



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Снежана Матић

ВАЛИДАЦИЈА НОВЕ МИКРОСКОПСКЕ МЕТОДЕ У
ДИЈАГНОСТИЦИ БАКТЕРИЈСКИХ ВАГИНОЗА
ПРИМЕНОМ РСР И real-time РСР

Докторска дисертација

Ментор: др сци.мед. Александар Живановић, редовни професор

Крагујевац, 2018. године

ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>	
Име и презиме: Снежана Матић	
Датум и место рођења: 02.12.1977. Крагујевац	
Садашње запослење: Клинички центар Крагујевац	
<i>II Докторска дисертација</i>	
Наслов: Валидација нове микроскопске методе у дијагностици бактеријских вагиноза применом PCR и real-time PCR	
Број страница: 95	
Број слика: 6 слика, 21 табела	
Број библиографских података: 145	
Установа и место где је рад израђен: Институт за јавно здравље Крагујевац	
Научна област (УДК): медицина	
Ментор: проф. др Александар Живановић	
<i>III Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме: 29.12.2015.	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: одлука бр. IV-919/5 од 05.10.2016.г.	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
1. проф. др Маја Ћупић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област <i>Микробиологија</i> , председник;	
2. доц. др Марија Шорак, доцент Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Гинекологија и акушерство</i> , члан;	
3. доц. др Биљана Љујић, доцент Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Генетика</i> , члан;	
4. доц. др Александра Димитријевић, доцент Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Гинекологија и акушерство</i> , члан;	
5. доц. др Марија Миловановић, доцент Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Микробиологија и имунологија</i> , члан.	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:	
1. проф. др Маја Ћупић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област <i>Микробиологија</i> , председник	
2. проф. др Александра Димитријевић, ванредни професор Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Гинекологија и акушерство</i> , члан	
3. доц. др Биљана Љујић, доцент Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област <i>Генетика</i> , члан	
-	
Датум одбране дисертације:	

САЖЕТАК

Увод: Бактеријска вагиноза се сматра једним од најчешћих поремећаја доњег гениталног тракта код жена у репродуктивном периоду. Карактерише је „замена“ доминантних врста лактобацила мешаном флором анаеробних и факултативно анаеробних бактерија. Прави узрок бактеријске вагинозе још увек није утврђен, већ се дијагноза поставља на основу клиничких и микроскопских критеријума који не узимају у обзир специфичну бактерију, већ присуство клиничких знакова и присуство бактерија одређеног морфотипа на препаратима вагиналног размаза.

Циљ: Испитивање слагања нове модификоване методе микроскопирања са осталим критеријумима (клиничким и микроскопским), који се већ користе у дијагностици бактеријских вагиноза, као и испитивање међусобног слагања свих критеријума са резултатима молекуларне анализе присуства и количине бактерија најчешће удружених са „здравим“ вагиналним микробиомом (*Lactobacillus spp*) и бактеријском вагинозом (*Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*).

Материјал и методе: Студија је обухватила 120 трудница, старости од 18-40 година. Узорци вагиналних брисева су узимани током редовних контрола трудница када су класификовани на основу клиничких и микроскопских критеријума по Амселу, Наценту, Исон/Хају, Клејсу и новој модификованој методи микроскопирања. Затим је са препарата бојених по Граму изолована ДНК бактерија и одређивано присуство и количина *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* и укупног вагиналног микробиома методама PCR и real-time PCR.

Резултати: Установили смо да постоји међусобно слагање микроскопских метода, а клиничке, микроскопске методе и нова метода микроскопирања су се слагале када су интермедијерни налази интерпретирани као нормални. Резултати PCR-а се нису слагали са резултатима класификованим по клиничким и микроскопским критеријумима. Са друге стране, у узорцима препарата вагиналног секрета бојених по Граму PCR-ом су детектовани *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, уз доминацију *Lactobacillus spp* у нормалним налазима, а *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* у налазима бактеријске вагинозе, при чему је њихов однос био уравнотежен у интермедијерним налазима. Укупни вагинални микробиом је корелирао са резултатима квантитативне категоризације (празан, умерен, пун) вагиналних размаза бојених по Граму, класификованих према новој модификованој методи микроскопирања, док је релативни однос *Lactobacillus spp* и свих осталих бактерија опадао крећући се од „нормалан пун“ ка „бактеријска вагиноза пун“, а тренд релативног односа *G. vaginalis* и *A. vaginae* обрнуто, је растао од „нормалан пун“ ка „бактеријска вагиноза пун“.

Закључак: Нова модификована метода микроскопирања је показала слагање са клиничким и осталим микроскопским методама као и квантитативним резултатима молекуларне анализе.

Кључне речи: бактеријска вагиноза, *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, PCR, real-time PCR.

ABSTRACT

Introduction: Bacterial vaginosis is considered to be one of the most common disorders of lower genital tract in women in reproductive age. It has been characterized by “replacement” of dominant lactobacilli with anaerobs or facultative anaerobs. The real cause of bacterial vaginosis still remains unclear; nevertheless its diagnosis is based on presence of clinical signs and/or certain bacterial morhotypes in smears of vaginal swabs.

Aim: Assessment of agreement between novel modified microscopic method and other criteria (clinical and microscopic) already in use in diagnosis of bacterial vaginosis, as well as evaluation of agreement of aforementioned diagnostic criteria and results of molecular detection and quantification of most common bacteria related to normal results (*Lactobacillus spp*) and bacterial vaginosis (*Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae*).

Material and methods: the study enrolled 120 pregnant women between 18 and 40 years of age. The vaginal swab specimens were taken during regular examinations, when they were classified according to clinical and microscopic criteria: Amsel, Nugent, Ison/Hay, Claeys and novel modified microscopic method. Further, bacterial DNA was isolated from Gram stained vaginal smears preparations and detection and quantification of *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* and total vaginal microbiome were performed by PCR and real-time PCR.

Results: Mutual agreement between all microscopic methods has been found as well as agreement between clinical, microscopic methods and novel modified microscopic method when intermediary results interpreted as normal. There was no agreement between PCR results and results classified by clinical or other microscopic methods. In the other hand, *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in Gram stained vaginal smears were detected by PCR, with domination of *Lactobacillus spp* in normal results, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in bacterial vaginosis, and balanced presence of both bacteria in intermediary results. Total vaginal microbiome correlated with results of quantitative categorization of Gram stained vaginal smears according to novel modified microscopic method (empty, mid, full), while for relative ratio of *Lactobacillus spp* and all other bacteria, going from “normal full” towards “bacterial vaginosis full”, decreasing trend has been observed. Inversely, the relative ratio of *G. vaginalis* and *A. vaginae*, going from “normal full” towards “bacterial full” had increasing trend.

Conclusion: Agreement between novel modified microscopic method, clinical criteria and other microscopic methods has been observed as well as agreement between novel modified microscopic method and results of quantitative molecular analysis.

Key words: bacterial vaginosis, *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, PCR, real-time PCR.

САДРЖАЈ

1 УВОД	1
1.1 Микробиом.....	1
1.2 Бактеријска вагиноза.....	2
1.2.1 Историјски осврт	3
1.2.2 <i>Lactobacillus spp</i>	5
1.2.3 <i>Gardnerella vaginalis</i>	6
1.2.4 <i>Atopobium vaginae</i>	7
1.2.5 Последице бактеријске вагинозе.....	8
1.2.6 <i>Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae</i> , HIV и бактеријска вагиноза	9
1.2.7 Аеробни вагинитис.....	10
1.2.8 Дијагноза бактеријске вагинозе	10
1.2.9 Терапија бактеријске вагинозе	15
2 ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	18
2.1 Циљеви	18
2.1.1 Примарни циљ	18
2.1.2 Секундарни циљеви	18
2.2 Хипотезе.....	20
2.2.1 Примарна хипотеза.....	20
2.2.2 Секундарне хипотезе.....	20
3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	21
3.1 План истраживања	21
3.2 Узорковање и примена клиничких критеријума по Амселу.....	22
3.3 Микроскопска евалуација препарата бојених по Граму	23
3.3.1 Категоризација препарата вагиналних размаза по Наџенту	23
3.3.2 Класификација препарата вагиналних размаза по Исон/Хају	25
3.3.3 Класификација препарата вагиналних размаза по Клејсу	26
3.3.4 Класификација препарата вагиналних размаза по новој микроскопској методи	27
3.4 Молекуларна анализа.....	35

3.4.1 Претретман препарата бојених по Граму.....	35
3.4.2 Екстракција ДНК.....	35
3.4.3 Детекција и квантификација.....	36
3.4.4 Интерпретација резултата PCR детекције и квантификације.....	37
3.5 Статистичка обрада података.....	38
4 РЕЗУЛТАТИ.....	41
4.1 Учесталост нормалних (Н), интермедијерних (ИМД) и БВ (бактеријска вагиноза) ...	41
4.2 Поређење резултата добијених употребом критеријума по Наценту са резултатима добијеним употребом осталих метода.....	42
4.2.1 Поређење резултата добијених употребом критеријума по Наценту и других микроскопских метода.....	42
4.2.2 Поређење клиничких и микроскопских метода када су интермедијерни резултати интерпретирани као нормалан налаз.....	44
4.2.3 Поређење клиничких и микроскопских метода када су интермедијерни резултати интерпретирани као БВ налаз.....	45
4.3 Поређење резултата добијених real-time PCR-ом са резултатима класификованим по осталим критеријумима.....	48
4.3.1 Поређење резултата добијених real-time PCR-ом са резултатима класификованим на основу микроскопских критеријума.....	48
4.3.2 Поређење резултата добијених real-time PCR-ом са резултатима класификованим по клиничким и микроскопским критеријумима у случају када су интермедијерни резултати интерпретирани као нормалан налаз.....	50
4.3.3 Поређење резултата добијених real-time PCR-ом са резултатима класификованим по клиничким и микроскопским критеријумима у случају када су интермедијерни резултати интерпретирани као БВ налаз.....	50
4.4 Просечан број бактерија квантификованих real-time PCR-ом у узорцима категорисаним по новој микроскопској методи.....	53
4.4.1 Анализа резултата real-time PCR-а сврстаних у три групе на основу целуларности (празан, умерен, пун).....	54
4.4.2 Анализа резултата real-time PCR-а када су резултати сврстани у три	

категорије нормалних налаза	55
4.4.3 Анализа резултата real-time PCR-а када су резултати сврстани у три категорије БВ налаза	56
4.4.4 Анализа резултата релативног односа просечног броја бактерија по различитим групама нове микроскопске методе.....	57
4.4.5 Анализа релативног односа просечног броја бактерија по различитим групама нове микроскопске методе када је 6 група класификовано у три групе (нормалан, интермедијеран и бактеријска вагиноза).....	58
4.5 Просечан број бактерија квантификованих real-time PCR-ом код пацијената са и без бактеријске вагинозе.....	59
4.6 ROC анализа броја <i>G. vaginalis</i> , <i>A. vaginae</i> и <i>Lactobacillus spp</i> добијеног real-time PCR квантификацијом	61
5 ДИСКУСИЈА	65
6 ЗАКЉУЧЦИ.....	79
7 ЛИТЕРАТУРА.....	81

ПОПИС ОЗНАКА И СКРАЋЕНИЦА

Ознака или скраћеница	Значење
Av	<i>Atopobium vaginae</i>
AB	Аеробни вагинитис
BVAB 1-3	енгл. Bacterial vaginosis associated bacteria 1-3 (бактерије које су у вези са бактеријском вагинозом)
BVAB-TM7	енгл. Bacterial vaginosis associated bacteria (бактерије које су у вези са бактеријском вагинозом), TM7 – идентификациони локус на рибозомској рибонуклеинској киселини
BB	Бактеријска вагиноза
BBH	Бактеријска вагиноза нул
BBU	Бактеријска вагиноза умерен
BBP	Бактеријска вагиноза пун
BF	Бациларне форме
GAL	<i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Atopobium vaginae</i> , <i>Lactobacillus spp</i>
Gv	<i>Gardnerella vaginalis</i>
ДНК	Дезоксирибонуклеинска киселина
ИМД	Интермедијеран
Lacto	<i>Lactobacillus spp</i>

ПОПИС ОЗНАКА И СКРАЋЕНИЦА

Ознака или скраћеница	Значење
НИН	Енгл. National Institutes of Health (Национални институти здравља)
НБФ	Не-бациларне форме
Н	Нормалан
НММ	Нова микроскопска метода
НН	Нормалан нул
НУ	Нормалан умерен
НП	Нормалан пун
NGAL	енгл. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (липокалин удружен са неутрофилном гелатиназом)
PCR	енгл. Polymerase chain reaction (ланчана реакција полимеризације)
real-time PCR	Ланчана реакција полимеризације у „реалном“ времену (квантификација)
РНК	Рибонуклеинска киселина
FISH	енгл. Fluorescent <i>in situ</i> hybridization (флуоресцентна <i>in situ</i> хибридизација)
HIV	енгл. Human immunodeficiency virus (вирус људске имунодефицијенције)

1 УВОД

1.1 Микробиом

Микробиом је скуп генома микроорганизама (бактерија, бактериофага, вируса, протозоа и гљивица) који живе на и унутар нашег тела. У циљу истраживања комплексног „не-људског“ организма, састављеног од микроорганизама, у склопу људског организма, НИН (од енгл. National Institutes of Health) су 2007. године покренули истраживање људског микробиома (енгл. Human Microbiome Project) као концептуално проширење пројекта хуманог генома (чији је циљ „мапирање“ комплетног људског генома). На основу пројекта истраживања људског микробиома, процењено је да људски микробиом садржи 10 хиљада пута више микроорганизама него што има ћелија у једном људском организму (1). Са свим овим микроорганизмима, по рођењу, а током живота, наш организам успоставља сложене „екосистеме“ на одређеним ткивима, органима и органским системима. Ове микробиотске заједнице у респираторном тракту, цревном тракту, кожи и урогениталном тракту су ко-еволуирале заједно са људима преко више хиљада година у циљу служења основним потребама „домаћина“ употпуњујући оно што је кодирано генима „домаћина“ (2). На пример, коменсални микробиоти из црева су нам омогућили својим ензимима да користимо састојке из хране несварљиве ензимима нашег цревног тракта (3). Истраживања на гнотобиотским мишевима (мишеви рођени и одгајани у потпуном, или делимичном одсуству микроорганизама) су показала да су различите микробиотске заједнице неопходне за физиолошко функционисање организма (4). Тако су код гнотобиотских мишева запажени бројни поремећаји, укључујући метаболичке, имунолошке, поремећаје понашања, телесног састава и гастроинтестиналног тракта (5-7)

Вагинални микробиом

Састав вагиналног микробиома је одређен разним факторима „домаћина“ укључујући узраст, промене у нивоима хормона (током менструалног циклуса, менопаузе, трудноће, узимање хормонских контрацептива), гениталне инфекције, одређено сексуално

понашање и хигијенске навике (8). Велики број бактеријских врста колонизује и дигестивни тракт и вагину. Штавише, сматра се да је ректум основни извор микроорганизама који насељавају вагину (9). Ово је значајно ради одржавања равнотеже у броју и саставу микроорганизама вагине, зато што се микроорганизми константно излучују путем вагиналног секрета у спољашњу средину. Хранљиве састојке микроорганизми користе од десквамисаних епителних ћелија и из секрета жлезда репродуктивног тракта. Унутар вагине владају анаеробни услови, а епител вагине пролази сталне цикличне промене под дејством хормона. Најдоминантнија бактеријска врста код репродуктивно зрелих жена су лактобацили који анаеробном гликолизом метаболичких продуката разградње гликогена из епителних ћелија стварају млечну киселину, тако да је вагинална средина код ове популације нормално кисела (pH око 4,5) (10). Пре пубертета вагинални pH је приближно неутралан, а микробиом је близак микробиому дигестивног тракта (11).

Секвенцирањем генома вагиналних микробиота код здравих северноамеричких жена у репродуктивном периоду је откривено пет микробиотских заједница, од којих су у четири доминирали лактобацили (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii*), а само у једној различите бактерије са преминацијом анаероба (12). Иако су код 90% белкиња, у поменутој студији, међу цервиковагиналним микробиотима били доминантни лактобацили, код здравих жена других раса у репродуктивном периоду су запажене разлике у саставу вагиналног микробиома. Тако је у неким студијама уочено да су лактобацили у вагиналном микробиому били доминантни код 80% азијаткиња, 60% жена Хиспано порекла, а код јужноафриканки само код 37% (13).

1.2 Бактеријска вагиноза

Бактеријска вагиноза (БВ) се сматра једним од најчешћих поремећаја доњег гениталног тракта код жена у репродуктивном периоду. Карактерише је „замена“ доминантних врста лактобацила мешаном флором анаеробних и факултативно анаеробних бактерија. БВ је често асимптоматска што је некада чини непрепознатом. Квалитативна и квантитативна структура бактеријске вагинозе није константна и није у потпуности дефинисана. Варира

у зависности од старости, нивоа хормона, расе, етничке припадности, социо-економског статуса и хигијенских навика (14). Бактеријски микробиом код БВ се може састојати од више од 80 родова и хиљаде врста, као што су *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium spp*, *Prevotella spp*, *Mobiluncus spp*, *Sneathia sanguinegens*, *Laptotrichia amnionii*, *Megasphaera* тип1 и 2, *Eggerthella spp*, кластридијалних врста као што су BVAB1-3 (од енгл. BV-associated bacteria) итд (15, 16). Обимна истраживања су показала да постоји веза између БВ и повећаног ризика од превременог порођаја, што је БВ ставило у фокус истраживања у смислу откривања које је то „стање“ посебног вагиналног микробиома код БВ које захтева лечење у трудноћи (17). Термин “бактеријска вагиноза” је почео да се користи раних осамдесетих година прошлог века означавајући стање са присутним одређеним клиничким симптомима и знацима (вагинална иритација, непријатан мирис вагиналног секрета, повишене вредности вагиналног рН), а у одсуству познатог патогена као проузроковача болести. Увођењем метода молекуларне биологије (PCR, real-time PCR, секвенцирање) састав вагиналног микробиома је прецизније утврђен зато што је већину бактерија које живе у специфичним условима вагиналне средине веома тешко култивисати методама конвенционалне бактериологије (18). Стога је ово „стање“ адекватније назвати дисбаланс у микробном саставу вагине који за резултат има одређене нефизиолошке последице, узрокованих комплексним односом не само међусобно бактерија, већ и бактерија са организмом „домаћина“ (19).

1.2.1 Историјски осврт

Још 1892, Дедерлајн је идентификовао, култивишући вагиналне секрете здравих жена, *Lactobacillus spp*, Грам-позитивне, факултативно анаеробне бактерије које је први пут открио Шеле у киселом млеку 1780, а код људи Фолварци 1858 (20). 1921. Шредер је потврдио Дедерлајнове налазе и установио три градуса у категоризацији микробног састава вагиналне флоре: 1) здрава микрофлора вагине (*Lactobacillus spp*), 2) лактобацили делимично „заменењени“ другим бактеријама и 3) лактобацили потпуно „заменењени“ другим бактеријама (21). 1928. Томас је идентификовао „Дедерлајнове бациле“ као *Lactobacillus*

acidophilus, када су Томас и Шредер закључили да је повећана вагинална секреција удружена са смањеним бројем лактобацила (22). Све до педесетих година прошлог века, лекари су за стање са градусом 3 вагиналног секрета, а без присуства гљивица или другог инфективног агенса, користили израз „неспецифични вагинитис“ (20). Леополд је био први који је из цервикалних брисева жена са упалом грлића материце изоловао мали, непокретни, Грам-негативни коко-бацил (1953. године) за који је предложио да се сврста у род *Haemophilus*, да би две године касније Гарднер и Дјукс изоловали овај микроорганизам код жена са несспецифичним вагинитисом (када је овај микроорганизам први пут предложен као могући узрочник несспецифичног вагинитиса) и назвали га *Haemophilus vaginalis* (23). Фајфер се сложио са резултатима Леополдових, Гарднерових и Дјуксових истраживања након успешног лечења несспецифичног вагинитиса метронидазолом 1978. године (24). Међутим, многи истраживачи се нису сложили са предлогом Гарднера и Дјукса зато што истраживања Гарднера и Дјукса нису била подржана основним постулатима микробиологије о узрочницима инфективних болести које је установио Кох 1890 (25). Према овим постулатима, а у циљу потврде узрочно-последичне везе између проузроковача болести и болести коју он изазива, је било неопходно изоловати узрочник из оболелог организма, а потом код здравог организма инокулацијом изолованог узрочника изазвати исто обољење. Гарднер и Дјукс су успели да изазову несспецифични вагинитис инокулацијом *H. vaginalis* код здравих добровољки у око 35% случајева што је било недовољно да се предложени узрочник са сигурношћу прихвати (26). Гринвуд и Пикет су 1980. користећи методе молекуларне биологије (ДНК-ДНК хибридизација) показали да *H. vaginalis* не припада роду *Haemophilus*, већ су ову бактерију сврстали у потпуно одвојени род који су у част Гарднера назвали *Gardnerella*, и преименовали *H. vaginalis* у *Gardnerella vaginalis* (27).

Данас се зна да је оно што је могуће видети на препаратима вагиналних размаза бојених по Граму само „поглед кроз кључаоницу“ у односу на далеко комплекснији „трилер“ збивања на релацији микробиом-организам. У светлу онога што је до сада откривено, а држећи се најупечатљивијих феномена, овде ћемо поменути најбројније конституенте вагиналног микробиома и објаснити њихове односе.

1.2.2 *Lactobacillus spp*

Најзаступљеније врсте лактобацила у вагини жена у репродуктивном периоду су *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* и *L. jensenii*, што није случај код других животињских врста, укључујући и остале примате (28,29). Релативни број лактобацила током трудноће расте, тако да је ова врста тада најзаступљенији одељак микробиома вагине. Под утицајем естрогена, у вагиналном епителу се акумулира гликоген који се под дејством α -амилазе из вагине разлаже до малтозе, малтотриозе и α -декстрина. Ове шећере за свој метаболизам користе лактобацили стварајући млечну киселину. Млечна киселина снижава рН вагине на 3,0-4,5 што делује инхибиторно на остале бактерије (30-32). Лактобацили адхерирају за епител вагине спречавајући друге микроорганизме да се везују за исти и продукују бактериоцине који делују бактерицидно тако да и на овај начин обезбеђују доминацију (33, 34). Код малог броја жена код којих лактобацили не доминирају у микробиому вагине, млечну киселину могу стварати друге бактеријске врсте: *Atopobium*, *Megasphaera* и *Leptotrichia* (35). Значајно је напоменути да малу количину млечне киселине ствара и вагинални епител под дејством естрогена. Мукоза људске вагине је у сталним анаеробним условима због смањене прокрвљености, тако да је млечна киселина коју стварају епителне ћелије вагиналне мукозе директни производ анаеробног метаболизма. За разлику од лактобацила који стварају оба изомера млечне киселине (D и L), епителне ћелије мукозе вагине производе само L-изомер (36). Међу свим врстама лактобацила, једино *L. iners* не поседује ген за D-дехидрогеназу млечне киселине, тако да може продуковати једино L-изомер млечне киселине. D-изомер млечне киселине делује инхибиторно на активацију металопротеиназе матрикса 8 (од енгл. MMP8; matrix metalloproteinase 8) која када је активирана разлаже слузави чеп у цервикалном каналу чија је улога да спречи продор бактерија у материцу (37). Од ове четири најзаступљеније врсте лактобацила код „здравог“ микробиома вагине, код једне жене је увек доминантна само једна врста лактобацила (38). *In vitro* студије су показале да концентрација млечне киселине присутна код „здравог“ микробиома показује снажан инхибиторни ефекат на деацетилазу хистона (нарочито D-изомер) и на овај начин активира ДНК-репарацијске ензиме. Као одговор на присуство лактобацила, епителне ћелије мукозе вагине продукују липокалин удружен са

неутрофилом гелатиназом (од енгл. NGAL; neutrophile gelatinase-associated lipocalin). NGAL инхибира дејство сидерофора, компоненти које стварају бактерије ради секвестрања гвожђа. Гвожђе је неопходно за метаболизам већине бактерија вагиналног микробиома (нпр. за *Gardnerella vaginalis*) осим за лактобациле (39).

1.2.3 *Gardnerella vaginalis*

Gardnerella спада у фамилију *Bifidobacteriaceae*. Због танког пептидогликанског омотача по Граму се боји варијабилно (и грам-позитивно и грам-негативно) и коко-бациларног је облика. Са друге стране, лактобацили су Грам-позитивни и бациларног су облика (краћи, или дужи штапићи) и углавном се микроскопски разликују од гарднереле. *G. vaginalis* је покривена фимбријама које јој омогућују причвршћивање за епител. Додатно, гарднерела продукује цитолизине који путем активације протеин-киназе могу довести до смрти епителних ћелија. Један од најбоље проучених цитолизина је вагинолизин, који путем формирања пора на циљним ћелијама (еритроцити и вагинална епителна ћелија) доводи до њихове цитолитике (40). У вагиналном секрету је чак могуће детектовати специфичне имуноглобулине А класе на овај цитолизин. Продукцијом сијалидазе, пролидазе и путресцина, *G. vaginalis* разлаже протективне факторе вагиналне мукозе што доводи до ексфолијације епителних ћелија (41). Способност *G. vaginalis* да адхерира за епител вагиналне мукозе је потпомогнута и могућношћу гарднереле да ствара биофилм који олакшава адхеренцију и опстанак и других микроорганизама најчешће удружених са бактеријском вагинозом (нпр. *Atopobium vaginae*). Установљено је да су *G. vaginalis* и *A. vaginae* најчешће заједно присутне у биофилму порекла вагиналног епитела пацијенткиња са бактеријском вагинозом. Биофилм има протективна својства, штитећи ове микроорганизме од дејства антибиотика (попут баријере кроз коју антибиотици не могу да дифундују), имунског система организма, чинећи БВ хроничном и рекурентном. *In situ* хибридизацијом (енгл. FISH, fluorescent in situ hybridization) је показано да је код 90% жена са БВ укупна маса биофилма покривала најмање 50% епитела, док је код здравих контрола исто било запажено код 10% (42). *G. vaginalis* је била доминантан конституент ових биофилмова, праћена у око 80% случајева присуством *A. vaginae*. Резистенција *A.*

vaginae на метронидазол и њена удруженост са биофилмом који ствара *G. vaginalis*, обезбеђује рекурентност БВ. Многобројне студије су показале присуство *G. vaginalis* не само код жена, већ и код мушких партнера жена које имају БВ. Биотипови гарднереле са високим степеном формирања биофилма су били присутни код сексуалних партнера сугеришући могућност сексуалне преносивости (43). Запажено је да гарднерела може стимулирати про-инфламаторни одговор стимулацијом синтезе интерлеукина-8. Ово про-инфламаторно својство гарднереле може бити чак повећано коинфекцијом *Trichomonas vaginalis* (најфреквентнијим “сапутником“ БВ), а посебно присуством *Trichomonas vaginalis virus* 1-4 који преноси ова протозоа (44). Узимајући у обзир да отпочињање порођаја у својој основи представља про-инфламаторни процес, може се претпоставити могући исход утицаја који гарднерела остварује овим својством. Недавна анализа 16S рибозомске РНК (бактеријске) је потврдила да повећана заступљеност гарднереле у вагиналном микробиому, истовремено са смањеним бројем присутних лактобацила, представља ризик од превременог порођаја (45).

1.2.4 *Atopobium vaginae*

A. vaginae су анаеробне, елонгиране Грам-позитивне коке које се распоређују појединачно, у паровима, или краћим ланцима. Варијабилна ћелијска морфологија ових микроорганизама отежава њихово микроскопско диференцирање (46). Главни метаболички продукт атопобијума је млечна киселина. Овај микроорганизам је углавном резистентан на метронидазол, а осетљив на клиндамицин и нифурател (47). *A. vaginae* је први пут доведен у везу са БВ 2004 (48). PCR анализом је установљено присуство ове бактерије код 96% жена са БВ и само код 12-19% жена без БВ (49-51). Какобило, неки аутори су детектовали *A. vaginae* код 69% жена без БВ, што показује да сама детекција ове бактерије има лошу предиктивну вредност за БВ. Са друге стране, квантификација атопобијума је била добар предиктор, обзиром да су код БВ квантификовани виши нивои овог микроорганизма (52). Присуство оба микроорганизма, *G. vaginalis* и *A. vaginae*, је детектовано у 78-96% узорака са БВ, за разлику од узорака без БВ где су оба микроорганизма била присутна у 5-10% узорака (52, 53). Показано је да је *A. vaginae*

снажан стимулатор урођеног имунског одговора. Овај микроорганизам активира нуклеарни фактор-капаБ (енгл. NF-κB) (54) и стимулише синтезу интерлеукина-8 у цервиковагиналним епителним ћелијама (55). Штавише, установљено је да је *A. vaginae* био потентнији стимулатор про-инфламаторног одговора него *G. vaginalis* (56).

1.2.5 Последице бактеријске вагинозе

БВ представља ризик за инфекцију и другим, патогеним микроорганизмима (обзиром да је „заштитна“ баријера обезбеђена протективним факторима вагиналног епитела у овом случају нарушена). Тако, жене са БВ чешће бивају инфициране са *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, протозоом *Trichomonas vaginalis* као и HIV-ом (енгл. Human Immunodeficiency virus) (57). Велике студије пресека (енгл. cross-sectional studies) су показале да су труднице са БВ у другом и трећем триместру трудноће биле у 40-80% већем ризику од превременог порођаја него жене без БВ (58, 59). Треба напоменути да немају сви припадници *Lactobacillus spp* подједнаку заштитну улогу. На пример, показано је да су жене код којих је доминантна врста лактобацила у вагиналном микробиому била *L. iners* биле под већим ризиком од HIV инфекције у односу на жене у чијем су вагиналном микробиому доминирале друге врсте лактобацила. Удруженост *L. iners* са инфламацијом указује на њихову везу са „нестабилним“ вагиналним микробиомом (60). Све наведено досада, иако многи аспекти значаја вагиналног микробиома нису сагледани до краја, говори у прилог томе да састав вагиналног микробиома итекако има значаја, како са аспекта физиолошког функционисања гениталног тракта, тако и са аспекта адекватне репродукције и здравља новорођенчића. Разумевање ове проблематике и правовремено препознавање стадијума у ком је пожељно интервенисати, овде мислимо на добру дијагностику, је од непроценљивог значаја.

1.2.6 *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, HIV и бактеријска вагиноза

Веза између БВ и HIV је први пут показана студијом спроведеном на Тајланду 1995. године (61). Отада, у многим радовима је приказана веза између БВ и HIV: код трудница и породиља у Малавију, код жена у Јужној Африци, Кенији и многе друге (62-64). Заправо, према резултатима опсежних студија, показано је да БВ повећава ризик од инфекције HIV вирусом за 60% (65). Тачан разлог ове предиспозиције још увек није утврђен али се зна да повишена рН вредност вагиналне средине поспешује адхеренцију и опстанак вируса, повећавајући ризик од инфекције. Са друге стране, проинфламаторни цитокини и хемокини, који се стварају у условима БВ (интерлеукин-1-бета, интерлеукин-8), повећавају ризик трансмисије вируса директном стимулацијом вирусне репликације и повећањем трафикинга и активације CD4+ ћелија домаћина које се нормално налазе у малом броју у цервико-вагиналној мукози (66). Такође, код БВ је уочена редукција антивирусних фактора као и смањени ниво урођеног имунског одговора (67, 68).

Неким истраживањима је установљена веза између присуства БВ и повећаног ризика од инфекција бактеријама *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoeae* (69). У овим случајевима обољевање трудница од хламидијалних инфекција је било два пута чешће, а обољевање од гонореје 6 пута чешће. Мартин et al, су показали да је одсуство вагиналних лактобацила повећавало ризик од инфекције гонорејом, али не и хламидијом (70). Анализом резултата добијених студијама које су укључивале и по пар хиљада пацијенткиња, установљено је да је код жена са БВ ризик од инфекције хламидијом или гонорејом био од 1,6-1,9 пута виши него код жена које нису имале БВ (71, 72). Узимајући све заједно, поменуте студије су БВ узеле у обзир као фактор ризика за инфекције хламидијом и гонорејом, али треба напоменути и чињеницу да је већина студија спроведена на узорцима жена високо-ризичног понашања (промискуитет, жене које су углавном посећивале клинике за сексуално преносиве болести, жене под ризиком за непланирану трудноћу).

1.2.7 Аеробни вагинитис

Аеробни вагинитис (АВ) је први пут дефинисан 2002. године као стање које се разликује од бактеријске вагинозе и као такво захтева потпуно другачији дијагностички и терапијски приступ (73). Као и БВ, и АВ представља поремећај вагиналног микробиома у смислу нарушености доминације лактобацила, али је праћен далеко снажнијим инфламаторним променама него БВ. Код АВ лактобацили најчешће бивају замењени аеробним цревним коменсалима, или патогенима као што су: *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Echerichia coli* и *Staphylococcus aureus* (74, 75). Присуство АВ је запажено код 8-11% трудница и код 5-24% жена које су се жалиле на вагинални дискомфорт (73, 75). АВ је понекада удружена са појачаном секрецијом и присуством великог броја полиморфонуклеарних леукоцита („токсични“ леукоцити). Жене са АВ обично имају тању вагиналну мукозу него жене са БВ, са повећаним бројем интермедијерних и парабазалних ћелија у вагиналним размазима, што указује на повећану десквамацију површних епителних слојева (76). И АВ и БВ се дијагностику прегледом нативног препарата вагиналног размаза на основу недостатка лактобацила. За разлику од БВ, АВ препарати садрже коке, парабазалне епителне ћелије и полиморфонуклеарне леукоците (77). Дондерс је препоручио систем скорирања за оцену АВ сличан ономе који је предложио Нацент за БВ. Овај систем такође има три групе налаза: нормалан, интермедијеран и АВ (73). Основа скорирања АВ је такође присуство лактобацила, с тим што су додате још четири варијабле: 1) пропорционални број лактобацила; 2) присуство „токсичних“ леукоцита; 3) присуство парабазалних епителних ћелија и 4) тип бактерија присутних уз лактобациле. АВ је могуће погрешно сврстати у БВ, што за последицу неисправног лечења може имати десквамативни инфламаторни вагинитис који је ризик за превремени порођај, хориоамнионитис и инфекције пупчане врпце током трудноће (78).

1.2.8 Дијагноза бактеријске вагинозе

Бактеријска вагиноза има високу преваленцу која се разликује у односу на анализирану популацију: од 4% у индустријализованим земљама до 61% у земљама у развоју, са

средњом вредношћу од 14% (79). Најмање 30% жена са вагиналним дискомфортом остаје недијагностиковано чак и после опсежног испитивања (80). Одлука о избору одговарајуће методе за дијагнозу БВ захтева евалуацију комплексности, трошкова и присуства резултата тешких за интерпретацију (81). Иако је успостављено више критеријума за оцену вагиналних размаза који су међусобно компарабилни, дешава се да не класификују исту групу пацијената у исту категорију. Као што је познато, присуство инфективног узročника је основни критеријум за постављање дијагнозе инфективног обољења. Ово није случај са БВ, обзиром да прави узрок поремећаја још увек није утврђен. Дијагноза БВ се заснива на клиничким и лабораторијским критеријумима који не узимају у обзир присуство и количину специфичне бактерије. Ово треба имати у виду приликом компарације различитих дијагностичких метода. Заправо БВ се не дефинише на основу присуства бактеријске инфекције изазване једним инфективним агенсом, већ као последица изазвана поремећајем уобичајне микрофлоре вагине. Дијагноза БВ заснована на дијагностичким критеријума је заправо процена критеријума у циљу добијања најбољег слагања критеријума и могућег присуства БВ. У том смислу је значајно да је „процењивач“ добро обучен да евалуира клинички значај различитих метода доступних за дијагнозу БВ.

Бактеријска вагиноза може бити дијагностикована коришћењем разних критеријума (клиничких, или микроскопских), које су до сада у клиничку и лабораторијску праксу увели Амсел, Нацент, Исон/Хај и Клејс (прва два су широко прихваћени као “златни стандарди“ у БВ дијагностици, клинички и микроскопски, респективно). Амселов метод је заснован на оцени одређених биохемијских својстава вагиналног секрета и карактеристичном микроскопском налазу нативних препарата вагиналног секрета. Према Амселовим критеријумима, дијагноза БВ се поставља када је присутно 3 од укупно четири критеријума (pH>4,5; млечно-сивкаста боја вагиналног секрета, позитиван Вифов тест и присуство клу-ћелија на нативном микроскопском препарату) (82). По Наценту препарати вагиналних размаза бојених по Граму се класификују на основу присуства одређених бактеријских морфотипова, као што су *Lactobacillus*, *Gardenerella-Bacteroides* и *Mobiluncus*, и њиховог броја у нормалну, интермедијерну и БВ групу (83). Са друге стране, категоризација по Исон/Хају подразумева класификацију препарата бојених по

Граму на основу евалуације пре квалитативног односа запажених бактеријских морфотипова, него на основу тачног броја бактерија. У циљу да се добије што прецизнији резултат класификације, Исон и Хај су увели и две додатне категорије: групу 0 (без бактерија) и групу 4 (велика количина Грам-позитивних кока) (84). Клејс је додатно модификовао Исон/Хај критеријуме комбинујући култивацију и молекуларну идентификацију бактерија са микроскопским прегледом препарата бојених по Граму. Заправо, Клејс је поделио групу 1 (нормалан налаз) у подкатеорије: 1а (дуги и танки Грам-позитивни штапићи), 1б (кратки и дебели Грам-позитивни штапићи), 1аб (комбинација прва два) и групу попут групе 1 (енгл. 1-like) у коју је сврстао Грам-позитивне бациле ирегуларног облика (85, 86). Иако широко коришћени, сви поменути критеријуми имају неке недостатке. На пример, неке студије су показале да Наџентови критеријуми, у поређењу са Амселовим критеријумима, могу преценити реалну преваленцу БВ и да чак могу здраве пацијенте интерпретирати као пацијенте са БВ (87). Са друге стране, Амселов метод је заснован на клиничким критеријума и дихотоман је, што значи да има само две категорије налаза, док су микроскопске методе засноване на анализи варијације вагиналне микрофлоре и имају три или више категорија. Све ово отежава међусобно поређење поменутих метода у смислу процене коју методу је боље користити и ствара потребу за додатним корекцијама у смислу међусобног усаглашавања дијагностичких критеријума. Наџентови критеријуми класификују вагиналне размазе квантификацијом бактеријских морфотипова, што захтева значајно време за евалуацију и вештину посматрача (88). Додатно, Наџентов систем категоризације укључује само три морфотипа што не може обухватити хетерогеност и комплексност вагиналног микробиома. Иако су Исон/Хај и Клејс превазишли неке недостатке Наџентових критеријума уводећи квалитативну евалуацију вагиналних размаза, њихов метод се ипак базира на анализи малог дела препарата под увеличањем $\times 1000$. Посматрањем 5-20 видних поља под увеличањем $\times 1000$ актуелна посматрана површина препарата чини само малу фракцију укупне површине препарата што може бити узрок грешке у смислу адекватне евалуације реалног стања (89, 90). Додатно, интервали скорирања код Наџента су веома уски, некада се разликују у само неколико бактерија, и запажени број бактеријских морфотипова може варирати од „оцењивача“ до „оцењивача“. Хомогеност и дебљина

препарата условљена техником наношења узорка на предметно стакло такође може утицати на исход евалуације узорака. Да би се избегло захтевно бројање бактеријских морфотипова, Исон/Хај и Клејс су увели квалитативну микроскопску евалуацију. Поменуте методе су боље у смислу да скраћују време евалуације узорака и да је систем критеријума бољи у смислу адекватнијег диференцирања морфотипова лактобацила, али мала површина препарата који се евалуира може утицати на процену реалног стања, нарочито због неједнаке дебљине узорка на препарату. Нови микроскопски метод има неке предности у дијагностици БВ у односу на остале микроскопске методе (91). Главна разлика између метода које су увели Нацент, Исон/Хај, Клејс и нове микроскопске методе је да претходно уведене методе користе микроскопско увеличање $\times 1000$, док је нови микроскопски метод заснован на опсервацији препарата под микроскопским увеличањем $\times 200$. На први поглед је јасно да се микроскопским увеличањем $\times 200$ обухвата већа површина посматраног препарата, него под увеличањем $\times 1000$. Заправо, ако је површина стандардног предметног стакла $25.4 \times 76.2 \text{ mm} = 1935 \text{ mm}^2$, и ако узмемо у обзир да ћелијски размаз чини само трећину плочице (око 600 mm^2), а да је величина видног поља под увеличањем $\times 1000$ 0.035 mm^2 , онда од укупно 17 143 поља ($600/0.035$) анализирамо само 15-20 поља. Када исти препарат посматрамо под увеличањем $\times 200$, величина видног поља је $0,875 \text{ mm}^2$ (број видних поља под увеличањем $\times 400$ је 6,25 пута већи него под увеличањем $\times 1000$, док је број видних поља под увеличањем $\times 200$ четири пута већи у односу на број видних поља под увеличањем $\times 400$), што значи да анализирамо 100-150 поља од укупно 686 ($600/0.875$), или $\frac{1}{4}$ укупне површине плочице. На основу новог микроскопског метода ког су предложили Ненадић, et al (91), поред могућности да се анализира већа површина препарата, постоји и могућност да се евалуација препарата може обавити за знатно краће време. Према новој методи, препарати се разврставају на 6 група према налазу. Сама категоризација је флексибилна и може се свести на две групе (нормалан налаз и БВ). Једноставнија је и бржа од Амселове категоризације, што може бити од помоћи лекарима клиничарима у свакодневном раду у смислу избора терапеутског приступа, посебно у случајевима где долази до разилажења у категоризацији по различитим дијагностичким критеријумима. Тако нпр. посебан проблем представља тзв. интермедијарна група за коју је показано да представља бактеријску флору

састављену од микроорганизама удружених са бактеријском вагинозом, као што је *Gardnerella vaginalis*, и лактобацила обично удружених са нормалном флором. То је главни разлог зашто се интермедијеран налаз сматра прелазном фазом између нормалног и БВ (92, 93).

Нови микроскопски метод је понудио нека од решења: омогућава „оцењивачу“ да: 1) формулише импресију на основу релативног броја штапићастих и нештапићастих морфотипова редукујући ризик од погрешне интерпретације повећањем посматране површине препарата и 2) због флексибилности категорија може бити организован у само две категорије (нормални налаз и БВ), што може имати значај у клиничким импликацијама.

Увођењем молекуларне биологије у дијагностику БВ је омогућило боље сагледавање комплексног састава вагиналног микробиома као и међусобног односа микроорганизама који га чине (94). На овај начин је омогућено разумевање онога што би требало да представља „здрава“ вагинална микрофлора као и оно што представља одступање од „здрог“. Методама молекуларне биологије (PCR и real-time PCR) је могуће проверити ефикасност клиничких и микроскопских метода дијагностиковања БВ, као и модификовати поменуте у циљу прецизније дијагностике.

Прва студија која је користила методе молекуларне дијагностике у смислу карактеризације бактерија вагиналног микробиома је објављена 2002. године (95). На основу резултата ове студије је показано да су код узорака класификованих по Наценту у групу 1 (нормалан налаз) доминирали лактобацили, а да је у БВ групи по Наценту била присутна мешана вагинална флора. Ревидирајући студије које су у анализи вагиналног микробиома користиле молекуларне технике у периоду од 2002-2008, Сринивасан et al. су закључили да је БВ заиста удружена са губитком лактобацила и појавом и/или доминацијом других анаеробних бактерија које су идентификовали, што није било могуће пре урадити методама конвенционалне бактериологије (96). Неке од ових бактерија су припадале роду лактобацила (*L. iners*), док су друге доминантно детектоване код бактеријске вагиозе (*A. vaginae*, BVAB1-3). На основу већине студија које су користиле молекуларне технике детекције и квантификације у периоду од 2008-2013. Запажено је да су лактобацили били присутни код свих категорија оцењених по Амселу и Наценту, али да

је *L. crispatus* изразито доминирао код “здравог“ вагиналног микробиома (97-106), док је *Liners* преовладавао у узорцима сврстаним у интермедијерну и БВ групу (97-103). Неке од најчешће детектованих бактерија које су биле удружене са БВ су *G. vaginalis*, *A. vaginae*, BVAB1-3; затим бактерије које су припадале родовима *Prevotella*, *Eggerthella*, *Dialister*, *Megasphaera*, *Sneathia*, *Leptotrichia*, *Parvimonas*, *Veillonella*, *Bacteroides*, *Mobiluncus*, *Porphyromonas*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Gemella* и *Escherichia/Shigella* (96-98). Запажено је да су *G. vaginalis* и *Prevotella spp* биле често присутне и код „здравог“ вагиналног микробиома, али је њихов број код вагинозе био значајно виши. Студија коју су Сринивасан et al. спровели 2013. је ставила под питање интерпретацију микроскопских препарата по Наценту (107). По овој студији морфотип који је по Наценту тумачен као *Mobiluncus* је по молекуларној анализи више одговарао BVAB-1. Иако су ово значајна запажања, обзиром да су оба микроорганизма удружена са БВ, није било клиничке релевантности. Нажалост, на основу поменутих студија састав и значај интермедијерне групе је остао непотпуно разјашњен. Оно што је такође занимљиво су запажања неких студија која су пронашла везу између типа вагиналног микробиома и предиспозиције ка неким проузроковачима вагинитиса. Тако је на пример уочено да је вагинална колонизација гљивицама *Candida spp* била чешћа уколико су доминантни конституенти вагиналног микробиома били лактобацили, док је инфекција протозоом *Trichomonas vaginalis* била чешће удружена са бактеријском вагинозом (108-111).

1.2.9 Терапија бактеријске вагинозе

Полимикробна етиологија БВ чини ово стање тешким у смислу адекватног избора одговарајућег терапеутског приступа. БВ најчешће настаје када промене у нивоима хормона резултирају снижењем вагиналне рН вредности, што даље модификује вагиналну микрофлору (112). Код половине трудница и трећине жена које нису трудне долази до спонтаног самоизлечења успостављањем нормалне вагиналне микрофлоре (115). Имајући у виду недовољно дефинисану етиологију БВ, често долази до грешака у лечењу овог поремећаја, што резултира рекурентношћу БВ. Терапија је заснована на примени

антибиотика код симптоматских пацијенткиња, до губитка симптома и нормализације микроскопских налаза. Лечење асимптоматских жена се избегава, зато што за последицу може имати симптоматску инфекцију гљивицама. Међутим, лечење асимптоматских жена се препоручује у случају потребе за специфичним гинеколошким процедурама ради профилаксе (113).

Терапија БВ се најчешће спроводи системском или топикалном применом метронидазола или клиндамицина (114). Клиндамицин је бактериостатик који делује на аеробне бактерије, укључујући неке Грам-позитивне и Грам-негативне анаеробе, док је метронидазол бактерицидни антибиотик који делује на Грам-негативне анаеробе. Важно је напоменути да метронидазол не делује на лактобациле, тако да не ремети значајније вагинални екосистем. Препоручене дозе поменутих антибиотика у лечењу БВ су: метронидазол 500mg *per os*, два пута дневно седам дана; клиндамицин 300mg *per os* два пута дневно током седам дана и 0,75% метронидазол вагинални крем једном или два пута дневно током пет дана (115). Сугерисане су и алтернативне опције као што су: 1) метронидазол 250mg *per os*, 5g метронидазол интравагинално седам дана (114) и 2) метронидазол 400mg током пет дана (117) и 2% клиндамицин једном дневно током пет дана (116).

Сви модели лечења су показали задовољавајући ниво лечења. Метронидазол примењем перорално у дози од 500mg два пута дневно током седам дана је показао ниво деловања од 23-99%, док је незнатно нижи ниво деловања био у случају примене 0,75% метронидазол вагиналног крема (26-81%) (117, 118). Иако је ниво деловања клиндамицина у дози од 300mg *per os* два пута дневно током седам дана био задовољавајући (70-94%) (114), ниво деловања топикалног клиндамицина је био дискутабилан (30-37%) (116). Без обзира на успешност терапије, 25-30% жена најчешће поново развије БВ у прва три месеца и 50% жена у периоду од 6-12 месеци. Рекурентност може имати следеће узроке: 1) реинфекција биотипом другачијим од оригиналног биотипа гарднереле, или 2) неадекватна ерадикација инфективних микроорганизама, и стога немогућност лактобацила да успоставе стање „здравог“ вагиналног микробиома (113, 118).

Откако је први пут демонстрирано успешно лечење БВ у трудноћи применом јогурта (119), многе студије су тестирале ефикасност примене пробиотика који садрже

лактобациле у терапији БВ (120, 121). Пробиотици су живи сојеви микроорганизама који имају благотворно дејство на организам. Примењују се перорално и своје дејство остварују у дигестивном тракту регулишући цревну флору и делујући имуностимулаторно. Из цревног тракта, пробиотици колонизују генитални тракт. При употреби пробиотика у лечењу БВ запажен је ниво деловања од 40% (122, 123).

2 ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

2.1 Циљеви

2.1.1 Примарни циљ

Утврдити да ли постоји слагање резултата добијених PCR и real-time PCR анализом са резултатима евалуације вагиналног секрета добијених употребом Амселовог критеријума (клинички критеријум) и резултата анализе вагиналних размаза бојених по Граму добијених категоризацијом по Нуценту, Исон/Хају, Клејсу и микроскопској методи по Ненадићу et al.

2.1.2 Секундарни циљеви

1. Категорисати вагиналне секрете на основу Амселових клиничких критеријума и микроскопских критеријума по Нуценту, Исон/Хају, Клејсу и Ненадићевој микроскопској методи.
2. Идентификовати и квантификовати *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* у предходно категорисаним препаратима вагиналних размаза.
3. Квантификовати укупни вагинални микробиом.
4. Одредити релативни однос *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, међусобно и у односу на укупни вагинални микробиом.
5. Утврдити да ли постоји слагање резултата добијених PCR и real-time PCR анализом са резултатима квалитативне категоризације (I, II, III) вагиналних секрета добијених употребом Амселовог критеријума (клинички критеријум) и критеријума по Нуценту, Исон/Хају, Клејсу и микроскопској методи по Ненадићу et al.
6. Утврдити да ли постоји слагање резултата добијених real-time PCR анализом са резултатима квантитативне категоризиције (празан, умерен, пун), вагиналних

размаза бојених по Граму, класификованих по микроскопској методи по Ненадићу et al.

2.2 Хипотезе

2.2.1 Примарна хипотеза

Постоји слагање резултата добијених PCR и real-time PCR анализом са резултатима евалуације вагиналног секрета добијених употребом Амселовог критеријума (клинички критеријум) и резултата анализе вагиналних размаза бојених по Граму добијених категоризацијом по Нуценту, Исон/Хају, Клејсу и микроскопској методи по Ненадићу et al.

2.2.2 Секундарне хипотезе

1. Категорије вагиналног секрета утврђене студијским методама су квалитативне (I, II, III) и квантитативне (празан, умерен, пун);
2. У узорцима препарата вагиналних секрета бојених по Граму се налазе *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*;
3. *Lactobacillus spp*, доминира у нормалним (I) а *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, у налазима вагиналних секрета класификованих као бактеријска вагиноза (III), при чему је њихов однос уравнотежен у интермедијарним налазима (II);
4. Укупни вагинални микробиом високо корелира са резултатима квантитативне категоризиције (празан, умерен, пун) вагиналних размаза, бојених по Граму, класификованих према микроскопској методи по Ненадићу et al.

3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1 План истраживања

Студија је дизајнирана као ретроспективна и обухватила је 120 трудница (старости од 18-40 година) којима је током редовне контроле, на Одељењу за гинекологију ВМА у Београду, узиман вагинални брис. У студију нису биле укључене пацијенткиње млађе од 18 и старије од 40 година, пацијенткиње са мултиплим трудноћама, аномалијама материце, конизацијом грлића материце, као ни пацијенткиње са претходним превременим порођајима или побачајима. Пацијенткиње које су биле под било каквом терапијом две недеље пре прегледа, као и пацијенткиње које су имале сексуалне односе недељу дана пре прегледа, такође нису биле укључене у студију.

Од пацијенткиња су узимани вагинални брисеви који су коришћени за прављење нативних препарата и препарата по Граму. Вагинални секрет је оцењиван по клиничким (Амсел) и микроскопским критеријумима (Нацент, Исон/Хај, Клејс, нови микроскопски метод). Након микроскопске евалуације, препарати су коришћени за молекуларну анализу (real-time PCR).

Етички Комитет Војномедицинске Академије у Београду је одобрио протокол студије и све пацијенткиње су дале сагласност да учествују у студији путем писаног информисаног пристанка.

3.2 Узорковање и примена клиничких критеријума по Амселу

Пре вагиналног прегледа, у вагину је био стављан спекулум без употребе лубриканса и клиничким прегледом је константована количина, конзистенција и боја вагиналног секрета. Са бочног вагиналног зида су узимана по два узорка памучним брисом. Први узорак је био наношен, благим котрљањем штапића по дужини, на микроскопску плочицу димензија 76,2x25,4 mm. Преко узорка је потом накапавана кап физиолошког раствора и стављано покровно стакло. Препарат је затим прегледан под фазно-контрасним микроскопом на увећању x400. По завршетку микроскопског прегледа, на исти препарат је укапавана кап 10% калијум-хидроксида ради лакше визуализације спора и/или хифа гљивица. Други узорак је на сличан начин размазиван по плочици, сушен на ваздуху, бојен по Граму и архивиран. Проба са 10% калијум-хидроксидом, у оквиру Амселовог критеријума, је извођена тако што је на памучни штапић са узорком узетог са бочног вагиналног зида накапавана по кап 10% калијум-хидроксида. Присуство мириса на покварену рибу (“fishy” odor) је указивао на позитиван тест. Вагинални рН, у оквиру Амселовог критеријума, је био одређиван лакмус папиром (Merck рН распона од 4,0 до 7,0).

Амселов критеријум је базиран на присуству:

1. Хомогеног, беличасто-сивкастог вагиналног секрета;
2. Мириса покварене рибе када се на секрет накапа 10% калијум-хидроксид („wiff“ тест);
3. Присуство „clue“ ћелија на нативном микроскопском препарату (више од 20%);
4. рН вагине преко 4.5

Било је потребно је да три од четири Амселова критеријума буде позитивно да би се поставила дијагноза бактеријске вагинозе.

3.3 Микроскопска евалуација препарата бојених по Граму

Препарати вагиналних размаза бојени по Граму, су били микроскопски евалуирани и категорисани по критеријумима које су успоставили Наџент, Исон/Хај, Клејс и Ненадић et al (нова микроскопска метода). Ради лакше компарације, сви налази су били класификовани на три, или две гупе. Када су микроскопске методе биле поређене са Наџентом као „златним“ стандардом, Исон/Хај и Клејс су класификовани у три групе налаза тако што су група 0 и 1 биле нормалан налаз; 2 је био интермедијеран налаз; а група 3 и 4 бактеријска вагиноза. Слично овоме, налази нове микроскопске методе су били класификовани у три групе на следећи начин: НП (нормалан пун) и НУ (нормалан умерен) су сврстани у нормалан налаз; НН (нормалан нул) и БВН (бактеријска вагиноза нул) су сврстани у интермедијеран налаз, док су БВУ (бактеријска вагиноза умерен) и БВП (бактеријска вагиноза пун) сврстани у бактеријску вагинозу (БВ). Када су микроскопске методе биле поређене са клиничким критеријумима по Амселу (Амсел категоризује све налазе у нормалан или БВ), све налазе микроскопских анализа смо поредили са Амселом на два начина: тако што смо групу интермедијерних налаза (ИМД) интерпретирали као нормалан налаз или смо ИМД интерпретирали као БВ.

3.3.1 Категоризација препарата вагиналних размаза по Наџенту

Укратко, Наџентов систем бодовања је подразумевао категоризацију размаза, посматраних микроскопски под увећањем $\times 1000$, у три групе на основу бактеријског морфотипа. Морфотипови су били категорисани на основу просечног броја бактерија по посматраном видном пољу (посматра се 5-20 поља). Ако је по видном пољу препознато више од 30 лактобацила, скор је био 0; ако није било лактобацила, скор је био 4. Ако су били одсутни морфотипови типа *Gardnerella*, скор је био 0; а ако их је било присутно више од 30, скор је био 4. На основу присуства других морфотипова, као што је *Mobiluncus*, било је додавано још 2 бода. На основу финалног скорa сви налази су били класификовани на: нормалан

налаз - група 1 (0-3 бода), интермедијеран налаз - група 2 (4-6 бодова) и бактеријску вагинозу - група 3 (7-10 бодова) (табела 1).

Табела 1. Шематски приказ система бодовања микроскопских препарата вагиналних размаза, бојених по Граму, по Нацентовим критеријумима.

Бодови	<i>Lactobacillus</i> морфотип		<i>Gardnerella/Bacteroides</i> морфотип		Закривљени Грам- варијабилни штапићи <i>Mobiluncus</i>
0	4+	+	0	+	0
1	3+		1+		1+ или 2+
2	2+		2+		3+ или 4+
3	1+		3+		-
4	0		4+		-
<p>Бодовање базирано на броју морфотипова по видном пољу (микроскопско увеличање x1000): 0=0; 1+ = < 1; 2+ = 1-4; 3+ = 5-30; 4+ = ≥ 30</p> <p>Укупан број бодова: 0-3 нормалан; 4-6 интермедијеран; 7-10 бактеријска вагиноза</p>					

3.3.2 Класификација препарата вагиналних размаза по Исон/Хају

Исон/Хај класификација је заснована на квалитативној процени присуства бактерија на размазима бојеним по Граму (уместо одређивања тачног броја бактерија) под увеличањем $\times 1000$. У поређењу са Наџентовим системом, Исон/Хај има још две категорије: 0 (без бактерија, тзв. „чисту“ групу) и групу 4 (Грам-позитивне коке као што су *Streptococcus* или *Staphylococcus*) (табела 2).

Табела 2. Шематски приказ критеријума за класификацију микроскопских препарата вагиналних размаза, бојених по Граму, по Исон/Хају.

Група	Квалитативна процена присуства одређених морфотипова под микроскопским увеличањем $\times 1000$.
0	На препарату нема бактерија
1	Доминирају Грам-позитивни штапићи
2	Присутни и Грам-позитивни штапићи и Грам-варијабилни коко-бацили
3	Доминирају Грам-варијабилни коко-бацили и/или закривљени Грам-позитивни штапићи
4	Доминирају Грам-позитивне коке
0 и 1 нормалан; 2- интермедијеран; 3 и 4 – бактеријска вагиноза	

3.3.3 Класификација препарата вагиналних размаза по Клејсу

Клејсови критеријуми су заснована на категоризацији по Исон/Хају, уз поделу групе 1 на 1а (кратки и дебели бацили), 1б (дуги и танки бацили) и 1аб (мешани лактобацили). Такође, категоризација по Клејсу подразумева и класификацију у 1-like групу, која обухвата Грам-позитивне бактерије дифтероидног морфотипа, и „пурулентну“ групу 1 (доминантан морфотип су лактобацили уз присуство леукореје). Групе 2, 3 и 4 по Клејсу, одговарају истоименим групама по Исон/Хају (табела 3).

Табела 3. Шематски приказ критеријума за класификацију микроскопских препарата вагиналних размаза, бојених по Граму, по Клејсу

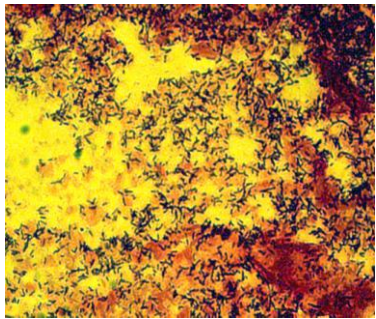
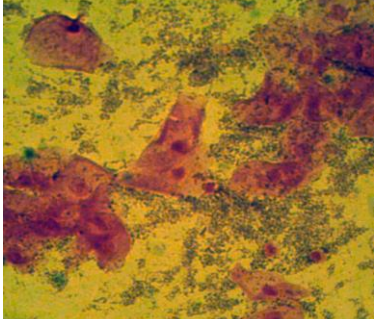
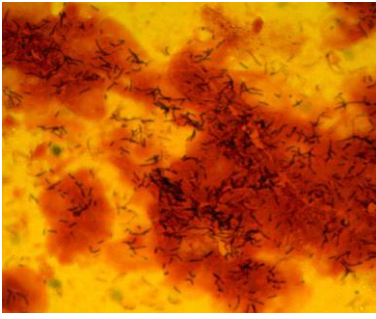
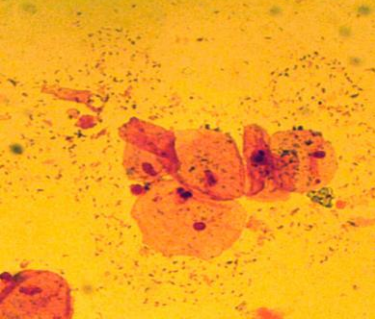
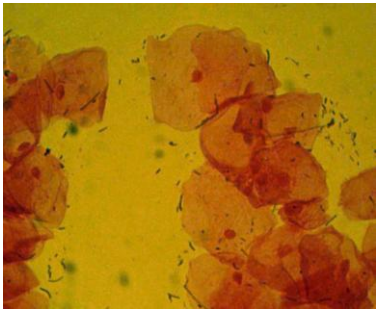
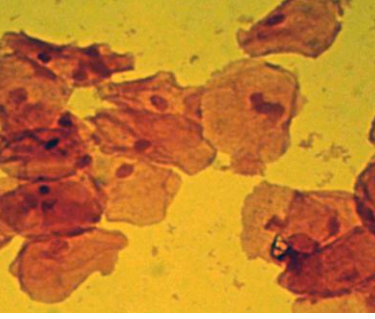
Група	Квалитативна процена присуства одређених морфотипова под микроскопским увећањем x1000.
0	Нема бактерија.
1	1а – доминирају дуги и танки Грам-позитивни штапићи
	1б – доминирају кратки и дебели Грам-позитивни штапићи
	1аб – мешано присуство дугих и танких заједно са кратким и дебелим Грам-позитивним штапићима
	1-like – доминирају Грам-позитивни дифтероиди
	Леукореја – Грам-позитивни штапићи уз присуство полиморфонуклеарних леукоцита
2	Присутни и Грам-позитивни штапићи и Грам-варијабилни коко-бацили
3	Доминирају Грам-варијабилни коко-бацили и/или закривљени Грам-позитивни штапићи
4	Доминирају Грам-позитивне коке
0 и 1 нормалан; 2- интермедијеран; 3 и 4 – бактеријска вагиноза	

3.3.4 Класификација препарата вагиналних размаза по новој микроскопској методи

Нова микроскопска метода (91) је заснована на оцењивању вагиналних размаза бојених по Граму под микроскопским увеличањем $\times 200$ и њиховој категоризацији на основу присуства бациларних форми (БФ) и других форми (не бациларне форме – НБФ). Најкраћа дужина микроорганизама која се под увеличањем $\times 200$ могла диференцирати као БФ је $1.5\mu\text{m}$. На основу ове чињенице, под увеличањем $\times 200$, није било потешкоћа у процени да ли на препарату преовладавају БФ ($> 1.5\mu\text{m}$, лактобацили), или НБФ ($< 1.5\mu\text{m}$, бактерије које су удружене са бактеријском вагинозом). Број БФ и НБФ се по новој микроскопској методи процењивао семиквантитативно на следећи начин: препарат са бројним бактеријама које прекривају већи део препарата (између, око и преко епителних ћелија) је био класификован као „пун“, препарат са ретким бактеријама (углавном око епителних ћелија) је био сврстан као „умерен“, и препарат са скоро одсутним бактеријама је био категорисан као „празан“ или „нул“. У зависности од односа БФ:НБФ, налази су додатно били категорисани у групе: нормалан и БВ. На овај начин, сви препарати су бити класификовани у 6 подгрупа, односно по три категорије у свакој групи, а то су: три са нормалним налазом (нормал нул – НН; нормал умерен – НУ и нормал празан – НП) и три групе са бактеријском вагинозом (БВ нул – БВН, БВ умерен – БВУ и БВ пун – БВП).

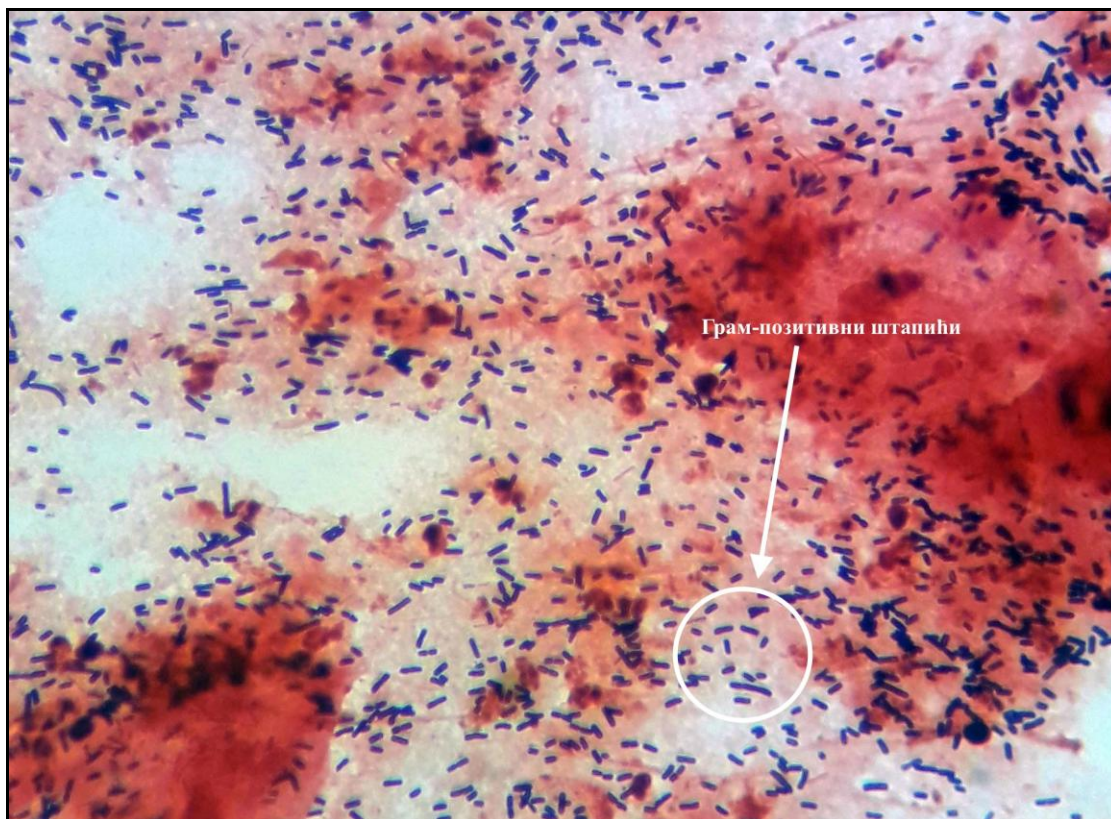
Табела 4. Шематски приказ за класификацију микроскопских препарата вагиналних размаза, бојених по Граму, по новој микроскопској методи

Семи-квантитативна процена „целуларности“ на основу присуства и броја одређених бактеријских морфотипова под микроскопским увећањем x200

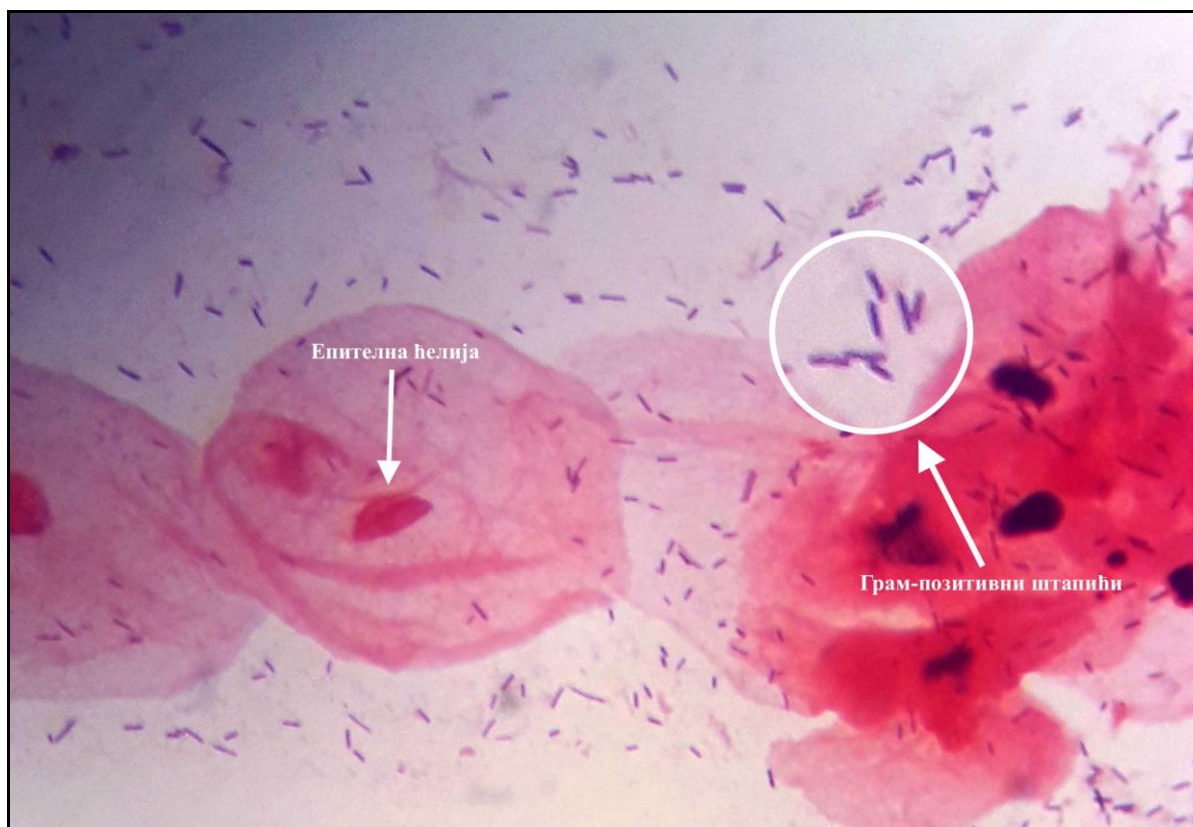
НП		БВП	
НУ		БВУ	
НН		БВН	

**НП – нормал пун; НУ – нормал умерен; НН – нормал нул; БВП – БВ пун;
БВУ – БВ умерен; БВН – БВ нул.**

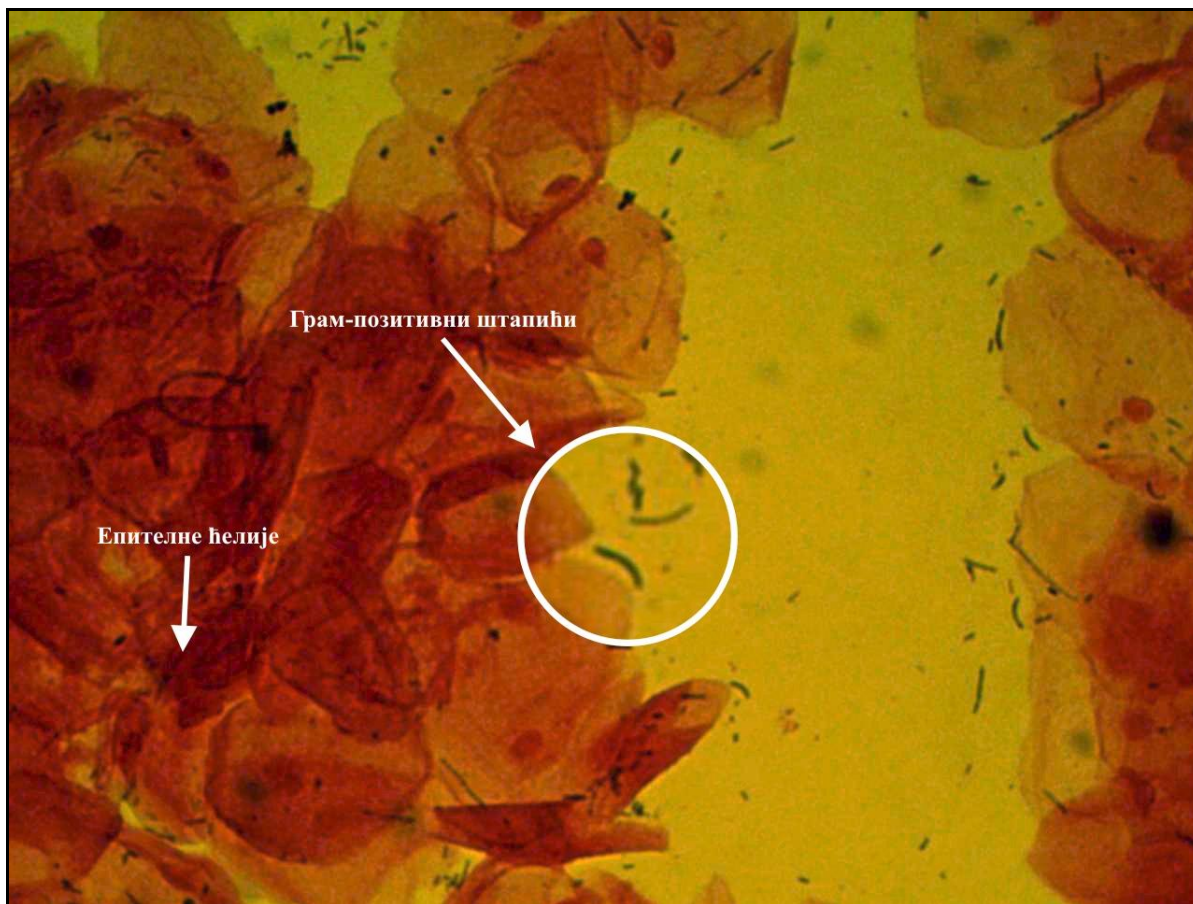
Слика 1. Нормалан пун (НП) – јасна доминација Грам-позитивних штапића (лактобацили) који су распоређени око и преко епителних ћелија. Увећање x1000.



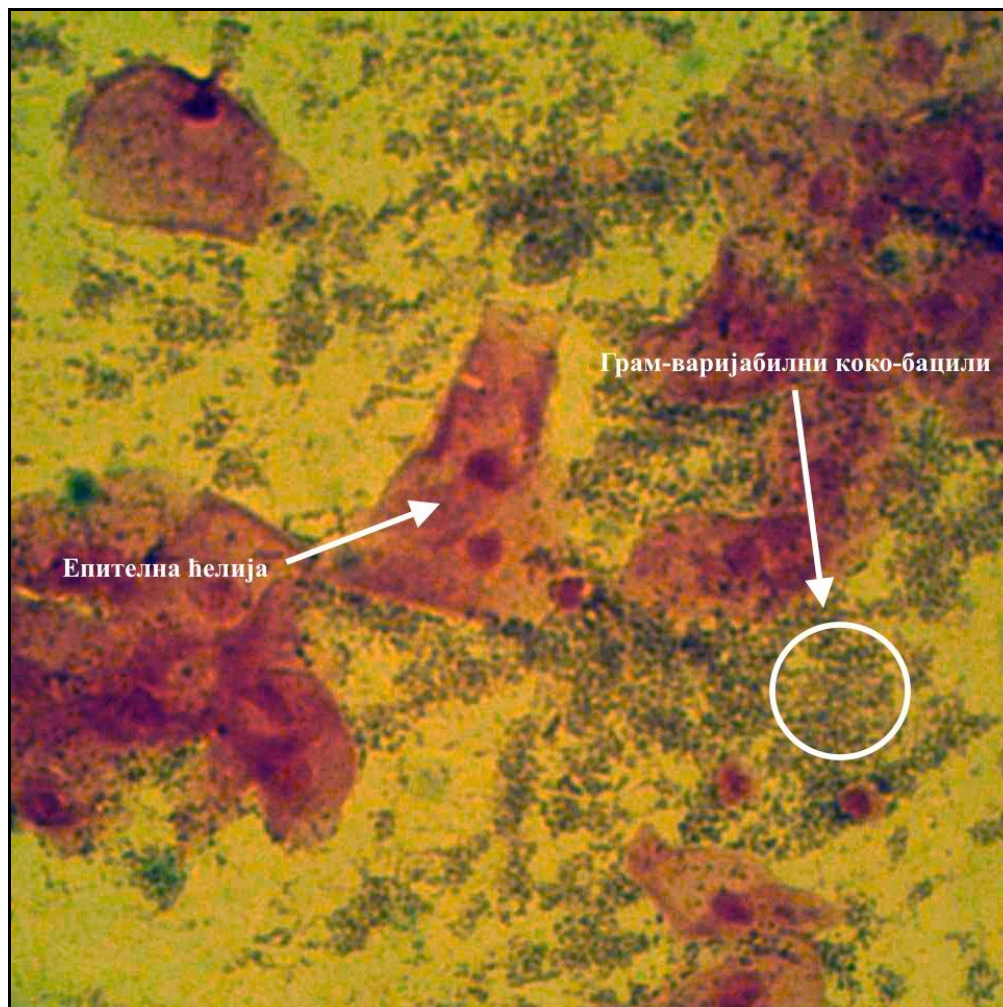
Слика 2. Нормалан умерен (НУ). Знатно мањи број Грам-позитивних штапића у односу на „пун“ препарат. Штапићи се углавном налазе око епителних ћелија. Увећање x1000.



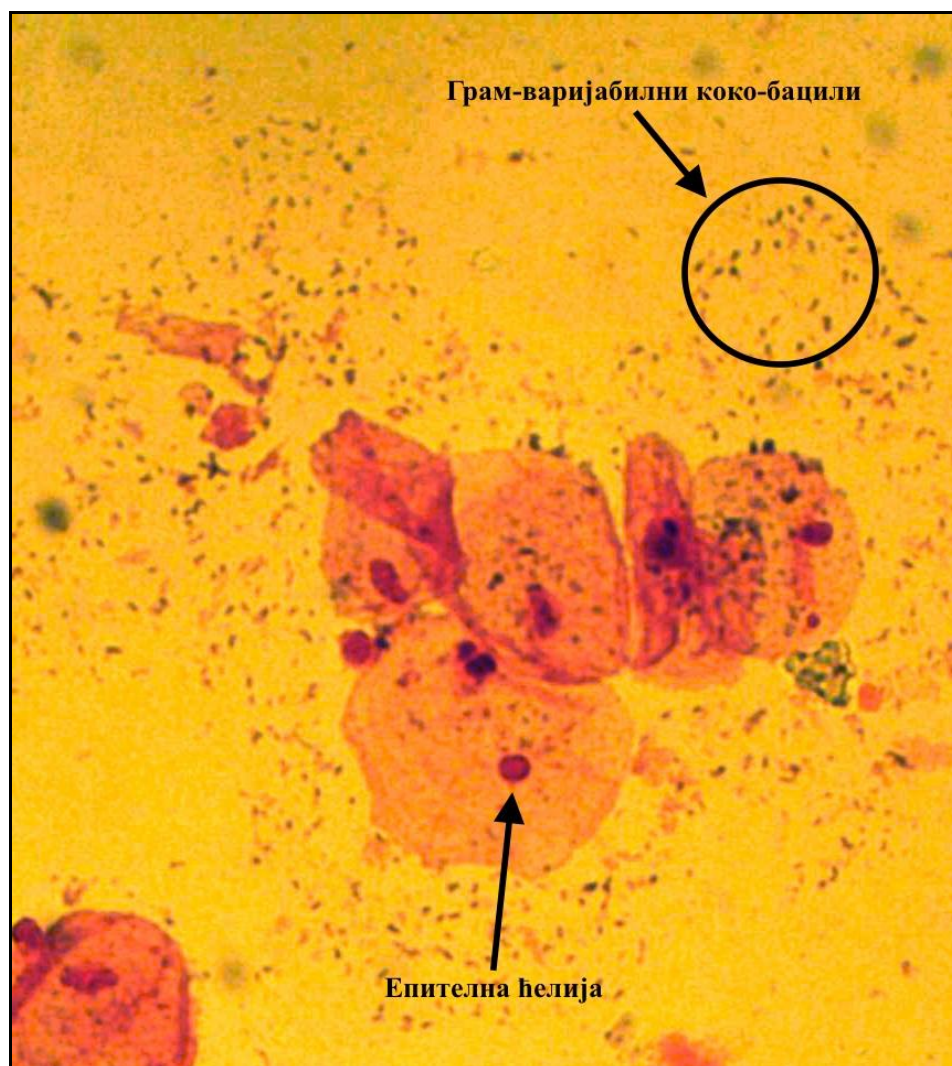
Слика 3. Нормал нул (НН). Грам-позитивни бацили изузетно ретки, углавном распоређени око епителних ћелија. Увећање x200.



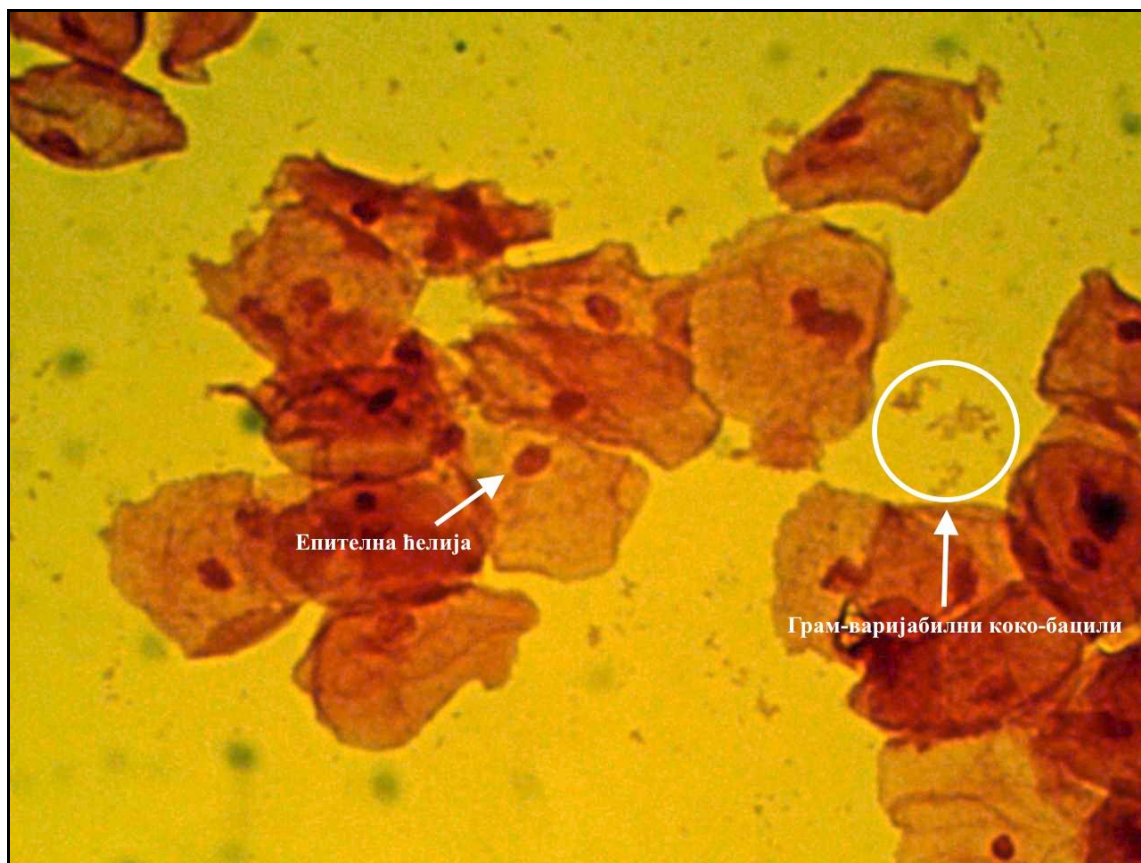
Слика 4. БВ пун (БВП). Доминација Грам-варијабилних коко-бацила који су распоређени око и преко епителних ћелија. Увећање x200.



Слика 5. БВ умерен (БВУ). Умерен број Грам-варијабилних коко-бацила распоређених углавном око епителних ћелија. Увећање x200.



Слика 6. БВ нул (БВН). Веома ретки Грам-варијабилни коко-бацили распоређени углавном око епителних ћелија. Увећање x200.



3.4 Молекуларна анализа

3.4.1 Претретман препарата бојених по Граму

ДНК бактерија је била изолована са препарата вагиналних размаза бојених по Граму по модификованој методи коју су описали Сринивасан et al (124). Укратко, препарати су били чишћени ксилолом ради уклањања имерзионог уља и потом потапани у раствор ксилола и етанола у односу 1:1 (ради спречавања евентуалне ре-преципитације кристал-виолет/карбол-фуксин боје, која се користи у бојењу по Граму). Након испирања у 100% етанолу, препарати су били сушени на собној температури.

3.4.2 Екстракција ДНК

Екстракција ДНК је обављена према упутству произвођача кита за екстракцију ДНК (QIAamp DNA extraction mini kit, Qiagen). Пре процедуре смо укључили термални шејкер до постизања температуре од 65°C. Затим смо раствор за лизирање ћелија (Lysis buffer) и раствор за испирање (washer) инкубирали у загрејаном термалном шејкеру. Када су реагенси постигли одговарајућу температуру, припремали смо негативну контролу изолације и узорке тако што смо у епрувете са затварачем додавали 300µl загрејаног раствора за лизирање и 100µl негативне контроле, за негативну контролу, а по 200µl раствора за лизирање у обележене епрувете са затварачем за узорке. Претретиране узорке вагиналних размаза смо прво преливали са по 200µl раствора за лизирање, а након тога смо их наставцима за аутоматску пипету „стругали“ у обележене одговарајуће епрувете. Све епрувете смо потом вортексовали и инкубирали 5 минута на 65°C у термалном шејкеру. Након инкубације све узорке смо центрифугирали један минут на 12.000g. У случају да узорци након центрифугирања нису били хомогени, понављали бисмо центрифугирање и продужавали на још пет минута. У следећем кораку смо центрифугираним узорцима додавали по 20µl сорбента чија је улога била да веже ДНК из

лизираног раствора. Затим смо узорке вортексовали и инкубирали три минута на собној температури. Ову процедуру смо поновили још два пута, па смо све узорке поново центрифугирали (30 секунди на 5.000g) и одбацили супернатант. У трећем кораку смо узорке испирали тако што смо сваком узорку додавали по 500µl раствора за испирање, вортексовали и центрифугирали по 30 секунди на 10.000g. Након уклањања супернатанта овај корак смо понављали још једном. Када смо по други пут уклонили супернатант, узорке смо инкубирали осам минута на 65°C у термалном шејкеру. После инкубације смо сваком узорку додавали по 100µl (који омогућава „ослобађање“ ДНК везане за сорбент), вортексовали и центрифугирали један минут на 12.000g. Пошто је цела процедура спроведена, узорке смо замрзавали до момента извођења real-time PCR реакције на -20°/-80°C.

3.4.3 Детекција и квантификација

Детекција и квантификација *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, и *Atopobium vaginae*, као и квантификација укупног вагиналног микробиома је била урађена коришћењем комерцијалног теста за real-time PCR (Bacterial Vaginosis Real-TM Quant, Sacace Biotechnologies, Como, Italy), према упутству произвођача. Након припреме плоче, правили смо раствор за PCR реакцију тако што смо на основу броја узорака прерачунавали количине основних реагенаса (10*Nµl од PCR-mix-1 FRT, 5*Nµl од PCR-mix-2 и 0,5*N ТаqF полимеразе). У сваки „бунарчић“ плоче је пипетирано по 15µl раствора за реакцију и 10µl узорака, позитивне и негативне контроле реакције, негативне контроле екстракције, као и стандарда до финалног волумена од 25µl. Плочу смо убацили у апарат (Sacace Biotechnologies, Como, Italy) и подесили услове реакције по шеми произвођача реагенаса за Sacace.

3.4.4 Интерпретација резултата PCR детекције и квантификације

Анализа резултата добијених real-time PCR реакцијом је обављена користећи Microsoft Excel software према алгоритму произвођача реагенаса.

Рачунски алгоритам

Microsoft Excel software, који је понудио произвођач реагенаса, рачуна однос коефицијената KC1, KC2 и KC3.

KC1 однос коефицијент – представља релативне концентрације *Lactobacillus spp* (Lac) и анаеробних микроорганизама (*Gardnerella vaginalis*+*Atopobium vaginae* (Gv+Av)). Рачуна се као разлика између логаритама ДНК концентрација одређених микроорганизама:

$$KC1 = \log(\text{Lac DNA}) - \log(\text{Gv+AvDNA}),$$

KC2 однос коефицијент – представља релативне концентрације укупног броја бактерија (Bac) и *Lactobacillus spp* (Lac). Рачуна се као разлика између логаритама ДНК концентрација одговарајућих микроорганизама:

$$KC2 = \log(\text{Bac DNA}) - \log(\text{LacDNA}),$$

KC3 однос коефицијент – представља релативне концентрације укупног броја бактерија (Bac) и анаеробних микроорганизама (*Gardnerella vaginalis*+*Atopobium vaginae* (Gv+Av)). Рачуна се као разлика између логаритама ДНК концентрација одговарајућих микроорганизама:

$$KC3 = \log(\text{BacDNA}) - \log(\text{Gv+AvDNA}).$$

На основу алгоритамске калкулације, следећи подаци се појављују аутоматски на бази вредности $KC1$, $KC2$ и $KC3$:

- 1) Релативне концентрације микробне ДНК која одговарају бактеријској вагинози ($KC1 < 0.5$);
- 2) Релативне концентрације микробне ДНК не одговарају бактеријској вагинози ($KC1 > 1$);
- 3) Релативне конвенрације микробне ДНК одговарају интермедијерној флори ($0.5 \leq KC1 \leq 1$);
- 4) Релативне концентрације микробне ДНК одговарају поремећају флоре неспецифичне етиологије ($KC2 > 1$, $KC3 > 2$, било која $KC1$ вредност);
- 5) Низак ниво копија ($KC1 > 1$, тако да се сматра да је узорак БВ негативан, а укупна количина бактеријске ДНК је мања од 10^6 копија/ml, али већи од 10^5 копија/ml);
- 6) Недовољан број копија за анализу (укупна количина бактеријске ДНК је мања од 10^5 копија/ml).

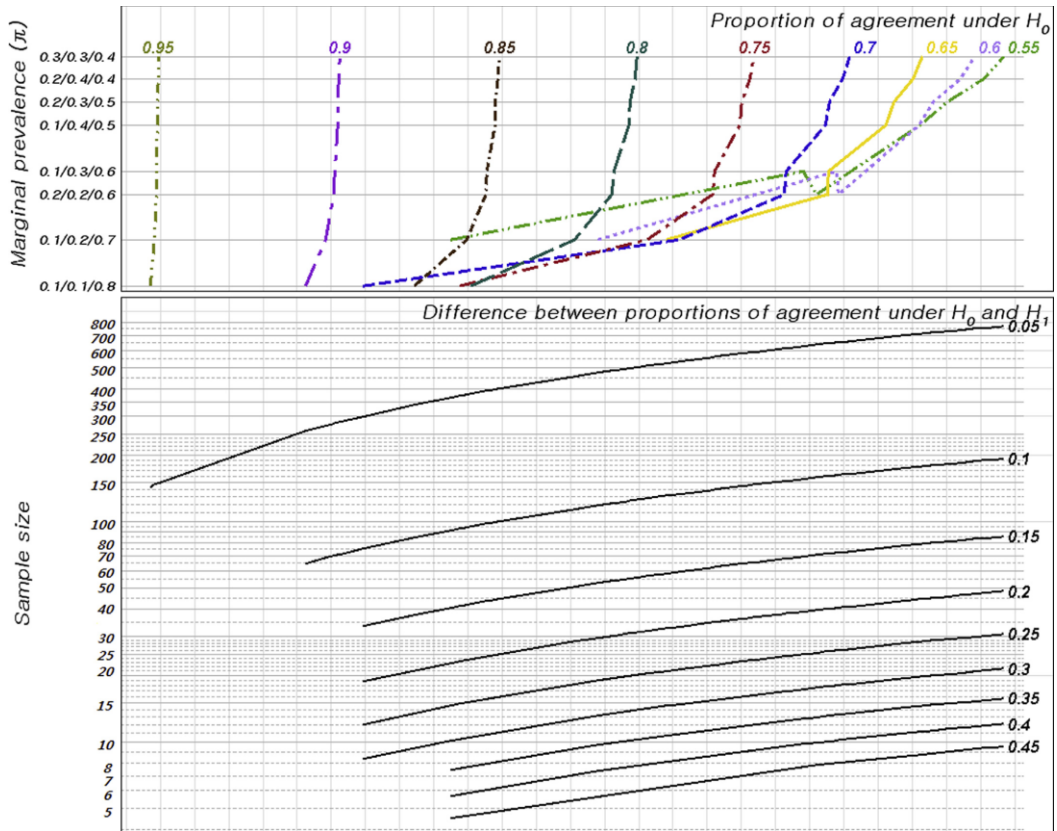
На основу рачунског алгоритма смо све резултате PCR анализе сврстали у три категорије: нормалан, ИМД и БВ. Ради поређења са Амселом, PCR резултате смо класификовали и у две групе налаза (нормалан и БВ) на основу *cut-off* вредности добијених помоћу ROC анализе са сензитивношћу и специфичношћу 100%. У односу гарднереле и атопобијума са лактобацилима, *cut-off* за БВ је био $>0,0163$; у односу гарнереле и атопобијума са укупним микробиомом *cut-off* за БВ је био $>0,008$; а у односу лактобацила са укупним микробиомом *cut-off* за БВ је био $\leq 0,359$.

3.5 Статистичка обрада података

Величина узорка је утврђена на основу претпоставке слагања примарне варијабле (категорије вагиналних секрета) добијене различитим студијским методама.

Претпостављено је да ће слагање између метода бити у 85% препарата, уз очекивану разлику од 10% између нулте (методе су упоредиве) и радне хипотезе (методе нису упоредиве). За прорачун студијског узорка је кориштен одговарајући номограм прорачуна узорка статистичког теста слагања дијагностичких метода за *kappa* статистику (табела 5). У зависности од квалитативних и квантитативних карактеристика секундарних варијабли, спроведене су одговарајуће статистичке анализе. Код нумеричких варијабли, спроведено је тестирање хипотезе код два независна узорка (Вилкоксон-Ман-Витни тест). Код категоријалних варијабли је коришћен хи-квадрат тест. Веза између испитиваних варијабли је била анализирана коришћењем ОРА (енгл. overall rates of agreement или overall percent of agreement). Примарне варијабле су биле анализиране употребом степена слагања између категоријских параметара израчунавањем *kappa* индекса. Методом бинарне логистичке регресије је била утврђивана значајност утицаја варијабли на дихотомне исходе, како самостално (униваријантна) тако и удружено (мултиваријантна анализа). Сензитивност и специфичност појединих параметара у дискриминацији клиничких исхода је била одређивана тзв. ROC анализом. За статистички значајну разлику у добијеним вредностима између група сматрано је када је $p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика била када је $p < 0.01$.

Табела 5. Номограм прорачуна узорка статистичког теста слагања дијагностичких метода за *карра* статистику



4 РЕЗУЛТАТИ

4.1 Учесталост нормалних (Н), интермедијерних (ИМД) и БВ (бактеријска вагиноза)

Табела 6. Учесталост нормалних (Н), интермедијерних (ИМД) и БВ (бактеријска вагиноза) резултата класификованих на основу шест различитих метода.

%	Амсел	Наџент	Исон/Хај	Клејс	НММ	PCR
Н	59,1	31,1	54,1	35	33,6	50,4
ИМД		26	11,7	25	32,8	26,5
БВ	40,9	42,9	34,2	40	33,6	23,1
<p>Н – нормал, ИМД – интермедијеран, БВ – бактеријска вагиноза. НММ – нова микроскопска метода</p>						

Резултате смо категорисали коришћењем шест различитих метода приказаних у табели 6. Сви резултати су сврстани у три групе (Н, ИМД и БВ) осим по Амселу, зато што клиничка категоризација по Амселу подразумева само два ентитета: Н (нормалан, здрав) и БВ (бактеријска вагиноза, болестан). Највиши проценат вагиноза је категорисан по Наџенту (42,9), док је најнижи детектован *real time* PCR-ом (23,1). Са друге стране, највиши проценат здравих је запажен при коришћењу Амселових критеријума (59,1). Највиши проценат случајева на прелазу из „здравог“ у „болесно“ (ИМД) је добијен категоризацијом нове микроскопске методе (НММ) (32,8), која по резултатима не одскаче значајно у односу на категоризације по Наџенту, Клејсу као и резултате добијене молекуларном анализом (25-32,8). Најнижи проценат ИМД је добијен применом Исон/Хај критеријума (11,7). По Наџенту, Клејсу и НММ проценат детектованих нормалних налаза је био приближан (31,1-35), док се по Амселу, Исон/Хају и *real time* PCR-у такође кретао у приближном опсегу али у нешто вишем проценту (50,4-59,1).

4.2 Поређење резултата добијених употребом критеријума по Наценту са резултатима добијеним употребом осталих метода

4.2.1 Поређење резултата добијених употребом критеријума по Наценту и других микроскопских метода

Обзиром да су на основу многобројних истраживања Нацентови критеријуми прихваћени за „златни стандард“ у микроскопској дијагностици, поредили смо разлике и слагање Нацента са осталим микроскопским методама (табела 7). Запазили смо најмање разлике ($\chi^2 = 0,65$ $df = 2$; $p = 0,72$), а највише слагање између Нацента и Клејса (ORA=94%; $\kappa = 0,91$). Са друге стране при поређењу Нацента и Исон/Хаја уочено је најниже слагање (ORA=74,6%; $\kappa = 0,61$) уз статистички значајну разлику, док је код Нацента и НММ показано умерено слагање (ORA=77,5%; $\kappa = 0,77$); $p < 0,001$)

Табела 7. Поређење резултата добијених употребом критеријума по Наценту у односу на резултате добијене коришћењем критеријума осталих микроскопских метода.

Исон/Хај	Нацент				Клејс	Нацент				НММ	Нацент			
	Н	ИМД	БВ			Н	ИМД	БВ			Н	ИМД	БВ	
Н	37	18	8	63	Н	37	4	0	41	Н	34	8	0	42
ИМД	0	11	3	14	ИМД	0	27	3	30	ИМД	2	21	14	37
БВ	0	1	40	41	БВ	0	0	45	45	БВ	1	2	38	41
Укупно	37	30	51	118	Укупно	37	31	48	116	Укупно	37	31	52	120
χ^2	$\chi^2 = 28,8$ df = 2; p < 0,001				χ^2	$\chi^2 = 0,65$ df = 2; p = 0,72				χ^2	$\chi^2 = 4,16$ df = 2; p = 0,13			
ORA	74,6%				ORA	94,0%				ORA	77,5%			
Карра	0,61				Карра	0,91				Карра	0,77			

Н – нормалан; **БВ** – бактеријска вагиноза; **ИМД** – интермедијеран; χ^2 – хи-квадрат тест; **ORA** – укупан проценат слагања (енгл. overall rates of agreement или overall percent of agreement); **Карра** – индекс слагања метода (енгл. Cohen's kappa index); **НММ** – нова микроскопска метода.

Са клиничког аспекта, ИМД група пацијената (на прелазу између „здравог“ у „болесно“) је неклассификована у смислу јасног терапијског протокола. Стога смо поредили резултате микроскопске анализе у случају када смо ИМД групу тумачили као „здраве“ пацијенте (табела 8) и у случају када смо ИМД анализирали као да су вагинозе (табела 9).

4.2.2 Поређење клиничких и микроскопских метода када су интермедијерни резултати интерпретирани као нормалан налаз

Пошто смо припајањем ИМД групе групи нормалних налаза добили две групе резултата (Н и БВ), резултате по Наценту нисмо поредили само са микроскопским методама већ и са клиничким критеријумима по Амселу који диференцира само два клинички значајна ентитета, Н и БВ, односно „здраве“ и „болесне“ респективно (табела 8). Овом анализом је показано веома добро слагање између Нацента и осталих микроскопских метода ($ORA=82,9-97,5\%$; $кара=0,80-0,95$). Са друге стране, слагање Нацента са Амселом било умерено ($ORA=79,5\%$; $кара=0,62$) уз најнижи проценат слагања између група „здравих“ пацијената ($NPA=75\%$), при чему Амсел већи број „здравих“ пацијената „види“ као вагинозе (табела 8). Све методе су показале нешто боље слагање у дијагностиковању вагиноза у односу на нормалне налазе ($PPA=82-98\%$; $NPA=75-97\%$). Бинарна логистичка регресија је показала да Амсел зависи од Нацента ($p<0,0005$). *Odds ratio* (OR) је био 3,687 (2,343-5,803), што значи да ако је Нацент позитиван (БВ), шанса да и Амсел буде позитиван је око четири пута већа, него да Амсел буде негативан. Такође, бинарна логистичка регресија је показала да Амсел зависи и од нове микроскопске методе ($p<0,0005$), док је *odds ratio* био 6,163 (3,427-11,085), што значи да ако је резултат по новој микроскопској методи позитиван, шанса да и Амсел буде позитиван је око шест пута већа, него да Амсел буде негативан.

4.2.3 Поређење клиничких и микроскопских метода када су интермедијерни резултати интерпретирани као БВ налаз

Поређењем Наџента са осталим микроскопским методама и Амселом, у случају када су ИМД пацијенти посматрани као вагинозе (табела 9), је показано одлично слагање једино са микроскопском методом по Клејсу (ORA=96,6%; kappa=0,92). Слагање са клиничким критеријумима по Амселу је било још ниже него када је ИМД група анализирана у склопу групе нормалних налаза (ORA=72,8%; kappa=0,49). Све методе су показале нешто боље слагање у детектовању „негативних“ пацијената у односу на „позитивне“ (PPA=70-95%; NPA=75-98%). Међутим, бинарна логистичка регресија у овом случају није показала да Амсел зависи од Наџента ($p = 0,997$), из чега произилази да је слагање метода боље ако се ИМД група интерпретира у склопу нормалних налаза.

Табела 8. Поређење резултата добијених употребом критеријума по Наценту у односу на резултате добијене коришћењем критеријума осталих метода, у случају када је ИМД група интерпретирана као нормалан налаз.

Амсел	Нацент			Исон/Хај	Нацент			Клејс	Нацент			НММ	Нацент		
	Н	БВ			Н	БВ			Н	БВ			Н	БВ	
Н	54	13	67	Н	67	11	78	Н	68	3	71	Н	52	5	57
БВ	10	35	45	БВ	1	40	41	БВ	0	48	48	БВ	15	45	60
Укупно	64	48	112	Укупно	68	51	119	Укупно	68	51	119	Укупно	67	50	117
χ^2	$\chi^2 = 0,33$ df = 1; p=0,57			χ^2	$\chi^2 = 3,43$ df = 1; p=0,064			χ^2	$\chi^2 = 0,31$ df = 1; p=0,058			χ^2	$\chi^2 = 3,49$ df = 1; p=0,062		
ORA	79,5%			ORA	89,9%			ORA	97,5%			ORA	82,9%		
PPA	82,0%			PPA	92,0%			PPA	98,0%			PPA	84,0%		
NPA	75,0%			NPA	87,0%			NPA	97,0%			NPA	82,0%		
Карра	0,62			Карра	0,82			Карра	0,95			Карра	0,8		

Н – нормалан; **БВ** – бактеријска вагиноза; χ^2 – хи-квадрат тест; **ORA** – укупан проценат слагања (енгл. overall rates of agreement или overall percent of agreement); **PPA** – проценат слагања позитивних резултата (енгл. positive percent of agreement); **NPA** – проценат слагања негативних резултата (енгл. negative percent of agreement); **Карра** – индекс слагања метода (енгл. Cohen's kappa index); **НММ** – нова микроскопска метода.

Табела 9. Поређење резултата добијених употребом критеријума по Наценту у односу на резултате добијене коришћењем критеријума осталих метода, у случају када је ИМД група интерпретирана као бактеријска вагиноза.

Амсел	Нацент			Исон/Хај	Нацент			Клејс	Нацент			НММ	Нацент		
	Н	БВ			Н	БВ			Н	БВ			Н	БВ	
Н	36	31	67	Н	37	25	62	Н	37	4	41	Н	36	22	58
БВ	0	47	47	БВ	0	55	55	БВ	0	78	78	БВ	1	57	58
Укупно	36	78	114	Укупно	37	80	117	Укупно	37	82	119	Укупно	37	79	116
χ^2	$\chi^2 = 39,0$ df = 1; p<0,001			χ^2	$\chi^2 = 24,7$ df = 1; p<0,001			χ^2	$\chi^2 = 0,63$ df = 1; p=0,43			χ^2	$\chi^2 = 17,5$ df = 1; p<0,001		
ORA	72,8%			ORA	78,6%			ORA	96,6%			ORA	80,2%		
PPA	70,0%			PPA	75,0%			PPA	95,0%			PPA	76,0%		
NPA	75,0%			NPA	81,0%			NPA	98,0%			NPA	83,0%		
Карра	0,49			Карра	0,58			Карра	0,92			Карра	0,6		

Н – нормалан; **БВ** – бактеријска вагиноза; χ^2 – хи-квадрат тест; **ORA** – укупан проценат слагања (енгл. overall rates of agreement или overall percent of agreement); **PPA** – проценат слагања позитивних резултата (енгл. positive percent of agreement); **NPA** – проценат слагања негативних резултата (енгл. negative percent of agreement); **Карра** – индекс слагања метода (енгл. Cohen's kappa index); **НММ** – нова микроскопска метода.

4.3 Поређење резултата добијених real-time PCR-ом са резултатима класификованим по осталим критеријумима

4.3.1 Поређење резултата добијених real-time PCR-ом са резултатима класификованим на основу микроскопских критеријума

На основу молекуларне анализе (PCR), резултати су сврстани у три групе (Н, ИМД и БВ) (табела 10). Поређењем резултата молекуларне анализе са резултатима добијеним евалуацијом по различитим критеријумима (клиничким и микроскопским), показано је да се укупан проценат слагања (ORA) кретао од 51,4% до 53,2%, док су вредности карра индекса биле у опсегу од 0,29 до 0,37. Овакве вредности ORA и карра су били показатељи слабог слагања молекуларне анализе у поређењу са осталим критеријумима. Слагање резултата молекуларне анализе је било приближно у односу на све методе.

Табела 10. Поређење резултата добијених PCR анализом са резултатима класификованим на основу микроскопских критеријума.

Нацент	real-time PCR				Исон/Хај	real-time PCR				Клејс	real-time PCR				НММ	real-time PCR			
	Н	ИМД	БВ			Н	ИМД	БВ			Н	ИМД	БВ			Н	ИМД	БВ	
Н	28	8	1	37	Н	39	18	7	64	Н	31	9	2	42	Н	29	9	1	39
ИМД	13	10	6	29	ИМД	9	3	2	14	ИМД	13	10	6	29	ИМД	14	14	9	37
БВ	14	12	19	45	БВ	9	9	17	35	БВ	13	11	18	42	БВ	12	7	16	35
Укупно	55	30	26	111	Укупно	57	30	26	113	Укупно	57	30	26	113	Укупно	55	30	26	111
χ^2	$\chi^2 = 19,8$ df=2; p<0,001				χ^2	$\chi^2 = 12,5$ df=2; p=0,002				χ^2	$\chi^2 = 13,8$ df=2; p=0,001				χ^2	$\chi^2 = 9,4$ df=2; p=0,009			
ORA	51,4%				ORA	52,2%				ORA	52,2%				ORA	53,2%			
Карра	0,36				Карра	0,29				Карра	0,34				Карра	0,37			

Н – нормалан; **ИМД** – интермедијеран; **БВ** – бактеријска вагиноза; χ^2 – хи-квадрат тест; **ORA** – укупан проценат слагања (енгл. Overall rates of agreement или overall percent of agreement); **Карра** – индекс слагања метода (енгл. Cohen's kappa index); **НММ** – нова микроскопска метода.

4.3.2 Поређење резултата добијених real-time PCR-ом са резултатима класификованим по клиничким и микроскопским критеријумима у случају када су интермедијерни резултати интерпретирани као нормалан налаз

Након сублимирања ИМД и Н пацијената (табела 11), укупан проценат слагања се кретао од 63,7%-68,8%, што је нешто боље слагање у поређењу са слагањем када су ИМД пацијенти посматрани одвојено (51,4% до 53,2%). Такође и карра вредности су биле нешто више (од 0,35-0,54) у односу на слагање када је ИМД група била посебно анализирана (0,29-0,37). Слагање молекуларне анализе са осталим методама у овом случају је било приближно, осим са Нацентом где је уочено нешто слабије слагање (ORA=63,7%; карра=0,35).

4.3.3 Поређење резултата добијених real-time PCR-ом са резултатима класификованим по клиничким и микроскопским критеријумима у случају када су интермедијерни резултати интерпретирани као БВ налаз

Када су ИМД пацијенти анализирани у склопу групе са вагинозом (табела 12), слагање молекуларне анализе са осталим методама је било нешто боље (ORA: 62,6%-69,6%; карра: 0,30-0,49), него када је ова група посматрана одвојено (ORA: 51,4% до 53,2%; карра: 0,29-0,37). Како било, слагање молекуларне анализе са осталим методама је било приближно, невезано од тога да ли је ИМД група била придружена нормалним (ORA: 63,7%-68,8%; карра: 0,35-0,54), или пацијентима са вагинозом (ORA: 62,6%-69,6%; карра: 0,30-0,49).

Табела 11. Поређење резултата добијених PCR анализом са резултатима класификованим по осталим критеријумима, у случају када је ИМД група резултата интрпретирана као нормалан налаз.

Амсел	real-time PCR			Нацент	real-time PCR			Исон/Хај	real-time PCR			Клејс	real-time PCR			НММ	real-time PCR		
	Н	БВ	67		Н	БВ	67		Н	БВ	72		Н	БВ	71		Н	БВ	59
Н	42	25	67	Н	41	26	67	Н	45	27	72	Н	43	28	71	Н	39	20	59
БВ	10	31	41	БВ	15	31	46	БВ	8	27	35	БВ	12	30	42	БВ	15	38	53
Укупно	52	56	108	Укупно	56	57	113	Укупно	53	54	107	Укупно	55	58	113	Укупно	54	58	112
χ^2	$\chi^2 = 8,34$ df = 1; p=0,004			χ^2	$\chi^2 = 4,28$ df = 1; p=0,038			χ^2	$\chi^2 = 13,5$ df = 1; p<0,001			χ^2	$\chi^2 = 9,07$ df = 1; p=0,003			χ^2	$\chi^2 = 0,894$ df = 1; p=0,344		
ORA	67,6%			ORA	63,7%			ORA	67,3%			ORA	64,6%			ORA	68,8%		
PPA	70,0%			PPA	67,0%			PPA	72,0%			PPA	68,0%			PPA	69,0%		
NPA	64,0%			NPA	60,0%			NPA	61,0%			NPA	60,0%			NPA	68,0%		
Карра	0,5			Карра	0,35			Карра	0,54			Карра	0,42			Карра	0,42		

Н – нормалан; БВ – бактеријска вагиноза; χ^2 – хи-квадрат тест; **ORA** – укупан проценат слагања (енгл. Overall rates of agreement или overall percent of agreement); **PPA** – проценат слагања позитивних резултата (енгл. Positive percent of agreement); **NPA** – проценат слагања негативних резултата (енгл. Negative percent of agreement); **Карра** – индекс слагања метода (енгл. Cohen's kappa index). **НММ** – нова микроскопска метода.

Табела 12. Поређење резултата добијених PCR анализом са резултатима класификованим по осталим критеријумима, у случају када је ИМД група резултата интерпретирана као бактеријска вагиноза.

Амсел	real-time PCR		Нацент	real-time PCR		Исон/Хај	real-time PCR		Клејс	real-time PCR		НММ	real-time PCR						
	Н	БВ		Н	БВ		Н	БВ		Н	БВ		Н	БВ					
Н	43	25	68	Н	27	10	37	Н	40	26	66	Н	29	12	41	Н	40	19	59
БВ	10	30	40	БВ	27	47	74	БВ	17	32	49	БВ	25	46	71	БВ	15	38	53
Укупно	53	55	108	Укупно	54	57	111	Укупно	57	58	115	Укупно	54	58	112	Укупно	55	57	112
χ^2	$\chi^2=8,34$ df=1; p=0,004		χ^2	$\chi^2=10,4$ df=1; p=0,001		χ^2	$\chi^2=2,82$ df=1; p=0,093		χ^2	$\chi^2=6,04$ df=1; p=0,014		χ^2	$\chi^2=0,572$ df=1; p=0,450						
ORA	67,6%		ORA	66,7%		ORA	62,6%		ORA	67,0%		ORA	69,6%						
PPA	71,0%		PPA	59,0%		PPA	65,0%		PPA	61,0%		PPA	70,0%						
NPA	63,0%		NPA	72,0%		NPA	60,0%		NPA	71,0%		NPA	69,0%						
Карра	0,49		Карра	0,48		Карра	0,30		Карра	0,43		Карра	0,42						

Н – нормалан; **БВ** – бактеријска вагиноза; χ^2 – хи-квадрат тест; **ORA** – укупан проценат слагања (енгл. Overall rates of agreement или overall percent of agreement); **PPA** – проценат слагања позитивних резултата (енгл. Positive percent of agreement); **NPA** – проценат слагања негативних резултата (енгл. Negative percent of agreement); **Карра** – индекс слагања метода (енгл. Cohen's kappa index); НММ – нова микроскопска метода.

4.4 Просечан број бактерија квантификованих real-time PCR-ом у узорцима категорисаним по новој микроскопској методи

Желећи да утврдимо да ли постоји слагање резултата добијених real-time PCR анализом са резултатима квантитативне категоризиције вагиналних размаза нове микроскопске методе (празан, умерен, пун) као и број, однос и тип бактерија у овим налазима, анализирали смо резултате real-time PCR анализе класификованих на основу критеријума нове микроскопске методе.

Подела нове микроскопске методе налаза вагиналних размаза бојених по Граму у основи разликује два ентитета, нормалан и бактеријска вагиноза (БВ). Оба ова ентитета су на основу целуларности (броја и типа присутних бактерија) подељена на по три групе (празан, умерен и пун).

4.4.1 Анализа резултата real-time PCR-а, сврстаних у три групе на основу целуларности (празан, умерен и пун)

Анализом целуларности (табела 13), молекуларна квантификација (real-time PCR) је показала јасан тренд градацијског пораста у просечном броју свих бактерија од „празан“ ка „пун“, где је просечан број бактерија укупног вагиналног микробиома био 34 пута већи код „пуних“ у односу на „празне“. Једини изузетак је био атопобијум, где је уочен пад у просечном броју у категорији „умерен“. Просечан број лактобацила је био приближан у групама „пун“ и „умерен“, док је код „празних“ био три пута нижи. У групама веће целуларности („пун“ и „умерен“) доминирали су *G. vaginalis* и *A. vaginiae*, са вредностима 14 и 1,3 пута вишим од лактобацила, респективно. Са друге стране, лактобацили су, у односу на друге две бактерије, доминирали у групи „празних“ са око 12 пута вишим вредностима.

Табела 13. Просечан број бактерија у 3 категорије нове микроскопске методе распоређене по целуларности (броју бактерија).

	Gv	Av	Lacto	GvAv	GAL	Bact	Suma
П	23.272.303	3.951.637	1.919.023	27.223.940	29.142.963	5.578.811	34.721.774
У	2.223.084	792	1.764.853	2.223.877	3.988.730	1.104.785	5.093.515
Н	37.630	5.041	538.052	42.671	580.723	552.999	1.133.722

П – пун, **У** – умерен, **Н** – нул (празан), **Gv** (*Gardnerella vaginalis*, просечан број), **Av** (*Atopobium vaginae*, просечан број), **Lacto** (*Lactobacillus spp*, просечан број), **GAL** – збир просечног броја гарднереле, атопобијума и лактобацила, **Bact** - просечан број осталих бактерија микробиома, **Suma** – просечан броја укупног микробиома.

4.4.2 Анализа резултата *real-time PCR*-а, када су резултати сврстани у три категорије нормалних налаза

Квантификацијом бактерија у узорцима са нормалним налазом (табела 14) установили смо да је просечан број укупног микробиома био највиши код узорака микроскопски означених као „пун“ (НП) са $2,4 \times 10^6$ бактерија; док је просечан број укупног микробиома код узорака микроскопски означених са „умерен“ (НУ) и „празан“ (НН) био приближан ($1,3 \times 10^6$). Од три бактерије које смо детектовали (*G. vaginalis*, *A. vagiana* и *Lactobacillus spp*) у свим подгрупама нормалних налаза је доминирао просечан број лактобацила у односу на укупан број друге две бактерије (преко 600 пута већи код „пуних“, 140 пута већи код „умерених“ и 90 пута већи код „празних“). Без обзира на „доминацију“ лактобацила, запажен је градацијски пораст *G. vaginalis* и *A. vagiana* крећући се од „пуног“ ка „празном“, где је однос ове две бактерије увек био приближан (око 5 пута већи број *G. vaginalis* у односу на *A. vagiana*).

Табела 14. Просечан број бактерија у 3 категорије нормалних налаза нове микроскопска методе.

	Gv	Av	Lacto	GvAv	GAL	Bact	Suma
НП	1.904	436	1.563.960	2.340	1.566.300	853.889	2.420.189
НУ	5.184	645	816.229	5.829	822.058	502.111	1.324.170
НН	6.228	1.303	682.159	7.531	689.690	643.087	1.332.777

НП – нормалан пун, **НУ** – нормалан умерен, **НН** – нормалан нул (празан), **Gv** (*Gardnerella vaginalis*, просечан број), **Av** (*Atopobium vaginae*, просечан број), **Lacto** (*Lactobacillus spp*, просечан број), **GAL** – збир просечног броја гарднереле, атопобијума и лактобацила, **Bact** - просечан број осталих бактерија микробиома, **Suma** – просечан броја укупног микробиома.

4.4.3 Анализа резултата *real-time PCR*-а, када су резултати сврстани у три категорије БВ налаза

Молекуларном анализом узорака са бактеријском вагинозом (табела 15) је показано да је просечан број укупног микробиома био највиши код узорака микроскопски класификованих као „пун“ (БВП) достижући просечан број бактерија од 67×10^6 , док је овај број градијски опадао ка узорцима микроскопски означених као „празан“ (БВН) са просечним бројем $0,9 \times 10^6$. Просечан број гарднереле и атопобијума је такође био највиши код узорака означених као „пун“ и укупан број ових бактерија је био знатно виши у категорији „пун“ односу на просечан број лактобацила (24 пута виши). Однос *G. vaginalis* и *A. vagiana* код „пуних“ узорака је био око пет у корист *G. vaginalis*. Укупан број *G. vaginalis* и *A. vagiana* је градијски опадао крећући се од „пун“ ка „празан“. Штавише, код „празних“ узорака је запажена доминација лактобацила у односу на укупан број друге две бактерије са чак 5 пута вишим вредностима лактобацила. Ако упоредимо „нормалан празан“ и „БВ празан“ запазићемо да у оба случаја доминирају лактобацили, уз разлику у броју и односу ових бактерија. Код „нормалних празних“ број лактобацила је био око 90 пута виши у односу на друге две бактерије, док је код „БВ празних“ број лактобацила био око 5 пута виши.

Табела 15. Просечан број бактерија у 3 категорије БВ налаза по новој микроскопској методи.

	Gv	Av	Lacto	GvAv	GAL	Bact	Suma
БВП	46.542.702	7.902.838	2.274.086	54.445.539	56.719.625	10.303.734	67.023.359
БВУ	4.440.985	939	2.713.477	4.441.925	7.155.402	1.707.458	8.862.860
БВН	69.033	8.778	393.945	77.810	471.755	462.912	934.667

БВП – бактеријска вагиноза пун, **БВУ** – бактеријска вагиноза умерен, **БВН** – бактеријска вагиноза нул (празан), **Gv** (*Gardnerella vaginalis*, просечан број), **Av** (*Atopobium vaginae*, просечан број), **Lacto** (*Lactobacillus spp*, просечан број), **GAL** – збир просечног броја гарднереле, атопобијума и лактобацила, **Bact** - просечан број осталих бактерија микробиома, **Suma** – просечан броја укупног микробиома.

4.4.4 Анализа релативног односа просечног броја бактерија по различитим групама нове микроскопске методе

Анализом релативног односа просечног броја бактерија у свих шест категорија (табела 16) је показано да релативни однос лактобацила и свих осталих бактерија опада крећући се од „нормалан пун“ ка „БВ пун“, док је тренд релативног односа гарднереле и атопобијума обрнут, расте од „нормалан пун“ ка „БВ пун“.

Табела 16. Релативни однос просечног броја бактерија код 6 категорија по новој микроскопској методи.

	Gv/Lacto	Av/Lacto	GvAv/Lacto	GvAv/ GAL	Lacto/ GAL	GvAv/ Suma	Lacto/ Suma
НП	0	0	1	1	99	0	50
НУ	4	0	3	4	96	2	51
НН	8	3	8	8	92	1	36
БВН	18	5	19	22	67	8	27
БВУ	15	2	17	16	79	9	41
БВП	44	16	45	45	35	36	24

НП – нормалан пун, **НУ** – нормалан умерен, **НН** – нормалан нул (празан), **БВП** – бактеријска вагиноза пун, **БВУ** – бактеријска вагиноза умерен, **БВН** – бактеријска вагиноза нул (празан), **Gv/Lacto** – релативни однос просечног броја гарднереле и лактобацила, **Av/Lacto** – релативни однос просечног броја атопобијума и лактобацила, **GvAv/Lacto** – релативни однос збира просечног броја гарднереле и атопобијума и лактобацила, **GvAv/GAL** – релативни однос збира просечног броја гарднереле и атопобијума и просечног броја збира гарднереле, атопобијума и лактобацила, **Lacto/GAL** – релативни однос просечног броја лактобацила и просечног броја збира гарднереле, атопобијума и лактобацила, **GvAv/Suma** – релативни однос збира просечног броја гарднереле и атопобијума и просечног броја укупног микробиома, **Lacto/Suma** – релативни однос просечног броја лактобацила и просечног броја укупног микробиома.

4.4.5 Анализа релативног односа просечног броја бактерија по различитим групама нове микроскопске методе када је 6 група класификовано у три групе (нормалан интермедијеран и бактеријска вагиноза)

На основу анализе релативног односа просечног броја бактерија класификованих у три дијагностичке групе по новој микроскопској методи (нормалан, интермедијеран и БВ), установили смо да однос *G.vaginalis* и *A. vaginae*, у односу на лактобациле, прати двоструки тренд пораста крећући се од нормалних ка БВ (табела 17). Са друге стране, лактобацили су, у односу на ове две бактерије, показали тренд опадања крећући се од нормалних ка БВ. Из овога се јасно види обрнуто пропорционалан однос испитиваних бактерија у налазима вагиналних секрета у различитим дијагностичким групама. Када смо посматрали однос испитиваних бактерија са укупним вагиналним микробиомом уочили смо да су *G.vaginalis* и *A. vaginae* задржали описани тренд, док је однос лактобацила и укупног микробиома код ИМД и БВ налаза био приближан.

Табела 17. Релативни однос просечног броја бактерија код 3 категорије по нове микроскопске методе (нормалан, ИМД и БВ)

	Gv/Lacto	Av/Lacto	GvAv/Lacto	GvAv/ GAL	Lacto/ GAL	GvAv/ Suma	Lacto/ Suma
Н	2	0	2	3	98	1	50
ИМД	13	4	14	15	80	5	32
БВ	30	9	31	31	57	23	33

Н – нормалан (нормалан пун+нормалан умерен), **ИМД** – интермедијеран (нормалан нул+БВ нул), **БВ** – бактеријска вагиноза (БВ умерен+БВ пун), **Gv/Lacto** – релативни однос просечног броја гарднереле и лактобацила, **Av/Lacto** – релативни однос просечног броја атопобијума и лактобацила, **GvAv/Lacto** – релативни однос просечног броја гарднереле и атопобијума и лактобацила, **GvAv/GAL** – релативни однос збира просечног броја гарднереле и атопобијума и просечног броја збира гарднереле, атопобијума и лактобацила, **Lacto/GAL** – релативни однос просечног броја лактобацила и просечног броја збира гарднереле, атопобијума и лактобацила, **GvAv/Suma** - релативни однос збира просечног броја гарднереле и атопобијума и просечног броја укупног микробиома, **Lacto/Suma** – релативни однос просечног броја лактобацила и просечног броја укупног микробиома.

4.5 Просечан број бактерија квантификованих real-time PCR-ом код пацијената са и без бактеријске вагинозе

На основу броја бактерија и њиховог међусобног односа, а прорачунавањем уз помоћ алгорита који је понудио произвођач реагенаса, сви резултати добијени молекуларним испитивањем су сврстани у три групе (табела 18). Највећи број свих бактерија је детектован код вагиноза (53×10^6) са и до 7 пута вишим бројем *Gardnerella vaginalis* (37×10^6) у односу на све остале бактерије. И број *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* је градацијски растао крећући се од групе нормалних налаза ка вагинозама, укључујући и њихов међусобан однос у корист *Gardnerella vaginalis*. Заправо, обе бактерије, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, су биле присутне и у групи нормалних налаза, где је *Gardnerella* била у четири пута већем броју од атопобијума. Код ИМД налаза, број *G. vaginalis* је био и 20 пута већи од броја *A. vaginae*, да би код вагиноза овај однос био смањен (*G. vaginalis* 7 пута већи број од *A. vaginae*) због знатног раста у броју *A. vaginae*, који је код вагиноза био 12 пута већи него код нормалних, а 5 пута већи у односу на ИМД. Што се тиче лактобацила, њихов број је био приближан и у групи нормалних и код вагиноза, уз разлику у односу са осталим бактеријама у групи нормалних и групи вагиноза. Заправо, у групи нормалних, број лактобацила је био преко 800 пута већи од броја обе детектоване бактерије (*G. vaginalis* и *A. vaginae*), док је у групи вагиноза број лактобацила био 22 пута нижи од укупног броја поменутих бактерија. Интересантно, у ИМД групи је запажен нагли пад лактобацила, у односу на број ових бактерија код нормалних и вагиноза (10 пута), док је број лактобацила још увек био око 9 пута виши у поређењу са укупним бројем *G. vaginalis* и *A. vaginae* у ИМД групи. Поред три поменуте бактерије, које смо детектовали молекуларном анализом, квантификовали смо и остале бактерије које су биле саставни део испитиваног вагиналног микробиома, чији је просечан број у групи нормалних био 1×10^6 , да би код вагиноза достигао висину и до 8×10^6 .

Табела 18. Просечан број бактерија квантификованих на основу real-time PCR-а код пацијената са и без бактеријске вагинозе класификованих у три дијагностичке групе.

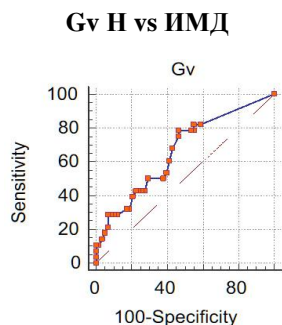
	Gv	Av	Lacto	GvAv	GAL	Bact	Suma
Н	1.990	475	1.977.848	2.465	1.980.313	1.024.683	3.004.996
ИМД	21.368	1.067	194.175	22.435	216.610	568.527	785.137
БВ	37.870.201	5.860.257	2.018.399	43.730.457	45.748.857	8.035.506	53.784.363

Gv (*Gardnerella vaginalis*, просечан број), **Av** (*Atopobium vaginae*, просечан број), **Lacto** (*Lactobacillus spp.*, просечан број), **GAL** – збир просечног броја гарднереле, атопобијума и лактобацила, **Bact** - просечан број осталих бактерија микробиома, **Suma** – просечан броја укупног микробиома., Н- нормал, **ИМД**-интермедијеран, **БВ**-бактеријска вагиноза.

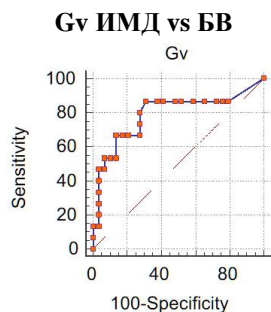
4.6 ROC анализа броја *G. vaginalis*, *A.vaginae* и *Lactobacillus spp* добијеног real-time PCR квантификацијом

ROC анализом броја испитиваних бактерија, установљено је да *G. vaginalis* најбоље диференцира БВ групу од нормалних налаза (сензитивност 87%, специфичност 83%, $p < 0,0001$) (табела 19). Такође, показано је и да *A.vaginae* боље диференцира БВ него ИМД пацијенте, уз ниску сензитивност (48%) и веома добру специфичност (96%). Ако се посматрају заједно, учинак обе бактерије у диференцијацији нормалних од БВ је синергистички. Заправо, анализом присуства и броја обе бактерије код узорака је установљено да расте сензитивност (80%) и специфичност (96%) у диференцирању БВ од здравих пацијената (табела 21). Са друге стране, лактобацили су показали веома добру диференцијацију свих група (сензитивност 79-89%, специфичност 94%) осим диференцијације ИМД групе од БВ групе (сензитивност само 32%, $AUC=0,52$, $p=8625$) (табела 20). Када анализирамо све три бактерије заједно (*G. vaginalis*, *A.vaginae* и *Lactobacillus spp*), сензитивност и специфичност је веома добра и у случају диференцијације нормалних од ИМД (89%, 93%, респективно) и у диференцијацији нормалних од БВ (90%, 93%, респективно) (табела 21). Супротно овоме, укупан бактеријски микробиом, анализиран у овој студији, није био добар показатељ диференцијације дијагностичких група (табела 20).

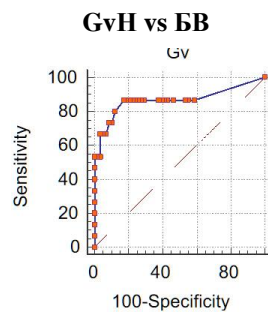
Табела 19. ROC анализа броја *G. vaginalis* и *A. vaginae* у различитим дијагностичким групама (Н, ИМД и БВ).



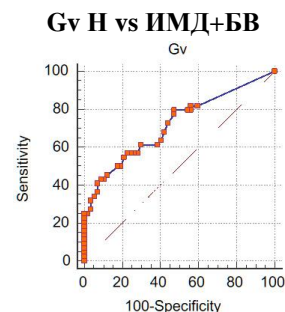
AUC – 0,66
 Сензитивност – 78,6
 Специфичност – 53,5
 p=0,01



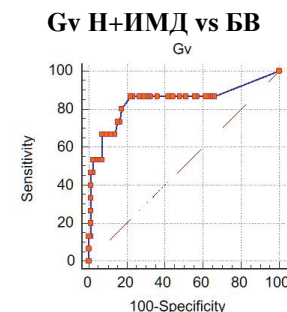
AUC – 0,79
 Сензитивност – 86,7
 Специфичност – 68,9
 p=0,0005



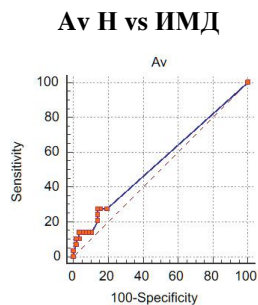
AUC – 0,87
 Сензитивност – 86,7
 Специфичност – 82,8
 p<0,0001



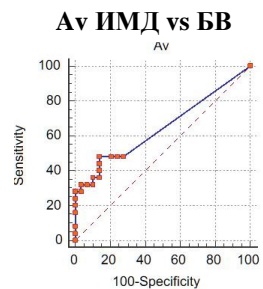
AUC – 0,72
 Сензитивност – 43,2
 Специфичност – 91,2
 p<0,0001



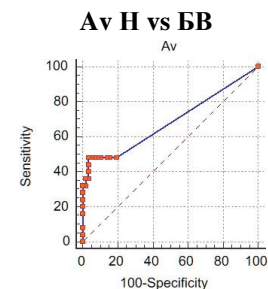
AUC – 0,84
 Сензитивност – 86,7
 Специфичност – 77,9
 p<0,0001



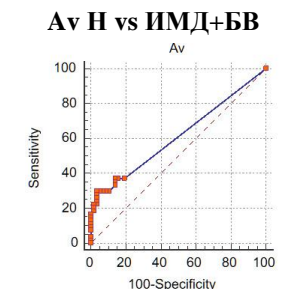
AUC – 0,55
 Сензитивност – 27,6
 Специфичност – 85,9
 p=0,3496



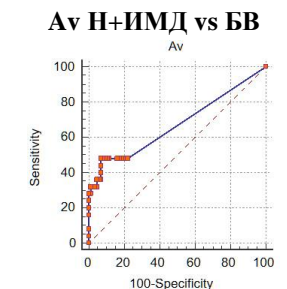
AUC – 0,65
 Сензитивност – 48,0
 Специфичност – 86,2
 p=0,0313



AUC – 0,69
 Сензитивност – 48,0
 Специфичност – 96,5
 p=0,0028

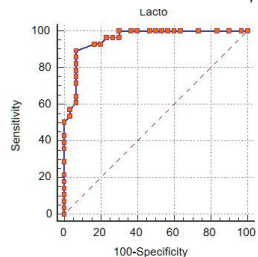


AUC – 0,61
 Сензитивност – 29,6
 Специфичност – 96,5
 p=0,0091

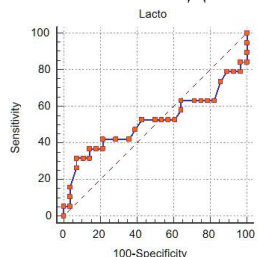


AUC – 0,69
 Сензитивност – 48,0
 Специфичност – 96,5
 p=0,0028

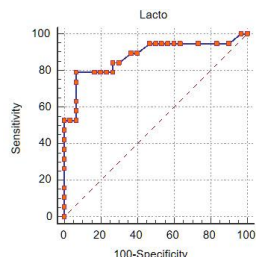
Gv – *Gardnerella vaginalis*, **Av** – *Atopobium vaginae*, **AUC** (енгл. area under the curve), **Н** – нормалан, **ИМД** – интермеђијеран, **БВ** – бактеријска вагиноза.

Табела 20. ROC анализа броја *Lactobacillus spp* и укупног бакт. микробиома код разл. дијагн. група (Н, ИМД и БВ).*Lactobacillus* Н vs ИМД

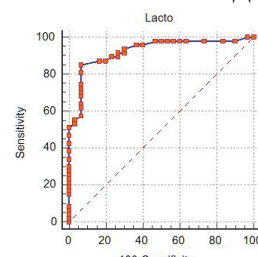
AUC – 0,96
Сензитивност – 89,3
Специфичност – 93,3
 $p < 0,0001$

Lactobacillus ИМД vs БВ

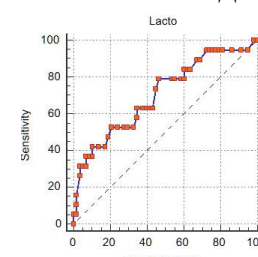
AUC – 0,52
Сензитивност – 31,6
Специфичност – 92,7
 $p = 0,8625$

Lactobacillus Н vs БВ

AUC – 0,88
Сензитивност – 79,0
Специфичност – 93,3
 $p < 0,0001$

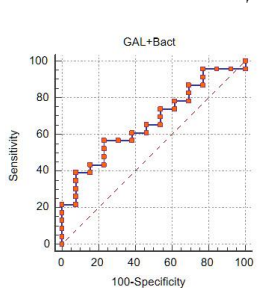
Lactobacillus Н vs ИМД+БВ

AUC – 0,92
Сензитивност – 85,1
Специфичност – 93,3
 $p < 0,0001$

Lactobacillus Н+ИМД vs БВ

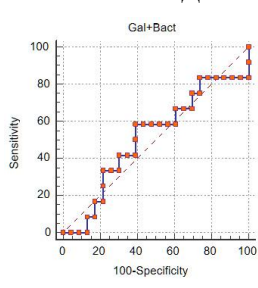
AUC – 0,70
Сензитивност – 79,0
Специфичност – 53,5
 $p = 0,005$

GAL+Бакт Н vs ИМД



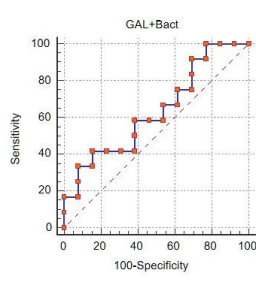
AUC – 0,67
Сензитивност – 56,5
Специфичност – 76,9
 $p = 0,0673$

GAL+Бакт ИМД vs БВ



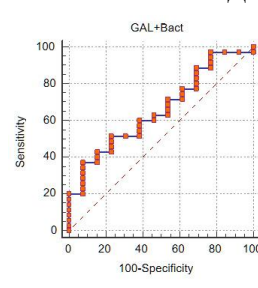
AUC – 0,51
Сензитивност – 58,3
Специфичност – 60,9
 $p = 0,9206$

GAL+Бакт Н vs БВ



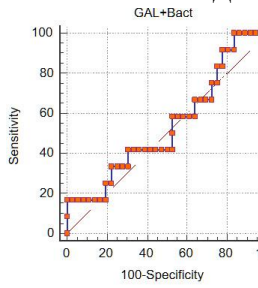
AUC – 0,64
Сензитивност – 78,6
Специфичност – 53,5
 $p = 0,0102$

GAL+Бакт Н vs ИМД+БВ



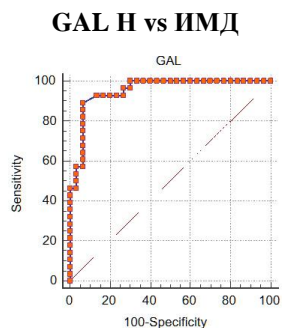
AUC – 0,66
Сензитивност – 37,1
Специфичност – 92,3
 $p = 0,0684$

GAL+Бакт Н+ИМД vs БВ

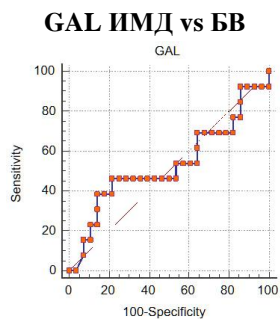


AUC – 0,54
Сензитивност – 16,7
Специфичност – 100,0
 $p = 0,6778$

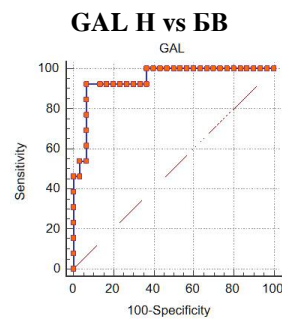
GAL – *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus*, **AUC** (енгл.area under the curve), **Бакт** – бактерије вагиналног микробиома осим GAL, **Н** – нормалан, **ИМД** – интермедијеран, **БВ** – бактеријска вагиноза.

Табела 21. ROC анализа броја *G. vaginalis*, *A. vaginae* и *Lactobacillus spp* код разл. дијагн. група (Н, ИМД и БВ).

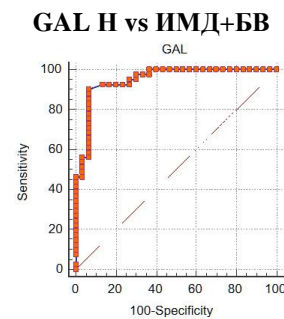
AUC – 0,95
Сензитивност – 89,3
Специфичност – 93,3
 $p < 0,0001$



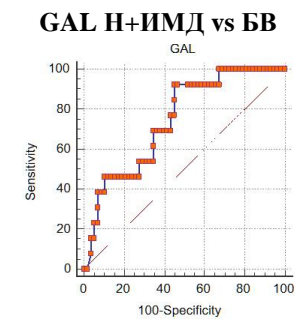
AUC – 0,53
Сензитивност – 46,2
Специфичност – 78,6
 $p = 0,7718$



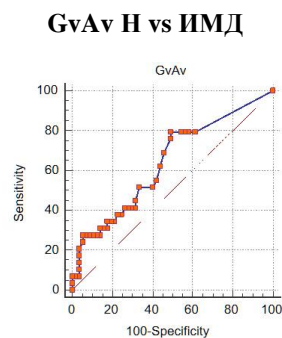
AUC – 0,94
Сензитивност – 92,3
Специфичност – 93,3
 $p < 0,0001$



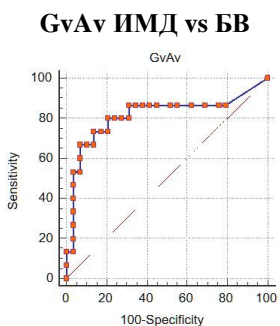
AUC – 0,95
Сензитивност – 90,2
Специфичност – 93,3
 $p < 0,0001$



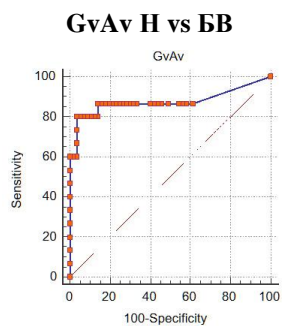
AUC – 0,75
Сензитивност – 92,3
Специфичност – 55,2
 $p = 0,0004$



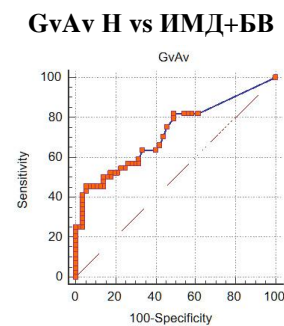
AUC – 0,64
Сензитивност – 79,3
Специфичност – 50,9
 $p = 0,0274$



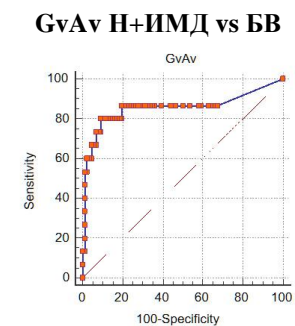
AUC – 0,81
Сензитивност – 66,7
Специфичност – 93,1
 $p = 0,0002$



AUC – 0,88
Сензитивност – 80,0
Специфичност – 96,5
 $p < 0,0001$



AUC – 0,72
Сензитивност – 45,5
Специфичност – 94,7
 $p < 0,0001$



AUC – 0,86
Сензитивност – 80,0
Специфичност – 90,0
 $p < 0,0001$

GAL - *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Lactobacillus*, **GvAv** - *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, **AUC** (енгл. area under the curve),
Н – нормалан, **ИМД** – интермедијеран, **БВ** – бактеријска вагиноза

5 ДИСКУСИЈА

Вагинална флора утиче на здравље жена и, у случају трудноће, утиче на фетус и новорођенче. Опште је прихваћено да у „здравом“ вагиналном микробиому доминира *Lactobacillus spp*, док замена ових микроорганизама факултативним и стриктним анаеробима, као што су *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella spp*, *Peptostreptococcus spp*, *Mobiluncus spp*, доводи до развоја бактеријске вагинозе (125). *Gardnerella vaginalis* је факултативни Грам-варијабилни анаероб и доминантна је бактеријска врста која има утицаја на БВ. Иако је БВ полимикробно стање, без специфичног узрочног патогена, 100% жена са БВ је колонизовано *G. vaginalis*. Ова бактерија је такође коменсал нормалне вагиналне флоре, тако да је њена улога у „здравом“ вагиналном микробиому и БВ комплексна (126).

БВ је значајан узрок гениталних симптома код жена у репродуктивном периоду широм света (127). Процењено је да свака пета жена има епизоду БВ бар једном годишње, али треба нагласити да је БВ асимптоматско стање код око 50% жена. Обзиром да је бактеријска вагиноза удружена са повећаним ризиком од превременог порођаја, побачаја, хориоамнионитиса, предиспозиције од инфекција другим микроорганизмима (HIV, генитални херпес, гонореја, хламидија) и пост-хистеректомијских инфекција (125), правовремена дијагноза је веома важна у циљу превенције компликација.

Бактеријска вагиноза се најчешће дијагностикује Амселовим клиничким критеријумима, где је за постављање дијагнозе потребно да три од четири критеријума буду присутна (сивкасто-беличаст хомогени вагинални секрет; рН вагиналног секрета виши од 4,5; позитиван Вифов тест и присуство клу-ћелија на нативном микроскопском препарату вагиналног размаза) (82). Додатно, дијагноза БВ се поставља и микроскопским критеријумима (по Наценту, Исон/Хају и Клејсу) међу којима су се Нацентови критеријуми показали као „златни“ стандард. На основу типа бактеријских морфотипова, евалуираних микроскопских препарата вагиналних размаза бојених по Граму, и броја бактерија, сви налази вагиналних секрета се по Наценту класификују у три групе:

нормалан, интермедијеран и БВ (83). Критеријуми по Исон/Хају и Клејсу се у основи држе Нацентове класификације налаза, с тим што у оцени налаза пре користе квалитативну процену присуства одређених бактеријских морфотипова, него бројање бактерија. Поред три групе налаза (нормалан, интермедијеран и БВ), Исон/Хај и Клејс детаљније анализирају састав микрофлоре нормалних налаза тако што додатно обраћају пажњу на налазе са изузетно малим бројем бактерија и налазе код којих су присутни полиморфонуклеарни леукоцити. Додатно, као посебну групу у оквиру БВ, Исон/Хај и Клејс анализирају налазе са присуством кока (84, 85). Основу за успостављање својих критеријума Клејс је пронашао користећи молекуларну дијагностику (real-time PCR) која последњих година прераста у независно дијагностичко средство за БВ (128). Техникама молекуларне биологије се прецизније “мапира“ састав вагиналног микробиома и на основу присуства, броја и међусобног односа бактерија се процењује да ли стање вагиналног микробиома одговара „здравом“ микробиому или бактеријској вагинози (129, 130). Још увек недовољно разјашњен значај интермедијерне групе ствара потребу за проналажењем методе која би предложила како тумачити интермедијеран налаз, у склопу нормалних налаза или као БВ. Нови микроскопски метод, који су предложили Ненадић et al, је омогућио нови приступ у евалуацији микроскопских препарата вагиналних размаза бојених по Граму (91), разврставајући све налазе на три градације “нормалног“ и три градације „БВ“. Основа за овакво градирање је „целуларност“ препарата (семи-квантитативна процена присуства одређених бактеријских морфотипова). На овај начин, новим микроскопским методом је покушано да се „реклаификацијом“ налаза потенцијални припадници интермедијерне групе сврстају или у нормалан, или БВ, што би лекарима клиничарима омогућило бољу процену у смислу које пацијенте лечити, а које не.

Без обзира на значајне дијагностичке напоре да се установи етиологија бактеријске вагинозе треба имати у виду и остале социо-економске и демографске специфичности. На пример стриктне разлике у учесталости БВ код пацијенткиња различите расне припадности, где је учесталост БВ код припадница црне расе виша, него код белкиња (131). Даље, рН вредност вагиналног секрета се разликује у односу на етничку припадност: запажене су више вредности код Хиспано жена и припадница црне расе, док

су код Азијаткиња и белкиња уочене ниже вредности (12). Наведене чињенице говоре у прилог томе да састав вагиналног микробиома зависи не само од услова који тренутно постоје у вагини, већ и од генетских својстава „домаћина“ као и начина живота жена одређених етничких припадности. Поставља се питање да ли је „здрав“ вагинални екосистем могуће дефинисати као универзални ентитет својствен свим припадницима људске популације или одредити шта је то што представља „здрavo“ код различитих раса и одређених етничких група. У том смислу се указује и потреба модификовања погледа на потенцијални терапеутски приступ. Можда нешто што представља БВ код Хиспано жена није БВ код Азијаткиња и *vice versa*. Неки аутори су чак предложили да се висок Наџентов скор код асимптоматских жена разматра као посебна група нормалних налаза (12).

Нашим радом смо желели да установимо учесталост БВ код трудница и да на овом узорку пацијената, поредећи различите дијагностичке критеријуме (клиничке и микроскопске) испитамо слагање истих. Додатно, применом молекуларне технике (real-time PCR) смо пратили присуство и количину три бактерије које су кроз досадашња истраживања потврђене као најчешћи конституенти вагиналног микробиома. Сврха коришћена real-time PCR-а је било поређење резултата молекуларне биологије и осталих метода, као и установљавање кореспондирања међу њима, са посебним аспектом на анализу нове микроскопске методе.

Поредећи учесталост БВ код наших пацијенткиња, користећи критеријуме по Амселу, Наџенту, Исон/Хају, Клејсу и PCR-у, уочили смо разлике у класификацији налаза (табела 6). На основу Амсела 40,9% пацијенткиња је било сврстано у групу БВ, док је 59,1% било нормално. Најприближније резултате Амсelloвој категоризацији добили смо категоризацијом по Исон/Хају (34,2 % је било БВ, а 54,1% нормално). Разлике између ове две методе су условљене основним принципима њихове категоризације, где су Амселови критеријуми дихотомни (разликују само нормал и БВ), док Исон/Хај има и групу интермедијерних резултата (ИМД). На основу поређења ове две методе види се да је 5% нормалних налаза и 6,7% БВ налаза по Амселу сврстано у ИМД резултате по Исон/Хају. Према резултатима студије коју су спровели Рангари et al, на основу Амселових критеријума је у БВ налазе сврстано 58% пацијената, док је на основу резултата студије коју су спровели Чавла et al, користећи Исон/Хај критеријуме

учесталост БВ била 40,8%, што је приближно нашим резултатима (132, 133) Највећа разлика у тумачењу нормалних налаза коју смо добили је била између Амсела и Нацента, где је по Наценту у групу нормалних сврстано 28% мање пацијената у односу на Амсела. Сличан резултат је добијен студијом код трудница спроведеном у Нигерији, где је по Наценту у групу нормалних сврстано 33,3% (134). На основу наше студије, по Наценту је 26% пацијената категорисано у ИМД групу, док је 42,9% било БВ (што је било приближно Амселовим 40,9%). Из овога произилази да је Амсел „видео“ ИМД пацијенте као нормалне. Метод најсличнији Наценту је била категоризација по Клејсу, где је Клејс имао само 3,9% више нормалних, 1% мање ИМД и 2,9% мање БВ. Што се тиче нове микроскопске методе, у смислу категоризације нормалних налаза, није било већих разлика у односу на Нацента и Клејса (33,6% нормалних налаза). Међутим, нова микроскопска метода је правила мању разлику у диференцирању ИМД од БВ налаза (32,8% ИМД и 33,6% БВ). Заправо, 9,3% пацијената које је Нацент „видео“ као БВ и 6,4% пацијената које је Клејс „видео“ као БВ, по новој микроскопској методи су сврстани у ИМД. Са друге стране, по резултатима PCR анализе, највећа разлика је била присутна у учесталости БВ, где је молекуларном анализом установљено само 23,1% БВ. Што се тиче ИМД категоризације, резултати PCR-а су се углавном поклапали са осталим методама (осим са Исон/Хајем где је код Исон/Хаја број ИМД пацијената био скоро двоструко мањи). У дијагностици нормалних случајева, PCR се најбоље поклапао са Амселом и Исон/Хајем, где је разлика између Амсела и PCR-а била 8,7%, а Исон/Хај је у групи нормалних имао само 3,7% више пацијената у односу на PCR. Сличне резултате су добили Гамал et al, по којима је 34% налаза припадало БВ, а 66% нормалним налазима (135). Нешто виши проценат налаза по групама се може објаснити тиме што Гамал et al, нису PCR-ом диференцирали ИМД случајеве. На основу молекуларне анализе коју смо спровели, да се закључити да су све методе „препознавале“ већи број БВ него што је то реално, да је Исон/Хај ИМД налазе „препознавао“ као нормалне, док је нова микроскопска метода „класификовала“ нормалне налазе као ИМД. Разлике у резултатима Амсела и осталих микроскопских метода потичу од мањкавости ових метода које смо раније поменули, а које се највише тичу немогућности прецизног диференцирања различитих бактеријских морфотипова на препарата бојеним по Граму, разлике у „дебљини“ вагиналног размаза,

разлике у величини површине посматраног препарата, као и субјективности „оцењивача“ у евалуацији препарата. Све наведено се читава у разликама резултата добијених многобројним студијама. По Гамалу et al, на основу Нацента 33% случајева је било БВ, док је по Амселу 36% налаза сврстано у БВ, чиме су установили да се ове две методе подударају у дијагностици БВ, што није био случај у нашој студији (135). Са друге стране, Бредшоу et al, су класификацијом по Наценту добили 50% нормалних налаза, 10% интермедијерних налаза и 40% БВ (51), док су Датку et al, добили 41% нормалних, 14% интермедијерних и 45% БВ (125). Разлике у добијеним резултатима се могу објаснити и величином узорка који је код Датку et al, био двоструко већи. Класификујући резултате по Исон/Хају, Чавла et al, су 48,4% налаза сврстали у нормалне, 10,8% у ИМД и 40,8% у БВ, док су Гергова et al, добили 31,7% БВ, 11,1% ИМД и 57,2% БВ. Гергова et al, су истраживање спровели код пацијената који су имали симптоме БВ, док се студија коју су спровели Чавла et al, заснивала на анализи узорака пацијенткиња са и без симптома, што је такође фактор који је могао утицати на разлике у резултатима (133, 136).

Обзиром да су Нацентови критеријуми широко прихваћени као „златни стандард“ микроскопске дијагностике БВ, поредили смо слагање Нацентових критеријума са осталим микроскопским методама (табела 7). На основу резултата наше студије, најбоље слагање је показано између Нацента и Клејса, са вредношћу карра-индекса од 0,91, што је представљало веома добро слагање. Са друге стране, најниже слагање је уочено при поређењу Нацента и Исон/Хаја уз статистички значајну разлику ($p < 0,001$). и карра-индексом 0,61 (умерено слагање). Нешто боље слагање је запажено између Нацента и нове микроскопске методе са вредношћу карра-индекса 0,77 (добро слагање). Поредили смо слагање Нацента и Амсела, Модак et al, су добили ниже вредности карра-индекса него ми (0,58), док су Рангари et al, поредили ове методе, добили чак негативну вредност карра-индекса (-0,26) (87, 132). Објашњење за тако велике разлике вероватно лежи у основним разликама на основу којих су засновани ови критеријуми (Амсел оцењује клиничке знаке и присуство клу-ћелија, док Нацент оцењује присуство и број различитих морфотипова на препаратима бојеним по Граму). Покушавајући да одговоре на ово питање, Родригез et al, су поредили појединачне критеријуме (клу-ћелије, рН вагиналног секрета, Вифов тест и боја секрета) са резултатима евалуације препарата по Наценту (137). Установили су да је

најбоље слагање са Нацентом показало присуство клу-ћелија ($\text{карра}=0,88$) и рН вредност вагиналног секрета ($\text{карра}=0,6$), док су друга два критеријума показала слабо слагање. Родригез et al, су закључили да су обе методе комплементарне у дијагностици БВ, и предложили употребу Амсела као скрининг-теста, а коришћење Нацентових критеријума као потврдног теста. За разлику од доброг слагања између Нацента и Исон/Хаја које смо ми пронашли ($\text{карра}=0,61$), Чавла et al, су установили веома добро слагање између ове две методе ($\text{карра}=0,83$) (133). Објашњење за ове разлике лежи у нешто комплекснијем градирању налаза по Исон/Хају, што може утицати на разлике у тумачењу међу различитим „оцењивачима“.

Један од потенцијалних разлога неслагања појединих метода је постојање интермедијерне групе. ИМД група заправо представља прелазну фазу између „здраве лактобациларне вагиналне флоре“ у „БВ флору“. Формирање ове групе налаза је предложио Нацент, а Исон/Хај и Клејс су је инкорпорирали и у своје критеријуме. На основу студија које су показале да трећина ИМД пацијената може бити под ризиком од превременог порођаја (17), значај ИМД групе је евидентан. Међутим, због постојања различитих критеријума у оцени микроскопских препарата вагиналних размаза, најчешће се дешава да се ИМД налаз различито интерпретира и сврста или у нормалне, или БВ. Из овог разлога смо поредили све методе након што смо ИМД налазе припајали нормалним или БВ налазима (табела 8 и 9).

Када смо ИМД налазе припојили нормалним налазима, поредили смо Нацента са свим микроскопским критеријумима, укључујући и клиничке критеријуме по Амселу (табела 8). Показано је боље слагање Нацента са свим микроскопским критеријумима, где је најбоље слагање било са Клејсом уз чак додатно повећање карра -индекса (0,95; одлично слагање). Слагање Нацента са осталим микроскопским методама је било веома добро (карра -индекс слагања са Исон/Хајем је био 0,82, а са новом микроскопском методом 0,8). Процент слагања позитивних резултата (РРА) је код свих метода био нешто виши (од 84%-98%) у односу на проценат слагања негативних резултата (НРА), који се кретао од 82%-97%, што значи да су све микроскопске методе биле подударне у дискриминацији и БВ и нормалних налаза, уз нешто бољу дискриминацију БВ налаза. Са друге стране, запажено је да је најслабије слагање Нацента било са Амселом уз вредност карра -индекса

0,62 (умерено слагање). Поредећи Нацента са Амселом, проценат слагања NPA је био нижи (75%) у односу на PPA (82%), што значи да се Нацент са Амселом боље слагао у смислу диференцијације БВ него нормалних налаза. Мартинез-Мартинез et al, су, слично нашој студији, компарирали три микроскопска критеријума у евалуацији препарата вагиналних размаза: Амселове, Нацентове и Клејсове (142). Ради адекватније компарације, ИМД налазе су интерпретирали као нормалан налаз. Међусобним поређењем Нацента са Клејсом, Нацента са Амселом и Клејса са Амселом добили су вредности карра-индекса 0,8; 0,69 и 0,81 респективно, што је представљало добро слагање међу методама. Најниже слагање је било између Нацента и Амсела, што је било подударно нашим резултатима. Према студији коју су спровели Форсум et al, вредности карра-индекса при поређењу истих метода су биле 0,75 (Амсел и Нацент), 0,89 (Нацент и Клејс) и 0,82 (Амсел и Клејс) (143), што је било у складу са претходном студијом, а и са резултатима наше студије који су показали најниже слагање Амсела и Нацента, а најбоље слагање Нацента и Клејса. За разлику од поменутих студија, ми смо Нацента, као „златни“ стандард, поредили са осталим методама, док нисмо поредили Амсела и Клејса.

Користећи real-time PCR, Бредшоу et al, су анализирали у којој мери су резултати молекуларне анализе коинцидирани са Нацентовим ИМД налазима. Установили су да су у овој групи налаза били присутни високи нови *G. vaginalis* и *A. vaginae*, што је по њима ову групу чинило блискијом БВ него нормалним налазима (51). Када смо ИМД налазе, у нашој студији, спајали са БВ налазима (табела 9), установили смо да је слагање Нацента са свим методама опало, где је најнижи карра-индекс био када је Нацент поређен са Амселом (0,49; умерено слагање). Са друге стране, највиши карра-индекс је био код Клејса (0,92; веома добро слагање), док је код Исон/Хаја и нове микроскопске методе био 0,58 (умерено слагање) и 0,6 (умерено слагање), респективно. PPA је значајно опао и кретао се од 70% код Амсела до 76% код нове микроскопске методе. Једини изузетак је чинио Клејс, где нису уочене битне промене у вредностима NPA и PPA. На основу резултата наше студије произилази да ИМД група више одговара групи нормалних налаза, што смо поткрепили и статистичким тестовима (бинарна логичка регресија), а што је супротно закључку наведене студије. Углавном су студије, ради међусобног поређења

метода, ИМД групу тумачила у склопу групе нормалних налаза (88, 138). Међутим, неке студије (133) су компарирајући методе (нпр. Наџента и Исон/Хаја) посматрале слагање метода и при тумачењу ИМД налаза у склопу БВ. Поменутом студијом је добијено веома добро слагање између Наџента и Исон/Хаја (карра=0,9), што се разликовало од резултата наше студије, где су ове методе показале боље слагање када је ИМД група налаза интерпретирана у склопу нормалних налаза. Разлози за могуће неслагање резултата добијених различитим студијама су многобројни, почевши од немогућности да се само на основу микроскопских налаза евалуира комплексност вагиналног микробиома, па преко разлика у интерпретацији условљено субјективним карактеристикама посматрача, до величине узорка и демографских карактеристика испитиване популације.

Служећи се сличном аналогијом, поредили смо резултатате молекуларне анализе (real-time PCR) као “златног“ стандарда са осталим микроскопским методама, како бисмо добили нешто објективнију слику о резултатима микроскопске евалуације налаза (табела 10). Анализом резултата је на основу вредности карра-индекса (0,29-0,37) установљено слабо слагање PCR-а са свим микроскопским методама. Када смо ИМД резултате додали групи нормалних резултата (табела 11), или групи БВ резултата (табела 12), добили смо нешто више вредности карра-индекса, са нешто бољим слагањем када су ИМД додати нормалним налазима. У овом случају, карра-индекс се кретао од 0,35 код Наџента (слабо слагање), до 0,54 код Исон/Хаја (умерено слагање).

Неке студије су, у циљу компарације клиничких и микроскопских критеријума са резултатима молекуларне анализе, креирале есеје за праћење и до 17 различитих микроорганизама који улазе у састав вагиналног микробиома како би успоставиле алгоритам за БВ дијагностику (139). Показано је да се присуство BVAB2 (од енгл. bacterial vaginosis associated bacteria type 2) најбоље подударало са Амселом уз сензитивност и специфичност од 99% и 89%, респективно, док се са Наџентом подударало уз сензитивност и специфичност од 96% и 99%, респективно. Неким каснијим студијама је запажено да је истовремено присуство *G. vaginalis* и *A. vaginae* у високом броју (преко 10^8) показало 95% сензитивности и 99% специфичности у дијагнози БВ (52). Иако су оба есеја коришћена у поменутиим студијама била веома прецизна, треба напоменути да су у овим студијама евалуирани само нормални и БВ налази, али не и ИМД налази. Међутим,

показано је да БВ, класификована Амселом, може бити присутна и у ИМД резултатима класификованим по Наценту (37-54% Нацентових ИМД налаза је била бактеријска вагиноза по Амселу) (140, 141). Чини се да у циљу бољег разумевања ИМД налаза молекуларна дијагностика може дати значајан допринос. Анализирајући 19 различитих бактерија које су у вези са БВ (*Atopobium vaginae*, *Sneathia sanguinegens*, *Leptotrichia amnionii*, BVAB 1-3, BVAB-TM7, *Megasphaera* 1-2, *Eggerthella-like bacterium*, *Mobiluncus curtisii*, *Mobiluncus mulieris*, *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Fingoldia magna* и *Prevotella spp*) Датку et al, су установили да је већина бактерија удружених са БВ такође присутна и код жена без БВ, те стога само квалитативна молекуларна дијагностика није добро средство за диференцирање нормалних од БВ налаза (125). У овом смислу квантификација циљних бактерија може ближе појаснити бактеријску динамику у оквиру вагиналног микробиома.

Наш есеј за молекуларну евалуацију узорака вагиналног секрета је био заснован на присуству и релативном односу броја три микроорганизама, за које је показано да су најчешћи конституенти вагиналног микробиома (*Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*) и њиховом односу наспрам количине бактерија укупног вагиналног микробиома. Два од поменутих три, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, су на основу спроведених истраживања, доведена у везу са БВ, док је познато да је *Lactobacillus spp* најбројнији микроорганизам „здравог“ вагиналног микробиома (94). Детекцијом и квантификацијом наведених микроорганизама и укупног броја микроорганизама присутних у појединачним узорцима, а помоћу алгоритма који је предложио произвођач реагенаса, све узорке смо сврстали у три групе: нормалан, ИМД и БВ (табела 18). Сви микроорганизми су били присутни код нормалних, ИМД и БВ налаза. Број *G. vaginalis* и *A. vaginae* је имао тренд пораста крећући се од нормалних ка БВ, док је број лактобацила био приближан и код нормалних и код БВ. Међутим, однос лактобацила у односу на друге две бактерије код нормалних и БВ се прилично разликовао (код нормалних број лактобацила је био 800 пута већи, док је код БВ број лактобацила био 22 пута нижи). Однос бактерија удружених са БВ је био различит у дијагностичким групама у корист *G. vaginalis*. Код нормалних је био 4 пута виши, код ИМД 20 пута виши, а код БВ 7 пута виши од броја *A. vaginae*. Датку et al, су квантификујући велики број бактерија удружених

са БВ (укључујући *G. vaginalis* и *A. vaginae*) установили статистички значајан пораст свих бактерија крећући се од нормалних налаза ка БВ (осим за *U. parvum* и *U. urealyticum*) (125). Слични резултати су добијени и другим студијама, где је још и установљена промена односа различитих врста лактобацила у односу на групу налаза. Наиме, пронађено је да је код нормалних налаза доминирао *Lactobacillus crispatus*, док је код БВ налаза доминирао *Lactobacillus inners* (111).

Резултати молекуларне анализе коју смо спровели јасно указују на значај не само детекције микроорганизама, већ и њихове квантификације. Заправо, број и релативни однос микроорганизама у узорцима вагиналног секрета могу представљати кључ за разумевање феномена присутних у комплексном вагиналном микро-екосистему.

У циљу решења недостатака клиничких и микроскопских критеријума који су коришћени у досадашњој пракси (слаба сензитивност Амселових критеријума, отежана интерпретација ИМД налаза, мала површина испитиваног препарата), Ненадић et al, су предложили нову микроскопску методу која се заснива на семи-квантитативној процени тзв. „целуларности“ (количина присутних бактерија одређеног морфотипа) веће површине препарата бојених по Граму (91). По категоризацији нове микроскопске методе, сви резултати микроскопских препарата вагиналних размаза се сврставају у 6 група (три групе нормалних налаза и три групе БВ налаза).

У циљу да установимо слагање резултата добијених real-time PCR-ом и нове микроскопске методе, прво смо поредили резултате са три групе нормалних налаза (празан, умерен и пун) (табела 14), а онда са три групе БВ налаза (празан, умерен и пун) (табела 15). Од три бактерије које смо детектовали, у свим подгрупама нормалних налаза (табела 14) је доминирао просечан број лактобацила у односу на укупан просечни број друге две (преко 600 пута већи код „пуних“, 140 пута већи код „умерених“ и 90 пута већи код „празних“). Покушај да се одговори на питање зашто лактобацили доминирају вагиналним микробиомом налази упориште у генетским својствима „домаћина“ укључујући хормонски статус и основне карактеристике урођеног имунског система. Изгледа да су лактобацили, у односу на све остале бактерије, најбоље одговорили захтевима организма који насељавају, а исто тако, захваљујући сопственом геному, показали највећи адаптабилни потенцијал на услове средине (142).

Када говоримо о новој микроскопској методи, треба имати у виду да се опис „празан“ никако не односи на потпуно одсуство бактерија на препарату, већ субјективни осећај недостатка бактерија. Квантификацијом укупног бактеријског микробиома смо установили да је просечан број укупних бактерија на „празним“ препаратима (нормалних и БВ налаза) био око милион. Без обзира на доминацију лактобацила код нормалних налаза, уочен је тренд пада бактерија удружених са БВ (*G. vaginalis* и *A. vaginae*), крећући се од нормалних „празних“ ка нормалним „пуним“. На основу ових података уочили смо обрнуто пропорционалан однос лактобацила и бактерија које су у вези са БВ у три категорије нормалних налаза, где је међусобан однос *G. vaginalis* и *A. vaginae* у свим подгрупама нормалних налаза био око пет пута већи у корист *G. vaginalis*. Испитујући концентрације *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *M. curtisii* и *M. mulieris*, Менард et al, су установили да су поменуте бактерије биле присутне у значајно већем броју код БВ него код нормалних налаза (52). Да подсетимо, на основу резултата своје студије су закључили да су и *G. vaginalis* и *A. vaginae* независно једна од друге биле добри предиктори БВ, а да је детекција и квантификација обе бактерије показала најбољу предиктивну вредност за дијагнозу БВ, са сензитивношћу од 95% и специфичношћу од 99%.

Поређењем резултата молекуларне анализе и подгрупа БВ налаза нове микроскопе методе (табела 15), запазили смо да је просечан број бактерија удружених са БВ био највиши код „пуних“ препарата, а најнижи код „празних“ препарата. Код „празних“ узорака, и БВ и нормалних налаза, доминирали су лактобацили, само што је њихов однос, у поређењу са друге две бактерије, био пет пута виши код БВ, а 90 пута виши код нормалних. Такође, однос испитиваних бактерија, латобацила и бактерија које су у вези са БВ, је био обрнуто пропорционалан, са градацијским падом бактерија удружених са БВ крећући се ка БВ „празним“ налазима. Униформни тренд „кретања“ *G. vaginalis* и *A. vaginae* се може објаснити својством *G. vaginalis* у стварању биофилма који *A. vaginae* често насељава, што се очитује кроз запажену коегзистенцију ова два микроорганизма. Заправо, коегзистенција *G. vaginalis* и *A. vaginae* је уочена код 78-96% БВ налаза и 5-10% нормалних налаза (50, 51, 85). Значај квантификације *G. vaginalis* и *A. vaginae* се огледа у непосредној вези високих нивоа ових бактерија и ризика од превременог порођаја. На

пример, неке студије су показале да су високи нивои ових бактерија измерени код 19% пацијенткиња са БВ, од којих је 65% имало превремени порођај (143).

Анализом релативног односа просечног броја бактерија у свих шест категорија нове микроскопске методе смо запазили обрнуто пропорционалан однос бактерија које су маркер „здравог“ микробиома (*Lactobacillus spp*) у односу на бактерије које су маркер БВ (*G. vaginalis* и *A. vaginae*) (табела 16 и 17). Заправо, када се анализира само однос испитиваних бактерија, показано је да релативни однос лактобацила опада крећући се од нормалан „пун“ ка БВ „пун“, док релативни однос *G. vaginalis* и *A. vaginae* обрнут, расте од нормалан „пун“ ка БВ „пун“. Са друге стране, када смо посматрали однос испитиваних бактерија са укупним вагиналним микробиомом уочили смо да су *G. vaginalis* и *A. vaginae* задржали тренд пораста крећући се од нормалних ка БВ, док је однос лактобацила и укупног микробиома код ИМД и БВ налаза био приближан. Ово запажање би захтевало додатну анализу различитих врста лактобацила у поменути групама ради проналажења одговарајућег објашњења (111).

На крају, поредили смо резултате молекуларне анализе са резултатима нове микроскопске методе класификоване по „целуларности“ на „празан“, „умерен“ и „пун“ (табела 13). Запазили смо да је просечан број бактерија укупног вагиналног микробиома био 34 пута већи код „пуних“ налаза у односу на „празне“. Такође, уочен је тренд пораста просечног броја свих бактерија крећући се од „празних“ ка „пуним“ налазима, са изузетком *A. vaginae* чији је пад у просечном броју запажен у групи „умерених“ налаза. У групи „празних“ налаза је доминирао просечан број лактобацила са 12 пута вишим вредностима у односу на укупан просечан број *G. vaginalis* и *A. vaginae*. Доминантан просечан број лактобацила у групама „празних“ резултата (који суштински одговарају ИМД групи налаза) сугерише могућност интерпретације ИМД налаза у склопу нормалних налаза. Да подсетимо, међусобним поређењем налаза класификованих Амселових критеријума и осталим микроскопским методама, када смо ИМД налазе интерпретирали као нормалне, добили смо нешто више вредности индекса слагања (каппа), него што је то био случај када смо ИМД налазе интерпретирали у склопу БВ налаза (табела 8 и 9). Са друге стране, према резултатима молекуларне анализе неких студија (квантификација бактерија), скоро половина ИМД налаза је одговарала саставу микробиома уоченом код БВ. Ови подаци су

указали да је сензитивност Нацентових критеријума ниска, у поређењу са квантификацијом бактеријских врста удружених било са „здравим“ вагиналним микробиомом, било са БВ. Јаз између ове две дијагностичке методе се може објаснити чињеницом да се *A. vaginae*, за који се показало да је значајно удружен са БВ, не може диференцирати на микроскопским препаратима бојеним по Граму (52).

ROC анализом броја бектерија који смо добили PCR квантификацијом у односу на различите дијагностичке групе (нормалан, ИМД и БВ) установили смо да је *G. vaginalis* била одличан маркер диференцијације између нормалних и БВ налаза (сензитивност 87%, специфичност 83%), док је *A. vaginae* показао ниску сензитивност, а добру специфичност (96%) (табела 19). Сличне резултате су добили Бредшоу et al (51) и Менард et al, са чак идентичном вредношћу за специфичност *A. vaginae* (96%), где су Менард et al, истакли значај квантификације ове бактерије у дијагностици БВ у односу на само детекцију (52). Наши резултати су показали и да је истовремено праћење броја обе ове бактерије повећавало сензитивност и специфичност у дијагностици БВ (табела 21), што је у складу са резултатима Хилберта et al (144) који су показали да је при истовременој анализи ових бактерија специфичност са 84% и 87% (када се анализирају одвојено) порасла на 94% уз истовремени пораст и сензитивности. Са друге стране, уочили смо да је *Lactobacillus spp* најбоље диференцирао нормалне налазе у односу на ИМД (сензитивност 89%, специфичност 93%) (табела 20). Међутим, квантификујући сва три микроорганизма заједно (*G. vaginalis*, *A. vaginae* и *Lactobacillus spp*) установили смо да су у комбинацији правили најбољу диференцијацију између свих група (нормал, ИМД и БВ) (табела 21). У овом смислу Ша et al, након ROC анализе резултата симултане квантификације више микроорганизма, истичу значај комбинације предикторних бактерија у дијагностици БВ (145).

Нашом студијом нисмо само установили слагање нове микроскопске методе са осталим, широко примењиваним дијагностичким критеријума, већ смо показали да је нова микроскопска метода, без обзира на лимитираност малим бројем бактеријских морфотипова као базе за диференцијацију налаза, успела да класификује значајне микробиолошке феномене који се тичу тзв. „целуларности“. Даље, показали смо да се иза „целуларности“ крије шаблон понашања бактерија вагиналног микробиома, што може

бити основа за дизајнирање есеја високе специфичности и сензитивности у молекуларној дијагностици бактеријске вагинозе.

6 ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

- Постоји међусобно слагање микроскопских метода,
- Постоји слагање између клиничких критеријума (Амсел) са Нацентовим критеријумима и новом микроскопском методом када се ИМД налази интерпретирају у склопу нормалних налаза,
- Резултати PCR-а се не слажу са резултатима Амсела и осталих микроскопских метода,
- У узорцима препарата вагиналних секрета бојених по Граму се налазе *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* и *Lactobacillus spp* доминира у нормалним (1), а *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* у налазима вагиналних секрета класификованих као бактеријска вагиноза (3), при чему је њихов однос уравнотежен у интермедијерним налазима (2),
- Укупни вагинални микробиом корелира са резултатима квантитативне категоризације (празан, умерен, пун) вагиналних размаза бојених по Граму, класификованих према новој микроскопској методи,
- Релативни однос *Lactobacillus spp* и свих осталих бактерија опада крећући се од „нормалан пун“ ка „БВ пун“, док је тренд релативног односа *G. vaginalis* и *A. vaginae* обрнут, расте од „нормалан пун“ ка „БВ пун“.

- Квантификација *G. vaginalis* и *A. vaginae* је показала високу сензитивност и специфичност у дијагностици бактеријске вагинозе,
- Квантификација *Lactobacillus spp* је показала високу сензитивност и специфичност у дијагностици нормалних налаза,
- Квантификација *G. vaginalis*, *A. vaginae* и *Lactobacillus spp* је показала високу сензитивност и специфичност у дијагностици нормалних, интермедијерних и БВ налаза.

7 ЛИТЕРАТУРА

1. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486:207-214.
2. Groussin M, Mazel F, Sanders JG, Smillie CS, Lavergne S, Thuiller W and Alm EJ. Unraveling the processes shaping mammalian gut microbiomes over evolutionary time. *Nat Commun* 2017; 8: 14319. doi: 10.1038/ncomms14319.
3. Martens EC, Lowe EC, Chiang H, Pudlo NA, Wu M, McNulty NP, Abott DW, et al. Recognition and degradation of plant cell wall polysaccharides by two human gut symbionts. *PLoS Biol* 2011; 9(12): e1001221. doi: 10.1371/journal.pbio.1001221.
4. Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science* 2012; 336:1268-1273.
5. Chung H, Pamp SJ, Hill JA, Surana NK, Edelman SM, Troy EB, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota. *Cell* 2012; 149: 1578-1593.
6. Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:979-984.
7. Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil* 2011; 23(3):255-264. e119. doi: 10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x.
8. Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annu Rev Microbiol* 2012; 66:371-389.
9. El Aila NA, Tency I, Claeys G, Saerens B, De Backer E, Temmerman M, et al. Genotyping of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci) isolated from vaginal and rectal swabs of women at 35-37 weeks of pregnancy. *BMC Infect Dis* 2009; 9(1): 153. doi: 10.1186/1471-2334-9-153.

- 10.Linhares IM, Summers PR, Larsen B, Giraldo PC, Witkin SS. Contemporary prospective on vaginal pH and lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 204(2):120.e1-5. doi: 10.1016/j.ajog.2010.07.010.
- 11.Syed TS, Braverman PK. Vaginitis in adolescents. *Adolesc Med Clin* 2004; 15(2):235-251.
- 12.Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Rusell J, Tacket CO, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(Suppl 1):4680-4687.
- 13.Anahtar MN, Byrne EH, Doherty KE, Bowman BA, Yamamoto HS, Soumillon M, Padavattan N, Ismail N, Moodley A, Sabatini ME, et al. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity* 2015; 42:965-976.
- 14.Kenyon C, Colebunders R, Crucitti T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol* 2013; 209:505-523.
- 15.Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, Matsen FA, Fiedler TL, Hall RW, et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analysis reveal relationship of microbiota to clinical criteria. *PLoS ONE* 2012; 7(6):e37818. doi: 10.1371/journal.pone.0037818.
- 16.Ling Z, Kong J, Liu F, Zhu H, Chen X, Wang Y, et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genom* 2010; 11:488. doi: 10.1186/1471-2164-11-488.
- 17.Bretelle F, Fenollar F, Baumstarck K, Fortanier C, Cocallemen JF, Serazin V, et al. Screen-and-treat program by point-of-care of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in preventing preterm birth (AuTop trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015; 16(9):978-984.
- 18.Lowe NK, Neal JL, Ryan-Wenger NA. Accuracy of the clinical diagnosis compared with a DNA probe laboratory standard. *Obstet Gynecol* 2009; 113:89-95.
- 19.Datcu R. Characterization of the vaginal microflora in health and disease. *Dan Med J*. 2014; 61:B4830.

-
20. Donders GG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin Obstet Gynecol* 2007; 2:355-373.
 21. Donders GG, Vereecken A, Salembier G, Van Bulck B, Spitz B. Assessment of vaginal lactobacillary flora in wet mount and fresh or delayed gram's stain *Infect Obstet Gynecol*. 1996; 4:2-6.
 22. Thomas S. Doderlein's bacillus: *Lactobacillus acidophilus*. *J Infect Dis* 1928; 43:218-227.
 23. Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1955; 69:962-976.
 24. Pfeifer TA, Forsyth PS, Durfee MA, Pollock HM, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: role of *Haemophilus vaginalis* and treatment with metronidazole. *N Engl J Med* 1978; 298:1429-1434.
 25. Ren X. Toward a more systematic understanding of bacterial virulence factors and establishing Koch postulates *in silico*. *Virulence* 2013; 4:437-438.
 26. Spiegel CA. Bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev* 1991; 4:485-502.
 27. Greenwood JR, Pickett MJ. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes). *Int J Syst Bacteriol* 1980; 30:170-178.
 28. Witkin SS, Ledger WJ. Complexities of the uniquely human vagina. *Sci Transl Med* 2012; 4(132):132fs11. doi: 10.1126/scitranslmed.3003944.
 29. Yildirim S, Yeoman CJ, Janga SC, Thomas SM, Ho M, Leigh SR, et al. Primate vaginal microbiomes exhibit species specificity without universal *Lactobacillus* dominance. *ISME J* 2014; 8:2431-2444.
 30. Spear GT, French AL, Gilbert D, Zariffard MR, Mirmonsef P, Sullivan TH, et al. Human α -amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processed glycogen to support vaginal colonization by *Lactobacillus*. *J Infect Dis* 2014; 210:1019-1028.
 31. Nasioudis D, Beghini J, Bongiovanni AM, Giraldo PC, Linhares IM, Witkin SS. α -Amylase in vaginal fluid: associations with conditions favorable to dominance of *lactobacillus*. *Reprod Sci* 2015; 22:1393-1398.

-
32. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PLoS ONE*. 2013; 8:e80074. doi.org/10.1371/journal.pone.0080074
 33. Mendes-Soares H, Suzuki H, Hickey RJ, Forney LJ. Comparative functional genomics of *Lactobacillus spp.* reveals possible mechanisms for specialization of vaginal lactobacilli to their environment. *J Bacteriol* 2014; 196:1458-1470.
 34. Ojala T, Kankainen M, Castro J, Cerca N, Edelman S, Westerlund-Wikstrom B, et al. Comparative genomics of *Lactobacillus crispatus* suggests novel mechanism for the competitive exclusion of *Gardnerella vaginalis*. *BMC Genom* 2014; 15:1070. doi: 10.1186/1471-2164-15-1070.
 35. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation independent methods. *Microbiology* 2004; 150:2565-73.
 36. Ewaschuk JB, Naylor JM, Zello GA. D-Lactate in human and ruminant metabolism. *J Nutr* 2005; 135:1619-1625.
 37. Rahkonen L, Rutanen EM, Unkila-Kallio L, Nuutila M, Nieminen P, Sorca T, et al. Factors affecting matrix metalloproteinase-8 levels in the vaginal and cervical fluids in the first and second trimester of pregnancy. *Hum Reprod* 2009; 24:2693-2702.
 38. Anahtar MN, Byrne EH, Doherty KE, Bowman BA, Yamamoto HS, Soumillon M, et al. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity* 2015; 42:965-976.
 39. Nasioudis D, Witkin SS. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and innate immune responses to bacterial infections. *Med Microbiol Immunol* 2015; 204:471-479.
 40. Gelber SE, Aguilar JL, Lewis KL, Ratner AJ. Functional and phylogenetic characterization of vaginolysin, the human-specific cytolytic from *Gardnerella vaginalis*. *J Bacteriol* 2008; 190:3896-3903.
 41. Cauci S, Culhane JF, Di Santolo M, Mc Collum K. Among pregnant women with bacterial vaginosis, the hydrolytic enzymes sialidase and prolidase are positively associated with interleukin-1beta. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198:132.e1-132.e7.

-
42. Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Dorffel Y, Scholze J, Lochs H, Verstraelen H. An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persist on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazol. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 198:97.e1-97.e6.
43. Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Verstraelen H, Vanechoutte M, Lemm V, Schilling J, Mendling W. *Gardnerella* biofilm involves females and males and is transmitted sexually. *Gynecol Obstet Invest* 2010; 70:256-263.
44. Fichorova RN, Buck OR, Yamamoto HS, Fashemi T, Dawood HY, Fashemi B, Hayes GR, Beach DH, Takagi Y, Delaney ML, Singh BN, Onderdonk AB/ The villain team-up or how *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis alter innate immunity in concert. *Sex Transm Infect* 2013; 89:460-466.
45. DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ, Robaczewska A, Sun CL, Goltsman DS, Wong RJ, Shaw G, Stevenson DK, Holmes SP, Relman DA. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112:11060-11065.
46. Rodriguez Jovita M, Collins MD, Sjoden B, Falsen E. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49(Part 4):1573-1576.
47. Polatti F. Bacterial vaginosis. *Atopobium vaginae* and nifuratel. *Curr Clin Pharmacol* 2012; 7:36-40.
48. Burton JP, Devillard E, Cadieux PA, Hammond JA, Reid G. Detection of *Atopobium vaginae* in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1829-1831.
49. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med* 2005; 353:1899-1911.
50. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, De Ganck C, Temmerman M, Vanechoutte 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.

-
51. 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 metronidazol therapy. *J Infect Dis* 2006; 194:828-836.
52. Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2008; 47:33-43.
53. Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH, Ferris MJ. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1812-1819.
54. Fichorova RN, Yamamoto HS, Delaney ML, Onderdonk AB, Doncel GF. Novel vaginal microflora colonization model providing new insight into microbicide mechanism of action. *mBio* 2011; 2:e00168-11. doi: 10.1128/mBio.00168-11. Print 2011.
55. Libby EK, Pascal KE, Mordechai E, Adelson ME, Trama JP. *Atopobium vaginae* triggers an innate immune response in an in vitro model of bacterial vaginosis. *Microbes Infect* 2008; 10: 439-446.
56. Kyongo JK, Crucitti T, Menten J, Hardy L, Cools P, Michiels J, Demany-Moretlwe S, Mwaura M, Ndayisaba G, Joseph S, Fichorova R, van de Wijgert J, Vanham G, Arien KK, Jespers V. Cross-sectional analysis of selected genital tract immunological markers and molecular vaginal microbiota in sub-Saharan African women, with relevance to HIV risk and prevention. *Clin Vaccine Immunol* 2015; 22:526-538.
57. Brotman RM. Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: an epidemiologic perspective. *J Clin Invest* 2011; 121:4610-4617.
58. Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH, Cotch MF, Edelman R, Pastorek JG 2nd, Rao AV, et al. The vaginal infections and prematurity study group. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. *N Engl J Med* 1995; 333:1737-1742.
59. Meis PJ, Goldenberg RL, Mercer B, Moawad A, Das A, McNellis D, Johnson F, Iams JD, Thorn E and Andrews WW. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. The preterm prediction study: significance of vaginal infections. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173:1231-1235.

-
60. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, De Backer E, Temmerman M and Vaneechoutte M. Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. *BMC Microbiol* 2009; 9:116. doi: 10.1186/1471-2180-9-116.
61. Cohen CR, Duerr A, Pruithithada N, Rugpao S, Hillier S, Garcia P, et al. Bacterial vaginosis and HIV seroprevalence among female commercial sex workers in Chiang Mai, Thailand. *AIDS* 1995; 9:1093-1097.
62. Taha TE, Hoover DR, Dallabetta GA, Kumwenda NI, Mtimavalye LA, Yang LP, et al. Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV. *AIDS* 1998; 12:1699-1706.
63. Sewakambo G, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNaim D, Wabwire-Mangen F, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* 1997; 350:546-550.
64. Myer L, Denny L, Telerant R, Souza M, Wright Jr TC, Kuhn L. Bacterial vaginosis and susceptibility to HIV infection in South African women: a nested case-control study. *J Infect Dis* 2005; 192:1372-1380.
65. Atashili J, Poole C, Ndumbe PM, Adimora AA, Smith JS. Bacterial vaginosis and HIV acquisition: a meta-analysis of published studies. *AIDS* 2008; 22(12):1493-1501.
66. Bueve A, Jaspers V, Crucitti T, Fichorova RN. The vaginal microbiota and susceptibility to HIV. *AIDS* 2014; 28:2333-2344.
67. Morrison C, Fichorova R, Mauck C, Chen P, Kwok C, Chipato T, Salata R, Doncel GF. Cervical inflammation and immunity associated with hormonal contraception, pregnancy and HIV-1 seroconversion. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2014; 66:109-117.
68. Thurman AR, Kimble T, Herold B, Mesquita PM, Fichorova RN, Dawood HY, Fashemi T, Chandra N, Rabe L, Cunningham TD, Anderson S, Schwartz J, Doncel G. Bacterial vaginosis and subclinical markers of genital tract inflammation and mucosal immunity. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2015; 31:1139-1152.

-
69. Gimenes F, Souza RP, Bento JC, Teixeira JJ, Maria-Engler SS, Bonini MG, et al. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nat Rev Urol* 2014; 11:672-687.
70. Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, Lavreys L, Hillier SL, Chohan B, et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999; 180:1863-1868.
71. Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW, Zhang J, et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. *J Infect Dis* 2010; 202:1907-1915.
72. Gallo MF, Macaluso M, Warner L, Fleenor ME, Hook 3rd EV, Brill I, et al. Bacterial vaginosis, gonorrhea, and chlamydial infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: a longitudinal analysis of possible causal links. *Ann Epidemiol* 2012; 22:213-220.
73. Donders G, Bellen G, Rezeberga D, Aerobic vaginitis in pregnancy. *BJOG* 2011; 118:1163-1170.
74. Sangeetha KT, Golia S, Vasudha CL. A study of aerobic bacterial pathogens associated with vaginitis in reproductive age group women (15-45 years) and their sensitivity pattern. *Int J Res Med Sci* 2015; 3(9):2268-2273.
75. Srinivasan U, Misra D, Marazita ML, Foxman B. Vaginal and oral microbes, host genotype and preterm birth. *Med Hypotheses* 2009; 73(6):963-975.
76. Donders GG, Ruban K, Bellen G. Selecting anti-microbial treatment of aerobic vaginitis. *Curr Infect Dis Rep* 2015; 17(5):477. doi: 10.1007/s11908-015-0477-6.
77. Tansarli GS, Kostaras EK, Athanasiou S, Falagas ME. Prevalence and treatment of aerobic vaginitis among non-pregnant women: evaluation of the evidence for an underestimated clinical entity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32(8):977-984.
78. Krauss-Silva L, Almada-Horta A, Alves MB, Camacho KG, Moreira MEL, Braga A. Basic vaginal pH, bacterial vaginosis and bacterial vaginitis: prevalence in early pregnancy and risk of spontaneous preterm delivery, a prospective study in a low

- socioeconomic and multiethnic South American population. *BMC Pregnancy Childbirth* 2014; 14(1):107. doi: 10.1186/1471-2393-14-107.
- 79.Koumans EH, Sternberg M, Bruce C, et al. The prevalence of bacterial vaginosis in the United States, 2001-2004; associations with symptoms, sexual behaviors, and reproductive health. *Sexually Transmitted Diseases* 2007; 78(6): 864-69.
- 80.Anderson MR, Klink K, and Cohrssen A. Evaluation of vaginal complaints. *JAMA* 2004; 291: 1368-79.
- 81.Tamonud M, Preeti A, Charan A, Raja R, Sebanti G, and Prमित G. Diagnosis of bacterial vaginosis in cases of abnormal vaginal discharge: comparison of clinical and microbiological criteria. *J Infect Dev Ctries* 2011; 5(5): 353-60.
- 82.Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiological associations. *Am J Med.* 1983; 74: 14-22.
- 83.Nugent RP, Krohn MA, and Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991; 297-301.
- 84.Ison CA and Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect.* 2002; 78: 413-415.
- 85.Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, et al. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. *BMC Microbiology.* 2005; 5: 61.
- 86.Vestraelen H, Verhelst R, Roelens K, et al. Modified classification of Gram-stained vaginal smears to predict spontaneous preterm birth: a positive cohort study. *Am J Obst Gynecol* 2007; 196: 528-29.
- 87.Modak T, Arora P, C. Agnes C et al. Diagnosis of bacterial vaginosis in cases of abnormal vaginal discharge: comparison of clinical and microbiological criteria. *Journal of Infection in Developing Countries* 2011; 5(5): 353–60.

-
88. Forsum U, Jakobsson T, Larsson PG, et al. An International study of the interobserver variation between interpretations of vaginal smear criteria of bacterial vaginosis. *APMIS* 2002; 110(11): 811-18.
89. Larsson PG, Carlsson B, Fahraeus L, Jakobsson T, and Forsum U. Diagnosis of bacterial vaginosis: need for validation of microscopic image area used for scoring bacterial morphotypes. *Sexually Transmitted Infections* 2004; 80(1): 63-7.
90. Forsum U, Larsson PG, and Spiegel C. Scoring vaginal fluid smears for diagnosis of bacterial vaginosis: need for quality specifications. *APMIS* 2008; 116(2): 156-9.
91. Nenadic DB, Pavlovic MD, and Motrenko T. A novel microscopic method for analyzing Gram-stained vaginal smears in the diagnosis of disorders of vaginal microflora. *Vojnosanit Pregl.* 2015; 72(8): 670-676.
92. Hillier SL, Krohn MA, Nugent RP et al, for the vaginal infections and prematurity study group. Characteristics of three vaginal flora patterns assessed by Gram stain among pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 938-44.
93. Rosenstein IJ, Morgan DJ, Sheehan M et al. Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different Gram-stain categories of the vaginal flora. *J Med Microbiol* 1996; 45: 120-6.
94. Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. The human microbiome during bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29(2):223-238.
95. Burton JP, Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J Infect Dis.* 2002; 186:1770-1780.
96. Srinivasan S, Fredricks DN. The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2008; 2008:750479. doi: 10.1155/2008/750479.
97. Spear GT, Sikaroodi M, Zariffard MR, Landay AL, French AL, et al. Comparison of the diversity of the vaginal microbiota in HIV-infected and HIV-uninfected women with or without bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 2008; 198:1131-1140.
98. Nikolaitchouk N, Anderchs B, Falsen E, Strömbeck 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.

-
- 99.Wertz J, Isaacs-Cosgrove N, Holzman C, Marsh TL. Temporal shifts in microbial communities in nonpregnant African-American women with and without bacterial vaginosis. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2008; 2008:181253. doi: 10.1155/2008/181253.
- 100.Dumonceaux TJ, Schellenberg J, Goleski V, Hill JE, Jaoko W, et al. Multiplex detection of bacteria associated with normal microbiota and with bacterial vaginosis in vaginal swabs by use of oligonucleotide-coupled fluorescent microspheres. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:4067-4077.
- 101.Dols JA, Smith PW, Kort R, Reid G, Schuren FH, et al. Microarray-based identification of clinically relevant vaginal bacteria in relation to bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 204:305e1-7.
- 102.Srinivasan S, Liu C, Mitchel CM, Fiedler TL, Thomas KK, et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS ONE.* 2010; 5:e10197. doi.org/10.1371/journal.pone.0010197.
- 103.Schelleberg JJ, Links MG, Hill JE, Dumonceaux TJ, Kimani J, et al. Molecular definition of vaginal microbiota in East African commercial sex workers. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77:4066-4074.
- 104.Yoshimura K, Morotomi N, Fukuda N, Nakano M, Kashimura M, et al. Intravaginal microbial flora by the 16S rRNA gene sequencing. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 205: 235.e1-9.
- 105.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; 123:242-256.
- 106.Pendharkar S, Magopane T, Larsson P-G, de Bruyn G, Gray G, et al. Identification and characterization of vaginal lactobacilli from South African women. *BMC Infect Dis.* 2013; 13:43. doi: 10.1186/1471-2334-13-43.
- 107.Marazzo JM, Thomas KK, Fiedler TL, Ringwood K, Fredricks DN. Relationship of specific vaginal bacteria and bacterial vaginosis treatment failure in women who have sex with women. *Ann Intern Med.* 2008; 149:20-28.

-
- 108.Santiago GL, Cools P, Verstraelen H, Trog M, Missine G, et al. Longitudinal study of the dynamics of vaginal microflora during two consecutive menstrual cycles. PLoS One. 2011; 6:e28180. doi.org/10.1371/journal.pone.0028180.
- 109.Hummelen R, Fernandes AD, Macklaim JM, Dickson RJ, Changalucha J, et al. Deep sequencing of the vaginal microbiota of women with HIV. PLoS One. 2010; 5:e12078. doi.org/10.1371/journal.pone.0012078.
- 110.Martinez-Pena MD, Castro-Escarpulli G, Aguilera-Arreola MG. *Lactobacillus species* isolated from vaginal secretions of healthy and bacterial vaginosis-intermediate Mexican women: a prospective study. BMC Infect Dis. 2013; 13:189. doi: 10.1186/1471-2334-13-189.
- 111.Gajer P, Brotman RM, Gyoyun B, Sakamoto J, Shütte UM, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. Sci Trans Med. 2012; 4(132):132ra52. doi: 10.1126/scitranslmed.3003605.
- 112.Muzny CA and Schwebke JR. Pathogenesis of bacterial vaginosis: discussion of current hypotheses. J Infect Dis 2016; 214 Suppl 1:S1-5. doi: 10.1093/infdis/jiw121.
- 113.Hay PE, Morgan DJ, Ison CA, Bhide SA, Romney M, McKenzie P, Pearson J, Lamont RF, Tylor-Robinson D. A longitudinal study of bacterial vaginosis during pregnancy. Br J Obstet Gynaecol 1994; 101(12):1048-1053.
- 114.Nelson DB and Macones G. Bacterial vaginosis in pregnancy: current findings and future directions. Epidemiol Rev 2002; 24:102-108.
- 115.Hay P. Bacterial vaginosis. Medicine 2005; 33(10):58-61
- 116.Livengood CH. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. Rev Obstet Gynecol 2009; 2(1):28-36.
- 117.Harwich MD, Alves JM, Buck GA, Strauss FS, Patterson JL, Oki AT, Ginerd PH and Jefferson KK. Drawing the line between commensal and pathogenic *Gardnerella vaginalis* through genome analysis and virulence studies. BMC Genomics 2010; 11:375. doi: 10.1186/1471-2164-11-375.
- 118.Anucam KC and Reid G. Organism associated with bacterial vaginosis in Nigerian women as determined by PCR-DGGE and 16s rRNA gene sequencing. African Health Science 2007; 7(2):68-72.

-
- 119.Neri A, Sabah G and Samra Z. Bacterial vaginosis in pregnancy treated with youghurt. *Acta Obstetrics and Gynaecology Scandinavia* 1993; 72:17-19.
- 120.Shalev E. Ingestion of probiotics: optional treatment of bacterial vaginosis in pregnancy. *Israel Medical Association Journal* 2002; 4:357-360.
- 121.Vitali B, Cruciani F, Baldassarre ME, Capursi T, Spisni E, Valerii MC, Candela M, Turrone S and Brigidi P. Dietary supplementation with probiotics during late pregnancy: outcome on vaginal microbiota and cytokine secretion. *BMC Microbiology* 2012; 12:236. doi: 10.1186/1471-2180-12-236.
- 122.Krauss-Silva L, Moreira ME, Alves MB, Rezende MR, Braga A, Camacho KG, Batista MR, Savastano C, Almada-Horta A and Guerra F. A randomised controlled trial of probiotics for the prevention of spontaneous preterm delivery associated with bacterial vaginosis: preliminary results. *Trials* 2011; 12:239. doi: 10.1186/1745-6215-12-239.
- 123.Othman M. ProB trials: probiotics and the prevention of preterm labour: a randomized controlled study protocol. *WebmedCentral Obstetrics and Gynaecology* 2012; 3(6):WMC003535. http://www.webmedcentral.com/article_view/3535
- 124.Srinivasan U, Ponnaluri S, Villareal L, et al. 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.
- 125.Datcu R, Gesink D, Mulvad G, Montgomery-Andersen R, Rink E, et al. Vaginal microbiome in women from Greenland assessed by microscopy and quantitative PCR. *BMC Infect Dis.* 2013; 13:480. doi: 10.1186/1471-2334-13-480.
- 126.Ling Z, Liu X, Luo Y, Wu X, Yuan L, et al. Associations between vaginal pathogenic community and bacterial vaginosis in Chinese reproductive age women. *PLoS One.* 2013; 8:e76589. doi.org/10.1371/journal.pone.0076589.
- 127.Kim TK, Thomas SM, Ho M, Sharma S, Reich CI, et al. Heterogeneity of vaginal microbial communities withing individuals. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:1181-1189.
128. Srinivasan S, Morgan MT, Liu C, Matsen FA, Hoffman NG, et al. More than meets the eye: associations of vaginal bacteria with Gram stain morphotypes using molecular phylogenetic analysis. *PLoS One.* 2013; 8:e78633. doi: 10.1371/journal.pone.0078633. eCollection 2013.

-
129. Smith BC, Mc Andrew T, Chen Z, Harari A, Barris DM, et al. The cervical microbiome over 7 years and a comparison of methodologies for its characterization. *PLoS One*. 2012; 7:e40425. doi.org/10.1371/journal.pone.0040425.
130. Jespers V, Menten J, Smet H, Poradosú S, Abdellati S, et al. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC Microbiol*. 2012; 12:83. doi: 10.1186/1471-2180-12-83.
131. Allsworth JE, Peipert JF. Prevalence of bacterial vaginosis: 2001-2004 national health and nutrition examination survey data. *Obstet Gynecol* 2007; 109:114-120.
132. Rangari AA, Singh P, Sharma VK. Comparison of the Amsel's composite clinical criteria and Nugent's criteria for diagnosis of bacterial vaginosis:- a step towards preventing mis-diagnosis. *JARMS* 2013; 5(1):37-44.
133. Chawla R, Bhalla P, Chadha S, Grover S and Gard 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.
134. Awoniyi AO, Komolafe OI, Bifarin O and Olarinde O. Bacterial vaginosis among pregnant women attending a primary health care center in Ile-Ife, Nigeria. *Global Advanced Research Journal of Medicine and Medical Science* 2015; 4(1):057-060. <http://garj.org/garjmms/index.htm>
135. Gamal FMG, El-Adawy AR, Mohammed MS, Ahmed AF, Mohamed HA. Evaluation of different diagnostic methods of bacterial vaginosis. *IOSR-JDMS* 2014; 13(1):15-23.
136. Gergova R, Strateva TV, Mitov IG. *Gardnerella vaginalis* – associated bacterial vaginosis in Bulgarian women. *Braz J Infect Dis* 2013; 17(3):313-318.
137. Rodrigues FS, Peixoto S, Adami F, Alves BCA, Gehrke FS, Azzalis LA. Proposal of a new cutoff for Nugent criteria in the diagnosis of bacterial diagnosis. *J Microbiol Methods* 2015; 115:144-146.
138. Martinez-Martinez W, Calderon-Badia B and Cruz-Lage L. Comparison of diagnostic methods for bacterial diagnosis. *African Journal of Microbiology Research* 2014; 8(12):1360-1367.

-
139. Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2007; 45:3270-3276.
140. Taylor-Robinson D, Morgan DJ, Sheehan M, Rosenstein IJ, Lamont RF. Relation between Gram-stain and clinical criteria for diagnosing bacterial vaginosis with special reference to Gram grade II evaluation. *Int J STD AIDS* 2003; 14:6-10.
141. Bradshaw CS, Morton AN, Garland SM, Horvath LB, Kuzevska I, Fairley CK. Evaluation of point-of-care test, BVBlue, and clinical and laboratory criteria for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43:1304-1308.
142. Witkin SS, Linhares IM. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG* 2017; 124(4):606-611.
143. Menard JP, Mazouni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Gamberre M and Bretelle F. High vaginal concentrations of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in women undergoing preterm labor. *Obstet Gynecol* 2010; 115(1):134-140.
144. Hilbert DW, Smith WL, Chadwick SG, Toner G, Mordechai E, Adelson ME, Aguin TJ, Sobel JD, Gyax SE. Development and validation of a highly accurate quantitative real-time PCR assay for diagnosis of bacterial diagnosis. *J Clin Microbiol* 2016; 54:1017-1024.
145. Sha BE, Chen HY, Wang QJ, Zariffard MR, Cohen MH and Spear GT. Utility of Amsel criteria, Nugent score, and quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Lactobacillus spp.* for diagnosis of bacterial vaginosis in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Microbiol* 2005; 43(9):4607-4612.

БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Снежана Матић је рођена 02.12.1977. године у Крагујевцу. Основну школу и средњу медицинску школу завршила је у Крагујевцу. Интегрисане академске студије Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу уписала је 1996/1997. и успешно завршила 2003. године са просечном оценом 9,40. Школске 2005/06. уписала је Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Положила је усмени докторски испит са оценом 10 (десет). Радила је осам година на Факултету Медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу као асистент за ужу научну област Микробиологија и имунологија (2003-2011). Специјалистички испит из микробиологије са паразитологијом положила је 2012. године са одличном оценом. Од 2013-2016. године је радила у приватној микробиолошкој лабораторији „Микромедика“ где је била и оснивач. Од 2016. године ради као микробиолог у Клиничком центру Крагујевац.

Др Снежана Матић се активно бави научно-истраживачким радом. Аутор је и коаутор више радова у часописима од међународног и националног значаја са рецензијом.

СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

1. **Matic S**, Nenadic D, Cukic J, Mijailovic Z, Manojlovic N, Sazdanovic P, Pavlovic M, Baskic D, Zivanovic A. Molecular diagnosis of bacterial vaginosis: prevalence of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in pregnant women. Srp Arh Celok Lek 2017. DOI: <https://doi.org/10.2298/SARH170315206M>
2. D. Baskic, P. Ristic, **S. Pavlovic**, N. Arsenijevic. Serum HER2 and CA 15-3 in breast cancer patient. Journal of BUON 2004; 9:289-294.
3. Baskic D, Ristic P, **Matic S**, Bankovic D, Popovic S. and Arsenijevic N. Clinical evaluation of the simultaneous determination of CA 15-3, CA 125 and sHER2 in breast cancer. Biomarkers 2007; 12(6):657-67.
4. **Pavlovic S**, Baskic D, Ristic P and Arsenijevic N. HER2, overexpression on malignant cells. Medicus 2004;5(1):22-26.
5. Sorak M, Arsenijevic S, Lukic G, Arsenijevic N, Ristic P, **Pavlovic S**, Popovic S. and Baskic D. Relationship of serum levels of tumor markers with tissue expression of gene products in ovarian carcinoma. J BUON 2007; 12(1):99-104.
6. Pulcini C, Tebano G, Mutters NT, Tacconelli E, Cambau E, Kahlmeter G, Jarlier V on behalf of the **EUCIC-ESGAP-EUCAST Selective Reporting Working Group**. Selective reporting of antibiotic susceptibility test results in European countries: an ESCMID cross-sectional survey. International Journal of Antimicrobial Agents 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.014>
7. Baskic D, Djurdjevic P, Djukic A, Lazic I, **Pavlovic S** and Arsenijevic N. Nitric oxide production in the culture of mononuclear leukocytes modulated by soluble products of tumor cells. Medicus 2001; 2/2: 29-31.
8. Baskic D, Radosavljevic G, Cokanovic V, Jetic I, Zelen I, Popovic S, **Pavlovic S** and Arsenijevic N. Serum levels of NO, IL-18 and MDA in patients with breast carcinoma. Medicus 2005; 6(2): 62-65.
9. **Matic S**. Cancer stem cells, a myth or real target. Serbian Journal of Experimental and Clinical Research 2010; 11(4): 163-170.
10. **Matic S**, Ninkovic V, Arsovic A, Obrenovic N, Baskic D. Sensitivity of urinary pathogens to antibiotics in primary health care patients. Medicinski casopis 2012; doi:10.5937/mckg 46-1899.

ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

ТД

Монографска публикација

Тип записа:

ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:

ВР

Докторска дисертација

Аутор:

АУ

Снежана Матић

Ментор/коментор:

МН

проф. др Александар Живановић

Наслов рада:

НР

Валидација нове микроскопске методе у дијагностици бактеријских вагиноза применом PCR и real-time PCR

Језик публикације:

ЈП

српски/ћирилица

Језик извода:

ЈИ

српски/енглески

Земља публикавања:

ЗП

Република Србија

Уже географско подручје:

УГП

Централна Србија

Година:

ГО

2018.

Издавач:

ИЗ

Ауторски репринт

Место и адреса:

МС

34000 Крагујевац, Светозара Марковића 69

Физичи опис рада:

ФО

Дисертација има 95 страна, 7 поглавља, 6 слика, 21 табелу

Научна област: Медицина

Научна дисциплина:

ДИ

Имунологија, инфекција, инфламација

Предметна одредница/ кључне речи

ПО

бактеријска вагиноза, *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, PCR, real-time PCR

УДК

Чува се:

ЧУ

У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Република Србија

Важна напомена:

МН

Извод:

ИД

Увод: Бактеријска вагиноза се сматра једним од најчешћих поремећаја доњег гениталног тракта код жена у репродуктивном периоду. Карактерише је „замена“ доминантних врста лактобацила мешаном флором анаеробних и факултативно анаеробних бактерија. Прави узрок бактеријске вагинозе још увек није утврђен, већ се дијагноза поставља на основу клиничких и микроскопских критеријума који не узимају у обзир специфичну бактерију, већ присуство клиничких знакова и присуство бактерија одређеног морфотипа на препаратима вагиналног размаза.

Циљ: Испитивање слагања нове модификоване методе микроскопирања са осталим критеријумима (клиничким и микроскопским), који се већ користе у дијагностици бактеријских вагиноза, као и испитивање међусобног слагања свих критеријума са резултатима молекуларне анализе присуства и количине бактерија најчешће удружених са „здравим“ вагиналним микробиомом (*Lactobacillus spp*) и бактеријском вагинозом (*Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*).

Материјал и методе: Студија је обухватила 120 трудница, старости од 18-40 година. Узорци вагиналних брисева су узимани током редовних контрола трудница када су класификовани на основу клиничких и микроскопских критеријума по Амселу, Наценту, Исон/Хају, Клејсу и новој модификованој методи микроскопирања. Затим је са препарата бојених по Граму изолована ДНК бактерија и одређивано присуство и количина *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* и укупног вагиналног микробиома методама PCR и real-time PCR.

Резултати: Установили смо да постоји међусобно слагање микроскопских метода, а клиничке, микроскопске методе и нова метода микроскопирања су се слагале када су интермедијерни налази интерпретирани као нормални. Резултати PCR-а се нису слагали са резултатима класификованим по клиничким и микроскопским критеријумима. Са друге стране, у узорцима препарата вагиналног секрета бојених по Граму PCR-ом су детектовани *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*, уз доминацију *Lactobacillus spp* у нормалним налазима, а *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* у налазима бактеријске вагинозе, при чему је њихов однос био уравнотежен у интермедијерним налазима. Укупни вагинални микробиом је корелирао са резултатима квантитативне категоризације (празан, умерен, пун) вагиналних размаза бојених по Граму, класификованих према новој модификованој методи микроскопирања, док је релативни однос *Lactobacillus spp* и свих осталих бактерија опадао крећући се од „нормалан пун“ ка „бактеријска вагиноза пун“, а тренд релативног односа *G. vaginalis* и *A. vaginae* обрнуто, је растао од „нормалан пун“ ка „бактеријска вагиноза пун“.

Закључак: Нова модификована метода микроскопирања је показала слагање са клиничким и осталим микроскопским методама као и квантитативним резултатима молекуларне анализе.

Кључне речи: бактеријска вагиноза, *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, PCR, real-time PCR.

Датум прихватања теме од стране ННВ:

ДП

28.09.2016.г.

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

1. проф. др Маја Ћупић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област *Микробиологија*, председник
2. проф. др Александра Димитријевић, ванредни професор Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Гинекологија и акушерство*, члан
3. доц. др Биљана Љујић, доцент Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област *Генетика*, члан

8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

DT

Monographic publication

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

Ph. D. Thesis

Author:

AU

Snezana Matic

Menthor/co-mentor

MN

Full professor Aleksandar Zivanovic, M.D. Ph.D

Title:

TI

Validation of novel microscopic method in diagnosis ob bacterial vaginosis by PCR and real-time PCR

Language of text:

LT

Serbian / Cyrillic

Language of abstract: Serbian / English

Country of publication:

CP

Republic of Serbia

Locality of publication:

LP

Central Serbia

Publication year:

PY

2018

Publisher:

PU

Author reprint

Publication place:

PP

34 000 Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

Physical description

PD

95 pages, 7 chapters, 6 pictures, 21 tables

Scientific field:

SF

Medicine

Scientific discipline:

SD

Immunity, infection, inflammation

Subject/key words:**SKW**

Bacterial vaginosis, *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, PCR, real-time PCR

UDC**Holding data:**

Library of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note:

N

Abstract:**AB**

Introduction: Bacterial vaginosis is considered to be one of the most common disorders of lower genital tract in women in reproductive age. It has been characterized by “replacement” of dominant lactobacilli with anaerobs or facultative anaerobs. The real cause of bacterial vaginosis still remains unclear; nevertheless its diagnosis is based on presence of clinical signs and/or certain bacterial morphotypes in smears of vaginal swabs.

Aim: Assessment of agreement between novel modified microscopic method and other criteria (clinical and microscopic) already in use in diagnosis of bacterial vaginosis, as well as evaluation of agreement of aforementioned diagnostic criteria and results of molecular detection and quantification of most common bacteria related to normal results (*Lactobacillus spp*) and bacterial vaginosis (*Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae*).

Material and methods: the study enrolled 120 pregnant women between 18 and 40 years of age. The vaginal swab specimens were taken during regular examinations, when they were classified according to clinical and microscopic criteria: Amsel, Nugent, Ison/Hay, Claeys and novel modified microscopic method. Further, bacterial DNA was isolated from Gram stained vaginal smears preparations and detection and quantification of *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* and total vaginal microbiome were performed by PCR and real-time PCR.

Results: Mutual agreement between all microscopic methods has been found as well as agreement between clinical, microscopic methods and novel modified microscopic method when intermediary results interpreted as normal. There was no agreement between PCR results and results classified by clinical or other microscopic methods. In the other hand, *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in Gram stained vaginal smears were detected by PCR, with domination of *Lactobacillus spp* in normal results, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in bacterial vaginosis, and balanced presence of both bacteria in intermediary results. Total vaginal microbiome correlated with results of quantitative categorization of Gram

stained vaginal smears according to novel modified microscopic method (empty, mid, full), while for relative ratio of *Lactobacillus spp* and all other bacteria, going from “normal full” towards “bacterial vaginosis full”, decreasing trend has been observed. Inversely, the relative ratio of *G. vaginalis* and *A. vaginae*, going from “normal full” towards “bacterial full” had increasing trend.

Conclusion: Agreement between novel modified microscopic method, clinical criteria and other microscopic methods has been observed as well as agreement between novel modified microscopic method and results of quantitative molecular analysis.

Key words: bacterial vaginosis, *Lactobacillus spp*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, PCR, real-time PCR.

Accepted by the Scientific Board on:

ASB

28th September 2016.

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

1. Full Professor Maja Cupic, M.D, Ph.D, Medical Faculty, University of Belgrade, scientific field *Microbiology*, chairman
2. Associate Professor Aleksandra Dimitrijevic, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field *Gynecology and Obstetrics*, member
3. Assistant Professor Biljana Ljubic, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, scientific field *Genetics*, member

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

која је одбрањена на _____
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У _____, _____ године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

која је одбрањена на _____

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У _____, _____ године,

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

ORIGINAL ARTICLE / ОРИГИНАЛНИ РАД

Molecular diagnosis of bacterial vaginosis – prevalence of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in pregnant women

Snežana Matić¹, Dane Nenadić², Jelena Čukić³, Željko Mijailović^{4,5}, Nevena Manojlović⁶, Predrag Sazdanović⁷, Miloš Pavlović⁸, Dejan Baskić^{3,9}, Aleksandar Živanović⁷

¹Kragujevac Clinical Center, Department of Microbiology, Kragujevac, Serbia;

²Military Medical Academy, Department of Gynecology, Belgrade, Serbia;

³Public Health Institute, Department of Microbiology, Laboratory for Virology and Immunology, Kragujevac, Serbia;

⁴Kragujevac Clinical Center, Clinic for Infectious Diseases, Kragujevac, Serbia;

⁵University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Infectious Diseases, Kragujevac, Serbia;

⁶University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Doctoral Academic Studies, Kragujevac, Serbia;

⁷Kragujevac Clinical Center, Clinic for Gynecology and Obstetrics, Kragujevac, Serbia;

⁸Infinity Family Medicine Clinic, Dubai, UAE

⁹University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Kragujevac, Serbia



SUMMARY

Introduction/Objective Bacterial vaginosis (BV) is defined as disequilibrium of vaginal microbiota due to proliferation of Gram-negative/variable anaerobes and reduction/depletion of vaginal lactobacilli. Difficulties in interpreting microscopically categorized findings in diagnosis of BV need a molecular analysis of bacteria present in vaginal discharge of patients. In this regard, we performed real-time qPCR analysis of vaginal discharge samples with the goal to explore in which extent prevalence and amount of anaerobes, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae*, are related to findings obtained by microscopy.

Methods This study enrolled 111 asymptomatic pregnant women between 24 and 28 weeks of pregnancy. Gram-stained vaginal smears were evaluated microscopically. Afterwards, DNA of bacteria was extracted from Gram slides and real-time qPCR was performed with the aim to detect and quantify *G. vaginalis* and *A. vaginae*.

Results The data of our study showed that 53.2% of patients had normal results, while 20.7% and 26.1% of patients had intermediary (IMD) and BV results, respectively. *G. vaginalis* and *A. vaginae* were more frequently found in IMD and BV than in healthy patients; also, the average bacterial number of *G. vaginalis* and *A. vaginae* were significantly higher in BV and IMD than in the group with normal findings ($p = 0.000$). Comparing mutual relation of *G. vaginalis* and *A. vaginae*, the prevalence and number of *G. vaginalis* were in all groups significantly higher than *A. vaginae*.

Conclusion The data of our study have shown that in distinguishing normal from BV findings, quantification of bacteria may be more important than just molecular detection of bacteria.

Keywords: bacterial vaginosis; real-time qPCR; *Gardnerella*; *Atopobium*

INTRODUCTION

Among disorders affecting female reproductive tract, bacterial vaginosis (BV) is one of the most common causes of vaginal flora disturbance. Bacterial vaginosis is a condition related to the disordered vaginal microbiota of polybacterial origin, characterized with proliferation of Gram-negative/variable anaerobes associated with reduction or almost complete depletion of “protective” vaginal lactobacilli [1].

Bacterial vaginosis prevalence is different between various ethnic groups in North America, Europe, the Middle East, or Asia. The global epidemiology study on this subject has shown that BV prevalence was the highest in some parts of Africa and lowest in most of Asia and Europe [2].

Proper diagnosis of BV is demanding in terms of sensitivity and specificity for precise outlining of the group of patients in need of treatment. The majority of studies have agreed on the fact that is not possible to cultivate microaerophilic or anaerobic residents of the vagina with complete efficiency [3–6]. With the introduction of molecular detection – polymerase chain reaction (PCR) – of the aforementioned bacteria, this problem has been surpassed. Furthermore, molecular analysis has shown that qualitative and quantitative architecture of BV is inconstant, composite, and not completely understood. It may comprise more than 80 various genera and thousands of species such as *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella* spp., *Atopobium* spp., *Mobiluncus* spp., etc. [7].

Received • Примљено:
March 15, 2017

Revised • Ревизија:
December 12, 2017

Accepted • Прихваћено:
December 13, 2017

Online first: December 22, 2017

Correspondence to:

Dejan BASKIĆ
Public Health Institute
Nikole Pašića 1
34000 Kragujevac, Serbia
dejan.baskic@gmail.com

Microorganisms mostly detected in BV were *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae*, with prevalence in BV ranging between 47.8–99% (*Gardnerella vaginalis*) and 75–95% (*Atopobium vaginae*) without significant difference in prevalence between pregnant and non-pregnant women [4, 8, 9]. In addition, the coexistence of these two microbes was documented in 78–96% of samples with BV [10]. Possible explanation for this was given by Hardy et al. [11]. By analyzing vaginal polymicrobial biofilm, they found that this biofilm is mostly formed by microaerophilic *Gardnerella vaginalis*, which further allows colonization by anaerobic *Atopobium vaginae*.

The importance of BV among pregnant women has been studied recently and it was shown that the rate of preterm delivery in patients with BV reached 30% [12]. Many diagnostic methods have been compared: cultivation of microorganisms mostly connected to BV, various microscopy criteria analyzing Gram-stained slides of vaginal swabs, molecular analysis, and molecular detection and quantification of microbes within the vaginal “ecosystem” [13, 14]. Moreover, it has been shown that microscopy classification of Gram-stained vaginal smears coincided with PCR in great extent, dividing all patients into three groups: normal, intermediary, and patients with BV (4). Nevertheless, although helpful in differing normal and BV findings, microscopy and simple molecular detection of microbes could not give answers on the significance of the intermediary group of patients, apart from its risk for preterm delivery [15, 16]. Due to this issue, Menard et al. [17] quantified by qPCR *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in vaginal samples of pregnant women. They found that preterm delivery was not linked to the presence of *G. vaginalis* and *A. vaginae*, but to high concentrations (> 106 copies/ml) of these bacteria, with four times higher prevalence of *Gardnerella* and *Atopobium* in women with preterm delivery than in women with term delivery.

Because of great importance of BV among pregnant women, we performed molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae*, the most common bacteria connected to BV, with the aim of exploring the relation of these microbes to the groups of patients divided by Nugent’s criteria.

METHODS

Study population and design

This retrospective study comprised 111 pregnant and asymptomatic women between 24 and 28 weeks of pregnancy, seen during regularly planned appointments at the Military Medical Academy hospital from 2012 to 2014. Women younger than 18 and older than 40 years, with multiple pregnancies, anomalies of the uterus, cervical colonization, or with previous preterm delivery were excluded from this study. Women who were under any kind of therapy within two weeks before examination, as well as women who had sexual intercourse within a week before appointment, were also not enrolled in the study. The in-

stitutional Ethics Board approved the study protocol and all study subjects agreed to participate through a written informed consent.

Sampling and data collection

The specimens were prepared under standard ethical and laboratory protocols. After clinical examination, vaginal samples were collected by inserting sterile polyethylene terephthalate-tipped swab into the vagina. The swab was rotated 360° against the vaginal wall at the mid portion of the vault and carefully withdrawn to prevent contamination. The swabs were then smeared on a plain-glass slide, air-dried at room temperature, and Gram stained. Using conventional light microscopy (DM 2000 LED microscope, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), the slides were categorized at 1,000 × magnification according to Nugent. DNA extraction was performed from Gram-stained preparations following protocol established by Srinivasan et al. [14] and procedures contained within commercially available kit (QIAamp DNA mini kit, Qiagen, Germantown, MD, USA). Detection and quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* was determined using SaCycler-96 by commercially available Bacterial Vaginosis Real-TM Quant test (Sacace Biotechnologies, Como, Italy), according to the instructions of the manufacturer.

Statistical analysis

Complete statistical analysis was conducted using SPSS Statistics, Version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Variables were presented as frequencies of individual parameters (categories), and statistical significance of differences was evaluated using the χ^2 test. Differences among groups of nonparametric data were analyzed by Mann–Whitney and Kolmogorov–Smirnov tests. Receiver operating characteristic (ROC) curve was constructed and used to evaluate whether the number of bacterial DNA copies/ml could be a marker of diagnostic accuracy. Statistical difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Using Nugent’s criteria, we found that 26.1% (29/111) of the patients were diagnosed with BV. Of the tested patients, 20.7% (23/111) were classified into the intermediary group, while 53.2% (59/111) were healthy. Prevalence and quantity of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in the vaginal samples of the pregnant women are presented in Table 1.

In addition to the cases with BV (93.1%), *Gardnerella vaginalis* was detected in 95.6% of intermediary patients, as well as in 55.9% of normal specimens. Although *Gardnerella vaginalis* is present in a higher percentage in intermediary and BV patients, the presence of this bacteria is not associated with the diagnosis of bacterial vaginosis (Pearson’s $\chi^2 = 0.668$; $p = 0.716$). *Atopobium vaginae* was also detected in patients with normal findings (16.9%), but

Table 1. Prevalence and quantity of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in the diagnosed groups of patients

Group	Prevalence (total n = 111)			Quantity (DNA copies/ml*)		
	<i>G. vaginalis</i>	<i>A. vaginae</i>	χ^2	<i>G. vaginalis</i>	<i>A. vaginae</i>	KS
N	33/59	10/59	$\chi^2 = 19.4$; $p = 0.000$	1,796	432	$p = 0.000$
IMD	22/23	11/23	$\chi^2 = 13$; $p = 0.000$	27,217	1,413	$p = 0.000$
BV	27/29	14/29	$\chi^2 = 14.1$; $p = 0.000$	35,258,502	5,456,101	$p = 0.004$

N – normal; IMD – intermediary; BV – bacterial vaginosis;

KS – Kolmogorov–Smirnov test;

*mean number

percentage of this bacteria was higher in the intermediary and the BV group, with 47.8% and 48.3%, respectively. However, regarding *Gardnerella vaginalis*, the presence of *Atopobium vaginae* is not associated with the diagnosis of bacterial vaginosis (Pearson's $\chi^2 = 3.480$; $p = 0.175$). Finally, in our samples we showed the coexistence of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* (Pearson's $\chi^2 = 14.199$; $p = 0.0005$). In the intermediary and the BV group, this coexistence was seen in 47.8% (11/23) and 48.3% (14/28), respectively, which was almost three times higher than in the normal group (16.9%; 10/59). More importantly, *Atopobium vaginae*, except in one case, were present only in the cases when *Gardnerella vaginalis* was also present.

Using real-time qPCR we found that the number of *Gardnerella vaginalis* and diagnosis are in weak positive correlation ($r = 0.272$; $p = 0.004$). The highest quantity of this bacterium was detected in samples with BV, while the lowest (20,000 times lower than in BV) has been calculated in patients with normal findings. The number of this bacterium in intermediary cases was 15 times higher than in samples with normal findings. Statistical analysis confirmed a significant difference in *Gardnerella vaginalis* quantity among all diagnosed groups of patients ($p = 0.001$) except for intermediary and BV ($p = 0.380$). In addition, as previously shown for *Gardnerella vaginalis*, we found that the number of *Atopobium vaginae* and diagnosis are in weak positive correlation ($r = 0.214$; $p = 0.023$). The largest amount of *Atopobium vaginae* was detected in BV, gradually decreasing in intermediary and normal groups with lesser difference between the normal and the intermediary group (three times only). However, in this case, the differences in the number of *Atopobium vaginae* between BV, intermediary, and normal findings were not statistically significant ($p = 0.072$).

As we found that *Gardnerella vaginalis* was detected in all the groups, that it was at least two times more frequent than *Atopobium vaginae*, and the the average number of *Gardnerella vaginalis* was significantly higher than *Atopobium vaginae* (Table 1), ROC curve was used to evaluate whether the number of DNA copies/ml of *Gardnerella vaginalis* could be a marker for diagnostic accuracy. We found that the number of DNA copies/ml of *Gardnerella vaginalis* is a very good marker for vaginal flora disturbance (AUC = 0.761; $p = 0.0005$). Moreover, using the ROC analysis, we showed that the number of DNA copies/ml of *Gardnerella vaginalis* has the ability to discriminate patients with normal findings from intermediary and BV patients. The defined cut-off value was 2,980 copies/ml, with a sensitivity and specificity of 78.6% and 72%, respectively (Figure 1).

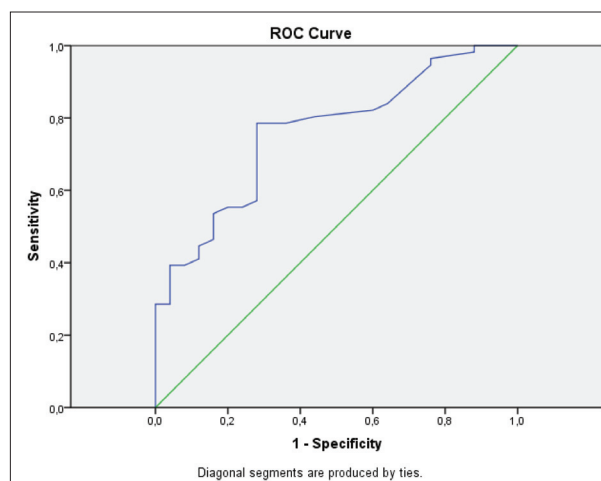


Figure 1. The number of DNA copies/ml was determined by the real-time qPCR method on the SaCycler-96 (Sacace Biotechnologies, Como, Italy); cut-off, sensitivity, and specificity were determined by ROC analysis and shown in the form of ROC curve

DISCUSSION

Bacterial vaginosis does not evolve from a commonly defined bacterial infection caused by one agent, but is a disorder of the vaginal microbiome. Therefore, the appropriate diagnosis of BV is demanding and the decision about the method of choice for its diagnosis requires a review of complexity, cost, and the constancy of samples difficult to interpret [18].

Nugent's criteria are the most widely used diagnostic tool for diagnosing BV, and are considered the gold standard, although their inter- and intraobserver accuracy have been questioned [19]. To avoid demanding and imprecise counting of bacterial morphotypes, qualitative microscopic examination was introduced by Ison and Hay [20] and Verhelst [21].

In daily practice, despite the numerous methods available, clinicians still have difficulties to decide which patient should be treated. This issue becomes further complicated with discrepancies in categorizing intermediate findings. Intermediate flora has been shown to consist of bacteria associated with BV, such as *Gardnerella vaginalis* and anaerobes, as well as lactobacilli, usually associated with normal flora, which is the main reason why this is considered a transitory condition between normal and BV, not yielding all clinical criteria of bacterial vaginosis [20, 22].

In this regard, over the last few years, several studies have been performed aiming to analyze microbial composition of vaginal discharge and quantity of bacteria associated with BV in microscopically categorized samples

using PCR and real-time qPCR [23, 24, 25]. It has been found that the most common bacteria detected in BV was *Gardnerella vaginalis*, but as being insufficiently specific, additional studies suggested *Atopobium vaginae* as the BV marker and an even greater risk factor for preterm delivery than *Gardnerella vaginalis* [26].

For this reason, we performed molecular analysis of vaginal discharge samples of pregnant women targeting these two bacteria. According to the results of our study, *Gardnerella vaginalis* was detected in intermediary patients as well as in patients with normal microscopy findings, which was in accordance with study conducted by Cox et al. [27]. The results of our study have also shown that quantity of *Gardnerella vaginalis* significantly differed between all the groups, representing that *Gardnerella* may be a better marker for BV than *Atopobium*, as well as a better marker in differentiating the intermediary from the normal group of patients. This was not in accordance with the study performed by Bradshaw et al. [28], where *A. vaginae* was found to be more specific for BV. This discrepancy may be explained by the differences between epidemiological characteristics, geographical origin, ethnic affiliation, or PCR assay.

Similarly, *Atopobium vaginae* was also present in healthy patients, but in intermediary and BV patients it was found with frequency almost three times higher. In addition, the quantity of both bacteria was the highest in BV samples. A similar study found that prevalence of *Atopobium vaginae* differed between the normal and the BV group, but not between the normal and the intermediary group [10]. The same group of investigators in additional research performed both molecular detection and quantification of *Gardnerella* and *Atopobium*. They suggested that in addition to the detection of these microbes, quantification is very important in determining patients for treatment since the highest quantities of both bacteria were present in recurrent BV [17]. These data propose that BV is rather related to the disturbance of bacteria ratios as well as to a rise in quantity of the aforementioned anaerobic bacteria. Bretelle et al. [26] suggested that *Atopobium vaginae* is highly important in the reclassification of intermediary

patients. Namely, in their study, analysis of *Atopobium vaginae* helped them to reclassify 57% of intermediary cases as BV [23]. Furthermore, they proved that high concentrations of both *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* were associated with preterm labor, and they documented the coexistence of both bacteria (78–96% of BV samples), while this association was detected in 5–10% of normal findings [10, 17]. We also observed that coexistence of *Gardnerella* and *Atopobium* was more prevalent in intermediary and BV patients than in patients with normal results. The prevalence of coexistence was almost equal in both the intermediary group and the BV group, which coincides with the observations of Menard et al. [10], who even proposed that the intermediary patients should be considered closer to BV patients than to normal results.

CONCLUSION

In our investigation, we found that the prevalence of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* was the highest in patients with BV. In addition, we also observed that quantification of these bacteria may be more important than their detection only, especially in the interpretation of intermediary results.

Our study has certain limitations. Higher number of patients could provide more relevant results and stronger statistics in support of observed phenomena. Additionally, we did not analyze other microorganisms, inhabitants of vaginal microbiome, and their potential link to BV, which future investigations should include.

ACKNOWLEDGMENT

This study was partially supported by grant No. III41010 awarded by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia. qPCR reagents (Bacterial Vaginosis Real-TM Quant) were kindly provided by Sacace Biotechnologies, Como, Italy.

REFERENCES

- Larsson PG, Forsum U. Bacterial vaginosis – a disturbed bacterial flora and treatment enigma. *APMIS*. 2005; 113(5):305–16.
- Kenyon C, Colebunders R, Crucitti T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*. 2013; 209(6):505–23.
- Ahmed RA, Elhag WI, Abdelhalim KA. Characterization and identification of microorganisms associated with vaginal infections in pregnant women attending the Ribat University Hospital, Sudan. *American Journal of Research Communication*. 2014; 2(10):301–9.
- Gergova RT, Strateva TV, Mitov IG. *Gardnerella vaginalis*-associated bacterial vaginosis in Bulgarian women. *Braz J Infect Dis*. 2013; 17(3):313–8.
- Ling Z, Kong J, Liu F, Zhu H, Chen X, Wang Y, et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics*. 2010; 11:488.
- Turovskiy Y, Noll SK, Chikindas ML. The aetiology of bacterial vaginosis. *J Appl Microbiol*. 2011; 110(5):1105–28.
- Datcu R, Gesink D, Mulvad G, Montgomery-Andersen R, Rink E, Koch A, et al. Vaginal microbiome in women from Greenland assessed by microscopy and quantitative PCR. *BMC Infect Dis*. 2013; 13:480.
- Stemmet M. Prevalence and characterization of *Gardnerella vaginalis* in pregnant mothers with a history of preterm delivery [Magister Scientiae Thesis]. University of the Western Cape; 2012. Available from: http://etd.uwc.ac.za/bitstream/handle/11394/2979/Stemmet_MSC_2012.pdf?sequence=1
- Aroutcheva AA, Simoes JA, Behbakht K, Faro S. *Gardnerella vaginalis* isolated from patients with bacterial vaginosis and from patients with healthy vaginal ecosystems. *Clin Infect Dis*. 2001; 33(7):1022–7.
- Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D. Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis*. 2008; 47(1):33–43.
- Hardy L, Jespers V, Dahchour N, Mwambarangwe L, Musengamana V, Vaneechoutte M, et al. Unraveling the bacterial vaginosis-associated biofilm: a multiplex *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* fluorescence *In situ* hybridization assay using peptide nucleic acid probes. *PLoS ONE*. 2015; 10(8):e0136658.

12. Koumans EH, Kendrick JS. Preventing adverse sequelae of bacterial vaginosis a public health program and research agenda. *Sex Transm Dis.* 2001; 28(5):292–7.
13. Nenadić DB, Pavlović MD, Motrenko T. A novel microscopic method for analyzing Gram-stained vaginal smears in the diagnosis of disorders of vaginal microflora. *Vojnosanit Pregl.* 2015; 72(8):670–6.
14. Srinivasan U, Ponnaluri S, Villareal L, Gillespie B, Wen A, Miles A, et al. Gram Stains: a resource for retrospective analysis of bacterial pathogens in clinical studies. *PLoS One.* 2012; 7(10):e42898.
15. Goldenberg RL, Hauth JC, Andrews WW. Intrauterine infection and preterm delivery. *N Engl J Med.* 2000; 342(20):1500–7.
16. Slattery MM, Morrison JJ. Preterm delivery. *Lancet.* 2002; 360(9344):1489–97.
17. Menard JP, Mazouni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, et al. High vaginal concentrations of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in women undergoing preterm labor. *Obstet Gynecol.* 2010; 115(1):134–40.
18. Modak T, Arora P, Agnes C, Ray R, Goswami S, Ghosh P, et al. Diagnosis of bacterial vaginosis in cases of abnormal vaginal discharge: comparison of clinical and microbiological criteria. *J Infect Dev Ctries.* 2011; 5(5):353–60.
19. Forsum U, Jakobsson T, Larsson PG, Schmidt H, Beverly A, Bjornerem A, et al. An international study of the interobserver variation between interpretations of vaginal smear criteria of bacterial vaginosis. *APMIS.* 2002; 110(11):811–8.
20. 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.
21. Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Van Simaey L, De Ganck C, et al. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. *BMC Microbiol.* 2005; 5:61.
22. Forsum U, Larsson PG, Spiegel C. Scoring vaginal fluid smears for diagnosis of bacterial vaginosis: need for quality specifications. *APMIS.* 2008; 116(2):156–9.
23. Bretelle F, Rozenberg P, Pascal A, Favre R, Bohec C, Loundou A, et al. High *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* loads are associated with preterm birth. *Clin Infect Dis.* 2015; 60(6):860–7.
24. Menard JP, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Bretelle F. Self-collected vaginal swabs for the quantitative real-time polymerase chain reaction assay of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* and the diagnosis of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012; 31(4):513–8.
25. Ling Z, Liu X, Luo Y, Wu X, Yuan L, Tong X, et al. Associations between vaginal pathogenic community and bacterial vaginosis in Chinese reproductive-age women. *PLoS One.* 2013; 8(10):e76589.
26. Bretelle F, Fenollar F, Baumstarck K, Fortanier C, Cocallemen JF, Serazin V, et al. Screen-and-treat program by point-of-care of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in preventing preterm birth (AuTop trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2015; 16:470. Erratum in: *Trials.* 2016; 17:83.
27. Cox C, McKenna JP, Watt AP, Coyle PV. New assay for *Gardnerella vaginalis* loads correlates with Nugent scores and has potential in the diagnosis of bacterial vaginosis. *J Med Microbiol.* 2015; 64(9):978–84.
28. Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E, Garland SM. The Association of *Atopobium vaginae* with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. *J Infect Dis.* 2006; 194:828–36.

Молекуларна дијагноза бактеријске вагинозе – заступљеност *Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae* код трудница

Снежана Матић¹, Дане Ненадић², Јелена Чукић³, Жељко Мијаиловић^{4,5}, Невена Манојловић⁶, Предраг Саздановић⁷, Милош Павловић⁸, Дејан Баскић^{3,9}, Александар Живановић⁷

¹Клинички центар Крагујевац, Одсек за микробиологију, Крагујевац, Србија;

²Војномедицинска академија, Одсек за гинекологију, Београд, Србија;

³Институт за јавно здравље, Одсек за микробиологију, Лабораторија за вирусологију и имунологију, Крагујевац, Србија;

⁴Клинички центар Крагујевац, Клиника за инфективне болести, Крагујевац, Србија;

⁵Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, Катедра за инфективне болести, Крагујевац, Србија;

⁶Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, докторске академске студије, Крагујевац, Србија;

⁷Клинички центар Крагујевац, Одсек за гинекологију и акушерство, Крагујевац, Србија;

⁸*Infinity Family Medicine Clinic*, Дубаи, УАЕ

⁹Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, Центар за молекуларну медицину и истраживање стем ћелија, Крагујевац, Србија

САЖЕТАК

Увод/Циљ Бактеријска вагиноза (БВ) стање је удружено са поремећајем односа лактобацила и анаеробних бактерија у вагини у корист анаероба. Тешкоће у тумачењу микроскопски класификованих налаза у дијагностици БВ захтевају молекуларну анализу бактерија присутних у вагиналном секрету. Циљ овог рада је био да *real-time qPCR* анализом узорака вагиналног секрета испитамо у ком обиму су заступљеност и количина анаероба (*Gardnerella vaginalis* и *Atopobium vaginae*) у вези са микроскопским налазима.

Метод У студију је укључено 111 асимптоматских трудница старости трудноће 24–28 недеља. Грам-препарати вагиналних размаза су категорисани микроскопски, а после тога је са грам-препарата изолована ДНК и изведена реакција идентификације и квантификације (*real-time qPCR*) *G. vaginalis* и *A. vaginae*.

Резултати Резултати наше студије су показали да је 53,2% трудница имало нормалан резултат, док је 20,7% и 26,1% имало интермедијеран (ИМ) и БВ резултат. *G. vaginalis* и *A. vaginae* су били чешће присутни у ИМ и БВ групи него код здравих пацијенткиња, а и просечан број *G. vaginalis* и *A. vaginae* је био значајно виши у БВ и ИМ групама него у групи са нормалним налазом ($p = 0,000$). Поредећи међусобан однос *G. vaginalis* и *A. vaginae*, заступљеност и број *G. vaginalis* је у свим групама био значајно виши од заступљености и броја *A. vaginae*.

Закључак Резултати наше студије су показали да би за разликовање нормалних од БВ налаза квантификација бактерија могла бити значајнија од саме молекуларне детекције.

Кључне речи: бактеријска вагиноза; *real-time qPCR*; *Gardnerella*; *Atopobium*

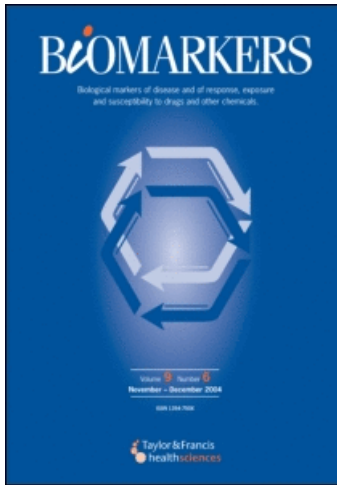
This article was downloaded by: [University at Buffalo (SUNY)]

On: 16 October 2008

Access details: Access Details: [subscription number 784375717]

Publisher Informa Healthcare

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Biomarkers

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title-content=t713693137>

Clinical evaluation of the simultaneous determination of CA 15-3, CA 125 and sHER2 in breast cancer

Dejan Baski ^a; Petar Risti ^a; Snežana Mati ^a; Dragi Bankovi ^b; Suzana Popovi ^a; Nebojša Arsenijevi ^a

^a Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty, Serbia ^b Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Kragujevac, Serbia

First Published on: 12 July 2007

To cite this Article Baski, Dejan, Risti, Petar, Mati, Snežana, Bankovi, Dragi, Popovi, Suzana and Arsenijevi, Nebojša(2007)'Clinical evaluation of the simultaneous determination of CA 15-3, CA 125 and sHER2 in breast cancer',Biomarkers,12:6,657 — 667

To link to this Article: DOI: 10.1080/13547500701520563

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/13547500701520563>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Clinical evaluation of the simultaneous determination of CA 15-3, CA 125 and sHER2 in breast cancer

DEJAN BASKIĆ¹, PETAR RISTIĆ¹, SNEŽANA MATIĆ¹,
DRAGIĆ BANKOVIĆ², SUZANA POPOVIĆ¹, &
NEBOJŠA ARSENIJEVIĆ¹

¹*Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty and* ²*Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Kragujevac, Serbia*

Abstract

Objective We investigated serum levels of CA 15-3, sHER2 and CA 125, and their usefulness in the detection of metastatic disease in breast cancer patients.

Methods The levels of CA 15-3, sHER2 and CA 125 tumour markers were determined in 60 patients, 40 with localized and 20 with metastatic breast carcinoma. The control group consisted of 10 healthy women.

Results We found that, at the time of diagnosis, serum levels of all three tumour markers were elevated in patients with distant metastases, but of minute importance in the detection of any breast cancer. When the data for the individual markers were combined the overall sensitivity of metastases detection with all three markers improved. In this regard, 90% of patients with distant metastases had an increase in serum level of at least one of tested tumour markers. Similar results were obtained using receiver operating characteristic curve (ROC). Moreover, using ROC we defined cut-off values for metastasis detection for each of the tested markers.

Conclusion Our findings indicate that measurement of CA 15-3 serum values in conjunction with sHER2 and CA 15-3 can increase sensitivity in metastasis detection.

Keywords: *Breast cancer, CA 15-3, sHER2, CA 125, serum levels*

(Received 28 November 2006; accepted 19 June 2007)

Introduction

One of the major aims in cancer research has been to develop biochemical tests for aiding screening and early diagnosis, assessing prognosis, predicting response to therapy and monitoring patients. All of these tasks, as well as treatment decisions for individual breast cancer patients were frequently (virtually obligatorily) based on traditional pathological parameters or other tissue-based assays. However, all of these methods require tumour tissue and thus invasive procedures. Consequently, the possibility of using the circulating markers as a way to predict patients' outcomes is more desirable.

To date, no tumour marker has demonstrated significant benefits in randomized controlled trials of screening and early diagnosis in the general population.

Correspondence: Dejan Baskić, School of Medicine, University of Kragujevac, S. Markovica 69, 34000 Kragujevac, Serbia and Montenegro. Tel: + 381 34 331344. Fax: + 381 34 331345. E-mail: dejan.baskic@gmail.com

Nevertheless, tumour markers can play a crucial role in diagnosing and monitoring of metastatic disease or assessing response to therapy in selected groups of patients.

As for the many cancer markers in routine use, no consensus exists regarding the reference cut-off for markers extensively used in monitoring of breast cancer. The difficulties in establishing the reference tumour marker values originate from appliance of different detection methodologies and different assays in the frame of one methodology. Thus, numerous studies have been performed in order of method and assay standardization (Henry & Hayes 2006). In one of the few studies describing the performance of tumour markers in external quality schemes, Pilo et al. (1995) reported the average between-laboratory and between-kit coefficient of variation for CA 15-3, CA 125 and CA 19-9. On the basis of these results we concluded that the reliability of current CA 15-3 and CA 125 assays was satisfactory. In other studies, the most reliable values of tumour markers were taken for CA 15-3, CA 125 and sHER-2, to be 20–40 U ml⁻¹, <35 IU ml⁻¹ and 6.5–10.2 ng ml⁻¹, respectively, which are similar to the reference values used in our study (Sugano et al. 2000, Canizares et al. 2001, Kong et al. 2006, Tampellini et al. 2006).

It seems that the origin of these differences for CA 15-3, sHER-2 and CA 125 is not due to ethnicity or variation across different population groups (Weiss et al. 1995, Doroudchi et al. 2005, Nichols et al. 2005). On the contrary, the structure of these markers is well defined and it is known that genetic variation does not exist in human populations for any of them (Sommer et al. 1992, Duffy 1999).

The assay for CA 15-3 is currently the most widely used tumour marker in routine monitoring of breast cancer patients. Many years of investigation confirmed its central role in monitoring patients with breast carcinoma; thus, it became the 'gold standard' for other tumour markers. The CA 15-3 molecule is a mucin, a product of the *MUC1* gene (Gendler & Spicer 1995). While the physiological function of the MUC1 protein is unknown, some evidence supports the important role that MUC1 may play in the adhesion of epithelial cells; MUC1 appears to reduce both cell–cell and cell–extracellular matrix interactions (Wesseling et al. 1996). However, there is a little value in it for the detection of early disease (Safi et al. 1991). CA 15-3 concentration at initial presentation can provide useful prognostic information in patients with apparently localized disease (Shering et al. 1998). High values of CA 15-3 are indicative of the possibility of metastases (Geraghty et al. 1992). Moreover, serial determination of CA 15-3 has the potential to detect both, preclinical recurrences and to monitor the treatment of metastatic breast cancer (Anonymous 1996).

CA 125 is a glycoprotein expressed in normal tissues originally derived from coelomic epithelia such as peritoneum or pleura. However, it is now believed that derivatives of all three layers of embryonic development may harbour the antigen (Hardardottir et al. 1990). Elevated CA 125 values are most often associated with epithelial ovarian cancer (Meyer & Rustin 2000), although CA 125 levels can also be elevated in other tumours and non-malignant disease (Buamah 2000). Although CA 125 production has been demonstrated in the healthy breast, the significance of CA 125 elevation in breast cancer is uncertain. It has been reported that higher serum levels of CA 125 are associated with increasing bulk of disease and worse prognosis mainly related to metastasis development (Norum et al. 2001).

HER2 (from Human Epidermal growth factor Receptor) is a component of a four-member family of closely related growth factor receptors, including HER1, HER2,

HER3 and HER4 (Maguire & Greene 1989). This molecule is regularly expressed on normal cells and overexpressed on malignant cells. The overexpression of this molecule has been observed in 20–30% of breast carcinoma cases and associated with poor clinical outcome (Slamon et al. 1989). The full-length HER2 protein undergoes proteolytic cleavage by metalloproteases (Codony-Servat et al. 1999), and its extracellular domain is shed into the blood as a circulating antigen (Pupa et al. 1993). The currently published literature suggests that the circulating HER2 antigen concentration lacks sensitivity for the detection of early disease (Carney et al. 2003, Kong et al. 2006). However, it has been shown that increasing concentration correlates with extensive tumour burden, which, in turn, correlates with progressive disease and worse prognosis (Jensen et al. 2003, Pichon et al. 2004).

In the present study, we investigated serum CA 15-3, CA 125 and sHER2 concentration and evaluated the usefulness of their combined determination in metastasis detection in breast carcinoma patients.

Patients and methods

Patients

Tumour markers were studied prospectively in 60 consecutive patients admitted to the Surgical Clinic at the Kragujevac University Hospital, 40 with localized and 20 with metastatic breast cancer. Patients with localized tumours were included in the study before surgical treatment, whereas the group with metastatic carcinoma was enrolled in the investigation after the final decision about the type of treatment, but before any treatment. In this way, any possible therapy effects (operative, chemo or hormonal), which could influence the results of the study were avoided. Patients with positive biohumoral markers of inflammation, as well as patients with clinical or biochemical evidence of co-existing chronic diseases such as endocrine and autoimmune diseases were excluded from the study. All cases with localized disease were histologically confirmed with breast cancer TNM (tumor-node-metastasis) staging of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) and the International Union Against Cancer (UICC) (Sobin & Wittekind 1997). The control group consisted of 10 healthy women chosen from the general population. A control group was matched with the cancer group on the basis of age (within 5 years), sex and menopausal status.

Methods

Blood samples were obtained from 70 different Serbian women, 60 of whom were hospitalized at the Kragujevac University Hospital. The same serum samples were used to quantitate the serum levels of CA 15-3, CA 125 and sHER2. Tested markers were determined by commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Breast Cancer Antigen CA 15-3 Enzyme Immunoassay Test Kit and Antigen CA 125 Enzyme Immunoassay Test Kit, DRG International, Inc., USA; Human sp185^{HER-2} ELISA, Bender MedSystems, Vienna, Austria). Cut-off values were suggested by the manufacturer: 36 U ml⁻¹ for CA 15-3, 36 IU ml⁻¹ for CA 125 and 6.4 ng ml⁻¹ for sHER2.

Statistical analysis

The data were evaluated using the SPSS commercial program package (version 10.0 SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The normal data distribution was evaluated by the Kolmogorov–Smirnov test. The non-parametric data of two or more groups were compared with the Mann–Whitney's *U*-test and the Kruskal–Wallis test. Receiver operating characteristic (ROC) curves were constructed for the individual tumour markers and the differences in the area under the curve (AUC) values were determined.

Results

Table I shows tumour marker results subdivided according to the disease extent. At the time of diagnosis, the serum levels of CA 15-3 and CA 125 were significantly higher in patients with metastatic breast cancer than either in the patients with localized disease (regardless of nodal involvement) or in the control group (CA 15-3: $p < 0.001$; CA 125: $p = 0.01$). No significant difference could be found in serum levels of sHER2 ($p > 0.05$). Although CA 15-3 serum values showed some gradual increase depending on the disease stage, there were no statistically significant differences between lymph node-negative and lymph node-positive breast cancer ($p = 0.1$) (Table I).

The proportions of elevated marker levels are shown in Table II. Ten patients (25.0%) with localized and 12 patients (60%) with metastatic breast cancer had CA 15-3 values above the recommended cut-off value of 36 U ml⁻¹. A similar proportion of patients, nine in the localized group (22.5%) and 11 in the metastatic group (55%), showed elevation of the sHER2 levels higher than the suggested cut-off of 6.4 ng ml⁻¹. Of the 40 patients with localized breast cancer, only two (5%) had increased serum CA 125 levels, whereas nine of 20 (45.0%) of metastatic patients had CA 125 values greater than cut-off at 36 IU ml⁻¹. Distributions of individual data for all three tumour markers are shown in Figure 1. All together, at the time of diagnosis, 15 patients (37.5%) with localized and 18 (90%) with metastatic tumours had elevated levels of either one, or several, tumour markers. Table III shows tumour marker sensitivity and specificity determined according to cut-off values suggested by manufacturer (36 U ml⁻¹ for CA 15-3, 6.4 ng ml⁻¹ for sHER2 and 36 IU ml⁻¹ for CA 125). The sensitivity of CA 15-3, sHER2 and CA 125 was very low in the detection of localized tumour. However, combined use of all markers showed that

Table I. Stratifying CA 15-3, CA 125 and sHER2 serum levels to different stages of disease. CA 15-3, CA 125 and sHER2 were determined in the serum samples from 40 patients with localized (26 lymph node negative, 14 lymph node positive) and 20 patients with metastatic breast cancer. Data are presented as median value (range) for each group.

	<i>n</i>	CA 15-3 (U ml ⁻¹)	CA 125 (IU ml ⁻¹)	sHER2 (ng ml ⁻¹)
Control	10	22.5 (15.4–31.1)	8.3 (3.4–24.2)	5.9 (4.8–8.0)
Localized nodus	26	21.1 (9.1–94.0)	8.2 (1.3–79.5)	5.8 (3.3–16.6)
Localized nodus	14	29.7 (6.0–69.0)	8.9 (4.6–73.9)	4.8 (3.7–33.0)
Metastatic	20	70.9 (16.3–240.0)*	31.1 (3.0–400.0)*	12.1 (3.8–28.9)

*Significant difference between metastatic and other groups (Kruskal-Wallis $p < 0.05$).

Table II. The proportions of serum CA 15-3, sHER2 and CA 125 levels elevated above the recommended cut-offs (36 U ml^{-1} , 6.4 ng ml^{-1} and 36 IU ml^{-1} , respectively) in 60 breast cancer patients. Values are shown as elevated/total (%).

	Control	Localized	Metastasis
CA 15-3	0/10 (0)	10/40 (25.0)	12/20 (60.0)
sHER2	1/10 (10)	9/40 (22.5)	11/20 (55.0)
CA 125	0/10 (0)	2/40 (5.0)	9/20 (45.0)
Any	1/10 (10)	15/40 (37.5)	18/20 (90.0)

elevation of any tumour marker increased sensitivity to 0.40 (Table III). In the group with metastatic disease all markers showed a higher sensitivity than in localized group, especially CA 15-3 whose sensitivity was the highest (0.60 with a specificity of 1.00). When combination of all markers was used, elevation of any tumour marker was indicative of metastases in 90% of patients with increased sensitivity of 0.90 and specificity of 0.90 (Table III). In addition, we showed that combined use of all markers increased sensitivity in differentiating between local and metastatic disease, as well as, between any and no disease (Table III).

Similar results were obtained when the data were compared with the receiver operating characteristic curve (ROC) (Figure 2). Of the individual markers, CA 15-3 had the largest AUC (AUC 0.85; $p < 0.0001$) for metastasis detection. Moreover, using ROC we defined cut-off values for metastasis detection. The cut-off point for the CA 15-3 tumour marker was 30 U ml^{-1} , with a sensitivity and specificity of 0.88 and 0.71, respectively; for CA 125 the cut-off was 18 U ml^{-1} with a sensitivity of 0.65 and a specificity of 0.89, respectively; for sHER2 the cut-off was 17 ng ml^{-1} with a sensitivity and specificity of 0.41 and 0.96, respectively. When cut-offs obtained using ROC were used for metastasis detection overall sensitivity with all three markers further improved to 0.95.

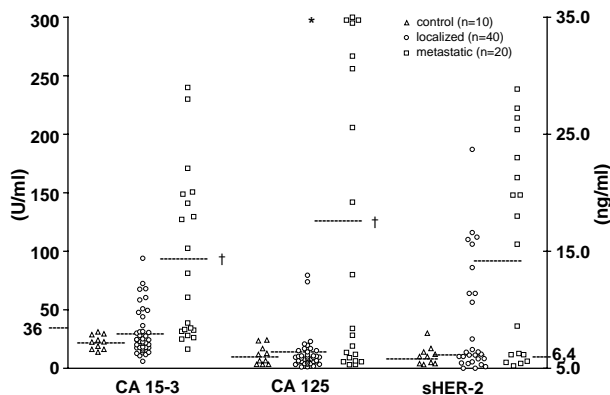


Figure 1. Concentration of CA 15-3, CA 125 and sHER2 serum levels in patients with localized and metastatic breast cancer. Data are presented as individual values. Each dot represents the data from a given individual and the horizontal bars represent the overall mean values for all individuals evaluated. Primary x-axis at 36 U ml^{-1} corresponds to recommended cut-off levels (according to manufacturer's manual) for CA 15-3 and CA 125. Secondary x-axis at 6.4 ng ml^{-1} corresponds to sHER2 cut-off level recommended by the manufacturer. †Statistical analysis using Kruskal-Wallis ANOVA showed a significant difference between groups (CA 15-3, $p = 0.0002$; CA 125, $p = 0.0116$). *Values above 300 IU ml^{-1} .

Table III. Tumour marker sensitivity and specificity.

	CA 15-3	CA 125	HER2	Any
Healthy vs localized				
Sen	0.25	0.05	0.23	0.40
Spec	1.00	1.00	0.90	0.90
PPV	1.00	1.00	0.90	0.94
NPV	0.25	0.21	0.23	0.27
Healthy vs metastatic				
Sen	0.60	0.45	0.55	0.90
Spec	1.00	1.00	0.90	0.90
PPV	1.00	1.00	0.92	0.95
NPV	0.56	0.48	0.50	0.82
Localized vs metastatic				
Sen	0.60	0.45	0.55	0.90
Spec	0.75	0.95	0.78	0.60
PPV	0.54	0.82	0.55	0.53
NPV	0.79	0.77	0.78	0.92
Any disease vs no disease				
Sen	0.37	0.18	0.33	0.57
Spec	1.00	1.00	0.90	0.90
PPV	1.00	1.00	0.95	0.97
NPV	0.21	0.17	0.18	0.26

Sen, sensitivity; Spec, specificity; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

Discussion

Serum tumour markers are circulating tumour-associated indicators of a tumour's biological and 'structural' behaviour. Measurement of serum tumour markers appears to reflect the total tumour burden in the body and represents the summation of numerous sub-clinical metastases. As such they are not suitable for screening and early diagnosis of primary breast cancer since the tumour burden is small in these circumstances. However, they are valuable as adjuncts for the medical follow-up care of breast cancer patients, where alterations of their serum level may anticipate tumour behaviour and provide valuable prognostic and predictive information.

In order to establish a normal, adult reference interval for analyte using a particular assay, one must calculate the mean plus or minus two standard deviations (95% confidence interval) of the assay results from a population set of adults known to be in good health. Subsequently, any patient's result, which falls within this interval, is considered to be 'normal', or healthy. However, results which fall outside (above or below) the limits of this interval are considered to be either abnormally elevated or decreased, respectively. A low result for tumour markers would not be of clinical significance. Therefore, one establishes the cut-off between normal (presumed negative for disease) and abnormal (presumed positive for disease) results by using the mean plus two standard deviations. The cut-off values for tumour markers used in our study were taken from the manufacturer's description of the assay.

CA 15-3 and, to a lesser extent carcinoembryonic antigen (CEA), are the most commonly used serum tumour markers in breast cancer. However, as a marker for breast cancer, CEA is a non-specific and it lacks sensitivity for the detection of early disease. On the contrary, CA 15-3 represents the 'gold standard' for the circulating

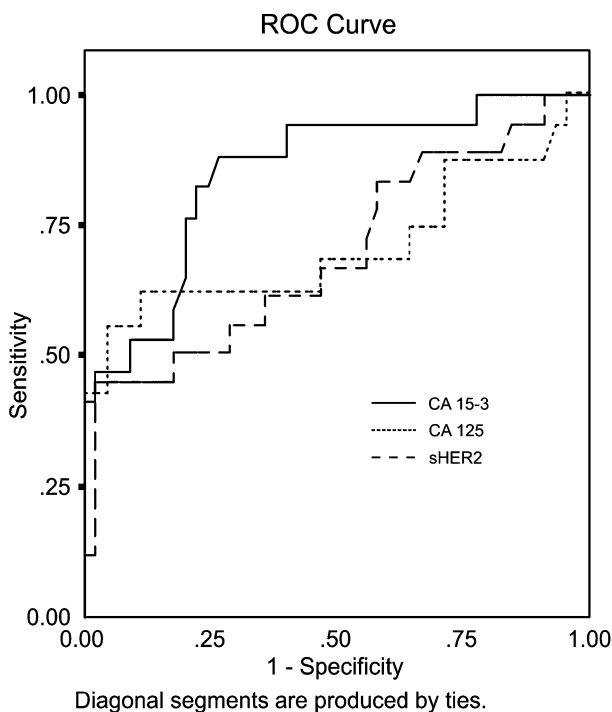


Figure 2. Comparison of serum CA 15-3, CA 125 and sHER2 with ROC curve analysis. The serum samples from 20 patients with metastatic breast cancer were used. ROC curves for each tumour marker in serum: solid line = CA 15-3; dotted line = CA 125; discontinuous line = sHER2. AUC (95% confidence interval): CA 15-3 = 0.85 (cut-off 30 U ml^{-1} , $p = 0.000$); sHER2 = 0.69 (cut-off 17 ng ml^{-1} , $p = 0.017$); CA 125 = 0.73 (cut-off 18 U ml^{-1} , $p = 0.006$). The difference in the AUC value of CA 15-3 compared with the AUC of the other markers was highly significant ($p = 0.000$).

markers in breast cancer, Moreover, new biochemical tests for this disease should be judged against this marker.

In several studies, CA 15-3 levels were compared between different population groups. One study found that concentrations of CA 15-3 were similar in both healthy men and women (Hayes et al. 1986). Further, Bon et al. (1997) found that CA 15-3 level was significantly higher in healthy postmenopausal women than in healthy premenopausal women. Patients with benign liver disease had higher CA 15-3 level than those with benign tumour of the breast (Hayes et al. 1986). There was no evidence about ethnic differences in concentrations of this marker (Weiss et al. 1995, Doroudchi et al. 2005, Nichols et al. 2005). CA 15-3 is not an organ-specific marker and therefore it is of a little value in identifying unknown primary cancer (Hayes et al. 1986).

Although CA 15-3 is of a little value in the early diagnosis of breast cancer, its pretreatment level is a recognized prognostic factor. An initially high level of CA 15-3 is more often observed in patients with advanced cancer than in those with localized cancer, where the concentration is correlated with the disease stage and therefore high levels indicate a worse outcome (Duffy et al. 1996, Shering et al. 1998). CA 15-3 levels that are initially high and remain high, despite applied treatment, indicate a failure to respond to the treatment and a very poor prognosis. Summarizing the data

from 11 studies, the authors concluded that measurement of CA 15-3 levels during treatment follow-up in patients with metastatic disease is useful in the evaluation of the treatment response (Anonymous 1996). The sensitivity of CA 15-3 in the diagnosis of local recurrence is poor, but it is clearly useful in the early diagnosis of breast cancer metastases (Anonymous 1996).

Similarly to current literature data we found that CA 15-3 is of little importance in the diagnosis of primary breast cancer, but is very useful in the diagnosis of metastatic disease. Although its serum values showed a gradual increase in patients with lymph node-positive breast cancer, its efficacy in the diagnosis of local metastasis is poor.

Regarding soluble HER2, numerous reports have shown that the prevalence of an increased sHER2 concentration is highly variable in breast cancer. A review of 24 references used to evaluate sHER2 concentration in primary breast cancer showed that only 18.5% (out of a total of 1923 patients) had circulating sHER2 above the control cut-off values described for each publication. In contrast, a review of 45 references and 4622 patients with metastatic breast cancer showed that 43% of patients had sHER2 levels above the cut-off for the control group in each study (Molina et al. 1996).

In several retrospective studies that included a significant number of patients, serum HER2 levels have demonstrated prognostic significance with respect to disease-free and overall survival. Furthermore, longitudinal changes in serum HER2 concentrations paralleled the clinical course of a patient's disease (Molina et al. 1996, Schippinger et al. 2004). Moreover, there are strong data showing an increased serum HER2 concentration as a predictor of poor response to therapy using chemotherapeutic (Harris et al. 2001) and hormonal treatment regimes (Lipton et al. 2005).

Our findings are, to a great extent, related to data in the literature. We found that 22.5% of primary breast cancer patients have soluble HER2 above the cut-off value. In contrast, 55.0% of metastatic breast cancer patients showed soluble HER2 above the cut-off recommended by the manufacturer.

The CA 125 tumour marker is commonly seen in ovarian carcinoma (Meyer & Rustin 2000). Elevation of this marker has also been observed in several advanced carcinomas of different origins (Buamah 2000, Norum et al. 2001). Unlike other established breast cancer markers such as CEA, CA 15-3 or sHER2, data related to CA 125, as a marker in breast cancer, is limited. In line with that, the cause and significance of its elevation in some metastatic breast cancer have been poorly defined. In reviewing reports evaluating CA 125 in primary breast cancer, Leonard et al. found very low detection rates, from 1% to 27%, and only one of eight studies reported CA 125 levels according to disease stage (Omar et al. 1989). In metastatic breast cancer, higher, but very variable, rates of detection are documented (18–84%). Similarly, we showed that the serum level of CA 125 was above recommended cut-off in a high proportion (45.0%) of metastatic patients, whereas only 5% of patients with localized disease had increased CA 125 values. The heterogeneity of serum CA 125 levels may be explained by the location of metastases, since high CA 125 is more common in visceral disease than in bone or soft tissue involvement (Berruti et al. 1994). In one study, authors found that 91% of cases with elevated CA 125 were due to pleural-based disease. However, only about 30% of them had direct involvement of the pleura, while other patients had lung or bone involvement adjacent to the pleura (Norum et al. 2001). In our study, we demonstrated several cases of elevated CA 125 in the

settings of advanced local disease, which could be related to the underlying inflammatory breast cancer or sub-clinical visceral metastases.

Several studies have shown that measurement of CA 15-3 serum values in conjunction with other tumour markers can increase sensitivity and specificity in metastasis detection. In their report, Colomer et al. (2000) suggested that a panel of tumour tests such as CEA, CA 15-3 and sHER2 could be used postoperatively with increased sensitivity of detecting early recurrence. The increase in sensitivity observed by Molina et al. (1996) was also supported by studies by Watanabe et al. (1994) and Schwartz et al. (2000); however, Eskelinen et al. (1997) reported only limited value in measuring serum CEA, CA 15-3 and sHER2 in conjunction with other cancer tests.

Our results showed that overall sensitivity of tumour detection with all three markers combined improved from 40% for localized to 90% for metastatic tumours. In addition, statistical analysis of our data showed that combined measurement of CA 15-3 and sHER2 was nearly as valuable as a combination of all three markers in discriminating not only between local and metastatic disease, but also between any and no disease (data not shown). Given that the sensitivity of each test alone is fairly low, these would be inadequate to use for screening in the general population or among persons already diagnosed with breast cancer. Therefore, as our study has shown that combined use of tested tumour markers was better than single marker detection, we recommended measurement of CA 15-3 serum values in conjunction with other tumour markers.

Finally, we have also demonstrated an interesting observation regarding the potential use of the combined measurement of serum tumour markers as a tool for detecting the development of metastatic disease. When cut-offs obtained using ROC were used for metastasis detection overall sensitivity with all three markers further improved to 0.95.

Although the significance of detecting tumour markers in the monitoring of primary disease after surgery, or the diagnosis and monitoring of metastatic disease is unequivocal, early detection of metastatic disease has not been always successful, and does not benefit the patient in terms of overall survival or time until the appearance of clinical signs. The value of early detection of metastasis will increase with the introduction of a variety of targeted therapies that can attack the tumour when the tumour burden is smaller, and in this way may enhance the probability of successful treatment.

Acknowledgements

This work was supported by grant 1637 from the Ministry of Science, Technologies and Development, Republic of Serbia. The skilful technical assistance of Mr Milan Milojević is gratefully acknowledged. The authors also wish to thank Dr Ivan Jovanović for handling clinical specimens and Marina Stojanovic PhD for reviewing the manuscript.

References

- Anonymous. 1996. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer by the American Society of Clinical Oncology. *Journal of Clinical Oncology* 14:2843–2877.
- Berruti A, Tampellini M, Torta M, Buniva T, Gorzegno G, Dogliotti L. 1994. Prognostic value in predicting overall survival of two mucinous markers: CA 15-3 and CA 125 in breast cancer patients at first relapse of disease. *European Journal of Cancer* 30:2082–2084.

- Bon GS, von Mensdorff-Pouilly S, Kenemans P, van Kamp GJ, Verstraeten RA, Hilgers J. 1997. Clinical and technical evaluation of ACS BR serum assay of MUC1 gene-derived glycoprotein in breast cancer, and comparison with CA 15-3 assay. *Clinical Chemistry* 43:585-93.
- Buamah P. 2000. Benign conditions associated with raised serum CA 125 concentration. *Journal of Surgical Oncology* 75:264-265.
- Canizares F, Sola J, Perez M, Tovar I, De Las Heras M, Salinas J, et al. 2001. Preoperative values of CA 15-3 and CEA as prognostic factors in breast cancer: a multivariate analysis. *Tumor Biology* 22:273-81.
- Carney WP, Neumann R, Lipton A, Leitzel K, Ali S, Price CP. 2003. Potential clinical utility of serum HER-2/neu oncoprotein concentrations in patients with breast cancer. *Clinical Chemistry* 49:1579-1598.
- Codony-Servat J, Albanell J, Lopez-Talavera JC, Arribas J, Baselga J. 1999. Cleavage of the HER-2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Research* 59:1196-1201.
- Colomer R, Montero S, Lluch A, Ojeda B, Barnadas A, Casado A, et al. 2000. Circulating HER-2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clinical Cancer Research* 6:2356-2362.
- Doroudchi M, Talei A, Modjtahedi H, Dehaghani AS, Pezeshki AM, Thomas H, et al. 2005. Serum level of HER-2 extracellular domain in Iranian patients with breast cancer: a follow-up study. *Iranian Journal of Immunology* 2:191-199.
- Duffy MJ, Shering SG, Sherry F, McDermott E, O'Higgins N. 1996. CA 15-3, a circulating marker with strong prognostic value in breast cancer, new observation. In: Martin SM, Halloran SP, editors. *Proceedings of the XVI International Congress of Clinical Chemists*. London: Association of Clinical Biochemists. Abstract A407.
- Duffy MJ. 1999. CA 15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer. *Annals of Clinical Biochemistry* 36:579-586.
- Eskelinen M, Kataja V, Hamalainen E, Kosma VM, Penttila I, Alhava E. 1997. Serum tumor markers CEA, AFP, CA15-3, TPS and neu in diagnosis of breast cancer. *Anticancer Research* 17:231-234.
- Gendler SJ, Spicer AP. 1995. Epithelial mucin genes. *Annual Review of Physiology* 57:607-634.
- Geraghty J, Coveney EC, Sherry F, O'Higgins NJ, Duffy MJ. 1992. CA 15-3 in patients with locoregional and metastatic breast carcinoma. *Cancer* 70:2831-2834.
- Hardardottir H, Parmley TH 2nd, Quirk JG Jr, Sanders MM, Miller FC, O'Brien TJ. 1990. Distribution of CA 125 in embryonic tissues and adult derivatives of the fetal periderm. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 163:1925-1931.
- Harris LN, Liotcheva V, Broadwater G, Ramirez MJ, Maimonis P, Anderson S, et al. 2001. Comparison of methods of measuring HER-2 in metastatic breast cancer patients treated with high-dose chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 19:1698-1706.
- Hayes DF, Zurawski VR, Kufe D. 1986. Comparison of circulating CA 15-3 and carcinoembryonic antigen levels in patients with breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 4:1542-1550.
- Henry NL, Hayes DF. 2006. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring and treatment of primary and metastatic breast carcinoma. *Oncologist* 11:541-552.
- Jensen BV, Johansen JS, Price PA. 2003. High levels of serum HER-2/neu and YKL-40 independently reflect aggressiveness of metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research* 9:4423-4434.
- Kong S-Y, Kang JH, Kwon Y, Kang H-S, Chung K-W, Kang SH, et al. 2006. Serum HER-2 concentration in patients with primary breast cancer. *Journal of Clinical Pathology* 59:373-376.
- Leonard GD, Low JA, Berman AW, Swain SM. 2004. CA 125 elevation in breast cancer: a case report and review of the literature. *The Breast Journal* 10:146-149.
- Lipton A, Leitzel K, Ali SM, Demers L, Harvey HA, Chaudri-Ross HA, et al. 2005. Serum HER-2/neu conversion to positive at the time of disease progression in patients with breast carcinoma on hormone therapy. *Cancer* 104:257-263.
- Maguire HC, Greene MI. 1989. The neu (c-erbB-2) oncogene. *Seminars in Oncology* 16:148-155.
- Meyer T, Rustin GJS. 2000. Role of tumour markers in monitoring epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer* 82:1535-1538.
- Molina R, Jo J, Filella X, Zanon G, Pahisa J, Munoz M, et al. 1996. C-erbB-2 oncoprotein in the sera and tissue of patients with breast cancer. Utility in prognosis. *Anticancer Research* 16:2295-2300.
- Molina R, Jo J, Zanon G, Filella X, Farrus B, Munoz M, et al. 1996. Utility of c-erbB-2 in tissue and serum in the early diagnosis of recurrence in breast cancer patients: comparison with carcinoembryonic antigen and CA 15-3. *British Journal of Cancer* 74:1126-1131.

- Nichols HB, Trentham-Dietz A, Love RR, Hampton JM, Thi Hoang Anh P, Allred DC, et al. 2005. Differences in breast cancer risk factors by tumor marker subtypes among premenopausal Vietnamese and Chinese women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 14:41–47.
- Norum LF, Erikstein B, Nustad K. 2001. Elevated CA 125 in breast cancer – a sign of advanced disease. *Tumor Biology* 22:223–228.
- Omar YT, Behbehani AE, al-Naqeeb N, Motawy MM, Foudeh MO, Awwad AH, et al. 1989. Preoperative and longitudinal serum levels of CA 125 and CA 15.3 in patients with breast cancer. *International Journal of Biological Markers* 4:81–86.
- Pichon MF, Hacene K, Guepratte S, Neumann R. 2004. Serum HER-2 extracellular domain (ECD) before the first metastasis in 128 breast cancer patients. *Clinical Laboratory* 50:163–170.
- Pilo A, Zucchelli GC, Cohen R, Bizollon C, Capelli G, Cianetti A, et al. 1995. Comparison of immunoassay for tumor markers CA 19-9, CA 15-3 and CA 125: data from an international quality assessment scheme. *Tumori* 81:117–124.
- Pupa SM, Menard S, Morelli D, Pozzi B, De Palo G, Colnaghi MI. 1993. The extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage. *Oncogene* 8:2917–2923.
- Safi F, Kohler I, Rottinger E, Beger HG. 1991. The value of tumor marker CA 15-3 in diagnosis and monitoring breast cancer. *Cancer* 68:574–582.
- Schippinger W, Regitnig P, Bauernhofer T, Ploner F, Hofmann G, Krippel P, et al. 2004. The course of serum HER-2/neu levels as an independent prognostic factor for survival in metastatic breast cancer. *Oncology Reports* 11:1331–1336.
- Schwartz MK, Smith C, Schwartz DC, Dnistrian A, Neiman I. 2000. Monitoring therapy by serum HER-2/neu. *International Journal of Biological Markers* 15:324–329.
- Shering S, Sherry F, McDermott E, O'Higgins N, Duffy MJ. 1998. Preoperative CA 15-3 concentrations predict outcome in breast cancer. *Cancer* 83:2521–2527.
- Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707–712.
- Sobin LH, Wittekind CH. 1997. International Union Against Cancer (UICC). In: *TNM Classification of Malignant Tumours*, 5th edition. New York, NY: Wiley-Liss.
- Sommer SS, Cunningham J, McGovern RM, Saitoh S, Schroeder JJ, Wold LE, et al. 1992. Pattern of p53 gene mutations in breast cancers in women of the Midwestern United States. *Journal of National Cancer Investigations* 84:246–252.
- Sugano K, Ushiyama M, Fukutomi T, Tsuda H, Kitoh T, Ohkura H. 2000. Combined measurement of the c-erbB-2 protein in breast carcinoma tissues and sera is useful as a sensitive tumor marker for monitoring tumor relapse. *International Journal of Cancer* 89:329–336.
- Tampellini M, Berruty A, Bitossi R, Gorzegno G, Alabiso I, Bottini A, et al. 2006. Prognostic significance of changes in CA 15-3 serum level during chemotherapy in metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Research and Treatment* 98:241–248.
- Watanabe N, Miyamoto M, Tokuda Y, Kubota M, Ando Y, Tajima T, et al. 1994. Serum c-erbB-2 in breast cancer patients. *Acta Oncologica* 33:901–904.
- Weiss SE, Tartter P, Ahmed S, Brower S, Brusco C, Bossolt K, et al. 1995. Ethnic differences in risk and prognostic factors for breast cancer. *Cancer* 76:268–274.
- Wesseling J, van der Valk SW, Hilken J. 1996. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell/cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Molecular Biology of the Cell* 7:565–577.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Selective reporting of antibiotic susceptibility test results in European countries: an ESCMID cross-sectional survey

Céline Pulcini ^{a,b,*}, Gianpiero Tebano ^a, Nico T. Mutters ^c, Evelina Tacconelli ^{d,e},
Emmanuelle Cambau ^{f,g}, Gunnar Kahlmeter ^h, Vincent Jarlier ^{i,j} on behalf of the EUCIC-
ESGAP-EUCAST Selective Reporting Working Group ¹^a Université de Lorraine, EA 4360 APEMAC, Nancy, France^b Service de Maladies infectieuses et Tropicales, CHRU de Nancy, Nancy, France^c Department of Infectious Diseases, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany^d Division of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine I, Tübingen University Hospital, Tübingen, Germany^e German Centre for Infection Research (DZIF), Tübingen, Germany^f AP-HP, Hôpital Lariboisière, Service de Bactériologie, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France^g UMR 1137, INSERM IAME, Paris, France^h Central Hospital, Department of Clinical Microbiology, Växjö, Swedenⁱ AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Bactériologie-Hygiène, Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (Université de Paris 6), Paris, France^j INSERM U1135, Centre for Immunology and Microbial Infections, Team 13, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 September 2016

Accepted 12 November 2016

Keywords:

Antibiotic stewardship

Questionnaire

Antibiotic susceptibility testing

Selective reporting

Antibiotic prescription

Antibiotic resistance

ABSTRACT

Selective reporting of antibiotic susceptibility test (AST) results is one possible laboratory-based antibiotic stewardship intervention. The primary aim of this study was to identify where and how selective reporting of AST results is implemented in Europe both in inpatient and in outpatient settings. An ESCMID cross-sectional, self-administered, internet-based survey was conducted among all EUCIC (European Committee on Infection Control) or EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) national representatives in Europe and Israel. Of 38 countries, 36 chose to participate in the survey. Selective reporting of AST results was implemented in 11/36 countries (31%), was partially implemented in 4/36 (11%) and was limited to local initiatives or was not adopted in 21/36 (58%). It was endorsed as standard of care by health authorities in only three countries. The organisation of selective reporting was everywhere discretely managed by each laboratory, with a pronounced intra- and inter-country variability. The most frequent application was in uncomplicated community-acquired infections, particularly urinary tract and skin and soft-tissue infections. The list of reported antibiotics ranged from a few first-line options, to longer reports where only last-resort antibiotics were hidden. Several barriers to implementation were reported, mainly lack of guidelines, poor system support, insufficient resources, and lack of professionals' capability. In conclusion, selective reporting of AST results is poorly implemented in Europe and is applied with a huge heterogeneity of practices. Development of an international framework, based on existing initiatives and identified barriers, could favour its dissemination as one important element of antibiotic stewardship programmes.

© 2017 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

* Corresponding author. EA 4360 APEMAC and Service de Maladies Infectieuses et Tropicales, CHRU de Nancy, Hôpitaux de Brabois, Université de Lorraine, 54511 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France. Fax: +33 383157027.

E-mail address: celine.pulcini@univ-lorraine.fr (C. Pulcini).

¹ The EUCIC-ESGAP-EUCAST Selective Reporting Working Group includes the following investigators for their country: Austria (Elisabeth Presterl); Azerbaijan (Akif Gurbanov); Belgium (Denis Piérard); Bosnia (Selma Uzunovic); Bulgaria (Rossitza Vatcheva-Dobrevska); Croatia (Arjana Tambic); Czech Republic (Helena Zemlickova); Denmark (Robert L. Skov); Estonia (Paul Naaber); Finland (Antti Hakanen); France (Vincent Jarlier); Germany (Sören Gatermann); Greece (Athanasios Tsakris); Hungary (Endre Ludwig); Iceland (Kristján Orri Helgason); Ireland (Kirsten Schaffer); Israel (Yehuda Carmeli); Italy (Mario Sarti); Kosovo (Lul Raka); Latvia (Arta Balode); Macedonia (Golubinka Bosevska); The Netherlands (Greetje A. Kampinga); Norway (Paul Christoffer Lindemann); Poland (Dorota Zabicka); Portugal (Valquíria Alves); Romania (Oana Săndulescu); Russia (Marina Sukhorukova); Serbia (Snezana Matic); Slovak Republic (Milan Niks); Slovenia (Iztok Štrumbelj); Spain (Luis Martínez-Martínez); Sweden (Annika Wistedt); Switzerland (Hugo Sax); Turkey (Deniz Gür); UK (Kathleen B. Bamford); and Ukraine (Viktor Liashko).

1. Introduction

Antibiotic use drives bacterial resistance [1], and antibiotic prescriptions are often inappropriate or unnecessary both in outpatient and in inpatient settings [2,3]. The microbiology laboratory plays a crucial role in antibiotic stewardship programmes [4], in particular through pathogen identification and reporting of antibiotic susceptibility test (AST) results. Huge efforts have been made to reinforce quality control and in the standardisation of testing procedures [5], but the significant impact of reporting on physicians' prescribing behaviour has been overlooked so far. Interpreting AST results might be a challenge for clinicians: they can find it difficult to assess the clinical relevance of the isolate and the practical relevance of minimum inhibitory concentration (MIC) values, and often see AST reports as a menu of possible choices [6,7].

Selective reporting of AST results is increasingly recognised as one of the key strategies of antibiotic stewardship programmes and has recently been included in the list of interventions recommended by the Infectious Diseases Society of America (IDA) and the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) [4], even though the level of evidence supporting this measure is quite low [8–10]. Selective reporting means that antibiotics are tested as usual (according to national or international recommendations) by the microbiology laboratory, but not all AST results are reported back to the clinician; amoxicillin, trimethoprim/sulfamethoxazole, nitrofurantoin, fosfomicin and pivmecillinam can, for example, be the only antibiotics reported for susceptible strains isolated from urine samples in women [11]. Selective reporting can be performed in several ways: (i) encourage reporting of drugs appropriate for the infection site (e.g. no reporting of nitrofurantoin on blood isolates); (ii) encourage reporting of narrower-spectrum agents over broad-spectrum agents; (iii) discourage reporting of drugs inappropriate for the organism where susceptible results might be misleading (e.g. aminoglycosides for salmonellae); (iv) discourage reporting of drugs that might have negative consequences for patients of a certain age group (e.g. fluoroquinolones for children, nitrofurantoin for elderly); and (v) in certain situations where an antibiotic treatment is not indicated (e.g. asymptomatic bacteriuria, wound swabs or contaminated blood cultures), AST results may not be reported at all [12]. The most likely variables used to determine which antimicrobial agents to include in a selective report are: the identity of the organism; the infection site; patient age and sex; agents tested; and the susceptibility pattern of the isolate in that if mostly susceptible, fewer agents would be reported and vice versa. These can be addressed in software rules to automatically suppress certain results. In all cases, all results are made available to the clinician on request.

It has been shown that reporting results for only a restricted number of drugs tested ('first-line drugs' or 'drugs of choice') is associated with a decrease in the use of antibiotics for which results are not reported and, conversely, an increase in the use of agents that are reported [8–10,13]. Similarly, some studies showed that the absence of AST reporting (e.g. for asymptomatic bacteriuria) was associated with a decrease in the use of antimicrobial agents [12]. Selective reporting could also ultimately have a positive impact on resistance rates owing to the induced changes in antibiotic use [13]. However, data on potential unintended consequences are scarce [7,12].

Selective reporting of AST results appears to be common practice in some countries, particularly in Northern Europe [14], but to the best of our knowledge no large study has assessed how and to what extent this strategy is implemented. The aim of this cross-sectional survey was to evaluate how and to what extent selective reporting of AST results is implemented in Europe both in inpatient and outpatient settings and to identify the potential barriers to its implementation.

2. Materials and methods

2.1. Setting and participants

An ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) cross-sectional, self-administered survey was performed. The questionnaire was addressed to all EUCIC (European Committee on Infection Control) or EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) national representatives in Europe and Israel (38 countries in total). Each national representative was asked to recommend another colleague for the survey if s/he was unable to complete it. All national representatives were specialists in clinical microbiology (CM), infectious diseases (ID) or infection control (IC) and were experts in AST. They were encouraged to be as representative as possible of what happened nationwide in their country (by contacting colleagues if needed) and to reply on behalf of their national societies.

2.2. Survey design, administration and analysis

The survey was developed after a literature search [8–10,12–15], by a team of seven specialists in ID, IC and CM. It included questions on the extent and modalities of implementation of selective reporting of AST results in each country as well as barriers to implementation. The 12-point questionnaire (in Word format, in English) was sent to all national representatives by e-mail in January–March 2016, asking in particular: (i) if selective reporting was used in the country; (ii) if not, why, and if yes, how (antibiotics reported, cascade reporting if resistant bacteria, etc.); and (iii) barriers to implementation. The survey included both closed questions with the possibility to freely add comments and open questions. Respondents were encouraged to provide any additional material (as recommendations or protocols) helping to detail the implementation of selective reporting in their country. The respondents were contacted personally to clarify ambiguous replies.

Selective reporting was defined as well implemented in a given country if part of daily practice in the majority of microbiology laboratories, at least in some clinical situations; partially implemented if applied at a regional, or even supraregional, level, but not in the majority of laboratories; and limited to local initiatives if adopted only in scattered laboratories. This categorisation was the result of a post-hoc analysis of the data based on replies to questions 4 and 7. To ensure that the analysis was correct, all participants were asked to double-check the final set of results and to approve the final version of the paper. The questionnaire is available as an Appendix. The results were analysed using Microsoft Excel 2010 (Microsoft Inc., Redmond, WA).

3. Results

3.1. Respondents' characteristics and attitudes towards selective reporting of antibiotic susceptibility test results

A total of 38 countries in Europe and Israel were eligible, of which 36 participated in the survey. Of the respondents, 11 were members of EUCIC and 13 of EUCAST, whereas 12 were an alternative contact appointed by the EUCIC/EUCAST national representative. Moreover, 21 national representatives replied also on behalf of 26 national societies (17 CM, 3 ID and 6 IC societies) in 21 countries.

One-half (18/36) of the respondents considered selective reporting to be very useful and another 39% (14/36) considered it to be useful.

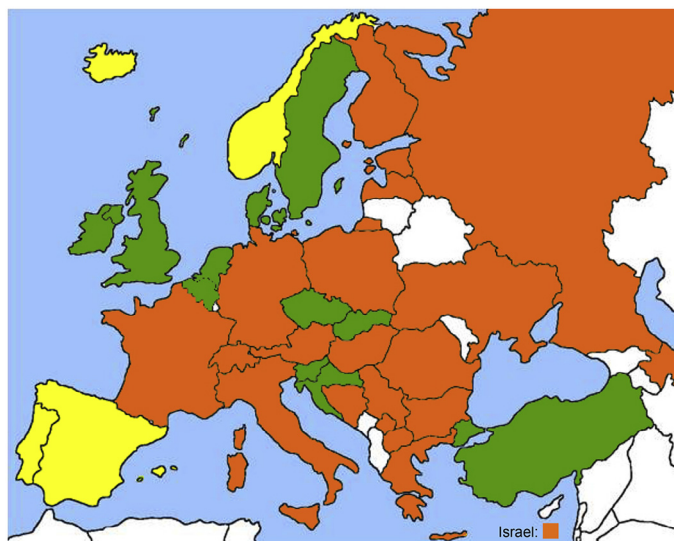


Fig. 1. Implementation of selective reporting of antibiotic susceptibility test results in Europe and Israel ($n = 36$ participating countries). Green: well implemented, i.e. part of daily practice in the majority of microbiology laboratories, at least in some clinical situations; yellow: partially implemented, i.e. applied at a regional, or even supraregional, level, but not in the majority of laboratories; and orange: only local initiatives or not implemented. In Slovakia and Slovenia, selective reporting is well implemented only in the outpatient (community) setting.

3.2. Implementation of selective reporting

Selective reporting of AST results was described as well implemented in 11 countries (31%) (Belgium, Croatia, Czech Republic, Denmark, Ireland, The Netherlands, Slovakia, Slovenia, Sweden, Turkey and the UK). In four countries (11%) (Iceland, Norway, Portugal and Spain), selective reporting was partially implemented. In the remaining 21 countries (58%) it was limited to local initiatives or was not adopted (Fig. 1).

Selective reporting was endorsed as standard of care by health authorities in Ireland, Turkey and the UK, but only the Turkish Society of Microbiology recently published detailed practical recommendations for selective reporting. Sweden and Ireland included some indications on how to perform selective reporting in their antimicrobial stewardship national programme [16,17].

The organisation of selective reporting and the degree of implementation in different clinical situations varied significantly across countries and within the same country, being managed independently by each laboratory in all countries. The most common use was in frequent and non-severe infections seen in the outpatient setting, e.g. urinary tract infections (UTIs), skin and soft-tissue infections, pharyngitis and, less frequently, lower respiratory tract infections. The choice of reported and withheld antibiotics was also quite variable. In some countries, in *Escherichia coli* without pronounced resistance and isolated in a urine sample (Table 1), only older agents with limited spectra (e.g. amoxicillin, pivmecillinam, trimethoprim, nitrofurantoin, fosfomycin) were reported. In other countries, amoxicillin/clavulanic acid, third-generation cephalosporins, fluoroquinolones and aminoglycosides would always be included in the AST report. Other examples of selective reporting cited by the respondents are presented in Table 2.

Rules for reporting differed between countries. In the 11 countries where selective reporting was well developed, additional results were always reported if the regular panel of tested antibiotics was found to be inactive. In 5 of the 11 countries, antibiotics for which the organism was resistant were included in the report irrespective

Table 1

Examples of selective reporting of antibiotic susceptibility test results for a wild-type (=susceptible) *Escherichia coli* isolated in a urine sample^a

Antibiotic	BE	CZ	DK	EE	EL	HR	IE	IT	PL	PT	SE	TR	UK
Ampicillin/ amoxicillin	X		X	X	X	X	X	X		X	X	X	
Amoxicillin/ clavulanic acid	X	X		X	X	X			X				X
Pivmecillinam			X		X								
Temocillin	X												
Piperacillin/ tazobactam	X												
Cefadroxil	X										X		
Cefalexin												X	X
Cefuroxime	X	X		X	X	X							
Cefaclor					X								
Cefixime						X							
Ceftriaxone	X												
Ceftazidime				X									
Trimethoprim			X				X		X		X		X
Sulfamethizole			X										
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	X	X		X	X	X		X	X				X
Ciprofloxacin	X			X	X	X		X	X		X		
Norfloxacin					X	X							
Gentamicin	X				X	X		X					X
Amikacin	X				X			X					
Nitrofurantoin	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fosfomycin	X								X	X	X		X

BE, Belgium; CZ, Czech Republic; DK, Denmark; EE, Estonia; EL, Greece; HR, Croatia; IE, Ireland; IT, Italy; PL, Poland; PT, Portugal; SE, Sweden; TR, Turkey; UK, United Kingdom.

^a All examples (except Turkey) represent locally implemented reporting policies and none can be considered as representative of a national standard.

of whether they belonged to the restricted panel. In 3 of the 11 countries, the report mentioned that there could be hidden results, whereas in the other countries no information about hidden results was included in the report.

Table 2

Other examples of selective reporting of antibiotic susceptibility test results.

Clinical situation	Reported antibiotics ^a
Skin and soft-tissue infections (streptococci, MSSA)	Cloxacillin, erythromycin, SXT
Streptococcal pharyngitis	Penicillin, erythromycin
Sputum:	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicillin, erythromycin, tetracycline
<i>Haemophilus influenzae</i>	Amoxicillin, erythromycin, tetracycline
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Amoxicillin, AMC, erythromycin, tetracycline
Stools:	
<i>Salmonella</i> spp. and <i>Shigella</i> spp.	Amoxicillin, ciprofloxacin, SXT
<i>Campylobacter</i> spp.	Ciprofloxacin, erythromycin, tetracycline
Gonorrhoea	Penicillin, ceftriaxone
Infections in hospitalised patients:	
Gram-negative, non-carbapenem R (Enterobacteriaceae, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>)	Do not report carbapenems, tigecycline
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> and <i>Burkholderia cepacia</i>	SXT
Staphylococci non-methicillin R and enterococci non-ampicillin R	Do not report glycopeptides, linezolid, daptomycin, tigecycline
Asymptomatic bacteriuria	Hide all results, except in pregnant women and before invasive urological procedures

MSSA, methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; AMC, amoxicillin/clavulanic acid; R, resistant.

^a For a susceptible isolate.

Table 3
Main barriers to the implementation of selective reporting of antibiotic susceptibility test (AST) results in Europe and Israel^a

Barrier category	Practical examples
Barriers related to guideline/recommendation factors	
Lack of national or international guidelines on AST results selective reporting	Each laboratory applies its own strategy for selective reporting of AST results, or does not use selective reporting at all
Lack of agreement	Some experts have doubts regarding usefulness or applicability of selective reporting
Difficult applicability to complicated cases	Polymicrobial infections, PK/PD factors, severe infections and other factors make selective reporting difficult to use in some patients
Complex implementation in areas with high MDR bacteria prevalence	A high prevalence of MDR pathogens limits the number of available antibiotic options
Barriers related to the individual healthcare professional	
Lack of awareness, familiarity and engagement	Professionals' awareness of antibiotic resistance and usefulness of selective reporting is low
Lack of physicians trained in clinical microbiology	Microbiologists are mainly technicians with biology background
Lack of capability	Clinical microbiology is not available as medical specialty
Barriers related to professional interactions	Scientific background and capabilities of local professionals are insufficient
Lack of communication	Patient clinical data available in the laboratory are insufficient
Barriers related to incentives and resources	Informing clinicians on hidden results is difficult and time consuming
Lack of human resources	Human resources in the laboratory are insufficient to guarantee the availability of results 24 h/day and 7 days/week in case of clinician request
Lack of dedicated IT	Available IT does not assist the microbiologist in selective reporting and makes it an additional workload
Lack of regular supply of laboratory materials	Shortage of laboratory materials makes it difficult to organise AST according to guidelines
Barriers related to capacity for organisational change	
Lack of priority	Selective reporting has not been included in the national/local AMS programmes
Other more basic priorities	Quality control and standardisation of testing procedures are still the main issue
Barriers related to social, political and legal factors	
Significant economic constraints on healthcare budget	There are significant financial problems that are prioritised in health system planning
Lack of recognition by the reimbursement system	Reimbursement system does not recognise or support selective reporting
Lack of collaboration from the private system	Private laboratories prefer full reporting because it requires less qualified personnel and implies less workload

PK/PD, pharmacokinetic/pharmacodynamic; MDR, multidrug-resistant; IT, information technology; AMS, antimicrobial stewardship.

^a Barriers are presented according to the framework proposed by Flottorp et al. [18].

Most respondents mentioned that intensive care and infectious diseases units received complete AST reporting owing to the complexity of clinical situations usually encountered in those settings.

3.3. Barriers to the implementation of selective reporting of antibiotic susceptibility test results

Many respondents (25/36; 69%) reported some current or potential barriers to the implementation of selective reporting [18], mainly related to lack of guidelines, lack of awareness, capability and involvement of medical professionals, lack of healthcare system support, and problems of applicability to complex clinical scenarios (Table 3).

4. Discussion

This survey provides an overview of AST selective reporting practice and challenges in 36 countries in Europe and Israel. Although selective reporting has been shown to improve the quality of antibiotic prescriptions [8–10,12,14,15], it was well implemented in only one-third of the participating countries. Nearly all respondents (34/36; 94%) perceived selective reporting as useful, but they also identified several barriers to implementation, which can explain its incomplete adoption.

Selective reporting was recognised as standard of care in only three countries, and only one country issued detailed practical recommendations on this topic. Moreover, in all countries each laboratory was free to choose the way AST results were reported. This probably explains the pronounced differences observed regarding the choice of antibiotics that were reported to clinicians. Overall, Northern European countries tended to apply selective reporting to a wider range of clinical situations and reported quite a

limited number of antibiotics compared with other countries. In some countries, the range of reported antibiotics was in fact rather large and even included broad-spectrum parenteral antibiotics. Moreover, intra-country variability remained significant in the majority of cases, as already reported in the literature [19].

Selective reporting requires good communication between laboratories and clinicians [6]. On the one hand, the microbiologist will probably be more confident in reporting only part of the AST results if receiving relevant and reliable clinical information (diagnosis, drug allergies, pregnancy, etc.), even though selective reporting can also be organised with very limited information (e.g. patient's age and sex); on the other hand, clinicians need to be aware that they can obtain hidden results if needed, without delay for severe infections, and with acceptable additional workload.

One of the most common concerns among respondents was the workload related to the perceived necessity to guarantee the 24 h/7 days availability of hidden results in order to avoid potential delay in effective documented treatment, especially for severe infections in the inpatient setting. Unintended consequences of selective reporting have, however, not been reported in the literature, although data on this topic are scarce [7,12]. The clinician can indeed usually select an appropriate documented antibiotic therapy based on the available reported results.

Another commonly perceived barrier was the applicability of selective reporting to complex clinical situations, particularly in areas with a high prevalence of multidrug-resistant bacteria. Reporting will indeed be less selective for resistant isolates; but narrow-spectrum options remain available for many common low-risk infections, such as fosfomycin and nitrofurantoin (and in some countries pivmecillinam) for uncomplicated UTIs [20], or penicillin/amoxicillin for most streptococcal infections [21]. Since prescriptions in the community account for >80% of total antibiotic use [22], the impact of selective reporting could still be significant in countries with a high prevalence of bacterial resistance. In the inpatient setting,

restricted and usually broad-spectrum antibiotics might not be reported (Table 2) if narrower-spectrum options are available.

Lack of information system support was also raised as a barrier to implementation. It is likely that the most successful selective reporting practices need to be supported by a laboratory information system that would automatically 'selectively report' certain antimicrobial agents without operator intervention (e.g. the software would decide which drugs to hide or report); this would also be the approach most likely to lead to consistent selective reporting with minimal errors.

Some respondents, particularly from Eastern Europe, reported that compliance with quality standards was still a big issue in their countries, making selective reporting less of a priority. In these settings, lack of resources and local expertise remain a critical issue, and both national and international professional societies have an important role to play in providing adequate support, education and leadership. The full recognition of CM and ID specialties, with standardised curricula, is another essential step [23,24]. In some countries, these specialties are not recognised as such and this can limit their legitimacy in implementing structural stewardship interventions, such as selective reporting. Moreover, including selective reporting and other laboratory-based stewardship interventions in the curriculum of both specialties is needed to change practices.

This study has several limitations. First, only one contact was consulted for each country. These AST experts (EUCIC or EUCAST representatives) were nevertheless asked to investigate the situation in their country, consulting other colleagues if needed; however, some relevant information might have been missed. Second, participant selection might have influenced the identified barriers, since respondents were mainly experts from tertiary university hospitals and their perspective might differ from that of frontline clinicians, particularly in the outpatient setting. Lastly, we aimed at an overall overview of selective reporting practice in each country, so we did not investigate and detail all local initiatives, particularly for large countries.

In conclusion, selective reporting of AST results is largely underused and shows great variability among individual microbiology laboratories in Europe and Israel. If this strategy were to be promoted as an important component of antibiotic stewardship programmes, an international framework would be needed, based on existing initiatives and endorsed by national and international professional societies. This will ultimately facilitate integration into existing information technologies, thus reducing the workload for microbiologists.

Acknowledgments

The authors thank the following colleagues who also participated in this survey: Joerg Wuellenweber (Germany); Biljana Kakaraskoska Boceska (Macedonia); Graça Rocha (Portugal); Daniela Pițigoi, Anca Streinu-Cercel, Dragoș Florea and Adrian Streinu-Cercel (Romania); Antonio Oliver (Spain); and Eva Melander and Christian Giske (Sweden).

Funding: None.

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.11.014.

References

- Costelloe C, Metcalfe C, Lovering A, Mant D, Hay AD. Effect of antibiotic prescribing in primary care on antimicrobial resistance in individual patients: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2010;340:c2096.
- Adriaenssens N, Coenen S, Versporten A, Muller A, Vankerkhoven V, Goossens H. European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): quality appraisal of antibiotic use in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(Suppl.):vi71–7.
- Hulscher ME, Grol RP, van der Meer JW. Antibiotic prescribing in hospitals: a social and behavioural scientific approach. *Lancet Infect Dis* 2010;10:167–75.
- Barlam TF, Cosgrove SE, Abbo LM, MacDougall C, Schuetz AN, Septimus EJ, et al. Implementing an antibiotic stewardship program: guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Clin Infect Dis* 2016;62:e51–77.
- Leclercq R, Cantón R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:141–60.
- Cunney RJ, Smyth EG. The impact of laboratory reporting practice on antibiotic utilisation. *Int J Antimicrob Agents* 2000;14:13–19.
- Steffee CH, Morrell RM, Wasilauskas BL. Clinical use of rifampicin during routine reporting of rifampicin susceptibilities: a lesson in selective reporting of antimicrobial susceptibility data. *J Antimicrob Chemother* 1997;40:595–8.
- Coupat C, Pradier C, Degand N, Hoffliger P, Pulcini C. Selective reporting of antibiotic susceptibility data improves the appropriateness of intended antibiotic prescriptions in urinary tract infections: a case–vignette randomised study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:627–36.
- Tan TY, McNulty C, Charlett A, Nessa N, Kelly C, Beswick T. Laboratory antibiotic susceptibility reporting and antibiotic prescribing in general practice. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:379–84.
- McNulty CAM, Lasseeter GM, Charlett A, Lovering A, Howell-Jones R, MacGowan A, et al. Does laboratory antibiotic susceptibility reporting influence primary care prescribing in urinary tract infection and other infections? *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1396–404.
- Hooton TM. Uncomplicated urinary tract infection. *N Engl J Med* 2012;366:1028–37.
- Leis JA, Rebeck GW, Daneman N, Gold WL, Poutanen SM, Lo P, et al. Reducing antimicrobial therapy for asymptomatic bacteriuria among noncatheterized inpatients: a proof-of-concept study. *Clin Infect Dis* 2014;58:980–3.
- Langford BJ, Seah J, Chan A, Downing M, Johnstone J, Matukas LM. Antimicrobial stewardship in the microbiology lab: impact of selective susceptibility reporting on ciprofloxacin utilization and Gram-negative susceptibility in a hospital setting. *J Clin Microbiol* 2016;54:2343–7.
- MacKenzie FM, Gould IM, Bruce J, Mollison J, Monnet DL, Krcmery V, et al. The role of microbiology and pharmacy departments in the stewardship of antibiotic prescribing in European hospitals. *J Hosp Infect* 2007;65(Suppl. 2):73–81.
- Cunney R, Aziz HA, Schubert D, McNamara E, Smyth E. Interpretative reporting and selective antimicrobial susceptibility release in non-critical microbiology results. *J Antimicrob Chemother* 2000;45:705–8.
- Svenska Läkarsällskapet. Referensgruppen för antibiotikfrågor. Available from: <http://www.sls.se/RAF/>. [Accessed 6 September 2016].
- Health Service Executive. Health Protection Surveillance Centre. Guidelines for antimicrobial stewardship in hospitals in Ireland. Available from: <https://www.hpsc.ie/A-Z/MicrobiologyAntimicrobialResistance/InfectionControlandHAI/Guidelines/File,4116,en.pdf>. [Accessed 6 September 2016].
- Flottorp SA, Oxman AD, Krause J, Musila NR, Wensing M, Godycki-Cwirko M, et al. A checklist for identifying determinants of practice: a systematic review and synthesis of frameworks and taxonomies of factors that prevent or enable improvements in healthcare professional practice. *Implement Sci* 2013;8:35.
- Tan TY, McNulty CA. Survey of public health laboratory protocols for reporting the antibiotic susceptibility of urinary isolates submitted from general practice. *Commun Dis Public Health* 2002;5:33–7.
- Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:899–905.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). MIC distribution for amoxicillin. Available from: <http://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BeginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=175&Specum=-1>. [Accessed 6 September 2016].
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Surveillance of antimicrobial consumption in Europe* 2012. Available from: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-consumption-europe-esac-net-2012.pdf>. [Accessed 6 September 2016].
- UEMS. Training curriculum for clinical microbiology. Available from: https://www.escmid.org/fileadmin/src/media/PDFs/5Profession_Career/UEMS_Training_Curriculum_CM.pdf. [Accessed 6 September 2016].
- UEMS. Training curriculum for infectious diseases. Available from: https://www.escmid.org/fileadmin/src/media/PDFs/5Profession_Career/UEMS_Training_Curriculum_ID.pdf. [Accessed 6 September 2016].