			LEPTO	KOKE	NOR	4,4	x
34	NN	CA NULL		LEPTO	KOKE	PMN2	5,5	neg
35	NN			LEPTO	KOKE	NOR	5	neg
36	NN			LEPTO		NOR	x	x
37	NN		BIFIDO	LEPTO	KOKE	NOR	4	poz
38	NN			LEPTO		PMN2	6,0	neg
39	NN		BIFIDO	LEPTO	KOKE	NOR	4	neg
40	NN		BIFIDO	LEPTO	KOKE	NOR	6	poz
41	NN		BIFIDO	LEPTO	KOKE	PMN3	4	neg
42	NN	CA MID		LEPTO	KOKE	PMN2	x	x

\*prazna polja znače da nisu detektovane bakterijske forme; §= znači da je nalaz nepoznat

Ako opet pogledamo Tabelu 3.4 videćemo da u njoj imamo 40!!! različitih mikroskopskih nalaza. Srednja vrednost pH je bila 5,0, od čega je su najveće srednje vrednosti nađene u grupi NF (pH=5,6), a najmanje u grupi BVF+BVM (pH=4,7, 3 pacijentkinje), dok je u ostalim grupama vrednost pH bila oko 5. Ili, pacijentkinje sa BV imale su srednju vrednost pH 4,9, a one sa normalnim nalazom 5,1!? Rezultati testa sa KOH (n=35) od 11 pacijentkinja koje su svrstane u grupu BV 7 je imalo negativan test sa 10%KOH, a 4 pozitivan, a od 24 pacijentkinje sa normalnim nalazom kod 18 je ovaj test bio negativan, a kod 6 pozitivan. Ukoliko bi sad kako se to najčešće radi procenjivali specifičnost i senzitivnost ova dva testa u dijagnozi BV, rezultati koje bi dobili bili bi katastrofalni, posebno za pH. Međutim ukoliko pažljivo analiziramo ovu grupu pacijentkinja i podatke iz tabele, i dozvolimo sebi da posumnjamo u dogmu da je mikroskopski nalaz superioran u odnosu na vrednosti pH u proceni stanja vaginalne flore onda bi tumačenje rezultata moglo izgledati bitno drugačije.

### 3.2.4 MORFOTIP BIFIDO

U radovima belgijske grupe istraživača koji su predstavili takozvanu Claeysovu podjelu mikroskopskog pregleda vaginalnog sekreta jedan od najintragantnijih nalaza bila je nova grupa koju su autori nazvali I-like, a koju smo u ovom ispitivanju nazvali grupom sa BIFIDO formama [216]. Već iz samog naziva I-like (sličan normalnom) jasno je da je ovu grupu mikroskopski najteže razlikovati od pacijentkinja sa predominacijom laktobacilarnih formi, kako smo to detaljno objasnili u Metodologiji.

Ako pogledamo raspodelu pacijentkinja sa BIFIDO formama po grupama na osnovu NP-6G (Grafikon 3.28, Tabela 17, Prilog 1) vidimo da je najveća zastupljenost bila u grupama sa normalnim nalazom 43 pacijentkinja, dok je 7 bilo u grupi sa BV. Kod pacijentkinja sa BVF nismo identifikovali ni jedan nalaz sa BIFIDO formama.

Najveći broj pacijentkinja kod kojih smo mikroskopskim nalazom detektovali BIFIDO forme pripadao je grupama NORMAL (86%) i BVN (10,2%). Kod pacijentkinja sa BVF nismo identifikovali ni jedan nalaz sa BIFIDO, a od 301 pacijentkinje sa nalazom NF BIFIDO forme su nađene kod 12 pacijentkinja (4,0%). Da smo u ovom radu koristili samo Amselove kriterijume imali bi dve grupe pacijentkinja zaključili bi da se BIFIDO forme u značajno većem procentu nalaze u grupi pacijentkinja sa normalnim nalazom, što bi nas moglo navesti da zaključimo da oni pripadaju normalnoj bakterijskoj flori. Od 50 Pacijentkinja sa BIFIDO formama 27 je imalo patološki broj PMN. I u radovima autora koji su uveli ovu grupu imamo malo podataka o drugim parametrima kao što su vrednost pH, pozitivan ili negativan test sa 10% KOH, broj PMN, prisustvo CA ili KOKA. Naredna dve tabele (3.29 i 3.30) ukazuju koliko je značajno da pored mikroskopskog nalaza koji pacijentkinje razvrstava samo u odnosu na broj laktobacila i BVAB u dve ili tri kategorije, imamo i druge parametre (CA, PMN, LEPTO, KOKE, BIFIDO, KOH test, pH) pre svega da bi postavili precizniju dijagnozu i sproveli eventualnu terapiju. pored toga ove dve tabele "slikovito" pokazuju koliko bi se razlikovali rezultati ispitivanja u zavisnosti od metodologije ispitivanja, preciznije u zavisnosti od dijagnostičkih kriterijuma.

Ako kao pH *cutoff* uzmemo vrednosti manje od 4,5 od 43 za koje smo imali nalaz pH (prikazane u tabeli) 17 pacijentkinja je imalo patološki nalaz, a 26 normalan. Srednja vrednost pH kod pacijentkinja sa BIFIDO formama iznosila je 4,6 (U poglavlju “Deskriptivne statistika” u tabelama su vrednosti srednjih koncentracija, SD, minimalnih maksimalnih vrednosti tako da neće biti navođene u daljem tekstu). Kao što je rečeno u prethodnoj diskusiji, dijagnostika i lečenje trudnica u ovom ispitivanju bili su zasnovani na dijagnostičkim kriterijumima po Amselu. Uprkos činjenici da nismo smatrali prisustvo CC neophodnim u dijagnozi BV i da su mikroskopski kriterijumu predstavljali najvažniji faktor u razlikovanju normalnog od patološkog, kod 36/43 (83,7%) pacijentkinja ustanovljen je normalni nalaz. Kod preostalih 7 pacijentkinja dijagnostikovana je BV, a CA na mikroskopskom pregledu detektovana je kod 9 pacijentkinja.

Suština Tabele 3.5 je da se ukaže na razlike u dijagnozi na osnovu različitih dijagnostičkih kriterijuma. Pored velikih razlika u detekciji CA, treba uočiti da većina pacijentkinje kod kojih je dijagnoza postavljena na osnovu pregleda preparata po Gramu (NP-6G) pripadaju grupama sa hipocelularnim nalazom. Izdvojićemo nalaz pacijentkinje kod koje smo na preparatu po Gramu postavili dijagnozu NF, koja je imala CA, pozitivan KOH test i pH, a kod koje je na osnovu Amselovih kriterijuma postavljena dijagnoza BV (u Tabeli redni broj 39).

U Tabeli 3.6 su prikazani rezultati mikroskopskog pregleda preparata po Gramu na osnovu različitih dijagnostičkih kriterijuma. Nećemo detaljnije komentarisati ove rezultate, ali ukazaćemo na neke najvažnije. Tako je na preparatu po Gramu kod 54% (27/50) pacijentkinja mikroskopski je detektovana CA, dok je taj procenat iznosio 19% (9/47) na NPVS sa 10% KOH. Od ovih 27 trudnica, 17 je sa mikroskopskim nalazom CA NULL, 6 CA MID i 4 CA FULL. Koke su mikroskopski detektovane kod 64% (BVM/50), a LEPTO forme kod 16% (8/50) pacijentkinja, ni u jednom slučaju prilikom pregleda NPVS.

**Tabela 3.5: Pojedinačni nalazi pacijentkinja sa BIFIDO formama odnosu na različite dijagnostičke kriterijume, vrednosti kliničkih testova i broj PMN (x400)**

R.B.	AMSEL	AMSEL CA	KOH TEST	pH	NP-6G	CA	BIFIDO	BROJ PMN X400
1	NOR	NOR	NEG	4,4	NM	NOR	BIFIDO	PMN1
2	NOR	NOR	NEG	4	NM	CA NULL	BIFIDO	PMN2
3	NOR	CA	NEG	4	NM	CA MID	BIFIDO	PMN2
4	NOR	NOR	NEG	4	NF	NOR	BIFIDO	PMN1
5	BV	CA	POZ	5,5	BVN	CA FULL	BIFIDO	PMN0
6	BV	BV	POZ	4,7	NN	NOR	BIFIDO	PMN0
7	NOR	NOR	NEG	4	NN	CA NULL	BIFIDO	PMN1
8	NOR	NOR	POZ	4,4	NM	NOR	BIFIDO	PMN0
9	NOR	NOR	NEG	4	NN	NOR	BIFIDO	PMN0
10	NOR	NOR	NEG	4,7	NF	CA NULL	BIFIDO	PMN1
11	NOR	NOR	NEG	5	NM	NOR	BIFIDO	PMN1
12	NOR	NOR	NEG	4,7	NN	NOR	BIFIDO	PMN0
13	NOR	NOR	NEG	4,0	NM	NOR	BIFIDO	PMN3
14	BV	CA	NEG	5,3	NN	CA FULL	BIFIDO	PMN3
15	BV	BV	NEG	5	BVN	3	BIFIDO	PMN0
16	NOR	NOR	NEG	4	NF	NOR	BIFIDO	PMN0
17	NOR	NOR	NEG	4,4	NF	CA NULL	BIFIDO	PMN1
18	NOR	NOR	NEG	4	NM	CA NULL	BIFIDO	PMN2
19	NOR	CA	NEG	4,4	NF	CA FULL	BIFIDO	PMN2
20	NOR	CA	NEG	5	NF	CA MID	BIFIDO	PMN1
21	NOR	NOR	NEG	6	NM	CA NULL	BIFIDO	PMN0
22	NOR	NOR	NEG	5	NN	NOR	BIFIDO	PMN0
23	NOR	CA	NEG	4,4	NM	CA MID	BIFIDO	PMN1
24	NOR	CA	NEG	4,4	NM	CA MID	BIFIDO	PMN3
25	NOR	NOR	NEG	4	NM	CA NULL	BIFIDO	PMN0
26	NOR	NOR	NEG	4	NM	CA NULL	BIFIDO	PMN1
27	NOR	NOR	POZ	4	NM	CA NULL	BIFIDO	PMN1
28	NOR	NOR	NEG	4	NM	CA NULL	BIFIDO	PMN2
29	NOR	NOR	NEG	4	NM	CA NULL	BIFIDO	PMN1
30	NOR	NOR	NEG	6	BVN	CA NULL	BIFIDO	PMN0
31	BV	BV	POZ	6	BVN	3	BIFIDO	PMN2
32	BV	CA	POZ	6	BVM	CA NULL	BIFIDO	PMN0
33	NOR	NOR		4,4	NN	NOR	BIFIDO	PMN0
34	NOR	NOR	NEG	5,5	NN	NOR	BIFIDO	PMN0
35	NOR	NOR	NEG	4	NM	NOR	BIFIDO	PMN3
36	NOR	NOR	NEG	4,7	BVM	3	BIFIDO	PMN0
37	NOR	NOR	NEG	6,0	NN	NOR	BIFIDO	PMN1
38	NOR	NOR	NEG	4,4	NF	CA NULL	BIFIDO	PMN2
39	BV	CA	POZ	6	NF	CA MID	BIFIDO	PMN2
40	NOR	NOR	NEG	4	NN	NOR	BIFIDO	PMN2
41	NOR	NOR	POZ	4,4	NF	CA NULL	BIFIDO	PMN2
42	NOR	NOR	NEG	4	NM	NOR	BIFIDO	PMN1
43	NOR	NOR	NEG	4,4	NF	NOR	BIFIDO	PMN1

Najvažnije zaključak koji vidimo kad pogledamo ove dve tabele je da se BIFIDO forme na NPVS prepoznaju kao laktobacilarna flora i nalaz tumači kao normalan. Ovo je jedan od razloga zbog koga su rezultati za specifičnost i senzitivnost pH u dijagnozi BV u nekim ispitivanjima veoma loši. Dakle, tako se u značajnoj meri smanjuje upotrebna vrednost dijagnostički potencijal ovoga jednostavnog, jeftinog i brzog testa. S druge strane, naši rezultati, iako na malom broju trudnica, ukazuju da kod pacijentkinja sa vrednostima pH preko 4,5, a koje imaju negativnu mikroskopsku sliku (predominantna "laktobacilarna" flora) i negativan KOH test ne bi trebalo bez razmišljanja postavljati dijagnozu normalnog nalaza, a pH proglašavati ne senzitivnim i ne specifičnim, nego bi morali razmisliti i o ovakvim mogućnostima, odnosno da pH test može ukazati na poremećaje vaginalne flore koje mi mikroskopski ne možemo detektovati.

**Tabela 3.6 rezultati mikroskopskog pregleda preparata po Gramu na osnovu različitih dijagnostičkih kriterijuma.**

NUGENT	Clays	NP-6G	CANDIDA	BIFIDO	LEPTO	KOKE	X200
INT	INT	NM	NOR	BIF	NM	NM	PMN1
INT	LEUK	NM	CAN	BIF	NM	NM	PMN1
NOR	NOR	NM	CAM	BIF	NM	NM	PMN3
NOR	LEUK	NF	NOR	BIF	NF	NF	PMN1
INT	LEUK	BVN	CAF	BIF	BVN	BVN	PMN3
INT	INT	NN	NOR	BIF	NN	KOKE	PMN0
INT	NOR	NN	CAN	BIF	NN	KOKE	PMN1
NOR	NOR	NN	NOR	BIF	NN	KOKE	PMN1
NOR	NOR	NM	NOR	BIF	NM	KOKE	PMN1
BV	BV	NN	NOR	BIF	NN	KOKE	PMN0
BV	BV	NM	NOR	BIF	NM	KOKE	PMN2
NOR	LEUK	NF	CAN	BIF	NF	KOKE	PMN3
INT	LEUK	NM	NOR	BIF	NM	KOKE	PMN1
BV	BV	NN	NOR	BIF	NN	KOKE	PMN0
INT	INT	BVN	CAF	BIF	BVN	BVN	PMN0
NOR	NOR	NM	NOR	BIF	NM	NM	PMN2
NOR	NOR	NN	CAF	BIF	NN	NN	PMN3
INT	BV	BVN	BV	BIF	BVN	BVN	PMN0
NOR	LEUK	NF	NOR	BIF	NF	NF	PMN0
NOR	NOR	NN	CAN	BIF	NN	KOKE	PMN2
NOR	NOR	NM	CAM	BIF	NM	KOKE	PMN2
NOR	LEUK	NF	CAN	BIF	NF	KOKE	PMN2
NOR	KOKE	NM	CAN	BIF	NM	NM	PMN3
NOR	LEUK	NF	CAF	BIF	LEPTO	NF	PMN2
NOR	LEUK	NF	CAM	BIF	LEPTO	KOKE	PMN1
NOR	NOR	NM	CAN	BIF	LEPTO	NM	PMN1
NOR	NOR	NN	NOR	BIF	LEPTO	KOKE	PMN0
NOR	NOR	NM	CAM	BIF	NM	NM	PMN2
NOR	NOR	NM	CAM	BIF	NM	KOKE	PMN3
NOR	NOR	NF	CAN	BIF	NF	KOKE	PMN2
NOR	NOR	NM	CAN	BIF	NM	KOKE	PMN2
NOR	NOR	NM	CAN	BIF	NM	KOKE	PMN2
NOR	NOR	NM	CAN	BIF	NM	KOKE	PMN3
NOR	NOR	NM	CAN	BIF	NM	KOKE	PMN2
NOR	KOKE	NM	CAN	BIF	NM	KOKE	PMN3
INT	LEUK	BVN	CAN	BIF	BVN	KOKE	PMN2
BV	BV	BVN	BV	BIF	BVN	BVN	PMN0
BV	BV	BVM	CAN	BIF	BVM	KOKE	PMN0
NOR	NOR	NF	NOR	BIF	NF	NF	PMN1
INT	INT	NN	NOR	BIF	LEPTO	KOKE	PMN0
NOR	NOR	NN	NOR	BIF	LEPTO	KOKE	PMN0
NOR	LEUK	NM	NOR	BIF	NM	KOKE	PMN3
NOR	LEUK	BVM	BV	BIF	BVM	BVM	PMN0
NOR	LEUK	NN	NOR	BIF	LEPTO	KOKE	PMN3
NOR	LEUK	NF	CAN	BIF	NF	KOKE	PMN3
NOR	NOR	NF	CAM	BIF	LEPTO	NF	PMN2
NOR	LEUK	NN	NOR	BIF	NN	KOKE	PMN2
NOR	NOR	NF	CAN	BIF	NF	KOKE	PMN3
NOR	NOR	NM	NOR	BIF	NM	KOKE	PMN1
NOR	NOR	NF	NOR	BIF	NF	KOKE	PMN1

Rezultati KOH testa bili su poznati za 42 pacijentkinje od čega je kod 8 test bio pozitivan, a kod 34 pacijentkinje negativan. Dalje od 50 pacijentkinja kod 27 je mikroskopski detektovan CA, i to kod 17 CA NULL, kod 6 CA MID i kod 4 CA FULL. Koke su mikroskopski detektovane kod 64% (32/50), a LEPTO forme kod 16% (8/50) pacijentkinja. Ukoliko sada zbirno i ukratko analiziramo ove podatke mogli bi smo reći da je mikroskopski nalaz BIFIDO formi češći kod pacijentkinja sa normalnim nalazom nego BV, daje vaginalni pH povišen kod ove grupe pacijentkinja, dok su vrednosti KOH testa kod većine pacijentkinja negativne, kao da su CA i KOKE često udružene sa ovim nalazom što nije slučaj sa LEPTO formama.

U zaključku, nalaz BIFIDO formi je češći kod trudnica sa normalnim mikroskopski nalazom nego sa BV. Njegova učestalost je najveća kod pacijentkinja sa gram pozitivnim formama koje liče na laktobacile i daju polimorfnu mikroskopsku sliku, povišenim vaginalnim pH i, uglavnom, negativnim KOH testom. CA i KOKE često nalazimo udružene BIFIDO, što nije slučaj sa LEPTO formama.

Verujemo da trudnica sa prevagom laktobacila, patološkim brojem PMN, CA i KOKAMA nije u kliničkom, mikroskopskom, imunološkom i terapijskom pogledu “ista” kao i trudnica bez laktobacila i BVAB (null), normalnim brojem PMN, bez CA i KOKA, mada smo i jednu i drugu svrstali u grupu BIFIDO formi. Mislimo takođe da semikvantifikacija ili kvantifikacija svih mikroskopskih formi mora imati značaja u razlučivanju normalnog i patološkog, odnosno da pacijentkinje sa malim brojem BIFIDO formi i one kod kojih te forme dominiraju nikako nisu iste. Iz razloga sličnim onim navedenim za KOKE nije rađena semikvantifikacija BIFIDO formi.

Ako metodologiju i rezultate koji su dobili Verstraelen i sar. [415] uporedimo sa našim, možemo doći do sledećih zaključaka. Iako su autori koristili podelu koja suštinski predstavlja modifikaciju kriterijuma po Ison/Hayu, upadljivo je da kod 221 trudnice autori nisu našli ni jednu pacijentkinju sa originalnim “gradus 0” (u ovom ispitivanju “čist nalaz”), kao ni jednu pacijentkinju kod koje su dominirale samo koke, originalno Gradus IV (u ovom ispitivanju KOKE). Na osnovu naših iskustava i rezultata pretpostavljamo da je većina ovih trudnica (kao posledica posmatranja preparata na uvećanju x1000), najmanje 10%, preraspoređena u neke od postojećih kategorija, najverovatnije u grupu BV-like. Ovo ispitivanje je, dakle, zanemarilo značaj pacijentkinja sa čistim nalazom ili nalazom koka. S obzirom da postojeći dijagnostički kriterijumi u svoj skor ne uključuju broj PMN jasno je da bi pacijentkinje iz grupe I-PMN (u našem radu grupa “leukoreja”) na osnovu Nugetovih ili Ison/Hayovih kriterijumima bile svrstane u grupu sa normalnim nalazom. Da bi pacijentkinje svrstali u ovu grupu neophodno je isključiti infekciju CA, ali se u radu nigde ne navodi da su pacijentkinje sa mikroskopskim nalazom ili nalazom kulture na CA isključene iz ispitivanja, a ne navode se ni kriterijumi za razlikovanje infekcije od kolonizacije CA. Imajući u vidu rezultate našeg ispitivanja kao i činjenicu da je infekcija CA češća u trudnoći, neverovatno je da od 211 trudnica nijedna na mikroskopskom nalazu po Gramu nije imala prisutne spore ili hife gljivica, ili su one u najvećem broju slučajeva ostale nedijagnostikovane zato što je pregledana mala površina preparata. Naši rezultati po kojima je 80% pacijentkinja sa mikroskopskim nalazom spora ili hifa gljivica imalo patološki broj PMN ukazuju na potrebu za daljim ispitivanjima koja bi utvrdila da li je samo CA uzrok povećanom broju PMN, ili se radi o poremećajima vaginalne

flore u kojima pored CA i KOKE, BIFIDO ili Lepto forme mogu biti razlog patološkom broju PMN. Verstraelen i sar. [415] u diskusiji ukazuju neravnomernu raspodelu PMN na preparatu po Gramu što otežava valjanu kvantifikaciju i daje različite rezultate u zavisnosti od posmatranog vidnog polja. Upravo je ta nehomogenost glavni razlog što smatramo da gledanjem veće površine preparata (uvećanje x200) i semikvantitativni pristup omogućavaju objektivniju procenu broja vaginalnih PMN na preparatu bojenom po Gramu.

Ipak, kada je reč o pacijentkinjama iz BIFIDO grupe, najveći problem svakako predstavlja činjenica da pod mikroskopom vidimo Gram pozitivne forme koje su vrlo sličnih fenotipskih karakteristika različitim sojevima laktobacila i što je samo na osnovu mikroskopskog nalaza teško pouzdano tvrditi koju vrstu bakterija vidimo. Dakle problem je veoma sličan onome koji se odnosi na (ne)mogućnost mikroskopskog razlikovanja *L. inersa* i *G. vaginalis*. Zato su neophodne uporedne studije u kojima bi kliničar, mikrobiolog i molekularni biolog blisko sarađivali i na osnovu kliničke slike, nalaza kulture, mikroskopskog nalaza, rezultata molekularnobioloških ispitivanja (pre svih Q-PCR) pokušali da definišu neke druge mikroorganizme ili mikrobne zajednice vagine koje bi mogle da imaju značaja za reproduktivno zdravlje žene.



### **3.3 BROJ, VIJABILNOST I APOPTOZA VAGINALNIH POLIMORFONUKLEARA**

Neutrofili (polimorfonuklearni neutrofilni leukociti) predstavljaju važnu komponentu urođenog imunog sistema, i oni mogu biti direktno aktivirani različitim bakterijskim produktima i aktivirani PMN fagocituju i ubijaju bakterije. Ovi procesi se pojačavaju opsonizacijom bakterija imunoglobulinima, komponentama komplekta (C3b) i fibronektinom (opsonini). Posle opsonizacije dolazi do vezivanja antigena za receptore na površini fagocita, posle čega dolazi do ingestije (antigen biva okružen membranom fagocita, patent-zatvarač) i stvaranja i odvajanja fagozoma koji se onda spaja sa primarnim i sekundarnim lizozomima stvarajući fagolizozom. Unutar fagolizozoma nalaze se azurofilne (primarne) granule koje sadrže kisele hidrolaze (katepsin, glukoronidaze, kisele fosfataze), mijeloperoksidaze, elastaze, kolagenaze, defenzini i lizozimi (muramidaze). Sekundarne (specifične) granule sadrže NADPH-oksidge, laktoferin, Vitamin B12 –vezujući protein i gelatinaze. NADPH-zavisni sistem oksidge predstavlja jedan od najvažnijih antimikrobnih odbrambenih mehanizama kod viših organizama. Ove oksidge pretvaraju molekul kiseonika u singlet-kiseonik, koji može nastati i spontanom dismutacijom superoksidnog anjona u reakcijama superoksidge i hidroksilnih radikala ili reakcijama superoksidge i vodonik-peroksidge. Mijeloperoksidaze katalizira oksidaciju halidnih jona vodonik peroksidom, gde kao jedan od produkata nastaje hipohlorid koji ima jaku antimikrobnu aktivnost. Azurofilne i specifične granule oslobađaju dve grupe toksičnih supstanci: 1) kiseonik-zavisne produkte koji nastaju iz reaktivnih metabolita kiseonika i 2) kiseonik-nezavisne reaktante kao što su proteaze, laktoferin i PLA2. Mikroorganizam biva obijen aktivnošću superoksidaznih jona, hidrogen peroksidge i hipohloridge. Dakle aktivisani neutrofili troše velike količine molekula kiseonika, i taj respiratorni prasak dovodi do nastanka radikala superoksidnog anjona (kiseonik koji je primio samo jedan elektron i onda može delovati i kao oksidans i kao reduktant) i vodonik peroksidge. U okolnostima kada se ove supstance izlučuju izvan neutrofila, mogu uzrokovati upalu i oštećenje tkiva. PMN su isključeni iz mononuklearnog fagocitnog sistema (monociti/makrofagi) zbog toga što oni ne učestvuju u normalnim specifičnim imunskim reakcijama; oni dakle samo fagocituju mikroorganizam da bi ga ubili, ali ne i da bi ga prezentovali ćelijama specifičnog imunskog sistema.

### 3.3.1 BROJ POLIMORFONUKLEARA- SEMIKVANTITATIVNE METODE

Najveći problem u proceni uloge PMN u različitim fiziološkim i patološkim zbivanjima jeste činjenica da ne postoji jasno definisana granica između fiziološkog i patološkog broja PMN. Najvažniji razlog za to su velike metodološke razlike i granične vrednosti koje prihvataju pojedini autori, tako da je većina ovih studija praktično neuporediva. Kada je idejno začinjan ovaj rad planirano je da referentni metod u određivanju broja PMN na preparatu bojenom po Gramu bude onaj koji su predložili Ramsey i sar. [384]. Ovaj rad je na neki način bio podstrek koji je opredelio temu ove doktorske disertacije jer su u tom radu Ramsey i sar. ne samo našli udruženost povećanog broja PMN i PP, nego su pokazali da i metodologija određivanja broja PMN može bitno uticati na konačan zaključak. Kasnije smo odustali od ove i drugih metodologija zbog već pomenute studija Larssona koja nas je naterala da izračunamo površinu vidnog polja našeg mikroskopa radi korektnog numeričkog odnosa bakterijskih formi u zbiru po Nugentu kao što je to prikazano u tabelama 1 i 2 (videti Materijal i metode). Nakon uvida u radove koji se bave ovom problematikom, ispostavilo se da su razlike u broju PMN među pojedinim autorima mnogo veće nego što se to čini na prvi pogled [385 - 409].

**Tabela 3.7: Normalan i patološki broj PMN različitih autora i na različitim mikroskopskim uvećanjima**

skor	x1000 Simhana <sup>401</sup>	x1000 Cauci <sup>209</sup>	x1000 Ramsey <sup>384</sup>	x400 Eschenbach <sup>19</sup> 7	x400 Hitti <sup>393</sup>	x400 NPVS Donders <sup>381</sup>	x100 0 Datcu i sar <sup>165</sup>	x400 Datcu +Larsson <sup>356</sup> *
<b>0</b>				0-1 PMN		<10 PMN	PMN	0-6 <b>0-24</b>
<b>1</b>				2-10 PMN		>10 PMN ali i ≤10PMN/1E C	<10 PMN	<60 <b>&lt;240</b>
<b>2</b>	>5PMN	≥13.9	>32 PMN ili PMN/EC ≥7	11-30 PMN	>5PM N	>10PMN/1E C	11- 50 PMN	61-300 <b>241-1200</b>
<b>3</b>				PREKO 30 PMN			> 50 PMN	>301 <b>&lt;1201</b>

\*U ovoj koloni su predstavljeni rezultat koji bi se dobili kada bi po formuli Larssona i sar. uvažile razlike u površini; površina VP na uvećanju x400 je 6,25 puta veća od površine na uvećanju x1000

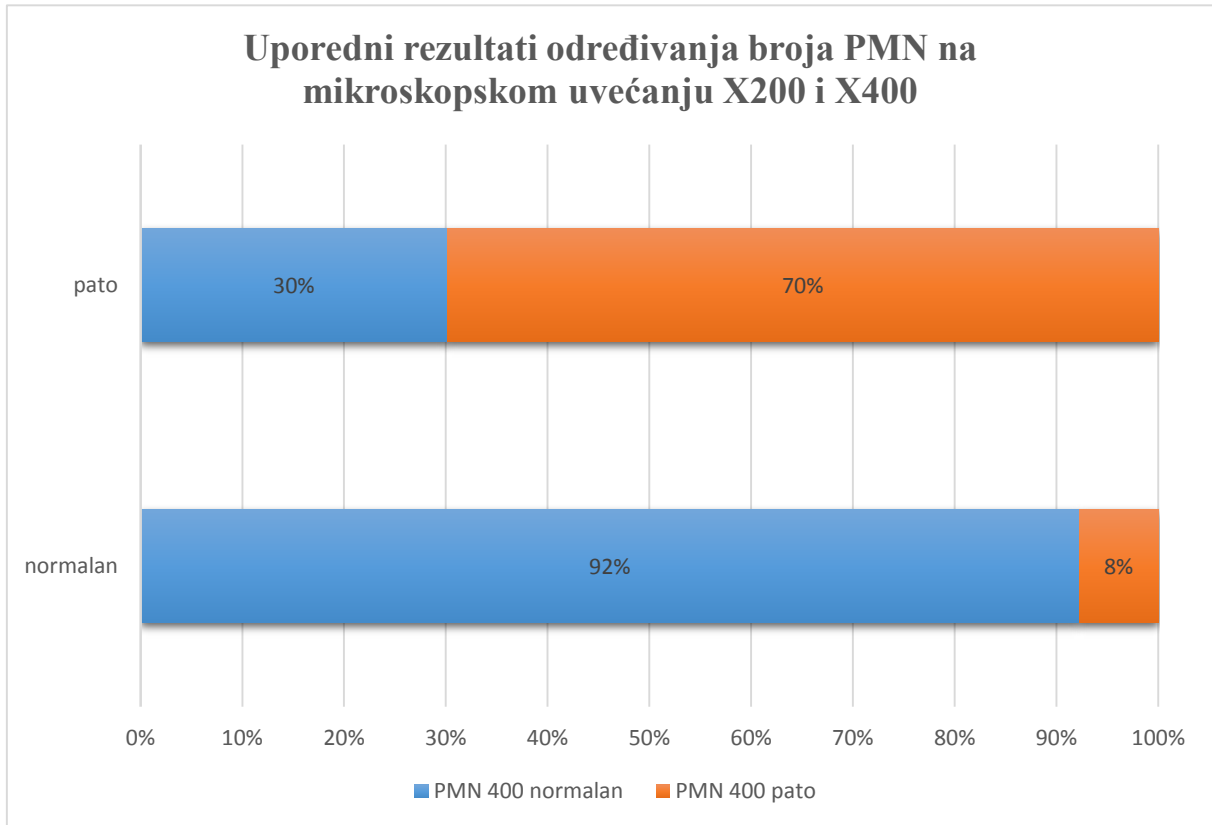
Najjednostavniji primer svakako je metodologija koju su koristili Hitti i sar [393]. i ona koju su koristili Simhan i sar [401] jer je granična vrednost (eng. *cut-off*) za fiziološki i patološki broj PMN ista, >5 PMN po jednom VP, a „samo“ se razlikuju mikroskopska uvećanja, x400 kod Hitti, a x1000 kod Simhana. Ako sada primenimo formulu iz rada Larssona i sar. [356], onda

bi u konkretnom slučaju patološki broj PMN na uvećanju x400 trebao da bude >30, jer je površina na x 400 veća 6,25 puta od površine na x 1000. Ako bi sa druge strane, Ramseyjevu graničnu vrednost preračunali po Larssonovoj formuli, onda bi ona na uvećanju x400 iznosila >200 PMN/VP, a u zadnjoj koloni je prikazano kako bi izgledali kriterijumu po Datcu i sar. na uvećanju x400. Ako bi se odlučili da brojimo PMN na uvećanju x200 i poštovali navedene proporcije, onda bi to značilo da ove brojeve na uvećanju x400 treba pomnožiti sa 4, jer je površina vidnog polja na x200 za 4X veća od površine vidnog polja na x400. Onda bi granične vrednosti bile kao one navedene u poslednjoj koloni (štampano masno i koso). Ni jedan od radova navedenih u tabeli kao ni desetina drugih ne pominju površinu vidnog polja kao relevantan parametar u metodologiji određivanja broja PMN. Uzimajući u obzir podatke o razlikama u površini vidnog polja različitih mikroskopa koje navodi Larsson u svojoj studiji, ovo bi buduće studije koje se zasnivaju na određenom broju PMN morale navoditi u metodologiji rada. Ništa manje važnim ne smatramo činjenicu koja se odnosi na broj pregledanih vidnih polja koju takođe većina autore ne navodi u metodologiji, a to bi bilo neophodno radi bolje uporedivosti. Polazeći od ovih činjenica i znajući da je brojanje PMN i EĆ i određivanje njihovog odnosa (Ramsey i sar. [384]) na NPVS veoma zamoran posao, u ovom ispitivanju smo se odlučili za jednostavniji i brži pristup. Suština je da se semikvantitativno proceni broj PMN u odnosu na broj EĆ, a da se vreme iskoristi na pregled što veće površine preparata. Ovakav pristup je neuporedivo brži i lakši, a i ne zahteva standardizaciju površine vidnog polja. U metodologiji je naveden najmanji broj VP koja treba pregledati, ali je u praksi taj broj višestruko veći. Ovakav pristup je suštinski statističko-matematička kategorija. Tako, verovatnoća za pronalaženje skrivenog objekta (npr. CA) i procenu broja vidljivih „objekata“ (npr. PMN) na mikroskopskom preparatu upravo je proporcionalna pregledanoj površini preparata, a obrnuto srazmerna njegovoj homogenosti, odnosno što je preparat nehomogeniji to je za donošenje validnih zaključaka potrebno pregledati veću površinu.

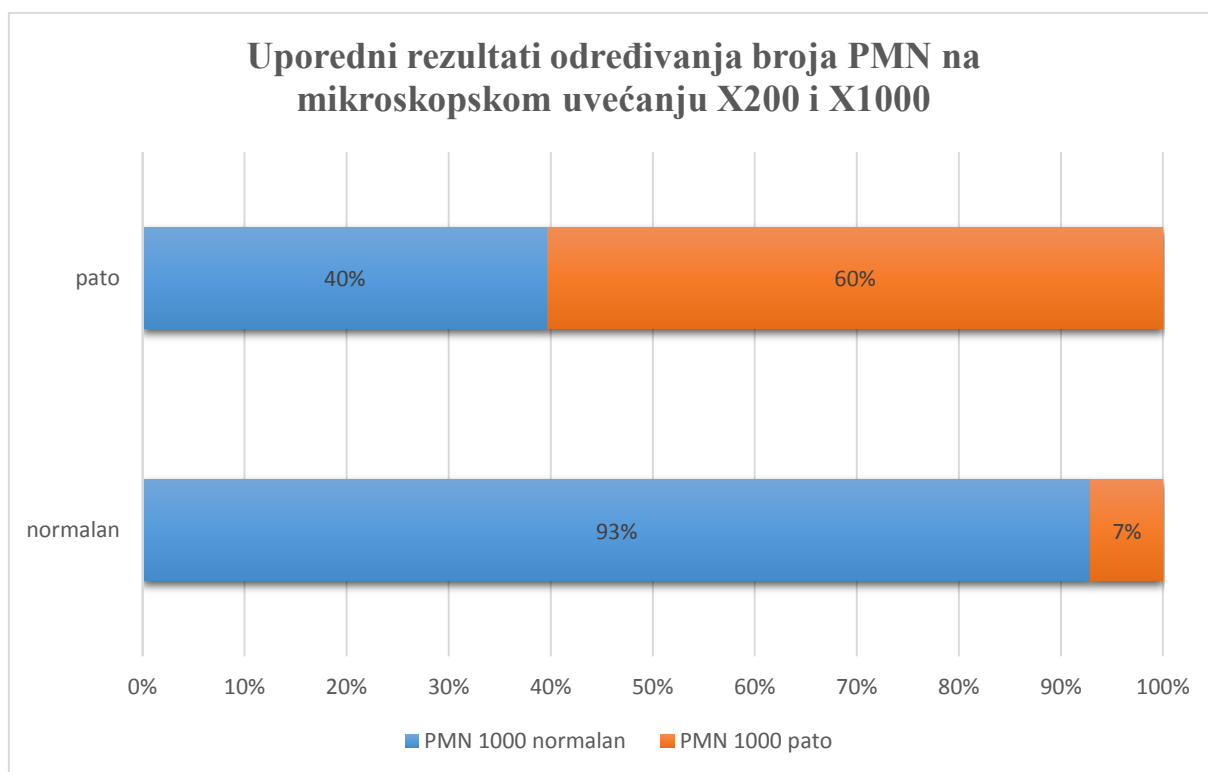
### **3.3.1.1 Poređenje rezultata - broja PMN na različitim mikroskopskim uvećanjima**

Radi bolje preglednosti u nekim tabelama brojevi 0, 1, 2 i 3 označavaju PMN grupe (PMN0, PMN1, PMN2 i PMN3), pri čemu se nalazi PMN0 i PMN1 smatraju fiziološkim brojem PMN, a nalazi PMN2 i PMN3, patološkim brojem PMN, što je u tabelama označeno kao NORMALNO i PATOLOŠKI kada se ove pacijentkinje spoje u jednu od ove dve grupe.

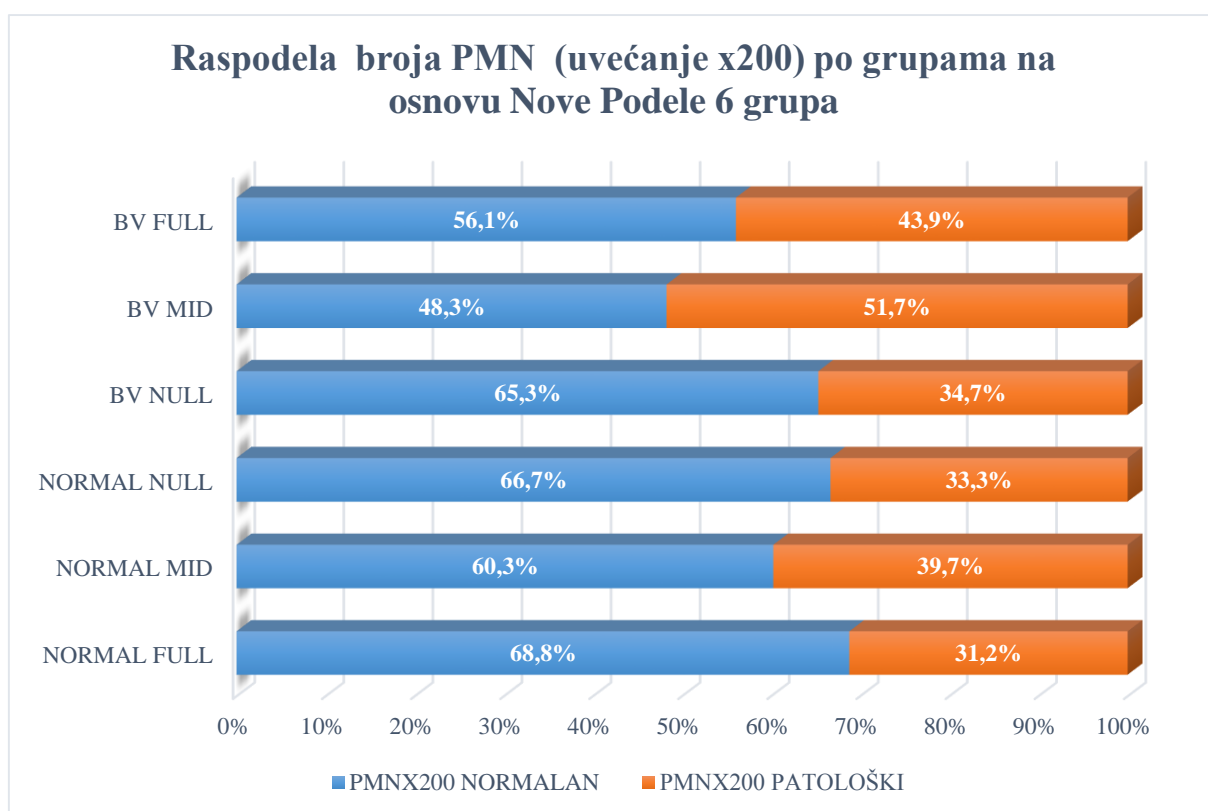
Primenom Hi kvadrat testa testirana je povezanost između pregleda na x200 i x400 i utvrđeno je postojanje dobre asocijacije ( $\chi^2=557,628$ ;  $df= 9$ ;  $p<0.001$ ; Tabela 18, Prilog 1), kao i povezanost između pregleda x200 i x1000 i utvrđeno je postojanje dobre asocijacije ( $\chi^2=471,181$ ;  $df= 9$ ;  $p<0.001$ ;Tabela 19, Prilog 1).



**Grafikon 3.31: Distribucija PMN x 400 u odnosu na PMN x200**



**Grafikon 3.32: Distribucija PMN x 1000 u odnosu na PMN x200**



**Grafikon 3.33: Raspodela pacijentkinja sa normalnim (PMN0+PMN1) i patološkim (PMN2+PMN3) brojem PMN na mikroskopskom uvećanju x200 po grupama na osnovu NP-6G**

Dakle, na osnovu dobijenih rezultata možemo zaključiti da se sva tri metoda mogu uspešno koristiti u semikvantitativnom određivanju broja PMN, pri čemu je asocijacija između pregleda na uvećanjima x200 i x400 bolja u odnosu na onu na uvećanju x1000, što je svakako u vezi sa činjenicom da na manjem uvećanju gledamo veću površinu. Ipak, vidi se da je ova povezanost najvećim delom posledica velike podudarnosti u grupi PMN0. S druge strane, iz Tabele 19 Prilog 1 u kojoj su prikazani uporedni rezultati pregleda X200 i x1000 može da se vidi da je 55% pacijentkinja koje su na osnovu pregleda uvećanja x200 svrstane u grupu PMN2, pregledom na uvećanju X1000 bile svrstane u grupe PMN0 (10%) i PMN1 (45%). Takođe, 26% pacijentkinja iz grupe PMN3 na uvećanju x200, je na uvećanju x1000 imalo je nalaz PMN0 (2%) i PMN1 (24%). Ako metod na uvećanju x200 prihvatimo kao zlatni standard onda je na osnovu pregleda na uvećanju x 1000 tačno 100 pacijentkinja sa patološkim nalazom (x200) imalo normalan nalaz (x1000), odnosno pripadalo grupi lažno negativnih (LN), dok bi 32 pacijentkinje bila lažno pozitivne. Ukoliko bi sada računali specifičnost i senzitivnost metoda na uvećanju x1000 u odnosu na x200 kao zlatni standard dobili bi sledeće rezultate: specifičnost 60,0%; senzitivnost 92,9%; sveukupna tačnost  $560/691=81,0\%$ ; PPV: 83,0%; NPV 80,0%.

U tabelama od 21 – 23, Prilog 1 prikazana je raspodela PMN na osnovu podele pacijentkinja po grupama različitim metodologijama Nugent, Ison/Hay, Claeys, Amsel i NP-6G. Ove podatke nećemo detaljnije analizirati jer su prikazani da bi se ukazalo na činjenicu da su PMN u patološkom broju prisutni kod velikog broja pacijentkinja sa normalnim ili patološkim nalazom bez obzira koji od dijagnostičkih kriterijuma su korišćeni. Ovaj podatak navodimo pre svega da naglasimo da se u najvećem broju ispitivanja koje se odnose na vaginalne infekcije PMN i ne pominju, a gotovo sve studije koje se ozbiljnije bave brojem PMN u vaginalnom sekretu naveli smo u delu u kome govorimo o različitim dijagnostičkim kriterijumima za određivanje broja PMN. Nije jasno kako je jedan parametar koji je u prošlosti bio sastavni deo procene stanja vaginalne flore gotovo potpuno nestao sa naučnoistraživačke i kliničke scene. Jedan od razloga svakako leži u činjenici da je veoma mali broj kliničara obučen za gledanje mikroskopskog preparata, bilo nativnog bilo bojenog po Gramu. S druge strane, gledanje preparata po Gramu (mikrobiolog) uglavnom je ograničeno na dijagnozu BV. Takođe, brojanje PMN na mikroskopskom preparatu poprilično je zamoran posao i zahteva mnogo vremena. Ali verovatno najvažniji razlog je činjenica da se poslednjih decenija bavimo uglavnom sa tri poremećaja vaginalne flore BV, infekcijom trihomonasom i kandidom. Pri tome se BV navodi kao primer vaginalne infekcije čija je jedna od najvažnijih karakteristika odsustvo PMN, dok se druga dva stanja karakterišu povećanim brojem PMN. Naravno, normalan nalaz takođe podrazumeva da su PMN odsutni ili prisutni u malom broju. To „podrazumevanje“ je verovatno

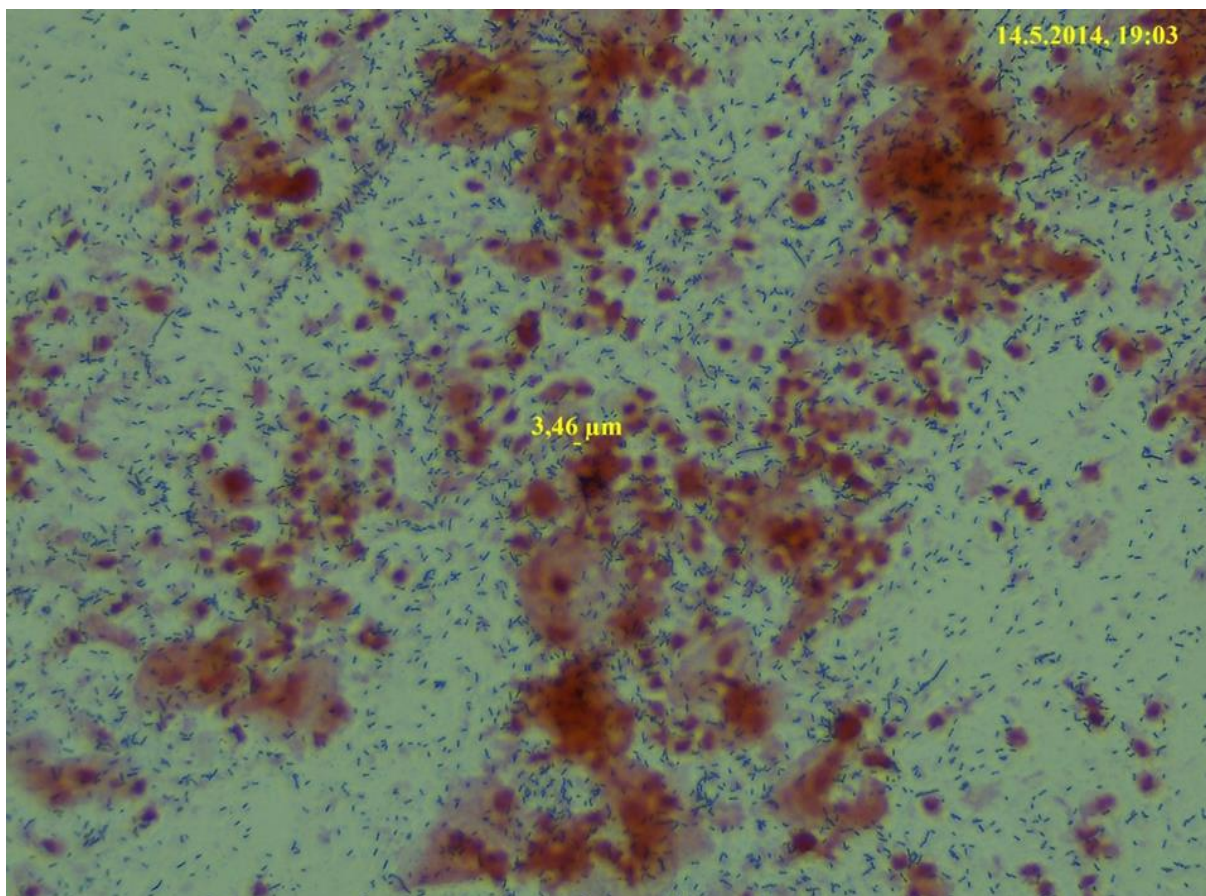
i osnovni razlog što najveći broj studija i ne pominje PMN. Zahvaljujući činjenici da je određivanje broja PMN bio najvažniji cilj ovog istraživanja, oni ne samo da nisu „izgubljeni“ nego ukazuju da bi svaki mikroskopski pregled vaginalnog sekreta morao da uključi i PMN u konačnu procenu stanja vaginalne flore.

Ako pogledamo podelu po Nugentu onda vidimo da su 153/440 (34,7%) pacijentkinje iz grupe sa normalnim nalazom imale patološki broj PMN, u intermedijarnoj grupi taj procenat je 32,1% (36/112), dok je u grupi BV 44,5% (66/148) pacijentkinja imalo patološki broj PMN. Slična raspodela je i u podeli u po Ison/Hayu, a najmanji broj PMN nađen je u grupi normalnih u podeli po Claeyesu. To je logično zbog postojanja grupe leukoreja koja podrazumeva pacijentkinje sa normalnim brojem laktobacila i velikim brojem PMN. Ako pogledamo raspodelu pacijentkinja sa različitim brojem PMN u grupama na osnovu NP-6G onda od ukupno 699 pacijentkinja, 255 (36,5%) je imalo patološki broj PMN, a 444 (63,5%) su imale normalan broj PMN. Od 526 pacijentkinje sa normalnim nalazom (NF+NM+NN) (298+256+72) mikroskopskog pregleda preparat po Gramu njih 179 (34%) je imalo patološki broj PMN, dok je od 173 pacijentkinje sa patološkim nalazom (BVF+ BVM+BVN), 76 (43,9%) imalo patološki broj PMN. Primenom Hi kvadrat testa utvrđeno je postojanje slabe asocijacije ( $\chi^2=110,943$ ;  $df=15$ ;  $p<0.001$ ) između 6 grupa na osnovu NP. Ovo ukazuje na iznenađujuće ravnomernu raspodelu PMN kod pacijentkinja sa normalnim i patološkim nalazom mikroskopskog nalaza vaginalnog sekreta. Mogli bismo reći da je u našem ispitivanju oko 35% pacijentkinja sa normalnim nalazom (predominacija laktobacila) imalo povećan broj PMN, kao i da je preko 40% pacijentkinja sa BV imalo patološki broj PMN. Ovo je svakako iznenađujuće jer ni pacijentkinje sa normalnim nalazom ni pacijentkinje sa BV ne bi trebalo da imaju povećan broj PMN. Poznato je da je odsustvo PMN jedan od znakova BV. Dakle, ako smo mi u našem ispitivanju imali oko 35% pacijentkinja sa patološkim brojem PMN, verovatno su i druge studije ovakvog tipa imale oko 1/3 pacijentkinja sa povećanim brojem PMN. Na primer, već više puta pominjana Ravelova [180] studija, kao i većina drugih, uopšte ne pominje broj PMN kao relevantan faktor u proceni stanja vaginalne flore. U tu studiju je bilo uključeno 396 asimptomatskih žena, od kojih je kod 97 na osnovu kriterijuma po Nugentu postavljena dijagnoza BV. Gledajući u rezultate našeg ispitivanja, koji suštinski ima takođe populaciju asimptomatskih trudnica, verujemo da je i u tom ispitivanju ako ne 35%, onda barem 20-25% pacijentkinja sa normalnim nalazom mikroskopskog pregleda imalo patološki nalaz PMN, odnosno da je, ako ne 40%, onda barem 20% (upola manje nego u našem ispitivanju) od 97 pacijentkinja kod kojih je dijagnostikovana BV imalo povećan broj PMN. Ravelovu [180] studiju navodimo kao primer koji ukazuje da najveći broj istraživanja koja se iz različitih

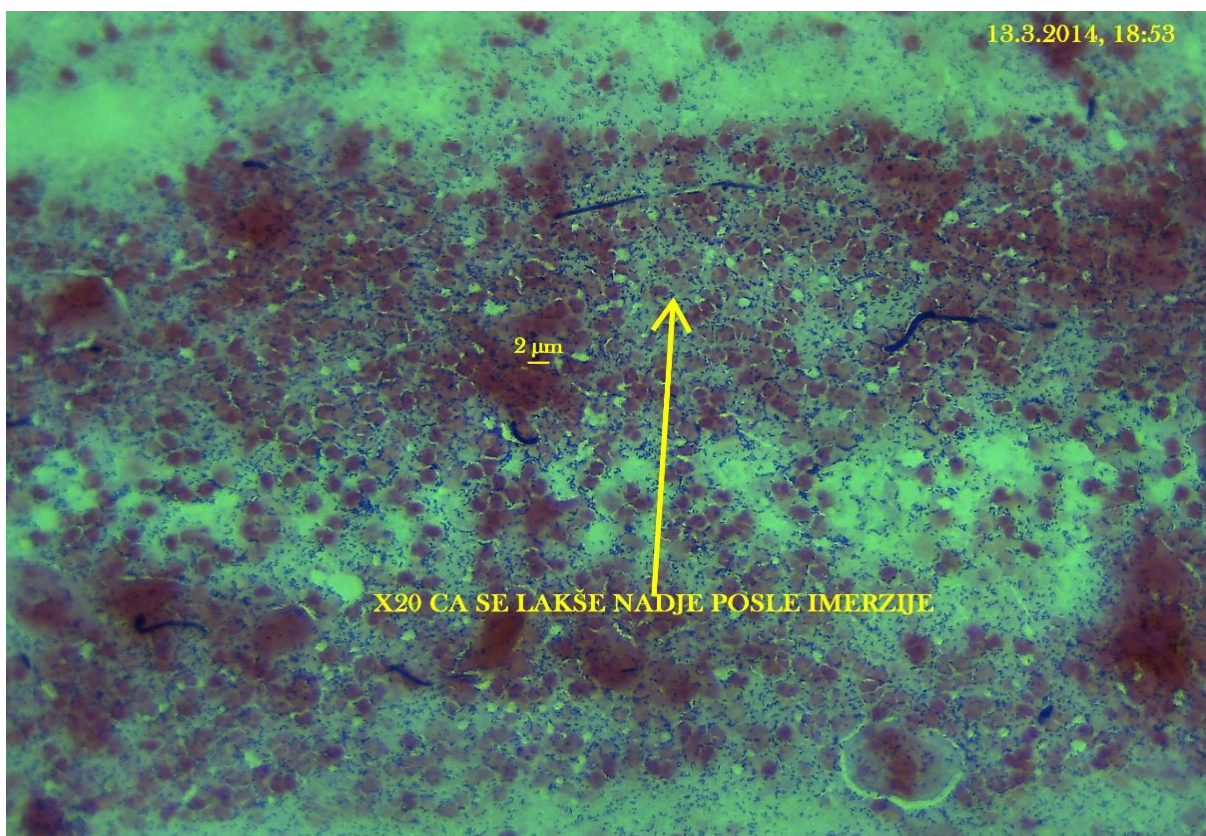
razloga bave BV uopšte ne pominju PMN jer se podrazumeva da oni nisu prisutni u ovoj grupi pacijentkinja. Dakle, ako gledamo rezultate neke studije u kojoj su korišćeni kriterijumi po Amselu znamo koliko je pacijentkinja imalo normalan nalaz, a koliko BV i na neki način podrazumevamo da je broj PMN u obe ove grupe bio normalan, jer se u studiji PMN ne pominju. Ako ovakva studija ispituje koncentracije nekog zapaljenjskog medijatora kod pacijentkinja sa normalnim nalazom i onih sa BV, onda bi PMN kao važan učesnik imunskog odgovora mogli uticati na koncentracije ispitivanog medijatora. Pacijentkinje sa predominacijom laktobacila i normalnim brojem PMN i pacijentkinje sa istim nalazom laktobacila i velikim brojem PMN, ne bismo mogli svrstati u istu kategoriju, a isto se odnosi i na pacijentkinje sa BV, odnosno svaku grupu pacijentkinja u podelama koje smo prethodno pominjali. Tako, ako su u nekom ispitivanju korišćeni Nugentovi dijagnostički kriterijumi, onda više ne bi imali 3, nego 6 grupa, tri (normalan, intermedijaran i BV) sa normalnim brojem PMN i tri (normalan, intermedijaran i BV) sa patološkim brojem PMN. Podaci iz našeg ispitivanja o značajnom broju pacijentkinja sa povećanim brojem PMN u svim grupama pacijentkinja i činjenica da najveći broj studija uopšte ne beleži PMN, verovatno su jedan od skrivenih ometajućih činilaca koji može da utiče na konačne rezultate ispitivanja. Ono što je nesporno je činjenica da su PMN, odnosno njihov povećan broj u vaginalnom sekretu, znak nekih zapaljenjskih zbivanja i da se takav nalaz uvek mora uzeti u obzir.

Najbolja potvrda ovakvim razmišljanjima je činjenica da su Claeys i sar. [216] u posebnu grupu izdvojili pacijentkinje sa predominantnom laktobacilarnom florom i patološkim brojem PMN, koji su nazvali idiopatska leukoreja. Naravno autori ukazuju da je uslov da pacijentkinju svrstate u ovu grupu da isključite infekciju CA jer je ona najčešći uzrok povećanog broja PMN (Slike 3.18 i 3.19). Ovaj uslov da se isključi infekcija CA je odličan uvod za prikazivanje daljih rezultata i naših iskustava tokom ovog ispitivanja, a koji se najvećim delom odnose na otkrivanje infekcije CA.





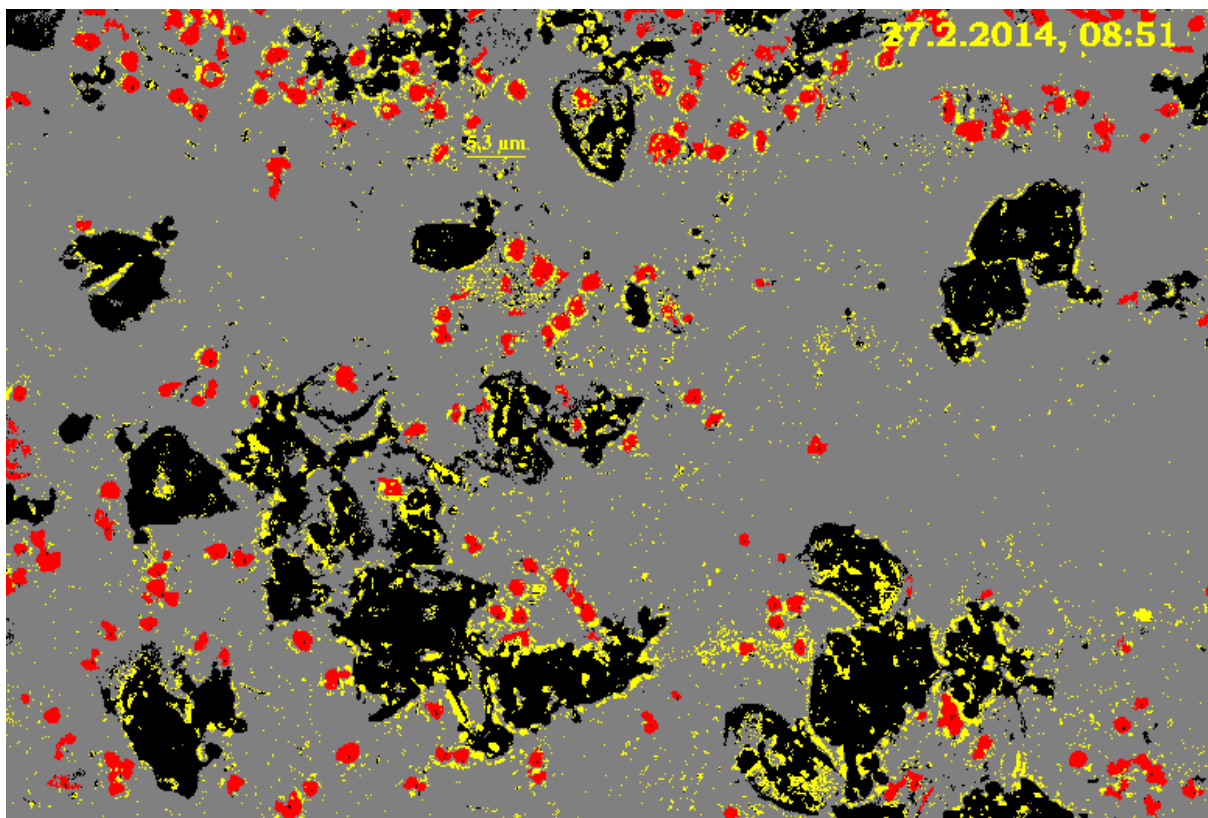
Slika 3.18: Gram pozitivne štapičaste forme i dosta PMN bez *C. albicans* (x200)



Slika 3.19: Gram pozitivne štapičaste forme, dosta PMN i hife gljivica (x200)

### 3.3.2 BROJ POLIMORFONUKLEARA- KVANTITATIVNE METODE

Pored semikvantitativnog određivanja broja PMN na različitim mikroskopskim uvećanjima (x200, x400 i x1000), u kvantitativnom određivanju broja PMN korišćena su još dva metoda (QPMN-A i QPMN-B), a određivana je i vijabilnost PMN izražena kao procenat apoptoze PMN (%APO). U poglavlju o PMN pokazali smo, primenom  $\chi$ -kvadratnog testa, da svaki od ovih metoda može uspešno da se koristi u određivanju broja PMN, ali i ukazali da ta podudarnost uglavnom potiče od trudnica s nalazom PMN0, kao i na značajne razlike među pojedinim mikroskopskim uvećanjima. Najpre nešto o našim iskustvima koja se odnose na broj PMN odredivan mikroskopskim pregledom (semikvantitativni metod, X200) i rezultate koje su dobijeni QPMN-B. Kod 14,6% (160/682) trudnica QPMN-B nisu nađeni PMN, što je sumnjivo jer, kao što smo rekli, retko se nađe preparat po Gramu na kome nema PMN. Od 255 trudnica kod kojih je mikroskopskim pregledom na uvećanju x200 utvrđen povećan broj PMN (PMN2+PMN3), kvantitativnom metodom QPMN-B PMN nisu nađeni kod 32 (14,4%) pacijentkinje, od čega su 23 iz grupe PMN2, a 9 iz grupe PMN3 na osnovu mikroskopskog pregleda na uvećanju x200. Ove razlike su najverovatnije posledica tehničkih propusta. Moguće je da je bris uziman sa različitih mesta u vagini ili je uzet bez dovoljnog pritiska, ili je u transportu došlo do razlivanja i možda zadržavanja PMN na zidu epruvete i sl. Generalno, što je duži put PMN od vagine do konačnog brojanja to je i veća mogućnost metodoloških neslaganja koja bitno mogu uticati na rezultate. Isto se odnosi i na drugi kvantitativni metod (QPMN-A) gde, pored teškoća da iz vagine usisamo uvek istu količinu tečnosti kojom smo je ispirali, činjenice da ovim postupkom ulaze u ukupan broj i PMN iz grlića i drugih delova vagine, već ukazuje na metodološke probleme. Verujemo da će i u budućim ispitivanjima mikroskopski nalaz preparata bojenog po Gramu ili nekom drugom tehnikom bojenja, kao jednostavan, brz i jeftin, omogućava uzimanje uzoraka sa različitih delova vagine i/ili grlića, uz pomenutu softversku analizu (Slika 3.20) (objektivizacija) broja PMN dati najbolje rezultate u određivanju graničnih vrednosti za broj PMN u brisu vaginalnog sekreta.



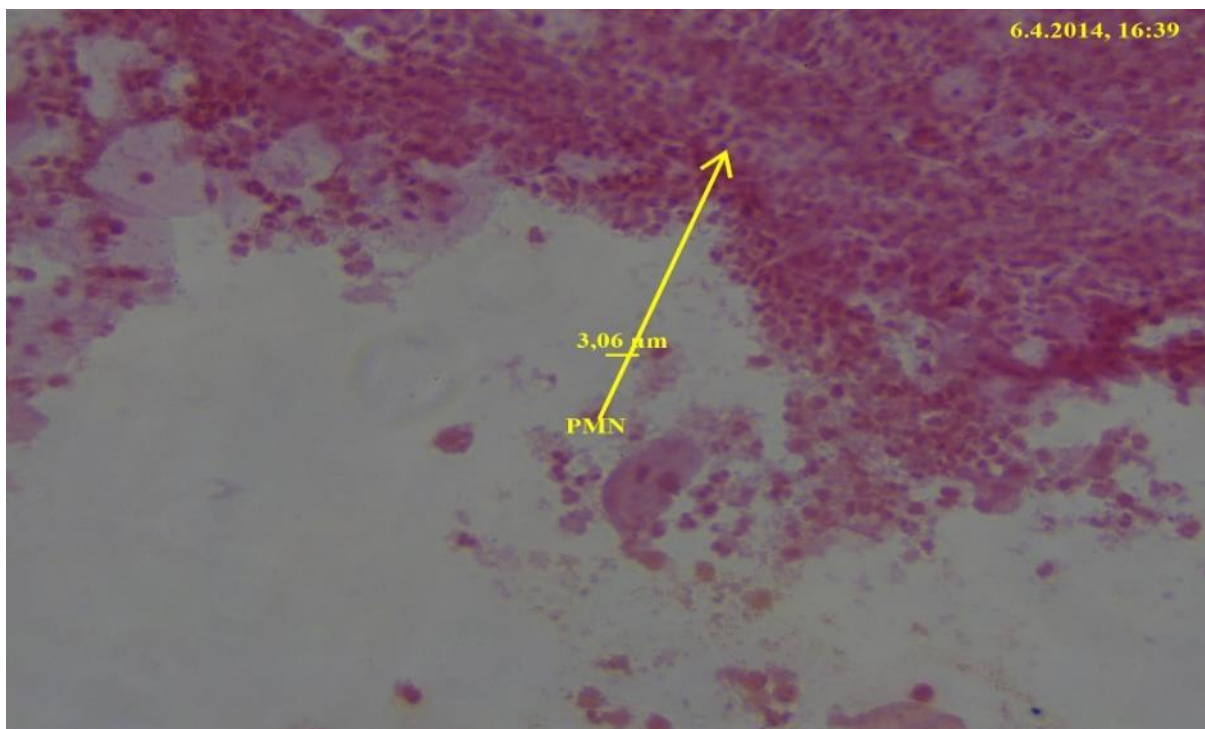
Slika 3.20: Softverska analiza - prepoznavanje objekata na slici (GSA Image Anlayser, Germany)

QPMN-B je dao relativno dobre rezultate u ROC analizi tako da njegova vrednost u otkrivanju poremećaja vaginalne flore ima senzitivnost 66,7% i specifičnost 44,0% za graničnu vrednost  $0,3 \times 10^6/\text{ml}$ , a određivan na osnovu *P/N ratio* (videti Grafikon 3.36 i Tabela 3.17 na strani 192). Međutim kako se ROC analiza odnosi na vrednost pojedinih parametara u dijagnozi BV, onda bi mogli reći da pacijentkinje sa BV imaju povećan broj PMN, što kao što smo pokazali u analizi rezultata na osnovu mikroskopskog pregleda na uvećanju x200, nije tačno. Tamo smo i ukazali na činjenicu da se povećan broj PMN kod pacijentkinja sa BV uglavnom ukazuje i na prisustvo CA. Ukratko, rezultati ROC analize ukazuju da je određivanje broja PMN metodom QPMN-B opterećeno metodološkim (tehničkim) nedostacima, i da je kao takvu ne bi mogli preporučiti za kliničku praksu. Ova metodologija uz strožije metodološke kriterijume (put uzorka od zida vagina do komore i brojanja) možda bi mogla dati bolje rezultate u istraživačkim projektima.

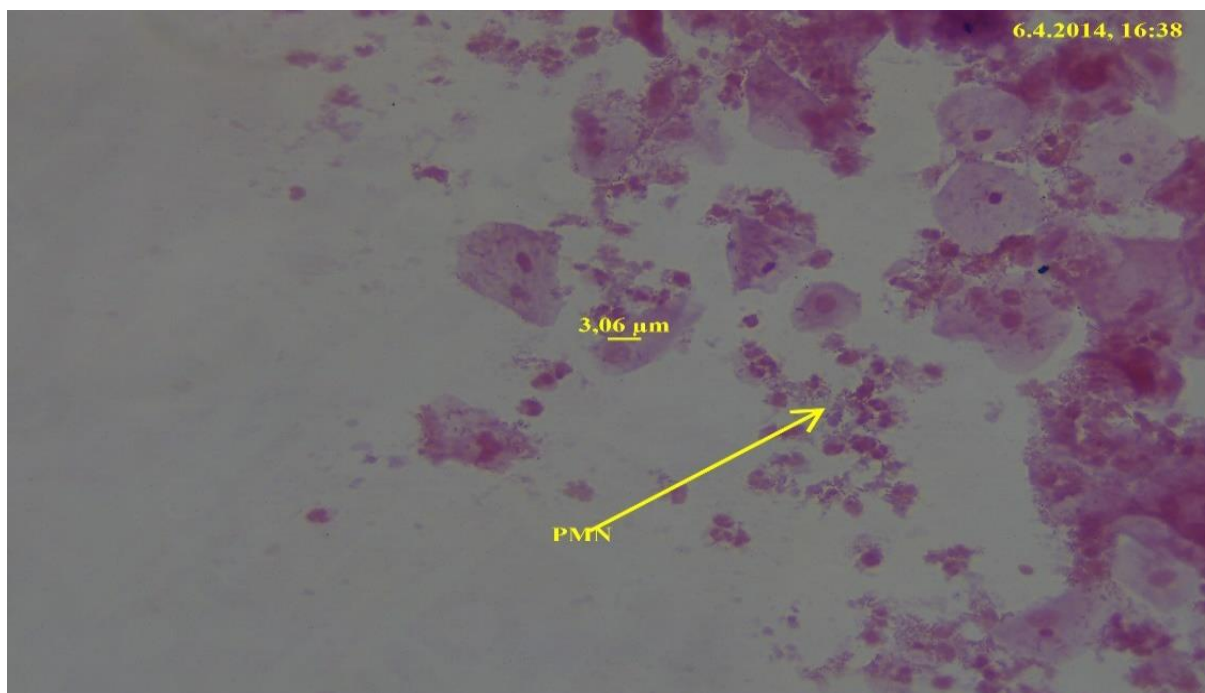
Primenom Spearmanovog testa korelacije nađena je dobra povezanost samo između semikvantitativnih metoda na različitim mikroskopskim uvećanjima (x200/x400, x200/x1000 i x400/x1000;  $\rho$  0,74,  $\rho$  0,73 i  $\rho$  0,81), dok takva povezanost ili nije nađena ili je bila slabija između semikvantitativnih i kvantitativnih metoda, što samo potvrđuje prethodnu diskusiju (Tabela 3.8).

U već pominjanim radovima belgijske grupe [415, 216, 428, 443], pored grupe *I-like*, u našem radu (BIFIDO), svakako da pažnju zaslužuje i grupa I-PMN (kod nas grupa "leukoreja"). I sami autori [415] ukazuju na činjenicu da bi ove pacijentkinje bile svrstane u grupu sa normalnim nalazom da je mikroskopski pregled preparata po Gramu procenjivan na osnovu dijagnostičkih kriterijuma po Nugentu ili Ison/Hayu. Kako autori u svom radu navode, uslov da bi pacijentkinju razvrstali u ovu grupu je da se isključi infekciju CA. U radu nema detaljnijih podataka o načinu detekcije CA, a s obzirom na nedorečene i neprecizne kriterijume u razlikovanju infekcije od kolonizacije CA, verujemo da ovo »isključivanje infekcije CA« podrazumeva da CA nije detektovana mikroskopskim pregledom preparata po Gramu. Druga mogućnost je, mada to autori nigde ne navode, da su pacijentkinje sa mikroskopskim nalazom CA isključene iz ispitivanja ili se podrazumeva da nijedna od 211 pacijentkinja uključenih u ispitivanje nije imala infekciju CA. PMN su brojani semikvantitativno i pacijentkinje su podeljene u 4 grupe: nema PMN, +, ++, +++, pri čemu su nalazi sa izrazito velikim brojem PMN svrstavani u grupu I-PMN. Pri tome ne navode kriterijume za dodelu +, ++, +++, a ne znamo ni broj vidnih polja koja su pregledana niti mikroskopsko uvećanje. Imajući u vidu rezultate našeg ispitivanja kao i poznatu činjenicu da je infekcija CA mnogo češća u trudnoći, malo je verovatno da od 211 pacijentkinja nijedna pacijentkinja na mikroskopskom nalazu po Gramu nije imala spore ili hife gljivica. S druge strane, ako mikroskopskim pregledom preparata po Gramu kod ovih 211 pacijentkinja nisu identifikovane spore i hife gljivica, ako je preparat gledan na uvećanju x1000, to potvrđuje naše rezultate vezane za detekciju CA na različitim mikroskopskim uvećanjima. Rezultati našeg ispitivanja u kojima je mikroskopski nalaz CA u skoro 80% slučajeva bio udružen sa patološkim brojem PMN, upućuje na potrebu da u ovakvim ispitivanjima, a posebno ako koristimo kriterijume po Claeyesu, prisustvo CA mora biti detaljnije ispitivano: klinički pregled, NPVS sa 10%KOH, specijalne podloge za kulture i molekularnobiološke metode (Q-PCR). Ovakvim pristupom i uključivanjem u ispitivanje npr. KOKA, BIFIDO I LEPTO formi, i drugih mogućih uzročnika povećanog broja PMN (*T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, virusi itd.) bili bismo bliže odgovoru o uzroku povećanog broja PMN. Grupa koja je od interesa za autore jesu pacijentkinje koje su imale normalan broj laktobacila i ekstremno velik broj PMN, a njih je bilo 7% (17/221). U studiji ne pominju pacijentkinje koje su imale povećan broj PMN (grupe ++ i +++ ali ne sa ekstremno velikim brojem PMN) kao ni njihovu raspodelu po grupama. I mi smo imali četiri grupe trudnica, dve sa normalnim nalazom i dve sa patološkim nalazom PMN (PMN2 i PMN3). Iako Verstraelen i sar. [415] nisu naveli detalje određivanja broja PMN, u diskusiji ukazuju da je jedan od ograničavajućih faktora u njihovoj studiji činjenica da je broj PMN određivan

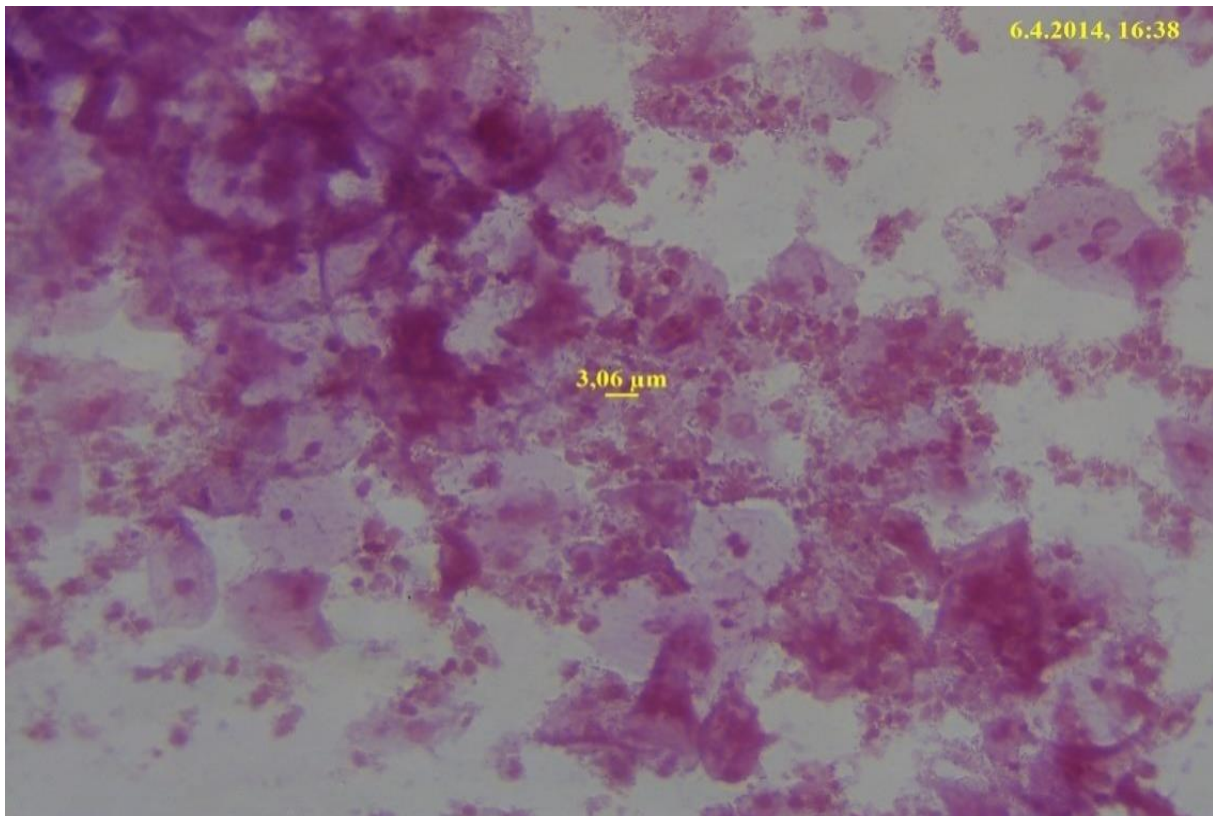
semikvantitativno. Kao najvažniji razlog za takav pristup navode nehomogenost preparata. Kao potvrdu nehomogenosti prilažemo još četiri fotografije iz ovog rada koje jasno ukazuju koliko se broj PMN može razlikovati na istom preparatu, pri čemu opet naglašavamo da su sve fotografije na uvećanju x200, i da se na toj površini nalazi 25 vidnih polja uvećanja X1000, odnosno da u ove četiri fotografije uvećanja x200, staje 100 fotografija (vidnih polja) uvećanja x1000.



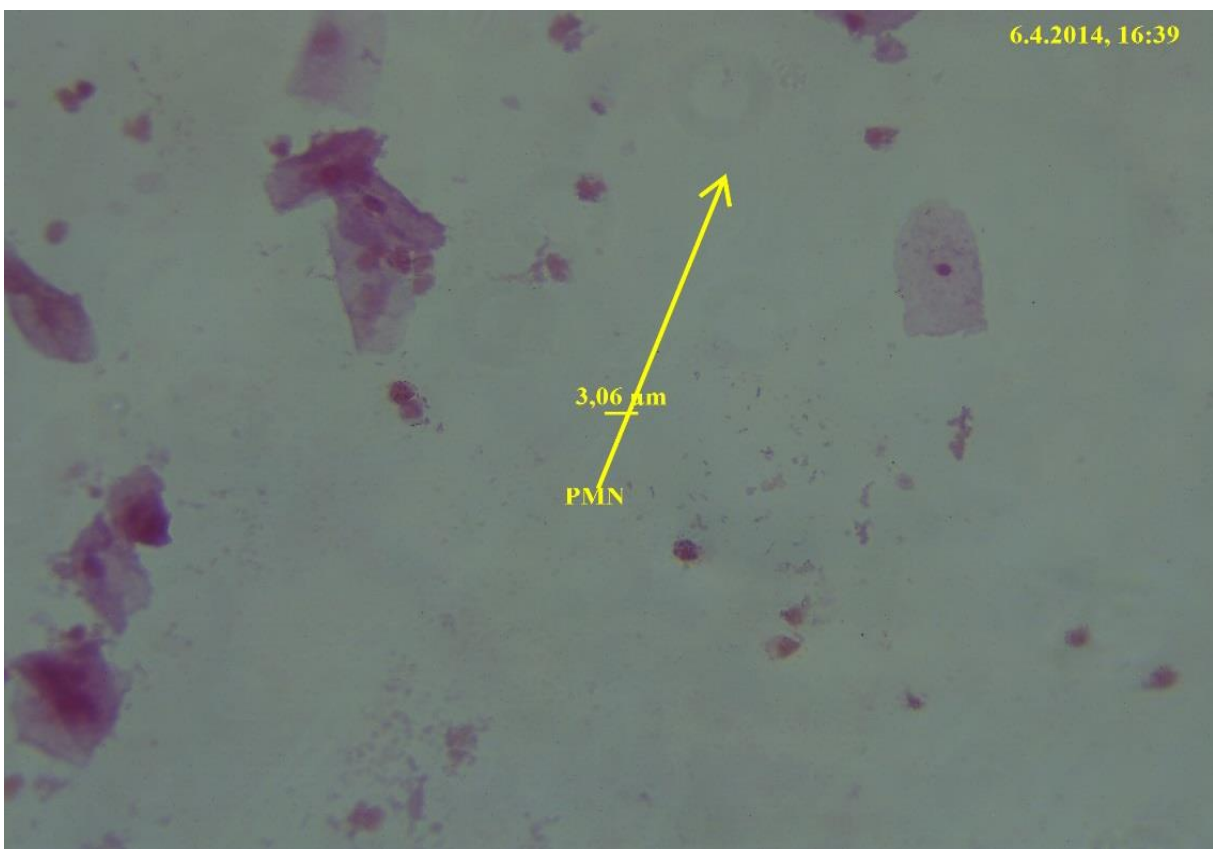
Slika 3.22: Ogroman broj PMN na ovom VPu i uvećanju x200 u našem ispitivanju PMN3



Slika 3.21: Isti pacijent susedno vidno polje (VP) broj PMN značajno manji PMN2; površina na uvećanju x200 ima 6,5 VP uvećanja x400



Slika 3.23: Isti preparat treće susedno VP polje na uvećanju x200 (PMN3)



Slika 3.24: Isti pacijent sa značajno manjim brojem PMN (PMN1); treba se prisetiti da na ovoj površini ima 25 vidnih polja uvećanja X1000 i uočiti koliko se broj PMN može razlikovati na maloj površini

Ako svaku od ovih fotografija podelimo na 25 jednakih delova lako uočavamo koliko se broj PMN razlikuje na svakom od tih 25 zamišljenih polja. Naravno, ovo zapažanje vredi i za druge ćelijske/bakterijske forme u vaginalnom sekretu. Sami belgijski autori priznaju da je pri ovakvoj (semi)kvantifikaciji razlika između posmatrača veoma velika i da zahteva dodatnu validaciju. Upravo neujednačenost razmaza vaginalnog sekreta nameće kao razumno rešenje semikvantitativni pristup i posmatranje pod manjim uvećanjem (x200) iz razloga koje smo prethodno razjasnili.

Zanimljiva alternativa, prikazana u Metodologiji o brojanju i morfometrijskim analizama laktobacila i BVAB je program za analizu mikroskopske slike. Taj program koristili smo u određivanju broja PMN i prvi rezultati (*nije prikazano*) koje smo dobili su veoma ohrabrujući (vidi Sliku 3.23). Verujemo da će ovakav pristup u bliskoj budućnosti biti oruđe koje će omogućiti da preciznije i objektivnije razgraničimo normalan od patološkog broja PMN u vaginalnom sekretu.

U ovom ispitivanju smo jasno definisali kriterijume za razlikovanje normalnog od patološkog broja PMN. Pokazali smo da je od ukupno 699 pacijentkinja 255 (36,5%) imalo patološki broj PMN. U Nugentovoj grupi sa normalnim nalazom bilo je 153/440 (34,7%) trudnica sa patološkim brojem PMN, u intermedijarnoj 26,7% (36/122), a u grupi sa BV čak 44,5% (66/148). Kod 57 od 179 (31,8%) pacijentkinja sa patološkim nalazom PMN nije nađena CA, dok je 35 pacijentkinja sa CA imalo normalan broj PMN. Dakle i ovde 10,8% (57/526) trudnica možemo da svrstamo u Claeysovu grupu sa idiopatskom leukorejom.

Među trudnicama sa BV, 12,3% (n=12) je imalo povećan broj PMN, a bez CA i ove pacijentkinje možemo da definišemo kao idiopatsku leukoreju. Podvlačimo da ne možemo da isključimo druge moguće uzroke povećanog broja PMN (KOKE, BIFIDO i LEPTO forme, *n. gonorrhoeae*, HPV, HSV).

Interesantna je hipoteza kojom Verstraelen i sar. [415] pokušavaju da objasne povećan broj PMN u grupi pacijentkinja sa “idiopatskom leukorejom”, po kojoj je to stanje poremećene vaginalne flore u fazi izlečenja, ali je dovelo do produženog zapaljenjskog odgovora koji se na mikroskopskom preparatu očituje kao povećan broj PMN. Ovo bi se naravno, moglo dovesti u vezu sa našim ispitivanjem koje se odnosi na apoptozu PMN u različitim stanjima vaginalne flore kao i činjenicom da je u uslovima infekcije produžen životni vek PMN. Imajući u vidu uopšteno veoma kratak životni vek PMN, njegovo produženje verovatno nije toliko da bi dalo ovakvu mikroskopsku sliku. Kao još jednu mogućnost autori navode podatke koji ukazuju na snažnu korelaciju između broja vaginalnih PMN i infekcija gornjih partija genitalnog trakta,

navodeći studiju Peipert i sar. [397] da prisustvo PMN u vaginalnom sekretu ima senzitivnost od oko 78% u dijagnozi akutnih infekcija gornjeg genitalnog trakta, kao i da broj PMN na NPVS predstavlja odličan marker subkliničkog endometritisa sa senzitivnošću od 90,9% [97, 98]. Oni takođe navode podatke da prisustvo vaginalnih PMN prethodi PP i da kao takvo može biti znak subkliničke intrauterine infekcije [99, 100]. Međutim, kako nemamo pouzdanih podataka šta je fiziološki, a šta patološki broj PMN u vaginalnom sekretu rezultate prethodno citiranih ispitivanja moramo da prihvatimo s velikom rezervom.

Verstraelena i sar. [415] su našli da pacijentkinje iz grupe I-PMN imaju oko 6,8 puta veći relativni (RR) rizik od PP. U našem ispitivanju na osnovu pregleda preparat po Gramu na tri različita mikroskopska uvećanja, dva kvantitativna metoda i pregledom NPVS, nismo našli da trudnice sa povećanim brojem PMN imaju veći RR za PP. Na osnovu naših rezultata (vidi odeljak o BIFIDO formama), i BIFIDO forme bi mogle biti uzrok povećanog broja PMN u grupi pacijentkinja definisanoj kao idiopatska leukoreja, pre nego hipoteza koju navode autori. Naravno, i druge bakterije, virusi i gljivice koje “ne vidimo” na mikroskopu mogli bi biti uzrok ovakvoj mikroskopskoj slici. Verujemo da je prvi i najvažniji zadatak da se napravi konsenzus o jedinstvenoj metodologiji mikroskopskog pregleda preparata dok eventualno brzom kompjuterskom analizom mikroskopskih nalaza kod velikog broja pacijentkinja ne stignemo do preciznije granice između normalnog i patološkog broja PMN.

Spearmanovim testom nismo našli korelaciju između dužine grlića materice i boja PMN određivanog semikvantitativnim ili kvantitativnim metodima. Drugim testovima (ANOVA i Tamhaneov *post hoc* test) pokazali smo da postoji statistički značajna razlika u varijacijama između grupe PMN0 i PMN3 ( $p < 0,05$ ) i dužine grlića materice na osnovu rezultata mikroskopskog pregleda broja PMN na uveličanju  $\times 200$ . Pacijentkinje sa većim brojem PMN (PMN3) imale su kraći grlić materice.

U tabeli 3.8 (i Tabelama 1 i 2, Prilog 4) prikazani su rezultati Spearmanovog koeficijenta korelacije. Ispitivana je međusobna povezanost procenta apoptoze, broja PMN određivanog semikvantitativnim metodom na različitim mikroskopskim uvećanjima, broja PMN određivanog s dva kvantitativna metoda, dužine grlića materice i ispitivanih citokina.



**Tabela 3.8: Sperman-ov koeficijent korelacije**

Parametri	*	% APO	PMN (x 200)	PMN (x 400)	PMN (x 1000)	qPMNA (x 10 <sup>6</sup> /ml)	qPMNB (x 10 <sup>6</sup> /ml)	Dužina grlića
% APO	ρ		<b>-0,218</b>	<b>-0,146</b>	-0,102	<b>-0,455</b>	-0,097	-0,045
	p	-	<b>0,001</b>	<b>0,033</b>	0,136	<b>0,001</b>	0,155	0,510
	n		217	215	215	217	217	217
Broj PMN (x 200)	ρ	<b>-0,218</b>		<b>0,742</b>	<b>0,727</b>	<b>0,404</b>	<b>0,356</b>	<b>-0,094</b>
	p	<b>0,001</b>	-	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,014</b>
	n	217		691	691	226	681	678
Broj PMN (x 400)	ρ	<b>-0,146</b>	<b>0,742</b>		<b>0,813</b>	<b>0,174</b>	<b>0,255</b>	<b>-0,058</b>
	p	<b>0,033</b>	<b>0,001</b>	-	<b>0,001</b>	<b>0,009</b>	<b>0,001</b>	<b>0,131</b>
	n	215	691		691	224	676	673
Broj PMN (x 1000)	ρ	-0,102	<b>0,727</b>	<b>0,813</b>		0,076	<b>0,223</b>	<b>-0,096</b>
	p	0,136	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	-	0,256	<b>0,001</b>	<b>0,013</b>
	n	215	691	691		224	676	673
QPMNA (x 10 <sup>6</sup> /ml)	ρ	<b>-0,493</b>	<b>0,404</b>	<b>0,174</b>	0,076		<b>0,131</b>	-0,106
	p	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,009</b>	0,256	-	<b>0,048</b>	0,110
	n	217	226	224	224		226	226
QPMNB (x 10 <sup>6</sup> /ml)	ρ	-0,097	<b>0,356</b>	<b>0,255</b>	<b>0,223</b>	<b>0,131</b>		-0,008
	p	0,155	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,048</b>	-	0,827
	n	217	681	676	676	226		679
Dužina grlića	ρ	-0,045	<b>-0,094</b>	-0,058	<b>-0,096</b>	-0,106	-0,008	
	p	0,510	<b>0,014</b>	0,131	<b>0,013</b>	0,110	0,827	-
	n	217	678	673	673	226	679	

\* ρ – koeficijent korelacije; p – verovatnoća; n – broj nalaza

Crvenim brojevima su označene i boldovane korelacije koje su pokazale statičku značajnost (( $p < 0,01$  ili  $p < 0,05$ ) kao i vrednosti  $\rho$  faktora. Očekivano najbolje rezultati su nađeni kod semikvantitativnog poređenja mikroskopskih nalaza na različitim uvećanjima x200, x400 i x 1000, dok su rezultati u odnosu na dve kvantitativne metode pokazali statističku značajnost ali slabiju korelaciju. Tako su vrednost  $\rho$  za broj PMN određivan na različitim uvećanjima međusobno x200/x400, x200/x1000 i x400/x1000 bile 0,74, 0,73 i 0,81 (vidi tabelu). Ovi nalazi potvrđuju ranije pominjane i analizirane rezultate koji se odnose na međusobnu podudarnost rezultata mikroskopskog pregleda. Treba primetiti da je semikvantitativna metoda na mikroskopskom uvećanju x200 dala bolje rezultate u odnosu na druga dva mikroskopska uvećanja (x400 i x1000) kada se posmatra međusobno povezanost sa dve kvantitativne metode (QPMN-A i QPMN-B).

Podatak koji nas je prilično iznenadio odnosi se na broj PMN i koncentracije ispitivanih citokina. Uprkos velikom broju različitih podela i grupa, određivanja broja PMN sa tri semikvantitativna i dva semikvantitativna metoda, kao i činjenicu da je u ispitivanje uključeno 13 potencijalno relevantnih citokina, kao i primenom najrazličitijih statističkih “oruđa”, nismo uspeli da nađemo nikakvu povezanost između broja PMN i bilo kog od ispitivanih citokina. Teško je shvatiti, gledajući fotografije pacijentkinja iz grupa PMN3 i PMN0, da ne postoje

nikakve statističke razlike u odnosu na ispitivane citokine. Kada smo govorili o broju PMN i lokalnim koncentracijama citokina i tada smo naglašavali da nije poznato da li povećan broj PMN, izazvan infekcijom i/ili zapaljenjem, dovodi do porasta citokina ili je obrnuto. Poznato je da PMN koji su pristigli na mesto infekcije mogu da budu aktivisani drugim lokalno proizvedenim citokinima dovodeći da oslobađanja drugih medijatora zapaljenja i pokrećući tako citokinskim kaskadu. Eksperimentalni podaci na miševima pokazali su nagomilavanje makrofaga u stromi grlića pre porođaja, što ukazuje da migracija makrofaga može imati važnu ulogu u sazrevanju grlića materice koji prethodi samom porođaju. Povećan broj makrofaga prati povećanu produkciju proinflamatornih citokina od kojih su najznačajniji IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ , dakle onih citokina za koja su dosadašnja ispitivanja pokazala da imaju najznačajniju ulogu u etiopatogenezi PP udruženog sa infekcijom [361-365]. Nekoliko studija pokazalo je udruženost i pozitivnu korelaciju velikog broja PMN i visokih koncentracija TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL- $\alpha$  u vaginalnom sekretu ispitivanih pacijentkinja [72, 261]. Povećanje broja PMN i makrofaga u grliću materice korelira sa povećanom produkcijom proinflamatornih citokina (IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- $\alpha$ ) [361-365]. Kako smo kod najvećeg broja pacijentkinja sa patološkim brojem PMN u našem ispitivanju mikroskopski detektovali CA interesovalo nas je da li tu možemo naći neki odgovor na pitanja koje se odnose na naše rezultate koji nisu našli nikakvu značajniju povezanost ni sa ovom infekcijom i koncentracijama citokina, uprkos najnovijim podacima koji ukazuju na značaj INF- $\gamma$ , IL-12, IL-17 i IL-23 koji su takođe bili deo našeg spektra citokina.

Zato smo se odlučili da retrospektivno modifikujemo NP-6G sa ciljem da ona ne odražava samo odnos laktobacila i BVAB nego da se u ovakvu analizu uvede bar jedan od ometajućih faktora u našem ispitivanju (CA, KOKE, BIFIDO, LEPTO, PMN) i da proverimo kako bi takva modifikacija uticala na koncentracije ispitivanih citokina. S obzirom na činjenicu da je smo kod oko 1/3 ispitanica mikroskopskim pregledom na uvećanju x200 detektovali spore i hife gljivica i semikvantitativno procenili da imaju povećan broj PMN (PMN2, PMN3) odlučili smo se modifikaciju u kojoj će mikroskopska detekcija CA biti osnovni modifikujući faktor. Dalje, oko 80% naših pacijentkinja kod kojih je mikroskopski detektovana CA imale su i patološki broj PMN, tako da ovakva modifikacija odražava mogući uticaj dva ometajuća faktora na dobijene rezultate. Tako je od pacijentkinje sa nalazom NF i NM, formirana nova grupa (NF+NM), koja je u zavisnosti od prisustva CA na mikroskopskom nalazu podeljene u dve nove grupe, sa ili bez CA (NF+NM i NF+NM/CA). Po istom modelu je od pacijentkinja sa nalazom BVF i BVM formirana jedna grupa, a zatim podeljena u dve u zavisnosti od prisustva CA na mikroskopskom

pregledu (BVF+BVM i BVF+BVM/CA). Pacijentkinje iz grupe NN i BVN (hipocelularne) takođe smo spojili u jednu grupu i podelili na nove dve u zavisnosti od mikroskopske detekcije CA (NN+BVN i NN+BVN/CA). U prilog ovakvoj modifikaciji ide i činjenica da Donders [214] ukazuje na postojanje dva tipa bakterijske vaginoze od kojih prvu definiše kao „BV u punom cvatu“ (eng. Full blown BV) što bi odgovaralo našoj grupi BVF, a drugu kao parcijalnu ili intermedijarnu BV, što bi odgovaralo našoj grupi BVM. Takođe se treba prisjetiti i podatka da je kod oko polovine pacijentkinja sa BV detektovano prisustvo CA. Kao što smo već opširno diskutovali naše grupe sa hipocelularnim nalazom (NN i BVN) su najproblematičnije kako u dijagnostičkom tako i u kliničkom pristupu, zbog čega smo ih u ovoj podeli transformisali u jednu grupu, pre svega što smo prethodnim rezultatima pokazali da mikroskopski kriterijumi nisu dovoljni da napravimo preciznu razliku između „normalnog“ i „patološkog“. Danas mislimo da ovakva modifikovana NP-6Ga bolje odražava stanje vaginalne flore u odnosu na originalnu NP-6G, kao i u odnosu na postojeće (Nugent, Amsel, Ison/Hay, Claeys), koje suštinski odražavaju samo odnos laktobacila i BVAB, dok ova modifikovana NP-6G odražava prisustvo jednog (CA) odnosno dva (CA i PMN) ometajućeg faktora s obzirom da je 80% pacijentkinja sa CA imalo i patološki broj PMN. Međutim odustali smo od ovakve podele jer ona jednostavno ne bi bila uporediva sa postojećim dijagnostičkim kriterijumima.

U Tabeli 3.9 su prikazani rezultati dobijeni Kruskal–Wallisovom analizom varijanse (*post hoc* Mann–Whitney U test; Tabela 6, Prilog 2) na osnovu modifikovane NP-6G, a statistički značajne razlike označene su crvenim slovima odnosno brojevima. Već na prvi pogled je jasno da se rezultati koje smo dobili ovako modifikovanom NP-6G bitno razlikuju od onih dobijenih u originalnoj NP-6G, i to kako u odnosu na koncentracije pojedinih citokina, tako i u odnosu na broj PMN.

**Tabela 3.9: Rezultati Kruskal-Wallis testa za modifikovanu i originalnu podelu NP-6G**

		QPMNA	QPMNB	IL-12p70	IFN- $\gamma$	IL-17A	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
NP-6G	$\chi^2$	14,78	48,20	8,07	6,91	13,99	10,81	9,20	20,50	0,90	16,58	11,14	14,67	7,38	32,53	8,42
(modifikovana)	p	<b>0,011</b>	<b>0,000</b>	0,152	0,227	<b>0,016</b>	0,055	0,101	<b>0,001</b>	0,970	<b>0,005</b>	<b>0,049</b>	<b>0,012</b>	0,194	<b>0,000</b>	0,135
		IL12p70	IFN $\gamma$	IL17A	IL2	IL-10	IL9	IL22	IL6	IL13	IL4	IL5	IL1 $\beta$	TNF $\alpha$		
NP-6G	$\chi^2$	<b>18,518</b>	<b>12,890</b>	5,641	3,638	3,721	10,417	5,108	<b>12,093</b>	2,307	2,478	4,192	<b>18,984</b>	8,386		
(originalna)	p	<b>0,002</b>	<b>0,024</b>	0,343	0,603	0,590	0,064	0,403	<b>0,034</b>	0,805	0,780	0,522	<b>0,002</b>	0,136		

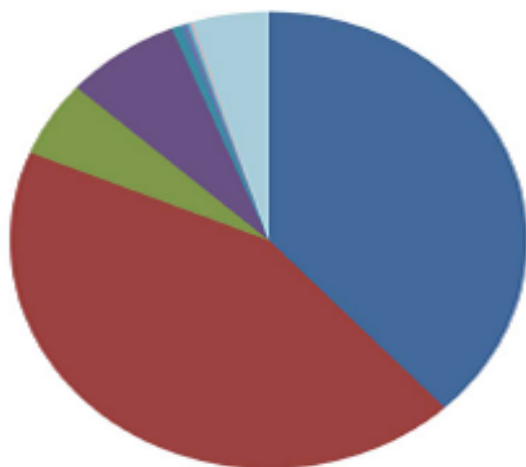
Tako je statistička značajnost u obe podele nađena samo za IL-6 i IL-1 $\beta$ , a modifikacijom NP-6G je „izgubljena“ značajnost za IL-12 i INF- $\gamma$ , ali je zato nađena za 4 druga citokina, IL-17, IL-4, IL-9 i IL-13. Pored toga modifikovanom podelom nađena je statistička značajnost i za obe kvantitativne metode za određivanje broja PMN (QPMN-A i QPMN-B) (vidi Tabelu 6 u Prilogu 2). Podatak da je modifikovanom podelom nađena statistička značajnost u odnosu na obe kvantitativne metode određivanja broja PMN ukazuje da je naša pretpostavka da će pored CA, PMN biti drugi ometajući faktor, tačna.

S obzirom da je u ovakvoj modifikovanoj podeli CA bila odlučujući faktor u formiranju novih grupa, ukazaćemo na neke, po našem mišljenju, važne činjenice. Prvo, detekcija spora ili hifa gljivica na mikroskopskom preparatu po Gramu ne znači da pacijentkinja ima infekciju CA jer je poznato, a to su pokazale i nove molekularne studije, da CA predstavlja čestog člana vaginalne flore i da je tu prisutna kao komensal. Takođe je poznato da izolacija CA kulturom ne znači infekciju, zbog čega neki autori veruju da je nalaz CA na mikroskopskom pregledu (nativnom ili bojenom po Gramu) pre govori u prilog infekcije nego pozitivan nalaz kulture, jer pozitivan mikroskopski nalaz govori u prilog većem broju patogena. Simptomi pacijentkinje i klinički znaci infekcije takođe su značajan deo skora u dijagnozi infekcije CA, ali je takođe poznato da određen broj pacijentkinja sa infekcijom CA (na osnovu postojećih dijagnostičkih kriterijuma) nema nikakvih simptoma (individualan prag osetljivosti za pečenje svrab), kao i da klinički nalaz može značajno da se razlikuje (karakterističan, gromuljičast sirast sekret, ali ili beličasta vodenasta sekrecija). Problem koji do sada nismo pominjali, a koji suštinski govori o onome što smo mi u ovom radu definisali kao ometajući faktori, je problem mešovutih vaginalnih infekcija, ili preciznije rečeno njihovog razlikovanja od koinfekcija. Rad Sobel i sar [416] možda na najbolji način definiše i objašnjava postojeće probleme, ali je jasno da na tom polju postoji još veliki broj problema, pogotovo ukoliko se osvrnemo na rezultate molekularnobioloških analiza vaginalnog mikrobima vagine. Koncept postojanja mešovitog vaginitisa (MV) veoma je teško definisati, a još teže klinički potvrditi. Sobel [416] ka najjednostavniju definiciju navodi onu po kojoj bi to značilo da su u vagini istovremeno prisutni dva ili više potencijalnih patogena, bez obzira na njihov pojedinačni klinički značaj. S obzirom na činjenicu da se CA može kulturom naći (kolonizacija) kod 10-15% zdravih pacijentkinja ovakav pristup značajno bi povećao učestalost (epidemiološku) mešovutih infekcija, a isključivanjem nalaza kulture gljivica ovaj procenat bi bio značajno niži. Zato Sobel [416] definiše mešoviti vaginitis kao prisustvo dva ili više patoloških procesa (ne patogena) koji koegzistiraju u vagini i od kojih svaki dovodi do određenih simptoma i kliničke slike. Suprotno

ukoliko je samo jedan od patogena odgovoran za simptome onda se prisustvo drugih može ignorisati jer se u takvim slučajevima radi o koinfekciji. Tako autor navodi primer da je malo verovatno da CA uzrokuje neprijatan miris iz vagine, ali da kod takve pacijentkinje kulturom može biti izolovana CA što ne znači da kod takve pacijentkinje treba sprovesti i antimikotičnu terapiju, nego treba lečiti uzrok neprijatnog mirisa koji je najčešće BV ili *Trichomonas vaginalis*. S druge strane pacijentkinja sa BV kod koje kulturom ili molekularnim tehnikama detektujemo prisustvo *C. trachomatis* ili *N. gonorrhoeae* potrebno je lečiti, jer kao što je poznato 2/3 infekcija *C. Trachomatis* protiče bez simptoma. Međutim, jasno je koliko samo podatak da oko 50% pacijentkinja sa BV nema simptome komplikuje pokušaje da razlučimo mešovite infekcije od koinfekcija samo kod pacijentkinja sa BV i CA. Ako tome pridodamo poremećaj vaginalne flore koje je Donders definisao kao aerobni vaginitis i koji se karakteriše mikroskopskim nalazom velikog broja PMN (što je i karakteristika vaginalne kandidoze), a pri tome su vrednosti pH preko 4,5 (što je karakteristika BV) onda su pokušaji da razlučimo mešovitu infekciju od koinfekcije još teži [417, 418]. Po našem mišljenju možda bi korektnija podela bila na endogene i egzogene vaginalne infekcije, mada je sam naziv na neki način zastareo i nerado se navodi u literaturi. Tako bi egzogene infekcije podrazumevale prisustvo mikroorganizama za koje je pokazano da nisu (povremeni ili stalni) članovi vaginalnog mikrobioma i podrazumevali bi infekcije mikroorganizmima kao što su *T. vaginali*, *C. Trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *HSV*, *HPV itd.*, odnosno svi oni mikroorganizmi (bakterije, virusi, gljivice, paraziti) za koje dosadašnje ili buduće molekularnobiološke analize pokažu da ne pripadaju vaginalnom mikrobiomu. S druge strane endogene infekcije nastaju kada dođe do poremećaja u broju i odnosu pojedinih članova u vaginalnom mikrobiomu. tako bi porast u broju nekih komensala kao što je *C. albicans* doveo bi do vaginalne kandidoze, porast u broju *G. vaginalis* i drugih BVAB doveo bi do nastanka BV, a porast broja koka do nastanka aerobnog vaginitisa. Najlakše je to razumeti ukoliko pogledamo grafikone preuzete iz rada Shiptsyne i sar. [179] u kojoj je kvantifikovano prisustvo pojedinih članova vaginalne flore. prvo što treba uočiti da je „spisak“ različitih bakterija gotovo identičan za sva tri navedena poremećaja vaginalne flore, a ono što ih razlikuje jeste odnos laktobacila (na grafikonima crvena, tamno plava i zelena boja) i BVAB (na grafikonima ljubičasta, svetlije nijanse plave i druge boje). Dakle suštinski dolazi samo do promene broja (kvantitativni diverzitet) članova vaginalnog mikrobioma, a svi se oni gotovo uvek mogu detektovati (kvalitativni diverzitet) i kod pacijentkinja sa normalnim nalazom i kod pacijentkinja sa BV. Međutim ono što po našem mišljenju nedostaje ovakvoj jednoj studiji, odnosno krugovima na grafikonima jeste prisustvo i kvantifikacija CA ili broja PMN, bez obzira na činjenicu da je ova studija primarno imala za

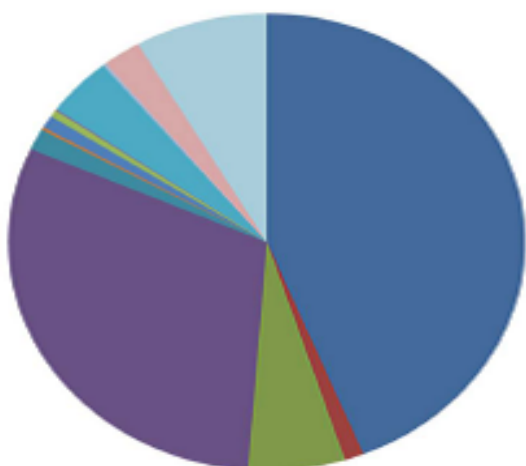
cilj da ispita vrednost molekularnih metoda u dijagnozi BV. U studiju su uključene su 163 žene 90 bez i 73 sa simptomima vaginalnih infekcija i to kako autori navode pojačan sekret, svrab, peckanje i dizurija. Dijagnoza BV postavljena je na osnovu Amselovih dijagnostičkih kriterijuma na osnovu kojih je kod 73 pacijentkinje postavljena dijagnoza BV, 11 je imalo intermedijaran nalaz na osnovu mikroskopskog nalaza nativnog preparata (dakle ne radi se o Nugentovoj intermedijarnoj grupi), a 79 pacijentkinja su bile zdrave. Iako bi neki od pomenutih simptoma govorili u prilog infekciji CA, autori nigde ne navode da li je i kako isključena infekcija CA. S obzirom na rezultate koje smo mi dobili u našem ispitivanju, kao i rezultate epidemioloških studija, smatramo da je nemoguće da bar 10-20% od ove 163 pacijentkinje nije imalo infekciju ili koinfekciju CA, a sličan komentar odnosio bi se i na normalan i patološki broj PMN. S obzirom da rezultati našeg ispitivanja nedvosmisleno ukazuju da je CA u najvećem broju slučajeva uzrok povećanom broju PMN, mislimo da bi svaka buduća studija koja se bavi vaginalnim mikrobiomom morala kao obavezan deo da ima prajmere za detekciju CA i semikvantitativnu procenu broja PMN, jer bi na taj način mogli preciznije da tumačimo dobijene rezultate. Čak i ukoliko nam je cilj da procenimo samo odnos laktobacila i BVAB i ispitamo mogućnost molekularne dijagnoze BV, treba imati u vidu da i neka druga stanja kao što su infekcija trihomonas vaginalisom ili aerobni vaginitis takođe daju isti kvantitativni odnos između laktobacila i BVAB. Dakle sasvim je moguće da na osnovu rezultata molekularnobioloških analiza postavimo dijagnozu BV, a da pacijentkinja ima infekciju trihomonasom ili aerobni vaginitis, a u pomenutom radu nije dakle isključena ni mogućnost postojanja jednog od dva entiteta. Takođe da je u pomenutom radu na primer kvantitativno procenjivan broj PMN i koreliran sa dobijenim rezultatima kvantifikativnog PCR mogli bi da donesemo mnogo pogrešnih zaključaka o uticaju određenih bakterijskih sojeva na broj PMN, zato što nismo isključili prisustvo CA, infekcije trihomonasom ili aerobnog vaginitisa, dakle tri vaginalne infekcije čija je jedna od osnovnih i zajedničkih karakteristika povećan broj PMN. Na kraju, mi smo u ovom radu nekoliko puta naveli podatak da je oko 50% naših pacijentkinja sa BV imalo mešovitu infekciju ili koinfekciju CA. Međutim nismo sigurni da ništa manje nije ispravno da smo rekli suprotno, da je oko 50%

## Kontrole



- Lactobacillus Inners (38,1%)
- Lactobacillus crispatus (43,2%)
- Druge vrste Lactobacillus (5,4%)
- Gardnerella Vaginalis (7,2%)
- Atopobium Vaginae (0,6%)
- Eggerethella (0,001%)
- Prevotella (0,2%)
- BVAB 1 (0,02%)
- BVAB 2 (0,01%)
- Fingulide magna (0,1%)
- Megaspheara tip 1 (0,2%)
- Megaspheara tip 2 (0%)
- Sneathia sanguinalis (0,1%)
- Leptotrichia amnionii (0,1%)
- BVAB TMT (0,002%)
- Mobiluncus (0,002%)
- Druge ne-Lactobacillus vrste (4,8%)

## Intermediarni



- Lactobacillus Inners (38,1%)
- Lactobacillus crispatus (43,2%)
- Druge vrste Lactobacillus (5,4%)
- Gardnerella Vaginalis (7,2%)
- Atopobium Vaginae (0,6%)
- Eggerethella (0,001%)
- Prevotella (0,2%)
- BVAB 1 (0,02%)
- BVAB 2 (0,01%)
- Fingulide magna (0,1%)
- Megaspheara tip 1 (0,2%)
- Megaspheara tip 2 (0%)
- Sneathia sanguinalis (0,1%)
- Leptotrichia amnionii (0,1%)
- BVAB TMT (0,002%)
- Mobiluncus (0,002%)
- Druge ne-Lactobacillus vrste (4,8%)

## BV



- Lactobacillus Inners (38,1%)
- Lactobacillus crispatus (43,2%)
- Druge vrste Lactobacillus (5,4%)
- Gardnerella Vaginalis (7,2%)
- Atopobium Vaginae (0,6%)
- Eggerethella (0,001%)
- Prevotella (0,2%)
- BVAB 1 (0,02%)
- BVAB 2 (0,01%)
- Fingulide magna (0,1%)
- Megaspheara tip 1 (0,2%)
- Megaspheara tip 2 (0%)
- Sneathia sanguinalis (0,1%)
- Leptotrichia amnionii (0,1%)
- BVAB TMT (0,002%)
- Mobiluncus (0,002%)
- Druge ne-Lactobacillus vrste (4,8%)

Slika 3.25: Preuzeto iz rada Shiptysyne i sar. referenca 179

pacijentkinja kod kojih smo mikroskopski detektovali CA imalo i BV. Dakle mi ne znamo šta je u konkretnom slučaju bio okidač za promene u vaginalnoj flori CA ili BVAB. Podsetićemo da smo u ovom ispitivanju pokušali da na osnovu mikroskopskog nalaza semikvantitativno razlikujemo tri oblika infekcije CA i da te rezultate uporedimo sa brojem PMN, i da nismo uspeli da nađemo takvu korelaciju. Pitanje na koje i sada nemamo odgovor jeste da li je u nekim slučajevima gde smo detektovali svega nekoliko spora i hifa gljivica to razlog velikog broja PMN ili su razlozi drugi, a nama za sada nepoznati. Bilo kako bilo modifikacija NP-6G nedvosmisleno je potvrdila da CA i PMN mogu značajno uticati na rezultate koji se odnose na koncentracije ispitivanih citokina. Podatak da je ovakvom podelom, u kojoj je CA osnovni faktor modifikacije, pokazana statistička značajnost za 4 druga citokina, IL-17, IL-4, IL-9 i IL-13, mogli bi povezati sa značajem ovih citokina u etiopatogenetskim zbivanjima vezanim za vaginalnu kandidozu. Na primeru vaginalne kandidoze pokušaćemo da ukažemo na svu komplikovanost odnosa i teškoće u tumačenju dobijenih rezultata kao i na činjenicu da broj i vrsta mikroorganizama nisu faktor koji odlučujuće utiče na koncentracije citokina u cervikalnom sekretu, nego da tu verovatno značajniju ulogu igraju ne samo imunske nego i epitelne ćelije (EĆ) domaćina. Još uvek ni za CA, a ni većinu drugih komensalnih organizama, nemamo objašnjenje kako ih domaćin nekada prepoznaje kao komensale a u drugim uslovima kao patogene, što je verovatno jedno od najvažnijih pitanja u budućim istraživanjima. Dosadašnja istraživanja uglavnom su se bavila odgovorom imunskih ćelija (PMN, makrofaga, dendritskih ćelija itd.) na CA, ali poslednjih godina se sve više ističe značaj EĆ u odbrani od ovog patogena. Prepoznavanje patogena od strane ćelija domaćina dovodi do oslobađanja odgovarajućeg spektra citokina. Dok je za mijeloidne ćelije ovaj spektar relativno dobro proučen i uključuje oslobađanje IL-12, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  zajedno sa drugim proinflamatornim citokinima [419], dok se o ulozi EĆ mnogo manje zna. Ipak možemo reći da inficirane EĆ takođe produkuju proinflamatorne citokine i hemokine [420, 421] kao što su IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-6, G-CSF, GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-8 i druge, ali EĆ ne produkuju IL-12, IFN $\gamma$ , IL-4 ili IL-13. Kakvi su direktni efekti ovih citokina ostaje nejasno, ali se zna da oni deluju na limfoidne i mijeloidne ćelije dovodeći do njihove aktivacije i regrutacije sa ciljem da se poveća njihov broj u mukoznim površinama i tako zaštite od patogena. Veliki značaj PMN u infekciji CA potvrđen je velikim brojem eksperimentalnih i kliničkih podataka na različitim životinjskim modelima i mukoznim površinama, a to su pokazali i rezultati našeg ispitivanja kada je u pitanju broj PMN i detekcija CA [422], i jedan od praktičnih zaključaka našeg ispitivanja je da uvek kada na mikroskopskom preparatu vidimo povećan broj PMN moramo pažljivo i dugo tragati za sporama i hifama gljivica. Studija Fidela i sar.[390] u kojoj je zdravim ženama inokulisana CA



ukazala je na postojanja dva tipa protekcije od CA, jedan asimptomatski u kome ne dolazi do nikakvog inflamatornog odgovora, i drugi simptomatski u kome dolazi do snažnog inflamatornog odgovora koji se primarno odlikuje velikim brojem PMN i klasičnim simptomima zapaljenja, crvenilom, otokom bolom. Ista studija je pokazala da tečnost dobijana lavažom iz vagine simptomatskih pacijentkinja u in vitro uslovima dovodi do migracije PMN, dok migracija PMN izostaje u vaginalnom ispirku asimptomatskih pacijentkinja. U ovoj studiji autori su pokazali da vaginalni pH, faza menstruacionog ciklusa, bakterijska flora u vreme inokulacije, kao ni koncentracija inokulisane CA nisu imali uticaja na razvoj simptomatske ili asimptomatske infekcije, pri čemu se naravno ne može isključiti mogućnost da virulentnost CA zavisi od drugih uslova u vaginalnoj sredini. Kao interesantne autori navode tri pacijentkinje koji su imale kliničke simptome ali ni kulturom ni pregledom mikroskopskog preparata sa 10% KOH nije detektovano prisustvo CA zbog čega u istoj studiji nisu smatrane inficiranim, ali autori ne isključuju mogućnost da se kod određenog broja žena i ovako male i kulturom nedetektabilno prisustvo CA može dovesti do simptoma, a kao drugu mogućnost navode neke druge poremećaje vaginalne flore koji su uzrok simptoma pacijentkinje. Još jedan važan zaključak ove studije jeste da koncentracija patogena sama po sebi nije prediktivna za nastanak infekcije. Ovi rezultati objašnjavaju mikroskopske nalaze pacijentkinja kod kojih smo videli veliki broj PMN, a kod kojih smo detektovali prisustvo malog broja spora ili hifa gljivica, pitajući se da li je moguće da tako mali broj spora bude uzrok tako velikom broju PMN. U ovu grupu svakako spadaju i pacijentkinje sa velikim brojem PMN kod kojih mikroskopski nismo detektovali prisustvo spora ili hifa gljivica, a i one kod kojih smo detektovali spore i hife gljivica, ali kod kojih je broj PMN bio normalan (51/249). Ispitujući razloge zbog kojih ispirak iz vagine simptomatskih pacijentkinja dovodi do hemotaksije PMN, autori navod da CA sama ne uzrokuje hemotaksu PMN, ali naravno ne isključuju mogućnost da interakcija CA i EĆ domaćina može biti razlog migracije PMN. Kod asimptomatske pacijentkinje kod kojih je detektovano prisustvo CA nije dolazilo do infiltracije PMN. Dakle nedvosmisleno je da PMN igraju veoma važnu ulogu kod pacijentkinja sa simptomatskom vaginalnom kandidozom, ali je logično da i drugi faktori kao što su citokini i imunomodulatorne supstance zajedno ili nezavisno od PMN imaju učešća u nastanku zapaljenskog procesa i simptomima pacijentkinja. Zato autori navode i podatke svojih preliminarnih ispitivanjima vaginalne tečnosti pre i posle inokulacije CA i zaključuju da su u vaginalnom ispirku detektovani različiti citokini i imunomodulatori ali da nisu mogli da utvrde ni jedan obrazac koji bi govorio u prilog zaštite ili povećana osetljivosti na infekciju CA, kao ni za BV. Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima koje smo mi dobili u našem ispitivanju a koji se odnose na koncentracije citokina i različite

mikroskopske nalaze vaginalne flore ili broj PMN. Tako je i ova studija potvrdila da broj bakterija i/ili broj PMN ne koreliraju po jednostavnom matematičkom modelu sa koncentracijama citokina ili različitih imunomodulatornih supstanci, nego da su one rezultanta velikog broja faktora od kojih neki indukuju a drugi inhibiraju produkciju određenog citokina. Na osnovu iznesenih činjenica jasno je sa koliko opreznosti i kritičnosti moramo tumačiti rezultate koji se odnose na koncentracije pojedinih citokina u ovakvim ispitivanjima. Ako se sada prisetimo činjenica o kojima smo govorili u uvodu ovog rada a koji se odnose na podatke koji jasno ukazuju kako bakterije u svojoj invaziji napadaju neke ključne odbrambene ćelijske mehanizme sa ciljem da preuzmu potpunu kontrolu nad njima ili da ih isključe iz funkcije. Takođe, meta njihovog napada gotovo nikada nije jedan, nego, više untarćelijskih mehanizama koji predstavljaju za njih potencijalnu opasnost, ali koji bi mogli da počnu da funkcionišu u njihovu korist [423]. Od mnogobrojnih i naučno dobro dokumentovanih “ratnih strategija” koje primenjuju različiti mikroorganizmi ovde ćemo navesti samo one najčešće. Gotovo na svakom delu imenskog odgovora domaćina mikroorganizmi imaju strategiju za izbegavanje imenskog odgovora domaćina, dakle od samog ulaska kada produkuju različite modulatore i toksine, preko modulacije receptora na svojoj površini i uticaja na receptore na imunskim ćelijama domaćina koji prepoznaju patogene, smanjuju ekspresiju MHC I i MHC II molekula, uticaja na antigen prezentujuće ćelije, citotoksične i NK ćelije [424, 425]. Modulacija vezikularnog saobraćaja unutar ćelija domaćina, odnosno strategije stvaranja niša (vakuola) unutar ćelije domaćina koji ih štite od humoralnog imuniteta i ćelijskih imunskih mehanizama. Ove niše neke od bakterija formiraju unutar makrofaga i PMN, koji kao što znamo imaju osnovnu funkciju da ih ubiju [426, 427].

Takođe oni ispoljavaju inhibitorne uticaje na regrutaciju PMN, i njihovu fagocitozu i druge odbrambene funkcije, inhibitorni uticaj na makrofage i funkcije komplementa, uticaj na produkciju proinflammatoryh, antiinflammatoryh citokina i hemokina, blokira inflamatorni i aktivira alternativne puteve, blokira ili pojačava TLR signale ili izbegava prepoznavanje od strane TLR i NOD receptora [428, 429]. Utiče na apoptozu i autofagiju dovodeći do njihove inhibicije ili akceleracije, aktivirajući ili remeteći apoptotične signalne puteve [430, 431]. Odlaganje apoptoze kao što smo pomenuli je jedan od najvažnijih faktora u nastanku hroničnih inflamatornih bolesti (najveći broj autora smatra da PP predstavlja hronični inflamatorni događaj). Zbog toga ćemo u narednom delu diskusije prikazati naše rezultate koji se odnose na vijabilnost i apoptozu PMN u ovom ispitivanju.

### 3.3.3 APOPTOZA I VIJABILNOST VAGINALNIH POLIMORFONUKLEARA

Da bi od blast ćelije nastao zreli neutrofil potrebno je oko 15 dana, dok je njihovo preživljavanje manje od jednog dana (6-18h). Od svih ćelija imunskog sistema neutrofili imaju najkraći vek što proizilazi iz činjenice da u fiziološkim uslovima neutrofili podležu apoptozi. Nove vremenske razlike u „rađanju“ i „umiranju“ PMN leži u činjenici da neutrofili u sebi nose različite supstance koje su neophodne u borbi protiv različitih patogena, ali koje ukoliko se nekontrolisano oslobađaju mogu biti potencijalno opasan po život ili dovesti do različitih oboljenja. Dakle, proces u kojem PMN prirodno prolaze svoj životni ciklus, bez potrebe da se generišu dodatni signali za ćelijsku smrt, ima za cilj da zaštiti domaćina od mogućnosti da veliki broj aktiviranih ćelija perzistira u cirkulaciji u dužem vremenskom periodu. Zbog kratkog poluživota cirkulišućih neutrofila koštana srži mora da oslobodi oko  $5 \times 10^{10}$  neutrofila dnevno potrebnih za efikasnu zaštitu od infekcije. Za razliku od kratkog poluživota cirkulišućih neutrofila, neutrofili regrutovani u tkiva imaju mnogo duži opstanak, jer tamo izbegavaju posledični apoptotični put. Iako ne znamo precizan odgovor na pitanje koliko PMN mogu da prežive u tkivima (nekoliko dana), ono što svakako znamo jeste da to u najvećoj meri zavisi od uslova lokalne sredine, odnosno balansa između proapoptotičnih i antiapoptotičnih faktora i naravno samog patogena. U *in vitro* uslovima PMN mogu preživeti nekoliko dana ukoliko su izloženi npr. proinflamatornim citokinima tako da nije nerazumno da se slično dešava i u *in vivo* uslovima. citokini i mnoge druge supstance mogu dovesti do odlaganja, ali ne i sprečavanja apoptoze PMN. Takvi faktori usporavaju, ali ne sprečavaju apoptozu i neutrofili će konačno postati apoptotični, a naknadno uklonjena sa mesta od strane makrofaga tkiva ili drugih fagocitnih ćelija. Čitav ovaj aktivni i stoga kontrolisani proces kontrolisane smrti i uklanjanja neutrofila naziva se rezolucija inflamacije i predstavlja jedan od najvažnijih homeostatskih mehanizama. Apoptotični neutrofili nemaju sposobnost hemotaksija, degranulacije, adherencija, fagocitoza ili aktivacija respiratornog praska, a ekspresija mnogih površinskih ćelijskih receptora značajno je smanjena. Na ovaj način plazmatska membrana ostaje netaknuta i deluje kao propustljiva barijera sprečavajući izlazak potencijalno opasnih sadržaja iz neutrofila, dok u slučaju nekroze dolazi do rupture plazmatske membrane, oslobađanja sadržaja i oštećenja lokalnog tkiva. Dakle, apoptoza neutrofila praćena njihovom fagocitozom od strane makrofaga i fibroblasta osigurava mehanizam za bezbedno uklanjanje neutrofila sa mesta upale čime se umanjuje rizik od oštećenja tkiva. U uslovima infekcije dolazi do povećanog broja PMN, ali i ometanja normalnog apoptotičnog puta sa ciljem da se produži preživljavanje PMN i tako efikasnije savlada infekcija. Zbog toga je jedan od ciljeva ovog ispitivanja bio da

proverimo u kakvom su odnosu ukupan broj vaginalnih PMN određivan kvantitativnim i semikvantitativnim metodama u odnosu na njihovu vijabilnost i apoptozu.

Odmah na početku ukazaćemo na veoma bitne metodološke razlike koja ne smemo zaboraviti kada se analiziraju rezultati koji se odnose na broj i apoptozu vaginalnih PMN. Tako smo za kvantifikativnu metodu A (QPMN-A) uzorak dobijali posle ispiranja vagine sa oko 20 ml fiziološkog rastvora, dok je za kvantitativnu metodu B (QPMN-B) uziman bris sa bočnog vaginalnog zida i stavljan u 1 ml fiziološkog rastvora, dok je za semikvantitativne metode uzorak uziman sa bočnog vaginalnog zida razmazivan na mikroskopsku pločicu i bojen po Gramu. Dakle u prvom slučaju uzorak je uziman sa mnogo veće površine, a s druge strane i deo PMN iz grlića materice verovatno ulazi u ukupna broj PMN. Ako opet znamo da su pojedini autori našli značajno različit broj PMN u uzorcima iz intoitusa, sredine ili forniksa vagine onda je jasno koliko ove metodološke razlike mogu bitno uticati na rezultate ispitivanja. S obzirom da su vijabilnost i apoptoza PMN određivani iz uzorka koji je dobijen ispiranjem vagine, logično je bilo da najbolje rezultate. Čelije su brojane u 1% rastvoru Turka, a ukupan broj vijabilnih ćelija je određen pomoću rastvora Tripan plavog. Iz Tabele 3.10 se vidi da je postala izrazito velika heterogenost u broju kako ukupnih tako i vijabilnih polimorfonukleara, koja je jednim delom verovatno uzrokovana i samom metodologijom. Naime, jasno je da u vaginu možemo ubaciti tačnu količinu fiziološkog rastvora, ali je takođe jasno da količina aspiriranog sadržaja ne može biti ista za sve pacijentkinje, kao i da to može uticati na konačan broj PMN.

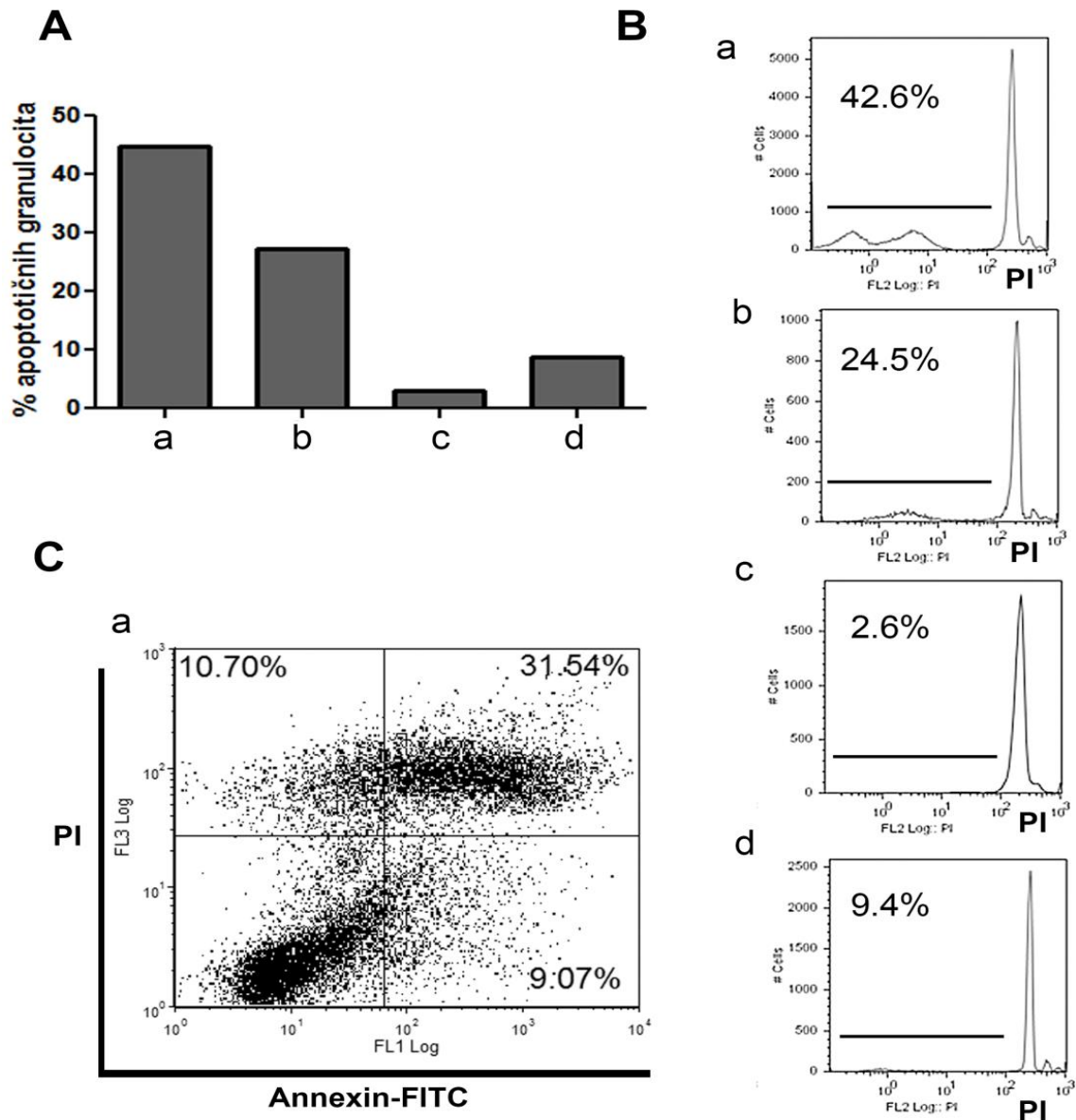
**Tabela 3.10: Vrednosti ukupnog broja PMN i broja vijabilnih PMN u vaginalnom ispirku trudnica**

	n	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Min	Max
<b>ukupan broj PMN (x 10<sup>6</sup>)</b>	217	41.8	160.2	0.2	1770.0
<b>ukupan broj vijabilnih PMN (x 10<sup>6</sup>)</b>	217	39.2	153.2	0.2	1725.8

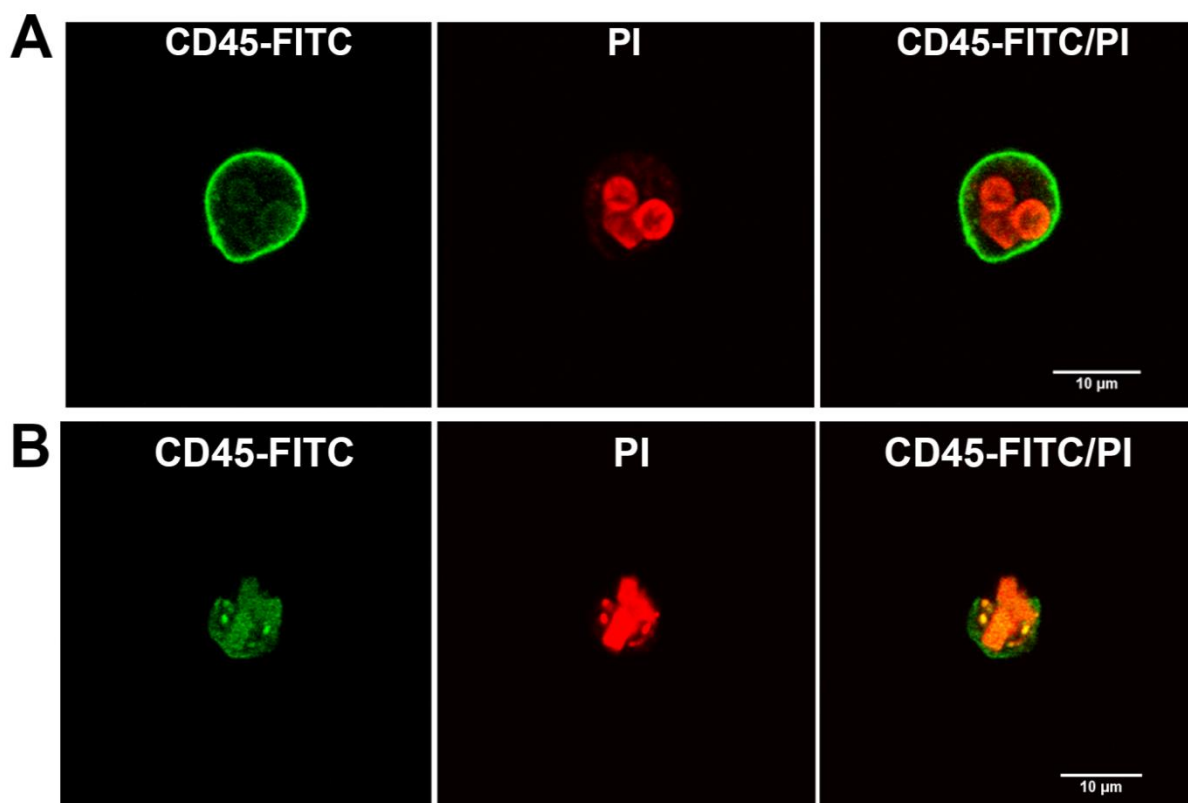
U okviru ispitivanja apoptoze vaginalnih polimorfonukleara, prvi cilj je bio uvođenje najjednostavnije i najpouzdanije metode za detekciju i kvantifikaciju apoptoze. Primenjene su sledeće metode: morfološka analiza ćelija u suspenziji nakon bojenja 1% rastvorom Turka, detekcija ćelija sa hipodiploidnim jedrima nakon bojenja permeabilizovanih ćelija sa propidijum jodidom i dodatnom morfološkom analizom na konfoklanom mikroskopu, detekcija apoptotičnih / sekundarno nekrotičnih ćelija nakon bojenja sa Aneksin-FITC-om i propidijum jodidom. Rezultati ispitivanja su prikazani na Grafikonu 3.34 i Slici 3.26.

Sve tri metode su pokazale veoma kompatibilne rezultate. Ukupan procenat apoptotičnih ćelija je bio nešto veći primenom Aneksin-FITC/propidijum jodid metode, a ukupan procenat

apoptoze nešto manji primenom hipodiploidnog kriterijuma, u odnosu na morfološku metodu. Zbog toga je u narednom ispitivanju morfološka metoda odabrana kao pouzdana, najjeftinija i najpouzdanija za kvantifikaciju apoptoze.



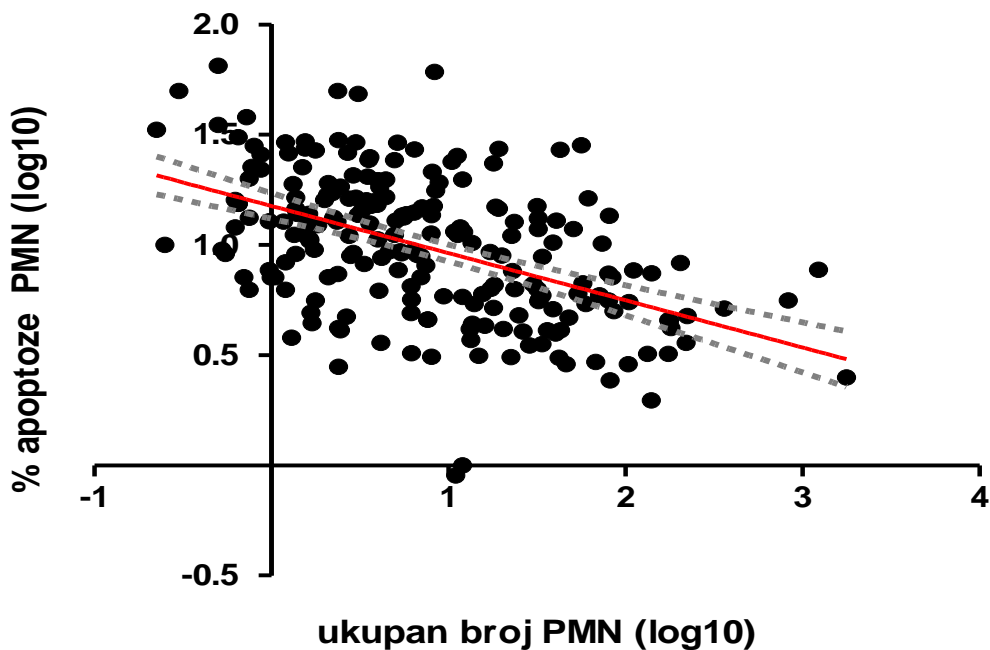
**Grafikon 3.34: Metode proučavanja apoptoze vaginalnih PMF. A) Prikaz rezultata morfološke analize apoptoze PMF obojenih 1% Turk-a za četiri različita uzorka (a-d). Procenti apoptotičnih PMF su dobijeni an osnovu najmanje 500 ćelija iz svakog uzorka. B) Prikaz rezultata apoptoze dobijene analizom hipodiploidnog nukleusa pomoću protočne citometrije za ista 4 uzorka (a-d). C) Reprezentativan tačkasti dijagram iz analize apoptoze PMF obojenih Aneksin/FITC-PI metode, na protočnoj citometriji**



**Slika 3.26:** Analiza apoptoze vaginalnih PMF pomoću konfoklane mikroskopije. PMF dobijeni iz vaginalnih ispiraka su sakupljeni i obojeni pomoću direktno konjugovanog antitela anti-CD45-FITC kako je opisano u poglavlju Materijal i Metode. Nakon toga, jedro ćelija je obojeno pomoću propidijum jodida, nakon čega je analiziran morfološki izgled A) Vijabilnih PMF i B) apoptotičnih PMF.

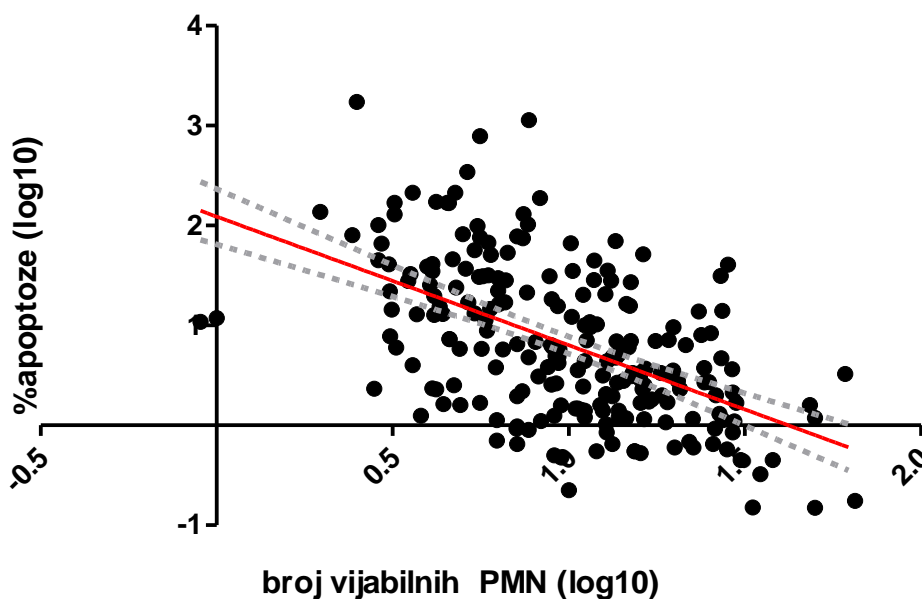
Morfološkom metodom je pokazano da je od ukupno analiziranih 217 uzoraka procenat apoptoze iznosio  $12.7\% \pm 10.1$  (opseg 0-65).

S obzirom da najbolju korelaciju očekujemo između ukupnog broja vaginalnih polimorfonukleara na osnovu QPMN-A i procenta apoptoze ovih ćelija ove rezultate ćemo detaljnije prikazati. U statističkoj analizi korišćen je Spermanov koeficijent korelacije i kako je to prikazano u Grafikonu uočava se statistički značajna negativna korelacija ( $r = -0.493$ ;  $p < 0.001$ ) između broja PMN određivanog QPMN-A i procenta apoptoze PMN.



Grafikon 3.35: Korelacija između ukupnog broja vaginalnih polimorfonukleara (PMN) i procenta apoptoze ovih ćelija. Netransformisani podaci su korelirani pomoću Spearman-ovog testa, a na grafiku su predstavljeni u logaritamskim odnosima (log10) radi jasnijeg uočavanja fenomena.

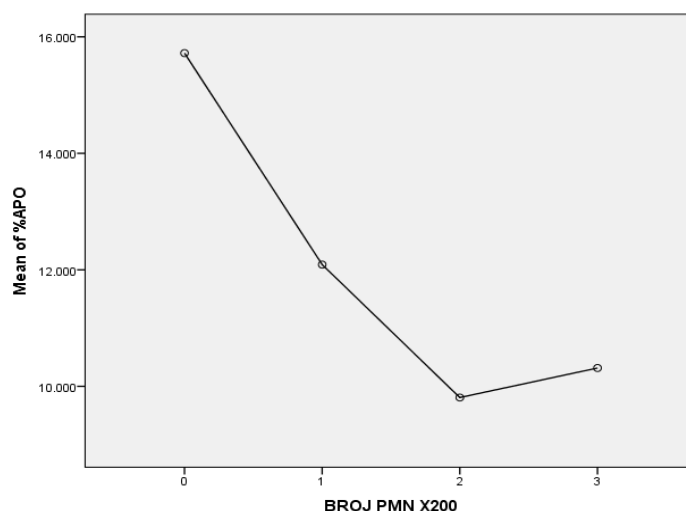
Još izraženija negativna korelacija je dobijena kada je upoređivan ukupan broj vijabilnih vaginalnih polimorfonukleara sa stepenom apoptoze ovih ćelija ( $r=-0.5378$ ,  $p<0.001$ ) (Grafikon 3.36).



Grafikon 3.36: Korelacija između broja vijabilnih vaginalnih polimorfonukleara (PMN) i procenta apoptoze ovih ćelija. Netransformisani podaci su korelirani pomoću Spearman-ovog testa, a na grafiku su predstavljeni u logaritamskim odnosima (log10) radi jasnijeg uočavanja fenomena.

U Tabeli 3.8 su zbirno prikazani rezultati koji se odnose i na drugu kvantitativnu metodu (QPMN-B) kao i za tri semikvantitativne metode na različitim mikroskopskim uvećanjima. Iz tabele se jasno vidi da je naša pretpostavka potvrđena i da su najbolji rezultati dobijeni za QPMN-A. Međutim, ono što nam se čini značajnim jeste podatak koji se odnosi na broj PMN i druge metode određivanja PMN koje smo koristili u ovom ispitivanju. Tako druga kvantitativna metoda QPMN-B nije pokazala statističku značajnost ( $p=155$ ) u odnosu na stepen apoptoze vaginalnih PMN. Rezultati dobijeni za tri semikvantitativne metode na različitim mikroskopskim uvećanjima samo potvrđuju našu pretpostavku pregledom veće površine mikroskopskog preparata (manje uvećanje) preciznije procenjujemo broj PMN. Tako na uvećanju x1000 nije nađena značajnost ( $p>0,05$ ) između broja PMN i stepena apoptoze, na uvećanju x 400 nađena je statistička značajnost ( $p=0,033$ ) ali slabija u odnosu na onu koja je nađena na uvećanju X200 ( $p=0,001$ ). Na osnovu ovih rezultata mogli bi smo zaključiti da mikroskopsko određivanje broja PMN na uvećanju X100 predstavlja bolju i precizniju metodu u određivanju broja PMN u odnosu na QPMN-B, i semikvantitativne metode na uvećanjima x200 i X400 ukoliko u konkretnom slučaju QPMN-A i procenat apoptoze shvatimo kao „zlatni standard“ .

Odnos broja PMN i stepena apoptoze vaginalnih PMN ispitivali smo i primenom još dva statistička testa ANOVE i t-testa. Primenom ANOVA i Tamhaneov *post hoc* test pokazali su da postoji statistički značajna razlika ( $p<0,05$ ) između stepena apoptoze i semikvantitativnog određivanja broja PMN uvećanju x200, x400 i x1000, a Tamhaneov *post hoc* analizom utvrđeno je da za stepen apoptoze postoji značajna razlika između grupe PMN0 i



**Slika 3.27: Procenat apoptoze u odnosu na broj PMN na uvećanju x200**

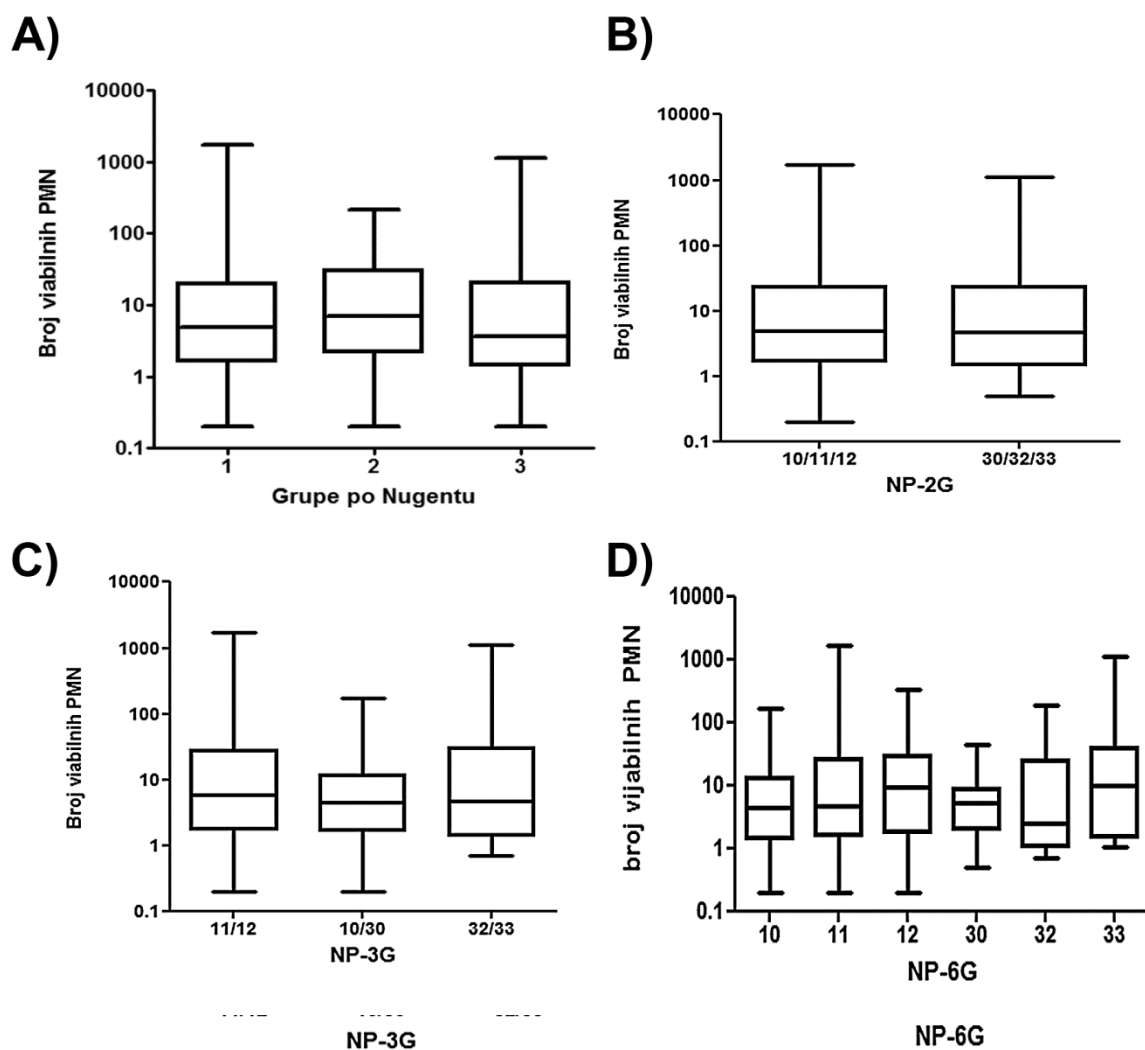


PMN2 (uvećanja x200 i x1000) i PMN0 i PMN3 (uvećanje x400) ( $p < 0,05$ ). Trudnice sa manjim brojem PMN imale su veći procenat apoptoze.

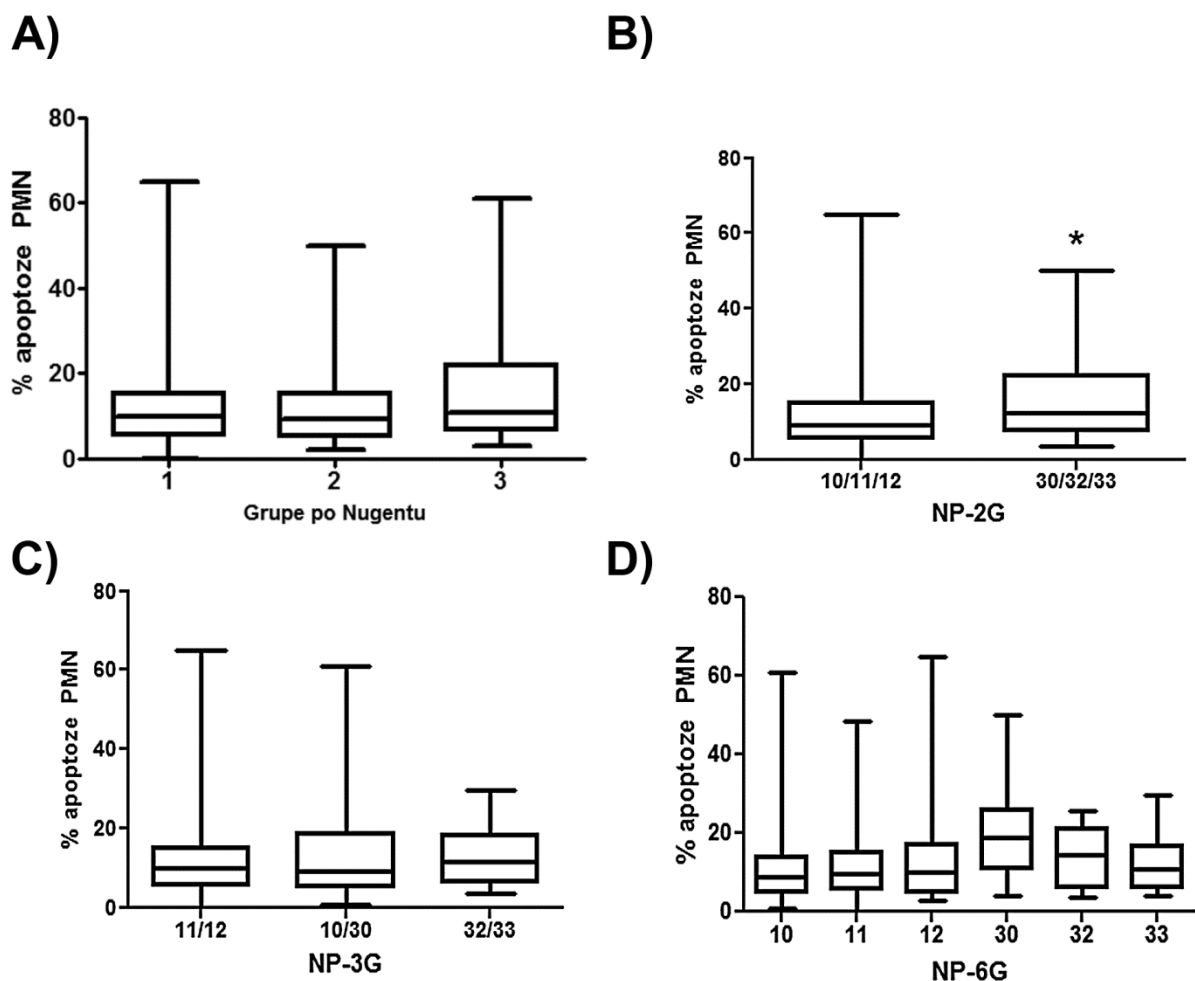
Kao što je prethodno objašnjeno, trudnice iz grupa PMN0 i PMN1 su trudnice sa normalnim brojem PMN (grupa PMN0+PMN1), dok su trudnice PMN2 i PMN3 s patološkim brojem PMN (grupa PMN2+PMN3). Ovakvom podelom trudnica u dve grupe (zdrave/bolesne) na osnovu semikvantitativnog nalaza na različitim mikroskopskim uvećanjima ispitivali smo da li postoji statistički značajna razlika u odnosu na stepen apoptoze i kvantitativno određivanje broja PMN ( $t$ -test, Levantovo test). Pregledom mikroskopskog preparata na uvećanju X1000 i X400 nađena je statistička značajnost samo u odnosu na QPMN-B ( $p = 0,005$ ), ali ne i za QPMN-Q i stepen apoptoze vaginalnih PMN. Određivanje broja PMN na uvećanju X200 dalo je statističku značajnost u odnosu na procenata apoptoze ( $p = 0,005$ ), QPMN-A ( $p = 0,036$ ) i QPMN-B ( $p = 0,001$ ). Ovi rezultati su još jedna indirektna potvrda da određivanje broja PMN na uvećanju x200 daje mnogo bolje rezultate u odnosu na uvećanja X400 i X1000. I ovim statističkim postupkom pokazano je da su pacijentkinje sa manjim brojem PMN (zdrave) imale su veći stepen apoptoze ( $13,78 \pm 10,86$ ) u odnosu na pacijentkinje sa patološkim brojem PMN ( $10,02 \pm 7,95$ ). Tri različita statistika postupka potvrdila su da su pacijentkinje sa većim brojem PMN imale manji procenat apoptoze što je u skladu sa poznatim činjenicama da u uslovima infekcije/zapaljenja dolazi ne samo do povećanja broja PMN nego i produženja njihovog životnog veka. Ipak ne smemo zaboraviti da su u ovakvoj statističkoj analizi podataka PMN posmatrani kao izdvojen parametar, a ukoliko pogledamo kako su oni bili distribuirani po različitim grupama onda možemo videti da smo patološki i normalan broj PMN nalazili u svakoj od 6 pomenutih „pozadina“ (NF, NM, NN, BVF, BVM, BVN). U prethodnoj diskusiji kako se uvođenjem samo jednog konfundirajućeg faktora kao što je CA ti odnosi bitno menjaju, a i pokazali smo kako modifikacija sa CA NP-6G može značajno uticati na nalaze. takođe smo ukazali i na mogući značaj i uticaj drugih ometajućih faktora u ovom ispitivanju (KOKE, LEPTO, BIFIDO) koje ne samo mogu uticati na broj PMN nego i na njihov vek. Poznato je da na apoptozu mogu da utiču mnogobrojni faktori, od kojih svakako i sami patogeni, a i komnsali, igraju značajnu ulogu. Zato je odgovor na pitanje šta je uzrok povećanom broju PMN i smanjenom procentu apoptoze uvek dubiozan. Tako je veoma teško reći da li su na ovakvu povezanost (veći broj PMN → smanjena apoptoza PMN) uticale trudnice sa povećanim brojem PMN i normalnim nalazom vaginalne flore (leukoreja) ili one sa povećanim brojem PMN i patološkim nalazom vaginalne flore (BV, BV+CA), i da li su i koliki uticaj imali KOKE, LEPTO i BIFIDO forme. Kao što smo rekli mi u našem ispitivanju PMN ipak posmatramo kao posledični sekundarni događaj zbog čega smo i diskusiju ovoga rada počeli sa poremećajima vaginalne flore i raznim

ometajućim faktorima koji bi u manjoj ili većoj meri trebali da budu uzrok povećanom, patološkom broju PMN. U prethodnoj diskusiji ukazali smo na postojanje najmanje tri biološke mreže (mikrobne, citokinske i apoptotske) koje nikako ne smeju biti zaboravljene kada se analiziraju i rezultati koji se odnose na broj PMN i vijabilnost i apoptozu PMN. Zbog toga ćemo pre detaljnije diskusije u kojoj ćemo pokušati da dovedemo u vezu pojedine faktore iz svake od ove tri mreže prikazati rezultate koji se odnose na eventualnu povezanost vijabilnosti i apoptozu vaginalnih PMN sa različitim stanjima vaginalne flore, kao i rezultatima dobijenim na osnovu različitih podela.

Primenom Kruskal–Wallis testa i *post hoc* analize (Mann–Whitney U test; Tabela 2, Prilog 2) utvrđeno je da u podeli po Ison/Hayu postoji statistički značajna razlika između grupe *Normalan* i grupe *Čist nalaz* ( $p=0,013$ ), grupe *Intermed* i grupe *Čist nalaz* ( $p=0,019$ ) i grupe *Čist nalaz* i grupe *Koke* ( $p=0,006$ ) u odnosu na procenat apoptoze. Kod podele po Claeysu *post hoc* analizom (Mann–Whitney U test; Tabela 3, Prilog 2) utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između grupe *Normalan* i grupe *Čist nalaz* ( $p=0,013$ ), grupe *Intermed* i grupe *Čist nalaz* ( $p=0,019$ ) i grupe *Čist nalaz* i grupe *Koke* ( $p=0,006$ ) u odnosu na procenat apoptoze. Takva značajnost nije nađena kod podela na osnovu Nugentovih kriterijuma, kao ni kod NP-6G ili NP-3G, ali je nađena na osnovu NP-2G (Grafikoni 3.37 i 3.38) čime smo još jednom ukazali na da različiti dijagnostički kriterijumi mogu da bitno utiču na dobijene rezultate.



**Grafikon 3.37: Poređenje ukupnog broja polimorfonukleara (PMN) u uzorcima vaginalnih ispiraka između grupa formiranih prema citološko-mikrobiološkim parametrima po A) Nungentu, B) NP-2G, C) NP-3G i D) NP-6G. Brojevi ćelija su prikazani na Y logaritamskoj skali (log10). Rezultati su predstavljani kao medijane unutar kutija koje sadrže 95% podataka, sa minimalnim i maksimalnim vrednostima (greške). U analizi je korišćen Kruskal Willis-ov test sa Dunnet- posttestom (A, C i D) ili Mann-Withney test (B).**



**Grafikon 3.38: Poređenje procenta apoptotičnih polimorfonukleara (PMN) u uzorcima vaginalnih ispiraka između citološko-mikrobioloških grupa formiranih po A) Nugentu, B) NP-2G, C) NP-3G i D) NP-6G. Brojevi ćelija su prikazani na Y linearnoj skali. Rezultati su predstavljani kao medijane unutar kutija koje sadrže 95% podataka, sa minimalnim i maksimalnim vrednostima (greške). U analizi je korišćen Kruskal Willis-ov test sa Dunnet- posttestom (A, C i D) ili Mann-Withney test (B).  $p < 0.05$**

Primenom drugog statističkog testa (ANOVA i post hoc Tamhane) značajnost u odnosu na procenat apoptoze nađena je samo u jednoj grupi pacijentkinja, odnosno samo u podeli u kojoj su pacijentkinje sa BIFIDO formama bile izdvojene u posebnu grupu (BIFIDO), gde je procenat apoptoze u grupi BIFIDO bio značajno niži ( $p < 0,001$ ) u odnosu na pacijentkinje sa normalnim nalazom i BV, a ta statistička značajnost nije postojala između grupe sa normalnim nalazom i BV (Tabela 3.11 i 3.12 i Grafikoni 3.39 i 3.40).

**Tabela 3.11: Srednje vrednosti procenta apoptoze na osnovu NP-3G u grupi pacijentkinja sa BIFIDO formama**

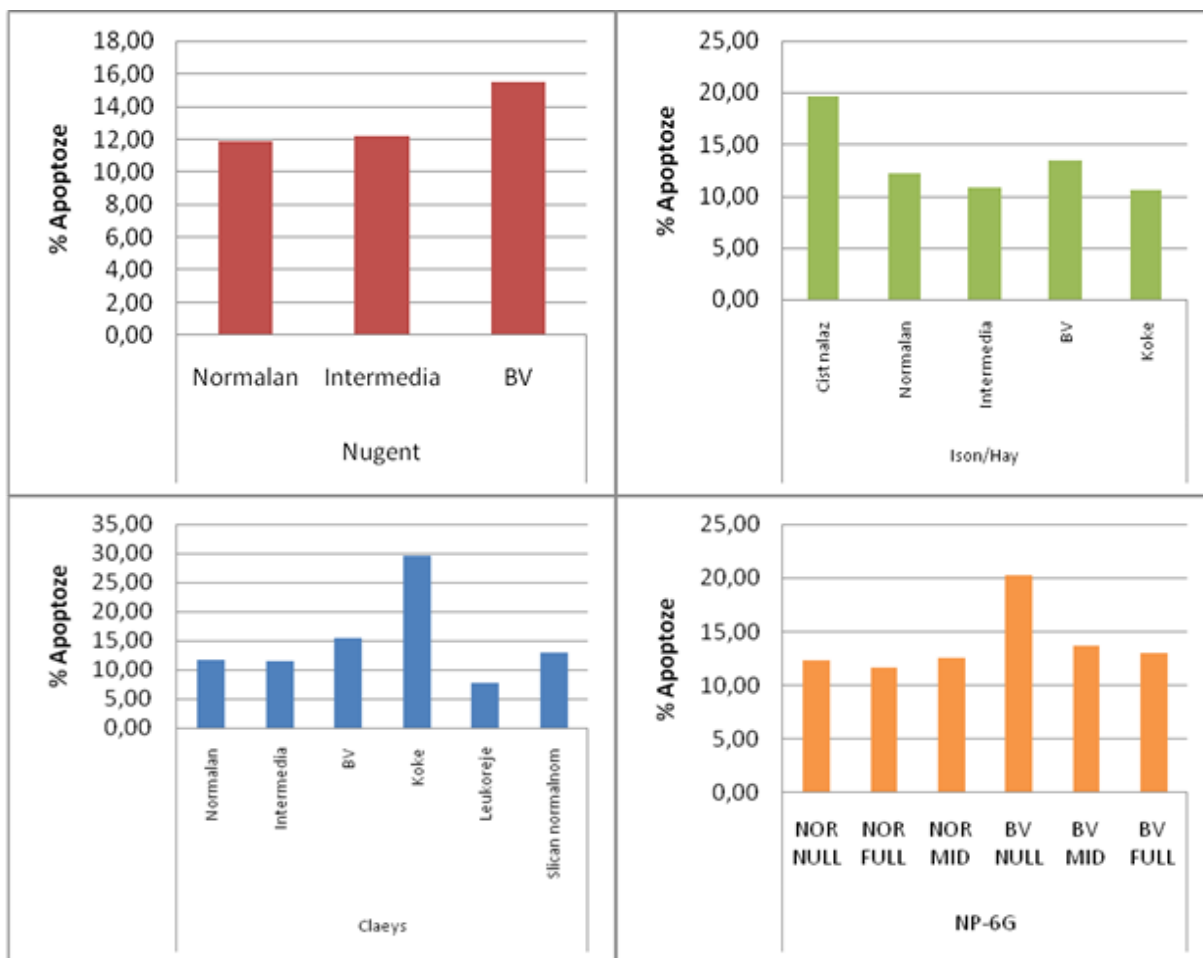
%APO	n	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška	95% interval poverenja	
					Donja granica	Gornja granica
<b>NOR</b>	161	12,70	10,39	0,82	11,08	14,31
<b>BV</b>	33	15,74	10,26	1,78	12,10	19,38
<b>BIFIDO</b>	23	7,30	5,60	1,17	4,88	9,72
<b>Ukupno</b>	217	12,59	10,16	0,70	11,23	13,95

**Tabela 3.12: Statistička obrada podataka (ANOVA, post hoc Tamhaneov test)**

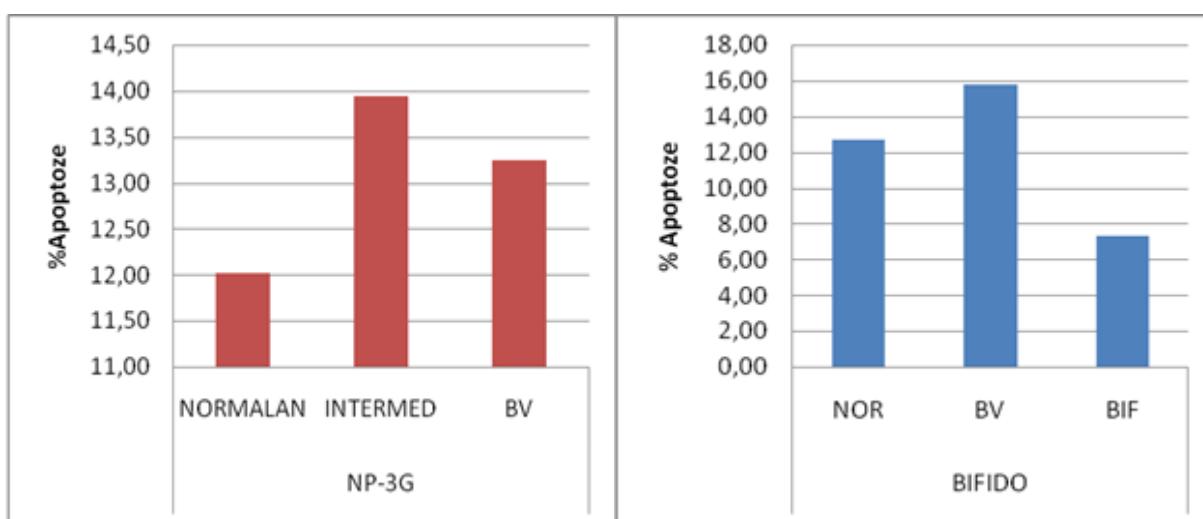
Procenat Apoptoze		Razlika srednjih vrednosti	Standardna greška	P	95% interval poverenja	
					Donja granica	Gornja granica
<b>NOR</b>	<b>BV</b>	-3,05	1,96	0,336	-7,91	1,82
	<b>BIF</b>	5,40	1,43	<b>0,001</b>	1,86	8,93
<b>BV</b>	<b>NOR</b>	3,05	1,96	0,336	-1,82	7,91
	<b>BIF</b>	8,44*	2,13	<b>0,001</b>	3,17	13,71
<b>BIF</b>	<b>NOR</b>	-5,40	1,43	<b>0,001</b>	-8,93	-1,86
	<b>BV</b>	-8,44	2,13	<b>0,001</b>	-13,71	-3,17

Ovi rezultati objašnjavaju zašto insistiramo na značaju dijagnostičkih kriterijuma i drugih bakterijskih morfotipova, ili kako smo ih nazvali u našem ispitivanju ometajućih faktora, u proceni stanja vaginalne flore i povezanosti sa drugim parametrima. Ako se prisetimo da pacijentkinje sa BIFIDO ne „prepoznaju“ ni dijagnostički kriterijumi po Amselu ni dijagnostički kriterijumi po Nugentu, i ako znamo da su ovi kriterijumi kao klinički ili istraživački zlatni standard ugrađeni u metodologiju preko 99% dosadašnjih ispitivanja, onda je jasno koliko bi se rezultati budućih ispitivanja mogli razlikovati uvođenjem samo jednog ometajućeg faktora. Ili, s obzirom na morfološke, ili bolje rečeno mikroskopske karakteristike BIFIDO formi i činjenicu da su one i u našem ispitivanju na osnovu mikroskopskog pregleda nativnog preparat na uvećanju x400 tumačene kao štapićaste forme (laktobacili) i svrstavane u grupu zdravih, mi bi smo zaključili da nismo našli statistički značajnu povezanost između pacijentkinja sa BV i normalnim nalazom i procenta apoptoze vaginalnih PMN. Isti zaključak doneli bi i na osnovu podele po Nugentu koja takođe ne uključuje ovaj bakterijski morfotip i

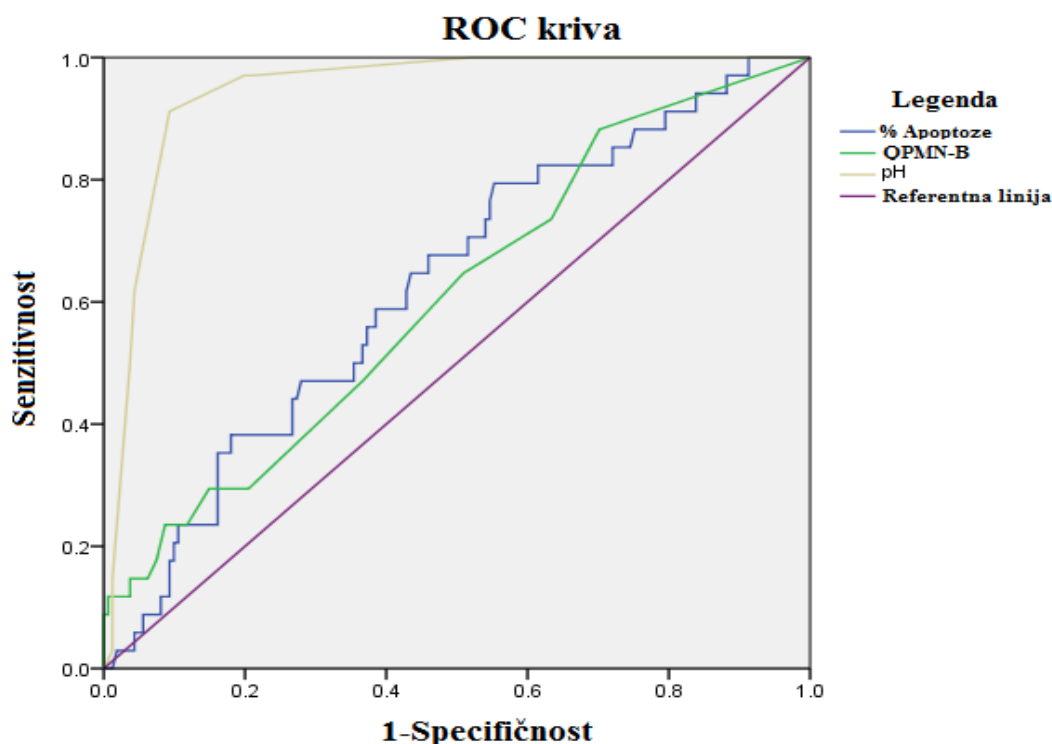
koji je u najvećem broju ispitivanja protumačen kao neki soj laktobacila (gram pozitivne štapićaste forme).



Grafikon 3.39: Distribucija srednjih vrednosti % Apoptoze u odnosu na Nugent, Ison/Hay, Claey's i NP-6G



Grafikon 3.40: Distribucija srednjih vrednosti % Apoptoze u odnosu na NP-3G i BIFIDO



**Grafikon 3.41: ROC kriva za % apoptoze, QPMN-B i pH**

Analizom ROC krive (prvih 217 pacijentkinja) ispitivali smo senzitivnost i specifičnost različitih parametara u odnosu na mikroskopski dijagnostikovano stanje vaginalne flore pa tako i procenta apoptoze. Analiza ROC krive rađena je na osnovu NP-6G, tako da površinu iznad referentne linije predstavljaju pacijentkinje sa BV (VBF+BVM+BVN), a površinu ispod referentne linije pacijentkinje sa normalnim nalazom (NF+NM+NN). Metod određivanja procenata apoptoze ima senzitivnost 82,4%, a specifičnost 38,5% za graničnu vrednost 6,66, dok je za graničnu vrednost 11,4 senzitivnost 58,8%, a specifičnost 61,6% (za izračunavanje ovih vrednosti korišćen je *P/N ratio*).

**Tabela 3.13: ROC kriva - tabelarni prikaz parametara koji su dali statističku značajnost  $p < 0.05$**

Test	Površina ispod krive	Standardna greška	Nivo značajnosti (p)	95% granica pouzdanosti CI	
				Minimum	Maksimum
%Apoptoze	0,627	0,051	0,020	0,527	0,727
qPMN-B	0,608	0,053	0,049	0,504	0,711
pH	0,945	0,017	0,000	0,912	0,979

Dakle na osnovu rezultata ROC krive možemo zaključiti da su pacijentkinje sa BV imale povećan procenat apoptoze, odnosno da bi povećan procenat apoptoze mogao ukazivati na BV. Međutim, poznato je da je jedna od osnovnih karakteristika BV odsustvo PMN, zbog čega je

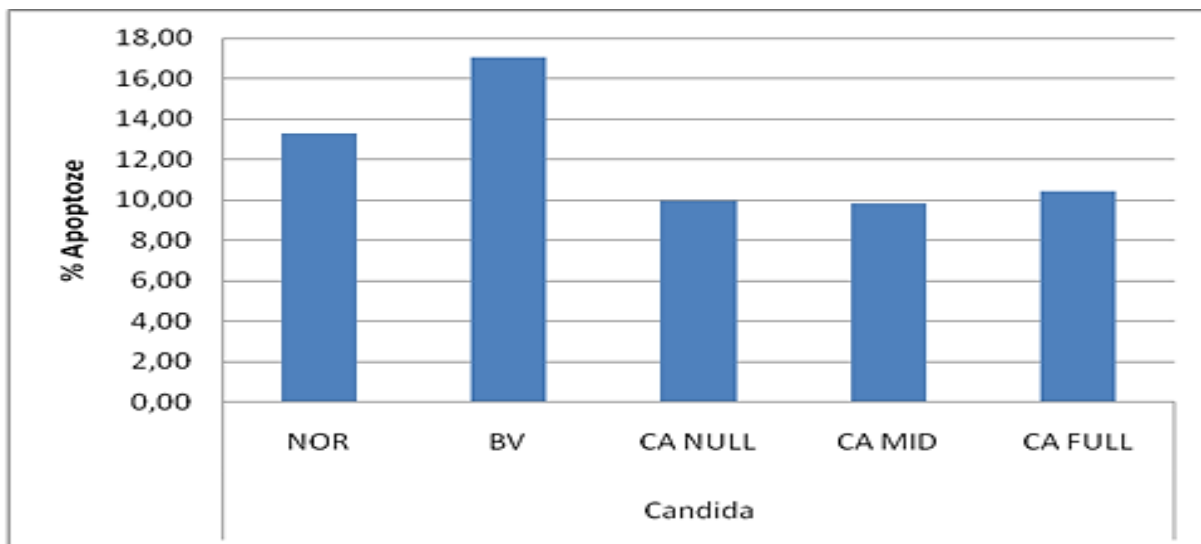
ova polimikrobna infekcija i dobila ime vaginoza, a ne vaginitis. U prethodnoj diskusiji smo pokazali da pacijentkinje sa manjim brojem PMN imaju povećan procenat apoptoze tako da bi se i ovo uklapalo u nalaze koje smo dobili. Činjenicu da je gotovo polovina naših pacijentkinja sa BV imala povećan patološki broj PMN i infekciju, koinfekciju ili kolonizaciju CA mogli bi smo iskoristiti kao razlog za malu površinu ispod ROC krive za procenat apoptoze. Međutim, brojne studije su pokazale da različite bakterije, a posebno anaerobi, produkuju velike količine MKKL. Kako BV karakteriše enorman porast različitih anaerobnih bakterija ova polimikrobna infekcija često se navodi kao primer infekcije u kojoj su koncentracije MKKL značajno veće u odnosu na zdravu populaciju [237, 432]. Poznato je da ove kiseline utiču na veliki broj imunskih procesa, ali uopšteno bi mogli reći da deluju antiinflamatorno. U najvećem broju slučajeva oni svoje antiinflamatorne efekte ostvaruju tako što dovode do supresije NF- $\kappa$ B signala i tako smanjuju proizvodnju proinflamatornih citokina. To ima negativne učinke na migraciju i fagocitozu PMN i istovremeno olakšava njihovu apoptozu [433-435]. MKKL imaju i snažan uticaj na mnoge funkcije PMN, a posebno hemotaksu i fagocitozu. Veruje se da su povećane koncentracije MKKL jedan od najvažnijih faktora (inhibicija hemotakse) zbog kojih pacijentkinje sa BV nemaju povećan broj PMN. Ovim mehanizmom bakterije izbegavaju rani kontakt sa PMN, i ako ovakva inhibicija traje dovoljno dugo, dolazi do uslova za rast i razmnožavanje velikog broja anaeroba (BVAB) i nastanka masivne polimikrobne infekcije kakva je BV. Takođe je pokazano da MKKL indukuju apoptozu različitih ćelija uključujući PMN [433-438]. Na osnovu ovoga mogli bismo da očekujemo da pacijentkinje sa BV imaju povećan indeks apoptoze i da je to uzrokovano, između ostalog, povećanim koncentracijama MKKL, što su potvrdili rezultati našeg ispitivanja (ROC kriva za apoptozu). S druge strane, pacijentkinje sa predominacijom laktobacilarne flore imaju niske koncentracije ovih kiselina što bi značilo da je u takvim uslovim indeks apoptoze manji. Međutim, drugi autori su pokazali da laktobacili imaju proapoptogeni efekat, odnosno da dovode do povećane apoptoze PMN [439]. Kako BV predstavlja stanje u kome je broj laktobacila drastično smanjen, to bi generalno trebalo da ima suprotan efekat na apoptozu PMN od onoga koje imaju povećane koncentracije MKKL. Tako bi stepen apoptoze kod pacijentkinja sa BV bio zavisen od snage i trajanja proapoptogenih uticaja zbog povećanih koncentracija MKKL i antiapoptogenih uticaja zbog nedostatka laktobacila. Takođe, kod pacijentkinja sa BV dolazi do povećanog oslobađanja različitih bakterijskih produkata (LPS) i povećanih koncentracija zapaljenjskih citokina što takođe dovodi do produženja životnog veka PMN. Međutim, u ovom ispitivanju nisu nađene nikakve direktne korelacije između procenta apoptoze i 13 ispitivanih citokina. Takođe, za nijedan od ovih citokina nije utvrđena statistički značajna povezanost sa brojem PMN. Pri tome



ne treba naravno zaboraviti da svaki od mikroorganizama može imati “svoje” (različite) efekte na apoptozu PMN.

Studiju koja najbolje govori o ovim dilemama, a koja je uporediva sa rezultatima koje smo mi dobili objavili su Beghini i sar [440]. U ovu studiju uključeno je 48 pacijentkinja sa normalnim nalazom, 40 sa CA, 32 sa BV i 12 pacijentkinja sa BV+CA. Dijagnoza BV postavljena je na osnovu Amselovih i Nugentovih dijagnostičkih kriterijuma, a detekcija CA na osnovu mikroskopskog pregleda i/ili izolacije CA kulturom na Sabouraudovoj podlozi. Cilj studije je bio da se uporedi ekspresija CD16 na vaginalnim PMN zdravih pacijentkinja i pacijentkinja sa vaginalnim infekcijama, pri čemu je ekspresija CD16 istovremeno bila i marker apoptoze. Dransfield i sar. su još 1994. pokazali da je apoptoza neutrofila udružena sa smanjenom ekspresijom CD16, što su kasnije potvrdili i drugi autori [441-443]. Beghini i sar [440] su pokazali da pacijentkinje sa infekcijom CA imaju značajno veći broj PMN u odnosu na druge grupe pacijentkinja, kao i u našem ispitivanju gde je od 239 pacijentkinja sa CA njih 187 (78,2%; 122+65) imalo patološki broj PMN, dok su 52 (21,8%; 35+17) pacijentkinje sa CA imale normalan broj PMN. Isti autori su pokazali da je ekspresija CD16 na vaginalnim PMN pacijentkinja sa BV i CA značajno veća u odnosu na zdrave, kao i da su pacijentkinje sa BV imale značajno veću ekspresiju CD16 u odnosu na pacijentkinje sa CA. Pacijentkinje sa BV+CA imale su značajno veću ekspresiju u odnosu na normalne i pacijentkinje sa CA. Mada u ovom ispitivanju nismo dobili statističku značajnost, prikazaćemo grafikon naše podele NP-2G/CA iz koga se vidi da rezultati koje bi dobili ne bi bili u saglasnosti sa analiziranom studijom i pacijentkinje kod kojih smo mikroskopom semikvantitativno detektovali CA imale su najmanje srednje vrednosti, a one sa BV najveće srednje vrednosti procenta apoptoze.

Pojačana ekspresija CD16, u skladu sa prethodno navedenim, može se između ostalog objasniti pojačanom aktivnošću i smanjenom apoptozom PMN kod ovih pacijentkinja [440]. Dakle pacijentkinje sa normalnom vaginalnom florom i velikim brojem laktobacila imaju smanjenu ekspresiju CD16, odnosno u takvim slučajevima smanjuje se aktivnost PMN i njihov životni vek. S druge strane, odsustvo laktobacila, veliki broj anaerobnih bakterija i/ili infekcija *C.albicans* dovešće do povećane ekspresije CD16, odnosno inhibicije apoptoze.



**Grafikon 3.42: Srednja vrednost procenta apoptoze kod pacijentkinja sa normalnim nalazom, BV i CA**

Mogli bi zaključiti da je procenat apoptoze najmanji (najveća ekspresija CD 16) kod pacijentkinja sa BV i da BV ima na neki način najveći uticaj na odlaganje apoptoze. Mi nismo našli direktnu povezanost između vijabilnosti PMN i BV, ali rezultati ROC analize pokazali su da je procenat apoptoze pokazao značajno veću vrednost u »prepoznavanju« patoloških zbivanja u vaginalnoj flori. Ako pri tom pogledamo kakve je rezultate dao pH vagine (ROC kriva) čije su povećane vrednosti svakako jedan od najznačajnijih prediktora BV, onda rezultati našeg ispitivanja pokazuju da vaginalni PMN kod pacijentkinje sa BV imaju kraći životni vek, odnosno da je u takvim uslovima povećana apoptoza vaginalnih PMN. Tako su rezultati našeg ispitivanja suprotni rezultatima Beghinija i sar. [440], koji »braneći« svoje rezultate smatraju da u kod pacijentkinja sa BV proapoptotični signali MKKL bivaju prevladani antiapoptotičnim signalima okruženja koje nastaje kod pacijentkinja sa BV. Naš zaključak koji se zasniva na rezultatima ROC analize ukazuju da pacijentkinje sa BV imaju povećanu apoptozu vaginalnih PMN i da je to posledica oslobađanja velikih količina MKKL kod pacijentkinja sa BV. Ovi rezultati ukazuju da je krajnja vrednost koji izrazimo kao procenta apoptoze ili ekspresiju CD16 u stvari rezultat odnosa velikog broja proapoptotičnih i antiapoptotičnih signala koji stižu iz mikrobne, citokinske i apoptotske mreže. I u pomenutom ispitivanju autori analiziraju grupe pacijentkinja koje se nalaze i u našoj metodologiji, ali bez ometajućih faktora koje bi kako smo to pokazali za BIFIDO forme mogle da imaju značajan uticaj na dobijene rezultate.

Prethodno smo pomenuli značaj proinflamatornih citokina i njihov mogući uticaj na produžetak životnog veka PMN ali u ovom ispitivanju nismo mogli da potvrdimo takve nalaze. Ovo je razumljivo ako se podsetimo podataka da su pacijentkinje sa BV na osnovu rezultata ROC krive imale povišen stepen apoptoze, a opet u toj istoj grupi pacijentkinja nađene su i

povišene koncentracije proinflatornog citokina IL-1 $\beta$  i IL-6 (vidi kasnije) koji bi dakle trebali da dovedu do odlaganja apoptoze i produže životni vek PMN, što je samo još jedna potvrda da veliki broj međusobno zavisnih i isprepletanih faktora određuje da li će apoptoza biti odložena ili ubrzana. Međutim kao što smo objasnili verovatno je i u ovom slučaju proapoptogeni efekat MKKL jači od efekata citokina, te kao krajnji rezultat imamo produžen životni vek PMN. da to svakako nije jedini razlog pokazaće i rezultati koje ćemo detaljno diskutovati kasnije, a ovde ćemo samo napomenuti da su pacijentkinje iz grupe BVF imale gotovo identične srednje koncentracije IL-6 kao i pacijentkinje iz grupe BVN, što ukazuje da broj bakterija nije odlučujući za koncentracije citokina, a indirektno bi mogli zaključiti ni za vek PMN. Kao što smo rekli koncentracijama citokina u odnosu na stanje vaginalne flore bavićemo se u posebnom delu diskusije, ali ovde ćemo izdvojiti jedan interesantan nalaz s obzirom da se on odnosi na grupu pacijentkinja sa BIFIDO formama za koje smo već pokazali da su imale značajno niži procenat apoptoze u odnosu na pacijentkinje sa normalnim nalazom i BV. Tako su na osnovu NP-6G u kojoj su pacijentkinje sa BIFIDO formama izdvojene u posebnu grupu nađene značajno niže ( $p < 0,05$ ) koncentracije IL-10 kod pacijentkinja sa BIFIDO formama i BV u odnosu na one sa normalnim nalazom (ANOVA, post hoc Tamhaneov test). napomenućemo takođe da statistička značajnost za IL-10 nije nađena ni za jednu grupu pacijentkinja na osnovu različitih dijagnostičkih kriterijuma, kao ni korišćenjem različitih statističkih postupaka.

**Tabela 3.14: Srednje vrednosti koncentracije IL-10 u grupi BIFIDO**

IL-10	n	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška	95% interval poverenja	
					Donja granica	Gornja granica
<b>NOR</b>	446	1808,86	13121,03	621,30	587,82	3029,91
<b>BV</b>	153	22,88	71,94	5,82	11,39	34,37
<b>BIF</b>	44	27,94	84,01	12,66	2,40	53,48
<b>Ukupno</b>	643	1262,03	10955,036	432,02	413,68	2110,38

**Tabela 3.15: Statistička obrada podataka (ANOVA, *post hoc* Tamhaneov test)**

IL-10		Razlika srednjih vrednosti	Standardna greška	p	95% interval poverenja	
					Donja granica	Gornja granica
NOR	BV	1785.98	621,33	0,013	296,81	3275,15
	BIF	1780.93	621,43	0,013	291,52	3270,33
BV	NOR	-1785.98	621,33	0,013	-3275,15	-296,81
	BIF	-5,06	13,94	0,978	-39,25	29,14
BIF	NOR	-1780.93*	621,43	0,013	-3270,33	-291,52
	BV	5,06	13,94	0,978	-29,14	39,25

Iako se smatra da IL-10 nema značajniji direktan uticaj na apoptozu, ovako niske vrednosti ovog potentnog antiinflamatornog citokina smatramo interesantnim, jer bi one suštinski mogle da doprinesu povećanom preživljavanju PMN. Podaci o procentu apoptoze koji su dobijeni kod pacijentkinja sa BIFIDO formama, naročito ako ih sagledamo uz podatak da je ova grupa trudnica jedina pokazala skoro 10 X veći rizik od PP, mogli bi biti od velikog značaja u budućim ispitivanjima. Na osnovu rezultata našeg ispitivanja mogli bi smo zaključiti da pacijentkinje sa povećanim procentom apoptoze i smanjenim preživljavanjem PMN imaju verovatno ili normalan nalaz ili BV, a jednostavan test sa pH pomogao bi nam da sa verovatnoćom preko 90% izdiferenciramo ova dva stanja. Rizičan nalaz bio bi onaj kod koga pacijentkinje imaju povišene vrednosti pH i povećano preživljavanje vaginalnih PMN (smanjena apoptoza), a mikroskopski nalaz ne ukazuje na BV, nego više »liči na normalan«. Ovakav nalaz ukazivao bi na prisustvo inflamacije i kao takav mogao bi da bude bolji prediktor stepena zapaljenja, što bi bilo značajnije u predviđanju PP za koji smo rekli da je prvenstveno zapaljenjski događaj. Da je to tako pokazali su rezultati našeg ispitivanja u kome su pacijentkinje iz grupe BIFIDO imale 9,7 puta veći rizik od PP u odnosu na pacijentkinje sa BV i normalnim nalazom, a kao što smo rekli procenata apoptoze i koncentracije antiinflamatornog citokina IL-10 bile su značajno niže kod pacijentkinja sa BIFIDO formama u odnosu na pacijentkinje sa normalnim nalazom i BV. Iz ovoga možemo zaključiti da bi vijabilnost PMN mogla da bude vrlo dobar prediktor PP, posebno ukoliko se u takvim analizama ima na umu činjenica da je apoptoza veća a vijabilnost PMN kraća kod pacijentkinja sa BV, što bi moglo da utiče na procenu vrednosti ovog parametra u predikciji PP.

### 3.4 UKUPNA PROCENA STANJA MIKROFLORE VAGINE

Na kraju analize rezultata koji se odnose na pregled mikroskopskog preparata različitim dijagnostičkim procedurama, određivanja broja PMN i značaja mogućih ometajućih činilaca, još jednom želimo da ukažemo na značaj dijagnostičkih kriterijuma, teškoće u razlikovanju normalnog i patološkog, kao i raznovrsnost vaginalne flore, jer mislimo da je to neophodno da bi se na pravi način sagledali drugi rezultati dobijeni u ovom ispitivanju.

Osnovni i najvažniji problem koji stoji na putu da preciznije definišemo etiopatogenetska zbivanja vezana za infekciju i/ili inflamaciju i PP, jeste činjenica da još uvek nemamo preciznu definiciju normalne vaginalne flore, ili bolje rečeno nemamo jasnu granicu između normalnog i patološkog. Odgovor na ovo pitanje nemamo na kliničkom, mikrobiološkom, a ni na molekularnom nivou. Postojeći dijagnostički kriterijumi razlikuju suštinski samo 5 vaginalnih infekcija: BV, kandidioza, trihomonoza, postmenopauzalni vaginitis i deskvamativni inflamatorni vaginitis, od kojih je jedan pre fiziološko stanje nego infekcija, a drugi veoma redak, tako da ostaje samo “velika trojka” (BV,CA,TV). Sve dok ne budemo znali koje trudnice i kako trebamo lečiti teško je očekivati bolje rezultate. Rezultati našeg ispitivanja ukazuju da na osnovu postojećih dijagnostičkih procedura kod najmanje 10-30% pacijentkinja ne znamo pravu dijagnozu, niti imamo odgovor na pitanje da li i kako lečiti ove pacijentkinje. S obzirom na dobijene rezultate mislimo da buduće studije treba da preispitaju vrednost postojećih dijagnostičkih kriterijuma, i da zajedničkim naporom kliničara, mikrobiologa i molekularnih biologa, možda budu uspostavljeni novi kriterijumi koji bi na bolji način odražavali kompleksnost mikrobne zajednice vagine i ukazali na postojanje nekih drugih stanja, koja nisu BV, a koji bi mogli značajno uticati na reproduktivno zdravlje žena.

Najbrojnija i najrazličitija zajednica na našoj planeti su mikrobi. Za razliku od makroskopskih organizama čiji su ekološke preferencije i međusobni odnosi u kvalitativnom i kvantitativnom smislu prilično dobro definisani, takve relacije su gotovo potpuno nepoznate i u prilično jednostavnim mikrobnim zajednicama. Mikrobiom vagine čini oko 300 do 400 različitih vrsta bakterija, što se u odnosu na druge mikroekološke zajednice definiše kao zajednica sa malim diverzitetom. Kao i u svakom drugom ekološkom sistemu članovi formiraju komplikovanu mrežu međusobnih odnosa, u kojoj se svaki od članova bori za opstanak i najbolje uslove za svoju vrstu. U ovakvoj ekološkoj zajednici domaćin primarno pokušava da obezbedi uslove (temperatura, voda, hrana, kiseonik, pH itd.) za “dobre stanare” (laktobacili) od kojih ima koristi, odnosno koji će ga štiti od potencijalnih neprijatelja. Ova „domaća“ flora je proizvod koevolucionog odnosa domaćina i različitih mikroorganizama, i kao takva predstavlja važan deo imunskog sistema domaćina u odbrani od patogena. Za razliku od nekih

drugih, u vaginalnom mikrobiomu nije identifikovana bakterijska zajednica koja bi bila na neki način stalna i nepromenljiva bez obzira na različite uticaje (engl. *core microbiom*). Danas se može kultivirati manje od 1% svih mikroorganizama, a taj procenat nije značajno veći ni za mikrobiom vagine (3-5%). Dakle, za preko 95% bakterija koje se nalaze u vagini ne znamo kakve uslove sredine zahtevaju, čime i kako se hrane, koliku količinu kiseonika zahtevaju, da li su sposobni za anaerobnu glikolizu i produkciju mlečne kiseline, koje metaboličke produkte oslobađaju, kakav imunski odgovor izazivaju, ili kako na njih utiču druge bakterijske vrste. Pošto su ekološki faktori raznovrsni i promenljivi, jedna organska vrsta ne može biti na sve njih istovremeno prilagođena. U kolikoj meri se vrsta prilagođava uslovima sredine, zavisi od njene ekološke valence. Ekološka valenca predstavlja širinu kolebanja pojedinih ekoloških faktora u čijim je granicama moguć opstanak neke vrste, i prema tome se razlikuju dve vrste organizama: eurivalentni i stenovalentni. Eurivalentni (gr. eurys = širok) su organizmi sa širokom ekološkom valencom, I stenovalentni (gr. stenos = uzak) sa uskom ekološkom valencom. Eurivalentni organizmi poseduju široke mogućnosti prilagođavanja što im omogućava opstanak u vrlo različitim sredinama. U našem ispitivanju CA je nađena u svim grupama NP-6G, a od 218 pacijentkinja za koje smo znali vrednost pH, kod oko jedne trećine (n=69) sa vrednostima pH preko 4,5 i srednjom vrednost pH 5,4 mikroskopskim pregledom nađene su spore i/ili hife gljivica, tako da bi smo CA mogli svrstati u eurivalentne mikroorganizme. Rezultati mikrobioloških studija ukazuju da i *L. iners* pripada ovoj grupi mikroorganizama, jer je detektovan u svim poznatim tipovima vaginalne flore. Nasuprot njima su više ili manje specijalizovani stenovalentni organizmi, kojima bi u našem ispitivanju pripadali laktobacili (posebno *L. Crispatus*) kojih nema kod pacijentkinja sa BV i povišenim pH.

Kod svake ekološke valence razlikuju se tri vrednosti: optimum, maksimum i minimum. Ekološki optimum predstavlja onu vrednost faktora u okviru ekološke valence pri kojoj se životni procesi neke vrste najbolje odvijaju. Gornja i donja granica neke ekološke valence su njen maksimum i minimum. Van tih granica fiziološki procesi se prekidaju i nastupa smrt. U spoljašnjoj sredini, gde se ekološki faktori uzajamno uslovljavaju; nijedan pojedinačni faktor ne postiže svoje optimalno dejstvo nezavisno od ostalih faktora. Najčešća situacija u prirodi je veće ili manje odstupanje od optimalnih uslova života. Što je odstupanje veće, to su uslovi za opstanak neke vrste manje povoljni. Samo jedan jedini ekološki faktor, čije se dejstvo približava maksimumu ili minimumu (npr. pH), može da onemogući opstanak nekog organizma na određenom mestu. Ekološki faktor tada postaje ograničavajući, zbog čega ekolozi mikroorganizme koji uspevaju da rastu u laboratorijskim uslovima simbolično nazivaju “korovom” mikroorganizama, ukazujući tako na njihovu sposobnost da prežive u najrazličitijim

uslovima. Iz napred navedenog nije teško zaključiti da mikroorganizmi koji izrastu u Petrijevom tanjiru (na primer posle uzimanja cervikalnog i/ili vaginalnog brisa i zasejavanja) nisu porasli u kulturi zato što su najbrojniji (kako se često u kliničkoj praksi tumači nalaz kulture), niti ih možemo smatrati uzročnicima eventualnih kliničkih simptoma pacijentkinje, nego se u najvećem broju slučajeva radi o eurivalentnim mikroorganizmima. Zbog toga svaku mikrobiološku zajednicu, a tako i vaginalnu ili intraamnijsku floru, moramo posmatrati kao kompleksnu, međusobno zavisnu celinu koja se neprekidno menja u vremenu i prostoru. Na njen sastav mogu uticati ishrana, stres, rasna pripadnost, seksualni odnosi, hormoni, trudnoća, menstruacije, ispiranje, promena lekova, opšte zdravlje i još mnogo drugih faktora.

Naravno da su međusobne interakcije članova određene mikrobne zajednice veoma važan faktor u krajnjoj determinaciji kvantitativnog i kvalitativnog stanja u takvoj zajednici. U ovom trenutku mi sa velikom verovatnoćom možemo pretpostaviti da se u okviru ove mikroekološke zajednice odigravaju procesi koji se odigravaju u drugim makroekološkim sistemima. S obzirom da organizmi u prirodi retko žive izolovano, onda je logično pretpostaviti da i u ovoj zajednici kao većini drugih vladaju različiti odnosi među njenim članovima. Najveći broj bakterija u mikrobiomu vagine nastao je u dugom koevolucionom procesu domaćina i mikroorganizama koji podrazumevaju odnose počev od mutualističkih i komensalnih, preko amensalističkih, kompetitivnih, pa do parazitanih. U mutualističkom odnosu oba “učesnika” povećavaju svoju adaptivnu vrednost zbog uzajamnog delovanja, oba imaju korist (+/+). Komensalizam je odnos u kome komensali i domaćini žive u tesnoj vezi, pri čemu komensali dobijaju korist (hranu, stan, vodu, skrovište) bez snižavanja adaptivne vrednosti domaćina; (+/0). U amensalizamu jedna od članica u interakciji smanjuje svojom aktivnošću adaptivnu vrednost druge članice, pri čemu od toga nema nikakvu korist niti štetu (0/-). Parazitizam je zajednica u kojoj jedan član ima korist, a drugi štetu (+/-), a kompeticija gde oba člana imaju štetu (-/-). Ovi makroekološki principi važe i za mikroekološku zajednicu vagine, ali su s obzirom na broj, raznolikost (diverzitet) i mnoge druge nepoznanice, možemo reći da su ovi odnosi u vaginalnom ekosistemu za sada gotovo potpuno nedefinisani [444]. Vaginalni mikrobiom je odličan primer fino izbalansirane mutualističke zajednice. Iako smo rekli da u vagini nema mikrobiološke zajednice koju bi mogli definisati kao *core microbiom*, ipak najveći broj studija neminovno ukazuje da postoji zajednica “starosedilaca” od kojih su svakako najvažniji različiti sojevi laktobacila koji promovišu zdravu vaginalnu sredinu i sprečavaju kolonizaciju potencijalnih patogena. Takođe, s obzirom na dinamičnost promena u mikrobiomu vagine potrebno je razumeti još neke ekološke termine kao što su rezilijencija, rezistencija i perzistencija. Mikroorganizmi vagine i njen domaćin predstavljaju jedan kompleksan

prilagodljiv sistem, koji se dinamički i nepredvidivo menja u kvantitativnom i kvalitativnom smislu, pod uticajem velikog broja faktora. Stabilnost mikrobiološke zajednice zavisi od njene otpornosti i rezilijencije. Otpornost (rezistencija) podrazumeva da flora u dužem vremenskom periodu (perzistentnost) suštinski bitnije ne menja uprkos različitim negativnim uticajima. Rezilijentnost je sposobnost brzog oporavka i vraćanja u prvobitno stanje, odnosno sposobnost ekosistema da se stalno menja i prilagođava, a ipak ostane u svojim stabilnim okvirima. Ekolozi kažu da u prirodi ne postoje potpuno homogena staništa. Ovakav stav primenljiv je na različita staništa (gastrointestinalni trakt, urogenitalni trakt, koža) unutar humanog organizma, i za očekivati je da sa mikrobna zajednica razlikuje u različitim delovima ovih sistema. Ali, treba uočiti da ove razlike postoje i unutar na izgled homogenih staništa, kao što je vagina. Tako, ako samo uzmemo u obzir činjenicu da ćelije grlića materice proizvode veliki broj različitih hemijskih supstanci, kao i činjenicu da se te supstance proizvode ciklično (mesečni ciklus), onda je sigurno da uslovi u fornixu vagine nisu identični onima u vestibulumu vagine. Dakle, sigurno je da će se njihove koncentracije (gradijent uslova ili dostupnih resursa) i njihovi nutritivni ili imunski potencijali bitno razlikovati u pomenutim delovima vagine i različitim fazama mesečnog ciklusa, što podrazumeva i diverzitet u sastavu mikrobiološke zajednice na tim mestima, a svakako i u različitim vremenskim periodima. Sa istraživačkog (metodologija) aspekta ovo bi značilo da se bris uzet iz forniksa vagine i vestibuluma i/ili različitim fazama ciklusa, mogu bitno razlikovati.

Naravno, svi ovi odnosi i sastav vaginalne flore ne bi nas toliko zanimali da najnovija ispitivanja nisu jasno pokazala ogroman značaj koji mikroorganizmi imaju za naše zdravlje. I danas za većinu ljudi bakterija je sinonim za bolesno, a sterilno (bez bakterija) za zdravo. Međutim, najnovija ispitivanja pokazuju da su “preterana” higijena i nekontrolisana upotreba antibiotika dva faktora koji značajno utiču na mikrobiom domaćina, i tako povećavaju rizik od nastanka mnogih bolesti. Naseljavanje ljudskog organizma počinje prolaskom novorođenčeta kroz vaginalni kanal, a novija ispitivanja pokazuju da deca porođena carskim rezom, baš zbog neadekvatnog naseljavanja mikroflorom u kasnijem životu imaju veći rizik za nastanak hroničnih bolesti, kao što je šećerna bolest. Dakle, mikrobna zajednica je od velikog značaja za sazrevanje i razvoj imunskog sistema pojedinca, počinje već u toku porođaja i traje ceo život. Jedan od ciljeva u projekta mikrobioma vagine je identifikacija, kako pojedinačnih mikroorganizama, tako i određenih mikrobioloških zajednice, i utvrđivanje njihove uloge i značaja u imunskom odgovoru domaćina. Ovaj imunski odgovor mora biti dobro izbalansiran i precizno kontrolisan, da dovede do eradikacije patogena, a da pri tome ne nanese štetu domaćinu. Danas je potpuno jasno da pojedini članovi mikrobne zajednice mogu direktno



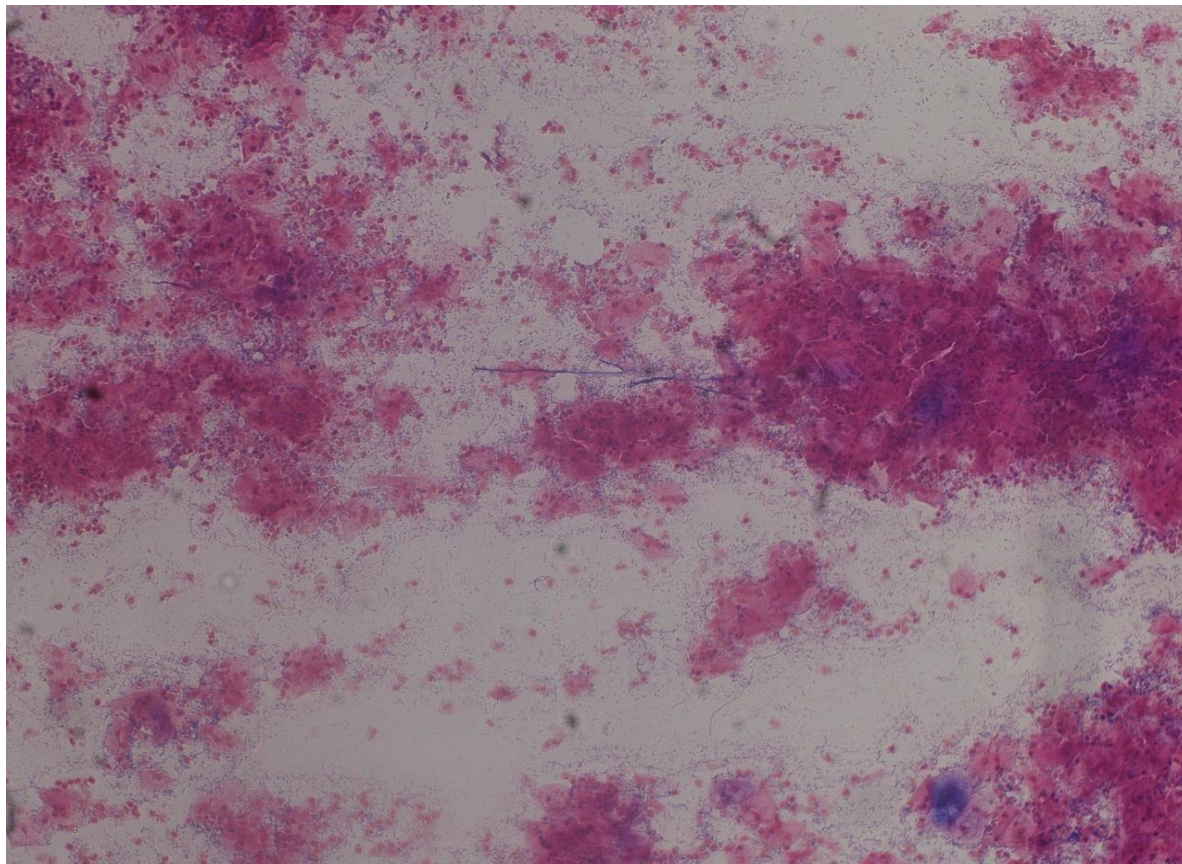
uticati na različite mehanizme imunskog odgovora. Najvažniju ulogu u ovoj toleranciji na komensale ima posebna subpopulacija T-limfocita nazvanih T-regulatorne ćelije (*engl. T regulatory cells, TREGs*). Takođe znamo da veoma važnu ulogu u razvoju imunskog sistema svakog pojedinca imaju komensalni mikroorganizmi. Pokazano je da nastanak i etiopatogeneza različitih autoimunih bolesti kao što je dijabetes melitus tip A, inflamatorna crevna bolest, astma, multipla skleroza, alergije itd. može biti povezan sa mikrobiološkom zajednicom pojedinca. Naime pretpostavlja se da u značajnom broju ovih oboljenja glavnu ulogu igraju savremeni životni uslovi koji uskraćuju pojedincu kontakt sa velikim brojem različitih mikroorganizama, i na taj način čine imunski sistem domaćina nesprenim da u određenim situacijama adekvatno reaguje. Suprotno, neprestani susreti sa stranim i domaćim mikroorganizma “vežbaju” imunski sistem i tako ga čine spremnim da u novim situacijama reaguje adekvatno. Ali imajući u vidu prisustvo na stotine različitih mikroorganizama u vagini teško je znati koji od njih su oni koji u stvari predstavljaju deo odbrambenog sistema domaćina, a još teže je odgovoriti na pitanje kako oni ostvaruju svoju ulogu. Pored toga verovatno se u najvećem broju slučajeva ne radi i pojedinačnim mikroorganizmima i njihovom uticaju na zdravo-bolesno, već se u najvećem broju slučajeva radi o većem broju mikroorganizama, dakle ekološkoj zajednici koja promovise zdravlje, a u kojoj svaki od njenih članova ima veću ili manju ulogu. Današnji dijagnostički kriterijumi svode se na svega nekoliko članova vaginalne flore ili preciznije na: *Lactobacillus*, *Gardnerella*, *Bacteroides*, *Mobiluncus*, *C. albicans*, *T. vaginalis*.

Ili, uobičajena statistička obrada podataka podrazumeva Nugentove kriterijume kao zlatni standard, na osnovu koga se procenjuje vrednost ostalih “testova” i dijagnostičkih kriterijuma [208, 444, 445]. Većina dosadašnjih ispitivanja pokazala je da postoji dobra podudarnost između različitih dijagnostičkih kriterijuma za BV, kao što smo i mi pokazali za NP-6G i njene modifikacije [446 - 452]. Međutim, za razliku od drugih studija NP-6G je izdvojila grupu pacijentkinja (NN+BVN) u kojoj je ta podudarnost veoma loša. Navešćemo kao primer ispitivanje Sha i sar. [455] u kojoj je senzitivnost Amselovih kriterijuma u odnosu na Nugenta kao zlatni standard bila svega 37% [453-455]. U uvodu autori [455] ukazuju da su Amselovi kriterijumi subjektivniji jer, zavise od iskustva i pronicljivosti kliničara, i zbog toga su manje osetljivi i reproducibilni u odnosu na Nugentove. Mi mislimo da je vrednost pH koja se očitava na test papiru objektivna dijagnostička procedura, što bi se moglo reći i za test sa a 10% KOH, a ono što je subjektivno u obe metodologije jeste mikroskopski pregled. Dakle , kako je moguće da je u pomenutoj studiji Sha i sar. [455] samo 75 žena imalo BV na osnovu Amselovih kriterijuma, a 203 na osnovu Nugentovih kriterijuma. Iz rezultata se vidi da su

specifičnost i senzitivnost koje se odnose na CC skoro podudarne navedenim, što znači da je najvažniji dijagnostički kriterijum za dijagnozu BV bio detekcija CC. Kao što smo detaljno obrazložili u metodologiji mi prisustvo CC nismo smatrali obaveznim za dijagnozu BV. U našem ispitivanju dijagnoza BV na osnovu Amselovih kriterijuma postavljena je kod 168/641 pacijentkinje, od čega su 63 na osnovu NP-6G imale BVF 37, 5% (63/168). Ove 63 pacijentkinje su na NPVS imale CC i da je to bio i naš kriterijum dobili bi iste rezultate kao i Sha i sar. [455]. Ali kako u našem ispitivanju CC nisu bile obavezne za dijagnozu BV mi smo BV dijagnostikovali kod još 105 pacijentkinja, dok je na osnovu NP-6G dijagnoza BV (BVF+BVM+BVN) postavljena kod 174 pacijentkinje. Zaključak je dakle da kliničar nije bitnije uticao na rezultate nego su oni posledica dosledne primene postojećih dijagnostičkih kriterijuma što ukazuje na potrebu za preispitivanjem njihove vrednosti.

Međutim, drugo i možda u ovom trenutku važnije pitanje jeste da li su 203 pacijentkinje iz ispitivanja Sha i sar. kod kojih je dijagnoza BV postavljena na osnovu Nugentovih kriterijuma i stvarno pacijentkinje koje imaju BV ili su neke pacijentkinje sa normalnim nalazom proglašene za BV, i obrnuto. Naravno s obzirom na činjenicu da su Nugentovi kriterijumi zlatni standard nemamo mogućnost da to proverimo, ali svakako nam je dozvoljeno da sumnjamo. Ono što nam svakako daje pravo da sumnju je ispitivanje De Backer i sar. [456] koji su među prvima pokazali da *L.iners* često ostaje skriven prilikom mikroskopskog pregleda zato što se boji Gram negativno. Nakon toga u poglavlju o gardnereli i knjizi „Molekularna detekcija bakterijskih patogena ljudi“ Rita Verhlest i sar.[213] navode da je zbog sličnosti u morfologiji kolonija *L. iners* u nekoliko navrata pogrešno identifikovan kao *G. vaginalis*, i da se kao i *G. vaginalis* kratki Gram pozitivan štapići *L. inersa* mogu bojiti i pod mikroskopom videti kao Gram negativni štapići, što može dovesti do pogrešnih zaključke o ulozi (dijagnozi) ovih vrsta u BV.

Rezultati najnovijih molekularnobioloških studija pokazuju da su *L.iners* i *G. vaginalis* dva najčešće detektovana mikroorganizma u mikrobiomu vagine, što praktično znači da ih gotovo uvek ima i na mikroskopskom preparatu, kako kod normalnih i intermedijarnih nalaza, tako i kod pacijentkinja sa BV.



**Slika 3.28: Fenotipska sličnost *L. Inners* i *G. vaginalis*, kako ih razlikovati pod mikroskopom? Vide se CA, PMN, KOKE (“blue cells”) i LEPTO forme**

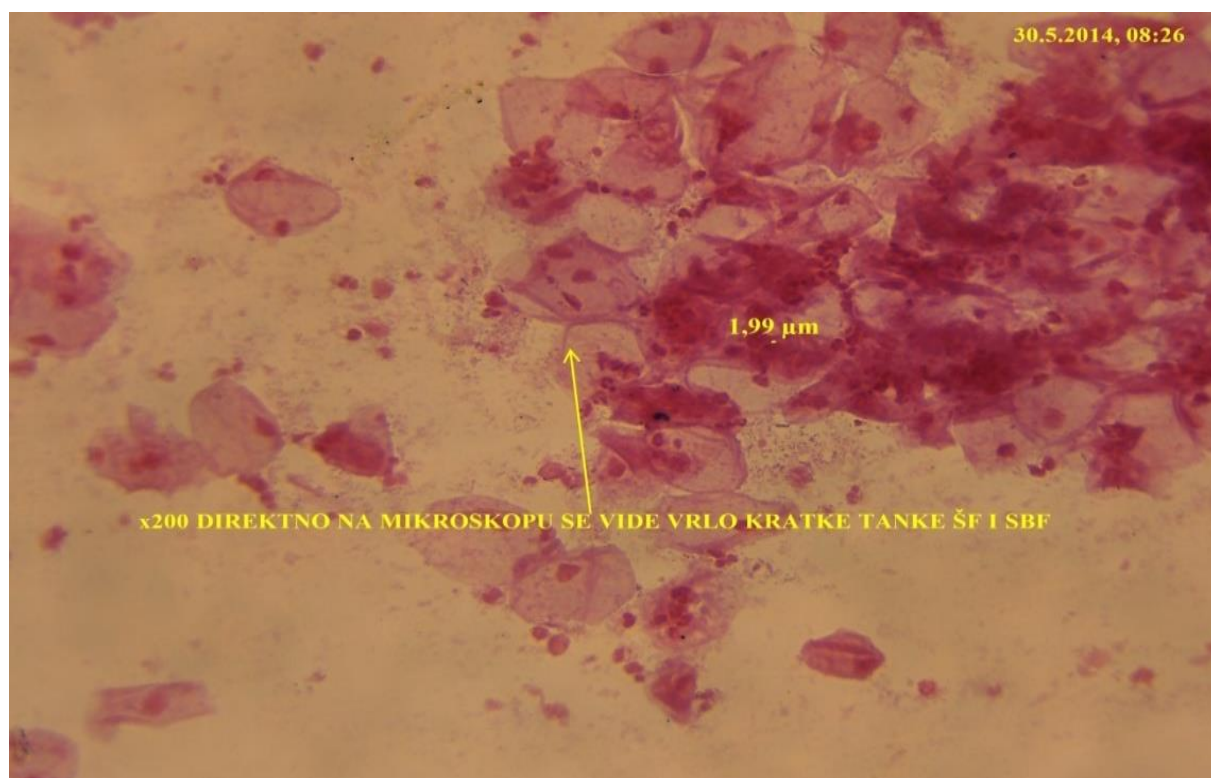
U prethodnoj diskusiji objasnili smo otkuda visoka podudarnost među različitim metodama, i da je u takvim slučajevima teže pogrešiti (NF, BVF) nego postaviti pravu dijagnozu.

Jedan od primera je i pacijentkinja pod rednim brojem jedan u tabeli 3.5. Tokom ispitivanja kao najčešće karakteristike ove “problematične” grupe bile su hipercelularnost (FULL ili MID), infekcija CA i prisutan veliki broj PMN (PMN2,PMN3), a ne retko i prisustvo drugih formi (KOKE, BIFIDO, LEPTO), tako da se ceo nalaz vidi kao neki “mešoviti” poremećaj vaginalne flore. Ono što je problematično u metodologiji gledanja na uvećanju X200 jeste činjenica da u takvim slučajevima nalaz na prvi pogled liči na BVF i prisustvo velikog broja NŠF. Međutim, pažljivim gledanjem se vidi (pod mikroskopom jasnije nego na fotografijama) da na preparatu pored velikog broja NŠF, takođe postoji i veliki broj vrlo kratkih ŠF, a kako smo na osnovu morfometrijskih merenja utvrdili (vidi metodologiju) formi čija je dužina preko 1,5  $\mu\text{m}$  (najmanja dužina na kojoj se neka forma prikazuje kao ŠF), ali manja od 3  $\mu\text{m}$ , tako da bi smo mogli reći da je njihova prosečna dužina oko 2  $\mu\text{m}$ . Dakle vidimo veliki broj SBF i vrlo kratkih ŠF, a to se bolje vidi na sledeće dve Slike (Slike 3.19 i 3.20) (druga pacijentkinja) na kojim smo još tokom ispitivanja upisali “najteže za diferencijaciju x200...” i “x200....se vide vrlo kratke tanke ŠF i SBF” (SBF je sitna bakterijska flora i odgovara BVAB flori kako je to definisano u Metodologiji).

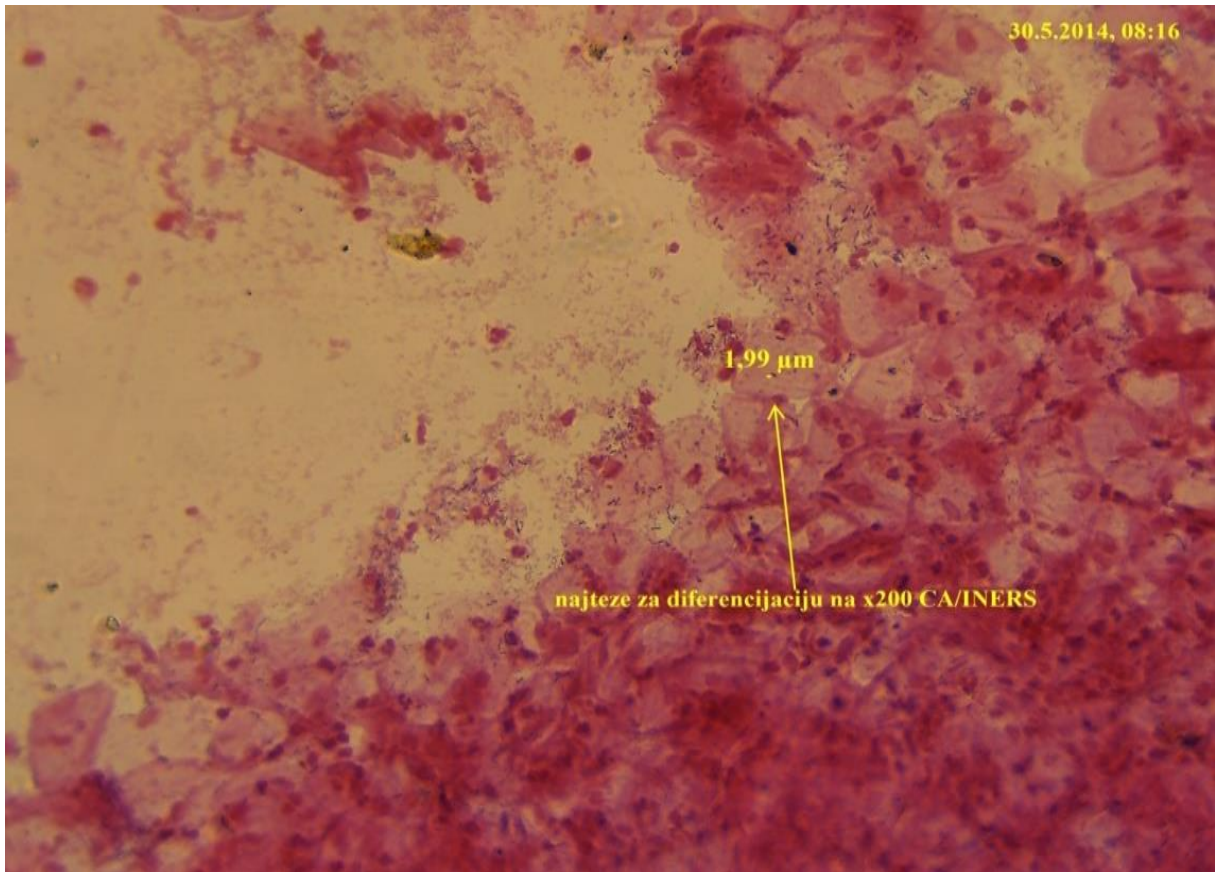
Na slikama treba uočiti marker dužine 1,99  $\mu\text{m}$ , u skladu sa prethodno navedenim. Na fotografijama koje slede, sa tekstom upisanim tokom ispitivanja, jasne su i naše dileme kod ovakvih nalaza. Tako na Slici 3.21 piše: “pre normalan nego BV” što jasno ukazuje na dubioznost ovakvih nalaza. Naš zaključak da se radi pre o normalnom (*L.iners*) nego patološkom nalazu podupirali smo još sledećim činjenicama: Prvo, kod pacijentkinja sa BVF ove vrlo kratke ŠF su retke ili ih nema, a sa duge strane ovakvi nalazi nikada ne pokazuju tipične slike “arhipelaga” i “peščanih staza” koje su patognomonične za BVF. Takođe, na ovakvim preparatima vrlo su retke ako ih uopšte ima clue cells tako da se epitelne ćelije jasno vide. Kako su clue cells formacije koje po našem mišljenju formira uglavnom *G. vaginalis*, kada apsolutno dominira vaginalnom florom, jedna od hipoteza ovog ispitivanja je da u ovakvim slučajevima zbog manjeg broja *G. vaginalis*, prilično velikog broja *L.iners*, a možda i prisustva CA ili nekih drugih faktora, ne dolazi do “formiranja” clue cells.

Još jedna od hipoteza ovog rada koju ćemo ovde pomenuti jeste da kod nekih pacijentkinja sa jasnim nalazom BVF nema clue cells i da se u takvim slučajevima radi o predominaciji drugih anaeroba (*A. vagine*, *Prevotella spp.*, *Megasphaera itd.*) dok je *G. vaginalis*, svakako, prisutna ali u značajno manjem broju zbog čega i nema clue cells. Dakle

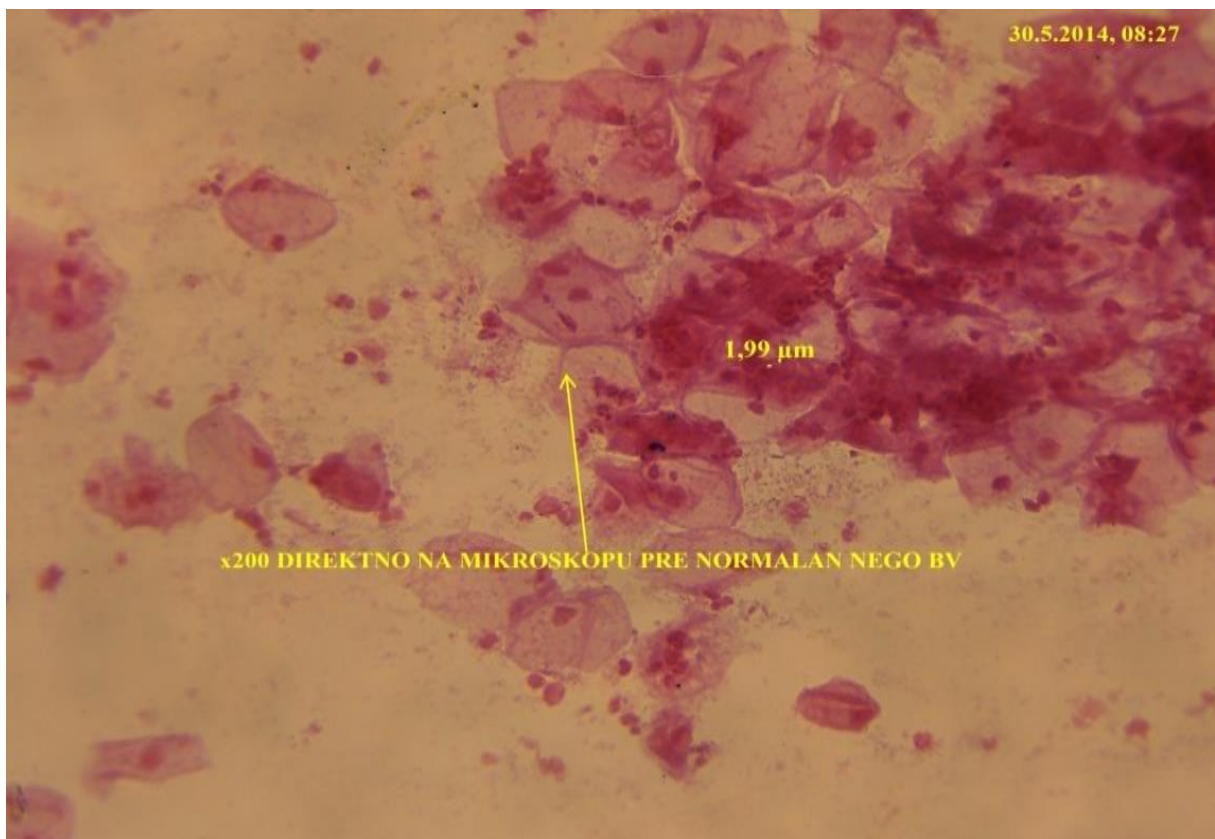
tako bi na neki način mogli razlikovati dva tipa BV: Prvi, u kojem predominira *G. vaginalis* (kvalitativno i kvantitativno) i koja se karakteriše velikim brojem clue cells, sa manjim brojem drugih BVAB (*A. vaginæ*, *Prevotella*, *Megasphaera*) i koji je na fotografiji definisan kao “tip A BV”(fotografije), i drugi (na fotografijama definisan kao Tip B) kod koga su clue cells retke ili nedostaju (manji broj *G. vaginalis*) a predominantne su druge BVAB, uz “sveprisutni” *Liners*. Da budemo jasni, naša hipoteza o predominaciji drugi BVAB u odnosu na *G. vaginalis* zasniva se najvećim delom činjenici da kod ovakvih nalaza nemamo clue cells, ali ne isključivo, jer smo za nalaze nekih mikroskopskih formi na koje smo nailazili tokom ispitivanja pretpostavili da predstavljaju druge članove BVAB familije (*A. vaginæ*, *Prevotella*, BVAB3), ali nigde nismo naći “vizuelnu” potvrdu ovakvih pretpostavki. Rad Datcu i sar. sa priloženim fotografijama pomogao nam je da potvrdimo neke naše pretpostavke, za koja do tada nismo imali objektivnu verifikaciju [165]. Veliki broj podataka u poslednjih desetak godina ukazuje da je *Atopobium vaginæ* jedan od najvažnijih mikroorganizama u etiopatogenezi BV [457-461]. Jedna od “mikroskopskih hipoteza” našeg ispitivanja je da malo *G. vaginalis* i predominacija drugih BVAB (*A. vaginæ*, *Prevotella*. daje sliku sa malo ili bez clue cells, nalaz na fotografijama označen kao BV tip B (Slika 3.25). Sledeće fotografije (3.29-3.38) su dokaz da je *A. vaginæ* moguće prepoznati i na uvećanju x200, a ako imate dobru opremu i izmeriti, a na uvećanju x 1000 to i potvrditi.



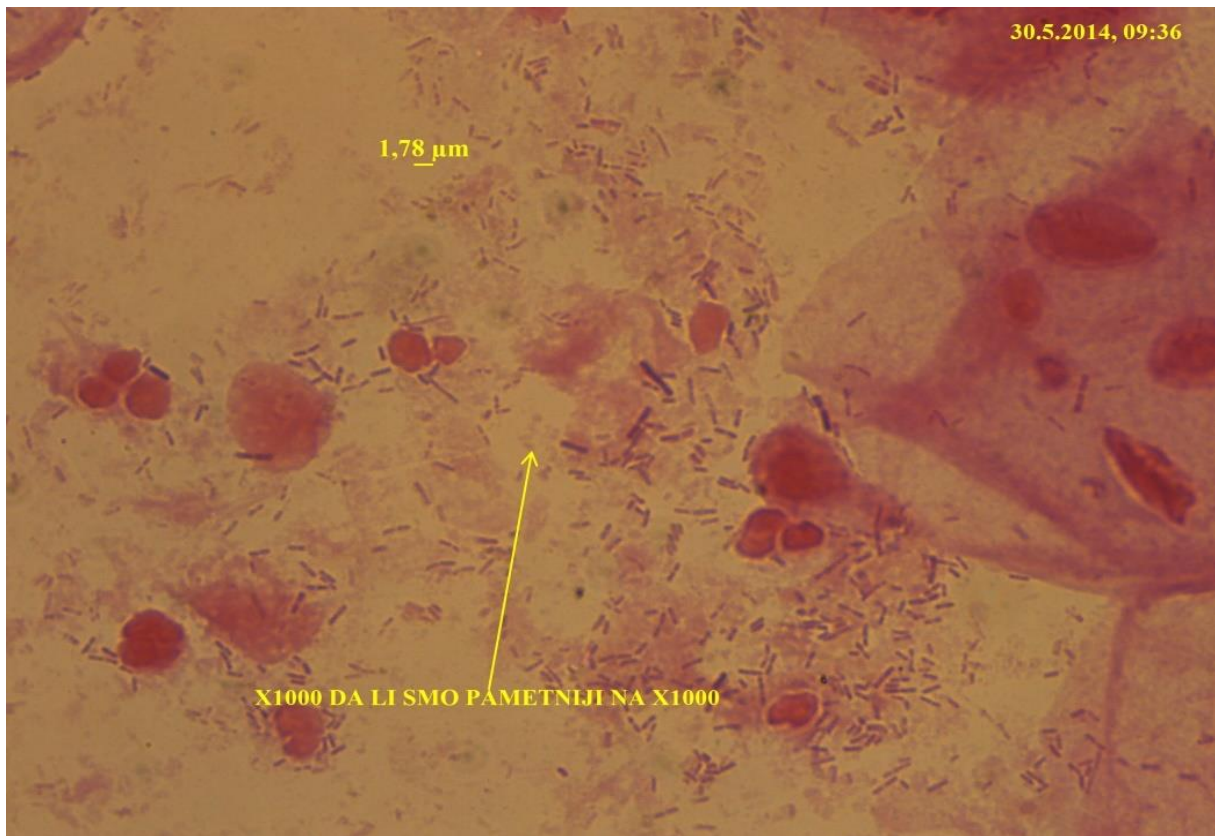
**Slika 3.29:** Na uvećanju X200 na prvi pogled liči na BV; vrlo kratke i tanke ŠF za koje mislimo da odgovaraju *L.inersu* ili *G.vaginalis* dužina ovih formi između 1,5- 2,5 µm; gram-varijabilne



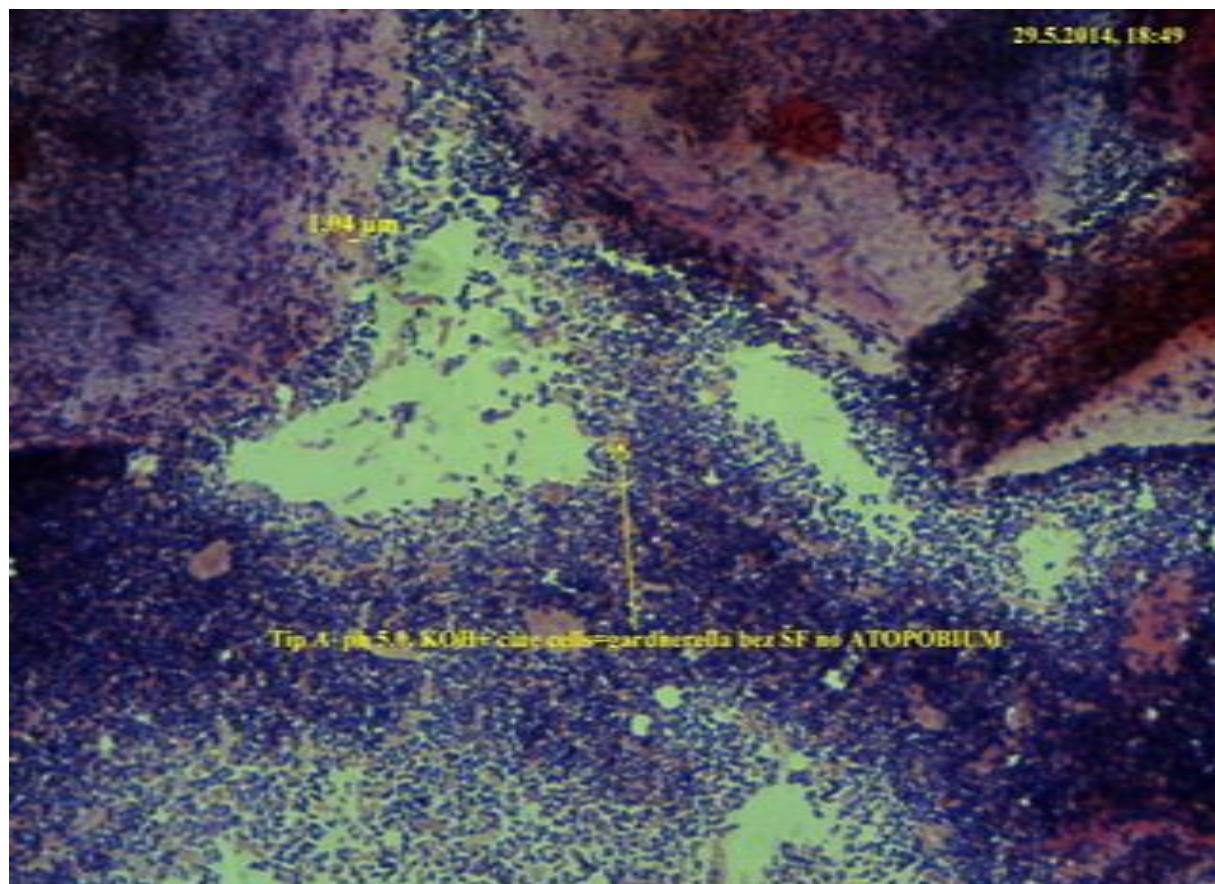
Slika 3.30 Uvećanje x200: Gram varijabilni vrlo kratki i tanki štapici za koje ne možemo reći da li odgovaraju *L.inersu* ili *G.vaginalis*, a ovakav nalaz je čest kod CA i udružen sa povećanim brojem PMN



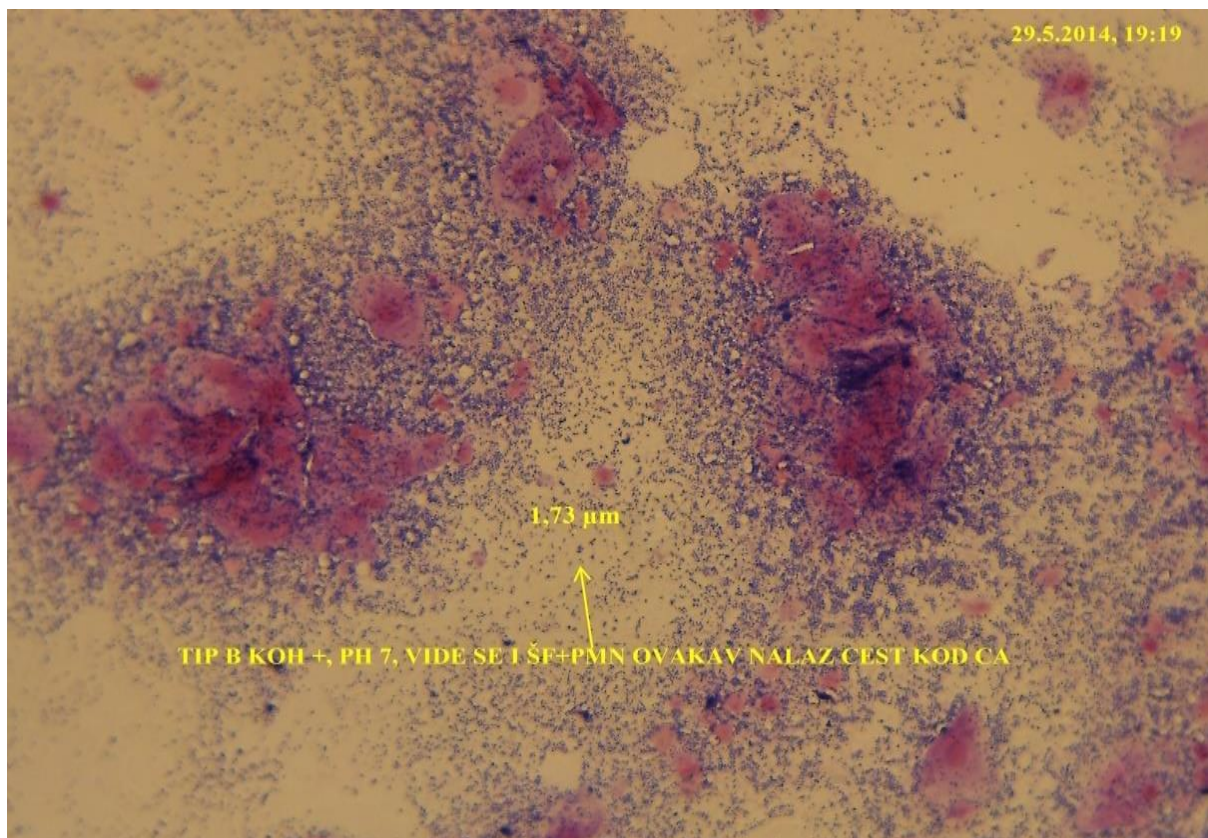
Slika 3.31: Dijagnoza normalan ili BV smo donosili ukoliko smo videli veći broj ovih sitinih tankih ŠF od NŠF, ali je često dijagnoza vrlo dubiozna



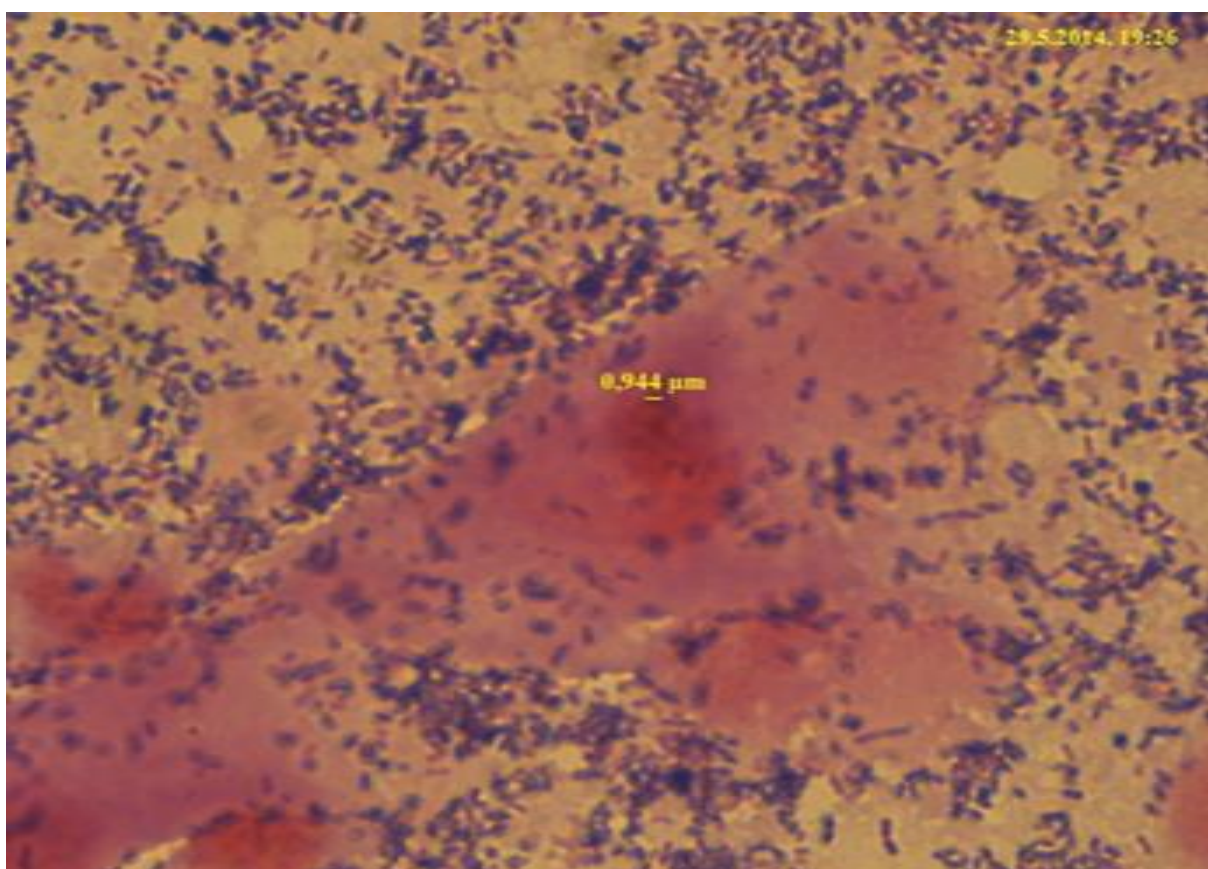
Slika 3.33: Isti preparat na uvećanju x1000 vidi se nekoliko laktobacila tipa *L.crispatusa* deblji i duži, a ya ostale Gram negativne ili Gram varijabilne sitne štapiće teško je reći da li su *L-iners* ili *G. vaginalis*



Slika 3.32: Uvećanje X100 tipičan nalaz za BVF (tip A) sa clue cells i velikim brojem BVAB čija je dužina manja od 1,5 $\mu$ m ili bolje rečeno bliže 1 $\mu$ m; primetiti dosta G+ BVAB ali nisu Atopobium vagine

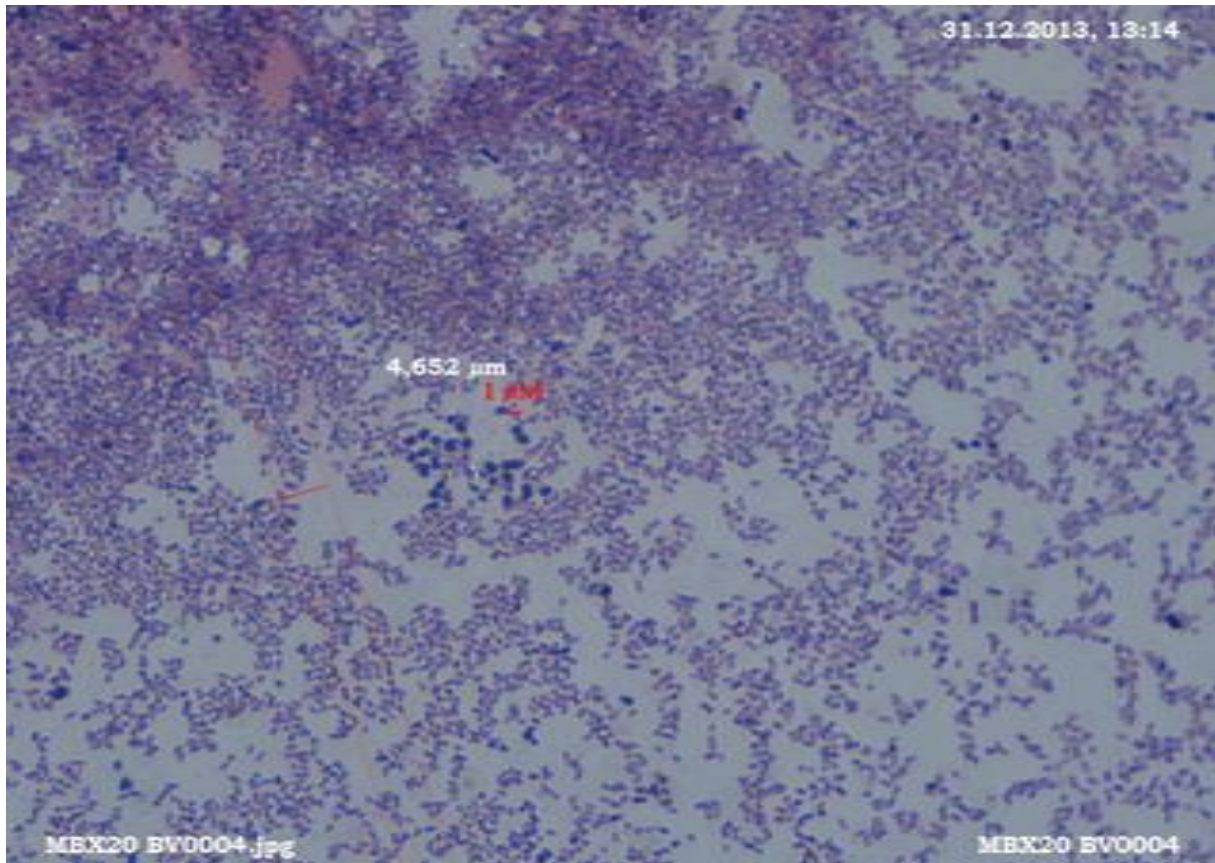


Slika 3.34: Više *L.inersa* ili *G.vaginalis*? Šta je šta? Uvećanju x200!?

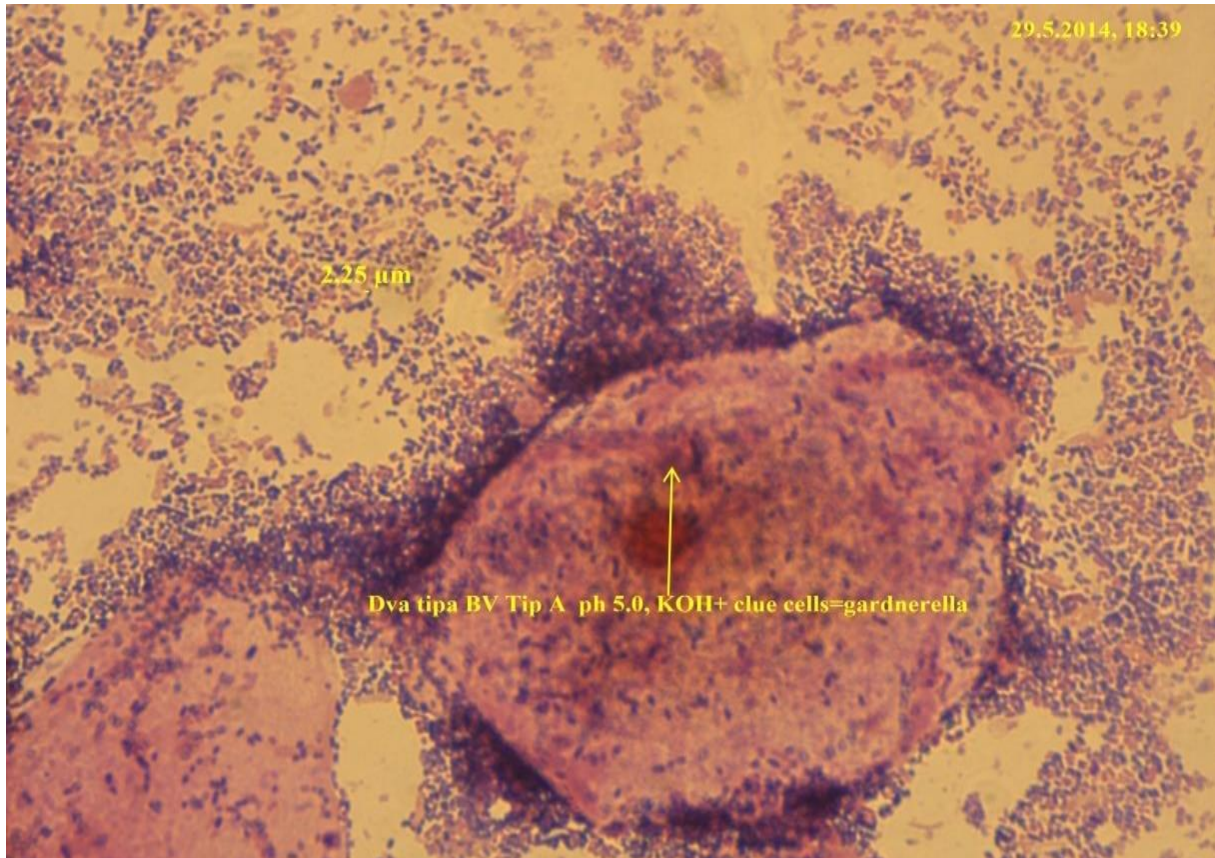


Slika 3.35: Više *L.inersa* ili *G.vaginalis*? Šta je šta? Uvećanju x1000!?

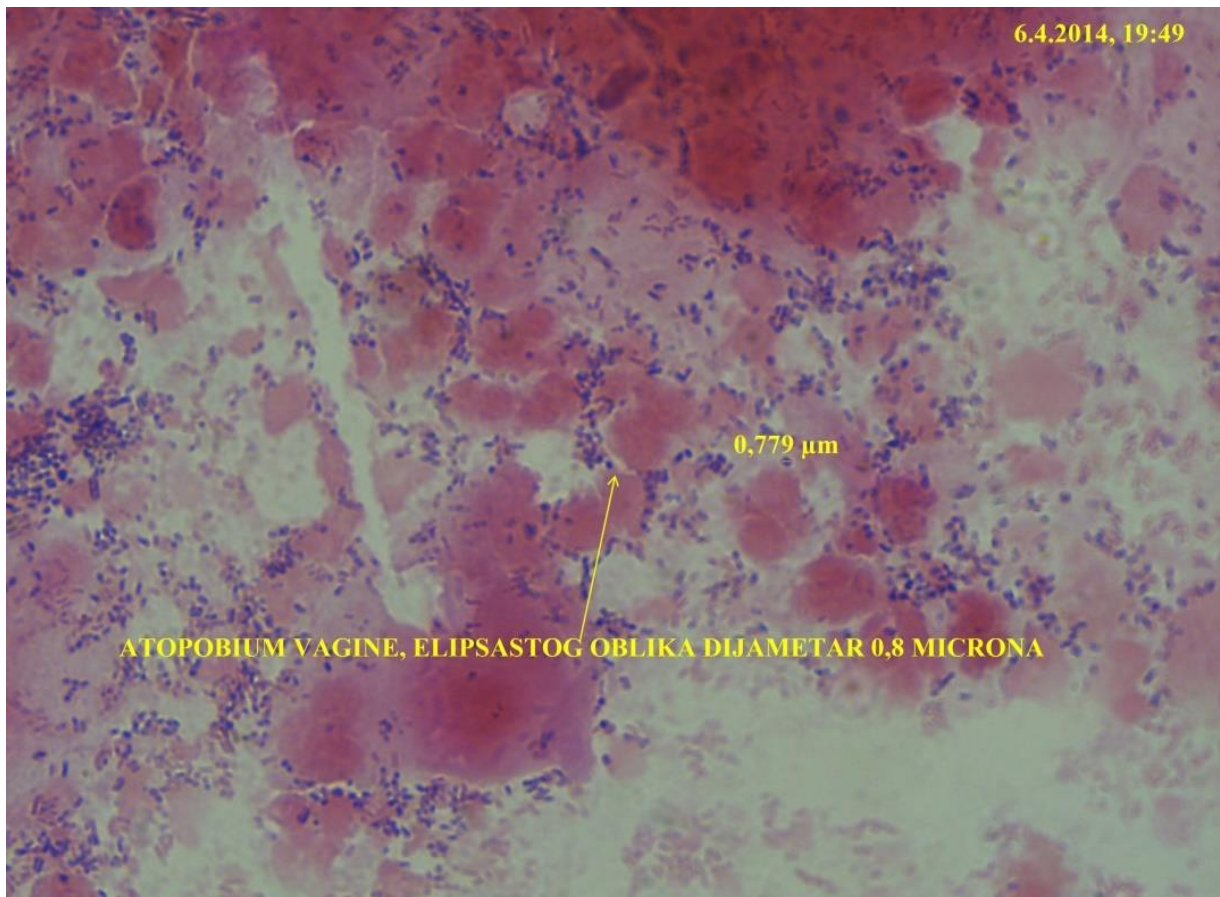




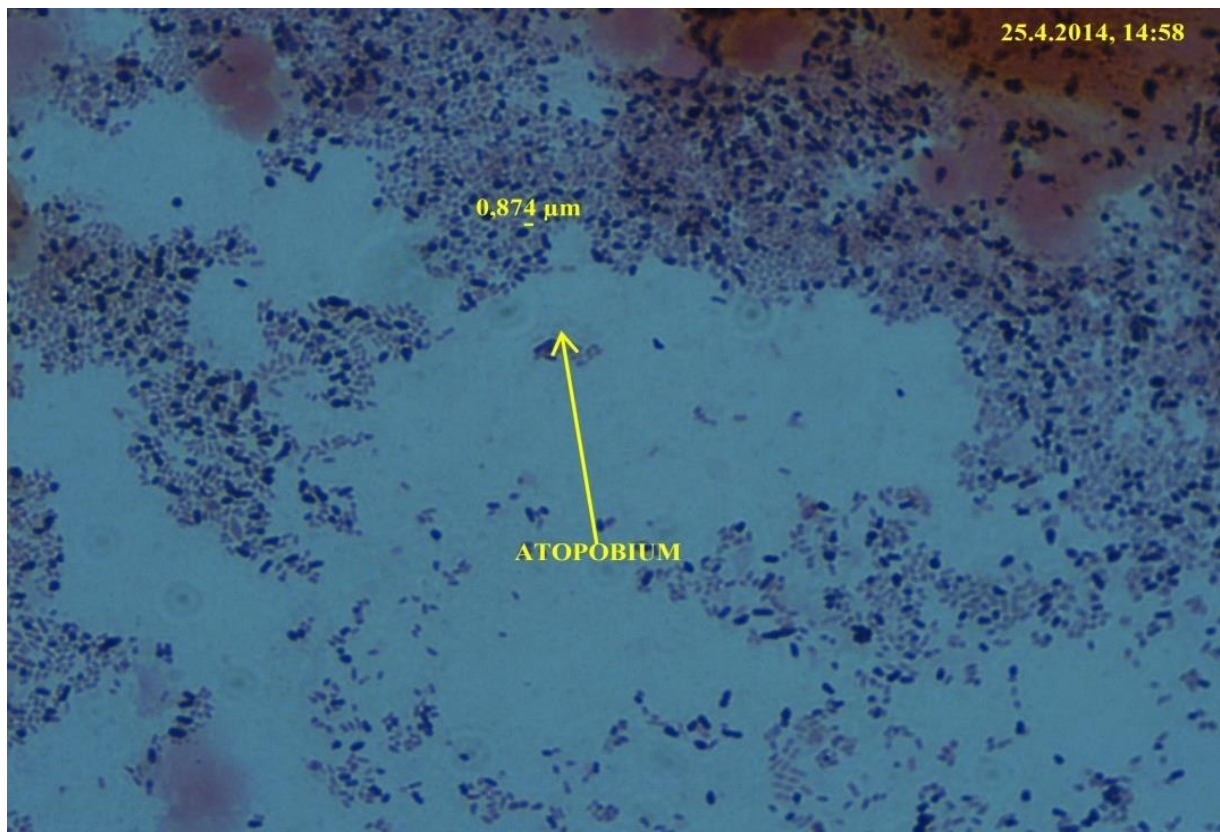
Slika 3.36: Tipična BVAM kod BVF (Tip B) sa elipsastim izrazito G+ formama za koje verujemo da su *Atopobium vaginæ*, drugi verovatno odgovaraju *Prevotella spp.* *G. vaginalis*, a sigurno ima i *L.inersa*



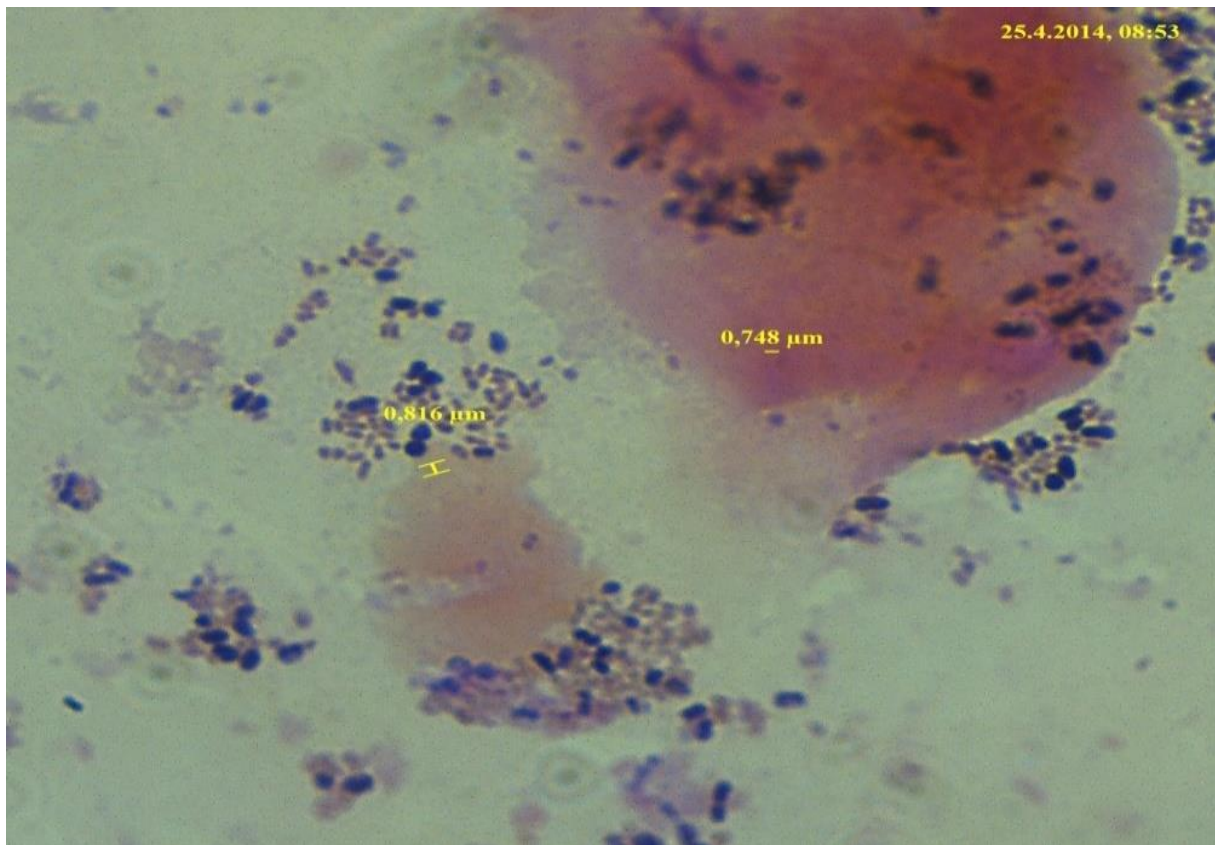
Slika 3.37: BVF tip A sa clue cells i verovatno predominantnom *G. vaginalis* u odnosu na druge BVAB, nema *Atopobiuma*, a sigurno ima *L.inersa*; više *G. vaginalis* više clue cells; uvećanje x1000



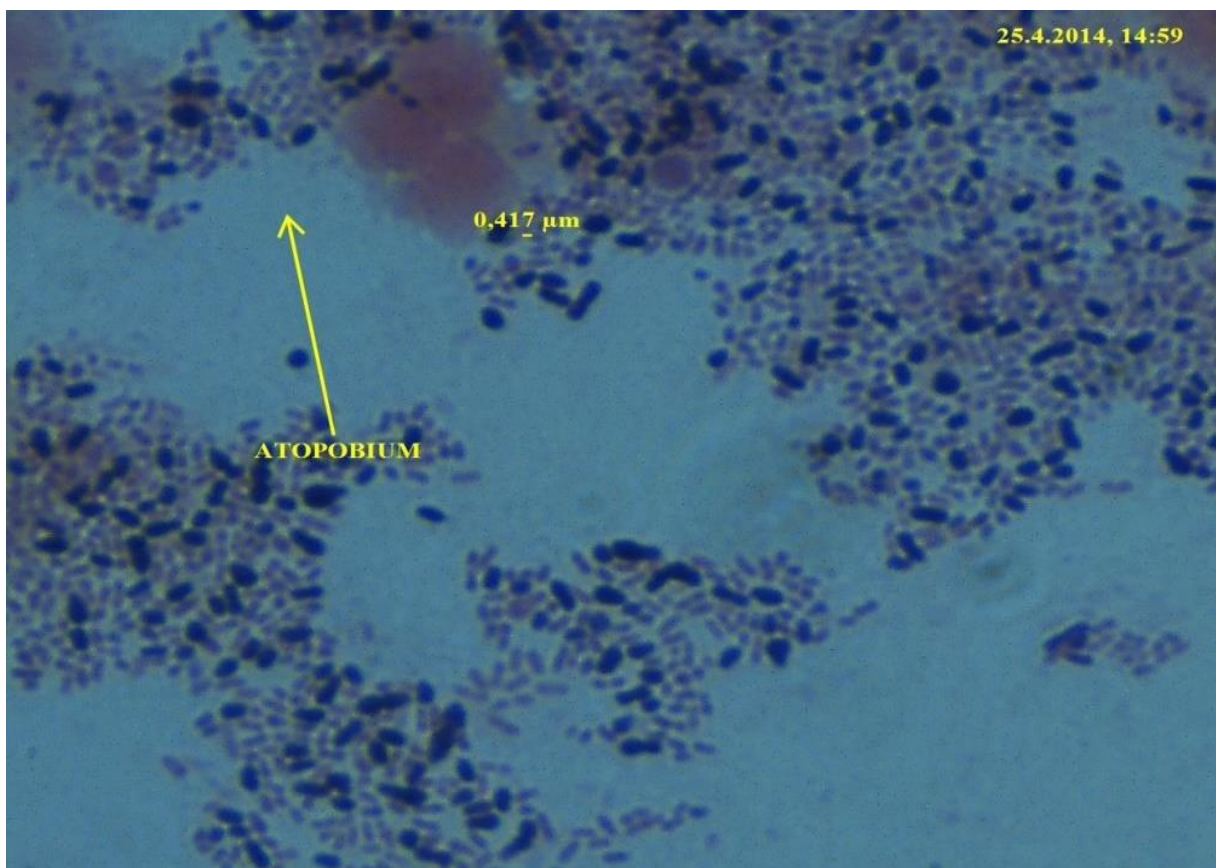
Slika 3.39: BVF ali bez clue cells (tipB) verovatno dominiraju *Prevotella spp.* i *Atopobium*, dok se *G. vaginalis* nalazi u manjem broju; uvećanje x1000



Slika 3.38: BVF u kome verovatno dominira *Atopobium* sa *Prevotella spp.*; clue cells retke ili odsutne; x1000



Slika 3.40: *Atopobium vaginiae* uvećanje x1000+ ; naravno ne možemo biti sigurni da ovo nisu neke druge gram pozitivne koke ali fenotipske karakteristike odgovaraju *A. vaginiae*



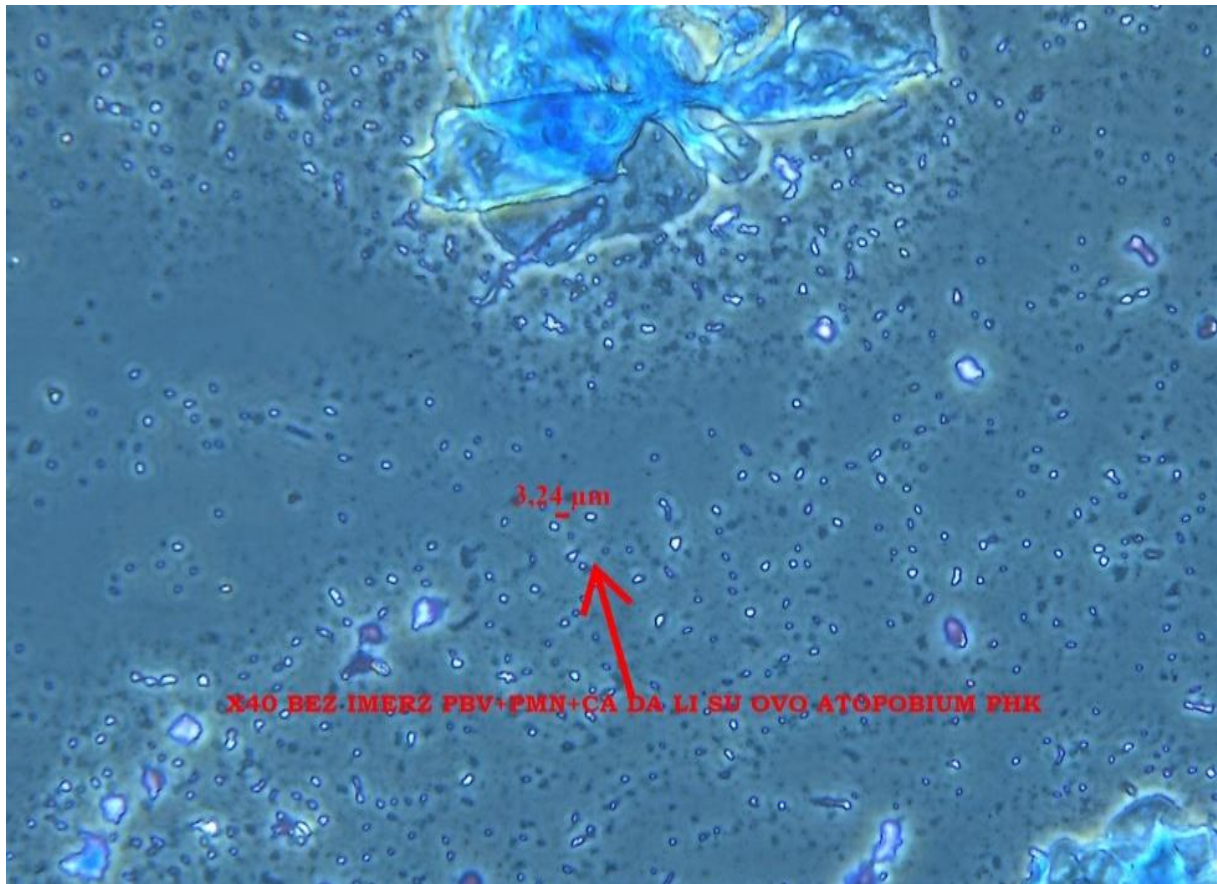
Slika 3.41: Predominiraju *A. vaginiae* i *Prevotella* spp. "Biopsija" ovoakvog preparata po Gramu i QPCR mogli bi nam pomoći da izdiferenciramo neke od ovih bakterijskih morfotipova.



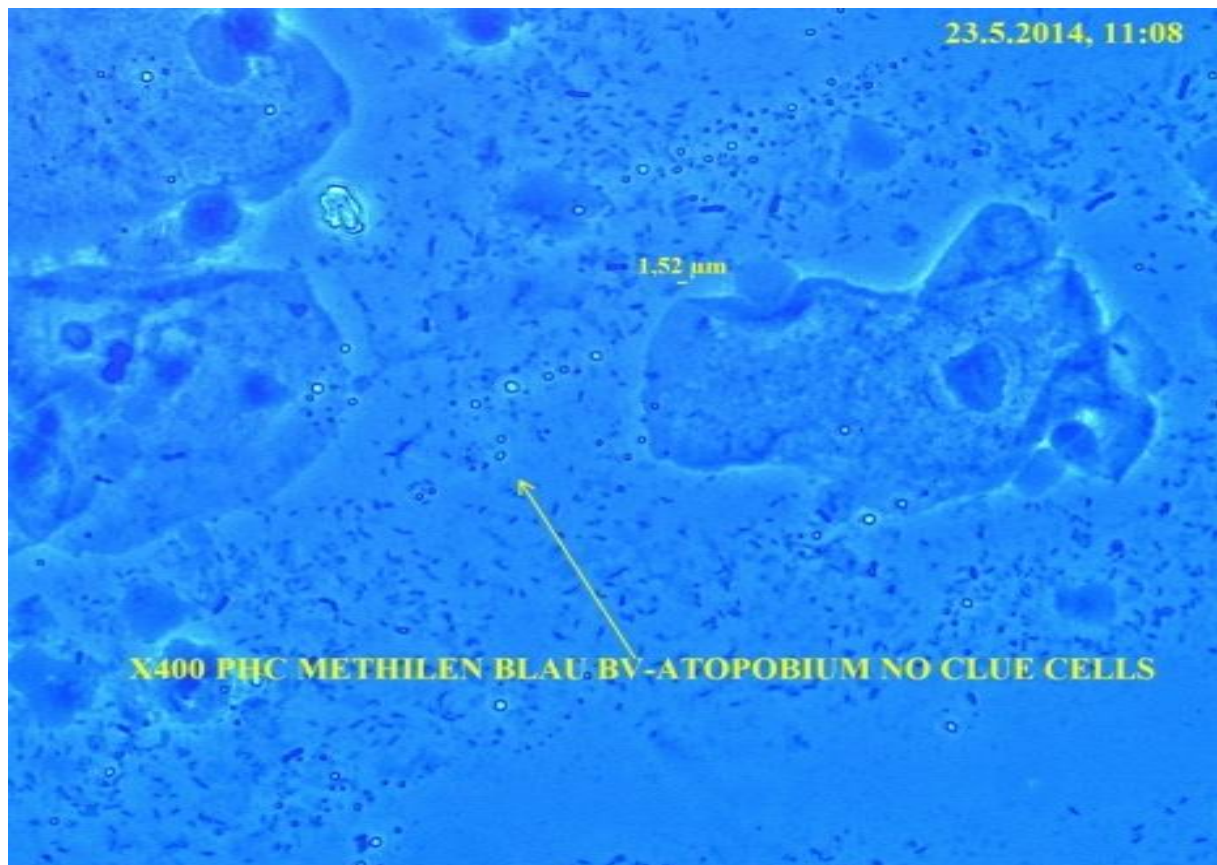
Slika 3.42: *A. vaginae* kod iste pacijentkinje na nativnom preparatu sa jednom kapi metilen blue, fazni kontrast, uvećanje X400, azni kontrast daje sliku “mehurića” koji se menjaju finim pomeranjem mikrometra (a-e), a bez faznog kontrasta vide se obojene veće “koke



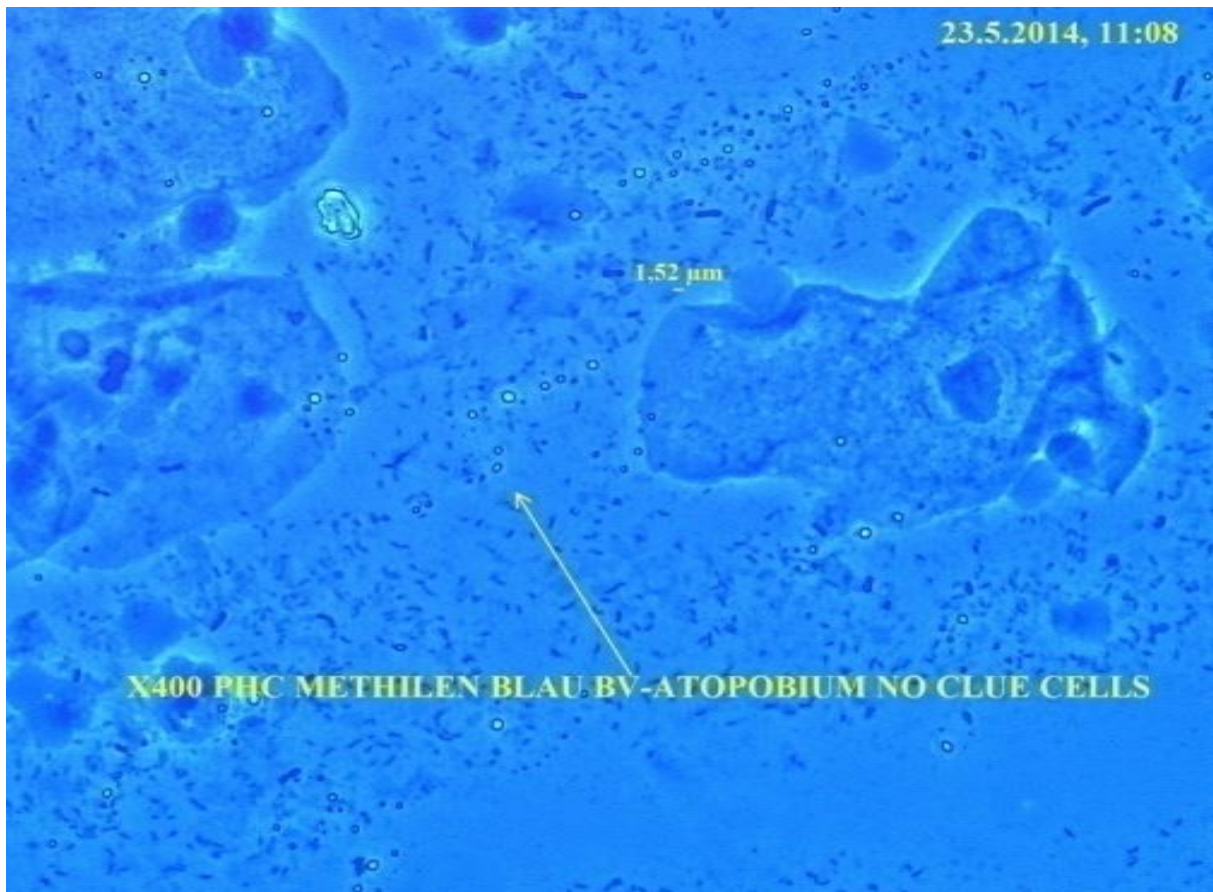
Slika 3.43: Pored *A. vaginae* vide se PMN, hife CA, retke štapićaste forme i dosta sitnih bakterijskih formi (SBF), ali nema clue cells.



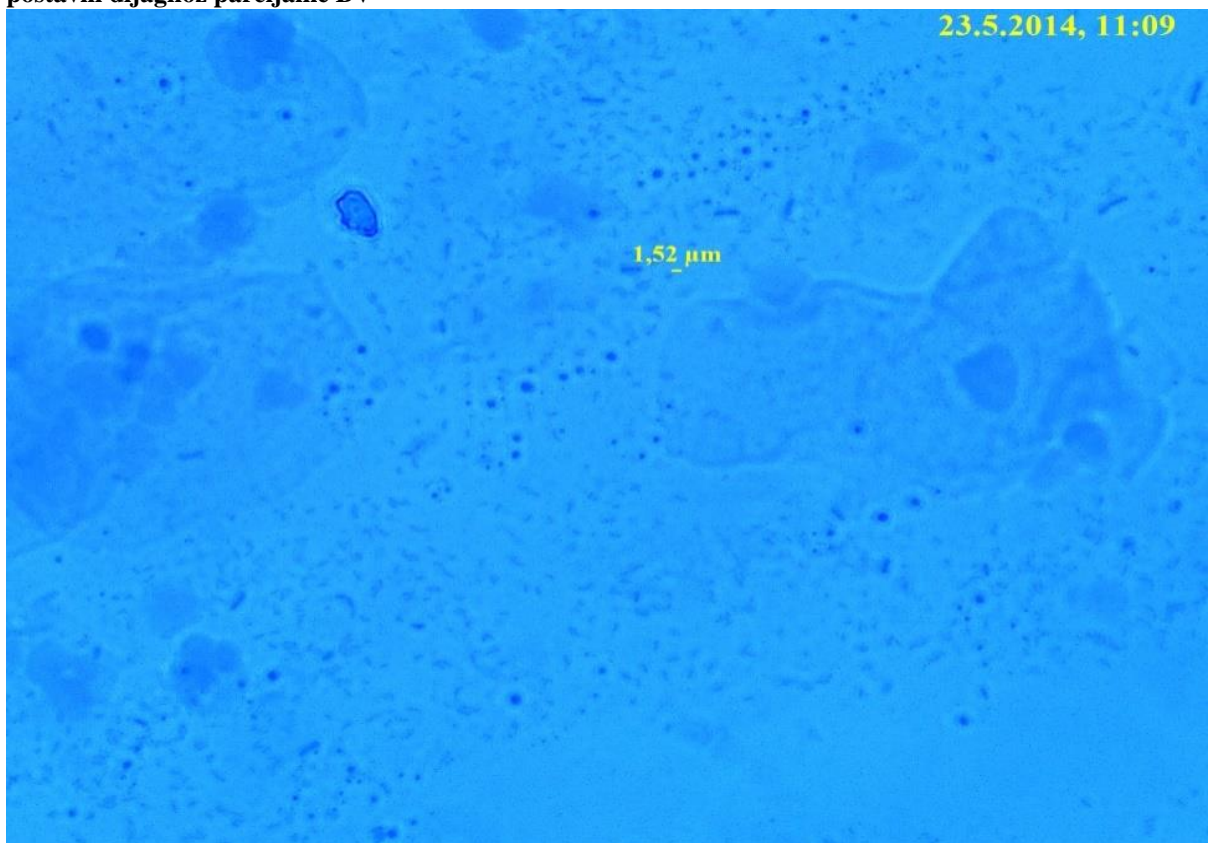
Slika 3.44: Ukoliko su clue cells obavezan dijagnostiki kriterijum u Amselovom kliničkom skor u onda kod ove pacijentkinje ne bi postavili dijagnoz BV



Slika 3.45: Na uvećanju x400 ne možemo primeniti našu formula o odnosu ŠF/NŠF, jer se na ovom uvećanju i SBF prikazuju kao kraći štapići; nema clue cells-nema BV, ali ukoliko bi primenili...



Slika 3.46: Dondersovu podelu i konstatovali da ovde dominiraju SBF onda bi oni sa više iskustva postavili dijagnoz parcijalne BV



Slika 3.47: Bez faznog kontrasta nativni preparat sa jednom kapi methilen blue

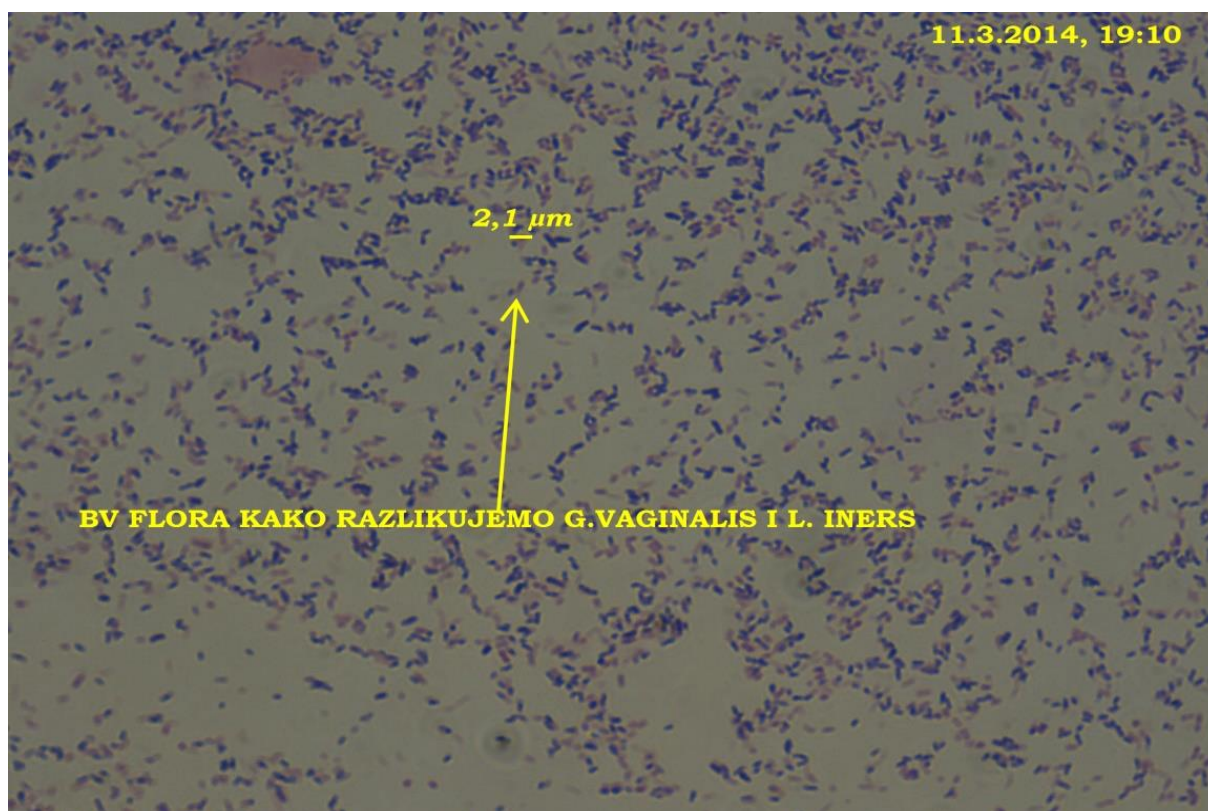
Ove slike sa *A. vaginae* kod iste pacijentkinje ide u prilog prethodnoj diskusiji u kojoj su Sha i saradnici na osnovu Amselovih kriterijuma postavili dijagnozu BV samo kod 77 od 203 pacijentkinje kod kojih je na osnovu Nugentovih kriterijuma postavljena dijagnoza BV, i jasno govori da BV postoji i bez *clue cells*. Treba malo iskustva da se *A. vaginae* prepozna fazno kontrastnom mikroskopijom, jer se njegov “izgled” pod mikroskopom menja sa pomeranjem mikrometra tako da početniku deluje kao artefakt jer se prvo prikazuje u obliku sitnih belih mehurića sa tačkicom u sredini, tako da se može pomisliti da se radi o artefaktu (koji inače nisu retki kod faznokontrastne mikroskopije, pogotovo ako stavite malo više fiziološkog rastvora), ili se brzim pomeranjem mikrometra može lako prevideti. Međutim, finim mikroskopiranjem vidi se da se ova formacija menja, smanji se, izgubi okrugao oblik, postane nepravilnija i nekako opet asocira na artefakt, da bi bez faznog kontrasta (poslednja fotografija) jasnije videli elipsastu formaciju, za koju verujemo da je *A. vaginae* .poslednja fotografija) jasnije videli elipsastu formaciju, za koju verujemo da je *A. vaginae*.

Na Slikama 3.47-3.49 (videti i Slike 3.28-3.31 3.33-3.34) prikazane su naše poteškoće tokom studije u razlikovanju *L.inersa* i *G. Vaginalis*, a u Tabeli 3.16 su prikazane fenotipske karakteristike najčešćih članova vaginalnog mikrobioma.

**Tabela 3.16: Fenotipske karakteristike najčešćih članova vaginalnog mikrobioma**

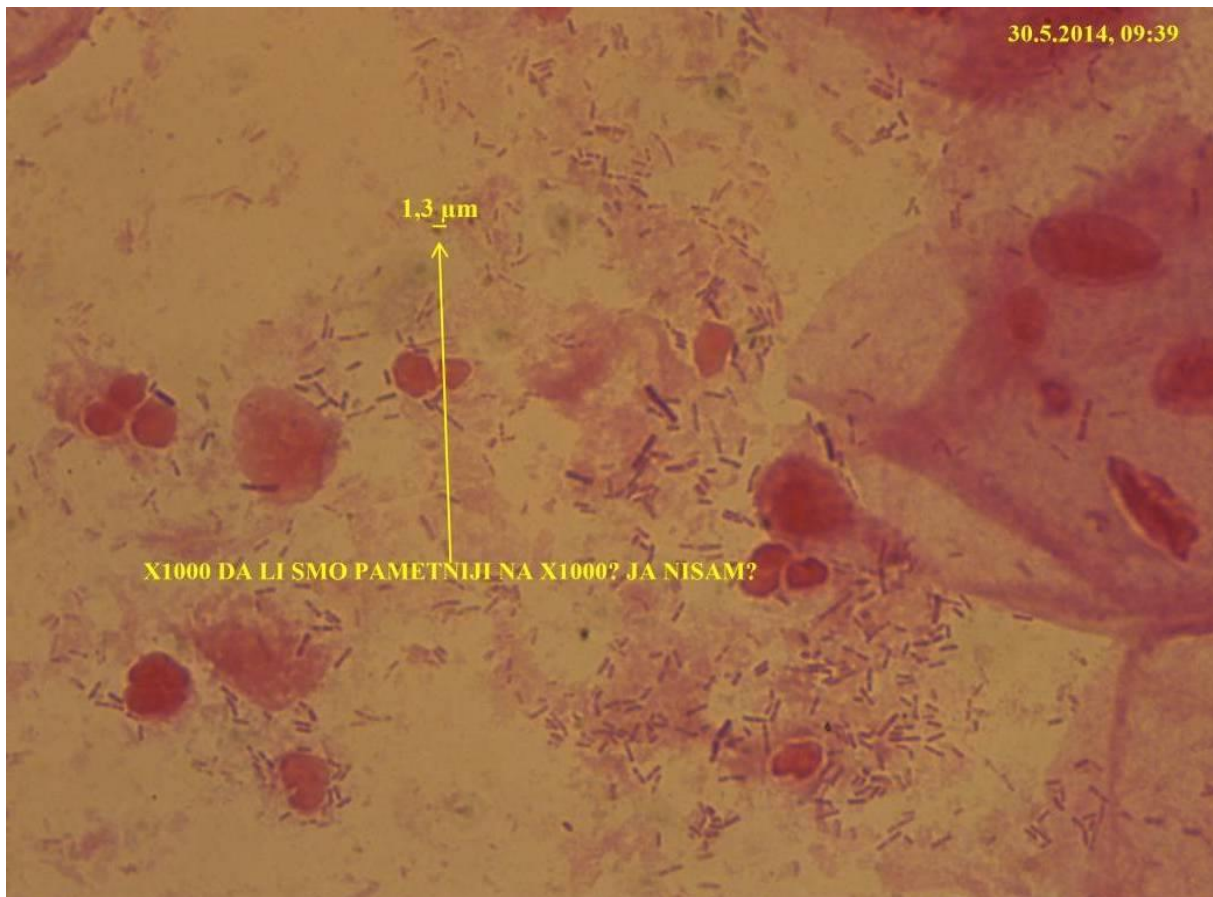
Naziv	Gram	Morfologija
<i>L.crispatus</i>	Gram +	Štapičaste forme 0.37-0.56x 2.9- 4.8 µm
<i>L.gasseri</i>	Gram +	ŠF, lanci,
<i>L. jensenii</i>	Gram +	ŠF 0.6-0.8x2.0-4.0µm
<i>L.iners</i>	Gram ±	Polimorfan, kokobacilaran, kratki i vrlo kratki
<i>G. vaginalis</i>	Gram ±	Poliomorfan, kokobacilaran, 0.4x 1-1.5 to 2-3µm
<i>Mobiluncus curtisii</i>	Gram ±	Zakrivljene ŠF <0.5x 1.5-1.9µm
<i>Atopobium vaginae</i>	Gram +	Polimorfan,kratak, eliptičan, male koke
<i>Eggerthella</i>	Gram +	ŠF 0.2-0.4 x 0.2-2-0 µm; chains
<i>Peptostreptococcus</i>	Gram +	Koke, kratki lanci, ili grupe
<i>Bifidobacteria</i>	Gram +	Ravni ili lako zakrivljeni Polimorfanog oblika, Y, V forme, sa čekičastim (batičastim) krajevima, grana se, 0,5-1,3x 1,5-8 µm “slične kineskom pismu”, neravnomerno se boje
<i>Actinomyces</i>	Gram +	Vitki, ravni ili zakrivljeni, 0.2-1x2- 5µm ili filamentni oblici 10-50µm granaje često, kratki oblici sa batičastim krajevima, Y, V,
<i>Corynebacterium</i>	Gram +	Ravni ili blago zakrivljeni štapići sa krajevima koji se sužavaju ili su ponekad batičasti 0,3-0,8x1,5-8,0 µm; prave V formacije; “slične kineskom pismu”;neravmomerno se boje; granule unutar ćelije
<i>Prevotella sp</i>	Gram -	Plejomorfane, 0.7–0.8 µm širine 1.3–2.1 µm
<i>Megasphaera</i>	Gram -	Koke, 1,5x 1,2 µm
<i>Mobiluncus mulieris</i>	Gram -	Zakrivljene ŠF <0.5x 2.9 µm
<i>Dialister micraero</i>	Gram -	Kokobacili, 0.2-0.3x–0.4- 0.6 µm
<i>Sneathia sanguineg.</i>	Gram -	Vrlo dugački ali i kratki, koke
<i>Leptotrichiaamnionii</i>	Gram -	Polimorfni, ravni ili zakrivljeni 0.8–1.5 x 5–15 µm
<i>Veillonella montpell.</i>	Gram -	Koke 0.3x0.5 µm
<i>Porphyromonas</i>	Gram -	Polimorfan, štapičaste ili kokoidne forme 0.4- 0.8x 0.8–6 µm
<i>Fusobacterium</i>	Gram -	Štapičaste forme sa zašiljenim krajevima
<b>BVAB1</b>	Nekultivisan	Zakrivljen tanak rod; 0.4x1.0-1.5 µm
<b>BVAB2</b>	Nekultivisan	Kratki, debeli
<b>BVAB3</b>	Nekultivisan	Dugački oblici izgleda lanceta

Vide pretežno vrlo kratke (1- 2,5  $\mu\text{m}$ ) štapićaste, kokobacilarne forme koje se boje Gram negativno, a koje morfološki odgovaraju i *L.inersu* i *G. vaginalis*. Na fotografijama treba ponovo uočiti marker i razumeti (kao što je to navedeno u metodologiji) da se na uvećanju X1000 kao ŠF prikazuju i formacije manje od 1,5  $\mu\text{m}$ . Na sledećoj fotografiji prikazan je Gram pozitivni, deblji štapić koji najverovatnije odgovara *L.crispatusu*, pre svega da bi se naglasila razlika između ova dva soja laktobacila. Shodno tome, jasno je da se ne može govoriti o iskustvu ili neiskustvu, niti o subjektivnom ili objektivnom, nego pre o objektivnim nedostacima dijagnostičkih procedura, nezavisno od toga da li preparate po Gramu ili NPVS gledate dve ili 20 godina. Iz rezultata ovog rada, i ličnog iskustva u gledanju preparatu po Gramu, zaključili bi da za Nugentove kriterijume nije potrebno nikakvo veliko ili višegodišnje iskustvo, na čemu se često insistira, nego da se taj posao može uspešno raditi i nakon intenzivne obuke od desetak dana. Ako već govorimo o iskustvu i krivi učenja, mislimo da je ono mnogo značajnije, a kriva učenja duža i teža za NPVS nego za pregled preparata po Gramu. Preliminarni rezultati sa nemedicinskim osobljem (rezultati nisu prikazani u ovom radu) ukazuju da ovde opisana metodologija i pregled mikroskopskog preparata po Gramu na uvećanju x200 (NP-6G) ima vrlo kratku krivu učenja i ne zahteva nikakvo prethodno medicinsko obrazovanje jer se dijagnoza u najmanje 60-70% slučajeva svodi na prepoznavanje tipičnih slika koje ćemo prikazati na slikama 3.51-3.59.

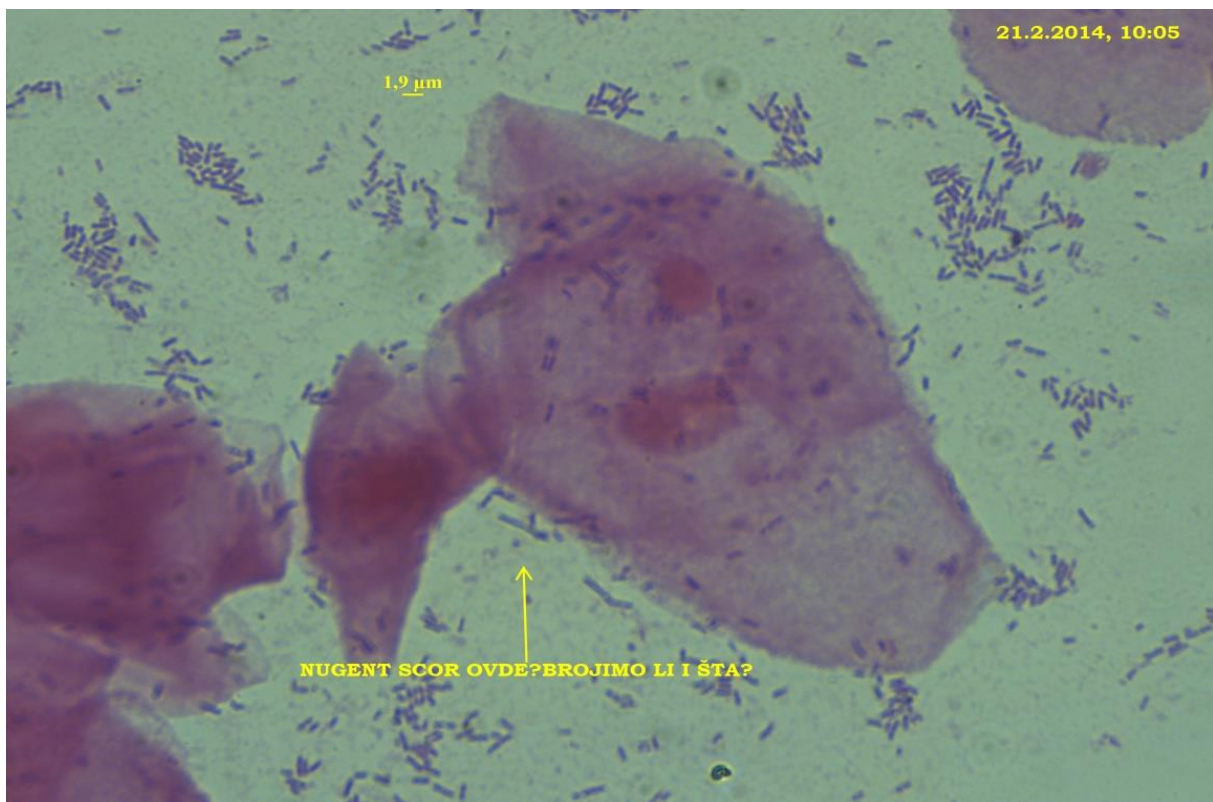


Slika 3.48: *G. vaginalis* i *L.iners*: plejomorfni, Gram varijabilni, sličnih dimenzija (0.7–0.8  $\mu\text{m}$  širine 1.3–2.1  $\mu\text{m}$  dužine) mikroskopski se ne mogu razlikovati bez obzira na uvećanje x200 ili x1000

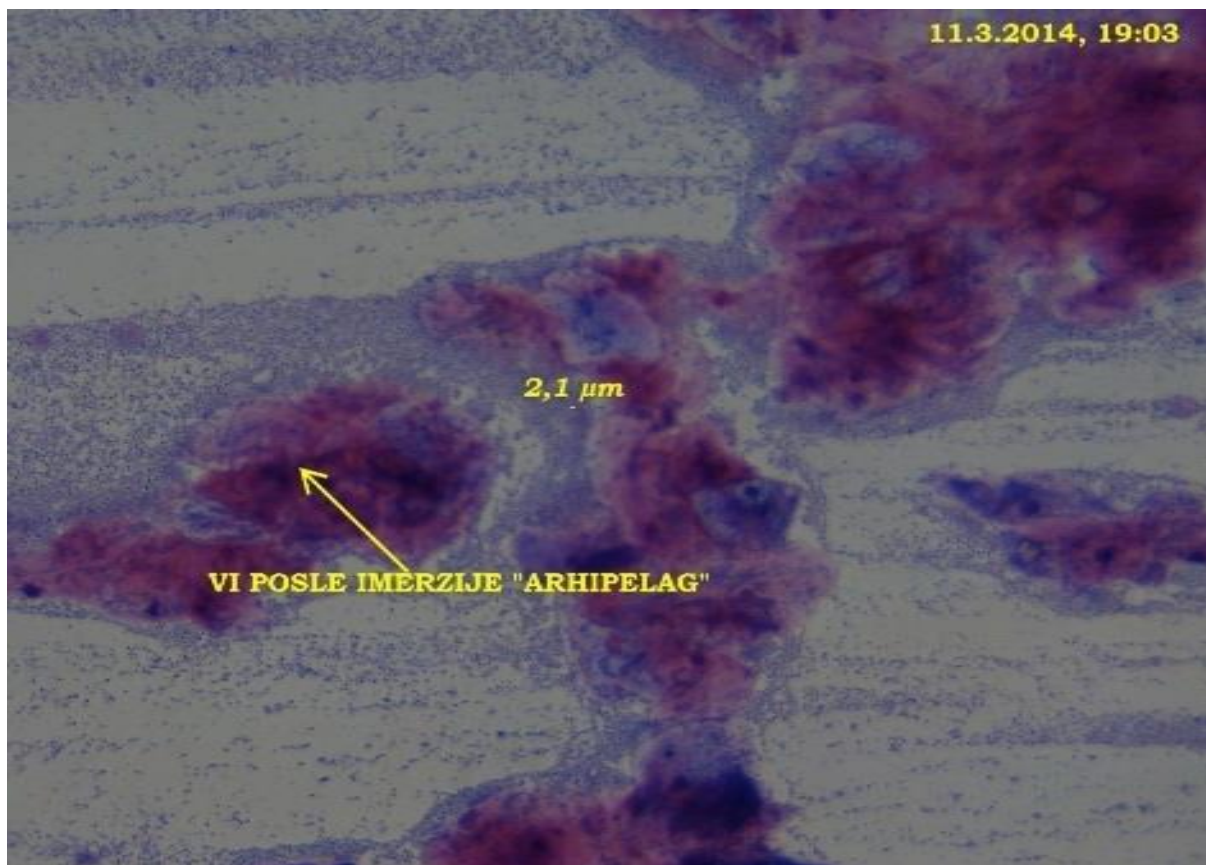




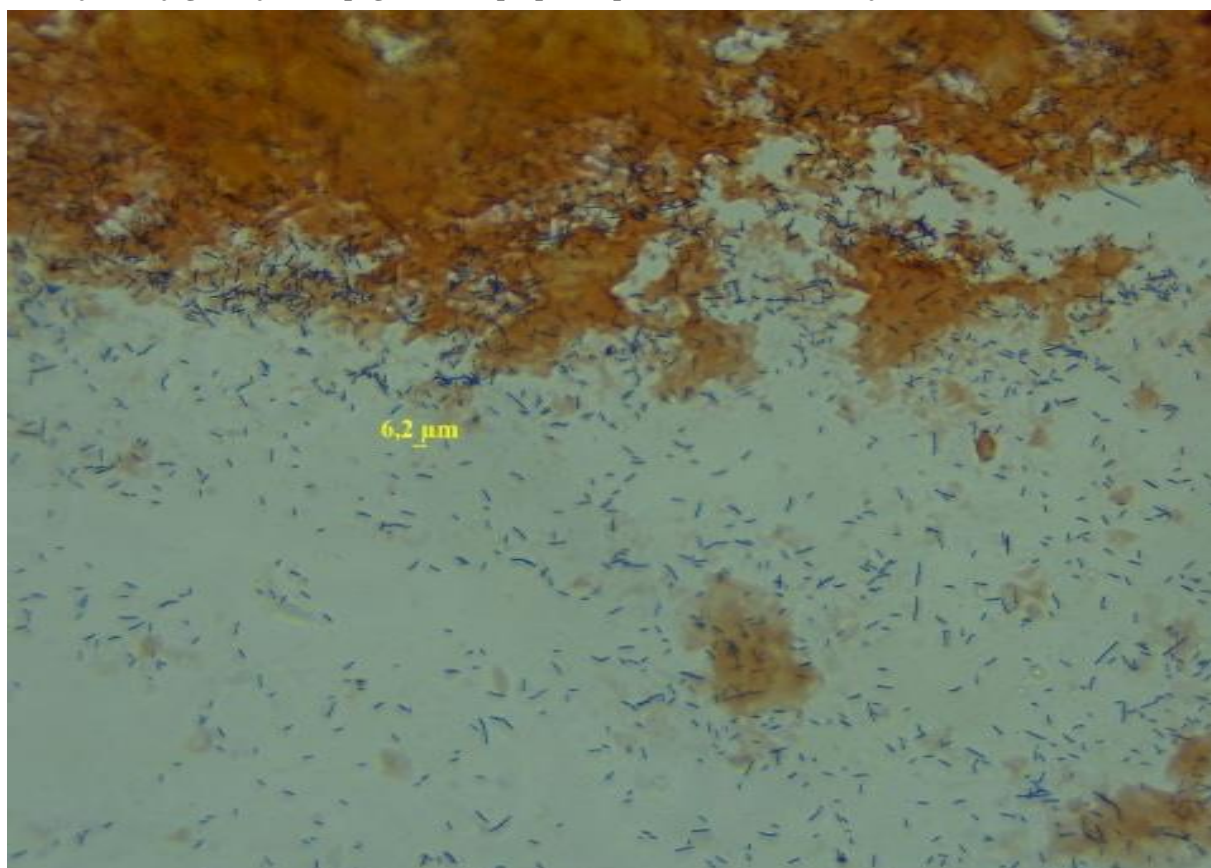
Slika 3.49: *G. vaginalis* i *L.iners*: plejomorfni, Gram varijabilni, sličnih dimenzija (0.7–0.8  $\mu\text{m}$  širine 1.3–2.1  $\mu\text{m}$  dužine) mikroskopski se ne mogu razlikovati bez obzira na uvećanje x200 ili x1000



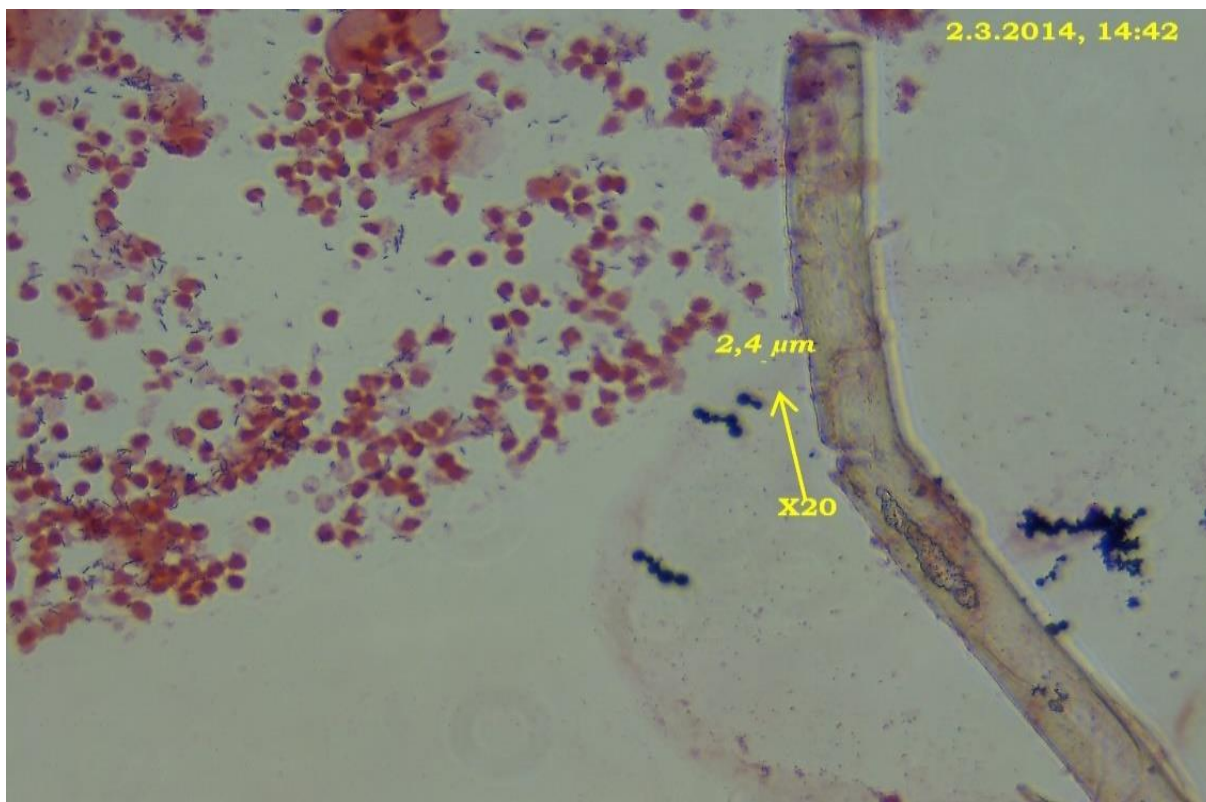
Slika 3.50: *G. vaginalis* i *L.iners* u Nugentovom bodovnom zbiru imaju potpuno suprotne vrednosti preko 30 morfotipova Gardnerelle 4 boda, a preko 30 laktobacila 0 bodova!



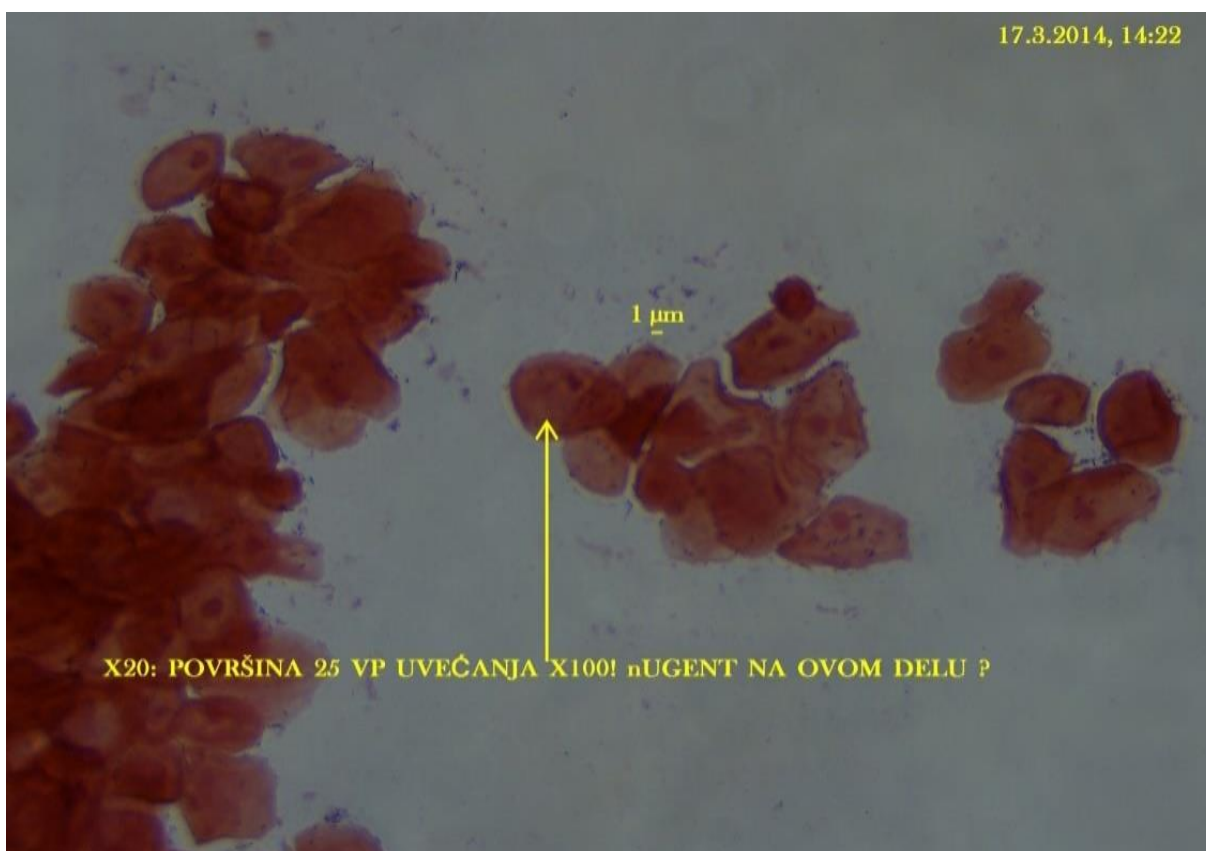
Slika 3.51: Tipična slika “arhipelaga” i “peščanih staza” kod pacijentkinja sa BVF na uvećanu x200 sa imerzijom; dijagnoza jednim pogledom na preparat; ponekad se kao na ovoj slici vid i biofilm



Slika 3.52: Normalan nalaz (NF) predomancija gram pozitivnih štapićastih formi ravnih krajeva; broj bakterija (laktobacila) kod NF je uvek neuporedivo manji od BVAB kod BVF.



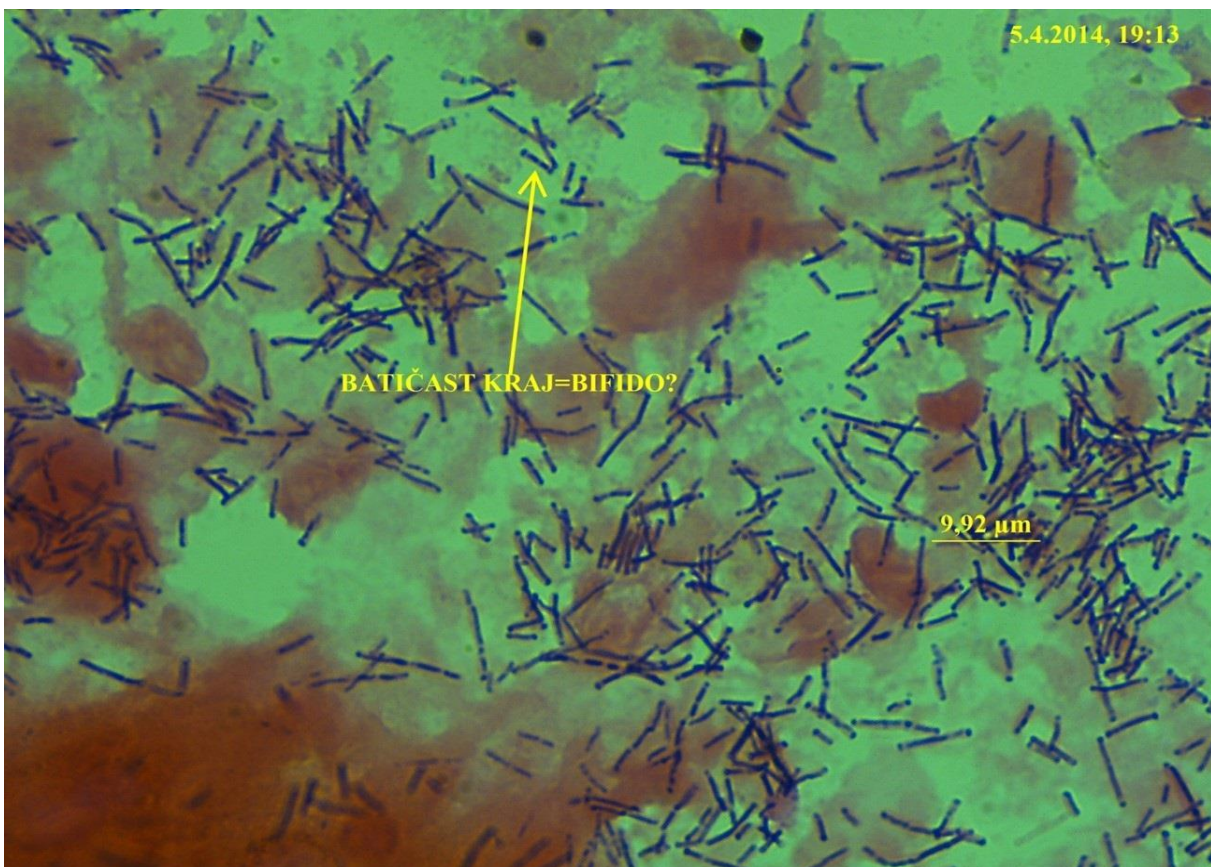
Slika 3.54: Veliki broj PMN, spore kvasnica koje se boje intenzivno G+, većina kvasnica je iz roda *Candida* i u ovom ispitivanju su obeležavane kao CA, dakle ne mislimo samo na *C. albicans* nego i druge sojeve



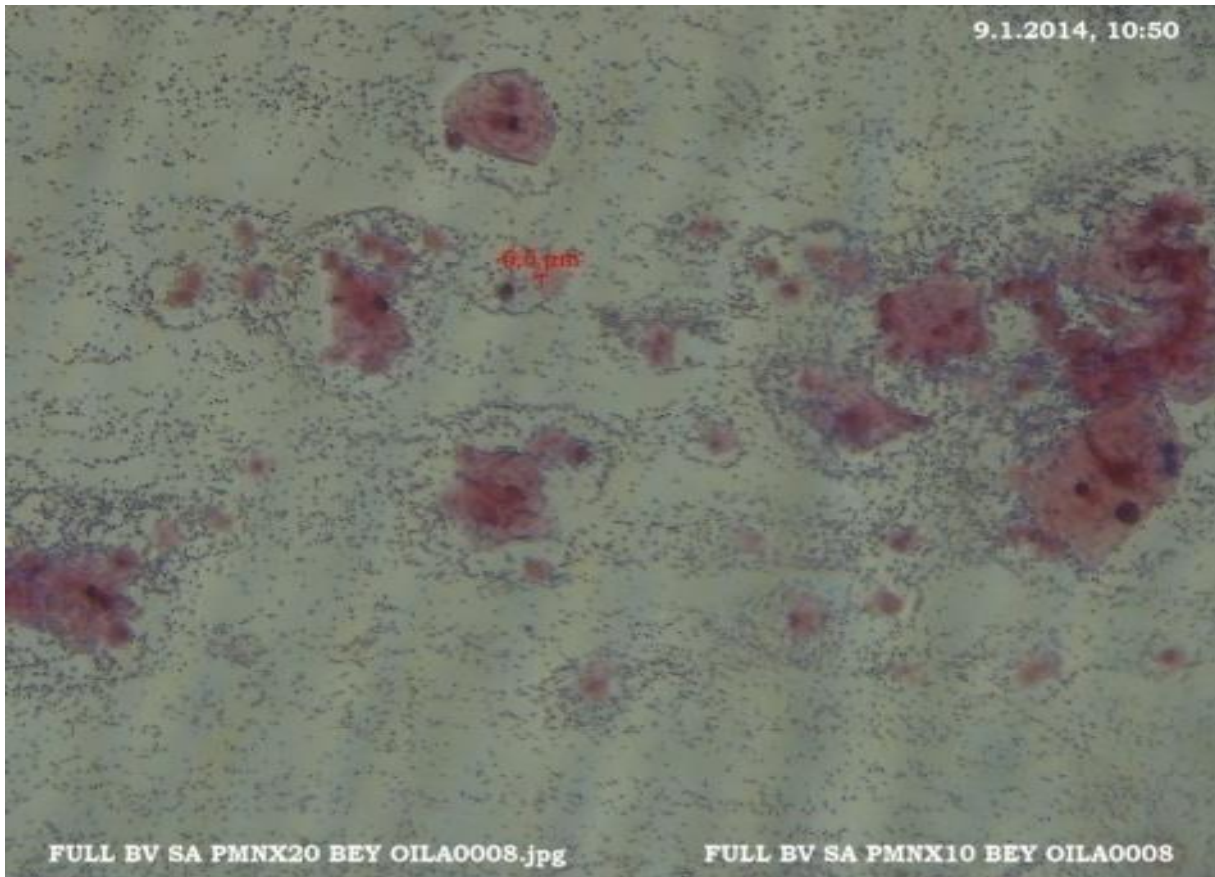
Slika 3.53: Uvećanje x20 Hipocelularan preparat (NULL) verujemo da je na ovakvim preparatima broj bakterija manji od  $10^4$ - $10^5$  i da zbog toga mikroskopskim pregledom ne možemo proceniti kvantitativne i kvalitativne odnose različitih bakterijskih morfotipova; veći dijagnostički značaj pH i KOH test



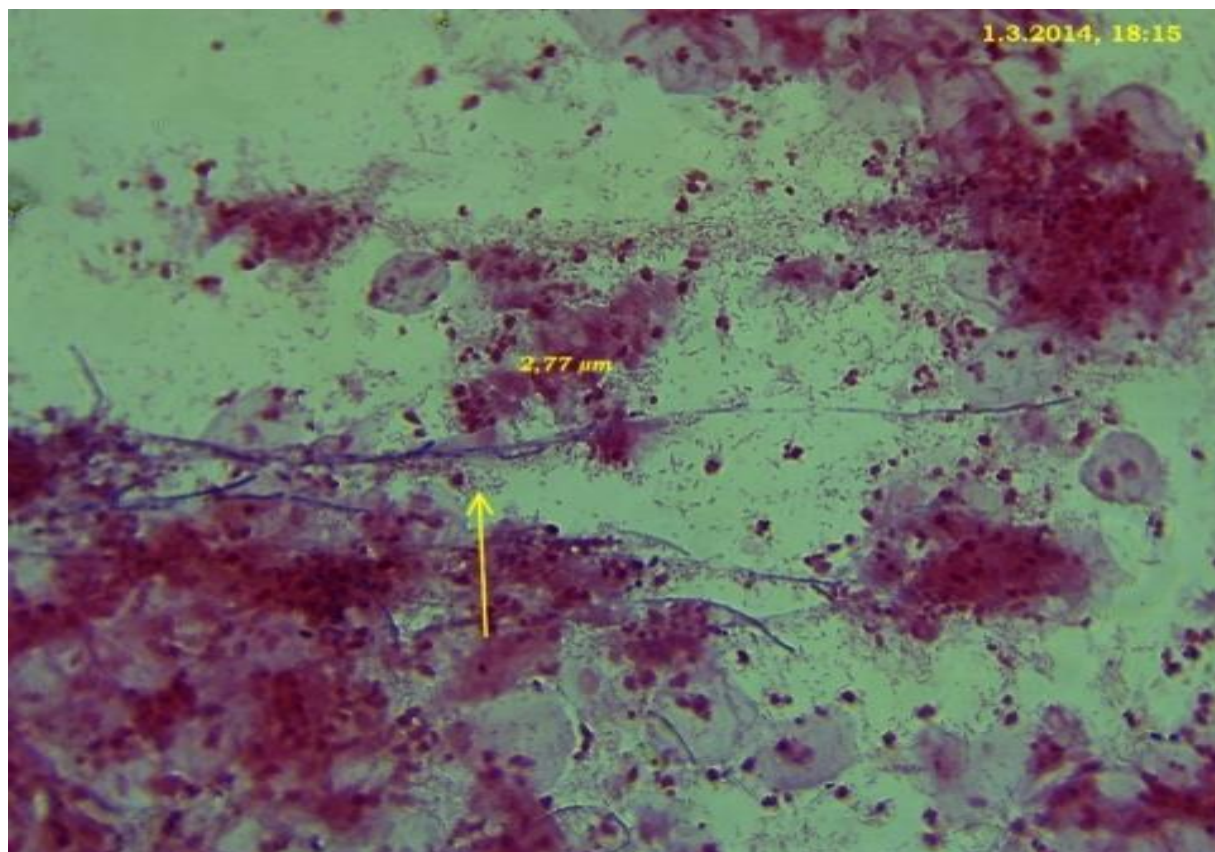
Slika 3.55: Koke su na uvećanju x200 posute kao sitni crni prah obično raporedene po regionima i neverovatno zvuči da ih lakše nalazimo i prepoznajemo na uvećanju x200 sa imerzijom; i one sa kao CA najčešće nalaze u nakupinama epitelnih ćelija



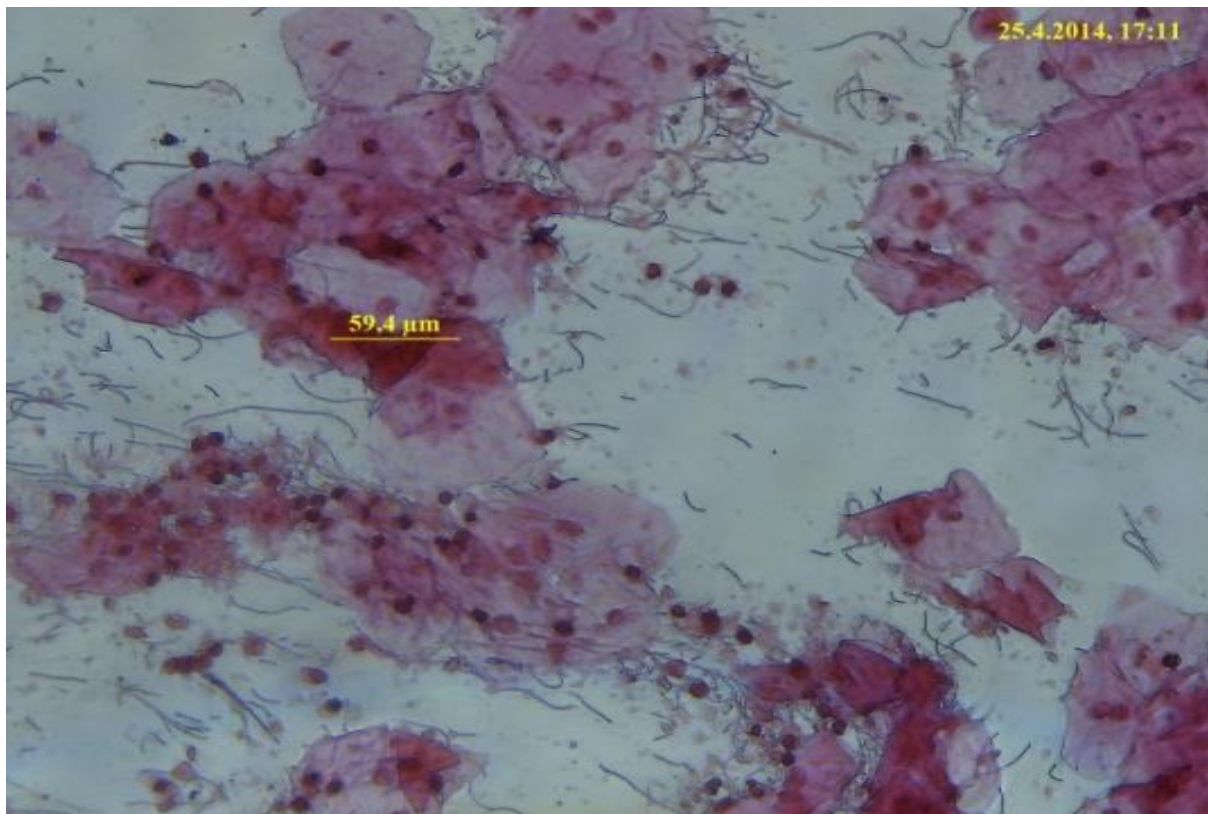
Slika 3.56: tapićaaste G<sup>+</sup> slične laktobacilima(ravni krajevi) sa čekićastim zadebljalim krajevima: neravnomerno se boje, granulirane, u ovom radunazvane BIFIDO forme, a za koje verujemo da su češće koreiformne bakterije (*Corynebacteria*)a rede *Bifidobacteria* ili *Actynomyces*



Slika 3.57: Slika arhipelaga (BVF) sa brodovima (PMN); dijagnoza BV se postavlja jednim pogledom na preparat a pregledom veće površine preparata veće su šanseza detekciju CA i precizniju procenu PMN



Slika 3.58: Karakteristične hife CA sa povećanim brojem PMN i bakterijskom florom u pozadini u kojoj dominiraju L.iners i G. vaginalis



Slika 3.59: LEPTO forme su dugačke tanke G+ forme često izvijugane i čudnih oblika, uvek tanje od hifa kvasnica, a u pozadini je obično mali broj bakterijski (hipocelularana)



Slika 3.60: Disbioza vs homeostaza

1Slika preuzeta iz rada Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. Cell Microbiol. 2014 Jul;16(7):1024-33

Iskustvo nije od velikog značaja ukoliko pod mikroskopom gledate hipocelularan preparat, dakle pacijentkinje koje smo mi u ovom ispitivanju podelili u dve grupe NN i BVN, i za koje smo već rekli da su osnovni izvor neslaganja u poređenju različitih dijagnostičkih kriterijuma i o kojima ćemo reći nešto više u ovom delu diskusije. Možda je ovaj mikroskopski nalaz (NULL) lakše razumeti, ako ga budemo posmatrali u jedno širem kontekstu, kontekstu disbioza. Disbioza (Slika 3.59) se definiše u najširem smislu kao bilo kakva promena u sastavu rezidualne komnesalne zajednice, odnosno zajednice koja je nađena kod većine zdravih pojedinaca. Termin disbioza se ređe koristi u ginekologiji i on je mnogo češći kod gastroenterologa koji razlikuju tri kategorije disbioza: 1) Smanjenje broja ili potpuni gubitak korisnih mikroorganizama; 2) Porast u broju patogenih ili potencijalno štetnih mikroorganizama; 3) Gubitak u različitosti (diverzitet) mikrobiološke zajednice.

Naravno da je i ova podela samo načelna, jer se radi o dinamičnim zajednicama u kojima je moguć prelaz iz jednog oblika u drugi, a i različiti spoljašnji faktori mogu na to uticati. Tako, terapija antibioticima može dovesti do gubitka korisnih mikroorganizama (*L. crispatus*) značajnih za zdravu vaginalnu floru, što onda može omogućiti porast u broju komensala (*C. albicans*) i dovesti do bolesti (vaginalna kandidoza), sa sledstvenim inflamatornim odgovorom koji može imati štetne posledice po domaćina (PP). Preciznija i tačnija od ove teoretske spekulacije bila bi ona koja bi tvrdila da primena antibiotika dovodi do poremećaja kvantitativne i kvalitativne ravnoteže između velikog broja mikroorganizama, koji će dovesti do stvaranja povoljnih uslova za rast i razvoj *C. albicans*. Kažemo preciznija i tačnija jer se gotovo uvek radi o poremećaju u mikrobnoj zajednici koji je mnogo značajnije od uticaja pojedinih mikroorganizama. Dosadašnja ispitivanja ukazuju da sastav i stabilnost vaginalnog mikrobioma zavise od velikog broja faktora i da se značajno razlikuju kod većine žena, te da se na osnovu jednostavne formule koja proračunava odnos različitih vrsta bakterija u jednoj mikrobiološkoj zajednici ne može izračunati šta je "normalan" i "zdravo", a šta "patološko" ili "bolesno". Treba razumeti da ne govorimo o pojedinačnim mikroorganizmima, i njihovom uticaju na zdravo-bolesno, već o mikrobiološkim zajednicama koje promovišu zdravlje domaćina. A kao što se vidi iz podele disbioza (3 grupa) i gubitak različitosti (diverziteta) mikrobiološke zajednice, takođe predstavlja jedan od oblika disbioze, a on suštinski odgovara pacijentkinjama koje su u ovom ispitivanju definisane kao NN i BVN. Naravno treba razumeti da se ova podela disbioza odnosi na mikrobiom gastrointestinalnog trakta čiji je i kvalitativni i kvantitativni biodiverzitet neuporedivo veći od mikrobioma vagine koja u odnosu na gastrointestinalni trakt predstavlja jednostavnu ekološku zajednicu. Ali ovim želimo da pokažemo da bi po istom principu, ovoj grupi disbioza pripale pacijentkinje koje su Ison/Hay-

a kategorisali kao “0” (u našim tabelama čist), nalaz koji izgleda potpuno “čist” bez bakterijskih formi. Kako podela po Nugentu nema ovu grupu pacijentkinja one u takvim ispitivanjima bivaju svrstane u neku od 3 Nugentove grupe, i tako “nestaju” iz ispitivanja. Dondersovi kriterijumi su ograničeni na dijagnozu AV, ali svakako bolje ukazuju na različite odnose u broju laktobacilarnih i sitnih bakterijskih formi, i na neki način problem intermedijarnog nalaza (originalno grupa IIa i IIb), ali takođe ne pominju ovu kategoriju pacijentkinja koja bi odgovarala Ison/Hayovoj grupi “0”, našoj NULL. Ovakva grupa pacijentkinja, ili bolje rečeno takav mikroskopski nalaz postoji i na NPVS, i to u istom procentu kao i na preparatu po Gramu (10-30%). Naša podela (NP-6G) ne samo što prepoznaje ovu grupu pacijentkinja, nego je smatra veoma važnom, odnosno grupom od posebnog interesa za koju u ovom trenutku nemamo ni dijagnostičke kriterijume niti znamo njen klinički značaj a oko 17% pacijentkinja svrstali smo u ovu grupu. Po našem mišljenju u ovakvim slučajevima dolazi pre svega do značajnog smanjenja broja bakterija u vaginalnom mikrobiomu i zbog tako malog broja ne možemo da ih vidimo na preparatu bojenom po Gramu. Naime dobro je poznata činjenica da bakterije moraju da pređu određen broj, koncentraciju ili broj kolonija po mililitru ili gramu uzorka da bi smo uopšte mogli da ih vidimo na preparatu obojenom po Gramu. U zavisnosti od uzorka ova se granica obično kreće  $>10^4$ - $10^5$ . U nekim uzorcima (urin) nalaz po Gramu može da služi kao skrining test jer ako ne vidimo bakterije ili ih je vrlo malo pretpostavljamo da je njihov broj manji od  $10^5$  i da u takvim slučajevima nema potrebe raditi urinokulturu. Rezultati našeg ispitivanja jasno ukazuju grupa pacijentkinja sa malim brojem bakterijskih formi izvesno postoji kao da je diferencijacija između zdravog i bolesnog u ovoj grupi najteža jer ne možemo primeniti postupak koji smo naveli za nalaz urina. Zato mislimo da kod ovakvih nalaza nije ni moguća dijagnoza samo na osnovu mikroskopskog nalaza bez obzira o kakvom se preparatu radi ili na kom uvećanju ga gledamo. Dakle zbog ukupno malog broja bakterija njihovi kvantitativni ili kvalitativni odnosi ostaju nepoznati nakon mikroskopskog pregleda, jer je moguće da u toj flori preovlađuju i laktobacili, ali je moguće i suprotno. Ukoliko se oslonimo samo na mikroskopski pregled onda je sigurno da bi u svakom ponovnom gledanju određen broj ovih pacijenata svrstali u drugu grupu u odnosu na prethodni nalaz. Naravno, da se ovakav nalaz može tumačiti i kao tranzicioni, prelazni, ali bi se takođe mogao i tumačiti kao disbioza sa gubitkom kvantitativnog diverziteta bakterijskih formi. Ako ovo i prihvatimo kao tranziciono stanje, problem je što ne znamo da li se tranzicija “kreće” u smeru od bolesnog prema zdravom ili obrnuto, što bi naravno bilo odlučujuće za kliničara, odnosno terapijski pristup takvom pacijentu. Suštinski, najvažnije praktično pitanje je da li su ove pacijentkinje zdrave ili bolesne, i da li treba da se leče i kako? S jedne strane, rezultati i studija koje su koristile kulturu kao i



rezultati najnovijih molekularnobioloških studija ukazuju na bar dva stanja koja bi mogla dovesti do ovakvih poremećaja vaginalne flore, a koja bi mogli smatrati fiziološkim. Prvo je vezano za menstruaciju i period neposredno nakon menstruacionog krvarenja, a drugo je postmenopauza [462-470]. I u jednom i u drugom slučaju dolazi do smanjenja estrogena, broja laktobacila i raznolikosti vaginalne flore. Prekomerna primena antibiotika takođe bi mogla dovesti do ovakvog stanja. Ali 17 % naših pacijentkinja koje su svrstane u grupu NULL su trudnice koje pre uzimanja uzorka nisu uzimale nikakvu terapiju? Pitanja na koja trenutno nemamo odgovore jeste koliko su ovakve promene flore česte i kolika je rezilijencija vaginalnog ekosistema, odnosno sposobnost da se bez intervencije spolja (terapija) vaginalni ekosistem vrati u zdravo stanje i koliko je vreme potrebno da bi se to desilo. Na osnovu iznesenih činjenica i našeg kliničkog iskustva mislimo da u ovakvim slučajevima mikroskopski nalaz ima mali značaj, odnosno da je pokušaj da ovu grupu pacijentkinja na osnovu mikroskopskog nalaza u zdrave, intermedijarne i BV, kao što smo već rekli osnovni uzrok dijagnostičkih neslaganja, a verovatno i prilično kontradiktornih rezultata u lečenju, recidivima i kliničkom ishodu, kao i rizicima za druge neželjene događaje. Na osnovu rezultata našeg ispitivanja i našeg kliničkog iskustva mislimo da u ovakvim slučajevima dijagnozu treba postavljati na kliničkog nalaza, odnosno prvenstveno na osnovu rezultata pH testa i probe sa 10% KOH. U našoj svakodnevnoj kliničkoj praksi pacijentkinje sa pozitivnim KOH testom i  $\text{pH} > 4,5$  a sa mikroskopskim nalazom NULL posmatramo kao pacijentkinje sa poremećenom vaginalnom florom ili „mikroskopski nevidljivom“ blagom BV i dajemo terapiju prebioticima i acidifikantima. I pacijentkinje sa negativna dva testa dobijaju istu terapiju, jer smatramo da ovakvo stanje može biti rizično za nastanak težih formi BV (parcijalna ili full), a ovakva terapija ne može naneti nikakvu štetu pacijentkinji. Primenu metronidazola ili drugih antibiorika predviđenih za lečenje BV u ovakvim slučajevima ne samo da smatramo neopravdanom, nego mislimo da bi mogla da bude potencijalno štetna. Tako je poznato da terapija metronidazolom dovodi i do uništavanja određenih sojeva laktobacila, najvećeg broja BVAB, ali je takođe poznato da je *A.vagine* rezistentan na ovaj lek. Teoretski, ovakvim „lečenjem“ mogli bi smo da napravimo idealne uslove za rast i razvoj *A.vagine*. Još interesantnije je pitanje da li bi nove objektivnije molekularne metode mogle pomoći da u ovoj grupi pacijentkinja preciznije povučemo granicu između normalnog i patološkog. Teoretski, svakako bi mogle, jer bi nam mogli pružiti bolji uvid u kvantitativni i kvalitativni sastav ove mikrobne zajednice, i mogućnost poređenja sa kliničkim i mikroskopskim podacima. Međutim da bi osmislili buduća ispitivanja prvi korak je da ovu grupu pacijentkinja moramo izdvojiti u posebnu kategoriju odnosno postići konsenzus u dijagnostičkim kriterijumima, jer kao što smo prethodno objasnili sadašnje podele

ne “prepoznaju” ovu grupu pacijentkinja. Ovo je još jedan razlog što mislimo da bi naša nova metodologija mikroskopskog pregleda (NMMP) koja omogućava da se na veoma brz i jednostavan način izdvoji ova grupa (NULL) pacijentkinja, bila bolja od postojećih u komparativnim studijama kliničkih, mikroskopskih i molekularnobioloških nalaza. Međutim i stav da se kod ovakvih pacijentkinja radi o disbiozi koja je uzrokovana smanjenjem broja i različitosti mikrobiološke zajednice potpuno je prihvatljiv, odnosno po našem mišljenju mnogo prihvatljiviji ili bar podsticajni za dalja ispitivanja, nego da ovu grupu pacijentkinja proglasimo intermedijarnom ili zdravom, odnosno onima koje nemaju BV (engl. *non-BV*). S obzirom da je ovo ispitivanje rađeno u populaciji trudnica, uticaj menstruacije i menopauze su isključeni, ali oko 17% naših pacijentkinja (NN+BVN) moglo bi se svrstati u treću kategoriju disbioza. I zaista, po rezultatima najnovijih molekularnobioloških studija, prisustvo i koncentracije *L. crispatus*, je svakako najvažniji parametar za “zdravo” u vaginalnoj flori. Na osnovu našeg iskustva i mikroskopskog pregleda vaginalnog preparata, bez ikakvih molekularnobioloških ispitivanja, slobodni smo tvrditi da kod ovakvih pacijentkinja gotovo uopšte nema *L. crispatus*, odnosno da je njegov broj značajno smanjen [216, 471, 472]. S druge strane najnovija ispitivanja pokazuju da u vagini pored *L. crispatus* ima i značajan broj drugih laktobacila koji promovisu zdravlje, ali bi takođe mogli zaključiti da se na osnovu onoga što znamo o fenotipskim karakteristikama npr. *L. jensenii*, ni ovi laktobacili ne nalaze na mikroskopskom preparatima ove grupe pacijentkinja. Laktobacili odnosno ŠF koje nalazimo na ovakvim preparatima obično su vrlo kratki, granične veličine u našem razlikovanju ŠF od NŠF (1,5-2,5 µm), gram-varijabilni i najverovatnije predstavljaju *L. iners*. S druge strane, poznato je da je *L. iners* predominantna vrsta laktobacila kod najvećeg broja pacijentkinja sa BV, intermedijarnim nalazom, ali da je i sastavni član laktobacilarne zajednice kod zdravih žena [130-135]. Verhelst i saradnici ukazuju da je predominacija *L. inersa* i *L. gasseri* znak nestabilnosti vaginalnog ekosistema i lakše mogućnosti za nastanak patološke vaginalne flore, dok De Backer sa saradnicima postavlja pitanje da li se predominacija *L. inersa* uz nedostatak drugih laktobacila uopšte može smatrati zdravom vaginalnom florom [456].

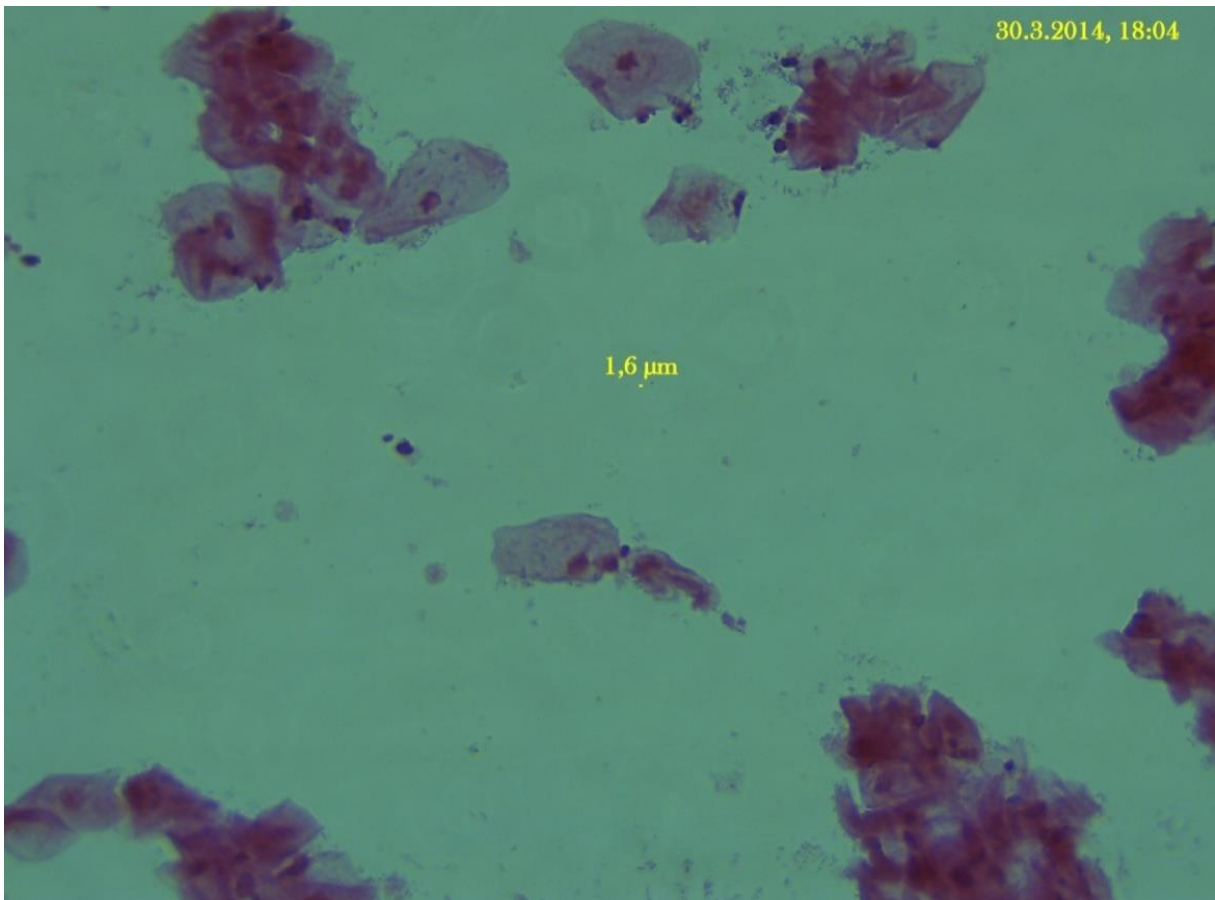
Dakle, ako na trenutak i zaboravimo podatak da pod mikroskopom ne možemo razlikovati *L. iners* i *G. vaginalis*, ili pretpostavimo suprotno, dakle da ih možemo razlikovati u 100% slučajeva, moramo se zapitati da li nam to što smo na hipocelularnom preparatu (NULL) izbrojali nekoliko ili desetak *L. inersa* više od *G. vaginalis* na 20 od 17 000 vidnih polja dozvoljava da postavimo dijagnozu normalne vaginalne flore (Nugentov skor). Naravno ni naša metodologija na x200 ne dozvoljava i ne omogućava mnogo precizniju razliku jer kao što smo rekli i na ovom uvećanju mi vidimo vrlo kratke granične ŠF, za koje verujemo da su *L. iners* pre

nego BVAB. Dakle, ako to i jeste *L.iners* njihov tako mali broj i prisustvo NŠF (a često i koka) ne daje nam pravo da postavimo dijagnozu normalnog nalaza. Dakle mi smo u ovom ispitivanju napravili razliku između pacijentkinja sa nalazom NN i BVN, ali i podela u kojoj ove pacijentkinje predstavljaju jednu grupu (NP-3G) nije bez osnova. Ponovićemo, u svakodnevnoj praksi, a i tokom našeg ispitivanja, pacijentkinjama sa ovakvim mikroskopskim nalazom ordiniramo terapiju, prebiotici sa acidifikacijom vagine. Problem u kliničkom radu mogu biti pacijentkinje kod kojih su pozitivni nalazi testa sa 10% KOH, vaginalni pH>4 i pojačanu sekreciju tako da bi na osnovu Amselovih kriterijuma kod takvih pacijentkinja mogli postaviti dijagnozu BV. Tako je u našem ispitivanju oko 40% pacijentkinja iz grupe NULL (NN+BVN) imalo pozitivan test sa KOH i vaginalni pH>4,5, od čega su oba testa bila pozitivna kod oko polovine od ovih pacijentkinja. Međutim čak i u takvim situacijama, kada na osnovu Amselovih kliničkih kriterijuma možemo postaviti dijagnozu BV, naš terapijski pristup se ne menja.

Jednostavnije je ukoliko pogledamo slike (Slika 3.18 i 3.19) na kojima smo na uvećanju x200 i x1000 postavili dijagnozu BVF i BVN. Dakle na osnovu većine postojećih kriterijuma ove dve pacijentkinje bile bi svrstane u istu grupu, a pitanje koje se nameće je da li ove dve pacijentkinje imaju isti poremećaj vaginalne flore i da li se i klinički razlikuju koliko se razlikuju vizuelno.

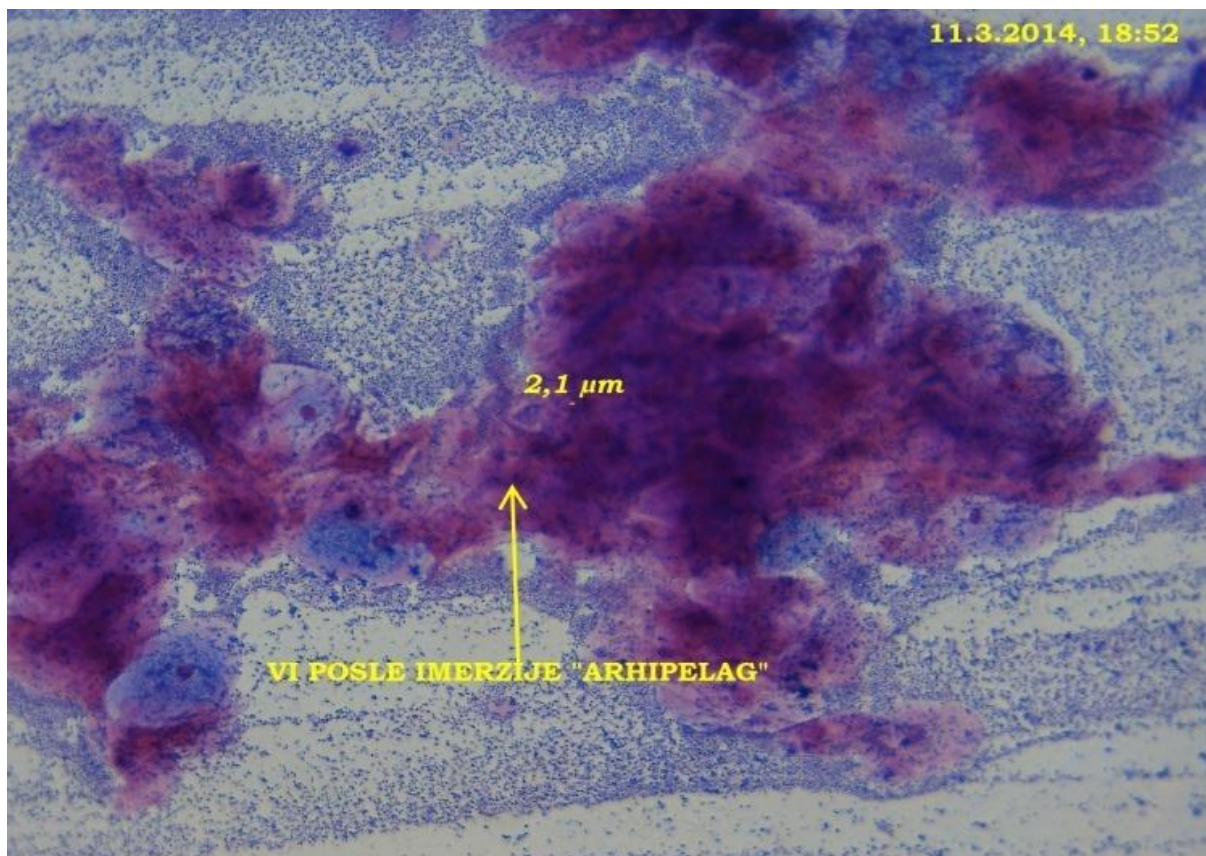
Očigledno je da pacijentkinje iz grupe BVF imaju neuporedivo veći broj bakterijskih formi u odnosu na pacijentkinje BVN i ukoliko bi patogeni potencijal procenjivali na osnovu kvantifikacije bakterijskih formi onda bi pacijentkinje iz grupe BVF imale daleko veći rizik za neželjena dešavanja od pacijentkinja sa nalazom BVN. Kako ovo ne može biti jedini parametar, naravno da ne možemo isključiti ni mogućnost da naprimer inflamatorni odgovor koji prouzrokuje bakterijska flora tipa BVN ne nosi veći rizik od PP u odnosu na nalaz BVF. Ali ako prihvatimo neke opšte imunološke postulate, kao što je činjenica da interakcija između bakterija i ćelija domaćina neminovno dovodi do oslobađanja određenih koncentracija jednog ili više citokina, i da ta produkcija citokina u velikoj meri zavisi od prirode mikrobiološkog agensa, a i od njegovog broja (*load*) onda je vrlo verovatno da će se imunski odgovor i spektar i koncentracije oslobođenih citokina i drugih inflamatornih medijatora razlikovati kod ove dve grupe pacijentkinja. Pri tome treba imati u vidu činjenicu da kod BV, a i većine drugih stanja vaginalne flore ne govorimo kao kod većine infektivnih bolesti o jednom mikrobiološkom agensu, nego o odnosu velikog broja različitih bakterijskih vrsta, i u kome predominacija jednih ili drugih definiše bolesno ili zdravo. Ono što smatramo veoma važnim da još jednom naglasimo jeste da je pacijentkinja sa BVN na osnovu Nugentovih dijagnostičkih kriterijuma za prosečan broj bakterija na 5 nesusednih vidnih polja i uvećanju x1000 imala ukupan zbir 9

(0 laktobacila=4 boda+ 6 Gardnerela morfotip=3 boda+6 zakrivljenih Mobiluncus=2 boda) što znači BV.



**Slika 3.61: Uvećane x200 pacijentkinja sa nalazom BVN sa 10-1000 puta manje bakterija u odnosu na pacijentkinje sa nalazom BVF(slika 3.61); da li se razlikuju u kliničkom i terapijskom pristupu koliko se razlikuju vizuelno? Koliki je rizik za PP? Nugentov skor ovde je bio 8=BV!**

Druga pacijentkinja je imala ukupan zbir 8 (0 laktobacila=4 boda+ >30 Gardnerela morfotip=4 boda+ nije viđen Mobiluncus morfotip=0) što opet znači BV. Dakle pacijentkinja sa neuporedivo manjim brojem bakterijskih formi ima veći skor po Nugentu. Cilj ove diskusije jeste da ukažemo da Nugentovi kriterijumi ne razlikuje ove grupe pacijentkinja niti u praktičnom bilo istraživačkom smislu ima razlike između pacijentkinja sa zbirom od 7 bodova ili zbirom od 10 bodova po Nugentu. Ili kada ginekolog koji ne gleda mikroskopski preparat po gramu dobije izveštaj iz mikrobiološke laboratorije najčešće ne stoji broj bodova nego samo dijagnoza: normalan, intermedijaran ili BV. Na kraju krajeva i da takav skor piše u nalazu i terapija koju će odrediti ginekolog je ista: metronidazol 2x500 grama 7 dana. Kao što smo rekli suština NP-6G je što razlikuje pacijentkinje po celularnosti (BVF, BVM, BVN) a i terapijski pristup se značajno razlikuje.



**Slika 3.62:** Uvećane x200 pacijentkinja sa nalazom BVF sa 10-1000 puta više bakterija u odnosu na pacijentkinje sa nalazom BVN (slika 3.60); Da se li koncentracije nekog citokina razlikuju koliko se razlikuje “koncentracije” bakterija? Koliki je rizik za PP? Nugentov skor ovde je bio 10=BV

Tako bi nulta hipoteza mogla biti da ove pacijentkinje predstavljaju grupu sa posebnim poremećajem vaginalne flore, i da su neophodna dalja ispitivanja koja će ovu grupu definisati u epidemiološkom, kliničkom i terapijskom smislu, kao i nova istraživanja koja bi dokučila etiopatogenetske mehanizme stanja vaginalne flore u kojoj nestaju i „dobre“ i „loše“ bakterije. Stanje u vaginalnom ekosistemu na ovakvim preparatima odgovaralo bi stanjima u makroekološkim sistemima posle elementarnih nepogoda (poplava, požar), u kojima je oko polovine stanovnika stradalo. Kao što smo rekli pretpostavke o menstruaciji, ispiranju vagine različitim rastvorima, menopauzi ili primeni antibiotika su potpuno prihvatljive kao “elementarne nepogode” koje su gotovo u potpunosti uništile i normalnu i patološku vaginalnu floru. Ali mi tražimo odgovor na pitanje kakva je to “elementarna nepogoda” u našoj populaciji trudnica dovela do ovakvog stanja vaginalne flore, s obzirom da naše pacijentkinje nisu uzimale nikakve lekove, nisu ispirale vaginu ili krvarile, nisu imali seksualne odnose najmanje 7 dana pre ispitivanja? Dakle, sigurno je da su kod naših pacijentkinja neki drugi, nama nepoznati, mehanizmi i stanja doveli do ovakvih promena u vaginalnoj flori. Naravno ne možemo isključiti ni mogućnost da se u ovakvim slučajevima radi o cikličnim fiziološkim procesima u kojima “čistači” (scavenger) domaćina prave “veliko spremanje”, posle čega kreće ponovna

kolonizacija i uspostavljanja novih odnosa mikrobnj zajednici. Moguće je da se radi o odbrambenom mehanizmu kod žena koji podrazumeva da se potencijalne opasnosti za domaćina, nastale zbog poremećaja odnosa među članovima vaginalne flore, najefikasnije ili jedino tako mogu sprečiti, odnosno omogućiti uslovi za ponovnu rekolonizaciju vagine laktobacilima. U svakom slučaju mislimo da ovaj interesantan fenomen i ova grupa pacijentkinja zaslužuju posebnu pažnju, kako u kliničkim tako i u mikrobiološkim, odnosno molekularnobiološkim ispitivanjima. Najinteresantnija pitanja su: Da li se radi o normalnim i prolaznim fiziološkim poremećajima, ili patološkim poremećajima vaginalne flore? Da li i kakva terapija treba ovoj grupi pacijentkinja? Da ova grupa u budućnosti treba da bude intenzivnije ispitivana indirektno ukazuju i rezultati internacionalne studije u kojoj su najiskusniji ispitivači procenjivali vrednost različitih dijagnostičkih kriterijuma (Nugent, Amsel, Ison/Hay) u dijagnozi BV. Rezultati ove studije pokazali su da je ukupna podudarnost između različitih metoda dobra, ali upozoravaju da su najveća neslaganja među ispitivačima bila kod nalaza sa malim brojem laktobacila, dakle hipocelularni nalazi, što se u potpunosti podudara sa rezultatima našeg ispitivanja [473].

Tako rezultati ovog ispitivanja, ukazuju da gotovo kod jedne trećine pacijentkinja na NPVS nismo detektovali prisustvo CA, a posle smo je detektovali na preparatu po Gramu. Drugo, rezultati našeg ispitivanja pokazuju da je oko 40% pacijentkinja imalo mešovitu infekciju CA/BV ili BV/CA. Dakle mikroskopska slika koju vidite na NPVS, sa predominacijom SBF i velikim brojem PMN ukazuje na AV, ali ista takva slika je i kod pacijentkinja sa patološkom vaginalnom florom (LBG IIB i LBG III) koje imaju u manjem ili većem broju spore i hife gljivica. A ponekad treba mnogo strpljenja i truda da se elementi gljivica detektuju na NPVS sa 10% KOH. Naime i na NPVS, vrlo je često da CA bude prisutna samo na malom delu preparata i vrlo lako može da se previdi. I ovde važi generalno mikroskopsko pravilo: Verovatnoća da ćete mikroskopskim pregledom detektovati ono što tražite upravo je proporcionalna površini preparata koju pregledate i vremenu kojem provedete gledajući preparat. Podatak, da smo u ovom ispitivanju pregledom NPVS CA detektovali kod 115 od 642 (18%) pacijentkinja, dok smo višestrukim gledanjem preparat po Gramu na uvećanjima 200 i x1000 CA detektovali kod 239 od 699 ( 34%) pacijentkinja. Od tih 114 pacijentkinja 82 su imale patološki broj PMN (uvećanje x200), odnosno kod ove 82 pacijentkinje mogli smo na osnovu kriterijuma po Dondersu i saradnicima postaviti dijagnozu AV. S druge strane, ako retrospektivno pogledamo rezultate našeg ispitivanja (samo preparat po Gramu) to bi bile naše pacijentkinje patološkim brojem PMN kod kojih nije nađena CA, a po podeli NP-6G bile su svrstane u grupu BVF (n=2), BVM (n=6) i BVN (n=3). Dakle samo

kod 11 pacijentkinja bi mogli postaviti dijagnozu AV. Tako bi epidemiološka studija zasnovana na nalazima NPVS zaključila bi da je učestalost AV u ispitivanoj bila 12,7%, (82/642), dok bi na osnovu pregleda preparata po Gramu (NP-6G) učestalost AV iznosila svega 1,7% (11/642). Takođe, nismo uspeli da izdiferenciramo šta Donders podrazumeva pod „toksičnim leukocitima“ posebno ne na NPVS, gde je najčešće ponekad zbog velikog broja optičkih fenomena na faznom kontrastu teško izdiferencirati finiju strukturu PMN, kao što se to lepo vidi pod imerzijom na uvećanju x1000. Takođe smo primetili da *T. vaginalis* koji nije živ, daje sliku koja nama liči na toksične, rasprsnute leukocite. Gledajući preparat po Gramu, nismo nalazili forme koje bi mogle odgovarati ovom opisu, ali smo primetili da se kod značajnog broja pacijentkinja sa CA PMN prikazuju drugačijim, slabije se boje, teško se diferenciraju bisagasta jedra, odnosno teško se uočava ćelijska membrana i kao da je došlo do citolize takvih PMN. Dakle, s obzirom na činjenicu da je u našem ispitivanju uzrok patološkog broja PMN u oko 80% slučajeva CA, za konačan stav o dijagnozi i stvarnoj učestalosti AV, trebalo bi tražiti odgovore u novim studijama i detekcijom CA kvantifikacionim PCR (Q-PCR).

Zato mislimo da metodologija koju smo koristili u našem ispitivanju može dati bolje rezultate u definisanju kvantitativnog i kvalitativnog biodiverziteta vaginalnog mikrobioma, prevazići mnoge od pomenutih nedostataka koji se odnose na postojeće metode i veoma lako se implementirati u svakodnevnu kliničku praksu, istovremeno omogućavajući da se preparati sačuvaju (nije moguće kod NPVS) i koriste za dalja naučna istraživanja. Sumiraćemo po našem mišljenju najvažnije prednosti NMMP i NP-6G:

***Površina pregledanog preparata bojenog po Gramu*** - Prva bitna razlika između naše i postojećih metodologija je što mi preparat bojen po Gramu posmatramo na mikroskopskom uvećanju x200, a prethodne tri metodologije podrazumevaju imerziju i uvećanje x1000. Ovakvim pristupom, za isto vreme, možemo pregledati površinu preparata koja je za oko 200-300 puta veća u odnosu na postojeće metode kojima se gleda 5-20 VP na uvećanju x1000. S obzirom da je vaginalni razmaz prilično nehomogen naša nova metodologija predviđa ispitivanje VP na tri različita dela preparata, uvek u smeru okomitom na razmaz, jer se tako izbegava “praćenje” razmaza i gledanje male površine na kojoj je razmaz isti. Ovakvom metodologijom stiče se objektivniji utisak o prisustvu različitih bakterijskih morfotipova, gljivica (kvalitativno) i njihovog relativnog broja i odnosa (kvantitativno) na mikroskopskom preparatu, kao i prisustva drugih nebakterijskih celularnih formi (PMN). Imajući u vidu nehomogenost preparata i kompleksnost vaginalne flore, mislimo, da numerički odnos 3 bakterijska morfotipa detektovan na 0,001% (20/15 000 VP) površine preparata nije dovoljan

za donošenje pouzdani zaključka o kvantitativnom i kvalitativnom odnosu različitih bakterijskih morfotipova i drugih nebakterijskih elemenata.

**Semikvantifikacija bakterijskih i drugih ćelijskih morfotipova** - Druga, i po našem mišljenju važnija razlika u odnosu na postojeće metodologije, odnosi se na činjenicu da je naša NP-6G prva klasifikacija koja i pacijentkinje sa normalnim nalazom (predominacija ŠF, lakotobacila) i pacijentkinje sa BV (predominacija NŠF, BVAB) razvrstava u tri kategorije na osnovu semikvantifikativne procene njihovog broja. Mislimo da bi ovakva kategorizacija bila korisna i da bi se u budućim ispitivanjima utvrdilo da li se ove grupe pacijentkinje razlikuju klinički koliko se razlikuju vizuelno, gde pre svega mislimo na pacijentkinje sa hipocelularnim nalazom (NN i BVN). Takođe, mislimo da bi ovakva podela omogućila mnogo bolje uporedne rezultate sa molekularnobiološkim studijama u kojima se koristi Q-PCR, i tako doprinela daljem napretku u razlikovanju normalnog i patološkog u vaginalnoj flori.

**Ista vrednost uvećanja na x200 i x1000 u razlikovanju *L. inersa* i *G. vaginalis*** - Podaci iz literature, kao i rezultati našeg ispitivanja, ukazuju da je najveći problem mikroskopskog pregleda preparata vaginalnog sekreta, nezavisno od uvećanja ili tehnike bojenja, predstavlja velika fenotipska sličnost dva najčešće detektovana mikroorganizma vaginalnog mikrobioma *L. inersa* i *G. vaginalis*. Verovatne posledice su da određen broj pacijentkinja u ispitivanjima pogrešno klasifikujemo u normalne, intermedijarne ili one sa BV. Moguće rešenje je u uporednim studijama sa qPCR koji bi možda mogle ukazati na neke fenotipske (mikroskopske) karakteristike ova dva mikroorganizma koji bi nam pomogli da ih preciznije izdiferenciramo. Rezultati i iskustvo tokom našeg ispitivanja čija se metodologija prvenstveno zasniva na prepoznavanju štapićastih formi na uvećanju x200, odnosno dimenzijama mikroorganizama dozvoljava nam da postavimo sledeću hipotezu: Ukoliko na uvećanju x200 vidimo vrlo kratke i tanke ŠF verujemo da one u najvećem broju slučajeva predstavljaju *L.iners*, dok se *G, vaginalis* na ovom uvećanju najčešće ne prikazuje kao štapićasta forma. Dakle prisustvo vrlo kratkih ŠF ukazuje na normalan nalaz, dok u slučaju dominacije NŠF imamo BV, uz napomenu da su ovakvi nalazi vrlo česti kod pacijentkinja sa CA i povećanim brojem PMN.”

**Jednostavna** - jedini parametar koji razlikuje zdravu od patološke vaginalne flore je kao što je rečeno odnos ŠF i NŠF, tako da za ovu metodologiju nije potrebno nikakvo prethodno medicinsko ni mikrobiološko znanje, i za veoma kratko vreme može se vrlo lako savladati. Dijagnoza BVF se postavlja bukvalno jednim pogledom na preparat, na kome se vide patognomonične mikroskopske slike “arhipelaga” i “peščanih staza” kao što je to prikazano na fotografijama . Ova slika je patognomonična za BV, i suštinski svako ko je vidi nekoliko puta lako će je prepoznati bez obzira na medicinsko obrazovanje. Sva dalja aktivnost usmerena je



na otkrivanje, drugih uzročnika i prisustva PMN, odnosno dijagnozu eventualnih mešovitihi infekcija. Isto je kada su u pitanju pacijentkinje iz grupe NF gde dominiraju laktobacilarne flore. Ništa teže nije kada su u pitanju pacijentkinje sa BVM ili NM jer se i tu najčešće i bez ikakvih problema mogu lako razlikovati ove dve grupe nalaza. Pacijentkinje iz grupe NUL je takođe jednostavno prepoznati, ali je u principu veoma teško povući granicu između NN i BVN, o čemu ćemo kasnije opširno diskutovati.

**Brza** – Vreme potrebno da se ovakav preparat pregleda višestruko je kraće u odnosu na pregled i računanje zbira po Nugentovoj metodologiji. Generalno, pregled preparata na manjem uvećanju je neuporedivo brži pre svega zahvaljujući činjenici da se mikrometar i izoštravanje slike koriste mnogo ređe nego na većim uvećanjima. Prema našim merenjima vreme potrebno da pregledate 20 VP na pod imerzijom brojeći pri tome bakterijske morfotipove i računajući Nugentov numerički skor je vreme za koje možete pregledati najmanje polovinu površine preparata na uvećanju x200. Nema potrebe za standardizacijom površine vidnog polja jer je metodologija semikvantitativna a površina koju gledamo neuporedivo veća. S obzirom na veliku površinu istovremeno se povećava verovatnoća da pod mikroskopom detektujemo prisustvo *C. albicans*, *T. vaginalis* ili drugih ćelijskih formi od interesa (PMN). Ovakvim prisustvom detektuje se i prisustvo nekih drugih bakterijskih formi koje bi mogle biti od značaja za stanje vaginalne flore, kao što je to slučaj sa formama koje su u ovom radu nazvane bifido i lepti.

**Lako se uvodi u svakodnevnu kliničku praksu** - Ovakav pristup omogućio bi na neki način kombinaciju kliničkog nalaza koji su bili privilegija Amselovih kriterijuma i nalaza mikroskopskog preparat bojenog po Gramu. Ono što je nedostatak, svakako je potreba da se organizuje bojenje preparata po Gramu, a što je ranije rađeno uglavnom u mikrobiološkoj laboratoriji. Naša iskustva govore da to nije nimalo komplikovano i da se može vrlo lako organizovati prostor i obučiti osoblje, tako da lekar u veoma kratkom vremenu dobije preparat obojen po Gramu. Odnosno, vreme koje “potrošite” na pripremu mikroskopskog preparat, višestruko će vam se vratiti, čak ukoliko se i poredite sa pregledom NPVS. U našoj sada već svakodnevnoj kliničkoj praksi to izgleda ovako: Na početku pregleda uzima se vaginalni bris, uradi test sa 10% KOH i odredi vaginalni pH. Sušenje, fiksiranje i bojenje preparata ne traje duže od 5-10 minuta, što je vreme za koje lekar završava pregled i upiše nalaz. Ovde želimo takođe dodati da bojenje ne mora da podrazumeva relativno komplikovanu proceduru bojenja po Gramu, nego se mogu primeniti i jednostavnije procedure, kao što je bojenje metilen plavim ili samo gencijana violetom. Kako je za NP-6G metodologiju dužina i oblik ćelijskih formi jedini parametar na osnovu kojih ih razlikujemo, i s obzirom na činjenicu da su i *G. vaginalis* i *L.iners* Gram varijabilni, ukoliko ne želite praviti uporedne studije sa Nugentom, ovakav

pristup je jednostavniji i brži. Po završetku pregleda preparat obrišete ksilolom i može da se koriti za dalja ispitivanja. Želimo naglasiti da pri ovom protokolu pored mikroskopskog nalaza lekar zna subjektivne tegobe pacijentkinja, klinički nalaz, rezultat testa sa 10% KOH i vrednosti pH vagine, što sve zajedno u određenim slučajevima može bitno uticati na konačnu dijagnozu, odnosno odluku da li i kako lečiti pacijentkinju. Dakle za razliku od drugih protokola u kojima pregled preparata po Gramu (Nugent, Ison/Hay, Claeys) uglavnom podrazumeva mikrobiološku laboratoriju bez podataka o kliničkoj slici ili rezultatima pomenutih testova, ovde se pregled preparata po Gramu radi u ordinaciji, tako da su šanse za ispravnu dijagnozu mnogo veće nego u slučajevima kada kliničar za dan ili dva dobije nalaz mikrobiologa na kome piše da je nalaz intermedijaran. U odnosu na Amselove kliničke kriterijume jasno je da je razlika u mikroskopskom pregledu, Amsel podrazumeva pregled NPVS na uvećanju x400, zbog čega ćemo uporediti i ova dva pristupa. Mikroskopski pregled NPVS svakako je brži i jednostavniji metod u odnosu na postojeće, a i odnosu na NP-6G jer umesto bojenja preparata po Gramu, razmažete bris na pločicu stavite kap fiziološkog rastvora, prekrijete pokrovnim stakalcem i odmah mikroskopirate. Sve ovo izgleda stvarno brzo i jednostavno, ali posle 15 godina iskustva u gledanju NPVS, na najrazličitijim mikroskopima, slobodni smo reći da to uvek i nije baš tako brzo ni tako jednostavno. Prvo da bi ste mogli da gledate NPVS treba da imate da imate fazni kontrast na uvećanju x400, jer je sve ostalo mnogo mukotrpnije i manje precizno., dok je za NP-6G dovoljan svaki mikroskop sa uvećanjem x200. Međutim i kada imate fazno kontrastni kap fiziološkog rastvora (a posebno nekoliko kapi više) prave problem jer na neki način morate čekati da se preparat “smiri” jer svi ćelijski elementi plivaju. Pitanje koliko ova jedna kap (koja pod mikroskopom deluje kao poplava u ekosistemu) može “razblažiti” čitav preparat i uticati na procenu kvantifikacije pojedinih ćelijskih elemenata, odnosno koliko ga čini uporedivim sa preparatom po Gramu (na kome nema kapi fiziološkog rastvora) ostavljamo budućim istraživačima. Pored toga, fazni kontrast u ovakvim situacijama daje mnogo optičkih “artefakata” tako da vrlo često morate da pomerate mikrometar da bi ste dobili dobru sliku, što sve značajno produžava vreme pregleda, za razliku od preparat bojenog po Gramu i pregleda na uvećanju x200 gde mikrometar koristite veoma retko zbog čega u istom vremenu možete da pregledate neuporedivo veću površinu preparata. Takođe, na osnovu dosadašnjeg iskustva mislim da je na uvećanju x400 mnogo teže izdiferencirati ŠF od NŠF jer se na ovom uvećanju i forme dužine 1 µm prikazuju kao štapići, a prilikom pregleda NPVS nema mogućnosti da preparat po potrebi pogledate na uvećanju x1000, kao što je to slučaj kod NP-6G. Ukoliko želite da dijagnostikujete CA, neophodno je da na drugom preparatu dodate kap 10% KOH, ili to uradite po završetku pregleda na istom preparatu. I na kraju to što ste videli ukoliko nemate

kameru ne možete da arhivirate i koristite za dalji naučno istraživački rad. Naravno da navedene prednosti tehničke prednosti NP-6G u odnosu na postojeće predstavljaju uglavnom subjektivne kategorije i da je za njihovu verifikaciju potrebna verifikacija od strane drugih istraživača. Ono što je svakako značajnije, a srećom i uporedivije jesu rezultati mikroskopskog pregleda dobijeni korišćenjem različitih dijagnostičkih procedura. Takođe verujemo da bi drugi ispitivač na osnovu Nugentovih kriterijuma značajan broj ovih pacijentkinja svrstao u grupu intermedijarnih nalaza. Podatke koje smo mi dobili, saglasni su rezultatima interobservacione studije koji su pokazali da su najveća neslaganja među ispitivačima upravo kod mikroskopskih nalaza koji imaju mali broj ćelijskih elemenata.

### 3.5 pH VAGINE U PROCENI STANJA VAGINALNOG EKOSISTEMA

U uvodu smo ukazali na neka pitanja koja su proistekla iz rezultata molekularnobioloških studija od kojih su za kliničara najvažnija dva. Prvo, da li je četvrtina žena koje nemaju predominantnu laktobacilarnu floru zdrava ili bolesna? Drugo, da li su vrednosti vaginalnog pH preko 4,5 zdrave (nalazimo ih kod 50% zdravih pacijentkinja) [169, 474, 475]. U uvodu smo i pomenuli da ove činjenice navode na preispitivanje vrednosti Nugentovih i Amselovih kriterijuma.

Pre nego što u ovom delu diskusije pokušamo na osnovu dobijenih rezultata da odgovorimo na pitanje koje se odnosi na granične vrednosti pH, želimo da ukažemo na neke važne evolucione podatke.

**Tabela 3.17: distribucija pH kroz rase**

<b>RASA</b>	<b>Srednja vrednost pH±SD</b>	<b>Medijana pH±MAD</b>
<b>Belci</b>	4,5±0,66	4,4±0,59
<b>Crnci</b>	4,7±0,66	4,7±1,00
<b>Hispano</b>	4,8±0,64	5,0±0,74
<b>Azijati</b>	4,6±0,64	4,4±0,59
<b>UKUPNO</b>	4,7±0,76	4,4±0,59

\*Trenutna procena vrednosti vaginalnog pH je: Nisi normalan ili nisi zdrav, a nije važno da li si Hispano ili Crnac Prvi, i veoma bitan podatak odnosi se na činjenicu da se vaginalna sredina u humanoj populaciji značajno razlikuje od drugih vrsta [476]. Tako, za razliku od većine sisara, uključujući tu i primata, ili laboratorijskih životinja (miševi, pacovi, zečevi) čiji se vaginalni pH kreće oko neutralnog, normalan pH vagine je obično <4,5, za šta je priroda svakako imala svoje razloge [476]. Ako znamo da vaginalni pH bitno utiče na sastav i koncentracije različitih metabolita (uslovi sredine, ishrana) od čega u velikoj meri zavisi mikrobna flora ekološke zajednice, kao i već pomenute interakcije između njenih pojedinih članova, onda je jasno koliki je uticaj ovog

parametra na sastav i stanje vaginalne flore. Priroda nije bez nekog razloga odlučila da vagina bude slabo prokrvljen organ koja će dobijati kiseonik difuzijom iz submukoznog tkiva, a svakako da je jedan od razloga što je to tako i činjenica da se na ovakav način obezbeđuju anaerobni uslovi, odnosno favorizuje naseljavanje uglavnom anaerobima. Takođe se potrudila da ćelije vaginalne sluznice budu među retkim u organizmu kojima nije potreban insulin za ulazak glukoze, da bi ih učinila sposobnim da u procesu anaerobne glikolize stvaraju mlečnu kiselinu, odnosno održavaju kiselu vaginalnu sredinu. Ništa manje važni nisu ni podaci koji ukazuju da je kolonizacija bakterijama koje proizvode mlečnu kiselinu karakteristična za ljudsku vrstu i da se razlikuje od drugih sisara uključujući tu i primata. Kako verovatno samo vaginalne ćelije nisu u stanju da održavaju pH kiselim, naseljavanje vagine i izbor stanovnika podrazumevao je da prednost imaju oni koji proizvode mlečnu kiselinu, dakle različiti sojevi laktobacila. Pored laktobacila, kao što smo već pominjali, i neke druge bakterije mogu da proizvode mlečnu kiselinu (*Atopobium*, *Megasphaera*, *Leptotrichia*). Potrebna su dalja istraživanja da bi se utvrdio značaj ovih (verovatno i mnogih drugih) bakterija na vrednosti vaginalnog pH, jer svaki mikroorganizam sposoban za anaerobnu glikolizu proizvode mlečnu kiselinu. Tako je ukupna produkcija mlečne kiseline zbir one koju proizvode epitelne ćelije i različite vrste bakterija, a mišljenja o tome čija je uloga važnija su podeljena. Najnovija ispitivanja ukazuju da epitelne ćelije vagine luče samo L-izomer mlečne kiseline, dok bakterije luče i D i L-mlečnu kiselinu, a Boskey i sar. su u vagini našli mnogo veće koncentracije D-mlečne kiseline i zaključili da bakterije predstavljaju glavni izvor mlečne kiseline [477]. Ipak, pad pH u periovulatornom periodu, ili činjenica da je pH vagine niži u forniksi nego u srednjoj i distalnoj trećini, govori više u prilog tome da važniju ulogu u regulisanju vaginalnog pH imaju EĆ, odnosno faktori domaćina [169, 470, 473, 474-476]. Witkin i sar. [476] su pokazali da su koncentracije vaginalnog induktora ekstraćelijske matriks metaloproteinaze (EMMPRIN) zavise ne samo od sastava mikrobne zajednice nego i od koncentracija i odnosa D i L-izomera mlečne kiseline. Ovi izomeri kao signalni molekuli utiču na gensku ekspresiju domaćina, dovode do povećanja koncentracija EMMPRIN a on indukuje produkciju MMP-8, poremećaja

u ekstraćelijskom matriksu grlića čime je olakšan ascedentni put bakterijama nastanak IUU i PP.



**Slika 3.63: Vaginalni mikrobiom kroz život**

Ranije se smatralo da produkcija hidrogen peroksida predstavlja čak i važniji faktor u odbrani od različitih patogena od mlečne kiseline, međutim novija ispitivanja nisu potvrdila takve nalaze, a Hanlon i sar. su pokazali se da je  $H_2O_2$  toksičniji za laktobacile nego za drugih 17 vrsta BVAB [478]. Oni su ukazali na širok spektar antimikrobnih aktivnosti laktobacilarne flore, kao i da laktobacili najverovatnije predstavljaju najvažniji izvor mlečne kiseline u vagini. Ovo je u skladu sa dobro poznatim činjenicama o odsustvu laktobacila i niskim koncentracijama

mlečne kiseline, odnosno povećanim vrednostima vaginalnog pH kod pacijentkinja sa BV. Mlečna kiselina se za razliku od  $H_2O_2$  proizvodi u hipoksičnim uslovima u vagini, nema štetne efekte na laktobacile, ne može biti neutralisana cervikalnim sekretom, a deluje mikrobicidno na BVAB, zbog čega Bai i sar. [479] smatraju najvažnijim pojedinačnim faktorom u odbrani od različitih patogena [477-481]. Dodaćemo još neke argumente koji brane našu hipotezu, a koji se opet odnose na savršenosti prirode u regulisanju vrednosti pH vagine. Izgleda da kontrola i regulacija pH vagine počinje rađanjem i traje ceo život. Tokom i neposredno posle porođaja estrogeni poreklom od majke omogućavaju bogatstvo vaginalnog epitela glikogenom, odnosno naseljavanje i rast mikroorganizama koji proizvode mlečnu kiselinu [482]. Ovi mikroorganizmi i kisela sredina verovatno štite novorođenče tokom i neposredno posle rađanja od poremećaja vaginalne flore i nastanka infekcije. Kratko potom i u ranom detinjstvu pa sve do perioda menarhe pH vagine je neutralan do blago alkalni, a broj mikroorganizama koji proizvode mlečnu kiselinu značajno manji [483]. Onoga trenutka kada počinje potencijalno "opasni" period počinje proces ponovne acidifikacije vagine. Porast estrogena će dovesti do porasta glikogena u vaginalnim EĆ i kolonizacije florom koja će proizvoditi mlečnu kiselinu [484].

Tako, ako znamo da krv predstavlja idealnu podlogu za veliki broj mikroorganizama, onda je jasno da bi menarha, bez prethodne acidifikacije vagine, verovatno predstavljala potencijalnu opasnost za nastanak vaginalnih infekcija i drugih komplikacija. Posle toga dolazi period u kome se povećavaju rizici za poremećaj vaginalne flore (seksualna aktivnost), što je još jedan alarm da se odbrambene snage pojačaju. Podatke Shafera i sar. [485] po kojima su adolescentkinje koje su imale seksualne odnose imale dvostruko veću kolonizaciju vagine laktobacilima od vršnjakinja koje nisu imale seksualne odnose, mogli bismo tumačiti kao još jedno "razumevanje" prirode koja sa povećanjem rizika, povećava broj bakterija koje mogu proizvoditi mlečnu kiselinu [485]. Ulaskom žene u menopauzu, odnosno prestankom funkcije gonada, dolazi do pada glikogena u EĆ i smanjenja broja laktobacila, smanjene acidifikacije vagine i porasta pH vagine, što omogućava kolonizaciju i razvoj patogenih bakterija [486, 487]. Studija Gupte i sar. [487] o uticaju hormonske supstitucione terapije na pH vagine i sastav vaginalne flore ukazuju da estrogeni imaju odlučujuću ulogu. I rezultati molekularnih studija ukazuju da HRT, povećava kolonizaciju laktobacilima i smanjuje vaginalni pH, dok je kod žena koje ne koriste ovu terapiju pH vagine značajno viši, a vaginalna flora slična onoj kod BV [486, 488, 489]. Dakle estrogen, kao najvažniji ženski hormon, upravlja većinom promena u organizmu žene i pod svojom kontrolom drži depoe glikogena, produkciju mlečne kiseline, održavanje kiselog pH vagine i naseljavanje odgovarajućim mikroorganizmima. Vaginalna

mukoza prolazi kroz ciklične promene proliferacije, sazrevanja i deskvamacije EĆ koji traje oko 96 sati. Normalni vaginalni epitel ima veliku metaboličku aktivnost i proizvodi na stotine različitih hemijskih supstanci, a energiju za ove procese u najvećoj meri obezbeđuje se metabolizmom glukoze. Depoi glukoze u obliku glukogena nalaze se u EĆ i u stanjima kada je ćeliji potrebna energija glikogen se razgrađuje u glukozu, i u procesu anaerobne glikolize oslobađa se energija i produkuje mlečna kiselina, koja izlazi iz ćelije i nagomilava se u ekstracelularnom prostoru i tako predstavlja jedan od najvažnijih odbrambenih faktora. Tako su najnovija ispitivanja pokazala da mlečna kiselina (pored acidifikacije vagine) ima specifična imunološka svojstva. Tako L-mlečna kiselina pod određenim uslovima dovodi do produkcije proinflamatornih citokina u kulturi humanih vaginalnih ćelija koji potom aktivišu TLR3 na tim ćelijama. Ovakav imunski odgovor specifičan je za prisustvo L-mlečne kiseline i dešava se samo u uslovima kisele sredine, jer nestaju dodavanjem sirćetne ili neutralizacijom mlečne kiseline. Veruje se da su i mnoga druga imunološka dešavanja zavisna od pH sredine i prisustva mlečne kiseline [490].

Kisela vaginalna sredina je posledica evolucionih procesa samo što mi u ovom trenutku verovatno nedovoljno razumemo njen pravi značaj. Međutim, istraživači su uglavnom okrenuti novom i još neistraženom, smatrajući polja kiselosti vagine “iscrpljenim” za nove naučne poduhvate. I u svakodnevnoj kliničkoj praksi malo je ginekologa koji koriste ovaj test ili ga smatraju vrednim u definisanju stanja vaginalne flore. Naravno, ovakvom stavu doprinose i stručni radovi koji ukazuju “na nisku specifičnost i senzitivnost” ovog testa u dijagnozi poremećaja vaginalne flore. Verujemo da neki evoluciono očuvani mehanizmi obezbeđuju da se vaginalni pH održi kiselim i da bi prelazak neke granice ukazivao na potencijalno rizična dešavanja pre nego mikroskopski pregled ili čak i nalaz PCR sa velikim brojem prajmera. Verovatno se tek prelaskom te granice stvaraju preduslovi za nastanak patološke vaginalne flore. Dakle, bez obzira kakav je sastav mikrobiološke zajednice vagine (broj i vrsta mikroorganizama), sve dok je vaginalni pH u zoni kiselog, to najverovatnije znači da metabolički odnosi između samih bakterija i domaćina nisu poremetili jedan od najvažnijih odbrambenih mehanizama vagine, te je rizik ili samo postojanje patološkog stanja malo verovatno. Iz ove diskusije je isključena infekcija CA. Suštinsko pitanje je možemo li pacijentkinji koja ima vrednost pH 5,5 reći da je zdrava na osnovu postojećih mikroskopskih, mikrobioloških i molekularnobioloških oruđa kojima raspoložemo, ili se moramo upitati da ne postoje nešto što izmiče postojećim dijagnostičkim procedurama i našim dijagnostičkim protokolima. Zbog toga su podaci koje smo dobili u ovom ispitivanju, a koji pokazuju da su pacijentkinje sa nalazom LEPTO i BIFIDO formi imali vrednosti pH preko 4,5, još značajniji.

Verujemo da neki evoluciono očuvani mehanizmi obezbeđuju da se vaginalni pH održi kiselim i da bi prelazak neke granice ukazivao na potencijalno rizična dešavanja pre nego mikroskopski pregled ili čak i nalaz PCR sa velikim brojem prajmera. Verovatno se tek prelaskom te granice stvaraju preduslovi za nastanak patološke vaginalne flore. Dakle, bez obzira kakav je sastav mikrobiološke zajednice vagine (broj i vrsta mikroorganizama), sve dok je vaginalni pH u zoni kiselog, to najverovatnije znači da metabolički odnosi između samih bakterija i domaćina nisu poremetili jedan od najvažnijih odbrambenih mehanizama vagine, te je rizik ili samo postojanje patološkog stanja malo verovatno. Iz ove diskusije je isključena infekcija CA. Suštinsko pitanje je možemo li pacijentkinji koja ima vrednost pH 5,5 reći da je zdrava na osnovu postojećih mikroskopskih, mikrobioloških i molekularnobioloških oruđa kojima raspolažemo, ili se moramo upitati da ne postoje nešto što izmiče postojećim dijagnostičkim procedurama i našim dijagnostičkim protokolima. Zbog toga su podaci koje smo dobili u ovom ispitivanju, a koji pokazuju da su pacijentkinje sa nalazom LEPTO i BIFIDO formi imali vrednosti pH preko 4,5, još značajniji. Podsetićemo na činjenicu da je srednja vrednost pH i kod pacijentkinja iz LEPTO grupe bila preko 4,5, što na neki način nije u skladu sa činjenicom da je mlečna kiselina krajnji produkt *Leptotrichia*. Međutim, treba se prisetiti da je najveći broj pacijentkinja iz te grupe bio u grupi NULL (niska celularnost) što bi značilo da je kod ovih pacijentkinja značajno smanjen i broj laktobacila, odnosno da u krajnjem, kapacitet domaćina i postojeće bakterijske flore nemaju kapacitet da pH održe u zoni kiselog, a odsustvo *clue* ćelija ili niske koncentracije *G. vaginalis* i *A. vaginae* određene qPCR svakako nam ne bi dali za pravo da ovu pacijentkinju proglasimo zdravom ili bez rizika za PP. I pacijentkinje iz grupe BIFIDO imali su pH 4,6 a kako je najveći broj ovih pacijentkinja na osnovu mikroskopskog nalaza NPVS proglašen zdravim (ove pacijentkinje su bile zdrave i u našim prvim gledanjima preparata po Gramu) ovo je najbolja praktična potvrda našeg prethodno iznesenog stava da povećane vrednosti pH mogu govoriti u prilog patološkog stanja koje izmiče mikroskopskom pregledu NPVS ili preparata bojenog po Gramu. Pomenuta studija Sha i sar. [455] je najbolji primer da su vrednost pH mnogo bolje procenjuju stanje vaginalne flore jer je na osnovu Amselovih kriterijuma dijagnoza BV postavljena kod 77 od 203 pacijentkinje kod kojih je dijagnoza postavljena na osnovu Nugentovih kriterijuma. Vrednosti specifičnosti (69%) i senzitivnosti (83%) pH > 4.5 u toj studiji, u odnosu na Nugenta kao zlatni standard, ustvari najrealnije odražavaju broj pacijentkinja sa nekim poremećajima vaginalne flore, odnosno da na osnovu Nugentovih kriterijuma sigurno je značajan broj pacijentkinja lažno pozitivnih. Korektnije rezultate bi verovatno dobili ukoliko bi u statističkoj analizi pH bio zlatni standard, a Nugentov metod "test" čiju vrednost ispitujemo. Pored velikog broja primera koji su navedeni od uvoda preko



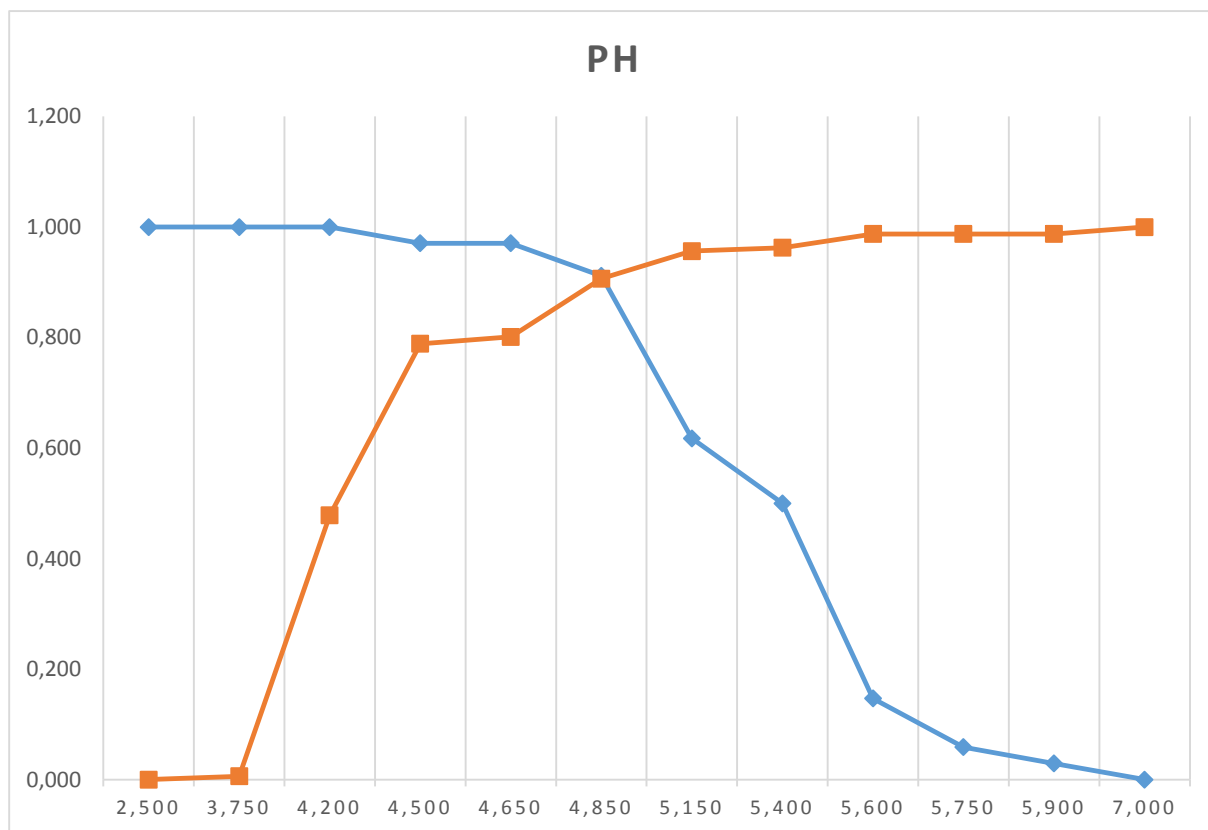
metodologije i diskusije, a koji se odnose na mane Nugentovih kriterijuma ovde ćemo komentarisati i odličnu studiju Menard i sar. [491] u kojoj autori ispituju mogućnost da na osnovu koncentracija (*loads*) *Gardnerella vaginalis* i *Atopobium vaginae* dijagnostikuju BV ali koja, s druge strane, govori mnogo i o Nugentovim kriterijumima i prethodno pomenutim nedoumicama. Kao i u većini drugih, i u ovoj studiji su Nugentovi kriterijumi bili zlatni standard na osnovu kojih je 167 uzoraka procenjeno kao normalna flora, 44 su imale intermedijaran nalaz, dok je kod 20 pacijentkinja dijagnostikovana BV. Oni su u ovoj studiji pokazali da kombinacija koncentracije *A. vaginae* izražene kao broj DNA kopija/ml ( $\geq 108$ ) i *G. vaginalis* ( $\geq 109$  kopija/ml) imaju senzitivnost i specifičnost 95%, odnosno 99%. Treba uočiti da u ovoj analizi nedostaju pacijentkinje sa intermedijarnim nalazom. Autori u diskusiji ukazuju da molekularni kriterijumi imaju nisku pozitivnu prediktivnu vrednost (73%), što ukazuje da su neki slučajevi kod kojih je postavljena „molekularna“ dijagnoza bakterijske vaginoze (5,5%) bile lažno pozitivni. Iako su u konkretnom slučaju (5,5%) ove pacijentkinje imale potpuno isti molekularni obrazac kao i pacijentkinje sa BV, analizirane su kao lažno pozitivne. Autori [491], kao i mi uostalom, ukazuju na mogućnost da se radi o stvarno pozitivnim koje nisu dijagnostikovane tradicionalnim dijagnostičkim procedurama. Molekularni metod je mnogo objektivniji od gledanja preparata po Gramu i teško je verovati da je kod 5,5% slučajeva „pogrešno izbrojao“ kopije DNA (mašina). Kada smo kod brojanja onda je mnogo verovatnije da onaj koji je brojao ćelijske morfotipove (čovjek) pogreši u odnosu na onoga ko je brojao kopije DNA. Još važnije pitanje od samog broja je pitanje: šta je brojano? Najnovija molekularno biološka oruđa ne mogu zameniti kopije DNA (prajmer) naprimer, *L. inersa* i *G. vaginalis*, a mi možemo da brojimo *L. inersa* kao *G. vaginalis* i obrnuto. Dakle, verovatnije je da je onaj koji je gledao preparat po Gramu u ovim slučajevima *G. vaginalis* brojao kao laktobacile i tako postavio dijagnozu normalnog nalaza. Jasno je da bi rezultati pH kod ovih 5,5% pacijentkinja bili „lažno pozitivni“. U literaturi smo i ranije često nailazili na podatke u kojima su se vrednosti senzitivnosti i specifičnosti pH vagine u dijagnozi BV dramatično razlikovale. Tako su u svojoj studiji Pastore i sar. [492] kod 22% žena sa BV izmerili normalne vrednosti pH, a kod 57% žena sa pH  $\geq 4.5$  nisu dijagnostikovali BV, dok je kod Zodizka i sar. [493] specifičnost i senzitivnost u dijagnozi BV iznosila 85% i 100%, respektivno. Treća bi mogla biti već analizirana studija Sha i sar. [455] u kojoj je senzitivnost bila 83%, a specifičnost 69%. Metodološke razlike su najverovatniji uzrok razlika u zaključcima. I u našem ispitivanju, bilo da se radi o međusobnoj podudarnosti različitih dijagnostičkih metoda, bilo da se radi o vrednosti KOH testa, ili određivanja vaginalnog pH, mogli bi uvek zaključiti isto: Najveća podudarnost ili korelacija i dobri rezultati koji se dobiju

u ovakvim statističkim analizama posledica su podudarnosti rezultata u grupama NF ili BVF (koji su uvek najbolji). Ti rezultati su značajno slabiji u grupi pacijentkinja sa hipocelularnim razmazom. Dakle na osnovu dobijenih rezultata mi bi svakako mogli zaključiti, da vrednosti pH u proceni stanja vaginalne flore (izuzimajući infekciju CA) imaju najveću pojedinačnu vrednost, i da verujemo (u procentima koji su veći nego oni prikazani na ROC krivi) da u slučajevima kada kod pacijentkinje detektujemo vrednosti  $pH > 4,8$  možemo sa 99 % verovatnoćom reći da je došlo do “nekog” poremećaja stanja vaginalne flore, i takvoj pacijentkinji treba da pristupimo sa maksimalnom ozbiljnošću i oprežnošću. Činjenica da mi u ovom trenutku ne raspolažemo dijagnostičkim oruđima ili ne prepoznamo takve poremećaje u svakom slučaju nas ne oslobađa odgovornosti i pokušaja da pomognemo. Možemo sa velikom sigurnošću da tvrdimo da je u takvim slučajevima indikovana acidifikacija vagine i primena prebiotika, jer se radi o postupcima koji ne mogu naškoditi pacijentkinjama. Verovatnoća da ćemo kod pacijentkinje sa BVF imati  $pH < 4,4$  praktično je nikakva. Tako u našem ispitivanju od 66 pacijentkinja sa BV (bez CA), samo su tri imale pH 4,4. Naknadno smo analizirali mikroskopske preparate ovih pacijentkinja i verujemo da smo u sva tri slučaja postavili pogrešnu dijagnozu, odnosno da smo za razliku od slučaja u Menardovoj studiji veliki broj *L. inersa* videli kao *G. vaginalis*, i postavili dijagnozu BV, a s obzirom na naš klinički stav sve tri su lečene, a možda, nepotrebno. Sporna i najteža, treća grupa, kao da ponovno traži da, posle toliko godina dominacije BV na “ginekološkoj sceni”, najzad neko i na nju obrati pažnju. Čini se da bi kapacitet produkcije mlečne kiseline bio primaran kod ovih pacijentkinja. Pretpostavljamo da normalne vrednosti pH (mislimo na manje od 4,5) kod pacijentkinja sa ovakvim mikroskopskim nalazom na neki način ukazuju na normalno, ili kao što smo ranije pominjali tranziciju u vaginalnoj flori koja bi trebala da ide ka zdravom, dok u slučaju sa patološkim vrednostima pH ta tranzicija bi mogla da ide u suprotnom smeru. U svakom slučaju u svakodnevnom kliničkom radu najveći broj pacijentkinja bio je lečen kombinacijom prebiotika i acidifikacije. Da je ovakav pristup poželjan ukazuju i rezultati našeg ispitivanja koji se odnose na grupu BIFIDO i PP, jer kao što smo već opomenuli pacijentkinje sa mikroskopski detektovanim BIFIDO formama imale su najveći rizik od PP, i uz pacijentkinje sa kraćim grlicem, gde je taj rizik bio značajno manji (vidi kasnije), predstavljaju jedina dva parametra koji su pokazali povećan rizik za PP.

Na osnovu rezultata pomenutih molekularnobioloških studija i vrednosti pH poslednjih godina se u literaturi sve češće sreću radovi koji ili u analizi podataka ili tokom ispitivanja pomeraju granicu pH na 4,7 a neki i na 5, često i u zavisnosti od etničke pripadnosti jer su rezultati pomenutih molekularnobioloških studija i merenja vaginalnog pH pokazale da

crnkinje i latinoamerička populacija imaju više vrednosti pH (Tabela 3.7). Zbog toga je u analizi statističkih podataka posle regresione analize na osnovu N/T odnosa određivana granična vrednost (Tabela 3.8).

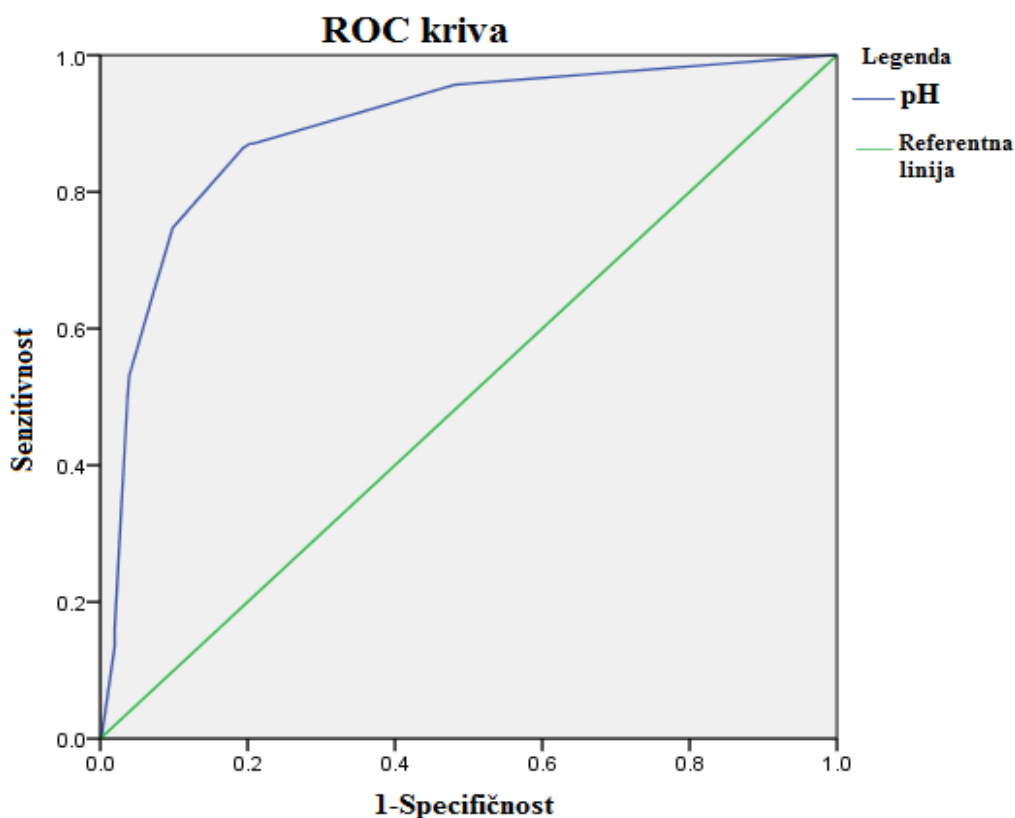
Kada je pH 4,8 poremećaje u vaginalnoj flori detektujemo kod 91,2% (senzitivnost) slučajeva, pri čemu je 9,3% lažno pozitivnih (specifičnost 90,7%) iz čega možemo zaključiti da test ima korektnu senzitivnost i specifičnost. Dakle, kriva za graničnu vrednost 4,8 izgleda kao u donjem grafikonu.



**Grafikon 3.43: Grafikon senzitivnost specifičnost za pH**

Tabela 3.18: Granične vrednosti N/T ratio

pH	Senzitivnost	Specifičnost
.....	.....	.....
4,20	1,00	0,48
4,50	0,97	0,79
4,65	<b>0,97</b>	<b>0,80</b>
4,85	0,91	0,91
.....	.....	.....
pH	Senz.	Spec
.....	.....	.....
4,20	0,95	0,51
4,55	<b>0,87</b>	<b>0,79</b>
4,65	0,87	0,80
4,85	0,75	0,90
.....	.....	.....



Grafikon 3.44: ROC kriva pH

Pri pH 4,5 senzitivnost i specifičnost su približno jednaki. Drugim rečima, kod pH 4,55 senzitivnost je 87,3 %, a specifičnost 79,5%.

Na osnovu dobijenih rezultata možemo da zaključimo da je u našem ispitivanju vrednost pH pokazala najbolje rezultate u predikciji poremećaja vaginalne flore kao i da je u populaciji

srpskih trudnica granična vrednost pH vagine  $<4,5$  optimalna. Tako treba postupati i u svakodnevnoj kliničkoj praksi. Dosadašnja praksa u kojoj se procena vrednosti pH zasnivala na poređenju u kome je pH uvek test, a različite podele zlatni standard, neće nam pokazati njegovu stvarnu kliničku vrednost. Najbolji primer za to su trudnice sa BIFIDO formama, koje smo na osnovu pregleda NPVS proglasili zdravim, a povišene vrednosti pH bi se onda mogle tumačiti kao lažno pozitivne. Naprotiv, mislimo da gotovo sve pacijentkinje sa vrednostima  $pH > 4,5$  imaju neki poremećaj vaginalne flore koje, na osnovu postojećih dijagnostičkih kriterijuma i postupaka, previđamo. Po nama, vaginalni pH kao pojedinačni parametar ima veću vrednost u razlikovanju zdravog i patološkog stanja vaginalne flore u odnosu na postojeće dijagnostičke metode i sve druge pojedinačne parametre. Odgovor na pitanje sa početka ove diskusije je da vrednost preko 4,5 uvek treba smatrati patološkim, čak i u slučajevima kada nam je klinički nalaz uredan i mikroskopska slika izgleda (“ličić”) na normalnu. I u takvim slučajevima potreban je oprez kliničara, a kao što smo već pominjali za druge “granične” slučajeve, acidifikacija vagine i primena prebiotika ne bi trebalo da naude pacijentkinji. Potrebna su dalja i detaljna ispitivanja ove grupe pacijentkinja da bi se procenila prava vrednost ovog testa u kliničkoj praksi, jer na osnovu rezultata našeg ispitivanja on bi mogao da se koristi ne samo u dijagnozi BV, nego bi kao skrining mogao da izdvoji grupu pacijentkinja koja nema BV, imam povišen pH, i po našim rezultatima značajno veći rizik za PP.

### **3.6 VREDNOST NALAZA KULTURE CERVIKOVAGINALNOG BRISA**

Danas znamo da na mikroskopskom preparatu ima oko 95% mikroorganizama koje ne možemo kultivisati, to znači da su nam njihove fenotipske karakteristike potpuno nepoznate. Na osnovu ovih podataka možemo tvrditi da na mikroskopskom preparatu vidimo koke koje se ne mogu kultivisati. Potvrdu ovakvom stavu nalazimo i u ekološkim ispitivanjima koja se bave proučavanjem mnogo složenijih mikrobni zajednica nego što je mikrobiom vagine i u kojima je odavno opisan fenomen “great plate count anomaly”, što znači da se preko 99% mikrobioloških vrsta koje vidimo pod mikroskopom ne može kultivisati u laboratoriji. Preparat po Gramu bi pre mogao biti “zlatni standard” na osnovu koga bi se procenjivala vrednost kulture, dakle potpuno suprotno čestom stavu kliničara u kome se negativan nalaz kulture poistovećuju sa zdravim, a pozitivan nalaz sa bolesnim. Zato je jedan od ciljeva ovog ispitivanja bio da pokažemo da kultura cervikalnog i vaginalnog brisa nema vrednost u svakodnevnoj kliničkoj praksi, i da bi češća primena jednostavnih i brzih postupaka, kao što su mikroskopski pregled NPVS, određivanje vaginalnog pH i test sa 10% KOH, dovela do mnogo boljih rezultata

u dijagnozi i lečenju vaginalnih infekcija, i prevenciji ozbiljnih komplikacija do kojih one mogu dovesti. Godinama unazad Wiesenfeld i Macio [494]. ukazuju na iznenađujuće retku upotrebu jednostavnih postupaka kao što su mikroskopski pregled NPVS, test sa 10% KOH, i određivanje vaginalnog pH u dijagnozi najčešćih vaginalnih infekcija, kao i na činjenicu o relativno visokom procentu pacijentkinja (u njihovoj studiji 17% prva citirana) kod kojih je uziman bris na vaginalnu kulturu, s obzirom na njegovu sumnjivu vrednost u dijagnozi vaginalnih infekcija. U Srbiji je kultura vaginalnog i cervikalnog brisa je još uvek vrlo čest postupak u svakodnevnoj praksi, dok se pomenute jednostavne i brze procedure koriste veoma retko. Nemogućnost kultivacije većine mikroorganizama nije začuđujuća ako razumemo da smo jedan mikroorganizam izmestili iz njegove prirodne sredine u kojoj je imao optimalnu količinu hranljivih materija, nivo kiseonika, temperaturu, pH, prisustvo drugih mikroorganizama, u novu veštačku gde bi morali da mu obezbedimo bar slične uslove da bi preživeo i rastao. Imajući u vidu ove činjenice, rezultati koji dobijemo standardnom mikrobiološkom kulturom (bez korišćenja specijalnih transportnih medijuma i podloga, anaerobnih uslova, kokultivacija i sl.) mogli bi da se tumače i kao sposobnost nekog mikroorganizma da opstane u novim uslovima, odnosno da preživi metodologiju ispitivanja. U prilog ovome govori i činjenica da su aerobi ili fakultativni anaerobi najčešći rezultat kulture cervikalnog ili vaginalnog brisa, dok je s druge strane poznato da vaginu uglavnom kolonizuju obligatni anaerobi. S obzirom da smo rezultate ovih ispitivanja kod 505 naših pacijentkinja prikazali u našem radu pod naslovom: »Vrednost bakterijske kulture vaginalnog brisa u dijagnozi vaginalnih infekcija« i da je on prihvaćen za štampu, zainteresovanog čitaoca upućujemo na taj rad, a ovde ćemo samo ukratko izneti delove diskusije zaključke do kojih smo došli [495]. Tako se na početku diskusije ukazuje da su pre više od 30 godina Hammerschlag i sar. [496] su objavili dve studije, kod devojčica starosti od 2 meseca do 15 godina, kod kojih je rađena kultura vaginalnog brisa tradicionalnim mikrobiološkim metodama, koje su pokazale da je vagina i u tom periodu, pored laktobacila, kolonizovana sa velikim brojem drugih bakterija kao što su: *Diphtheroids* (78%), *Staphylococcus epidermidis* (73%), *α-hemolytic streptococci* (39%), *Escherichia coli* (34%), *Candida species* (28%), *U. urealyticum* (27%), *Klebsiella* (15%), *Enterococcus species* 10%, *Group D streptococci* (8.5%), *S. aureus* (7%), *M. hominis* (6%), *Haemophilus influenza* (5%), *Pseudomonas aeruginosa* (5%), *Proteus* (5%). Metodološki slične studije kod žena u reproduktivnom periodu pokazuju da se pored pomenutih bakterija sa manjom ili većom učestalošću mogu izolovati i drugi aerobi ili fakultativni anaerobi (*Peptostreptococcus*, *Gardnerella*, *Bacteroides*, *Veillonella*, *Bifidobacterium* itd) [497]. Naravno, izolacija bilo kog od pomenutih mikroorganizama znači samo njihovo prisustvo i

nikako ne podrazumeva kauzalnu povezanost sa bilo kakvim znacima ili simptomima kod pacijentkinje. Rezultati našeg ispitivanja pokazuju da bi korišćenjem kulture cervikalnog i vaginalnog brisa najveći broj pacijentkinja sa patološkom vaginalnom florom ostao nedijagnostikovano i nelečen, dok bi s druge strane neke pacijentkinje sa normalnom vaginalnom florom zbog izolacije neke od bakterija verovatno bile nepotrebno lečene. Takođe, za razliku od većine infektivnih bolesti koje se dijagnostikuju izolacijom ili identifikacijom određenog mikroorganizma, najčešće i bez njegove kvantifikacije, kod BV kao polimikrobnog sindroma nemamo pojedinačnog uzročnika, tako da su nalazi kulture (podrazumeva se i izolacija *G. vaginalis*) praktično neupotrebljivi u dijagnozi ovog sindroma. Rezultati našeg ispitivanja takođe pokazuju da bi samo primena dva jednostavna testa, merenje vaginalnog pH i proba sa 10% KOH bila dovoljna da u najvećem broju slučajeva, ako ne postavimo preciznu dijagnozu, onda svakako sa velikom verovatnoćom isključimo postojanje bolesti, ili izdvojimo one koje treba uputiti na dalja ispitivanja. Dalje ispitivanje, u ovakvim slučajevima pre svega podrazumeva mikroskopski pregled NPVS ili preparata po Gramu, a tek nakon toga (u malom broju slučajeva) korišćenje drugih mikrobioloških i/ili molekularnih postupaka u cilju detekcije specifičnih mikroorganizama (npr. *C.trachomatis*). Dakle, mikroskopski pregled NPVS i/ili preparata bojenog po Gramu je još uvek najvažniji u evaluaciji stanja vaginalne flore, i tako će i ostati, sve dok se ne uspostave molekularna oruđa koja bi na personalnom nivou definisala kvantitativni i kvalitativni sastav vaginalne flore, i možda preciznije definisala granicu između normalnog i patološkog. Zaključak ove studije je da uprkos velikom broju činjenicama koje nedvosmisleno ukazuju na malu (nikakvu) vrednost kulture vaginalnog i ili cervikalnog brisa u kliničkoj praksi, iz nama neobjašnjivih razloga, ovo u našoj zemlji još uvek najčešća procedura za procenu stanja vaginalne flore. S druge strane, i rezultati našeg ispitivanja pokazuju da korišćenje samo dva jednostavna testa, dakle i u uslovima kada lekar nema ili nije obučen za mikroskopski pregled, mogu kod najvećeg broja pacijentkinja isključiti postojanje infekcije, ili ukazati na potrebu za daljim ispitivanjima. Ovakav pristup doveo bi do mnogo boljih rezultata u dijagnozi, lečenju i prevenciji ozbiljnih komplikacije do kojih one mogu dovesti.

Naravno rezultati se nisu bitnije promenili ni kod 701 pacijentkinje (u odnosu na 505 pacijentkinja analiziranih u pomenutom radu) za koje smo imali nalaz kulture i kod 51 (7,2 %) je kultura bila pozitivna i iz cervikovaginalnog brisa su izolovani: *Staphylococcus coag. neg.* (n=15), *Enterococcus* (n=10), *E. coli* (n=7), *Staphylococcus aureus* (n=6) *Streptococcus β haemoliticus* (n=5); *G. vaginalis* (n=5), *Streptococcus viridans* (n=2) i *Proteus mirabilis* (n=1). Dakle, kulturom smo detektovali KOKE kod 5,4% (38/701) pacijentkinja, mikroskopskim pregledom na uvećanju X1000 detektovali smo ih kod 6,4 % (45/704), a mikroskopskim

pregledom na uvećanju x200 kod 36,6% (258/704) uzoraka. Vrednost pH i KOH testa pokazala se i značajnijim nego što je to izneto u pomenutom radu, i samo potvrdila da bi ova dva jednostavna testa trebalo da se koriste kao skrining metode u dijagnozi vaginalnih infekcija, kako u populaciji trudnica tako i generalno, što bi značajno doprinelo poboljšanju reproduktivnog zdravlja naših pacijentkinja.

U ovom ispitivanju svim pacijentkinjama uziman je i cervikalni bris na prisustvo *M. hominis*, *U. urealyticum* i *C. Trachomatis*, ali s obzirom na vrlo malu učestalost oko 1% (*M. Hominis*) 3% (*U. Urealyticum*) i oko 2% *C. Trachomatis* ovi podaci nisu analizirani.



### 3.7 KONCENTRACIJE ISPITIVANIH CITOKINA

Citokini su proteina ili glikoproteina male molekulske mase koje sekretuju gotovo sve ćelije organizma a čija je najvažnija uloga održavanje međucelijskih komunikacija. Nije podela citokina idealna s obzirom na njihove karakteristike i činjenicu da ih luče gotovo sve ćelije u organizmu zbog čega ćemo navesti nekoliko najčešćih Tako ih možemo podeliti na one koji učestvuju u celularnom (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) ili humoralnom imunom odgovoru (IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, and IL-13) ili na Th<sub>1</sub> i Th<sub>2</sub> citokine u kojoj Th<sub>2</sub> ćelije luče uglavnom antiinflamatorne, a Th<sub>1</sub> proinflamatorne citokine. Međutim napredak nauke i otkrivanje novih citokina i njihove uloge i značaja u različitim imunskim mehanizmima nameće potrebu za novim podelama. Tako smo i mi u ovom rada sve ispitivane citokine načelno podelili na Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12 p70), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13), Th17 (IL-17a, IL-22), Th9 (IL-9), proinflamacijske citokine (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ ) i imunoregulatorni IL-10. Podela na Th1, Th2, Th17 i Th9 govori samo o ćelijama koje predstavljaju dominantan izvor određenog citokina, i o njegovoj ulozi u celularnoj ili humoralnoj imunskoj reakciji. Tako, Th2 ćelije luče uglavnom antiinflamatorne citokine (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), ali i manji broj proinflamatornih citokina i hemokina ( IL-6, IL-8). Th1 ćelije primarno proizvode uglavnom proinflamatorne i u manjim količinama antiinflamatorne citokine. Dakle jasno je da pravu prirodu nekog citokina teško možemo sagledati iz informacije o pripadnosti nekoj od Th ćelija. Reproductivni imunolozi citokina najčešće dele na proinflamatorne, antiinflamatorne, hemokini i polipeptidne faktore rasta. Nakon prepoznavanja antigena dolazi do aktivacije APC i njihove migracije u sekundarne limfne organe, gde one aktiviraju naivne (TH0) ćelije koje se dalje diferenciraju u različite subpopulacije: TH1, TH2, TH3, TH9, TH17, TFH, TReg ili citotoksične T ćelije [33] Diferencijacija Th0 u ove subpopulacije zavisna je od mnogobrojnih faktora, ali svakako da je jedan od bitnijih vrsta i koncentracija antigena, odnosno u našem slučaju broj i vrsta mikroorganizama. Od istog faktora najviše zavisi i tip citokinske mreže koji će se formirati, a u zavisnosti od citokinske mreže koja dominira tokom prezentacije antigena zavisi u kom će pravcu krenuti diferencijacija Th0 ćelija. Odmah posle aktivacije citotoksični T limfociti (CTL) su potpuno funkcionalni i spremni da upotrebe svoj arsenal oružja u cilju eliminacije inficiranih ćelija. Aktivirane CD4<sup>+</sup> T kao što im samo ime kaže, pomažu, aktivaciju B-ćelija i CTL, ili tako što sekretuju citokine ili samim ćelijsko-ćelijskim kontaktima. Istovremeno TH ćelije učestvuju u inicijaciji, održavanju i regulaciji urođenog imunskog odgovora tako što dovode do aktivacije i regrutacije PMN, makrofaga, mast ćelija i monocita. Dakle kombinacije različitih citokina su odlučujući faktor u diferencijaciji Th0 u različite

subpopulacije Th limfocita, a ponovićemo da one u najvećoj meri zavise od broje i vrsta mikroorganizama koji se trenutno nalaze u vagini. Trenutno, zbog toga što su najnovija molekularna ispitivanja pokazala veliku dinamičnost vaginalnog ekosistema na koju može da utiče veliki broj endogenih i egzogenih faktora, a pretpostavljamo da ovakva dinamičnost neminovno dovodi do promena u koncentracijama pojedinih citokina. Postojanje TH1 i TH2 subpopulacije je odavno poznato i dobro su proučeni mehanizmi koji dovode do diferencijacije naivnih ćelija u jednu od ove dve subpopulacije. TH1 ćelije proizvode IFN $\gamma$  i učestvuju u ćelijski posredovanom imunskom odgovoru, uglavnom protiv intraćelijskih patogena. IFN- $\gamma$  proizvode uglavnom TH1 limfociti, CTL, NK-ćelije i makrofagi, dok TH2 subpopulacija limfocita ne luči IFN- $\gamma$ . Sve ove ćelije luče IFN- $\gamma$  samo kada su aktivirane, odnosno kao deo imunskog odgovora na IL-2, antigene, mitogene, aloantigene ili udružene efekte IL-12 i IL-18. Proizvodnju IFN-gama inhibiraju IL-4, IL-10, TGF-beta, glukokortikoidi, vitamin D3. IFN- $\gamma$  promovira specifične i nespecifične mehanizme odbrane domaćina od infektivnih agenasa. Jedan je od najvažnijih citokina odgovornih za pojačanu ekspresiju MHC molekula klase I, i indukciju ekspresije MHC molekula klase II na leukocitima i epitelnim ćelijama. Smatra se najvažnijim citokinom u aktivaciji i regulaciji aktivnosti mononuklearnih fagocita i učestvuje u regulaciji proizvodnje drugih imunomodulatornih i proinflamatornih citokina, kao što su TNF-alfa i IL-12 [498]. TH2 ćelije proizvode IL4, IL5, IL13 i IL10 i njihove aktivnosti su vezane uglavnom za humoralni imunski odgovor protiv različitih parazita. Ključni citokin koji indukuje diferencijaciju TH naivnih ćelija u TH1 je IL-12, dok IL4 dovodi do indukcije transkripcionog faktora GATA-3, sekrecije IL4, IL5 i IL13 i diferencijacije u TH2 subpopulaciju. Glavne efektorske ćelije TH1 imunskog odgovora su makrofagi, CTL, IgB B ćelije i CD4 T ćelije koje proizvode IFN $\gamma$ , a u TH2 imunskom odgovoru to su eozinofili, bazofili, mast ćelije, IgE B-ćelije i CD4 ćelije koje proizvode IL4 i IL5. Poslednjih godina međutim pokazano je postojanje još nekoliko T ćelijskih subpopulacija koje se razvijaju nezavisno od TH1/TH2 puta. Treća subpopulacija nazvana je Th17 ćelijama, otkrivena je u ispitivanjima autoimunih oboljenja, gde je pokazano da se razlikuje od klasičnog Th1/TH2 puta. Transkripcioni faktori kao što su T-beta i GATA-3 koji su važni faktori regulacije TH1/TH2 diferencijacije, imaju negativne efekte na diferencijaciju TH17. TH17 ćelije sekrecuju IL-17, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-21 i IL-22 i posreduju u odbrani od ekstraćelijskih bakterija ili gljivica. IL-17 spada u grupu proinflamatornih citokina i značajan je faktor u etiopatogenezi različitih inflamatornih oboljenja. IL-17 promovira inflamatorne procese tako što indukuje proizvodnju različitih proinflamatornih citokina i hemokina, MMP, regrutuje PMN, povećava proizvodnju antitela i aktivira T ćelije. IL-23 koji proizvode dendritske ćelije povećava proizvodnju IL-17 u

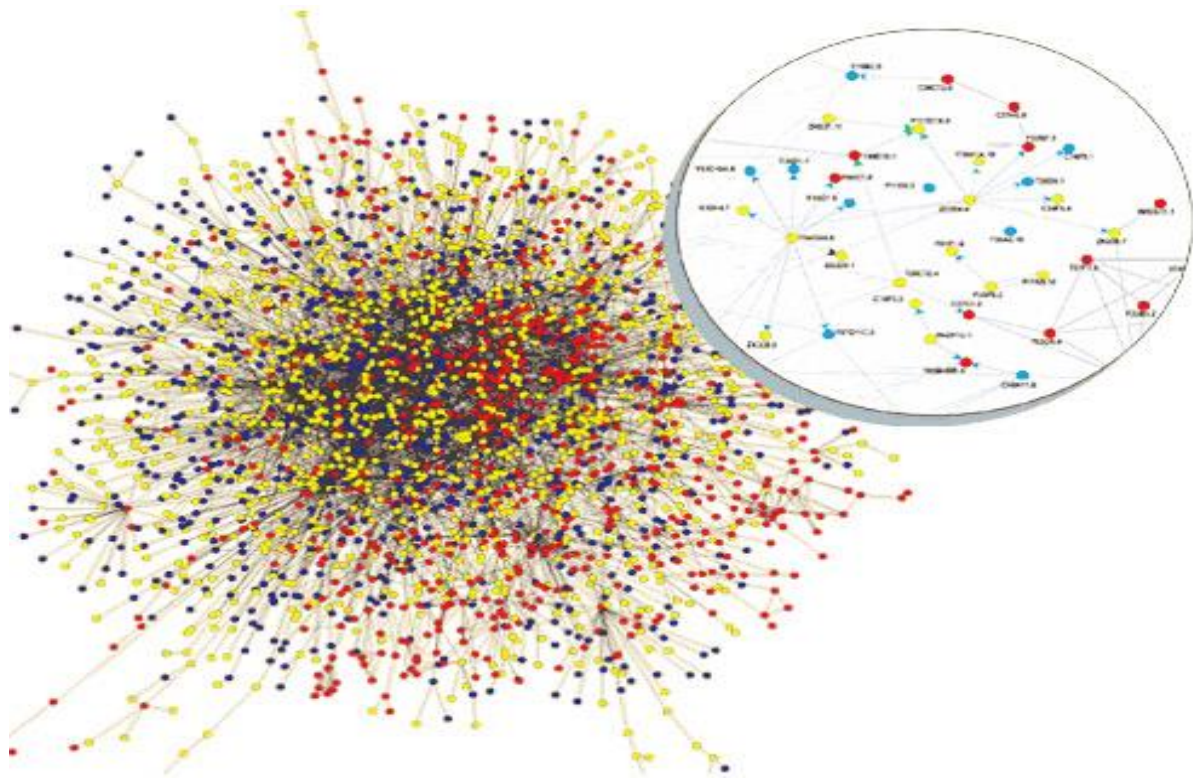
kulturi T ćelija. IL-23 je heterodimeričan protein sa dve subjedinice, IL-23p19 i IL-12p40. Precizno je regulisana ravnoteža između TH-17 i TREGs posebno na mukoznim površinama, a TGF- $\beta$  je neophodan u diferencijaciji oba puta. Dakle, najvažniji citokin za razvoj TH17 tipa imunskog odgovora je faktor transformacije rasta beta (TGF- $\beta$ ), zajedno sa IL-6, IL-17, IL-21, IL-22, IL-1 i IL-23. Ova diferencijacija se pojačava u odsustvu IFN- $\gamma$  i IL-4. IL-6 i IL-21 dovode do aktivacije tipičnog TH17 transkripcionog faktora ROR $\gamma$ t, što dovodi do diferencijacije u TH17. Vitamin A, retionska kiselina i IL-6 promovišu TREGs diferencijaciju, a inhibicija IL-6 dovodi do promocije TH17. Dakle, TGF- $\beta$  je najčešće udružen sa diferencijacijom TREGs ćelija, odnosno inhibicijom TH1 i TH2, prisustvo antiinflamatornog citokina kao što je IL-6, dovodi do inhibicije razvoja Treg ćelija i diferencijacije Th0 u TH17. Nakon IL-17 identifikovana je još jedna subpopulacija nazvana TH9, jer luči značajne količine IL9, a za diferencijaciju iz TH0 ćelija neophodno je prisustvo TGF- $\beta$  i IL-4, mada stimulacija ovim citokinima ne dovodi do produkcije TH2 citokina, nego dovodi do produkcije IL9, za što je neophodna aktivacija transkripcionih faktora STAT6 (eng. *signal transducer and activator of transcription 6*), IRF4 (eng. *interferon response factor 4*), i GATA3 (1–4) [499-506]. Pored IL-9, TH9 proizvode IL-10 i IL-21. IL-9 pokazuje proinflamatorne osobine, i značajan je faktor u alergijskim inflamatornim procesima i odbrani od ekstraćelijskih parazitarnih infekcija. Pokazano je takođe da TH17 i TREGs mogu sekretovati IL9. Nedavno je pokazano da subpopulacija *human skin homing memory T cells* proizvode IL22, IL26 i IL13, ali ne i IL17 i IFN $\gamma$ , zbog čega je i dobila ime TH22 subpopulacija, koja je značajna u etiopatogenezi različitih autoimunih bolesti. U stečenoj imunskoj reakciji na većinu antigena mogu se identifikovati humoralni ili celularni tip imunskog odgovora, na osnovu komponenata imunskog sistema koje učestvuju u tom dogovoru. Humoralni tip imunskog odgovora posredovan je B-limfocitima, dok u celularnom tipu posreduju T-limfociti. Efektorne T-ćelije se dalje dele u citotoksične i pomažuće. Citotoksične ćelije ubijaju inficirane ciljne ćelije bilo oslobađanjem litičnih granula (perforin, granzimi) ili preko indukcije Fas liganda i TNF-alfa, koji preko vezivanja za svoje receptore iniciraju ćelijsku suicidalnu kaskadu, dovodeći do apoptoze ciljne ćelije. Aktivirajući signal naivne ćelije dobijaju od APC koje proizvode odgovarajuće citokine određuju koja će subpopulacija limfocita biti aktivirana. Od monocita koji izišu iz krvnog suda regrutuje se populacija takozvanih prekursorskih dendritskih ćelija iz kojih nastaju nezrele dendritične ćelije, a iz njih pod uticajem kostimulatora (IL-4, IL-12, GM-CSF i bakterijskih toksina nastaju zrele dendritske ćelije tipa 1. One stimulišu TH1 subpopulaciju i ćelijski imunski odgovor. Dendritske ćelije tipa 2 stimulišu TH2 subpopulaciju i humoralni imunski odgovor. Važan faktor u determinaciji imunskog odgovora je i vrsta APC

(makrofagi, B-limfociti, dendritične ćelije i dr), a ove ćelije produkuju i kostimulatore neophodne u proliferaciji i diferencijaciji T-limfocita.

Poslednjih godina ukazuje se na značaj koncepta mreže u biološkim naukama, pri čemu mreža predstavlja skup jedinica (citokin, bakterija, antiapoptotski faktor) povezanih jednom ili više veza preko kojih šalju signale koji određuju i regulišu međusobni uticaj između jedinica. Konačni efekti su rezultanta snage i trajanja pojedinih signala između jedinica pri čemu treba imati na umu da se radi o dinamičnim sistemima u kojima se signali i njihova snaga menjaju u jedinici vremena. U našem ispitivanju imamo najmanje tri isprepletene mreže mikrobnu, citokinsku i apoptotsku i članovi svaka od njih mogu svojim signalima da utiču na one druge. Tako naprimer u zavisnosti od karakteristike mikroorganizama dolazi do aktivacije određenih ćelija i njihovih TLR receptora, aktivacije transkripcionih mehanizama i oslobađanja određenog spektra citokina koji određuje pokretanja TH1 ili TH2 tip imunskog odgovora. Ako znamo da jedan isti mikroorganizam može u različitim ćelijama domaćina odvesti do oslobađanja potpuno različitih citokina, ili da ćelije mogu proizvoditi različite izoforme nekog citokina koji uvek indukuju ili inhibiraju druge citokine, onda je jasno koliko su ovi odnosi komplikovani i u jednostavnim biološkim sistemima. Međutim, novija istraživanja jasno pokazuju da bakterije produkuju različite molekule koji mogu imati značajan efekat na kapacitet leukocita i tkivnih ćelija da produkuje određenu mrežu citokina. Tako je poslednjih godina pažnja istraživača u izučavanju patogeneze infektivnih bolesti preusmerena sa ćelijskih učesnika u imunskom i inflamatornom odgovoru na medijatore koji orkestriraju taj odgovor. Citokini su svakako jedna od najvažnijih klasa medijatora inflamatornog odgovora. Zna se da se oni mogu u prenošenju signala ponašati kao klasični endokrini hormoni ali se mnogo više pažnje posvećuje njihovim autokrinim, parakrinim, jukstrakrinim, retrokrinim i intrakrinim efektima. Pažnja usmerena sa ćelija domaćina koje su smatrane jedinim faktorom u kontroli biologije citokina i na bakterije koje mogu svojim produktima ili direktnom interakcijom sa ćelijama bitno modifikovati citokinsku mrežu.

Dakle svaka od ometajućih faktora u ovom ispitivanju (CA, BIFIDO, LEPTO, KOKE) može uticati na koncentracije citokina kao i na broj i vijabilnost PMN, odnosno procenat apoptoze.

Ukoliko sad pored ove mikrobne mreže zamislimo i postojanje još dve druge mreže, citokinske i apoptotske, onda bi međusobne interakcije jedinica između ove tri mreže bile značajno komplikovanije od slike koju smo preuzeli iz rada Li i sar. Samo da bi ilustrovali komplikovanost i isprepletanost signala između pomenutih mreža [79, 507].



**Slika 3.64: Interakcije mikrobne mreže u vagini**

Termin interaktom prvi put je upotrebila grupa francuskih istraživača na čelu sa Žak Bernarom i ovaj termin se uglavnom odnosi na interakcije među genima, smatrajući da je međusobna interakcija među jedinicama ovakve mreže mnogo važnije od samog broja gena, jer i razlika u malom broju gena i proteina čiju produkciju kontrolišu može da dovede do značajnih uticaja na funkcionisanje jedne ovakve mreže, odnosno u krajnjoj meri na uticaj genotipa na fenotip [90]. Tako naprimer HIV sa svojih 19 proteina pravi sa proteinima čoveka (100 000 proteina) oko 1 443 direktne interakcije, a mikrobiom gastrointestinalnog trakta sa oko 9 miliona jedinstvenih gena mikroorganizama ostvaruje neprocenjiv broj interakcija sa humanim proteomom, a slično se može primeniti i na mikrobiom vagine, s tim što je ovaj neprocenjiv broj značajno manji. Koncept mreže (“network”) i interaktoma svakako su neke od najaktuelnijih tema u savremenoj biologiji, i svaki istraživač bi morao da ih ima na umu kada govori o rezultatima ovakvih ispitivanja [508-510].

Naravno da bi stres ili neke hormonske promene mogli značajno da utiču na svaku od tri pomenute mreže. Tako, mada glukokortikoidi inhibiraju produkciju kortikotropin rilizing hormona (CRH) u hipotalamusu, genska ekspresija CRH u placenti može biti stimulisana glukokortikoidima, i tako uspostavljati pozitivnu povratnu spregu pri kraju trudnoće, tako da povećanje kortizola dovodi do povećanja CRH. Interesantno, iako je kortizol inhibitor genske ekspresije CRH u odsustvu progesterona, nadmetanje sa jačim inhibitornim efektom progesterona na CRH gene u kasnoj trudnoći, moglo bi objasniti ovaj paradoksalnu pozitivnu

povratnu spregu sa produkcijom CRH u kasnoj trudnoći. Kako adenokortikotropni hormon stimuliše produkciju dihidroepiandrosterona u fetalnoj zoni nadbubrega, koji se onda u placenti metaboliše u estrogen i dovodi do pojačane sekrecije CRH u placenti stvarajući tako sekundarnu pozitivnu spregu, koja može sinhronizovati fetalnu maturaciju i miometrijalnu senzitivaciju. PGE<sub>2</sub>, IL-1 i IL-6 pojačavaju endometrijalnu ekspresiju gena CRH. Ovo takođe ukazuje na moguće autokrine i parakrine efekte CRH u tim tkivima i interakciju proinflamatornih citokina u decidui. Ova isprepletenost endokrine regulacije sa parakrinim interakcijama, delimično objašnjava teškoće pri pokušaju preciznijeg definisanja zbivanja u porođaju kod primata. Kako je već pokazano da postoji sistemska veza između CRH i inflamatornih citokina u CNS, logično je pretpostaviti da ona egzistira i na lokalnom, intrauterinom, nivou. Gestaciona tkiva proizvode i CRH i citokine tako da postoji jasna mogućnost međusobne regulacije CRH i citokina, kako u tim tkivima tako i u odnosu sa fetusom. Tako bi rani porast CRH mogao da dovede do povećane produkcije IL-1 ili da dovede do senzitivacije tkiva koja bi onda proizvela IL-1 u odgovoru na slabije inflamatorne stimulanse. I obrnuto, aktivacija inflamatornih medijatora i pokretanje citokinske kaskade može dovesti do porasta centralne i lokalne produkcije CRH, objašnjavajući porast serumskog CRH kod žena sa PL [511, 512]. IL-1 stimuliše produkciju CRH, a CRH povratno reguliše produkciju citokina utičući na imunske efektorske ćelije. Kako je pokazano da je stres majke udružen sa PL, poremećaji regulacije CRH i produkciji inflamatornih citokina može biti mehanizam koji objašnjava patofiziologiju ovih zbivanja [513-515]. Na osnovu do sada poznatih podataka nije moguće utvrditi da li je CRH uzrok ili posledica pojačanog inflamatornog odgovora, moguće je da oba događaja egzistiraju istovremeno [516-519]. Utvrđivanje tačnog sleda događaja bilo bi od velikog značaja u rasvetljavanju patofizioloških zbivanja kod PL udruženog sa stresom majke [520-525].

I sve ovo ne prvi pogled nema značaja za naše ispitivanje, ali ako uvažimo podatke po kojim a stres može dovesti do nastanka BV i značajno uticati na sastav vaginalne mikroflore jasno je kolika je isprepletenost pojedinih mehanizama u nastanku PP, i koliko je teško razlučiti uzročno od posledičnog [526-530].

Tabela 3.19 prikazuje kako bi pacijentkinje u ovom ispitivanju bile razvrstane po grupama ukoliko bi podelu pravili na osnovu samo mikroskopskih ometajućih faktora, odnosno broja PMN, CA, KOKA, BIFIDO i LEPTO formi. Kao što smo rekli ono na čemu se suštinski zasniva nova podela, kao i sve postojeće, jeste odnos laktobacila i BVAB, a u zavisnosti od njihovog broja dele se u tri podgrupe FULL, MID i NULL. Ono što želimo naglasiti je da pacijentkinje sa BVF imaju 100-1000 više bakterija u odnosu na pacijentkinje iz grupe NULL, zbog čega je

naša nulta hipoteza da bi ovolike razlike u broju morale odraziti na koncentracije citokina. Takođe, verujemo da bi svaki od ometajućih faktora i njihov kvantitet mogli značajno uticati na koncentracije citokina. Naravno da bi u ovu tabelu mogli uvesti još jedan faktor iz našeg ispitivanja koji bi moga značajno uticati na koncentracije ispitivanih citokina a to su vrednosti pH. Zaključak o mogućem broju faktora koji nisu deo našeg ispitivanja a koji bi mogli uticati na naše rezultate može se izvući iz diskusije o postojanju bioloških mreža i/ili interaktoma.

**Tabela 3.19: Mikroskopski nalaz kod 704 pacijentkinje na osnovu NP-6G, semikvantitativnog broja PMN i mikroskopske detekcije KOKA, LEPTO i BIFIDO formi**

NF	n	NORMAL-MID	n	NORMAL-NULL	n	UKUPNO
NF	192	NM	77	NN	28	297
NF/CA/PMN	27	NM/CA/K/PMN	18	NN/CA/K/PMN	10	55
NF/CA/K/PMN	25	NM/CA/PMN	13	NN/CA/K	7	45
NF/PMN	21	NM/CA	9	NN/BIF/K	5	35
NF/CA	9	NM/CA/BIF/K/PMN	7	NN/BIF/L/K	3	19
NF/CA/BIF/K/PMN	5	NM/PMN	8	NN/CA/L/K/PMN	2	15
NF/CA/K	4	NM/K/PMN	5	NN/CA/PMN	3	12
NF/K/PMN	5	NM/BIF/K	3	NN/K	2	10
NF/BIF	2	NM/CA/BIF/PMN	4	NN/L/K	2	8
NF/CA/BIF/L/K/PMN	2	NM/BIF/K/PMN	2	NN/PMN	2	6
NF/CA/BIF/L/PMN	2	NM/L/K	2	NN/BIF/K/PMN	1	5
NF/L/PMN	2	NM/L/K/PMN	2	NN/BIF/L/K/PMN	1	5
NF/BIF/K	1	NM/BIF	2	NN/CA/BIF/K	1	4
NF/CA/L/K	1	NM/BIF/PMN	1	NN/CA/BIF/K/PMN	1	3
NF/CA/L/K/PMN	1	NM/CA/BIF	1	NN/CA/BIF/PMN	1	3
NF/K	1	NM/CA/BIF/L	1	NN/CA/L	1	3
NF/L	1	NM/CA/L/K	1	NN/L	1	3
		NM/CA/L/K/PMN	1	NN/L/PMN	1	2
<b>UKUPNO</b>	<b>301</b>	<b>UKUPNO</b>	<b>157</b>	<b>UKUPNO</b>	<b>72</b>	<b>530</b>
<b>BV-FULL</b>	<b>N</b>	<b>BV-MID</b>	<b>N</b>	<b>BV-NULL</b>	<b>N</b>	<b>UKUPNO</b>
BVF/K	34	BVM/K	18	BVN/K	16	68
BVF/CA/K/PMN	19	BVM/CA/K/PMN	16	BVN/CA/K/PMN	8	43
BVF/CA/PMN	5	BVM/CA/PMN	6	BVN	3	14
BVF/K/PMN	2	BVM/CA/K	5	BVN/K/PMN	3	10
BVF/CA/K	2	BVM/CA	4	BVN/L	3	9
BVF/CA/L/PMN	1	BVM/PMN	3	BVN/BIF	2	6
BVF/PMN	1	BVM/K/PMN	2	BVN/CA/K	2	5
BVF	1	BVM/L/PMN	1	BVN/CA/L/K	2	4
BVF/CA	1	BVM/CA/BIF/K	1	BVN/CA/L/K/PMN	2	4
		BVM	1	BVN/CA/L/PMN	1	2
		BVM/BIF	1	BVN/CA	1	2
		BVM/L/K	1	BVN/CA/BIF	1	2
				BVN/CA/BIF/K/PMN	1	1
				BVN/CA/BIF/PMN	1	1
				BVN/CA/L	1	1
				BVN/CA/PMN	1	1
				BVN/L/K	1	1
<b>UKUPNO</b>	<b>66</b>	<b>UKUPNO</b>	<b>59</b>	<b>UKUPNO</b>	<b>49</b>	<b>174</b>
	<b>367</b>		<b>216</b>		<b>121</b>	<b>704</b>

K=koke; BIF= BIFIDO; L= LEPTO; PMN= (PMN2+PMN3)

Gledajući ovu tabelu ono čega se treba prisetiti jeste da najveći broj do sada objavljenih studija, a koji se odnosi na lokalne koncentracije citokina pacijentkinje deli u samo u dve (Amsel) odnosno tri grupe (Nugent). Prihvatanjem takve podele i statističke analize podataka kod te dve ili tri grupe pacijentkinja, isključuje se ne samo mogućnost uticaja pomenutih ometajućih (mešajućih, konfauding) faktora, pri čemu opet podsećamo da ove dve podele suštinski ne razlikuju kvantitativni odnos između broja laktobacila i BVAB. Tako pacijentkinja koje smo na osnovu kriterijuma po Ison/Hayu ili NP-6G svrstali u grupu sa čistim ili hipocelularnim (BVN) nalazom, na osnovu Nugentovih kriterijuma mogu biti svrstane u grupu intermedijaran ili BV. Naprimer, ako na 5 vidnih polja ne nađemo laktobacile ta pacijentkinja će dobiti 4 boda i po Nugentovim kriterijuma biti svrstana u intermedijarne. Ako na tih istih 5 polja nađemo preko 6 morfotipova tipa gardnerele pacijentkinja će dobiti još 3 boda i sa 7 bodova biće postavljena dijagnoza BV. Kao što je poznato da bi neku bakteriju uopšte videli na preparatu po Gramu ona mora da je prisutna u koncentracijama koje su veće od  $10^4$ - $10^5$  iz čega možemo zaključiti da se koncentracije bakterija kod hipocelularnih nalaza kreću u ovim granicama ili su manje, dok su koncentracije kod pacijentkinje sa nalazom BVF kao što smo rekli 100-1000 puta veće, što je najlakše razumeti ukoliko još jednom pogledamo fotografije pacijentkinja sa nalazom BVN i BVF u našem ispitivanju.

Zbog toga je u ovom ispitivanju statistička obrada podataka za svaki od ispitivanih citokina rađena u odnosu na različite dijagnostičke kriterijume. Rezultati dobijeni Kruskal–Wallisovom analizom varijanse (*post hoc* analiza Mann–Whitney U test; Tabele 1, 2, 3, 4 i 5, Prilog 3) prikazani su u Tabeli 3.20 a statistički značajne razlike označene su crvenim slovima odnosno brojevima.

Ukoliko pogledamo tabelu u kojoj je prikazan sumarni prikaz rezultat za ispitivane citokine u odnosu na različite podele očigledno je da se izdvajaju tri citokina IL-6 i IL-1 $\beta$  i IL-12, i da je za prva dva statistička značajnost ( $p < 0,05$ ) nađena u odnosu na sve podele, dok za treći statistička značajnost nije nađena samo u podeli po Claeyasu. S druge strane samo u NP-6G nađena je statistička i INF- $\gamma$ . Zbog toga ćemo pre tumačenja dobijenih rezultata ukratko prodiskutovati opšte osobine ovih citokina i rezultate dobijene u dosadašnjim ispitivanjima.



**Tabela 3.20: Sumarni prikaz Kruskal-Wallis testa**

		IL12p70	IFN $\gamma$	IL17A	IL2	IL-10	IL9	IL22	IL6	IL13	IL4	IL5	IL1 $\beta$	TNF $\alpha$
Nugent	$\chi^2$	<b>8,060</b>	0,140	1,708	2,523	0,167	0,623	2,528	<b>17,090</b>	3,965	0,517	2,769	<b>16,910</b>	4,106
	p	<b>0,018</b>	0,932	0,426	0,283	0,920	0,732	0,283	<b>0,000</b>	0,138	0,772	0,250	<b>0,000</b>	0,128
Ison/Hay	$\chi^2$	<b>17,210</b>	0,207	4,532	8,862	4,013	4,081	1,540	<b>14,848</b>	7,056	5,068	5,520	<b>15,558</b>	9,034
	p	<b>0,002</b>	0,995	0,339	0,065	0,404	0,395	0,819	<b>0,005</b>	0,133	0,280	0,238	<b>0,004</b>	0,060
Claeys	$\chi^2$	10,552	2,417	1,888	3,790	3,846	1,946	5,173	<b>19,156</b>	4,142	2,301	2,088	<b>16,011</b>	5,802
	p	0,061	0,789	0,864	0,580	0,572	0,857	0,395	<b>0,002</b>	0,529	0,806	0,837	<b>0,007</b>	0,326
NP-6G	$\chi^2$	<b>18,518</b>	<b>12,890</b>	5,641	3,638	3,721	10,417	5,108	<b>12,093</b>	2,307	2,478	4,192	<b>18,984</b>	8,386
	p	<b>0,002</b>	<b>0,024</b>	0,343	0,603	0,590	0,064	0,403	<b>0,034</b>	0,805	0,780	0,522	<b>0,002</b>	0,136

### 3.7.1 IL-1 $\beta$

IL-1 je zajedničko ime za dva posebna proteina IL-1 $\alpha$  i IL-1 $\beta$  koji su prvi u nizu velike porodice citokina nazvanih interleukini. IL-1 proizvode gotovo sve ćelije sa jedrom uključujući sve članove familije monocita/makrofaga, B-limfocita, NK-ćelija, klonu T-limfocita, dendritskih ćelija, astrocita, fibroblasta, neutrofila, endotelijalnih i ćelija glatkih mišića. IL-1 je veoma važan citokin koji poseduje nekoliko bioloških osobina koje dovode do ekspresije proinflamatornih gena. Jedna od najvažnijih osobina IL-1 je njegova sposobnost da pokrene i podrži ekspresiju COX2 i inducibilne azot oksid sintetaze (iNOS). Ovo ima za posledicu stvaranje velike količine PGE2 i NO u ćelijama izloženim dejstvu IL-1. Druga važna osobina IL-1 je da poveća ekspresiju adhezivnih molekula kakav je intracelularni adhezivni molekul – 1 (ICAM-1) koji se nalazi u endotelijalnim ćelijama i na drugim ćelijskim površinama. Ova osobina IL-1 omogućava infiltraciju inflamatornih i imunokompetentnih ćelija u ekstravaskularnom prostoru. IL-1 je plejotropni citokin koji egzistira u dve homologe ali genetski različite izoforme koji posreduju u različitim fiziološkim i patofiziološkim događajima. Dovodi do pojačane ekspresije IL-2, IL-7, IL-10 i IL-12. U normalnoj trudnoći nivo IL-1 u amnionskoj tečnosti i gestacionim tkivima raste tokom trudnoće, sa značajnim povećanjem koncentracije u toku porođaja [531]. Kasnija eksperimentalna istraživanja na životinjama pokazala su da administracija IL-1 $\alpha$  ili IL-1 $\beta$  indukuje PL.

Romero i sar. su davno pretpostavili da IL-1 produkovan od strane domaćina (fetus ili majka) može dovesti do inicijacije porođaja [532]. Kasnija saznanja potvrdila su ovu pretpostavku jer je pokazano da stimuliše produkciju PG u amnionu, horionu i miometriju, da humana decidua proizvodi IL-1 u odgovoru na bakterijske produkte, nađene su povišene koncentracije ovog citokina u amnionskoj tečnosti trudnica sa PP i IUI. IL-1 učestvuje u indukciji ekspresije

gena za COX-2 i produkciji PG [533]. Pokazan je veliki značaj ovog interleukina u uslovima PP udruženog sa infekcijom gram negativnim bakterijama [534-536]. IL-1 $\beta$  dovodi do porasta PG, tako što dovodi do povećane ekspresije inducibilne forme PGHS-2 [537].

IL-1 $\beta$  posredovani signali rezultiraju aktivacijom transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B i posledične povećane produkcije TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, MIP-1 $\alpha$ , i drugih citokina, važnih za akutni inflamatorni odgovor. Povećana produkcija i oslobađanje TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  ponovno aktivira NF- $\kappa$ B stvarajući tako jednu pozitivnu povratnu spregu koja može dovesti do ekscesivne produkcije citokina koja igra ključnu ulogu u patogenezi PP. Pored toga, NF- $\kappa$ B reguliše transkripciju gena za COX-2, koja je esencijalna za produkciju PG, i ima veliku ulogu u genskoj regulaciji sinteze progestrona. Ipak, rezultati Hirsch i sar [538]. na modelu miševa sugerišu da lokalna pojačana ekspresija IL-1 možda i ne igra centralnu ulogu u patofiziološkim zbivanjima PL udruženog sa infekcijom. Ovakav zaključak protivreči, je u suprotnosti sa velikim brojem opservacionih studija kod žena koje su našle udruženost između povećane koncentracije inflamatornih citokina i infekcijom indukovano porođaja. Druge studije na eksperimentalnim životinjama dokumentovale su sposobnost citokina da indukuju porođaj, tako infuzija IL-1beta u amnionsku šupljinu rezus majmuna uzrokuje rapidnu produkciju TNF-alfa i PG, praćenih uterinim kontrakcijama [539]. PL je indukovano i kod miševa nakon sistemske administracije IL-1 [540] i kod zečeva kombinacijom IL-1 i TNF-alfa ubačenih u amnionsku šupljinu [541]. Zbog toga su Hirsch i sar, zbog preciznijeg određivanja uloge IL-1 kod PL udruženog sa infekcijom u eksperimentu koristili miševe kod kojih je potpuno odsutan signal za IL-1 (eng. *knockout*) i pokazali da maternalna aktivnost IL-1 nije neophodna za porođaj, bilo na lokalnom ili sistemskom nivou. Ova neovisnost o IL-1 može biti rezultat redundantnosti u citokinskoj mreži, ili sa nekim još nepoznatim mehanizmima koji nisu u vezi sa aktivnošću IL-1, a preko kojih infekcija dovodi do PL. Zbog toga autori veruju da je pojačana produkcija IL-1 jedan epifenomen koji se prvenstveno javlja zbog prisustva bakterija u uterinoj šupljini. Primarna uloga IL-1 je da dovodi do povećane aktivacije imunih ćelija i posledičnog uticaja na njihovu produkciju citokina i imunomodulatornih molekula.

### **3.7.2 IL-6**

IL-6 je jedan od najvažnijih medijatora u odgovoru domaćina na infekciju ili oštećenje tkiva i produkuje ga veliki broj različitih ćelija: stimulisani monociti, fibroblasti, endotelijalne ćelije, makrofazi, T-ćelije, B-ćelije, PMN, glatke mišićne ćelije i druge. Fiziološki stimulansi dovode do sinteze IL-6 su IL-1, bakterijski endotoksini i TNF- $\alpha$ . IL - 6 može sam stimulisati ili inhibirati svoju sintezu u zavisnosti od tipa ćelija. U epitelijalnim endotelijalnim i fibroblasnim ćelijama sekreciju IL-6 može indukovati i IL-17. IL-6 igra centralnu ulogu u gotovo svakom

akutnom inflamatornom odgovoru bilo da se radi o infekciji ili stranom telu, tako što se upliće u procese aktivacije komplementa, opsonizacije bakterija, mobilizacije neutrofila, porasta bazalne temperature i aktivacije T i B limfocita. Na uloga IL-6 u događajima vezanim za PP udružen sa infekcijom ukazuju različiti podaci kao što su, povećana produkcija PG u amnionu i decidui i njegova pojačana produkcija u odgovoru na bakterijske produkte i mnogi drugi [542-546]. Pacijentkinje sa pozitivnom kulturom imale su kraći interval od amniocenteze do porođaja od onih kod kojih je kultura bila negativna. Ovaj interval bio je kraći i kod pacijentkinja sa negativnom kulturom, ali visokim koncentracijama IL-6. Ovakav nalaz potvrđuje nalaze Romera i sar. [547-549] i podržava hipotezu da aktivacija inflamatornih medijatora igra značajnu ulogu u pokretanju i/ili propagaciji inflamatorno-imunološke kaskade koja dovodi do porođaja. Na ovo ukazuje i podatak da kod pacijentkinja sa PL postoji bolja korelacija vrednosti citokina u amnionskoj tečnosti (koji predstavljaju odraz odgovora fetomaternalne jedinice na infekciju) od kulture amnionske tečnosti (detektuje se samo prisustvo nekog mikroorganizma) u predikciji PP. Romero i sar. [549] su u svojoj studiji utvrdili klinički skor na osnovu sledećih parametara: gestacina starost, preparat po Gramu, koncentracija glukoze, leukocite esteraza, CRP u serumu majke. Rezultati ove studije pokazali su da vrednosti IL-6 u AF mnogo bolji prediktori PP od bilo kojeg drugog parametra ili kliničkog skora (samog ili u kombinaciji). Njihov matematički model ukazuje na mogućnost korišćenja kvantitativnih vrednosti citokina u preciznijoj predikciji PP, i s obzirom na nalaze o korelaciji citokina u cervikovaginalnom sekretu i amnionskoj tečnosti [550]. predlažu određivanje citokina u cervikalnom sekretu. Ovo bi omogućilo da se kod pacijentkinja sa pozitivnim nalazom u cervikalnom sekretu uradi amniocenteza i kvantitativno odrede vrednosti citokina, te da se na osnovu toga predvidi verovatan period u kome će doći do porođaja i da se na osnovu toga preduzmu adekvatni terapijski postupci [551-553]. Wensrom i sar. [554] su našli povišene koncentracije IL-6 u amnionskoj tečnosti žena koje su se prevremeno porodile 30 dana posle rane amniocenteze, u odnosu na kontrolnu grupu. U odsustvu infekcije ovaj citokin može biti detektovan u malim koncentracijama u amnionskoj tečnosti žena u drugom i trećem trimestru koje nisu u porođaju [555]. Andrews i sar.[556] našli povećane koncentracije IL-6 u amnionskoj tečnosti žena kod kojih je iz horioamniona ili amnionske tečnosti izolovan jedan ili više mikroorganizama, kao i da vrednosti IL-6 ukazuju na kolonizaciju horioamniona mikroorganizmima čak i kada je kultura amnionske tečnosti negativna. Ovaj nalaz bio je dalji poticaj za izučavanje vrednosti IL-6 kao markera IUI i kada je nalaz kulture negativan. Yoon i sar. [557] su našli značajno veće koncentracije IL-6 kod žena sa histopatološki potvrđenim nalazom horioamnionitisa i ukazali na vrednost određivanja IL-6 kao prediktora

horioamnionske infekcije i povećanog neonatalnog rizika. Goepfert i sar [558] su u svojoj prospektivnoj opservacionoj studiji merili koncentraciju IL-6 i FFN kod 2 929 trudnica bez simptoma između 22 i 24 n.g. Ovde ćemo napomenuti da najveći broj studija koji se odnose na koncentracije kako IL-6, a tako i drugih citokina, odnosi na pacijentkinja sa simptomima i znacima PP, zbog čega nisu uporedivi sa rezultatima našeg ispitivanja jer mislimo da se u takvim uslovima izvori i uzroci povišenih ili sniženih koncentracija citokina bitno razlikuju u odnosu na populaciju asimptomatskih pacijentkinja. Naprimera, ukoliko kod trudnice sa znacima i simptomima PP nađemo povišene koncentracije IL-6 a pri tome pacijentkinja ima BV nikako ne možemo zaključiti da je BV uzrok povišenih koncentracija IL-6 bez obzira na rezultate nekih, a i našeg ispitivanja, da pacijentkinje sa BV imaju veće koncentracije IL-6. u ovoj grupi trudnica veće je došlo do aktivacije fetalnih membrana, kontrakcija miometrijuma i promena na grliću materice i tako je aktivirana veliki broj drugih ćelija (amnion, decidua, horion, miometrijum, grlić) koje mogu bitno uticati na koncentracije citokina koje mi izmerimo u grliću materice i poredimo ih sa mikrobiološkim statusom vaginalne flore. Asimptomatske trudnice su prema tome bili osnovni razlog za poređenje ove studije i naših rezultata, a osim stoga u ovoj studiji ispitivani su i vrednost drugih prediktora PP kao što su BV, dužina grlića materice koji su deo našeg ispitivanja. Posle toga su napravljene dve grupe pacijentkinja (n=125) one koje su se porodile pre 37 n. g. i posle 37 n.g. dok je u prvoj grupi 49 pacijentkinja imalo PL pre 32 n. g. Koncentracija IL-6 u cerviksu pacijentkinja između 22-24 n.g. koje su se porodile pre 32 n. g. ( $247 \pm 365$  vs  $84 \pm 129$  pg/ml;  $P=.005$ ), kao i kod svih pacijentkinja porođenih pre 35 n. g. ( $212 \pm 339$  vs  $111 \pm 186$  pg/ml;  $P=.008$ ) bila je signifikantno veća u odnosu na kontrolnu grupu. Oni su odredili 90. i 95. percentilu za kontrolne subjekte posle čega je izračunata granična vrednost za povišenu koncentraciju IL-6. Koncentracija IL-6  $>305$  pg/ml  $>90.$  percentile i  $>538$  pg/ml za 95. percentilu. Povišena koncentracija IL-6  $>$  za 90. percentilu 305 pg/ml nađena je kod 20% pacijentkinja sa PP i kod 9,6% u kontrolnoj grupi ( $p=.02$ ), a IL-6  $>95.$  percentile 538 pg/ml kod 12% i 4,8% ( $P=.04$ ). Pacijentkinje sa IL-6  $>95.$  percentile imale su 9X veći rizik od PP pre 32 n. g. i 3X veći rizik od PP pre 35 n. g. Među ženama porođenim pre 35 n. g. sa povišenom cervikalnom koncentracijom IL-6 u 24 n. g. autori nisu našli značajniju korelaciju sa drugim faktorima rizika kao što su: BV, BMI  $<19,8$  kg/m<sup>2</sup>, skraćeni grlić, ali su zato našli značajnu udruženost sa povišenim vrednostima FFN koji se danas smatra najboljim markerom u predikciji PP. Pretpostavlja se da subklinička infekcija ili amnio-horiona ili decidue, ili obe, mogu dovesti do poremećaja ekstracelularnog matriksa i pojavljivanja FFN u cerviksu i vagini. Međutim multivarijantnom analizom za povišene koncentracije IL-6 i granične vrednosti 50. i

95. percentile nije nađena statistički značajna korelacija ovog citokina i porođaja pre 35. ili 32. nedelje gestacije.

### **3.7.3 IL-12 p70**

IL-12p70 je heterodimerni glikoprotein koji se sastoji iz dve subjediniice p40 i p35 čija se ekspresija reguliše nezavisno. Dokazano je postojanje homodimernih i monodimernih oblika subjediniice p40 (IL-12p40) koji mogu delovati antagonistički na funkcije IL-12. Kao induktori produkcije INF- $\gamma$  IL-12. IL-23 i IL-27 igraju krucijalnu ulogu u regulaciji inflamatornog odgovora. Tako IL-12 i IL-27 učestvuju u TH1 diferencijaciji, dok je IL-27 značajan za opstanak i ekspanziju TH17. Fiziološki izvor IL-12, in vivo, primarno su APC, uključujući aktivirane monocite/makrofage i dendritične ćelije. Unutar nekoliko časova od infekcije počinje lučenje IL-12, posebno ako su u pitanju infekcija bakterijama i intraćelijskim parazitima. Pokazano je da IFN- $\gamma$  ima snažan pojačavajući efekat na sposobnost fagocitnih ćelija da luče IL-12, verovatno potencirajući produkciju IL-12 unutar inflamiranih tkiva. Bakterije, bakterijski produkti, zatim intracelularni patogeni kao što su virusi, gljivice dolaze u interakciju sa različitim receptorima na fagocitnim ćelijama i predstavljaju glavne induktore produkcije IL-12. Pored ovih stimulatornih mehanizama, produkciju IL-12 kontrolišu i inhibitorni mehanizmi. IL-10 koji je potentan inhibitor produkcije mnogih proinflamatornih citokina, takođe inhibira i produkciju IL-12. Eksperimentalno je pokazano da su IL-10 deficijentni miševi mnogo vulnerabilniji na LPS-izazvni endotoksični šok. Takođe je pokazano da sam IL-12 pojačava produkciju IL-10 u T-ćelijama. Pored IL-10 i TGF- $\beta$  je snažan inhibitor produkcije IL-12. IL-4 i IL-13 takođe delimično inhibiraju produkciju IL-12, sugerišući hipotezu po kojoj Th2 ćelije preko produkcije citokina kao što su IL-10, IL-4 i IL-13 suprimiraju produkciju IL-12 i tako sprečavaju uspostavljanje TH1 tipa imunskog odgovora. Nedavno je pokazano postojanje i trećeg mehanizma indukcije produkcije IL-12 tokom inflamacije, koji je nezavisan od prisustva aktivne infekcije ili imunskog odgovora. Tokom inflamacije dolazi u ECM do nakupljanja fragmenata niske molekulske težine koji potiču od glikozaminoglikana hijalurana, koji su se pokazali kao potentni induktori produkcije IL-12 u makrofagama. Ovi molekuli se vežu za adhezivni površni molekul CD44 na membrani makrofaga i uzrokuju povećanu produkciju IL-12. tako i u uslovima aseptičkog inflamatornog stanja, kao i odsustva imunskih mehanizmima indukovane ekspresije CD40 na T-ćelijama, može biti indukovana produkcija IL-12, koji onda može dovesti do indukcije produkcije IFN- $\gamma$  i tako dovesti do aktivacije makrofaga. Pored ovih stimulatornih mehanizama, produkciju IL-12 kontrolišu i inhibitorni mehanizmi. IL-10 koji je potentan inhibitor produkcije mnogih proinflamatornih citokina, takođe inhibira i produkciju IL-12. Eksperimentalno je pokazano da su IL-10 deficijentni

miševi mnogo vulnerabilniji na LPS-izazvni endotoksični šok. Takođe je pokazano da sam IL-12 pojačava produkciju IL-10 u T-ćelijama. Pored IL-10 i TGF- $\beta$  je snažan inhibitor produkcije IL-12. IL-4 i IL-13 takođe delimično inhibiraju produkciju IL-12, sugerišući hipotezu po kojoj Th2 ćelije preko produkcije citokina kao što su IL-10, IL-4 i IL-13 suprimiraju produkciju IL-12 i tako sprečavaju uspostavljanje TH1 tipa imunskog odgovora. Dakle, interleukin-12 se proizvodi u toku rane faze infekcije i inflamacije i deluje kao proinflamatorni citokin koji dovodi do produkcije IFN-gama, u T i NK-ćelijama, koji onda aktivira fagocitne ćelije. Ako je IL-12 i IL-12-indukovani IFN-gama prisutni tokom rane ekspanzije T-ćelija u odgovoru na antigen, dolazi do favorizacije Th1 imunskog odgovora i inhibicije Th2 imunskog odgovora. Dakle IL-12 pored proinflamatornih dejstava, predstavlja i potentan imunoregulatorni citokin koji promovise Th1 diferencijaciju i pomaže u odbrani od bakterija, intracelularnih parazita, gljiva i nekih virusa. Inhibirajući TH2 tip imunskog odgovora IL-12 ima supresivne efekte na alergijske reakcije, dok s druge strane promovišući Th1 tip imunskog odgovora on ima značajnu ulogu u imuno patološkim zbivanjima odgovornim za neke organ specifične autoimunske bolesti. Virus koji dovode do trajne ili prolazne imunodepresije, kao što su HIV ili virus malih boginja, mogu dovesti do smanjenja produkcije IL-12. S obzirom na sposobnost IL-12 da poveća otpornost na neke infektivne bolesti i da deluje kao adjuvant u vakcinaciji, kao i zbog njegovog snažnog antitumorskog dejstva, ispituje se mogućnost njegove terapijske upotrebe kod pacijenata sa HIV-infekcijom, malignim i nekim drugim bolestima. IL-12 takođe pojačava proliferaciju i citolitičku aktivnost CTL i NK-ćelija i stimuliše oslobađanje IFN-gama u tim ćelijama. Kao što je prethodno rečeno IFN-gama ima snažne pojačavajuće efekte na produkciju IL-12, a s druge strane poznato je da je IL-12 moćan induktor produkcije IFN- $\gamma$  u NK i T-ćelijama. Tako, IL-12-indukovani IFN- $\gamma$  uspostavlja pozitivnu povratnu spregu koja dovodi do pojačane produkcije IL-12. IL-12 i TNF- $\alpha$  zajedno sa IFN- $\gamma$  iz TH1 ćelija, stimulišu aktivaciju CTL i NK-ćelija, kao i monocita/makrofaga, koji predstavljaju najvažnije komponente celularnog imunskog odgovora. Ovi pozitivni mehanizmi amplifikacije (IL-12 = IFN- $\gamma$  = IL-12) predstavljaju potencijalno opasne mehanizme koji mogu dovesti do nekontrolisane produkcije citokina i šoka. da ne bude tako odgovorni su inhibitorni mehanizmi (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13). Ćelijska dejstva IL-12 posredovana su visokospecifičnim receptorima koji se sastoje iz dve subjednice nazvane IL-12R $\beta$ 1 i IL-12R $\beta$ 2. Ekspresija  $\beta$ 2 je ograničena i ona verovatno predstavlja centralni mehanizam kontrole aktivnosti IL-12. Smatra se da je ekspresija  $\beta$ 2 subjednice neophodna za TH1 diferencijaciju i da do njihove ekspresije ne dolazi na T-ćelijama koje ispoljavaju TH2 citokinsku mrežu. Aktivacija receptorskog kompleksa preko više fosforilacija dovodi do translokacije STAT do jedra, gde on veže specifične DNA sekvence u

promotornom regionu IL-12 inducibilnog gena. Dakle, IL-12 ima višestruke funkcije u imunskom odgovoru, a jedna od najvažnijih, ako ne i najvažnija, je u povećavanju produkcije IFN- $\gamma$ . S druge strane, pokazano je postojanje pozitivne povratne sprege između ova dva citokina. Jedan od glavnih zadataka u imunologiji je da se utvrdi uloga koju ima IFN- $\gamma$  na produkciju IL-12, kao i da li produkcija IFN- $\gamma$  prethodi produkciji IL-12 ili je obrnuto. Većina istraživanja je pokazala da je IFN- $\gamma$  potreban za produkciju IL-12 u monocitima ili makrofagama. Noviji podaci ukazuju da do indukcije IL-12 može doći nezavisno od IFN- $\gamma$ , odnosno da IFN- $\gamma$  nije neophodan za produkciju IL-12, ali je sigurno da IFN- $\gamma$  dovodi do povećane produkcije IL-12 i to preko različitih mehanizama: 1) direktno indukuje transkripciju IL-12p35 u perifernim mononuklearima krvi i priprema monocite za LPS-indukovanu transkripciju gena za IL-12 p35 i p40. 2) IFN- $\gamma$  povećava ekspresiju CD40 na monocitima koji najverovatnije pojačavaju odgovor monocita na stimulaciju ligandom CD40. 3) IFN- $\gamma$  smanjuje efekte IL-10 koji je snažan inhibitor produkcije IL-12. Smatra se da je IL-12 najmoćniji stimulator NK-ćelija i u njima indukuje transkripciju IFN- $\gamma$  koji pokazuje snažna sinergistička dejstva sa IL-2. IL-12 pojačava citotoksičnu aktivnost NK-ćelija i istovremeno je faktor rasta za te ćelije. Ova aktivnost IL-12 može biti blokirana antitelima specifičnim za TNF- $\alpha$ . U Th1 subpopulaciji limfocitima IL-12 indukuje sintezu IFN- $\gamma$ , IL-2 i TNF- $\alpha$ . Preko IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  IL-12 utiče na bolju ekspresiju MHC antigena na imunokompetentnim i ciljnim ćelijama, što dovodi do bolje interćelijske komunikacije imunokompetentnih ćelija, kao i do efikasnijeg prepoznavanja ciljnih ćelija. TNF- $\alpha$  je umešan u dejstva IL-12 na NK ćelije, jer aktivnost IL-12 može biti blokirana antitelima na TNF- $\alpha$ . IL-12 i TNF- $\alpha$  su kostimulatori u produkciji IFN- $\gamma$ . Produkcija IL-12, TNF- $\alpha$  i IFN- $\gamma$  inhibira IL-10. U TH2 ćelijama IL-12 smanjuje sintezu IL-4, IL-5 i IL-10. S obzirom da IL-12 pored APC luče i B-limfociti, koji su prvenstveno pod kontrolom TH2 ćelija, svaka akceleracija TH2 imunskog odgovora vodi u stimulaciju B-limfocita i povećanje produkcije IL-12, koji onda favorizuje TH1 tip imunskog odgovora. Dakle, IL-12 bi mogao biti transformator koji akceleraciju TH2 tipa imunskog odgovora pretvara u akceleraciju TH1 imunskog odgovora. Treba reći da B-limfociti sekretuju IL-12 samo u situacijama kada imaju ulogu APC, odnosno samo onda kada posle endocitoze antigena prezentuju njegove epitope u kontekstu MHC antigena klase II. Ovim fenomenom mogli bi se objasniti pobačaji posredovani imunskim mehanizmima, a koji su inicirani aktivacijom B-ćelija, posle kojih su zabeležene značajno veće serumske koncentracije IL-12 nego u normalnim trudnoćama. Novija ispitivanja pokazuju da je IL-4 dominantan citokin u odnosu na IL-12 i da se i da se imunski odgovor u uslovima istovremenog pojavljivanja značajnih koncentracija ova dva citokina ipak odvija u pravcu TH2 tipa imunskog odgovora, te

da je IL-12 sekretovan iz B-ćelija, u uslovima akceleracije Th2 tipa imunskog odgovora, zbog istovremenog izlučivanja IL-4 ipak u nemogućnosti da preokrene smer imunske reakcije ka Th1 tipu imunskog odgovora. IL-12 nema nikakvog uticaja na proliferaciju TH0 i TH2 ćelija, dok ima snažni proliferativni i aktivacioni uticaj na TH1 ćelije.

### 3.7.4 KONCENTACIJE CITOKINA PO GRUPAMA NA OSNOVU RAZLIČITIH DIJAGNOSTIČKIH KRITERIJUMA

#### NUGENTOVI KRITERIJUMI

Na osnovu Nugentovih kriterijuma statistička značajnost između različitih grupa pacijentkinja nađena je za tri od 13 citokina, IL-12, IL-6 i IL-1 $\beta$ . **Koncentracije IL-12** bile su najniže kod pacijentkinja sa BV (43,4 $\pm$ 198,5) i značajno su se razlikovale kod pacijentkinja sa normalnim (63,8 $\pm$ 448,9) i intermedijarnim (68,9 $\pm$ 520) nalazom, intermedijarnim nalazom (68,9 $\pm$ 520) i BV (43,4 $\pm$ 198,5), ali nije nađena statistički značajna razlika u koncentracijama IL-12 između pacijentkinja sa normalnom nalazom i BV. Koncetracije IL-6 značajno su se razlikovale kod pacijentkinja sa normalnim nalazom (224,8 $\pm$ 4003,5) u odnosu na pacijentkinje sa intermedijarnim nalazom (1631,4 $\pm$ 16324,6) i BV (629,6 $\pm$ 6873,8). Statistički značajne razlike za IL-1 $\beta$  nađene su samo između pacijentkinja sa normalnom nalazom (1087,1 $\pm$ 1304,8) i BV (1682,4 $\pm$ 1666,1).

#### ISON/HAY

U podeli po Ison/Hayu takođe je nađena statistička značajnost za tri ista citokina kao i podele po Nugentu što na indirektan način potvrđuje rezultate koje smo dobili poređenjem ove dve metode o njihovoj međusobnoj podudarnosti (hi kvadrat i Kappa indeks). Ipak treba primetiti da uvođenjem dve nove grupe, čist nalaz i koke, postojanje statističke značajnosti između pojedinih grupa se menja. Za IL-12 nađeni su isti rezultati, odnosno statistička značajnost između pacijentkinja sa normalnom nalazom (64,0 $\pm$ 458,7) i onih sa intermedijarnim (111,4 $\pm$ 642,3) i BV (51,8 $\pm$ 216,7), ali takva značajnost nađena je i za dve nove grupe pacijentkinja. Tako su pacijentkinje iz grupe čist nalaz (1,66 $\pm$ 4,74) i grupe koke (13,0 $\pm$ 68,9) imale statistički značajno različite koncentracije IL-12 u odnosu na pacijentkinje sa normalnom nalazom i BV. Ako pogledamo srednje koncentracije između pacijentkinja sa normalnim, intermedijarnim i BV videćemo da se one za IL-12 ne razlikuju značajnije, odnosno da su u obe podele pacijentkinje sa intermedijarnim nalazom imale najveće koncentracije ovog citokina, po Nugentu (67,9) a Ison/Hayu (111), dok su pacijentkinje sa BV imale najniže srednje vrednosti 43,4 (Nugent) i 51,7 (Ison/Hay). Podelom po Nugentu nisu nađene statistički razlike u odnosu na apoptozu, dok su u podeli po Ison/Hay pacijentkinje iz grupe čist nalaz (19,7 $\pm$ 15,3) imale



značajno veći procenat apoptoze u odnosu na pacijentkinje sa normalnom ( $12,2 \pm 9,7$ ), intermedijarnim nalazom ( $10,9 \pm 7,5$ ) ili kokama ( $10,6 \pm 11,4$ ), ali ne i pacijentkinjama sa BV ( $13,5 \pm 8,4$ ). Generalno pacijentkinje sa čistim nalazom u grupi po Ison/Hayu odlikuju se hipocelularnošću bakterijskih formi i PMN tako da bi ovi nalazi i pojačana apoptoza PMN govorili u prilog odsustva infekcije ili inflamacije, odnosno da je pacijentkinja zdrava. Međutim, kao što smo rekli hipocelularni nalaz na neki način znači da je broj bakterija manji od  $10^4 - 10^5$  te da na osnovu mikroskopskog nalaza ne možemo utvrditi kakav je odnos laktobacila i BVAB. Ako znamo da laktobacili imaju poapoptogeni efekat onda bi povećan procenat apoptoze mogao da nas navede da zaključimo da u ovakvoj zajednici dominiraju laktobacili ali da to zbog njihovog malog broja ne možemo utvrditi mikroskopskim pregledom. Međutim sasvim je moguća i potpuno suprotna pretpostavka po kojoj u ovoj mikroskopski nevidljivoj zajednici dominiraju BVAB koji dovode do povećane produkcije MKKL za koje je takođe pokazano da imaju antiinflamatorne i proapoptogene efekte. Ovaj primer najbolje ilustruje težinu tumačenja različitih inflamatornih medijatora kao prediktora zbivanja preveremenog porođaja.

#### CLEAYS

I podelom po Claeysu nađena je statistička značajnost u odnosu na stepen apoptoze, i to između sledećih grupa: normalan ( $11,6 \pm 9,2$ ) i BV ( $15,4 \pm 12,6$ ), normalan ( $11,6 \pm 9,2$ ) i koke ( $29,6 \pm 15,7$ ), intermedijaran ( $11,6 \pm 7,3$ ) i koke ( $29,6 \pm 15,7$ ), BV ( $15,4 \pm 12,6$ ) i koke ( $29,6 \pm 15,7$ ), grupe leukoreja ( $7,8 \pm 3,5$ ) i koke ( $29,6 \pm 15,7$ ), kao i između koke ( $29,6 \pm 15,7$ ) i pacijentkinja koje su imale nalaz Sličan normalnom ( $12,9 \pm 11,9$ ). dakle pacijentkinje koje u ovoj podeli karakteriše ekstremno veliki broj PMN imale su najniži stepen apoptoze što je u skladu sa činjenicom da u uslovima zapaljenje ili inflamacije (povećan broj PMN) je produžena vijabilnost PMN odnosno dolazi do odlaganja apoptoze. Ovom podelom nađene su i statistički značajne razlike u koncentracijama IL-6 i IL-1 $\beta$ . Pacijentkinje sa normalnim nalazom ( $256,6 \pm 4314,3$ ) imale su značajno manje koncentracije ovog citokina u odnosu na pacijentkinje sa BV ( $654,0 \pm 7002,5$ ), a takva značajnost nađena je i između pacijentkinja sa BV ( $654,0 \pm 7002,5$ ) i leukorejom ( $19,8 \pm 45,3$ ). Dakle pacijentkinje sa velikim brojem PMN imale su izrazito niske srednje koncentracije ovog citokina. Koncentracija IL-1 $\beta$  su se razlikovale u grupama normalan ( $1087,9 \pm 1316,0$ ) i BV ( $1625,9 \pm 1679,4$ ) kao i kod pacijentkinja sa intermedijarnim ( $1187,2 \pm 1211,5$ ) i BV ( $1625,9 \pm 1679,4$ ).

#### AMSEL

Da je studija rađena samo na osnovu Amselovih kriterijuma onda bi statistička značajnost (*t*-test) postojala samo za IL-1 $\beta$  i zaključili bi da je to jedini od ispitivanih citokina

koji je ima povećane koncentracije kod pacijentkinja sa BV, potvrđujući tako nalaze većine dosadašnjih studija.[559-564].

#### NP-6G

Analizom podataka na osnovu NP-6G nađena je statistička značajnost za IL-6, IL-12, IL-1 $\beta$  i IFN- $\gamma$ . Statistički značajna razlika koncentracija IL-12 nađena je između grupa:

- NF/NM (54,6 $\pm$ 384,8/28,5 $\pm$ 127,9);
- NF/**NN** (54,6 $\pm$ 384,8/**169,3** $\pm$ 968,6);
- NM/BVM (28,5 $\pm$ 127,9/88,5 $\pm$ 297,6);
- NN/**BVN** (169,3 $\pm$ 968,6/**14,4** $\pm$ 67,3);
- NN/BVM (169,3 $\pm$ 968,6/88,5 $\pm$ 297,6).

I ovde ćemo ukazati na činjenicu da ovi i prethodno pomenuti rezultati, dakle koncentracije citokina u grupama normalni, intermedijarni i BV (Nugent, Ison/Hay, Claeys), odnosno grupama normalne i BV (NP-6G predstavljaju koncentracije citokina koje suštinski zavise od odnosa laktobacila i BVAB. Dakle nijedan od ovde prikazanih rezultata ne uvažava mogući uticaj nekog od pomenutih ometajućih faktora. Kao što smo već rekli NP-6G za razliku od svih ostalih razlikuje pacijentkinje na osnovu broja bakterijskih morfotipova na preparatu po Gramu podatak koji nam je svakako interesantan jeste onaj koji ukazuje da su koncentracije IL-12p70 bile najviše i najniže u grupi pacijentkinja sa hipocelularnim nalazom, odnosno u grupama NN i BVN. Ovi rezultati jasno ukazuju da broj bakterija nije od odlučujućeg značaja za koncentracije citokina u grliću materice trudnica između 24-28 nedelje gestacije. Pri tome naravno ne možemo isključiti de je odnos između pojedinih bakterijskih vrsta taj koji značajno utiče na koncentracije citokina jer je poznato da neki mikroorganizmi dovode do pojačane produkcije nekog citokina dok drugi imaju suprotan efekat. Dakle posmatrajući samo mikrobnu mrežu koncentracije nekog citokina bile bi krajnja rezultata stimulativnih ili inhibitornih mehanizama velikog broja mikroorganizama, a kao što smo rekli prikazani rezultati ne uvažavaju ulogu nijednog od pomenutih mešajućih faktora:

- NF/NM (54,6 $\pm$ 384,8/28,5 $\pm$ 127,9);
- NF/**NN** (54,6 $\pm$ 384,8/**169,3** $\pm$ 968,6);

Ili ako pogledamo samo grupu sa normalnim nalazom (NF+NM+NN) onda vidimo da su pacijentkinje sa nalazom NF imale značajno veće koncentracije IL-12 u odnosu na nalaz NM, što bi nas moglo navesti da zaključimo da je veći broj laktobacila u ovoj grupi razlog ove

značajnosti. Međutim već sledeći nalaz koji ukazuje na značajno veće (najveće) koncentracije ovog citokina kod pacijentkinja iz grupe NN, ukazuje da broj laktobacila svakako nije odlučujući faktor za koncentracije IL-12. Ipak mislimo da je kroz diskusiju o laktobacilima i njihovom mogućem uticaju na koncentracije različitih citokina najlakše shvatiti koliko je teški, ili bolje rečeno sa koliko opreza i (samo) kritičnosti treba tumačiti dobijene rezultate. U studiji Nikolaitchouk i sar.[565] kod pacijentkinja bez BV pokazano je da je prisustvo *L. iners* u negativnoj korelaciji sa IL-1 $\beta$  i pozitivnoj korelaciji sa antiinflamatornim molekulom, sekretornim inhibitorom proteaza leukocita (SLPI; *secretory leukocyte protease inhibitor*), dok je drugi soj laktobacila *L. gasseri* u pozitivnoj korelaciji sa IL-1 $\beta$ . Druga studija Orfanelija i sar. [566] pokazala je da pacijentkinje kod kojih dominira *L. crispatus* imaju niže koncentracije IL-1 $\beta$ , a veće koncentracije SLPI. U Japanskoj populaciji trudnica kod kojih su laktobacili detektovani kulturom pokazano je da su žene sa izolovanim laktobacilima imale najmanje koncentracije IL-8, bez obzira da li su ili nisu izolovane druge anaerobne bakterije [567]. Kod 30 asimptomatskih žena kod kojih su koncentracije *L. inersa* merene Q-PCR dobijene su niske koncentracije IL-8 pri čemu podsećamo da *L. iners* ne raste u kulturi u kojoj uspevaju drugi laktobacili [568]. Suprotno, studija na populaciji adolescenata kod kojih su laktobacili izolovani kulturom, nisu pokazale nikakve razlike u koncentracijama citokina u odnosu na prisustvo laktobacila [569]. Ukratko, različiti sojevi laktobacila mogu različito da utiču na koncentracije pojedinih citokina. U ovom ispitivanju sve trudnice kod kojih su na preparatu po Gramu dominirale Gram pozitivne štapićaste forme (laktobacili) svrstane su u grupu zdravih, iako su se ove forme prilično razlikovale po svojim morfološkim, odnosno mikroskopskim karakteristikama. Tako su neke vrlo tanke i slabo se boje, dugačke, druge su deblje i jače se boje, neke su savijene i kratke – dakle brojni oblici različitog mikroskopskog izgleda koje smo tumačili kao laktobacile. U Metodologiji smo napomenuli da se u mikrobiološkom Bergeyevom priručniku laktobacili definišu kao bakterije dužine od 1,5 -10  $\mu\text{m}$ , ali da smo u ovom radu i forme do 20  $\mu\text{m}$  smatrali laktobacilima. Ukazali smo i na činjenicu da se rod bifidobakterija na preparatu po Gramu nekada veoma teško razlikuje od laktobacila. Dakle, različite Gram pozitivne štapićaste ili slične štapićastim formama smo tumačili kao laktobacile. U skladu s tim, najnoviji rezultati molekularnobioloških studija potvrđuju i ukazuju na još veću fenotipsku raznovrsnost laktobacila. Tako su *L. iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* najčešći laktobacili detektovani u vagini, dok se *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. johnsonii*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. paracasei* i *L. delbrueckii* nalaze ređe, a sve, naravno, zavisi i od korišćenih molekularnobioloških metoda i ispitivane populacije. [471, 570, 571]. Imajući u vidu bogatstvo roda laktobacila moguće je da

mikroskopske forme na fotografijama pripadaju nekom od ovih sojeva laktobacila ali je i moguće da se radi i o drugim bakterijama. Cilj nam je da ukažemo da različiti sojevi laktobacila mogu imati različit uticaj na koncentracije pojedinih citokina, i da se te koncentracije citokina mogu značajno razlikovati u “istoj” populaciji žena koje smo mi na osnovu nekih od dijagnostičkih kriterijuma (Amsel, Nugent, Ison/Hay, Claeys, NP-6G) svrstali u “zdrave”. Broj laktobacila predstavljaju važan činitelj koji može uticati na krajnje koncentracije nekog citokina, ali nikako odlučujući kao što smo pokazali na primeru koncentracija IL-12.

Još bolji primer si koncentracije IL-6 u različitim grupama pacijentkinja na osnovu NP-6G. Statistički značajna razlika nađena je između grupa:

- NF/BVF (316,1±4846,2/49,3±99,8);
- NM/BVF (31,00±80,5/49,3±99,8);
- NN/BVF (1221,00±9831,3//49,3±99,8).

Trudnice sa nalazom BVF imale su značajno različite koncentracije IL-6 u odnosu na sve tri grupe pacijentkinja. Ukoliko pogledamo Tabelu ove rezultate jasno je da ih ne možemo objasniti ni različitim odnosom a ni brojem između laktobacila i BVAB. Tako su pacijentkinje sa BVF, odnosno pacijentkinje sa najvećim brojem NŠF (BVAB) na mikroskopskom preparatu imale skoro identične srednje koncentracije ( 49,3 pg/ml) IL-6, kao i pacijentkinje koje su svrstane u grupu BVN (50,8 pg/ml) i kod kojih je broj BVAB preko 1000X manji u odnosu na BVF, što je najlakše razumeti ako još jednom pogledamo fotografije pacijentkinja sa BVF i BVN. S druge strane pacijentkinje iz grupe BVM, kod kojih je broj BVAB između ova dva nalaza imale su neuporedivo više koncentracije IL-6 ( 3057.1 pg/ml), dakle oko 60X više u odnosu na ove dve grupe. Jedini zaključak koji možemo doneti iz ovih podataka bio bi da broj BVAB nikako nije faktor od koga zavise koncentracije IL-6 u grliću materice. Interesantno je da su Lockwood i sar [572] i Rizza i sar. [573] pre skoro 20 godina objavili ispitivanja u kojima su pokazali da nisu našli značajniju korelaciju između koncentracija citokina u cervikovaginalnom sekretu i prisustva različitih mikrobiloških agenasa i stanja vaginalne flore. Ovi nalazi osporavani su od najvećeg broja autora, a takvo je bilo i naše mišljenje, koji su smatrali da je broj pacijentkinja uključen u ove dve studije bio mali da bi dozvoljavao takve zaključke. Međutim, rezultati našeg ispitivanja i NP-6G nedvosmisleno ukazuju da koncentracije citokina ne zavise od broja bakterija, a da raspodela pacijentkinja može značajno uticati na dobijene rezultate. Ovde se svakako treba prisjetiti i rezultat koje smo dobili na osnovu retrospektivno modifikovane podele u 6 grupa, a koju smo detaljno komentarisali u diskusiji o broju PMN. Na osnovu dobijenih rezultata mogli bi smo zaključiti da kod pacijentkinja kod kojih na mikroskopskom preparatu vidimo 1000X veći broj bakterija ili 1000X veći broj PMN

koncentracije citokina u grliću materice ne samo što ne moraju značajno da se razlikuju nego mogu biti skoro jednake. Dakle neki drugi faktori su uzrok razlika u koncentracijama IL-6. Koji? naravno, prvi razlog koji smo imali na umu kada smo dobili ovakve rezultate bio je onaj koji se odnosio na metodologiju ispitivanja. Ipak, ovde se nećemo detaljnije baviti metodološkim faktorima kao mogućim uzrocima jer je dobro poznato da oni od uzimanja uzorka, preko transporta i čuvanja pa do korišćenja određenih testova mnogu značajno uticati na dobijene rezultate. Postupak u kome smo mi dakronski štapić kod trudnica držali u grliću materice 1 minut je jedan od najčešćih, i verujemo da nije značajnije uticao na ovakve razlike. Naravno, neko bi mogao da nam zameri i ukaže da se radi o cervikalnim, a ne vaginalnim koncentracijama citokina, ali je poznato da je uzorkovanje iz vagine još problematičnije od uzimanja uzorka iz grlića. Tako ispirak iz vagine ne bi dolazio u obzir jer bi tako uključili i citokine poreklom iz grlića, a aspirirani uzorak i razređenja mogle bi da budu razlog velikih razlika u rezultatima. Ukoliko bi uzimali uzorak iz vagine brisom ili saturacijom, onda bi s obzirom na činjenicu da vaginalni mikrobiom proučava vaginalnu floru iz tri dela vagine (forniks, srednji deo i introitus) i to mogao biti metodološki problem. dakle svakako uvažavajući činjenicu da su metodološki problemi značajan problem svake studije koja se bavi određivanjem koncentracija citokina (posebno njihove uporedivosti) ipak mislimo da metodologija nije mogla u takvoj meri uticati na dobijene rezultate. Drugo, iako koncentracije citokina koje smo dobili u ovom ispitivanju suštinski odražavaju samo broj i odnos ŠF/NŠF i ne odražavaju mogući uticaj nijednog od ometajućih faktora uključenih u naše ispitivanje (CA, KOKE, BIFIDO, LEPTO), mislili smo da bi to mogao biti razlog ovakvim rezultatima. Međutim ukoliko pođemo od pretpostavke da laktobacili i BVAB predstavljaju i u kvantitativnom i u kvalitativnom smislu najveći deo vaginalnog mikrobioma. Onda je teško poverovati da broj ili prisustvo CA, KOKA, BIFIDO ili LEPTO formi može značajnije uticati na koncentracije citokina. Ovome idu u prilog i rezultati koji se odnose na nepostojanje razlike u koncentracijama citokina i broja PMN (koje smo takođe posmatrali kao mogući ometajući faktor). činjenica da se poslednjih godina sve više usmerava pažnja na značaj ćelija domaćina u formiranju citokinske mreže ovo bi mogao biti jedan od razloga koji objašnjava dobijene rezultate. Poznato je da su cervikalne i epitelne ćelije vagine važan izvor citokina, a svakako da u našem ispitivanju ne možemo isključiti kao mogući izvor citokina celu fetomaternalnu jedinicu, i na neki način pretpostaviti da oni odlučujuće utiču na koncentracije citokina koje detektujemo u grliću materice. ali u ovakvom modelu to bi značilo da kapacitet bakterijske flore na neki način ne prelazi granice detektibilnosti nekog citokina, i da one nemaju gotovo nikakav ili imaju veoma mali uticaj na krajnje koncentracije citokina, sa čime se naravno ne slažemo.

Ono što nam se nametnulo kao moguće rešenje jesu rezultati koje smo dobili za apoptozu PMN i verovatno prisustvo i uticaj MKKL, koji su kao što smo rekli izrazito povećani kod pacijentkinja sa BV. Mogli bi smo pretpostaviti da su kod pacijentkinja sa BVF koncentracije MKKL (ili nekih drugih metaboličkih produkata bakterija) značajno veće u odnosu na pacijentkinje sa BVM i da njihov antiinflamacijski efekat predstavlja objašnjenje za ovakve razlike u koncentracijama IL-6. Na pitanje a kako su koncentracije IL-6 gotovo iste i kod pacijentkinja sa BVN i kod pacijentkinja sa BVF mogli bi smo odgovoriti pojednostavljenim matematičkim modelom: Pacijentkinje sa BVF imaju 1 000 000 BVAB, ali zbog toga one proizvode 1 000 000 antiinflamatornih supstanci (npr. MKKL) i krajnja rezultanta je 1 što je koncentracija npr. IL-6, dok pacijentkinje sa BVN imaju 1 000 BVAB i one proizvode 1 000 MKKL pa je i ovde krajnja rezultanta odnosno koncentracije IL-6 jednaka 1, što bi onda odgovaralo rezultatima koje smo dobili u ovom ispitivanju. Ovaj pojednostavljen matematički model s obzirom na mogući broj konfundirajućih faktora opet nas vodi do biološke mreže i interaktoma, odnosno zaključka da izmerene koncentracije nekog citokina predstavljaju krajnju rezultantu velikog broja indukujućih ili inhibitornih mehanizama i isprepletenih i međusobno zavisnih odnosa između najmanje tri biološke mreže u našem ispitivanju, mikrobne, citokinske i apoptotske. Dakle pokušaj svake simplifikacije koncepta biološke mreže često može da dovede do pogrešnih, ili bolje reći kontradiktornih rezultata, a ova simplifikacija je nažalost objektivna neminovnost svake *in vitro* studije. Zato ćemo na jednom primeru pokušati da pokažemo kako drugi pokušavaju da povežu citokine i zapaljenjske procese u vagini.

Autofagija je proces u kome ćelijski makromolekuli i organele (ostarele mitohondrije) ili unutarćelijski mikroorganizmi bivaju sekvstrirani u formaciji zvanoj autofagozom. Zatim dolazi do fuzije autofagozoma sa lizozomom i nastanka autolizozoma, unutar koga se proteinske makromolekularne komponente pomoću lizozomalnih enzima razgrađuju u peptide i aminokisline i vraćaju u citoplazmu, gde se koriste za ishranu i esencijalne metaboličke procese [574, 575]. Pored uloge u eliminaciji unutarćelijskih mikroorganizama, autofagija je veoma važna komponenta urođenog i stečenog imunskog sistema. Jayaram i sar. [576] u svom radu ukazuju na značaj autofagije u različitim vaginalnim infekcijama. U diskusiji autori navode da je INF- $\gamma$  potentan induktor autofagije, obrazlažući to podacima koji su dobijeni na kulturi ćelija sa hepatocelularnim karcinomom [577]. Takođe autori nas upućuju na studiju Miettinen i sar. [578] koji su pokazali da različiti sojevi laktobacila indukuju produkciju INF- $\gamma$  u kulturi monocita periferne ćelijske krvi. Na osnovu ovoga oni pretpostavljaju da bi pacijentkinje sa BV (nedostatak laktobacila), ustvari mogle lučiti manje koncentracije INF- $\gamma$  što bi onda dovelo do izostanka indukcije autofagije, a što u eksperimentima kod miševa dovodi

do PP [579]. Diskutujući dalje, autori ukazuju na činjenicu da BV povećava prijemčivost za seksualno prenosive bolesti (*C. trachomatis*, HIV), a da je za to verovatno delimično odgovorna i pomenuta sprega: nedostatak laktobacila-manje koncentracije INF- $\gamma$  izostanak indukcije autofagije. Nažalost, ovim zaključcima nedostaju formalni, neposredni dokazi. Kakve su bile koncentracije INF- $\gamma$  u našem ispitivanju? Pacijentkinje iz grupe BVN su imale značajno veće koncentracije od svih drugih grupa na osnovu NP-6G; u podeli NP-3G pacijentkinje (slično kao primer sa IL-6, *vidi supra*) sa normalnim nalazom imale veće koncentracije od onih sa BV, a najveće bi bile u intermedijarnoj grupi, dok bi NP-2G pacijentkinje sa BV opet imale veće koncentracije INF- $\gamma$  od onih sa normalnim nalazom. Ovi nalazi nisu u skladu sa iznetom hipotezom autora da je nedostatak laktobacila razlog nižih koncentracija INF- $\gamma$ . Naše rezultate i hipoteze pomenutih autora navodimo kao primer da je u literaturi, kada je reč o citokinima (a i drugim inflamatornim medijatorima), uvek moguće naći rezultate koji su prilično kontradiktorni za jedan isti citokin, a naročito ako poredimo rezultate *in vivo* i one rađene u *in vitro* uslovima. Tako je verovatno da laktobacili u uslovima koji su opisani u ovom radu [578] dovode do pojačane produkcije INF- $\gamma$ , ali je takođe sigurno da u ovakvim uslovima nedostaje mnogo drugih faktora mikrosredine vagine koji ne mogu da se premeste u laboratoriju. Dakle, ukoliko se zadržimo na bakterijskoj flori jasno je da ovakvom eksperimentu “nedostaje” veliki broj bakterija koje ne mogu da prežive uslove izvan svog prirodnog staništa. Sve ove bakterije mogle bi da imaju uticaj i na laktobacile i koncentracije INF- $\gamma$ .

Još je zapletenije u patološkim stanjima vaginalne mikroflore, barem toliko koliko je povećana raznovrsnost i broj bakterijskih vrsta. Ukupna koncentracija bakterija je u većini slučajeva BV 100–1000 puta veća nego kod zdravih. Drugim rečima, postoje i kvalitativna i kvantitativna promena mikroflore [580]. Preko 200 različitih bakterijskih vrsta identifikovano je u vagini i ako pretpostavimo da bar deo ima specifičnu biološku ulogu i klinički značaj onda je jasno koliko je važno da se u budućim ispitivanjima definiše učestalost, kvantitet i značaj pojedinih mikroorganizama [581]. Dosadašnja ispitivanja nisu uspela da definišu osnovni mikrobiom vagine, a prema pretpostavkama, on neće biti ni definisan jer takva zajednica u vagini i ne postoji. Verovatnije je da će i budući nalazi potvrditi današnje, po kojima je vaginalni mikrobiom karakterističan za svake ženu, da se kod nekih više, a kod drugih manje menja, i da će buduće lečenje podrazumevati individualizovani pristup. Na primer, novim molekularno biološkim oruđima je *G.vaginalis* detektovana kod preko 90% žena, što potvrđuje da njeno prisustvo u određenoj koncentraciji ne dovodi do negativnih uticaja na zdravlje žene, a možda je prisustvo ovog mikroorganizma u manjem broju poželjno i tako sprečava naseljavanje nekih drugih opasnijih patogenih. Još jedna potvrda značaja kvantifikacije “stanovnika” ekološke niše.

Ono što nam je danas jasno jeste činjenica da se biološka uloga pojedinih mikroorganizama menja u zavisnosti od kvalitativnih i kvantitativnih promena u celoj mikrobiološkoj zajednici. Rezultati molekularnih studija ukazuju da BV predstavlja polimikrobni sindrom koji se može razlikovati kako u kvantitativnom tako i u kvalitativnom smislu. Ovo je bio jedan od razloga zbog kojih smo svoje trudnice sa patološkom vaginalnom florom, odnosno BV, razvrstali u tri kategorije, a na osnovu semikvantitativne procene broja bakterijskih formi na mikroskopskom preparatu.

Trudnice sa BV imale su veće koncentracije INF- $\gamma$  nego pacijentkinje sa normalnim nalazom u slučaju podele u 3 grupe. U svom prethodnom istraživanju smo ustanovili, iako nije bilo statističke značajnosti, izražen trend u porastu lokalnih koncentracija INF- $\gamma$  sa "pomeranjem" mikroskopskog nalaza od normalnog ka patološkom [582]. Takođe, u nedavnom ispitivanju nađene su značajno veće koncentracije proinflammatoryh citokina (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF i TNF- $\alpha$ ) kod pacijentkinja kod kojih je izolovana *G. vaginalis* i pigmentovane i nepigmentovane Gram negativne bakterije koje po autorima verovatno odgovaraju *Prevotella spp.* [583]. Kako u studiju nisu bile uključene pacijentkinje sa BV pretpostavili bi da pacijentkinje sa BV imaju još više koncentracije IFN- $\gamma$  jer su *G. vaginalis* i *Prevotella spp.* na hiljade puta brojnija kod pacijentkinja sa BV. Međutim zahvaljujući rezultatima ovog ispitivanja i NP-6G znamo da ove pacijentkinje ne samo da ne moraju da imaju povećane koncentracije IFN- $\gamma$ , nego da je takođe moguće da one budu iste ili čak i značajno niže, bez obzira na hiljade puta veći broj bakterija. Aboul Enien i sar. [584] zaključuju da je BV udružena sa povećanim koncentracijama IFN- $\gamma$  i TNF- $\alpha$ , što može biti od značaja kod pacijentkinja sa nepoznatim uzrokom steriliteta. Ukratko, nalazi dobijeni u vezi s koncentracijom citokina u vaginalnom sekretu su toliko raznoliki, ne samo po vrednostima, već i metodologiji, da je nemoguće doneti konačni sud. Imajući u vidu ove rezultate i koncept biološke mreže onda ne čudi što u ovom ispitivanju nismo našli statističku značajnost između inflamatornih markera kao što su mikroskopski nalaz (infekcija), broj, vijabilnost i apoptoza PMN (inflamacija) ili koncentracije proinflammatoryh citokina. S obzirom na činjenicu da inflamacija/infekcija predstavlja najvažniji faktor u etiopatogenetskim zbivanjima vezanim kako za terminski tako i za PP ovakvi rezultati su u svakom slučaju neočekivani, i na prvi pogled razočaravajući za istraživača. Generalno, veći je broj studija koje ukazuju na povezanost različitih inflamatornih markera i PP, ali nije mali ni broj onih koje nisu našle takvu povezanost. S obzirom da se ove studije značajno metodološki razlikuje najbolji utisak o vrednosti inflamatornih markera svakako dolazi iz metaanalitičkih studija. Veći broj ispitivanja, a samim tim i metaanalitičkih studija odnosi se na populaciju pacijentkinja sa simptomima i znacima PP koje, kao što smo



već objasnili, iz mnogo razloga nisu uporedive sa rezultatima koje smo mi dobili u ovom ispitivanju. Conde-Agudelo i sar. [586] su u svojoj metaanalitičkoj studiji analizirali vrednost različitih biomarkera u predviđanju PP kod asimptomatskih žena. U analizu su uključene 72 opservacione studije, sa 89.786 žena, i analizirano je 30 biomarkera. Zaključak autora je da nijedan od ovih biomarkera ne ispunjava kriterijume da bi bio upotrebljiv u kliničkoj praksi kao prediktor PP. Podatak da se nijedan od analiziranih biomarkera nije izdvojio svojom vrednošću ukazuje da se radi o kompleksnim i međusobno zavisnim etiopatogenetskim zbivanjima na koja može da utiče veliki broj faktora [586-590], što potvrđuju i rezultati našeg ispitivanja. Poslednjih decenija je ispitivano preko 100 različitih biomarkera i jedini koji je se izdvojio svojom vrednošću i konstantnošću je test kojim određujemo koncentracije fetalnog fibronektina (FFN) u cervikovaginalnom sekretu [591-596]. Fetalni fibronektin (FFN) je glikoprotein koji produkuje horion membrane i u najvećim koncentracijama nalazi se u prostoru između decidue bazalis i fetalnih membrane gde kao adhezivni molekul ima ulogu "tkivnog lepka" koji omogućava da fetalne membrane i decidua majke ostanu "slepljene". Međutim, ipak treba reći da ovaj test ima veliku vrednost u kratkoročnom predviđanju (7-10 dana) PP kod žena sa znacima i simptomima PP, kao i visoku negativnu prediktivnu vrednost kod asimptomatskih pacijentkinja, takođe za period od 7-14 dana. Ipak, ovaj test ima malu vrednost u predviđanju PP kod asimptomatskih pacijentkinja, što bi opet bila najveća vrednost idealnog biomarkera [490-498]. Po našem mišljenju ovako dobri rezultati su u najvećoj meri posledica činjenice da FFN ne predstavlja marker infekcije i/ili inflamacije nego pre svega marker uterinih kontrakcija i promena na grliću kojima uzročni faktor u najvećem broju slučajeva jesu infekcija i/ili inflamacija, ali one nemaju direktan uticaj na koncentracije FFN. Ovakav stav potvrđuju i rezultati mnogobrojnih studija koje nisu nas povezanost koncentracija FFN sa različitim poremećajima vaginalne flore, ka ni da je lečenje u takvim slučajevima imalo ikakvog uticaja na detekciju i koncentracije FFN [597-601]. U skladu sa našom prethodnom diskusijom mogli bi smo reći da je broj mogućih ometajućih faktora, ili broj jedinica u zamišljenoj biološkoj mreži fetalnog fibronektina mnogo manji u odnosu na mikrobnu ili citokinsku, ili još važnije, da jedinice iz ove dve mreže nemaju gotovo nikakav direktan ili indirektan uticaj na koncentracije FFN. Kao jedan od mogućih faktora koji može uticati na povećane koncentracije FFN najnovije studije navode seksualni odnos (unutar 48h) što se objašnjava prisustvom izomernog obilka ovog glikoproteina i u spermi partnera, pri čemu ne pominju mehanički faktor ili prostaglandine sperme koji možda mogu dovesti do kidanja u horiodecidualnom spoju i povećanih koncentracija citokina [602-604].

Dakle za razliku od markera u našem ispitivanju i tri vrlo komplikovane i međusobno isprepletene biološke mreže (mikrobna, citokinska, apoptotska), FFN suštinski zavisi od neuporedivo manjeg broja faktora i zbog toga imaju značajno veću prediktivnu vrednost. I drugi faktori kao što su dinamičnost vaginalne flore, genetski i epigenetski takođe imaju mnogo manji potencijalni uticaj na koncentracije FFN nego na markere koji su deo ovog ispitivanja. Činjenice, da ovaj test ima vrednost u kratkoročnom predviđanju PP, kao i nisku pozitivnu prediktivnu vrednost, ustvari govore da je ovaj test marker finalnih ili bolje rečeno posledičnih zbivanja, dok mi pokušavamo da definišemo početne ili uzročne markere. Ako se prisetimo da je PP suštinski sindrom, ili bolje rečeno da je njegova etiologija multifaktorijalna, onda je jasno zašto u prethodnih 30 godina nismo uspeli da u kliničku praksu uvedemo ni jedan od markera infekcije i/ili zapaljenja, i zbog čega su rezultati dosadašnjih studija prilično kontradiktorni. Ova diskusija o FFN može se primeniti i na merenje dužine grlića materice, koji je zajedno sa ovim testom najbolji prediktor PP, jer se i u ovom slučaju radi o događaju (skraćen grlić) koji je posledičan, finalni, a ne uzročni. Dakle ukoliko zamislimo jednu preciznu vagu koja tokom trudnoće svakako ne miruje nego pravi otklone na jednu (aktivacija fetalnih membrana, promene na grliću, kontrakcije miometrijuma=PP) ili drugu stranu (sva tri mehanizma u stanju mirovanja= nastavak trudnoće), koji imaju graničnu liniju, i ukoliko se ona pređe process dobija ireverzibilan karakter i može se završiti PP. Tako bi markeri koje smo mi ispitivali (bakterijska flora, broj i vijabilnost PMN, koncentracije citokina) beli sitni tegovi na tasu koji sami pojedinačno ne mogu da se približe graničnoj liniji, a koji bi zajedno mogli da dovedu i do pojave fetalnog fibronektina ili skraćenja grlića materice koji imaju značajno veću težinu sa kojom čitav tas dovode veoma blizu granične linije čime se značajno povećava rizik za PP. Dalje oni mnogo manje zavise od metodologije ispitivanja jer uzorkovanje fetalnog fibronektina i merenje dužine grlića predstavljaju precizno definisane metodološke procedure, a što je još značajnije dobro su i definisane njihove granične vrednosti (cut-off). Ako to poredimo sa našom metodologijom i našim potencijalnim prediktorima onda je lako uočiti da u našem ispitivanju ni za jedan od njih (isključujući dužinu grlića) nemamo granične vrednosti. Tako nemamo jasnu granicu između normalne i patološke vaginalne flore, normalnog ili patološkog broja PMN, kao ni granične vrednosti koncentracija ni za jedan od ispitivanih citokina, što su već sasvim dovoljni razlozi za nisku prediktivnu vrednost ovih markera, čak ukoliko i potpuno zaboravimo na metodološke problem koje prate parametre ispitivane u ovom radu. Zato je po našem mišljenju prvi preduslov da bi u budućnosti uopšte mogli porediti ovakve studije uspostavljanje jedinstvenih dijagnostičkih kriterijuma, i tek tada bi mogli očekivati i bolje rezultate. Naravno, svesni smo da se do takvih konsenzusa teško dolazi, a to je verovatno

jedan od razloga što su Nugentovi i Amselovi kriterijumi preko dve decenije zlatni standard u dijagnozi BV, mada su u međuvremenu pojedini autori predlagali i bolje podele (Ison/Hay, Claeys, Donders) o čemu smo takođe diskutovali. Rezultati koje smo dobili u ovom ispitivanju ukazuju da je došlo vreme da se ozbiljno preispita vrednost oba “zlatna standarda” i kliničkog (Amsela) i istraživačkog (Nugent). Zbog toga nam se čine veoma važnim rezultati našeg ispitivanja prikazani u Tabeli 3.12. Dakle da smo NP-6G transformisali u NP-3G kako je opisano u Metodologiji, a što je uporedivo sa Nugentovom podelom (“istraživački zlatni standard”), onda bi pacijentkinje sa BV imale najveće koncentracije IL-6, one sa intermedijarnom grupom manje, a najmanje koncentracije ovog citokina bile bi kod pacijentkinja sa normalnim nalazom. Ovakvi rezultati bili bi u skladu sa najvećim brojem do sada objavljenih studija koje su pokazale da pacijentkinje sa BV imaju značajno veće koncentracije IL-6 u odnosu one sa normalnim, dok su podaci o intermedijarnoj grupi kontradiktorni. Ova kontradiktornost poslužila bi nam za objašnjenje koncentracija IL-6 u ovom ispitivanju dobijene na osnovu podele po Nugentu, a po kojoj su pacijentkinje sa intermedijarnim nalazom imale najveće koncentracije IL-6, slede one sa BV, a najmanje su kod onih sa normalnim nalazom. Naravno u tumačenju razlika ovih citokina podsetili bi da je u NP-3G “intermedijarana” grupa formirana spajanjem pacijentkinja nalazom NN+BVN. S druge strane da je ovo ispitivanje rađeno na osnovu Amselovih dijagnostičkih kriterijuma (“klinički zlatni standard”) onda bi smo imali samo dve grupe pacijentkinja normalne i BV kao što je i slučaj kad NP-6G transformišemo NP-2G, normalne i BV. U tom slučaju na osnovu Amselovih kriterijuma (NP-2G) ne bi našli statističku značajnost za koncentracije IL-6 između ove dve grupe pacijentkinja, iako bi srednje koncentracije IL-6 bile više kod pacijentkinja sa BV. Sada treba da pogledamo i rezultate koje su dobijene za koncentracije ovog citokina u podelama po Ison/Hayu i Claeysu koje takođe imaju grupe normalna, intermedijarne i BV, ali još dve odnosno tri nove grupe. Tako u podeli po Ison/Hayu imamo 78 pacijentkinja koje su “oduzete” Nugentu i to 35 pacijentkinja sa “čistim” nalazom (odgovara hipocelularnom nalazu NP-6G) i 43 pacijentkinje kod kojih je pregledom mikroskopskog preparata po Gramu na uvećanju x1000 viđena predominacija koka. Nalaz koji potpuno odstupa od prethodnih jeste da su pacijentkinje sa BV u ovakvoj podeli imali najniže koncentracije IL-6 (45,4 pg/ml), dok su u grupi koke ove koncentracije bile veoma visoke 3 889, 0 pg/ml, iz čega indirektno možemo zaključiti da je najveći broj ovih pacijentkinja bio u Nugentovoj intermedijarnoj grupi. Kako podela po Claeysu nema grupu čist nalaz, onda je 35 pacijentkinja iz ove grupe i 39 iz grupe koke po Ison/Hayu, svrstano u dve nove grupe, jedna sa ekstremno velikim brojem PMN (leukoreja) i druga sa nalazom sličan normalnom (načelno BIFIDO u NP-6G). Ako sada pogledamo te rezultate

interesantno je da su pacijentkinje sa “najvećim” brojem PMN imale najniže koncentracije IL-6, iako su PMN značajan izvor IL-6. Ovakav nalaz mogli bi smo dovesti u vezu sa rezultatima nekih istraživanja koja su pokazala da IL-6 ima značajnu ulogu kako u inicijalnoj regrutaciji PMN tako i u rezoluciji infekcije u kojoj apoptoza PMN igra veoma važnu ulogu. Tako su Fielding i sar. [605] i svom eksperimentalnom modelu peritonitisa kod miševa pokazali da IL-6 značajno ograničava regrutaciju PMN i oslobađanja citokina, tako da bi niske koncentracije IL-6 u našem ispitivanju mogle dovesti u vezu sa ovim rezultatima [605]. S druge strane Biffi i sar. [606] su pokazali da IL-6 odlaže apoptozu PMN, što bi onda bilo u suprotnosti sa rezultatima koje smo mi dobili.

**Tabela 3.21: Srednje vrednosti koncentracije IL-6 kroz Nugent, Ison/Hay, Claeys, Amsel i NP-6G kriterijume**

NP-6G	IL-6		
	n	srednja vrednost	standardna devijacija
<b>NOR FULL</b>	275	316,06	4846,18
<b>NOR MID</b>	141	31,00	80,47
<b>NOR NULL</b>	67	1221,00	9831,23
<b>BV NULL</b>	45	50,84	99,16
<b>BV MID</b>	55	3057,15	22447,96
<b>BV FULL</b>	60	49,31	99,81
Clayes	IL-6		
	n	srednja vrednost	standardna devijacija
<b>Normalan</b>	347	256,60	4314,30
<b>Intermed</b>	85	1988,76	18057,20
<b>BV</b>	132	654,05	7002,53
<b>Koke</b>	4	12,28	16,45
<b>Leukoreje</b>	44	19,82	45,38
<b>Sličan normalnom</b>	32	36,10	105,23
Ison/Hay	IL-6		
	n	srednja vrednost	standardna devijacija
<b>Čist nalaz</b>	35	39,09	70,58
<b>Normalan</b>	383	235,94	4106,60
<b>Intermedia</b>	69	1193,63	9686,95
<b>BV</b>	114	45,39	91,74
<b>Koke</b>	43	3889,02	25389,65
Nugent	IL-6		
	n	srednja vrednost	standardna devijacija
<b>Normalan</b>	403	224,75	4003,45
<b>Intermed</b>	104	1631,37	16324,59
<b>BV</b>	137	629,62	6873,74

**Tabela 3.22: Različite koncentracije IL-6 po grupama a na osnovu tri različite podele (NP-6G; NP-3G; NP-2G)**

NP-6G	IL-6 pg/ml	NP-3G	IL-6 (pg/ml)	NP-2G	IL-6 (pg/ml)
-------	------------	-------	--------------	-------	--------------

<b>NOR FULL</b>	316,1	Normalan	173,5	Normalan	522,6
<b>NOR MID</b>	31,0				
<b>NOR NULL</b>	1221,0	Intermed	635,9	BV	1052,4
<b>BV NULL</b>	50,8				
<b>BV MID</b>	3057,1	BV	1553,3		
<b>BV FULL</b>	49,3				

Ko što smo rekli na osnovu NP-6G statistički značajna razlike nađene su između različitih grupa za još dva citokina:

IL-1 $\beta$ :

- NF/BVN (1061,7 $\pm$ 1376,2//1397,4 $\pm$ 1460,6);
- NF/ BVM (1061,7 $\pm$ 1376,2/1546,8 $\pm$ 1590,2);
- NF/BVF (1061,7 $\pm$ 1376,2/1775,9 $\pm$ 1800,5);
- NM/BVF (1169,6 $\pm$ 1244,5/1775,9 $\pm$ 1800,5) i,

IFN- $\gamma$ :

- NF/BVN (3719,0 $\pm$ 16605,7/9980,8 $\pm$ 26590,6);
- NM/BVN (1104,3 $\pm$ 9196,5/9980,8 $\pm$ 26590,6);
- NN/BVN (1271,9 $\pm$ 7416,2//9980,8 $\pm$ 26590,6);
- BVM/BVN (507,0 $\pm$ 3666,7/9980,8 $\pm$ 26590,6);
- BVF/BVN (34,6 $\pm$ 155,7/9980,8 $\pm$ 26590,6).

Ove rezultate nećemo detaljnije komentarisati jer bi bili veoma slični onima koji se odnose na koncentracije IL-12 i IL-6.

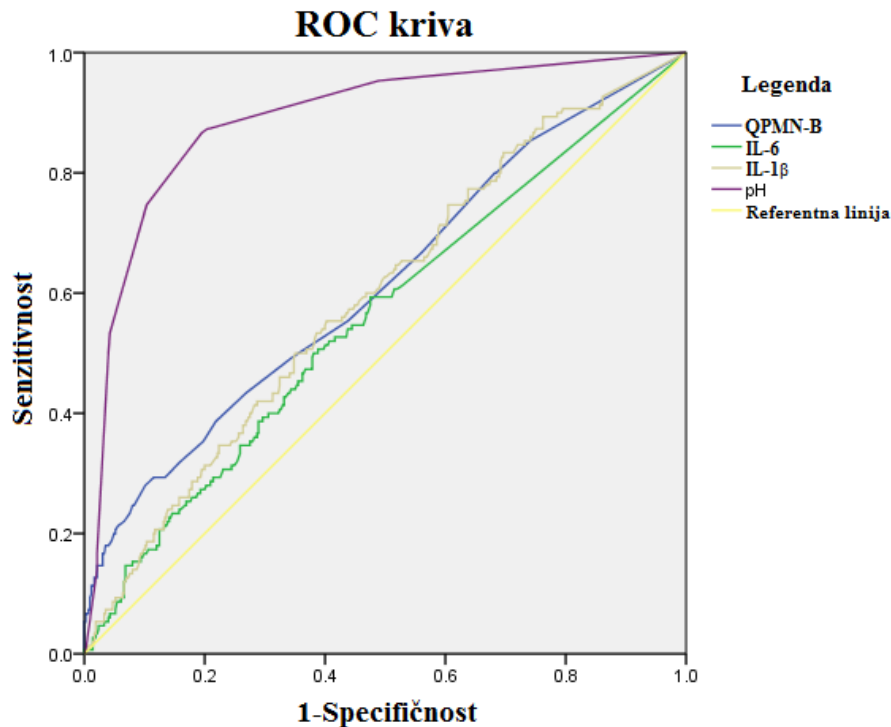
Statistička analiza prethodno diskutovanih podataka kao što smo rekli rađena je Kruskal Wallisovim testom kao najboljim za ovu vrstu podataka, ali neki od statističara koje smo konsultovali imali su drugačije mišljenje i smatrali su da korišćenje ANOVE i Tamhanovog *post hoc* testa ne bi dalo ništa lošije rezultate. Ne ulazeći u domen statistike na grafikonu br su prikazani rezultati koje bi dobili da smo koristili drugu statističku metodu. Tako bi u Nugentovoj podeli dobili statističku značajnost za IL-2, IL-10, IL-13 i IL-1 $\beta$  Grafikon broj . Ovo je dobar primer koliko i izbor statističkog postupka može bitno uticati na dobijene rezultate.

U ovom ispitivanju statističkom obradom podataka (t-test, univarijantna nominalna regresiona analiza i multivarijantna logistička regresiona analiza) nismo našli povezanost koncentracija ni jednog od 13 ispitivanih citokina sa terminom porođaja. PP.

Istim statističkim postupkom nađena je značajnost za samo jednu (BIFIDO) od svih grupa pacijentkinja koje su formirane na osnovu različitih dijagnostičkih kriterijuma (Nugent, Ison/Hay, Claeys, NP-6G, NP-3G, NP-2G, NP-6G/CA, NP-6G/LEPTO), a *t*-testom nije nađena statistička značajnost ni kod podele na osnovu Amselovih kriterijuma. [607-615].

Ako zaboravimo faktore kao što su dinamičnost vaginalne flore, imunologiju, genetiku i epigenetiku, mislimo da su rezultati ovog ispitivanja i navedeni primeri jasno pokazali kako primena različitih dijagnostičkih kriterijuma može bitno uticati na rezultate i zaključke ispitivanja. Dakle prvi preduslov da bi u budućnosti uopšte mogli porediti ovakve studije jeste uspostavljanje jedinstvenih dijagnostičkih kriterijuma, i tek tada bi mogli očekivati i bolje rezultate. Naravno, svesni smo da se do takvih konsenzusa teško dolazi, a to je verovatno jedan od razloga što su Nugentovi i Amselovi kriterijumi preko dve decenije zlatni standard u dijagnozi BV, mada su u međuvremenu pojedini autori predlagali i bolje podele (Ison/Hay, Claeys, Donders) o čemu smo takođe diskutovali. Rezultati koje smo dobili u ovom ispitivanju ukazuju da je došlo vreme da se ozbiljno preispita vrednost oba “zlatna standarda” i kliničkog (Amsela) i istraživačkog (Nugent). Imajući u vidu navedene činjenice koje ukazuju na veliki broj faktora koji mogu uticati na etiopatogenetska zbivanja kao i karakteristike pojedinih markera, slažemo se sa onima koji misle da je malo verovatno da će u budućnosti biti pronađen jedan marker za predviđanje PP, i da je realnije očekivati da će možda neki set markera koji kombinuju klinički nalaz, ultrazvučni pregled, genetske i epigenetske analize i zapaljenjske biomarkere moći da izdvoji iz populacije asimptomatskih trudnica one koje imaju visok rizik za PP [614].

Primenom analize ROC krive testirana je specifičnost i senzitivnost pojedinih parametara (videti legendu slike 1 grafikon) u odnosu na nalaz mikroskopskog nalaza vaginalnog sekreta normalan (NF, NM i NN) ili patološki (BVF, BVM i BVN).



Grafikon 3.45: ROC kriva za QPMN-B, IL-6, IL-1 i pH

Na prvom grafikonu prikazani su rezultati koji se odnose na prvih 217 pacijentkinja kod kojih je određivana vijabilnost PMN, dok su na drugom grafikonu prikazani rezultati koji su dobijeni analizom rezultata ukupnog broja trudnica uključenih u ispitivanje (732). Na oba grafikona jasno se vidi da su najbolji rezultati dobijeni za vrednosti pH (diskutovano prethodno), dok su ostali parametri pokazali značajno slabije rezultate.

Tabela 3.23: ROC kriva - tabelarni prikaz parametara koji su dali statističku značajnost  $p < 0.05$

Test	Površina ispod krive	Standardna greška	Nivo značajnosti (p)	95% Granica Pouzdanosti CI	
				Minimum	Maximum
IL-6	0,560	0,028	0,028	0,506	0,615
IL-1 $\beta$	0,595	0,027	0,001	0,542	0,647

Zato se i mehanizam normalnog i PP udruženog sa infekcijom, uvek moraju posmatrati kao kompleksan sistem, sačinjen od velikog broja jedinica koje su međusobno povezane mnogobrojnim i kompleksnim vezama, tako da je često veoma teško utvrditi šta je uzrok, a šta posledica određenih zbivanja. U trudnoći se stvari dodatno komplikuju postojanjem dva

subjekta, majka i fetus, i međusobnim interakcijama njihovih sistema, a epigenetika nas upozorava da ako se baka trudnice hranila loše ili pušila dok je nosila majku trudnice da bi i to moglo bitno uticati na tok i ishod trudnoće kod unuke. Kako mi u našem ispitivanju promene u kvantitativnom i kvalitativnom sastavu mikrobioma vagine smatramo primarnim, uzročnim faktorom koji odlučujuće utiče na sve ostale ispitivane parametre i koji su tako posledica promena u vaginalnom mikrobiomu (broj, vijabilnost i apoptoza vaginalnih PMN, koncentracije citokina) najveći trud uložen je u pokušaje da na osnovu kliničkih i mikroskopskih parametara pokušamo preciznije povući granicu između „normalnog“ i „patološkog“ u mikroekološkoj zajednici kava je vaginalna. Tako ove promene u broju i vrsti različitih mikroorganizama (mikrobska mreža) mogu na direktan ili indirektan način dovesti do promena u druge dve (citokinska i apoptotska mreža), a u zavisnosti od ovih mnogobrojnih i međusobno zavisnih lokalnih i/ili sistemskih signala doći će do stvaranjem određene mreže citokina koja onda može dovesti do povoljnih ili nepovoljnih zbivanja u trudnoći. Prisustvo proinflammatoryh i antinflammatoryh citokina dokazano je u različitim periodima trudnoće i na osnovu dosadašnjih ispitivanja verovatno je da su određena MC karakteristične za određene periode trudnoće. Takođe, veliki broj studija je pokazao da kod trudnica sa infekcijom dolazi do značajnih promena u koncentracijama citokina kao i njihovih međusobnih uticaja. [159-163]. Trudnoća je fiziološko stanje u kome dolazi do promene Th1/Th2 imunskog odgovora tako što dolazi do pojačane produkcije Th2 citokina i sledstvene predominacije Th2 imunskog odgovora. I kod terminskog i kod prevremenog porođaja dolazi do aktivacije inflamatorne kaskade u fetalnim mebranama, decidui i cerviksu, a citokini imaju veoma važnu ulogu. [118, 119]. Proinflammatory citokini IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6 učestvuju i incijaciji urođenog i propagaciji stečenog imunskog odgovora. Na osnovu podataka kojima danas raspolažemo, mogli bi smo reći da IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8 igraju najvažniju ulogu u etiopatogenetskim zbivanjima vezanim za PP udružen sa infekcijom [154-157].

Kako još postoje mnoge nepoznanice i dileme u etiologiji i patogenezi PL, i kako nijedna od postojećih teorija ne može objasniti precizan tok događaja za pretpostaviti je da bar jedan deo PP ima svoju osnovu u genetskoj predispoziciji pojedinca. Ovakav pristup mogao bi objasniti zašto se kod nekih pacijentkinja sa BV dolazi do PP, a kod drugih ne. Ipak, malo je verovatno da PP nastaje kao rezultat poremećaja jednog gena. Takođe postoji mogućnost da su ovi poremećaji na genima ustvari epifenomeni, to jest da do njihovog poremećaja ili poremećaja u translaciji njihovih proteina dolazi tek pošto se neki drugi faktor (npr. infekcija) umešao u kaskadu događaja koji vode do PP. Romero i sar. ukazali su da je PL najbolje posmatrati kao sindrom u kome prevremenom porođaju prethode ili infekcija ili ishemija na nivou



fetomaternalne jedinice. Ovi poremećaji onda dovode do pojačane produkcije citokina i drugih medijatora inflamacije, koji onda dovode do stimulacije sinteze PG, povećanja kontraktilnosti miometrijuma i PP. Interesantna je teorija po kojoj postoji genetska predispozicija za pojačan imunski odgovor (engl. *hyperresponsiveness*) na infekciju, koji onda dovodi pojačane produkcije proinflamatornih citokina. U prilog genetskoj predispoziciji za PP govori i činjenica da trudnice sa prethodnim PP imaju značajno veći rizik za ponovni PP, a pokazano je da postoji rasna predispozicija za PP. Takođe je jasno da je biosinteza ovih proinflamatornih citokina pod preciznom genskom kontrolom. Geni koji kodiraju IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, INF- $\gamma$  i IL-10 su klonirani i sekvencirani, a što je još važnije sada je nedvosmisleno pokazano da postoje polimorfizmi za ove gene koji značajno mogu uticati na njihovu transkripcionu aktivnost. Nosioci takvog genskog polimorfizma, bilo da su homozigoti ili heterozigoti, pokazuju povećanu sklonost za određenu bolest, a tako i za PP. predispozicija domaćina kao imunskog hiperrespondera može dovesti do porođaja [616, 617]. Međutim, klasična genetika sama ne može objasniti raznolikost fenotipova unutar populacije, kao ni činjenicu da uprkos identičnih DNA sekvenci monozigotni blizanci mogu imati različit fenotip, naprimer rizik za PP [618]. Pokazalo se da definisanje strukture gena i genetska sklonost za nastanak određene bolesti predstavljaju samo vrh ledenog brega. Danas je potpuno jasno da su mehanizmi koji regulišu aktivnost gena (fiziologija gena) mnogo važniji od same genske strukture (anatomije gena). Epigenetske promene se definišu kao mitotski i mejotski nasledne i stabilne promene ekspresije gena, potencijalno reverzibilne, ali bez promene nukleotidne sekvence. Glavni epigenetski mehanizmi odgovorni za funkciju gena su: 1) metilacija molekula DNA; 2) modifikacija histona i 3) uticaj regulatornih nekodirajućih RNA na ekspresiju gena (4). Ova tri najvažnija epigenetska mehanizma međusobno su funkcionalno isprepleteni gradeći kompleksnu epigenetsku mrežu koja reguliše mnogobrojne ćelijske procese, tako što aktivise ili deaktivise genetsku informaciju. Dakle jasno je da identifikacija i bolje razumevanje svih epigenetskih modifikacija predstavljaju sledeći veliki korak za bolje razumevanje ljudske biologije a tako i fenomena PP [619-624].

Zbog toga smatramo da bi naša semikvantitativna podela grupe pacijentkinja na tri kategorije (NORMAL FULL, MID, NULL) mogla da bude od koristi kako u studijama koje ispituju koncentracije različitih zapaljenjskih medijatora u vagini tako i u onima u kojima se kvantifikuju (QPCR) pojedini sojevi laktobacila. Pošto kod jedne pacijentkinje prevladuje najčešće jedna ili dve vrste bakterija, sasvim smislenom nam se čini ideja “biopsije“ preparata po Gramu”, kvantitativnog PCR i mikroskopskog pregleda preparat po Gramu, u pokušaju da

izdiferenciramo još neki od sojeva laktobacila kao što su to uradili Verhelst i sar. za *L. crispatus*, *L. gasseri* i *L. iners*[213, 216, 456, 471]. Madan i sar. [625] su ispitivali koncentracije 10 citokina (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ 2, IL-1RA, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  i RANTES) kod adolescentkinja i odraslih i ni za jedan od ispitivanih citokina nisu našli značajnije razlike u njihovim koncentracijama. U istom ispitivanju, kod samo 40% adolescentkinja su našli *L. jensenii*, koje su bile oko 4 puta ređe nego kod odraslih pacijentkinja. Ovaj nedostatak *L. jensenii* uz značajne koncentracije BVAB (*Megasphaera*, BVAB1–3) autori tumače kao moguću veću učestalost asimptomatske BV u populaciji adolescentnih pacijentkinja. Ako prihvatimo ovakav zaključak autora, onda bi asimptomatska BV kod adolescentkinja trebalo da da povišene koncentracije proinflamatornih citokina ali, kao što smo rekli, te razlike nisu nađene. Sve ovo govori o velikom broju faktora koji mogu uticati na koncentracije zapaljenjskih medijatora.

Mogli bismo da zaključimo da laktobacili generalno smanjuju koncentracije proinflamatornih, a povećavaju koncentracije antiinflamatornih medijatora i tako smanjuju rizik od PP. Neki sojevi laktobacila (*L. gasseri*) imaju proinflamatorne efekte i ukoliko su oni pretežna laktobacilarna flora, to bi moglo povećati rizik za nastanak PP. Možda laktobacili i nemaju značajnijeg uticaja na koncentracije citokina. Moguće da mikroskopski pregled (ili Nugentov zbir 0-3, normalan nalaz) bez obzira na predominaciju laktobacilarne flore (*L. iners*) ne može da isključi rizik od PP, s obzirom na pokušaje da se na osnovu mikroskopskog pregled preparata po Gramu razlikuju pojedini sojevi laktobacila.

Stanje potpune ravnoteže i mirovanja pro-zapaljenjskih i anti-zapaljenjskih činilaca ne postoji jer u svakom trenutku prevagnu jedni ili drugi, a ova odstupanja imaju granice unutar kojih ne dolazi do štetnih zbivanja za trudnoću. Kada prevagnu proinflamatorni medijatori dolazi do PP, u suprotnom, do posterminskog porođaja. Ovakav stav potvrđuju mnogi eksperimentalni podaci koji pokazuju da primena proinflamatornih medijatora dovodi do PP, a da se primenom antiinflamatornih medijatora (TGF- $\beta$ , IL-10) ovi mehanizmi mogu zaustaviti. Jedan isti citokin mogu da proizvode različiti tipovi ćelija ili različiti tipovi ćelija mogu proizvoditi različite izoforme istog citokina. Ali citokini verovatno nikada ne deluju izolovano, nego uz indukciju i/ili inhibiciju drugih citokina, stvarajući tako mrežu citokina koja će dovesti do određenog ćelijskog odgovora. Novija istraživanja jasno pokazuju da i bakterije, pored naših ćelija, proizvode različite molekule koji mogu imati značajan efekat na kapacitet leukocita i tkivnih ćelija da proizvode određenu mrežu citokina. Mreža citokina zajedno sa mikrobnom mrežom i dinamične promene u oba ova sistema su verovatni najvažniji razlozi zbog kojih

citokini neće imati značajniju ulogu u predikciji PP, na šta ukazuju i rezultati drugih ispitivanja i metaanalitičkih studija.

### **3.8 BIFIDO FORME I PREVREMENI POROĐAJ**

U ovom poglavlju zbirno ćemo prikazati rezultate koji se odnose na vrednost različitih poremećaja vaginalne flore, broja i vijabilnosti PMN, koncentracija ispitivanih citokina i dužine grlića materice u predviđanju PP, odnosno u proceni rizika za PP.

- Primenom  $\chi^2$  testa ispitivano je postojanje asocijacije između različitih nalaza mikroskopskog sekreta i broja PMN određivanog semikvantitativnim metodima. Takva asocijacija nađena je samo za grupu pacijentkinja kod kojih smo mikroskopskim nalazom detektovali BIFIDO forme ( $\chi^2=20,989$ ;  $df=2$ ;  $p<0.005$ ).
- U ispitivanju odnosa između termina porođaja i procenta apoptoze, semikvantitativnog broja PMN, koncentracija ispitivanih citokina i dužine grlića materice korišćena je i univarijantna nominalna regresiona analiza (*t*-test, Leveneov test), a statistička značajnost nađena je samo u odnosu na dužinu grlića materice ( $p<0,001$ ).
- Logističkom multivarijantnom analizom utvrđivan je značaj svakog od ispitivanih parametara u predviđanju PP i pokazano da samo mikroskopski nalaz preparata na Gramu na kome smo detektovali BIFIDO forme i dužina grlića materice mogu da se koriste u predviđanju PP. Pacijentkinje kod kojih su detektovane BIFIDO forme imale su 9,8 puta veći relativni rizik ( $RR=9,8$ ; 95% CI 2,7-34,6) za pretermijski porođaj u odnosu na pacijentkinje sa normalnim nalazom ili BV. Pacijentkinje sa kraćim grličem materice takođe su imale su 1,2 puta povećan relativni rizik ( $RR=1,2$ ; 95% CI 0,7-0,9), dakle značajno manji u odnosu na BIFIDO.
- Na osnovu NP-6G kod 12 trudnica sa nalazom NF i 19 sa nalazom NM nađene su BIFIDO forme. Kod trudnica iz grupe NN i BVN BIFIDO su detektovane kod 12, odnosno 5 pacijentkinja, u grupi BVM kod 2 pacijentkinje, dok kod trudnica sa BVF nismo detektovali BIFIDO forme. Interesantno je da je 86% (43/50) pacijentkinja sa BIFIDO formama bilo u grupi sa normalnim mikroskopskim nalazom ( $NF+NM+NN=12+19+12$ ).
- Rezultati KOH testa: Od 42 pacijentkinje sa BIFIDO formama kod 80% (34/42) test je bio negativan.
- Rezultati pH testa: Kod 17 pacijentkinja pH je bio veći od 4,5, a kod 33 pacijentkinje normalan. Srednja vrednost pH kod pacijentkinja BIFIDO formama bila je  $pH= 4,63$

kod pacijentkinja sa BV pH=5,19 dok su pacijentkinje sa normalnim nalazom imale srednju vrednost pH= 4,29 i ove razlike između svake od ove tri grupe bile su statistički značajne ( $p<0,01$ ).

- Od 50 trudnica sa BIFIDO formama kod 27 je mikroskopski detektovan CA, i to kod 17 CA NULL, kod 6 CA MID i kod 4 CA FULL. Preko 50% pacijentkinja imalo je i mikroskopski detektovanu CA.
- U grupi BIFIDO KOKE su mikroskopski detektovane kod 64% (32/50), a LEPTO forme kod 16% (8/50) pacijentkinja.
- Vijabilnost PMN bila je značajno produžena, ali su zato srednje vrednosti procenta apoptoze kod trudnica sa BIFIDO formama (7,3%) bile niže u odnosu na one sa normalnim nalazom (12,7%) i BV (15,7%). Ova razlika je bila statistički značajna u odnosu na trudnice sa normalnim nalazom i BV ( $p<0,001$ ), dok statistička značajnost nije nađena kod pacijentkinja sa BV i normalnim nalazom ( $p>0,001$ ).
- Srednje koncentracije IL-10 bile su niže kod pacijentkinja sa BV i BIFIDO formama i ta razlika je bila statistički značajna za trudnice sa BIFIDO formama i BV u odnosu na grupu sa normalnim nalazom ( $p<0,005$ ), što nije nađeno kod trudnica sa BV i BIFIDO formama ( $p>0,005$ ).

Podatak da smo kod 86% pacijentkinja kod kojih smo detektovali BIFIDO forme mikroskopski postavili dijagnozu normalan nalaz i da kod pacijentkinja sa BVF nismo detektovali ove forme smatramo veoma zanimljivim. I studije koje su koristili kulturu i novije molekularnobiološke studije pokazale su da različiti sojevi *Bifidobacteria* mogu da se nađu u vagini, ali njihova uloga i značaj ni do danas nije precizno definisana [411, 457, 626-630]. Tako su Rosenstein i sar.[631] su još 1996. god. našli (kultura) da je *Bifidobacterium spp.* prisutan kod oko 12% zdravih žena, kod 41% pacijentkinja označenih u studiji kao revertant i pacijentkinje koje su na prvom pregledu imale BV ili intermedijarnu floru, a kod kojih je posle 3-4 nedelje došlo do spontane rezolucije poremećaja vaginalne flore i nalaz je definisan kao normalan), kod 58% pacijentkinja sa intermedijarnim nalazom i 94% pacijentkinja sa BV. Ovaj linearan porast koagulaza negativnog stafilokoka i bifidobakterija sa pomeranjem nalaza od normalnog ka BV naveo je autore da postave hipotezu po kojoj bi ove bakterije doveli do početnih promena u vaginalnoj flori, koji bi onda stvorili uslove za rast i razvoj drugih anaerobnih mikroorganizama (BVAB), odnosno nastanak BV. Rezultati molekularnobioloških studija koji se odnose na detekciju bifidobakterija u vaginalnom mikrobiomu uglavnom zavise od molekularnih oruđa korištenim u tim studijama. Tako su molekularno biološke studije u kojima se detekcija

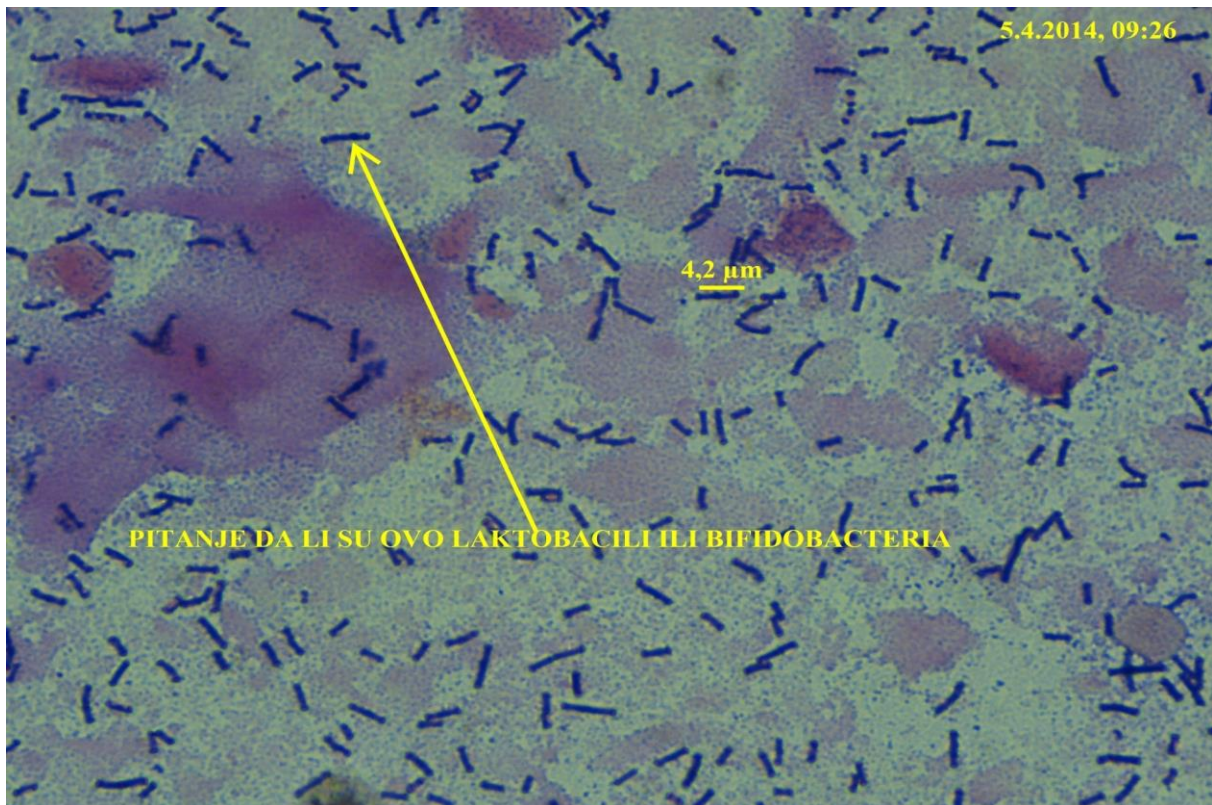
mikroorganizama zasnovanim na detekciji 16S rRNK gena detektovale *Bifidobacterium spp.* u vaginalnom mikrobiomu [632-635]. Burton i sar. [526] zaključuju da su nađeni sojevi bifidobakterija uglavnom fekalnog porekla i da se veoma retko nalaze u vagini. Hyman i sar. [635] su kod dve od 20 (10 %) žena našli bifidobakterije kao predominantnu bakterijsku vrstu, a često se *Bifidobacteria* i ne prikazuju kao članovi vaginalnog mikrobima [180, 441, 632]. Chaban i sar. [636] smatraju da jedan od razloga najverovatnije leži u činjenici da su studije koje su ispitivale prisustvo *Bifidobacteria* u intestinalnom traktu kulturom detektovale značajno veći broj sojeva bifidobakterija nego što je to postignuto korišćenjem 16S rRNK gena kojim se uspelo detektovati svega nekoliko sojeva. Kao drugu otežavajuću okolnost u identifikaciji *Bifidobacteria* isti autori ukazuju na činjenicu da su *G. vaginalis* (kao jedan od najčešće detektovanih mikroorganizama mikrobima vagine) i *Bifidobacteria* srodni mikroorganizmi koji taksonomski pripadaju istoj familiji. Zbog toga su Chaban i sar. [636] u svojoj studiji objavljenoj jula 2014. god. koristeći drugu metodologiju (*cpn60-based universal PCR protocol*) došli do rezultata koji su pokazali da *Bifidobacteria* verovatno predstavljaju češće i važnije članove vaginalnog mikrobioma nego što se to do sada predpostavljalo. Tako je u njihovom ispitivanju korišćenjem ovakve metodologije kod 5 od 27 asimptomatskih žena kao dominantne vaginalne mikroorganizme imalo *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* ili *Alloscardovia omnicoles*. Kako se *Bifidobacteria* generalno smatraju korisnim članom intestinalnog mikrobioma, i kako su detektovani kod asimptomatskih, i kako autori navode zdravih žena, iz ovoga bi mogli zaključiti da se verovatno radi i o korisnim članovima vaginalnog mikrobioma, iako autori mudro izbegavaju takav zaključak i ukazuju da uloga ovih mikroorganizama u vaginalnom mikrobiomu nije razjašnjena. Ipak, oni smatraju mogućim i razumljivim da *Bifidobacteria* kao mikroorganizmi koji proizvode mlečnu kiselinu imaju ulogu sličnu laktobacilima u mikrobiomu vagine, pri čemu ukazuju na značaj koji *Bifidobacteria* imaju za novorođenčad i njihovo zdravlje, te da prisustvo *Bifidobacteria* u vagini zdravih žena omogućava naseljavanje gastrointestinalnog trakta novorođenčeta tokom vaginalnog porođaja. Ovde ćemo još pomenuti studiju Swidinskog i sar. [637] kod 10 pacijentkinja sa BV kod kojih je ispitivano prisustvo *G. vaginalis* i različitih vrsta *Bifidobacterium* u perianalnoj regiji i vagini pokazala je prisustvo *G. vaginalis* na oba mesta odakle su uzimani uzorci, dok su različite vrste bifidobakterija (*Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum* i *Bifidobacterium catenulatum*) detektovane kod gotovo svih (izuzev jedne) pacijentkinja u uzorku iz perianalne regije, ali ni kod jedne pacijentkinje u uzorku iz vagine. Na osnovu tih nalaza autori zaključuju da BV ne nastaje jednostavnim prelaskom (*per continuitatem*) iz perianalne regije u vaginu, i da samo određene vrste bakterija (*G.*

*vaginalis*) opstaju u obe ekološke niše. Ako sad rezultate ovih studija i trenutna znanja o Bifidobacteriamama u vaginalnom mikrobiomu poredimo međusobno i sa rezultatima koje smo mi dobili mogli bi doći do sledećih zaključaka, ili bolje rečeno hipoteza:

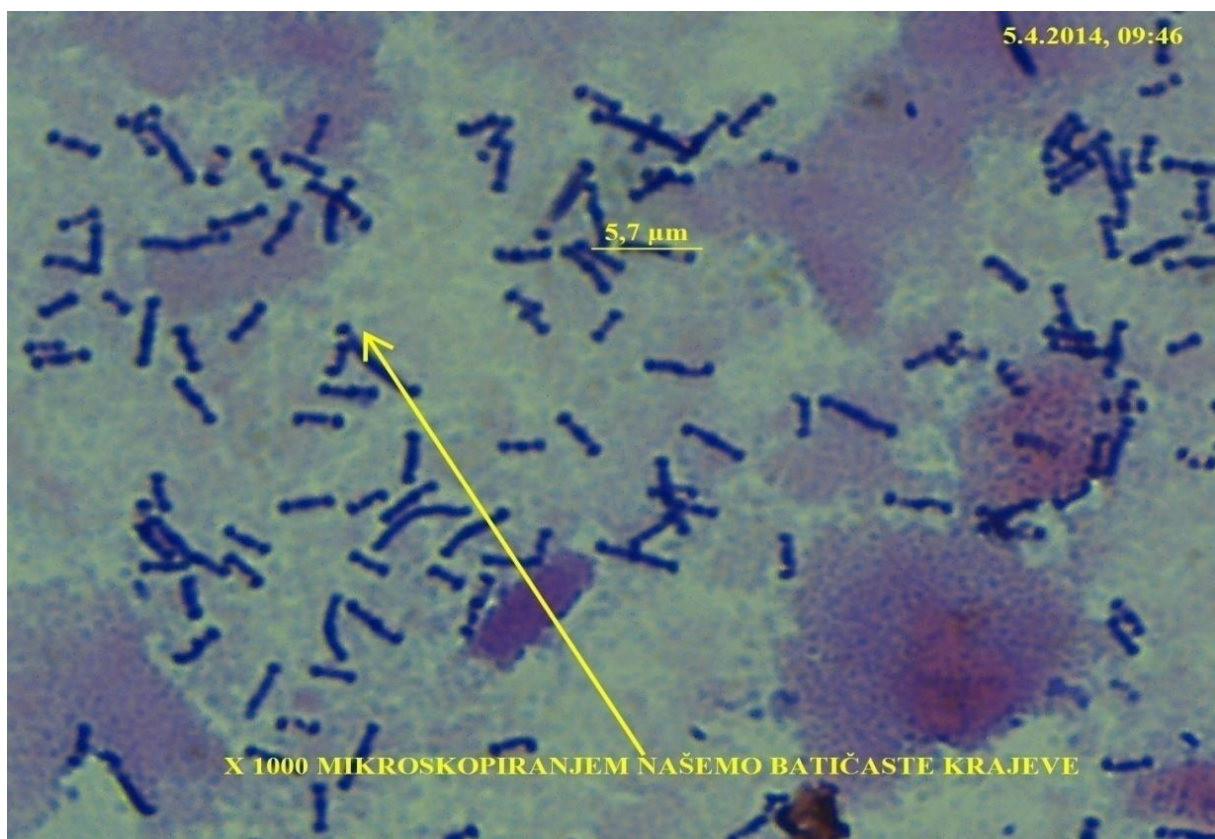
Prvo, ispitivanje *Rosenstein* i sar. koje ukazuje da bi bifidobakterije mogle da učestvuju u etiopatogenzi poremećaja vaginalne flore i nastanka BV ostaje na neki način usamljena. Naime rezultati našeg ispitivanja su potpuno suprotni rezultatima ovog ispitivanja jer se u našem ispitivanju detekcija bifidobakterija mikroskopskim pregledom preparata po Gramu smanjuje od normalnog ka patološkom mikroskopskom nalazu, dok se u ispitivanju *Rosenstein* i sar. izolacija bifidobakterija kulturom povećava kod mikroskopskog nalaza koji ide od normalnog ka patološkom. Štaviše, u našem ispitivanju sa porastom broja BVAB od BVN prema BVF smanjuje se prisustvo BIFIDO formi, tako da su naši rezultati u potpunosti saglasni sa rezultatima studije *Swidinskog* i sar. [637] koji ni kod jedne od 10 pacijentkinja sa BV nisu detektovali *Bifidobacteria*. Naša hipoteza je da sa velikim porastom broja BVAB dolazi do kvantitativnih i kvalitativnih promena vaginalne mikroflore, što onda dovodi do promene uslova (pH, kiseonik, mlečna kiselina, ishrana, metabolizam i sl.) u vaginalnoj sredini koji onemogućavaju rast i razvoj *Bifidobacteria*.

Drugo, većina drugih studija ukazuje da su *Bifidobacteria* najverovatnije deo normalne vaginalne flore, jer su u najvećem broju studija detektovani kod zdravih asimptomatskih žena [180, 469, 632-636]. Da nismo dobili podatak da prisustvo ovih formi predstavlja 10X veći rizik od PP, verovatno bi i mi zaključili da se BIFIDO forme češće nalaze kod pacijentkinja sa normalnom bakterijskom florom, da su retke kod pacijentkinja sa BV, i da najverovatnije predstavljaju deo normalne bakterijske flore. Ovde ćemo ukazati na još jednu po našem mišljenju veoma bitnu činjenicu, a koja se odnosi na detekciju *Bifidobacteria*, ili bolje rečeno i svih drugih bakterija u različitim molekularno-biološkim studijama. Naprimer, čitajući rad *Liu* i sar.[638] nailazimo na podatak da su kontrolnoj, zdravoj grupi nađene dve pacijentkinja u čijem mikrobiomu su kod jedne bile predominantne *Bifidobacteria*, a kod druge *Streptococcus*. Kao potvrdu da se ovakvi nalazi sreću kod zdravih asimptomatskih žena autori navode radove *Gajera* [469] i *Srinivasan* [219]. Dakle i ovaj rad bi govorio u prilog tome da su *Bifidobacteria* deo normalne vaginalne flore. Međutim ono što uvek moramo imati na umu jeste činjenica da se u najvećem broju ovih studija pacijentkinje svrstavaju u zdrave na osnovu Nugentovih i Amselovih kriterijuma ili se zdravo poistovećuje sa asimptomatskim. Veliki deo prethodne diskusije govori o nesavršenosti postojećih dijagnostičkih kriterijuma (Nugent, Amsel) u razlikovanju normalne od patološke vaginalne flore, a poistovećivanje asimptomatskog sa zdravim u medicini nije moguće. Naime, ako je oko polovine pacijentkinja sa BV

asimptomatsko, logično je da i neki drugi poremećaji vaginalne flore mogu takođe imati asimptomatski tok, a najbolji primer je infekcija HPV koja protiče potpuno asimptomatski, a može imati teške posledice po zdravlje žene. Kao što smo rekli Nugentovi kriterijumi razlikuju samo tri bakterijska morfotipa i logično je pretpostaviti da su u najvećem broju dosadašnjih ispitivanja *Bifidobacteria* i/ili *Corynebacteria* kao izrazito Gram pozitivna štapićaste forme bili protumačeni kao laktobacili. Ukazali smo i na razloge zbog čega u najvećem broju dosadašnjih molekularnobioloških studija nije detektovano prisustvo *Bifidobacteria*, i zašto je tek studija Chaban i sar. [636] ukazala na njihov mogući značaj. Najlakše je shvatiti o čemu govorimo ukoliko pogledamo naredne Slike 3.65 – 3.76. Tako ako pogledamo Sliku 3.65 jasno je da ove forme mogu lako da se protumače kao laktobacili jer su izrazito Gram pozitivne i štapićaste (kako smo ih i mi tumačili u prvim gledanjima pod mikroskopom). Međutim pažljivijom analizom i finim pomeranjem mikrometra može se uočiti da su krajevi ovih formi batičasti da se verovatno radi o *Bifidobacteriama* ili *Corynebacterima*, a ukoliko ih pogledamo na uvećanju većem od X1000 onda je to i uverljivije (Slike 3.66-3.68). Zbog toga verujemo da je pomenuta pacijentkinja iz studije Liu i sar [638]. kod koje je molekularnobiološkim analizama detektovana predominacija *Bifidobacteria*, a koja je na osnovu Nugentovih i Amselovih kriterijuma, koji su korišteni u toj studiji, i odsustva simptoma bila pogrešno svrstana u grupu zdravih, i da se radi o pacijentkinji koja je imala sličan mikroskopski nalaz kao onaj prikazan na Slikama 3.65 – 3.76 i koju bi mi u našem ispitivanju svrstali u BIFIDO grupu. U Metodologiji i prethodnoj diskusiji detaljno smo opisali morfološke karakteristike *Bifidobacteria* i *Corynebacteria* i ukazali koliko ih je teško razlikovati, ne samo međusobno, nego i od laktobacila. Takođe, ove mikroskopske forme se na uvećanju x400 i prilikom pregleda NPVS ne mogu razlikovati od laktobacila.

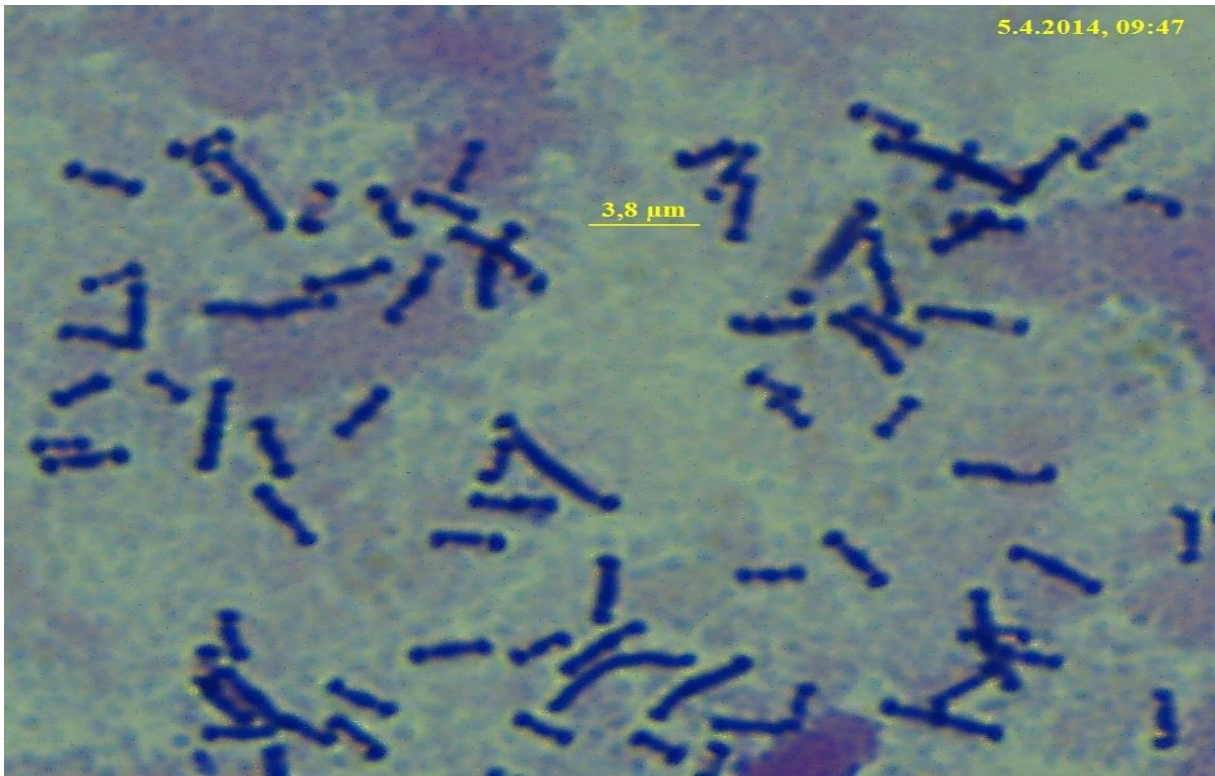


Slika 3.65: Preparat po Gramu uvećanje X1000: Gram pozitivne štapičaste forme koje liče na laktobacile

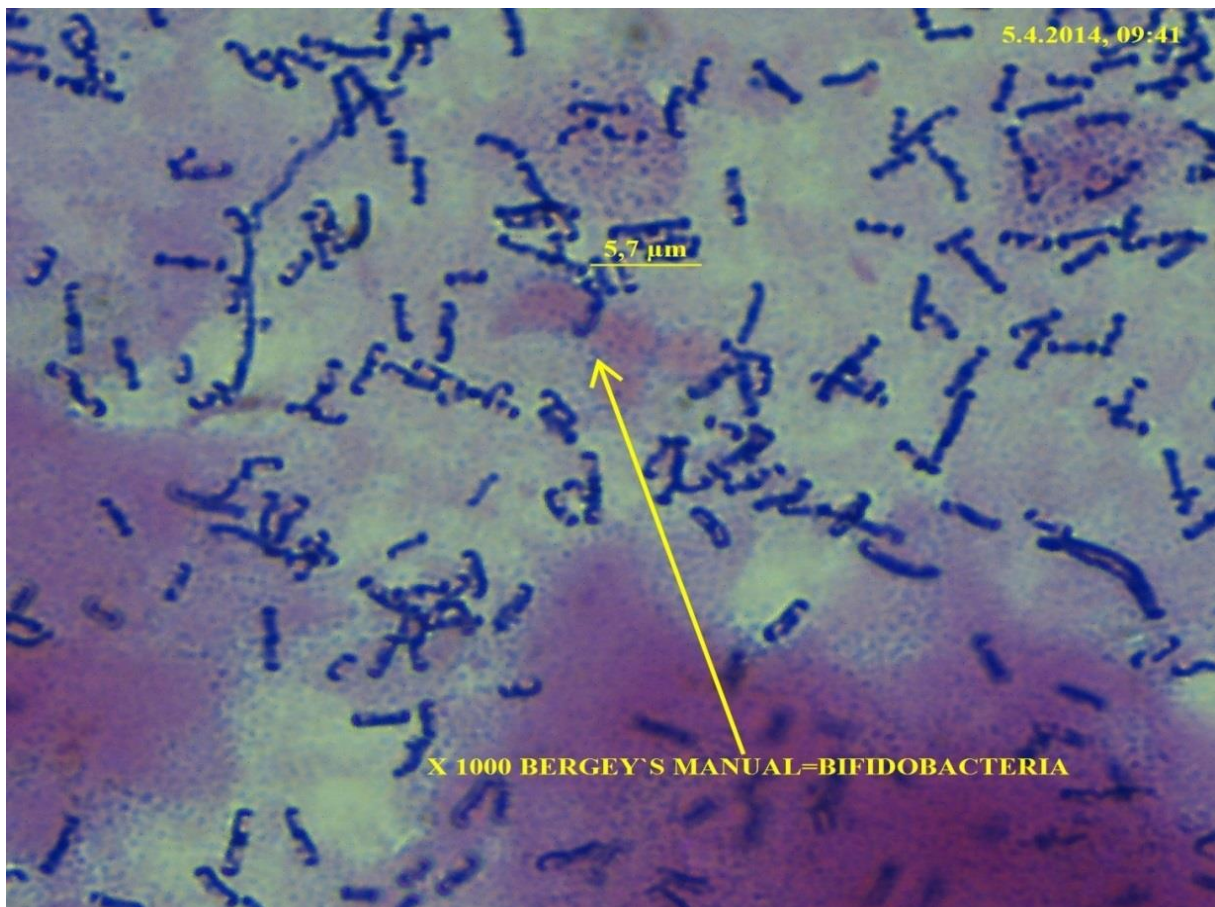


Slika 3.66: Preparat po Gramu uvećanje X1000+: Gram pozitivne štapičaste forme sa batičastim krajevima koji verovatno predstavljaju *Bifidobacteria* ili *Corynebacteria*, a ne laktobacile čiji su krajevi ravni





Slika 3.67: Preparat po Gramu uvećanje X1000+: Gram pozitivne štapičaste sa batičastim krajevima koje nisu laktobacili Actinomyces?.....?



Slika 3.68: Preparat po Gramu uvećanje X1000: Bifidobacteria? Corynebacteria?

Ovo potvrđuju rezultati našeg ispitivanja u kojima smo na osnovu modifikovanih Amselovih kriterijuma 40 od 50 trudnica (koje smo naknadnim pregledom preparata po Gramu svrstali u BIFIDO grupu) proglasili zdravim, a da smo se pridržavali originalnih kriterijuma po Amselu (vidi Metodologiju) sigurno bi i veći broj pacijentkinja imao normalan nalaz.

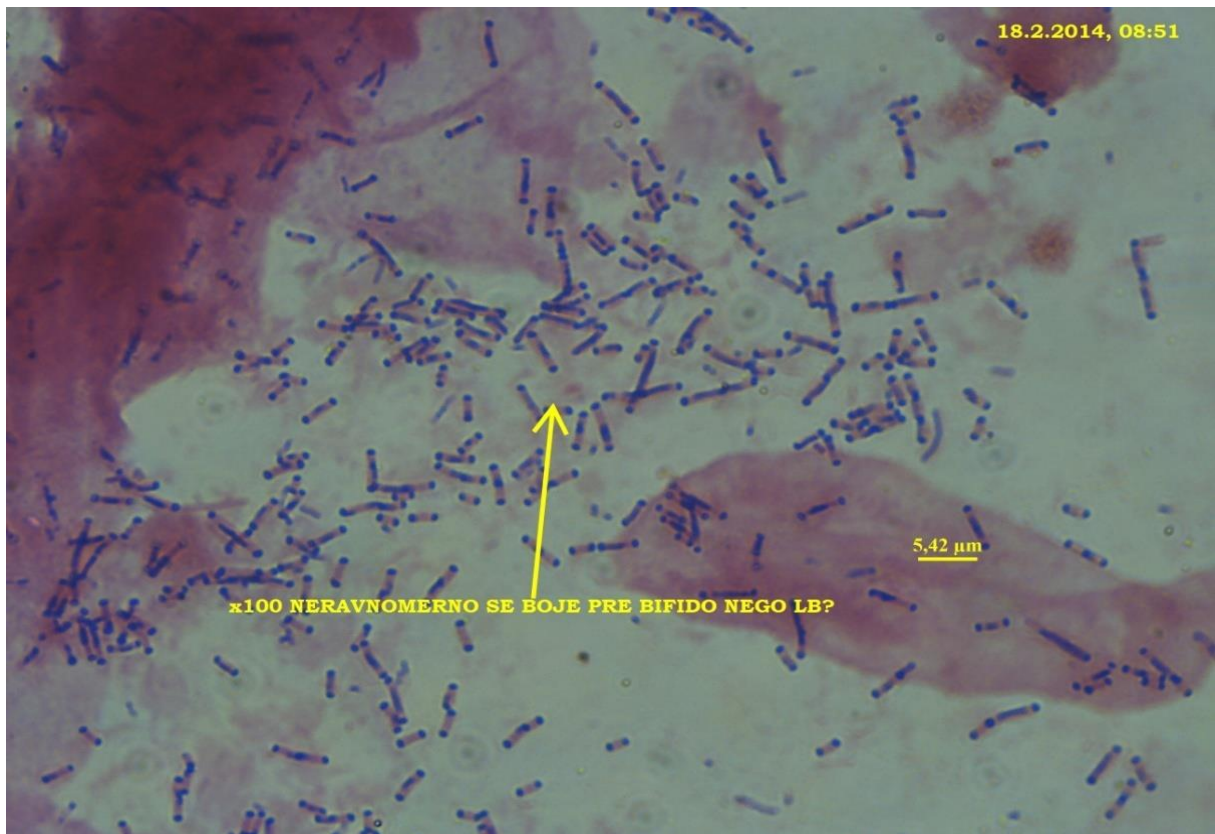
Na osnovu prethodno iznesenih podataka i rezultata našeg ispitivanja pretpostavljamo da se u ovakvim slučajevima radi o poremećaju vaginalne flore u kome dolazi do predominacije *Bifidobacteria* i *Corynebacteria* koje dovode do pojačanog inflamatornog odgovora i predstavljaju rizik za PP. Takođe, mogli bi smo reći da su ove bakterije tokom evolucije stekli sposobnost mimikrije. Ako mimikriju definišemo kao evolucionu sposobnost prilagođavanja radi preživljavanja, onda je ona u ovom slučaju odlično razvijena. U konkretnom slučaju govorimo o “mikroekološkoj mimikriji” s obzirom na njihovu sličnost sa laktobacilima i činjenicu da su prisutni kod pacijentkinja čiji je nalaz bliži normalnom nego patološkom, negativan test sa 10% KOH (80%) i verovatno odsustvo simptoma. Jedini podatak koji smo dobili u našem ispitivanju, a koji bi mogao ukazati na poremećaj vaginalne flore, odnosno na nesavršenost mimikrije su srednje vrednosti pH, 4,6, a ovaj podatak je značajniji ako znamo da ove bakterije nisu nađene ni kod jedne pacijentkinje sa BVF (najveće vrednosti pH) i kod malog broja pacijentkinja sa BVM, da su u 80% slučajeva bili u grupi sa normalnim nalazom (najniže vrednosti pH), što indirektno navodi na zaključak da ove bakterije na neki način “pomeraju” pH prema alkalnoj sredini. Ako pri tome dodamo da je često uz BIFIDO forme detektovana i CA kojoj suštinski odgovara kiseli vaginalni pH, onda ovaj podatak ima još veću vrednost. U literaturi nismo našli podatke koji se odnose na korelaciju ova dva parametra, ali smo našli podatak da je optimalan pH za rast bifidobakterija između 6,5 i 7,0 i da nije zabeležen rast u sredinama sa vrednostima pH manjim od 4,5 ili većim od 8,5. Kako u našem ispitivanju nismo našli BIFIDO forme kod pacijentkinja sa BVF mogli bismo pretpostaviti da su u ovakvim slučajevima neki drugi faktori (ishrana, kiseonik, druge vrste bakterija i sl.) važniji od pH sredine za rast BIFIDO formi. Rezultati koji se odnose na vijabilnost PMN ukazuju na prisustvo zapaljenja, a niske koncentracije IL-10 na mogućnost snažnijeg inflamatornog odgovora, što bi moglo da bude od velikog značaja u etiopatogenezi PP kod ove grupe trudnica.

BIFIDO forme su bakterije koje se zbog svoje sličnosti sa laktobacilima najčešće previde mikroskopskim pregledom i najveći broj pacijentkinja zbog toga ne dobija nikakvu terapiju i biva proglašen zdravim. Iako su vrednosti pH često preko 4,5, najčešće negativna proba sa 10% KOH, uz “normalnu” mikroskopsku sliku ne omogućava da ni na osnovu Amselovih kriterijuma posumnjamo da je došlo do značajnijeg (BV) poremećaja vaginalne flore. Verovatno da ove bakterije na neki način dovode do smanjene produkcije IL-10 što dovodi do

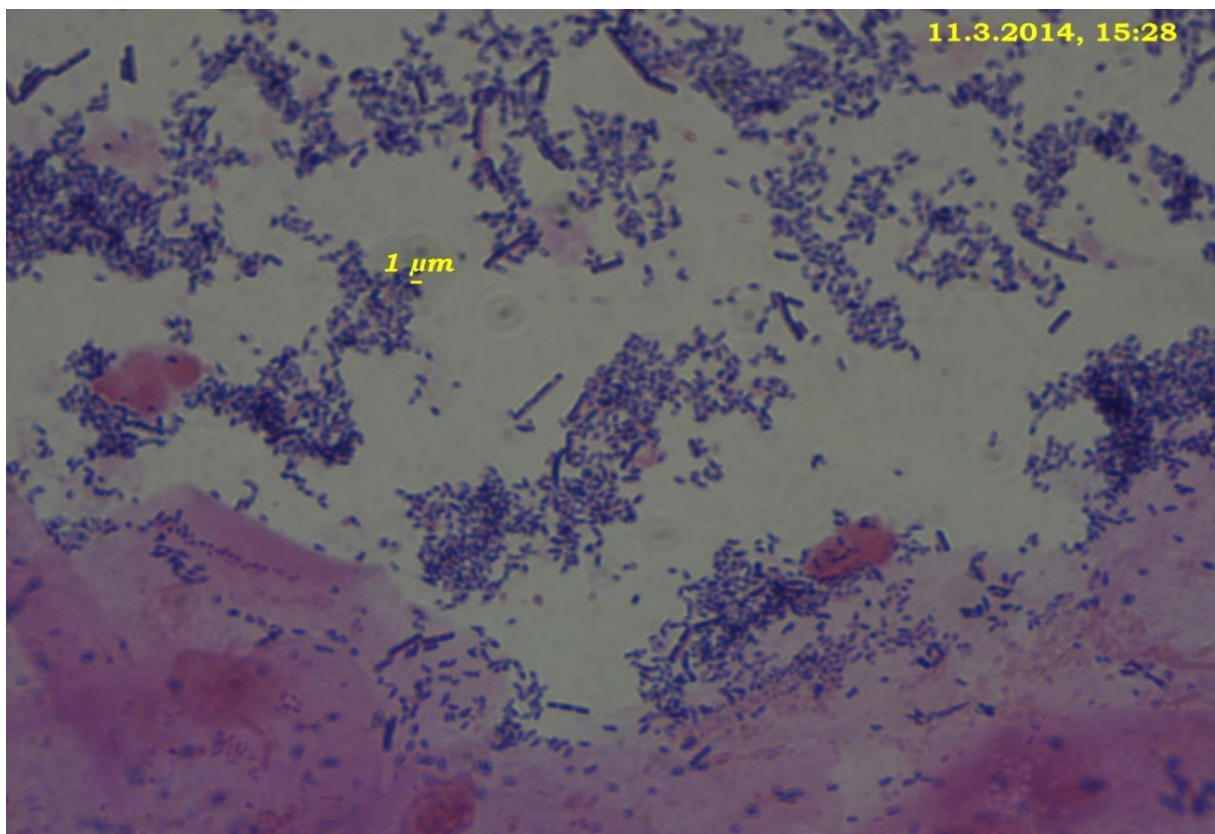
pojačanog i produženog zapaljenjskog odgovora koji može da dovede do povećanog lučenja proinflammatoryh citokina, sinteze prostaglandina, promena na grliću, aktivacije fetalnih membrana i miometrijuma i sledstvenog PP. Do odgovora na pitanje o eventualnoj terapiji sigurno nećemo doći ni brzo ni lako, zbog čega mislimo da u ovakvim slučajevima (povišen pH i normalan mikroskopski nalaz) acidifikacija vagine i primena prebiotika imaju svoje mesto. U literaturi smo našli samo jednu studiju koja je pokazala da pacijentkinje sa nalazom ovakvih mikroskopskih formi ("sličnih normalnom") imaju povećan rizik od PP. Radi se o već pominjanoj prospektivnoj kohortnoj studiji Verstraelen i sar. [415] u kojoj su autori procenjivali vrednost nove klasifikacije u predviđanju PP. Kod 221 trudnice uziman je uzorak za preparat po Gramu u prvom i drugom trimestru trudnoće, a kategorizacija pacijentkinja rađena na osnovu kriterijuma po Claeysu (vidi Metodologiju). Semikvantitativno je određivan i broj PMN. U konačnoj analizi normalan nalaz preparat po Gramu imale su pacijentkinje sa nalazom Ia, Ib i Iab, dok se patološkim nalazom smatrane pacijentkinje iz grupe I-like (u našem ispitivanju BIFIDO grupa), I-PMN (u našem radu leukoreja), i grupe II i III koje odgovaraju intermedijarnom nalazu i BV po Ison/Hayu, a koje su autori u ovom radu posmatrali kao jednu grupu i nazvali je BV-like. Rezultati su bili sledeći: oko 64% (154/221) žena imalo je normalnu vaginalnu floru, oko 20% (46/221) BV-like (intermedijaran+BV) oko 7% (17/221) I-PMN (leukoreja) i oko 9% (21/221) I-like (BIFIDO). Pre 37. n.g. porodile su se 23 (10,4%) pacijentkinje. Pacijentkinje sa normalnom florom imale su 4x manji rizik od PP, dok su pacijentkinje sa patološkim nalazom imale 5x veći rizik da se porode pre vremena. Među njima, relativni rizik za PP bio je najveći kod trudnica u grupu I-like (RR=7,0), sledile su trudnice iz grupe I-PMN (RR=6,8), a najmanji relativni rizik je bio kod pacijentkinja u grupi BV-like (RR=2,7). U odnosu na konvencionalne metode (Nugent i Amsel), senzitivnost vaginalnog brisa za PP porasla je sa 25% na 70%. Dakle, za razliku od studije Verstraelen i sar.[415] mi u našem ispitivanju nismo našli da su pacijentkinje sa povećanim brojem PMN, „konvencionalnim“ poremećajem vaginalne flore (BV, intermedijaran) ili poremećajima vaginalne flore na osnovu nove podele (BVF, BVM, BVN) i/ili prisustvom ometajućih faktora (CA, KOKE, LEPTO) imaju povećan rizik za PP. U našem ispitivanju samo su pacijentkinje iz BIFIDO grupe imale 10X veći rizik od PP.

Na osnovu iznesenih podataka jasno je da su neophodna dalja ispitivanja i bliža saradnja kliničara, mikrobiologa i molekularnog biologa kako bi se preciznije definisala uloga i značaj ovih bakterija (*Bifidobacteria*, *Corynebacteria*) u reproduktivnom zdravlju žene. Iako se u našem ispitivanju radi o pacijentkinjama koje su dolazile na unapred zakazivan pregled zbog čega ih smatramo uslovno asimptomatskom populacijom, u ovom trenutku nemamo preciznijih

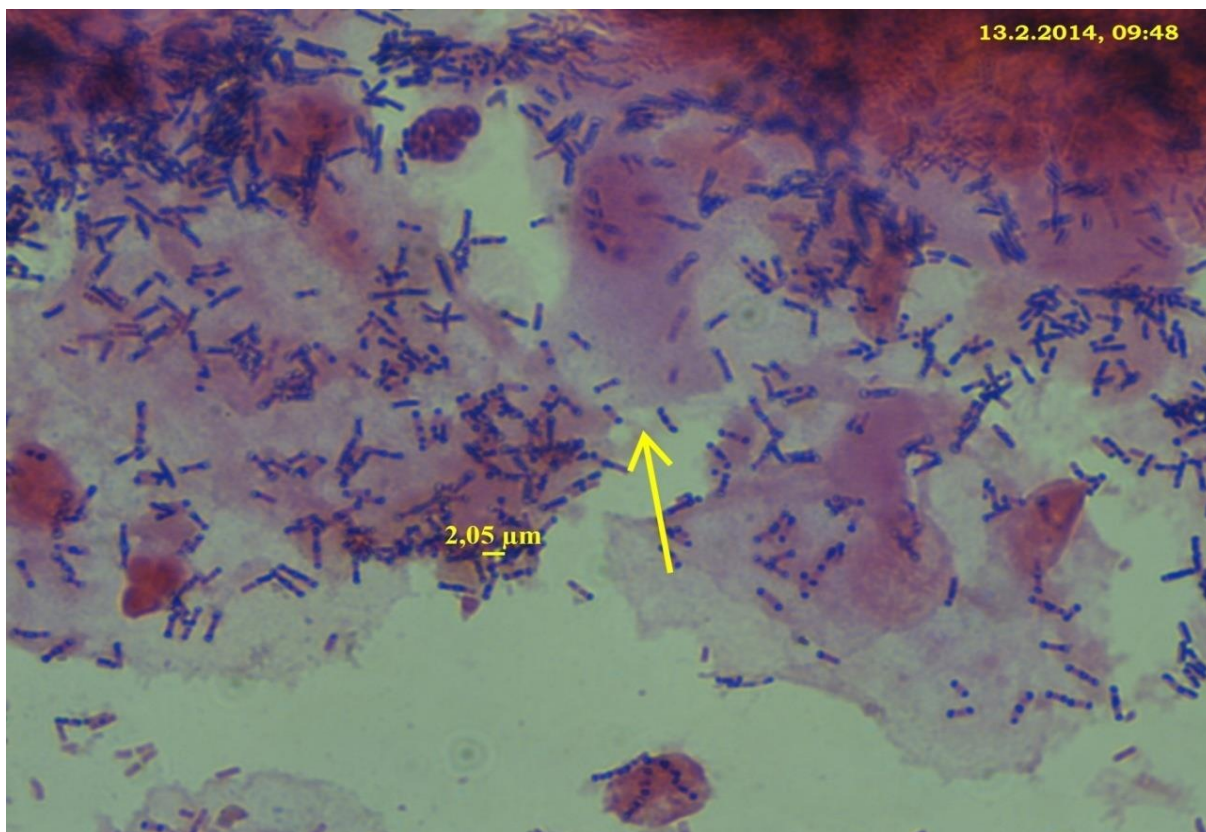
podataka o simptomima i kliničkoj slici ove grupe pacijentkinja, tako da bi buduća studija podrazumevala detaljnu anamnezu, klinički pregled i test sa 10% KOH i određivanje vaginalnog pH. Mikroskopski pregled NPVS verovatno ne bi bio od većeg značaja, iako posle ovih naših saznanja i iskustava, mislimo da se i na NPVS može naslutiti postojanje “neobičnih” štapićastih formi, koje bi mogle ukazivati na prisustvo ovih bakterijskih morfotipova. Mikroskopski pregled preparata po Gramu podrazumevao bi detaljniju analizu svih Gram pozitivnih štapićastih formi koji liče na laktobacile, pri čemu je naravno jasno da sam mikroskopski pregled nije dovoljan da za određenu “mikroskopsku formu” tvrdimo da je određena bakterija. Molekularnobiološka metodologija podrazumevala bi primenu oruđa koja mogu ne samo kvalitativno identifikovati prisustvo *Bifidobacteria*, odnosno njihovih različitih sojeva, nego i njihovu kvantifikaciju (Q-PCR). Ako sad pogledamo nalaz pacijentkinje prikazan na prethodne 4 slike ali na uvećanju x200 još je jasnije da se radi o predominaciji Gram pozitivnih štapićastih formi koji nisu laktobacila, i da bi verovatno uzimanje uzorka sa ovakvog preparata po Gramu i analiza adekvatnim molekularnobiološkim oruđima mogla da nam pomogne u odgovoru na pitanje da li su Gram pozitivne štapićaste forme *Bifidobacteria*, *Corynebacteria*, *Actinomyces* ili neke druge još nekultivisane bakterije? Mislimo da bi ovakva metodologija koja podrazumeva blisku saradnju kliničara, mikrobiologa i molekularnog biologa u budućnosti mogla dati precizniji odgovor o ulozi i značaju ovih bakterija ili bakterijskih zajednica na reproduktivno zdravlje žena.



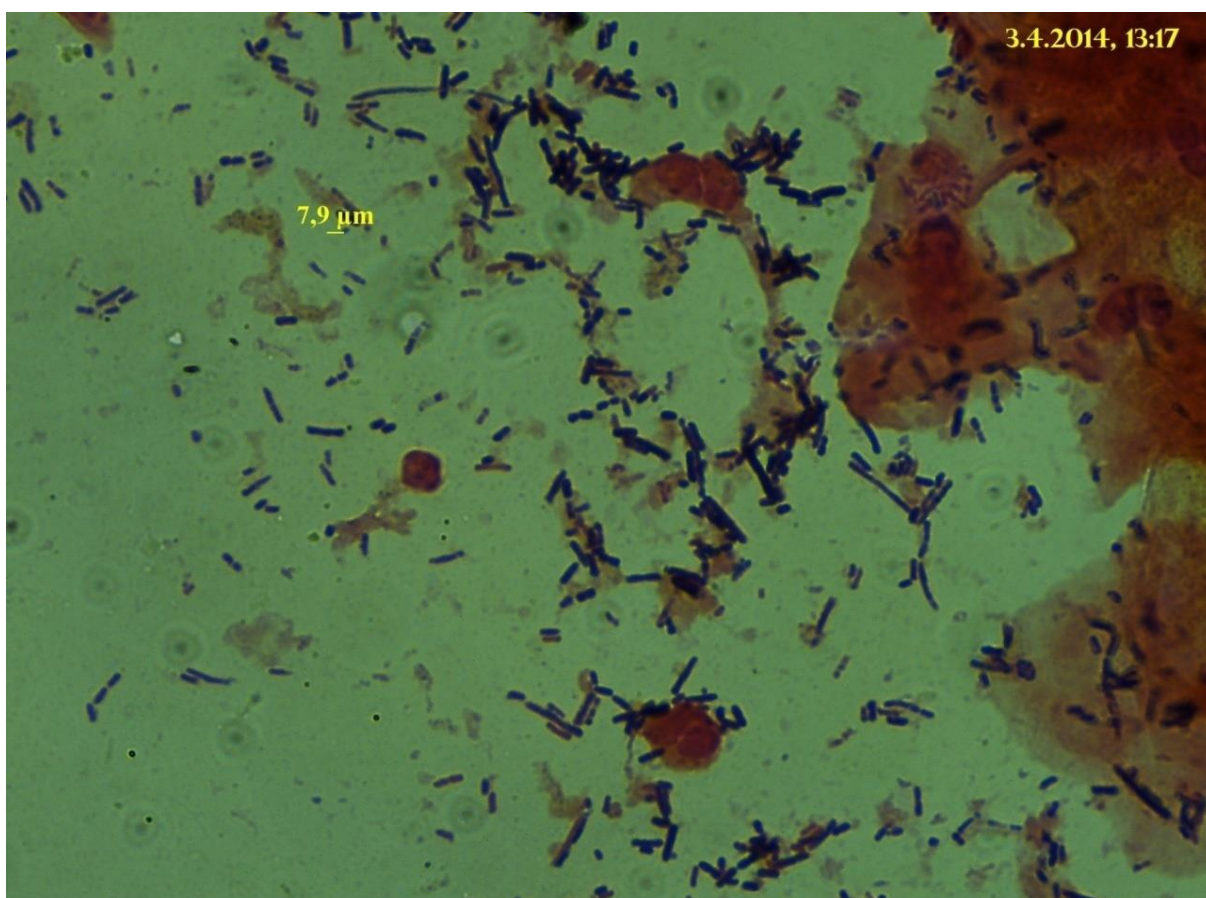
Slika 3.69 Preparat po Gramu uvećanje X1000: Bifidobacteria? Corynebacteria? Actinomyces?.....?



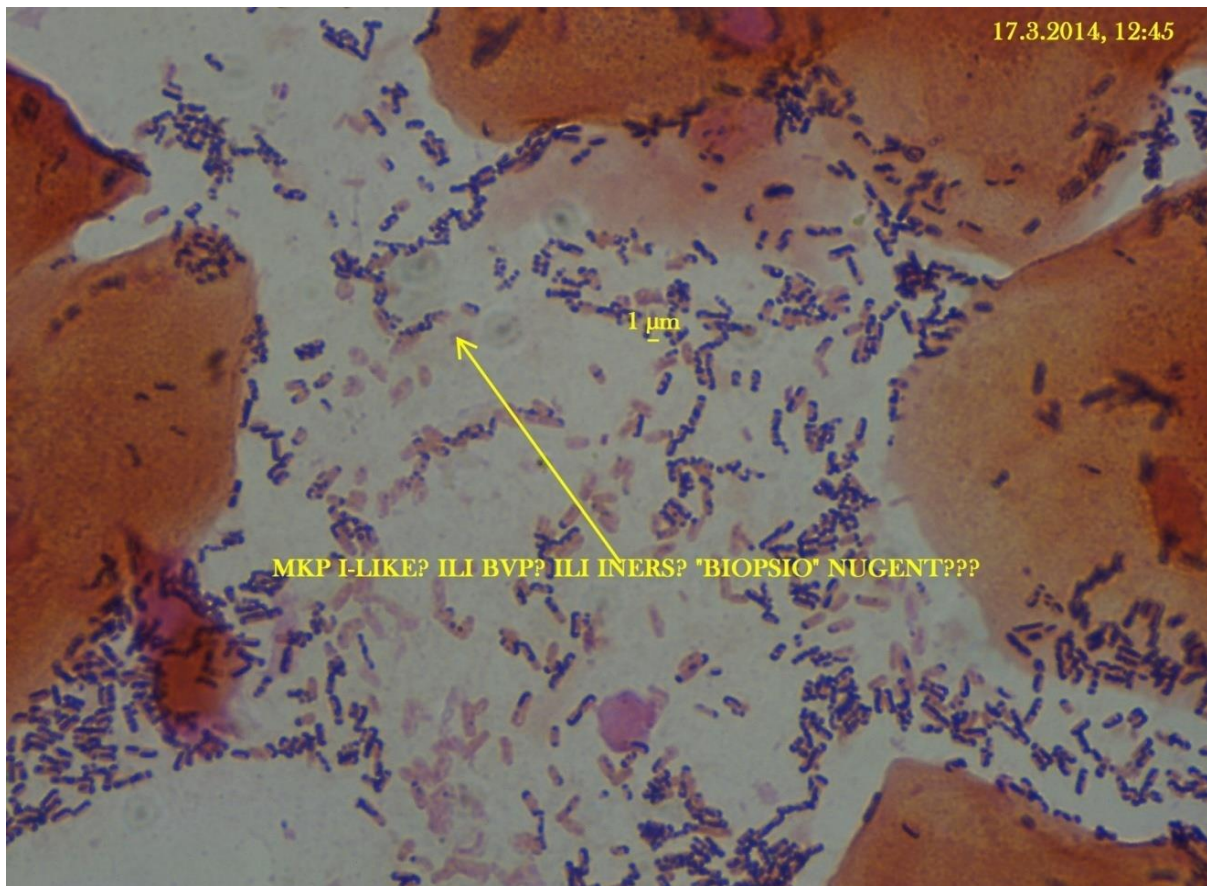
Slika 3.70 Preparat po Gramu uvećanje X1000: Bifidobacteria? Corynebacteria? Actinomyces?.....?



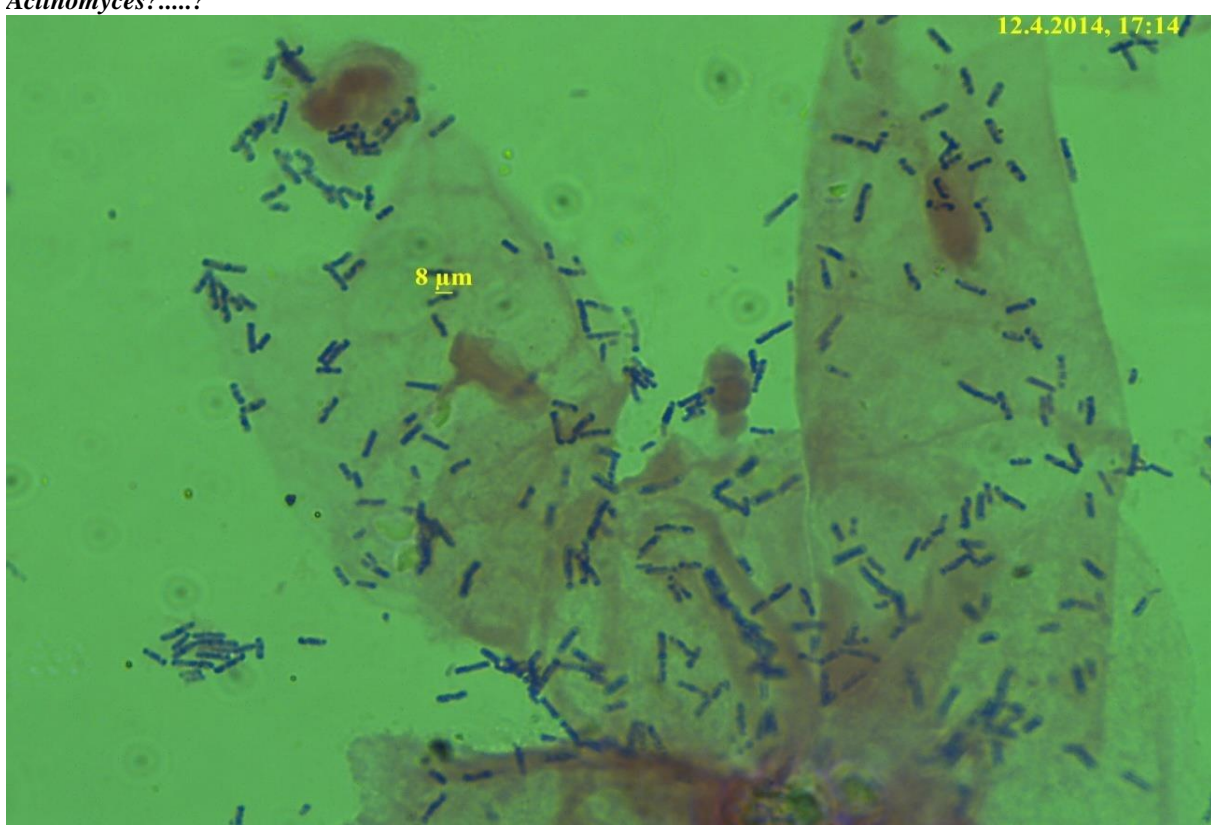
Slika 3.72: Preparat po Gramu uvećanje X1000: *Lactobacillus*? *Bifidobacteria*? *Corynebacteria*? *Actinomyces*?.....?



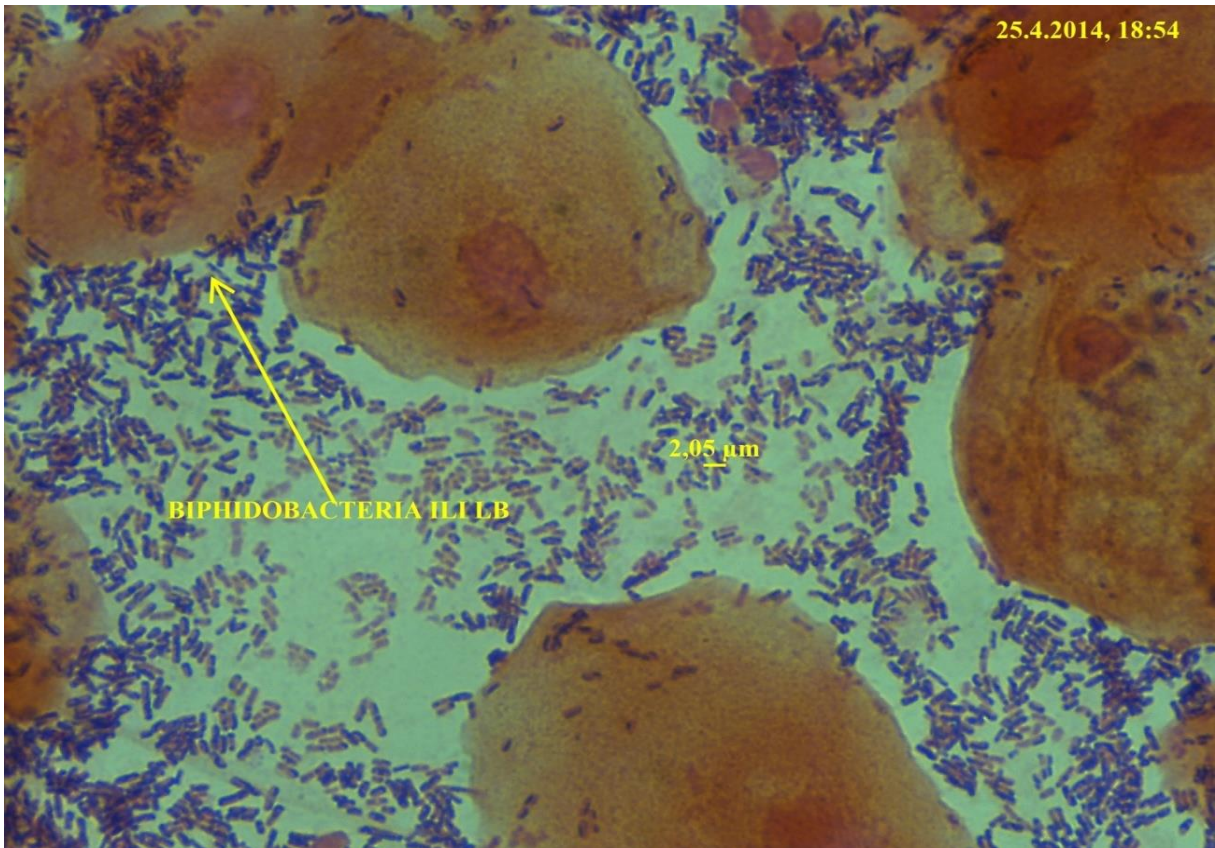
Slika 3.71: Preparat po Gramu uvećanje X1000: *Corynebacteria*? *Lactobacillus*? *Bifidobacteria*? *Actinomyces*?.....?



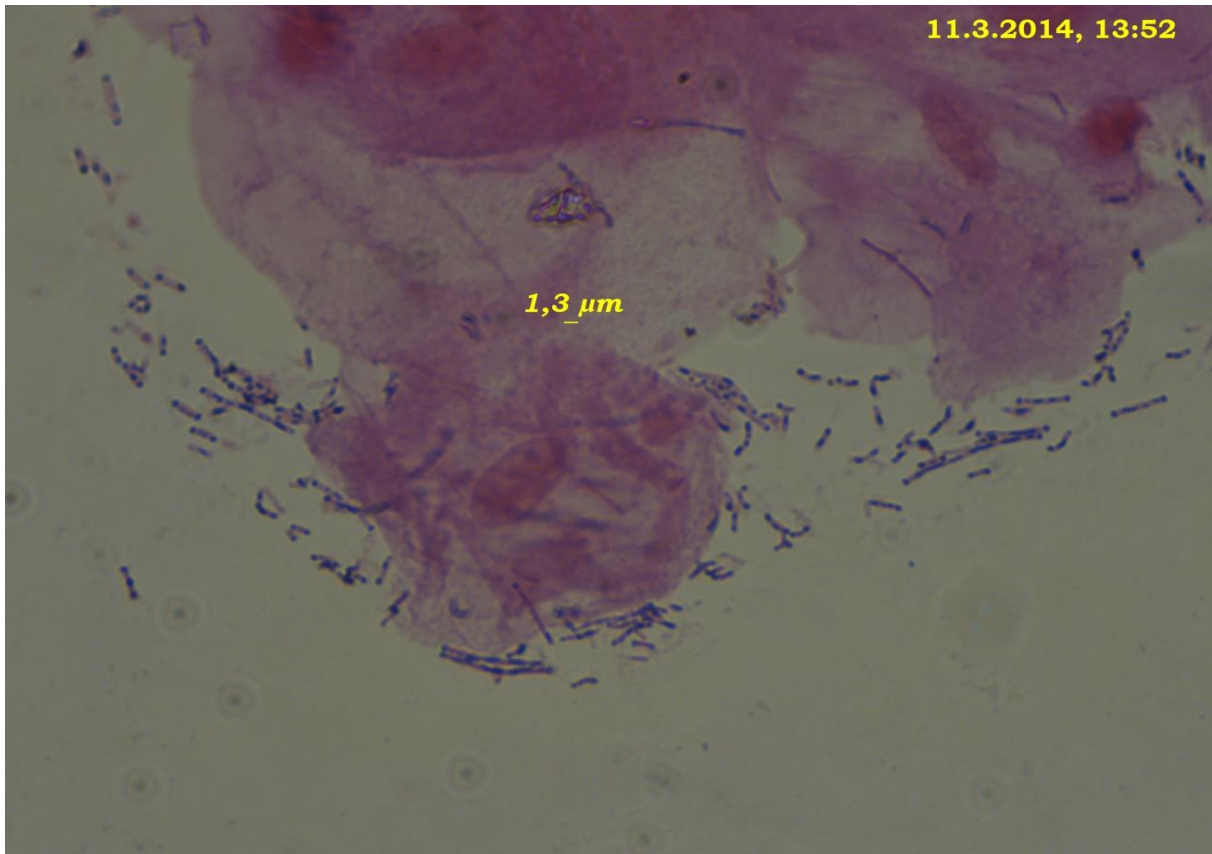
Slika 3.74: Preparat po Gramu uvećanje X1000: *Bifidobacteria*? *Corynebacteria*? *Lactobacillus*? *Actinomyces*?.....?



Slika 3.73: Preparat po Gramu uvećanje X1000: *Corynebacteria*? *Lactobacillus*? *Bifidobacteria*? *BVAB1*? *Actinomyces*?.....?



Slika 3.76: Preparat po Gramu uvećanje X1000: *Lactobacillus*? *Bifidobacteria*? *Corynebacteria*? *BVABI*? *Actinomyces*?.....?



Slika 3.75: Preparat po Gramu uvećanje X1000: *Lactobacillus*? *Bifidobacteria*? *Corynebacteria*? *BVABI*? *Actinomyces*?.....?



U Tabeli 3.24 se nalaze podaci koji pokazuju rezultate mikroskopskog pregleda brisa vaginalnog sekreta kod 21 trudnice koja se porodila pre 37. n.g. I ovu tabelu treba posmatrati kao “sliku” koja pokazuje koliko se mikroskopski nalazi mogu razlikovati u zavisnosti od dijagnostičkih kriterijuma, kao i u odnosu na prisustvo različitih ometajućih faktora kao što su CA, BIFIDO, LEPTO, KOKE I PMN ili razlika u vrednostima vaginalnog pH, odnosno pozitivnog ili negativnog KOH testa.

**Tabela 3.24: Rezultati mikroskopskog pregleda brisa vaginalnog sekreta kod 21 trudnice koja se porodila pre 37. n.g.**

	Nugent	Ison	Claeys	AMSEL	KOH	pH	NP-6G	NP-2G/CA	NP-2G/BIF	NP-6G/LEPTO	NP-6G/KOKE	PMN X200
1	INT	KOKE	LEUKO	BV	POZ	5,5	BVN	CAF	BIFIDO	BVN	BVN	PMN3
2	NOR	NOR	NOR	NOR	POZ	4,4	NM	NOR	BIFIDO	NM	KOKE	PMN1
3	NOR	NOR	NOR	NOR	NEG	4,0	NF	NOR	NOR	NF	NF	PMN1
4	NOR	NOR	LEUK	NOR	NEG	4,7	NF	CAN	BIFIDO	NF	KOKE	PMN3
5	NOR	NOR	NOR	BV	NEG	5,3	NN	CAF	BIFIDO	NN	NN	PMN3
6	NOR	NOR	NOR	NOR	NEG	4,0	NF	NOR	NOR	NF	NF	PMN1
7	NOR	NOR	LEUK	NOR	NEG	4,4	NF	CAN	BIFIDO	NF	KOKE	PMN2
8	BV	BV	BV	BV	POZ	5,3	BVF	BV	BV	BVF	KOKE	PMN3
9	INT	INT	INT	BV	POZ	5,5	NN	CAN	NOR	LEPTO	KOKE	PMN2
10	NOR	NOR	NOR	NOR	NEG	4,0	NF	NOR	NOR	NF	NF	PMN1
11	NOR	NOR	NOR	NOR	NEG	4,0	NF	NOR	NOR	NF	NF	PMN0
12	NOR	NOR	LEUKO	NOR	NEG	4,4	NF	CAF	BIFIDO	LEPTO	NF	PMN2
13	NOR	NOR	NOR	NOR	NEG	4,0	NM	NOR	NOR	NM	NM	PMN0
14	NOR	NOR	I-LIKE	NOR	NEG	4,0	NF	NOR	NOR	NF	KOKE	PMN3
15	BV	BV	BV	BV	POZ	5,0	BVF	BV	BV	BVF	KOKE	PMN0
16	INT	INT	INT	NOR	POZ	4,0	BVN	BV	BV	BVN	BVN	PMN1
17	NOR	NOR	NOR	BV	POZ	4,7	BVN	CAM	BV	LEPTO	BVN	PMN1
18	INT	ČIST	INT	NOR	NOR	5,0	NN	CAN	NOR	NN	KOKE	PMN1
19	INT	INT	LEUKO	NOR	NOR	6,0	BVN	CAN	BIFIDO	BVN	KOKE	PMN2
20	NOR	NOR	NOR		NEG	4,0	NF	NOR	NOR	NF	NF	PMN1
21	BV	BV	BV	BV	POZ	6,0	BVF	CAF	BV	BVF	KOKE	PMN3

LEUKO=leukoreja; CAF=CA-FULL; CAM=CA-MID; CAN=CA-NULL;

Iz tabele se vidi ono na šta ukazujemo u najvećem delu naše diskusije, a to je kompleksnost i različitost vaginalne flore, odnosno neophodnost da u budućim ispitivanjima veća pažnja bude usmerena na stanja vaginalne flore koje nisu samo BV, CA i TV kao najčešće vaginalne infekcije, nego su neke druge bakterijske (*Bifidobacteria*, *Corynebacteria*, *Coccae*, *Leptotrichia*) i nebakterijske forme (PMN) koje kao članovi (jedinice) mikrobne mreže mogu značajno da utiču na članove (jedinice) druge dve biološke mreže citokinske i apoptotske, i *vice versa*. Iako je statistička obrada podataka pokazala da pacijentkinje kod kojih smo detektovali BIFIDO forme imale oko 10 puta veći rizik od PP, gledajući u ovu tabelu i uočavajući koliko se ovih sedam pacijentkinja razlikuje međusobno po drugim parametrima, ne možemo da se ne

zapitamo da li se radi o pojedinačnim uzročnicima (*Corynebacteria* ili *Bifidobacteria*) ili o bakterijskoj zajednici koja u krajnjoj meri dovodi do neželjenog ishoda trudnoće.

### **3.9 CERVIKOMETRIJA I PREVREMENI POROĐAJ**

Dosadašnja istraživanja su pokazala da je dužina grlića ima normalnu distribuciju i da se značajnije ne menja do trećeg trimestra trudnoće, odnosno da promene u dužini grlića nisu od kliničkog značaja i da su manje od 0,5 mm nedeljno [639-643]. Takođe je potvrđeno da je merenje dužine grlića merena transvaginalnom sonografijom (TVS) upotrebljiv u predviđanju PP, i da je skraćen grličić povezana sa povećanim rizikom za PP [644-647]. Ipak, možemo reći da ni danas ne postoji konsenzus ni precizna definicija „kratkog grlića“ u trudnoći, što bi bilo od velikog značaja s obzirom da novija istraživanja pokazuju da bi medicinska intervencija u takvim slučajevima mogla da smanji učestalost PP [648-650]. Tako je pokazano da terapija progesteronom [651-653] aplikacija serklaža [654, 655] primena antibiotika [656] ili indometacina [657] može smanjiti broj PP. I za kratak grličić, kao i za PP, mogli bi smo reći da predstavlja sindrom koji može biti prouzrokovan različitim etiološkim faktorima, sličnim onim o kojima smo govorili i kod PP. Uprkos velikom broju istraživanja i danas postoje različita mišljenja o tome kada treba da počnemo sa merenjem dužine grlića materice, koliko često i u kojim vremenskim razmacima treba to da radimo i da li cervikometrija treba da bude obavezna kod svih trudnica (metoda). Cervikometrija se u našem Centru radi unazad desetak godina kao sastavni deo skoro svakog ultrazvučnog pregleda u trudnoći, a obavezan je u periodu od 22.-32. n.g. S obzirom da su mnogo veće studije koje su bile primarno dizajnirane već potvrdile da merenje dužine grlića materice, uz FFN, predstavlja najvredniji marker u predviđanju PP, naš primarni cilj nije bio da ispitamo njenu vrednost u predikciji PP, kao ni vrednost i efikasnost različitih terapijskih pristupa kod pacijentkinja sa kraćim grličićem. Naš primarni cilj bio je da ispitamo da li je i u kakvoj je vezi dužina grlića materice sa stanjem vaginalne flore, brojem, vijabilnošću i apoptozom vaginalnih PMN i koncentracijama ispitivanih citokina.

Od 618 trudnica za koje nam je bio poznat termin porođaja 597 (96,6%) se porodilo u terminu, dok se 3,4% (n=21) porodilo pre 37 n.g. Od 21 trudnice koja su se porodile pre termina njih 13 (61,9%) porodilo se posle 34 n.g., 6 (28,5%) se porodilo između 31 i 34 n.g, a po jedna je u grupi ranih i izuzetno ranih PP (Tabela 3.25). Takođe treba uočiti da je 11 pacijentkinja poređeno posle 35 n.g. i da značajan broj studija koje se odnose na PP kao granicu uzima 35 n.g., jer je posle ovog perioda perinatalni morbiditet i mortalitet značajno manji

Tabela 3.25: Raspodela trudnica u odnosu na period trudnoće u kome je došlo do PP

R.B.	Izuzetno rani PP pre 27. n.g	Rani PP 28-30,6. n.g	Umereno Rani PP (31-33,6. n.g)	Kasni PP (34-36,6 n.g.)
1.	26,0 n.g.	PT 29,3	PT 32,4	PT 34,0
2.			PT 32,5	PT 34,2
3.			PT 32,6	PT 35,0
4.			PT 33,2	PT 35,2
5.			PT 33,2	PT 35,3
6.			PT 34,1	PT 35,3
7.				PT 35,4
8.				PT 36,0
9.				PT 36,1
10.				PT 36,1
11.				PT 36,2
12.				PT 36,2
13.				PT 36,2

Srednja dužina grlića materice kod 597 pacijentkinja koje su imale terminski porođaj iznosila je  $40,8 \pm 6,5$  mm, a kod pacijentkinja sa PP  $30,8 \pm 9,0$ . T-test je pokazao da je ova razlika statistički visoko značajna ( $p < 0,001$ ). Od ukupno 618 pacijentkinja uključenih u naše ispitivanje kod 568 (91,9%) dužina grlića je bila preko 30 mm, dok je 8,1% ( $n=50$ ) imalo dužinu manju od 30 mm. Od 597 trudnica sa terminskim porođajem kod 556 (93,1%,) dužina grlića je bila preko 30 mm, dok je 41 (6,9%) imala dužinu grlića manju od 30 mm. U grupi sa PP 57,1% ( $n=12$ ) izmerena je dužina preko 30 mm, dok je 42,9% ( $n=9$ ). Nikolaides i sar. [658] našli su da je srednja dužina grlića materice u drugom trimestru trudnoće je između 35 i 38 mm, a dužina grlića od 25 mm odgovara 10 percentili. U našem ispitivanju mediana je 39 mm, a 5. percentila 28 mm. Najveći broj dosadašnjih studija koje se odnose na pacijentkinja sa malim rizikom za PP ukazuje da je dužina grlića manja od 25 mm u periodu između 18 i 24 nedelje gestacije udružena sa PP pre 35 nedelje (oko 5%), u odnosu na opštu populaciju gde je taj procenat oko 2,4%. većina studija takođe je pokazala da je cervikometrija bolji prediktor ranih PP ( $< 32$  n.g.), a kao što smo rekli u našem ispitivanju preko 60% pacijentkinja se porodilo posle 35 n.g.

Primenom Hi kvadrat testa ( $\chi^2$ ) pokazana je da postoji povezanost između dužine grlića materice i termina porođaja ( $\chi^2=35.336$ ;  $df=1$ ;  $p < 0,001$ ; Tabela 3.26). Takva značajnost nađena je i kada su pacijentkinje podeljene u dve grupe a kao granična vrednost uzeta dužina grlića od 25 mm ( $\chi^2=27.591$ ;  $df=1$ ;  $p < 0,001$ ; Tabela 3.27). Istim statističkim postupkom za graničnu vrednost od 36 mm pokazano je postojanje asocijacije između dužine grlića i termina porođaja ( $\chi^2=23.49$ ;  $p < 0,001$ ; Tabela 3.28).

**Tabela 3.26: Prikaz dobijenih rezultata za dužinu grlića materice 30mm i termina porođaja**

TERMIN	DUŽINA GRLIĆA		Σ	
	≥30 mm	<30 mm		
TERMINSKI	n	556	41	597
	%	93,1	6,9	100,0
PRETERMINSKI	n	12	9	21
	%	57,1	42,9	100,0
Σ	n	568	50	618
	%	91,9	8,1	100,0

$\chi^2=35.34$ ; df=1; p<0,001

**Tabela 3.27: Prikaz dobijenih rezultata za dužinu grlića materice 25 mm i termina porođaja**

TERMIN	DUŽINA GRLIĆA 25 mm		Σ	
	≥25 mm	<25 mm		
TERMINSKI	n	581	16	597
	%	97,3	2,7	100,0
PRETERMINSKI	n	16	5	21
	%	76,2	23,8	100,0
Σ	n	597	21	618
	%	96,6	3,4	100,0

$\chi^2=27.59$ ; df=1; p<0,001

**Tabela 3.28: Prikaz dobijenih rezultata za dužinu grlića materice 36 mm i termina porođaja**

TERMIN	DUŽINA GRLIĆA		Σ	
	≥36 mm	<36 mm		
TERMINSKI	n	452	145	597
	%	75,7	24,3	100,0
PRETERMINSKI	n	6	15	21
	%	28,6	71,4	100,0
Σ	n	458	160	618
	%	74,1	25,9	100,0

$\chi^2=23.49$ ; df=1; p<0,001

Od 597 trudnica sa terminskim porođajem kod 581 (97,3%) dužina grlića je bila preko 25 mm, a manje od 25 mm izmereno je kod 16 (2,7%) trudnica. Ali pri ovoj graničnoj vrednosti 76,2% (n=16) trudnica sa PP imalo je grlić preko 25 mm, a kraći od te vrednosti 23,8% (n=5). Dakle od 618 pacijentkinja kod 597 (96,6%) grlić je bio duži od 25 mm, a grlić kraći od 25 mm izmeren je kod 3,4 % (n=21) pacijentkinja.

Primenom *t*-testa, (Leveneov test) utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između dužine grlića materice u odnosu na broj PMN određen pregledom preparata po Gramu

na uvećanju x200 ( $p < 0,05$ ), dok takva značajnost nije nađena za druge dve semikvantitativne metode na uvećanjima x400 i x1000. Nijedna od dve kvantitativne metode određivanja broja PMN nije pokazala povezanost između broja PMN i dužine grlića materice. Ovi podaci su od značaja ukoliko ih sagledamo u svetlu činjenice da dužina grlića materice merena transvaginalnom sonografijom, uz fetalni fibronektin, danas predstavlja najvredniji prediktor PP. Tako bi povećan broj PMN na mikroskopskom uvećanju x200 mogao biti indikacija za ultrazvučni pregled vaginalnom sondom, odnosno cervikometriju. Broj i vijabilnost vaginalnih PMN nisu pokazali statistički značajnu povezanost sa dužinom grlića materice.

Ako sad detaljnije analiziramo podatke kod 21 pacijentkinja sa grličem  $\leq 25$  mm doći ćemo do nekih zaključaka koji izmiču statistici a koji su po našem mišljenju za razumevanje dobijenih rezultata. Tako, ako znamo da se 16 pacijentkinja sa grličem  $\leq 25$  porodilo u terminu, mogli bi smo doći do zaključka da se u našem ispitivanju većina trudnica sa grličem  $\leq 25$  porodila u terminu (16/21). Međutim ukoliko znamo da su sve ove trudnice dobijale terapiju progesteronom a da je kod pet trudnica stavljen serklaž onda je jasno da ne možemo znati koliko bi se ovih trudnica porodilo pre vremena a koliko u terminu da nisu lečene. U Tabelama 3.29 i 3.30 su prikazane dužine grlića za svaku od ovih pacijentkinja kao i ishod trudnoće. Ono što smatramo veoma važnim i želimo istaći jeste činjenica da su sve ove pacijentkinje došle na pregled i da nisu imale nikakve simptome. Dakle ni jedna od 5 pacijentkinja sa grličem  $\leq 15$  mm nije navodila nikakve tegobe. Mada smo u tim slučajevima insistirali na preciznim anamnestičkim podacima unazad nekoliko dana ili nedelja većina pacijentkinja je negirale bilo kakve tegobe koje bi ukazivale na mogući PP. Svakako su najupečatljivije dve trudnice kod kojih je grlič bio 10 ili 14 mm, i kod kojih su kliničkim pregledom viđeni plodovi ovojci, a koje pri tome nisu imale nikakve simptome, ni tog ni prethodnih dana. Kao što se vidi u tabeli grlič  $\leq 15$  mm imalo je 5 pacijentkinja od kojih su se 3 porodile pre termina uprkos aplikaciji cerklaža i medikamentnoj terapiji, dok su se primenom istih procedura 2 trudnice porodile u terminu. Iako neki autori u literaturi navode kao graničnu vrednost od 15 mm za rizik od PP, naši rezultati ukazuju da je u takvim slučajevima verovatnoća da će se trudnica poroditi pre termina veća, bez obzira na primenjenu terapiju. Ako sad analiziramo grupu pacijentkinja sa grličem  $> 15$  mm a  $\leq 25$  mm vidimo da tu imamo 14 pacijentkinja koje su se porodile u terminu, dok su se 2 pacijentkinje porodile pre termina. Kao što smo rekli najveći broj autora danas uzima kao graničnu vrednost 25 mm i smatra da u takvim slučajevima treba započeti terapiju progesteronskim preparatima, a po nekima aplikovati serklaž. Sve pacijentkinje sa grličem kraćim  $\leq 20$  mm upućivane su u tercijarnu ginekološku ustanovu radi eventualne aplikacije

serklaža, primene tokolitičke i/ili progesteronske terapije, a u zavisnosti od mikroskopskih i mikrobioloških analiza uključivana je i antibiotska i/ili antimikotična terapija. Nakon otpusta sve pacijentkinje su nastavljale sa terapijom progesteronom do 34- 35 n.g., i češće su kontrolisane. Samo dve od 16 pacijentkinja porodile su se pre termina, i obe su imale kasni PP. Mislimo da ovi rezultati potvrđuju značaj cervikometrije pri svakom ultrazvučnom pregledu trudnice, bez obzira da li ima ili nema simptome koji ukazuju na PP, i da se takvim pristupom može izdvojiti rizična grupa, a pravovremenom i adekvatnom terapijom značajno smanjiti učestalost PP.

**Tabela 3.29: Raspodela pacijentkinja na osnovu dužine grlića (10 – 30 mm) u odnosu na termin porođaja**

	Dužina grlića (mm)															
	10	11	14	15	17	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
TP	1	0	1	0	1	2	1	1	1	2	6	3	3	5	6	8
PP	0	1	1	1	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	3

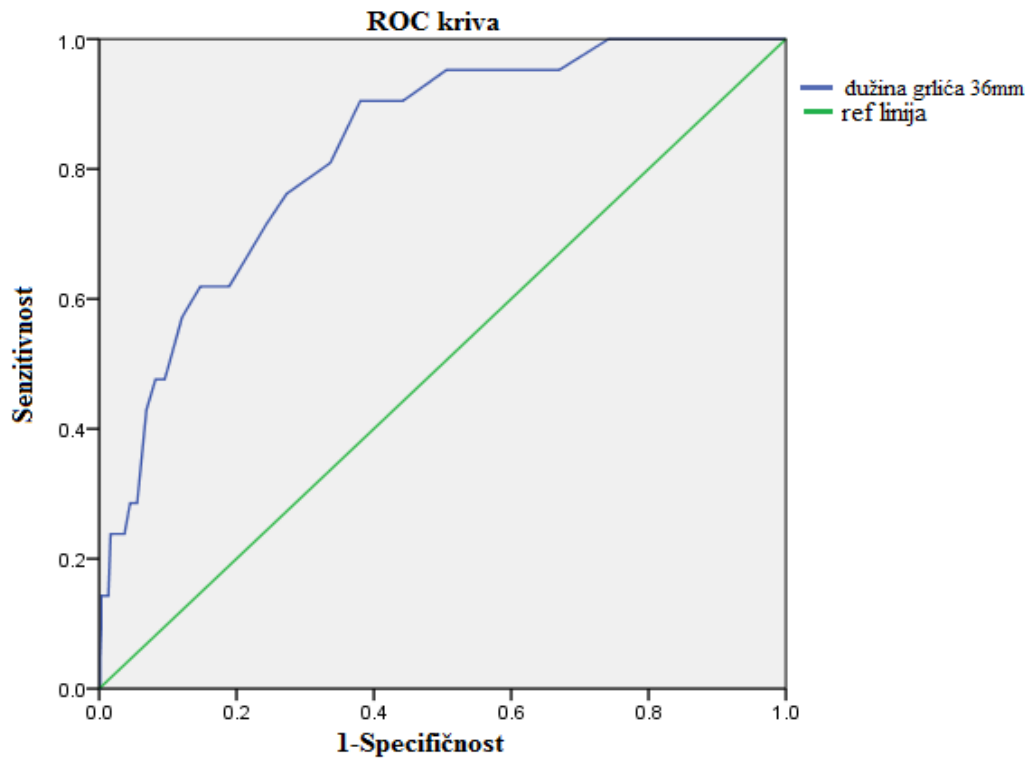
**Tabela 3.30: Raspodela pacijentkinja na osnovu dužine grlića (31 – 45 mm) u odnosu na termin porođaja**

	Dužina grlića (mm)													
	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	45	
TP	8	8	15	16	25	32	18	38	26	37	38	28	30	
PP	1	0	2	1	0	2	1	1	2	0	1	0	1	

Većina istraživača slaže se da je PP malo verovatan ukoliko je dužina grlića  $\geq 30$  mm [659-662]. Sa ovakvim stavom saglasni smo i mi bez obzira što smo analizom ROC krive najbolje rezultate dobili za graničnu vrednost 36,5 mm. Međutim ono po čemu se naša studija razlikuje od drugih ovakvo tipa jeste naš stav da u ovom ispitivanju svim pacijentkinjama sa grličem  $>25$  mm a  $\leq 30$  mm uvedemo progesteronsku terapiju 200 mg vaginalno u jednoj dozi uveče, kasno pre spavanja. Dakle ova grupa pacijentkinja nije hospitalizovana, ali je kontrolna cervikometrija rađena prve dve nedelje na 7 dana, a potom na 2-3 nedelje do termina. Ako sad pogledamo rezultate prikazane u tabeli videćemo da smo u ovoj grupi imali 29/618 (4,7%) pacijentkinja, kojima smo možda po trenutnim medicinskim postulatima neopravdano davali terapiju progesteronom. Međutim ako pogledamo rezultate videćemo da se 25 (86,2%) ovih pacijentkinja porodilo u terminu, a 4 (13,8%) pre termina. Naravno kako nismo imali kontrolnu ili placebo grupu ovi rezultati nam ne daju za pravo da donosimo statističke zaključke, ali mi

mislimo da je i u ovim slučajevima terapija progesteronom značajno uticala na manji broj PP u ovoj grupi pacijentkinja.

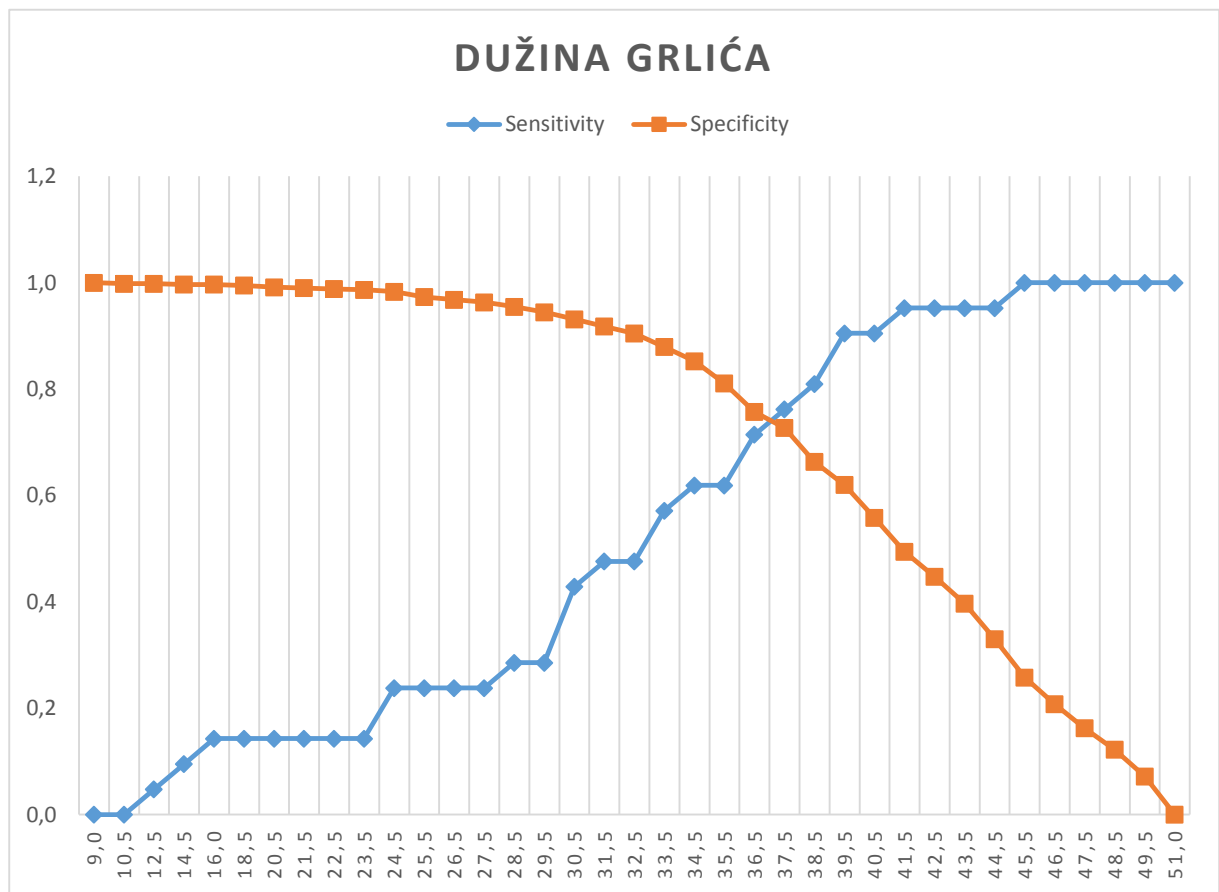
Od 21 trudnice koja su se porodile pre vremena 5 je imalo grlić kraći od 25 mm, četiri duži od 25 ali  $\leq 30$  mm, 6 u grupi  $>30$  mm a  $\leq 36$ , a preostalih 6 je dužina grlića bila preko 36 mm (Tabele 3.29 i 3.30).



Grafikon 3.46: ROC kriva za dužinu grlića 36 mm

Tabela 3.31: ROC kriva - tabelarni prikaz parametara koji su dali statističku značajnost

Test	Površina ispod krive	Standardna greška	Nivo značajnosti (p)	95% granica pouzdanosti CI	
				Minimum	Maksimum
Dužina grlića 36 mm	0,829	0,040	0,000	0,750	0,909



Grafikon 3.47: Odnos senzitivnosti i specifičnosti za dužinu grlića

Tabela 3.32: Tabela prikaz distribucije specifičnosti i senzitivnost u odnosu na dužinu grlića

Dužina grlića	Senzitivnost	Specifičnost
.....	.....	.....
32,5	0,48	0,90
33,5	0,57	0,88
34,5	0,62	0,85
35,5	0,62	0,81
<b>36,5</b>	<b>0,71</b>	<b>0,76</b>
<b>37,5</b>	<b>0,76</b>	<b>0,73</b>
38,5	0,81	0,66
39,5	0,90	0,62
40,5	0,90	0,56
41,5	0,95	0,49
.....	.....	.....

Iz grafikona jasno se vidi da postoji obrnuta korelacija između rizika za PP i dužine grlića materice, a ovakvi rezultati nađeni su u velikom broju studija [663-669]. Davies i sar. [670] kod 964 našli su senzitivnost od 57% i specifičnost od 82% za graničnu vrednost od 30



mm između 24 i 28 nedelje gestacije. Pozitivna prediktivna vrednost bila je svega 4,5% za PP <35 n.g. zato što je i u ovoj studiji broja pacijentkinja sa PP bio mali (n=46). Iz Tabele 3.26 se vidi da je specifičnost 93,1% odnosno da je 6,1% rezultata lažno pozitivno, dakle pacijentkinje su imale grlić kraći od 30 mm ali su se ipak porodile u terminu. S druge strane senzitivnost 42,9% znači da je 57,1% lažno negativnih jer su imale grlić preko 30 mm a porodile su se pre termina. Pozitivna prediktivna vrednost (PPV) iznosila je 18% dok je negativna prediktivna vrednost (NPV) 97,9%. U našem ispitivanju za graničnu vrednost od 25 mm senzitivnost je iznosila 23,8%, a specifičnost 97,3% (Tabela 3.27). Dakle smanjivanjem dužine grlića materice smanjuje se senzitivnost i povećava specifičnost cervikometrije, a sa porastom dužine grlića materice dešava se obrnuto što se najbolje vidi na Grafikonu 3.47. Velika studija Iamsa i sar. [647] kada je poredila žene koje su imale dužinu grlića iznad 75. percentile sa onima koje su imale kraći grlić u 24 n.g našla je da pacijentkinje sa grličem kraćim od 30 mm (25. percentila) imaju 4x veći relativni rizik (RR), 6X za grlić < 26 mm (10. percentila), 9X za grlić ispod < 22 mm (5. percentila) i 14X veći RR ako je dužina grlića manja od 13 mm (1. percentila).

**Tabela 3.33: Percentile za dužinu grlića u odnosu na termin porođaja**

	Terminski	Preterminski	Ukupno	
$\Sigma$	597	21	679	
Srednja vrednost	40,82	30,86	40,41	
Mediana	41,00	33,00	41,00	
Standardna devijacija	6,53	9,03	6,84	
Minimum	10,00	11,00	10,00	
Maksimum	50,00	45,00	50,00	
Percentile	5	29,00	11,30	28,00
	10	33,00	14,20	32,00
	15	35,00	17,70	34,00
	20	36,00	24,00	35,00
	25	37,00	26,00	36,00
	30	38,00	29,20	38,00
	35	39,00	30,00	38,00
	40	40,00	30,00	39,00
	45	41,00	30,90	40,00
	50	41,00	33,00	41,00
	55	42,00	33,10	42,00
	60	43,00	34,40	43,00
	65	44,00	36,00	44,00
	70	45,00	36,40	45,00
	75	46,00	37,50	45,00
	80	47,00	38,60	46,00
	85	48,00	39,00	48,00
	90	49,00	40,60	49,00
	95	50,00	44,60	50,00
100	50,00	45,00	50,00	

Ipak i u ovoj studiji PPV je bila između 6-44% a senzitivnost 47%, dakle veoma slabi u populaciji pacijentkinja sa malim rizikom za PP. I u našoj studiji su dobijeni slabi rezultati za PPV i senzitivnost, i ovo je glavni razlog zbog koga neki smatraju da uvođenje skrininga u populaciji asimptomatskih pacijentkinja, odnosno pacijentkinja sa malim rizikom za PP, nije opravdano. Percentile dobijene u našem ispitivanju za tri grupe trudnica prikazane su u Tabeli 3.33. Još jednom naglašavamo činjenicu da je naša populacija trudnica asimptomatska, a dobijeni rezultati potvrđuju vrednost cervikometrije u otkrivanju trudnica sa visokim rizikom za PP kod kojih se lečenjem značajno može produžiti trajanje trudnoće i smanjiti učestalost PP. Verujemo da ju ovakav pristup u našem ispitivanju u značajnoj meri doprineo da učestalost PP bude 3,4%, a ne očekivanih 6-9% koliko se kreće u različitim regionima Srbije. Zato se zalažemo da cervikometrija u periodu od 20-28 nedelje trudnoće bude obavezna, i verujemo da bi takav klinički protokol doprineo smanjenju broja PP u našoj zemlji.

Nijedan od mikroskopskih nalaza koji se odnose na različite poremećaje vaginalne flore nije pokazao statističku značajnost u odnosu na dužinu grlića materice, što nije nađeno ni u većini drugih istraživanja. Tako u svom radu Manusco i sar. [671] su analizirali rezultate kod 949 pacijentkinja, koristeći jednostavni linearnu regresioni model našli su da je Nugentov skor u obrnutoj korelaciji sa dužinom grlića materice (linearni regresioni koeficijent = -0.33,  $p = 0.003$ ), a pacijentkinje sa Nugentovim zbirom  $> 7$  (BV) imali su značajno kraći grlič u odnosu na one sa nižim Nugentovim zbirom (28.0 mm vs. 29.9 mm,  $p = 0.04$ ). Ipak, korišćenjem kovarijanti prilagođenog modela nisu našli statističku značajnost u odnosu na Nugentov zbir ( $p = 0.259$ ) dužina grlića materice bila je slična kod pacijentkinja sa BV i onih sa intermedijarnim i normalnim nalazom (29.8 mm vs. 30.2 mm). Drugim statističkim postupkom (ANOVA, Tamhane post hoc test) mi u našem ispitivanju nismo našli statistički značajne razlike između ove tri grupe pacijentkinja na osnovu podele po Nugentu, mada se i u našem ispitivanju pacijentkinje sa normalnim nalazom imale najveću srednju dužinu grlića 40,7 mm, one sa intermedijarnim nalazom 40.2 mm, a pacijentkinje sa BV 39.7 mm. Isti statističkim postupkom nismo našli statistički značajne razlike između dužine grlića materice i podela po Amselu, Ison Hayu, Claeysu, NP-6G, NP-2G, NP-2G, kao ni na osnovu podela koje su napravljene izdvajanjem različitih ometajućih faktora CA, KOKE, BIFIDO i LEPTO forme. Ipak nalaz koji se izdvaja i koji je u ovakvoj statističkoj analizi na granici statističke značajnosti ( $p=0,054$ ). je onaj koji se odnosi na dužinu grlića materice kod pacijentkinja sa BIFIDO grupom. Tako su pacijentkinje iz BIFIDO grupe imale srednju dužinu grlića 37,8 mm, pacijentkinje sa BV 39,9 mm, a pacijentkinje sa normalnim nalazom 40,8 mm. Primenom ANOVA i post hoc Tamhane

testa (Tabele 3.34 i 3.35) nije nađena statistička značajnost između pacijentkinja sa normalnim nalazom i BV ( $p=0,423$ ) ili pacijentkinja sa BV i BIFIDO grupe ( $p=0,293$ ), dok je između pacijentkinja sa normalnim nalazom i BIFIDO grupom bila na granici statističke značajnosti ( $p=0,054$ ). Ovo smatramo veoma interesantnim nalazima s obzirom da je samo ova grupa (BIFIDO) pacijentkinja pokazala najveći relativan rizik ( $RR=9,7$ ) za PP. Zato smatramo da je ovaj nalaz još jedna potvrda mogućeg značaja ovih bakterijskih formi u predviđanju rizika za PP, odnosno da bi u budućnosti kombinacija mikroskopskog nalaza i merenja dužine grlića mogla dati bolje rezultate u predikciji PP. Dakle za razliku od zaključka autora koji ukazuju da BV nije nezavisan prediktor za kraći grlić materice, ukazujući da nedostatak povezanosti na neki način objašnjava zašto dosadašnja ispitivanja nisu našla povezanost između asimptomatske BV i PP, odnosno neuspešnog lečenja. Mi bi smo mogli zaključiti da ne samo BV, nego i drugi poremećaji vaginalne flore prema različitim podelama i grupama pacijentkinja u našem ispitivanju nisu značajnije povezani sa dužinom grlića materice. Primenom ROC analize krive takođe nije nađena statistička značajnost (površina ispod krive 0.47) između dužine grlića materice i normalnog ili patološkog nalaza mikroskopskog nalaza preparat bojenog po Gramu na osnovu NP-6G. Kao ni autori pomenute studije nismo našli statističku značajnost između vrednosti pH i dužine grlića materice, a u našem ispitivanju ni rezultati KOH testa nisu bili povezani sa dužinom grlića materice (t-test).

**Tabela 3.34: Dužina grlića u odnosu na NP-2G/BIFIDO (ANOVA)**

		n	Srednja vrednost	Standardna devijacija	Standardna greška	95% Interval poverenja	
						Donja granica	Gornja granica
<b>Dužina grlića</b>	NOR	467	40,83	6,49	0,30	40,24	41,42
	BV	163	39,95	7,15	0,56	38,85	41,06
	BIF	48	37,77	8,46	1,22	35,31	40,23
	Total	678	40,40	6,85	0,26	39,89	40,92

**Tabela 3.35: Dužina grlića u odnosu na NP-2G/BIFIDO (Tamhane post hoc)**

			Razlika srednjih vrednosti	Standardna greška	p	95% Interval poverenja	
						Donja granica	Gornja granica
<b>Dužina grlića</b>	NOR	BV	0,88	0,64	0,423	-0,65	2,41
		BIF	3,06	1,26	0,054	-0,04	6,16
	BV	NOR	-0,88	0,63	0,423	-2,41	0,65
		BIF	2,18	1,34	0,293	-1,11	5,47

	NOR	-3,06	1,26	0,054	-6,16	0,04
BIF	BV	-2,18	1,34	0,293	-5,47	1,11

Rezultat koji smo već pominjali u diskusiji o PMN smatramo značajnim jer smo različitim statističkim metodama pokazali povezanost između dužine grlića materice i broja PMN, a najbolje rezultate dala je semikvantitativna metoda na uvećanju x200. Tako je primenom ANOVE i post hoc Tamhane testa u podeli PMN na 4 grupe pokazano da postoji statistička značajnost na mikroskopskim uvećanjima x 200 i 1000 ali ne i na uvećanju x400. Treba se još jednom se podsetiti koliko se razlikuje broj pacijentkinja sa normalnim i patološkim brojem PMN u zavisnosti od mikroskopskog uvećanja. Ukratko, na osnovu semikvantitativne procene broja PMN na uvećanju x200 188 pacijentkinja imalo nalaz PMN0, dok je na osnovu pregleda na uvećanju x1000 u ovoj grupi bilo 60 pacijentkinja više, dok je u grupi PMN3 bilo 60 pacijentkinja manje. Kao što smo detaljno objasnili tačno 100 pacijentkinja sa patološkim nalazom PMN na uvećanju x200, imalo je normalan broj PMN na uvećanju x1000. Zato je statističkom analizom (ANOVA) rezultata dobijenih na uvećanju x200 nađena statistički značajna razlika u odnosu na dužinu grlića materice između grupe PMN0 i PMN3, dakle one sa najmanjim i najvećim brojem PMN ( $p=0,006$ ), dok je istim statističkim postupkom takva razlika nađena između PMN0 i PMN1 ( $p=0,05$ ), dakle između dve grupe sa normalnim brojem PMN, a objašnjenje leži u prethodno pomenutim činjenicama i različitoj raspodeli pacijentkinja na osnovu dva različita mikroskopska uvećanja. Ovi rezultati indirektno potvrđuju veću vrednost NMMP na uvećanju x 200 u semikvantitativnoj proceni broja PMN na mikroskopskom preparatu bojenom po Gramu. To istovremeno objašnjava zašto je primenom t-testa pokazana statistička značajnost između broja PMN i dužine grlića materice ( $p<0,05$ ) ali samo na mikroskopskom uvećanju x200, dok takva značajnost nije utvrđena za druge semikvantitativne i kvantitativne metode u kojima je određivana njihov broj ili vijabilnost. Srednja dužina grlića materice kod pacijentkinja koje su se porodile posle 37 n.g bila je  $40,8 \pm 6,5$  mm, a kod pacijentkinja koje su se porodile pre 37 n.g. iznosila je  $30,8 \pm 9,0$  mm. Nije nađena korelacija između dužine grlića materice i koncentracija ni jednog od 13 ispitivanih citokina.

Dosadašnja ispitivanja su pokazala da bi primena preparata progesterona kod pacijentkinja sa kraćim grličem materice mogla da smanji ne samo učestalost PP, nego da smanji perinatalni morbiditet i mortalitet u takvoj populaciji trudnica. Ipak moramo reći da danas ne postoji konsenzus o primeni progesterona kada su u pitanju granične vrednosti dužine grlića, vrste progesteronskih preparata, njihovi oblici ili doze kao ni o trajanju terapije. Iste dileme i veća

neslaganja postoje i kada je u pitanju aplikacija serklaža kod ovih pacijentkinja. Izdvojićemo dve značajnije kliničke studije čiji rezultati ukazuju da cervikometrijom možemo izdvojiti grupu trudnica sa povećanim rizikom za PP i primenom progesteronskih preparata smanjiti njegovu učestalost, odnosno produžiti trajanje trudnoće, i tako smanjiti ukupni perinatalni morbiditet i mortalitet. Prva je studija Fonsece i sar. [651] koja je pokazala da vaginalna primena progesterona smanjuje rizik od PP za oko 44% kod pacijentkinja sa kraćim grlićem materice. U ovoj randomizovanoj dvostruko slepoj studiji pacijentkinje sa grlićem  $\leq 15$  mm između 20- 25 n. g. dobijale su 200 mg progesterona vaginalno ili placebo od 24- 34 nedelje trudnoće. Učestalost PP pre 34 n.g. bila je značajno niža kod pacijentkinja koje su dobijale progesteron u odnosu na placebo grupu (19.2% (24/125) i 34.4% (43/125);  $P = 0.007$ ). Druga studija koja je pokazala korist od vaginalne primene progesterona je studija De Franco i sar. [652] koji su ispitivali efekat primene vaginalnog progesterona za dve granične vrednosti dužine grlića materice  $\leq 30$  mm i  $< 28$  mm. Kod pacijentkinja koje su dobijale progesteron u odnosu na pacijentkinje iz placebo grupe, (granična vrednost  $\leq 30$  mm), primećen je trend kasnijeg porođaja ( $p = 0.057$ ). Ipak, nije nađena razlika u učestalosti PP  $\leq 32$  n.g. Za drugu graničnu vrednost  $< 28$  mm pacijentkinje koje su dobijale vaginalni progesteron imale su manju učestalost PP  $\leq 32$  n. g., iako ovo nije primećeno za PP pre 35. ili 37. nedelje trudnoće. Tako su ove dve studije i uticale na našu odluku da u ovom ispitivanju sve pacijentkinje sa dužinom grlića  $\leq 30$  mm dobiju terapiju sa 200 mg progesterona vaginalno jednom dnevno.

Na osnovu rezultata našeg ispitivanja, kao i na osnovu podataka iz literature mogli bi smo zaključiti da cervikometrija predstavlja relativno jednostavnu i bezbednu proceduru koju pacijentkinje dobro prihvataju i podnose i da se kao takva može koristiti u predikciji PP. Ipak, rezultati našeg ispitivanja su pokazali da od 21 pacijentkinje sa PP, 9 je imalo grlić  $\leq 30$  mm, dok je kod 12 pacijentkinja grlić bio  $> 30$  mm. Od ovih 12 pacijentkinja kod 6 je izmeren grlić  $\leq 36$  mm, dok je kod preostalih 6 izmerena dužina grlića materice bila veća od 36 mm. Ovi rezultati jasno ukazuju da se cervikometrijom ipak može izdvojiti samo određen deo populacije koji ima povećan rizik za PP, i da bi kombinovana primena nekih drugih testova, kao što je naprimer fetalni fibronektin, mogla značajno da doprinose boljim rezultatima o čemu smo već diskutovali. Ovo je naravno potpuno razumljivo ukoliko znamo da PP ima multifaktorijalnu etiologiju, tako da ni u budućnosti primena samo jednog biološkog markera neće dati bolje rezultate. Ovakav stav je u potpunosti saglasan sa rezultatima velike metaanalitičke studije u kojoj su Conde-Agudelo i sar. [585] zaključili da nijedan od do sada opisanih biomarkera ne ispunjava kriterijume za primenu u kliničkoj praksi, kao i da bi primena više markera dala bolje rezultate. Ovde ćemo samo napomenuti da se merenjem dužine grlića materice kod značajnog

broja žena mogu izbeći nepotrebne hospitalizacije ili medicinske intervencije. Značajan broj žena javlja se ginekologu zbog tegoba koje ukazuju na PP, kao što su neodređeni bolovi u donjem delu stomaka, bolovi u leđima i slično. Kod značajnog broja pacijentkinja veliki broj kliničara i bez merenja grlića materice ili samo na osnovu anamnestičkih podataka i kliničkog pregleda donosi odluku o uvođenju progesterona u terapiju. Takođe, nije mali broj žena koje zbog tegoba u prvom trimestru trudnoće (bolovi, krvarenja) ovu terapiju dobijaju tokom čitave trudnoće, jer lekar koji ukine terapiju progesteronom „preuzima odgovornost“ za eventualni PP, bez obzira što je recimo dužina grlića u tom trenutku bila 45 mm. Iz našeg kliničkog iskustva mogli bi smo reći da većina lekara smatra terapiju progesteronom potpuno bezbednom i da se on u velikom broju slučajeva nekritično uvodi u terapiju, a takođe je jasno da i njegova primena može pomoći samo određenoj subpopulaciji trudnica. Treba se priseliti da je pre 10-20 godina najveći broj trudnica sa ovakvim tegobama dobijao terapiju oralnim tokoliticima, sve dok prospektivne randomizovane studije nisu pokazale da njihova primena u trudnoći ima veću štetu nego korist i donesena odluka da se prekine sa njihovom upotrebom. Kakav će biti naš stav o primeni progesteronskih preparata u trudnoći za 10 godina ne znamo, kao što ni sada ne možemo biti sigurni da je primena progesterona u trudnoći stvarno toliko bezopasna i za majku i dete. Takođe ćemo ukazati na podatak na koji nismo naišli u literaturi i o kome se veoma malo govori, a za koji mislimo da je veoma važan kada govorimo o različitim prediktorima PP, a koji se odnosi na njegovu prihvatljivost od pacijenta. Na osnovu kliničkog iskustva i razgovora sa pacijentima, najveći broj pacijentkinja mnogo lakše prihvata pregled vaginalnom sondom nego pregled pod spekuluma, bimanuelni ginekološki pregled ili uzimanje uzorka krvi što je neophodno da bi smo dobili uzorak za 99% postojećih prediktora PP. Zbog toga mislimo da u tom pogledu cervikometrija ima veliku prednost u odnosu na sve druge biomarkere, odnosno da u tom pogledu ima najveću vrednost kao moguća skrining metoda.

Dakle ukoliko bi smo na kraju sumirali naše rezultate koji se odnose na cervikometriju zaključili bi smo da pacijentkinje sa dužinom grlića preko 36 mm imaju vrlo mali rizik za PP, one sa dužinom grlića između 30 i 36 mm su u malom riziku, dok one sa dužinom grlića 30 mm i manje imaju visok rizik za PP, koji progresivno raste sa skraćivanjem grlića materice. Opet naglašavamo da nijedna od naših trudnica sa PP (n=21) nije imala nikakve simptome i da su došle na zakazan pregled radi uzimanja uzoraka, što samo potvrđuje vrednost transvaginalne sonografije i naš stav da svaki ultrazvučni pregled posle 20 n.g. kao integralni deo mora imati i merenje grlića materice transvaginalnom sonografijom. Međutim, kao što smo rekli ovakvim postupkom otkrivamo samo deo trudnica sa visokim rizikom za PP.

Zato ćemo ovde ukratko pokušati da ukažemo na faktore koji su u našem ispitivanju pokazali da bi mogli da se koriste u predikciji PP. U populaciji asimptomatskih trudnica između 24-28 n.g. u grupi sa povećanim rizikom bile bi one kod kojih smo detektovali jedan ili više sledećih riziko faktora:

1. Detekcija BIFIDO formi mikroskopskim pregledom preparata po Gramu
2. Skraćen grlić materice ( $\leq 30$  mm) izmeren transvaginalnom sonografijom
3. Povećan broj PMN na mikroskopskom uvećanju x200
4. Smanjen procenat apoptoze
5. vrednosti pH  $>4,5$
6. BV

Pre analize rezultata prikazanih u Tabeli 3.36 ukazaćemo na neke po našem mišljenju važne činjenice za razumevanje i tumačenja ovih rezultata.

**Tabela 3.36: Faktori rizika za PP dobijeni u ovom ispitivanju kod trudnica sa PP**

	<b>BIFIDO</b>	<b>Dužina grlića</b>	<b>PMN X200</b>	<b>pH</b>	<b>KOH</b>	<b>AMSEL</b>	<b>NP-6G</b>
1	<b>BIFIDO</b>	<b>30</b>	<b>PMN3</b>	<b>5,5</b>	<b>POZ</b>	<b>BV</b>	<b>BVN</b>
2	<b>BIFIDO</b>	36	PMN1	4,4	<b>POZ</b>	NOR	NM
3	NOR	33	PMN1	4,0	NEG	NOR	NF
4	<b>BIFIDO</b>	<b>11</b>	<b>PMN3</b>	<b>4,7</b>	NEG	NOR	NF
5	<b>BIFIDO</b>	<b>24</b>	<b>PMN3</b>	<b>5,3</b>	NEG	<b>BV</b>	NN
6	NOR	37	PMN1	4,0	NEG	NOR	NF
7	<b>BIFIDO</b>	<b>30</b>	<b>PMN2</b>	4,4	NEG	NOR	NF
8	BV	31	<b>PMN3</b>	<b>5,3</b>	<b>POZ</b>	<b>BV</b>	<b>BVF</b>
9	NOR	<b>24</b>	<b>PMN2</b>	<b>5,5</b>	<b>POZ</b>	<b>BV</b>	NN
10	NOR	39	PMN1	4,0	NEG	NOR	NF
11	NOR	39	PMN0	4,0	NEG	NOR	NF
12	<b>BIFIDO</b>	<b>28</b>	<b>PMN2</b>	4,4	NEG	NOR	NF
13	NOR	38	PMN0	4,0	NEG	NOR	NM
14	NOR	<b>14</b>	<b>PMN3</b>	4,0	NEG	NOR	NF
15	BV	45	PMN0	<b>5,0</b>	<b>POZ</b>	<b>BV</b>	<b>BVF</b>
16	BV	34	PMN1	4,0	<b>POZ</b>	NOR	<b>BVN</b>
17	BV	<b>15</b>	PMN1	<b>4,7</b>	<b>POZ</b>	<b>BV</b>	<b>BVN</b>
18	NOR	41	PMN1	<b>5,0</b>	NEG	NOR	NN
19	<b>BIFIDO</b>	33	<b>PMN2</b>	<b>6,0</b>	NEG	NOR	<b>BVN</b>
20	NOR	36	PMN1	4,0	NEG	NOR	NF
21	BV	<b>30</b>	<b>PMN3</b>	<b>6,0</b>	<b>POZ</b>	<b>BV</b>	<b>BVF</b>

Prvo, treba se prisetiti da je dijagnoza stanja vaginalne flore tokom ispitivanja vršena na osnovu mikroskopskog pregleda NPVS, određivanje vaginalnog pH, probe sa 10% KOH i pregleda NPVS sa 10% KOH. Procena stanja vaginalne flore rađena je na osnovu modifikovanih kriterijuma po Amselu. Na osnovu ovih nalaza pacijentkinje su dobijale odgovarajuću terapiju: pacijentkinje sa BV i prisutnim clue cells lečene metronidazolom 2x500 mg 7 dana uz istovremenu lokalnu primenu prebiotika i/ili acidifikant, dok su pacijentkinje bez clue cells i

hipocelularnim nalazom bez obzira na pozitivna ili negativna dva testa (pH i KOH) takođe dobijale prebiotik sa acidifikantom. Pacijentkinje kod kojih su na NPVS sa 10% KOH detektovane spore ili hife gljivica tretirane su antimikotičkom terapijom. Pacijentkinje sa povećanim brojem PMN kod kojih nismo detektovali gljivice a kod kojih smo mikroskopski našli dominaciju SBF ili podjednak broj laktobacila i sitnih bakterijskih formi dobijale su terapiju Eritromicin 500 mg 4x1 7 dana jer smo smatrali da se kod ovih pacijentkinja radi o aerobnom vaginitisu (AV). Kao što smo rekli ovaj istraživački projekat nije bio primarno dizajniran da proceni efikasnost različitih terapijskih pristupa (progesteron, antibiotici, prebiotici, acidifikanti, antimikotici) zbog šega smo u pogledu lečenja poštovali važeće principe i protokole dobre kliničke prakse kao i naša klinička iskustva o čemu smo već detaljno diskutovali. Dakle, iako statističkom analizom rezultata u našem ispitivanju nije nađen povećan rizik od PP kod pacijentkinja sa BV ili drugim poremećajima vaginalne flore na osnovu NPVS, kao ni kod pacijentkinja kod kojih su na NPVS detektovane spore i hife kvasnica ili povećan broj PMN, treba imati u vidu činjenicu da je najveći broj takvih, pacijentkinja lečen jednom ili više pomenutih terapijskih opcija. Dakle, mi u ovom trenutku ne možemo precizno odgovoriti na pitanje koliko je terapija bilo progesteronom bilo antibioticima ili drugim oblicima terapije uticala na dobijene rezultate, povezanost pojedinih parametara sa rizikom za PP, kao ni na krajnu učestalost PP u ovom ispitivanju. Takođe, ne možemo odgovoriti ni na pitanje u kolikoj je meri primena progesterona kod svih pacijentkinja sa grlićem  $\leq 30$ mm ili aplikacija serklaža uticala na tok i ishod trudnoće. Ipak, činjenica da je učestalost PP u našem ispitivanju bila dvostruko do trostruko manja od očekivane, mislimo da su pomenuti terapijski protokoli odlučujuće uticali na nisku učestalost PP u našem ispitivanju.

U prilog ovome govori i činjenica da pacijentkinje iz grupe BIFIDO, koje su na osnovu statističke analize imale najveći rizik za PP, nisu ni bile prepoznate pregledom NPVS nego su BIFIDO forme tumačene kao laktobacili a ove pacijentkinje smatrane zdravim, zbog čega u najvećem broju slučajeva nisu ni dobijale nikakvu terapiju. Da li i kako treba lečiti pacijentkinje iz grupe BIFIDO ostaje da se utvrdi u budućim istraživanjima. Ukoliko pogledamo Tabelu 3.36 primetićemo da i kada ukrstimo sve ove faktore koji su u našem ispitivanju pokazale da bi u većoj ili manjoj meri uticali na povećan rizik za PP, ipak nam ostaju tri pacijentkinje (14,3%) koje su se porodile pre termina, a nisu imali nijedan od faktora rizika prepoznatih u ovom ispitivanju. Ovi nalazi potvrđuje da PP može biti pokrenut različitim etiološkim faktorima i ukazuju na potrebu za korišćenjem različitih testova da bi pravovremeno prepoznali trudnice sa povećanim rizikom za PP i adekvatnim lečenjem smanjili njegovu učestalost koja se u zadnjih nekoliko decenija nije značajnije menjala.



## 4 ZAKLJUČCI

1. Usporedna statistička analiza rezultata dobijenih na osnovu NP-6G pokazala je dobru asocijaciju ( $\chi^2$ ) i slaganje ( $\kappa$  indeks) u odnosu na postojeće dijagnostičke kriterijume (Nugent, Amsel, Ison/Hay i Claeys). i tako potvrdila svoju vrednost i upotrebljivost u kliničkoj praksi. Ipak, ovako dobri rezultati su posledica visoke podudarnosti kod hipercelularnih i srednje celularnih nalaza (NF, NM, BVF, BVM) 80-95%, dok je ova podudarnost značajno manja (30%) u grupama sa hipocelularnim nalazom (NN+BVN).
2. Novi metod mikroskopskog pregleda (NMMP) preparata bojenog po Gramu na uvećanju x200 u odnosu na postojeće metode na mikroskopskim uvećanjima x400 (Amsel) i x1000 (Nugent, Ison/Hay i Claeys) omogućava da se u kraćem vremenu pregleda značajno veća površina preparata i time preciznije utvrdi kvantitativni i kvalitativni biodiverzitet vaginalne mikroflore i tako i bolje proceni rizik od PP.
3. Semikvantitativna metoda procene broja vaginalnih PMN na uvećanju x200 u poređenju sa standardnim metodama na uvećanjima x400 i x1000 pokazala je mnogo bolje rezultate u odnosu na druge ispitivane parametre: a) broj PMN određivan kvantitativnim metodama, b) vijabilnost i apoptozu vaginalnih PMN i c) dužinu grlića materice. Time je potvrđena i naša druga hipoteza da pregled veće površine preparata daje bolju procenu broja PMN, zbog čega mislimo da bi ova metodologija u budućnosti mogla da postane »zlatni standard« u proceni broja vaginalnih PMN.
4. Trudnice sa većim brojem PMN imale su manji procenat apoptoze što je u skladu sa poznatim činjenicama da u uslovima infekcije/zapaljenja dolazi ne samo do povećanja broja PMN nego i produženja njihovog životnog veka. Najbolji rezultati dobijeni su u odnosu na procenu broja PMN na uvećanju x200.
5. Pacijentkinje sa BV imale su veći procenat apoptoze vaginalnih PMN dok je kod pacijentkinje sa BIFIDO formama taj procenat bio značajno niži. Tako bi procenat apoptoze vaginalnih PMN, ali kod pacijentkinja bez BV, mogao da bude bolji prediktor stepena inflamacije (ne i infekcije) što bi moglo da bude od značaja u predviđanju PP za koji smo rekli da je prvenstveno zapaljenjski događaj
6. Pacijentkinje sa BV imale su povećane koncentracije IL-1 $\beta$  i IL-6, a niže koncentracije IL-12p70. Podjednake koncentracije citokina nađene su kod pacijentkinja sa bitno različitom celularnošću (npr. BVF i BVN) što ukazuje da broj bakterija nije faktor koji značajnije utiče na koncentracije citokina u grliću materice

7. Nije nađena povezanost između broja, vijabilnosti i procenta apoptoze PMN u odnosu na koncentracije ispitivanih citokina. Ovo zajedno sa prethodnim zaključkom ukazuje da su koncentracije nekog citokina krajnji rezultat velikog broja međusobno zavisnih signala koji potiču od velikog broja jedinica iz najmanje tri biološke mreže mikrobne, citokinske i apoptotske.
8. Nije nađena povezanost između vijabilnosti i apoptoze vaginalnih PMN sa incidencijom ili povećanim rizikom za PP. Ipak, pacijentkinje sa najvećim rizikom za PP (BIFIDO grupa) u našem ispitivanju imale su značajno niži procenat apoptoze, dok takva povezanost nije nađena u drugim grupama pacijentkinja na osnovu postojećih dijagnostičkih kriterijuma.
9. Samo je broj PMN određivan semikvantitativno na uvećanju x200 statistički značajno povezan sa dužinom grlića materice – trudnice sa većim brojem PMN imale su kraći grlić materice. Povećan broj PMN određen na ovaj način mogao bi da bude indikacija za cervikometriju.
10. Nije nađena povezanost između koncentracija ispitivanih citokina i dužine grlića materice.
11. Vrednosti vaginalnog pH>4,5 sa gotovo apsolutnom verovatnoćom (isključujući infekciju kvasnicama) ukazuju na poremećaj vaginalne flore i u nekim slučajevima ima veću vrednost od mikroskopskog pregleda kao što je to slučaj kod pacijentkinja sa hipocelularnim nalazom ili kod nalaza koji liče na normalan (BIFIDO grupa).
12. Kultura vaginalnog i/ili cervikalnog brisa predstavlja skup i neupotrebljiv nalaz u svakodnevnoj kliničkoj praksi, i da dva jednostavna, brza i jeftina testa (pH i KOH) daju mnogo bolje rezultate
13. Pacijentkinje sa kraćim grličem materice izmerenim transvaginalnim ultrazvukom imaju povećan rizik za PP.
14. Dijagnoza poremećaja vaginalne flore i grupe pacijentkinja formirane na osnovu kliničkog zlatnog standarda (kriterijumi po Amselu) ili istraživačkog zlatnog standarda (kriterijumi po Nugentu) nisu pokazala povećan rizik za PP, a takav rizik nije nađen ni na osnovu podele na osnovu kriterijuma po Ison/Hayu i Claeysu
15. Samo je NMMP detektovala grupu pacijentkinja sa BIFIDO formama koja je imala 9,7 puta veći relativni rizik od PP u odnosu na pacijentkinje sa normalnim nalazom i BV. U ovoj grupi pacijentkinja nađena je povećan broj vaginalnih PMN. pH>4,5, značajno manja apoptoza i značajno niže koncentracija IL-10, dok je dužina grlića bila na granici statističke značajnosti (p=0,054). Zajedno, ovi rezultati ukazuju na izrazito pojačan

zapaljenski odgovor kod ovih trudnica i objašnjavaju najveći rizik od PP, koji je prvenstveno inflamatorni događaj.

16. NMMP kao jednostavna, jeftina i brza procedura omogućava precizniju procenu broja vaginalnih PMN i kvantitativnog i kvalitativnog biodiverziteta vaginalnog mikrobioma, a tako i bolje prepoznavanje pacijentkinja sa rizikom za PP. Zajedno sa još dva skrining testa (pH i KOH) i merenjem dužine grlića materice transvaginalnom sonografijom možemo iz populacije asimptomatskih trudnica izdvojiti najveći broj onih sa povećanim rizikom za PP. Pravovremeno prepoznavanje i lečenje ovih pacijentkinja moglo bi da dovede do značajnog smanjenja broja PP kao što je to pokazano u ovom ispitivanju. .

## LITERATURA

1. Norwitz ER, Robinson JN, Challis JRG. 1999 The control of labor. *N Engl J Med.* 341:660-666. .
2. Berkowitz GS, Papiernik E. Epidemiology of preterm birth. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 414-43.
3. Yang H, Kramer MS, Platt RW et al. How does ultrasound scan estimation of gestational age lead to higher rates of preterm birth? *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186:433-7. .
4. Shah NR and Bracken MB. A systematic review and meta-analysis of prospective studies on the association between maternal cigarette smoking and preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2000;182:465-72.
5. Mercer BM, Goldenberg RL, Moawad AH, et al. The Preterm Prediction Study: Effect of gestational age and cause of preterm birth on subsequent obstetric outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:1216-21.
6. Mercer BM, Goldenberg RL, Meis PJ, et al. The preterm prediction study: Prediction of preterm premature rupture of membranes through clinical findings and ancillary testing. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:738-45.
7. Andolsek KM and Kelton GM. Risk assessment. *Prim Car Clin Offi Pract* 2000; 27(1):71-103.
8. Weismuller DG: Preterm labor. *Am Fam Physician* 1999 ; 59:593-602.
9. Meis PJ, Goldenberg RL: The preterm prediction study: Risk factors for indicated preterm births. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178:562-567.
10. Iams JD, Goldenberg RL, Mercer BM et al. The Preterm Prediction Study: Can low-risk women destined for spontaneous preterm birth be identified? *Am J Obstet Gynecol* 2001;184:652-5.
11. Mercer BM, Goldenberg RL, Das A, Moawad AH, Iams JD, Meis PJ, et al. The preterm prediction study: a clinical risk assessment system. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174:1885-95. FUL
12. Goldenberg RL, Rouse DJ. The prevention of premature birth. *N Engl J Med* 1998;339:313-20
13. Challis JRG, Matthews SG, Gibb W and Lye SJ. Endocrine and paracrine regulation of birth at term and preterm. *Endoc Rew* 2000; 21(5): 514-50.
14. Bryce J , Boschi-Pinto C , Shibuya K , Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005 ; 365: 1147 –52.
15. Richardson DK , Gray JE , Gortmaker SL , et al . Declining severity adjusted mortality: evidence of improving neonatal intensive care. *Pediatrics* 1998 ; 102:893 –9.
16. Fanaroff AA , Hack M , Walsh MC. The NICHD neonatal research network: changes in practice and outcomes during the first 15 years. *Semin Perinatol* 2003 ; 27: 281 –7.
17. Wilson- Costello D , Friedman H , Minich N , Fanaroff AA , Hack M. Improved survival rates with increased neurodevelopmental disability for extremely low birth weight infants in the 1990s. *Pediatrics* 2005 ; 115:997 –1003.
18. Botting N , Poulos A , Cooke RW , Marlow N. Cognitive and educational outcome of very-low-birthweight children in early adolescence. *Dev Med Child Neurol* 1998 ; 40: 652 –60.
19. Breslau N , Chilcoat HD . Psychiatric sequelae of low birth weight at 11 years of age. *Biol Psychiatry* 2000 ; 47:1005 –11.
20. Nosarti C , Giouroukou E , Healy E , et al . Grey and white matter distribution in very preterm adolescents mediates neurodevelopmental outcome. *Brain* 2008 ; 131: 205 –17.
21. Beck, S., Wojdyla, D., Say, L., Betran, A.P., Merialdi, M., et al. (2010). The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization*, 88(1), 31-38

22. Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M., Chou, D., Moller, A.B., et al. (2012). National, regional and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends for selected countries since 1990: a systematic analysis. *The Lancet*, in press.
23. Byrne B., Morrison JJ. Preterm birth. *Clin Evid* 2004;1903-22. 15. Martin JA, Hamilton BE, Sutton PD, Ventura SJ, Menacker F, Munson ML. Births:final data for 2003. *Natl Vital Stat Rep* 2005;54:1-116.
24. McPheeters ML, Miller WC, Hartmann KE, Savitz DA, Kaufman JS, Garrett JM et al. The epidemiology of threatened preterm labor: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 2005;192:1325-9
25. Mercer BM, Goldenberg RL, Das A, Moawad AH, Iams JD, Meis PJ, et al. The preterm prediction study: a clinical risk assessment system. *Am J Obstet Gynecol* 1996;174: 1885-95.
26. Iams JD, Goldenberg RL, Mercer BM et al. The Preterm Prediction Study: Can low-risk women destined for spontaneous preterm birth be identified? *Am J Obstet Gynecol* 2001;184: 652-5.
27. Goldenberg RL, Rouse DJ. The prevention of premature birth. *N Engl J Med* 1998; 339: 313-20
28. Colton T, Kayne HL, Zhang Y, Heeren T. A metaanalysis of home uterine activity monitoring. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1499-1505
29. The Collaborative Home Uterine Monitoring Study (CHUMS) Group. A multicenter randomized controlled trial of home uterine monitoring: active versus sham device. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1120-1127 11.
30. Lu GC, Goldenberg RL. Current concepts on the pathogenesis and markers of preterm births. *Clin Perinatol* 2000; 27: 263-283
31. Kazemier B, Buijs P, Mignini L, Limpens J, de Groot C, Mol B; EBM CONNECT. Impact of obstetric history on the risk of spontaneous preterm birth in singleton and multiple pregnancies: a systematic review. *BJOG*. 2014 Jun 5. doi:10.1111/1471-0528.12896
32. Chan RL. Biochemical markers of spontaneous preterm birth in asymptomatic women. *Biomed Res Int*. 2014;2014:164081.
33. Honest H, Forbes CA, Durée KH, Norman G, Duffy SB, Tsourapas A, Roberts TE, Barton PM, Jowett SM, Hyde CJ, Khan KS. Screening to prevent spontaneous preterm birth: systematic reviews of accuracy and effectiveness literature with economic modelling. *Health Technol Assess*. 2009 Sep;13(43):1-627. doi: 10.3310/hta13430.
34. Gotsch F, Gotsch F, Romero R, Erez O, Vaisbuch E, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Kim SK, Hassan S, Yeo L. The preterm parturition syndrome and its implications for understanding the biology, risk assessment, diagnosis, treatment and prevention of preterm birth. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009;22 Suppl 2:5-23.
35. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, Chaiworapongsa T, Mazor M. The preterm parturition syndrome. *BJOG*. 2006 Dec;113 Suppl 3:17-42. Review. Erratum in: *BJOG*. 2008 Apr;115(5):674-5.
36. Romero R, Espinoza J, Gonçalves LF, Kusanovic JP, Friel L, Hassan S. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Semin Reprod Med*. 2007 Jan;25(1):21-39. Review. PubMed PMID: 17205421 e
37. Romero R, Chaiworapongsa T, Espinoza J. Micronutrients and intrauterine infection, preterm birth and the fetal inflammatory response syndrome. *J Nutr*. 2003 May;133(5 Suppl 2):1668S-1673S.
38. Revie. Menon R, Conneely KN, Smith AK. DNA methylation: an epigenetic risk factor in preterm birth. *Reprod Sci*. 2012 Jan;19(1):6-13.
39. Dhobale M, Joshi S. Altered maternal micronutrients (folic acid, vitaminB(12)) and omega 3 fatty acids through oxidative stress may reduce neurotrophic factors in preterm pregnancy. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012 Apr;25(4):317-23.

40. Burris HH, Collins JW Jr. Race and preterm birth--the case for epigenetic inquiry. *Ethn Dis.* 2010 Summer;20(3):296-9.
41. Burdet J, Rubio AP, Salazar AI, Ribeiro ML, Ibarra C, Franchi AM. Inflammation, Infection and Preterm Birth. *Curr Pharm Des.* 2014;20(29):4741-8
42. Petit E, Abergel A, Dedet B, Subtil D. [The role of infection in preterm birth]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2012 Feb;41(1):14-25.
43. Keelan JA. Pharmacological inhibition of inflammatory pathways for the prevention of preterm birth. *J Reprod Immunol.* 2011 Mar;88(2):176-84.
44. Vrachnis N, Vitoratos N, Iliodromiti Z, Sifakis S, Deligeoroglou E, Creatsas G. Intrauterine inflammation and preterm delivery. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Sep;1205:118-22. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05684.x. Review.
45. MacIntyre DA, Sykes L, Teoh TG, Bennett PR. Prevention of preterm labour via the modulation of inflammatory pathways. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012 Apr;25 Suppl 1:17-20. doi: 10.3109/14767058.2012.666114. Epub 2012 Mar 13. Review
46. Simpson KL, Keelan JA, Mitchell MD. Labour-associated changes in the regulation production of immunomodulators in human amnion by glucocorticoids, bacterial lipopolysaccharide and pro-inflammatory cytokines. *J Reprod Fertil* 1999; 116:321-7.
47. Kelly RW. Inflammatory mediators and parturition. *J Reprod Fertil* 1996; 106:89-96
48. Junqueira LC, Zugaib M, Montes GS. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical ripening. *Am J Obstet Gynecol* 1980;138:273-81.
49. Liggins GC. Cervical ripening as an inflammatory process. In: Ellwood DA, Anderson AB, editors. *The cervix in pregnancy and labor: clinical and biochemical investigations.* Edinburgh: Churchill Livingstone; 1981. p. 1-9
50. Mackler Mackler A, Iezza G, Akin MR et al. macrophage trafficking in the uterus and cervix precedes parturition in the mouse. *Biol reprod* 1999; 61:879-83.
51. Rajabi MR, Dean DD, Beydoun S, Woessner JF Jr. Elevated tissue levels of collagenase during dilatation of uterine cervixes in human parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1988;159:971-6
52. Osmer R, Rath W, Adelman-Grill BC, Fittkow C, Kuloczik M, Szeverenyi M, et al. Origin of cervical collagenase during parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:1455-60.
53. Thomson AJ, Telfer JF, Young J et al. leukocytes infiltrate the myometrium during human parturition: further evidence that labour is an inflammatory process. *Hum Reprod* 1999; 14:229-36.
54. Winkler M, Fisscher DC, Ruck P et al. Parturition at term: parallel increases in interleukin-8 and proteinase concentrations and neutrophil count in the lower uterine segment. *Hum reprod* 1999; 14:1096-100.
55. Romero R, Gomez R, Mazor M, et al: The preterm labor syndrome. In Elder MG, Romero R, Lamont RF (eds). *Preterm Labor.* New York: Churchill Livingstone, 1997, pp 29-49
56. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R (2008) Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 371: 75-84.
57. Romero R, Mazor M (1988) Infection and preterm labor. *Clin Obstet Gynecol* 31: 553-584M
58. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med* 2000;342:1500-1507. [PubMed: 10816189]
59. Yoon BH, Romero R, Kim M, et al. Clinical implications of detection of *Ureaplasma urealyticum* in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1130-1137
60. Berger A, Witt A, Haiden N, et al. Microbial invasion of the amniotic cavity at birth is associated with adverse short-term outcome of preterm infants. *J Perinat Med* 2003;31:115-121

61. Rinaldi SF, Catalano RD, Wade J, Rossi AG, Norman JE. Decidual neutrophil infiltration is not required for preterm birth in a mouse model of infection-induced preterm labor. *J Immunol.* 2014 Mar 1;192(5):2315-25.
62. Adams Waldorf KM, Rubens CE, Gravett MG. Use of nonhuman primate models to investigate mechanisms of infection-associated preterm birth. *BJOG.* 2011Jan;118(2):136-44.
63. Kullander S: Fever and parturition: An experimental study in rabbits. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl* 66:77-85, 1977
64. Hirsch E, Blanchard R, Mehta S. Differential fetal and maternal contributions to the cytokine milieu in a murine model of infection-induced preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 429-34
65. Hirsch E, Ichiko I and Hirsh D. A model of intrauterine infection and preterm delivery in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:1598-603
66. Davies JK, Shikes RH, Sze CI et al. Histologic inflammation in the maternal and fetal compartments in a rabbit model of acute intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:1088-93.
67. Ernst LM, Gonzalez J, Ofori E, Elovitz M. Inflammation-induced preterm birth in a murine model is associated with increases in fetal macrophages and circulating erythroid precursors. *Pediatr Dev Pathol.* 2010 Jul-Aug;13(4):273-81
68. Munn MB, Groome LJ, Atterbury JL, et al: Pneumonia as a complication of pregnancy. *J Matern Fetal Med* 8:151-154, 1999.
69. Jeffcoat MK, Geurs NC, Reddy MS, et al: Current evidence regarding periodontal disease as a risk factor in preterm birth. *Ann Periodontol* 6:183-188, 2001.
70. Offenbacher S, Boggess KA, Murtha AP, et al: Progressive periodontal disease and risk of very preterm delivery. *Obstet Gynecol* 107:29-36,2006.
71. Xiong X, Buekens P, Fraser WD, et al: Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: A systematic review. *BJOG* 113:135-143, 2006.ee
72. Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1515-28.
73. Horvath B, Lakatos F, Tóth C, Bödecs T, Bódis J. Silent chorioamnionitis and associated pregnancy outcomes: a review of clinical data gathered over a 16-year period. *J Perinat Med.* 2014 Jul 1;42(4):441-7.
74. Ustün C, Koçak I, Barış S, Uzel A, Saltik F. Subclinical chorioamnionitis as an etiologic factor in preterm deliveries. *Int J Gynaecol Obstet.* 2001 Feb;72(2):109-15.
75. Elovitz MA, Brown AG, Breen K, Anton L, Maubert M, Burd I. Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury. *Int J Dev Neurosci.* 2011 Oct;29(6):663-71
76. Duff P, Kopelman NJ. Subclinical intra-amniotic infection in asymptomatic patients with refractory preterm labor. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 756-9.
77. Romero R, Sirtori M, Oyarzun E et al. Infection and labor. V. Prevalence, microbiology, and clinical significance of intra-amniotic infection in women with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 817-824
78. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts DH, Kiviat NB, Eschenbach DA. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 81: 941-8.
79. Cassell GH, Davis RO, Waites KB, et al: Isolation of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from amniotic fluid at 16-20 weeks of gestation: Potential effect on outcome of pregnancy. *Sex Transm Dis* 10:294-302, 1983.
80. Gray DJ, Robinson HB, Malone J, et al: Adverse outcome in pregnancy following amniotic fluid isolation of *Ureaplasma urealyticum*. *Prenat Diagn* 12:111-117, 1992.
81. Horowitz S, Mazor M, Romero R, et al: Infection of the amniotic cavity with *Ureaplasma urealyticum* in the midtrimester of pregnancy. *J Reprod Med* 40:375-379, 1995.

82. Silver HM, Sperling RS, St Gibbs RS. Evidence relating bacterial vaginosis to intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 808-12.
83. Romero R, Salafia CM, Athanassiadis AP, Hanoaka S, Mazor M, Sepulved W, et al. The relationship between acute inflammatory lesions of the preterm placenta and amniotic fluid microbiology. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1382-8
84. Martius J, Escheenbach DA. The role of bacterial vaginosis as a cause of amniotic fluid infection, chorioamnionitis and prematurity: a review. *Arch Gynecol Obstet* 1990; 247: 1-13.
85. Newton RE, Piper, Peairs W. Bacterial vaginosis and intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 672-7. : 77: 63-68.
86. Gravett MG, Hummel D, Eschenbach DA, Holmes KK. Preterm labor associated with subclinical amniotic fluid infection and with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 1986; 67: 229-37.
87. Brocklehurst P, Gordon A, Heatley E, Milan SJ. Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Jan 31;
88. Flenady V, Hawley G, Stock OM, Kenyon S, Badawi N. Prophylactic antibiotics for inhibiting preterm labour with intact membranes. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013 Dec 5;12:
89. Romero R, Munoz H, Gomez R, et al: Antibiotic therapy reduces the rate of infection-induced preterm delivery and perinatal mortality. *Am J Obstet Gynecol* 170:390, 1994.
90. Fidel P, Ghezzi F, Romero R, et al: The effect of antibiotic therapy on intrauterine infection-induced preterm parturition in rabbits. *J Matern Fetal Neonatal Med* 14:57-64, 2003
91. Challis JRG, Lye SJ and Gibb W. Understanding preterm labor. *Ann N Y acad Sci* 2001; 943:225-34.
92. Peltier MR, Drobek CO, Bhat G, Saade G, Fortunato SJ, Menon R. Amniotic fluid and maternal race influence responsiveness of fetal membranes to bacteria. *J Reprod Immunol*. 2012
93. Mirmonsef P, Gilbert D, Zariffard MR, Hamaker BR, Kaur A, Landay AL, Spear GT. The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol*. 2011 Mar;65(3):190-5.
94. Abrahams VM, Potter JA, Bhat G, Peltier MR, Saade G, Menon R. Bacterial modulation of human fetal membrane Toll-like receptor expression. *Am J Reprod Immunol*. 2013 Jan;69(1):33-40.
95. Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2007 Jun;21(3):347-54.
96. Fukata M, Vamadevan AS, Abreu MT. Toll-like receptors (TLRs) and Nod-like receptors (NLRs) in inflammatory disorders. *Semin Immunol*. 2009 Aug;21(4):242-53
97. Noguchi T, Sado T, Naruse K, Shigetomi H, Onogi A, Haruta S, Kawaguchi R, Nagai A, Tanase Y, Yoshida S, Kitanaka T, Oi H, Kobayashi H. Evidence for activation of Toll-like receptor and receptor for advanced glycation end products in preterm birth. *Mediators Inflamm*. 2010;2010:490406.
98. Buhimschi CS, Baumbusch MA, Dulay AT, Oliver EA, Lee S, Zhao G, Bhandari V, Ehrenkranz RA, Weiner CP, Madri JA, Buhimschi IA. Characterization of RAGE, HMGB1, and S100beta in inflammation-induced preterm birth and fetal tissue injury. *Am J Pathol*. 2009 Sep;175(3):958-75.
99. Thaxton JE, Nevers TA, Sharma S. TLR-mediated preterm birth in response to pathogenic agents. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2010;2010. pii: 378472
100. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*. 2002 Feb;14(1):103-10



101. Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res.* 2007;40(2):97-112.
102. Romero R, Chaiworapongsa T, Alpay Savasan Z, Xu Y, Hussein Y, Dong Z, Kusanovic JP, Kim CJ, Hassan SS. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) in preterm labor with intact membranes and preterm PROM: a study of the alarmin HMGB1. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011 Dec;24(12):1444-55.
103. Rubartelli A, Lotze MT, Latz E, Manfredi A. Mechanisms of sterile inflammation. *Front Immunol.* 2013 Nov 22;4:398. doi: 10.3389/fimmu.2013.00398.eCollection 2013
104. McDonald B, Pittman K, Menezes GB, Hirota SA, Slaba I, Waterhouse CC, Beck PL, Muruve DA, Kubes P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. *Science.* 2010 Oct 15;330(6002):362-6
105. Burdet J, Rubio AP, Salazar AI, Ribeiro ML, Ibarra C, Franchi AM. Inflammation, Infection and Preterm Birth. *Curr Pharm Des.* 2014 Jan 30. [Epubahead of print] PubMed PMID: 24588830.
106. Jaiswal MK, Agrawal V, Mallers T, Gilman-Sachs A, Hirsch E, Beaman KD. Regulation of apoptosis and innate immune stimuli in inflammation-induced preterm labor. *J Immunol.* 2013 Dec 1;191(11):5702-13. doi: 10.4049/jimmunol.1301604. Epub 2013 Oct 25.:
107. Agrawal V, Hirsch E. Intrauterine infection and preterm labor. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012 Feb;17(1):12-9. doi: 10.1016/j.siny.2011.09.001. Epub 2011 Sep 25.
108. Romero R, Kusanovic JP, Chaiworapongsa T, Hassan SS. Placental bed disorders in preterm labor, preterm PROM, spontaneous abortion and abruptio placentae. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011 Jun;25(3):313-27.
109. Lappas M. NOD1 and NOD2 regulate proinflammatory and prolabor mediators in human fetal membranes and myometrium via nuclear factor-kappa B. *Biol Reprod.* 2013 Jul 18;89(1):14. doi: 10.1095/biolreprod.113.110056
110. Lindström TM, Bennett PR. The role of nuclear factor kappa B in human labour. *Reproduction.* 2005 Nov;130(5):569-81. Review
111. Cookson VJ, Chapman NR. NF-kappaB function in the human myometrium during pregnancy and parturition. *Histol Histopathol.* 2010 Jul;25(7):945-56. Review.
112. Markovic D, Bari MF, Lu B, Vatish M, Grammatopoulos DK. Corticotropin-releasing hormone interacts with interleukin-1 $\beta$  to regulate prostaglandin H synthase-2 expression in human myometrium during pregnancy and labor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Jul;98(7):2864-75. doi: 10.1210/jc.2013-1094. Epub 2013 May 10
113. Slater DM, Dennes WJ, Campa JS, Poston L, Bennett PR. Expression of cyclooxygenase types-1 and -2 in human myometrium throughout pregnancy. *Mol Hum Reprod* 1999;5:880-884
114. Ackerman WE, Summerfield TL, Vandre DD, Robinson JM, Kniss DA: Nuclear factor-kappa B regulates inducible prostaglandin E synthase expression in human amnion mesenchymal cells. *Biol Reprod* 2008, 78:68-76.
115. Kniss DA, Rovin B, Fertel RH, Zimmerman PD: Blockade NF-kappaB activation prohibits TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 gene expression in ED27 trophoblast-like cells. *Placenta* 2001, 22:80-89.
116. Callejas NA, Casado M, Bosca L, Martin-Sanz P: Requirement of nuclear factor kappaB for the constitutive expression of nitric oxide synthase-2 and cyclooxygenase-2 in rat trophoblasts. *J Cell Sci* 1999, 112:3147-3155
117. Helmer H, Tretzmüller U, Brunbauer M, Kaider A, Husslein P, Knöfler M. Production of oxytocin receptor and cytokines in primary uterine smooth muscle cells cultivated under inflammatory conditions. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9:15-21. 21.

118. Khanjani S, Kandola MK, Lindstrom TM, Sooranna SR, Melchionda M, Lee YS, Terzidou V, et al. NF- $\kappa$ B regulates a cassette of immune/inflammatory genes in human pregnant myometrium at term. *J Cell Mol Med* 2011;15:809–824
119. Choi SJ, Oh Sy, Kim JH, Roh CR. Changes of nuclear factor kappa B (NF-kappaB), cyclooxygenase-2 (COX-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human myometrium before and during term labor. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007 Jun;132(2):182-8.
120. Fan MS, Jiang ZY, Zou YF, Qu L, Zhou X, Sun LZ. [Effect of transforming growth factor  $\beta$ 1 on the expression of matrix metalloproteinase 9, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and nuclear factor kappa B signalling pathway in the human amniotic cells WISH].
121. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. 2013 Jan;48(1):29-33 Allport VC, Pieber D, Slater DM, Newton R, White JO, Bennett PR. Human labour is associated with nuclear factor- $\kappa$ B activity which mediates cyclo-oxygenase-2 expression and is involved with the ‘functional progesterone withdrawal’. *Mol Hum Reprod* 2001;7:581–586.
122. Lim S, MacIntyre DA, Lee YS, Khanjani S, Terzidou V, Teoh TG, Bennett PR. Nuclear factor kappa B activation occurs in the amnion prior to labour onset and modulates the expression of numerous labour associated genes. *PLoS One.* 2012;7(4):e34707..
123. Vora S, Abbas A, Kim CJ, Summerfield TL, Kusanovic JP, Iams JD, Romero R, Kniss DA, Ackerman WE 4th. Nuclear factor-kappa B localization and function within intrauterine tissues from term and preterm labor and cultured fetal membranes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010 Jan 25;8:8.
124. Tan H, Yi L, Rote NS, Hurd WW, Mesiano S. Progesterone receptor-A and -B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012 May;97(5):E719-30. doi: 10.1210/jc.2011-3251. Epub 2012 Mar 14.
125. Vrachnis N, Malamas FM, Sifakis S, Tsikouras P, Iliodromiti Z. Immune aspects and myometrial actions of progesterone and CRH in labor. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:937618. doi: 10.1155/2012/937618. Epub 2011 Oct 19. Review.
126. Brown AG, Leite RS, Strauss JF 3rd. Mechanisms underlying “functional” progesterone withdrawal at parturition. *Ann. NY Acad. Sci.* 1034, 36–49 (2004)
127. Pieber D, Allport VC, Hills F, Johnson M, Bennett PR. Interactions between progesterone receptor isoforms in myometrial cells in human labour. *Mol Hum Reprod.* 2001 Sep;7(9):875-9. PubMed PMID: 11517295.
128. Goldman S, Weiss A, Almalah I, Shalev E. Progesterone receptor expression in human decidua and fetal membranes before and after contractions: possible mechanism for functional progesterone withdrawal. *Mol Hum Reprod.* 2005 Apr;11(4):269-77. Epub 2005 Mar 11. PubMed PMID: 15764807.
129. Condon JC, Hardy DB, Kovaric K, Mendelson CR. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol Endocrinol.* 2006 Apr;20(4):764-75
130. Hardy DB, Janowski BA, Corey DR, Mendelson , Progesterone receptor plays a major antiinflammatory role in human myometrial cells by antagonism of nuclear factor-kappaB activation of cyclooxygenase 2 expression. *CR Mol Endocrinol.* 2006 Nov; 20(11):2724-33
131. Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol. Today* 1997; 18: 478-82
132. Hansen WR, Kellan JA, Skinner SJM and Mitchell MD. Key enzymes of prostaglandin biosynthesis and metabolism. Coordinate regulation of expression by cytokines in gestational tissue: A review. *Prostag Lipid Mediat* 1999; 57:243-57.
133. Saito S. Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta . *Jour Reprod Immun* 2001; 52:15-33.Saito S. Cytokine network at the feto-maternal interface. *Jour Reprod Immun* 2000; 47:87–103

134. Raghupathy, R., Makhseed, M., Azizieh, Fet al. Maternal Th1- and Th2-type reactivity to placental antigens in normal human pregnancy and unexplained recurrent spontaneous abortions. *Cell. Immunol.*1999; 196:122–130.
135. Piccinni MP and Romagnani R. Regulation of fetal allograft survival by hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines. *Immunol. Res* 1996; 1: 141–150
136. Brombacher F, Kastelein RA and Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol* 2003; 24 (4):207-212
137. Trinchieri, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.*1995; 13: 251-27
138. Dyer JFM, You Wu C and Seder RA. The regulation of IL-12: Its role in infectious, autoimmune, and allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:11-5.
139. Bach EA, Aguet M and Schreiber RD. The IFN $\gamma$  receptor: A paradigm for cytokine receptor signaling. *Ann Rev Immunol* 1997; 15:563-91.
140. Munder M, Mallo M, Eichmann K and Modolell M. Murine Macrophages Secrete Interferon upon Combined Stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: A Novel Pathway of Autocrine Macrophage Activation. *J. Exp. Med.*1998; 187:2103-2108.
141. Hasbold, J., J. S. Hong, M. R. Kehry, and P. D. Hodgkin. 1999. Integrating signals from IFN- $\gamma$  and IL-4 by B cells: positive and negative effects on CD40 ligand-induced proliferation, survival, and division-linked isotype switching to IgG1, IgE, and IgG2a. *J. Immunol.* 163:4175-4181
142. Yoshimoto, T., H. Okamura, Y. Tagawa, Y. Iwakura, and K. Nakanishi. 1997. Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon- $\gamma$  production from activated B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 3948-3953.
143. Munder M, Mallo M, Eichmann K and Modolell M. Murine Macrophages Secrete Interferon upon Combined Stimulation with Interleukin (IL)-12 and IL-18: A Novel Pathway of Autocrine Macrophage Activation. *J. Exp. Med.*1998; 187:2103-2108.
144. Ohteki T, Fukao T, Suzue K et al. Interleukin 12-dependent Interferon Production by CD8+ Lymphoid Dendritic Cells. *J. Exp. Med* 1999; 189:1981-1986
145. Kniss DA, Iams JD. Regulation of parturition update: Endocrine and paracrine effectors of term and preterm labor. *Clin Perinat* 1998; 25(4): 819-836.
146. Knofler M, Kiss H, Mosl B, et al. Interleukin-1 stimulates TNF- $\alpha$  release from cytotrophoblastic BeWo cells independetly of induction of the TNF- $\alpha$  m RNA. *FEBS* 1997; 405: 213-8.
147. Friebe-Hoffmann U, Chiao JP, Rauk PN. Effect of IL-1 $\beta$  and IL-6 on oxytocin secretion in human uterine smooth muscle cells. *Am J Reprod Immunol* 2001 Sep; 46(3): 226-31
148. Romero R, Mazor M, Brandt F, et al. Interleukin-1 $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  in preterm and term human parturition. *Am J Reprod Immunol* 1992; 27: 117-23.
149. Fortunato SJ, Menon RP, Swan KF, Menon R. Inflammatory cytokine (interleukins 1, 6, and 8 and tumor necrosis factor- $\alpha$ ) release from cultured human fetal membranes in response to endotoxic lipopolysaccharide mirrors amniotic fluid concentrations. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174: 1855-62.
150. Romero R, Manogue KR, Mitchell MD, Wu YK, Oyarzun E, Hobbins JC, et al. Infection and labor IV. Cachectin-tumor necrosis factor in the amniotic fluid of women with intraamniotic infection and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 336-41
151. Bry K, Hallman M. Synergistic stimulation of amnion cell prostaglandin E2 synthesis by interleukin-1, tumor necrosis factor and products from activated human granulocytes. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*,1991; 44(4): 241-5.
152. Gibb W, Sun M. Cellular specificity of interleukin-1  $\beta$  stimulated expression of type-2 PGHS in human amnion cell culture. *Biol Reprod* 1998; 59: 1139-42.

153. Casey ML, Cox SM, Beutler B, Milewich L, MacDonald PC. Cachetin tumor necrosis factor-alpha formation in human decidua: potential role of cytokines in infection induced preterm labor. *J Clin Invest* 1989; 83: 430-6.
154. Fortunato S, Menon R, Swan KF, Lombardi SJ. Interleukin-10 and transforming growth factor-beta inhibit amniochorion tumor necrosis factor-alpha production by contrasting mechanisms of action: therapeutic implications in prematurity. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 803-7
155. Romero R, Yoon BH, Mazor M, Gomez R, Diamond MP, Kenney JS, et al. The diagnostic and prognostic value of amniotic fluid white blood cell count, glucose, interleukin-6, and gram stain in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 805-16.
156. Andrews WW, Hauth JC, Goldenberg RL, Gomez R, Romero R, Cassell GH. Amniotic fluid interleukin-6: correlation with upper genital tract microbial colonization and gestational age in women delivered after spontaneous labor versus indicated delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 606-12.
157. Hsu CD, Meaddough E, Aversa K, et al. Elevated amniotic fluid levels of leukemia inhibitory factor, interleukin 6, and interleukin 8 in intra-amniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179: 1267-70.
158. Hsu CD, Meaddough E, Hong SF, Aversa K, Lu LC, Copel JA. Elevated amniotic fluid nitric oxide metabolites and interleukin-6 in intraamniotic infection. *J Soc Gynecol Invest* 1998; 5: 21-4.
159. Hsu CD, Meaddough E, Aversa K, Copel JA. The role of amniotic fluid I-selectin, GRO-alpha, and interleukin-8 in the pathogenesis of intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 178: 428-32
160. Winkler M, Fisscher DC, Ruck P et al. Parturition at term: paralel increases in interleukin-8 and proteinase concentrations and neutrophil count in the lower uterine segment. *Hum reprod* 1999; 14:1096-100
161. Weaver JD, Scott S, Williams OB. The bacterial flora found in nonspecific vaginal discharge. *Am J Obstet Gynecol.* 1950 Oct;60(4):880-4.
162. Gardner HL, Dukes CD. Haemophilus vaginalis vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am J Obstet Gynecol.* 1955 May;69(5):962-76
163. Paramel Jayaprakash T, Schellenberg JJ, Hill JE. Resolution and characterization of distinct cpn60-based subgroups of Gardnerella vaginalis in the vaginal microbiota. *PLoS One.* 2012;7(8):e43009. doi: 10.1371/journal.pone.0043009. Epub 2012 Aug.
164. Eren AM, Zozaya M, Taylor CM, Dowd SE, Martin DH, Ferris MJ. Exploring the diversity of Gardnerella vaginalis in the genitourinary tract microbiota of monogamous couples through subtle nucleotide variation. *PLoS One.* 2011;6(10):e26732. doi: 10.1371/journal.pone.0026732. Epub 2011 Oct 25
165. Datscu R. Characterization of the vaginal microflora in health and disease. *Dan Med J.* 2014 Apr;61(4):B4830. PubMed PMID: 24814599.
166. Ling Z, Liu X, Chen X, Zhu H, Nelson KE, Xia Y, Li L, Xiang C. Diversity of cervicovaginal microbiota associated with female lower genital tract infections. *Microb Ecol.* 2011 Apr;61(3):704-14. doi: 10.1007/s00248-011-9813
167. Schwebke JR, Richey CM and Weiss HL. Correlation of bihevior with microbiological changes in vaginal flora. *J Infect Dis* 1999; 180:1632-6.
168. Escheenbach DA, Thwin SS, Patton DL et al. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin Infect Dis* 2000;30:901-5
169. Ravel J, Brotman RM, Gajer P, Ma B, Nandy M, Fadrosh DW, Sakamoto J, Koenig SS, Fu L, Zhou X, Hickey RJ, Schwebke JR, Forney LJ. Daily temporal dynamics of vaginal

- microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome*. 2013 Dec 2;1(1):29
170. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 13;486(7402):207-14. doi:10.1038/nature11234. PubMed PMID: 22699609; PubMed Central PMCID: PMC3564958.
  171. Fettweis JM, Serrano MG, Sheth NU, Mayer CM, Glascock AL, Brooks JP, Jefferson KK; Vaginal Microbiome Consortium (additional members), Buck GA. Species-level classification of the vaginal microbiome. *BMC Genomics*. 2012;13 Suppl 8:S17. doi: 10.1186/1471-2164-13-S8-S17. Epub 2012 Dec 17
  172. Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, Segata N, Gevers D, Raes J, Huttenhower C. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comput Biol*. 2012;8(7):e1002606
  173. Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *Am J Med Sci*. 2012 Jan;343(1):2-9
  174. Gordon JI, Klaenhammer TR. A rendezvous with our microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4513-5.
  175. Martin DH, Zozaya M, Lillis R, Miller J, Ferris MJ. The microbiota of the human genitourinary tract: trying to see the forest through the trees. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2012;123:242-56. PubMed PMID: 23303991; PubMed Central PMCID: PMC3540603.
  176. Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *Am J Med Sci*. 2012 Jan;343(1):2-9. doi: 10.1097/MAJ.0b013e31823ea228. Review.
  177. Fredricks DN. Molecular methods to describe the spectrum and dynamics of the vaginal microbiota. *Anaerobe*. 2011 Aug;17(4):191-5. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.01.001. Epub 2011 Mar 3. PubMed PMID: 21376827
  178. Jaspers V, Menten J, Smet H, Poradosú S, Abdellati S, Verhelst R, Hardy L, Buvé A, Crucitti T. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC Microbiol*. 2012 May 30;12:83. doi: 10.1186/1471-2180-12-83. PubMed PMID: 22647069; PubMed Central PMCID: PMC3418157.
  179. Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, Hallén A, Fredlund H, Jensen JS, Engstrand L, Unemo M. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age--sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One*. 2013 Apr 9;8(4):e60670
  180. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4680-7. doi: 10.1073/pnas.1002611107
  181. Marconi C, Donders GG, Parada CM, Giraldo PC, da Silva MG. Do *Atopobium vaginae*, *Megasphaera* sp. and *Leptotrichia* sp. change the local innate immune response and sialidase activity in bacterial vaginosis? *Sex Transm Infect*. 2013 Mar;89(2):167-73. doi: 10.1136/sextrans-2012-050616. Epub 2012 Oct 16. PubMed PMID: 23076402
  182. Ling Z, Kong J, Liu F, Zhu H, Chen X, Wang Y, Li L, Nelson KE, Xia Y, Xiang C. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics*. 2010 Sep 7;11:488. doi:10.1186/1471-2164-11-488.
  183. Ferris MJ, Maszta A, Aldridge KE, Fortenberry JD, Fidel PL Jr, Martin DH. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. *BMC Infect Dis*. 2004 Feb 13;4:5. PubMed PMID:15018635; PubMed Central PMCID:
  184. Sobel JD. Bacterial vaginosis. *Annu Rev Med* 2000; 51:349-56

185. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353:1899–1911
186. Wolraht H, Forsum U, Larsson PG and Boren H. Analisis of bacterial vaginosis-related amines in vaginal fluid by gas chromatography and mass spectrometry. *J Clin Microb* 2001; 39:4026-31
187. Mead PB. epidemiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:446-9
188. Bernstein PS. Screening for bacterial vaginosis in pregnancy. ACOG 2000; 48th Annual Clinical Meeting
189. Ralph SG, Rutheford AJ and Wilson JD. Influence of bacterial vaginosis on concepcion and miscarriagin the first trimestar:cohort study. *BMJ* 1999; 319:220-3.
190. Donders GG, Van Bulck B, Caudron J et al. Realtionship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontanous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183:431-7
191. McGregor JA, French JI, Jones W, et al. Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: results of a controlled trial of topical clindamycin cream. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:1048–60.
192. Hay PE, Lamont RF, Taylor-Robinson, et al. Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *BMJ* 1994;308:295–8.xt]
193. Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, et al. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant.*NEngl JMed* 1995;333:1737–42.
194. Chaim W.,Mazor M and Leiberman JR. The relationship between bacterial vaginosis and preterm birth. A review.*Arch Gynecol Obstet* 1997; 259:51-58. ,
195. Silver HM, Sperling RS and St Gibbs RS. Evidence relating bacterial vaginosis to intraamniotic infection. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:808-12.
196. Martius J and Escheenbach DA. The role of bacterial vaginosis as a cause of amniotic fluid infectionn, chorioamnionitis and prematurity: a review. *Arch Gynecol Obstet* 1990; 247:1-13.
197. Eschenbach DA. bacterial vaginosis. In: Hitchcock PJ, Mac Cay HT, Wasserheit IJ Eds. *Sexually transmitted diseases and adverse outcomes in pregnancy*. Washington. DC:ASM press; 1999; 103-23.
198. McDonald HM, O'Loughlin JA, Vigneswaran R et al. Impact of metronidazole therapy on pretherm birth in womwn with bacterial vaginosis flora(*Gardnerella vaginalis*): a randosimed, placebo controlled trial. *BJOG* 1997; 104:1391-7.
199. Carey JC, Klebanoff M, Hauth JC, Hillier SL, Thom EA, Ernest JM, et al. Metronidazole to prevent preterm delivery in pregnant women with asymptomatic bacterial vaginosis. National Institute of Child Health and Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. *N Engl J Med* 2000; 342:534-40.
200. Morales WJ, Schorr S, Albritton J. Effect of metronidazole in patients with preterm birth in preceding pregnancy and bacterial vaginosis: a placebo-controlled, double-blind study. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:345-7.
201. Hauth JC, Goldenberg RL, Andrews WM, DuBard MB, Copper RL. Reduced incidence of preterm delivery with metronidazole and erythromycin in women with bacterial vaginosis. *N Engl J Med* 1995;333:1732–6
202. Donders GGG. Bacterial vaginosis in pregnancy: screen and treat? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;83:1–4.
203. Donders GGG. Traetmant of sexually transmitted bacterial diseases in pregnat womwn. *drugs* 2000; 59:477-85.
204. Brocklehurst P, Gordon A, Heatley E, Milan SJ. Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jan 31;1:CD000262. doi: 10.1002/14651858.CD000262.pub4. Revie .
205. McDonald HM, Brocklehurst P, Gordon A. Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst. Rev .* 1, CD000262 (2007).

206. Nygren P, Fu R, Freeman Met al. Evidence on the benefits and harms of screening and treating pregnant women who are asymptomatic for bacterial vaginosis: an update review for the US Preventive Services Task Force. *Ann. Intern. Med.* 148(3), 220–233 (2008)
207. Cochrane Database Syst Rev. 2013 Jan 31;1:CD000262
208. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29(2):297-301
209. Cauci S, Culhane JF. High sialidase levels increase preterm birth risk among women who are bacterial vaginosis-positive in early gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2011 Feb;204(2):142.e1-9. doi: 10.1016/j.ajog.2010.08.061. Epub 2010 Nov5. PubMed PMID: 2105572
210. Marconi C, Donders GG, Bellen G, Brown DR, Parada CM, Silva MG. Sialidase activity in aerobic vaginitis is equal to levels during bacterial vaginosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Apr;167(2):205-9. doi:10.1016/j.ejogrb.2012.12.003. Epub 2013 Feb 10 5.
211. Hay, P. E. et al . Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *BMJ.* 308 , 295–298 (1994).
212. Donders, G. G. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 21 , 355–373 (2007)
213. Verhelst R, Cools P, Lopes dos Santos Santiago G, Temmerman M, Venechoutte M. Garnderella. In: *Molecular detection of human bacterial pathogens.* Liu D, editor. Boca Raton: Press Taylor & Fracis Group. 2011; p. 81-95
214. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med.* 1983; 74(1):14-22.
215. Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect.* 2002;78(6):413-5
216. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Van Simaey L, De Ganck C, et al. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade Imicroflora. *BMC Microbiol.* 2005; 5:61
217. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 2002; 109(1):34-43
218. Srinivasan S, Morgan MT, Liu C, Matsen FA, Hoffman NG, Fiedler TL, et al. More than meets the eye: associations of vaginal bacteria with gram stain morphotypes using molecular phylogenetic analysis. *PLoS One.* 2013; 8(10):e78633.
219. Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, Matsen FA, Fiedler TL, Hall RW, et al. Bacterial Communities in Women with Bacterial Vaginosis: High Resolution Phylogenetic Analyses Reveal Relationships of Microbiota to Clinical Criteria. *PLoS ONE*, 2012; 7(6): e37818.
220. Brotman RM, Ravel J, Cone RA, Zenilman JM. Rapid fluctuation of the vaginal microbiota measured by Gram stain analysis. *Sex Transm Infect.* 2010; Aug;86(4):297-302
221. Biagi E, Vitali B, Pugliese C, Candela M, Donders GG, Brigidi P. Quantitative variations in the vaginal bacterial population associated with asymptomatic infections: a real-time polymerase chain reaction study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009 Mar; 28(3):281-5
222. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ, Marrazzo JM, Fredricks DN. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS One.* 2010 Apr 15;5(4):e10197. doi:10.1371/journal.pone.0010197. PubMed PMID: 20419168; PubMed Central PMCID: PMC2855365.
223. Ravel J, Brotman RM, Gajer P, Ma B, Nandy M, Fadrosh DW, Sakamoto J, Koenig SS, Fu L, Zhou X, Hickey RJ, Schwebke JR, Forney LJ. Daily temporal dynamics of vaginal

- microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome*. 2013 Dec 2;1(1):29. doi: 10.1186/2049-2618-1-29.
224. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev*. 2005 Aug;206:306-35. Review. PubMed PMID: 16048557.
  225. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, Wira CR. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol*. 2011 Mar;88(2):185-94. doi: 10.1016/j.jri.2011.01.005. Epub 2011 Feb 26. Review. PubMed PMID: 21353708; PubMed Central PMCID: PMC3094911.
  226. Wira CR, Fahey JV. The innate immune system: gatekeeper to the female reproductive tract. *Immunology*. 2004 Jan;111(1):13-5. PubMed PMID: 14678193; PubMed Central PMCID: PMC1782397.
  227. Rodriguez-Garcia M, Patel MV, Wira CR. Innate and adaptive anti-HIV immune responses in the female reproductive tract. *J Reprod Immunol*. 2013 Mar;97(1):74-84.
  228. Hickey DK, Patel MV, Fahey JV, Wira CR. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *J Reprod Immunol*. 2011 Mar;88(2):185-94.
  229. Wira CR, Fahey JV, Rodriguez-Garcia M, Shen Z, Patel MV. Regulation of Mucosal Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Sex Hormones in Immune Protection Against Sexually Transmitted Pathogens. *Am J Reprod Immunol*. 2014 Apr 16.
  230. Wira CR, Grant-Tschudy KS, Crane-Godreau MA. Epithelial cells in the female reproductive tract: a central role as sentinels of immune protection. *Am J Reprod Immunol*. 2005 Feb;53(2):65-76. Review. PubMed PMID: 15790340.
  231. Quayle AJ. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol*. 2002 Oct-Nov;57(1-2):61-79. Review. PubMed PMID: 12385834
  232. Andersen JM, Al-Khairy D, Ingalls RR. Innate immunity at the mucosal surface: role of toll-like receptor 3 and toll-like receptor 9 in cervical epithelial cell responses to microbial pathogens. *Biol Reprod*. 2006 May;74(5):824-31. Epub 2006 Jan 18. PubMed PMID: 16421230.
  233. Hase K, Ohno H. [Epithelial cells as sentinels in mucosal immune barrier]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2006 Feb;29(1):16-26. Review. Japanese. PubMed PMID: 16505599
  234. Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M. Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. Dec; 1987 149(2):755-761. [PubMed: 3322281]
  235. Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ. Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. Dec; 1987 84(24):9233-9237.
  236. Al-Mushrif S, Eley A, Jones BM. Inhibition of chemotaxis by organic acids from anaerobes may prevent a purulent response in bacterial vaginosis. *J Med Microbiol*. 2000 Nov;49(11):1023-30
  237. Mirmonsef P, Gilbert D, Zariffard MR, Hamaker BR, Kaur A, Landay AL, Spear GT. The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol*. 2011; 65:190-195.
  238. Kobayashi SD, Voyich JM, Burlak C, DeLeo FR. Neutrophils in the innate immune response. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. Nov; 2005 53(6):505-517.



239. Ravichandran KS. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity*. 2011 Oct 28;35(4):445-55
240. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, Park D, Woodson RI, Ostankovich M, Sharma P, Lysiak JJ, Harden TK, Leitinger N, Ravichandran KS. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*. 2009 Sep 10;461(7261):282-6. doi:10.1038/nature08296.
241. Gude DR, Alvarez SE, Paugh SW, Mitra P, Yu J, Griffiths R, Barbour SE, Milstien S, Spiegel S. Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal. *FASEB J*. 2008 Aug;22(8):2629-38.
242. Kobayashi SD, DeLeo FR. Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2009 Nov-Dec;1(3):309-33.
243. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80: 2012–2020 10
244. Lee A, Whyte MKB, Haslett C (1993) Prolongation of in vitro lifespan and functional longevity of neutrophils by inflammatory mediators acting through inhibition of apoptosis. *J Leukoc Biol* 54: 283–288.
245. Kobayashi SD, Braughton KR, Whitney AR, Voyich JM, Schwan TG, Musser JM, DeLeo FR. Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 16;100(19):10948-53
246. Dibbert B, et al. Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 13330–13335.9.
247. Saba S, Soong G, Greenberg S, Prince A. Bacterial stimulation of epithelial G-CSF and GM-CSF expression promotes PMN survival in CF airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;27:561–567
248. Lee A, Whyte MKB, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 1993;54:283–288. 60.
249. Gasmi L, McLennan AG, Edwards SW. The diadenosine polyphosphates Ap3A and Ap4A and adenosine triphosphate interact with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to delay neutrophil apoptosis: implications for neutrophil–platelet interactions during inflammation. *Blood* 1996;87:3442–3449. 61.
250. Lee E, et al. Reversal of human neutrophil survival by leukotriene B4 receptor blockade and 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein inhibitors. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:2079–2085. 62.
251. Colotta F, Re F, Polantarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992;80:2012–2020. 63.
252. Pericle F, et al. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur J Immunol* 1994;24:440–444. 64.
253. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CCJ. Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J Leukoc Biol* 1995;58:582–584. 65.
254. Girard D, Paquet ME, Paquin R, Beaulieu AD. Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on Human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression and apoptosis by IL-15. *Blood* 1996;88:3176–3184. 66.
255. Klebanoff SF, Olszowski S, Voorhis WCV, Ledbetter JA, Waltersdorff AM, Schlechte KG. Effects of g-interferon on human neutrophils: protection from deterioration on storage. *Blood* 1992;80:225–234. 67.
256. Daigle I, Yousefi S, Colonna M, Green DR, Simon HU. Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils. *Nat Med* 2002;8:61–67. 68.

257. Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* 2002;168:4701–4710
258. Borjesson DL, Kobayashi SD, Whitney AR, Voyich JM, Argue CM, DeLeo FR. Insights into pathogen immune evasion mechanisms: *Anaplasma phagocytophilum* fails to induce an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *J Immunol.* 2005 May 15;174(10):6364-72. PubMed PMID: 15879137. 2:
259. Voyich JM, Braughton KR, Sturdevant DE, Whitney AR, Saïd-Salim B, Porcella SF, Long RD, Dorward DW, Gardner DJ, Kreiswirth BN, Musser JM, DeLeo FR. Insights into mechanisms used by *Staphylococcus aureus* to avoid destruction by human neutrophils. *J Immunol.* 2005 Sep 15;175(6):3907-19. PubMed PMID: 16148137. 3:
260. Kobayashi SD, Voyich JM, Somerville GA, Braughton KR, Malech HL, Musser JM, DeLeo FR. An apoptosis-differentiation program in human polymorphonuclear leukocytes facilitates resolution of inflammation. *J Leukoc Biol.* 2003 Feb;73(2):315-22. PubMed PMID: 12554809.
261. Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, DeLeo FR. Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 2003 Mar 15;170(6):3357-68. PubMed PMID: 12626596.
262. Kennedy AD, DeLeo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res.* 2009;43(1-3):25-61.
263. Hitti J, Hillier SL, Agnew KJ, Krohn MA, Reisner DP, Eschenbach DA. Vaginal indicators of amniotic fluid infection in preterm labor. *Obstet Gynecol.* 2001 Feb;97(2):211-9.
264. Danforth, D. N., 1983, "The Morphology of the Human Cervix," *Clin. Obstet. Gynecol.*, 26(1), pp. 7–13
265. Uldbjerg N, Ekman G, Malmstrom A. Ripening of the human uterine cervix related to changes in collagen, glycosaminoglycans and collagenolytic activity. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 147:662. 80.
266. Uldbjerg N, Forman A, Peterson L et al. Biomechanical and biochemical changes of the uterus and cervix during pregnancy. In: Reece E, Hobbins J, Mahoney M et al, eds. *Medicine of the Fetus and Mother.* Philadelphia: JB Lippincott, 1992:849. 81.
267. Liggins G. Cervical ripening as an inflammatory reaction. In: Ellwood D, Anderson A, eds. *The Cervix in Pregnancy and Labour: Clinical and Biochemical Investigations.* Edinburgh: Churchill Livingstone, 1981
268. Ito A, Hiro D, Ojima Y et al. Spontaneous production of interleukin-1-like factors from pregnant rabbit uterine cervix. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 159:261-65. 83.
269. Ito A, Hiro D, Sakyo K et al. The role of leukocyte factors on uterine cervical ripening and dilation. *Biol Reprod* 1987; 37:511-17. 84.
270. Ito A, Leppert PC, Mori Y. Human recombinant interleukin-1 alpha increases elastase-like enzyme in human uterine cervical fibroblasts. *Gynecol Obstet Invest* 1990; 30:239-41. 278 *Immunology of Pregnancy* 85.
271. Osmers RG, Blaser J, Kuhn W et al. Interleukin-8 synthesis and the onset of labor. *Obstet Gynecol* 1995; 86:223-29. 86.
272. Maradny EE, Kanayama N, Halim A et al. Stretching of fetal membranes increases the concentration of interleukin-8 and collagenase activity. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174:843-49
273. Ogawa M, Hirano H, Tsubaki H et al. The role of cytokines in cervical ripening: Correlations between the concentrations of cytokines and hyaluronic acid in cervical mucus and the induction of hyaluronic acid production by inflammatory cytokines by human cervical fibroblasts. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:105-10.
274. Junqueira LCU, Zugaib M, Montes GS, Toledo OMS, Krisztan RM, Shigihara KM. Morphologic and histochemical evidence for the occurrence of collagenolysis and for the role

- of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes during cervical dilation. *Am J Obstet Gynecol* 1980;138:273-81.
275. Kobayashi H and Terao T. Hyaluronic acid-specific regulation of cytokines by human uterine fibroblasts, *Am J Physiol* 1997; 273:1151-9.
  276. Ogawa M, Hirano H, Tsubaki H et al. The role of cytokines in cervical ripening: Correlations between the concentrations of cytokines and hyaluronic acid in cervical mucus and the induction of hyaluronic acid production by inflammatory cytokines by human cervical fibroblasts. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:105-10.
  277. Watari M, Watari H, DiSanto ME, Chacko S, Shi GP, Strauss JF III. Pro-inflammatory cytokines induce expression of matrixmetabolizing enzymes in human cervical smooth muscle cells. *Am J Pathol* 1999;154(6):1755–62.
  278. Watari M, Watari H, Fujimoto T. Lipopolysaccharide Induces Interleukin-8 Production By Human Cervical Smooth Muscle Cells. *J Soc Gynecol Investig* 2003;10:110 –7.
  279. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Expression of a progelatinase activator (MT1-MMP) in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol* 1998; 39:316-22.
  280. Fortunato SJ, Menon R, Lombardi SJ. Presence of four tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMP –1, 2, 3, 4) in human fetal membranes. *Am J Reprod Immunol* 1998; 40:395-400.
  281. Full Huang HY, Wen Y, Urwin C et al. Cytokine-Mediated Regulation of 92-Kilodalton Type IV Collagenase, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1), and TIMP-3 Messenger Ribonucleic Acid Expression in Human Endometrial Stromal Cells. *J Clin Endocrin Metab* 1998; 83:1721-29. .
  282. Challis JR, Sloboda DM, Alfaidy N, et al. Prostaglandins and mechanisms of preterm birth. *Reproduction* 2002;124(1):1–17.
  283. Gibb W, Challis JR. Mechanisms of term and preterm birth. *J Obstet Gynaecol Can* 2002;24(11):874–83.
  284. Whittle WL, Patel FA, Alfaidy N, et al. Glucocorticoid regulation of human and ovine parturition: The relationship between fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and intrauterine prostaglandin production. *Biol Reprod* 2001;64(4): 1019–32.
  285. Winkler M, Oberpichler A, Tschesche H, Ruck P, Fischer DC, Rath W. Collagenolysis in the lower uterine segment during parturition at term: Correlations with stage of cervical dilatation and duration of labor. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181(1):153–8
  286. R . A . Word, X. H. Li, M. Hnat, and K. Car r i c k , “Dynamics of cervical remodeling during pregnancy and parturition: mechanisms and current concepts,” *Seminars in Reproductive Medicine*, vol. 25, no. 1, pp. 69–79, 2007
  287. Wood C, Bannerman R, Booth R et al. The prediction of premature labor by observation of the cervix and external tocography. *Am J Obstet Gynecol* 1965; 91:396. 104.
  288. Catalano PM, Ashikaga T, Mann LI. Cervical change and uterine activity as predictors of preterm delivery. *Am J Perinatol* 1989; 6:185-90. 105.
  289. Leveno KJ, Cox K, Roark ML. Cervical dilatation and prematurity revisited. *Obstet Gynecol* 1986; 68:434-35. 106. Heath VC, Southall TR, Souka AP et al. Cervical length at 23 weeks of gestation: Prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998; 12:312-17.
  290. Uldbjerg N, Ekman G, Malmstrom A, Olsson K, Ulmsten U. Ripening of the human uterine cervix related to changes in collagen, glycosaminoglycans, and collagenolytic activity. *Am Obstet Gynecol* 1983;147(6):662–6.
  291. Rotten D, Gavignet C, Colin MC, Robert AM, Godeau G. Evolution of the elastic fiber network of the human uterine cervix before, during and after pregnancy. A quantitative evaluation by automated image analysis. *Clin Physiol Biochem* 1988;6(5):285–92.

292. Watari M, Watari H, DiSanto ME, Chacko S, Shi GP, Strauss JF III. Pro-inflammatory cytokines induce expression of matrixmetabolizing enzymes in human cervical smooth muscle cells. *Am J Pathol* 1999;154(6):1755–62.
293. Bokstrom H, Brannstrom M, Alexandersson M, Norstrom A. Leukocyte subpopulations in the human uterine cervical stroma early and term pregnancy. *Hum Reprod* 1997;12(3):586–90.
294. Collins JJ, Usip S, McCarson KE, Papka RE. Sensory nerves and neuropeptides in uterine cervical ripening. *Peptides* 2002; 23(1):167–83.
295. Knudsen UB, Uldbjerg N, Rechberger T, Fredens K. Eosinophils in human cervical ripening. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997;72(2):165–8.
296. Owiny JR, Gilbert RO, Wahl CH, Nathanielsz PW. Leukocytic invasion of the ovine cervix at parturition. *J Soc Gynecol Investig* 1995;2(4):593–6.
297. Spanggaard H, Knudsen UB, Uldbjerg N, Jeziorska M, Woolley DE, Danielsen CC. Mast cells in cervical ripening an immunohistochemical and biomechanical study in rats. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997;73(1):91–7.
298. Stjernholm Y, Sennstrom M, Granstrom L, Ekman G, Johansson O. Protein gene product 9.5-immunoreactive nerve fibers and cells in human cervix of late pregnant, postpartal and non-pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999;78(4): 299–304.
299. Weiss G. Endocrinology of Parturition. *J Clin Endoc and Metab.* 2000; 85:4421-5.
300. Yallampalli C, Buhimschi I, Chwalisz K, Garfield RE, Dong YL. Preterm birth in rats produced by the synergistic action of a nitric oxide inhibitor (NG -nitro-L-arginine methyl ester) and an antiprogesterin (onapristone). *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:207-12
301. Kelly RW, Leask R, Calder AA. Choriodecidual production of interleukin-8 and mechanism of parturition. *Lancet* 1992; 339:776.8
302. Chwalisz K, Shi Shao O, Neff G, et al: The effect of antigestagen ZK 98, 199 on the uterine cervix. *Acta Endocrinol* 283:113, 1987. 57.
303. Elliott CL, Brennand JE, Calder AA: The effects of mifepristone on cervical ripening and labor induction in primigravidae. *Obstet Gynecol* 92:804-809, 1998. 58.
304. Giacalone PL, Daures JP, Faure JM, et al: The effects of mifepristone on uterine sensitivity to oxytocin and on fetal heart rate patterns. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 97:30-34, 2001. 59.
305. Norman J: Antiprogesterones. *Br J Hosp Med* 45:372-375, 1991. 60.
306. Stenlund PM, Ekman G, Aedo AR, et al: Induction of labor with mifepristone: A randomized, double-blind study versus placebo. *Acta Obstet Gynecol Scand* 78:793-798, 1999. 61.
307. Chwalisz K, Shao-Qing S, Garfield RE, et al: Cervical ripening in guineapigs after a local application of nitric oxide. *Hum Reprod* 12:2093-2101, 1997. 62.
308. Hegele-Hartung C, Chwalisz K, Beier HM, et al: Ripening of the uterine cervix of the guinea-pig after treatment with the progesterone antagonist onapristone (ZK 98.299): An electron microscopic study. *Hum Reprod* 4:369-377, 1989. 63.
309. Wolf JP, Sinosich M, Anderson TL, et al: Progesterone antagonist (RU 486) for cervical dilation, labor induction, and delivery in monkeys: Effectiveness in combination with oxytocin. *Am J Obstet Gynecol* 160:45-47, 1989. 64.
310. Stys SJ, Clewell WH, Meschia G: Changes in cervical compliance at parturition independent of uterine activity. *Am J Obstet Gynecol* 130:414- 418, 1978. 65.
311. Chwalisz K: The use of progesterone antagonists for cervical ripening and as an adjunct to labour and delivery. *Hum Reprod* (9 Suppl 1):131-161, 1994. 66.
312. DeFranco EA, O'Brien JM, Adair CD, et al: Vaginal progesterone is associated with a decrease in risk for early preterm birth and improved neonatal outcome in women with a short cervix: A secondary analysis from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol* 30:697-705, 2007.67.

313. Meis PJ, Klebanoff M, Thom E, et al: Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate. *N Engl J Med* 348:2379-2385, 2003. 68.
314. Fonseca EB, Celik E, Parra M, et al: Progesterone and the risk of preterm birth among women with a short cervix. *N Engl J Med* 357:462-469, 2007. 69.
315. Facchinetti F, Paganelli S, Comitini G, et al: Cervical length changes during preterm cervical ripening: Effects of 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate. *Am J Obstet Gynecol* 196:453-454, 2007
316. Phelps JY, Higby K, Smyth MH, Ward JA, Arredondo F, Mayer AR. Accuracy and intraobserver variability of simulated cervical dilatation measurements. *Am J Obstet Gynecol.* Sep 1995;173(3 Pt 1):942-945. 43.
317. Newman RB, Goldenberg RL, Iams JD, et al. Preterm prediction study: Comparison of the cervical score and Bishop score for prediction of spontaneous preterm delivery. *Obstet Gynecol.* Sep 2008;112(3):508-515. 47
318. Celik, E., To, M., Gajewska, K., Smith, G. C. S., and Nicolaides, K. H., 2008, "Cervical Length and Obstetric History Predict Spontaneous Preterm Birth: Development and Validation of a Model to Provide Individualized Risk Assessment," *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 31(5), pp. 549–554. [29]
319. Fonseca, E. B., Celik, E., Parra, M., Singh, M., and Nicolaides, K. H., 2007, "Progesterone and the Risk of Preterm Birth Among Women With a Short Cervix," *N. Engl. J. Med.*, 357(5), pp. 462–469. [30]
320. Hassan, S. S., Romero, R., Berry, S. M., Dang, K., Blackwell, S. C., Treadwell, M. C., and Wolfe, H. M., 2000, "Patients With an Ultrasonographic Cervical Length  $\leq 15$  mm Have Nearly a 50% Risk of Early Spontaneous Preterm Delivery," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 182(6), pp. 1458–1467. [31]
321. Hassan, S. S., Romero, R., Vidyadhari, D., Fusey, S., Baxter, J. K., Khandelwal, , 2011, "Vaginal Progesterone Reduces the Rate of Preterm Birth in Women With a Sonographic Short Cervix: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial," *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 38(1), pp. 18–31.].
322. Iams, J. D., Goldenberg, R. L., Meis, P. J., Mercer, B. M., Moawad, A., Das, A., Thom, E., McNellis, D., Copper, R. L., Johnson, F., and Roberts, J. M., 1996, "The Length of the Cervix and the Risk of Spontaneous Premature Delivery. National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Unit Network," *N. Engl. J. Med.*, 334(9), pp. 567–572
323. Andersen HF, CE Nugent, SDWanty, RH Hayashi: Prediction of risk for preterm delivery by ultrasonographic measurement of cervical length. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 859-67. 10)
324. Cook CM, DA Ellwood: The cervix as a predictor of preterm delivery in 'at-risk' women. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2000;15:109-13. 11)
325. Hassan SS, R Romero, SM Berry, et al.: Patients with an ultrasonographic cervical length  $\leq 15$  mm have nearly a 50% risk of early spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182:1458-67.12)
326. Heath VC, TR Southall, AP Souka, A Elisseou, KH Nicolaides: Cervical length at 23 weeks of gestation: prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1998;12:312-7. 13)
327. Taipale P, V Hiilesmaa: Sonographic measurement of uterine cervix at 18-22 weeks gestation and the risk of preterm delivery. *Obstet Gynecol.* 1998 ;92:902-7.
328. Heath VC, Southall TR, Souka AP, Elisseou A, Nicolaides KH. Cervical length at 23 weeks of gestation: prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1998;12:312-317. 7.

329. Crane JM, Hutchens D. Transvaginal sonographic measurement of cervical length to predict preterm birth in asymptomatic women at increased risk: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008;31:579–587
330. Owen J, Szychowski JM, Hankins G, et al. Does midtrimester cervical length >25 mm predict preterm birth in high-risk women? *Am J Obstet Gynecol.* Oct 2010;203(4):393.e1-5
331. Conde-Agudelo A, Romero R, Hassan SS, Yeo L. Transvaginal sonographic cervical length for the prediction of spontaneous preterm birth in twin pregnancies: A systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* Aug 2010;203(2):128.e1-12
332. Iams JD, Berghella V. Care for women with prior preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* Aug 2010;203(2):89-100.
333. Iams JD. Prediction and early detection of preterm labor. *Obstet Gynecol.* Feb 2003;101(2):402-412
334. Iams JD, Creasy RK. *Preterm Labor and Delivery.* 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2004.
335. Meis PJ, Klebanoff M, Thom E, et al; National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate. *N Engl J Med.* 2003;348:2379-2385.
336. Hassan SS, Romero R, Vidyadhari D, et al; PREGNANT Trial. Vaginal progesterone reduces the rate of preterm birth in women with a sonographic short cervix: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;38:18-31.
337. da Fonseca EB, Bittar RE, Carvalho MH, Zugaib M. Prophylactic administration of progesterone by vaginal suppository to reduce the incidence of spontaneous preterm birth in women at increased risk: a randomized placebo-controlled double-blind study. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:419-424.
338. Berghella V, Rafael TJ, Szychowski JM, et al. Cerclage for short cervix on ultrasonography in women with singleton gestations and previous preterm birth: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2011;117:663-671.8.
339. Berghella V, Odibo AO, To MS, Rust OA, Althuisius SM. Cerclage for short cervix on ultrasonography: meta-analysis of trials using individual patient-level data. *Obstet Gynecol.* 2005;106:181-189
340. Fonseca EB, Celik E, Parra M, Singh M, Nicolaidis KH. Progesterone and the risk of preterm birth among women with a short cervix. *N Engl J Med.* 2007;357:462-469.
341. Hassan SS, Romero R, Vidyadhari D, et al. Vaginal progesterone reduces the rate of preterm birth in women with a sonographic short cervix: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011;38:18-31.
342. Romero R, Nicolaidis K, Conde-Agudelo A, et al. Vaginal progesterone in women with an asymptomatic sonographic short cervix in the midtrimester decreases preterm delivery and neonatal morbidity: a systematic review and metaanalysis of individual patient data. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206:124. e1-19.)
343. Larma JD, Iams JD. Is sonographic assessment of the cervix necessary and helpful? *Clin Obstet Gynecol.* 2012 Mar;55(1):324-35.
344. Arisoy R, Yayla M. Transvaginal sonographic evaluation of the cervix in asymptomatic singleton pregnancy and management options in short cervix. *J Pregnancy.* 2012;2012:201628. doi: 10.1155/2012/201628. Epub 2012 Feb 22. Review.
345. Chandiramani M, Seed PT, Orsi NM, Ekbote UV, Bennett PR, Shennan AH, Tribe RM. Limited relationship between cervico-vaginal fluid cytokine profiles and cervical shortening in women at high risk of spontaneous preterm birth. *PLoS One.* 2012;7(12):e52412. doi: 10.1371/journal.pone.0052412. Vis JY,
346. Kuin RA, Grobman WA, Mol BW, Bossuyt PM, Opmeer BC. Additional effects of the cervical length measurement in women with preterm contractions: a systematic review.

- Arch Gynecol Obstet. 2011 Sep;284(3):521-6. doi:10.1007/s00404-011-1892-z. Epub 2011 Apr 12. Review.
347. Kayem G, Maillard F, Popowski T, Haddad B, Sentilhes L. Uterine cervical length measurement by endovaginal ultrasonography: Technique and main utilizations]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2010 Jun;39(4):267-75. doi: 10.1016/j.jgyn.2010.03.005. Epub 2010 Apr 10. Review.
348. Meijer-Hoogeveen M, Stoutenbeek P, Visser GH. Transperineal versus transvaginal sonographic cervical length measurement in second- and third-trimester pregnancies. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 Oct;32(5):657-62.
349. Celik E, To M, Gajewska K, Smith GC, Nicolaidis KH; Fetal Medicine Foundation Second Trimester Screening Group. Cervical length and obstetric history predict spontaneous preterm birth: development and validation of a model to provide individualized risk assessment. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 May;31(5):549-54
350. Crane JM, Hutchens D. Transvaginal sonographic measurement of cervical length to predict preterm birth in asymptomatic women at increased risk: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 May;31(5):579-87.
351. Holst RM, Jacobsson B, Hagberg H, Wennerholm UB. Cervical length in women in preterm labor with intact membranes: relationship to intra-amniotic inflammation/microbial invasion, cervical inflammation and preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2006 Nov;28(6):768-74.
352. Hong JS, Park KH, Noh JH, Suh YH. Cervical length and the risk of microbial invasion of the amniotic cavity in women with preterm premature rupture of membranes. *J Korean Med Sci*. 2007 Aug;22(4):713-7.
353. Whitworth MK, Pafilis I, Vince G, Quenby S., Park KH, Hong JS, Kang WS, Shin DM. Transvaginal ultrasonographic measurement of cervical length in predicting intra-amniotic infection and impending preterm delivery in preterm labor: a comparison with amniotic fluid white blood cell count. *J Perinat Med*. 2008;36(6):479-84.
354. Jung HJ, Park KH, Kim SN, Hong JS, Oh KJ, Kim G, Kwon JY. Non-invasive prediction of intra-amniotic inflammation in women with preterm labor. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011 Jan;37(1):82-
355. Park KH, Lee SY, Kim SN, Jeong EH, Oh KJ, Ryu A. Prediction of imminent preterm delivery in women with preterm premature rupture of membranes. *J Perinat Med*. 2011 Nov 16;40(2):151-7.
356. Larsson PG, Carlsson B, Fåhraeus L, Jakobsson T, Forsum U. Diagnosis of bacterial vaginosis: need for validation of microscopic image area used for scoring bacterial morphotypes. *Sex Transm Infect*. 2004; 80(1):63-7.
357. Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect*. 2002;78(6):413-5.
358. Vandamme, P., B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters, and J. Swings. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 1996; 60: 407-38..
359. Bruno Biavati and Paola Mattarelli. The family bifidobacteriaceae. In: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer, Erko Stackebrandt, Editors. *A Handbook on the Biology of Bacteria*. Springer Science Business Media, LLC; 2006. p. 3:322–38.
360. Bergey's manual of systematic bacteriology. Ninth edition Baltimore: John G Holt editor. Williams&Wilkins Company; 2000, p. 573-574.

361. Eribe, E.R.K. et al., Genetic diversity of *Leptotrichia* and description of *Leptotrichia goodfellowii* sp. nov., *Leptotrichia hofstadii* sp. nov., *Leptotrichia shahii* sp. nov., and *Leptotrichia wadei* sp. nov., *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 583, 2004
362. Eribe, E.R., and Olsen, I., SDS-PAGE of whole-cell proteins and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analyses of *Leptotrichia* isolates, *Microbial Ecol. Health Dis.*, 14, 193, 2002
363. Söderberg, G., Lindberg, A.A., and Nord, C.E., *Bacteroides fragilis* in acute salpingitis, *Infection*, 7, 226, 1979.
364. Evaldson, G. et al., Microbiological findings in pregnant women with premature rupture of the membranes, *Med. Microbiol. Immunol.*, 168, 283, 1980.
365. Collins MD, Hoyles L, Tornqvist E, von Essen R, Falsen E: Characterization of some strains from human clinical sources which resemble “*Leptotrichia sanguinegens*“: description of *Sneathia sanguinegens* sp. nov., gen. nov. *Syst Appl Microbiol* 2001, 24(3):358-361
366. Shukla SK, Meier PR, Mitchell PD, Frank DN, Reed KD: *Leptotrichia amnionii* sp. nov., a novel bacterium isolated from the amniotic fluid of a woman after intrauterine fetal demise. *J Clin Microbiol* 2002, 40(9):3346-3349.
367. Marrazzo JM, Martin DH, Watts DH, Schulte J, Sobel JD, Hillier SL, Deal C, Fredricks DN. Bacterial vaginosis: identifying research gaps proceedings of a workshop sponsored by DHHS/NIH/NIAID. *Sex Transm Dis.* 2010 Dec;37(12):732-44
368. Fredricks, D.N. et al., Changes in vaginal bacterial concentrations with metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR, *J.Clin.Microbiol.*, 2009, January 14. (Epub ahead of print).
369. Fredricks, D.N. et al., Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis, *J.Clin.Microbiol.*, 45, 3270, 2007.
370. Tamrakar, R. et al., Association between *Lactobacillus* species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women, *BMC Infect.Dis.*, 7, 128, 2007.
371. Fredricks, D.N., Fiedler, T.L., and Marrazzo, J.M., Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis, *N.Engl.J.Med.*, 353, 1899, 2005.
372. Fredricks D.N., and Marrazzo, J.M., Molecular methodology in determining vaginal flora in health and disease: Its time has come, *Curr.Infect.Dis.Rep.*, 7, 463, 2005. 76. Thiesen, C.M. et al., *Leptotrichia amnionii*, an emerging pathogen of the female urogenital tract, *J.Clin.Microbiol.*, 45, 2347, 2007.
373. Srinivasan S, Fredricks DN: The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2008, 2008:750479.
374. Haggerty CL, Totten PA, Ferris M, Martin DH, Hoferka S, Astete SG, Ondondo R, Norori J, Ness RB: Clinical characteristics of bacterial vaginosis among women testing positive for fastidious bacteria. *Sex Transm Infect* 2009, 85(4):242-248.
375. Ling Z, Kong J, Liu F, Zhu H, Chen X, Wang Y, Li L, Nelson KE, Xia Y, Xiang C: Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota
376. Boennelycke, M. et al., *Leptotrichia amnionii* found in septic abortion in Denmark, *Scand.J.Infect.Dis.*, 39, 382, 2007.



377. Domann, E. et al., Culture-independent identification of pathogenic bacteria and polymicrobial infections in the genitourinary tract of renal transplant recipients, *J.Clin.Microbiol.*, 41, 5500, 2003,
378. DiGiulio, D.B. et al., Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: A molecular and culture-based investigation, *PLoS ONE*, 3, e 3056, 2008.80.
379. Han, Y.W. et al., Uncultivable bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth, *J.Clin.Microbiol.*, 47, 38, 2009.
380. Slover CM, Danzinger L: *Lactobacillus* : a review. *Clin Microbiol Newsl* 2008,30: 23– 27.
381. Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, et al. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 2002; 109: 34-43
382. Martínez-Martínez, W., Calderón-Badía, B., & Cruz-Lage, L. Comparison of diagnostic methods for bacterial vaginosis. *African Journal of Microbiology Research*. 2014. 8(12), 1360-1367
383. Ramsey PS, Lyon MD, Goepfert AR, Cliver S, Schwebke J, Andrews WW, Goldenberg RL, Hauth JC. Use of vaginal polymorphonuclear to epithelial cell ratios for the prediction of preterm birth. *Obstet Gynecol*. 2005 Jan;105(1):139-44
384. Berntsson M, Tunbäck P. Clinical and microscopic signs of cervicitis and urethritis: correlation with *Chlamydia trachomatis* infection in female STI patients. *Acta Derm Venereol*. 2013 Mar 27;93(2):230-3.
385. Berntsson M, Tunbäck P. Clinical and microscopic signs of cervicitis and urethritis: correlation with *Chlamydia trachomatis* infection in female STI patients. *Acta Derm Venereol*. 2013 Mar 27;93(2):230-3.
386. Cauci S, Guaschino S, De Aloysio D, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, Quadrifoglio F Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. *Mol Hum Reprod*. 2003 Jan;9(1):53-8.
387. Culhane JF, Desanto D, Goldenberg RL, McCollum KF, King F, Guaschino S. Variation in Nugent score and leukocyte count in fluid collected from different vaginal sites. *Obstet Gynecol*. 2005 Jan;105(1):120-3.
388. Datcu R, Gesink D, Mulvad G, Montgomery-Andersen R, Rink E, Koch A, Ahrens P, Jensen JS. Vaginal microbiome in women from Greenland assessed by microscopy and quantitative PCR. *BMC Infect Dis*. 2013 Oct 16;13(1):480.
389. Eschenbach DA, Thwin SS, Patton DL, Hooton TM, Stapleton AE, Agnew K, Winter C, Meier A, Stamm WE. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin Infect Dis*. 2000 Jun;30(6):901-7.
390. Fidel PL Jr, Barousse M, Espinosa T, Ficarra M, Sturtevant J, Martin DH, Quayle AJ, Dunlap K. An intravaginal live *Candida* challenge in humans leads to new hypotheses for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Infect Immun*. 2004 May;72(5):2939-46.
391. Geisler WM, Yu S, Venglarik M, Schwebke JR. Vaginal leucocyte counts in women with bacterial vaginosis: relation to vaginal and cervical infections. *Sex Transm Infect*. 2004 Oct;80(5):401-5.
392. Hitti J, Hillier SL, Agnew KJ, Krohn MA, Reisner DP, Eschenbach DA. Vaginal indicators of amniotic fluid infection in preterm labor. *Obstet Gynecol*. 2001 Feb;97(2):211-9.

393. Holst E, Goffeng AR, Andersch B. Bacterial vaginosis and vaginal microorganisms in idiopathic premature labor and association with pregnancy outcome. *J Clin Microbiol.* 1994 Jan;32(1):176-86
394. Lazenby GB, Soper DE, Nolte FS. Correlation of leukorrhea and *Trichomonas vaginalis* infection. *J Clin microbiol.* 2013 Jul;51(7):2323-7.
395. Matsubara S, Yamada T, Minakami H, Sato I. Stimulated polymorphonuclear leukocytes in vaginal secretions from patients with preterm labor. *Gynecol Obstet Invest* 1998; 45:35– 40.
396. Moore SG, Miller WC, Hoffman IF, Fox KK, Owen-O'Dowd J, McPherson JT, Privette A, Schmitz JL, Leone PA. Clinical utility of measuring white blood cells on vaginal wet mount and endocervical gram stain for the prediction of chlamydial and gonococcal infections. *Sex Transm Dis.* 2000 Oct;27(9):530-8.
397. Peipert JF, Ness RB, Soper DE, Bass D. Association of lower genital tract inflammation with objective evidence of endometritis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2000;8(2):83-7
398. Prakash M, Patterson S, Kapembwa MS. Macrophages are increased in cervical epithelium of women with cervicitis. *Sex Transm Infect.* 2001 Oct;77(5):366-9.
399. Simhan HN, Bodnar LM. Prepregnancy body mass index, vaginal inflammation, and the racial disparity in preterm birth. *Am J Epidemiol.* 2006 Mar 1;163(5):459-66.
400. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Hillier SL. Elevated vaginal pH and neutrophils are associated strongly with early spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Oct;189(4):1150-4.
401. Simhan HN, Caritis SN, Krohn MA, Hillier SL. The vaginal inflammatory milieu and the risk of early premature preterm rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Jan;192(1):213-8.
402. Steinhandler L, Peipert JF, Heber W, Montagno A, Cruickshank C. Combination of bacterial vaginosis and leukorrhea as a predictor of cervical chlamydial or gonococcal infection. *Obstet Gynecol.* 2002 99:603-7.
403. Novikova N, Yassievich E, Mårdh PA. Microscopy of stained smears of vaginal secretion in the diagnosis of recurrent vulvovaginal candidosis. *Int J STD AIDS.* 2002 May;13(5):318-22.
404. Yamada T, Matsubara S, Minakami H, Ohkuchi A, Hirat-suka M, Sato I. Relation between viability of vaginal polymorphonuclear leukocytes and presence of histologic chorioamnionitis. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79: 818 –23.
405. Yamada T, Minakami H, Matsubara S, Kohmura Y, Aoya T, Sato I. Changes in the number of polymorphonuclear leukocytes and concentrations of IL-8 and granulocyte elastase in the vaginas of normal pregnant women. *Am J Reprod Immunol* 2002;47:98 –103.
406. Yamada T, Minakami H, Matsubara S, Yatsuda T, Sato I. Changes in polymorphonuclear leukocytes in the vagina of patients with preterm labor. *Gynecol Obstet Invest* 1998;45:32– 4.
407. Yano J, Kolls JK, Happel KI, Wormley F, Wozniak KL, Fidel PL Jr. The acute neutrophil response mediated by S100 alarmins during vaginal *Candida* infections is independent of the Th17-pathway. *PLoS One.* 2012;7(9):e46311.
408. Yudin MH, Hillier SL, Wiesenfeld HC, Krohn MA, Amortegui AA, Sweet RL. Vaginal polymorphonuclear leukocytes and bacterial vaginosis as markers for histologic endometritis among women without symptoms of pelvic inflammatory disease. *Am J Obstet Gynecol.* 2003 Feb;188(2):318-23.

409. Srinivasan U, Ponnaluri S, Villareal L, Gillespie B, Wen A, Miles A, Bucholz B, Marrs CF, Iyer RK, Misra D, Foxman B. Gram stains: a resource for retrospective analysis of bacterial pathogens in clinical studies. *PLoS One*. 2012;7(10):e42898. doi: 10.1371/journal.pone.0042898. Epub 2012 Oct 11
410. Santiago GL, Tency I, Verstraelen H, Verhelst R, Trog M, Temmerman M, Vancoillie L, Decat E, Cools P, Vanechoutte M. Longitudinal qPCR study of the dynamics of *L. crispatus*, *L. iners*, *A. vaginae*, (sialidase positive) *G. vaginalis*, and *P. bivia* in the vagina. *PLoS One*. 2012;7(9):e45281. doi: 10.1371/journal.pone.5281. Epub 2012 Sep 21.
411. Santiago GL, Cools P, Verstraelen H, Trog M, Missine G, El Aila N, Verhelst R, Tency I, Claeys G, Temmerman M, Vanechoutte M. Longitudinal study of the dynamics of vaginal microflora during two consecutive menstrual cycles. *PLoS One*. 2011;6(11):e28180
412. Hamilton, R.D., and Zahler, S.A., A study of *Leptotrichia buccalis*, *J.Bacteriol.*, 73, 386, 1957.
413. Eribe, E.R.K., and Olsen, I., *Leptotrichia* species in human infections, *Anaerobe*, 14, 131, 2008
414. Harwich MD Jr, Serrano MG, Fettweis JM, Alves JM, Reimers MA; Vaginal Microbiome Consortium (additional members), Buck GA, Jefferson KK. Genomic sequence analysis and characterization of *Sneathia amnii* sp. nov. *BMC Genomics*. 2012;13 Suppl 8:S4. doi: 10.1186/1471-2164-13-S8-S4. Epub 2012 Dec 17
415. Verstraelen H, Verhelst R, Roelens K, Claeys G, Weyers S, De Backer E, Vanechoutte M, Temmerman M. Modified classification of Gram-stained vaginal smears to predict spontaneous preterm birth: a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*. 2007 Jun;196(6):528.e1-6.
416. Sobel JD, Subramanian C, Foxman B, Fairfax M, Gyax SE. Mixed vaginitis—more than coinfection and with therapeutic implications. *Curr Infect Dis Rep*. 2013 Apr;15(2):104-8. doi: 10.1007/s11908-013-0325-5
417. Donders GG, Van Calsteren K, Bellen G, Reybrouck R, Van den Bosch T, Riphagen I, Van Lierde S. Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. *BJOG*. 2009 Sep;116(10):1315-24. doi: 10.1111/j.1471-0528.2009.02237.x. Epub 2009 Jun 17. PubMed PMID: 19538417. 3:
418. Fan AP, Xue FX. Clinical characteristics of aerobic vaginitis and its mixed infections.. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2010 Dec;45(12):904-908. Chinese. PubMed PMID: 21211421.
419. M. G. Netea, G. D. Brown, B. J. Kullberg, and N. A. Gow, “An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 6, no. 1, pp. 67–78, 2008.
420. M. Schaller, U. Boeld, S. Oberbauer, G. Hamm, B. Hube, and H. C. Korting, “Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an Clinical and Developmental Immunology 9 in vitro model of oral candidosis,” *Microbiology*, vol. 150, no. 9, pp. 2807–2813, 2004.
421. C. C. Villar, H. Kashleva, A. P. Mitchell, and A. Dongari-Bagtzoglou, “Invasive phenotype of *Candida albicans* affects the host proinflammatory response to infection,” *Infection and Immunity*, vol. 73, no. 8, pp. 4588–4595, 2005.
422. P. L. Fidel Jr., “Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis,” *Medical Mycology*, vol. 40, no. 4, pp. 359–375, 2002
423. Bhavsar AP, Guttman JA, Finlay BB Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. *Nature*. 2007;449:827-34.

424. Finlay BB, McFadden G. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):767-82. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):1033-40.
425. Brodsky IE, Medzhitov R. Targeting of immune signalling networks by bacterial pathogens. *Nat Cell Biol*. 2009 May;11(5):521-6. doi: 10.1038/ncb0509-521. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997 Jun;61(2):136-69
426. Méresse S, Steele-Mortimer O, Moreno E, Desjardins M, Finlay B, Gorvel JP. Controlling the maturation of pathogen-containing vacuoles: a matter of life and death. *Nat Cell Biol*. 1999;1:E183-8.
427. Cossart P, Roy CR. Manipulation of host membrane machinery by bacterial pathogens. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Aug;22(4):547-54. . 24
428. Müller MP, Peters H, Blümer J, Blankenfeldt W, Goody RS, Itzen A. The Legionella effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science*. 2010;329:946-9.
429. Salinas-Carmona MC, Zúñiga JM, Pérez-Rivera LI, Segoviano-Ramírez JC, Vázquez-Marmolejo AV. *Nocardia brasiliensis* Modulates IFN-gamma, IL-10, and IL-12 cytokine production by macrophages from BALB/c Mice. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29:263-71.
430. Joshi SG, Francis CW, Silverman DJ, Sahni SK. Nuclear factor kappa B protects against host cell apoptosis during *Rickettsia rickettsii* infection by inhibiting activation of apical and effector caspases and maintaining mitochondrial integrity. *Infect Immun*. 2003;71:4127-36.22 .
431. Häcker G, Kirschnek S, Fischer SF. Apoptosis in infectious disease: how bacteria interfere with the apoptotic apparatus. *Med Microbiol Immunol*. 2006;195:11-9.
432. Chaudry AN, Travers PJ, Yuenger J, Colletta L, Evans P, Zenilman JM, Tummon A. Analysis of vaginal acetic acid in patients undergoing treatment for bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*. 2004 Nov;42(11):5170-5x
433. Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, Vidal A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2007; 13:2826–2832. [PubMed: 17569118]19.
434. Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*. 2000; 47:397–403.
435. Luhrs H, Gerke T, Muller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberger F, Scheppach W, Menzel T. Butyrate inhibits NF-kappaB activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol*. 2002; 37:458–466. [PubMed: 11989838)
436. Aoyama M, Kotani J, Usami M. Butyrate and propionate induced activated or non-activated neutrophil apoptosis via HDAC inhibitor activity but without activating GPR-41/GPR-43 pathways. *Nutrition*. 2010 Jun;26(6):653-61
437. Kurita-Ochiai T, Fukushima K, Ochiai K. Lipopolysaccharide stimulates butyric acid-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun*. 1999 Jan;67(1):22-9. 2: Kurita-Ochiai T, Amano S, Fukushima K, Ochiai K. Cellular events involved in butyric acid-induced T cell apoptosis. *J Immunol*. 2003 Oct 1;171(7):3576-84.34

438. Cox MA, Jackson J, Stanton M, Rojas-Triana A, Bober L, Lavery M, Yang X, Zhu F, Liu J, Wang S, Monsma F, Vassileva G, Maguire M, Gustafson E, Bayne M, Chou CC, Lundell D, Jenh CH. Short-chain fatty acids act as antiinflammatory mediators by regulating prostaglandin E(2) and cytokines. *World J Gastroenterol.* 2009; 15:5549–5557
439. Dolgushin II, Andreeva IuS, Plekhanova EV. Interaction of neutrophils and different bacterial agents. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii*2008;5:103–5
440. Beghini J, Giraldo PC, Riboldi R, Amaral RL, Eleutério J Jr, Witkin SS, Guimarães F. Altered CD16 expression on vaginal neutrophils from women with vaginitis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Mar;167(1):96-9
441. Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C, Hogg N. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *Journal of Immunology* 1994;15:1254–63.
442. Nusbaum P, Laine C, Seveau S, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization. *Biochemical Society Transactions* 2004;32:477–9.
443. Song HO, Lim YS, Moon SJ, Ahn MH, Ryu JS. Delayed human neutrophil apoptosis by *Trichomonas vaginalis* lysate. *Korean Journal of Parasitology* 2010;48:1–7
444. Hillier, S. L., M. A. Krohn, L. K. Rabe, S. J. Klebanoff, and D. A. Eschenbach. 1993. The normal vaginal flora, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin. Infect. Dis.* 16(Suppl. 4):S273–S281.
445. Krohn, M. A., S. L. Hillier, and D. A. Eschenbach. 1989. Comparison methods for diagnosing bacterial vaginosis among pregnant women. *J. Clin. Microbiol.* 27:1266–1271.
446. Rumyantseva TA, Bellen G, Romanuk TN, Shipulina OI, Guschin AE, Shipulin GA, Donders GG. Utility of Microscopic Techniques and Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction for the Diagnosis of Vaginal Microflora Alterations. *J Low Genit Tract Dis.* 2014 Jul 11.
447. Datcu R. Characterization of the vaginal microflora in health and disease. *Dan Med J.* 2014 Apr;61(4):B4830. PubMed PMID: 24814599.
448. Mengistie Z, Woldeamanuel Y, Asrat D, Yigeremu M. Comparison of clinical and gram stain diagnosis methods of bacterial vaginosis among pregnant women in ethiopia. *J Clin Diagn Res.* 2013 Dec;7(12):2701-3. doi:10.7860/JCDR/2013/5872.3736. Epub 2013 Dec 15.
449. Hemalatha R, Ramalaxmi BA, Swetha E, Balakrishna N, Mastromarino P. Evaluation of vaginal pH for detection of bacterial vaginosis. *Indian J Med Res.* 2013 Sep;138(3):354-9.
450. Chawla R, Bhalla P, Chadha S, Grover S, Garg S. Comparison of Hay's criteria with Nugent's scoring system for diagnosis of bacterial vaginosis. *Biomed Res Int.* 2013;2013:365194. doi: 10.1155/2013/365194. Epub 2013 Jun 13.
451. Mittal V, Jain A, Pradeep Y. Development of modified diagnostic criteria for bacterial vaginosis at peripheral health centres in developing countries. *J Infect Dev Ctries.* 2012 May 14;6(5):373-7.
452. Campos AA, Leite AP, Lisboa CV, Andrade CC, Bezerra AF, Mattar R, Souza Ed. Comparative study between the pH test and of the KOH versus Nugent score for diagnosis of bacterial vaginosis in pregnant women]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2012 May;34(5):209-14.

453. Gratacos, E., F. Figueras, M. Barranco, R. Ros, A. Andreu, P. L. Alonso, and V. Cararach. 1999. Prevalence of bacterial vaginosis and correlation of clinical to Gram stain diagnostic criteria in low risk pregnant women. *Eur. J. Epidemiol.* 15:913–916. 15).
454. Tam, M. T., M. Yungbluth, and T. Myles. 1998. Gram stain method shows better sensitivity than clinical criteria for detection of bacterial vaginosis in surveillance of pregnant low-income women in a clinical setting. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 6:273–275.
455. Sha BE, Chen HY, Wang QJ, Zariffard MR, Cohen MH, Spear GT. Utility of Amsel criteria, Nugent score, and quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Lactobacillus* spp. for diagnosis of bacterial vaginosis in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Microbiol.* 2005 Sep;43(9):4607-12.
456. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, 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
457. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, VanSimaey L, De Ganck C, Temmerman M, Vaneechoutte M: Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol* 2004, 4:16.
458. Ferris MJ, Maszta A, Martin DH: Use of species-directed 16S rRNA gene PCR primers for detection of *Atopobium vaginae* in patients with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2004, 42(12):5892-5894.
459. Thies FL, Konig W, Konig B: Rapid characterization of the normal and disturbed vaginal microbiota by application of 16S rRNA gene terminal RFLP fingerprinting. *J Med Microbiol* 2007, 56(Pt 6):755-761.
460. Burton JP, Chilcott CN, Al-Qumber M, Brooks HJ, Wilson D, Tagg JR, Devenish C: A preliminary survey of *Atopobium vaginae* in women attending the Dunedin gynaecology out-patients clinic: is the contribution of the hard-to-culture microbiota overlooked in gynaecological disorders?
461. Aust N Z J Obstet Gynaecol 2005, 45(5):450-452.] Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. *J Infect Dis.* 2006 Sep 15;194(6):828-36
462. Brotman RM, Ravel J, Cone RA, Zenilman JM (2010) Rapid fluctuation of the vaginal microbiota measured by Gram stain analysis. *Sex Transm Infect* 86(4):297–302.
463. Hay PE, Ugwumadu A, Chowns J (1997) Sex, thrush and bacterial vaginosis. *Int J STD AIDS* 8(10): 603–608.
464. Keane FE, Ison CA, Taylor-Robinson D (1997) A longitudinal study of the vaginal flora over a menstrual cycle. *Int J STD AIDS* 8(8): 489–494.
465. Schwebke JR, Richey CM, Weiss HL (1999) Correlation of behaviors with microbiological changes in vaginal flora. *J Infect Dis* 180(5): 1632–1636.
466. Eschenbach DA, Thwin SS, Patton DL, Hooton TM, Stapleton AE, et al. (2000) Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin Infect Dis* 30(6): 901–907.
467. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Fadrosh D, Chang K, Silver MI, Viscidi RP, Burke AE, Ravel J, Gravitt PE. Association between the vaginal microbiota,

- menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. *Menopause*. 2014; May;21(5): 450-8. doi: 10.1097/GME.0b013e3182a4690b0.
468. Priestley CJ, Jones BM, Dhar J, Goodwin L (1997) What is normal vaginal flora? *Genitourin Med* 73(1): 23–28.
469. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schutte UM, et al. 2012 Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 4(132): 132ra52.
470. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, et al. (2010) Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS One* 5(4): e10197
471. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, De Backer E, Temmerman M, et al. (2009) Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L.crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. *BMC Microbiol* 9: 116.
472. Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH, Ferris MJ (2010) Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 48(5): 1812–1819
473. Forsum U, Jakobsson T, Larsson PG, Schmidt H, Beverly A, Bjørnerem A, Carlsson B, Csango P, Donders G, Hay P, Ison C, Keane F, McDonald H, Moi H, Platz-Christensen JJ, Schwebke J. An international study of the interobserver variation between interpretations of vaginal smear criteria of bacterial vaginosis. *APMIS*. 2002 Nov;110(11):811-8
474. Ling Z, Kong J, Liu F, Zhu H, Chen X, Wang Y, Li L, Nelson KE, Xia Y, Xiang C. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics*. 2010 Sep 7;11:488.
475. Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, Hallén A, Fredlund H, Jensen JS, Engstrand L, Unemo M. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age-- sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One*. 2013 Apr 9;8(4):e60670
476. Witkin SS, Ledger WJ. Complexities of the uniquely human vagina. *Sci Transl Med*. 2012 May 2;4(132):132fs11
477. Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ, Moench TR. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod* 2001;16:1809-13
478. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PLoS One*. 2013 Nov 6;8(11):e80074.
479. Bai G, Gajer P, Nandy M, Ma B, Yang H, Sakamoto J, Blanchard MH, Ravel J, Brotman RM. Comparison of storage conditions for human vaginal microbiome studies. *PLoS One*. 2012;7(5):e36934. doi: 10.1371/journal.pone.0036934. Epub 2012 May 24
480. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infectious Diseases*. 2011; 11:200. [PubMed: 21771337] 2. Linhares IM, Summers PR, Larsen B, Giraldo PC, Witkin SS. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol*. 2010; 203:1.e1–1.e5
481. Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun*. 1999 Oct;67(10):5170-5

482. Marshall W, Tanner J. Puberty. In: Davis J, Dobbing J, editors. *Scientific Foundations of Paediatrics*. London: Heinemann; 1981
483. Farage MA, Maibach H. Lifetime changes in the vulva and vagina. *Arch Gynecol Obstet*. 2006;273:195–202
484. Larsen B, Monif GR. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin Infect Dis*. 2001;32:e69–77
485. Shafer MA, Sweet RL, Ohm-Smith MJ, Shalwitz J, Beck A, Schachter J. Microbiology of the lower genital tract in postmenarchal adolescent girls: differences by sexual activity, contraception, and presence of nonspecific vaginitis. *J Pediatr*. 1985;107:974–81
486. Galhardo CL, Soares JMJ, Simões RS, Haidar MA, Rodrigues de Lima G, Baracat EC. Estrogen effects on the vaginal pH, flora and cytology in late postmenopause after a long period without hormone therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2006;33:85–9. 48.
487. Gupta S, Kumar N, Singhal N, Kaur R, Manektala U. Vaginal microflora in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Indian J Pathol Microbiol*. 2006;49:457–61.3
488. Devillard E, Burton JP, Hammond J, Lam D, Reid G. Novel insight into the vaginal microflora in postmenopausal women under hormone replacement therapy as analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;117:76–81. 47.
489. Heinemann C, Reid G. Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Can J Microbiol*. 2005;51:777–81
490. Witkin SS. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Feb;204(2):120.e1-5.
491. Menard J.P, Mazouni C, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Bretelle F. Diagnostic accuracy of quantitative real-time PCR assay versus clinical and Gram stain identification of bacterial vaginosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* : Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology, 2010; 29(12), 1547–52
492. Pastore LM, Thorp JM Jr, Royce RA, Savitz DA, Jackson TP. Risk score for antenatal bacterial vaginosis: BV PIN points. *J Perinatol*. 2002 Mar;22(2):125-32. PubMed PMID: 11896517.
493. Zodzika J, Rezeberga D, Jermakova I, Vasina O, Vedmedovska N, Donders G. Factors related to elevated vaginal pH in the first trimester of pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011 Jan;90(1):41-6. doi: 10.1111/j.1600-0412.2010.01011.x. Epub 2010 Nov 26. PubMed PMID: 21275914
494. Wiesenfeld HC, Macio I. The infrequent use of office-based diagnostic tests for vaginitis. *Am J Obstet Gynecol*. 1999 Jul;181(1):39-41. Wiesenfeld HC, Macio I. A growing concern: inability to diagnose vulvovaginal infections correctly. *Obstet Gynecol*. 2004 Jul;104(1):199
495. Nenadić DB, Pavlović MD. Value of bacterial culture of vaginal swabs in diagnosis of vaginal infections. *Vojnosanit Pregl*. Accepted for press
496. Hammerschlag MR, Alpert S, Rosner I, et al. Microbiology of the vagina in children: normal and potentially pathogenic organisms. *Pediatrics*. 1978;62:57–62. Hammerschlag MR, Alpert S, Onderdonk AB, et al. Anaerobic microflora of the vagina in children. *Am J Obstet Gynecol*. 1978;131:853–6
497. Larsen B, Monif GR. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin Infect Dis*. 2001;32:e69–77.



498. Bach EA, Aguet M and Schreiber RD. The IFN $\gamma$  receptor: A paradigm for cytokine receptor signaling. *Ann Rev Immunol* 1997; 15:563-91. full B-ćelije takode produkuje IFN-gama.
499. Chang HC, et al. The transcription factor PU. 1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol.* 2010; 11:527–534.
500. Dardalhon V, et al. IL-4 inhibits TGF- $\beta$ -induced Foxp3 + T cells and, together with TGF- $\beta$ , generates IL-9 + IL-10 + Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol.* 2008; 9:1347–1355.
501. Staudt V, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity.* 2010; 33:192–202.
502. Veldhoen M, et al. Transforming growth factor- $\beta$  ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol.* 2008; 9:1341–1346.
503. Kaplan MH, et al. STAT3-dependent IL-21 production from T helper cells regulates hematopoietic progenitor cell homeostasis. *Blood.* 2011; 117:6198–6201. 6.
504. Goswami R, Kaplan MH. Gcn5 is required for PU. 1-dependent Interleukin-9 (IL-9) induction in Th9 cells. *J Immunol.* 2012; 189:3026–3033.
505. Tan C, et al. Antigen-specific Th9 cells exhibit uniqueness in their kinetics of cytokine production and short retention at the inflammatory site. *J Immunol.* 2010; 185:6795–6801.
506. Goswami R, Kaplan MH. A brief history of IL-9. *J Immunol.* 2011; 186:3283–3288.
507. Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M et al. Map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science.* 2004 Jan 23;303(5657):540-3.
508. Vidal M, Cusick ME, Barabási AL. Interactome networks and human disease. *Cell.* 2011 Mar 18;144(6):986-98. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.016. Review.
509. Missiuro PV, Liu K, Zou L, Ross BC, Zhao G, Liu JS, Ge H. Information flow analysis of interactome networks. *PLoS Comput Biol.* 2009 Apr;5(4):e1000350. doi: 10.1371/journal.pcbi.1000350. Epub 2009 Apr 10.
510. Cusick ME, Klitgord N, Vidal M, Hill DE. Interactome: gateway into systems biology. *Hum Mol Genet.* 2005 Oct 15;14 Spec No. 2:R171-81. Epub 2005 Sep 14. Review.
511. Dudley DJ. Immunoendocrinology of preterm labor: The link between corticotropin-releasing hormone and inflammation. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:S251-6. full
512. Korebrits C, Ramirez MM, Watson L, Brinkman E, Bocking AD, Challis JR. 1998 Maternal corticotropin-releasing hormone is increased with impending preterm birth. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 83:1585-1591. full
513. Copper RL, Goldenberg RL, Das A, Elder N, Swain M, Norman G, et al. The preterm prediction study: maternal stress is associated with spontaneous preterm birth at less than 35 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1286-92
514. Dudley DJ. Immunoendocrinology of preterm labor: The link between corticotropin-releasing hormone and inflammation. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:S251-6
515. Lockwood CJ. 1999 Stress-associated preterm delivery: the role of corticotropin-releasing hormone. *Am J Obstet Gynecol.* 180:264S-266S
516. Korebrits C, Ramirez MM, Watson L, Brinkman E, Bocking AD, Challis JR. Maternal corticotropin-releasing hormone is increased with impending preterm birth. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:1585-91.

517. McGregor JA, Jackson GM, Lachelin G. Salivary estriol as risk assessment for preterm labor: a prospective trial. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173:1337-42
518. Copper RL, Goldenberg RL, Das A, Elder N, Swain M, Norman G, et al. The preterm prediction study: maternal stress is associated with spontaneous preterm birth at less than 35 weeks' gestation. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:1286-92.
519. Lockwood CJ. 1999 Stress-associated preterm delivery: the role of corticotropin-releasing hormone. *Am J Obstet Gynecol.* 180:264S-266S.
520. Herrmann TS, Siega-Riz AM, Hobel CJ et al. Prolonged periods without food intake during pregnancy increase risk for elevated maternal corticotropin-releasing hormone concentrations. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:403-12
521. Karteris E, Grammatopoulos D, Randeve H and Hillhouse EW. Signal transduction characteristics of the Corticotropin-Releasing Hormone Receptors in the Feto-Placental Unit. *J Clin Endoc Metab* 2000; 85: 1989-96
522. Coleman MA, France JT, Schellenberg JC, Ananiew V, Townsend K, Keelan JA, et al. Corticotropin-releasing hormone, corticotropin-releasing hormone-binding protein, and activin A in maternal serum: prediction of preterm delivery and response to glucocorticoids in women with symptoms of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:643-8.
523. Jane Ellis M, Livesey JH, Inder WJ et al. Plasma corticotropin-releasing hormone and unconjugated estriol in human pregnancy: Gestational patterns and ability to predict preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:94-9
524. McLean M, Bisits A, Davies J, Walters W, Hackshaw A, de Voss K, et al. Predicting risk of preterm delivery by second-trimester measurement of maternal plasma corticotropin-releasing hormone and alpha-fetoprotein concentrations. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181:207-15.
525. Inder WJ, Prickett TCR, Jane Eliss M et al. The Utility of Plasma CRH as a Predictor of Preterm Delivery. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 5706–5710, 200
526. Christian LM, Glaser R, Porter K, Iams JD. Stress-induced inflammatory responses in women: effects of race and pregnancy. *Psychosom Med.* 2013Sep;75(7):658-69. doi: 10.1097/PSY.0b013e31829bbc89. Epub 2013 Jul 19.
527. Paul K, Boutain D, Manhart L, Hitti J. Racial disparity in bacterial vaginosis: the role of socioeconomic status, psychosocial stress, and neighborhood characteristics, and possible implications for preterm birth. *Soc Sci Med.* 2008 Sep;67(5):824-33. doi: 10.1016/j.socscimed.2008.05.017. Epub 2008 Jun 21.
528. Culhane JF, Rauh V, McCollum KF, Elo IT, Hogan V. Exposure to chronic stress and ethnic differences in rates of bacterial vaginosis among pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 2002 Nov;187(5):1272-6. PubMed PMID: 12439519.
529. Culhane JF, Rauh V, McCollum KF, Hogan VK, Agnew K, Wadhwa PD. Maternal stress is associated with bacterial vaginosis in human pregnancy. *Matern Child Health J.* 2001 Jun;5(2):127-34. PubMed PMID: 11573838
530. Shapiro GD, Fraser WD, Frasch MG, Séguin JR. Psychosocial stress in pregnancy and preterm birth: associations and mechanisms. *J Perinat Med.* 2013 Nov;41(6):631-45. doi: 10.1515/jpm-2012-0295. Review. PubMed PMID: 24216160
531. Opsjln SL, Wathen NC, Tingulstad S, Wiedswang G, Sundan A, Waage A, Austgulen R. Tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6 in normal human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169:397–404
532. . Romero R, Brody DT, Oyarzun E, Mazor M, Wu YK, Hobbins JC, et al. Infection and labor, III: interleukin-1: a signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol* 1989;160:1117-23

533. Hirsch E, Muhle RA, Mussalli GM and Blanchard R Bacterially induced preterm labor in the mouse does not require maternal interleukin-1 signaling. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:523-30
534. Romero, R, Mazor M, and Tartakovsky B. Systemic administration of interleukin-1 induces preterm parturition in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:969-971.
535. Hillier, SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts DH, Kiviat NB, and Eschenbach DA. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histologic chorioamnionitis, and chorioamnion infection. *Obstet Gynecol* 1993; 81: 941-8.
536. Romero, R, Mazor M, Brandt F, Sepulveda W, Avila C, Cotton DB, and Dinarello CA. Interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta in preterm and term human parturition. *Am J Reprod Immunol* 1992; 27: 117-123
537. Gibb W, Sun M. Cellular specificity of interleukin-1 beta stimulated expression of type-2 PGHS in human amnion cell culture. *Biol Reprod* 1998;59:1139-42
538. Hirsch E, Muhle RA, Mussalli GM and Blanchard R Bacterially induced preterm labor in the mouse does not require maternal interleukin-1 signaling. *Am J Obstet Gynecol* 2002;186:523-30
539. Baggia S, Gravett MG, Witkin SS, Haluska GJ, Novy MJ. Interleukin-1 $\beta$  intra-amniotic infusion induces tumor necrosis factor- $\alpha$ , prostaglandin production, and preterm contractions in pregnant Rhesus monkeys. *J Soc Gynecol Invest* 1996;3:121-6.
540. Romero R, Mazor M, Tartakovsky B. Systemic administration of interleukin-1 induces preterm parturition in mice. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:969-71
541. Bry K, Hallman M. Transforming growth factor- $\beta$ 2 prevents preterm delivery induced by interleukin-1 $\alpha$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  in the rabbit. *Am J Obstet Gynecol* 1993;168:1318-22
542. Coultrip LL, Lien JM, Gomez R, Kapernick P, Khoury A, Grossman JH. The value of amniotic fluid interleukin-6 determination in patients with preterm labor and intact membranes in the detection of microbial invasion of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol* 1994;171:901-11.
543. Hillier SL, Witkin SS, Krohn MA, Watts DH, Kiviat NB, Eschenbach DA. The relationship of amniotic fluid cytokines and preterm delivery, amniotic fluid infection, histological chorionamnionitis and chorioamniotic infection. *Obstet Gynecol* 1993;81:941-8.
544. Romero R, Avila C, Santhanam U, et al. Amniotic fluid interleukin-6 in preterm labor: association with infection. *J Clin Invest* 1990;85:1392-400.
545. Greig PC, Ernest JM, Tcot L, Erikson M, Talley R. Amniotic fluid interleukin-6 levels correlate with histologic chorioamnionitis and amniotic fluid cultures in patient in premature labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:1035-44.
546. Romero R, Yoon BH, Mazor M, et al. The diagnostic and prognostic value of amniotic fluid white blood cell count, glucose, interleukin-6, and Gram stain in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:805-16.)
547. Romero R, Yoon BH, Mazor M, Gomez R, Diamond MP, et al. The diagnostic and prognostic value of amniotic fluid white blood cell count, glucose, interleukin-6, and Gram stain in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:805-16.

548. Romero R, Yoon BH, Kenney JS, Gomez R, Allison AC, et al. Amniotic fluid interleukin-6 determinations are of diagnostic and prognostic value in preterm labor. *Am J Reprod Immunol* 1993;30:167-83.
549. Romero R, Yoon BH, Mazor M, Gomez R, Gonzales R, et al. A comparative study of the diagnostic performance of amniotic fluid glucose, white blood cell count, interleukin-6, and Gram stain in the detection of microbial invasion in patients with preterm premature rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:839-51
550. Rizzo G, Capponi A, Rinaldo D, Tedeschi D, Arduini D, et al. Interleukin-6 concentrations in cervical secretions identify microbial invasion of the amniotic cavity in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:812-7.
551. Dudley DJ, Trautman MS, Araneo B, Edwin SS, Mitchel MD. Decidual cell biosynthesis of IL-6: regulation by inflammatory cytokines. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:884-9.
552. Romero R, Avila C, Santhanam U, et al. Amniotic fluid interleukin-6 in preterm labor: association with infection. *J Clin Invest* 1990;85:1392-400.
553. Dudley DJ, Trautman MS, Edwin SS, Lundin-Schiler S and Mitchel MD. Biosynthesis of IL-6 by cultured human chorion laeve cells: regulation by cytokines *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1081-6.
554. Wenstrom KD, Andrews WW, Tamura T, DuBard MB, Johnston KE, Hemstreet GP. Elevated amniotic fluid interleukin-6 levels AF genetic amniocentesis predict subsequent pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:830-3
555. Romero R, Avila C, Santhanam U, et al. Amniotic fluid interleukin-6 in preterm labor: association with infection. *J Clin Invest* 1990;85:1392-400
- 556.
557. Yoon BH, Romero R, Kim CJ, Jun JK, Gomez R, Choi J-H, et al. Amniotic fluid interleukin-6: a sensitive test for antenatal diagnosis of acute inflammatory lesions of preterm placenta and prediction of perinatal mortality. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172: 960-70.x
558. Goepfert AR, Goldenberg, R. L, Andrews WW ez al. The preterm prediction study: association between cervical interleukin-6 concentrations and spontaneous preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184:483-8
559. Hemalatha R, Mastromarino P, Ramalaxmi BA, Balakrishna NV, Sesikeran B. Effectiveness of vaginal tablets containing lactobacilli versus pH tablets on vaginal health and inflammatory cytokines: a randomized, double-blind study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Nov;31(11):3097-105. doi:10.1007/s10096-012-1671-1. Epub 2012 Jul 10
560. Marconi C, Donders GG, Bellen G, Brown DR, Parada CM, Silva MG. Sialidase activity in aerobic vaginitis is equal to levels during bacterial vaginosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013 Apr;167(2):205-9. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.12.003. Epub 2013 Feb 1.
561. Cauci S, Culhane JF, Di Santolo M, McCollum K. Among pregnant women with bacterial vaginosis, the hydrolytic enzymes sialidase and prolidase are positively associated with interleukin-1beta. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Jan;198(1):132.e1-7.
562. Mattsby-Baltzer I, Platz-Christensen JJ, Hosseini N, Rosén P. IL-1beta, IL-6, TNFalpha, fetal fibronectin, and endotoxin in the lower genital tract of pregnant women with bacterial vaginosis. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1998 Aug;77(7):701-6.
563. Hedges SR, Barrientes F, Desmond RA, Schwebke JR. Local and systemic cytokine levels in relation to changes in vaginal flora. *J Infect Dis*. 2006 Feb 15;193(4):556-62. Epub 2006 Jan 17. PubMed PMID: 16425135.

564. Anton G, Rid J, Mylonas I, Friese K, Weissenbacher ER. Evidence of a TH1-shift of local vaginal inflammatory response during bacterial vaginosis. *Infection*. 2008 Mar;36(2):147-52. doi: 10.1007/s15010-007-7152-2. Epub 2008 Mar 12. PubMed PMID: 18330506.
565. Nikolaitchouk N, Andersch B, Falsen E, Strombeck L, Mattsby-Baltzer I: The lower genital tract microbiota in relation to cytokine-,SLPI- and endotoxin levels: application of checkerboard DNA-DNA hybridization (CDH). *APMIS* 2008; 116:263–277.
566. Orfanelli T, Jayaram A, Doulaveris G, Forney LJ, Ledger WJ, Witkin SS: Human epididymis protein 4 and secretory leukocyte protease inhibitor in vaginal fluid: relation to vaginal components and bacterial composition. *Reprod Sci* 2014; 21:538–542.
567. Sakai M, Ishiyama A, Tabata M, Sasaki Y, Yoneda S, Shiozaki A, Saito S: Relationship between cervical mucus interleukin-8 concentrations and vaginal bacteria in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2004; 52:106–112.
568. Kyongo JK, Jaspers V, Goovaerts O, Michiels J, Menten J, Fichorova RN, Crucitti T, Vanham G, Arien KK: Searching for lower female genital tract soluble and cellular biomarkers: defining levels and predictors in a cohort of healthy Caucasian women. *PLoS ONE* 2012; 7:e43951
569. Alvarez-Olmos MI, Barousse MM, Rajan L, Van Der Pol BJ, Fortenberry D, Orr D, Fidel PL Jr: Vaginal lactobacilli in adolescents: presence and relationship to local and systemic immunity, and to bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis* 2004; 31:393–400.
570. Xiao BB, Liao QP. [Analysis of diversity of vaginal microbiota in healthy Chinese women by using DNA-fingerprinting]. *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2012 Apr 18;44(2):281-7.
571. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosch DW, Bieda J, Chaemsathong P, Miranda J, Chaiworapongsa T, Ravel J. The vaginal microbiota of pregnant women who subsequently have spontaneous preterm labor and delivery and those with a normal delivery at term. *Microbiome*. 2014 May 27;2:18. doi:10.1186/2049-2618-2-18
572. Lockwood CJ, Ghidini A, Wein R, Lapinsky R, Casal D, Berkowitz RL. Increased interleukin-6 concentrations in cervical secretions are associated with preterm delivery
573. Rizzo G, CaPLoni A, Rinaldo D, Tedeschi D, Arduini D, Romanini C. Interleukin-6 concentrations in cervical secretions identify microbial invasion of the amniotic cavity in patients with preterm labor and intact membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175:812-7
574. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010 May;221(1):3-12. doi: 10.1002/path.2697. Review
575. Murrow L, Debnath J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol*. 2013 Jan 24;8:105-37. doi: 10.1146/annurev-pathol-020712-163918. Epub 2012 Oct 31. Review
576. Jayaram A, Orfanelli T, Doulaveris G, Linhares I, Ledger W, Witkin S. Autophagy and female genital tract infections: new insights and research directions. *BJOG*. 2014 Jun;121(7):801-8.
577. Li P, Du Q, Cao Z, Guo Z, Evankovich J, Yan W, et al. Interferon- $\gamma$  induces autophagy with growth inhibition and cell death in human hepatocellular carcinoma

- (HCC) cells through interferon-regulatory factor-1 (IRF-1). *Cancer Lett* 2012;314:213–22.)
578. Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, Pirhonen J, Varkila K, Kurimoto M, Julkunen I. Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun*. 1998 Dec;66(12):6058-62.
  579. Hirota Y, Cha J, Yoshie M, Daikoku T, Dey SK. Heightened uterine mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling provokes preterm birth in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:180738
  580. Forsum U, Holst E, Larsson PG, et al.:Bacterial vaginosis a microbiological and immunological enigma. *APMIS* 2005, 113: 81–90.
  581. Danielsson D, Teigen PK, Moi H. The genital econiche: focus on microbiota and bacterial vaginosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Aug;1230:48-58. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06041.x. Review.
  582. Nenadić DB, Pavlović MD. Cervical fluid cytokines in pregnant women: Relation to vaginal wet mount findings and polymorphonuclear leukocyte counts. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008 Oct;140(2):165-70.
  583. Anderson BL, Cu-Uvin S, Raker CA, Fitzsimmons C, Hillier SL. Subtle perturbations of genital microflora alter mucosal immunity among low-risk pregnant women. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011 May;90(5):510-5.
  584. Aboul Enien WM, El Metwally HA. Association of abnormal vaginal flora with increased cervical tumour necrosis factor--alpha and interferon--gamma levels in idiopathic infertility. *Egypt J Immunol*. 2005;12(2):53-9.
  585. Conde-Agudelo A, Papageorgiou AT, Kennedy SH, Villar J. Novel biomarkers for the prediction of the spontaneous preterm birth phenotype: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*. 2011 Aug;118(9):1042-54.
  586. Menon R, Torloni MR, Voltolini C, Torricelli M, Merialdi M, Betrán AP, Widmer M, Allen T, Davydova I, Khodjaeva Z, Thorsen P, Kacerovsky M, Tambor V, Massinen T, Nace J, Arora C. Biomarkers of spontaneous preterm birth: an overview of the literature in the last four decades. *Reprod Sci*. 2011 Nov;18(11):1046-70.
  587. Brou L, Almlı LM, Pearce BD, Bhat G, Drobek CO, Fortunato S, Menon R. Dysregulated biomarkers induce distinct pathways in preterm birth. *BJOG*. 2012 Mar;119(4):458-73.
  588. Thorsen P, Schendel DE, Deshpande AD, Vogel I, Dudley DJ, Olsen J. Identification of biological/biochemical marker(s) for preterm delivery. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2001 Jul;15 Suppl 2:90-103.,
  589. Kacerovsky M, Lenco J, Musilova I, Tambor V, Lamont R, Torloni MR, Menon R; PREBIC Biomarker Working Group 2012-2013. Proteomic biomarkers for spontaneous preterm birth: a systematic review of the literature. *Reprod Sci*. 2014 Mar;21(3):283-95. doi: 10.1177/1933719113503].
  590. Smith GC, Shah I, White IR, Pell JP, Crossley JA, Dobbie R. Maternal and biochemical predictors of spontaneous preterm birth among nulliparous women: a systematic analysis in relation to the degree of prematurity. *Int J Epidemiol*. 2006 Oct;35(5):1169-77
  591. Lockwood CJ, Senyei AE, Dische MR, Casal D, Shah KD, Thung SN, et al. Fetal fibronectin in cervical and vaginal secretions as a predictor of preterm delivery. *N Engl J Med* 1991;325:669-74.
  592. Nageotte MP, Casal D, Senyei AE. Fetal fibronectin in patients at increased risk for premature birth. *Am J Obstet Gynecol* 1994;170:20-5.

593. Inglis SR, Jeremias J, Kuno K, Lescale K, Peeper Q, Chervenak FA, et al. Detection of tumor necrosis factor-alpha, inter-leukin-6, and fetal fibronectin in the lower genital tract during pregnancy: relation to outcome. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171:5-10.
594. Iams JD, Casal D, McGregor JA, Goodwin TM, Kreaden US, Lowensohn R, et al. Fetal fibronectin improves the accuracy of diagnosis of preterm labor. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173:141-5.
595. Goldenberg RL, Mercer BM, Meis PJ, Copper RL, Das A, Mc-Nellis D. The preterm prediction study: fetal fibronectin testing and spontaneous preterm birth. NICHD Maternal Fetal Medicine Units Network. *Obstet Gynecol* 1996;87:643-8.
596. Goldenberg RL, Thom E, Moawad AH, Johnson F, Roberts J, Caritis SN. The preterm prediction study: fetal fibronectin, bacterial vaginosis, and peripartum infection: NICHD Maternal Fetal Medicine Units Network. *Obstet Gynecol* 1996;87:656-60
597. Andrews WW, Sibai BM, Thom EA, Dudley D, Ernest JM, McNellis D, Leveno KJ, Wapner R, Moawad A, O'Sullivan MJ, Caritis SN, Iams JD, Langer O, Miodovnik M, Dombrowski M; National Institute of Child Health & Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. Randomized clinical trial of metronidazole plus erythromycin to prevent spontaneous preterm delivery in fetal fibronectin-positive women. *Obstet Gynecol*. 2003 May;101(5 Pt 1):847-55.
598. Shennan A, Crawshaw S, Briley A, Hawken J, Seed P, Jones G, Poston L. A randomised controlled trial of metronidazole for the prevention of preterm birth in women positive for cervicovaginal fetal fibronectin: the PREMETS Study. *BJOG*. 2006 Jan;113(1):65-74.
599. Briery CM, Chauhan SP, Magann EF, Cushman JL, Morrison JC. Treatment of bacterial vaginosis does not reduce preterm birth among high-risk asymptomatic women in fetal fibronectin positive patients. *J Miss State Med Assoc*. 2011 Mar;52(3):72-5.
600. Andrews WW, Goldenberg RL; National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. What we have learned from an antibiotic trial in fetal fibronectin positive women. *Semin Perinatol*. 2003 Jun;27(3):231-8. Review.
601. Diaz-Cueto L, Dominguez-Lopez P, Tena-Alavez G, Cuica-Flores A, Rosales-Ortiz S, Arechavaleta-Velasco F. Effect of clindamycin treatment on vaginal inflammatory markers in pregnant women with bacterial vaginosis and a positive fetal fibronectin test. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009 Nov;107(2):143-6. doi:10.1016/j.ijgo.2009.06.015. Epub 2009 Aug 3.
602. McLaren JS, Hezelgrave NL, Ayubi H, Seed PT, Shennan AH. Prediction of spontaneous preterm birth using quantitative fetal fibronectin after recent sexual intercourse. *Am J Obstet Gynecol*. 2014 Jun 30. pii: S0002-9378(14)00635-8. doi: 10.1016/j.ajog.2014.06.055.
603. Faron G, Buyl R, Foulon W. Does recent sexual intercourse during pregnancy affect the results of the fetal fibronectin rapid test? A comparative prospective study. *J Perinat Med*. 2014 Jun 14. pii:/j/jpme.ahead-of-print/jpm-2014-0127/jpm-2014-0127.xml. doi:10.1515/jpm-2014-0127.
604. Shimoya K, Hashimoto K, Shimizu T, Saji F, Murata Y. Effect of sexual intercourse on fetal fibronectin concentration in cervicovaginal secretions. *Am J Obstet Gynecol*. 1998 Jul;179(1):255-6.

605. Fielding CA, McLoughlin RM, McLeod L, Colmont CS, Najdovska M, Grail D, Ernst M, Jones SA, Topley N, Jenkins BJ. IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J Immunol*. 2008 Aug 1;181(3):2189-95
606. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC Jr, Carl VS, Peterson VN. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis. *Arch Surg*. 1996 Jan;131(1):24-9; discussion 29-30.
607. Chan RL. Biochemical markers of spontaneous preterm birth in asymptomatic women. *Biomed Res Int*. 2014;2014:164081. doi: 10.1155/2014/164081. Epub 2014 Jan
608. Menon R. Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2008;87(6):590-600.
609. Menon R, Fortunato SJ, Thorsen P, Williams S. Genetic associations in preterm birth: a primer of marker selection, study design, and data analysis. *J Soc Gynecol Investig*. 2006 Dec;13(8):531-41.
610. Shah SJ, Yu KH, Sangar V, Parry SI, Blair IA. Identification and quantification of preterm birth biomarkers in human cervicovaginal fluid by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2009 May;8(5):2407-17. doi: 10.1021/pr8010342. Erratum in: *J Proteome Res*. 2009 Jul;8(7):3786.
611. Honest H, Bachmann LM, Sundaram R, Gupta JK, Kleijnen J, Khan KS. The accuracy of risk scores in predicting preterm birth--a systematic review. *J Obstet Gynaecol*. 2004 Jun;24(4):343-59. Review.
612. Peterson WE, Sprague AE, Reszel J, Walker M, Fell DB, Perkins SL, Dunn SI, Johnson M. Women's perspectives of the fetal fibronectin testing process: a qualitative descriptive study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014 Jun 4;14:190. doi: 10.1186/1471-2393-14-190
613. Honest H, Forbes CA, Durée KH, Norman G, Duffy SB, Tsourapas A, Roberts TE, Barton PM, Jowett SM, Hyde CJ, Khan KS. Screening to prevent spontaneous preterm birth: systematic reviews of accuracy and effectiveness literature with economic modelling. *Health Technol Assess*. 2009 Sep;13(43):1-627
614. Bhat G, Williams SM, Saade GR, Menon R. Biomarker interactions are better predictors of spontaneous preterm birth. *Reprod Sci*. 2014 Mar;21(3):340-50. doi:10.1177/1933719113497285.
615. Deshpande SN, van Asselt AD, Tomini F, Armstrong N, Allen A, Noake C, Khan K, Severens JL, Kleijnen J, Westwood ME. Rapid fetal fibronectin testing to predict preterm birth in women with symptoms of premature labour: a systematic review and cost analysis. *Health Technol Assess*. 2013 Sep;17(40):1-138. doi:10.3310/hta17400. Review
616. Dizon-Townson D, Major H, Varner M and Ward K. A promoter mutation that increases transcription of the tumor necrosis factor-alpha gene is not associated with preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:810-14.
617. Dizon-Townson D, Kinney S, LU J and Ward K. A promoter mutation in the tumor necrosis factor-alpha a possible association with intraamniotic infection and preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180:S97-103
618. Beack and A. Olek, *The Epigenome*, WILEY-VCH GmbH Co.KGaA, 2003
619. Rodenhiser D, Mann M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. *CMAJ* 2006; 174(3): 341-8.
620. S Zdenko Herceg, *Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors*, *Mutagenesis* vol. 22 no. 2 pp. 91–103, 2007.



621. Mitsuya K, Singh N, Sooranna SR, Johnson MR, Myatt L. Epigenetics of human myometrium: DNA methylation of genes encoding contraction-associated proteins in term and preterm labor. *Biol Reprod.* 2014 May 8;90(5):98. doi: 10.1095/biolreprod.113.113209. Print 2014 May. PubMed PMID: 24571989. 2:
622. Chan RL. Biochemical markers of spontaneous preterm birth in asymptomatic women. *Biomed Res Int.* 2014;2014:164081. doi: 10.1155/2014/164081. Epub 2014 Jan 19. PubMed PMID: 24551837; PubMed Central PMCID: PMC3914291. 3:
623. Luo X, Shi Q, Gu Y, Pan J, Hua M, Liu M, Dong Z, Zhang M, Wang L, Gu Y, Zhong J, Zhao X, Jenkins EC, Brown WT, Zhong N. LncRNA pathway involved in premature preterm rupture of membrane (PPROM): an epigenomic approach to study the pathogenesis of reproductive disorders. *PLoS One.* 2013 Nov 27;8(11):e79897. doi: 10.1371/journal.pone.0079897. eCollection 2013.
624. Cruickshank MN, Oshlack A, Theda C, Davis PG, Martino D, Sheehan P, Dai Y, Saffery R, Doyle LW, Craig JM. Analysis of epigenetic changes in survivors of preterm birth reveals the effect of gestational age and evidence for a long term legacy. *Genome Med.* 2013 Oct 18;5(10):96. doi: 10.1186/gm500. eCollection 2013.
625. Madan RP, Carpenter C, Fiedler T, Kalyoussef S, McAndrew TC, Viswanathan S, Kim M, Keller MJ, Fredricks DN, Herold BC. Altered biomarkers of mucosal immunity and reduced vaginal *Lactobacillus* concentrations in sexually active female adolescents. *PLoS One.* 2012;7(7):e40415. doi: 10.1371/journal.pone.0040415. Epub 2012 Jul 10.
626. Bartlett JG, Onderdonk AB, Drude E, Goldstein C, Anderka M, Alpert S, McCormack WM: Quantitative bacteriology of the vaginal flora. *J Infect Dis* 1977, 136:271–277.
627. Sautter RL, Brown WJ: Sequential vaginal cultures from normal young women. *J Clin Microbiol* 1980, 11:479–484.
628. Wilks M, Tabaqchali S: Quantitative bacteriology of the vaginal flora during the menstrual cycle. *J Med Microbiol* 1987, 24:241–245. 22. Priestley CJ, Jones BM, Dhar J, Goodwin L: What is normal vaginal flora? *Genitourin Med* 1997, 73:23–28.,
629. Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ, Eschenbach DA: The normal vaginal flora, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis* 1993, 16:S273–S281.
630. Korshunov VM, Gudieva ZA, Efimov BA, Pikina AP, Smeianov VV, Reid G, Korshunova OV, Tiutiunnik VL, Stepin II: [The vaginal Bifidobacterium flora in women of reproductive age]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1999, 4:74–78.
631. Rosenstein IJ, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Taylor-Robinson D. Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora. *J Med Microbiol.* 1996 Aug;45(2):120-6. PubMed PMID: 8683547.
632. Drell T, Lillsaar T, Tummeleht L, Simm J, Aaspõllu A, Väin E, Saarma I, Salumets A, Donders GG, Metsis M: Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. *PLoS One* 2013, 8:e54379.
633. Sundquist A, Bigdeli S, Jalili R, Druzin ML, Waller S, Pullen KM, El-Sayed YY, Taslimi MM, Batzoglou S, Ronaghi M: Bacterial flora-typing with targeted, chip-based pyrosequencing. *BMC Microbiol* 2007, 7:108.
634. Burton JP, Dixon JL, Reid G: Detection of Bifidobacterium species and Gardnerella vaginalis in the vagina using PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Int J Gynaecol Obstet* 2003, 81:61–63.

635. Hyman RW, Fukushima M, Diamond L, Kumm J, Giudice LC, Davis RW: Microbes on the human vaginal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:7952–7957.
636. Chaban B, Links MG, Jayaprakash TP, Wagner EC, Bourque DK, Lohn Z, Albert AY, van Schalkwyk J, Reid G, Hemmingsen SM, Hill JE, Money DM. Characterization of the vaginal microbiota of healthy Canadian women through the menstrual cycle. *Microbiome*. 2014 Jul 4;2:23. doi: 10.1186/2049-2618-2-23
637. Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, Mendling W, Schilling J, Patterson JL, Verstraelen H. Dissimilarity in the occurrence of Bifidobacteriaceae in vaginal and perianal microbiota in women with bacterial vaginosis. *Anaerobe*. 2010;Oct;16(5):478-82. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.06.011. Epub 2010 Jul 8.
638. Liu MB, Xu SR, He Y, Deng GH, Sheng HF, Huang XM, Ouyang CY, Zhou HW. Diverse vaginal microbiomes in reproductive-age women with vulvovaginal candidiasis. *PLoSOne*. 2013 Nov 12;8(11):e79812. doi: 10.1371/journal.pone.0079812. eCollection,2013.
639. Cook CM, Ellwood DA. A longitudinal study of the cervix in pregnancy using transvaginal ultrasound. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:16–8.
640. Smith CV, Anderson JC, Matamoros A, Rayburn WF. Transvaginal sonography of cervical width and length during pregnancy. *J Ultrasound Med* 1992;11:465–7.
641. Tongsong T, Kamprapanth P, Pitaksakorn J. Cervical length in normal pregnancy as measured by transvaginal sonography. *Int J Gynaecol Obstet* 1997;58:313–5
642. Smith CV, Anderson JC, Matamoros A, Rayburn WF. Transvaginal sonography of cervical width and length during pregnancy. *J Ultrasound Med* 1992;11:465–7.
643. Carvalho MH, Bittar RE, Brizot ML, Maganha PP, Borges da Fonseca ES, et al. Cervical length at 11–14 weeks' and 22–24 weeks' gestation evaluated by transvaginal sonography, and gestational age at delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;21:135–9
644. Iams JD, Romero R, Culhane JF, Goldenberg RL. Primary, secondary, and tertiary interventions to reduce the morbidity and mortality of preterm birth. *Lancet* 2008; 371: 164–175.
645. Taipale P, Hiilesmaa V. Sonographic measurement of uterine cervix at 18–22 weeks' gestation and the risk of preterm delivery. *Obstet Gynecol* 1998; 92: 902–907. Heath VC, Southall TR,
646. Souka AP, Elisseou A, Nicolaides KH. Cervical length at 23 weeks of gestation: prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998; 12: 312–317.
647. Iams JD, Goldenberg RL, Meis PJ, Mercer BM, Moawad A, Das A, Thom E, McNellis D, Copper RL, Johnson F, Roberts JM. The length of the cervix and the risk of spontaneous premature delivery. National Institute of Child Health and Human Development Maternal Fetal Medicine Unit Network. *N Engl J Med* 1996; 334: 567–572
648. Iams JD, Goldenberg RL, Meis PJ, Mercer BM, Moawad A, Das A, Thom E, McNellis D, Copper RL, Johnson F, Roberts JM. The length of the cervix and the risk of spontaneous premature delivery. *N Engl J Med*. 1996; 334:567–572.
649. Hassan SS, Romero R, Berry SM, Dang K, Blackwell SC, Treadwell MC, Wolfe HM. Patients with an ultrasonographic cervical length < or =15 mm have nearly

- a 50% risk of early spontaneous preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 182:1458–1467.
650. Salomon LJ, az-Garcia C, Bernard JP, Ville Y. Reference range for cervical length throughout pregnancy: non-parametric LMS-based model applied to a large sample. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009; 33:459–464.
  651. Fonseca EB, Celik E, Parra M, Singh M, Nicolaidis KH. Progesterone and the risk of preterm birth among women with a short cervix. *N Engl J Med.* 2007; 357:462–469.
  652. De Franco EA, O'Brien JM, Adair CD, Lewis DF, Hall DR, Fusey S, Soma-Pillay P, Porter K, How H, Schakis R, Eller D, Trivedi Y, Vanburen G, Khandelwal M, Trofatter K, Vidyadhari D, Vijayaraghavan J, Weeks J, Dattel B, Newton E, Chazotte C, Valenzuela G, Calda P, Bsharat M, Creasy GW. Vaginal progesterone is associated with a decrease in risk for early preterm birth and improved neonatal outcome in women with a short cervix: a secondary analysis from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007; 30:697–705.
  653. Dodd JM, Flenady VJ, Cincotta R, Crowther CA. Progesterone for the prevention of preterm birth: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2008; 112:127–134.)
  654. Mancuso MS, Owen J. Prevention of preterm birth based on a short cervix: cerclage. *Semin Perinatol.* 2009; 33:325–333.
  655. Owen J, Hankins G, Iams JD, Berghella V, Sheffield JS, Perez-Delboy A, Egerman RS, Wing DA, Tomlinson M, Silver R, Ramin SM, Guzman ER, Gordon M, How HY, Knudtson EJ, Szychowski JM, Cliver S, Hauth JC. Multicenter randomized trial of cerclage for preterm birth prevention in high-risk women with shortened midtrimester cervical length. *Am J Obstet Gynecol.* 2009; 201:375–378.
  656. Hassan S, Romero R, Hendler I, Gomez R, Khalek N, Espinoza J, Nien JK, Berry SM, Bujold E, Camacho N, Sorokin Y. A sonographic short cervix as the only clinical manifestation of intraamniotic infection. *J Perinat Med.* 2006; 34:13–19.
  657. Berghella V, Rust OA, Althuisius SM. Short cervix on ultrasound: does indomethacin prevent preterm birth? *Am J Obstet Gynecol.* 2006; 195:809–813.
  658. Nicolaidis KH, Tsoi E & To MS. Sonographic measurement of cervical length and preterm delivery. In Critchley HO, Bennett PR & Thornton S (eds.). *Preterm Birth.* RCOG Press, 2004, pp. 124–139
  659. Vendittelli F, Volumenie J. Transvaginal ultrasonography examination of the uterine cervix in hospitalised women undergoing preterm labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;90:3–11
  660. Crane JM, Van den Hof M, Armson BA, Liston R. Transvaginal ultrasound in the prediction of preterm delivery: singleton and twin gestations. *Obstet Gynecol* 1997;90:357–63. 102.
  661. Tsoi E, Akmal S, Rane S, Otigbah C, Nicolaidis KH. Ultrasound assessment of cervical length in threatened preterm labor. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003;21:552–5.
  662. Tsoi E, Fuchs IB, Rane S, Geerts L, Nicolaidis KH. Sonographic measurement of cervical length in threatened preterm labor in singleton pregnancies with intact membranes. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2005;25:353–6.
  663. Berghella V, Kuhlman K, Weiner S, Texeira L, Wapner RJ. Cervical funneling: sonographic criteria predictive of preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 1997;10:161–6

664. Berghella V, Roman A, Daskalakis C, Ness A, Baxter JK. Gestational age at cervical length measurement and incidence of preterm birth. *Obstet Gynecol* 2007;110:311–17
665. Crane JM, Hutchens D. Transvaginal sonographic measurement of cervical length to predict preterm birth in asymptomatic women at increased risk: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;31:579–87
666. Heath VC, Southall TR, Souka AP, Elisseou A, Nicolaides KH. Cervical length at 23 weeks of gestation: prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol* 1998;12:312–7
667. Ozdemir I, Demirci F, Yucel O, Erkorkmaz U. Ultrasonographic cervical length measurement at 10–14 and 20–24 weeks gestation and the risk of preterm delivery. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007;130:176–9
668. Andersen HF, Nugent CE, Wanty SD, Hayashi RH. Prediction of risk for preterm delivery by ultrasonographic measurement of cervical length. *Am J Obstet Gynecol* 1990;163:859–67
669. Berghella V, Baxter JK, Hendrix NW. Cervical assessment by ultrasound for preventing preterm delivery. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;CD007235.
670. Davies G, Ottenhof C, Woodman M, Farley A, Julien N, Van VD, et al. Cervix length and relaxin as predictors of preterm birth. *J Obstet Gynaecol Can* 2008;30:1124–31
671. Mancuso MS, Figueroa D, Szychowski JM, Paden MM, Owen J. Midtrimester bacterial vaginosis and cervical length in women at risk for preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2011 Apr;204(4):342.e1-5. doi: 10.1016/j.ajog.2010.11.003. Epub 2010 Dec 22.

## PRILOG 1

Tabela 37: Usporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Nugentu („zlatni standard“) i Nove Podele u 6 grupa (NP-6G)

NP-6G	NUGENT			$\Sigma$	
		NORMAL	INTERMEDIAR		BV
<b>NORMAL</b>	n	289	12	0	301
<b>FULL</b>	%	96,0	4,0	0,0	100,0
<b>NORMAL MID</b>	n	126	29	2	157
	%	80,3	18,5	1,3	100,0
<b>NORMAL NULL</b>	n	22	32	18	72
	%	30,6	44,4	25,0	100,0
<b>BV NULL</b>	n	4	28	17	49
	%	8,2	57,1	34,7	100,0
<b>BV MID</b>	n	3	10	46	59
	%	5,1	16,9	78,0	100,0
<b>BV FULL</b>	n	0	1	65	66
	%	0,0	1,5	98,5	100,0
$\Sigma$	n	444	112	148	704
	%	63,1	15,9	21,0	100,0

$\chi^2=669,80$ ;  $df=10$ ;  $p<0.001$

Tabela 38: Usporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Nugentu („zlatni standard“) i Nove Podele u 3 grupe (NP-3G)

NP-3G	NUGENT			$\Sigma$	
		NORMAL	INTERMEDIAL		BV
<b>NORMAL</b>	n	415	41	2	458
	%	90,6	9,0	0,4	100,0
<b>INTERMEDIAL</b>	n	26	60	35	121
	%	21,5	49,6	28,9	100,0
<b>BV</b>	n	3	11	111	125
	%	2,4	8,8	88,8	100,0
$\Sigma$	n	444	112	148	704
	%	63,1	15,9	21,0	100,0

$\chi^2=634,44$ ;  $df=4$ ;  $p<0.001$

**Tabela 39: Usporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Nugentu („zlatni standard“) i Nove Podele u 2 grupe (NP-2G)**

NP-2G		NUGENT			Σ
		NORMAL	INTERMEDIAL	BV	
NORMAL	n	437	73	20	530
	%	82,5	13,8	3,8	100,0
BV	n	7	39	128	174
	%	4,0	22,4	73,6	100,0
Σ	n	444	112	148	704
	%	63,1	15,9	21,0	100,0

$\chi^2=437,40$ ;  $df=2$ ;  $p<0.001$

**Tabela 40: Usporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Amselu i Nove Podele u 6 grupa (NP-6G)**

NP-6G		AMSEL		Σ
		NORMAL	BV	
NORMAL	n	262	1	263
	%	99,6	0,4	100,0
NORMAL	n	143	2	145
	%	98,6	1,4	100,0
NORMAL	n	51	14	65
	%	78,5	21,5	100,0
BV NULL	n	19	28	47
	%	40,4	59,6	100,0
BV MID	n	15	43	58
	%	25,9	74,1	100,0
BV FULL	n	2	61	63
	%	3,2	96,8	100,0
Σ	n	492	149	641
	%	76,8	23,2	100,0

$\chi^2=426,17$ ;  $df=5$ ;  $p<0.001$

**Tabela 41: Usporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Amselu i Nove Podele u 3 grupe (NP-3G)**

NP-3G		AMSEL		Σ
		NORMAL	BV	
NORMAL	n	405	3	408
	%	99,3	0,7	100,0
INTERMEDIAL	n	70	42	112
	%	62,5	37,5	100,0
BV	n	17	104	121
	%	14,0	86,0	100,0
Σ	n	492	149	641
	%	76,8	23,2	100,0

$\chi^2=395.29$ ;  $df=2$ ;  $p<0.001$

Tabela 42: Usporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Amselu i Nove Podele u 2 grupe (NP-2G)

NP-2G	AMSEL		$\Sigma$	
	NORMAL	BV		
NORMAL	n	456	17	473
	%	96,4	3,6	100,0
BV	n	36	132	168
	%	21,4	78,6	100,0
$\Sigma$	n	492	149	641
	%	76,8	23,2	100,0

$\chi^2=390,60$ ;  $df=1$ ;  $p<0.001$

Tabela 43: Usporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Ison/Hayu i Nugentu

Nugent	Ison/Hay					$\Sigma$	
	Čist nalaz	Normalan	Intermedia	BV	Koke		
NORMAL	n	2	406	17	0	19	444
	%	0,5	91,4	3,8	0,0	4,3	100,0
INTERMERDIAL	n	21	15	53	3	21	113
	%	18,6	13,3	46,9	2,7	18,6	100,0
BV	n	14	1	7	121	5	148
	%	9,5	0,7	4,7	81,8	3,4	100,0
$\Sigma$	n	37	422	77	124	45	705
	%	5,2	59,9	10,9	17,6	6,4	100,0

$\chi^2=894,33$ ;  $df=8$ ;  $p<0.001$

Tabela 44: Usporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Ison/Hayu i nove podele u 6 grupa (NP-6G)

NP-6G	Ison/Hay					$\Sigma$	
	Čist nalaz	Normalan	Intermedia	BV	Koke		
NORMAL FULL	n	1	281	15	0	4	301
	%	0,3	93,4	5,0	0,0	1,3	100,0
NORMAL MID	n	1	124	23	1	8	157
	%	0,6	79,0	14,6	0,6	5,1	100,0
NORMAL NULL	n	21	12	18	4	17	72
	%	29,2	16,7	25,0	5,6	23,6	100,0
BV NULL	n	13	2	11	12	11	49
	%	26,5	4,1	22,4	24,5	22,4	100,0
BV MID	n	1	3	8	42	5	59
	%	1,7	5,1	13,6	71,2	8,5	100,0
BV FULL	n	0	0	1	65	0	66
	%	0,0	0,0	1,5	98,5	0,0	100,0
$\Sigma$	n	37	422	76	124	45	704
	%	5,3	59,9	10,8	17,6	6,4	100,0

$\chi^2=862,73$ ;  $df=20$ ;  $p<0.001$

Tabela 45: Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Ison/Hayu i nove podele u 3 grupe (NP-3G)

NP-3G		Ison/Hay					$\Sigma$
		Čist nalaz	Normalan	Intermedia	BV	Koke	
NORMAL	n	2	405	38	1	12	458
	%	0,4	88,4	8,3	0,2	2,6	100,0
INTERMEDIAL	n	34	14	29	16	28	121
	%	28,1	11,6	24,0	13,2	23,1	100,0
BV	n	1	3	9	107	5	125
	%	0,8	2,4	7,2	85,6	4,0	100,0
$\Sigma$	n	37	422	76	124	45	704
	%	5,3	59,9	10,8	17,6	6,4	100,0

$\chi^2=819,41$ ; df=8; p<0.001

Tabela 46: Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Ison/Hayu i nove podele u 2 grupe (NP-2G)

NP-2G		Ison/Hay					$\Sigma$
		Čist nalaz	Normalan	Intermedia	BV	Koke	
NORMAL	n	23	417	56	5	29	530
	%	4,3	78,7	10,6	0,9	5,5	100,0
BV	n	14	5	20	119	16	174
	%	8,0	2,9	11,5	68,4	9,2	100,0
$\Sigma$	n	37	422	76	124	45	704
	%	5,3	59,9	10,8	17,6	6,4	100,0

$\chi^2=470,27$ ; df=4; p<0.001

Tabela 47: Uporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Claeyssu i Nugentu

Nugent		Claeys						$\Sigma$
		Normal	Intermedia	BV	Koke	Leukoreje	Sličan normalnom	
NORMAL	n	369	2	0	0	47	26	444
	%	83,1	0,5	0,0	0,0	10,6	5,9	100,0
INTERMERDIAL	n	11	84	1	4	6	7	113
	%	9,7	74,3	0,9	3,5	5,3	6,2	100,0
BV	n	0	6	142	0	0	0	148
	%	0,0	4,1	95,9	0,0	0,0	0,0	100,0
$\Sigma$	n	380	92	143	4	53	33	705
	%	53,9	13,0	20,3	0,6	7,5	4,7	100,0

$\chi^2=1155,27$ ; df=10; p<0.001



Tabela 48: Usporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Claeysu i nove podele u 6 grupa (NP-6G)

NP-6G	Claeys							$\Sigma$
	Normal	Intermedia	BV	Koke	Leukoreje	Sličan normalnom		
<b>NORMAL FULL</b>	n 240 % 79,7	6 2,0	0 0,0	1 0,3	36 12,0	18 6,0	301 100,0	
<b>NORMAL MID</b>	n 117 % 74,5	14 8,9	2 1,3	1 0,6	14 8,9	9 5,7	157 100,0	
<b>NORMAL NULL</b>	n 18 % 25,0	36 50,0	13 18,1	0 0,0	2 2,8	3 4,2	72 100,0	
<b>BV NULL</b>	n 4 % 8,2	25 51,0	17 34,7	1 2,0	0 0,0	2 4,1	49 100,0	
<b>BV MID</b>	n 1 % 1,7	9 15,3	46 78,0	1 1,7	1 1,7	1 1,7	59 100,0	
<b>BV FULL</b>	n 0 % 0,0	1 1,5	65 98,5	0 0,0	0 0,0	0 0,0	66 100,0	
$\Sigma$	n 380 % 54,0	91 12,9	143 20,3	4 0,6	53 7,5	33 4,7	704 100,0	

$\chi^2=734,47$ ; df=25; p<0.001

Tabela 49: Usporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Claeysu i nove podele u 3 grupe (NP-3G)

NP-3G	Claeys							$\Sigma$
	Normal	Intermedia	BV	Koke	Leukoreje	Sličan normalnom		
<b>NORMAL</b>	n 357 % 77,9	20 4,4	2 0,4	2 0,4	50 10,9	27 5,9	458 100,0	
<b>INTERMEDIA</b>	n 22 % 18,2	61 50,4	30 24,8	1 0,8	2 1,7	5 4,1	121 100,0	
<b>BV</b>	n 1 % 0,8	10 8,0	111 88,8	1 0,8	1 0,8	1 0,8	125 100,0	
$\Sigma$	n 380 % 54,0	91 12,9	143 20,3	4 0,6	53 7,5	33 4,7	704 100,0	

$\chi^2=707.72$ ; df=10; p<0.001

Tabela 50: Usporedni rezultati mikroskopskog pregleda na osnovu kriterijuma po Claeysu i nove podele u 2 grupe (NP-2G)

NP-2G	Claeys							$\Sigma$
	Normal	Intermedia	BV	Koke	Leukoreje	Sličan normalnom		
<b>NORMAL</b>	n 375 % 70,8	56 10,6	15 2,8	2 0,4	52 9,8	30 5,7	530 100,0	
<b>BV</b>	n 5 % 2,9	35 20,1	128 73,6	2 1,1	1 0,6	3 1,7	174 100,0	
$\Sigma$	n 380 % 54,0	91 12,9	143 20,3	4 0,6	53 7,5	33 4,7	704 100,0	

$\chi^2=481.25$ ; df=5; p<0.001

**Tabela 51: Raspodela KOKA po grupama na osnovu NP-6G**

NP-6G		NOR FULL	NOR MID	NOR NULL	BV NULL	BV MID	BV FULL	KOKE	Σ
<b>NORMAL</b>	n	254	0	0	0	0	0	47	301
<b>FULL</b>	%	84,4	0	0	0	0	0	15,6	100
<b>NORMAL</b>	n	0	116	0	0	0	0	41	157
<b>MID</b>	%	0	73,9	0	0	0	0	26,1	100,0
<b>NORMAL</b>	n	0	0	37	0	0	0	35	72
<b>NULL</b>	%	0	0	51,4	0	0	0	48,6	100
<b>BV NULL</b>	n	0	0	0	15	0	0	34	49
	%	0	0	0	30,6	0	0	69,4	100
<b>BV MID</b>	n	0	0	0	0	15	0	44	59
	%	0	0	0	0	25,4	0	74,6	100
<b>BV FULL</b>	n	0	0	0	0	0	9	57	66
	%	0	0	0	0	0	13,6	86,4	100
<b>Σ</b>	n	254	116	37	15	15	9	258	704
	%	36,1	16,5	5,3	2,1	2,1	1,3	36,6	100

$\chi^2=1260,863$ ;  $df=30$ ;  $p<0.001$

**Tabela 52: Raspodela LEPTO po grupama na osnovu NP-6G**

NP-6G		NOR FULL	NOR MID	NOR NULL	BV NULL	BV MID	BV FULL	LEPTO	Σ
<b>NORMAL</b>	n	292	0	0	0	0	0	9	301
<b>FULL</b>	%	97,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,0	100,0
<b>NORMAL</b>	n	0	149	0	0	0	0	8	157
<b>MID</b>	%	0,0	94,9	0,0	0,0	0,0	0,0	5,1	100,0
<b>NORMAL</b>	n	0	0	61	0	0	0	11	72
<b>NULL</b>	%	0,0	0,0	84,7	0,0	0,0	0,0	15,3	100,0
<b>BV NULL</b>	n	0	0	0	38	0	0	11	49
	%	0,0	0,0	0,0	77,6	0,0	0,0	22,4	100,0
<b>BV MID</b>	n	0	0	0	0	57	0	2	59
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	96,6	0,0	3,4	100,0
<b>BV FULL</b>	n	0	0	0	0	0	65	1	66
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	98,5	1,5	100,0
<b>Σ</b>	n	292	149	61	38	57	65	42	704
	%	41,5	21,2	8,7	5,4	8,1	9,2	6,0	100,0

$\chi^2=3245,245$ ;  $df=30$ ;  $p<0.001$

**Tabela 53: Raspodela BIFIDO formi po grupama na osnovu NP-6G**

NP-6G		NORMAL	BV	BIFIDO	$\Sigma$
NORMAL FULL	n	289	0	12	301
	%	96,0	0,0	4,0	100,0
NORMAL MID	n	138	0	19	157
	%	87,9	0,0	12,1	100,0
NORMAL NULL	n	60	0	12	72
	%	83,3	0,0	16,7	100,0
BV NULL	n	0	44	5	49
	%	0,0	89,8	10,2	100,0
BV MID	n	0	57	2	59
	%	0,0	96,6	3,4	100,0
BV FULL	n	0	66	0	66
	%	0,0	100,0	0,0	100,0
$\Sigma$	n	487	167	50	704
	%	69,2	23,7	7,1	100,0

$$\chi^2=697,083; df=10; p<0.001$$

**Tabela 54: Uporedni rezultati određivanja broja PMN na mikroskopskom uvećanju X200 i X400**

BROJ PMN X 200		BROJ PMN X 400				$\Sigma$
		PMN0	PMN1	PMN2	PMN3	
PMN0	n	161	26	4	0	191
	%	84,3	13,6	2,1	0,0	100,0
PMN1	n	58	160	22	8	248
	%	23,4	64,5	8,9	3,2	100,0
PMN2	n	10	43	42	25	120
	%	8,3	35,8	35,0	20,8	100,0
PMN3	n	5	18	45	64	132
	%	3,8	13,6	34,1	48,5	100,0
$\Sigma$	n	234	247	113	97	691
	%	33,9	35,7	16,4	14,0	100,0

$$\chi^2=557,628; df= 9; p<0.001$$

**Tabela 55: Usporedni rezultati određivanja broja PMN na mikroskopskom uvećanju X200 i X1000**

BROJ PMN X 200		BROJ PMN X 1000				Σ
		PMN0	PMN1	PMN2	PMN3	
PMN0	n	164	27	0	0	191
	%	85,9	14,1	0,0	0,0	100,0
PMN1	n	73	144	28	3	248
	%	29,4	58,1	11,3	1,2	100,0
PMN2	n	12	54	29	25	120
	%	10,0	45,0	24,2	20,8	100,0
PMN3	n	3	31	53	45	132
	%	2,3	23,5	40,2	34,1	100,0
Σ	n	252	256	110	73	691
	%	36,5	37,0	15,9	10,6	100,0

$\chi^2=471,181$ ; df= 9; p<0.001

**Tabela 56: : Raspodela pacijentkinja sa različitim brojem PMN na mikroskopskom uvećanju x200 po grupama pacijentkinja na osnovu Nugentovih dijagnostičkih kriterijuma**

Broj PMN X200		NUGENT			Σ
		NORMAL	INTERMEDIAL	BV	
PMN0	n	88	45	59	192
	%	45,8	23,4	30,7	100
PMN1	n	199	31	23	253
	%	78,7	12,3	9,1	100
PMN2	n	79	19	24	122
	%	64,8	15,6	19,7	100
PMN3	n	74	17	42	133
	%	55,6	12,8	31,6	100
Σ	n	440	112	148	700
	%	62,9	16	21,1	100

$\chi^2=62,51$ ; df= 6; p<0.001

**Tabela 57: Raspodela pacijentkinja sa različitim brojem PMN na mikroskopskom uvećanju x200 po grupama na osnovu podele po Ison/Hayu**

Broj PMN (X200)		Ison/Hay					Σ
		Čist nalaz	Normalan	Intermedia	BV	Koke	
PMN0	n	27	83	24	46	12	192
	%	14,1	43,2	12,5	24,0	6,3	100
PMN1	n	7	196	19	17	14	253
	%	2,8	77,5	7,5	6,7	5,5	100
PMN2	n	3	69	17	21	12	122
	%	2,5	56,6	13,9	17,2	9,8	100
PMN3	n	0	71	15	40	7	133
	%	0	53,4	11,3	30,1	5,3	100
Σ	n	37	419	75	124	45	700
	%	5,3	59,9	10,7	17,7	6,4	100

$$\chi^2=103,03; df= 12; p<0.001$$

**Tabela 58: Raspodela pacijentkinja sa različitim brojem PMN na mikroskopskom uvećanju x200 po grupama na osnovu podele po Claeyssu**

Broj PMN (X200)		Claeys					Sličan normal	Σ
		Normal	Intermedia	BV	Koke	Leukoreje		
PMN0	n	89	37	59	2	1	4	192
	%	46,4	19,3	30,7	1	0,5	2,1	100
PMN1	n	194	26	18	1	3	11	253
	%	76,7	10,3	7,1	0,4	1,2	4,3	100
PMN2	n	57	15	24	1	17	8	122
	%	46,7	12,3	19,7	0,8	13,9	6,6	100
PMN3	n	36	13	42	0	32	10	133
	%	27,1	9,8	31,6	0	24,1	7,5	100
Σ	n	376	91	143	4	53	33	700
	%	53,7	13	20,4	0,6	7,6%	4,7	100

$$\chi^2=182,16; df= 15; p<0.001$$

**Tabela 59: Raspodela pacijentkinja sa različitim brojem PMN na mikroskopskom uvećanju x200 po grupama na osnovu podele po Amselu**

BROJ PMN X200		AMSEL		Σ
		NORMAL	BV	
PMN0	n	112	65	177
	%	63,3	36,7	100
PMN1	n	202	18	220
	%	91,8	8,2	100
PMN2	n	89	23	112
	%	79,5	20,5	100
PMN3	n	86	43	129
	%	66,7	33,3	100
Σ	n	489	149	638
	%	76,6	23,4	100

$$\chi^2=53,64; df= 3; p<0.001$$

**Tabela 60: Raspodela pacijentkinja sa različitim brojem PMN na mikroskopskom uvećanju x200 po grupama na osnovu NP-6G**

NP-6G		BROJ PMN X 200				Σ
		PMN0	PMN1	PMN2	PMN3	
<b>NORMAL</b>	n	52	153	46	47	298
<b>FULL</b>	%	17,4	51,3	15,4	15,8	100,0
<b>NORMAL</b>	n	40	54	32	30	156
<b>MID</b>	%	25,6	34,6	20,5	19,2	100,0
<b>NORMAL</b>	n	29	19	18	6	72
<b>NULL</b>	%	40,3	26,4	25,0	8,3	100,0
<b>BV NULL</b>	n	21	11	11	6	49
	%	42,9	22,4	22,4	12,2	100,0
<b>BV MID</b>	n	15	13	7	23	58
	%	25,9	22,4	12,1	39,7	100,0
<b>BV FULL</b>	n	34	3	8	21	66
	%	51,5	4,5	12,1	31,8	100,0
<b>Σ</b>	n	191	253	122	133	699
	%	27,3	36,2	17,5	19,0	100,0

$$\chi^2=110,94; df=15;p<0.001$$

PRILOG 2

**Tabela 61: Mann-Whitney U test za podelu po Nugent-u**

IL-12p70	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 8,06$ ; $p = 0,018$ )		
	NORMALAN	INTERMED	BV
NORMALAN	-	<b>0,005</b>	0,736
INTERMED	<b>0,005</b>	-	<b>0,027</b>
BV	0,736	<b>0,027</b>	-
IL-6	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 17,09$ ; $p < 0,001$ )		
	NORMALAN	INTERMED	BV
NORMALAN	-	<b>0,042</b>	<b>0,000</b>
INTERMED	<b>0,042</b>	-	0,164
BV	<b>0,000</b>	0,164	-
IL-1 $\beta$	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 16,91$ ; $p < 0,001$ )		
	NORMALAN	INTERMED	BV
NORMALAN	-	0,086	<b>0,000</b>
INTERMED	0,086	-	0,092
BV	<b>0,000</b>	0,092	-

**Tabela 62: Mann-Whitney U test za podelu po Ison/Hay-u**

IL-12p70	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 17,21$ ; $p = 0,002$ )				
	Čist nalaz	Normalan	Intermed	BV	Koke
Čist nalaz	-	<b>0.004</b>	0.298	<b>0.002</b>	0.497
Normalan	<b>0.004</b>	-	<b>0.031</b>	0.494	<b>0.040</b>
Intermed	0.298	<b>0.031</b>	-	<b>0.019</b>	0.740
BV	<b>0.002</b>	0.494	<b>0.019</b>	-	<b>0.023</b>
Koke	0.497	<b>0.040</b>	0.740	<b>0.023</b>	-
IL-6	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 14,85$ ; $p = 0,005$ )				
	Čist nalaz	Normalan	Intermed	BV	Koke
Čist nalaz	-	<b>0.010</b>	0.138	0.655	0.058
Normalan	<b>0.010</b>	-	0.278	<b>0.002</b>	0.911
Intermed	0.138	0.655	-	0.196	0.547
BV	0.655	<b>0.002</b>	0.196	-	0.077
Koke	0.058	0.911	0.547	0.077	-
IL-1 $\beta$	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 15,56$ ; $p = 0,004$ )				
	Čist nalaz	Normalan	Intermed	BV	Koke
Čist nalaz	-	0.536	0.632	0.088	0.940
Normalan	0.536	-	0.727	<b>0.000</b>	0.457
Intermed	0.632	0.727	-	<b>0.011</b>	0.760
BV	0.088	<b>0.000</b>	<b>0.011</b>	-	0.116
Koke	0.940	0.457	0.760	0.166	-

**Tabela 63: Mann-Whitney U test za podelu po Clayes-u**

IL-6	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 19,16$ ; $p = 0,002$ )					
	Normal	Intermed	BV	Koke	Leukoreje	Sličan normalnom
Normal	-	0.233	<b>0.000</b>	0.434	0.722	0.059
Intermed	0.233	-	0.052	0.679	0.642	0.422
BV	<b>0.000</b>	0.052	-	0.758	<b>0.035</b>	0.598
Koke	0.434	0.679	0.758	-	0.583	0.858
Leukoreje	0.722	0.642	<b>0.035</b>	0.583	-	0.201
Sličan normalnom	0.059	0.422	0.598	0.858	0.201	-

IL-1 $\beta$	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 16,01$ ; $p = 0,007$ )					
	Normal	Intermed	BV	Koke	Leukoreje	Sličan normalnom
Normal	-	0.187	<b>0.000</b>	0.337	0.856	0.271
Intermed	0.187	-	<b>0.070</b>	0.445	0.572	0.792
BV	<b>0.000</b>	<b>0.070</b>	-	0.652	0.051	0.325
Koke	0.337	0.445	0.652	-	0.465	0.512
Leukoreje	0.856	0.572	0.051	0.465	-	0.483
Sličan normalnom	0.271	0.792	0.325	0.512	0.483	-

**Tabela 64: Mann-Whitney U test za podelu po Amsel-u**

IL-1 $\beta$	Mann-Whitney U (26913,000; $p = 0,015$ )	
	NORMAL	BV
NORMAL	-	<b>0,015</b>
BV	<b>0,015</b>	-



**Tabela 65: Mann-Whitney U test za podelu po NP-6G**

IL-12p70	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 18,52$ ; $p = 0,002$ )					
	NOR FULL	NOR MID	NOR NULL	BV NULL	BV MID	BV FULL
NOR FULL	-	<b>0.021</b>	<b>0.001</b>	0.625	0.192	0.239
NOR MID	<b>0.021</b>	-	0.357	0.063	<b>0.012</b>	0.413
NOR NULL	<b>0.001</b>	0.357	-	<b>0.007</b>	<b>0.020</b>	0.106
BV NULL	0.625	0.063	<b>0.007</b>	-	0.530	0.179
BV MID	0.192	<b>0.012</b>	<b>0.020</b>	0.530	-	0.062
BV FULL	0.239	0.413	0.106	0.179	0.062	-

IFN- $\gamma$	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 12,89$ ; $p = 0,024$ )					
	NOR FULL	NOR MID	NOR NULL	BV NULL	BV MID	BV FULL
NOR FULL	-	0.165	0.826	<b>0.006</b>	0.716	0.347
NOR MID	0.165	-	0.450	<b>0.001</b>	0.533	0.949
NOR NULL	0.826	0.450	-	<b>0.009</b>	0.899	0.596
BV NULL	<b>0.006</b>	<b>0.001</b>	<b>0.009</b>	-	<b>0.016</b>	<b>0.004</b>
BV MID	0.716	0.533	0.899	<b>0.016</b>	-	0.632
BV FULL	0.347	0.949	0.596	<b>0.004</b>	0.632	-

IL-6	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 12,09$ ; $p = 0,034$ )					
	NOR FULL	NOR MID	NOR NULL	BV NULL	BV MID	BV FULL
NOR FULL	-	0.318	0.179	0.136	0.160	<b>0.010</b>
NOR MID	0.318	-	0.690	0.431	0.510	<b>0.019</b>
NOR NULL	0.179	0.690	-	0.649	0.873	<b>0.074</b>
BV NULL	0.136	0.431	0.649	-	0.828	0.386
BV MID	0.160	0.510	0.873	0.828	-	0.189
BV FULL	<b>0.010</b>	<b>0.019</b>	<b>0.074</b>	0.386	0.189	-

IL-1 $\beta$	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 18,98$ ; $p = 0,002$ )					
	NOR FULL	NOR MID	NOR NULL	BV NULL	BV MID	BV FULL
NOR FULL	-	0.135	0.090	0.041	<b>0.003</b>	<b>0.010</b>
NOR MID	0.135	-	0.560	0.325	0.068	<b>0.038</b>
NOR NULL	0.090	0.560	-	0.704	0.309	0.168
BV NULL	<b>0.041</b>	0.325	0.704	-	0.531	0.361
BV MID	<b>0.003</b>	0.068	0.309	0.531	-	0.801
BV FULL	<b>0.010</b>	<b>0.038</b>	0.168	0.361	0.801	-

**Tabela 66: Mann-Whitney U test za podelu modifikovana NP-6G**

QPMN-A	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 14,78$ ; $p = 0,011$ )					
	NF	BVF+BVM	NF+NM/CA	BVF+BVM/CA	NN+BVN	NN+BVN/CA
NF+NM	-	0,082	0,755	<b>0,030</b>	0,095	<b>0,031</b>
BVF+BVM	0,082	-	0,105	<b>0,016</b>	<b>0,030</b>	<b>0,005</b>
NF+NM/CA	0,755	0,105	-	<b>0,040</b>	0,127	0,076
BVF+BVM/CA	<b>0,030</b>	0,016	<b>0,040</b>	-	0,726	0,418
NN+BVN	0,095	<b>0,030</b>	0,127	0,726	-	0,594
NN+BVN/CA	<b>0,031</b>	<b>0,005</b>	0,076	0,418	0,594	-
QPMN-B	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 48,20$ ; $p = 0,000$ )					
	NF	BVF+BVM	NF+NM/CA	BVF+BVM/CA	NN+BVN	NN+BVN/CA
NF	-	0,491	0,792	0,058	<b>0,000</b>	<b>0,007</b>
BVF+BVM	0,491	-	0,650	0,252	<b>0,000</b>	0,210
NF+NM/CA	0,792	0,650	-	0,091	<b>0,000</b>	<b>0,021</b>
BVF+BVM/CA	0,058	0,252	0,091	-	<b>0,000</b>	0,896
NN+BVN	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	-	<b>0,000</b>
NN+BVN/CA	<b>0,007</b>	0,210	<b>0,021</b>	0,896	<b>0,000</b>	-
IL-17A	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 13,99$ ; $p = 0,016$ )					
	NF	BVF+BVM	NF+NM/CA	BVF+BVM/CA	NN+BVN	NN+BVN/CA
NF	-	0,092	0,911	0,087	0,731	<b>0,005</b>
BVF+BVM	0,092	-	0,095	0,883	0,133	0,706
NF+NM/CA	0,911	0,095	-	0,077	0,872	<b>0,005</b>
BVF+BVM/CA	0,087	0,883	0,077	-	0,101	0,737
NN+BVN	0,731	0,133	0,872	0,101	-	<b>0,035</b>
NN+BVN/CA	<b>0,005</b>	0,706	<b>0,005</b>	0,737	<b>0,035</b>	-
IL-9	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 20,50$ ; $p = 0,001$ )					
	NF	BVF+BVM	NF+NM/CA	BVF+BVM/CA	NN+BVN	NN+BVN/CA
NF	-	<b>0,029</b>	0,204	<b>0,003</b>	0,904	<b>0,000</b>
BVF+BVM	<b>0,029</b>	-	0,185	0,415	0,107	0,670
NF+NM/CA	0,204	0,185	-	<b>0,021</b>	0,537	<b>0,011</b>
BVF+BVM/CA	<b>0,003</b>	0,415	<b>0,021</b>	-	<b>0,025</b>	0,621
NN+BVN	0,904	0,107	0,537	<b>0,025</b>	-	<b>0,023</b>
NN+BVN/CA	<b>0,000</b>	0,670	<b>0,011</b>	0,621	<b>0,023</b>	-
IL-6	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 16,58$ ; $p = 0,005$ )					
	NF	BVF+BVM	NF+NM/CA	BVF+BVM/CA	NN+BVN	NN+BVN/CA
NF	-	<b>0,000</b>	0,413	0,209	0,108	0,064
BVF+BVM	<b>0,000</b>	-	<b>0,001</b>	0,049	0,053	<b>0,018</b>
NF+NM/CA	0,413	<b>0,001</b>	-	0,451	0,268	0,263
BVF+BVM/CA	0,209	<b>0,049</b>	0,451	-	0,805	0,891
NN+BVN	0,108	0,053	0,268	0,805	-	0,847
NN+BVN/CA	0,064	<b>0,018</b>	0,263	0,891	0,847	-
IL-13	Kruskal Wallis test ( $x^2 = NF,14$ ; $p = 0,049$ )					
	NF	BVF+BVM	NF+NM/CA	BVF+BVM/CA	NN+BVN	NN+BVN/CA
NF	-	0,978	0,339	0,321	0,428	<b>0,035</b>
BVF+BVM	0,978	-	0,516	0,474	0,522	0,174
NF+NM/CA	0,339	0,516	-	0,091	0,897	<b>0,003</b>
BVF+BVM/CA	0,321	0,474	0,091	-	0,158	0,628
NN+BVN	0,428	0,522	0,897	0,158	-	<b>0,028</b>
NN+BVN/CA	<b>0,035</b>	0,174	<b>0,003</b>	0,628	<b>0,028</b>	-
IL-4	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 14,67$ ; $p = 0,012$ )					
	NF	BVF+BVM	NF+NM/CA	BVF+BVM/CA	NN+BVN	NN+BVN/CA
NF	-	0,224	0,730	0,112	0,271	<b>0,006</b>
BVF+BVM	0,224	-	0,271	0,690	0,056	0,434
NF+NM/CA	0,730	0,271	-	0,153	0,158	<b>0,010</b>
BVF+BVM/CA	0,112	0,690	0,153	-	<b>0,025</b>	0,716
NN+BVN	0,271	0,056	0,158	<b>0,025</b>	-	<b>0,003</b>
NN+BVN/CA	<b>0,006</b>	0,434	<b>0,010</b>	0,176	<b>0,003</b>	-
IL-1 $\beta$	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 32,53$ ; $p = 0,000$ )					
	NF	BVF+BVM	NF+NM/CA	BVF+BVM/CA	NN+BVN	NN+BVN/CA
NF	-	<b>0,000</b>	<b>0,011</b>	0,181	<b>0,012</b>	<b>0,000</b>
BVF+BVM	0,000	-	0,003	0,009	0,054	0,103
NF+NM/CA	<b>0,011</b>	<b>0,003</b>	-	0,682	0,526	<b>0,043</b>
BVF+BVM/CA	0,181	<b>0,009</b>	0,682	-	0,429	0,074
NN+BVN	<b>0,012</b>	0,054	0,526	0,429	--	0,403
NN+BVN/CA	<b>0,000</b>	0,103	<b>0,043</b>	0,074	0,403	-

**Tabela 67: Mann-Whitney U test za % apoptoze u podeli po Ison/Hay**

% Apoptoze	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 33,96$ ; $p = 0,027$ )				
	Čist nalaz	Normalan	Intermed	BV	Koke
Čist nalaz	-	<b>0.013</b>	<b>0.019</b>	0.198	<b>0.006</b>
Normalan	<b>0.013</b>	-	0.664	0.297	0.115
Intermed	<b>0.019</b>	0.664	-	0.156	0.343
BV	0.198	0.297	0.156	-	0.053
Koke	<b>0.006</b>	0.115	0.343	0.053	-

**Tabela 68: Mann-Whitney U test za % apoptoze u podeli po Claeysu**

% Apoptoze	Kruskal Wallis test ( $x^2 = 36,07$ ; $p = 0,050$ )					
	Normal	Intermed	BV	Koke	Leukoreje	Sličan normalnom
Normal	-	0.687	<b>0.091</b>	<b>0.08</b>	0.323	0.992
Intermed	0.687	-	0.189	<b>0.012</b>	0.352	0.736
BV	<b>0.091</b>	0.189	-	<b>0.033</b>	0.107	0.272
Koke	<b>0.08</b>	<b>0.012</b>	<b>0.033</b>	-	<b>0.011</b>	<b>0.028</b>
Leukoreje	0.323	0.352	0.107	<b>0.011</b>	-	0.611
Sličan normalnom	0.992	0.736	0.272	<b>0.028</b>	0.611	-

### PRILOG 3

**Tabela 69: Procenat apoptoze, kvantifikativno određivanje broja PMN, Dužina grlića materice, vaginalni pH i koncentracije ispitivanih citokina kod tri grupe pacijentkinja na osnovu podele po Nugentu**

parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Aoptoze				IL-1 $\beta$			
Normalan	131	11,87	9,66	Normalan	403	1087,10	1304,79
Intermed	47	12,22	9,15	Intermed	104	1283,65	1373,72
BV	39	15,46	12,49	BV	137	1628,41	1666,14
UKUPNO	217	12,59	10,16	UKUPNO	644	1233,99	1414,53
QPMN-A				TNF- $\alpha$			
Normalan	134	8,29	34,51	Normalan	402	13,85	58,28
Intermed	50	5,63	10,07	Intermed	104	6,51	10,93
BV	42	8,89	38,08	BV	136	13,23	33,04
UKUPNO	226	7,81	31,49	UKUPNO	642	12,53	48,79
QPMN-B				IL-12p70			
Normalan	427	0,61	1,35	Normalan	403	63,81	448,92
Intermed	109	0,87	2,43	Intermed	104	67,89	520,55
BV	146	2,54	9,92	BV	137	43,37	198,46
UKUPNO	682	1,07	4,86	UKUPNO	644	60,12	421,67
Dužina grlića				IFN- $\gamma$			
Normalan	425	40,69	7,04	Normalan	403	2905,71	14484,67
Intermed	109	40,20	5,87	Intermed	104	3370,10	15160,25
BV	145	39,74	6,95	BV	137	2078,05	12798,78
UKUPNO	679	40,41	6,84	UKUPNO	644	2804,64	14240,89
pH				IL-2			
Normalan	390	4,27	0,43	Normalan	403	49,27	133,45
Intermed	95	4,76	0,53	Intermed	104	25,92	54,33
BV	137	5,18	0,57	BV	137	39,49	69,19
UKUPNO	622	4,55	0,61	UKUPNO	644	43,42	112,66
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
IL-4				IL-17A			
Normalan	403	12,49	17,97	Normalan	403	127,54	1692,15
Intermed	104	9,59	13,97	Intermed	104	20,09	48,29
BV	137	12,39	20,26	BV	137	33,22	77,68
UKUPNO	644	12,00	17,92	UKUPNO	644	90,13	1339,47
IL-5				IL-22			
Normalan	403	20,62	85,56	Normalan	403	175,59	465,25
Intermed	104	21,28	82,54	Intermed	104	133,28	337,84
BV	137	19,69	70,08	BV	137	233,76	820,32
UKUPNO	644	20,53	81,90	UKUPNO	644	181,13	544,91
IL-6				IL-9			
Normalan	403	224,75	4003,45	Normalan	403	45,14	200,40
Intermed	104	1631,37	16324,59	Intermed	104	36,24	68,21
BV	137	629,62	6873,74	BV	137	36,63	73,97
UKUPNO	644	538,04	7934,67	UKUPNO	644	41,89	164,40
IL-13				IL-10			
Normalan	403	66,16	211,37	Normalan	403	1578,39	12298,99
Intermed	104	24,26	48,94	Intermed	104	2757,65	16633,42
BV	137	54,68	202,24	BV	137	20,01	71,36
UKUPNO	644	56,95	192,86	UKUPNO	644	1437,31	11815,78

**Tabela 70: Procenat apoptoze, kvantifikativno određivanje broja PMN, dužina grlića materice, vaginalni pH i koncentracije ispitivanih citokina kod pet grupa pacijentkinja na osnovu podele po Ison/Hay-u**

parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Apoptoze				IL-1 $\beta$			
Čist nalaz	17	19,68	15,29	Čist nalaz	35	1104,16	977,74
Normalan	122	12,16	9,67	Normalan	383	1116,92	1327,50
Intermedia	28	10,86	7,47	Intermedia	69	1130,56	1398,59
BV	28	13,49	8,42	BV	114	1719,88	1746,77
Koke	22	10,55	11,43	Koke	43	1260,22	1286,97
UKUPNO	217	12,59	10,16	UKUPNO	644	1233,99	1414,53
QPMN-A				TNF- $\alpha$			
Čist nalaz	18	1,50	1,61	Čist nalaz	35	9,91	17,04
Normalan	124	8,70	35,74	Normalan	382	14,33	59,71
Intermedia	30	6,90	11,40	Intermedia	69	5,82	8,57
BV	31	11,33	44,22	BV	113	14,46	35,76
Koke	23	4,45	9,55	Koke	43	4,35	6,36
UKUPNO	226	7,81	31,49	UKUPNO	642	12,53	48,79
QPMN-B				IL-12p70			
Čist nalaz	37	0,22	0,24	Čist nalaz	35	1,66	4,74
Normalan	407	0,62	1,36	Normalan	383	64,01	458,65
Intermedia	72	1,21	3,02	Intermedia	69	111,35	642,31
BV	122	2,93	10,80	BV	114	51,74	216,74
Koke	44	0,52	0,82	Koke	43	13,02	68,85
UKUPNO	682	1,07	4,86	UKUPNO	644	60,12	421,67
Dužina grlića				IFN- $\gamma$			
Čist nalaz	37	40,84	4,96	Čist nalaz	35	25,91	90,73
Normalan	405	40,54	7,16	Normalan	383	2944,43	14704,49
Intermedia	72	40,29	6,23	Intermedia	69	5025,89	18920,58
BV	121	39,90	6,99	BV	114	2028,59	13157,21
Koke	44	40,43	5,87	Koke	43	2314,36	8733,14
UKUPNO	679	40,41	6,84	UKUPNO	644	2804,64	14240,89
pH				IL-2			
Čist nalaz	33	4,83	0,42	Čist nalaz	35	37,14	57,91
Normalan	371	4,26	0,41	Normalan	383	51,72	137,49
Intermedia	63	4,64	0,59	Intermedia	69	21,72	38,92
BV	117	5,26	0,55	BV	114	42,18	73,43
Koke	38	4,70	0,62	Koke	43	12,70	17,90
UKUPNO	622	4,55	0,61	UKUPNO	644	43,42	112,66
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
IL-4				IL-4			
Čist nalaz	35	13,55	19,52	Čist nalaz	35	26,44	47,24
Normalan	383	12,88	18,36	Normalan	383	134,80	1735,66
Intermedia	69	9,00	10,54	Intermedia	69	19,08	40,29
BV	114	12,87	21,62	BV	114	33,17	82,49
Koke	43	5,49	5,86	Koke	43	9,02	17,77
UKUPNO	644	12,00	17,92	UKUPNO	644	90,13	1339,47
IL-5				IL-22			
Čist nalaz	35	42,04	119,79	Čist nalaz	35	114,88	218,38
Normalan	383	21,38	87,71	Normalan	383	175,43	465,99
Intermedia	69	15,10	54,45	Intermedia	69	241,82	1072,75
BV	114	20,48	76,02	BV	114	174,18	376,30
Koke	43	4,22	6,27	Koke	43	206,86	526,47
UKUPNO	644	20,53	81,90	UKUPNO	644	181,13	544,91
IL-6				IL-9			
Čist nalaz	35	39,09	70,58	Čist nalaz	35	31,90	58,87
Normalan	383	235,94	4106,60	Normalan	383	46,40	205,33
Intermedia	69	1193,63	9686,95	Intermedia	69	40,49	72,52
BV	114	45,39	91,74	BV	114	40,30	80,36
Koke	43	3889,02	25389,65	Koke	43	16,37	26,12
UKUPNO	644	538,04	7934,67	UKUPNO	644	41,89	164,40
IL-13				IL-10			
Čist nalaz	35	76,06	242,69	Čist nalaz	35	16,62	35,43
Normalan	383	65,39	205,11	Normalan	383	1661,64	12611,33
Intermedia	69	23,90	42,50	Intermedia	69	3318,91	19288,07
BV	114	59,02	220,59	BV	114	22,80	77,86
Koke	43	13,88	25,05	Koke	43	1326,42	8665,67
UKUPNO	644	56,95	192,86	UKUPNO	644	1437,31	11815,78

**Tabela 71: Procenat apoptoze, kvantifikativno određivanje broja PMN, dužina grlića materice, vaginalni pH i koncentracije ispitivanih citokina kod šest grupa pacijentkinja na osnovu podele po Claeys-u**

parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Apoptoze				IL-1 $\beta$			
Normalan	114	11,61	9,24	Normalan	347	1087,89	1316,01
Intermed	37	11,55	7,26	Intermed	85	1177,18	1211,51
BV	37	15,44	12,56	BV	132	1625,89	1679,40
Koke	4	29,56	15,72	Koke	4	2247,07	2160,10
Leukoreje	6	7,75	3,51	Leukoreje	44	1192,04	1488,79
Sličan normalnom	19	12,90	11,86	Sličan normalnom	32	1283,64	1308,23
UKUPNO	217	12,59	10,16	UKUPNO	644	1233,99	1414,53
QPMN-A				TNF- $\alpha$			
Normalan	117	8,94	36,83	Normalan	346	14,62	62,42
Intermed	40	5,17	9,50	Intermed	85	6,03	10,16
BV	40	9,24	39,00	BV	131	13,59	33,61
Koke	4	0,37	0,28	Koke	4	1,55	2,03
Leukoreje	6	2,84	3,60	Leukoreje	44	11,83	19,77
Sličan normalnom	19	6,55	10,39	Sličan normalnom	32	5,15	7,52
UKUPNO	226	7,81	31,49	UKUPNO	642	12,53	48,79
QPMN-B				IL-12p70			
Normalan	366	0,58	1,35	Normalan	347	67,19	480,32
Intermed	89	0,78	1,85	Intermed	85	82,76	575,35
BV	141	2,62	10,09	BV	132	44,83	202,06
Koke	4	0,35	0,06	Koke	4	0,01	0,01
Leukoreje	49	1,26	2,98	Leukoreje	44	28,78	120,06
Sličan normalnom	33	0,44	0,48	Sličan normalnom	32	36,93	134,94
UKUPNO	682	1,07	4,86	UKUPNO	644	60,12	421,67
Dužina grlića				IFN- $\gamma$			
Normalan	364	40,99	6,56	Normalan	347	2838,67	14353,89
Intermed	89	40,72	5,61	Intermed	85	2898,15	12591,92
BV	140	39,63	7,03	BV	132	2156,65	13034,20
Koke	4	36,50	5,26	Koke	4	2,47	1,72
Leukoreje	49	38,55	8,73	Leukoreje	44	4226,79	17303,31
Sličan normalnom	33	39,70	8,41	Sličan normalnom	32	3254,91	18388,55
UKUPNO	679	40,41	6,84	UKUPNO	644	2804,64	14240,89
pH				IL-2			
Normalan	327	4,26	0,39	Normalan	347	52,49	142,46
Intermed	78	4,77	0,54	Intermed	85	24,01	46,97
BV	134	5,20	0,56	BV	132	39,73	69,88
Koke	3	4,70	0,52	Koke	4	7,62	11,09
Leukoreje	48	4,22	0,41	Leukoreje	44	39,55	66,14
Sličan normalnom	32	4,63	0,74	Sličan normalnom	32	21,60	37,41
UKUPNO	622	4,55	0,61	UKUPNO	644	43,42	112,66
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
IL-4				IL17A			
Normalan	347	12,57	18,07	Normalan	347	143,84	1823,31
Intermed	85	9,54	14,96	Intermed	85	19,65	40,83
BV	132	12,32	20,30	BV	132	33,44	78,86
Koke	4	5,66	2,40	Koke	4	3,15	4,71
Leukoreje	44	13,67	19,26	Leukoreje	44	34,76	69,47
Sličan normalnom	32	9,58	10,72	Sličan normalnom	32	15,72	38,65
UKUPNO	644	12,00	17,92	UKUPNO	644	90,13	1339,47
IL-5				IL-22			
Normalan	347	21,37	91,29	Normalan	347	179,13	488,58
Intermed	85	24,63	90,93	Intermed	85	154,14	368,47
BV	132	19,70	71,16	BV	132	234,03	834,56
Koke	4	4,42	5,19	Koke	4	23,06	19,99
Leukoreje	4	17,44	35,30	Leukoreje	44	186,51	313,11
Sličan normalnom	44	10,13	18,87	Sličan normalnom	32	68,60	130,39
UKUPNO	32	20,53	81,90	UKUPNO	644	181,13	544,91
IL-6				IL-9			
Normalan	347	256,60	4314,30	Normalan	347	47,53	214,62
Intermed	85	1988,76	18057,20	Intermed	85	32,04	60,77
BV	132	654,05	7002,53	BV	132	37,16	75,26
Koke	4	12,28	16,45	Koke	4	13,35	16,56
Leukoreje	44	19,82	45,38	Leukoreje	44	45,22	87,92
Sličan normalnom	32	36,10	105,23	Sličan normalnom	32	25,38	26,48
UKUPNO	644	538,04	7934,67	UKUPNO	644	41,89	164,40
IL-13				IL-10			
Normalan	347	64,17	193,04	Normalan	347	1503,11	11778,28
Intermed	85	23,57	45,16	Intermed	85	2024,22	13762,63
BV	132	55,56	205,93	BV	132	20,41	72,64
Koke	4	10,71	12,08	Koke	4	1,72	3,02
Leukoreje	44	43,87	64,56	Leukoreje	44	2612,67	17205,15
Sličan normalnom	32	96,93	399,04	Sličan normalnom	32	3572,89	20177,04
UKUPNO	644	56,95	192,86	UKUPNO	644	1437,31	11815,78

**Tabela 72: Procenat apoptoze, kvantifikativno određivanje broja PMN, dužina grlića materice, vaginalni pH i koncentracije ispitivanih citokina kod tri grupe pacijentkinja na osnovu podele po Amsel-u**

Parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Apoptoze				IL-1 $\beta$			
Normalan	157	12,22	10,31	Normalan	455	1166,23	1360,75
BV	44	12,91	9,47	BV	137	1521,49	1600,59
QPMN-A				TNF- $\alpha$			
Normalan	162	8,24	31,78	Normalan	454	13,68	56,06
BV	48	8,10	35,64	BV	136	10,77	25,95
QPMN-B				IL-12p70			
Normalan	482	0,69	1,71	Normalan	455	74,50	496,18
BV	147	2,53	9,88	BV	137	27,40	118,75
Dužina grlića				IFN- $\gamma$			
Normalan	480	40,66	6,66	Normalan	455	3257,51	15379,33
BV	146	39,64	7,50	BV	137	2035,40	12623,31
pH				IL-2			
Normalan	472	4,32	0,44	Normalan	455	47,85	127,83
BV	148	5,29	0,48	BV	137	35,77	64,90
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
IL-4				IL-17A			
Normalan	455	12,89	18,42	Normalan	455	116,79	1592,79
BV	137	10,26	16,91	BV	137	23,21	57,51
IL-5				IL-22			
Normalan	455	21,96	85,14	Normalan	455	192,08	607,53
BV	137	14,67	58,24	BV	137	153,15	335,55
IL-6				IL-9			
Normalan	455	383,12	5325,57	Normalan	455	47,88	192,10
BV	137	1247,08	14223,17	BV	137	28,94	56,13
IL-13				IL-10			
Normalan	455	56,79	178,53	Normalan	455	1778,12	13537,49
BV	137	50,09	201,45	BV	137	433,43	4854,16

**Tabela 73: Procenat apoptoze, kvantifikativno određivanje broja PMN, dužina grlića materice, vaginalni pH i koncentracije ispitivanih citokina kod šest gupa pacijentkinja na osnovu NP-6G**

parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Apoptoze				IL-1 $\beta$			
NOR FULL	84	11,66	8,56	NOR FULL	275	1061,66	1376,17
NOR MID	59	12,52	10,68	NOR MID	141	1169,64	1244,52
NOR NULL	38	12,28	12,48	NOR NULL	67	1230,86	1206,28
BV NULL	10	20,26	13,04	BV NULL	45	1397,39	1460,59
BV MID	9	13,74	8,18	BV MID	55	1546,75	1590,18
BV FULL	17	12,98	8,30	BV FULL	60	1775,90	1800,49
UKUPNO	217	12,59	10,16	UKUPNO	643	1234,61	1415,54
Br. PMN - Metoda A				TNF- $\alpha$			
NOR FULL	84	9,85	42,47	NOR FULL	275	12,37	29,34
NOR MID	62	6,93	13,28	NOR MID	140	15,40	90,04
NOR NULL	39	3,48	7,39	NOR NULL	67	6,44	10,91
BV NULL	11	1,97	2,85	BV NULL	45	16,72	38,26
BV MID	12	4,54	11,65	BV MID	55	8,87	12,07
BV FULL	18	16,48	57,40	BV FULL	59	13,53	36,62
UKUPNO	226	7,81	31,49	UKUPNO	641	12,52	48,83
Br. PMN - Metoda B				IL-12p70			
NOR FULL	285	0,56	1,13	NOR FULL	275	54,59	384,78
NOR MID	154	0,66	1,81	NOR MID	141	28,49	127,93
NOR NULL	71	0,65	1,47	NOR NULL	67	169,29	968,55
BV NULL	49	0,44	0,68	BV NULL	45	14,41	67,26
BV MID	58	1,58	2,72	BV MID	55	88,51	297,55
BV FULL	64	4,78	14,70	BV FULL	60	17,26	80,70
UKUPNO	681	1,07	4,86	UKUPNO	643	57,43	416,43
Dužina grlića				IFN- $\gamma$			
NOR FULL	283	40,90	6,74	NOR FULL	275	3719,04	16605,72
NOR MID	154	40,02	7,15	NOR MID	141	1104,27	9196,51
NOR NULL	71	40,86	5,62	NOR NULL	67	1271,93	7416,22
BV NULL	49	40,29	7,12	BV NULL	45	9980,83	26590,56
BV MID	58	38,83	7,31	BV MID	55	507,03	3666,69
BV FULL	63	40,13	7,16	BV FULL	60	34,60	155,70
UKUPNO	678	40,40	6,85	UKUPNO	643	2710,35	14049,40
pH				IL-2			
NOR FULL	258	4,24	0,36	NOR FULL	275	54,58	154,54
NOR MID	138	4,31	0,47	NOR MID	141	31,24	60,92
NOR NULL	63	4,60	0,53	NOR NULL	67	36,96	67,00
BV NULL	45	5,06	0,54	BV NULL	45	43,44	76,70
BV MID	56	5,04	0,57	BV MID	55	30,44	50,12
BV FULL	61	5,47	0,43	BV FULL	60	40,60	75,77
UKUPNO	621	4,55	0,61	UKUPNO	643	43,48	112,74
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
IL-4				IL-17A			
NOR FULL	275	12,67	19,20	NOR FULL	275	172,56	2047,62
NOR MID	141	11,66	15,93	NOR MID	141	26,62	59,57
NOR NULL	67	10,81	12,80	NOR NULL	67	28,50	58,08
BV NULL	45	12,81	21,16	BV NULL	45	33,98	90,47
BV MID	55	9,79	13,95	BV MID	55	20,16	48,61
BV FULL	60	12,67	21,88	BV FULL	60	38,12	78,71
UKUPNO	643	12,02	17,93	UKUPNO	643	90,27	1340,51
IL-5				IL-22			
NOR FULL	275	18,01	50,48	NOR FULL	275	144,80	364,98
NOR MID	141	13,25	30,90	NOR MID	141	186,73	571,11
NOR NULL	67	33,61	179,48	NOR NULL	67	148,96	340,08
BV NULL	45	47,95	129,27	BV NULL	45	266,64	509,75
BV MID	55	10,16	17,92	BV MID	55	371,05	1250,89
BV FULL	60	23,84	95,71	BV FULL	60	128,03	193,83
UKUPNO	643	20,56	81,96	UKUPNO	643	180,74	545,24
IL-6				IL-9			
NOR FULL	275	316,06	4846,18	NOR FULL	275	46,89	236,84
NOR MID	141	31,00	80,47	NOR MID	141	44,38	83,00
NOR NULL	67	1221,00	9831,23	NOR NULL	67	30,75	42,92
BV NULL	45	50,84	99,16	BV NULL	45	40,35	104,12
BV MID	55	3057,15	22447,96	BV MID	55	25,66	44,20
BV FULL	60	49,31	99,81	BV FULL	60	42,30	72,28
UKUPNO	643	538,86	7940,82	UKUPNO	643	41,96	164,52
IL-13				IL-10			
NOR FULL	275	70,55	223,36	NOR FULL	275	2092,09	14470,68
NOR MID	141	41,20	129,70	NOR MID	141	1239,39	10705,69
NOR NULL	67	52,74	179,93	NOR NULL	67	863,52	6941,20
BV NULL	45	38,47	70,12	BV NULL	45	25,88	59,65
BV MID	55	33,92	71,49	BV MID	55	29,92	102,40
BV FULL	60	72,30	294,39	BV FULL	60	12,34	31,02
UKUPNO	643	57,04	193,00	UKUPNO	643	1262,03	10955,04



**Tabela 74: Procenat apoptoze, kvantifikativno određivanje broja PMN, dužina grlića materice, vaginalni pH i koncentracije ispitivanih citokina kod tri gupe pacijentkinja na osnovu NP-3G**

parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Apoptoze				IL-1 $\beta$			
Normalan	143	12,02	9,47	Normalan	416	1098,26	1332,48
Intermed	48	13,94	12,88	Intermed	112	1297,77	1310,56
BV	26	13,24	8,10	BV	115	1666,31	1699,64
UKUPNO	217	12,59	10,16	UKUPNO	643	1234,61	1415,54
QPMN-A				TNF- $\alpha$			
Normalan	146	8,61	33,29	Normalan	415	13,39	57,39
Intermed	50	3,15	6,67	Intermed	112	10,57	26,02
BV	30	11,70	44,93	BV	114	11,28	27,63
UKUPNO	226	7,81	31,49	UKUPNO	641	12,52	48,83
QPMN-B				IL-12p70			
Normalan	439	0,60	1,40	Normalan	416	45,75	321,60
Intermed	120	0,57	1,21	Intermed	112	107,06	751,93
BV	122	3,26	10,89	BV	115	51,33	215,84
UKUPNO	681	1,07	4,86	UKUPNO	643	57,43	416,43
Dužina grlića				IFN- $\gamma$			
Normalan	437	40,59	6,89	Normalan	416	2832,78	14564,63
Intermed	120	40,63	6,25	Intermed	112	4771,04	18203,62
BV	121	39,50	7,23	BV	115	260,54	2537,17
UKUPNO	678	40,40	6,85	UKUPNO	643	2710,35	14049,40
pH				IL-2			
Normalan	396	4,27	0,40	Normalan	416	46,67	130,93
Intermed	108	4,79	0,58	Intermed	112	39,57	70,79
BV	117	5,26	0,54	BV	115	35,74	64,71
UKUPNO	621	4,55	0,61	UKUPNO	643	43,48	112,74
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
IL-4				IL-17A			
Normalan	416	12,33	18,14	Normalan	416	123,09	1665,59
Intermed	112	11,62	16,61	Intermed	112	30,70	72,51
BV	115	11,30	18,49	BV	115	29,53	66,38
UKUPNO	643	12,02	17,93	UKUPNO	643	90,27	1340,51
IL-5				IL-22			
Normalan	416	16,39	44,83	Normalan	416	159,01	445,40
Intermed	112	39,37	160,71	Intermed	112	196,24	418,48
BV	115	17,30	70,28	BV	115	244,25	880,62
UKUPNO	643	20,56	81,96	UKUPNO	643	180,74	545,24
IL-6				IL-9			
Normalan	416	219,44	3940,37	Normalan	416	46,04	198,39
Intermed	112	750,84	7602,98	Intermed	112	34,61	73,59
BV	115	1487,84	15523,44	BV	115	34,34	60,82
UKUPNO	643	538,86	7940,82	UKUPNO	643	41,96	164,52
IL-13				IL-10			
Normalan	416	60,60	197,00	Normalan	416	1803,07	13307,23
Intermed	112	47,00	145,77	Intermed	112	526,97	5368,36
BV	115	53,95	218,27	BV	115	20,75	74,45
UKUPNO	643	57,04	193,00	UKUPNO	643	1262,03	10955,04

**Tabela 75: Procenat apoptoze, kvantifikativno određivanje broja PMN, dužina grlića materice, vaginalni pH i koncentracije ispitivanih citokina kod dve grupe pacijentkinja na osnovu NP-2G**

parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Apoptoze				IL-1 $\beta$			
Normalan	181	12,07	10,13	Normalan	483	1116,65	1315,32
BV	36	15,19	10,04	BV	160	1590,68	1635,92
QPMN-A				TNF- $\alpha$			
Normalan	185	7,53	29,82	Normalan	482	12,43	53,45
BV	41	9,09	38,53	BV	159	12,82	30,98
QPMN-B				IL-12p70			
Normalan	510	0,60	1,41	Normalan	483	62,88	468,33
BV	171	2,45	9,28	BV	160	40,95	186,90
DUŽINA GRLIĆA				IFN- $\gamma$			
Normalan	508	40,63	6,72	Normalan	483	2616,27	13800,89
BV	170	39,73	7,19	BV	160	2994,37	14815,50
pH				IL-2			
Normalan	459	4,31	0,44	Normalan	483	45,33	124,04
BV	162	5,21	0,55	BV	160	37,91	68,13
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
IL-4				IL-17A			
Normalan	483	12,12	17,50	Normalan	483	109,97	1546,00
BV	160	11,72	19,23	BV	160	30,78	73,68
IL-5				IL-22			
Normalan	483	18,78	78,59	Normalan	483	157,62	432,03
BV	160	25,92	91,42	BV	160	250,55	792,48
IL-6				IL-9			
Normalan	483	358,38	5169,43	Normalan	483	43,92	184,85
BV	160	1083,68	13160,50	BV	160	36,03	75,23
IL-13				IL-10			
Normalan	483	59,51	194,56	Normalan	483	1672,74	12616,27
BV	160	49,59	188,60	BV	160	22,19	70,46

**Tabela 76: Ispitivani parametri u podeli u kojoj su sve pacijentkinje sa *C. albicans* na osnovu semikvantitativne podele svrstane u tri grupe, a preostale pacijentkinje u grupu sa normalnim nalazom i BV (NP-2G/CA)**

parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Apoptoze				IL-1 $\beta$			
NOR	128	13,28	11,21	NOR	344	1028,24	1270,24
BV	20	17,07	10,60	BV	83	1683,69	1554,55
CA NULL	35	9,95	6,67	CA NULL	117	1476,84	1793,23
CA MID	20	9,79	6,87	CA MID	66	1373,60	1228,16
CA FULL	14	10,43	8,22	CA FULL	33	1119,48	862,28
UKUPNO	217	12,59	10,16	UKUPNO	643	1234,61	1415,54
QPMN-A				TNF- $\alpha$			
NOR	131	6,58	31,98	NOR	343	13,04	62,45
BV	23	1,57	2,61	BV	83	14,07	32,02
CA NULL	36	5,60	9,56	CA NULL	117	13,00	27,64
CA MID	21	16,49	36,62	CA MID	66	9,02	13,39
CA FULL	15	21,29	62,33	CA FULL	32	8,53	14,33
UKUPNO	226	7,81	31,49	UKUPNO	641	12,52	48,83
QPMN-B				IL-12p70			
NOR	360	0,48	0,91	NOR	344	70,37	480,28
BV	88	0,48	0,69	BV	83	33,50	138,29
CA NULL	128	0,93	2,10	CA NULL	117	75,99	507,95
CA MID	72	3,22	13,09	CA MID	66	14,87	72,82
CA FULL	33	4,89	8,00	CA FULL	33	1,98	5,49
UKUPNO	681	1,07	4,86	UKUPNO	643	57,43	416,43
Dužina griča				IFN- $\gamma$			
NOR	358	41,04	6,13	NOR	344	2807,59	14304,85
BV	87	40,09	7,30	BV	83	3863,72	16684,28
CA NULL	128	39,44	7,92	CA NULL	117	2509,36	14300,11
CA MID	72	40,38	7,16	CA MID	66	1268,62	7566,10
CA FULL	33	38,12	7,27	CA FULL	33	2391,93	13700,84
UKUPNO	678	40,40	6,85	UKUPNO	643	2710,35	14049,40
pH				IL-2			
NOR	317	4,30	0,42	NOR	344	41,45	125,88
BV	86	5,23	0,45	BV	83	41,66	64,34
CA NULL	118	4,51	0,60	CA NULL	117	54,99	125,87
CA MID	71	4,71	0,69	CA MID	66	36,84	66,89
CA FULL	29	4,89	0,79	CA FULL	33	41,65	86,10
UKUPNO	621	4,55	0,61	UKUPNO	643	43,48	112,74
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
IL-4				IL-17A			
NOR	344	10,57	15,97	NOR	344	134,69	1830,91
BV	83	13,11	20,25	BV	83	30,53	71,76
CA NULL	117	15,60	23,20	CA NULL	117	47,96	112,84
CA MID	66	12,14	13,75	CA MID	66	36,51	71,00
CA FULL	33	11,54	15,93	CA FULL	33	34,89	64,46
UKUPNO	643	12,02	17,93	UKUPNO	643	90,27	1340,51
IL-5				IL-22			
NOR	344	18,68	90,61	NOR	344	154,46	418,45
BV	83	32,21	111,85	BV	83	285,35	1015,60
CA NULL	117	22,60	57,03	CA NULL	117	201,34	541,69
CA MID	66	15,23	27,66	CA MID	66	150,97	317,11
CA FULL	33	14,25	29,05	CA FULL	33	178,19	370,52
UKUPNO	643	20,56	81,96	UKUPNO	643	180,74	545,24
IL-6				IL-9			
NOR	344	490,81	6122,84	NOR	344	40,45	212,19
BV	83	59,90	113,27	BV	83	33,13	63,79
CA NULL	117	1449,21	15391,34	CA NULL	117	55,04	103,24
CA MID	66	27,62	52,29	CA MID	66	39,22	54,59
CA FULL	33	39,19	111,35	CA FULL	33	39,01	66,57
UKUPNO	643	538,86	7940,82	UKUPNO	643	41,96	164,52
IL-13				IL-10			
NOR	344	56,22	191,03	NOR	344	2174,98	14610,00
BV	83	65,30	255,10	BV	83	23,79	85,79
CA NULL	117	67,19	219,47	CA NULL	117	25,64	66,60
CA MID	66	41,44	63,62	CA MID	66	875,46	6993,48
CA FULL	33	40,07	71,95	CA FULL	33	16,24	34,02
UKUPNO	643	57,04	193,00	UKUPNO	643	1262,03	10955,04

**Tabela 77: Procenat apoptoze, kvantifikativno određivanje broja PMN, dužina grlića materice i koncentracije ispitivanih citokina kod dve grupe pacijentkinja na osnovu pH**

parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Apoptoze				IL-1 $\beta$			
Zdrave	149	12,10	10,05	Zdrave	419	1131,49	1260,95
Bolesne	46	13,73	10,78	Bolesne	157	1552,07	1735,18
QPMN-A				TNF- $\alpha$			
Zdrave	152	8,22	32,66	Zdrave	417	13,76	58,30
Bolesne	52	8,45	34,56	Bolesne	157	11,03	24,77
QPMN-B				IL-12p70			
Zdrave	446	0,69	1,61	Zdrave	419	74,76	509,09
Bolesne	165	2,16	9,30	Bolesne	157	39,58	185,97
Dužina grlića				IFN- $\gamma$			
Zdrave	444	40,70	6,65	Zdrave	419	2643,98	13344,40
Bolesne	164	40,00	7,08	Bolesne	157	4328,96	18751,36
pH				IL-2			
Zdrave	455	4,23	0,27	Zdrave	419	47,21	130,66
Bolesne	167	5,41	0,40	Bolesne	157	37,62	67,55
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
IL-4				IL-17A			
Zdrave	419	12,39	18,00	Zdrave	419	121,72	1659,66
Bolesne	157	11,29	17,01	Bolesne	157	27,55	61,94
IL-5				IL-22			
Zdrave	419	22,75	92,48	Zdrave	419	175,24	481,61
Bolesne	157	13,75	32,07	Bolesne	157	144,07	260,02
IL-6				IL-9			
Zdrave	419	413,18	5549,08	Zdrave	419	45,99	198,13
Bolesne	157	1091,70	13286,46	Bolesne	157	33,86	60,92
IL-13				IL-10			
Zdrave	419	54,36	172,94	Zdrave	419	1520,08	12064,76
Bolesne	157	57,80	218,19	Bolesne	157	1467,53	12840,25

**Tabela 78: Procenat apoptoze, kvantifikativno određivanje broja PMN, dužina grlića materice, vaginalni pH i koncentracije ispitivanih citokina kod tri gupe pacijentkinja na osnovu rezultata testa sa 10% KOH**

parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Apoptoze				IL-1 $\beta$			
Negativan	157	11,90	9,72	Negativan	455	1157,65	1316,22
Pozitivan	44	14,75	11,65	Pozitivan	137	1531,95	1734,79
QPMN-A				TNF- $\alpha$			
Negativan	162	8,48	32,74	Negativan	454	13,36	57,09
Pozitivan	48	7,41	33,71	Pozitivan	136	11,84	31,38
QPMN-B				IL-12p70			
Normalan	482	0,66	1,56	Negativan	455	80,45	516,07
BV	147	2,16	9,29	Pozitivan	137	23,67	109,09
Dužina grlića				IFN- $\gamma$			
Negativan	480	40,73	6,74	Negativan	455	3378,52	15777,41
Pozitivan	146	39,73	7,04	Pozitivan	137	2296,19	12653,70
pH				IL-2			
Negativan	472	4,37	0,49	Negativan	455	47,81	130,13
Pozitivan	148	5,02	0,63	Pozitivan	137	35,48	69,43
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
IL-4				IL-17A			
Negativan	455	12,66	17,54	Negativan	455	121,59	1657,52
Pozitivan	137	10,81	19,03	Pozitivan	137	27,06	72,25
IL-5				IL22			
Negativan	455	20,80	84,42	Negativan	455	154,76	387,61
Pozitivan	137	18,43	69,54	Pozitivan	137	196,87	537,69
IL-6				IL-9			
Negativan	455	410,26	5542,54	Negativan	455	46,12	196,70
Pozitivan	137	1107,38	13371,77	Pozitivan	137	33,30	71,16
IL-13				IL-10			
Negativan	455	61,49	195,32	Negativan	455	1784,29	13244,77
Pozitivan	137	46,91	191,36	Pozitivan	137	21,98	71,60

**Tabela 79: Procenat apoptoze, dužina grlića materice i koncentracije ispitivanih citokina kod četiri gupe pacijentkinja na osnovu semikvantitativne procene broja PMN na mikroskopskom uvećanju x 200**

parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Apoptoze				IL-17A			
PMN0	85	15,72*	12,95*	PMN0	236	10,94	28,94
PMN1	86	12,09	8,35	PMN1	236	15,26	74,20
PMN2	28	9,81*	6,58*	PMN2	98	11,93	27,81
PMN3	16	10,31	9,56	PMN3	69	10,28	15,35
UKUPNO	215	12,59	10,16	UKUPNO	639	12,53	48,79
Dužina grlića				IL-22			
PMN0	248	41,38*	5,93	PMN0	236	160,70	365,58
PMN1	248	40,50	6,56	PMN1	236	138,30	437,28
PMN2	107	40,64	6,68	PMN2	98	199,36	487,78
PMN3	70	38,55*	8,31	PMN3	69	274,36	882,39
UKUPNO	673	40,40	6,84	UKUPNO	639	181,13	544,91
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	IL-9			
				PMN0	236	38,13	72,64
				PMN1	236	46,61	254,54
				PMN2	98	42,87	80,41
				PMN3	69	37,78	84,74
				UKUPNO	639	41,89	164,40
IL-1 $\beta$				IL-10			
PMN0	236	1289,92	1324,61	PMN0	236	961,28	9455,59
PMN1	236	1132,48	1479,05	PMN1	236	2011,38	13959,10
PMN2	98	1271,29	1484,33	PMN2	98	1066,40	10931,31
PMN3	69	1307,85	1361,71	PMN3	69	1393,42	11411,73
UKUPNO	639	1233,99	1414,53	UKUPNO	639	1437,31	11815,78
TNF- $\alpha$				IL-4			
PMN0	235	10,94	28,94	PMN0	236	11,21	14,41
PMN1	236	15,26	74,20	PMN1	236	12,10	18,15
PMN2	98	11,93	27,81	PMN2	98	13,76	20,06
PMN3	68	10,28	15,35	PMN3	69	11,44	20,10
UKUPNO	637	12,53	48,79	UKUPNO	639	12,00	17,92
IL-12p70				IL-5			
PMN0	236	55,78	404,59	PMN0	236	20,36	77,91
PMN1	236	64,49	432,78	PMN1	236	16,94	53,49
PMN2	98	92,85	610,11	PMN2	236	30,31	144,95
PMN3	69	29,56	111,69	PMN2	98	18,83	47,89
UKUPNO	639	60,12	421,67	PMN3	69	20,53	81,90
				UKUPNO	639	11,21	14,41
IFN- $\gamma$				IL-6			
PMN0	236	1629,05	10049,06	PMN0	236	38,64	93,26
PMN1	236	4079,58	16826,78	PMN1	236	1449,23	13246,56
PMN2	98	3646,39	18111,60	PMN2	98	34,42	78,90
PMN3	69	1415,87	9464,73	PMN3	69	19,57	51,11
UKUPNO	639	2804,64	14240,89	UKUPNO	639	538,04	7934,67
IL-2				IL-13			
PMN0	236	36,93	76,57	PMN0	236	60,11	228,38
PMN1	236	47,84	144,65	PMN1	236	58,48	191,85
PMN2	98	45,42	73,69	PMN2	98	47,96	72,71
PMN3	69	42,92	118,10	PMN3	69	57,43	211,78
UKUPNO	639	43,42	112,66	UKUPNO	639	56,95	192,86

**Tabela 80: Procenat apoptoze, dužina grlića materice i koncentracije ispitivanih citokina kod četiri gupe pacijentkinja na osnovu semikvantitativne procene broja PMN na mikroskopskom uvećanju x 400**

parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Apoptoze				IL-17A			
PMN0	71	14,97*	13,38	PMN0	219	31,80	66,80
PMN1	88	11,94	8,22	PMN1	229	50,00	227,27
PMN2	39	11,12	8,02	PMN2	101	372,13	3363,14
PMN3	17	8,21*	4,96	PMN3	90	21,90	52,41
UKUPNO	215	12,50	10,16	UKUPNO	639	90,72	1344,69
Dužina grlića				IL-22			
PMN0	231	41,21	6,04	PMN0	219	173,42	378,23
PMN1	238	39,91	7,35	PMN1	229	175,08	529,52
PMN2	109	39,74	7,08	PMN2	101	213,16	905,45
PMN3	95	40,25	6,88	PMN3	90	187,85	390,45
UKUPNO	673	40,38	6,82	UKUPNO	639	182,33	546,86
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	IL-9			
				PMN0	219	37,10	72,57
				PMN1	229	48,87	254,84
				PMN2	101	47,08	103,97
				PMN3	90	30,13	58,58
				UKUPNO	639	41,91	165,02
IL-1 $\beta$				IL-10			
PMN0	219	1401,83	1574,17	PMN0	219	1325,61	11515,03
PMN1	229	1097,73	1266,10	PMN1	229	1270,75	11262,88
PMN2	101	1098,10	1151,92	PMN2	101	1701,39	12636,20
PMN3	90	1352,09	1600,29	PMN3	90	1916,23	13377,94
UKUPNO	639	1237,84	1416,34	UKUPNO	639	1448,53	11861,30
TNF- $\alpha$				IL-4			
PMN0	218	12,35	27,82	PMN0	219	12,15	16,16
PMN1	229	14,60	73,50	PMN1	229	12,32	17,57
PMN2	101	11,44	32,23	PMN2	101	12,17	20,36
PMN3	89	9,51	15,00	PMN3	90	11,16	20,43
UKUPNO	637	12,62	48,97	UKUPNO	639	12,08	17,97
IL-12p70				IL-5			
PMN0	219	69,20	436,30	PMN0	219	25,18	120,34
PMN1	229	55,06	440,46	PMN1	229	19,04	54,01
PMN2	101	34,40	123,35	PMN2	101	17,71	49,44
PMN3	90	83,04	550,01	PMN3	90	17,04	51,66
UKUPNO	639	60,58	423,29	UKUPNO	639	20,65	82,20
IFN- $\gamma$				IL-6			
PMN0	219	3471,63	15579,17	PMN0	219	34,45	83,45
PMN1	229	2945,53	14740,11	PMN1	229	1460,30	13274,77
PMN2	101	550,88	5226,06	PMN2	101	26,14	72,97
PMN3	90	3507,87	16599,68	PMN3	90	20,77	49,44
UKUPNO	639	2826,54	14294,42	UKUPNO	639	542,19	7965,56
IL-2				IL-13			
PMN0	219	41,17	82,10	PMN0	219	63,02	219,66
PMN1	229	49,59	142,63	PMN1	229	59,15	181,98
PMN2	101	40,72	123,00	PMN2	101	62,31	233,44
PMN3	90	37,87	76,68	PMN3	90	33,24	60,16
UKUPNO	639	43,65	113,07	UKUPNO	639	57,33	193,56

**Tabela 81: Procenat apoptoze, dužina grlića materice i koncentracije ispitivanih citokina kod četiri gupe pacijentkinja na osnovu semikvantitativne procene broja PMN na mikroskopskom uvećanju x 1000**

parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija
%Apoptoze				IL-17A			
PMN0	85	14,47*	12,25	PMN0	236	172,17	2200,50
PMN1	86	11,38	8,76	PMN1	236	56,53	231,34
PMN2	28	8,69*	6,48	PMN2	98	26,83	66,83
PMN3	16	14,72	7,80	PMN3	69	19,82	40,82
UKUPNO	215	12,50	10,16	UKUPNO	639	90,72	1344,69
Dužina grlića				IL-22			
PMN0	248	41,45*	5,89	PMN0	236	171,19	373,36
PMN1	248	39,91*	7,01	PMN1	236	166,45	484,82
PMN2	107	39,53	8,05	PMN2	98	149,38	338,97
PMN3	70	39,54	6,89	PMN3	69	321,51	1151,24
UKUPNO	673	40,38	6,82	UKUPNO	639	182,33	546,86
parametri	n	srednja vrednost	standardna devijacija	IL-9			
				PMN0	236	35,87	70,15
				PMN1	236	57,63	257,27
				PMN2	98	30,22	67,37
				PMN3	69	25,45	42,64
				UKUPNO	639	41,91	165,02
IL-1 $\beta$				IL-10			
PMN0	236	1298,62	1398,88	PMN0	236	1471,49	11671,12
PMN1	236	1160,94	1398,52	PMN1	236	1473,40	11670,88
PMN2	98	1261,89	1516,35	PMN2	98	1180,06	11528,86
PMN3	69	1258,80	1408,79	PMN3	69	1666,27	13739,95
UKUPNO	639	1237,84	1416,34	UKUPNO	639	1448,53	11861,30
TNF- $\alpha$				IL-4			
PMN0	235	11,74	26,73	PMN0	236	11,55	15,33
PMN1	236	15,80	74,16	PMN1	236	13,18	19,54
PMN2	98	8,61	16,17	PMN2	98	11,88	22,49
PMN3	68	10,35	23,13	PMN3	69	10,36	12,98
UKUPNO	637	12,62	48,97	UKUPNO	639	12,08	17,97
IL-12p70				IL-5			
PMN0	236	64,58	420,56	PMN0	236	24,19	116,09
PMN1	236	27,20	154,57	PMN1	236	21,12	59,64
PMN2	98	152,27	816,38	PMN2	98	16,60	53,20
PMN3	69	30,87	140,12	PMN3	69	12,70	19,19
UKUPNO	639	60,58	423,29	UKUPNO	639	20,65	82,20
IFN- $\gamma$				IL-6			
PMN0	236	3802,90	16167,58	PMN0	236	32,33	77,69
PMN1	236	1970,63	12172,65	PMN1	236	1076,98	12013,10
PMN2	98	2249,29	11926,18	PMN2	98	844,32	8128,86
PMN3	69	3234,46	17096,89	PMN3	69	27,85	55,06
UKUPNO	639	2826,54	14294,42	UKUPNO	639	542,19	7965,56
IL-2				IL-13			
PMN0	236	39,32	79,67	PMN0	236	60,44	211,75
PMN1	236	55,26	159,14	PMN1	236	63,15	182,36
PMN2	98	33,03	66,28	PMN2	98	34,13	65,28
PMN3	69	33,79	58,64	PMN3	69	59,72	273,18
UKUPNO	639	43,65	113,07	UKUPNO	639	57,33	193,56



**Tabela 82: Procenat apoptoze, dužina grlića materice i koncentracije ispitivanih citokina kod dve grupe pacijentkinja na osnovu semikvantitativne procene broja PMN na mikroskopskom uvećanju x 200**

BROJPMNX200G		n	Srednja vrednost	Standardna devijacija
%Apoptoze	Zdrava	148	13,78	10,86
	Bolesna	69	10,03	7,95
QPMN-A	Zdrava	157	3,50	8,81
	Bolesna	69	17,61	54,43
QPMN-B	Zdrava	433	0,36	0,51
	Bolesna	248	2,31	7,89
Dužina grlića	Zdrava	430	40,89	6,30
	Bolesna	248	39,55	7,64
IL-12p70	Zdrava	411	60,66	420,11
	Bolesna	233	59,17	425,32
IFN- $\gamma$	Zdrava	411	3000,39	14281,53
	Bolesna	233	2459,33	14193,00
IL-17A	Zdrava	411	120,52	1675,25
	Bolesna	233	36,51	91,78
IL-2	Zdrava	411	43,04	119,54
	Bolesna	233	44,09	99,62
IL-10	Zdrava	411	1548,92	12180,28
	Bolesna	233	1240,44	11166,74
IL-9	Zdrava	411	42,88	196,27
	Bolesna	233	40,16	82,61
IL-22	Zdrava	411	148,17	406,94
	Bolesna	233	239,27	724,54
IL-6	Zdrava	411	828,02	9924,85
	Bolesna	233	26,52	65,86
IL-13	Zdrava	411	59,20	208,47
	Bolesna	233	53,00	162,05
IL-4	Zdrava	411	11,71	16,60
	Bolesna	233	12,52	20,07
IL-5	Zdrava	411	18,44	65,31
	Bolesna	233	24,20	105,02
IL-1 $\beta$	Zdrava	411	1201,82	1413,61
	Bolesna	233	1290,75	1417,41
TNF- $\alpha$	Zdrava	410	13,36	58,77
	Bolesna	232	11,05	22,06

**Tabela 83: Procenat apoptoze, dužina grlića materice i koncentracije ispitivanih citokina kod dve grupe pacijentkinja na osnovu semikvantitativne procene broja PMN na mikroskopskom uvećanju x 400**

BROJPMNX400G		n	Srednja vrednost	Standardna devijacija
%Apoptoze	Zdrava	159	13,30	10,90
	Bolesna	56	10,24	7,31
QPMN-A	Zdrava	167	6,22	28,65
	Bolesna	57	12,72	38,94
QPMN-B	Zdrava	471	0,49	0,96
	Bolesna	205	2,42	8,61
Dužina grlića	Zdrava	469	40,55	6,76
	Bolesna	204	39,98	6,97
IL-12p70	Zdrava	448	61,97	438,00
	Bolesna	191	57,32	387,69
IFN- $\gamma$	Zdrava	448	3202,71	15141,36
	Bolesna	191	1944,23	12068,06
IL-17A	Zdrava	448	41,10	169,13
	Bolesna	191	207,10	2446,43
IL-2	Zdrava	448	45,47	116,97
	Bolesna	191	39,38	103,53
IL-10	Zdrava	448	1297,57	11374,11
	Bolesna	191	1802,63	12956,98
IL-9	Zdrava	448	43,12	189,02
	Bolesna	191	39,09	85,84
IL-22	Zdrava	448	174,27	461,29
	Bolesna	191	201,23	709,27
IL-6	Zdrava	448	763,29	9507,70
	Bolesna	191	23,61	62,89
IL-13	Zdrava	448	61,04	201,07
	Bolesna	191	48,62	174,89
IL-4	Zdrava	448	12,24	16,88
	Bolesna	191	11,70	20,35
IL-5	Zdrava	448	22,04	92,52
	Bolesna	191	17,40	50,37
IL-1 $\beta$	Zdrava	448	1246,39	1431,55
	Bolesna	191	1217,79	1383,52
TNF- $\alpha$	Zdrava	447	13,50	56,03
	Bolesna	190	10,54	25,60

**Tabela 84: Procenat apoptoze, dužina grlića materice i koncentracije ispitivanih citokina kod dve grupe pacijentkinja na osnovu semikvantitativne procene broja PMN na mikroskopskom uvećanju x 1000**

BROJPMNX1000G		n	Srednja vrednost	Standardna devijacija
%Apoptoze	Zdrava	171	12,92	10,72
	Bolesna	44	10,88	7,50
QPMN-A	Zdrava	179	6,24	27,74
	Bolesna	45	14,40	43,60
QPMN-B	Zdrava	499	0,55	1,13
	Bolesna	177	2,55	9,21
Dužina grlića	Zdrava	496	40,68	6,51
	Bolesna	177	39,54	7,59
IL-12p70	Zdrava	472	45,89	317,05
	Bolesna	167	102,11	633,31
IFN- $\gamma$	Zdrava	472	2886,76	14324,40
	Bolesna	167	2656,33	14250,90
IL-17A	Zdrava	472	114,35	1563,97
	Bolesna	167	23,94	57,48
IL-2	Zdrava	472	47,29	125,96
	Bolesna	167	33,35	63,06
IL-10	Zdrava	472	1472,44	11658,61
	Bolesna	167	1380,95	12452,26
IL-9	Zdrava	472	46,75	188,67
	Bolesna	167	28,25	58,33
IL-22	Zdrava	472	168,82	432,24
	Bolesna	167	220,50	785,68
IL-6	Zdrava	472	554,65	8501,79
	Bolesna	167	506,97	6227,03
IL-13	Zdrava	472	61,80	197,40
	Bolesna	167	44,70	182,27
IL-4	Zdrava	472	12,37	17,56
	Bolesna	167	11,25	19,11
IL-5	Zdrava	472	22,65	92,20
	Bolesna	167	14,99	42,52
IL-1 $\beta$	Zdrava	472	1229,78	1398,92
	Bolesna	167	1260,61	1468,53
TNF- $\alpha$	Zdrava	471	13,78	55,77
	Bolesna	166	9,32	19,28

**Tabela 85: Rezultati ANOVA (post hoc Tamhane) za podelu po Nugentu i podelu po Ison/Hay**

Podela po Nugent-u			
parametri	grupe		p
IL-13	Normalan	Intermedia	0,001
IL-1b	Normalan	BV	0,002
IL-2	Normalan	Intermedia	0,019
IL-10	Normalan	BV	0,034
pH	Normalan	Intermedia	0,000
		BV	0,000
	BV	Intermedia	0,000

Podela po Ison/Hay-u			
parametri	grupe		p
QPMN-B	Cist nalaz	Normalan	0,000
IFNg	Cist nalaz	Normalan	0,001
IL-17a		BV	0,037
IL-2	Normalan	Intermedia	0,004
	Normalan	Koke	0,000
	BV	Koke	0,001
pH	Cist nalaz	Normalan	0,000
	Cist nalaz	BV	0,000
	Normalan	Intermedia	0,000
	Normalan	BV	0,000
	Normalan	Koke	0,001
	Intermedia	Normalan	0,000
	Intermedia	BV	0,000
	BV	Koke	0,000

**Tabela 86: Rezultati ANOVA (post hoc Tamhane) za podelu po Claeys-u i podelu po NP-6G**

podela po Claeys-u				podela po NP-6G			
parametri	grupe		p	parametri	grupe		p
QPMN-A	Intermedia	Koke	0,042	QPMN-B	BV NULL	BV MID	0,048
IFN $\gamma$	Normalan	Koke	0,004	IFN $\gamma$	NOR FULL	BV FULL	0,004
IL-17a	Intermedia	Koke	0,001	pH	NOR NULL	NOR FULL	0,000
	BV	Koke	0,001		NOR NULL	NOR MID	0,004
IL-2	Normalan	Intermedia	0,031		NOR NULL	BV NULL	0,000
		Koke	0,001		NOR NULL	BV MID	0,001
	BV	Koke	0,023		NOR NULL	BV FULL	0,000
IL-22	Normalan	Sličan normalnom	0,028		NOR FULL	BV NULL	0,000
	Intermedia	Koke	0,036		NOR FULL	BV MID	0,000
	Koke	Normalan	0,000		NOR MID	BV NULL	0,000
	Koke	Leukoreje	0,022		NOR MID	BV MID	0,000
IL-13	Normalan	Intermedia	0,007		NOR MID	BV FULL	0,000
	Normalan	Koke	0,001		BV MID	NOR NULL	0,001
	Intermedia	Normalan	0,007		BV MID	BV FULL	0,000
IL-4	Normalan	Koke	0,029		BV FULL	NOR NULL	0,000
TNF- $\alpha$	Normalan	Koke	0,004		BV FULL	NOR FULL	0,000
	BV	Koke	0,003		BV FULL	BV NULL	0,001
	Koke	Leukoreje	0,031				
pH	Normalan	Intermedia	0,000				
	Normalan	BV	0,000				
	Intermedia	BV	0,000				
	Intermedia	Leukoreje	0,000				
	BV	Leukoreje	0,000				
	BV	Sličan normalnom	0,003				

## PRILOG 4

**Tabela 87: Sperman-ov koeficijent korelacije**

Parametri	*	IL-12p70	IFN- $\gamma$	IL-17A	IL-2	IL-10	IL-9	IL-22
% APO	$\rho$	0,028	0,046	0,033	0,014	0,029	-0.150*	0,055
	p	0,679	0,504	0,630	0,833	0,673	0,028	0,421
	n	214	214	214	214	214	214	214
Broj PMN (x 200)	$\rho$	.082*	-0,026	-0,012	-0,028	0,014	-0,041	0,052
	p	0,038	0,510	0,766	0,478	0,728	0,302	0,192
	n	644	644	644	644	644	644	644
Broj PMN (x 400)	$\rho$	0,020	-0,054	-0,001	-0,031	-0,017	-0,047	-0,057
	p	0,619	0,169	0,974	0,436	0,660	0,239	0,148
	n	639	639	639	639	639	639	639
Broj PMN (x 1000)	$\rho$	0,017	-0,054	-0,036	-0,055	-0,015	-0,026	-0,045
	p	0,673	0,174	0,363	0,165	0,698	0,519	0,257
	n	639	639	639	639	639	639	639
Broj PMN (x 10 <sup>6</sup> /ml)	$\rho$	0,014	-0,002	0,013	0,026	-0,016	.155*	-0,017
	p	0,838	0,979	0,851	0,700	0,818	0,021	0,806
	n	223	223	223	223	223	223	223
Broj PMN (x 10 <sup>9</sup> /l)	$\rho$	.131**	0,035	-0,029	0,008	0,054	-.086*	.119**
	p	0,001	0,376	0,465	0,848	0,174	0,028	0,002
	n	644	644	644	644	644	644	644
Dužina grlića	$\rho$	0,051	0,013	0,006	-0,020	0,051	-0,049	0,065
	p	0,199	0,735	0,877	0,609	0,195	0,211	0,101
	n	644	644	644	644	644	644	644

\*  $\rho$  –koeficijent korelacije; p – verovatnoća; n – broj nalaza

Parametri	*	IL-6	IL-13	IL-4	IL-5	IL-1b	TNF- $\alpha$
% APO	$\rho$	0,045	0,029	0,021	0,042	0,018	0,024
	p	0,513	0,672	0,758	0,540	0,790	0,727
	n	214	214	214	214	214	214
Broj PMN (x 200)	$\rho$	-0,047	0,048	-0,036	0,052	0,019	.087*
	p	0,231	0,226	0,361	0,186	0,634	0,027
	n	644	644	644	644	644	642
Broj PMN (x 400)	$\rho$	-0,019	0,004	-0,033	0,006	-0,023	-0,008
	p	0,636	0,928	0,409	0,872	0,562	0,839
	n	639	639	639	639	639	637
Broj PMN (x 1000)	$\rho$	-0,040	0,005	-0,051	0,006	-0,040	0,007
	p	0,309	0,893	0,197	0,880	0,315	0,855
	n	639	639	639	639	639	637
Broj PMN (x 10 <sup>6</sup> /ml)	$\rho$	-0,020	0,130	0,065	.141*	0,053	.148*
	p	0,765	0,053	0,333	0,035	0,435	0,027
	n	223	223	223	223	223	223
Broj PMN (x 10 <sup>9</sup> /l)	$\rho$	-.092*	0,025	-0,060	0,020	0,019	.101*
	p	0,020	0,519	0,128	0,606	0,633	0,010
	n	644	644	644	644	644	642
Dužina grlića	$\rho$	-0,027	-0,020	0-,020	-0,010	-0,045	0,010
	p	0,501	0,604	0,620	0,801	0,251	0,803
	n	644	644	644	644	644	642