

## MICROBIOME OF THE WOMEN'S GENITAL SYSTEM

Monika Pytka, Monika Kordowska-Wiater\*, Piotr Jarocki

Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, University of Life Sciences in Lublin

Received in December 2018, accepted in June 2019

**Abstract:** The genital system of women has been colonized by various species of microorganisms since the beginning of life. In the post-natal period, the method of birth is important; when a child is born naturally, passing the female genital tract, it acquires bacteria present in the mother's vagina, and when through the cesarean section, the child's organism is first colonized by the mother's skin microbiota and hospital strains. In female newborns during the first days after the natural birth, the presence of *Lactobacillus* rods, which acidify the vagina, is readily observed. Later, however, they disappear and during the childhood period, the pH of the vagina becomes alkaline. Only in the period of puberty and full puberty, as a result of the increase in the level of estrogen in the female body, the amount of *Lactobacillus* strains increases and this continues up to the menopause period, when pathogenic strains begin to dominate. The female vagina is home to not only numerous bacteria, but also fungi, including mainly *Candida* yeast and filamentous fungi at a lower extent. Dysbiosis of the vagina may be caused by the predominance of pathogenic bacteria over *Lactobacillus*, resulting in bacterial vaginosis or excess of *Candida* yeast, resulting in candidiasis. An effective method leading to the homeostasis of the female sexual system is the use of vaginal probiotics, which should consist of strains characteristic to a given female population.

1. Introduction. 2. Microbiome of the baby in the prenatal and postnatal period. 3. *Lactobacillus* genus as the dominant microbiota of the female genital system. 4. Mycobiome of the female vagina. 5. Vaginal probiotics. 6. Summary

### MIKROBIOM UKŁADU PŁCIOWEGO KOBIEC

**Streszczenie:** Układ płciowy kobiet już od początku życia jest kolonizowany przez różnorodne gatunki drobnoustrojów. W okresie post-natalnym istotne znaczenie ma sposób narodzin dziecka; jeśli narodziło się w sposób naturalny to przechodząc przez drogi rodne matki nabyło bakterie bytujące w jej pochwie, a jeśli w wyniku cesarskiego cięcia, jego organizm został na początku zasiedlony przez mikrobiotę skóry matki oraz szczepy szpitalne. U noworodków płci żeńskiej, przez pierwsze dni po porodzie naturalnym obserwuje się obecność pałeczek mlekowych *Lactobacillus*, które zakwaszają pochwę. Później jednak zanikają i w okresie dziecięcym pH staje się zasadowe. Dopiero w okresie dojrzewania i pełnej dojrzałości płciowej, w wyniku zwiększenia poziomu estrogenów w kobiecym organizmie, następuje wzrost liczby szczepów *Lactobacillus* i trwa to aż do okresu menopauzy, kiedy zaczynają dominować szczepy patogenne. Kobięca pochwa jest miejscem bytowania nie tylko licznych bakterii, ale również grzybów, w tym głównie drożdży z rodzaju *Candida*, oraz mniej licznych grzybów strzępkowych. Dysbioza pochwy może być spowodowana przewagą bakterii patogennych nad pałeczkami *Lactobacillus*, co skutkuje waginozami bakteryjnymi lub nadmiarem drożdży *Candida*, w efekcie czego pojawiają się kandydozy. Skuteczną metodą prowadzącą do homeostazy układu płciowego kobiet jest stosowanie probiotyków dopochwowych, które powinny składać się ze szczepów charakterystycznych dla danej populacji kobiet.

1. Wprowadzenie. 2. Mikrobiom dziecka w okresie prenatalnym i postnatalnym. 3. Rodzaj *Lactobacillus* jako dominująca mikrobiota w układzie płciowym kobiet. 4. Mykobiom kobiecej pochwy. 5. Probiotyki dopochwowe. 6. Podsumowanie

**Key words:** *Lactobacillus*, microbiome, mycobiome, vaginal probiotics, genital system of women

**Słowa kluczowe:** *Lactobacillus*, mikrobiom, mykobiom, probiotyki dopochwowe, układ płciowy kobiet

### 1. Introduction

The human body is a unique living environment for many microorganisms characterized by a large diversity of species and genera. Bacteria, fungi, archaea and viruses colonizing the human body are called a microbiota [27]. They are found both on the skin surface and in the entire digestive system, from the oral cavity to the anus, in the upper respiratory tract and the urogenital system. However, most of them inhabit our digestive tract, including their greatest abundance in

the large intestine, where in 1 ml of the content there are on average  $10^{12}$  microbial cells [25, 58]. Currently, the term microbiome refers to the set of genomes of archaea, commensal, symbiotic and pathogenic bacteria and fungi as well as viruses in the human environment. Clarification of this term became possible thanks to the development of molecular biology and genetic engineering, in particular metagenomic sequencing [32, 50, 58]. Acquiring knowledge of the microbiome revealed the presence of many microorganisms that had previously been unknown [27]. The first comprehensive studies

\* Corresponding author: Monika Kordowska-Wiater, Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704, Lublin; phone: + 48 81 462 33 57; e-mail: monika.kordowska-wiater@up.lublin.pl

of the human microbiome were launched in 2007 by implementing the international Human Microbiome Project (HMP). The project mentioned above concerned microorganisms whose discovery was based on their genomic nucleotide sequences (metagenomes), nucleotide sequences of messenger RNA (metatranscriptome), protein synthesis (metaproteome) and determination of metabolic products (metabolome) [50]. It is reported that the weight of an adult human's microbiota is approx. 1–1.5 kg [35, 62]. Microorganisms are particularly abundant and multiply in the places of human body secretions and fluids, such as saliva, sweat, urine, tallow, runny nose, vaginal mucus and blood. Among them are microorganisms providing metabolites necessary for the proper functioning of the organism and pathogens, which cause dysbiosis in the human organism, often causing infections, inflammations, viral, bacterial or fungal diseases.

The female vagina is a characteristic microenvironment of the human body. The species diversity of the vaginal microbiota depends on many factors, such as: woman's age, place of residence (climatic zone), quality and frequency of hygienic procedures, medications applied, e.g. antibiotics, steroids, immunosuppressants or level of hormones, mainly estrogens in the female organism [44]. The predominant group of bacteria colonizing the vagina of healthy women are the rods of *Lactobacillus*, while among the yeasts the most common are those of the genus *Candida*. Disorders of the homeostasis of the vaginal microbiota rely mainly on the change in the ratio between lactobacilli and pathogens, in favour of the latter [26, 71]. In order to restore the natural vaginal microbiota, vaginal probiotics consisting of various species of *Lactobacillus*, isolated from the vagina of healthy women, are used.

## 2. Microbiome of the baby in the prenatal and postnatal period

Until recently, it was thought that the intrauterine environment of a child's life is sterile. However, modern microbiological and genetic tests confirm the existence of microorganisms in a child already in the prenatal period. The source of these microorganisms is the mother's organism, and her health condition has a big impact on their quality.

During pregnancy, the female body undergoes numerous changes at the hormonal, immunological and metabolic level, necessary for the normal growth and development of the child in the prenatal period [46]. During this time, the levels of secreted hormones: progesterone and estrogens increase rapidly, and complex changes modulating the immune system, protecting the mother and child from infections are observed.

During the prenatal development of the child, the presence of bacteria has been demonstrated in the placenta, amniotic fluid and umbilical cord blood. It was found that the bacterial populations present in the placenta and amniotic fluid are similar and exhibit little diversification. The type *Proteobacteria* dominated and the main genera were *Enterobacter*, *Escherichia* and *Shigella*. Microorganisms were also detected in meconium, i.e. the first stool of newborns delivered both in the natural way and by caesarean section. There occurred mainly lactic bacteria of the genus *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* and *Enterococcus* in it, as well as other ones of the genus *Streptococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* and *Bacteroides* [38]. It is assumed that the presence of bacteria belonging to the genera: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in the placenta, amniotic fluid or meconium may be caused by the transition of microorganisms via the bloodstream, which is confirmed by the presence of various bacteria in umbilical cord blood [37]. In addition, in the child's body in the prenatal period, the presence of microbiota may be the result of swallowing amniotic fluid, which affects the initial colonization of the gastrointestinal tract and skin in children, and in the case of newborn of female sex – colonization of the vagina [63].

The analysis of the composition of the bacteria species identified in meconium, placenta and amniotic fluid showed a high similarity to the species composition of bacteria found in the mouth of mothers. It has been observed that some oral cavity and gum diseases in pregnant mothers increase the risk of premature labour [1]. Therefore, it is important to care for hygiene and prevent periodontal diseases in this group of women. Another reason for the translocation of bacteria into the uterine cavity in pregnant women are prolonged vaginal infections. Aerobic, anaerobic bacteria and yeast-like fungi have also been identified in the uterine cervix. In addition to commensal bacteria of the genus *Lactobacillus*, pathogenic species: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Eubacterium lentum* and yeasts *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* were the most commonly isolated [42]. Their presence in the cervical canal leads to serious gynaecological-obstetric complications, including miscarriages, premature births, infections of the amniotic fluid or lesions of the pelvic organs. Thus, intrauterine infections of the foetus and newborn may occur [12, 30, 41].

Among the postnatal factors affecting the microbiome of the newborn, the following are distinguished: the type of delivery (natural or caesarean section), diet (breastfeeding or modified milk), hygiene (sufficient or excessive) and the use or not of the antibiotic

therapy or other medications in the first days of the child's life, e.g. steroids, modifying the composition of the microflora. During natural delivery, the neonate, passing through the mother's birth canal, has contact with the microflora derived from her vagina, mainly with the lactic fermentation rods of the genus *Lactobacillus*, which quickly colonise the skin, digestive tract, oral and nasopharyngeal cavity, but also in the case of the female sex, the urogenital tract [35]. That is why in the newborns of female sex, low pH of the vagina is observed during the first 2–3 weeks of life, which results from lactic acid produced by *lactobacilli*. Later, the pH of the vagina becomes neutral and remains so until puberty. Other bacteria acquired during physiological labour are: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Blautia*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Planococcus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* and *Prevotella* [20, 34, 59]. In turn, the organism of neonates born via caesarean section is initially colonized mainly by microorganisms typical of the mother's skin and hospital strains of the genera: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Actinobacter*, *Klebsiella* and *E. coli* [8, 20, 21, 47]. Infections with some of these bacteria are undoubtedly detrimental to the health of the child and often require applying antibiotic therapy immediately after delivery. Adverse effects of caesarean section on the risk of the occurrence of such diseases in children like: obesity, type I diabetes, celiac disease, asthma or atopy have also been observed [10, 13, 16, 43].

Over time, the differences in the microbiomes of infants born in a different way gradually diminish, however, the first microorganisms acquired during labour can persist up to approx. 6–24 month of life [8, 34, 39]. After delivery, the composition of the infant's microbiome is shaped depending on the type of feeding. The microbiological profile of the naturally fed infant's microbiome abounds in various microbial species, including lactic acid bacteria of the genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* and *Enterococcus*, which is not observed in artificial and mixed feeding, where a lower phylogenetic diversity occurs [47]. Madan *et al.* [47] observe a reduction in the number of *Lactococcus* bacteria in infants being exclusively breast-fed compared to those fed exclusively with modified milk. Other studies indicate that artificial feeding reduces the population size of *Bifidobacterium* bacteria compared to exclusive breastfeeding. However, the currently applied enrichment of dairy mixtures with prebiotics, such as short-chain galactooligosaccharides and long-chain fructooligosaccharides, increases the overall abundance of *Bifidobacterium* in infants fed with modified milk [55, 73]. Around the age of two, species and generic biodiversity of a child's microbiota increases to become more and more similar to an adult human microbiota.

### 3. *Lactobacillus* genus as the dominant microbiota of the female genital system

The mucous membrane of the female vagina is the site where numerous bacteria occur. So far, 37 genera have been identified, i.e.: *Anaerococcus*, *Anaerotruncus*, *Atopobium*, *Arcanobacterium*, *Bacteroides*, *Bulleidia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Coriobacterium*, *Corynebacterium*, *Dialister*, *Eggerthella*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Fingoldia*, *Gardnerella*, *Gemella*, *Klebsiella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lachnospira*, *Megasphaera*, *Mobiluncus*, *Mycoplasma*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Propionibacterium*, *Prevotella*, *Peptoniphilus*, *Rhodobaca*, *Rhuminococcus*, *Streptococcus*, *Sneathia*, *Staphylococcus*, *Ureaplasma*, *Veillonella* [40, 64, 67].

The most abundant amongst them are Gram-positive lactobacilli of the genus *Lactobacillus* which, depending on the physiological condition of the woman, constitute 60 to even 95% of the microorganisms in the vagina of women in Europe or the United States [31]. They compete there for receptors on epithelial cells and nutrients [42]. *Lactobacillus* bacterium is characterized by the ability to hydrolyse glycogen, a polysaccharide found in the vaginal glands, which, as a result of their action, is hydrolysed to lactic acid. In this way, the vagina becomes acidified to a pH below 4.5, which protects the epithelium against colonization of the reproductive organs by pathogenic bacteria. Other metabolites produced by *Lactobacillus* bacteria are bacteriocins which exhibit bacteriostatic and bactericidal activity against pathogenic or related strains. Hydrogen peroxide is also produced, which inhibits the growth of catalase-negative and peroxidase-negative bacteria, and protease inhibitors which prevent the growth and propagation of pathogenic yeast *Candida albicans*.

To date, 25 species of *Lactobacillus* inhabiting the female vagina have been identified, i.e.: *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. coleohominis*, *L. debrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. frumenti*, *L. gasseri*, *L. gallinarum*, *L. helveticus*, *L. iners*, *L. johnsonii*, *L. jensenii*, *L. oris*, *L. mucoase*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. ruminis*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. suntoryeus*, *L. vaginalis* [4, 18, 76].

The structure, size and composition of vaginal microbiota depends on genetic and environmental factors and correlates with the geographical place of residence of women, individual predispositions for colonization and hormone levels [24, 63]. It is observed that the abundance of the rods of *Lactobacillus* is dependent on the amount of glycogen present in the vagina, which depends on the level of estrogens, female sex hormones.

Currently, many strains isolated from the vagina of women living in Europe, America, Asia and Africa have been tested (Table I). Among the species being

Table I  
Bacteria of the genus *Lactobacillus* isolated from the female vagina in various geographical regions

<i>Lactobacillus</i> species	Country/continent	References
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. agilis</i> , <i>L. coleohominis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. vaginalis</i>	Brazil/South America	[52]
<i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. salivarius</i>	Bulgaria/Europe	[18]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. vaginalis</i>	China/Asia	[36]
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. rhamnosus</i>	Iran/Asia	[53]
<i>L. aviaries</i> , <i>L. coleohominis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. vaginalis</i>	Japan/Asia	[77]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. vaginalis</i>	Korea/Asia	[45]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. jensenii</i>	Germany/Europe	[33]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. suntoryeus</i> , <i>L. vaginalis</i>	Nigeria/Africa	[5]
<i>L. acidophilus</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. antri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. coleohominis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. vaginalis</i>	Poland/Europe	[19, 56, 68, 69]
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i>	Russia/Europe	[17]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. jensenii</i>	Rwanda/Africa	[15]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. vaginalis</i>	United States/North America	[4, 75]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i>	Sweden/Europe	[74]
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. jensenii</i>	Switzerland/Europe	[6]

dominant in the vaginal microbiota of Polish women, the following prevail: *L. acidophilus* (35%), *L. fermentum* (30%), *L. plantarum* (30%), *L. delbrueckii* (5%), *L. rhamnosus* (5%) and a small number of *L. gasseri* and *L. casei* [56, 68, 69]. In Nigeria, however, the dominant strains are: *L. iners* (64%), *L. gasseri* (8.3%), *L. plantarum* (7.0%), *L. suntoryeus* (7.0%), *L. crispatus* (4, 0%), *L. rhamnosus* (2.7%), *L. vaginalis* (2.7%), *L. fermentum* (1.3%), *L. helveticus* (1.3%) and *L. johnsonii* (1, 3%) [5].

It has also found that the microbiome of female genital tract during the nine months of pregnancy is subject to significant microbiological changes. It becomes stable and less diverse in terms of species composition, with predominance of the bacteria of the genus *Lactobacillus* [65]. In the examined pregnant Polish women, the most common species of *Lactobacillus* colonizing the vagina in the first trimester are: *L. crispatus* (29%), *L. gasseri* (19.4%) and *L. rhamnosus* (16.1%), in the second trimester: *L. crispatus* (51.6%), *L. gasseri* (25.8%), *L. rhamnosus* (19.4%) and *L. amylovorus* (16.1%), and in the third trimester – *L. crispatus* (25.8%), *L. gasseri* (25.8%) and *L. johnsonii* (19.4%) [19].

Based on the studies of the vaginal microbiota of healthy women in reproductive age from all over the world, the microorganisms occurring in the vagina are classified in V CST (Community State Types) groups [63]. The CST types distinguished: I, II, III and V, are dominated by the following lactic fermenta-

tion bacteria: *L. crispatus* (CST type I), *L. gasseri* (CST type II), *L. iners* (CST type III) and *L. jensenii* (CST type V). The CST IV type includes anaerobic microorganisms such as: *Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Eggerthella*, *Aerococcus*, *Fingoldia* and *Mobiluncus*, among which there is no specific dominant species [63, 76]. In addition, in American studies, including women from different populations, various proportions of CST types were observed depending on the ethnic group (Table II).

It was also observed that the number of *Lactobacillus* depends on the stage of development and life of women. Initially, in the prenatal period, the presence of various microorganisms was found, which later, in

Table II  
Percentage of five types of CST *Lactobacillus* bacteria in four ethnic groups of women

Ethnic group/ CST %	Asians/ Asian	Caucasian/ White	Black African/ Black	Latino/ Hispanic
Type I	25	45.4	22.1	14.4
Type II	5.2	8.2	4.8	7.2
Type III	42.7	26.8	31.4	36.1
Type IV	19.8	10.3	40.4	38.1
Type V	7.3	9.3	1	4.1



the course of the translocation of the microflora from the mouth and vagina, reach the uterus and colonize the child's body. These include lactic bacteria of the genera: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* and *Leuconostoc* [38]. After passing through the mother's birth canal, abundant in *Lactobacillus* bacteria, in the female newborns, the pH of the vagina is maintained within 4.8–5.7 for 2–3 weeks, which indicates the activity of lactobacilli. However, already after 3 weeks from giving birth, the pH rises to 6–8 and persists throughout the period of childhood. During pubescence and full maturity in healthy women lactobacilli dominate during the menstrual cycle acidifying the vagina. This is due to the increasing concentration of estrogens in the follicular phase and the increase in glycogen levels. In addition, the presence of  $\alpha$ -amylase in the vaginal mucosa supports the breakdown of glycogen into products such as maltose, maltotriose and maltotetraose, which stimulate *Lactobacillus* spp. to multiply and colonise [49]. However, during menstrual bleeding, the number of *Lactobacillus* cells decreases periodically, and the pH of the vagina increases to 7.3–7.4. During the premenopausal period, due to decreasing estrogen and glycogen levels and the vaginal mucosa becoming thin, the pH changes in the alkaline direction, and the number of lactic bacteria decreases, which promotes frequent vaginal infections caused by pathogens.

The reduction in the abundance of *Lactobacillus* bacteria is also influenced by steroid and immunosuppressive drugs, antibiotics and hormonal contraceptives. Steroids imitating female sex hormones, e.g. estrane derivatives, corticosteroids, adrenocortical hormones, have immunosuppressive, anti-inflammatory and antiallergic effects and contribute to reducing the number of *Lactobacillus* bacteria. Antibiotics, on the other hand, which act bactericidally against Gram-positive, also reduce the number of lactobacilli [51]. These are the following antibiotics:

- beta-lactam antibiotics: natural, isoxazole and semi-synthetic penicillins, cephalosporins, carbapenems, monobactams, macrolides, lincosamides, fusidic acid;
- peptide antibiotics, containing in their composition bacteriocins, i.e.: gramatacin, tirodacin, bacitracin, viomycin, polymyxin;
- glycopeptide: vancomycin and teicoplanin;
- semi-synthetic lipopeptides, e.g.: daptomycin.

The vaginal microbiota is also influenced by the use of hormonal contraceptives, containing low doses of estrogen, which blocks ovulation and maturation of the endometrium. Thus, the level of glycogen in the vagina is low, resulting in a reduction in the number of *Lactobacillus* rods. The result thereof are frequent infections of the female vagina: bacterial vaginosis (BV) and vaginal candidiasis.

#### 4. Mycobiome of the female vagina

The term mycobiome is defined as the sum of genomes and genes belonging to the fungi which inhabit a specific biological niches. The female genital tract, and in particular the vagina, is a specific micro-environment for fungi, to which considerable attention has been paid in the last few years. Molecular technique – NGS sequencing (Next Generation Sequencing) and bioinformatics tools play an important role in understanding the diversity of fungi and are useful in identifying microorganisms and providing a new insight into fungal ecology. Initial studies were based on the techniques of culturing the material obtained through swabs from healthy volunteers or diabetics, teenagers or pregnant women. Fungi were detected in 20–60% of trials [11]. Among them, the yeasts of the genera *Candida* and *Saccharomyces* dominated, to a lesser extent there occurred filamentous fungi of the genera *Aspergillus*, *Alternaria* and *Cladosporium*. The presence of these microorganisms depends on the age, hormonal cycle, female health status and the presence of bacteria in the genital tract and specific vaginal environment [11, 14, 50]. Without exception, the dominant member of the fungal community is *Candida albicans* (85–95% of the *Candida* population), although there are other species of this genus, e.g. *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* and others [11, 66]. Guo *et al.* [29] using the molecular method for identifying the 18S rRNA gene, identified 3 families of fungi: *Ascomycota*, with the dominant genus of *Candida*, and *Basidiomycota* and *Oomycota*. They also established that women suffering from allergic rhinitis or recurrent vaginal candidiasis had a higher percentage of *C. albicans*, and lower percentage of *S. cerevisiae* or other unidentified fungi in comparison with healthy women. In turn, Drell *et al.* [22], by sequencing a ITS1 fragment of DNA in samples obtained from the vaginas of 294 healthy women in Estonia, established the presence of *Ascomycota* in 58% of trials, and *Basidiomycota* in only 3% of trials. Within the type *Ascomycetes* the researchers have detected representatives of the orders *Saccharomycetales* (mainly the genus *Candida*), *Capnodiales*, *Eurotiales*, *Pleosporales* and *Helotiales*. *C. albicans* was detected in 68% of sequenced samples, while many sequences were not systematically assigned due to limited resources of available databases connected with sequencing fungi. On the other hand, in the studies by Bitew and Abebaw [9] in samples of swabs obtained from 210 women in Ethiopia, the following yeasts were identified *C. albicans* in 58.6% of isolates, *C. krusei* in 17.2%, *C. dubliniensis* in 9.2%, *C. glabrata* in 3.4 % and *C. inconspicua*, *C. tropicalis*, *C. kefir*, *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* and *C. parapsilosis* in individual cases. The researchers used

an automated, compact Vitek 2 system for identification, based on fluorescent detection of yeast growth and metabolic changes occurring in microwells of special cards placed in an incubator connected to the reader [9]. Similar results were obtained in the study of vaginal swabs from women in Saudi Arabia, using various identification methods, where the dominant species in both diseased and healthy women was *C. albicans*, followed by *C. dubliniensis* and *C. glabrata*; while *C. tropicalis* was found only in diseased women [2]. In turn, in studies conducted in Egypt in 62.7% of samples of swabs from women with symptoms of candidiasis *Candida* yeasts were found, of which 81.1% were *C. albicans*, 8.1% *C. glabrata* and *C. tropicalis* and 2.7% *S. cerevisiae* [66].

Yeasts enter the human organism from the natural environment and can be transferred to newborns during labour, colonizing specific human body niches. Ward *et al.* [72] conducted research on the development of mycobiome in infants in the first months of life, depending on the method of delivery. They found that dominant species in samples obtained from various parts of the body of infants (skin, mouth, anus) were *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. othopsilosis*, *Cryptococcus pseudolongus*, *Cladosporium velox*, *Debaryomyces rhenium*, *D. hansenii*, *Hanseniaspora uvarum*, and *C. krusei*. On the other hand, the composition of the vaginal mycobiome of the women giving birth was dominated by *C. albicans*, while in the mycobiome of the anus *C. albicans*, *S. cerevisiae*, and *C. parapsilosis* were the most numerous. The overall numbers of detected taxa were similar in the samples obtained from infants and women. Researchers established that the way the children were delivered had an effect on the number of species, but not on the structure of the fungal population. Naturally born infants did not exhibit a greater similarity of the skin mycobiome to their mother's vaginal mycobiome than the neonates born by caesarean section. However, the difference was visible in the number of *C. albicans*, which occurred in a significantly higher number on the skin of 1-month-old infants born naturally in comparison to the infants born by caesarean section [72].

There is more and more evidence indicating that estrogens have a positive effect on the colonization of the vaginal mucosa and subsequent infection caused by *Candida* yeast. Some *Candida* species possess estrogen receptors. It has been demonstrated that estrogen interferes with the chemotaxis of neutrophils to the vaginal epithelium and inhibits Th17 lymphocytes differentiation, which consequently can lead to an increased susceptibility of the host to the pathogens of the genus *Candida*. Some reports link symptomatic vaginosis to the luteal phase just before menstruation, when high estrogen level is observed, as well as an increase in vaginal pH level, which additionally facilitates its coloniza-

tion by the pathogenic yeasts. It has also been proven that *Candida* can metabolise lactate derived from lactic acid produced by lactic bacteria in the vagina and it has been shown that in the presence of lactic acid *C. albicans* is less efficiently attacked by macrophages and can change the profiles of immune cell cytokines by raising the production of interleukin 10 (IL-10) and lowering IL-17. Studies confirm that *Candida* can evolve to stop the immune response and increase the area of its commensalism.

The initial adhesion of yeast to epithelial cells is regulated by hydrophobic interactions between surfaces. The attachment of yeast to the epithelial cell receptors is mediated by adhesion proteins [11, 14]. High capacity of yeasts for adhesion to epithelial cells obtained from women suffering from recurrent candidiasis of vulva and vagina (VVC – VulvoVaginal Candidiasis) has been demonstrated. It is estimated that 3 out of 4 women have been infected with candidiasis at least once in their lifetime, and 20% of healthy women may also be asymptomatic carriers that have been infected with this microorganism in commensal interactions. There exists a view whereby the predispositions for being colonised by *Candida* are niche-dependent, but they also depend on host immune defects, interrupted vaginal epithelium and microbiological dysbiosis. A statistically significant increase in the number of *C. albicans* pathogenic yeasts is observed in women with VVC compared to the number of these microorganisms in healthy women, while no significant differences have been observed in the number of *Candida* yeasts not belonging to the *albicans* species. These observations confirm the theory of “fungal burden threshold”, above which inflammatory cells occur, whose metabolites are the direct cause of the symptoms of vaginal infection, such as itching, irritation, burning and the appearance of secretions. *Candida* is a polymorphic fungus in which morphogenic transitions are also part of the pathogenicity mechanism. The yeast form is associated with asymptomatic colonization, transmission and spreading especially through the circulatory system, while the mycelial form is associated with adhesion and mucosal invasion, characteristic for disease symptoms, and the production of agents that cause macrophage lysis [11]. Morphogenesis, however, depends on various factors, including the activity of macrophages, the presence of bacteria and their metabolites in the vagina and estrogen levels [14].

*C. albicans* virulence factors include extracellular hydrolytic enzymes, heat shock proteins and factors leading to biofilm production. *In vitro* studies of the proteolytic activity of *C. albicans* isolates from women with VVC have shown increased activity of enzymes, especially from the aspartic protease family, which are virulence factors disturbing the continuity of the mucosa and inducing immunopathology. Yeast also

produces several extracellular enzymes, such as phospholipases, lipases and haemolysins, essential for tissue invasion and nutrient uptake, especially iron released from haemoglobin degradation [14]. Another hypothesis on the pathogenicity of *C. albicans* is associated with the secretion of toxins. Moyes *et al.* [54], using a mouse model of oropharyngeal candidiasis, identified a cytolytic peptide toxin, candidalysin, essential for the pathogenesis of the mucosa. Another pathogenic feature of *C. albicans* is the ability to create a biofilm in contact with, e.g. mucous membranes, followed by the production of hyphae capable of penetrating host tissues. *C. albicans* biofilm is formed by polysaccharides such as  $\alpha$ -mannan,  $\beta$ -1,6 glucan and  $\beta$ -1,3 glucan. The ability to form biofilms is also demonstrated by *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis*. All of the above species are capable of creating an invasive hyphal form. In the context of triggering candidiasis, biofilms have been reported to be up to 1000-fold more resistant to antifungal agents used in the treatment, compared to the cells that do not form biofilms [14].

An important issue is an interaction between the bacteria found in the vagina, mainly the rods of *Lactobacillus* and the pathogenic *Candida* yeasts. In general, there are 5 ways of fungi-bacteria interaction that can also be present in the vagina, i.e. physical interactions, chemical changes, metabolic by-products, environmental changes and changes in the host's immune resistance [61]. The most reliable hypothesis regarding these interactions is that the bacteria found in the vagina do not prevent the mucosa colonizing from *Candida*, but only limit the excessive growth of yeasts, among others through the production of lactate and short-chain fatty acids inhibiting the passage of the pathogen from the cellular stage to the hyphal one [11]. In addition, women with VVC have a less abundant *Lactobacillus* population. An additional factor influencing the disruption of balance between bacteria and yeasts is antibiotic therapy, but no unequivocal correlation between taking antibiotics and the incidence of VVC has been proven [11]. Another hypothesis is that the hydrogen peroxide secreted by *Lactobacillus* bacteria is involved in the prevention of adhesion to epithelial cells and is responsible for the control of *Candida* growth, in addition to other mechanisms associated with the activity of lactobacilli which are not fully understood yet [14]. Mutual interactions of these microbial groups are also dependent on the formation of a multispecies biofilm on the mucous membrane surface. *In vitro* studies have confirmed the negative impact of *Lactobacillus* on the formation of mycelium and the suppression of genes responsible for this process [11]. Research into mutual interactions of lactic acid bacteria and yeasts is still continuing and very much needed in the context of VVC prevention and treatment.

Characteristics of the human mycobiome is important for the development of diagnostics and preventive measures in fungal diseases, including vaginal candidiasis.

## 5. Vaginal probiotics

Female vaginal microbiota disorders are most often caused by a decrease in the number of lactobacilli to the advantage of pathogenic microorganisms. This results in various types of infections, i.e. bacterial vaginosis and vaginal candidiasis [7, 57, 60]. Vaginal homeostasis disorders are caused by antibiotics, steroid and immunosuppressive drugs, as well as hormonal and barrier contraceptive agents such as condoms, caps and vaginal diaphragms which damages the vaginal epithelium. Other factors with poorly understood mechanism of influencing the vaginal microbiota are: poor hygiene, use of underwear made of synthetic materials, vaginal irrigation, weakening of the immune system as a result of systemic infection or chronic diseases or stress, use of tampons, sexual intercourse or even swimming in a pool during which some rods of *Lactobacillus* may be partially washed out [50]. Therefore, it is important to quickly restore the original state of the microbiota in this part of the female body by using live cultures of lactic acid bacteria in the form of vaginal probiotics. These are microorganisms which favourably influence the vaginal microbiota by combating the pathogens which are present there. They should meet the criteria set in 2001 and 2002 by the European Food Safety Authority (EFSA) and the World Health Organization (WHO) [28].

Among the basic requirements for vaginal probiotics the following are listed:

- being derived from the urogenital system of young women;
- accurate genetic, biochemical and morphological identification of the strain;
- clinically proven ability to colonize the female vagina;
- antagonistic activity against pathogenic bacteria causing infections of the urogenital system;
- strong adherence to the vaginal epithelium;
- confirmed reduction of the adhesion of pathogens to the vaginal epithelium;
- specific resistance to antibiotics for a given species [33].

It has been demonstrated that the use of the *L. acidophilus* probiotic strains for 6–12 days and *L. rhamnosus* GR-1, *L. fermentum* RC-1 for 2 months inhibits the growth of the bacteria causing BV. This is the result of producing hydrogen peroxide, lactic acid, bacteriocins and the inhibition of the adherence of *G. vaginalis* [23].



Polish studies have demonstrated that oral administration of three specific strains: *L. gasseri*, *L. fermentum* and *L. plantarum* to women of reproductive age, increased the number of *Lactobacillus* rods in the anus and vagina of the patients. At the same time, a decrease in vaginal pH and an effective change in the Nugent scale values has been observed, which is used to assess the vaginal biocenosis based on proportional shares of particular types of bacteria in the preparation tested. However, the use of probiotic is not always effective, especially when the urogenital tract infection is very advanced [70]. In addition, it was found that other species of *Lactobacillus*, which are not the natural, native microbiota of the vaginal epithelium, cannot colonize intimate areas permanently. They occur only locally during the application of the probiotic, and after the end of supplementation they die and are excreted from the body. According to the data published in the journal *Nature* [48], the immune system ultimately determines what the quantitative and qualitative composition of the microbiota of our body will be. This is confirmed by the studies in which a vaginal probiotic containing *L. rhamnosus* strain was used by women who live in the United States. On the third day of the experiment, the strain was characterized by a high titre but on the 21st day it was barely detectable. The supplemented microorganism was not identified as a typical, native microbiota of the genital tract of American women. It was only a temporary colonizer. The authors suggest that the elimination of the *L. rhamnosus* probiotic strain occurred due to the natural self-regulating mechanisms of the vaginal ecosystem [3].

Vaginal probiotics available on the pharmaceutical market are in the form of freeze-dried cellular biomass immobilized in hard cellulose or gelatine capsules. The frequency of their application depends on the severity of infection resulting from vaginal microbiota disorders. They can colonize the vagina or stay there long enough to cause the restoration of native, natural microbiota. For this purpose, they must produce L (+) lactic acid in an amount of more than 50% of the total amount of acid produced and possibly other organic acids, such as acetic, formic, propionic, benzoic or mevalonic acid. They should have the ability to adhere to the vaginal epithelium, which requires testing their hydrophobic properties, surface charge, surface structure and affinity for the epithelial cell receptors.

## 6. Summary

Knowledge and understanding of the functioning of the female reproductive system microbiota is important in the treatment and prevention of vaginal infection. The more so because they are often chronic and dif-

ficult to treat, which constitutes a contemporary challenge in urology and gynaecology. In particular, vaginosis and candidiasis which occur in pregnant women require treatment due to the risk of miscarriages and intrauterine infections. More and more knowledge about the role of probiotic bacteria in the treatment of vaginal infections allows the search for new, effective strains. It is important that they have GRAS (generally recognized as safe) status, i.e. they are non-pathogenic and do not produce toxic, carcinogenic, teratogenic and mutagenic substances. In addition, they should survive the technological process and storage period in dry and refrigerated conditions for 12 to 24 months. All the more so because during production, the bacteria are most often subjected to the freeze-drying process (lyophilization), which allows for obtaining permanent preparations which preserve their viability. In addition, a probiotic preparation which is a medicine should be manufactured in accordance with good manufacturing practice (GMP) and be appropriately labelled. There is a great need to compose new vaginal probiotics on the Polish market, which is deficient in preparations based on native *Lactobacillus* bacteria strains.

## Acknowledgements

The article was translated by EURO-ALPHABET from Polish into English under agreement 659 / P-DUN/2018 and funded by the Ministry of Science and Higher Education.

## References

1. Aagaard K., Ma J., Antony KM., Ganu R., Petrosino J., Versalovic J.: The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* **6**, 237–265 (2014)
2. Ameen F., Moslem M., Tami M.AL., Al-Ajlan H., Al-Qahtani N.: Identification of *Candida* species in vaginal flora using conventional and molecular methods. *J. Mycologie Medicale*, **27**, 364–368 (2017)
3. Antonio M.A., Meyn L.A., Murray P.J., Busse B., Hillier S.L.: Vaginal colonization by probiotic *Lactobacillus crispatus* CTV-05 is decreased by sexual activity and endogenous *Lactobacilli*. *J. Infect. Dis.* **199**, 1506–1513 (2009)
4. Antonio M.A., Hawes S.E., Hillier S.L.: The identification of vaginal *Lactobacillus* species and demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J. Infect. Dis.* **180**, 1950–1956 (1999)
5. Anukam K.C., Osazuwa E.O., Ahonkhai I., Reid G.: 16S rRNA gene sequence and phylogenetic tree of *Lactobacillus* species from the vagina of healthy Nigerian women. *Afr. J. Biotechnol.* **4**, 1222–1227 (2005)
6. Atassi F., Brassart D., Grob P., Graf F., Servin A.L.: *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.* **48**, 424–432 (2006)
7. Atassi F., Brassart D., Grob P., Graf F., Servin A.L.: Vaginal *Lactobacillus* isolates inhibit uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **257**, 132–138 (2006)



8. Bäckhed F.: Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*, **17**, 690–703 (2015)
9. Bitew A., Abebaw Y.: Vulvovaginal candidiasis: species distribution of *Candida* and their antifungal susceptibility pattern. *BMC Women's Health*, **18**, 94 (2018)
10. Blustein J., Attina T., Liu M., Ryan A.M., Cox L.M., Blaser M.J., Trasande L.: Association of caesarean delivery with child adiposity from age 6 weeks to 15 years. *Int. J. Obesity*, **37**, 900–906 (2013)
11. Bradford L.L., Ravel J.: The vaginal microbiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. *Virulence*, **8**, 342–351 (2017)
12. Brook I.: Bacteremia and septicemia due to anaerobic bacteria in newborns. *J. Neonatal Perinatal Med.* **1**, 201–208 (2008)
13. Cardwell C.R., Patterson C.C. et al.: Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetology*, **51**, 726–735 (2008)
14. Cauchie M., Desmet S., Lagrou K.: *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. *Res. Microbiol.* **168**, 802–810 (2017)
15. Crucitti T., Hardy L., van de Wijgert J., Agaba S., Buyze J., Kestelyn E., Delvaux T., Mwambarangwe L., De Baetselier I., Jaspers V.: Contraceptive rings promote vaginal lactobacilli in a high bacterial vaginosis prevalence population: A randomised, open-label longitudinal study in Rwandan women. *Plos One*, **13**, e0201003 (2018)
16. Decker E., Engelmann G., Findeisen A., Gerner P., Laaß M., Ney D., Posovszky C., Hoy L., Hornef M.W.: Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Pediatr.* **125**, 1433–1440 (2010)
17. Demkin V.V., Koshechkin S.I.: Characterization of vaginal *Lactobacillus* species by rplK – based multiplex qPCR in Russian women. *Anaerobe*, **47**, 1–7 (2017)
18. Dimitonova S.P., Bakalov B.V., Aleksandrova-Georgieva R.N., Danova S.T.: Phenotypic and molecular identification of lactobacilli isolated from vaginal secretions. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **41**, 469–77 (2008)
19. Dobrut A., Gosiewski T., Pabian W., Bodaszewska-Lubas M., Ochonska D., Buland M., Brzychczy-Wloch M.: The dynamics of vaginal and rectal *Lactobacillus* spp. flora in subsequent trimesters of pregnancy in healthy Polish women, assessed using the Sanger sequencing method. *BMC Pregnancy and Childbirth*, **18**, 350 (2018)
20. Dominguez-Bell M.G., Costello E.K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N., Knight R.: Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in new borns. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 11971–11975 (2010)
21. Dominguez-Bello M.G., Clementem J.C. et al.: Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat. Med.* **22**, 250–253 (2016)
22. Drell T., Lillsaar T., Tummelleht L., Simm J., Aaspollou A., Vain E., Saarma I., Salumets A., Donders G.G., Metsis M.: Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. *Plos One*, **8**, e54379 (2013)
23. Falagas M.E., Bersi G.I., Athanasiou S.: Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 657–664 (2007)
24. Fettweis J.M., Brooks J.P., Serrano M.G., Sheth N.U., Girerd P.H., Edwards D.J., Strauss J.F., Jefferson K.K., Buck G.A.: Differences in vaginal microbiome in African-American women versus women of European ancestry. *Microbiology*, **160**, 2272–2282 (2014)
25. Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B.: Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, **312**, 1355–1359 (2006)
26. Gratacos E., Figueras F., Barranco M., Ros R., Andreu A., Alonso P.L., Cararach V.: Prevalence of bacterial vaginosis and correlation of clinical to Gram strain diagnostic criteria in low risk pregnant women. *Eur. J. Epidemiol.* **15**, 913–916 (1999)
27. Gregorczyk-Maślanka K., Kurzawa R.: Mikrobiota organizmu ludzkiego i jej wpływ na homeostazę immunologiczną – część I. *Alerg. Astma Immun.* **21**, 146–150 (2016)
28. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Raport a Joint FAO/WHO Working Group, London, Ontario, Canada, (2002)
29. Guo R., Zheng N., Lu H., Yin H., Yao J., Chen Y.: Increased diversity of fungal flora in the vagina of patients with recurrent vaginal candidases and allergic rhinitis. *Microb. Ecol.* **64**, 918–927 (2012)
30. Heczko P.B., Niemiec T.: Zalecenia dotyczące wykazywania nosicielstwa paciorkowców grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków spowodowanym przez ten drobnoustroj. *Zakażenia*, **2**, 87–96 (2008)
31. Hillier S., Arko S.: Vaginal infection (in) Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS, red. S.A. Morse, A.A. Moreland, K.K. Holmes, Mosby-Wolfe, Baltimore, 1996, s. 79–94
32. Hoopner L.V., Gordon J.I.: Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, **292**, 1115–1118 (2001)
33. Hütt P., Mändar R. et al.: Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. *Microb. Ecol. Health Dis.* **27**, 30484 (2016)
34. Jakobsson H.E., Abrahamsson T.R., Jenmalm M.C. et al.: Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*, **63**, 559–566 (2014)
35. Jaworski A., Dudek K., Jurczak I.: Struktura i rola biologiczna mikrobioty przewodu pokarmowego człowieka zdrowego i w chorobie. *J. Health Study Med.* **4**, 37–61 (2016)
36. Jaspers V., Crucitti T. et al.: The significance of *Lactobacillus crispatus* and *L. vaginalis* for vaginal health and the negative effect of recent sex: a cross-sectional descriptive study across groups of African women. *BMC Infectious Diseases*, **15**, 115 (2015)
37. Jiménez E., Fernández L., Marin M.L., Martin R., Odriozola J.M., Nueno-Palop C., Narbad A., Olivares M., Xaus J., Rodríguez J.M.: Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Cur. Microbiol.* **51**, 270–274 (2005)
38. Jiménez E., Marin M.L., Martin R., Odriozola J.M., Olivares M., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M.: Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* **159**, 187–193 (2008)
39. Kabeerdoss J., Ferdous S., Balamurugan R., Mechenro J., Vidya R., Santhanam S., Jana A.K., Ramakrishna B.S.: Development of the gut microbiota in southern Indian infants from birth to 6 months: a molecular analysis. *J. Nutr. Sci.* **2**, e18 (2013)
40. Kasprówicz A., Białecka A.: Ocena biocenozy pochwy – stopnie czystości pochwy. *Diagnosta Lab.* **2**, 23–24 (2008)
41. Kazimierzczak W., Wnęk M., Kamiński K.: Częstość zakażeń pochwy ciężarnych hospitalizowanych w klinice perinatologii i ginekologii w Zabrze. *Ginekol. Pol.* **75**, 932–936 (2004)
42. Kierzkowska M., Młynarczyk G. et al.: Ocena mikroflory bakteryjnej szyjki macicy u kobiet w ciąży. *Perinatol. Neonatol. Ginekol.* **5**, 1, 26–29 (2012)
43. Kolokotroni O., Middleton N., Gavatha M., Lamnisis D., Priftis K.N., Yiallourous P.K.: Asthma and atopy in children born by caesarean section: effect modification by family history of

- allergies – a population based cross-sectional study. *BMC Pediatr.* **12**, 179 (2012)
44. Kozieł M., Włodarczyk K., Wojton D.: Kształtowanie się mikrobioty jelitowej noworodków a konsekwencje zdrowotne (in) *Mikrobiologia medyczna i środowiskowa – wybrane zagadnienia*, Lublin, 2017, 14–27.
  45. Kim J.H., Yoo S.M., Sohn Y.H., Jin C.H., Yang Y.S., Hwang I.T.: Predominant *Lactobacillus* species types of vaginal microbiota in pregnant Korean women: quantification of the five *Lactobacillus* species and two anaerobes. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **30**, 2329–2333 (2017)
  46. Kumar P., Magon N.: Hormones in pregnancy. *Niger. Med. J.* **53**, 179–183 (2012)
  47. Madan J.C., Hoen A.G., Lundgren S.N., Shohreh F.F., Cottingham K.L., Morrison H.G., Sogin M. L., Li H., Moore J.H., Karagas M.R.: Effects of Cesarean delivery and formula supplementation on the intestinal microbiome of six-week old infants. *JAMA Pediatr.* **170**, 212–219 (2016)
  48. McFall-Ngai M.: Adaptive immunity: care for the community. *Nature*, **445**, 153 (2007)
  49. MacIntyre D.A., Bennett F.B. et al.: The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Sci. Rep.* **5**, 8988 (2015)
  50. Malinowska M., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Mikrobiom człowieka. *Post. Mikrobiol.* **56**, 1, 33–42 (2016)
  51. Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A.: Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (2012)
  52. Martinez R.C.R., Franceschini S.A., Patta M.C., Quintana S.M., Nunes A.C., Moreira J.L.S., Anukam K.C., Gregor Reid G., De Martinis E.C.P.: Analysis of vaginal *Lactobacilli* from healthy and infected brazilian women. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4539–4542 (2008)
  53. Motevaseli E., Shirzad M., Raoofian R., Hasheminasab S., Hatami M., Dianatpour M., Modarressi M.: Differences in vaginal *Lactobacilli* composition of iranian healthy and bacterial vaginosis infected women: a comparative analysis of their cytotoxic effects with commercial vaginal probiotics. *Iran. Red Crescent Med. J.* **15**, 199–206 (2013)
  54. Moyes D.L., Naglik J.R. et al.: Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, **532**, 64–68 (2016)
  55. Mueller N.T., Bakacs E., Combellic J., Grigoryan Z., Dominguez-Bello M.G.: The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol. Med.* **21**, 109–117 (2015)
  56. Niemiec T.: Zakażenia w położnictwie i ginekologii. *Via Medica*, Gdańsk (2009)
  57. Kumar N., Beauty B., Sai S.S., Kunal P., Saroj R.: Bacterial vaginosis: etiology and modalities of treatment – a brief note. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* **3**, 496–503 (2011)
  58. Olszewska J., Jagusztyn-Krynicka E.: HMP (Human Microbiome Project) – mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka. *Post. Mikrobiol.* **51**, 243–256 (2012)
  59. Pantoja-Feliciano I.G., Clemente J.C., Costello E.K., Perez M.E., Blaser M.J., Knight R., Dominguez-Bell M.G.: Biphasic assembly of the murine intestinal microbiota during early development. *Multidisc. J. Microbial Ecol.* **7**, 1112–1115 (2013)
  60. Paczkowska I., Wójtowicz A., Malm A.: Wybrane aspekty farmakoterapii kandydoz. *Terapia i Lek*, **8**, 539–543 (2010)
  61. Peleg A.Y., Hogan D.A., Mylonakis E.: Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 340–349 (2010)
  62. Pluznick L.J.: Gut microbes and host physiology: what happens when you host billions of guests? *Front Endocrinol.* **5**, 91 (2014)
  63. Podgorskii V.S., Liaskovskii T.M., Kovalenko N.K., Oleshchenko L.T.: Study of vaginal and intestinal microflora of women in the prenatal period and its correction in dysbacteriosis. *Mikrobiol. Z.* **68**, 92–104 (2006)
  64. Ravel J., Forney L.J. et al.: Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 4680–4687 (2011)
  65. Romero R., Ravel J. et al.: The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of nonpregnant women. *Microbiome*, **2**, 4 (2014)
  66. Shaaban O.M., Abbas A.M., Moharram A.M., Farhan M.M., Hassanen I.H.: Does vaginal douching affect the type of candidal vulvovaginal infection? *Med. Mycol.* **53**, 817–827 (2015)
  67. Smith S.B., Ravel J.: The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J. Physiol.* **595**, 451–463 (2017)
  68. Strus M., Malinowska M.: Zakres antagonistycznego działania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na czynniki etiologiczne waginozy bakteryjnej. *Med. Dosw. Mikrobiol.* **51**, 47–57 (1999)
  69. Strus M.: Podstawy stosowania probiotyków dopochwowych w zakażeniach układu moczowo-płciowego. *Zakażenia*, **4**, 40–43 (2005)
  70. Strus M., Kochan P., Chełmicki Z., Chełmicki A., Stefański G., Dechnik K., Jabłońska E., Heczko P.: Wpływ doustnego podawania trzech probiotycznych szczepów *Lactobacillus* na poprawę odczynu i składu mikroflory pochwy u kobiet w wieku reprodukcyjnym. *Gin. Dypl.* **3**, 53–59 (2008)
  71. Wasieła M., Pieczara A., Hanke W., Kalinka J.: Porównanie częstości występowania bacterial vaginosis między I i III trymestrem ciąży. *Ginekol. Prakt.* **9**, 111–114 (2001)
  72. Ward T., Dominguez-Bello M.G., Heisel T., Al-Ghalith G., Knights D., Gale C.A.: Development of the human mycobiome over the first month of life and cross body sites. *mSystems*, **3**, e00140–17 (2018)
  73. Vandenplas Y., De Greef E., Veereman G.: Prebiotics in infant formula. *Gut Microbes*, **5**, 681–687 (2014)
  74. Vásquez A., Jakobsson T., Ahrné S., Forsum U., Molin G.: Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2746–2749 (2002)
  75. Ventolini G.: Vaginal *Lactobacillus*: biofilm formation *in vivo* – clinical implications. *Int. J. Womens Health*, **7**, 243–247 (2015)
  76. Zhanshan (Sam) M., Lianwei L.: Quantifying the human vaginal community state types (CSTs) with the species specificity index. *Peer J.* DOI 10.77717/peerj. 3366 (2017)
  77. Zhou X., Hansmann M.A., Davis C.C., Suzuki H., Brown C.J., Schutte U., Pierson J.D., Forney L.J.: The vaginal bacterial communities of japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58**, 169–181 (2010)

## MIKROBIOM UKŁADU PŁCIOWEGO KOBIECI

Monika Pytka, Monika Kordowska-Wiater\*, Piotr Jarocki

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywnienia Człowieka, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wpłynęło we wrześniu 2018 r., zaakceptowano w czerwcu 2019 r.

1. Wprowadzenie. 2. Mikrobiom dziecka w okresie prenatalnym i postnatalnym. 3. Rodzaj *Lactobacillus* jako dominująca mikrobiota w układzie płciowym kobiet. 4. Mykobiom kobiecej pochwy. 5. Probiotyki dopochwowe. 6. Podsumowanie

**Streszczenie:** Układ płciowy kobiet już od początku życia jest kolonizowany przez różnorodne gatunki drobnoustrojów. W okresie postnatalnym istotne znaczenie ma sposób narodzin dziecka; jeśli narodziło się w sposób naturalny to przechodząc przez drogi rodne matki nabyło bakterie bytujące w jej pochwie, a jeśli w wyniku cesarskiego cięcia, jego organizm został na początku zasiedlony przez mikrobiotę skóry matki oraz szczepy szpitalne. U noworodków płci żeńskiej, przez pierwsze dni po porodzie naturalnym, obserwuje się obecność pałeczek mlekowych *Lactobacillus*, które zakwaszają pochwę. Później jednak zanikają i w okresie dziecięcym pH staje się zasadowe. Dopiero w okresie dojrzewania i pełnej dojrzałości płciowej, w wyniku zwiększenia poziomu estrogenów w kobiecym organizmie, następuje wzrost liczby szczepów *Lactobacillus* i trwa to aż do okresu menopauzy, kiedy zaczynają dominować szczepy patogenne. Kobięca pochwa jest miejscem bytowania nie tylko licznych bakterii, ale również grzybów, w tym głównie drożdży z rodzaju *Candida*, oraz mniej licznych grzybów strzępkowych. Dysbioza pochwy może być spowodowana przewagą bakterii patogennych nad pałeczkami *Lactobacillus*, co skutkuje waginozami bakteryjnymi lub nadmiarem drożdży *Candida*, w efekcie czego pojawiają się kandydozy. Skuteczną metodą prowadzącą do homeostazy układu płciowego kobiet jest stosowanie probiotyków dopochwowych, które powinny składać się ze szczepów charakterystycznych dla danej populacji kobiet.

### MIKROBIOME OF THE WOMEN'S GENITAL SYSTEM

1. Introduction. 2. Microbiome of the baby in the prenatal and postnatal period. 3. *Lactobacillus* genus as the dominant microbiota of the female genital system. 4. Mycobiome of the female vagina. 5. Vaginal probiotics. 6. Summary

**Abstract:** The genital system of women has been colonized by various species of microorganisms since the beginning of life. In the postnatal period, the method of birth is important; when a child is born naturally, passing the female genital tract, it acquires bacteria present in the mother's vagina, and when through the caesarean section, the child's organism is first colonized by the mother's skin microbiota and hospital strains. In female newborns during the first days after the natural birth, the presence of *Lactobacillus* rods, which acidify the vagina, is readily observed. Later, however, they disappear and during the childhood period the pH of the vagina becomes alkaline. Only in the period of puberty and full puberty, as a result of the increase in the level of estrogen in the female body, the amount of *Lactobacillus* strains increases and this continues up to the menopause period, when pathogenic strains begin to dominate. The female vagina is a place of living not only of numerous bacteria, but also of fungi, including mainly *Candida* yeast and filamentous fungi at a lower extent. Dysbiosis of the vagina may be caused by the predominance of pathogenic bacteria over *Lactobacillus*, resulting in bacterial vaginosis or excess of *Candida* yeast, resulting in candidiasis. An effective method leading to homeostasis of the female sexual system is the use of vaginal probiotics, which should consist of strains characteristic to a given female population.

**Słowa kluczowe:** *Lactobacillus*, mikrobiom, mykobiom, probiotyki dopochwowe, układ płciowy kobiet

**Key words:** *Lactobacillus*, microbiome, mycobiome, vaginal probiotics, genital system of women

### 1. Wprowadzenie

Organizm ludzki jest niepowtarzalnym środowiskiem życia dla wielu licznych mikroorganizmów charakteryzujących się dużym zróżnicowaniem gatunkowym i rodzajowym. Bakterie, grzyby, archeony i wirusy kolonizujące organizm człowieka nazywane są mikrobiotą [27]. Bytują one zarówno na powierzchni skóry, jak i w całym układzie pokarmowym począwszy od jamy ustnej aż po odbyt, w górnych drogach oddechowych oraz układzie moczowo-płciowym. Jednak więk-

szczość z nich zasiedla nasz przewód pokarmowy, w tym najliczniej jelito grube, gdzie w 1 ml treści znajduje się średnio  $10^{12}$  komórek drobnoustrojów [25, 58]. Aktualnie termin mikrobiom odnosi się do zbioru genomów archeonów, bakterii i grzybów komensalnych, symbiotycznych i patogennych oraz wirusów w środowisku człowieka. Doprecyzowanie tego terminu stało się możliwe dzięki rozwojowi biologii molekularnej i inżynierii genetycznej, szczególnie sekwencjonowaniu metagenomowemu [32, 50, 58]. Poznanie mikrobiomu ujawniło obecność wielu mikroorganizmów dotąd

\* Autor korespondencyjny: Monika Kordowska-Wiater, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywnienia Człowieka, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704, Lublin; tel. 81 462 33 57; e-mail: monika.kordowska-wiater@up.lublin.pl



nieznanych [27]. Pierwsze kompleksowe badania mikrobiomu człowieka rozpoczęto w 2007 roku realizując międzynarodowe badania Human Microbiome Project (HMP). Wspomniany projekt dotyczył mikroorganizmów, których poznanie nastąpiło w oparciu o ich genomowe sekwencje nukleotydowe (metagenom), sekwencje nukleotydowe całkowitego, informacyjnego RNA (metatranskryptom), syntezę białek (metaproteom) oraz oznaczanie produktów metabolizmu (metabolom) [50]. Podaje się, że masa mikrobioty dorosłego człowieka wynosi ok. 1–1,5 kg [35, 62]. Drobnoustroje szczególnie licznie występują i namnażają się w miejscach występowania wydzielin i płynów ustrojowych człowieka, takich jak: ślina, pot, mocz, łój, katar, śluz pochwoy oraz krew. Wśród nich są drobnoustroje, dostarczające niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu metabolity, jak i patogeny, które wywołują dysbiozę w organizmie człowieka powodując niejednokrotnie infekcje, stany zapalne, choroby wirusowe, bakteryjne lub grzybowe.

Charakterystycznym mikrośrodowiskiem organizmu ludzkiego jest kobieca pochwa. Gatunkowa różnorodność mikrobioty pochwy zależy od wielu czynników, takich jak: wiek kobiety, miejsce zamieszkania (strefa klimatyczna), jakość i częstotliwość zabiegów higienicznych, stosowane leki, np. antybiotyki, steroidy, immunosupresanty czy poziom hormonów, głównie estrogenów w kobiecym organizmie [44]. Dominującą grupę bakterii kolonizujących pochwę zdrowych kobiet stanowią pałeczki *Lactobacillus*, zaś wśród drożdży najczęściej wykrywane są te z rodzaju *Candida*. Zaburzenia homeostazy mikrobioty kobiecej pochwy polegają głównie na zmianie proporcji między pałeczkami mlekowymi a patogenami, na korzyść tych drugich [26, 71]. W celu powrotu do naturalnej mikrobioty pochwy, stosuje się probiotyki dopochwowe, składające się z różnych gatunków *Lactobacillus*, izolowanych z pochwy zdrowych kobiet.

## 2. Mikrobiom dziecka w okresie prenatalnym i postnatalnym

Do niedawna uważano, że wewnątrzmaciczne środowisko życia dziecka jest jałowe. Jednak współczesne badania mikrobiologiczne i genetyczne potwierdzają fakt istnienia mikroorganizmów u dziecka już w okresie prenatalnym. Źródłem tych drobnoustrojów jest organizm matki, zaś jej stan zdrowia ma duży wpływ na ich jakość.

W okresie ciąży ciało kobiece przechodzi liczne zmiany na poziomie hormonalnym, immunologicznym i metabolicznym, konieczne dla prawidłowego wzrostu i rozwoju dziecka w okresie prenatalnym [46]. W tym czasie gwałtownie wzrastają poziomy wydzielanych

hormonów: progesteronu i estrogenów, oraz obserwuje się złożone zmiany modulujące układ immunologiczny, chroniący matkę i dziecko przed infekcjami.

W czasie rozwoju prenatalnego dziecka, wykazano obecność bakterii w łożysku, płynie owodniowym i krwi pępowinowej. Stwierdzono, że populacje bakterii obecnych w łożysku i płynie owodniowym były do siebie podobne i mało zróżnicowane. Dominował typ *Proteobacteria*, a główne rodzaje to *Enterobacter*, *Escherichia* i *Shigella*. Drobnoustroje wykryto również w smółce, czyli pierwszym stolcu noworodków urodzonych zarówno drogami natury, jak i przez cesarskie cięcie. Występowały w niej głównie bakterie mlekowe z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Leuconostoc* i *Enterococcus* oraz inne z rodzaju *Streptococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* i *Bacteroides* [38]. Przypuszcza się, że obecność bakterii należących do rodzajów: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* w łożysku, płynie owodniowym czy smółce może być spowodowana przemieszczaniem się drobnoustrojów drogą krwiopochodną, co potwierdzają badania na obecność różnych bakterii w krwi pępowinowej [37]. Ponadto w organizmie dziecka w okresie prenatalnym obecność mikrobioty może być wynikiem połykania płynu owodniowego, co wpływa u dzieci na początkową kolonizację przewodu pokarmowego i skóry, a w przypadku noworodków płci żeńskiej – na kolonizację pochwy [63].

Analiza składu gatunkowego zidentyfikowanych bakterii w smółce, łożysku i płynie owodniowym wykazała duże podobieństwo do składu gatunkowego bakterii występujących w jamie ustnej matek. Obserwowano, że niektóre choroby bakteryjne jamy ustnej i dziąseł u matek ciężarnych zwiększają ryzyko przedwczesnego porodu [1]. Dlatego istotną sprawą jest dbałość o higienę i zapobieganie chorobom przyzębia u tej grupy kobiet. Innym powodem translokacji bakterii do jamy macicy u kobiet ciężarnych są długotrwałe infekcje pochwy. Bakterie tlenowe, beztlenowe i grzyby drożdżopodobne identyfikowano również w szyjce macicy. Oprócz bakterii komensalnych z rodzaju *Lactobacillus*, najczęściej izolowano gatunki chorobotwórcze: *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Saphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Eubacterium lentum* oraz drożdże *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* i *Saccharomyces cerevisiae* [42]. Ich obecność w kanale szyjki macicy prowadzi do poważnych powikłań ginekologiczno-położniczych, m.in. poronień, przedwczesnych porodów, zakażeń płynu owodniowego lub zapaleń narządów miednicy mniejszej. Tym samym może dochodzić do wewnątrzmacicznych zakażeń płodu i noworodka [12, 30, 41].

Wśród czynników postnatalnych wpływających na mikrobiom noworodka wyróżnia się rodzaj porodu (naturalny lub przez cesarskie cięcie), dietę (karmie-



nie piersią lub mlekiem modyfikowanym), higienę (wystarczająca lub nadmierna) oraz zastosowanie lub nie w pierwszych dniach życia dziecka antybiotykoterapii lub innych leków, np. sterydów, modyfikujących skład mikroflory. Podczas porodu naturalnego noworodek, przechodząc przez kanał rodny matki, ma kontakt z mikrobiotą pochodzącą z jej pochwy, w tym głównie z pałeczkami fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus*, które w szybkim tempie zasiedlają nie tylko skórę, przewód pokarmowy, jamę ustną i nosowo-gardłową, ale w przypadku płci żeńskiej również drogi moczowo-płciowe [35]. Dlatego u noworodków płci żeńskiej obserwuje się przez pierwsze 2–3 tygodnie życia niskie pH pochwy, powstałe na skutek wytworzonego przez pałeczki mlekowe kwasu mlekowego. Później pH pochwy staje się obojętne i takie pozostaje aż do okresu dojrzewania. Inne bakterie nabywane w czasie porodu fizjologicznego to: *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Blautia*, *Veillonella*, *Streptococcus*, *Planococcus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* i *Prevotella* [20, 34, 59]. Z kolei organizm noworodków urodzonych poprzez cięcie cesarskie jest początkowo kolonizowany głównie przez mikroorganizmy typowe dla skóry matki oraz szczepy szpitalne z rodzaju: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Actinobacter*, *Klebsiella* i gatunku *E. coli* [8, 20, 21, 47]. Zakażenia niektórymi z tych bakterii są niewątpliwie niekorzystne dla zdrowia dziecka i wymagają często stosowania antybiotykoterapii tuż po porodzie. Obserwowano również niekorzystny wpływ cesarskiego cięcia na ryzyko występowania chorób u dzieci, takich jak: otyłość, cukrzyca typu I, celiakia, astma czy atopia [10, 13, 16, 43].

Z upływem czasu różnice w mikrobiomach niemowląt urodzonych w odmienny sposób stopniowo się zacierają, jednak pierwsze drobnoustroje nabyte podczas porodu mogą utrzymywać się do ok. 6–24 miesięcy życia [8, 34, 39]. Po porodzie skład mikrobiomu dziecka kształtuje się w zależności od rodzaju karmienia. Profil mikrobiologiczny mikrobiomu noworodka karmionego naturalnie obfituje w różnorodne gatunki drobnoustrojów, w tym bakterie fermentacji mlekowej z rodzaju *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* i *Enterococcus*, czego nie obserwuje się przy karmieniu sztucznym i mieszanym, gdzie występuje niższa różnorodność filogenetyczna [47]. Madan i wsp. [47] obserwują zmniejszenie liczebności bakterii *Lactococcus* u niemowląt karmionych wyłącznie piersią w porównaniu z tymi, karmionymi wyłącznie mlekiem modyfikowanym. Inne badania wskazują, że karmienie sztuczne powoduje zmniejszenie liczebności bakterii *Bifidobacterium* w porównaniu do karmienia wyłącznie piersią. Jednak stosowane obecnie wzbogacanie mieszanek mlecznych w prebiotyki, takie jak krótkołańcuchowe galaktooligosacharydy i długołańcuchowe fruktooligo-

sacharydy, zwiększa ogólną liczebność *Bifidobacterium* u niemowląt karmionych mlekiem modyfikowanym [55, 73]. Około drugiego roku życia bioróżnorodność gatunkowa i rodzajowa mikrobioty małego dziecka zwiększa się i coraz bardziej przypomina mikrobiotę dorosłego człowieka.

### 3. Rodzaj *Lactobacillus* jako dominująca mikrobiota w układzie płciowym kobiet

Błona śluzowa kobiecej pochwy jest miejscem występowania licznych bakterii. Dotychczas zidentyfikowano 37 rodzajów, tj.: *Anaerococcus*, *Anaerotruncus*, *Atopobium*, *Arcanobacterium*, *Bacteroides*, *Bulleidia*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Coriobacterium*, *Corynebacterium*, *Dialister*, *Eggerthella*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Finegoldia*, *Gardnerella*, *Gemella*, *Klebsiella*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lachnospira*, *Megasphaera*, *Mobiluncus*, *Mycoplasma*, *Parvimonas*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Propionibacterium*, *Prevotella*, *Peptoniphilus*, *Rhodobaca*, *Rhuminococcus*, *Streptococcus*, *Sneathia*, *Staphylococcus*, *Ureaplasma*, *Veillonella* [40, 64, 67].

Najliczniejsze spośród nich są Gram-dodatnie pałeczki kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus*, stanowiące, zależnie od stanu fizjologicznego kobiety, od 60 do nawet 95% mikroorganizmów pochwy Europejki czy mieszkanki Stanów Zjednoczonych [31]. Konkurują tam o receptory na komórkach nabłonka oraz składniki odżywcze [42]. Bakterie *Lactobacillus* cechuje zdolność do hydrolizy glikogenu, polisacharydu występującego w cewach gruczołowych pochwy, który w wyniku ich działania ulega hydrolizie do kwasu mlekowego. W ten sposób dochodzi do zakwaszenia pochwy do pH poniżej 4,5, co stanowi ochronę nabłonka przed kolonizacją narządu rodowego przez bakterie chorobotwórcze. Innymi metabolitami wytwarzanymi przez bakterie mlekowe *Lactobacillus* są bakteriocyny, które mają działanie bakteriostatyczne i bakteriobójcze w stosunku do szczepów patogennych lub spokrewnionych. Wytwarzany jest również nadtlenek wodoru, który hamuje wzrost bakterii katalazoujemnych i peroksydazoujemnych, oraz inhibitory proteaz, które uniemożliwiają rozwój i namnażanie patogennych drożdży *Candida albicans*.

Do tej pory zidentyfikowano 25 gatunków *Lactobacillus* bytujących w kobiecej pochwie, tj.: *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. coleohominis*, *L. debrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. frumenti*, *L. gasseri*, *L. gallinarum*, *L. helveticus*, *L. iners*, *L. johnsonii*, *L. jensenii*, *L. oris*, *L. mucoase*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. ruminis*, *L. sakei*, *L. salivarius*, *L. suntoryeus*, *L. vaginalis* [4, 18, 76].

Struktura, liczebność i kompozycja waginalnej mikrobioty zależą od czynników genetycznych oraz

środowiskowych i koreluje z geograficznym miejscem zamieszkania kobiet, indywidualnymi predyspozycjami do kolonizacji oraz poziomem hormonów [24, 63]. Obserwuje się, że liczebność pałeczek *Lactobacillus* jest zależna od ilości glikogenu występującego w pochwie, ten zaś zależy od poziomu estrogenów, żeńskich hormonów płciowych.

Obecnie przebadano wiele szczepów wyizolowanych z pochwy kobiet mieszkających w Europie, Ameryce, Azji i Afryce (Tabela I). Wśród gatunków dominujących w mikrobiocie pochwy u Polek przeważa: *L. acidophilus* (35%), *L. fermentum* (30%), *L. plantarum* (30%), *L. delbrueckii* (5%), *L. rhamnosus* (5%) oraz niewielka liczba *L. gasseri* i *L. casei* [56, 68, 69]. Natomiast w Nigerii dominujące szczepy to: *L. iners* (64%), *L. gasseri* (8,3%), *L. plantarum* (7,0%), *L. suntoryeus* (7,0%), *L. crispatus* (4,0%), *L. rhamnosus* (2,7%), *L. vaginalis* (2,7%), *L. fermentum* (1,3%), *L. helveticus* (1,3%) i *L. johnsonii* (1,3%) [5].

Stwierdzono również, że mikrobiom kobiecych dróg rodnych podczas dziewięciu miesięcy ciąży podlega znacznym zmianom mikrobiologicznym. Staje się stabilny i mniej zróżnicowany pod względem gatunkowym, z przewagą bakterii z rodzaju *Lactobacillus* [65]. U badanych Polek będących w ciąży najczęściej spotykanymi gatunkami *Lactobacillus* kolonizującymi pochwę w pierwszym trymestrze były: *L. crispatus* (29%), *L. gasseri* (19,4%) i *L. rhamnosus* (16,1%), w dru-

gim trymestrze: *L. crispatus* (51,6%), *L. gasseri* (25,8%), *L. rhamnosus* (19,4%) i *L. amylovorus* (16,1%), a w trzecim trymestrze – *L. crispatus* (25,8%), *L. gasseri* (25,8%) i *L. johnsonii* (19,4%) [19].

Na podstawie badań mikrobioty pochwy zdrowych kobiet w wieku rozrodczym, pochodzących z całego świata, drobnoustroje występujące w pochwie sklasyfikowano w V grupach CST (Community State Types) [63]. Wyróżnione typy CST: I, II, III i V, zdominowane są przez następujące bakterie fermentacji mlekowej: *L. crispatus* (CST typ I), *L. gasseri* (CST typ II), *L. iners* (CST typ III) oraz *L. jensenii* (CST typ V). Do typu CST IV zaliczono drobnoustroje beztlenowe, takie jak: *Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Eggerthella*, *Aerococcus*, *Finegoldia* i *Mobiluncus*, wśród których nie ma określonego dominującego gatunku [63, 76]. Ponadto w badaniach amerykańskich, obejmujących kobiety z różnych populacji, zaobserwowano inne proporcje typów CST w zależności od grupy etnicznej (Tabela II).

Obserwowano również, że liczebność *Lactobacillus* zależy od etapu rozwoju i życia kobiet. Początkowo, w okresie prenatalnym stwierdzono obecność różnych drobnoustrojów, które w późniejszym okresie w wyniku translokacji mikroflory z jamy ustnej i pochwy docierają do macicy i kolonizują ciało dziecka. Są to m.in. bakterie mlekowe z rodzaju: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus* i *Leuconostoc* [38]. Po przejściu przez

Tabela I

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* izolowane z kobiecej pochwy w różnych rejonach geograficznych

Gatunki <i>Lactobacillus</i>	Państwo/kontynent	Piśmiennictwo
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. agilis</i> , <i>L. coleohominis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. vaginalis</i>	Brazylia/Ameryka Południowa	[52]
<i>L. brevis</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. salivarius</i>	Bułgaria/Europa	[18]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. vaginalis</i>	Chiny/Azja	[36]
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. rhamnosus</i>	Iran/Azja	[53]
<i>L. aviaries</i> , <i>L. coleohominis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. vaginalis</i>	Japonia/ Azja	[77]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. vaginalis</i>	Korea/Azja	[45]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. jensenii</i>	Niemcy/Europa	[33]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. suntoryeus</i> , <i>L. vaginalis</i>	Nigeria/Afryka	[5]
<i>L. acidophilus</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. antri</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. coleohominis</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. vaginalis</i>	Polska/Europa	[19, 56, 68, 69]
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i>	Rosja/Europa	[17]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. vaginalis</i> , <i>L. jensenii</i>	Rwanda/Afryka	[15]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. oris</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. ruminis</i> , <i>L. vaginalis</i>	Stany Zjednoczone/Ameryka Północna	[4, 75]
<i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. iners</i> , <i>L. jensenii</i>	Szwecja/Europa	[74]
<i>L. acidophilus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. jensenii</i>	Szwajcaria/ Europa	[6]

Tabela II  
 Udział procentowy pięciu typów CST bakterii *Lactobacillus* u czterech grup etnicznych kobiet

Grupa etniczna / CST %	Azjaci	Biali	Czarni	Latynosi
Typ I	25	45,4	22,1	14,4
Typ II	5,2	8,2	4,8	7,2
Typ III	42,7	26,8	31,4	36,1
Typ IV	19,8	10,3	40,4	38,1
Typ V	7,3	9,3	1	4,1

kanal rodny matki, obfitujący w bakterie *Lactobacillus*, u noworodków płci żeńskiej przez okres 2–3 tygodni pH pochwy utrzymuje się w granicach 4,8–5,7, co wskazuje na aktywność pałeczek mlekowych. Jednak już powyżej 3 tygodnia po porodzie pH wzrasta do wartości 6–8 i utrzymuje się przez cały wiek dziecięcy. W czasie pokwitania i pełnej dojrzałości u zdrowych kobiet podczas cyklu miesięczkowego dominują pałeczki kwasu mlekowego zakwaszające pochwę. Jest to spowodowane narastającym stężeniem estrogenów w fazie folikularnej i wzrostem poziomu glikogenu. Dodatkowo obecność  $\alpha$ -amylazy w błonie śluzowej pochwy wspomaga rozkład glikogenu na produkty, takie jak: maltoza, maltotrioza i maltotetraoza, które stymulują *Lactobacillus* spp. do namnażania i kolonizacji [49]. Jednak w czasie krwawienia miesięcznego okresowo zmniejsza się ilość komórek *Lactobacillus*, a pH pochwy rośnie do 7,3–7,4. W okresie premenopauzy, ze względu na to, że obniża się poziom estrogenów i glikogenu, a błona śluzowa pochwy staje się cienka, pH zmienia się w kierunku zasadowym, a liczba bakterii mlekowych zmniejsza się, co sprzyja częstym infekcjom pochwy wywołanym przez patogeny.

Na obniżenie liczebności bakterii *Lactobacillus* wpływają również leki steroidowe i immunosupresyjne, antybiotyki oraz hormonalne środki antykoncepcyjne. Steroidy, naśladujące żeńskie hormony płciowe, np. pochodne estranu, kortykosteroidy, hormony kory nadnerczy, działają immunosupresyjnie, przeciwzapalnie i przeciwalergicznie i przyczyniają się do zmniejszenia liczebności pałeczek *Lactobacillus*. Z kolei antybiotyki, które działają bakterioobójczo na bakterie Gram-dodatnie, również obniżają liczbę pałeczek mlekowych [51]. Są to następujące antybiotyki:

- beta-laktamowe: penicyliny naturalne, izoksazolowe i półsyntetyczne, cefalosporyny, karbapenemy, monobaktamy, makrolidy, linkozamidy, kwas fusydowy;
- peptydowe, zawierające w swoim składzie bakteriocyny, tj.: gramidacyna, tyrodacyna, bacytracyna, wiomycyna, polimyksyna;
- glikopeptydowe: wankomycyna i teikoplanina;
- półsynetyczne lipopeptydy, np.: daptomycyna;

Na stan mikroflory pochwy ma wpływ również stosowanie hormonalnych środków antykoncepcyjnych, zawierających niskie dawki estrogenów, co blokuje owulację i dojrzewanie błony śluzowej macicy. Tym samym poziom glikogenu w pochwie występuje na niskim poziomie wywołując redukcję liczby pałeczek mlekowych *Lactobacillus*. Skutkiem tego są częste infekcje kobiecej pochwy: waginozy bakteryjne (BV) i kandydozy pochwy (drożdżycy pochwy).

#### 4. Mykobiom kobiecej pochwy

Termin mykobiom definiuje się jako sumę genomów i genów należących do grzybów zasiedlających określoną niszę biologiczną. Drogi rodne kobiety, a w szczególności pochwa są swoistym mikrośrodowiskiem dla grzybów, na które w ostatnich kilku latach zwrócono znaczną uwagę. Istotną rolę w poznaniu różnorodności grzybów odgrywa technika molekularna – sekwencjonowanie NGS (Next Generation Sequencing) oraz narzędzia bioinformatyczne, przydatne w identyfikacji drobnoustrojów i dostarczające nowego spojrzenia na ekologię grzybów. Początkowe badania bazowały na technikach hodowlanych materiału pobranego z wymazów od zdrowych ochotniczek lub diabetyczek, kobiet nastoletnich lub ciężarnych. Grzyby wykrywane były w 20–60% prób [11]. Wśród nich dominowały drożdże z rodzaju *Candida* i *Saccharomyces*, w mniejszym stopniu występowały grzyby strzępkowe z rodzajów *Aspergillus*, *Alternaria* i *Cladosporium*. Obecność tych drobnoustrojów zależna jest od wieku, cyklu hormonalnego, stanu zdrowia kobiety oraz obecności bakterii w drogach rodnych i specyficznego środowiska pochwy [11, 14, 50]. Bez wyjątku dominującym członkiem społeczności grzybów jest *Candida albicans* (85–95% populacji *Candida*), chociaż występują też inne gatunki tego rodzaju, np. *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea* i inne [11, 66]. Guo i wsp. [29] stosując metodę molekularną oznaczania genu 18S rRNA zidentyfikowali 3 rodziny grzybów: *Ascomycota*, z dominującym rodzajem *Candida*, oraz *Basidiomycota* i *Oomycota*. Stwierdzili też, że kobiety chorujące na katar alergiczny lub nawracające drożdżycy pochwy mają większy odsetek *C. albicans*, a niższy *S. cerevisiae* lub innych niezidentyfikowanych grzybów w porównaniu z kobietami zdrowymi. Z kolei Drell i wsp. [22] stosując sekwencjonowanie fragmentu ITS1 DNA z próbek pobranych z pochwy od 294 zdrowych kobiet w Estonii stwierdzili obecność *Ascomycota* w 58% prób, zaś *Basidiomycota* tylko w 3% prób. W obrębie typu *Ascomycetes* badacze wykryli przedstawicieli rzędów *Saccharomycetales* (głównie rodzaj *Candida*), *Capnodiales*, *Eurotiales*, *Pleosporales* i *Helotiales*. *C. albicans*



wykryto w 68% zsekwencjonowanych prób, natomiast wiele sekwencji nie zostało przyporządkowanych systematycznie z uwagi na ograniczone zasoby dostępnych baz danych dotyczących sekwencji grzybów. Z kolei w badaniach Bitew i Abebaw [9] w próbach wymazów pobranych od 210 kobiet w Etiopii zidentyfikowano drożdże *C. albicans* w 58,6% izolatów, *C. krusei* w 17,2%, *C. dubliniensis* w 9,2%, *C. glabrata* w 3,4% oraz *C. inconspicua*, *C. tropicalis*, *C. kefir*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae* i *C. parapsilosis* w pojedynczych przypadkach. Badacze stosowali do identyfikacji zautomatyzowany, kompaktowy system Vitek 2 oparty na fluorescencyjnej detekcji wzrostu drożdży i zmian metabolicznych zachodzących w mikrostudzienkach specjalnych kart umieszczonych w inkubatorze połączonym z czytnikiem [9]. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach wymazów z pochwy od kobiet w Arabii Saudyjskiej, z zastosowaniem różnych metod identyfikacji, gdzie dominującym gatunkiem zarówno u kobiet chorych, jak i zdrowych był *C. albicans*, a następnie *C. dubliniensis* i *C. glabrata*; natomiast *C. tropicalis* stwierdzono tylko u kobiet chorych [2]. Z kolei w badaniach prowadzonych w Egipcie w 62,7% prób wymazów od kobiet z objawami kandydozy stwierdzono drożdżaki *Candida*, w tym 81,1% stanowiły *C. albicans*, po 8,1% *C. glabrata* i *C. tropicalis* oraz 2,7% *S. cerevisiae* [66].

Drożdże dostają się do organizmu człowieka ze środowiska przyrodniczego i mogą być przenoszone na noworodki w trakcie porodu, kolonizując określone nisze ciała człowieka. Ward i wsp. [72] przeprowadzili badania nad rozwojem mykobioty u niemowląt w pierwszych miesiącach życia w zależności od metody porodu. Stwierdzili, że dominującymi gatunkami w próbkach pobranych z różnych miejsc ciała niemowląt (skóra, jama ustna, odbył) były *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. othopsilosis*, *Cryptococcus pseudolongus*, *Cladosporium velox*, *Debaryomyces renami*, *D. hansenii*, *Hanseniaspora uvarum* i *C. krusei*. Natomiast w mykobiotmie pochwy matek rodzących dominowały *C. albicans*, zaś w mykobiotmie odbytu najbardziej liczne były *C. albicans*, *S. cerevisiae* i *C. parapsilosis*. Ogólne liczby wykrytych taksonów były podobne w próbkach niemowląt i kobiet. Badacze ustalili, że sposób narodzin dzieci miał wpływ na liczebność gatunków, ale nie na strukturę zbiorowiska grzybów. Noworodki urodzone naturalnie nie wykazały większego podobieństwa mykobiotmy skóry do mykobiotmy pochwy matek niż noworodki urodzone poprzez cesarskie cięcie. Natomiast różnica była widoczna w liczbie *C. albicans*, który występował w istotnie wyższej liczbie na skórze 1-miesięcznych niemowląt rodzonych naturalnie w porównaniu z niemowlętami rodzonymi poprzez cesarskie cięcie [72].

Pojawia się coraz więcej dowodów na pozytywny wpływ estrogenów na kolonizację błony śluzowej

pochwy i następnie infekcję powodowaną przez drożdże *Candida*. Niektóre gatunki *Candida* posiadają receptory estrogenowe. Wykazano, że estrogen zakłóca chemotaksję neutrofili do nabłonka pochwy i hamuje różnicowanie limfocytów Th17, co w konsekwencji prowadzi do podwyższonej podatności gospodarza na patogeny z rodzaju *Candida*. Niektóre doniesienia łączą objawowe zapalenie pochwy z fazą lutealną tuż przed miesiączką, kiedy to obserwuje się wysoki poziom estrogeny, jak i podwyższone pH pochwy, co dodatkowo ułatwia jej kolonizację przez patogenne drożdże. Dowiedziono również, że *Candida* może metabolizować mleczany, powstałe z kwasu mlekowego wytwarzanego przez bakterie mlekowe w pochwie, oraz wykazano, że w obecności kwasu mlekowego *C. albicans* jest atakowana mniej wydajnie przez makrofagi i może zmienić profile cytokin komórek immunologicznych podnosząc produkcję interleukiny 10 (IL-10), a obniżając IL-17. Badania potwierdzają, że *Candida* może ewoluować, aby powstrzymać odpowiedź immunologiczną i zwiększyć obszar swojego komensalizmu.

Początkowa adhezja drożdżaków do komórek nabłonka jest regulowana przez powierzchniowe interakcje hydrofobowe. W przyłączeniu się drożdży do receptorów komórek nabłonkowych pośredniczą białka adhezyjne [11, 14]. Wykazano silne właściwości adhezyjne drożdży do komórek nabłonkowych pochodzących od kobiet cierpiących na nawracające kandydozy pochwy i sromu (VVC – VulvoVaginal Candidosis). Szacuje się, że 3 na 4 kobiety były co najmniej raz w życiu zakażone kandydozą, a 20% zdrowych kobiet również może być bezobjawowo zakażona tym drobnoustrojem w postaci komensalnej. Istnieje pogląd, że predyspozycje do kolonizacji przez *Candida* są niszowo zależne, jednak również zależą od defektów immunologicznych gospodarza, przerwanej ciągłości nabłonka pochwy oraz dysbiozy mikrobiologicznej. Statystycznie istotny wzrost liczby patogennych drożdży *C. albicans* obserwuje się u kobiet z VVC w porównaniu z liczbą tych drobnoustrojów u kobiet zdrowych, natomiast nie zaobserwowano istotnych różnic w liczbie drożdży *Candida* nie należących do gatunku *albicans*. Spostrzeżenia te potwierdzają teorię „progu obciążenia grzybami” (‘fungal burden threshold’), powyżej którego pojawiają się komórki zapalne, których metabolity są bezpośrednią przyczyną objawów infekcji pochwy, takich jak: swędzenie, podrażnienie, pieczenie i pojawienie się wydzieliny. *Candida* jest grzybem polimorficznym, u którego zmiany morfogenetyczne są również częścią mechanizmu patogenezy. Forma drożdżowa jest związana z kolonizacją bezobjawową, transmisją i rozprzestrzenianiem szczególnie poprzez układ krwionośny, natomiast forma mycelialna związana jest z adhezją i inwazją śluzówki, charakterystyczną dla objawów chorobowych, oraz produkcją czynników



powodujących lizę makrofagów [11]. Morfogeneza zaś zależna jest od różnych czynników, m.in. aktywności makrofagów, obecności bakterii i ich metabolitów w pochwie oraz poziomu estrogenów [14].

Do czynników wirulencji *C. albicans* zalicza się hydrolityczne enzymy zewnątrzkomórkowe, białka szoku termicznego i czynniki prowadzące do produkcji biofilmu. Badania *in vitro* aktywności proteolitycznej izolatów *C. albicans* od kobiet chorych na VVC wykazały większą aktywność enzymów, zwłaszcza z rodziny proteaz aspartylowych, które są czynnikami wirulencji naruszającymi ciągłość śluzówki i wywołującymi immunopatologię. Drożdże wytwarzają też kilka zewnątrzkomórkowych enzymów, takich jak fosfolipazy, lipazy i hemolizyny, istotnych dla inwazji tkanki i pobierania substancji odżywczych, szczególnie żelaza pochodzącego z degradacji hemoglobiny [14]. Kolejna hipoteza patogeniczności *C. albicans* związana jest z wydzielaniem toksyn. Moyes i wsp. [54], wykorzystując mysz model kandydozy jamy ustnej i gardła, zidentyfikowali cytolityczną toksynę peptydową, candidalizinę, istotną dla patogenezы śluzówki. Inną, patogenną cechą *C. albicans* jest zdolność do tworzenia biofilmu w kontakcie m.in. z błonami śluzowymi, a następnie wytwarzanie strzępek zdolnych do penetracji tkanek gospodarza. Biofilm *C. albicans* tworzony jest z udziałem polisacharydów, takich jak  $\alpha$ -mannan,  $\beta$ -1,6 glukan i  $\beta$ -1,3 glukan. Zdolność do tworzenia biofilmu wykazują również *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*. Wszystkie powyższe gatunki zdolne są do tworzenia inwazyjnej formy strzępkowej. W kontekście wywoływania kandydozy, stwierdzono, że biofilm posiada nawet 1000 razy większą oporność na środki przeciwgrzybowe stosowane w kuracji, w porównaniu z komórkami nietworzącymi biofilmu [14].

Ważnym zagadnieniem są interakcje pomiędzy bakteriami występującymi w pochwie, głównie pałeczkami *Lactobacillus*, a chorobotwórczymi drożdżami *Candida*. Ogólnie można wyróżnić 5 sposobów oddziaływania bakterie-grzyby, które mogą także występować w pochwie, tj.: interakcje fizyczne, zmiany chemiczne, produkty uboczne metabolizmu, zmiany środowiskowe i zmiany odporności immunologicznej gospodarza [61]. Najbardziej wiarygodna hipoteza dotycząca tych interakcji mówi, że bakterie występujące w pochwie nie zapobiegają kolonizacji śluzówki przez *Candida*, a jedynie ograniczają nadmierny wzrost drożdżaków, m.in. poprzez produkcję mleczanu i krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych hamujących przejście patogenu ze stadium komórkowego do strzępkowego [11]. Ponadto u kobiet chorujących na VVC stwierdza się mniej liczebną populację *Lactobacillus*. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na zaburzenie równowagi między bakteriami a drożdżami jest terapia antybiotykowa, ale nie udowodniono jednoznacznej korelacji między

przyjmowaniem antybiotyków a zachorowalnością na VVC [11]. Inna hipoteza głosi, że to nadtlenek wodoru wydzielany przez bakterie *Lactobacillus* ma udział w zapobieganiu adhezji do komórek nabłonkowych i jest odpowiedzialny za kontrolę wzrostu *Candida*, oprócz innych mechanizmów związanych z aktywnością pałeczek kwasu mlekowego, a jeszcze niedokładnie poznanych [14]. Wzajemne interakcje tych grup drobnoustrojów uzależnione są również od tworzenia wielogatunkowego biofilmu na powierzchni błony śluzowej. W badaniach *in vitro* potwierdzono negatywny wpływ *Lactobacillus* na tworzenie grzybni i supresję odpowiedzialnych za ten proces genów [11]. Badania nad wzajemnymi interakcjami bakterii fermentacji mlekowej i drożdżami są wciąż kontynuowane i bardzo potrzebne w kontekście zapobiegania i leczenia VVC.

Charakterystyka mykrobiomu ludzkiego ma znaczenie dla postępu diagnostyki i działań prewencyjnych w chorobach grzybowych, w tym kandydozach pochwy.

## 5. Probiotyki dopochwowe

Zaburzenia mikrobioty kobiecej pochwy wynikają najczęściej ze zmniejszenia liczebności pałeczek kwasu mlekowego na korzyść mikroorganizmów patogennych. Skutkiem tego są różnego rodzaju infekcje, tj. waginozy bakteryjne i kandydozy pochwy [7, 57, 60]. Przyczyną zaburzeń homeostazy kobiecej pochwy są antybiotyki, leki sterydowe i immunosupresyjne oraz środki hormonalne i barierowe, takie jak prezerwatywa, kapturki, błony dopochwowe powodujące uszkodzenia nabłonka pochwy. Innymi czynnikami o niedokładnie poznanym mechanizmie oddziaływań na mikrobiotę pochwy są: niewłaściwa higiena, używanie bielizny z tworzyw sztucznych, irygacje pochwy, osłabienie układu immunologicznego w wyniku ogólnoustrojowej infekcji, czy chorób o charakterze przewlekłym lub stresu, stosowanie tamponów, współżycie seksualne czy nawet kąpiel w basenie, podczas której może dojść do częściowego wypłukania pałeczek *Lactobacillus* [50]. Dlatego ważne jest szybkie przywrócenie pierwotnego stanu mikrobioty w tej części kobiecego ciała poprzez stosowanie żywych kultur bakterii mlekowych w postaci probiotyków dopochwowych. Są to mikroorganizmy, które korzystnie wpływają na poprawę mikrobioty pochwy poprzez zwalczanie patogenów tam obecnych. Powinny one spełniać kryteria ustalone w 2001 i 2002 roku przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority; EFSA) oraz Światową Organizację Zdrowia (WHO) [28].

Wśród podstawowych wymagań dotyczących probiotyków dopochwowych wymienia się:

- pochodzenie z układu moczowo-płciowego młodych kobiet;

- dokładną identyfikację genetyczną, biochemiczną i morfologiczną szczepu;
- udokumentowaną badaniami klinicznymi zdolność do kolonizacji kobiecej pochwy;
- działanie antagonistyczne wobec bakterii patogennych wywołujących infekcje układu moczowo-płciowego;
- silną adherencję do nabłonka pochwy;
- potwierdzoną redukcję adhezji patogenów do nabłonka pochwy;
- oporność swoistą na antybiotyki dla danego gatunku [33].

Wykazano, że zastosowanie probiotycznych szczepów *L. acidophilus* przez okres 6–12 dni oraz *L. rhamnosus* GR-1, *L. fermentum* RC-1 przez 2 miesiące hamuje wzrost bakterii wywołujących BV. Jest to wynikiem produkcji nadtlenu wodoru, kwasu mlekowego, bakteriocyn oraz inhibicji adherencji *G. vaginalis* [23].

W polskich badaniach wykazano, że doustne podawanie trzech konkretnych szczepów: *L. gasseri*, *L. fermentum* i *L. plantarum* kobietom w wieku reprodukcyjnym, zwiększyło liczbę pałeczek *Lactobacillus* w odbycie oraz pochwie pacjentek. Równocześnie obserwowano obniżenie pH pochwy i skuteczną zmianę w wartościach skali Nugenta, która służy do oceny biocenozy pochwy w oparciu o proporcjonalne udziały poszczególnych rodzajów bakterii w badanym preparacie. Jednak użycie probiotyku nie zawsze jest efektywne, szczególnie wtedy, gdy infekcja dróg moczowo-płciowych jest bardzo zaawansowana [70]. Ponadto stwierdzono, że inne gatunki pałeczek *Lactobacillus*, nie będące naturalną, rodzimą mikrobiotą nabłonka pochwy nie mogą kolonizować na stałe miejsc intymnych. Występują tylko lokalnie podczas stosowania probiotyku, zaś po zakończeniu suplementacji giną i są z organizmu wydalone. Według danych opublikowanych w czasopiśmie *Nature* [48] to układ immunologiczny ostatecznie decyduje, jaki będzie skład ilościowy i jakościowy mikrobioty naszego organizmu. Potwierdzają to badania, w których probiotyk dopochwowy zawierający szczep *L. rhamnosus* stosowały kobiety zamieszkujące Stany Zjednoczone. Szczep w trzecim dniu eksperymentu charakteryzował się wysokim mianem, ale w 21 dniu był w niewielkim stopniu wykrywalny. Suplementowany drobnoustrój nie był identyfikowany jako typowa, rodzima mikroflora dróg rodnych Amerykanek. Był jedynie przejściowym kolonizatorem. Autorzy sugerują, że eliminacja probiotycznego szczepu *L. rhamnosus* nastąpiła wskutek naturalnych mechanizmów samoregulujących ekosystem pochwy [3].

Probiotyki dopochwowe na rynku farmaceutycznym występują w postaci liofilizowanej biomasy komórkowej unieruchomionej w twardych kapsułkach celulozowych lub żelatynowych. Częstość ich stosowania jest uzależniona od zaawansowania infek-

cji powstałych w wyniku zaburzeń mikrobioty pochwy. Mogą one kolonizować pochwę lub wystarczająco długo tam przebywać, aby spowodować odbudowę rodzimej, naturalnej mikrobioty. W tym celu muszą produkować kwas L (+) mlekowy w ilości powyżej 50% całkowitej ilości produkowanego kwasu oraz ewentualnie inne kwasy organiczne, takie jak: kwas octowy, mrówkowy, propionowy, benzoesowy lub mewalony. Powinny cechować się zdolnością adhezji do nabłonka pochwy, co wymaga zbadania ich właściwości hydrofobowych, ładunku powierzchniowego, struktury powierzchniowej i powinowactwa do receptorów komórek nabłonkowych.

## 6. Podsumowanie

Poznanie i zrozumienie funkcjonowania mikrobioty kobiecego układu płciowego jest istotne w leczeniu i profilaktyce infekcji pochwy. Tym bardziej, że często mają one charakter przewlekły, trudny w leczeniu, co stanowi współczesne wyzwanie w urologii i ginekologii. Szczególnie, występujące u kobiet w ciąży waginozy i kandydozy, wymagają leczenia ze względu na zagrażające poronienia i zakażenia wewnątrzmaciczne. Coraz większa wiedza na temat roli bakterii probiotycznych w leczeniu infekcji pochwy pozwala na poszukiwanie nowych, skutecznie działających szczepów. Ważne jest by miały status GRAS (generally recognized as safe), tzn. były niepatogenne, nie wytwarzały substancji toksycznych, kancerogennych, teratogennych i mutagennych. Ponadto powinny przeżyć proces technologiczny oraz okres przechowywania w warunkach suchych i chłodniczych przez czas od 12 do 24 miesięcy. Tym bardziej, że podczas produkcji bakterie najczęściej są poddawane procesowi suszenia sublimacyjnego (liofilizacji), co pozwala na uzyskanie preparatów trwałych i zachowujących swoją żywotność. Ponadto preparat probiotyczny będący lekiem powinien być wytwarzany zgodnie z dobrą praktyką wytwarzania (GMP – good manufacturing practice) oraz odpowiednio oznakowany. Istnieje duża potrzeba komponowania nowych probiotyków dopochwowych na polski rynek, który jest ubogi w preparaty oparte o rodzime szczepy bakterii *Lactobacillus*.

## Piśmiennictwo

1. Aagaard K., Ma J., Antony KM., Ganu R., Petrosino J., Versalovic J.: The placenta harbors a unique microbiome. *Sci. Transl. Med.* 6, 237–265 (2014)
2. Ameen F., Moslem M., Tami M.AL., Al-Ajlan H., Al-Qahtani N.: Identification of *Candida* species in vaginal flora using conventional and molecular methods. *J. Mycologie Medicale*, 27, 364–368 (2017)

3. Antonio M.A., Meyn L.A., Murray P.J., Busse B., Hillier S.L.: Vaginal colonization by probiotic *Lactobacillus crispatus* CTV-05 is decreased by sexual activity and endogenous *Lactobacilli*. *J. Infect. Dis.* **199**, 1506–1513 (2009)
4. Antonio M.A., Hawes S.E., Hillier S.L.: The identification of vaginal *Lactobacillus* species and demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J. Infect. Dis.* **180**, 1950–1956 (1999)
5. Anukam K.C., Osazuwa E.O., Ahonkhai I., Reid G.: 16S rRNA gene sequence and phylogenetic tree of *Lactobacillus* species from the vagina of healthy Nigerian women. *Afr. J. Biotechnol.* **4**, 1222–1227 (2005)
6. Atassi F., Brassart D., Grob P., Graf F., Servin A.L.: *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.* **48**, 424–432 (2006)
7. Atassi F., Brassart D., Grob P., Graf F., Servin A.L.: Vaginal *Lactobacillus* isolates inhibit uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **257**, 132–138 (2006)
8. Bäckhed F.: Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host Microbe*, **17**, 690–703 (2015)
9. Bitew A., Abebaw Y.: Vulvovaginal candidiasis: species distribution of *Candida* and their antifungal susceptibility pattern. *BMC Women's Health*, **18**, 94 (2018)
10. Blustein J., Attina T., Liu M., Ryan A.M., Cox L.M., Blaser M.J., Trasande L.: Association of caesarean delivery with child adiposity from age 6 weeks to 15 years. *Int. J. Obesity*, **37**, 900–906 (2013)
11. Bradford L.L., Ravel J.: The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases. *Virulence*, **8**, 342–351 (2017)
12. Brook I.: Bacteremia and septicemia due to anaerobic bacteria in newborns. *J. Neonatal Perinatal Med.* **1**, 201–208 (2008)
13. Cardwell C.R., Patterson C.C. i wsp.: Caesarean section is associated with an increased risk of childhood-onset type 1 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Diabetology*, **51**, 726–735 (2008)
14. Cauchie M., Desmet S., Lagrou K.: *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. *Res. Microbiol.* **168**, 802–810 (2017)
15. Crucitti T., Hardy L., van de Wijgert J., Agaba S., Buyze J., Kestelyn E., Delvaux T., Mwambarangwe L., De Baetselier I., Jaspers V.: Contraceptive rings promote vaginal lactobacilli in a high bacterial vaginosis prevalence population: A randomised, open-label longitudinal study in Rwandan women. *Plos One*, **13**, e0201003 (2018)
16. Decker E., Engelmann G., Findeisen A., Gerner P., Laaß M., Ney D., Posovszky C., Hoy L., Hornef M.W.: Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Pediatr.* **125**, 1433–1440 (2010)
17. Demkin V.V., Koshechkin S.I.: Characterization of vaginal *Lactobacillus* species by rplK – based multiplex qPCR in Russian women. *Anaerobe*, **47**, 1–7 (2017)
18. Dimitonova S.P., Bakalov B.V., Aleksandrova-Georgieva R.N., Danova S.T.: Phenotypic and molecular identification of lactobacilli isolated from vaginal secretions. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **41**, 469–77 (2008)
19. Dobrut A., Gosiewski T., Pabian W., Bodaszewska-Lubas M., Ochonska D., Buland M., Brzywczy-Wloch M.: The dynamics of vaginal and rectal *Lactobacillus* spp. flora in subsequent trimesters of pregnancy in healthy Polish women, assessed using the Sanger sequencing method. *BMC Pregnancy and Childbirth*, **18**, 350 (2018)
20. Dominguez-Bell M.G., Costello E.K., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N., Knight R.: Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in new borns. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **107**, 11971–11975 (2010)
21. Dominguez-Bello, M.G., Clementem J.C. i wsp.: Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat. Med.* **22**, 250–253 (2016)
22. Drell T., Lillsaar T., Tummeleht L., Simm J., Aaspollou A., Vain E., Saarma I., Salumets A., Donders G.G., Metsis M.: Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. *Plos One*, **8**, e54379 (2013)
23. Falagas M.E., Bersi G.I., Athanasiou S.: Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin. Microbiol. Infect.* **13**, 657–664 (2007)
24. Fettweis J.M., Brooks J.P., Serrano M.G., Sheth N.U., Girerd P.H., Edwards D.J., Strauss J.F., Jefferson K.K., Buck G.A.: Differences in vaginal microbiome in African-American women versus women of European ancestry. *Microbiology*, **160**, 2272–2282 (2014)
25. Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B.: Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, **312**, 1355–1359 (2006)
26. Gratacos E., Figueras F., Barranco M., Ros R., Andreu A., Alonso P.L., Cararach V.: Prevalence of bacterial vaginosis and correlation of clinical to Gram strain diagnostic criteria in low risk pregnant women. *Eur. J. Epidemiol.* **15**, 913–916 (1999)
27. Gregorczyk-Maślanka K., Kurzawa R.: Mikrobiota organizmu ludzkiego i jej wpływ na homeostazę immunologiczną – część I. *Alerg. Astma Immun.* **21**, 146–150 (2016)
28. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Raport a Joint FAO/WHO Working Group, London, Ontario, Canada, (2002)
29. Guo R., Zheng N., Lu H., Yin H., Yao J., Chen Y.: Increased diversity of fungal flora in the vagina of patients with recurrent vaginal candidases and allergic rhinitis. *Microb. Ecol.* **64**, 918–927 (2012)
30. Heczko P.B., Niemiec T.: Zalecenia dotyczące wykazywania nosicielstwa paciorkowców grupy B (GBS) u kobiet w ciąży i zapobiegania zakażeniom u noworodków spowodowanym przez ten drobnoustrój. *Zakażenia*, **2**, 87–96 (2008)
31. Hillier S., Arko S.: Vaginal infection (w) Atlas of sexually transmitted diseases and AIDS, red. S.A. Morse, A.A. Moreland, K.K. Holmes, Mosby-Wolfe, Baltimore, 1996, s. 79–94
32. Hoopner L.V., Gordon J.I.: Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, **292**, 1115–1118 (2001)
33. Hütt P., Mändar R. i wsp.: Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. *Microb. Ecol. Health Dis.* **27**, 30484 (2016)
34. Jakobsson H.E., Abrahamsson T.R., Jenmalm M.C. i wsp.: Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*, **63**, 559–566 (2014)
35. Jaworski A., Dudek K., Jurczak I.: Struktura i rola biologiczna mikrobioty przewodu pokarmowego człowieka zdrowego i w chorobie. *J. Health Study Med.* **4**, 37–61 (2016)
36. Jaspers V., Crucitti T. i wsp.: The significance of *Lactobacillus crispatus* and *L. vaginalis* for vaginal health and the negative effect of recent sex: a cross-sectional descriptive study across groups of African women. *BMC Infectious Diseases*, **15**, 115 (2015)
37. Jiménez E., Fernández L., Marin M.L., Martin R., Odriozola J.M., Nueno-Palop C., Narbad A., Olivares M., Xaus J., Rodríguez J.M.: Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by caesarean section. *Cur. Microbiol.* **51**, 270–274 (2005)



38. Jiménez E., Marin M.L., Martin R., Odriozola J.M., Olivares M., Xaus J., Fernández L., Rodríguez J.M.: Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* **159**, 187–193 (2008)
39. Kaberdoss J., Ferdous S., Balamurugan R., Mechenro J., Vidya R., Santhanam S., Jana A.K., Ramakrishna B.S.: Development of the gut microbiota in southern Indian infants from birth to 6 months: a molecular analysis. *J. Nutr. Sci.* **2**, e18 (2013)
40. Kasprowicz A., Białecka A.: Ocena biocenozy pochwy – stopnie czystości pochwy. *Diagnosta Lab.* **2**, 23–24 (2008)
41. Kazimierzczak W., Wnęk M., Kamiński K.: Częstość zakażeń pochwy ciężarnych hospitalizowanych w klinice perinatologii i ginekologii w Zabrzcu. *Ginekol. Pol.* **75**, 932–936 (2004)
42. Kierzkowska M., Młynarczyk G. i wsp.: Ocena mikroflory bakteryjnej szyjki macicy u kobiet w ciąży. *Perinatol. Neonatol. Ginekol.* **5**, 1, 26–29 (2012)
43. Kolokotroni O., Middleton N., Gavatha M., Lamniso D., Priftis K.N., Yiallourous P.K.: Asthma and atopy in children born by caesarean section: effect modification by family history of allergies – a population based cross-sectional study. *BMC Pediatr.* **12**, 179 (2012)
44. Kozieł M., Włodarczyk K., Wojton D.: Kształtowanie się mikrobioty jelitowej noworodków a konsekwencje zdrowotne (w) Mikrobiologia medyczna i środowiskowa-wybrane zagadnienia, Lublin, 2017, 14–27.
45. Kim J.H., Yoo S.M., Sohn Y.H., Jin C.H., Yang Y.S., Hwang I.T.: Predominant *Lactobacillus* species types of vaginal microbiota in pregnant Korean women: quantification of the five *Lactobacillus* species and two anaerobes. *J. Matern. Fetal Neonatal Med.* **30**, 2329–2333 (2017)
46. Kumar P., Magon N.: Hormones in pregnancy. *Niger. Med. J.* **53**, 179–183 (2012)
47. Madan J.C., Hoen A.G., Lundgren S. N., Shohreh F.F., Cottingham K.L., Morrison H.G., Sogin M.L., Li H., Moore J.H., Karagas M.R.: Effects of Cesarean delivery and formula supplementation on the intestinal microbiome of six-week old infants, *JAMA Pediatr.* **170**, 212–219 (2016)
48. McFall-Ngai M.: Adaptive immunity: care for the community. *Nature*, **445**, 153 (2007)
49. MacIntyre D.A., Bennett F.B. i wsp.: The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Sci. Rep.* **5**, 8988 (2015)
50. Malinowska M., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Mikrobiom człowieka. *Post. Mikrobiol.* **56**, 1, 33–42 (2016)
51. Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A.: Bakterie, antybiotyki, lekooporność. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa (2012)
52. Martinez R.C.R., Franceschini S.A., Patta M.C., Quintana S.M., Nunes A.C., Moreira J.L.S., Anukam K.C., Gregor Reid G., De Martinis E.C.P.: Analysis of vaginal *Lactobacilli* from healthy and infected brazilian women. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4539–4542 (2008)
53. Motevaseli E., Shirzad M., Raoofian R., Hasheminasab S., Hatami M., Dianatpour M., Modarressi M.: Differences in vaginal *Lactobacilli* composition of iranian healthy and bacterial vaginosis infected women: a comparative analysis of their cytotoxic effects with commercial vaginal probiotics. *Iran. Red Crescent Med. J.* **15**, 199–206 (2013)
54. Moyes D.L., Naglik J.R. i wsp.: Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*, **532**, 64–68 (2016)
55. Mueller N.T., Bakacs E., Combellick J., Grigoryan Z., Dominguez-Bello M.G.: The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol. Med.* **21**, 109–117 (2015)
56. Niemiec T.: Zakażenia w położnictwie i ginekologii. *Via Medica*, Gdańsk (2009)
57. Kumar N., Beauty B., Sai S.S., Kunal P., Saroj R.: Bacterial vaginosis: etiology and modalities of treatment – a brief note. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* **3**, 496–503 (2011)
58. Olszewska J., Jagusztyn-Krynicka E.: HMP (Human Microbiome Project) – mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka. *Post. Mikrobiol.* **51**, 243–256 (2012)
59. Pantoja-Feliciano I.G., Clemente J.C., Costello E.K., Perez M.E., Blaser M.J., Knight R., Dominguez-Bello M.G.: Biphasic assembly of the murine intestinal microbiota during early development. *Multidisc. J. Microbial Ecol.* **7**, 1112–1115 (2013)
60. Paczkowska I., Wójtowicz A., Malm A.: Wybrane aspekty farmakoterapii kandydoz. *Terapia i Lek.* **8**, 539–543 (2010)
61. Peleg A.Y., Hogan D.A., Mylonakis E.: Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 340–349 (2010)
62. Pluznick L.J.: Gut microbes and host physiology: what happens when you host billions of guests? *Front Endocrinol.* **5**, 91 (2014)
63. Podgorski V.S., Liaskovski T.M., Kovalenko N.K., Oleshchenko L.T.: Study of vaginal and intestinal microflora of women in the prenatal period and its correction in dysbacteriosis. *Mikrobiol. Z.* **68**, 92–104 (2006)
64. Ravel J., Forney L.J. i wsp.: Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 4680–4687 (2011)
65. Romero R., Ravel J. i wsp.: The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of nonpregnant women. *Microbiome*, **2**, 4 (2014)
66. Shaaban O.M., Abbas A.M., Moharram A.M., Farhan M.M., Hassanen I.H.: Does vaginal douching affect the type of candidal vulvovaginal infection? *Med. Mycol.* **53**: 817–827 (2015)
67. Smith S.B., Ravel J.: The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J. Physiol.* **595**, 451–463 (2017)
68. Strus M., Malinowska M.: Zakres antagonistycznego działania bakterii z rodzaju *Lactobacillus* na czynniki etiologiczne wagi-nozy bakteryjnej. *Med. Doś. Mikrobiol.* **51**, 47–57 (1999)
69. Strus M.: Podstawy stosowania probiotyków dopochwowych w zakażeniach układu moczowo-płciowego. *Zakażenia*, **4**, 40–43 (2005)
70. Strus M., Kochan P., Chelwicki Z., Chelwicki A., Stefański G., Dechnik K., Jabłońska E., Heczko P.: Wpływ doustnego podawania trzech probiotycznych szczepów *Lactobacillus* na poprawę odczynu i składu mikroflory pochwy u kobiet w wieku reprodukcyjnym. *Gin. Dypl.* **3**, 53–59 (2008)
71. Wasieła M., Pieczara A., Hanke W., Kalinka J.: Porównanie częstości występowania bacterial vaginosis między I i III trymestrem ciąży. *Ginekol. Prakt.* **9**, 111–114 (2001)
72. Ward T., Dominguez-Bello M.G., Heisel T., Al-Ghalith G., Knights D., Gale C.A.: Development of the human mycobiome over the first month of life and cross body sites. *mSystems*, **3**, e00140–17 (2018)
73. Vandenplas Y., De Greef E., Veereman G.: Prebiotics in infant formula. *Gut Microbes*, **5**, 681–687 (2014)
74. Vásquez A., Jakobsson T., Ahrné S., Forsum U., Molin G.: Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2746–2749 (2002)
75. Ventolini G.: Vaginal *Lactobacillus*: biofilm formation *in vivo* – clinical implications. *Int. J. Womens Health*, **7**, 243–247 (2015)
76. Zhanshan (Sam) M., Lianwei L.: Quantifying the human vaginal community state types (CSTs) with the species specificity index. *Peer J.* DOI 10.77717/peerj. 3366 (2017)
77. Zhou X., Hansmann M.A., Davis C.C., Suzuki H., Brown C.J., Schutte U., Pierson J.D., Forney L.J.: The vaginal bacterial communities of japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **58**, 169–181 (2010)