

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
LÉKAŘSKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
PORODNICKÁ A GYNEKOLOGICKÁ KLINIKA



DISERTAČNÍ PRÁCE

Chronický vulvovaginální dyskomfort a kvalita poševního prostředí

Doktorský studijní program Gynekologie a porodnictví

MUDr. Jan Kestřánek

Školitel: doc. MUDr. Jiří Špaček, PhD., IFEPAG

Hradec Králové 2014

Poděkování

Poděkování patří zejména mému školiteli doc. MUDr. Jiří Špačkovi, PhD., IFEPAG za ochotu, podporu a odbornou konzultaci disertační práce. Dále bych rád poděkoval doc. RNDr. Vladimíru Buchtovi, CSc. a PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. z Farmaceutické fakulty UK za odbornou pomoc při přípravě disertační práce a doc. RNDr. Petru Klemerovi, CSc. z Katedry biofyziky a fyzikální chemie Farmaceutické fakulty UK za zpracování dat. Děkuji také Mgr. Vandě Leierové za zpracování a poskytnutí dat z její diplomové práce na téma Vulvovaginální dyskomfort – příčinné faktory. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině především za podporu a trpělivost.

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 20.6.2014

Obsah

1.	Souhrn	6
2.	Abstract	8
3.	Seznam zkratk	10
4.	ÚVOD	12
5.	Cíle práce	14
6.	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	16
6.1	Akutní vulvovaginální dyskomfort	17
6.2	Chronický vulvovaginální dyskomfort	18
6.3	Ontogeneze vulvovaginální oblasti	19
6.4	Pravděpodobné etiopatogenetické aspekty CVD	25
6.5	Kvalita poševního prostředí	26
6.6	Koncept normální vaginální mikrobioty	30
6.7	Koncept atypické vaginální mikrobioty	31
6.8	Dynamika vaginální mikrobioty	35
6.9	Biofilm	36
6.9.1	Bakteriální biofilm	36
6.9.2	Kvasinkový biofilm	37
6.10	Metabolická kooperace a interakce mezi bakteriemi	38
6.11	Quorum sensing molekuly	39
6.12	Genetické faktory vzniku VVD	41
7.	SOUBOR PACIENTEK A POUŽITÉ METODY	43
	Vyšetření QSM a MBL	46

7.1	Vyhodnocení dat	48
	Shluková analýza	48
	Chí-kvadrát.....	48
	T-test.....	49
	Vyjádření významnosti	50
8.	VÝSLEDKY.....	51
9.	MIKROSKOPICKÝ MONITORING U PACIENTEK S CVD.....	92
10.	DISKUSE.....	95
11.	ZÁVĚR.....	108
12.	POUŽITÁ LITERATURA.....	110
13.	PUBLIKAČNÍ ČINNOST	130
	Monografie a kapitoly v monografiích.....	130
	Původní články	130
	Přehledové články	132
	Přednášky na odborných setkáních	132

1. Souhrn

Vulvovaginální dyskomfort (VVD) není život ohrožující onemocnění, avšak jeho dopad na kvalitu života ženy je veliký. Po gynekologické prevenci a prenatální péči je nejčastějším důvodem návštěvy gynekologické ambulance. Zatímco u sporadické formy VVD je etiologie většinou známá (kvasinková infekce, bakteriální vaginóza, aerobní vaginitida atd.), příčiny vzniku chronické formy nejsou prokazatelně objasněny.

CÍLE PRÁCE: Prvním cílem této práce bylo pokusit se odhalit etiologii chronického vulvovaginálního dyskomfortu (CVD), charakterizovat skupinu pacientek s CVD a vztáhnout tuto ke kvalitě poševního prostředí. Druhým cílem bylo vyhodnocení dotazníku, který byl zaměřen na možné příčinné faktory CVD. Třetí část práce je experimentální, zaměřená na problematiku quorum sensing molekul (QSM) a manosa-binding lektin (MBL) polymorfismů.

METODY: Data pro všechny tři části studie byla získána v ambulanci pro chronický vulvovaginální dyskomfort vyšetřením a dlouhodobým sledováním pacientek s CVD. Kontrolní skupinu tvořily pacientky vyšetřené v této ambulanci z jiných důvodů než je CVD. K pátrání po možných příčinných faktorech CVD byl použit dotazník.

VÝSLEDKY: Studie prokázala, že se v naprosté většině případů setkáváme s idiopatickou formou CVD. Dle výsledků je zřejmé, že se jedná hlavně o ženy v produktivním věku, v naprosté většině případů jinak zdravé, bez zjevného spouštěcího momentu. Bylo prokázáno, že se v ambulanci této problematice adekvátně věnuje minimum lékařů. Dále bylo prokázáno, že nejmarkantnějším nálezem u pacientek s CVD je výrazný úbytek či absence laktobacilů prokázaným při mikroskopickém vyšetření a že mikroskopie, v součinnosti s dalšími klinickými vyšetřeními, má zcela klíčové postavení ve vyšetřovacím algoritmu pacientek s CVD.

Vyhodnocení dotazníkové studie přineslo řadu statisticky významných závěrů, např. souvislost s léčbou antibiotiky, sexuální aktivitou, užívání antikoncepce atd. V experimentální části naše pilotní výsledky ukázaly, že pacientky s CVD ve srovnání s kontrolními ženami měly statisticky významně vyšší hladiny farnesolu ve vaginální sekretu a naopak nižší koncentrace tyrosolu. Velký rozptyl hodnot u obou QSM podporuje předpoklad, že CVD je multifaktoriální povahy. Výsledky analýzy MBL polymorfismů naznačily, že není významný rozdíl v distribuci jednotlivých polymorfismů. Z tohoto však nelze vyvozovat žádné závěry, protože vyšetřovaný soubor pacientek byl relativně malý.

ZÁVĚR: Výsledky studie potvrzují, že skupina pacientek s CVD není homogenním souborem. V naprosté většině případů není známa ani vyvolávající příčina, která odstartuje nástup těchto obtíží. Studie prokázala, že kvasinková etiologie není tak častá, jak se předpokládá. Zejména dlouhodobý mikroskopický monitoring pacientek, které byly před vstupem do naší studie opakovaně léčeny antimykotickými prostředky, potvrzoval spíše klidové nálezy, tedy nepřítomnost zánětlivých změn. Naopak převažujícím nálezem bývají nátěry s velmi malým nebo nulovým počtem laktobacilů. Dominující je tak potřeba protekce než pokračování v devastující antimikrobiální léčbě.

Klíčová slova: vulvovaginální dyskomfort, poševní prostředí, kvalita života, mikroskopické vyšetření, quorum sensing molekuly, MBL

2. Abstract

Vulvovaginal discomfort (VVD) is not a life-threatening disease, however, its impact on quality of life is enormous. It is the most often reason for seeing a gynecologist, after a gynecological prevention and prenatal care. Whilst the etiology of sporadic form of VVD is mostly known (yeast infection, bacterial vaginosis, aerobic vaginitis etc.), the causes of the origins of the chronic form are not provably clarified

THE OBJECTIVES OF THE THESIS: The first aim of this thesis has been to make an attempt to reveal the etiology of chronic vulvovaginal discomfort (CVD), to characterize a group of patients with CVD and refer it to the quality of vaginal environment. The second aim has been an evaluation of a questionnaire, which had been focused on probable causal factors of CVD. The third part is experimental, focused on the issue of quorum sensing molecule (QSM) and manosa-binding lectin (MBL) polymorphisms.

METHODS: The data for all three parts of the study were gained at the outpatient's department for chronic vulvovaginal discomfort. The sources for the study were obtained by examining and long-term following CVD patients. The patients in the control group had been treated at the outpatient's department from different reasons than CVD. A questionnaire was used when investigating the probable CVD factors.

RESULTS: The study has proved that we come across the idiopathic form of CVD in most cases. According to the results, it is obvious, that the issue concerns mainly women at productive age, in most cases healthy, without an evident starting moment. It has been proved that only a minimum of physicians in private practice pay attention to this issue. The study has also shown that the most noticeable finding in CVD patients is a considerable decrease or absence of lactobacillus proved when performing a microscopic examination and that microscopy together with other clinical examinations have a crucial position in the examination algorithm of CVD patients.

The evaluation of the questionnaire study has brought a range of statistically important conclusions, for instance a connection with antibiotics treatment, sexual activity, use of contraception and so on. In the experimental part, our pilot results have shown that CVD patients, in comparison with the control women, had a statistically significant higher level of farnesol in the vaginal secretion and, on the contrary, a lower concentration of tyrosol. A great margin of values in both QSM supports an assumption that CVD is of multifactorial nature. The results of MBL polymorphisms analysis have implied that there is no significant difference in distribution of single polymorphisms. It is not possible to draw any conclusions from that as the investigated group of patients was relatively small.

CONCLUSION: The results of the study confirm that a group of CVD patients is not a homogeneous group. In most cases even the cause, which starts the onset of these difficulties is not known. The study has proved that yeast etiology is not as often as it is assumed. Particularly, the long-term microscopic monitoring of patients, who had been repeatedly treated with antimycotics before the entry to the study, has confirmed rather physiological findings, that implies the absence of inflammatory changes. On the contrary, the prevailing findings are with very little or null number of lactobacillus. There is thus a predominant need of protection than continuing in devastating antimicrobial treatment.

Key words: vulvovaginal discomfort, vaginal environment, quality of life, microscopic examination, quorum sensing molecules, MBL

3. Seznam zkratk

AV	Aerobní vaginitida
BP	Barvený preparát
BV	Bakteriální vaginosa
CDAL	<i>C. Albicans</i>
COC	Kombinovaná orální kontracepce
CVD	Chronický vulvovaginální dyskomfort
DM	Diabetes mellitus
ECM	Extracelulární matrix
FAF	Farmaceutické fakulty
GBS	Group B streptococcus
GIT	Gastrointestinální trakt
GV	<i>Gardnerella vaginalis</i>
HAK	Hormonální antikoncepce
HRT	Hormonal replacement therapy
CHCE	Cholecystektomie
IL	Interleukin
IUD	Intrauterine device
IUS	Intrauterine system
LBG	Laktobacilární stupeň (lactobacillary grade)
MBL	Manosa-binding lektin
NAT	Nativní preparát
PCR	Polymerase chain reaction
QSM	Quorum sensing molekuly
RCUI	Revisio cavi uteri instrumentalis
RVVK	Rekurentní vulvovaginální kandidóza
SAD	Supravaginální amputace dělohy
STD	Sexually transmitted disease

UHPLC	Ultra high performance liquid chromatography
VAS	Vertebrogenní algický syndrom
VVD	Vulvovaginální dyskomfort
VVK	Vulvovaginální kandidóza

4. ÚVOD

Problematika vulvovaginálního dyskomfortu je nejfrekventovanější náplní činnosti gynekologa a s tím souvisí i preskripce antiinfekční léčby. Její objem je obrovský a stále narůstá. Dominujícím nešvarem současnosti je její nadužívání a zářným příkladem v tomto ohledu je i gynekologie, kde kromě simplifikovaného přístupu ze strany ambulujících lékařů je bezprecedentní i možnost volného nákupu antiinfekčních prostředků pro gynekologické použití. Nasazení antimykotik tak závisí v podstatě na osobním rozhodnutí bez jakékoliv lékařské kontroly. Zdaleka ne všechno jde však na vrub dysmikrobii, infekci či zánětu a v době, kdy se pojem personalizovaná medicína skloňuje ve všech pádech, jsme tak svědky pravého opaku, který hrubým způsobem nerespektuje základní pravidla. Zejména v oblasti pochvy a zevního genitálu se setkáváme s případy, kde dominují silné obtíže, ale objektivní nález bývá velmi chudý. Kvalita života bývá narušena zásadním způsobem, ale závěr gynekologického vyšetření může být zcela normální. Situaci pak neřeší ani opakovaná antiinfekční léčba, která postrádá racionální opodstatnění a samozřejmě má dubiózní efekt. Z hlediska vědeckého zájmu je velmi atraktivní mykologická problematika, kde je vztah hlavního potenciálního vyvolavatele *Candida albicans* předznamenán jednak možností bezpříznakového nosičství, na straně druhé se také těmto mikroorganismům přisuzuje právě v souvislosti s vulvovaginálním dyskomfortem nebývalý význam. Kvasinky tak můžeme označit jako univerzální mikroby, které mohou být přítomny v pochvě zdravých žen, na straně druhé mohou způsobit vulvovaginální kandidózu. Sice se jedná o dobře léčitelné onemocnění, nicméně právě její rekurentní forma je dodnes pro řadu žen stále strašákem.

Předložená disertační práce je výsledkem dlouhodobého prospektivního sledování a mikroskopického monitorování pacientek, které mají v oblasti pochvy a zevního genitálu chronické obtíže. Tyto ženy prošly naší specializovanou poradnou

pro vulvovaginální dyskomfort. Práce je dokladem systematického přístupu, který je u těchto pacientek esenciální.

5. Cíle práce

Vzhledem k absenci prací, které by problematiku chronického vulvovaginálního dyskomfortu (CVD) řešily komplexněji, bylo cílem tohoto projektu tuto charakteristiku vytvořit. V naprosté většině případů se setkáváme s idiopatickou formou CVD a základní premisa této práce se odvíjí od předpokladu úzké souvislosti mezi přítomnými obtížemi a aktuální kvalitou poševního prostředí. V širším slova smyslu patří ke chronickému vulvovaginálnímu dyskomfortu také vulvodynie. Ani zde se většinou nepodaří prokázat původ a stále nám chybí účinné možnosti, jak pozitivně léčebně zasáhnout. Je proto logické, že se právě u těchto pacientek pokoušíme o léčebný efekt i formou experimentálního přístupu.

Většina údajů, které jsou v této práci uvedeny, vychází z prospektivního sledování pacientek s CVD, jež byly v rámci specializované ambulance pro tuto problematiku v průběhu jednoho roku zařazeny. Toto bylo uskutečněno na základě vyhodnocení anamnestických informací od sledovaného souboru pacientek s CVD (**n = 106**). Velmi důležitou součástí práce byl i mikroskopický monitoring, který dosud nebyl u takového souboru realizován.

Část informací pochází též z epidemiologické sondy pilotní studie, která proběhla pomocí dotazníkové akce na Farmaceutické fakulty (FAF) UK v Hradci Králové. Vlastní údaje byly získány na základě:

- vyhodnocení epidemiologických a demografických údajů, které byly získány v rámci širší populace od studentek FAF
- vyhodnocení epidemiologických a demografických údajů, které byly získány od pacientek s CVD, zhodnocení spektra anamnestických informací získaných od vytvořeného souboru pacientek s CVD se zaměřením na přítomnost faktorů, které lze považovat za rizikové
- prospektivní vyhodnocování klinického stavu a fyzikálního vyšetření u pacientek s CVD za použití běžně dostupných metod

- prospektivní mikroskopické monitorování (nativní mikroskopie a barvené preparáty)
- mikrobiologická analýza včetně druhové identifikace kvasinek s určením jejich citlivosti k běžně používaným antimykotikům; (součástí tohoto projektu byla snaha o zjištění skutečné incidence rekurentní vulvovaginální kandidózy)
- vyšetření parametrů lokální imunity
- vyšetření MBL polymorfismů
- stanovení quorum sensing látek (farnesol a tyrosol) u těchto pacientek

Za nejčastějšího původce CVD byly považovány tradičně kvasinky a na tyto mikroorganismy je zacílena pozornost právě v experimentální části práce, kde jsme měli, mimo jiné, možnost stanovit úroveň komunikace mezi kvasinkami pomocí quorum sensing látek.

6. SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Vulvovaginální dyskomfort (VVD) můžeme v širším slova smyslu definovat jako akutní, dlouhodobé nebo opakované subjektivně pociťované nepohodlí (dyskomfort) ženy v genitální oblasti, které je doprovázené variabilním klinickým obrazem. Tento nemusí odpovídat rozsahu a intenzitě subjektivních příznaků. Za vyvolávající příčinu VVD je nejčastěji považován mikrobiální původ, ale na jeho vzniku se může podílet celá řada dalších faktorů, včetně nemikrobiálních příčin.^{237;43;87;152;212} Vulvovaginální dyskomfort se nejčastěji projevuje svěděním a/nebo pálením a/nebo výtokem. V současné době představuje jeden z nejčastějších důvodů návštěvy gynekologické ambulance. Vedle pacientek s náhle vzniklými problémy, se stále častěji setkáváme také s případy, u kterých se objevují tyto obtíže opakovaně. Za majoritního vyvolavatele VVD jsou dosud považovány kvasinky. Vulvovaginální dyskomfort však může mít rozmanitou etiologii a nutno počítat i s neinfekčními příčinami. Příkladem může být chemická iritace či alergická reakce. Podle internetových serverů je tato problematika jednou z nejsledovanějších a frustrace postižených je mnohdy alarmující.^{60;70;93;105} U akutních, sporadických obtíží se realizuje antimikrobiální preskripce obvykle v rámci první návštěvy na základě anamnézy a klinického nálezu. Zájem o příčinu však velmi často ustupuje do pozadí a u opakujících se obtíží nejsou pacientky velmi často vyšetřovány vůbec.^{106;191} To má za následek nebývalé zjednodušení této problematiky. Vše přebíjí bohaté armamentárium řady antiinfekčních a antimykotických preparátů, včetně možnosti aplikace širokospektrých přípravků, řada z nich je dnes volně přístupná i bez receptu. Tyto léky, zejména pak perorální formy, nemíří pouze do cílové oblasti a potenciální komplikace spočívají jak v narušení poševního mikroekosystému, tak i v ovlivnění dalších kompartmentů včetně potenciálního rozvratu složení mikrobiální flóry. Ze strany gynekologů je vyvíjena minimální snaha o diagnostiku a standardně doporučené mikroskopické vyšetření dnes paradoxně téměř nikdo neprovádí. Přitom právě kvalitně provedená mikroskopie představuje u pacientek

s vulvovaginálním dyskomfortem velmi důležitý zdroj informací. Máme možnost použití výkonných mikroskopů, které nejsou cenově nedostupné, digitální fotografie umožňuje snadný přenos dat, možné je i sekundární čtení za přítomnosti mikrobiologa. Zejména u chronických obtíží lze dle aktuálního stavu poševního prostředí zacílit i léčebný zásah.^{106;119} Logické by proto mělo být komplexnější pojetí této problematiky. Jednak bychom měli respektovat možnost bezpříznakového nosičství a zvláště u chronických případů se nevyhýbat ani základním otázkám souvisejícím se způsobem života, dietou, stylem oblékání atd. Jinými slovy za každou cenu neusilovat o sterilní prostředí, ale naopak o šetrnou restituci poševního prostředí a navození tolerance. Vlastními prostředky nastavená bezpříznakovost je určitě užitečnější než postantibiotická dysmikrobie. Ve hře je řada dalších aspektů včetně psychosomatiky a některé případy bude nutné řešit i v rámci mezioborové spolupráce.^{18;23;105}

Vedle klasických vyšetřovacích metod, kterými zůstává klinické a mikroskopické vyšetření se rozvíjejí i nové diagnostické možnosti (např. průkaz mikrobiální DNA a RNA, proteomika). Vzhledem k naléhavosti neodkladného léčebného zásahu je výhodné posunout co nejvíce dovedností přímo k pacientce, tj. těžiště diagnostiky přenést z laboratoře do ambulance. Na straně druhé je logickou snahou zřizovat pracoviště, která se budou věnovat této problematice systematicky.^{179;199}

Dizertační práce je zaměřena na zhodnocení kvality poševního prostředí u pacientek s chronickými obtížemi ve vulvovaginální oblasti. Prostor pro teoretický úvod je tak mimořádně široký. S ohledem na mikrobiální koncept, ke kterému se tato práce snaží přispět, je rozčleněn i teoretický úvod, snaha o nadhled a zároveň uvedení experimentální metody.

6.1 Akutní vulvovaginální dyskomfort

Jedná se o náhle vzniklé obtíže v oblasti zevního genitálu a pochvy jako je výtok, svědění nebo pálení. Příčinou bývá kvasinková, bakteriální, virová nebo

parazitární infekce. V praxi se nejčastěji setkáváme s vulvovaginální kandidózou a bakteriální vaginózou která není považovaná za infekci, ale za poruchu poševního prostředí. Dále přichází v úvahu aerobní vaginitida, poševní laktobacilóza, popř. herpes genitalis nebo trichomoniáza.^{94;95;106;138} O co méně často se dnes setkáváme s hnisavou kolpítidou, o to více pracujeme s pojmy, jakými jsou vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí. Příkladem je vulvovaginální kandidóza. To, že ji provázejí typické symptomy a diagnostika nečiní žádné diagnostické obtíže, ve skutečnosti již zdaleka neplatí. S akutní mykotickou kolpítidou (dříve používaný termín kolpítida měl vyjadřovat vystupňovanost zánětlivých projevů) se setkáváme spíše výjimečně a daleko častěji přicházejí v úvahu méně nápadné nálezy. V rámci běžné ambulance se dále setkáváme s bakteriální vaginózou a bakteriální (aerobní) vaginitidou. Z hlediska etiopatogeneze je užitečné zdůraznit i příčiny, které souvisí se stavem trofiky, příkladem je atrofická vaginitida. Problematika vulvovaginálního dyskomfortu je ve skutečnosti mnohem širší a vyšetřující gynekolog musí mít na paměti i sexuálně přenosná onemocnění. V oblasti vulvy se však mohou nezřídka projevovat i některé dermatózy a v těchto případech je výhodná spolupráce s dermatologem.^{2;99;102;218;219}

6.2 Chronický vulvovaginální dyskomfort

Jednou z charakteristik současnosti je narůstající počet žen, které trpí rekurentními, chronickými obtížemi. CVD definujeme jako výskyt výtoku, svědění nebo pálení v oblasti zevního genitálu a pochvy třikrát a více za rok. Jedná se o nehomogenní skupinu žen, kde u části z nich dochází po aplikaci antiinfekční léčby pouze k přechodnému zlepšení, u dalších však ani tento efekt nepřichází.¹⁰⁶ Z hlediska definice je nejlépe charakterizovaná skupina s rekurentní vulvovaginální kandidózou (RVVK), která je definovaná 3-4 mikrobiologicky potvrzenými atakami vulvovaginálního dyskomfortu kvasinkové etiologie během jednoho roku. Paradoxně však vidáme právě u této skupiny často zcela normální klidový nález. Diskrepance mezi minimálními nebo úplně absentujícími projevy zánětu je nápadná a při

neznalosti dané problematiky může svádět ke zlehčování a následné psychotraumatizaci a v některých případech až psychostigmatizaci. Spolupráce s ostatními odborníky, jako je mikrobiolog, imunolog či psycholog, se v mnoha případech z hlediska dlouhodobého sledování stává nutností.^{1;24;114;199}

6.3 Ontogeneze vulvovaginální oblasti

Zevní genitál a pochva jsou významnou estrogendependentní oblastí s charakteristickým vývojem v přímé závislosti na hladinách cirkulujících estrogenů, tab. 6.1.

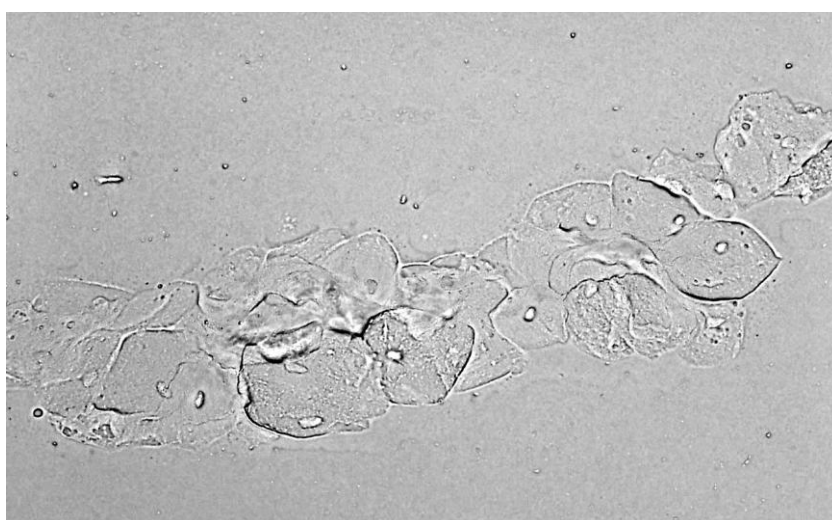
Tab. 6.1 Rozdělení života ženy z hlediska steroidogeneze a účinku na vulvovaginální oblast

	Zevní genitál	Pochva
Novorozenecké období	Prosáklý poševní vchod, zduřelá labia minora a praeputium clit.	pH \leq 4,5; prosáklá sliznice, postupně odeznívá
Dětství (klidové období rodičel)	Labia minora a klitoris jsou nepatrná; sliznice poševního vchodu je jemná a bledá	pH $>$ 4,5; nízký dlaždicový epitel
Puberta	Malá labia se zvětšují, pigmentace a ochlupení velkých labií, která překrývají malá labia	pH \leq 4,5; aktuální nález je závislý na stupni vývoje
Reprodukční období (premenopauza)	Definitivní uspořádání zevního genitálu	pH 3,8-4,5; aktuální nález závisí na fázi cyklu
Postmenopauza	Nástup přítomnosti a postupná dominance atrofických změn	pH $>$ 4,5; atrofické změny poševní sliznice

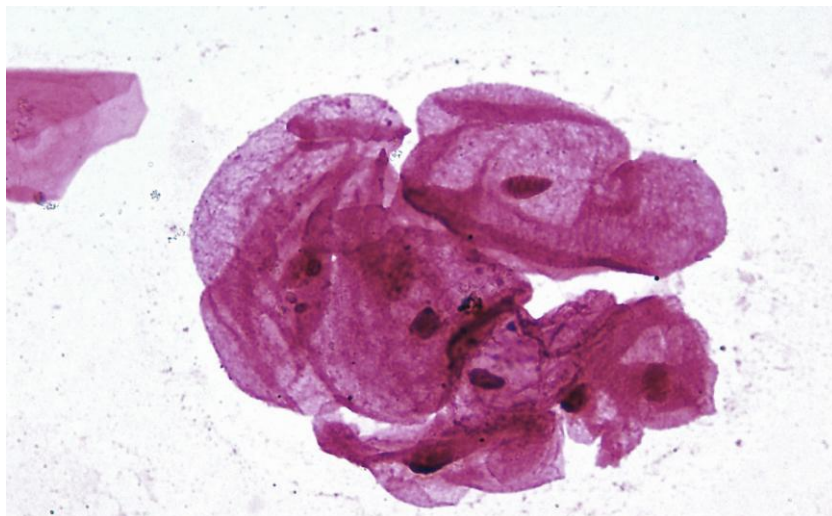
V novorozeneckém období dominuje vliv mateřských steroidních hormonů (objektivní nález je v oblasti zevního genitálu zcela odlišný od dětského genitálu). Projevy estrogenizace jsou evidentní, poševní sliznice je prosáklá, kyprá a složená v řasy. V tomto období obsahuje vrstevnatý dlaždicový epitel pochvy čtyři základní druhy buněk (bazální, parabazální, intermediální a superficiální). Dostatečné

množství glykogenu umožňuje přítomnost laktobacilů a kyselé pH. Vliv mateřských estrogenů však od čtvrtého dne po narození začíná odeznívat a od třetího týdne úplně mizí. Ve třech měsících vidíme již obraz fyziologické atrofie. Tento stav trvá až do puberty. V klidovém období jsou poševní stěny hladké (bez řas) vystlané velmi nízkým epitelem (pět až osm vrstev parabazálních buněk), který nehromadí glykogen. Hladina estrogenů je na minimálních hodnotách a tomu odpovídá i počet laktobacilů (pH je spíše alkalické). Jako velmi citlivý indikátor na měnící se hormonální situaci reaguje právě epitel pochvy, který začíná proliferovat ještě před nástupem viditelných sekundárních pohlavních znaků. V cytologickém nátěru nacházíme směs intermediálních a povrchových buněk, které postupně převažují. S nástupem puberty reaguje sliznice na rostoucí hladiny estrogenů proliferací epitelu až do superficiální vrstvy; poševní stěny jsou kypré, prosáklé a hromadí glykogen, pochva se osídluje laktobacilem a pH klesá až do hodnot $\leq 4,5$. Od menarche se objevuje normální cytologický nález jednotlivých fází menstruačního cyklu. Poševní výstelka je cílovým orgánem pro estrogeny, gestageny a androgeny; z buněčných změn v horní třetině pochvy můžeme proto zpětně usuzovat na ovariální činnost.^{90;110;157}

Obr. 6.1 Výtěr z pochvy u 3 denní holčičky, nativ, zv. 400×



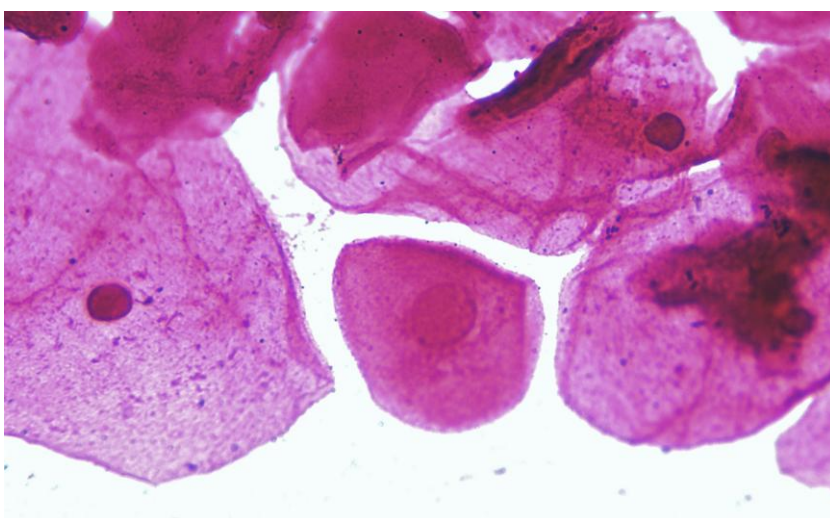
Obr. 6.1 Buňky z povrchového epitelu pochvy u 3 denního novorozence, Gram, zv. 1000×



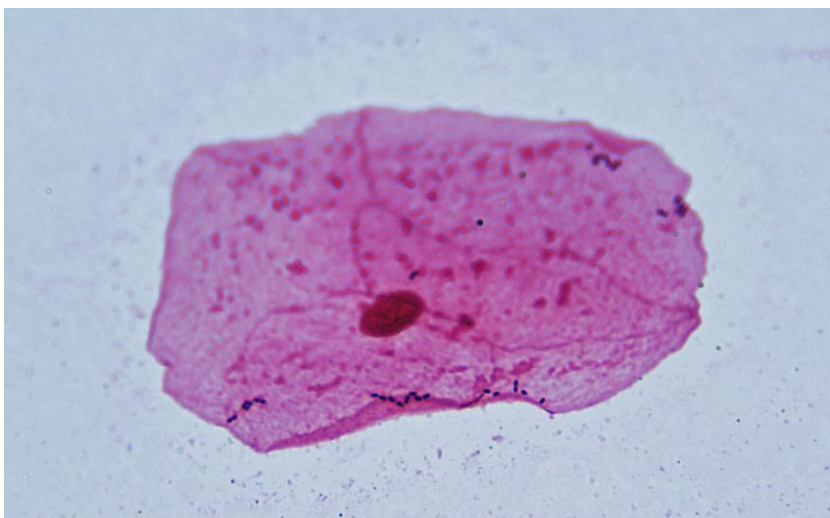
Pod vlivem steroidních hormonů a v souladu s děložním cyklem prodělává poševní epitel cyklické změny, které se týkají jednak jeho tloušťky (je vyšší v proliferační fázi) a dále charakteru povrchových buněk. Vnímavost pochvy na hormonální změny tak odráží počet buněčných vrstev a charakter buněk, které epitel tvoří. Na vnějším povrchu jsou povrchní epiteliální buňky, které jsou ploché, polyedrické o velikosti 70 μm . Mají malé až pyknotické jádro (menší než 5 μm) a perinukleární projasnění – oblast cytoplasmy s velkým množstvím glykogenu. Pod vrstvou svrchních buněk leží vrstva buněk středních s dlouhými mezibuněčnými spoji a na bázi je vrstva buněk parabazálních a bazálních, které jsou odděleny od submukózy bazální membránou. Střední buňky tvoří v těhotenství hypertrofickou vrstvu buněk navikulárních, které připomínají tvarem člunek nebo lasturu a v tomto období nejsou překryty vrstvou povrchních buněk. Z epiteliálních elementů jsou nejmenší bazální buňky, jsou kulovité až oválné a měří 15 až 30 μm . Protože poševní epitel odpovídá částečně svou skladbou epidermis (neobsahuje ovšem vývody žláz ani další přídatné elementy), jsou v něm přítomny Langerhansovy dendritické buňky specializované na sběr antigenů a jejich předkládání lymfocytům adaptivní imunity. V poševních nátěrech se mohou vyskytovat kromě výše uvedených buněk vaginálního epitelu také bezjaderné skvamy, epiteliální buňky

z endocervixu a endometria (sekreční buňky nebo buňky s řasinkami). Dalšími elementy jsou histiocyty, erytrocyty, granulocyty, monocyty, lymfocyty a plasmatické buňky. Poševní nátěry se mění během menstruačního cyklu, přičemž období ovulace je charakterizováno u zdravých žen převahou povrchních epitelíí a nepřítomností leukocytů a hlenu, zatímco v období sekrece přibývá středních buněk. V období menstruace dominují krevní buňky a hlen.^{32;39;85}

Obr. 6.3 Výtěr z pochvy u 9 leté dívky, Gram, zv. 1000×

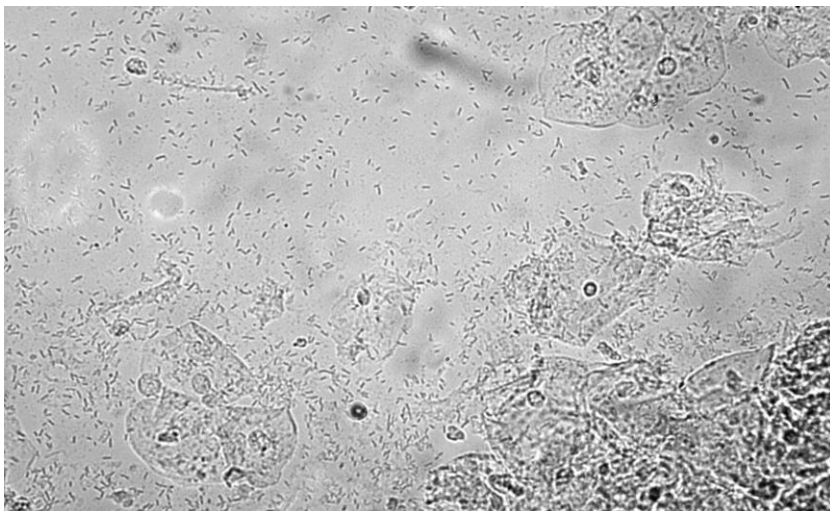


Obr. 6.4 Výtěr z pochvy u 9 leté dívky, Gram, zv. 1000

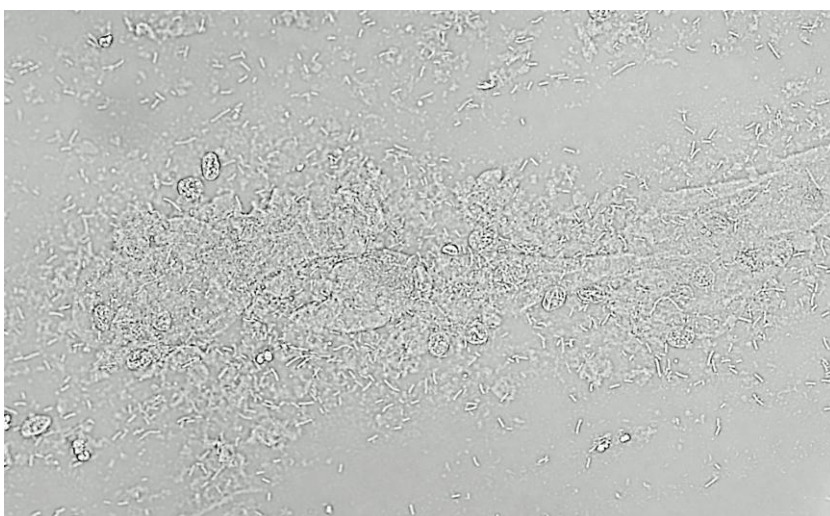


Obsah glykogenu je tedy „*conditio sine qua non*“ pro růst protektivní mikroflóry se symbiotickými kmeny laktobacilů (na poševní sliznici tvoří biofilm). Laktobacily fermentují glykogen na kyselinu mléčnou a okyselují prostředí. Dosud známými obrannými faktory, kterými přispívají k potlačení nežádoucí patogenní mikroflóry je nižší pH, produkce peroxidu vodíku a bakteriocinů. Povrch sliznice je pokryt glykokalyxem a sekretem cervikálních žlázek, které obsahují řadu produktů vrozené i adaptivní imunity. Nelze nezmínit ani možnost transsudace, ale i sekrety Bartholinských žláz a další. Hormonální hladiny menstruačního cyklu řídí cyklické změny růstu, zrání a deskvamace nerohovějícího dlaždicového epitelu, vznikají dobré podmínky pro antimikrobiální ochranu pochvy. Jsou optimální zejména u těhotné ženy, jejíž pochva má silnou slizniční vrstvu, v buňkách nejvíce glykogenu a zároveň mnoho laktobacilů. Napětí kyslíku je u netěhotné ženy v pochvě nízké, poševní prostředí je mikroaerobní až anaerobní. Za menstruace je pO_2 vyšší a podle momentálního množství krve se značně mění. Po menopauze pochva svoji hormonální podporu ztrácí, sliznice atrofuje, stoupá pH a laktobacily mizí. Aréna neustále se měnících fyziologických kontrol je umístěna především v poševní tekutině, která má svůj původ v sekretu děložního hrdla, v transsudátu plazmy, méně v tekutině děložní dutiny, vejcovodů, peritonea a folikulárním moku. Stále se obnovuje a resorbuje nazpět. Spolu se slizničním imunitním systémem, nízkým pH a metabolickými produkty komenzálů se v pochvě účastní boje proti patogenním mikrobům. V reprodukčním období se v cytologickém nálezu fyziologicky nacházejí jen buňky povrchové a intermediální, buňky z hlubších vrstev chybějí.^{32;85;112}

Obr. 6.5 Poševní výtěr – fyziologický nález u 24 leté asymptomatické ženy, dominuje větší množství laktobacilů, nativ, zv. 400



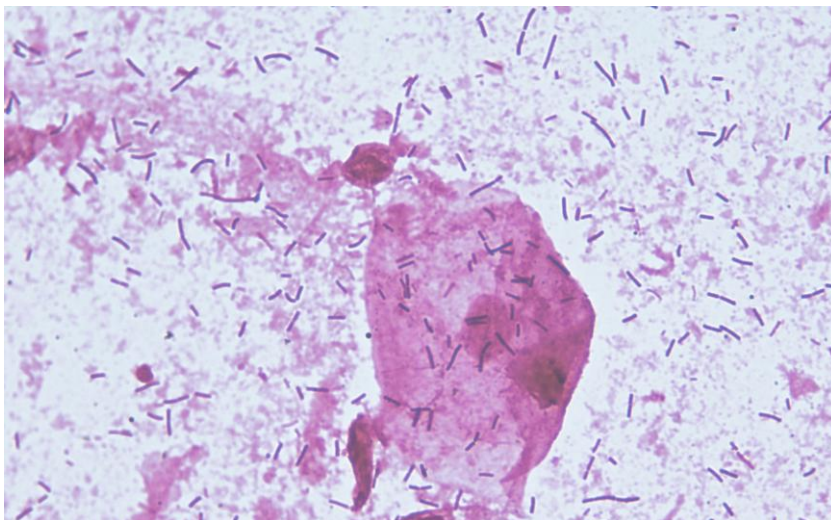
Obr. 6.6 Poševní výtěr – fyziologický nález u 33 leté asymptomatické ženy, laktobacily a susp. kvasinky, nativ, zv. 400



Během vývoje dochází k viditelným změnám také v oblasti zevních rodidel. Vulva novorozence je charakteristicky prosáklá, labia minora, praeputium clitoridis a hymen jsou zduřelé, takže je velké stydké pysky nemohou zakrývat. Po odeznění vlivu mateřských estrogenů se dostávají zevní rodidla do „klidového“ stavu. V tomto období jsou malé stydké pysky nepatrné, podobně i praeputium clitoridis a samotný klitoris. Sliznice poševního vchodu je bledá a jemná. Labia majora se pigmentací ani vzhledem neliší od kůže jiných částí těla. Velká labia kryjí malé pysky, pošťváček, hymen i ústí uretry a uzavírají poševní vchod. V období dospívání se tkáň zevních

rodidel ztlušťují, labia minora se zvětšují, kůže velkých pysků se pigmentuje a objevují se chlupy.

Obr. 6.7 Poševní výtěr – fyziologický nález u 24 leté asymptomatické ženy, Gram, zv. 1000



Mikrobiální osídlení ženského genitálu se během života mění a závisí zejména na aktuálním hormonálním stavu. Fyziologická výbava dává pochvě rozsáhlé možnosti kontroly jejího ekosystému a ochrany proti útokům na její integritu. Nejznámější mikroorganismy, které se v pochvě nacházejí a kterým je obecně připisovaná protektivní úloha, patří do skupiny označované jako *Lactobacillus acidophilus*.^{90;112}

6.4 Pravděpodobné etiopatogenetické aspekty CVD

Společné vyústění močové trubice a pochvy do poševní předsíně, těsná blízkost análního otvoru, ale i potenciální brána vstupu pro sexuálně přenosná onemocnění dává tušit mimořádné exponovanosti vulvovaginální oblasti. Je proto i logické, že mikrobiální původ vzniku obtíží je zvažován vždy na prvním místě.^{88;150;155;223} Jaká změna je schopna posunout kvalitu vnímání je však těžko odhadnutelné. Většinou si klademe otázky, zdali se jedná o infekci nebo jenom o dysmikrobii, posuzujeme přítomnost zánětlivých změn. Má-li být však mikrobiologické hledisko VVD uvedeno seriózním způsobem, je třeba na prvním místě do úvahy vzít

zejména biologii a patogenitu hlavních mikroorganismů, které se v této oblasti mohou vyskytovat. Do popředí stále většího zájmu výzkumu se tak dostává problematika vztahů mikrobiálního společenství v pochvě. Tak jako v jiných tělních kompartmentech je i zde vývoj mikrobioty komplexní proces, ve kterém se uplatňuje řada různých faktorů. Kromě sexuální aktivity se uplatňují ve vulvovaginální oblasti i zevní vlivy a do poměrů v poševním mikroekosystému se tak projikuje řada různých faktorů. K těm nejvýznamnějším patří věk, výživa, oblékání, životní styl a řada dalších.^{43;52;54;59;102;103;133;158;196;199}

Z hlediska hypotézy této práce je však u těchto pacientek neustále nutné myslet právě na kvalitu poševního prostředí, která je nejdůležitějším faktorem a neměli bychom však ani zapomínat i na přítomnost zmíněných zevních faktorů, jejichž finální projekce probíhá i na této úrovni. V každém případě je nutné zohledňovat jejich riziko, na straně druhé proti němu hledat protekci.

6.5 Kvalita poševního prostředí

Kvalita poševního prostředí je závislá na více faktorech, hlavně je však odvozována od stávající hormonální situace. Pohled na vaginální mikroflóru vychází z tradiční představy laktobacilů jako fyziologické složky, která zabraňuje přerůstání patogenních mikrobů. Přestože byla tato koncepce v minulosti několikrát doplněna a zpřesněna, zůstává ve své podstatě platnou. Laktobacilů, které kolonizují pochvu je více druhů než *pouze L. acidophilus*. *Jedná se o L. crispatus, jensenii, gasserii a iners*, a vládne mezi nimi rozdílnost a variabilita. Ne všechny vlastnosti jsou laktobacilům jedinečné. Například tvorba H₂O₂ stejně jako produkce kyseliny mléčné není vlastní všem druhům a kmenům. Uvážíme-li, že minimálně jedna třetina druhů je nekultivovatelných, budeme muset náš dosavadní úhel pohledu na vaginální mikrobiotu poopravit.^{129;146;153;199;229}

Roku 1892 prof. Döderleinem popisuje dva základní typy vaginálního prostředí, který vycházel z nativní mikroskopie poševního sekretu a tím je i definována role laktobacilů jako představitelů normální vaginální mikroflóry. Prof.

Schröder pak dělil vaginální mikroflóru podle přítomnosti laktobacilů do tří hlavních skupin: 1) zdravá mikroflóra s dominantní převahou laktobacilů; 2) intermediární stav; 3) nespecifická vaginitida s minimem nebo absencí laktobacilů. Následně byla pozornost zaměřena na mikrobiální agens, která narušují představu mikrobiálně zdravé pochvy. Brzy byli identifikováni tři hlavní původci: *C. albicans*, *Trichomonas vaginalis* a *G. vaginalis*. Postupně byly vypracovány určité postupy k zpřesnění diagnostiky, např. pro BV byla klinická kritéria podle Amsela a mikrobiologická podle Nugenta. V Česku to byl mikrobiální obraz poševní (MOP), který zahrnoval diagnostiku jak vaginitidy bakteriální vaginitidy, tak i kandidové a trichomonádové.^{112;156;209;210}

Nugentovo skóre v podstatě navazuje na koncept nespecifické vaginitidy, který Gardner spojoval s *Gardnerella vaginalis* jako jediným a hlavním původcem odpovědným za BV. Časem byl tento koncept jednoho druhu modifikován na polymikrobiální s tím, že i další anaerobní bakterie jako *Bacteroides*, *Mobiluncus*, *Prevotella* se podílí na BV a představují patogenní mikrobiotu. Později k těmto druhům přibylo *A. vaginae* a několik dalších, kteří byli považováni za potenciálně patogenní. Uvedený koncept vcelku spolehlivě odděluje zdravou mikroflóru od patologické.^{143;156;208}

Avšak ne vždy objektivní nález odpovídal klinickým projevům a naopak. Potíže jsou spojeny zejména s interpretací Nugentova skóre 4 až 6, které odpovídá intermediární kategorii. Příčinou je částečně nedostatečná citlivost a specifická mikroskopického hodnocení barveného preparátu, částečně definicí samotné BV. Barvení podle Grama poskytuje jenom rozlišení na gram-pozitivní a gram-negativní mikroby, a určení tvaru a uspořádání mikrobů, méně spolehlivé je však kvantitativní hodnocení. Přesnější identifikace vyžaduje sofistikované molekulární metody, v současnosti přicházejí v úvahu hlavně PCR a MALDI-TOF MS. Závažnější se z dnešního hlediska jeví spíše nedostatky koncepce. Zásadní změnou v pohledu na koncepci BV je teorie že *G. Vaginalis*, *A. vaginae* a ostatní anaeroby hrají podstatně výraznější roli ve fungování vaginální mikrobioty, a že pohlavní přenos nemusí souviset ani tak s přenosem patogenních bakterií jako se změnou vaginálních

poměrů a tím i složením mikrobioty, následkem alkalizace pochvy po nechráněném pohlavním aktu.^{117;161;220}

Koncepce fyziologické změny vaginální mikrobioty byla formulována finským lékařem Leppäluotem začátkem 70. let jako alternativa Gardnerovy nespecifické vaginitidy vyvolané *G. vaginalis* přenášené pohlavní cestou.^{124;125} Vychází z předpokladu, že změna poševní mikroflóry je adaptační reakce na alkalizaci prostředí ejakulátem během nechráněného sexu. Výsledkem vytvoření postkoitálních podmínek v pochvě je podpora růstu *G. vaginalis* a jiných fermentujících bakterií, které funkčně nahrazují laktobacily. Postkoitální přítomnost gardnerel popř. dalších anaerobních mikrobů by tak spíše reprezentovala alternativní mikrobiotu, která po přechodnou dobu plní úlohu laktobacilů a je pod vlivem hormonální produkce.^{67;68} To více méně odpovídá současným poznatkům, že vedle normální mikrobioty, která stojí na dominanci laktobacilů, existují zdravé ženy s pestrá sestavou mikrobů bez nebo jen s malým zastoupením laktobacilů.¹⁷³ Rovněž tato koncepce předjímá současné diskuze, do jaké míry jsou tyto alternativní změny stabilní a do jaké míry pružné, tj. schopné návratu do původního složení před inzultem. I v tomto případě hovoří známá zjištění o dynamice vaginální mikrobioty ve prospěch této přehlížené teorie. Dále, tento koncept nastiňuje účel takových změn – dočasnou alkalizací pochvy se vytváří podmínky, které napomáhají přežití spermatozoí z ejakulátu. Případná nestabilita takového systému, která vychází z prekoitálního složení poševní mikroflóry a zvýšeného pH jako důsledku časté alkalizace opakovaným nechráněným pohlavním aktem, by potom mohla odpovídat za část potíží spojovaných s BV. Dodatečným zdrojem bakterií, které by našly uplatnění při BV, popřípadě při následné rekolonizaci do původního stavu by mohla být perianální oblast. Tím je silně narušena představa BV jako primárně pohlavně přenosného onemocnění, což podporují i výsledky některých studií, které v případě BV hovoří spíše o sexem vystupňované (angl. enhanced) infekci endogenního původu. Zároveň by to znamenalo změnu přístupu k terapii, ta by nevyžadovala tak časté zásahy pomocí antibiotik, v řadě případů by stačilo ženě poskytnout čas k úpravě sexuálního života.^{15;45;57;58}

Nedostatky Nugentova skóre při hodnocení bakteriální mikroflóry vedly k rozpracování podobného, na mikroskopii založeného systému skupinou belgických autorů kolem prof. Donderse. Cílem bylo stanovení laktobacilárního stupně pomocí nativní mikroskopie vaginální tekutiny, který umožňuje diagnostikovat poševní mikrobiotu s ohledem na BV a jiné patologické stavy. Systém v podstatě navazuje na Schröderovu trojstupňovou klasifikaci, která byla rozšířena o jednu kategorii, přesněji kategorie II byla rozdělena na podkategorie IIa a IIb. Modifikace tohoto systému rovněž umožnila diagnostikovat autory nově popsanou nozologickou jednotku – aerobní vaginitidu (AV), na základě AV skóre (tab. 6.2), které je výhradně založené na mikroskopii. I zde se navázalo na předchozí známou klasifikaci deskvamační zánětlivé vaginitidy, která v tomto systému odpovídá AV skóre vyšší než 7.^{43;48}

Tab. 6.2 Skórovací systém pro aerobní vaginitidu (AV**Chyba! Záložka není definována.**)*

AV skóre Chyba! Záložka není definována.	Laktobacilární stupeň	Počet leukocytů**	Podíl toxických leukocytů***	Ostatní mikrobiota	Podíl bazálních buněk
0	LBG I/ IIa	≤10	0 až vzácně	nerozlišitelná nebo cytolýza	žádné nebo <1%
1	LBG IIb	>10 + ≤ 10 epitelíí	≤ 50% všech leukocytů	malé koliformní bacily	≤ 10%
2	LBG III	>10 epitelíí	>50% všech leukocytů	koky nebo streptokoky	>10%

LBG – laktobacilární stupeň (angl. lactobacillary grade)

* podle Donderse, ** hpř, počet v zorném poli objektivu 40× a okuláru 10× (angl. high-power field), *** toxické leukocyty mají výraznou granularitu odpovídající silné lysozomální aktivitě

AV skóre: <3 žádné znaky AV

3–4 lehká AV

5–6 střední AV

>6 silná AV (deskvamační zánětlivá vaginitis)

Přístup belgické školy se v principu na vaginální mikrobiotu dívá z opačného úhlu – primárně nehledá patogenní mikroby, ale zda a v jakém stavu je přítomna normální složka – laktobacily. Myšlenkově vychází z odchylky od normálního poševního obrazu zdravé ženy, na kterou můžeme pohlížet jako na ekologickou nerovnováhu (dysbióza), která je charakterizována přítomností „atypických“ fyziologických parametrů a bakterií. Na změnu bakteriální složky je především pohlíženo jako na změnu relativního zastoupení laktobacilů, tj. jejich významným úbytkem nebo absencí. Snížený počet laktobacilů má za následek změny přirozených poměrů ve vagíně a ty potom mohou korelovat ženy vulvovaginálním dyskomfortem.^{43;46;47;49}

Ovšem i tento systém naráží na své limity, např. u stavů jako je intermediární mikroflóra a částečná bakteriální vaginóza. Tento koncept neumí vysvětlit všechny diskrepance mezi změnami mikrobioty a klinickými projevy, neboť nepočítá s tím, že normální mikrobiota nemusí být postavena na dominanci laktobacilů a že u většiny žen složení mikrobioty často podléhá výrazným změnám její dynamiky.

6.6 Koncept normální vaginální mikrobioty

Koncept vaginální mikrobioty můžeme chápat z diagnostického hlediska jako mikrobiální obraz ztotožňující se s fyziologickými poměry, ve kterém dominují laktobacily nebo jiné fermentativní bakterie, které mohou laktobacily funkčně zastoupit a jsou odpovědné za nízké pH. Na odchylku od těchto parametrů může být pohlíženo jako na atypickou mikrobiotu, která nemusí být nutně spojena s patologickými projevy. Složení mikrobioty se nějakým způsobem odráží ve stabilitě a pružnosti vaginálního ekosystému, otázkou je do jaké míry a jaké mechanismy se

přítom uplatňují a jaký to má vliv na kvalitu percepce. Není pochyb o tom, že složení mikrobioty a její změny jsou důležité pro správné fungování pochvy a že také mikroorganismy, které osídlují poševní sliznici, jsou ovlivněny a ovlivňovány celou řadou vnějších i vnitřních faktorů prostředí. Hlavní zbraní laktobacilů a jim podobných fermentujících bakterií jsou kyselé produkty jejich anaerobního metabolismu, zvláště pak kyselina mléčná. Dalším působkem, se kterým se musí případní konkurenti vyrovnat, je peroxid vodíku. Oba faktory vytvářejí primární síto pro všechny potenciální mikrobiální vetřelce, které drží přítomné mikroby zkrátka, tj. v malých počtech a tím brání jejich případnému přemnožení. O tom, jestli existují i jiné látky se selektivním antimikrobním účinkem, které by využívala přirozená vaginální mikrobiota ve svůj prospěch, máme jen omezené množství dokladů.^{5;9;53;65;199;212;215;216}

6.7 Koncept atypické vaginální mikrobioty

Laktobacily nemusí být u všech žen dominantním druhem v tzv. zdravé pochvě. Většina tzv. atypických druhů je přítomna i za normálních poměrů, avšak jen v malém množství a nelze je běžnými technikami zachytit. Neznamená to však, že je celý koncept identifikace původce a jeho korelace s obtížemi pacientky je zcela chybný, ale že řadu dyskomfortních stavů nelze jednoduše přiřadit jednomu nebo několika druhům mikrobů a to může vést k zjednodušení a zavádějícím závěrům. Pokud ano, potom je nemůžeme aplikovat na všechny ženy univerzálně anebo jen časově omezeně. Je tedy nutné nejdříve znovu definovat normální mikrobiotu a následně můžeme redefinovat mikroby a podmínky za jakých působí škodlivě, příznivě či neutrálně a ty navázat na subjektivní a objektivní obtíže pacientky. V tomto nepochybně budou hrát stále větší roli moderní technologie, jejich možnosti a dostupnost. Dá se předpokládat, že žádný univerzální recept nebude nejspíše nalezen a že budeme muset přistupovat ke stále větší části pacientek individuálně ve smyslu personalizované medicíny.^{50;65;77;78;108;117}

Z výše uvedeného vyplývá pro dnešní diagnostiku důležitý závěr: u části pacientek může být hodnocení jednotlivé bakterie zavádějící, a je nutné přihlížet

k jejímu relativnímu množství, přítomnosti či absenci jiných bakterií a to vše v kombinaci s dalšími vyšetřeními (pH, klinické známky zánětu atd.). Z tohoto také vyplývá, že atypická mikrobiota neznamená vždy patologická mikrobiota. Navíc, co pro jednu ženu je typická (normální) mikrobiota, může být pro jinou ženu atypická, jak vyplývá přinejmenším z variabilního zastoupení hlavních morfotypů vaginální mikrobioty v rámci i mezi jednotlivými etniky.

Skutečnost, že normální mikrobiota nemusí být tvořena pouze s laktobacily, upozorňovaly již výsledky předchozích studií. Vzhledem k použité metodice první generace molekulárních metod (PCR-DGGE), se však mohly opřít o studium jen omezeného počtu žen. Každopádně ještě před nástupem nové generace molekulárních technik (pyrosekvenace) byla identifikována skupina anaerobních bakterií podobná spektru BV, respektive skupiny IV, včetně v pochvě nově popsanych druhů jako *Streptococcus* sp., *Veillonella* sp. či *Chloroflexi*.^{25;35;40;166;172;199;201;220;224;230;230;238}

Dle současných znalostí o kolonizaci pochvy bylo vydefinováno pět základních mikrobiálních společenství. Zásadním zjištěním není počet typů, ale fakt, že ne ve všech dominují laktobacily, ale i jiné fermentující bakterie, které je funkčně nahrazují. Toto rozdělení na pět základních typů mikrobioty umožnily vysoce efektivní molekulární techniky (např. pyrosekvenace nové generace). Ve čtyřech typech dominovaly laktobacily – *L. crispatus* (skupina I), *L. gasseri* (skupina II), *L. iners* (skupina III) a *L. jensenii* (skupina V), ve skupině IV jiné fermentující anaerobní bakterie (tab. 6.3). Doposud bylo prostředí zdravé pochvy považováno za druhově chudé, s minimální diverzitou, v němž převažuje jeden morfotyp bakterie – laktobacilus. Nyní jsme konfrontováni s nálezy, kdy ve skupině IV místo převahy laktobacilů nacházíme překvapivě pestré společenství bakterií podobně jako u BV-*Prevotella* sp., *G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Sneathia* a dal. (tab. 3.2).

Tab. 6.3 Charakteristika hlavních typů mikrobiálních společenstev vaginálního mikrobiomu*

	Mikrobiální společenství					
	Skupina I	Skupina II	Skupina III	Skupina IV-A	Skupina IV-B	Skupina V
Hlavní mikroby	<i>L. crispatus</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. iners</i>	<i>Anaerococcus</i> <i>Corynebacterium</i> <i>Fingoldia</i> <i>Streptococcus</i>	<i>Atopobium</i> <i>Prevotella</i> <i>Paryimonas</i> <i>Sneathia</i> <i>Gardnerella</i> <i>Mobiluncus</i> <i>Peptoniphilus</i>	<i>L. jensenii</i>
Vedlejší mikroby	<i>L. jensenii</i> <i>Prevotella</i>	<i>Prevotella</i>	<i>L. jensenii</i> <i>Prevotella</i>	<i>L. crispatus</i> , <i>L. iners</i> <i>Lactobacillus</i>		<i>Prevotella</i>
pH	4,0 – 4,5	4,5 - 5,5	4,0 - 5,0	4,7 - 5,9		4,3 - 5,1
Etnikum **						
Kavkazské	+++	(+)	++	+		(+)
Hispánské	+	(+)	+++	+++		(+)
Asijské	++	(+)	+++	++		(+)
Africké	++	(+)	+++	+++		(+)

* Upraveno podle Ravel et al. 2011 a Gajer et al. 2012

** Zastoupení v rámci skupiny: +++ 30-50%; ++ 30-15%; + 15-10; (+) <10%

Vlastní dělení do pěti skupin bylo částečně modifikováno s tím, že místo skupiny V (dominantní *L. jensenii*), byla blíže specifikována skupina IV, kterou početně a složením neovládají laktobacily, a rozdělena podle složení na podskupiny IVA a IVB. Zatímco skupina IVA je charakterizována minoritní přítomností laktobacilů a bakteriemi jako *Anaerococcus*, *Fingoldia* a/nebo *Streptococcus*, ve skupině IVB prakticky laktobacily chybí a převažují *Atopobium*, *Prevotella*, *Paryimonas*, *Sneathia*, *Gardnerella*, *Mobiluncus* a *Peptoniphilus*.^{65;152;159;167;172;184;207;211}

Současně byla pozornost věnována i dynamice změn složení vaginální mikrobioty. Tyto studie potvrdil předchozí závěry a přinesl řadu nových poznatků, které ukazují, že změny složení a stabilita vaginální mikrobioty jsou ovlivněny řadou faktorů, zejména menstruačním cyklem, druhovým složením dané komunity mikrobu a částečně také sexuální aktivitou.^{7;54;65;66;79;87;103;182;183}

Bylo-li určitým překvapením, že fyziologická kolonizace pochvy nemusí být vždy spojeny jen s laktobacily, pak dalším překvapením bylo zjištění, že složení vaginální mikrobioty se liší mezi hlavními etniky. U všech se setkáváme se všemi pěti základními typy, ale jejich vzájemná proporce uvnitř jednotlivých skupin vykazuje řadu odlišností (tab. 6.3). U kavkazské populace dominuje skupina I s *L. crispatus*, zatímco u zbylých etnik je významněji zastoupen *L. Inek* a obvykle v menší míře zbývající dva laktobacily *L. gasseri* a *L. jensenii*. Naproti tomu vyšší podíl skupiny IV byl zaznamenán u žen hispánského a zvláště afrického etnika. To by mohlo vysvětlovat obecně větší sklon žen hispánského a afrického původu ke vzniku BV. Protože etnické příslušnosti podléhá rovněž kolísání pH pochvy, jehož normální hodnoty jsou u afro-americké rasy v průměru vyšší (pH 4,9), přinejmenším u žen tohoto etnika bude nejspíše nutné do budoucna znovu definovat diagnostická kritéria pro normální mikrobiotu a normální pH. Nutno však dodat, že u všech hlavních typů je možné najít, i když ve výrazné menšině, ženy, které neodpovídají základnímu parametrickému nastavení mikrobiálního profilu dané skupiny.^{62;65;117;161;165;187;187}

Z předchozího vyplývá, že u diagnózy vulvovaginálního dyskomfortu nelze spoléhat jenom na jeden marker (klinický nález, pH nebo přítomnost určitého mikrobiálního monotypu) a na tomto jednom znaku či příznaku stavět diagnosu. Doposud známe jen málo o vzájemných vazbách a interakcích mezi různými mikroby, mikrobiotou a hostitelem, navíc v prostředí s krátkodobými a dlouhodobými fluktuacemi hladin sexuálních hormonů. Důležitou otázkou je, zda strategie dosažení fyziologických poměrů odlišným složením poševní mikrobioty ovlivňuje stabilitu vaginálního mikrobiomu. Tedy do jaké míry je odpovědná za interpersonální rozdíly vnímavosti a odolnosti žen ke změnám vaginálního prostředí v reakci na působení vnitřních a/nebo vnějších faktorů. Identifikace těchto faktorů by mohla pomoci při

rekonstrukci vaginálního mikrobiomu a léčbě různých forem CVD a infekcí pochvy, včetně využití prebiotik a probiotik.^{56;89;117;140;143;173;174;199;203;221}

6.8 Dynamika vaginální mikrobioty

Dynamika a složení mikrobioty je významně spojena s produkcí estrogenů. Ukazuje se, že některé morfotypy vaginální mikrobioty jsou náchylnější ke změnám a jiné jsou odolnější. Studie naznačily, že největší odolnost ke změnám má skupina II s dominancí *L. gasseri*, u které si téměř 90% žen během čtyřměsíční periody sledování zachovalo původní složení mikrobioty, zatímco u žen s typem IV-A to bylo jen 55% (tab. 3.2).¹⁹⁹

Dynamika vaginální mikrobioty je úzce propojena s její stabilitou. Nepochybně se jedná o komplexní a dynamický systém, jehož studium stojí na počátku a odkrývá možnosti hlubšího porozumění vnitřním mechanismům vývoje poševní mikroflóry a tím i cílených reparačních a terapeutických zásahů do jejího složení v případě obtíží.^{43;65;103}

Vaginální mikrobiota podléhá krátkodobým i dlouhodobým změnám (kvalitativním i kvantitativním). Toto se děje hlavně vlivem věku, menstruačního cyklu nebo v reakci na antibiotickou či hormonální terapii. Studie využívající kvantitativní PCR částečně objasnily problematiku vlivu hormonů na vaginální mikrobiotu. Navázaly na práce, které dlouhodobě sledovaly ženy a jejich mikroflóru na základě mikroskopického vyšetření barvených preparátů. U poloviny hodnocených žen, byly zaznamenány v průběhu menstruačního cyklu změny mikrobioty; u čtvrtiny se vyvinula částečná nebo úplná BV a to přednostně během prvních devíti dnů cyklu. To odpovídá období přirozené alkalizace pochvy na začátku menstruačního cyklu. Využití kvantitativní PCR přineslo další informace o dynamice vaginální mikrobioty během menstruačního cyklu. V průběhu menstruace počty laktobacilů u sledovaných žen klesaly a zastoupení *G. Vaginalis* stoupalo, obvykle však výrazněji než byl pokles laktobacilů. V případě žen s mikrobiotou podobnou BV (skupina IV) byl průběh podobný, ale odrážející odlišné základní složení její mikrobioty. To odpovídá

předchozímu pozorování vlivu menstruace na vaginální mikrobiotu, ve kterých byl zaznamenán podobný nepřímo úměrný vztah mezi anaeroby (*G. vaginalis*, *Bacteroides*) a laktobacily. Využitím pyrosekvenční metody bylo zjištěno, že výkyvy složení vaginální mikrobioty jsou do značné míry individuální a lze je rozdělit do dvou hlavních skupin. Buď mikrobiota žen v průběhu menstruace vykazuje značnou ekologickou adaptační odolnost (angl. resilience), tj. vyznačuje se předvídatelným návratem do původního stavu po odeznění měsíčků, nebo může během menstruačního cyklu odolávat jakýmkoliv změnám popřípadě plynule, bez ohledu na vnější podněty, přechází z jednoho stavu do druhého.^{15;65;86;103;195-199}

6.9 Biofilm

Vznik biofilmu je výsledkem morfogenetických změn jednoho nebo více mikrobů a jejich vzájemné kooperace a interakce se specifickými životními podmínkami daného prostředí. Tento proces nakonec vede ke vzniku jedinečného společenstva, v rámci kterého nejenom že jednotlivé mikroorganismy mají obvykle zcela odlišné vlastnosti než jejich planktonické formy, ale zároveň, v případě polymikrobiálního biofilmu, vytvářejí jako celek novou kvalitu.^{42;206}

6.9.1 Bakteriální biofilm

Spojení mezi tvorbou biofilmu a BV. a dalšími komplikacemi je nejlépe popsáno u *G. vaginalis*. a *A. vaginae*, u kterých byla tato schopnost také experimentálně prokázána.^{61;131} Tato strategie jim zřejmě umožňuje přizpůsobit se prostředí relativně chudému na živiny a lépe odolávat stresovým vlivům jako je antibiotická terapie. Snížená citlivost k metronidazolu může přispívat k zjevné diskrepanci ve výsledcích terapie BV metronidazolem vyjádřené vysokou frekvencí relapsů dosahujících až 50%. Kmeny gardnerel získané od pacientek s BV měly výrazně větší schopnost tvořit biofilm a zároveň i vyšší cytotoxicitu a přilnavost i k vaginálním epitelialním buňkám než od zdravých kontrol.^{117;131;143;199} Je rovněž

doloženo, že v biofilmu několikanásobně stoupá odolnost gardnerel k působení peroxidu vodíku (4×), laktátu (8×) i metronidazolu ve srovnání s planktonickou formou.²⁰² Zjistilo se, že existují dvě formy biofilmu – kohesivní (masivně adheované gardnerely) a dispergovaná (jednotlivé gardnerely společně s dalšími bakteriemi). Kohesivní forma je prakticky výhradně svázána s BV a nevyskytuje se u zdravých žen. Tyto nálezy podporují možnost přenosu BV pohlavní cestou, zvláště když kohesivní forma není přítomna u dívek, ale byla prokázána v ejakulátu sexuálních partnerů žen s BV. Bližší analýza *G. vaginalis* ukázala, že pokud se jednalo o smíšený biofilm, jedinou bakterií, která v něm měla významnější podíl, byla *A. vaginae*.^{37;116;169;184;199;201;205;207;216;238}

6.9.2 Kvasinkový biofilm

Kvasinky rodu *Candida* mají schopnost tvořit biofilm ať už na umělých površích jako jsou katétry či zubní náhrady nebo sliznicích. Většina poznatků o kvasinkovém biofilmu pochází ze studia modelů na umělých površích a pokusných zvířatech. Je známo, že u pacientů s umělými náhradami, včetně intravaskulárních přístrojů, mohou kvasinky resp. biofilm značně komplikovat léčbu a podílet se na zvýšené morbiditě a mortalitě zejména u hospitalizovaných pacientů.^{77;163;170;171}

Tvorba biofilmu probíhá v několika etapách. Během časně fáze kvasinkové buňky adherují k vhodnému povrchu a prochází morfologickou konverzí ve vláknitou formu. V intermediární fázi pokračuje růst ve formě hyf a začíná se tvořit extracelulární matrix (ECM) především z polysacharidů a proteinů houbové stěny. Zralý biofilm je nakonec tvořen smíšenou houbovou morfologií (hyfy a kvasinky) tvořící komplexní strukturu s ECM. Finální stádium je charakterizováno na jedné straně vysoce komplexní stavbou, na straně druhé schopností se šířit uvolňováním planktonických kvasinek.^{76;199}

Do nedávna unikala větší pozornosti schopnost kandid tvořit biofilm na vaginální sliznici a jeho role v patogenezi kandidové vulvovaginitidy. Pomocí myšího modelu, se prokázalo, že vaginální biofilm *C. albicans* má typickou architekturu,

včetně extracelulární matrix, a jeho tvorba je geneticky podmíněna morfogenetickou transformací kvasinkové formy v hyfovou. Mechanismus kontroly tvorby kandidového biofilmu spočívá ve vzájemném sladění aktivity quorum sensing farnesolu a tyrosolu. Tyrosol podporuje vláknitou formu *C. albicans*, která se uplatňuje v časně fázi tvorby biofilmu. Farnesol naproti tomu potlačuje růst vláknitého mycélia a procesu klíčení, ale ne růst samotného biofilmu. To umožňuje v pozdějších stádiích zrání a šíření biofilmu, které se projevuje uvolňováním planktonické, kvasinkové formy.^{33;64;171;193}

Zajímavé je zjištění, že IUD může v pochvě poskytovat platformu pro růst bakterií a kvasinek v biofilmu a stát se tak zdrojem či rezervoárem patogenních mikrobů a možná tak i přispívat k vyšší rozmanitosti vaginální mikrobioty. S tím korespondují výsledky studií, ve kterých ženy s IUD trpěly častěji BV než ty, které používaly jiný typ antikoncepce.^{27;29;163;170}

6.10 Metabolická kooperace a interakce mezi bakteriemi

Vzájemná provázanost na úrovni metabolických drah je u poševní mikrobioty nejlépe zdokumentována u *Gardnerella vaginalis* a *Prevotella bivia*. *P. bivia* produkuje amoniak, který slouží gardnerelám jako růstový substrát a gardnerely na oplátku zase poskytují prevotelám potřebné aminokyseliny. Dalším příkladem je koincidence *G. vaginalis* a *Atopobium vaginae*, která, zvláště když se jedná o vyšší nálož obou druhů, silně koreluje s projevy BV. Na druhé straně z jiných studií vyplývá, že jsou gardnerely pravidelně izolovány společně s *L. iners*. Je tedy zřejmé, že výsledné vyznění přítomnosti gardnerel bude do nějaké míry ovlivněno přímo nebo nepřímo vazbou na jiné mikroorganismy. Klíčovou roli bude nejspíše zaujímat schopnost tvořit biofilm.^{8;12;20;28;34;37;51;63;144;145;169;170;184;190;192;233}

Zdali je možné metabolické ovlivnění mezi bakteriemi a kvasinkami, nelze jednoznačně potvrdit. Stimulaci kandidami bylo možno pozorovat u laktobacilů i na běžných kultivačních půdách, na druhé straně, pokud byly laktobacily ve výrazné početní převaze (1000:1), růst kandid byl potlačován. Otázkou zůstává, zda k tomu

došlo metabolickou deprivací nebo zvýšením koncentrace některého z protikandidových působků jako je peroxid vodíku či bakteriociny.^{111;137;199;204;222}

Experimentálně bylo prokázáno vzájemné ovlivňování bakterií pomocí různých inhibičních látek, včetně druhů, které jsou trvalou nebo přechodnou součástí vaginální mikrobioty. Jedná se pravděpodobně o důsledek interference s tvorbou acyl-homoserinových laktonů – quorum sensing molekul.^{96;171}

6.11 Quorum sensing molekuly

Přestože mikroorganismy nemají smyslové orgány, mohou hodnotit okolní prostředí a komunikovat navzájem pomocí quorum-sensing molekul (QSM), tab. 6.4. QSM jsou extracelulární signální molekuly sloužící k základní komunikaci mezi mikroorganismy. U kvasinek, zvláště pak u *C. albicans*, např. řídí přeměnu z hyfální na jednobuněčnou blastickou formu a naopak (dimorfismus). Ve spojitosti s *C. albicans* byly identifikovány QSM: tyrosol, farnesol a kyselina farnesolová.^{36;80;91;123}

QSM mohou, aktivací příslušného genu, regulovat virulenci, morfologii a další vlastnosti mikroorganismů. Pro příklad, farnesol blokuje přeměnu kvasinky z blastospor ve vláknitou formu, a naopak tyrosol podporuje přechod ze stadia blastospor v pseudohyfu.

Pro klinickou praxi by mohlo být přínosné vytvořit metodu ke stanovení přítomnosti a množství QSM v poševním prostředí a tím pádem i lépe odhadnout invazivní potenciál kvasinek.^{17;22;30;73;80;81;91;92;96;113;127;160;185;189}

Tab 6.4 Příklady QS molekul a jejich účinku u bakterií a kvasinek

Mikroorganismus	Quorum sensing molekuly	Účinek, vliv
Gram-negativní bakterie		
<i>Vibrio fischeri</i>	acyl-homoserin laktony	
<i>Pseudomonas spp.</i> (vč. <i>Ps. aeruginosa</i>)	acyl-homoserin laktony 2-alkyl-4-chinolony (PQS) buryrolaktony derivát benzensulfonamidu diketopiperaziny	↓ hyfové fáze <i>C. albicans</i>
<i>Escherichia coli</i> EHEC		
Gram-pozitivní bakterie		
<i>Staphylococcus aureus</i>	peptid se skupiny cyklických thiolaktonů	
<i>Enterococcus faecalis</i>		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>		
Kvasinky		
<u><i>Candida albicans</i></u>	farnesol tyrosol	<i>C. albicans</i> : ↑ kvasinkové fáze, ↓ biofilm ↑ virulence <i>C. albicans</i> , ↓ IL-12, ↑ IL-6 ↓ oxidativní stress <i>Ps. aeruginosa</i> : ↓ PQS / ↑ fenanzinové toxiny <i>Staph. aureus</i> : ↓ biofilm, ↑ citlivosti k ATB <i>C. albicans</i> : ↑ hyfové fáze, ↑ biofilm
<i>Saccharomyces spp.</i>	amoniak	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	QS-like peptid (QSP1)	podpora růstu <i>in vitro</i> při nízké denzitě inokula

6.12 Genetické faktory vzniku VVD

Obranyschopnost člověka podléhá prastarým mechanismům evoluce (přizpůsobovat a měnit se), jedním z projevů je polymorfismus genů, který poskytuje možnosti, zda budeme odolávat, tolerovat či podléhat infekčním agens.^{82;98;178;226;227}

V souvislosti s kandidovými infekcemi bylo identifikováno několik genových polymorfismů, z nichž některé mají velmi blízko k VVK. Zřejmě nejvíce prozkoumaný je gen *MBL2* (mannose binding lectin), který u kavkazské populace kóduje MBL proteiny a má tři funkční polymorfismy exonu 1 v místě kodonu 54 MBL proteiny patří mezi proteiny akutní fáze, nacházíme je v séru, ale také ve vaginální tekutině, kde fungují jako opsoniny.^{59;71;84} Pokud jsou přítomny v deficitním množství, v menší míře se vážou na příslušné ligandy kvasinek, které potom nejsou efektivně eliminovány přirozenou imunitou. Výsledky bádání nejsou jednoznačné. Zvýšená frekvence MBL polymorfismu (alely B) u pacientek s rekurentní formou VVK byla nalezena u brazilské, lotyšské, čínské a belgické populace, která byla spojena se sníženou produkcí MBL proteinu. Podobná souvislost byla prokázána také u rekurentní bakteriální vaginózy. Na druhé straně, jiné výzkumné týmy poukázaly na metodologické problémy spojené se stanovením MBL a nepotvrdily výše uvedené závěry. Naopak hodnoty MBL proteinu byly vyšší u pacientek s rekurentní VVK v porovnání s kontrolní skupinou a také u kultivačně pozitivních žen s rekurentní VVK než kultivačně negativních u téže skupiny.^{10;13;38;44;71}

Zdá se, že spojení mezi MBL polymorfismem a jeho produkty nebude jednoznačné a bude podléhat jistému stupni. Toto podpořily práce, které naměřily vyšší hladiny MBL proteinů u žen, které braly hormonální antikoncepci či používaly nitroděložní tělíška. Naproti tomu nositelky alely B měly nižší hladiny MBL po léčbě flukonazolem, což lze vykládat jako sníženou nálož kvasinek v pochvě v reakci na úspěšnou antimykotickou terapii. Z klinického pohledu je rovněž zajímavé zjištění, že vazba MBL proteinů na *C. albicans* je pH dependentní – vzrůstala od hodnoty pH 4,0 po 5,5. Mohl by to být mechanismus jak při normálním pH, zdravých poměrech, tlumit zánětlivou reakci sníženou opsonizací. Takto by se mohl MBL selektivně vyvázat ze

své role v rámci vaginální imunity, tj. chránit před potenciálně nebezpečnými mikroby v době, kdy jsou pod vlivem estrogenů a progesteronu potlačeny lokální obranné mechanismy (tvorba IgG, IgA) během proliferační a sekreční fáze.^{54;107;147;198}

Má se za to, že MBL polymorfismus je v souvislosti s *C. albicans* také sdružený s vývojem primárního vulvárního vestibulárního syndromu a se sníženou produkcí TNF- α v reakci na mikrobiální komponenty. To, že MBL proteiny možná zasahují v širším kontextu do poševní imunity, naznačilo zjištění, že jejich snížené hladiny představují rizikový faktor ovariálního karcinomu.^{14;74;97;126;126;225;236}

Protihoubovou imunitu mohou ovlivňovat i jiné polymorfismy, např. genu pro interleukin-4 (IL-4), jehož vaginální koncentrace jsou u žen s RVVK vyšší než u zdravých kontrol. Hladiny IL-4 bylo nepřímo úměrné koncentraci MBL proteinů a oxidu dusného, který má výrazný inhibiční efekt na protikandidovou aktivitu makrofágů. Samotný IL-4 imunosupresivně působí tím, že potlačuje rozvoj prozánětlivé T_{H1} buněčné imunity a blokuje aktivaci makrofágů, což může přispívat k rozvoji RVVK.^{14;72;151;154;168;199;200;217;232}

Nutno však zdůraznit, že co se polymorfismu jedná, jde o genetickou dispozici, která se nemusí vždy realizovat. Avšak v případě vytvoření vyhledávací diagnostické metody, by mohla být tato využita při vyhledávání osob v riziku či náchylnosti k určitým nemocem.¹⁷

7. SOUBOR PACIENTEK A POUŽITÉ METODY

Studie probíhala v letech 2008-2013. Do studie bylo zařazeno 106 žen, které splňovaly vstupní kritéria pro CVD. Před vlastním zařazením do souboru byly tyto ženy sledovány po dobu 1 roku a vyšetřeny minimálně 2x v období výskytu obtíží a 2x v období remise. Soustředili jsme se zejména na běžně dostupná vyšetření: u každé pacientky byla odebrána podrobná anamnéza, provedeno klinické vyšetření (tab. 7.1 - gynekologické vyšetření, měření vaginálního pH, sniff test, popsán charakter výtoku, odběr z cervixu na vyšetření chlamydiové cervicitis, odebrána kultivace z pochvy), doplněné mikroskopickým vyšetření, odebrání materiálu k nátěru na mikroskopická skla a jejich následné vyhodnocení (nativní a barvený preparát) (tab. 7.2). Kontrolní skupinu tvořilo 48 pacientek, které anamnesticky netrpí CVD, tj. mají méně než tři ataky VVD za rok. U těchto pacientek bylo provedeno pouze jedno vyšetření, ale dle obdobného vyšetřovacího algoritmu jako pacientky s CVD.

Tab. 7.1 Ambulatiní vyšetření pacientek pro CVD

Vyšetření	Provedení a hodnocení
Vyšetření zevního genitálu a vulvoskopie	Přítomnost zánětu (vestibulitis), kondylomat, štětíčkou vymezíme rozsah obtíží
Vaginální vyšetření v zrcadlech a kolposkopie	Přítomnost, kvalita a kvantita výtoku, známky kolpitis či cervicitis
Bimanuální vaginální vyšetření	Bolestivé pohyby čípku, tonus/spasmus svalů dna pánevního, bolestivost v oblasti uretry a močového měchýře
pH	Měření pH papírkem
Mikroskopie	Stěr z laterální stěny poševní a nanesení sekretu na 3 podložní skla (1x nativní mikroskopie, 1x nativní mikroskopie s KOH, 1x barvený preparát)
Vyšetření chlamydií	Kartáčkový stěr z endocervixu, PCR vyšetření na chlamydiovou DNA
Sniff test	Stěr z pochvy na sklíčko s kapkou 10% KOH
Kultivace	Odběr ze zadní klenby poševní

Tab. 7.2 Nativní mikroskopie

Objekt	Co sledujeme
Epitele	Přítomnost/množství, clue cells, parabazální buňky
Tyče-laktobacily	Přítomnost a množství – počet na jednu epitelovou buňku, délka (leptotrichia)*
Koky a jiné bakterie	Přítomnost
Trichomonády	Přítomnost
Leukocyty (polymorfonukleární)	Přítomnost a množství
Kvasinky, pseudomycelium	Přítomnost a množství
Nativní mikroskopie s KOH	Přítomnost kvasinek

* Výrazný úbytek laktobacilů = méně než 10 laktobacilů na jednu epitelovou buňku, absence laktobacilů = méně než 2 laktobacily/1 epitelovou b.

Soubor pacientek dotazníkové studie

Dotazníkové části studie se účastnilo 65 žen, 39 pacientek vrátilo dotazník zcela vyplněný. V dotazníku je 50 otázek, a prakticky každá otázka má i podotázku. Na první straně dotazníku jsou informace pro pacientku o cílech studie a návod k vyplnění. Jasně je zdůrazněna anonymita dotazníku. Většina otázek se vyplňuje zaškrtnutím, u několika otázek je však požadována i slovní odpověď. Otázky byly strukturovány do níže uvedených tematických okruhů.¹²²

1. Gynekologické obtíže a jejich léčba: V prvních třech otázkách pátráme po výskytu a frekvenci gynekologických obtíží, které by mohly souviset s CVD. Ptáme se na období několika posledních let. V dalších otázkách je pacientka dotazována na předchozí medikaci, zda a jak byla vyšetřena gynekologem a zda-li byla léčba i v obdobích remise (preventivně) či jen při obtížích. Pacientky s CVD pak odpovídaly i na doplňující otázky: jaké aktivity jsou onemocněním nejvíce omezeny, snažily se odhadnout příčinu obtíží a porovnat změny v aktivitách vykonávaných v době bez a s obtížemi.
2. Menstruace: Otázky se týkaly pravidelnosti menstruačního cyklu, trvání menstruace, menarche, používané hygienické potřeby a na možnou souvislost obtíží a fází menstruačního cyklu.

3. Gravidita: Počet abortů, umělých přerušení gravidity a porodů, případně i sterilitu a výskyt obtíží (VVD) v průběhu těhotenství.
4. Oblékání a osobní hygiena: Otázky byly cíleny na druh oblíbeného oblečení - spodního prádla, kalhot a sukní. Dále pak na druh osobní hygieny, její četnost a použité hygienické pomůcky, způsob úpravy pubického ochlupení, preference vložek či tamponů, používání a frekvence poševních výplachů a gelů a teplotu praní prádla.
5. Stravovací návyky: Dotazované zde vyplňovaly průměrnou spotřebu mléčných výrobků, různých nemléčných nápojů a vyjmenovaných potravin. Respondentky také zaznamenaly eventuelní užívání přípravku s probiotikem nebo se zinkem, a zda-li užívání těchto přípravků přineslo nějakou změnu.
6. Zdravotní stav: Otázky jsou zaměřeny na alergii či výskyt projevů možné alergie a zda ženy kouří.
7. Antikoncepce: Dotazy na formu antikoncepce a respondentky odhadovaly možnou souvislost této se změnou zdravotního stavu (CVD).
8. Intimní život: V těchto otázkách byly respondentky dotazovány na koitarche a začátek pravidelného pohlavního života, počet partnerů, pravidelnost a četnost styku, provozované a preferované sexuální praktiky, nutnost užití lubrikantů a pocity při styku. Pacientky hodnotily, zda a do jaké míry CVD zasahuje do jejich sexuálního života.
9. Životní spokojenost: Dotazované ženy vybíraly ze škály odpovědí velmi nespokojena až velmi spokojena. Otázky se týkaly zdraví, financí, volného času, partnerství či manželství, spokojenosti s vlastní osobou, bydlením a přátelstvím. Z těchto otázek byla vyhodnocena míra zranitelnosti stresem.
10. Demografie: V závěru jsme zjišťovali věk, výšku, hmotnost, rodinný stav, vzdělání, zaměstnání a sdílení domácnosti.

Soubor pacientek s CVD a kontrolní skupina (dotazníková studie)

Kontrolní skupinu tvoří 32 žen, které byly zařazeny do kontrolní skupiny při vyhodnocování již dříve distribuovaných dotazníků hodnotících výskyt CVD v

populaci. K vytvoření kontrolní skupiny byly určeny otázky 1 – 3, které byly vytvořeny tak, že při dotazu na výskyt CVD byla odpověď negativní. Ženy v kontrolní skupině tedy neudávají svědění a pálení genitálu, ani výtoky či otok, a bolesti zevního genitálu, vyskytující se více než třikrát za rok, během posledních pěti let.

Skupinu žen s CVD tvoří 39 pacientek poradny pro chronický vulvovaginální dyskomfort, Porodnické a gynekologické kliniky FNHK, u kterých byl CVD již prokázán. Avšak i v dotaznících jsou kritéria pro CVD splněna, tj. výskyt obtíží (pálení svědění, výtok, vulvodynie) 3 a vícekrát v posledním roce.

Zpracování dotazníků

Dotazníky byly zpracovány za pomoci skeneru HP ScanJet 8270C. Přečtení a zaznamenání dat umožnila softwarová aplikace FineReader v. 4, kde jsme vytvořili šablony pro každou stranu dotazníku. Všechny dotazníky jsme převedli do elektronické formy, každou stranu jsme překontrolovali a porovnali s originálem.

Data jsme převedli do LibreOffice Calc., kde každému dotazníku přísluší jeden řádek tabulky. Číselné hodnoty v buňkách vyjadřují určitou odpověď na danou otázku. Hodnota (-1) znamená nezaškrtnutí žádné z nabízených odpovědí dané položky. Takto získaná data byla dále zpracována a vyhodnocena.

Vyšetření QSM a MBL

Ve 3. fázi studie bylo vyšetřeno celkem 48 pacientek na přítomnost QSM. 21 (43.8%) pacientek s CVD a 27 (56.2%) žen tvořilo kontrolní skupinu. Odběry byly provedeny u skupiny žen s CVD a bez CVD. Odběr QSM byl proveden speciálně pro tento účel vytvořenou komůrkou, obr7.1.

Obr. 7.1 Odběrová vaginální komůrka



Komůrka má dva kanály, jeden pro stříkačku s fyziologickým roztokem a druhý sloužící jako přetlakový kanál. Důvodem pro vytvoření komůrky byla nutnost přesně vymezit oplachovanou plochu poševní sliznice s co nejpřesněji definovaným množstvím tekutiny použité k oplachu sliznice. Komůrka se přiložila na sliznici přední stěny poševní, 5 ml fyziologického roztoku se vstříklo do komůrky a tento byl poté opět nasát zpět do stříkačky. Odebraná tekutina byla rozdělena do zkumavek po 1 ml a tyto neprodleně odeslány k dalšímu zpracování na mikrobiologii. Materiál z jedné zkumavky byl zpracován mikrobiologicky k průkazu a eventuálnímu přesnému určení druhu kvasinky. Ostatní vzorky byly, před dalším zpracováním, zmrazené na -80°C . Následně, po rozmrazení, byla tekutina vyšetřena na přítomnost QSM za použití ultravysokotlaké kapalinové chromatografie (ultra high performance liquid chromatography, UHPLC).⁷³

V případě MBL bylo vyšetřeno 24 vzorků DNA od pacientek s diagnózou rekurentní vulvovaginální kandidóza (medián věku 33 roků, rozmezí 18-47 roků) a 24 vzorků od zdravých žen (medián 31 roků, rozmezí 25-54 roků).

7.1 Vyhodnocení dat

Data byla nejprve uspořádána do tabulky v programu MS Excel. Následně pro část dat použita clusterová analýza k získání přehledu o možných souvislostech sledovaných znaků v souboru.

Pro účely hodnocení dotazníkové studie bylo třeba data řádně zorganizovat. Pro každou podotázku či část podotázky jsme vytvořili samostatný sloupec s originálním názvem začínajícím číslem otázky, názvy jsme pak seřadili abecedně. Každý řádek zase náležel jedné respondentce. Pro sloupce jsme vytvořili filtry pro lepší manipulaci s výsledky. Pro statistické hodnocení dat jsme použili následující statistické funkce.

Shluková analýza

Shluková analýza (clusterová analýza) je vícerozměrná statistická metoda, která se používá ke klasifikaci objektů. Slouží k třídění jednotek do skupin (shluků) tak, aby si jednotky náležící do stejné skupiny byly podobnější než objekty ze skupin různých. Shlukovou analýzu je možné provádět jak na množině objektů, z nichž každý musí být popsán prostřednictvím stejného souboru znaků, které má smysl v dané množině sledovat, tak na množině znaků, které jsou charakterizovány prostřednictvím určitého souboru objektů, nositelů těchto znaků. Shluková analýza vychází z podobnosti, resp. vzdálenosti objektů.

Chí-kvadrát

Chí-kvadrát se používá pro testování hypotéz o kategoriálních znacích. Je to neparametrická metoda, která zjišťuje, zda mezi dvěma kategoriálními znaky existuje

prokazatelný výrazný vztah. Porovnává pozorované četnosti s četnostmi očekávanými za platnosti nulové hypotézy.

Vztah pro výpočet tohoto testu je:

$$\chi^2 = \left(\frac{ad - bc}{n_A + n_B} \right)^2 \left(\frac{1}{a_0} + \frac{1}{b_0} + \frac{1}{c_0} + \frac{1}{d_0} \right) \quad \text{kde} \quad a = k_A, \quad b = k_B, \quad c = n_A - k_A,$$

$$d = n_B - k_B$$

$$a_0 = (k_A + k_B) \cdot n_A / (n_A + n_B), \quad b_0 = a + b - a_0, \quad c_0 = n_A - a_0, \quad d_0 = n_B - b_0$$

k_A, k_B = počet výskytu znaku

n_A, n_B = počet pokusů náhodného jevu A, B

Statisticky významný rozdíl dvou kvalitativních znaků byl se spolehlivostí p prokázán, pokud byla splněna nerovnost $pc > c$.

Pro tento test jsme použili šablonu Chikvadr v programu MS Excel.

T-test

K testování hypotéz o populačním průměru daného kvantitativního znaku se používá tzv. Studentův t-test. Principem je předpoklad, že pokud náhodný výběr pochází z normálního rozdělení, pak výběrový průměr má také normální rozdělení se stejnou střední hodnotou. Rozdíl výběrového průměru a střední hodnoty normovaný pomocí skutečného rozptylu by pak měl normální rozdělení s nulovou střední hodnotou a jednotkovým rozptylem. Skutečný rozptyl však neznáme. Pokud jej nahradíme odhadem pomocí výběrového rozptylu, dostaneme T rozdělení, které je podobné normálnímu rozdělení.

T-test je metodou matematické statistiky, která umožňuje ověřit některou z následujících hypotéz:

1. zda normální rozdělení, z něhož pochází určitý náhodný výběr, má určitou konkrétní střední hodnotu, přičemž rozptyl je neznámý
2. zda dvě normální rozdělení mající stejný (byť neznámý) rozptyl, z nichž pocházejí dva nezávislé náhodné výběry, mají stejné střední hodnoty (resp. rozdíl těchto středních hodnot je roven určitému danému číslu). V praxi to

znamená, že t-test porovnává, zda se výsledky měření na jedné skupině významně liší od výsledků měření na druhé skupině. Hypotéza se zamítá v případě, že veličina T překročí kritickou hodnotu T rozdělení o uvedeném počtu stupňů volnosti.

V našem případě jsme pracovali s dvouvýběrovým nepárovým t-testem

Vyjádření významnosti

Počet hvězdiček u konkrétní podotázky vyjadřuje hladinu spolehlivosti, na níž byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi skupinou CVD a kontrolní skupinou.

jedna hvězdička – hladina spolehlivosti 0.95,

dvě hvězdičky – hladina spolehlivosti 0.99,

tři hvězdičky – hladina spolehlivosti 0.999.

8. VÝSLEDKY

Vyhodnocením dat získaných v 1. fázi studie byly charakterizovány ženy ve skupině s CVD a ženy kontrolní skupiny. Průměrný věk pacientek s CVD je 31 roků a většinou se jedná o ženy v produktivním věku (19-45 let, n=87, 82.2%, tab. 8.1 a 8.2, graf 8.1), v naprosté většině případů zdravé, bez zjevného spouštěcího momentu a bez vztahu obtíží k menstruačnímu cyklu. Nebyl signifikantní rozdíl mezi výskytem nemocí (hypertenze, hypotyreóza atd.) ve skupině žen s CVD a kontrolní skupině. Nebyl zjištěn ani signifikantní rozdíl ve výskytu alergií (prach, pyl atd.). Obě skupiny byly srovnatelné i co do užívání antikoncepce a počtu gravidit a porodů, graf 8.2-4, tab. 8.3-6.

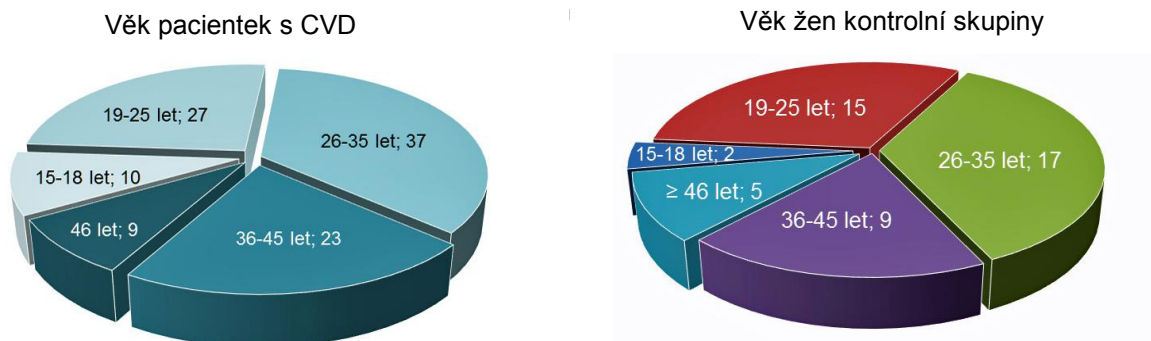
Tab. 8.1 Věkové rozdělení pacientek s CVD

Věkové rozmezí (roky)	Počet pacientek (n=106)	%
15-18	10	9.3
19-25	27	25.5
26-35	37	35.0
36-45	23	21.7
≥46	9	8.5

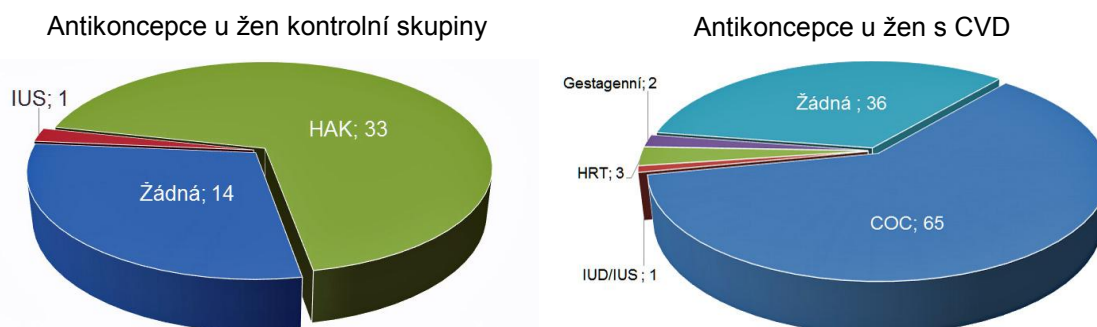
Tab. 8.2 Věkové rozdělení u žen kontrolní skupiny

Věkové rozmezí (roky)	Počet pacientek (n=48)	%
15-18 (17)	2	4.1
19-25	15	31.25
26-35	17	35.4
36-45	9	18.75
≥46	5	10.4

Graf. 8.1 Věkové rozdělení u žen s CVD a kontrolní skupiny

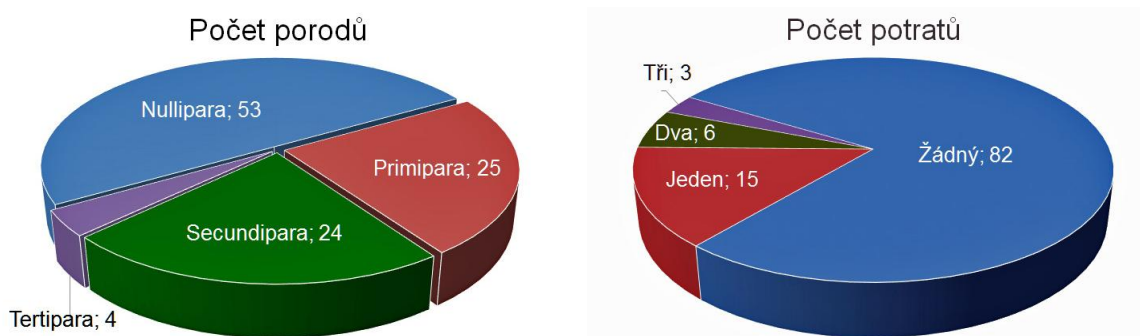


Graf. 8.2 Druh antikoncepce u žen s CVD a kontrolní skupiny



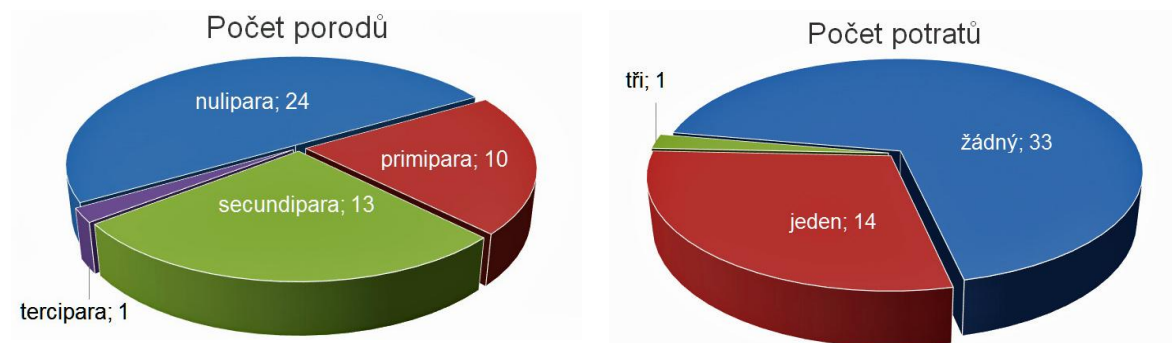
IUS/IUD – Intrauterine system/Intrauterine device, HAK – Hormonální antikoncepce, COC – Kombinovaná orální kontracepce, HRT – Hormonal replacement therapy, Gestagenní – Čistě gestagenní antikoncepce

Graf. 8.3 Počet gravidit u pacientek s CVD



Počet nulligravid ve skupině žen s CVD byl 47 (44%).

Graf. 8.4 Počet gravidit u pacientek kontrolní skupiny



Tab. 8.3 Výskyt nemocí u pacientek s CVD.

Onemocnění	Astma bronch.	Deprese	Ewingův sarkom	Hashimotova struma	Hypo-thyreosa	m. Leiden	Hypertenze	Migréna	Osteoporosa	Sterilita	VAS
Počet pacientek	3	2	1	1	3	1	1	1	1	1	1

Tab. 8.4 Výskyt nemocí u pacientek kontrolní skupiny.

Onemocnění	Hypothyreosa	Hypertenze	Astma bronch.	Osteoporosa
Počet pacientek	2	1	1	1

Tab. 8.5 Chirurgické zákroky u pacientek s CVD

Výkon	Hysterektomie	Appendektomie	Excise z vulvy	SAD	Konisace	CHCE	Císařský řez	Thyrei-dektomie	LPSK diag.	Adnexektomie
Počet pacientek	2	9	2	2	2	1	1	1	2	1

SAD - supravaginální amputace dělohy, CHCE – cholecystektomie

Tab. 8.6 Chirurgické zákroky u pacientek kontrolní skupiny.

Výkon	Císařský řez	Tonsil-ektomie	Adnexektomie	RCUI	Append-ektomie
Počet pacientek	2	1	1	1	2

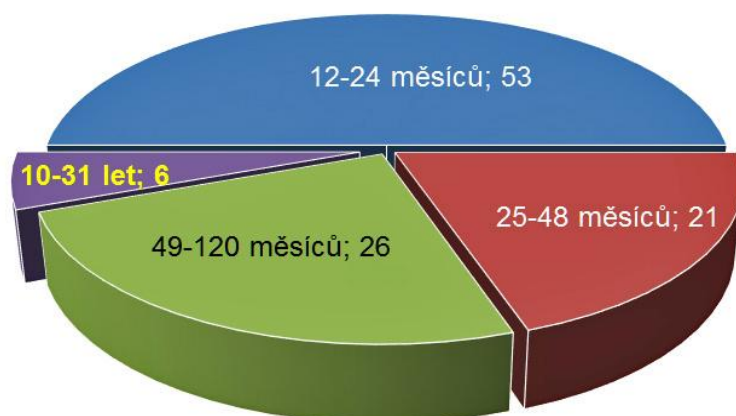
O závažnosti této problematiky vypovídá výskyt symptomů CVD během jednoho roku (jednotkou je jeden měsíc), kdy 93% pacientek (99) udává obtíže 6x a více/rok, v kontrolní skupině byl výskyt obtíží za 5 let následující: 21 pacientek nikdy, 26 pacientek měl obtíže 1 až maximálně 5x/rok, pouze jedna pacientka udávala obtíže 8x/5let.

Počet gynekologů provádějících základní ambulantní vyšetření jako jsou pH pochvy a o něco náročnější, mikroskopické vyšetření nativního preparátu byl ve skupině pacientek s CVD 1 gynekolog, v kontrolní skupině nebylo ani u jedné pacientky použito měření pH a mikroskopie.

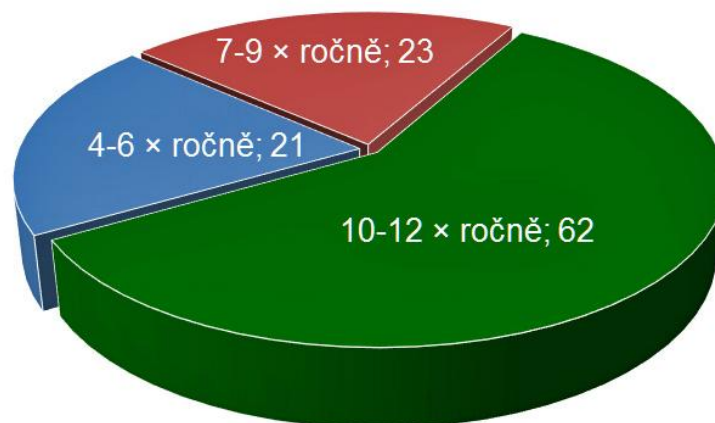
U pacientek s CVD byla sledována i délka trvání obtíží (graf 8.5) a frekvence episod obtíží během jednoho roku, graf 8.6. 50% (53) pacientek se neúspěšně léčí pro CVD více než dva roky (1 pacientka více než 15 let) a 80,2% (85) žen udává

obtíže častěji než 6x za rok, přičemž 58,5% (62) žen má obtíže prakticky každý měsíc (10-12x/rok).

Graf. 8.5 Doba trvání obtíží u pacientek s CVD

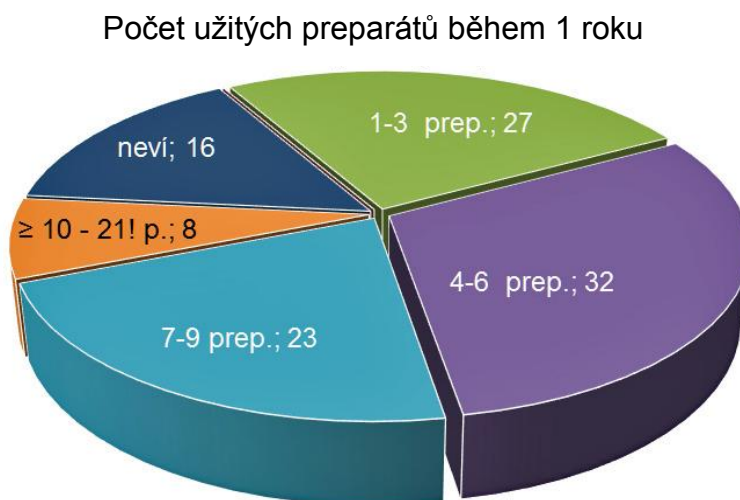


Graf. 8.6 Frekvence episod obtíží během jednoho roku. Pacientky s CVD.



Důležitým údajem jsou i počty předepsaných léků jednotlivým pacientkám (graf 8.7-8) a preskripce léků bez adekvátního či dokonce jakéhokoliv vyšetření lékařem.

Graf. 8.7 Počet užitých preparátů za rok u pacientek s CVD.



Graf. 8.8 Počet užitých preparátů za 5 let u kontrolní skupiny.



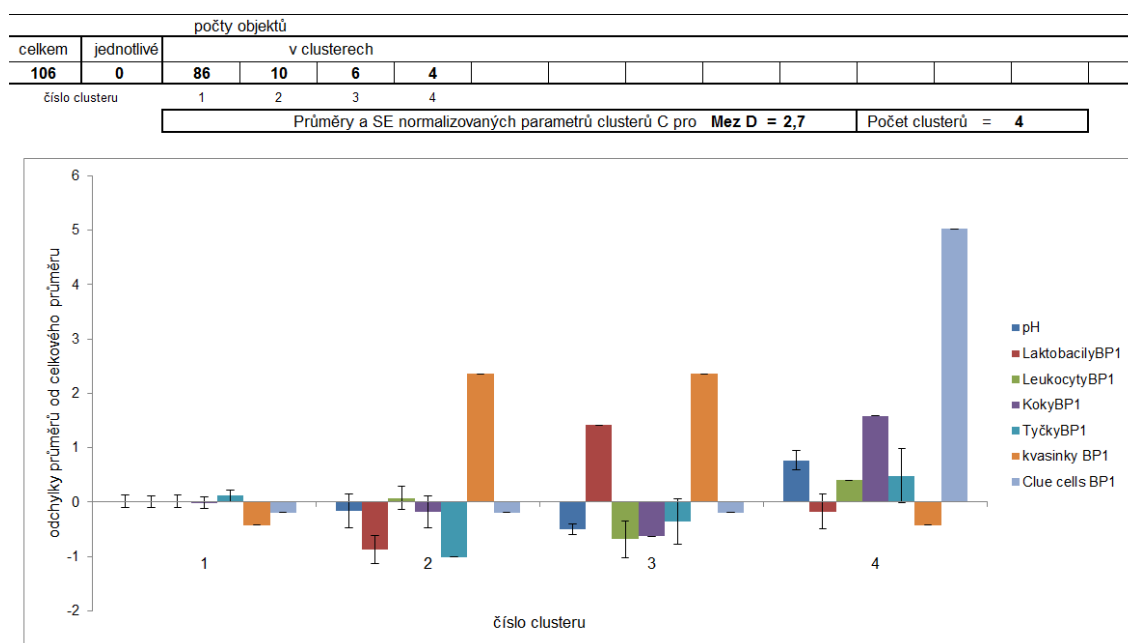
U pacientek s CVD nebyl zjištěn „spouštěč“ (trigger moment). 8 pacientek (7,6%) dávalo vznik obtíží do souvislosti s pohlavním stykem a 2 pacientky (1,9%) s jinou událostí (1 pacientka s porodem a 1 s operací).

Každá pacientka s CVD byla vyšetřena i na přítomnost chlamydií (chlamydiová cervicitis). U 17 pacientek (16%) byla pomocí PCR prokázána i

přítomnost chlamydií. Vzhledem k negativním klinickým známkám chlamydiové cervicitis by tento údaj mohl přispět k diskusi o prevalenci chlamydiových onemocnění v populaci.

Před zahájením statistické chí kvadrát analýzy byla nejprve použita analýza pomocí clusterů a tím získán rámcový přehled o možných souvislostech ve sledovaných souborech. Pro příklad jak vypadá cluster analýza je přiložen graf 8.9.

Graf. 8.9 Shluková analýza – vztah pH a nálezů v barveném preparátu u první kontroly v období obtíží.



BP1 – barvený preparát, 1. Vyšetření

Cluster analýza naznačila mezi kterými hodnotami hledat vztah. K dalšímu statistickému hodnocení byl již použit chí-kvadrát a t-test.

V souboru pacientek s CVD byla prokázána řada pozitivních a negativních, statisticky významných korelací.

Statisticky významný pokles pH v období od obtíží do první kontroly ($p=0,001$).

Další pozitivní korelace byla prokázána u přítomnosti *Enterokoka* a svědění ($p=0,01$). Taktéž byla prokázána pozitivní korelace u přítomnosti kvasinky prokázané kultivací a zároveň nativní mikroskopii a v barveném preparátu ($p=0,01$).

Bylo taktéž prokázáno, že *Gardnerella vaginalis* je spojena s pozitivním KOH testem, subjektivně udávaným i objektivně prokázaným oděrem, a taktéž s přítomností clue cells, jak v nativním tak i barveném preparátu. Jasná negativní korelace byla prokázána u pozitivního KOH testu a přítomností pálení. Naopak pozitivní korelace byla u pozitivního KOH testu a přítomností clue cells v nativním i barveném preparátu.

Positivní korelace byla prokázána u subj. udávaného fluoru a objektivní nepřítomnosti známek zánětu v pochvě.

Dokladem smysluplnosti a kvality prováděného mikroskopického vyšetření u pacientek s CVD je průkaz, že při 1. vyšetření v období obtíží, je při mikroskopickém nálezů kvasinek (v barveném i nativním preparátu) následně *C. albicans* prokázána i kultivačně, tab. 8.7. Zásadní však je, že nebyla zjištěna statisticky významná souvislost mezi kultivační pozitivitou *C. albicans* a klinickými známkami zánětu a bílého hrudkovitého výtoku v pochvě. Obdobné výsledky jsme zaznamenali i při 2. kontrole v období obtíží, ale pouze u hodnocení přítomnosti kvasinek v nativním preparátu a pozitivní kultivaci *C. albicans*, tab. 8.8.

Positivní kultivační vyšetření bez klinických známek zánětu, dle našeho názoru, podporuje myšlenku asymptomatického osídlení pochvy kvasinkami a tedy zbytečného užití antimykotik v těchto případech. Naopak průkaz kvasinek mikroskopii a klinických známkách zánětu považujeme za klinicky významný a tedy i vhodný k léčbě antimykotiky.

Tab. 8.7 Vztah mikroskopického průkazu kvasinek a pozitivní kultivace *C. albicans* při 1. kontrole v období obtíží

Mikroskopie	Výsledek kultivace	Hladina významnosti
Kvasinky (barvený preparát)	<i>C. albicans</i>	**

Kvasinky (nativní preparát)	<i>C. albicans</i>	***
Kvasinky (nativní preparát s KOH)	<i>C. albicans</i>	**

Tab. 8.8 Vztah pozitivní kultivace *C. albicans* a mikroskopického průkazu kvasinek při 2. kontrole v období obtíží

Mikroskopie	Výsledek kultivace	Hladina významnosti
Kvasinky (nativní preparát)	<i>C. albicans</i>	***

Kvalitu prováděného nativního mikroskopického vyšetření dokládá tab. 8.9, kde je prokázána pozitivní statisticky významná korelace mezi hodnocením nativního a barveného preparátu.

Tab. 8.9 Test shody nálezů v barveném a nativním preparátu.

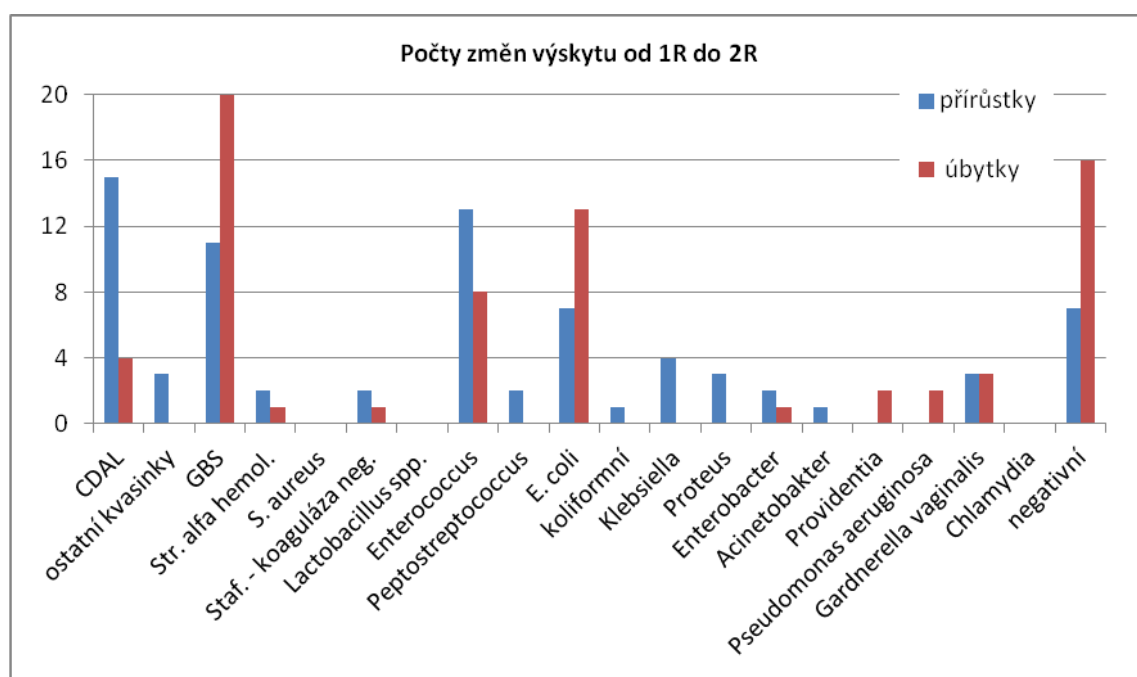
Test shody nálezů v barveném a nativním preparátu		
Sledované parametry	Hladina významnosti	
Laktobacily	0,00000	***
Leukocyty	0,00016	***
Koky	0,00000	***
Kvasinky	0,00000	***
Clue cells	0,00000	***

C. albicans považována za hlavní příčinu CVD byla sledována kulturační pozitivita *C. albicans* při kontrolách v období obtíží i v období remise. Při prvním vyšetření v období s obtížemi byla *C. albicans* prokázána ve 20 případech (18.9%) a u 9 pacientek (8.6%) při kontrole druhé. V období remise byla *C. albicans* pozitivní u 1 pacientky (0.9%) a u 6 žen (5.9%) při kontrole druhé. Nejčastější výsledek kulturačního vyšetření byl negativní: 1. období obtíží 38 žen (35.8%), 2. období obtíží 47 žen (44.3%), 1. kontrola bez obtíží 81 žen (80.2%) a 2. období bez obtíží 87 žen (82.1%).

Změny v kultivacích při obtížích i mimo obtíže vypovídá o nesourodosti skupiny žen s CVD a zároveň o tom, že nemůžeme určit jednoho nebo i více patogenů způsobujících CVD. Změny v kultivacích zobrazují grafy 8.10 a 8.11.

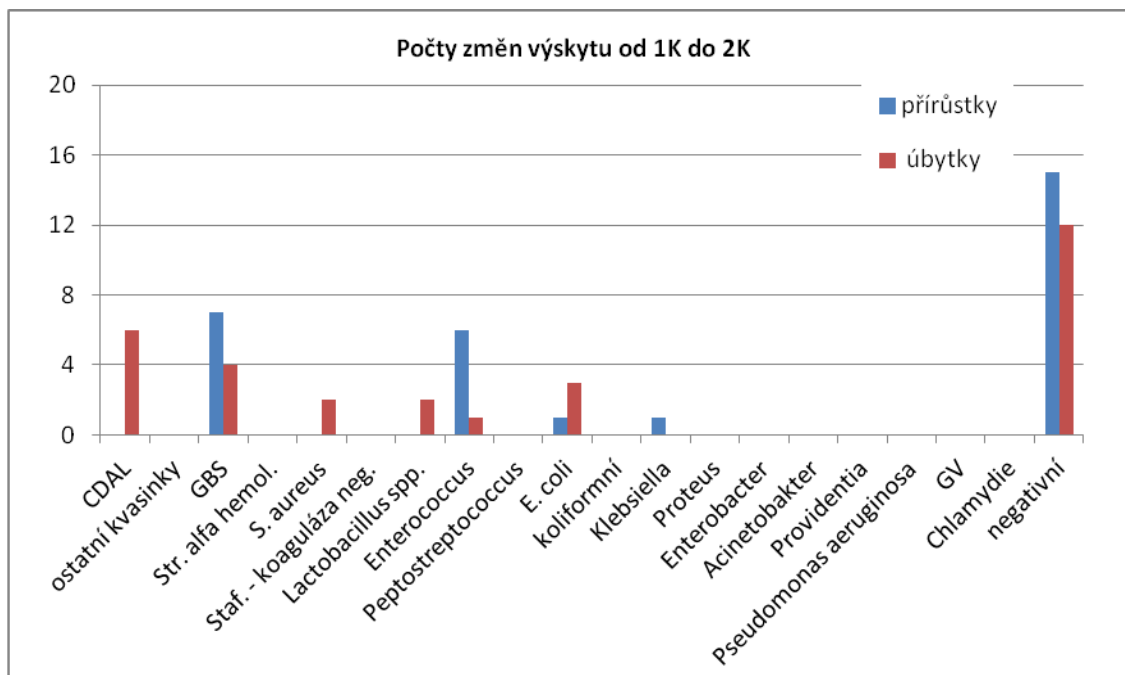
Změny subjektivních symptomů a objektivního nálezu vypovídá o nejednotném obrazu CVD, graf 8.12 a 8.13.

Graf 8.10 Počty změn v pozitivní kultivaci mezi prvním a druhým vyšetřením v období obtíží



CDAL - *C. albicans*, GBS – Group B streptococcus

Graf 8.11 Počty změn v pozitivní kultivaci mezi prvním a druhým vyšetřením v období bez obtíží

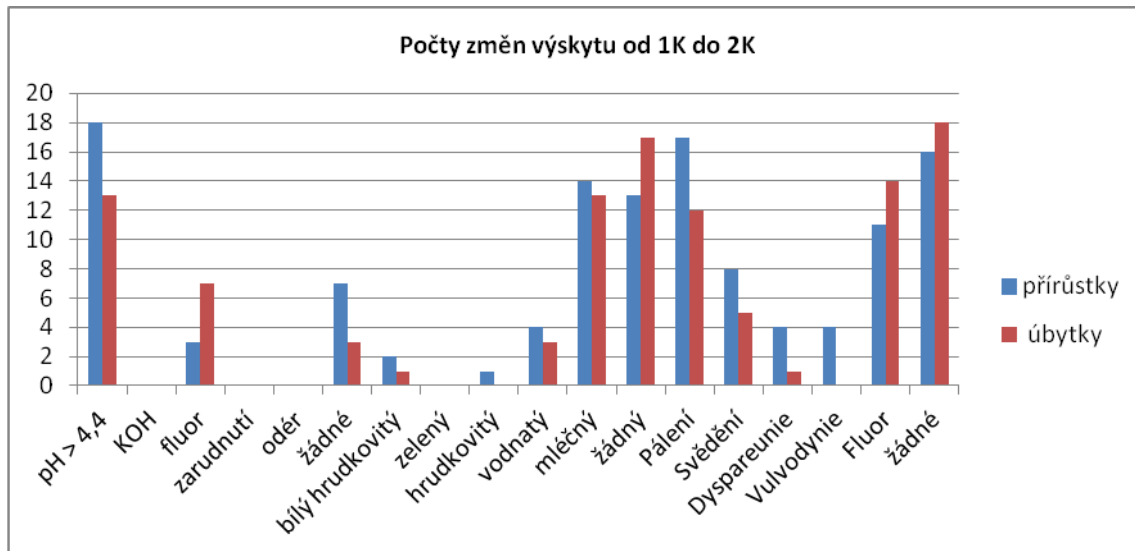


CDAL - *C. albicans*, GV - *Gardnerella vaginalis*, GBS – Group B streptococcus

Graf 8.12 Počty změn objektivních příznaků CVD a subjektivních obtíží mezi prvním a druhým vyšetřením v období obtíží

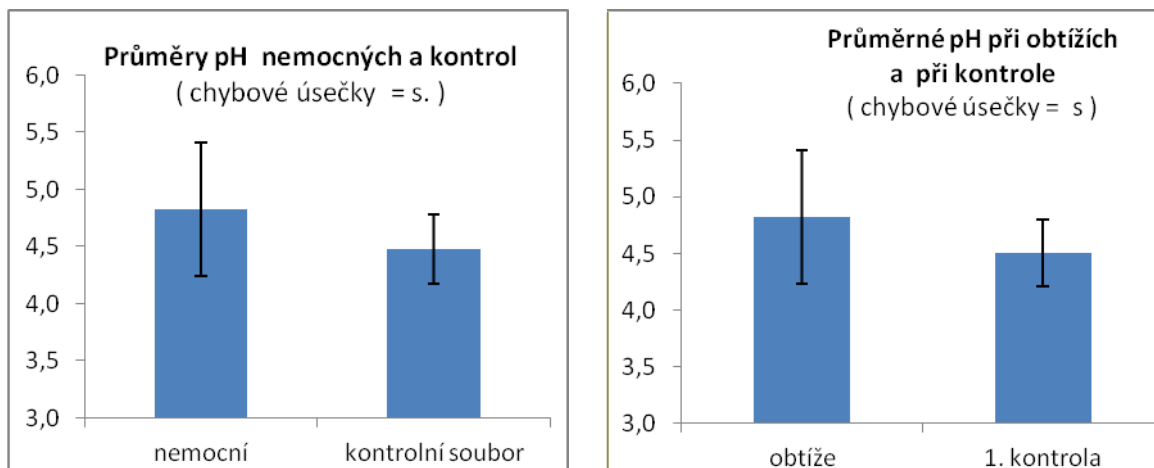


Graf 8.13 Počty změn objektivních příznaků CVD a subjektivních obtíží mezi prvním a druhým vyšetřením v období bez obtíží.



Statisticky významný pokles pH u žen s CVD v období obtíží a v období bez obtíží při první kontrole ($p=0,001$), graf 8.14 a 8.15.

Graf. 8.14 a 8.15 Rozdíl pH pochvy u žen s CVD v období obtíží a v kontrolní skupině a v období obtíží a v období bez obtíží.



Průměrná hodnota pH od obtíží do 1. kontroly poklesla téměř na úroveň pH kontrolního souboru. To znamená, že pH může být použito jako diagnostický marker akutní exacerbace CVD.

Zásadní je průkaz statisticky významné pozitivní korelace nepřítomnosti klinických známek zánětu (fluor, zarudlá sliznice pochvy, oděr, pozitivní KOH test), a

nepřítomnost známek zánětu v nativní mikroskopii a barveném preparátu (leukocyty, clue cells, koky) v období obtíží, tab. 8.10.

Tab. 8.10 Negativní korelace mezi klinickými a mikroskopickými známkami zánětu v období obtíží

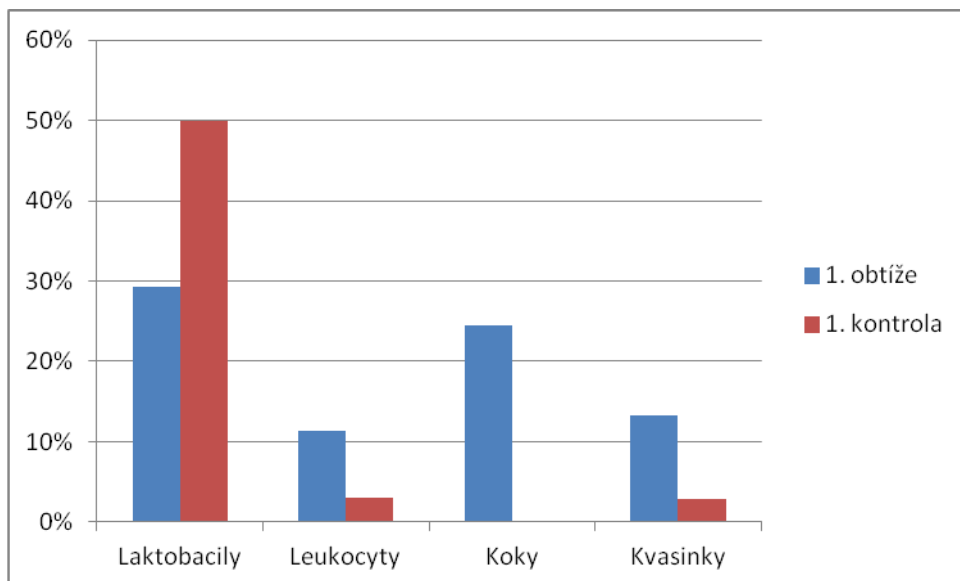
Klinické známky zánětu	Mikroskopický nálezy (barvený i nativní preparát)	Hladina významnosti				
žádné	Leukocyty BP	0,00206	**	-	66,0%	55,2%
žádné	Clue cells BP	0,00753	**	-	3,8%	0,0%
žádné	Leukocyty NAT	0,00017	***	-	58,5%	44,8%
žádné	Koky NAT	0,01097	*	-	24,5%	16,4%

BP – barvený preparát, NAT – nativní preparát

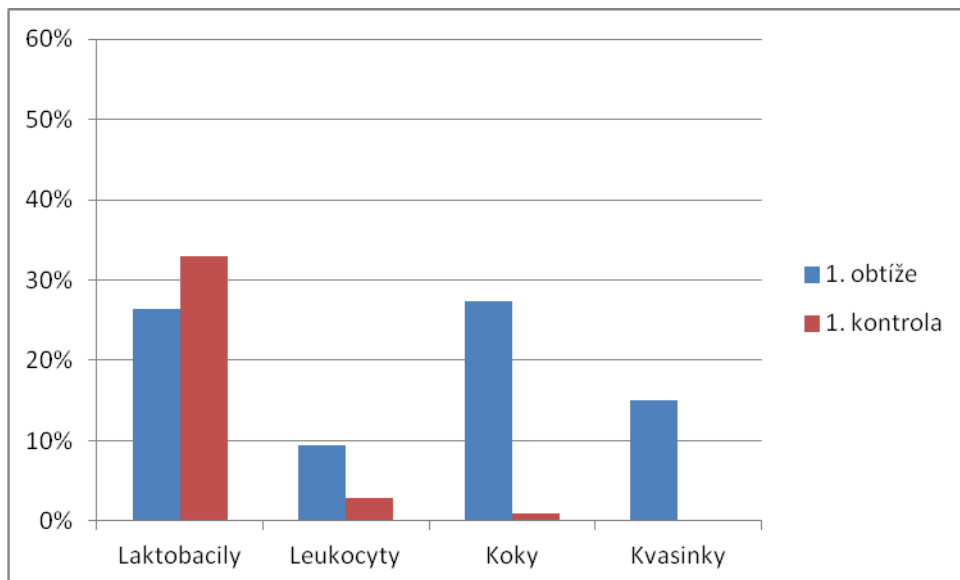
K tomuto klinickému a mikroskopickému nálezu přispívá průkaz výrazného úbytku či praktické absenci laktobacilů (tyčí) v barveném (BP) a nativním (NAT) preparátu. Úbytek či absence laktobacilů byl prokázán u 78 (BP) a 75 (NAT) pacientek v období obtíží (73,5% BP, 70,7% NAT) a poměrně překvapivě i u 71 (BP) a 53 (NAT) pacientek (67% BP a 50% NAT) v období kontroly bez obtíží. Ještě markantnější byly výsledky při druhé kontrole při obtížích a v době remise. 93 (BP) a 60 (NAT) (99,4% BP, 61,9% NAT) pacientek při obtížích a 66 (BP) a 62 (NAT) (64,7% BP, 60,8% NAT) v období remise.

Koky jsme zjistily v BP při první kontrole v období obtíží u 30 pacientek (28,3%) a 26 pacientek v NAT (24,5%), v období remise to byla 1 pacientka v BP (0,9%) a žádná pacientka v NAT. U druhé kontroly v období obtíží to bylo 29 pacientek v BP (28,2%) a 16 pacientek v NAT (15,2%), 1 pacientka v BP (0,9%) a žádná pacientka v NAT v období bez obtíží. Podobně chudé nálezy byly zaznamenány i co do přítomnosti kvasinek, koků a leukocytů. Výsledky zobrazeny v grafech 8.16-19.

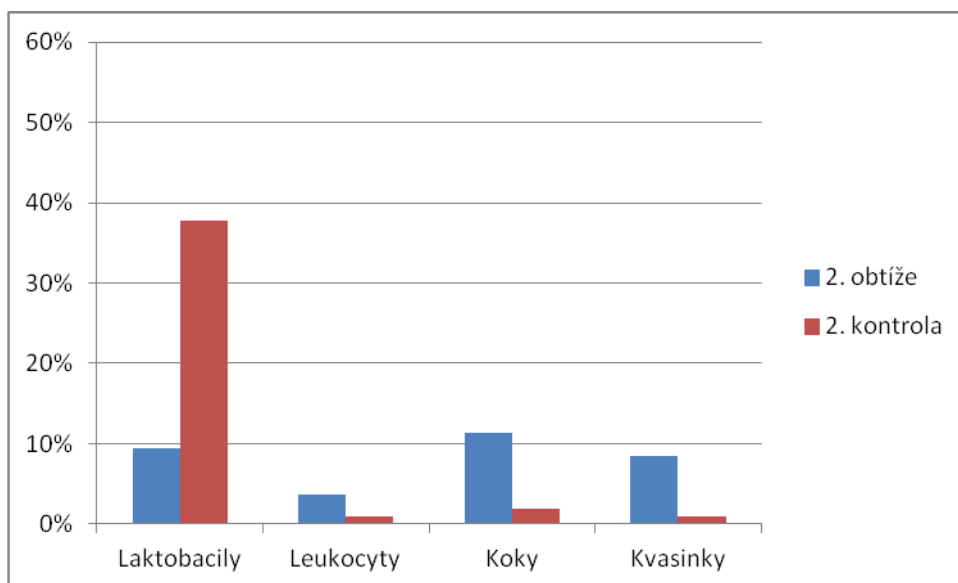
Graf. 8.16 Nálezy v nativní mikroskopii při první kontrole v období obtíží a období remise.



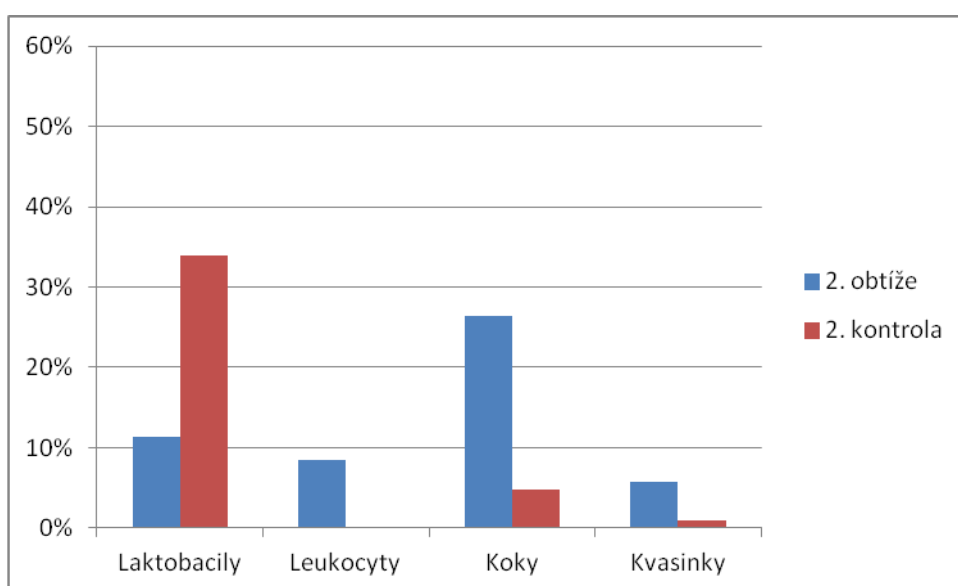
Graf. 8.17 Nálezy v barveném preparátu při první kontrole v období obtíží a období remise.



Graf. 8.18 Nálezy v nativní mikroskopii při druhé kontrole v období obtíží a období remise.



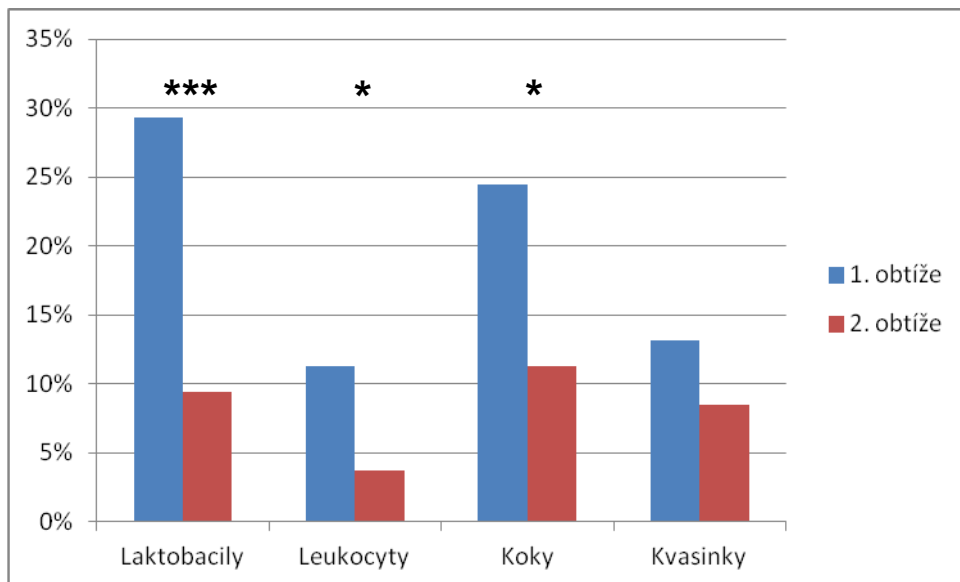
Graf. 8.19 Nálezy v barveném preparátu při druhé kontrole v období obtíží a období remise.



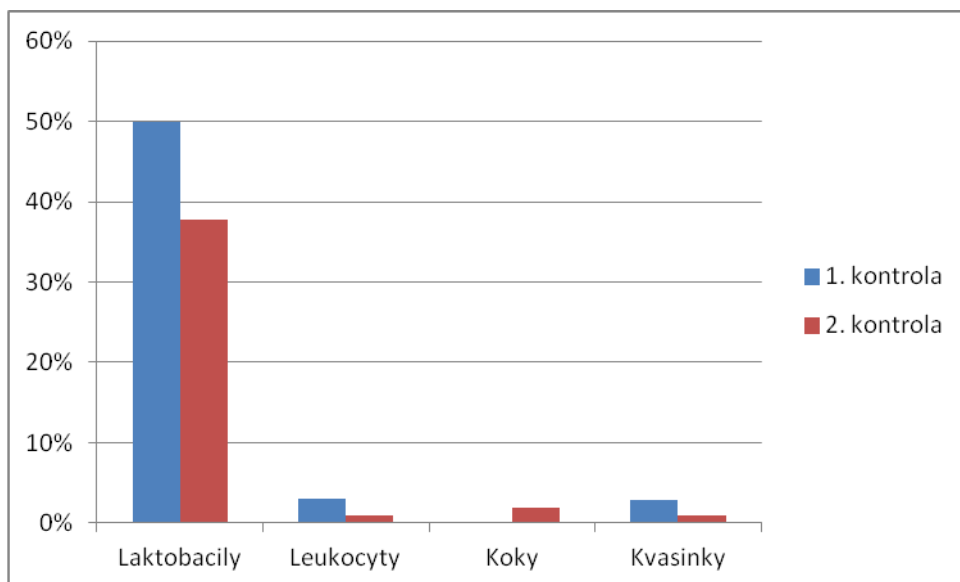
Důkazem heterogenity skupiny pacientek s CVD je srovnání přítomnosti laktobacilů, leukocytů, koků a kvasinek v NAT při prvním a druhém vyšetření v období obtíží a v období remise. Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány při srovnání obtíží při 1. a 2. kontrole, graf. 8.20 a 21. Absence laktobacilů a buněk

spojených se zánětem považujeme za důkaz neinfekčního původu CVD (v naprosté většině případů) a tedy i dokladem neadekvátnosti léčby antibiotiky/antimykotiky.

Graf. 8.20 Nálezy v nativním preparátu při první a druhé kontrole v období obtíží.

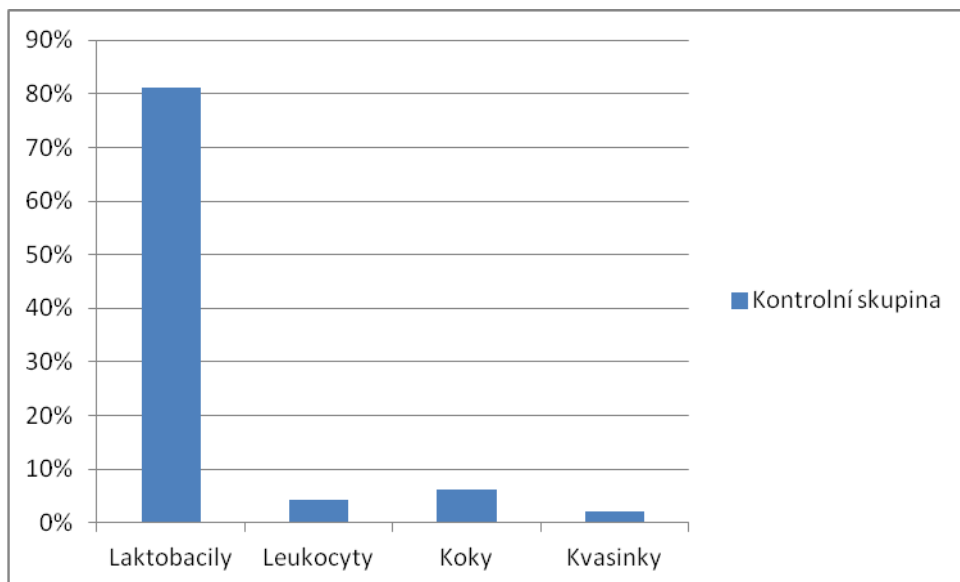


Graf. 8.21 Nálezy v nativním preparátu při první a druhé kontrole v období remise.



Zcela odlišná je situace u žen kontrolní skupiny, graf 8.22.

Graf. 8.22 Nálezy v nativní mikroskopii u žen kontrolní skupiny.



Výsledky dotazníkové studie¹²²

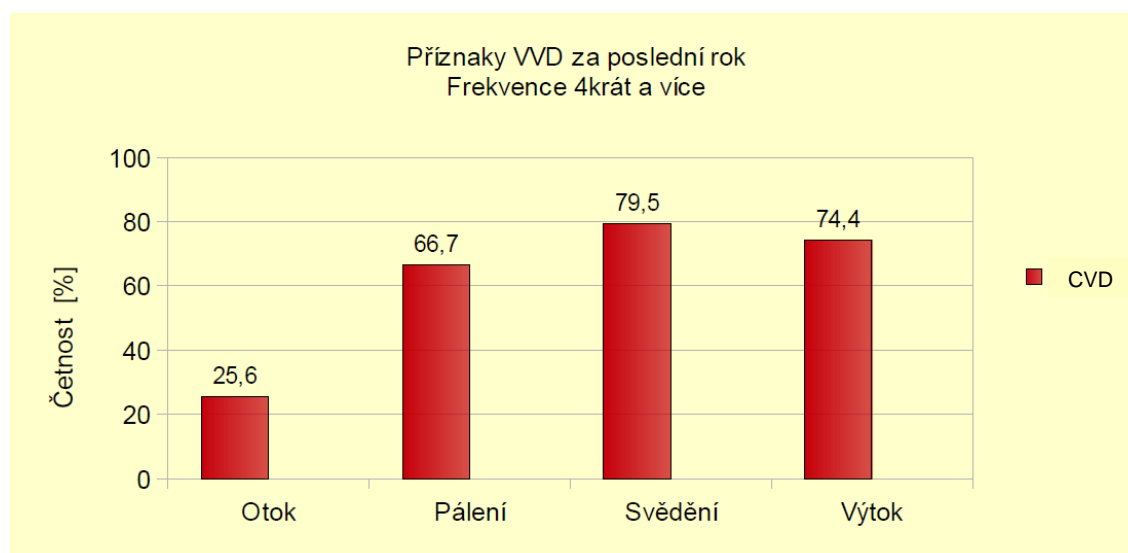
Otázky 1-3 byly použity k rozdělení žen/dotazovaných do příslušných skupin (ženy s CVD a kontrolní skupina). První otázkou byly respondentky dotazovány na výskyt příznaků zánětu pochvy a vnějšího genitálu, a udaly četnost výskytu obtíží za poslední kalendářní rok.

V další otázce (2) byly dotazovány, zda frekvence výskytu obtíží byla vyšší než třikrát a vícekrát v posledních pěti letech a ve třetí otázce výskyt příznaků ve frekvenci 1-3krát za posledních pět let.

V této práci jsou prezentovány jen výsledky se statisticky významnými hodnotami a několik grafů charakterizujících pacientky s CVD.

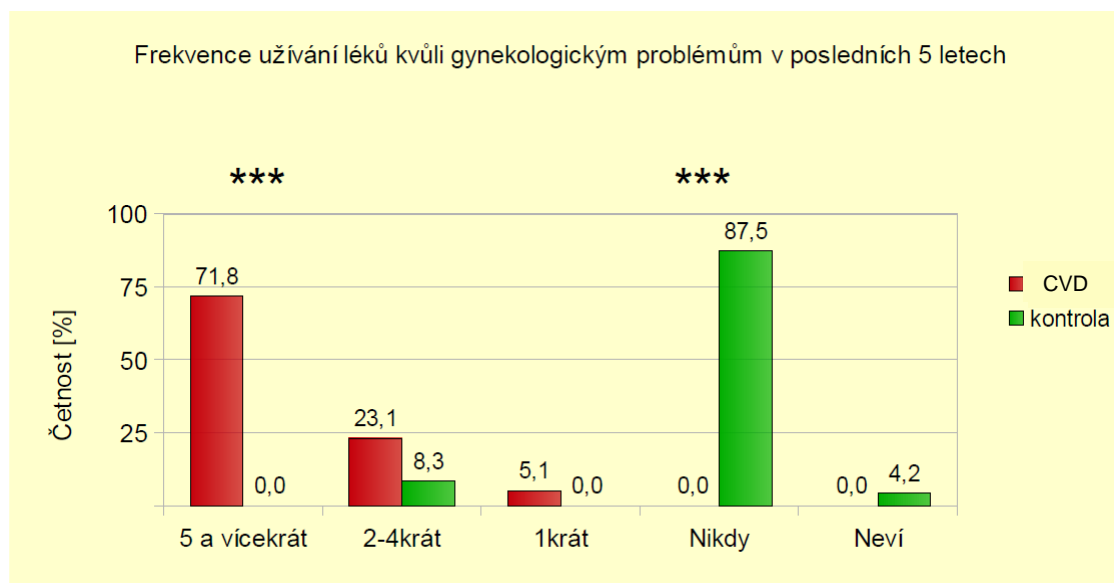
Graf 8.23 ukazuje výskyt příznaků spojených s VVD při frekvenci výskytu 4x a více za poslední rok. Nejčastějším steskem je svědění (79,5%), výtok (74,4%), pálení (66,7%), nejméně pak otok vnějších rodidel doprovázený bolestí či svěděním (25,6%).

Graf 8.23. Příznaky VVD za poslední rok



Ve čtvrté otázce jsme zjišťovali, zda, a eventuelně kolikrát ženy v posledních pěti letech užívaly léčivé preparáty určené k léčbě VVD. Byl zjištěn statisticky významný rozdíl u frekvence 5 a vícekrát a u frekvence nikdy, graf 8.24.

Graf 8.24 Frekvence užívání léků kvůli gynekologickým problémům v posledních 5 letech.



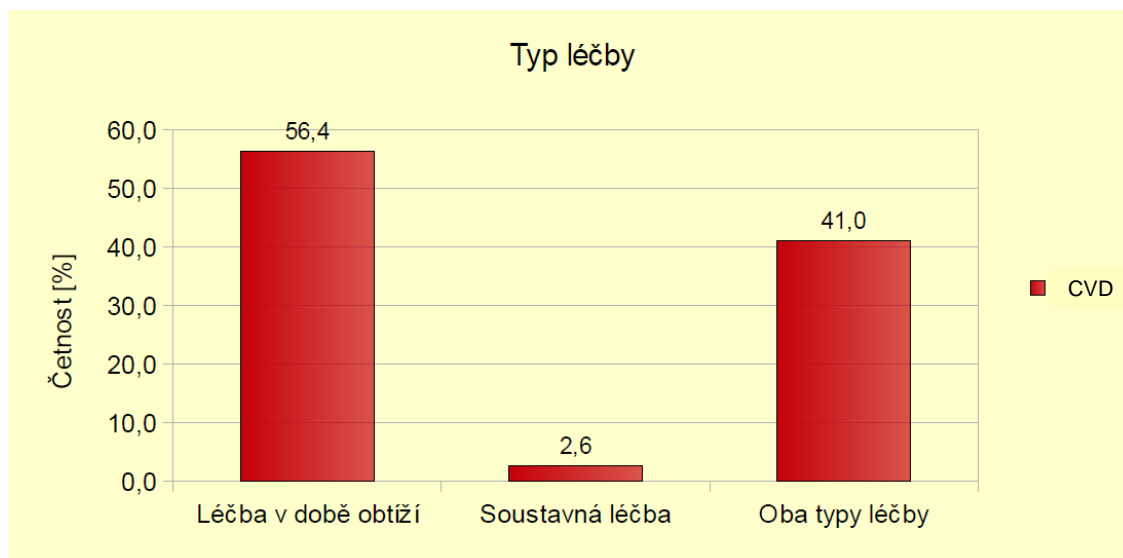
Dle grafu 8.24 je zřejmé, že se gynekologickou medikací užilo i několik žen (8,3%) z kontrolní skupiny.

Jelikož je kontrolní skupina definována nepřítomností příznaků VVD, předpokládáme, že tyto ženy se léčily kvůli jiným gynekologickým potížím. V tomto případě byl proveden i dvouvýběrový nepárový t-test (t-test) a zjistili jsme, že skupiny se významně liší na hladině spolehlivosti 0,999.

Otázka 4 taktéž obsahovala dotaz na období léčby.

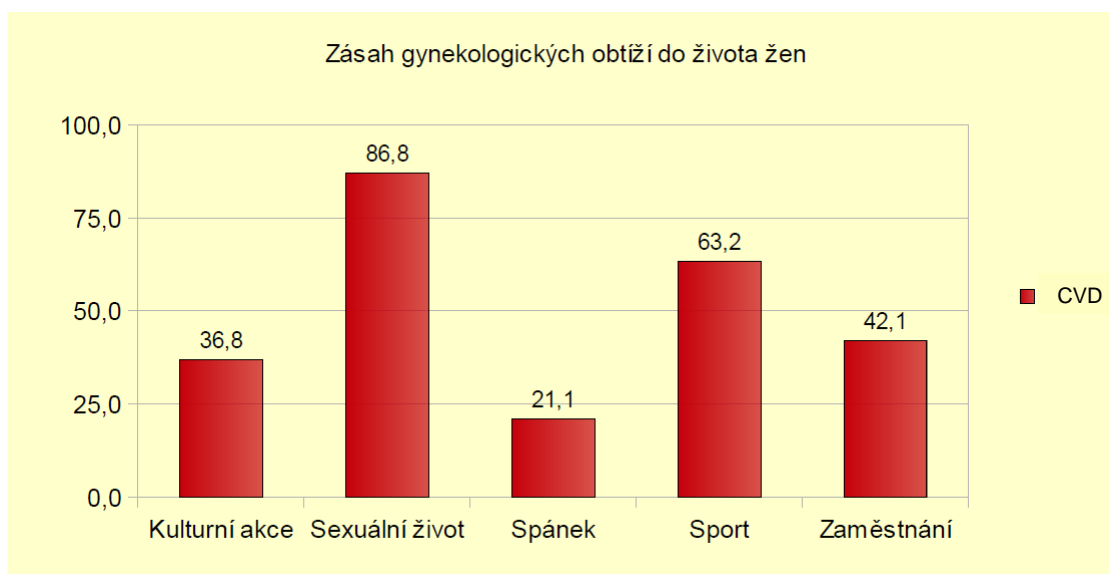
22 pacientek (56,4%) uvedlo léčbu pouze v době obtíží, jedna pacientka (1,77%) potíže řešila soustavnou léčbou typu prevence a 16 pacientek (41,0%) vyzkoušelo jak soustavnou (preventivní), tak léčbu v období relapsu, graf 8.25.

Graf 8.25 Typ léčby



V 6. otázce bylo hodnoceno omezení běžných denních aktivit následující škálou: zcela neumožňuje byla přiřazena 1, silně omezuje 2, omezuje 3, poněkud brání 4, neovlivňuje 5 a činnost neprovádím 6. Dle výsledků byl u pacientek nejvíce zasažen/omezen sexuální život (průměrná hodnota odpovědi je 2,21), dále pak sport, turistika a další hobby (3,16), následují zaměstnání a domácí práce (3,57), kulturní vyžití (3,74), kvalita spánku (4,29) je ovlivněna nejméně. 86,8 % žen ze skupiny CVD je omezeno v sexuálním životě a 63,2% pacientek je omezeno ve sportu, turistice a dalších hobby, graf 8.26.

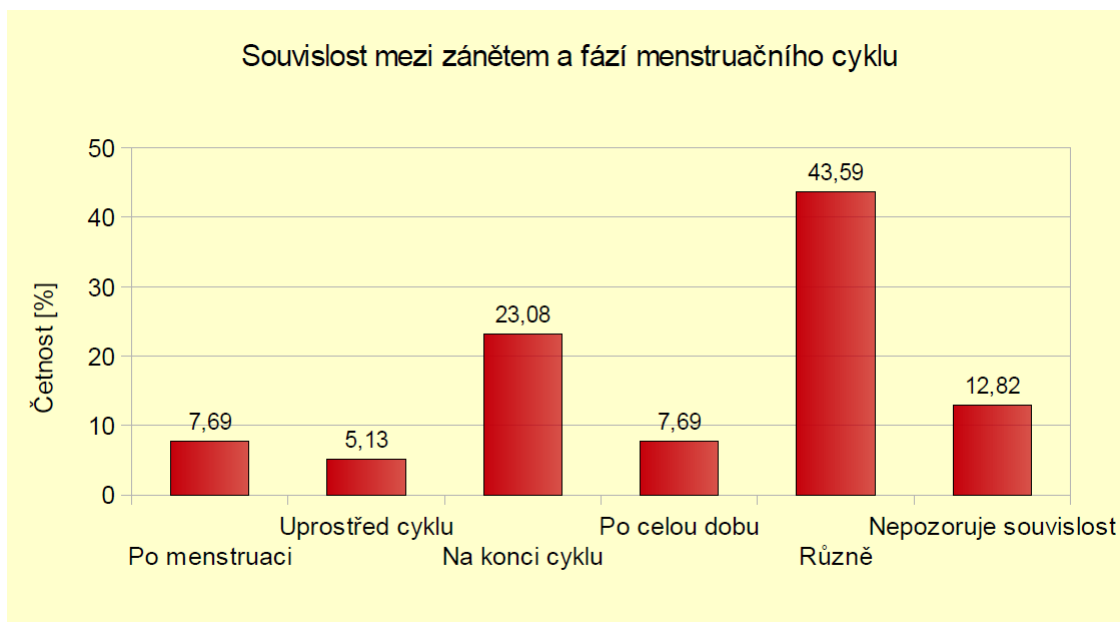
Graf 8.26 Zásah gynekologických obtíží do života žen



Sedmá otázka se týkala menstruačního cyklu. Průměrná délka menstruace je u žen ze skupiny CVD 5,24 dne a u zdravé kontroly 5,34 dne, není statisticky významný rozdíl. Není statisticky významný rovněž ani v pravidelnosti cyklu. Ve skupině CVD je u 5 žen délka cyklu kratší než 23 dnů, u 25 žen 24-33 dnů a u tří žen je cyklus delší než 34 dnů. V kontrolní skupině udávala polymenorrhoe 1 žena, 28 žen eumenorrhoe a 2 ženy oligomenorrhoe.

Souvislost mezi fází menstruačního cyklu a propuknutím ataky zánětu bylo sledováno v 8. otázce. Procentuální zastoupení je ukázáno v grafu 8.27.

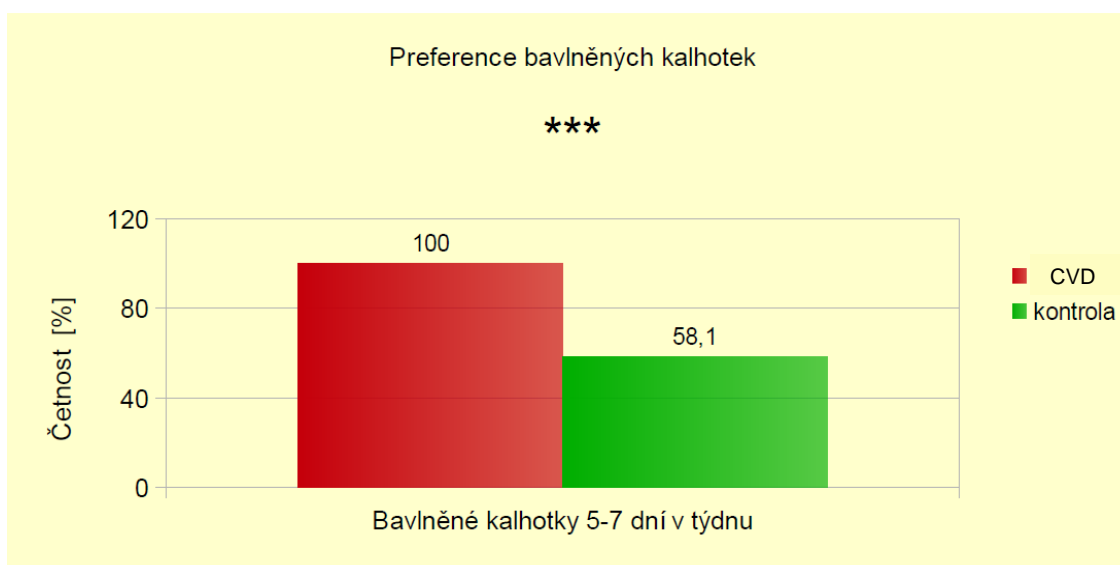
Graf 8.27. Souvislost mezi zánětem a fází menstruačního cyklu



Otázky 9 – 12, zaměřené na případné souvislosti mezi těhotenstvím a vznikem CVD či změnou výskytu CVD. Toto nebylo hodnoceno pro malý počet rodiček. V souboru pacientek s CVD a kontrolní skupině nebyly pacientky léčené či sledované pro sterilitu.

V další otázce byla sledována oblíbenost nošení různých druhů oblečení.

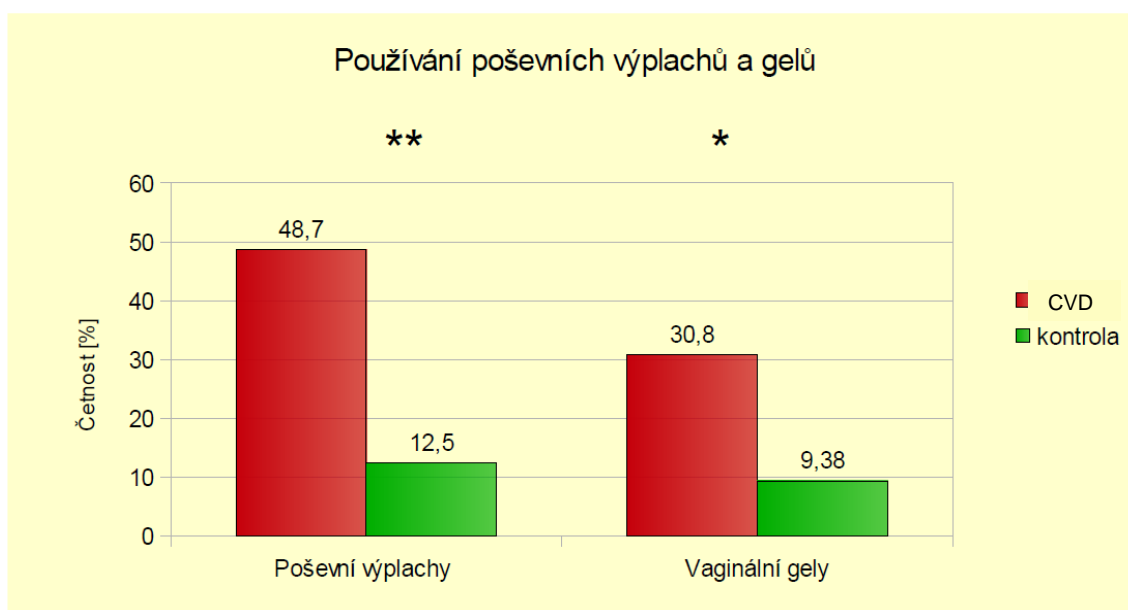
Graf 8.28. Bavlněné kalhotky 5-7 dnů v týdnu



Statisticky významný byl zjištěn jen v nošení bavlněných kalhotek 5-7dní v týdnu, 36 pacientek s CVD a 18 žen z kontrolní skupiny, graf 8.28. U ostatních druhů oblečení nebyl statisticky významný rozdíl prokázán.

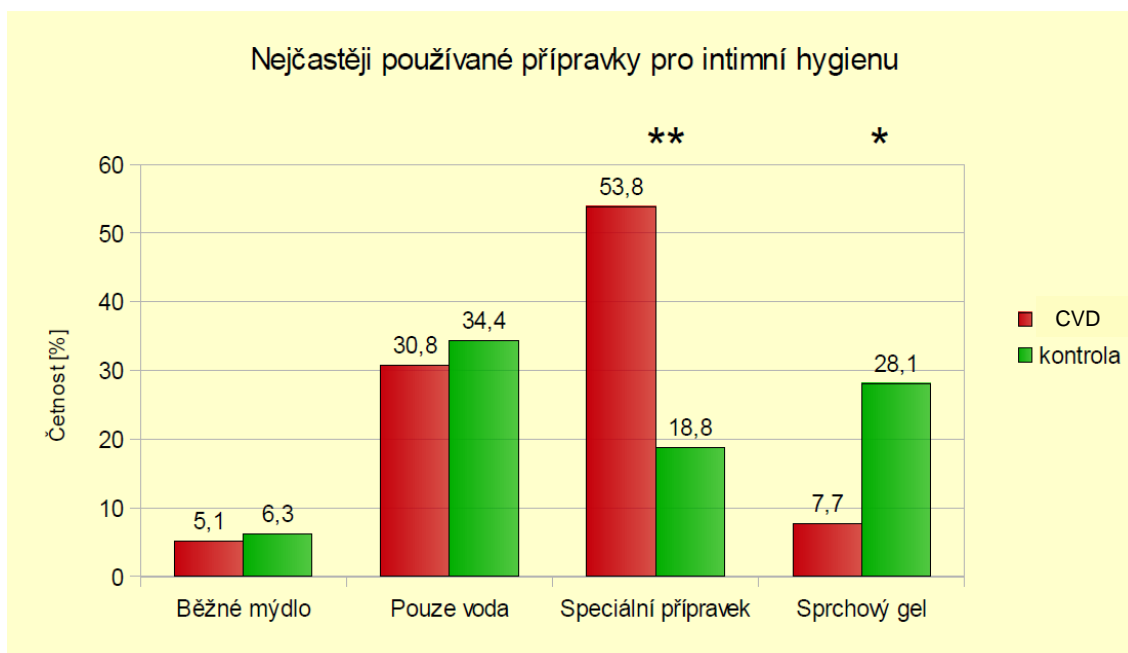
Vaginální irigace a gely používají významně častěji ženy s CVD, graf 8.29. Bylo také zjištěno, že ve skupině žen s CVD 62,2% žen používá vaginální irigaci a většina z těchto (60,0%) s výplachy začala až po objevení VVD.

Graf 8.29 Používání poševních výplachů a gelů



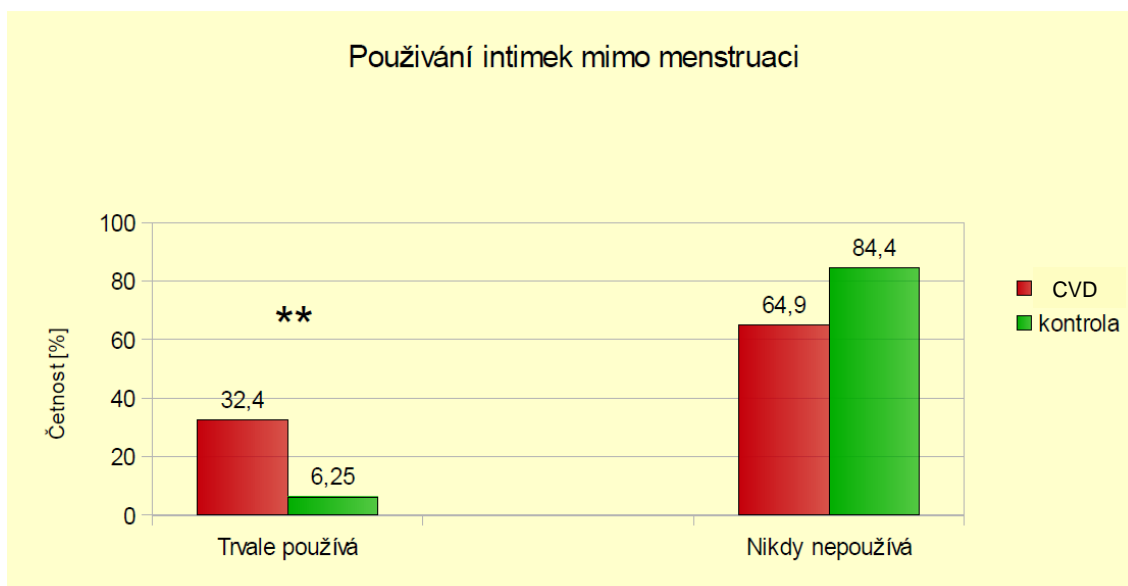
V otázkách cílených na intimní hygienu a její častost byl statisticky významný rozdíl prokázán v používání běžného sprchového gelu 5-7x týdně, kdy v kontrolní skupině jej ženy používají v 28,1%, kdežto ženy s CVD v 7,7%. Užívání jen vody, jen běžného mýdla atd. je znázorněno v grafu 8.30.

Graf 8.30 Nejčastěji používané přípravky pro intimní hygienu



Statisticky významný rozdíl byl zjištěn u žen nosících vložky (intimky) i mimo menstruaci, a které nenosí intimky mimo menstruaci vůbec, graf 8.31.

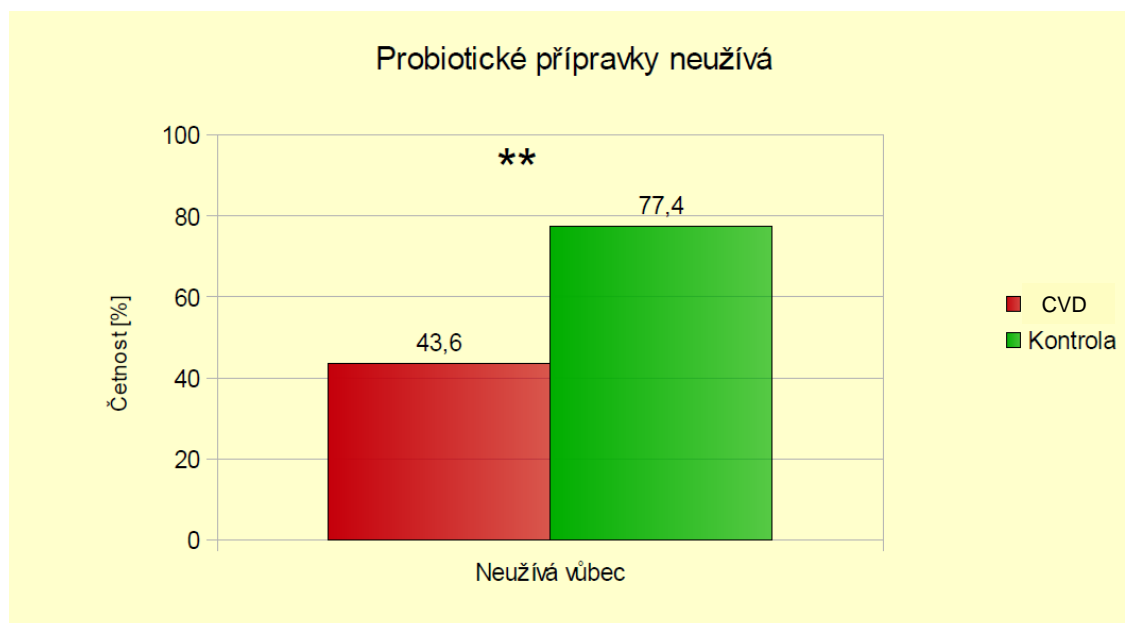
Graf 8.31 Používání intimek v době mimo menstruaci



Nezaznamenali jsme statistický významný rozdíl v teplotě praní prádla (na 40°C nebo 60°C).

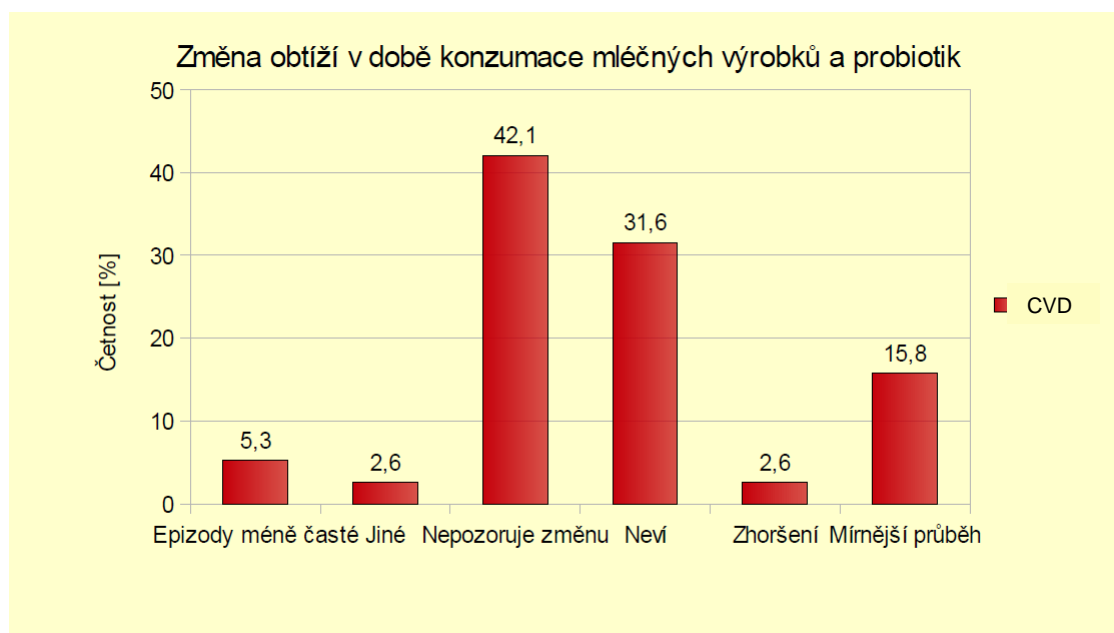
Statisticky významný rozdíl byl prokázán u žen ne/užívajících probiotika, graf 8.32. Probiotika neužívá 43,6% žen s CVD a 77,4% žen v kontrolní skupině.

Graf 8.32 Část žen, která neužívá probiotické přípravky.



Hodnocení vlivu konzumace mléčných výrobků nebo užívání probiotik na vznik a průběh VVD je zobrazeno v grafu 8.33. Nebyl zjištěný statisticky významný rozdíl u obou skupin. Jedna pacientka (2,6%) popisuje dokonce zhoršení stavu.

Graf 8.33 Změna obtíží v době konzumace mléčných výrobků a probiotik



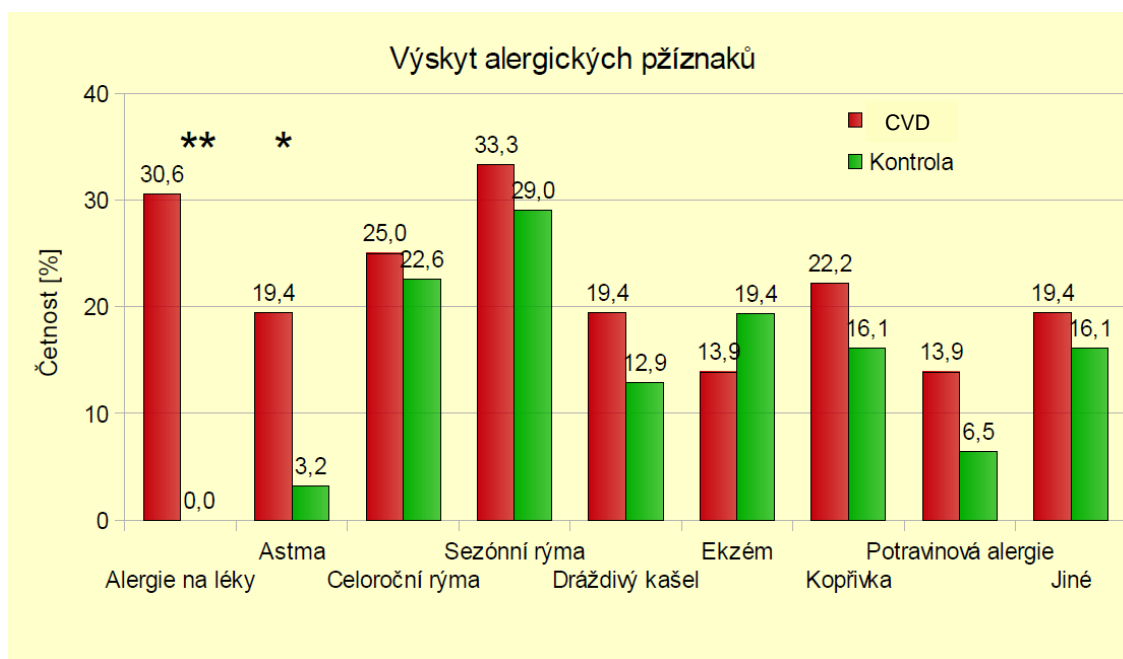
Respondentky byly rovněž tázány na, již diagnostikovanou, hyperglykémii a na případnou léčbu. Ve skupině zdravých kontrol je jedna žena s diabetem (DM) závislým na inzulinu, ve skupině žen s CVD je jedna žena s DM II. typu léčeným dietou s nízkým obsahem sacharidů.

Celkem sedm žen, z toho šest ve skupině s CVD hyperglykémii nijak neléčí.

V otázce hodnotící přítomnost alergií či alergických příznaků byl prokázán rozdíl statisticky významný. U žen s CVD je o něco častější výskyt alergií. Nejčastější je senná rýma, kopřivka, celoroční rýma, alergie na léky a ekzém.

Rozdíl statisticky významný je u alergie na léky, kdy tuto udává 11 žen s CVD a žádná žena z kontrolní skupiny. Dále pak astma bronchiale, které udalo celkem 8 žen, z toho 7 s CVD.

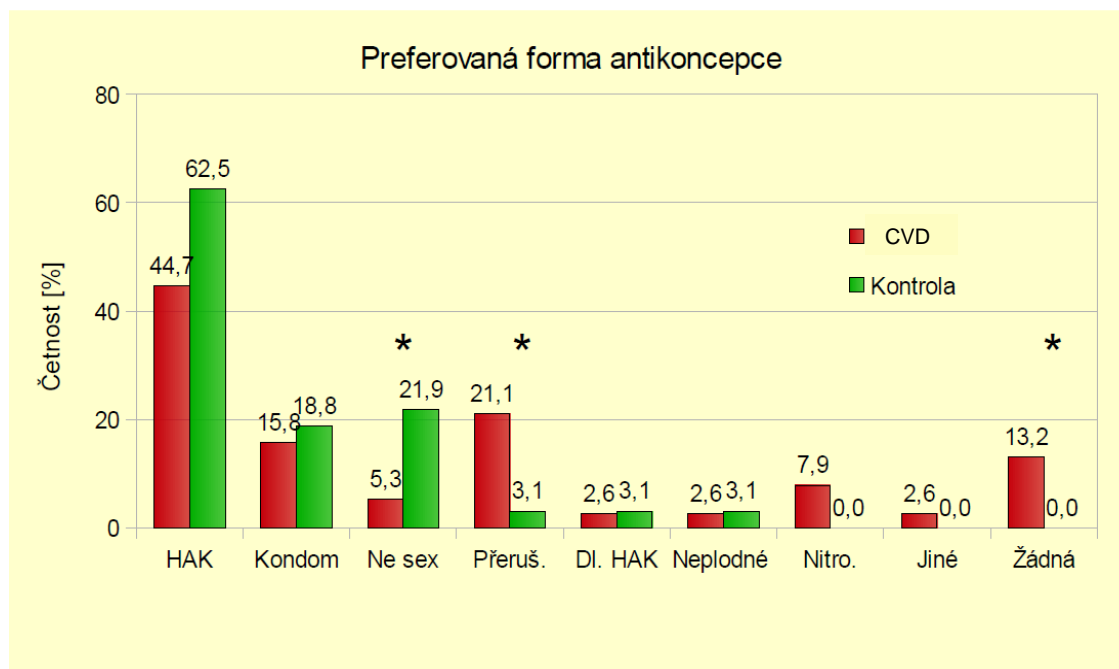
Graf 8.34 Výskyt alergických příznaků



Abusus cigaret hodnotila otázka 28. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl.

Další otázka byla zaměřena na druh antikoncepce, včetně přirozených metod plánování rodičovství, graf 8.35. Nejčastější je hormonální antikoncepce ve 37 případech (44,7% žen s CVD; 62,5% kontroly), bariérovou antikoncepcí (kondom) 15,8% žen s CVD a 18,8% kontroly. Významný rozdíl je u žen, které nemají pohlavní styk a u žen, které nepoužívají žádnou antikoncepci.

Graf 8.35 Preferovaná forma antikoncepce

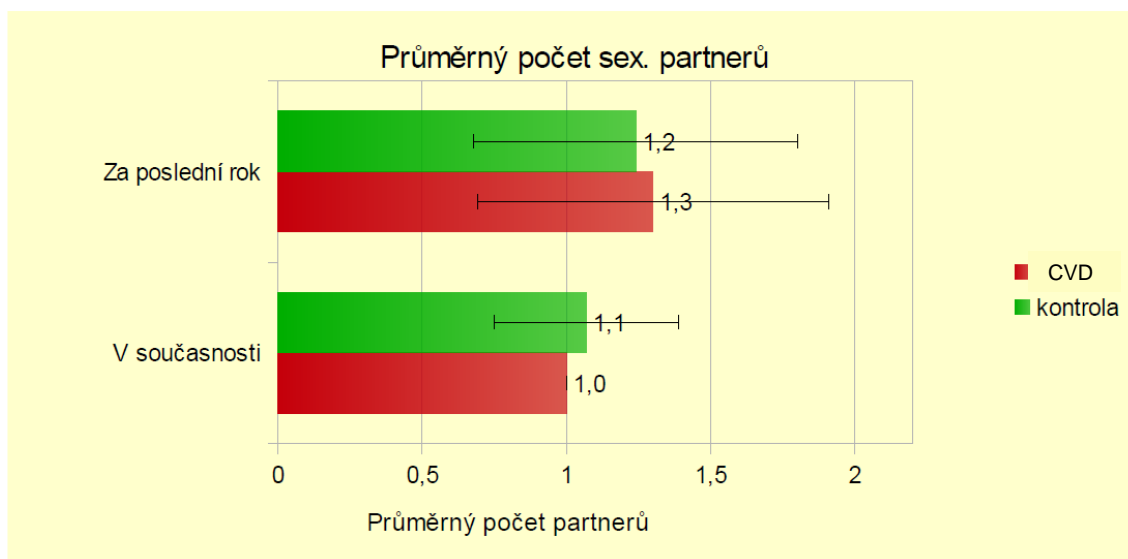


Pozn.: Ne sex=Nemá pohlavní styk, Přeruš.=Přerušovaná soulož, DI.HAK=Dlouhodobě užívaná hormonální antikoncepce, Neplodné=Metoda neplodných dnů, Nitro.=Nitroděložní tělísko (IUD i IUS)

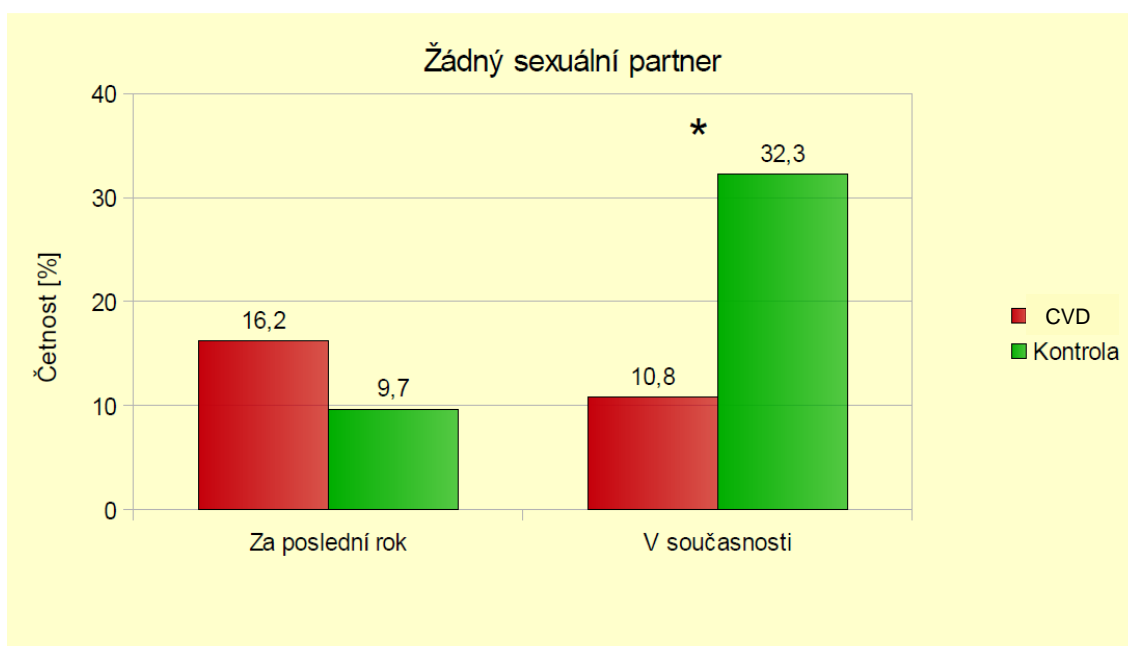
Co se týká názoru žen na vliv antikoncepce na jejich zdravotní stav, pak 28,6% žen s CVD a 23,1% z kontrolní skupiny je přesvědčeno o vlivu hormonální antikoncepce na zdravotní stav, 35,7% žen s CVD a 38,5% žen z kontrolní skupiny si myslí, že zdravotní stav neovlivňuje a 39,3% žen s CVD a 38,5% kontrol neví.

Zatímco v počtu sexuálních partnerů za posledních 12 měsíců nebyla prokázána statisticky významná odlišnost, byl statisticky významný rozdíl prokázán u žen, které nemají v současnosti sexuálního partnera (32,3% žen z kontrolní skupiny, 10,8% ze CVD), graf 8.36 a 8.37.

Graf 8.36 Průměrný počet sexuálních partnerů (hodnoceno t-testem)

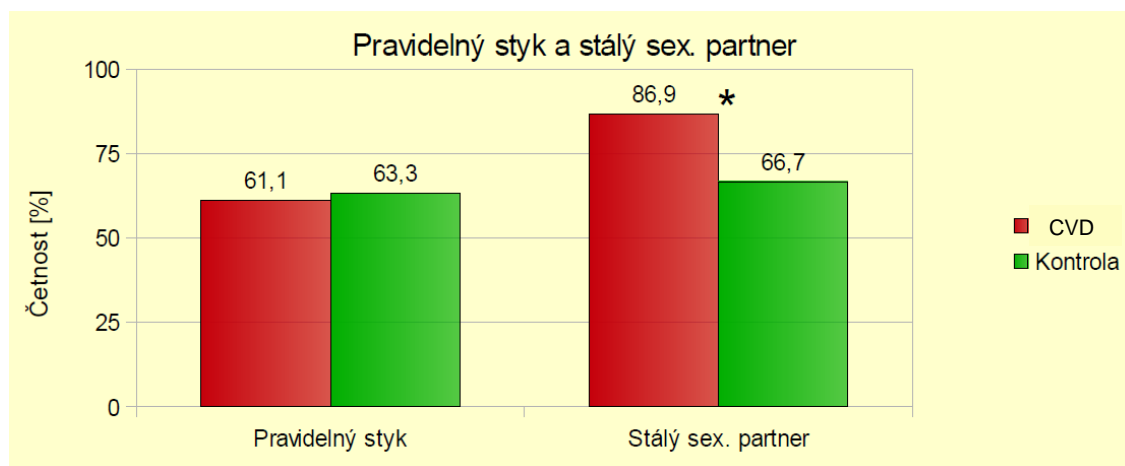


Graf 8.37 Žádný sexuální partner



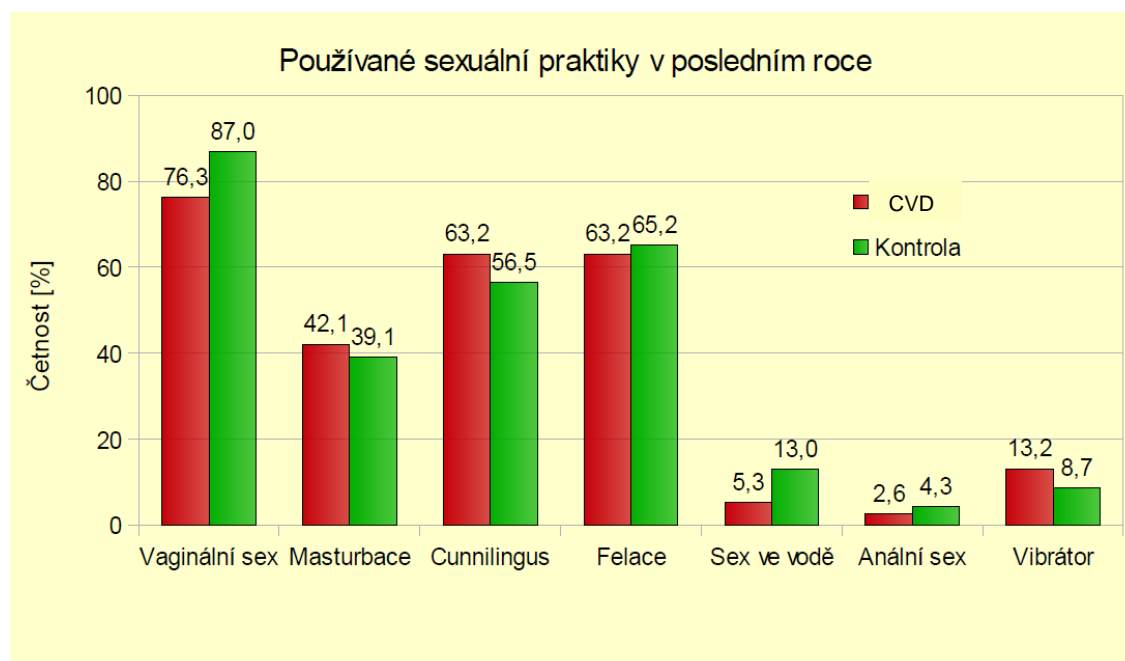
V otázce stálého sexuálního partnera a pravidelného pohlavního styku byl prokázán statisticky významný rozdíl. Stálého sexuálního partnera má 86,9% žen ze skupiny CVD a 66,7% z kontroly, graf 8.38.

Graf 8.38 Pravidelný pohlavní styk a stálý sexuální partner



Sexuální chování respondentek zobrazuje graf 8.39. Odpovídaly pouze ženy, které měly v posledním roce pohlavní styk. Nebyl prokázán statisticky významný rozdíl.

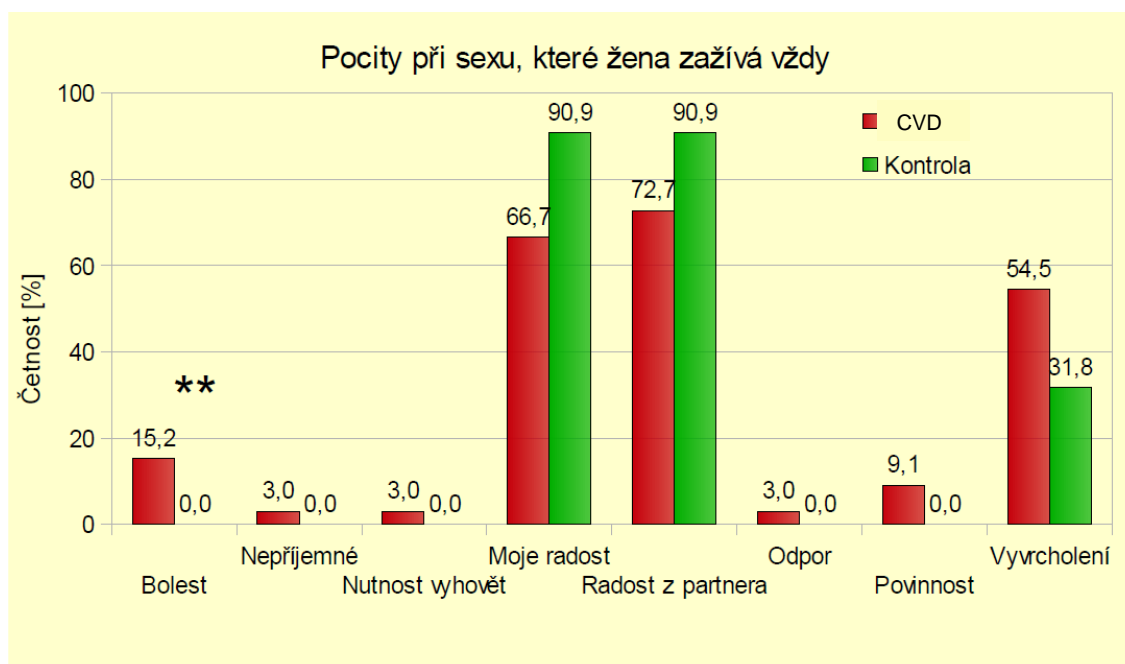
Graf 8.39 Používané sexuální praktiky v posledním roce



Pozn.: Občas = cca 1x měsíčně

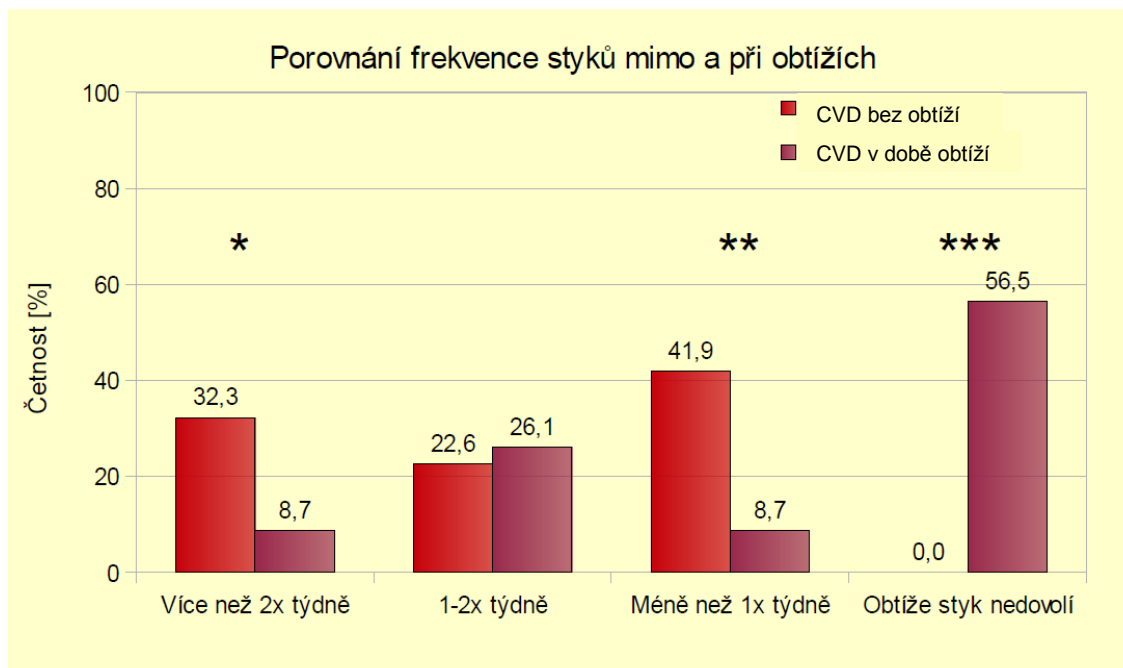
V otázce na sexuální soužití a pozitiva sexu s partnerem byla statisticky významná odlišnost prokázána jen v podotázce „Bolest a nepříjemné pocity po styku“, graf 8.40. Na otázky opět odpovídaly jen ženy, které byly v posledním roce sexuálně aktivní.

Graf 8.40 Pocity při sexu, které žena zažívá vždy



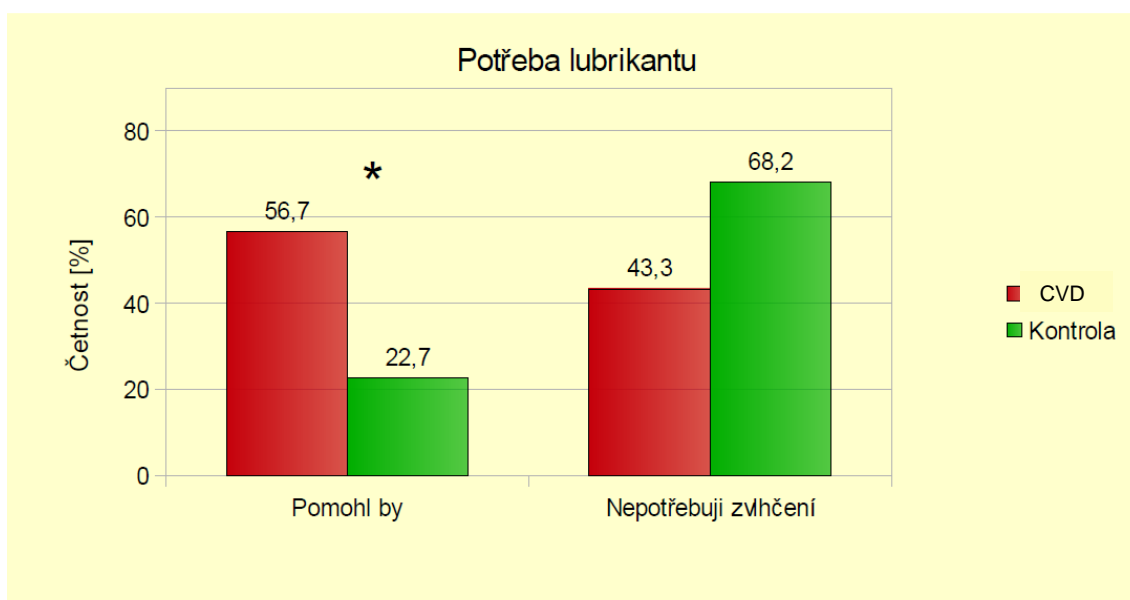
Dále byla sledována frekvence pohlavních styků za poslední rok v kontrolní skupině a skupině s CVD v období bez obtíží; a četnost styků v době výskytu obtíží, hodnoceno jen u žen s CVD. 32,2% pacientek má mimo dobu obtíží sex více než 2x týdně, v období obtíží 8,7%. 41,0% žen, které měly styk méně než 1x týdně má při potížích styk 8,7% a pro 56,5% žen je v době obtíží styk nemožný. V obou případech byl prokázán statisticky významný rozdíl, graf 8.41.

Graf 8.41 Porovnání frekvence styků mimo obtíže a při obtížích



V otázce užití lubrikantu při styku se 56,7% žen s CVD a 22,7% z kontrolní skupiny si myslí, že by lubrikant při obtížích pomohl, graf 8.42.

Graf 8.42 Potřeba lubrikantu

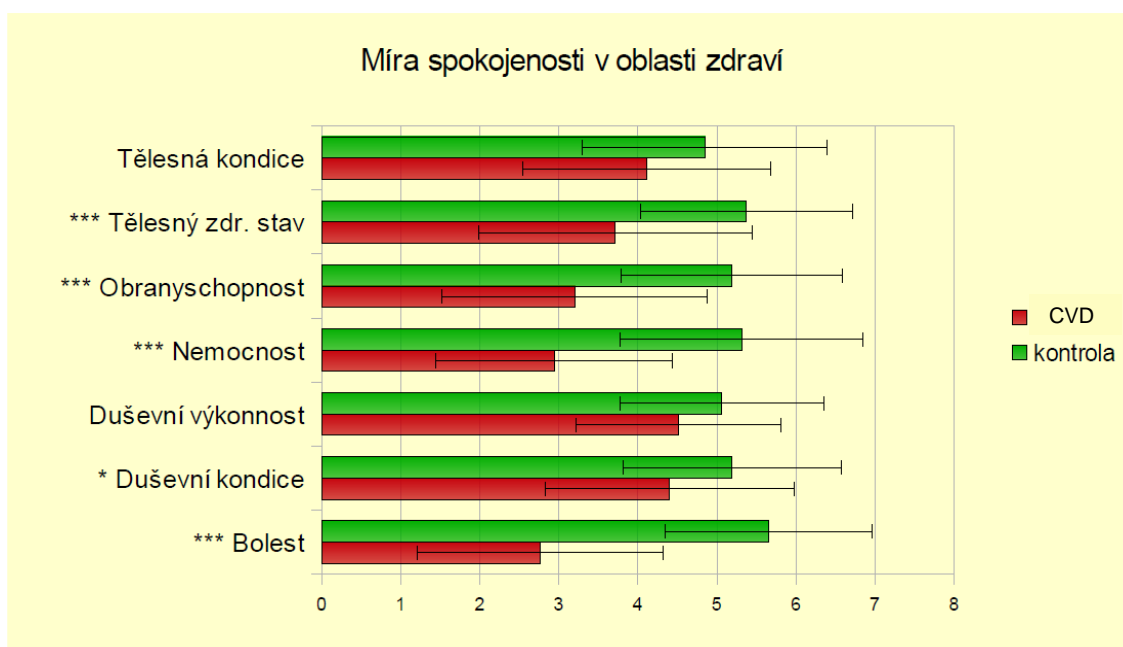


Následně byla hodnocena osobnost žen a spokojenost s vlastním životem. Pro statistické hodnocení jsme zvolili t-test.

Oblast zdraví

Právě oblast zdraví ukazuje nejhojnější výskyt statisticky významných rozdílů mezi skupinou CVD a skupinou kontrolní. Jak ukazuje graf 8.43, statisticky významné rozdíly jsou přítomny u spokojenosti s tělesným zdravotním stavem, obranyschopností, nemocností, duševní kondicí a bolestí.

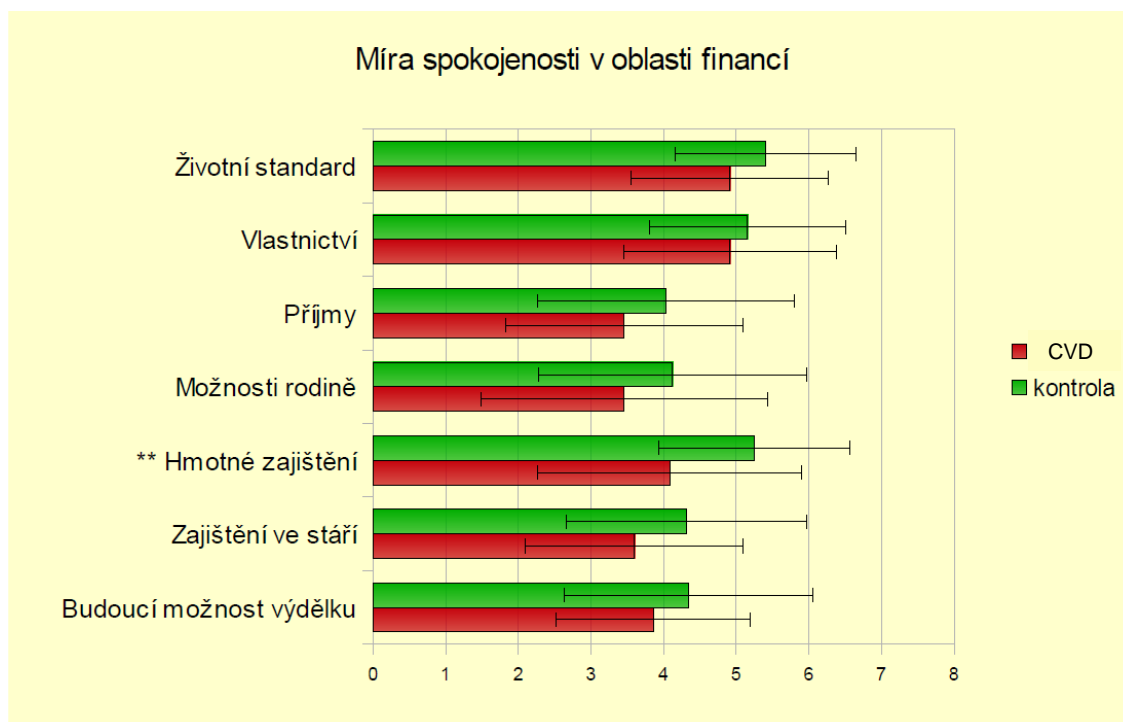
Graf 8.43 Míra spokojenosti v oblasti zdraví



Oblast financí

Přestože kontrolní skupina sestává téměř výhradně (96,9%) ze studentek, výsledky ukazují, že jsou to naopak ženy ze skupiny CVD, kdo je méně spokojen se svou finanční situací. Statisticky významný rozdíl jsme zjistili u spokojenosti s hmotným zajištěním.

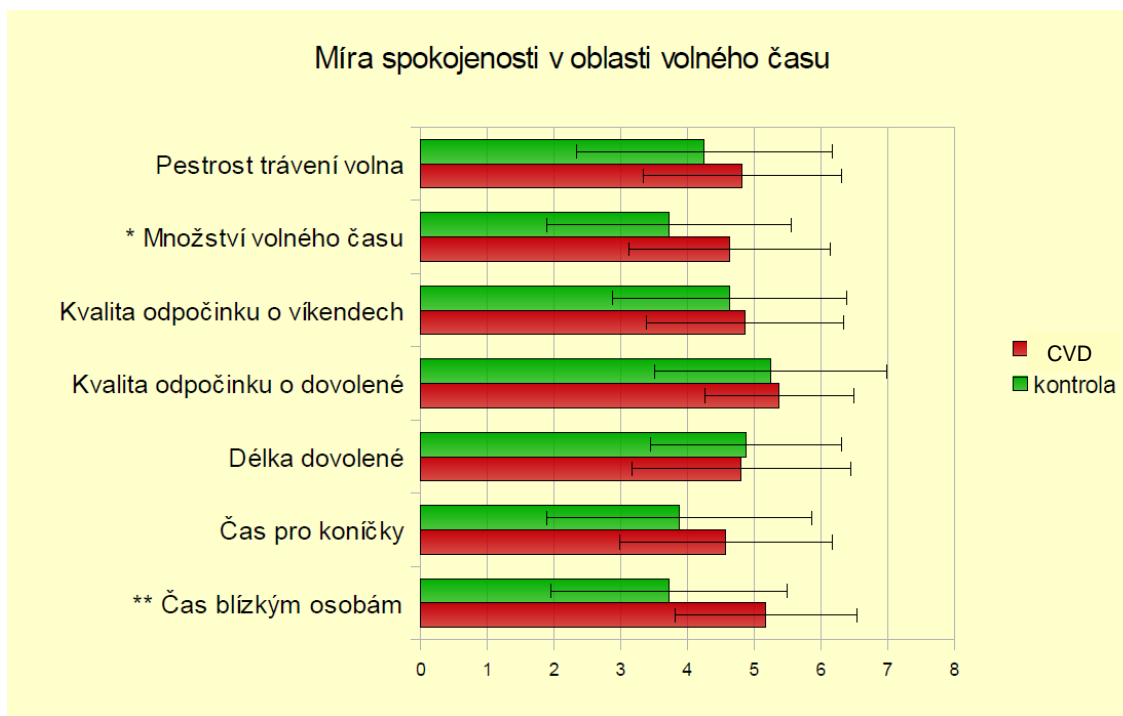
Graf 8.44 Míra spokojenosti v oblasti financí



Oblast volného času

S kvalitou, délkou a pestrostí trávení volného času jsou poněkud více spokojeny ženy ze skupiny CVD. Vysvětlením by mohlo být náročné studium studentek, jež jsou zahrnuty v kontrolní skupině a rovněž jejich odloučení od rodiny při pobytu na kolejích. Statisticky významné rozdíly jsme zjistili ve spokojenosti s množstvím volného času a ve spokojenosti s časem věnovaným blízkým osobám.

Graf 8.45 Míra spokojenosti v oblasti volného času



Oblast partnerství a manželství

Celkově je spokojenost s partnerstvím a manželstvím v obou skupinách velice podobná, ač hodnoty směrodatných odchylek značí velké rozdíly v odpovědích jednotlivých respondentek.

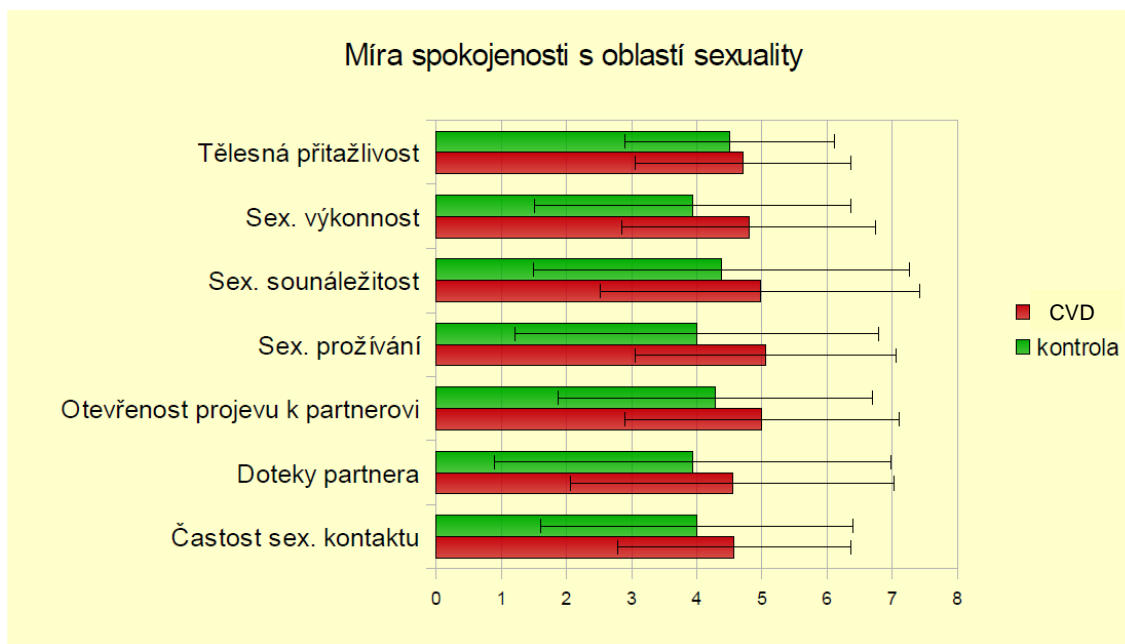
Oblast vlastní osoby

V oblasti spokojenosti s vlastní osobou jsou odpovědi obou skupin vyrovnané a nenalezli jsme žádný statisticky významný rozdíl.

Oblast sexuality

V této oblasti jsou v každé z podotázek více spokojeny ženy ze skupiny CVD. Statisticky významný rozdíl ovšem není přítomen.

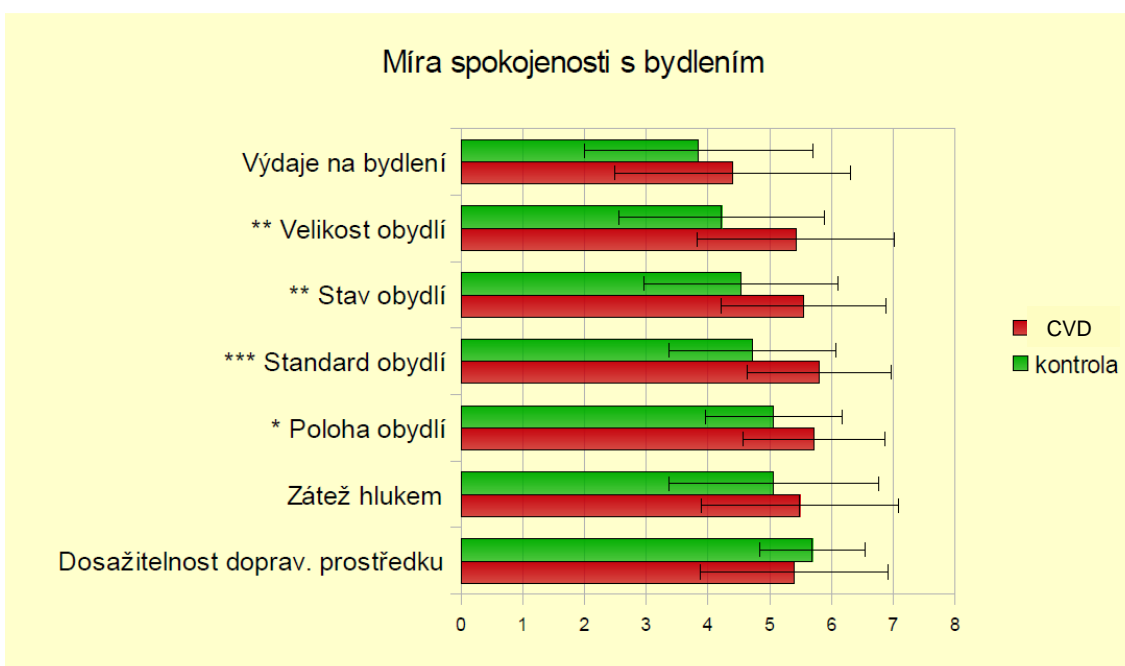
Graf 8.46 Míra spokojenosti v oblasti sexuality



Oblast bydlení

Statisticky významné rozdíly ve velikosti bydlení, stavu obydlí, standardu obydlí a polohy obydlí vyplývají pravděpodobně z faktu, že studentky z kontrolní skupiny nebyly spokojeny s kvalitou ubytování na kolejích.

Graf 8.47 Míra spokojenosti v oblasti bydlení



Oblast společenských aktivit – přátelé, známí, příbuzní

V kontaktu se společností jsou obě skupiny vyrovnané, nenalezli jsme zde žádné statisticky významné rozdíly.

Další soubor otázek se věnuje odhadu zranitelnosti stresem. Otázky jsou koncipovány tak, aby odhalily, v jaké míře jsou naše respondentky vystavovány stresovým situacím. Dotazované měly za úkol vyjádřit míru, s jakou souhlasí s jednotlivými tvrzeními.

Statisticky významné rozdíly jsme zaznamenali u schopnosti otevřeně hovořit o svých pocitech i ve složitých životních situacích. S tímto tvrzením se více ztotožnila skupina CVD. Naopak kontrolní skupina statisticky významněji potvrzuje náboženskou víru. S tvrzením „Cvičím až do zpocení nejméně 2x týdně“ se statisticky významněji ztotožnila rovněž skupina kontrolní. Grafické zobrazení dalších tvrzení přináší graf 8.48.

Graf 8.48 Míra zranitelnosti stresem



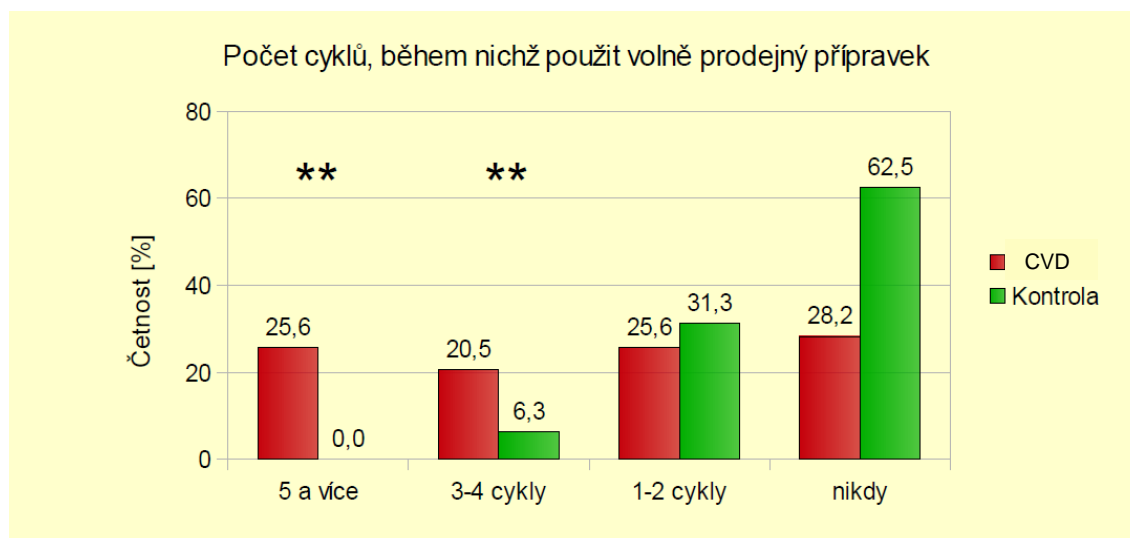
V tomto souboru otázek jsme rovněž vyhodnotili míru zranitelnosti stresem. Sečetli jsme hodnoty odpovědí (tj. 1-5) jednotlivých otázek a ženy zařadili do skupin podle počtu dosažených bodů. Z výsledků vyplývá, jak jsou ženy schopné se adaptovat ve stresových situacích.

V obou skupinách se nachází nejvíce žen v oblasti mírné zranitelnosti stresem.

Ve skupině silné zranitelnosti stresem se nachází poněkud více žen ze skupiny CVD v oblasti silné zranitelnosti stresem. Dobrou adaptabilitou na stres se vyznačují dvě ženy v každé skupině a žádná žena není extrémně zranitelná stresem. Předposlední otázka v dotazníku nás vrátí k tématu gynekologických problémů. Dotazované zde uvádějí počet menstruačních cyklů za poslední rok, během nichž použily nějaké volně prodejné přípravky (zejména krémy, globule a poševní čípky) určené k léčbě svědění, pálení či výtoku. Čtvrtina žen ze skupiny CVD použila takovýto přípravek za poslední rok pětkrát a více. Zde je statisticky významný rozdíl oproti ženám z kontrolní skupiny. I ženy z kontrolní skupiny použily volně prodejný přípravek na gynekologické obtíže, a to nejčastěji během 1-2 cyklů. Mohlo se tedy jednat o léčbu jiného gynekologického problému nebo toto zaškrtnly například uživatelky laktobacilů na zavádění, poševních gelů či výplachů.

Volně prodejný přípravek nepoužilo nikdy za poslední rok významně více žen z kontrolní skupiny.

Graf 8.49 Počet cyklů, během nichž byl použit volně prodejný přípravek na gynekologické obtíže



Na závěr respondentky odpověděly na doplňující otázku týkající se dyskomfortu. Dvanáct pacientek (33,3%) zažilo dyskomfort častěji po začátku pohlavního života. Osm pacientek (25%) zažilo dyskomfort v době používání hormonální antikoncepce. U 25 pacientek (69,44%) se dyskomfort objevil používání antibiotik. Matku či sestru trpící poševním dyskomfortem potvrdilo 14 dotazovaných, z toho polovina pacientek (18,0% CVD a 21,9% kontroly).

Charakteristika respondentek

Následují informace o průměrném věku, zaměstnanosti, rodinném stavu, vzdělání a bydlení respondentek.

Průměrný věk respondentek

Průměrný věk žen ze skupiny CVD je 31,62 let, průměrný věk zdravé kontroly je 22,95 let.

Zaměstnanost

Dvacet dva pacientek a 4 ženy z kontrolní skupiny jsou zaměstnané. Dvě pacientky mají vlastní firmu. Pět pacientek je nezaměstnaných, 8 pacientek studuje. Dvě pacientky jsou ženy v domácnosti a dvě pacientky jsou v důchodu. Třicet jedna žen z kontrolní skupiny studuje.

Rodinný stav

Sedmnáct žen ze skupiny CVD a 3 z kontrolní skupiny jsou vdané. Tři pacientky jsou rozvedené, 18 žen ze skupiny CVD a 29 zdravých žen je svobodných.

Vzdělání

Jedna žena ze skupiny CVD a jedna z kontrolní skupiny mají základní vzdělání, 6 žen ze skupiny CVD jsou vyučené, 4 jsou vyučené s maturitou.

Ukončené středoškolské vzdělání má 18 nemocných a 29 zdravých. Ukončené vysokoškolské vzdělání má 10 nemocných a 2 zdravé. Vysněného vzdělání dosáhlo 15 žen s CVD a 5 žen z kontrolní skupiny.

Bydlení

24 žen ze skupiny CVD a 9 žen z kontrolní skupiny žije s partnerem, 8 pacientek a 16 žen z kontrolní skupiny žije s rodiči a 6 pacientek a 3 ženy z kontrolní skupiny žijí samy.

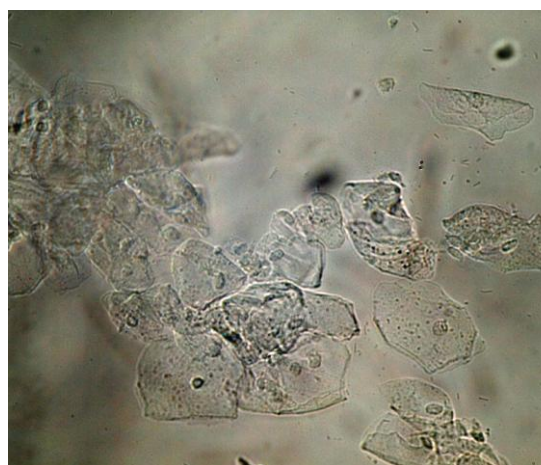
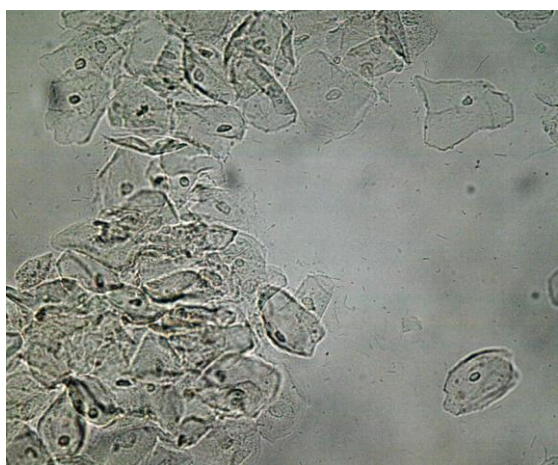
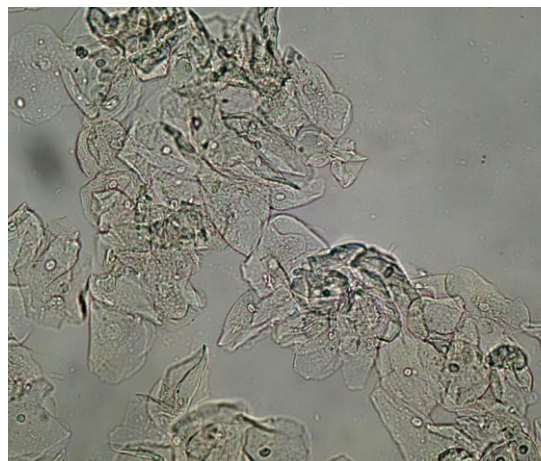
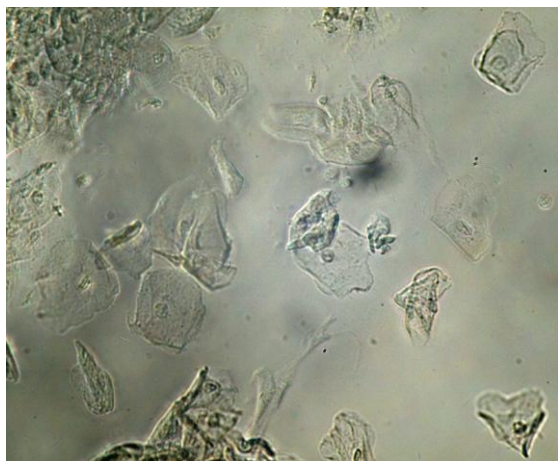
Výsledky experimentální části studie – QSM a MBL

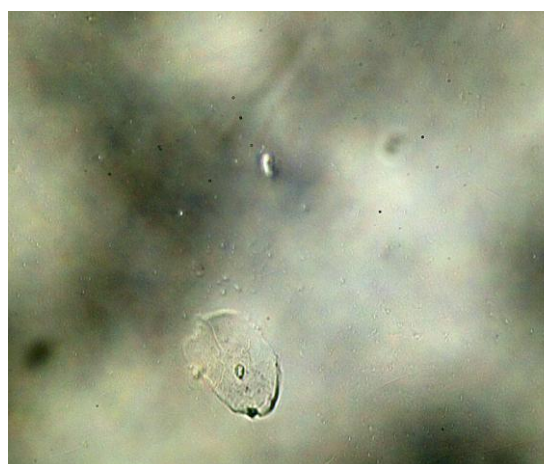
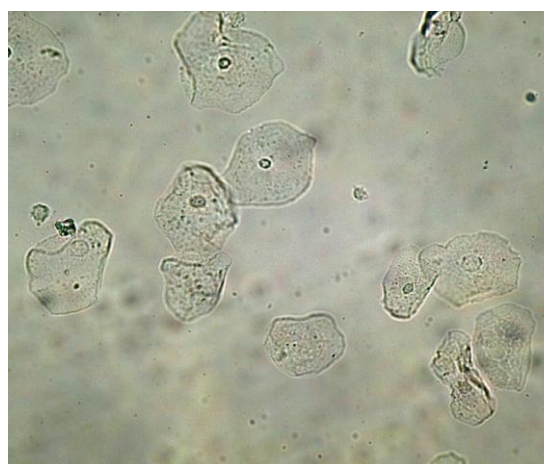
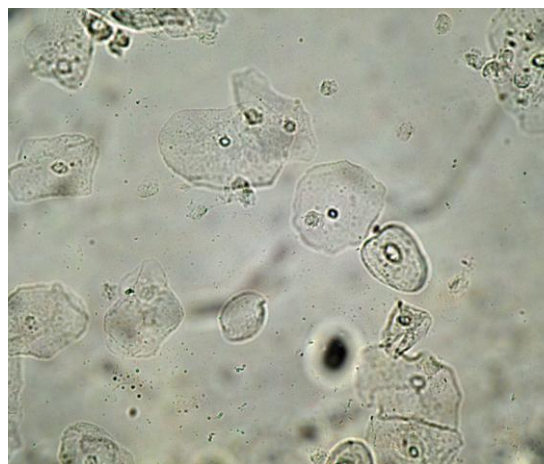
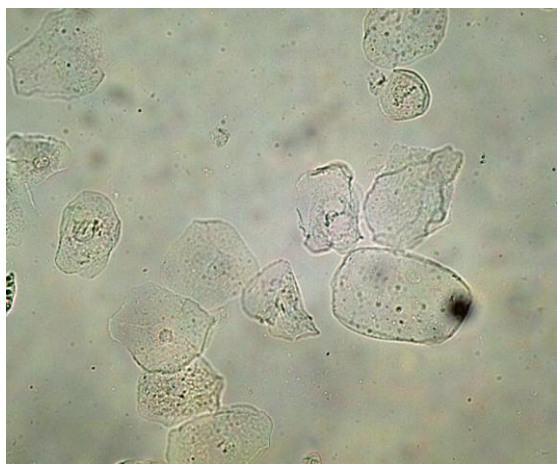
Pilotní výsledky ukázaly, že pacientky s CVD ve srovnání s kontrolními ženami měly vyšší hladiny farnesolu (24,4 vs. 11,9 nmol/L) ve vaginální sekretu a naopak nižší koncentrace tyrosolu (1088 vs. 3170 nmol/L). V případě farnesolu se jednalo o statisticky významný rozdíl ($p = 0,95$), zatímco u tyrosolu se jednalo pouze o trend. Relativně velký rozptyl hodnot u obou QSM a obou skupin žen naznačuje, že jedno z možných vysvětlení může být definice pacientky s CVD, respektive podporuje předpoklad, že CVD je multifaktoriální povahy a že ne ve všech případech musí být jeho příčinou kvasinka.²²

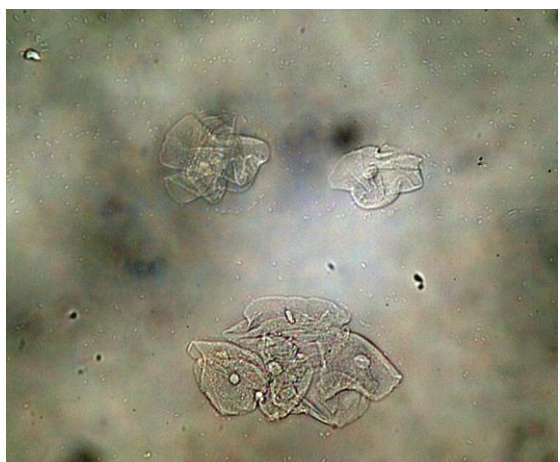
Výsledky analýzy MBL polymorfismů naznačily, že není významný rozdíl v distribuci jednotlivých polymorfismů, z čehož ale nelze vyvozovat žádné závěry, protože vyšetřovaný soubor pacientek byl relativně malý.¹⁷

9. MIKROSKOPICKÝ MONITORING U PACIENTEK S CVD

Obr. 8.1-14 Mikroskopické nálezy u patientek s CVD. Dominuje absence či výrazný úbytek laktobacilů, absence leukocytů a nepřítomnost jiných patogenů (koků, kvasinek, prvoků). Původní zvětšení 400x.







10. DISKUSE

Jednou z možných charakteristik současnosti je i narůstající počet žen, které trpí chronickými obtížemi ve vulvovaginální oblasti a postiženou nutí vyhledat odbornou lékařskou pomoc více než třikrát za rok (základní definice pro CVD). Jedná se o nehomogenní skupinu, kde u části pacientek sice dochází po nasazení antiinfekční léčby k přechodnému zlepšení, u dalších však nedojde ani k tomu. Cílem tohoto projektu bylo vytvořit charakteristiku pacientky s chronickým vulvovaginálním dyskomfortem a zejména ji vztáhnout ke kvalitě poševního prostředí.

Tato problematika zahrnuje více aspektů a je jasné, že vulvovaginální dyskomfort provází infekci, zánět a dysmikrobii. Jeho přítomnost je logická u měnících se anatomických poměrů a setkáváme se s ním pochopitelně také u nádorových změn. Proč se však můžeme setkat i s jeho těžkou formou, aniž by tomu odpovídal objektivní nálezný a zdali je vůbec možné se dopátrat k prapůvodu příčiny obtíží, jsou kruciólní otázky, které vymezují základní dimenze této problematiky. Na prvním místě by mělo být především pomýšleno na to, co se momentálně v pochvě odehrává. Předpokládáme, že poševní mikrobiota hraje v tomto ohledu významnou roli. Například její úloha při ochraně své niky (stanoviště) pomocí antimikrobních působků, quorum sensing faktorů nebo kompetice o živiny. Mikrobiota moduluje slizniční rezistenci a imunitu, zároveň je též pod vlivem makroorganismu (hormony, endogenní mikrobicidy, živiny, deskvamovaný epitel, mikroby ze střevního rezervoáru apod.), působí na ni i vlivy exogenní (hygienické prostředky, sperma, zárodky STD apod.). Krátce řečeno, mimořádná problematika a stále probíhající vícerozměrová projekce.

I když není pochyb o tom, že se jedná o skupinu pacientek, jejíž geneze není jednotná, hlavním prostředkem, který se v současné době promiskue používá je antiinfekční léčba a antimykotika. „Za všechno mohou mikroby a je třeba bojovat za kultivačně negativní nálezy!“ To je bohužel dogma řady našich kolegů, ze kterého nechtějí slevit a o které se opírají celý svůj profesní život.

Naopak smysluplné diagnostice v této oblasti se nevěnuje téměř nikdo a vše přebíjí preskripce protiinfekční a antimykotické léčby. Jak dokladujeme obrazovou dokumentací, vytváří se zde skupina pacientek, které mohou mít z opakování této léčby do budoucna jenom a jenom problémy. Problematika vulvovaginálního dyskomfortu se z hlediska personalizované medicíny dostává na samé dno. Vůči onkologickým případům a poporodnímu krvácení se sice jedná o banalitu, nicméně hodnoceno zorným úhlem momentální kvality života může jít zejména u rekurentních obtíží o frustrující hendikep. Vzhledem k tomu, že se jedná o jeden z nejčastějších důvodů návštěvy gynekologické ambulance vůbec, nelze považovat tuto problematiku za marginální.

Práce se soustřeďuje na rozbor údajů souvisejících s diagnostickým úsilím věnovaném této problematice. Jedná se o epidemiologické a demografické údaje, které byly získány v rámci širší populace (studentky FAF v Hradci Králové) a dále od vyselektované skupiny s CVD. Byl vyhodnocován počet návštěv, četnost preskripce a fakta o tom, jak probíhala diagnostika (údaje o provedeném vyšetření, léčba naslepo, mikroskopické nebo kultivační vyšetření v posledním roce před zařazením do studijní skupiny). Výsledkem naší pilotní studie je zjištění úrovně diagnostického úsilí, které je této problematice věnováno. Bohužel, naše závěry potvrzují diagnostickou apatii a nihilismus. Otázkou také je, jak tato situace vypadá v okolních zemích, ale faktem zůstává, že právě v naší republice se této problematice z řad praktických gynekologů téměř nikdo nevěnuje a podle výsledků zpracování dotazníků je patrné, že zvláště u recidiv je snaha o objektivizaci obtíží minimální. „Diagnostickým maximem“ je kultivační vyšetření. To samo o sobě do problematiky samozřejmě jasno nemůže vnést a naopak o to důležitější základní metodu - mikroskopii nikdo neprovádí, ne všechny pacientky byly z hlediska těchto obtíží vůbec vyšetřeny. Vyhodnocením získaných dat byl zjištěn zásadní odklon od personalizovaného přístupu, což může mít zejména do budoucna jenom a jenom negativní konsekvence.

Naše studie prokázala, že se v naprosté většině případů setkáváme s idiopatickou formou tohoto stavu a příčinu nedokážeme vysvětlit. Z uvedených výsledků je patrné, že se jedná většinou o ženy v produktivním věku, v naprosté

většinu případů zdravé, bez zjevného spouštěcího momentu a bez vztahu těchto vulvovaginálních obtíží k menstruačnímu cyklu. O závažnosti této problematiky vypovídá výskyt symptomů CVD během jednoho roku, kdy 85 (80,2%) pacientek udává obtíže více než 6x/rok. Zarážející je počet gynekologů provádějících základní ambulantní vyšetření jako jsou pH pochvy a o něco náročnější, mikroskopické vyšetření nativního preparátu (1 gynekolog). Za velmi nepříznivé znamení považujeme délku trvání obtíží, kdy 53 (50%) pacientek se neúspěšně léčí pro CVD více než dva roky (1 pacientka dokonce více než 15 let). Dalším alarmujícím zjištěním jsou počty předepsaných léků jednotlivým pacientkám (tab. 2) a preskripce léků bez adekvátního či dokonce jakéhokoliv vyšetření lékařem (17 pacientek, 22,7%). Toto vše svědčí o určité bezradnosti až lhostejnosti k této problematice. Jednorázové úspěšné terapeutické zvládnutí akutní ataky sporadické vaginitidy u většiny pacientek jakoby závažnost této problematiky zlehčuje. Představuje však jednu stranu mince. Tou druhou zůstává narůstající počet případů s chronickými obtížemi, kde se pravidelně můžeme dostat do diagnostických rozpaků, což činí následné terapeutické rozhodnutí problematickým. Optimální snahou je proto naučit ambulujícího lékaře na tuto problematiku správně reagovat. Výhodou je návaznost na erudované mikrobiologické pracoviště a přesunutí maxima dovedností souvisejících s mikroskopickým vyšetřením k pacientce do ambulance. Správná interpretace nálezů předpokládá patřičnou erudici a zkušenost. U klinického mikrobiologa to znamená pochopení výše uvedených souvislostí, standardizace popisu mikroskopických nálezů (např. dle Nugenta).

Z hlediska celostního přístupu k těmto pacientkám je však třeba uvažovat i v rámci širších souvislostí. Známe určité faktory, které jsou dávány do souvislosti s možným narušením kvality poševního prostředí a které jsou považovány za rizikové. Jedná se například o sex a s tím související praktiky, dále to jsou hygienické návyky a styl oblékání, ale i antibiotická léčba, dietetické odchylky a celá řada dalších. Vůči kvasinkám a kvasinkovým zánětům byl v minulosti označován jako velmi silný rizikový faktor diabetes mellitus. Součástí této práce bylo i vyhodnocení přítomnosti těchto potenciálních rizik u dlouhodobě sledovaného souboru s CVD.

Například sexuální aktivita a s ní související praktiky přináší, kromě možnosti přenosu sexuálně přenosných onemocnění, změnu pH pochvy - ejakulát mění poměry ve prospěch mikrobů adaptovaných na alkaličtější podmínky. Otázkou zůstává, zda výsledný účinek připadá na vrub zvýšeného pH a nebo jiných antimikrobních či imunologicky aktivních komponent ejakulátu. Například nechráněný sex vede k signifikantnímu zvýšení počtu *E.coli* v pochvě a také v moči, což sebou nese vyšší riziko i močových infekcí. Studium probiotik nepřímo naznačilo, že jedním z faktorů, který byl odpovědný za selhání kolonizace probiotickým kmenem, byl vaginální pohlavní styk ať už chráněný nebo nechráněný. Vzhledem k tomu, že statistická významnost byla podstatně vyšší u nechráněného sexu, lze za hlavního viníka označit seminální tekutinu/ejakulát. Pomineme-li primárně pohlavně přenosná infekční agens (např. trichomonády) je už méně dokladů o tom, jak taková dočasná alkalizace působí na bakterie nebo kvasinky.^{57;79} V rámci našeho souboru se nám nepodařila prokázat přímá souvislost mezi probíhajícím sexuálním životem a ataky VVD. Zajímavá je tato možnost jako spouštěče - trigger momentu. Ze 106 pacientek s CVD uvedlo toto pouze 10 žen (9,5%).

Do dynamiky vývoje a stability vaginální mikrobioty zasahují významně i antibiotika. Jejich aplikace je považována za obecně rizikový faktor vzniku VVD, neboť nevyhnutelně zasahuje přirozenou mikrobiotu člověka, patří tak k inzultům, které jsou spojené se vznikem např. sporadické formy vulvovaginální kandidosy a spouštěcím momentem rekurentní vulvovaginální kandidosy. Za těchto okolností bude záležet na schopnosti mikrobioty návratu do původního stavu, tj. na její ekologické pružnosti. Stále více je zřejmé, že v přechodových a destabilizovaných stavech má důležitou úlohu *L. iners*. Např. po léčbě metronidazolem, počty *L. iners* zůstávají relativně málo ovlivněné či dokonce stoupají, zatímco u ostatních bakterií BV klesají, včetně *G. vaginalis*. Jindy, u ženy, která předtím nebyla kolonizována „prospěšnými“ laktobacily (*L. crispatus*, *L. jensenii*), kolísaly hladiny anaerobů (*G. vaginalis*, *A. vaginae*, *Leptotrichia*, *Sneathia* a dal.) s maximem během menstruace a s tím, že se u ní později vyvinula BV. Počty *L. iners*, pokud byl přítomen, byly nepřímo úměrné množství gardnerel. Předpokládáme tedy, že rekurentní epizody

nejsou způsobeny selháním terapie metronidazolem, jako spíše rekolonizací pochvy anaeroby z jiných lokalit (konečník, dutina ústní). Na straně druhé, lze analogicky uvažovat o normalizaci poševních poměrů využitím probiotických kmenů laktobacilů. Z hlediska našich výsledků lze konstatovat, že většina pacientek s CVD považuje aplikaci antibiotik jako velmi rizikovou. Dle našeho zjištění je toto způsobeno spíše intuitivním strachem z recidivy obtíží, která je aplikaci antibiotik v rámci širší populace takto vnímána.

Základní tezí této práce je předpoklad souvislosti mezi percepcí vulvovaginální oblasti a aktuálním stavem poševního prostředí – jeho kvalitou, kam se projikuje celá řada faktorů a které je zrcadlem celého organismu.

Podle naší hypotézy tak CVD zřejmě představuje multifaktoriálně podmíněnou situaci, jejíž součástí je i porušení ekologické rovnováhy poševního prostředí, což může spustit známé příznaky. Nemusí se však jednat o infekci a zánět, ani o dysmikrobii. Možná je i pouhá dysbalance, která nastartuje známý kolotoč.

Nosnou součástí práce je proto prospektivní mikroskopický monitoring u CVD, který nemá dosud v současné době obdobu. Je výjimečný jednak z hlediska počtu zachycených pacientek, ale také vůči délce sledování. Cílem naší práce bylo také, jaká je skutečná prevalence rekurentní vulvovaginální kandidózy v naší části populace.

Jedná se o velký soubor a starat se o tyto pacientky ve východočeském regionu představuje každý týden 4hodinovou ambulanci. V rámci našeho souboru prováděli mikroskopické vyšetření pouze dva lékaři, kteří používali jeden mikroskop (Olympus). Obrovským pokrokem byla možnost snímky digitálně uchovávat a zejména zpočátku některé rozpaky konzultovat s erudovaným mikrobiologem. Learning curve se základním zácvikem pro nativní mikroskopii odhadujeme na 50 provedených vyšetření. Rozlišení dalších nuancí je potom běh na delší trať. V porovnání se zdravými kontrolami však sami považujeme za základní zjištění to, že v naprosté většině případů atak nebyla u našich sledovaných pacientek (dle aktuálního klinického a mikroskopického vyšetření) léčba indikovaná a tuto jsme ani

neaplikovali. Ohledně vlastního vyhodnocení mikroskopických nálezů oproti zdravým kontrolám naše práce prokázala významný deficit ohledně přítomnosti laktobacilů.

V další části je diskuse věnována vztahovým záležitostem, vztahu laktobacilů k ostatním mikroorganismům, z nichž někteří mohou být potencionálními patogeny. Tento vztah byl například prověřován u bakteriální vaginózy, dále byl zkoumán vztah laktobacilů respektive H_2O_2 ke kvasince *C. albicans*. Z velkého počtu studií je však obtížné vytvořit koncizní závěry o jejich protektivní roli u VVK. Znovunabytý zájem o tuto problematiku přichází zejména v souvislosti s novými molekulárními technologiemi a taxonomickými poznatky o laktobacilech. Ukazuje se, že snížené riziko vzniku kandidové infekce není primárně navázáno na přítomnost a počty laktobacilů, ale jejich schopnost produkovat peroxid vodíku, což je vlastnost, která je spojená jen s některými jejich druhy a kmeny. Z jedné studie vyplynulo, že přítomnost laktobacilů produkujících H_2O_2 korelovala s větší odolností k vulvovaginální kandidóze, ale ne k bakteriální vaginóze.^{78;87} Z dosavadního výzkumu srovnání žen s VVK se zdravými kontrolami nevyplývaly zásadní odlišnosti ve složení jejich mikrobioty a také pH, a proto mikrobiologické vyšetření založené na stanovení bakterií a pH nemá větší diagnostickou hodnotu. Předpokládá se, že VVK je alespoň pod částečnou kontrolou laktobacilů produkujících peroxid vodíku, ale inhibiční efekt na kvasinky, zvláště v podmínkách poševního prostředí, nebyl jednoznačně doložený a vysvětlený.⁸⁷

Na druhé straně většina starších experimentů, na kterých stojí tyto závěry, byla provedena v době, kdy byl známý a studovaný jenom „jeden“ *L. acidophilus* a případné rozdíly považované za nitrodruhovou variabilitu. Kandidy můžeme najít nejenom u zdravých žen, ale prakticky u všech doposud popsanych atypických a patologických stavů v pochvě, BV počínaje a trichomonádovou vaginitidou konče. Přitom se ani zdaleka ne vždy musí jednat o smíšenou infekci nebo dysbiózu. Z tohoto důvodu je přítomnost kvasinky v pochvě relativně nejméně patognomická, zvláště pokud není doprovázena konverzí v hyfovou formu spolu příslušnými klinickými projevy a fyziologickými změnami v pochvě. Riziko, které z toho vyplývá, je

rovněž zřejmé – diagnóza postavená pouze na nálezu kvasinky může být v mnoha případech zavádějící.^{65;117}

Na rozdíl od anaerobů tedy nelze interakci laktobacilů s kvasinkami hodnotit jednoznačně jako antagonistickou. Způsob jakým laktobacily potlačují kvasinky, není dostatečně vysvětlen. Nejspíše neexistuje univerzální látka produkovaná některým z vaginálních mikrobů, která by potlačovala kandidy. Tvorba kyseliny mléčné, kyselého prostředí a přítomnost H₂O₂, hrají roli v kontrole kvasinek, ale zjevně ne jedinečnou a absolutní. Je nutné počítat i s jinými způsoby a prostředky, které snižují počty kvasinek. Možnými kandidáty jsou zmíněné látky typu bakteriocinů nebo antibiotik, možná v kombinaci s dalšími známými či neznámými faktory. Antifungální účinek bakteriocinů proti *C. albicans* byl popsán u cyklických dipeptidů a kyseliny fenylmléčné produkovaných *L. plantarum*, pentocinu *L. pentosus* či blíže neidentifikovatelného bakteriocinu u *L. jensenii*.^{101;104;109}

Experimentální část naší práce se věnovala problematice quorum sensing látek. Neschopnost laktobacilů výrazněji potlačovat kandidy může vyplývat také z protektivního účinku farnesolu. Kandidy jsou prostřednictvím farnesolu adaptovány k oxidativnímu stresu, včetně působení H₂O₂. Zda se tento mechanismus může uplatnit v reálných podmínkách poševního prostředí je zpochybňováno pokusy, které ukázaly, že za anaerobních podmínek roste *C. albicans* přednostně ve vláknité formě, tudíž netvoří farnesol a ani není farnesolem ovlivňována.^{91;92} Klinicky relevantní však může být zjištění, že za nepřístupu vzduchu byla výrazně snížena citlivost *C. albicans* k antifungálním lékům, pravděpodobně alterací metabolismu ergosterolu.¹⁰⁷

Celkově dosavadní poznatky o poševním ekosystému tak svědčí spíše o koexistenci laktobacilů s kandidami než ostrém konkurenčním boji. Výskyt laktobacilů se zdá být nezávislý na vaginální kolonizaci kvasinkami, které tak představují více či méně přirozenou složku vaginální mikrobioty přítomnou u většiny žen.¹⁷⁹

Vzhledem k tomu, že se jedná o prospektivní longitudinální studii a pacientky byly tím pádem v naší péči, řešili jsme i jejich další léčbu. Kromě klinického vyšetření

jsme se řídily i aktuálními mikroskopickými nálezy a při nepřítomnosti projevů infekce a zánětu jsme preferovali zejména podpůrnou léčbu. Z hlediska personalizovaného přístupu je třeba obtíže související s VVD dle našeho názoru vyhodnocovat velmi uvážlivě a snažit se preskribovat antiinfekční, popřípadě antimykotickou léčbu pouze tam, kde je to nutné. Za majoritního vyvolavatele dlouhodobých obtíží jsou sice považovány kvasinky, nicméně závěry naší studie toto nepotvrzují a naopak poukazují na to, že v oblasti zevního genitálu a pochvy mohou mít právě tyto obtíže zcela odlišnou etiologii a je nutno počítat i se stavy, kde se jakákoliv antiinfekční léčba mívá účinkem a naopak je kontraproduktivní. Na významu nabývají i neinfekční příčiny a zejména využívání podpůrných léčebných prostředků.

Pro pomoc ženám trpícím CVD se nabízí intervence do poševního ekosystému „biologickými“ prostředky, jakými jsou probiotika/prebiotika nebo imunomodulátory. Jako probiotika jsou definovány živé mikroorganismy, které při aplikaci v dostatečném množství přinášejí léčené osobě prospěch. Probiotika by měla ovlivňovat patologické procesy na místech osídlených přirozenou mikrobiotou a zprostředkovaně pak i stav celého těla. Empirické užívání probiotik má tisícletou tradici, v současnosti je snaha přenést otázku probiotik na vědeckou i komerční bázi. Pro pochopení role probiotik uvažujme o tom, že lidské tělo je konfrontováno s mnohými vnějšími vlivy, které působí především v posledních dekadách tak razantně, že adaptační mechanismy nezvládají zajišťovat homeostázu, hovoříme např. o civilizačních chorobách.

Mezi rychle změněné (z hledisek evoluce *Homo sapiens*) faktory lidského života patří i mikrobiota. Jsou redukovány některé patogeny a nemoci jimi způsobované. Díky očkování a antibiotikům mizí nebo plně neprobíhají infekční choroby, čímž je omezován trénink imunity, naopak přežívají jedinci, kteří by byli uvedenými nemocemi selektováni.¹⁴⁸ Běžně se hovoří o hygienické, přesněji o antigen deprivační hypotéze v souvislosti s imunopatologickými nemocemi.¹⁸¹ Naše těla jsou konfrontována s jinou mikrobiální zátěží, s jiným spektrem antigenů, s jinou expozicí xenobiotikům, než na jakou jsou evolučně vybavena. To přináší naznačené

problémy, to přináší řešení pomocí náhražek chybějících stimulů, to je výchozí pozice probiotik.^{101;228}

Klinický efekt probiotik u CVD lze předpokládat, ovšem ustavit, resp. obnovit trvalou rovnováhu nemusí být dosažitelné, ekosystém může, ale nemusí, najít *modus vivendi* s hostitelkou. Normalizace poševní mikrobioty je zřejmě ideál.⁸⁷

Mezi kandidáty pro poševní probiotika jsou řazeny především laktobacily, neboť jsou přítomny u většiny zdravých fertálních žen a bývají spojovány s dobrou kondicí poševního prostředí. Laktobacily mají řadu druhů a ty pak více kmenů; podstatné je to, že jednotlivé kmeny se liší svými vlastnostmi a tedy i probiotickým potenciálem. Například při použití stejné identifikační metody byl u žen bez VVD nalezen nejčastěji *L. salivarius*, u žen s VVK pak *L. catenaforme*.¹⁹⁴ Pro výběr probiotického kmene se volí izoláty od žen, které nemají potíže (lze spekulovat o tom, že nejvhodnějšími „dárkyněmi“ by měly být ženy, které prodělaly právě jednu epizodu BV resp. VVK a potom už byly bez potíží). Je třeba hledat a analyzovat kmeny vhodné pro probiotickou aplikaci.^{83;87;101;176}

Výskyt určitých kmenů resp. druhů laktobacilů je vázán na etnické resp. socio-ekonomické podmínky, věk, rasu, sexuální aktivitu atd.³ Je otázkou, zda kmeny osídlující určitou populaci zdravých žen mohou ženám jiné rasy a životního stylu přinést prospěch.^{69;87}

Probiotický kmen by měl mít řadu vlastností vhodných pro normalizaci poševního prostředí. Za jeden z nejpodstatnějších produktů laktobacilů je vedle kyseliny mléčné považován peroxid vodíku, jeho produkce by měla být u probiotik přítomna.²¹⁴ Laktobacily produkují antimikrobně účinnou látku reuterin (3-hydroxypropionaldehyd), ovšem reuterin není pro probiotický účinek nezbytný, neboť kmeny bez produkce reuterinu mají příznivé probiotické účinky.²⁶ Dalším zajímavým produktem je laktocin, nedráždivý, antimikrobně účinný peptid s potenciálem pro léčbu poševních infekcí.^{9;41;50;50}

Probiotické laktobacily by dále měly být rezistentní na antibiotika užívaná u

pacientek, (metronidazol, ciprofloxacin, gentamicin, clindamycin, trimethoprim-sulfametoxazol) a citlivé k beta-laktamům, erytromycinu, tetracyklinu a benzalkonium chloridu. Také je žádoucí rezistence k nonoxinolu 9, který se užívá jako spermicid.¹³⁴ Probiotické organismy by měly mít hydrofobní povrch, schopnost adherovat na vaginální epitelie a kompetovat o místa na povrchu sliznice s patogenními kmeny^{34;115;235}, koagregovat s patogenními mikroby¹⁶⁴, inhibovat růst patogenů, např. kandid nebo prevotel či gardnerel, redukovat aktivitu biofilmu obsahujícího vaginální patogeny, např. gardnerely popř. inhibovat jiné mikroorganismy, které představují model patogenní mikroflóry při BV.^{9;11;12;141;142;169;180;186;204}

K jiným příznivým účinkům vhodných laktobacilů v pochvě patří snížení koncentrace cytokinu IL-8, který je silným chemotaktickým (tedy i prozánětlivým) působkem pro neutrofile, přitahuje je na povrch sliznice. Například přítomnost kandid je doprovázena vyššími koncentracemi IL-8.^{200;213} Laktobacily (přímo či nepřímo) redukuje počty ostatních mikroorganismů, snižují tím nabídku jejich imunoiritačních struktur (např. ligandů Toll-like receptorů) a brání tím přehnané reaktivitě epitelu a podslizničních imunitních struktur.^{74;132;168;200} Vztah laktobacilů a imunity lze charakterizovat jako vztah zdánlivé tolerance.¹⁷⁷ Hostitelka nepociťuje problémy, přitom ovšem její epitelové a imunitní struktury s laktobacily interagují.

Laktobacily indukují v buňkách vaginální sliznice nebo v neutrofilech tvorbu defenzinů, což jsou kationické bílkoviny fungující jako endogenní antibiotika. Některé defenziny jsou tvořeny trvale, jiné na popud látek z mikrobiálních těl. Defenziny udržují slizniční mikrobiotu v přijatelném množství a složení. Například *L. jensenii* stimuloval v experimentu tvorbu β -defenzinu lidskými vaginálními epiteliemi, zatímco *G. vaginalis* nikoliv. Přitom právě β -defenzin je ve vaginálním sekretu snížen při BV a jeho koncentrace se vrací k normálu po úspěšné antibiotické terapii (metronidazol, clindamycin).²¹³ Normalizovat β -defenziny v pochvě pomocí probiotik může být šetrnější a přímější cesta.

Dalším požadavkem na probiotický kmen je schopnost osídlit genitál z rezervoáru v GIT. Je považováno za výhodné, když probiotické kmeny mohou projít

GIT, usadit se v tlustém střevě a odtud kolonizovat genitál.¹⁴⁹ Perorální aplikace má totiž lepší adherenci (přijatelnost) než aplikace vaginální.^{101;166;167;176}

S laktobacily jsou prováděny genetické manipulace s cílem vložit do nich geny, které by kódovaly efektivní produkci léčivých proteinů; zatím jsou slibné pokusy s produkcí cyanovirinu N, který má inhibiční účinky na virus HIV.^{21;128} Lze očekávat i úspěšné manipulace ve prospěch léčby CVD.

Laktobacily představují i potenciální riziko, byly popsány ojedinělé případy infekčního onemocnění, např. endokarditidy při léčbě laktobacily.²³¹ Riziková je i vakcína připravená z laktobacilů – je s ní dávána do souvislosti primární biliární cirhóza.^{19;120;234}

Mezi kmeny s prokázanými probiotickými účinky patří *L. rhamnosus* GR-1, *L. reuteri* B-54 a *L. reuteri* RC-14¹⁷⁵ nebo *Weisella kimchii*.¹²¹ [Pozor, *L. rhamnosus* se ještě nedávno jmenoval *L. casei* a *L. reuteri* byl dříve *L. acidophilus* nebo *L. fermentum*.]¹¹⁷

Podstatný je ovšem klinický efekt, který je třeba určit relevantní klinickou studií. Očekávání lékařů a hlavně pacientek vede k silnému placebo účinku, takže je nutno opírat se o relevantní, zaslepené, placebem kontrolované studie. V případě probiotické léčby BV lze nalézt kolem 350 článků, pouze 4 studie snesou kritéria relevance.¹⁸⁸ Přehled studií je v tabulce, tab. 23.1.

Tab. 23.1 Výsledky studií léčby BV

Probiotikum	další léčivo	aplikace	výsledek
<i>L. rhamnosus</i> GR-1 a <i>L. reuteri</i> RC-14 (1x10 ⁹ CFU v kapsli) 2× denně 30 dnů	metronidazol	perorálně	mikrobiologie u léčených významně lepší
<i>L. rhamnosus</i> GR-1 a <i>L. reuteri</i> RC-14 (1x10 ⁹ CFU v kapsli) na noc po 5 nocí	metronidazolový gel 2× denně intravaginálně 5 dnů	intravaginálně	mikrobiologie u léčených nevýznamně lepší, pacientky subjektivně nevýznamně lepší
impregnované tampony obsahovaly <i>L. casei</i> var. <i>rhamnosus</i> , <i>L. gasseri</i> a <i>L.</i> <i>fermentum</i> (1x10 ⁸ na tampon).	předcházela léčba klindamycinovými kuličkami 100 mg vloženými vaginálně jednou denně po 3 dny	tampony během menstruace	mikrobiologie u léčených nezměněna, subjektivně nezlepšeno objektivně beze změn
vaginální tablety obsahující <i>L. acidophilus</i> (Gynoflor)	estriol	vaginální tablety	Objektivně významně zlepšeno

Podobně pesimisticky vyznívá i metaanalýza Barronse a Tassoneho (2008).¹⁶

Další studie nezahrnuté do výše uvedených metaanalýz nepřinesly většinou příznivé terapeutické výsledky při léčbě probiotickými laktobacily. Např. Larsson a

Forsum nepovažují poševní aplikaci jogurtu za fungující terapii, byť byly dříve publikovány výsledky svědčící o pozitivním vlivu konzumace jogurtu na redukci atak při RVVK.^{61;118} Hallen a spol. zaznamenali po vaginální aplikaci laktobacilů počáteční zlepšení stavu léčených, během několika týdnů se efekt vytratil.⁷⁵ Přitom ovšem bylo dokázáno, že laktobacily dokážou obsadit vaginální niku, ovšem trvanlivost laktobacilového osídlení je snižována nechráněným sexem a přítomností jiných laktobacilů v době aplikace probiotického kmene.^{4;6} Ani další autoři nedokládají pozitivní efekt probiotik při léčbě nebo prevenci BV.⁵⁵

Naopak placebem kontrolovaná studie Ozkinaye a kol. zaměřená na normalizaci vaginální mikrobioty po léčbách kandidózy, BV nebo trichomoniázy přinesla povzbudivé výsledky. Byla použita kombinace laktobacilus – estrogen.¹⁶² Podobně výsledky studie zaměřené na léčbu BV kombinací metronidazol + *L. rhamnosus* GR-1 a *L. reuteri* RC-14 byly pozitivní – po terapii byl častěji zaznamenán normální mikroskopický poševní nález (37% žen) zatímco u kontrolní skupiny normalizace byla jen u 13%.¹⁷⁶ Třebaže rozdíl je statisticky významný, terapie přináší laboratorní zlepšení pouze třetině léčených.

Teprve poslední sdělení přinášejí povzbudivé výsledky léčby BV probiotiky.^{31;130;136;139} Rovněž při léčbě RVVK probiotiky v kombinaci s antimykotikem je referováno o úspěšné terapii.¹³⁵ Zdá se, že pečlivý výběr probiotických kmenů, které se dostávají na trh v poslední době, přináší kýžený efekt. Nelze ovšem předpokládat účinek u každé pacientky a za všech okolností.¹⁰⁰ Soužití člověka s mikrobiotou se vytvářelo během stovek generací, během posledních 2 generací nastaly na straně hostitelek výrazné změny (např. antibiotika, hygiena, antikoncepce, oblečení), nelze očekávat, že vcelku jednoduchým zásahem probiotiky dokážeme ovlivnit delikátní vztah mikrobioty a makroorganismu.

11. ZÁVĚR

Z hlediska každodenní praxe představuje CVD značný medicínský problém, přičemž naprostá většina případů představuje právě jeho primární idiopatickou formu.

Výsledky naší studie potvrzují, že skupina pacientek s CVD není homogenním souborem. V naprosté většině případů nejsme schopni identifikovat ani moment, který odstartuje nástup těchto obtíží. Z hlediska každodenní praxe tak vyvstává zásadní medicínský problém zejména ve vztahu k personalizovanému přístupu. Absentuje adekvátní přístup a dokola opakující antimykotická léčba.

Naše studie potvrdila, že rekurentní vulvovaginální kandidóza, respektive kvasinková etiologie není tak častá, jak se všeobecně předpokládá. Zejména dlouhodobý mikroskopický monitoring pacientek, které byly před vstupem do naší studie opakovaně léčeny antimykotickými prostředky, potvrzoval klidové nálezy. Dominující je tak nepřítomnost zánětlivých změn, které bychom vzhledem k prezentovaným obtížím očekávali. Naopak převažujícím nálezem bývají velmi chudé nátěry s malým nebo nulovým počtem laktobacilů. Dominující je tak potřeba protekce než pokračování v devastující antimikrobiální léčbě. Současná medicína se tak v tomto případě dostává do pastí. Proklamovaná personalizace jakoby v tomto případě vůbec neexistovala, naopak vše se odvíjí od nesmyslného používání něčeho, co není vůbec potřeba a co může být i do budoucna velmi nebezpečné.

Výsledky experimentální části jsou pilotní, aby tyto měly vypovídající hodnotu, bude nutné soubor rozšířit.

Jako vždy a všude se správný přístup k této problematice obvykle odvíjí od zachování určité logické posloupnosti. Výsledkem tohoto snažení by mělo být efektivnější diagnosticko-terapeutické schéma, které nás bude dále navádět:

- Komplexní posouzení každého případu.
- Úprava životního stylu.

- Prospektivní mikroskopický monitoring považujeme za nejdůležitější diagnostický vstup.
- Kultivační vyšetření a druhová identifikace etiologického agens je jen doplňující vyšetření.
- V případě kvasinkové etiologie je nutné počítat s tím, že dominujícím agens je *C.albicans*, přičemž přítomnost ostatních kvasinek je možná, ale méně častá.
- Práce potvrdila, že je nutno počítat i se značnou diskrepancí mezi výrazně akcentovanými subjektivními příznaky a tomu neodpovídajícím chudým objektivním nálezem.
- Jako nejdůležitější součást léčebného přístupu u pacientek s CVD vidíme potřebu protekce poševního prostředí, opakování antimykotické léčby je iracionální. V případě opakovaných nálezů s absencí laktobacilů máme dobré zkušenosti i s hormonální léčbou. Vše se odvíjí od způsobu života, typu obtíží a naléhavosti požadavku na zlepšení kvality života. O úloze probiotik bylo proto rozsáhle diskutováno v předchozí kapitole.
- Podpůrnou, ale zároveň nezbytnou součástí léčby je i odpovídající psychologický přístup.

Předložená disertační práce je výsledkem dlouhodobého úsilí, které přineslo řadu pozoruhodných výsledků. Tyto budou postupně opublikovány v mezinárodních časopisech s IF.

12. POUŽITÁ LITERATURA

- (1) Aballea S, Guelfucci F, Wagner J, Khemiri A, Dietz JP, Sobel J et al. Subjective health status and health-related quality of life among women with Recurrent Vulvovaginal Candidosis (RVVC) in Europe and the USA. *Health Qual Life Outcomes* 2013; 11:169.
- (2) Anderson MR, Klink K, Cohrsen A. Evaluation of vaginal complaints. *JAMA* 2004; 291(11):1368-1379.
- (3) Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis* 1999; 180(6):1950-1956.
- (4) Antonio MA, Hillier SL. DNA fingerprinting of *Lactobacillus crispatus* strain CTV-05 by repetitive element sequence-based PCR analysis in a pilot study of vaginal colonization. *J Clin Microbiol* 2003; 41(5):1881-1887.
- (5) Antonio MA, Meyn LA, Murray PJ, Busse B, Hillier SL. Vaginal colonization by probiotic *Lactobacillus crispatus* CTV-05 is decreased by sexual activity and endogenous *Lactobacilli*. *J Infect Dis* 2009; 199(10):1506-1513.
- (6) Antonio MA, Meyn LA, Murray PJ, Busse B, Hillier SL. Vaginal colonization by probiotic *Lactobacillus crispatus* CTV-05 is decreased by sexual activity and endogenous *Lactobacilli*. *J Infect Dis* 2009; 199(10):1506-1513.
- (7) Antonio MA, Rabe LK, Hillier SL. Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 2005; 192(3):394-398.
- (8) Aroutcheva A, Ling Z, Faro S. *Prevotella bivia* as a source of lipopolysaccharide in the vagina. *Anaerobe* 2008; 14(5):256-260.
- (9) Aroutcheva AA, Simoes JA, Faro S. Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2001; 9(1):33-39.
- (10) Ashman RB. Protective and pathologic immune responses against *Candida albicans* infection. *Front Biosci* 2008; 13:3334-3351.
- (11) Aslim B, Kilic E. Some probiotic properties of vaginal *Lactobacilli* isolated from healthy women. *Jpn J Infect Dis* 2006; 59(4):249-253.
- (12) Atassi F, Brassart D, Grob P, Graf F, Servin AL. *Lactobacillus* strains isolated from the vaginal microbiota of healthy women inhibit *Prevotella bivia* and *Gardnerella vaginalis* in coculture and cell culture. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 48(3):424-432.

- (13) Babula O, Lazdane G, Kroica J, Ledger WJ, Witkin SS. Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose-binding lectin, and a mannose-binding lectin gene polymorphism in Latvian women. *Clin Infect Dis* 2003; 37(5):733-737.
- (14) Babula O, Lazdane G, Kroica J, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS. Frequency of interleukin-4 (IL-4) -589 gene polymorphism and vaginal concentrations of IL-4, nitric oxide, and mannose-binding lectin in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Clin Infect Dis* 2005; 40(9):1258-1262.
- (15) Barbone F, Austin H, Louv WC, Alexander WJ. A follow-up study of methods of contraception, sexual activity, and rates of trichomoniasis, candidiasis, and bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163(2):510-514.
- (16) Barrons R, Tassone D. Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clin Ther* 2008; 30(3):453-468.
- (17) Beranek M, Drastikova M, Buchta V, Kestránek J, Spacek J, Petera J. Jednosměrné sekvenování pcr produktů MBL2 genu pomocí polyadenylovaného sekvenačního primeru. *Chem. Listy*. 2012; 106:783-787.
- (18) Berg AO, Heidrich FE, Fihn SD, Bergman JJ, Wood RW, Stamm WE et al. Establishing the cause of genitourinary symptoms in women in a family practice. Comparison of clinical examination and comprehensive microbiology. *JAMA* 1984; 251(5):620-625.
- (19) Bogdanos D, Pusch T, Rust C, Vergani D, Beuers U. Primary biliary cirrhosis following *Lactobacillus* vaccination for recurrent vaginitis. *J Hepatol* 2008; 49(3):466-473.
- (20) Boggess KA, Trevett TN, Madianos PN, Rabe L, Hillier SL, Beck J et al. Use of DNA hybridization to detect vaginal pathogens associated with bacterial vaginosis among asymptomatic pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193(3 Pt 1):752-756.
- (21) Brichacek B, Lagenaur LA, Lee PP, Venzon D, Hamer DH. In vivo evaluation of safety and toxicity of a *Lactobacillus jensenii* producing modified cyanovirin-N in a rhesus macaque vaginal challenge model. *PLoS One* 2013; 8(11):e78817.
- (22) Buchta V, Kestránek J, Novaková L, Špaček J, Jílek P, Křivčíková L. Farnesol and tyrosol in the women with chronic vulvovaginal discomfort. 5th Trends in Medical Mycology, Poster P020 Mycoses. 2-5 October 2011, Valencia, Spain. Abstract, 2011; 54 (Suppl. 2): 66.
- (23) Buchta V, Spacek J. [Microbiological findings in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis in the Hradec Kralove Faculty Hospital 1995-2002]. *Ceska Gynekol* 2004; 69(1):7-14.

- (24) Buchta V, Spacek J. [Pitfalls of the current laboratory diagnosis and treatment of vulvovaginal candidiasis]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2011; 17(5):158-163.
- (25) Burton JP, Cadieux PA, Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(1):97-101.
- (26) Cadieux P, Wind A, Sommer P, Schaefer L, Crowley K, Britton RA et al. Evaluation of reuterin production in urogenital probiotic *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(15):4645-4649.
- (27) Camacho DP, Consolaro ME, Patussi EV, Donatti L, Gasparetto A, Svidzinski TI. Vaginal yeast adherence to the combined contraceptive vaginal ring (CCVR). *Contraception* 2007; 76(6):439-443.
- (28) Cartwright CP, Lembke BD, Ramachandran K, Body BA, Nye MB, Rivers CA et al. Development and validation of a semiquantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2012; 50(7):2321-2329.
- (29) Chassot F, Negri MF, Svidzinski AE, Donatti L, Peralta RM, Svidzinski TI et al. Can intrauterine contraceptive devices be a *Candida albicans* reservoir? *Contraception* 2008; 77(5):355-359.
- (30) Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(14):5048-5052.
- (31) Cianci A, Giordano R, Delia A, Grasso E, Amodeo A, De L, V et al. [Efficacy of *Lactobacillus Rhamnosus* GR-1 and of *Lactobacillus Reuteri* RC-14 in the treatment and prevention of vaginoses and bacterial vaginitis relapses]. *Minerva Ginecol* 2008; 60(5):369-376.
- (32) Čihák R. *Anatomie 2*. Second ed., Grada, Praha 2002, p.366-374.
- (33) Consolaro ME, Gasparetto A, Svidzinski TI, Peralta RM. Effect of pepstatin A on the virulence factors of *Candida albicans* strains isolated from vaginal environment of patients in three different clinical conditions. *Mycopathologia* 2006; 162(2):75-82.
- (34) Coudeyras S, Jugie G, Vermerie M, Forestier C. Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2008; 2008:549640.
- (35) Cruciani F, Brigidi P, Calanni F, Lauro V, Tacchi R, Donders G et al. Efficacy of rifaximin vaginal tablets in treatment of bacterial vaginosis: a molecular characterization of the vaginal microbiota. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(8):4062-4070.

- (36) Cugini C, Calfee MW, Farrow JM, III, Morales DK, Pesci EC, Hogan DA. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 2007; 65(4):896-906.
- (37) De BE, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR et al. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. *BMC Microbiol* 2007; 7:115.
- (38) De SF, Maso G, Piccoli M, Bianchini E, Crovella S, De SD et al. The role of mannose-binding lectin gene polymorphisms in women with recurrent bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197(6):613.
- (39) Deliveliotou A, Creatsas G. *Anatomy of the vulva*. First ed., Informa, London 2006, p. 344
- (40) Devillard E, Burton JP, Reid G. Complexity of vaginal microflora as analyzed by PCR denaturing gradient gel electrophoresis in a patient with recurrent bacterial vaginosis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2005; 13(1):25-31.
- (41) Dishisha T, Pereyra LP, Pyo SH, Britton RA, Hatti-Kaul R. Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Microb Cell Fact* 2014; 13:76.
- (42) Domingue PA, Sadhu K, Costerton JW, Bartlett K, Chow AW. The human vagina: normal flora considered as an in situ tissue-associated, adherent biofilm. *Genitourin Med* 1991; 67(3):226-231.
- (43) Donders GG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; 21(3):355-373.
- (44) Donders GG, Babula O, Bellen G, Linhares IM, Witkin SS. Mannose-binding lectin gene polymorphism and resistance to therapy in women with recurrent vulvovaginal candidiasis. *BJOG* 2008; 115(10):1225-1231.
- (45) Donders GG, Folens S, Peperstraete B, Bellen G. Age of sexual debut and central introital dyspareunia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 158(1):90-92.
- (46) Donders GG, Larsson PG, Platz-Christensen JJ, Hallen A, van der Meijden W, Wolner-Hanssen P. Variability in diagnosis of clue cells, lactobacillary grading and white blood cells in vaginal wet smears with conventional bright light and phase contrast microscopy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 145(1):109-112.
- (47) Donders GG, Marconi C, Bellen G. Interobserver variability in vaginal fluid wet mount microscopy can be reduced by precise definition of flora types and use of phase contrast. *J Low Genit Tract Dis* 2011; 15(4):331-332.

- (48) Donders GG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG* 2002; 109(1):34-43.
- (49) Donders GG, Vereecken A, Dekeersmaecker A, Van BB, Spitz B. Wet mount microscopy reflects functional vaginal lactobacillary flora better than Gram stain. *J Clin Pathol* 2000; 53(4):308-313.
- (50) Dover SE, Aroutcheva AA, Faro S, Chikindas ML. Safety study of an antimicrobial peptide lactocin 160, produced by the vaginal *Lactobacillus rhamnosus*. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2007; 2007:78248.
- (51) Dumonceaux TJ, Schellenberg J, Goleski V, Hill JE, Jaoko W, Kimani J 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(12):4067-4077.
- (52) Edstrom Hagerwall AM, Rydengard V, Fernlund P, Morgelin M, Baumgarten M, Cole AM et al. beta-Microseminoprotein endows post coital seminal plasma with potent candidacidal activity by a calcium- and pH-dependent mechanism. *PLoS Pathog* 2012; 8(4):e1002625.
- (53) El Aila NA, Tency I, Claeys G, Verstraelen H, Saerens B, Santiago GL et al. Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microflora. *BMC Infect Dis* 2009; 9:167.
- (54) Eschenbach DA, Patton DL, Meier A, Thwin SS, Aura J, Stapleton A et al. Effects of oral contraceptive pill use on vaginal flora and vaginal epithelium. *Contraception* 2000; 62(3):107-112.
- (55) Falagas M, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(7):657-664.
- (56) Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(2):266-272.
- (57) Fethers KA, Fairley CK, Hocking JS, Gurrin LC, Bradshaw CS. Sexual risk factors and bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2008; 47(11):1426-1435.
- (58) Fethers KA, Fairley CK, Morton A, Hocking JS, Hopkins C, Kennedy LJ et al. Early sexual experiences and risk factors for bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 2009; 200(11):1662-1670.
- (59) Fidel PL, Jr., Ginsburg KA, Cutright JL, Wolf NA, Leaman D, Dunlap K et al. Vaginal-associated immunity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: evidence for vaginal Th1-type responses following intravaginal challenge with *Candida* antigen. *J Infect Dis* 1997; 176(3):728-739.

- (60) Forstl M, Spacek J, Buchta V, Cermak P, Kalousek I. [Differential diagnosis of inflammations of the vagina and external genitalia and possibilities and limits of microbiologic examination]. *Ceska Gynekol* 2005; 70(1):79-86.
- (61) Forsum U, Holst E, Larsson PG, Vasquez A, Jakobsson T, Mattsby-Baltzer I. Bacterial vaginosis--a microbiological and immunological enigma. *APMIS* 2005; 113(2):81-90.
- (62) Frank DN, Manigart O, Leroy V, Meda N, Valea D, Zhang W et al. Altered vaginal microbiota are associated with perinatal mother-to-child transmission of HIV in African women from Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2012; 60(3):299-306.
- (63) 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(10):3270-3276.
- (64) Fujibayashi T, Nakamura M, Tominaga A, Satoh N, Kawarai T, Narisawa N et al. Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida* spp. Adherence and Biofilm Formation. *Jpn J Infect Dis* 2009; 62(5):337-342.
- (65) Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schutte UM, Zhong X et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 2012; 4(132):132ra52.
- (66) Garcia-Closas M, Herrero R, Bratti C, Hildesheim A, Sherman ME, Morera LA et al. Epidemiologic determinants of vaginal pH. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180(5):1060-1066.
- (67) Gardner HL. Desquamative inflammatory vaginitis: a newly defined entity. *Am J Obstet Gynecol* 1968; 102(8):1102-1105.
- (68) Gardner HL, DUKES CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1955; 69(5):962-976.
- (69) Garg KB, Ganguli I, Das R, Talwar GP. Spectrum of *Lactobacillus* species present in healthy vagina of Indian women. *Indian J Med Res* 2009; 129(6):652-657.
- (70) Giraldo P, von NA, Gomes FA, Linhares I, Neves NA, Witkin SS. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* 2000; 95(3):413-416.
- (71) Giraldo PC, Babula O, Goncalves AK, Linhares IM, Amaral RL, Ledger WJ et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 2007; 109(5):1123-1128.
- (72) Glocker EO, Hennigs A, Nabavi M, Schaffer AA, Woellner C, Salzer U et al. A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections. *N Engl J Med* 2009; 361(18):1727-1735.

- (73) Gregus P, Vlckova H, Buchta V, Kestránek J, Krivcikova L, Novakova L. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of quorum-sensing molecules of *Candida albicans*. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53(3):674-681.
- (74) Gupta SM, Aranha CC, Mohanty MC, Reddy KV. Toll-like receptors and cytokines as surrogate biomarkers for evaluating vaginal immune response following microbicide administration. *Mediators Inflamm* 2008; 2008:534532.
- (75) Hallen A, Jarstrand C, Pahlson C. Treatment of bacterial vaginosis with lactobacilli. *Sex Transm Dis* 1992; 19(3):146-148.
- (76) Harriott MM, Lilly EA, Rodriguez TE, Fidel PL, Jr., Noverr MC. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology* 2010; 156(Pt 12):3635-3644.
- (77) Harriott MM, Noverr MC. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(9):3914-3922.
- (78) Hawes SE, Hillier SL, Benedetti J, Stevens CE, Koutsky LA, Wolner-Hanssen P et al. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections. *J Infect Dis* 1996; 174(5):1058-1063.
- (79) Hay PE, Ugwumadu A, Chowns J. Sex, thrush and bacterial vaginosis. *Int J STD AIDS* 1997; 8(10):603-608.
- (80) Hazen KC, Cutler JE. Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1979; 24(3):661-666.
- (81) Hazen KC, Cutler JE. Isolation and purification of morphogenic autoregulatory substance produced by *Candida albicans*. *J Biochem* 1983; 94(3):777-783.
- (82) Hedges SR, Barrientes F, Desmond RA, Schwebke JR. Local and systemic cytokine levels in relation to changes in vaginal flora. *J Infect Dis* 2006; 193(4):556-562.
- (83) Hemmerling A, Harrison W, Schroeder A, Park J, Korn A, Shiboski S et al. Phase 1 dose-ranging safety trial of *Lactobacillus crispatus* CTV-05 for the prevention of bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis* 2009; 36(9):564-569.
- (84) Henic E, Thiel S, Mardh PA. Mannan-binding lectin in women with a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2010; 148(2):163-165.
- (85) Herberbeck G, Ondruš J, Dvořák V, Mortakis A. Atlas kolposkopie. První vyd. Maxdorf, Praha 2011, s.14-25

- (86) Hickey RJ, Abdo Z, Zhou X, Nemeth K, Hansmann M, Osborn TW, III et al. Effects of tampons and menses on the composition and diversity of vaginal microbial communities over time. *BJOG* 2013; 120(6):695-704.
- (87) Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The normal vaginal flora, H₂O₂-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis* 1993; 16 Suppl 4:S273-S281.
- (88) Hirdes MM, de Jong TP, Dik P, Vijverberg MA, Chrzan R, Klijn AJ. Urethral length in girls with lower urinary tract symptoms and forme fruste of female epispadias. *J Pediatr Urol* 2010; 6(4):372-375.
- (89) Homayouni A, Bastani P, Ziyadi S, Mohammad-Alizadeh-Charandabi S, Ghalibaf M, Mortazavian AM et al. Effects of probiotics on the recurrence of bacterial vaginosis: a review. *J Low Genit Tract Dis* 2014; 18(1):79-86.
- (90) Hořejší J. Dětská gynekologie, Avicenum, Praha 1990, s.68
- (91) Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(7):2982-2992.
- (92) Hornby JM, Kebaara BW, Nickerson KW. Farnesol biosynthesis in *Candida albicans*: cellular response to sterol inhibition by zaragozic acid B. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(7):2366-2369.
- (93) Horowitz BJ, Giaquinta D, Ito S. Evolving pathogens in vulvovaginal candidiasis: implications for patient care. *J Clin Pharmacol* 1992; 32(3):248-255.
- (94) Horowitz BJ, Mardh PA, Nagy E, Rank EL. Vaginal lactobacillosis. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170(3):857-861.
- (95) Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 1998; 180(18):4765-4774.
- (96) Jabra-Rizk MA, Shirliff M, James C, Meiller T. Effect of farnesol on *Candida dubliniensis* biofilm formation and fluconazole resistance. *FEMS Yeast Res* 2006; 6(7):1063-1073.
- (97) Jeremias J, Ledger WJ, Witkin SS. Interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphism in women with vulvar vestibulitis. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182(2):283-285.
- (98) Jilek P, Spacek J, Buchta V, Kucera Z, Drahosova M, Forstl M et al. [Systemic immunity in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis]. *Ceska Gynekol* 2005; 70(6):453-459.
- (99) Jírovec O, Peter R, Málek I. Mikrobní obraz poševní. SZdN, Praha, 1962

- (100) Jurden L, Buchanan M, Kelsberg G, Safranek S. Clinical inquiries. Can probiotics safely prevent recurrent vaginitis? *J Fam Pract* 2012; 61(6):357, 368.
- (101) Kaewsrichan J, Peeyananjarassri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 48(1):75-83.
- (102) Kaufman RH, Faro S, Brown D. Benign diseases of the vulva and vagina. Elsevier/Mosby, Philadelphia 2005, 420 p.
- (103) Keane FE, Ison CA, Taylor-Robinson D. A longitudinal study of the vaginal flora over a menstrual cycle. *Int J STD AIDS* 1997; 8(8):489-494.
- (104) Kennedy MJ, Volz PA. Effect of various antibiotics on gastrointestinal colonization and dissemination by *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1985; 23(4):265-273.
- (105) Kestránek J, Jr., Buchta V, Spacek J, Forstl M, Kestránek J, Sr., Jilek P et al. [Multidisciplinary approach to the management of vulvovaginal discomfort]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol* 2008; 57(1):23-27.
- (106) Kestránek J, Jilek P, Matula V, Buchta V, Gregor M, Spacek J. [What is the current stage of vulvovaginal discomfort diagnostics in the Czech Republic? Pilot analysis]. *Ceska Gynekol* 2013; 78(6):522-527.
- (107) Kinsman OS, Pitblado K, Coulson CJ. Effect of mammalian steroid hormones and luteinizing hormone on the germination of *Candida albicans* and implications for vaginal candidosis. *Mycoses* 1988; 31(12):617-626.
- (108) Klebanoff SJ, Hillier SL, Eschenbach DA, Waltersdorff AM. Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating lactobacilli. *J Infect Dis* 1991; 164(1):94-100.
- (109) Klebanoff SJ, Hillier SL, Eschenbach DA, Waltersdorff AM. Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating lactobacilli. *J Infect Dis* 1991; 164(1):94-100.
- (110) Kobilková J, Siracký J. Cytodiagnostika v gynekologii. Avicenum, Praha 1984, s.39-49
- (111) Kohler GA, Assefa S, Reid G. Probiotic interference of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 with the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2012; 2012:636474.
- (112) Koleta F. Infekce a zánět v gynekologii a porodnictví. První vyd., Grada, Praha 1995, 159 s.

- (113) Kruppa M. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses* 2009; 52(1):1-10.
- (114) Kumari A, Bishier MP, Naito Y, Sharma A, Solimene U, Jain S et al. Protective effect of an oral natural phytonutrient in recurrent vulvovaginal candidiasis: a 12-month study. *J Biol Regul Homeost Agents* 2011; 25(4):543-551.
- (115) Kwok L, Stapleton AE, Stamm WE, Hillier SL, Wobbe CL, Gupta K. Adherence of *Lactobacillus crispatus* to vaginal epithelial cells from women with or without a history of recurrent urinary tract infection. *J Urol* 2006; 176(5):2050-2054.
- (116) Lambert JA, John S, Sobel JD, Akins RA. Longitudinal analysis of vaginal microbiome dynamics in women with recurrent bacterial vaginosis: recognition of the conversion process. *PLoS One* 2013; 8(12):e82599.
- (117) Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG* 2011; 118(5):533-549.
- (118) Larsson PG, Forsum U. Bacterial vaginosis--a disturbed bacterial flora and treatment enigma. *APMIS* 2005; 113(5):305-316.
- (119) Lascar RM, Devakumar H, Jungmann E, Copas A, Arthur G, Mercey D. Is vaginal microscopy an essential tool for the management of women presenting with vaginal discharge? *Int J STD AIDS* 2008; 19(12):859-860.
- (120) Lazar E, Varga R. Gynevac-a vaccine, containing *Lactobacillus* for therapy and prevention of bacterial vaginosis and related diseases. *Akush Ginekol (Sofia)* 2011; 50(7):36-42.
- (121) Lee Y. Characterization of *Weissella kimchii* PL9023 as a potential probiotic for women. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 250(1):157-162.
- (122) Leierová V. Vulvovaginální dyskomfort – příčinné faktory: diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze, 2012; 105 s. Vedoucí dipl. práce Jílek P.
- (123) Lengeler KB, Davidson RC, D'souza C, Harashima T, Shen WC, Wang P et al. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64(4):746-785.
- (124) Leppaluoto P. The coitus-induced dynamics of vaginal bacteriology. *J Reprod Med* 1971; 7(4):169-175.
- (125) Leppaluoto P. A cytologic evaluation of the relationship of coitus and vaginal *Mycoplasma*. *J Reprod Med* 1972; 9(1):35-39.
- (126) Lev-Sagie A, Prus D, Linhares IM, Lavy Y, Ledger WJ, Witkin SS. Polymorphism in a gene coding for the inflammasome component NALP3

- and recurrent vulvovaginal candidiasis in women with vulvar vestibulitis syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200(3):303-306.
- (127) Lingappa BT, Prasad M, Lingappa Y, Hunt DF, Biemann K. Phenethyl alcohol and tryptophol: autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. *Science* 1969; 163(3863):192-194.
- (128) Liu X, Lagenaur LA, Simpson DA, Essenmacher KP, Frazier-Parker CL, Liu Y et al. Engineered vaginal lactobacillus strain for mucosal delivery of the human immunodeficiency virus inhibitor cyanovirin-N. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(10):3250-3259.
- (129) Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome* 2013; 1(1):12.
- (130) Marcone V, Calzolari E, Bertini M. Effectiveness of vaginal administration of *Lactobacillus rhamnosus* following conventional metronidazole therapy: how to lower the rate of bacterial vaginosis recurrences. *New Microbiol* 2008; 31(3):429-433.
- (131) Marconi C, Cruciani F, Vitali B, Donders GG. Correlation of *Atopobium vaginae* Amount With Bacterial Vaginosis Markers. *J Low Genit Tract Dis* 2012; 16(2):127-132.
- (132) Mares D, Simoes JA, Novak RM, Spear GT. TLR2-mediated cell stimulation in bacterial vaginosis. *J Reprod Immunol* 2008; 77(1):91-99.
- (133) Marin MG, King R, Sfameni S, Dennerstein GJ. Adverse behavioral and sexual factors in chronic vulvar disease. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(1):34-38.
- (134) Martin R, Soberon N, Vaneechoutte M, Florez AB, Vazquez F, Suarez JE. Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. *Int Microbiol* 2008; 11(4):261-266.
- (135) Martinez RC, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Candido RC, Ferreira JC et al. Improved treatment of vulvovaginal candidiasis with fluconazole plus probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Lett Appl Microbiol* 2009; 48(3):269-274.
- (136) Martinez RC, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Gomes BC, De Martinis EC et al. Improved cure of bacterial vaginosis with single dose of tinidazole (2 g), *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, and *Lactobacillus reuteri* RC-14: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Microbiol* 2009; 55(2):133-138.
- (137) Martinez RC, Seney SL, Summers KL, Nomizo A, De Martinis EC, Reid G. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 on

- the ability of *Candida albicans* to infect cells and induce inflammation. *Microbiol Immunol* 2009; 53(9):487-495.
- (138) Mašata J, Jedličková A, Poislová M, Mašatová D, Martan A. Současné možnosti diagnostiky vulvovaginálních infekcí. *Česka Gynekol* 2010; 75(2):111-117
- (139) Mastromarino P, Macchia S, Meggiorini L, Trinchieri V, Mosca L, Perluigi M et al. Effectiveness of Lactobacillus-containing vaginal tablets in the treatment of symptomatic bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15(1):67-74.
- (140) Mastromarino P, Vitali B, Mosca L. Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics. *New Microbiol* 2013; 36(3):229-238.
- (141) McClelland RS, Richardson BA, Hassan WM, Graham SM, Kiarie J, Baeten JM et al. Prospective study of vaginal bacterial flora and other risk factors for vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* 2009; 199(12):1883-1890.
- (142) McMillan A, Dell M, Zellar MP, Cribby S, Martz S, Hong E et al. Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; 86(1):58-64.
- (143) 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.
- (144) 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):513-518.
- (145) 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):134-140.
- (146) 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(7):1458-1470.
- (147) Milanese M, Segat L, De SF, Pirulli D, Fabris A, Morgutti M et al. MBL2 genetic screening in patients with recurrent vaginal infections. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59(2):146-151.
- (148) Mirmonsef P, Gilbert D, Zariffard MR, Hamaker BR, Kaur A, Landay AL et al. The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol* 2011; 65(3):190-195.

- (149) Morelli L, Zonenenschain D, Del PM, Cognein P. Utilization of the intestinal tract as a delivery system for urogenital probiotics. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38(6 Suppl):S107-S110.
- (150) Morgan DM, Umek W, Guire K, Morgan HK, Garabrant A, DeLancey JO. Urethral sphincter morphology and function with and without stress incontinence. *J Urol* 2009; 182(1):203-209.
- (151) Mucida D, Salek-Ardakani S. Regulation of TH17 cells in the mucosal surfaces. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123(5):997-1003.
- (152) Nam H, Whang K, Lee Y. Analysis of vaginal lactic acid producing bacteria in healthy women. *J Microbiol* 2007; 45(6):515-520.
- (153) Nardis C, Mastromarino P. Antibiotic effects on vaginal microbiota. *Ann Ig* 2013; 25(6):553-555.
- (154) Nasu K, Narahara H. Pattern recognition via the toll-like receptor system in the human female genital tract. *Mediators Inflamm* 2010; 2010:976024.
- (155) Nguyen RH, Swanson D, Harlow BL. Urogenital infections in relation to the occurrence of vulvodynia. *J Reprod Med* 2009; 54(6):385-392.
- (156) Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29(2):297-301.
- (157) Nyklicek O. [Improved form of vaginal cytogram for precise cytohormonal gynecological diagnostics]. *Cesk Gynekol* 1955; 20(2):132-133.
- (158) O'Hanlon DE, Lanier BR, Moench TR, Cone RA. Cervicovaginal fluid and semen block the microbicidal activity of hydrogen peroxide produced by vaginal lactobacilli. *BMC Infect Dis* 2010; 10:120.
- (159) O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect Dis* 2011; 11:200.
- (160) Oh KB, Miyazawa H, Naito T, Matsuoka H. Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(8):4664-4668.
- (161) Onderdonk AB, Zamarchi GR, Rodriguez ML, Hirsch ML, Munoz A, Kass EH. Qualitative assessment of vaginal microflora during use of tampons of various compositions. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53(12):2779-2784.
- (162) Ozkinay E, Terek MC, Yayci M, Kaiser R, Grob P, Tuncay G. The effectiveness of live lactobacilli in combination with low dose oestriol (Gynoflor) to restore the vaginal flora after treatment of vaginal infections. *BJOG* 2005; 112(2):234-240.

- (163) Paiva LC, Donatti L, Patussi EV, Svizdinski TI, Lopes-Consolaro ME. Scanning electron and confocal scanning laser microscopy imaging of the ultrastructure and viability of vaginal *Candida albicans* and non-*albicans* species adhered to an intrauterine contraceptive device. *Microsc Microanal* 2010; 16(5):537-549.
- (164) Pascual LM, Daniele MB, Ruiz F, Giordano W, Pajaro C, Barberis L. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. *J Gen Appl Microbiol* 2008; 54(3):141-148.
- (165) Pendharkar S, Magopane T, Larsson PG, de BG, Gray GE, Hammarstrom L et al. Identification and characterisation of vaginal lactobacilli from South African women. *BMC Infect Dis* 2013; 13:43.
- (166) Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, Krondorfer I, Janitschek C, Kneifel W et al. Characterisation of the oral, vaginal and rectal *Lactobacillus* flora in healthy pregnant and postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 160(1):93-99.
- (167) Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, Sandhofer MJ, Krondorfer I, Kneifel W et al. Differences in the vaginal lactobacilli of postmenopausal women and influence of rectal lactobacilli. *Climacteric* 2013; 16(3):356-361.
- (168) Pietrella D, Rachini A, Pines M, Pandey N, Mosci P, Bistoni F et al. Th17 cells and IL-17 in protective immunity to vaginal candidiasis. *PLoS One* 2011; 6(7):e22770.
- (169) Pybus V, Onderdonk AB. Evidence for a commensal, symbiotic relationship between *Gardnerella vaginalis* and *Prevotella bivia* involving ammonia: potential significance for bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 1997; 175(2):406-413.
- (170) Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res* 2006; 6(7):979-986.
- (171) Ramage G, Saville SP, Wickes BL, Lopez-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(11):5459-5463.
- (172) Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108 Suppl 1:4680-4687.
- (173) Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis* 1990; 12(5):856-872.
- (174) Reid G. Modulating the vaginal microbiome: the need for a bridge between science and practice. *Semin Reprod Med* 2014; 32(1):28-34.

- (175) Reid G, Bruce AW. Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. *World J Urol* 2006; 24(1):28-32.
- (176) Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D, Poehner R et al. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 35(2):131-134.
- (177) Reid G, Dols J, Miller W. Targeting the vaginal microbiota with probiotics as a means to counteract infections. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12(6):583-587.
- (178) Richardson M, Rautemaa R. How the host fights against *Candida* infections. *Front Biosci (Schol Ed)* 2009; 1:246-257.
- (179) Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosch DW, Nikita L et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome* 2014; 2(1):4.
- (180) Ronnqvist D, Forsgren-Brusk U, Husmark U, Grahn-Hakansson E. *Lactobacillus fermentum* Ess-1 with unique growth inhibition of vulvo-vaginal candidiasis pathogens. *J Med Microbiol* 2007; 56(Pt 11):1500-1504.
- (181) Rook GA, Stanford JL. Give us this day our daily germs. *Immunol Today* 1998; 19(3):113-116.
- (182) Rowe BR, Logan MN, Farrell I, Barnett AH. Is candidiasis the true cause of vulvovaginal irritation in women with diabetes mellitus? *J Clin Pathol* 1990; 43(8):644-645.
- (183) Rylander E, Berglund AL, Krassny C, Petrini B. Vulvovaginal candida in a young sexually active population: prevalence and association with oro-genital sex and frequent pain at intercourse. *Sex Transm Infect* 2004; 80(1):54-57.
- (184) Santiago GL, Tency I, Verstraelen H, Verhelst R, Trog M, Temmerman M et al. Longitudinal qPCR study of the dynamics of *L. crispatus*, *L. iners*, *A. vaginae*, (sialidase positive) *G. vaginalis*, and *P. bivia* in the vagina. *PLoS One* 2012; 7(9):e45281.
- (185) Sato T, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T. Farnesol, a morphogenetic autoregulatory substance in the dimorphic fungus *Candida albicans*, inhibits hyphae growth through suppression of a mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol Pharm Bull* 2004; 27(5):751-752.
- (186) Saunders S, Bocking A, Challis J, Reid G. Effect of *Lactobacillus* challenge on *Gardnerella vaginalis* biofilms. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2007; 55(2):138-142.

- (187) Schellenberg JJ, Links MG, Hill JE, Dumonceaux TJ, Kimani J, Jaoko W et al. Molecular definition of vaginal microbiota in East African commercial sex workers. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(12):4066-4074.
- (188) Senok AC, Verstraelen H, Temmerman M, Botta GA. Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;(4):CD006289.
- (189) Shchepin R, Hornby JM, Burger E, Niessen T, Dussault P, Nickerson KW. Quorum sensing in *Candida albicans*: probing farnesol's mode of action with 40 natural and synthetic farnesol analogs. *Chem Biol* 2003; 10(8):743-750.
- (190) Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, Hallen A, Fredlund H, Jensen JS et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age-- sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One* 2013; 8(4):e60670.
- (191) Sihvo S, Hemminki E. Self-medication of dyspepsia: how appropriate is it? *Scand J Gastroenterol* 1997; 32(9):855-861.
- (192) Silva D, Henriques A, Cereija T, Martinez-de-Oliveira J, Miranda M, Cerca N. Prevalence of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in Portuguese women and association with risk factors for bacterial vaginosis. *Int J Gynaecol Obstet* 2014; 124(2):178-179.
- (193) Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol* 2009; 47(7):681-689.
- (194) Sobel JD, Chaim W. Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Clin Microbiol* 1996; 34(10):2497-2499.
- (195) Spacek J, Buchta V, Jilek P, Kalousek I, Kestránek J, Matula V. Gestagens in the management of recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Chemother.* 2007; 19(3): 101.
- (196) Spacek J, Buchta V, Jilek P, Forstl M. Clinical aspects and luteal phase assessment in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007; 131(2):198-202.
- (197) Spacek J, Buchta V, Veselsky Z, Kalousek I. [Host-yeast interactions in relation to the urogenital tract, vulvovaginal candidiasis and urologic aspects of mycotic diseases]. *Ceska Gynekol* 2003; 68(6):432-439.
- (198) Spacek J, Jilek P, Buchta V, Forstl M, Hronek M, Holeckova M. The serum levels of calcium, magnesium, iron and zinc in patients with recurrent vulvovaginal candidosis during attack, remission and in healthy controls. *Mycoses* 2005; 48(6):391-395.
- (199) Spacek J, Buchta V, Jilek P. Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí. Grada, Praha 2013; 360 s.

- (200) Spear GT, Zariffard MR, Cohen MH, Sha BE. Vaginal IL-8 levels are positively associated with *Candida albicans* and inversely with lactobacilli in HIV-infected women. *J Reprod Immunol* 2008; 78(1):76-79.
- (201) Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS One* 2010; 5(4):e10197.
- (202) Strus M, Brzychczy-Wloch M, Gosiewski T, Kochan P, Heczko PB. The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 48(1):56-63.
- (203) Strus M, Chmielarczyk A, Kochan P, Adamski P, Chelmicki Z, Chelmicki A et al. Studies on the effects of probiotic *Lactobacillus* mixture given orally on vaginal and rectal colonization and on parameters of vaginal health in women with intermediate vaginal flora. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 163(2):210-215.
- (204) Strus M, Kucharska A, Kukla G, Brzychczy-Wloch M, Maresz K, Heczko PB. The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2005; 13(2):69-75.
- (205) Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Verstraelen H, Vaneechoutte M et al. *Gardnerella* biofilm involves females and males and is transmitted sexually. *Gynecol Obstet Invest* 2010; 70(4):256-263.
- (206) Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP et al. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 2005; 106(5 Pt 1):1013-1023.
- (207) Turovskiy Y, Ludescher RD, Aroutcheva AA, Faro S, Chikindas ML. Lactocin 160, a Bacteriocin Produced by Vaginal *Lactobacillus rhamnosus*, Targets Cytoplasmic Membranes of the Vaginal Pathogen, *Gardnerella vaginalis*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2009; 1(1):67-74.
- (208) Unzeitig V, Bucek R, Cupr Z, Vachek S. [Epidemiology and diagnosis in the vaginal environment. III. Diagnosis and epidemiology of bacterial vaginosis]. *Cesk Gynekol* 1991; 56(4):247-252.
- (209) Unzeitig V, Bucek R, Cupr Z, Vachek S. [Epidemiology and diagnostics in the vaginal area. I. Study of the vaginal flora using microscopy and evaluation of the microbial picture of the vagina]. *Cesk Gynekol* 1991; 56(1):1-10.
- (210) Unzeitig V, Bucek R, Cupr Z, Vachek S. [Problems of epidemiology and diagnosis in the vaginal area. II. Measurement of vaginal pH values and its relation to vaginal diseases]. *Cesk Gynekol* 1991; 56(2):93-96.
- (211) Valdez JC, Peral MC, Rachid M, Santana M, Perdigon G. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in

- infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(6):472-479.
- (212) Vallor AC, Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. *J Infect Dis* 2001; 184(11):1431-1436.
- (213) Valore EV, Wiley DJ, Ganz T. Reversible deficiency of antimicrobial polypeptides in bacterial vaginosis. *Infect Immun* 2006; 74(10):5693-5702.
- (214) Verstraelen H. Cutting edge: the vaginal microflora and bacterial vaginosis. *Verh K Acad Geneesk Belg* 2008; 70(3):147-174.
- (215) Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, De BE, Temmerman M, 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.
- (216) Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, Temmerman M, Vaneechoutte M. Culture-independent analysis of vaginal microflora: the unrecognized association of *Atopobium vaginae* with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191(4):1130-1132.
- (217) Verstraelen H, Verhelst R, Nuytinck L, Roelens K, De ME, De VD et al. Gene polymorphisms of Toll-like and related recognition receptors in relation to the vaginal carriage of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae*. *J Reprod Immunol* 2009; 79(2):163-173.
- (218) Vettrano IM, Merritt DF. Crohn's disease of the vulva. *Am J Dermatopathol* 1995; 17(4):410-413.
- (219) Virgili A, Bacilieri S, Corazza M. Managing vulvar lichen simplex chronicus. *J Reprod Med* 2001; 46(4):343-346.
- (220) Vitali B, Pugliese C, Biagi E, Candela M, Turrone S, Bellen G et al. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73(18):5731-5741.
- (221) Vujic G, Jajac KA, Despot S, V, Kuzmic V, V. Efficacy of orally applied probiotic capsules for bacterial vaginosis and other vaginal infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 168(1):75-79.
- (222) Wagner RD, Johnson SJ. Probiotic lactobacillus and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. *J Biomed Sci* 2012; 19:58.

- (223) Williams DN, Knight AH, King H, Harris DM. The microbial flora of the vagina and its relationship to bacteriuria in diabetic and non-diabetic women. *Br J Urol* 1975; 47(4):453-457.
- (224) Wilson JD, Lee RA, Balen AH, Rutherford AJ. Bacterial vaginal flora in relation to changing oestrogen levels. *Int J STD AIDS* 2007; 18(5):308-311.
- (225) Witkin SS, Gerber S, Ledger WJ. Differential characterization of women with vulvar vestibulitis syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187(3):589-594.
- (226) Witkin SS, Jeremias J, Ledger WJ. A localized vaginal allergic response in women with recurrent vaginitis. *J Allergy Clin Immunol* 1988; 81(2):412-416.
- (227) Witkin SS, Kalo-Klein A, Galland L, Teich M, Ledger WJ. Effect of *Candida albicans* plus histamine on prostaglandin E2 production by peripheral blood mononuclear cells from healthy women and women with recurrent candidal vaginitis. *J Infect Dis* 1991; 164(2):396-399.
- (228) Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P, Ledger WJ. An altered immunity hypothesis for the development of symptomatic bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2007; 44(4):554-557.
- (229) Wittemer C, Bettahar-Lebugle K, Ohl J, Rongieres C, Viville S, Nisand I. [Abnormal bacterial colonisation of the vagina and implantation during assisted reproduction]. *Gynecol Obstet Fertil* 2004; 32(2):135-139.
- (230) Xiao BB, Liao QP. [Analysis of diversity of vaginal microbiota in healthy Chinese women by using DNA-fingerprinting]. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2012; 44(2):281-287.
- (231) Yagi S, Akaike M, Fujimura M, Ise T, Yoshida S, Sumitomo Y et al. Infective endocarditis caused by lactobacillus. *Intern Med* 2008; 47(12):1113-1116.
- (232) Yano J, Noverr MC, Fidel PL, Jr. Cytokines in the host response to *Candida* vaginitis: Identifying a role for non-classical immune mediators, S100 alarmins. *Cytokine* 2012; 58(1):118-128.
- (233) Yoshimura K, Morotomi N, Fukuda K, Nakano M, Kashimura M, Hachisuga T et al. Intravaginal microbial flora by the 16S rRNA gene sequencing. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 205(3):235-239.
- (234) Yu Q, Zhu L, Kang H, Yang Q. Mucosal *Lactobacillus* vectored vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 2013; 9(4):805-807.
- (235) Zarate G, Nader-Macias ME. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett Appl Microbiol* 2006; 43(2):174-180.
- (236) Zariffard MR, Novak RM, Lurain N, Sha BE, Graham P, Spear GT. Induction of tumor necrosis factor- alpha secretion and toll-like receptor 2 and 4 mRNA

expression by genital mucosal fluids from women with bacterial vaginosis. *J Infect Dis* 2005; 191(11):1913-1921.

- (237) Zdolsek B, Hellberg D, Froman G, Nilsson S, Mardh PA. Vaginal microbiological flora and sexually transmitted diseases in women with recurrent or current vulvovaginal candidiasis. *Infection* 1995; 23(2):81-84.
- (238) 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(5):1812-1819.

13. PUBLIKAČNÍ ČINNOST

Monografie a kapitoly v monografiích

Kestřánek J, Špaček J. Vulvodynie ve Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí. Grada, Praha 2013; s.231-240.

Špaček J, Soukup T, Jílek P, Bavor J, Kestřánek J. Anatomické a histologické poznámky, ontogenetické aspekty vulvovaginální oblasti ve Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí. Grada, Praha 2013; s.17-30.

Špaček J, Buchta V, Kestřánek J. Rozdělení vulvovaginálního dyskomfortu, možnosti diagnostiky v ambulanci ve Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí. Grada, Praha 2013; s.93-112.

Špaček J, Buchta V, Jílek P, Kestřánek J. Vulvovaginální kandidóza ve Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí. Grada, Praha 2013; s.155-178.

Buchta V, Špaček J, Jílek P, Kestřánek J. Rekurentní vulvovaginální kandidosa na začátku 3. tisíciletí ve Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí. Grada, Praha 2013; s.177-196.

Původní články

Kestřánek J, Špaček J, Ryška P, Adamkov J, Matula V, Buchta V. Radiofrequency therapy for severe idiopathic vulvodynia. J Low Genit Tract Dis. 2013;17(4):1-4. **IF 1,21**

Kestřánek J, Jílek P, Matula V, Buchta V, Gregor M, Špaček J. Jaký je aktuální stav diagnostiky vulvovaginálního dyskomfortu v České republice? Pilotní analýza. Ceska Gynekol 2013; 78(6):522-527.

Kestřánek J, Špaček J, Matula V. Nový pohled na problematiku vulvodynie. Česká gynekologie, 2010; 75(6):521-526

Kestřánek J, Buchta V, Špaček J, Förstl M, Kestřánek J sr., Jílek P, Matula V. Problematika vulvovaginálního dyskomfortu z hlediska mezioborové spolupráce. EMI 2008; 57(1):23-27

Kestřánek J. Antiinfekční terapie v graviditě a laktaci. Gynekolog 2006; 16(3):107-109.

Gregus P, Vlckova H, Buchta V, Kestranek J, Krivcikova L, Novakova L. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of quorum-

sensing molecules of *Candida albicans*. *J Pharm Biomed Anal* 2010; 53(3):674-681.
IF 2,453

Unzeitig V, Kestřánek J, Špaček J. Podání transfer-faktoru (IMUNOR) u žen s chronickým vulvovaginálním diskomfortem: výsledky klinické studie. *Praktická gynekologie*. 2012, 16(1):3-6

Beránek M, Draštíková M, Buchta V, Kestřánek J, Špaček J, Petera J. Jednosměrné sekvenování pcr produktů MBL2 genu pomocí polyadenylovaného sekvenačního primeru. *Chem. Listy*. 2012; 106:783-787.

Buchta V, Matula V, Kestřánek J, Vejsová M, Křivčíková L, Špaček J. Je diabetes mellitus rizikový faktor kvasinkového poševního zánětu? *Ceska Gynekol* 2013; 78(6):537-544.

Matula V, Kestřánek J, Buchta V, Broďák M, Špaček J. Jak dále v diagnostice kvasinek u gynekologických pacientek? *Česka Gynekol* 2010; 75(6): 547-552.

Špaček J, Buchta V, Jílek P, Krejsek J, Pidrman V, Kalousek I et al. Rekurentní vulvovaginální kandidóza - současný stav problematiky a léčebné možnosti. *Česká Gynekol* 2008; 73(3):179-184.

Špaček J, Buchta V, Kestřánek J. Vulvovaginální dyskomfort mykotického původu – současný stav a léčebné možnosti. *Interní medicína pro praxi*. 2012; 14(3):119-121.

Špaček J, Buchta V, Jílek P, Kestřánek J, Matula V. Quo vadis v antimykotické léčbě gynekologických obtíží na začátku třetího tisíciletí? *Dermatologie pro praxi*. 2011; 5(2): 81-85.

Špaček J, Buchta V, Jílek P, Halada P, Kestřánek J. Současné trendy v léčbě vulvovaginálního dyskomfortu. *Medicína pro praxi* 2011; 8(2):77-82.

Jiří Špaček, Petr Jílek, Vojtěch Matula, Jan Kestřánek Vliv vaginálního ekosystému na komplikace v graviditě *Gynekológia pre prax*. 2007, roč. 5, č. 4, s. 197-199.

Špaček, Vladimír Buchta, J. Kestřánek Vulvovaginální kandidóza - problém stále aktuálnější *Gynekolog*. 2006, Roč. 15, č. 4, s. 149-152

Řezáč A, Sedláková I, Tošner J, Špaček J, Kestřánek J, Kříž J. Význam testování chemosenzitivity u ovariálního. *Gynekolog*. 2006, Roč. 15, č. 5, s. 193-196.

Náležinská M, Soukal A, Zachoval R, Kerekes Z, Kestřánek J, Chovanec J. Schwannom v pánevní lokalizaci – kazuistika. *Gynekolog*. 2014, 23(1):13-17.

Špaček J jr, Navrátil P, Kestřánek J, Špaček J, Doležal J, Broďák M. Vezikouterinní vlasová píštěl osm let po císařském řezu – kazuistika. *Česká gynekologie*. 2013, 78(6):528-530.

Přehledové články

Kestřánek J. Diskuse na celostátním sjezdu gyn.-por. společnosti v Českém Krumlově. Gynekolog 2004; 13(4):185-187.

Přednášky na odborných setkáních

Kestřánek J., Matula V., Dvořák O.: První zkušenosti s fixací předního prolift like meshe do sakrospinózních ligament. Praktická urogynekologie, Mělník 2010

Kestřánek J. Vulvodynie – pohled odborníka. Konference ČGPS a SSG, Praha 2013

Kestřánek J, Špaček J. Jaké mikroskopické nálezy můžeme očekávat u pacientek s chronickým vulvovaginálním dyskomfortem? 3. Konference sekce infekčních nemocí v gynekologii a porodnictví, Praha 2010

Kestřánek J, Matula V, Dvořák O. Fixation of anterior Prolift-like mesh in sacrospinous ligaments – first experience (poster 438), 36. annual meeting of the IUGA, 2011, Lisbon, Int Urogynecol J 2011; 22 (Suppl 3):1954.

Kestřánek J. Chronický vulvovaginální dyskomfort – problém stále aktuálnější (poster). 4. česko – slovenská mezioborová konference lékařské mykologie, 31.5.-2.6.2007, Pardubice 2007.

Kalousek I, Kopecký P, Kestřánek J. Overactive bladder – Multimedia interactive CD (poster 312), 33. annual IUGA meeting, Book of abstracts, Taipei 2008; S232.

Kalousek I, Kopecký P, Kestřánek J. Success of stress incontinence treatment by means of TOT Ureas H system in the region of Hradec Králové (the Czech Republic) (poster P630), XIX FIGO World Congress of Gynecology & Obstetrics, 2009, Cape Town, Int J Gynecol Obstet 2009; 1:107.

Dvořák O, Kestřánek J, Matula V. Nekrotizující fasciitida - pooperační komplikace TOT. Praktická urogynekologie, Mělník 2010

Matula V., Kestřánek J. Zkušenosti s využitím implantátů v terapii sestupu dna pánevního ve FN v letech 2006-2010, Praktická urogynekologie, Mělník 2010

Matula V, Dvořák O, Kestřánek J. TRANSURETRÁLNÍ MALINZERCE TOT–CASE REPORT. Praktická urogynekologie, Praha 2011

Dvořák O, Kestřánek J, Matula V. FIXACE PŘEDNÍHO PROLIFT-LIKE MESHE DO SAKROSPINÁLNÍCH LIGAMENT (12-18 MĚSÍČNÍ FOLLOW UP). Praktická urogynekologie, Praha 2011

Spacek J, Buchta V, Jilek P, Kalousek I, Kestranek J, Matula V. Gestagens in the management of recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Chemother.* 2007; 19(supp. 3): 101.

Buchta V, Kestřánek J, Novaková L, Špaček J, Jílek P, Křivčíková L. Farnesol and tyrosol in the women with chronic vulvovaginal discomfort. 5th Trends in Medical Mycology, Poster P020 Mycoses. 2-5 October 2011, Valencia, Spain. Abstract, 2011; 54 (Suppl. 2): 66.