ترجمه فا

TarjomeFa.Com

ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

شناسایی، کمیت سنجی، و تعیین نوع Gardnerella vaginalis در نمونه های واژنی بالینی غیرکشت شده توسط PCR کمّی

چکیده

Gardnerella vaginalis یک مولفه مهم در میکروفلور واژن انسان می باشد. این باکتری احتمالا در آسیب شناسی واژینوز باکتریال BV یک نقش کلیدی را ایفا می کند که شایع ترین بیماری واژن می باشد. در اینجا ما درباره ابداع، روایی سازی و تحلیل تطبیقی یک روش مولکولی تازه است که قادر به شناسایی G. vaginalis، کمیت سنجی و تعیین نوع نمونه های واژن غیرکشت شده است. با استفاده از دو سنجش PCR کمّی qPCR، ما به تحلیل بارهای باکتریایی G. vaginalis و توزیع دسته باکتریایی در ۶۰ نمونه سواب واژینال بالینی پرداختیم. یک شیوع خیلی بالای پاتوژن توسط qPCR خاص نمونه نه تنها در میان بیماران BV (۱۰۰ درصد)، بلکه در میان زنان سالم (۹۷ درصد) آشکار شده است، هر چند غلظت G. vaginalis به طرز معنی داری در نمونه های غیرBV پایین تر می باشد. دستجات G. vaginalis که در نمونه های واژنی توسط تعیین نوع qPCR نوع multiplex شناسایی شده است، که هدفش چهار نشانگر ژنتیکی خاص دسته می باشد، دارای فراوانی های ۵۳ درصدی برای دسته ۱، ۲۵ درصدی برای دسته ۲، ۳۲ درصدی برای دسته ۳، و ۸۳ درصدی برای دسته ۴ می باشد. دستجات متعددی در ۷۰ درصد نمونه های یافت گردید. دستجات G. vaginalis منفرد با دستجات ۱ و ۴ در ۲۸ درصد نمونه مشخص گردید. یک رابطه مثبت با بیماری BV برای دستجات ۱ و ۳ نشان داده شد درحالیکه دسته ۲ به طور مثبت با میکروفلور واژینال حدوسط مرتبط بوده است ولی با BV مرتبط نبوده است. دسته ۴ نشان دهنده هیچ گونه همبستگی با این اختلال نیست. حضور دستجات متعدد دارای یک رابطه مثبت بالایی با بیماری BV می باشد، در صورتیکه G. vaginalis که به شکل یک دسته منفرد شناسایی شده است به طور منفی با این بیماری مرتبط بوده اند. عفونت G. vaginalis پلی کلونال می تواند یک ریسک فاکتور برای بیماری BV باشد.

مقدمه

Gardnerella vaginalis یک باکتری بی هوازی اختیاری کاتالاز منفی و اکسیداز منفی می باشد. سلولهای G. vaginalis باکتریهای میله ای شکل پلئومورفیک، گرم منفی تا گرم متغیر، بدون کپسول غیرمتحرک با اندازه متوسط µm ۰,۵-۱,۵ می باشند. این میکروارگانیسم که در آغاز توسط کاشفین تحت عنوان Haemophilus vaginalis مورد اشاره گردید، بعدها تحت عنوان Corynebacterium vaginale مورد اشاره قرار گرفته و از لحاظ تاکسونومیکی تحت عنوان G. vaginalis تخصیص یافته اند. در حال حاضر تنها گونه در جنس Gardnerella می باشد (فهرست نامهای پروکاریوتی با رتبه نامگذاری www.bacterio.net–).

G. vaginalis اساسا به عنوان بخشی از میکروفلور مجرای تناسلی زنانه پایینی در نظرگرفته شده است. این باکتری می تواند همچنین به طور روتین از مجرای ادارای تناسلی مردان بنا به گزارش اولیه مقاله روی این میکروارگانیسم و یک تعداد مطالعات دیگر جداسازی شود. وجود G. vaginalis در نمونه های حفره دهانی و مخرجنیز توضیح داده شده است. در کنار اختلالات در مجرای ادراری تناسلی، G. vaginalis به عنوان عامل مسبب باکتریمیا، سپتی سمی با اندوکرادیتیس عفونی، استئومیلیت مهره ای، آرتریت باسن حاد، و واسکولیت قرنیه شناخته شده است.

از لحظه کشف G. vaginalis به واژینوز باکتریال BV مربوط بوده است، که شایع ترین بیماری واژن است. BV با افزایش pH واژنی و علائم بالینی مانند ترشح واژنی بدبو و وجود سلولهای نشانه رویت شده روی برامدگی خیس مشخص می شود هرچند درصد زیادی از زنان مبتلا به BV می توانند بدون نشانه باشند. این اختلال همراه با یک تغییر برجسته در میکروفلور واژن است وقتی که گونه های لاکتوباسیل حفاظت کننده تخلیه شده و با باکتریهای بی هوازی سخت گیر مانند Prevotella، Atopobium، Megasphaera، Sneathia و G. vaginalis جایگزین شده است. ولیکن G. vaginalis که توسط کاشفان خود تحت عنوان ماده سبب شناختی منفرد BV توصیف شده است، در برقراری فرضیات کخ برای عفونت میکروبی در مطالعات متعدد ناکام مانده است. ماهیت پلی میکروبی پیچیده BV و وجود G. vaginalis در محیط واژن افراد سالم علیه تعریف G. vaginalis به عنوان گونه انحصاری مسبب بیماری بحث می کند. مع ذلک این میکروارگانیسم یک سوظن

اصلی در آسیب شناسی BV باقی مانده است چرا که در ۹۵ الی ۱۰۰ درصد از بیماران مبتلا به BV وجود دارد، هر چند مشخص گردید که رابطه G. vaginalis با Atopobium یا Megasphaera مقدار پیشگویی کننده بهتری را برای این بیماری به نمایش می گذارد. مطرح شده است که G. vaginalis ممکن است به شکل کلنی ساز اولیه مهم برای ابتلا به BV عمل نماید. برخی مطالعات حاکی از آنست که غلبه G. vaginalis در میکروفلور واژنی می تواند نمایانگر یک حالت انتقالی و ناپایدار مجزا یا حدواسط میان میکروفلور سالم اشغال شده توسط لاکتوباسیل ها و میکروفلور نوع BV با جمعیت بی هوازی سخت گیر باشد. بعد از بیش از نیم قرن نقش G. vaginalis در یک بیماری گیج کننده ای مثل BV همچنان مبهم باقی مانده است.

به عنوان یک گونه، G. vaginalis یک دامنه وسیعی از فنوتیپ های متابولیکی را نشان می دهد. هر چند اکثریت سویه های بالینی G. vaginalis کاتالز منفی و اکسیداز منفی می باشند و قادر به بتاهمولیز خون انسان هستند، تنوع زیادی در تخمیر کربوهیدرات، تولید سیالیداز، هیدرولیز هیپورات، فعالیت های لیپاز و بتاگالاکتوزیداز وجود دارد. سه مشخصه انزیمی اخیر برای ابداع شماهای بیوتایپینگ تسهیل کننده مطالعات اپیدمیولوژی G.vaginalis استفاده شدند. سوشهای متعلق به هشت بیوتایپ ممکن با فراوانی های مختلف بسته به محل جغرافیایی و وضعیت سلامت بیمار جداسازی شده اند. حامل بیوتایپ چندگانه در تعدادی مطالعات تعیین گردید و نسبتا شایع درنظر گرفته شد. مشخص گردید که توزیع بیوتایپ ها بین زنان مبتلا به BV و غیرمبتلا به BV متفاوت است، ولیکن، یک عدم توافق قابل ملاحظه درباره مرتبط سازی بیوتایپ های ویژه با بیماری BV بین مطالعات وجود دارد. سایر مطالعات هیچ تفاوت معنی دار آماری را میان بیوتایپ های پاتوژن در بیماران مبتلا به BV و و افراد با میکروفلور واژینال طبیعی نشان نداد که باعث شد نویسندگان اینگونه نتیجه گیری کنند که هیچ فنوتیپ یا ژنوتیپ خاصی از G. vaginalis بیماریزا نبوده و باعث BV نمی شود.

فقدان یک همبستگی میان بیوتایپ/ژنوتیپ G. vaginalis و عوامل بیماریزایی مانند چسبندگی به سلولهای اپیتلیال واژن، تولید بیوفیلم، هیدروفوبیسیته سطحی، تولید واژینولیزین، و فعالیت های فسفولیپاز C و پروتئاز نیز نشان داده شده است. نتایج ضد و نقیض درباره بیوتایپ G. vaginalis و رابطه بیماری BV می تواند تا اندازه ای با کمبودهای شیوه فنوتیپی توضیح داده شود، که مستعد شناسایی بیوتاپی اشتباه می باشد.

محدودیت های شمای تعیین نوع فنوتیپی G. vaginalis در مطالعات بعدی مطرح گردید که حاکی از تکنیک های اصلاح شده است هر چند همچنان براساس کشت باکتریایی می باشند. مشخص گردید که یک تعداد روشهای مولکولی مانند DNA پلی مورفیک تکثیرشده تصادفی (RAPD) و آنالیز محدودیت DNA ریبوزومی تکثیر شده (ARDRA) برای شناسایی سه تا از چهار ژنوتیچ G. vaginalis مختلف مفید بوده است. هر چند یک پیوند با تولید سیالیدازی در دو ژنوتیپ مجزا یافت گردید، یک همبستگی میان بیماری BV و هر یک از ژنوتیپ ها نتوانست شناسایی گردد. همین اواخر، پیشرفتهای فناوری تعیین توالی نسل بعدی باعث تمایز سوشها و زیرگروه ههای G. vaginalis طبق تنوعات توالی در ژنهای ۱۶S rRNA و cpn۶۰ و نیز کل آنالیز تعیین توالی ژنومی گردید. مقایسات در سطح ژنومی نشان دهنده واگرایی معنی دار میان سوشهای جداسازی شده G. vaginalis از بیماران مبتلا به BV و زنان سالم می باشد. تحلیل جامع ژنوم های ۱۷ سویه بالینی G. vaginalis تفاوتهای اساسی را در اندازه ژنوم، محتوای گوانین و سیتوزین DNAو ترکیب ژنی آشکار کرده است که باعث جداسازی آنها به چهار دسته با ذخایر ژنی مجزا و خصوصیات ژنومیک می شود. مجموعه های بیومارکرهای ژنتیکی منحصر به فرد برای هر دسته شناسایی شدند، که حاکی از تفاوتهایی در قابلیت های متابولیکی و قابلیت های بیماریزایی میان دستجات می باشد.

ما که از میزان بالای غیرعادی تنوع ژنومی بین چهار دسته مجزای G. vaginalis که توسط آنالیز ژنومی آشکارشده بود، متعجب بودیم، به بررسی فایده نشانگرهای ژنتیکی خاص دسته حفاظت شده برای یک شمای تعیین نوع مولکولی جدید مستقل از کشت پرداختیم. در اینجا ابداع دو روش سنجش PCR کمی (qPCR) برای شناسایی خاص گونه G. vaginalis و نیز تمایز چهار دسته ژنتیکی را گزارش می کنیم. روایی روش سنجش شامل واکنش بینابینی، صحت، کارایی PCR، استنباط، محدودیت شناسایی LOD، و تعیین اختصاصی بودن و حساسیت تحلیلی بود. سنجشهای qPCR با استفاده از سویه های بالینی G. vaginalis ، سایر کشت های میکروبی، DNA کروموزومی انسان، DNA پلاسمید و سواب واژینال ارزیابی گردید. مشخص گردید که روش تایپینگ مبتنی بر qPCR خاص دسته جات G. vaginalis بوده و توانایی شناسایی ارگانیسم، کمیت سنجی، و تعیین نوع بیشتر در نمونه های واژینال غیرکشت شده را دارد. با استفاده از یک مجموعه نمونه های واژینال

مشخص شده از بیماران مبتلا به BV و افراد سالم، ما تفاوتهای معنی داری را در رابطه چهار دسته G. vaginalis با بیماری BV نشان دادیم.

روش اجرا:

نمونه های بیمار، تشخیص BV، نمونه های DNA و سوشهای میکروبی-یک صد نمونه سواب واژینال در کلینیک درمانی واژینیت دانشکده علوم پزشکی دانشگاه ایالتی Wayne در شهر دترویت امریکا به عنوان بخشی از مطالعه چندرشته ای در زمینه پاتوژنز BV جمع آوری گردید. نمونه ها به آزمایشگاه های تشخیص پزشکی انتقال داده شده که به شکل یخ زده در محیط کشت انتقالی همگانی UTM-RT (شرکت ایتالیایی Copan) از اگوست تا اکتبر ۲۰۱۲ بوده است.

ارزیابی های بالینی و ازمایشگاهی بیماری BV در ۶۰ نفر دهندگان نمونه واژینال در کلینیک واژینیت طبق معیارهای Amsel و امتیازات Nugent اجرا گردید. امتیازات Nugent براساس شمارش انواع مختلف مورفوتایپ های باکتریایی واژینالی توسط رنگ امیزی گرم و میکروسکوپ نمونه واژینال که در آن یک دامنه امتیازبندی با فلور میکروبی طبیعی (امتیاز صفر تا ۳)، فلور میکروبی حدواسط (امتیاز ۴ الی ۶)، یا میکروفلورغیرطبیعی (امتیازات ۷ الی ۱۰) مرتبط بوده است. معیارهای Amsel براساس یک ارزیابی بالینی بوده است که شامل ارزیابی pH واژن بالاتر از ۴٫۵ ، وجود سلولهای نشانه با استفاده از میکروسکوپ آماده خیس، تخلیه واژنی سفیدرنگ همگن و بوی ماهی (تست آمین KOH مثبت) می باشد. یک بیمار باید دارای سه تا از چهار معیار از جمله وجود اجباری pH بالا رفته و وجود سلولهای نشانه برای طبقه بندی در BV مثبت باشد. چهل دهنده نمونه واژینال برای بیماری BV ارزیابی نشدند. سواب های واژینال از این ۴۰ بیمار به عنوان نمونه های مشخص نشده استفاده گردیدند.

رضایت نامه مطلعانه از همه افراد مورد مطالعه بدست آمد. معیارهای ورود به مطالعه باعث ورود زنان دوره پیش یائسگی بزرگتر از ۱۸ سال گردید. معیارهای خروج از مطالعه شامل زنانی بود که درمان ضدالتهابی واژنی یا درمان ضدهیستامینی را دریافت کرده بودند، آنتی بیوتیک هایی را در عرض ۳۰ روز دریافت کردند یا اینکه باردار بودند، سرکوبی ایمنی داشته یا متحمل درمانی برای بیماری عفونی ادراری تناسلی به غیر از BV شده بودند. سن

میانه شرکت کنندگان ۳۲,۵ سال بود (از ۲۰ الی ۴۶ سالگی). خط مشی های آزمایشات انسانی در وزارت بهداشت و خدمات انسانی امریکا و نیز خط مشی های موسسات محققان به شدت تبعیت گردید.

میکروارگانیسم های سه منبع مختلف در این مطالعه بکار گرفته شدند. ۲۴ سوش G. vaginalis (جدول ۱) از نه نمونه مشخص شده و نه نمونه مشخص نشده سواب واژینال با پلیت گذاری بخش های محیط کشت انتقالی UT<-RT روی آگار مایع قلبی مغزی (شرکت Becton Dickinson) با مکمل خون گوسفندی ۵ درصد و مکمل انتخابی G. vaginalis (شرکت Oxoid) جداسازی گردید و آنها را به شکل غیرهوازی در ۳۷ درجه سانتیگراد برای مدت ۷ روز انکوبه نمودند. شناسایی قبلی سویه های G. vaginalis براساس بتاهمولیز روی پلیت های آگار دولایه خون انسان-توین (شرکت Becton Dickinson) و با رنگ امیزی گرم متغیر زیر میکروسکوپ بوده است. دوازده سوش G. vaginalis که قبلا توضیح داده شد به لطف دکتر گارت ارلیخ در مرکز علوم ژنومی موسسه تحقیقاتی آلژنی-سینگر در پیتسبورگ امریکا توضیح داده شد. سه سوش G. vaginalis (جدول ۱)، و سی و هشت سوش از گونه های باکتریایی، قارچی و پروتوزوا (جدول ۲) از شرکت مجموعه کشت از نوع امریکایی ATCC خریداری گردید. DNA کروموزومی انسان از شرکت Promega خریداری شد.

استخراج DNA و تعیین توالی آن- DNA حاصل از نمونه های بالینی با استفاده از کیت QIAamp Mini (شرکت Qiagen) همراه با افزودن قبلی پروتئیناز K و هموژنیزاسیون مکانیکی استخراج گردید. نمونه های واژینال در درجه حرارت اتاق از یخ زدگی باز شده و به شدت سانتریفوژ گردیدند. یک عدد بخش پذیر ۶۰۰ µl از محیط کشت انتقالی UTM-RT به کمک پیپت به یک لوله E شکل ماتریس لیزینگ (شرکت MP Biomedicals) و همراه با ۶۰ µl پروتئیناز K (شرکت Qiagen) اضافه گردید. برهم زنی مکانیکی در دستگاه هموژنایزر FastPrep-۲۴ (شرکت MP Biomedicals) برای مدت ۱ دقیقه با سرعت ۴m/s انجام گردید. محیط کشت انتقالی UTM-RT ی ۴۰۰µl به یک لوله میکروسانتریفوژ ۱,۵ml جدید منتقل گردید و در معرض عملیات استخراج DNA کیت QIAamp Mini طبق توصیه کارخانه قرار گرفت. DNA از کشت های باکتریایی و قارچی، از جمله کشت های یخ زده خشک ATCC، بوسیله همان روش رهیدراسیون در آب مقطر در صورت نیاز استخراج گردید. DNA پلاسمید کنترل tuf سنتتیک از کشت های باکتریایی با استفاده از کیت Plasmid

Mini (شرکت Qiagen) استخراج گردید. تعیین توالی DNA از محصولات PCR روی یک دستگاه آنالیزور DNA خودکار مدل CEQ۸۰۰۰ با استفاده از یک کیت آغازگر GenomeLab DTCS Quick Start (شرکت Beckman Coulter) اجرا گردید. پرایمر تعیین توالی فوروارد M۱۳-۲۰ ی 5′-GTAAAACGACGG-CCAGT-3′ و پرایمر تعیین توالی معکوس M۱۳-۲۶ی 5′-AACAGC-TATGACCATG-3′ برای PCR و تعیین توالی استفاده گردید وقتی که پلاسمید کنترل سنتتیک به شکل الگو بکار گرفته شد. پرایمرهای Gv_tuf_S۶ و Gv_tuf_AS۷ (جدول ۳) برای PCR و تعیین توالی بکار رفتند وقتی قطعات PCR با تکثیر ژن tuf در G. vaginalis ایجاد گردیدند.

بیوتایپینگ معمول G. vaginalis و ژنوتایپینگ ARDRA–بیوتایپینگ فنوتیپی G. vaginalis با استفاده از تست های استاندارد بیوشیمیایی انجام گردید: هیدرولیز هیپورات، و فعالیت های لیپاز و بتا-گالاکتوزیداز طبق توضیحات مقالات دیگر. آگار زرده تخم مرغ اصلی تهیه شده با زرده تخم مرغ با ۵۰ درصد غنی سازی (شرکت Becton Dickinson)، ولی بدون تست نقطه ای ۴-متیل لومبلی فریل-اولئات، برای تعیین فعالیت لیپازی استفاده گردید. سوش های G. vaginalis ATCC ۱۴۰۱۸, B۵۱۲ به عنوان به ترتیب شاهدهای مثبت و منفی در همه سه تست در ازمایشات بیوتایپینگ استفاده گردیدند. برای ARDRA، قطعات ژن ۱۶S rRNA ی G. vaginalis به کمک پرایمرهای GV10F 5′-GGTTCGATTCTGGCTCAG-3′ و ωMB 5′-TACCTTGTTACGACTTCGTCCCA-3′ طبق توضیحات مقاله دیگری تکثیر شدند. قطعات PCR به کمک اندونوکلئاز محدودیت HpaII (شرکت New England Biolabs) طبق توصیه کارخانه هضم گردیدند. قطعات هضم محدودیت با استفاده از دستگاه Bioanalyser ۲۱۰۰ (شرکت Agilent Technologies) آنالیز شده و با الگوهای تعیین ژنوتیپ اصلی مقایسه شدند.

qPCRها و کنترلهای qPCR–پرایمرهای qPCR و پروب های TaqMan با استفاده از توالی های کروموزومی ذخیره شده سوشهای G. vaginalis ATCC ۱۴۰۱۹، ۰۰۷۰۳C۲mash، ۰۰۷۰۳Dmash و ۰۵-۴۰۹ با شماره های دسترسی GenBank مربوطه NC_۰۱۴۶۴۴، ADEU۰۱۰۰۰۰۰۰، ADEV۰۱۰۰۰۰۰۰ و NC_۰۱۳۷۲۱ طراحی گردیدند. الیگونوکلئوتیدها (جدول ۳) از شرکت Integrated DNA Technologies خریداری گردید. واکنش های انجام شده Multiplex TaqMan qPCR و نوع uniplex آنها در این مطالعه

در واکنش های ۲۵µl حاوی محلول ۱×PerfeCTa qPCR UNG SuperMix (شرکت Quanta BioSciences)، ۸۰۰ nm از هر پرایمر DNA ، ۱۰۰ nM از هر پروب TaqMan و ۲,۵µl از DNA انجام گردیدند. واکنش های qPCRهای نوع Uniplex SYBR Green در واکنش های ۲۵µl حاوی محلول ۱×PerfeCTa SYBR Green UNG SuperMix (شرکت Quanta BioSciences)، ۴۰۰ nm از هر پرایمر DNA و ۲,۵µl از DNA انجام گردیدند. پارامترهای cycling شامل ۴۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۵ دقیقه عملیات UNG ، ۹۵ درجه سانتیگراد برای ۳ دقیقه دناتوراسیون اولیه، ۴۰ دور دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتیگراد برای مدت ۱۵ ثانیه، و حرارت دهی به اضافه عملیات Extension در ۶۰ درجه سانتیگراد در ۶۰ درجه سانتیگراد برای ۴۵ ثانیه با کسب فلورسانس در پایان هر چرخه بودند. عملیات qPCR از نوع uniplex TaqMan با هدفگیری ژنهای ۱۶S rRNA و cpn۶۰ طبق توضیحات مقالات قبلی اجرا گردید. دستگاه MX۳۰۰P (شرکت Agilent Technologies) برای همه آزمایشات qPCR استفاده شدند.

پلاسمید کنترل سنتتیک با کلون سازی قطعات PCR ژن tuf در سویه G. vaginalis ATCC شماره ۱۴۰۱۸ (جدول ۱) ساخته شد که با پرایمرهای Gv_tuf_S۴ و Gv_tuf_AS۳ (جدول ۳) به ناقل pCR۲,۱ با استفاده از یک کیت کلونسازی TOPO TA (شرکت Life Technologies) تکثیر گردیدند. محلولهای پلاسمیدی از لحاظ غلظت DNA با استفاده از یک ابزار Nanodrop ۲۰۰۰ (شرکت Thermo Fisher Scientific) تست گردیدند که به طور سریالی رقیق گردیده و به عنوان استانداردهای کمّی در همه آزمایشات qPCR استفاده گردیدند. یک دامنه غلظت از ۰ تا $۱۰^{۷}$ به ازای هر واکنش برای تعیین LOD استفاده گردید. برای ارزیابی کمّی بارهای باکتریایی G. vaginalis در نمونه های بالینی، چهار غلظت پلاسمید کنترل tuf سنتتیک از ۱۰ ، $۱۰^{۳}$ ، $۱۰^{۵}$ و $۱۰^{۷}$ نسخه در هر µl به طور دوتایی در هشت qPCR جداگانه حاوی پرایمرهای Gv_tuf_S۴، Gv_tuf_AS۳ و TaqMan پروب Gv_tuf_TM۱ (جدول ۳) بکار بسته شدند.

آنالیز داده ها–نتایج qPCR با کمک نرم افزار MX۳۰۰P نسخه ۴,۱۰ تحلیل گردید. حساسیت تحلیلی و اختصاصی بودن تحلیلی بین سنجش ها با استفاده از نرم افزار InSat (شرکت GraphPad Software) نسخه ۳,۰۶ با استفاده از یک آنالیز جدول تصادفی دوطرفه و تست دقیق فیشر با فاصله اطمینان ۹۵ درصدی CI محاسبه گردیده است. تحلیل همبستگی با نرم افزار InSat انجام شد و تست همبستگی r پیرسون را بکار بست.

نرم افزار MEGALIGN نسخه ۶,۱ (شرکت DNASTAR) و ابزار جستجوی همترازسازی محلی پایه متعلق به مرکز ملی مبتنی بر وب برای اطلاعات بیوتکنولوژی (یا BLAST) برای همترازسازی DNA استفاده گردید.

G. vaginalis strain	Source/sample	Clade by qPCR	Biotype	Genotype	*tuf* qPCR	16S rRNA qPCR	*cpn60* qPCR
14018	ATCC	1	1	1	+	+	+
14019	ATCC	1	4	1	+	+	+
49145	ATCC	1	4	1	+	+	+
B472	ASRI*	1	1	1	+	+	+
B473	ASRI*	1	1	1	+	+	+
B474	ASRI*	1	1	1	+	+	+
B475	ASRI*	4	5	3	+	+	−
B476	ASRI*	4	5	3	+	+	−
B477	ASRI*	1	1	1	+	+	+
B478	ASRI*	1	4	ND	+	+	+
B479	ASRI*	3	5	3	+	+	+
B482	ASRI*	ND	5	4	+	+	−
B483	ASRI*	3	7	3	+	+	+
B512	ASRI*	3	7	3	+	+	+
B513	ASRI*	2	5	4	+	+	−
S0012	001	1	1	1	+	+	+
S0070	007	4	5	3	+	+	−
S0151	015	1	4	ND	+	+	+
S0154	015	4	5	3	+	+	−
S0191	019	1	ND	1	+	+	+
S0244	024	1	4	1	+	+	+
S0282	028	1	1	1	+	+	+
S0284	028	2	5	ND	+	+	−
S0380	038	4	5	ND	+	+	−
S0432	043	1	1	1	+	+	+
S0523	052	4	5	3	+	+	−
S0524	052	1	1	1	+	+	+
S0741	074†	1	4	1	+	+	+
S0762	076†	2	7	3	+	+	−
S0763	076†	1	1	1	+	+	+
S0771	077†	2	5	4	+	+	−
S0775	077†	4	5	3	+	+	−
S0822	082†	1	ND	1	+	+	+
S0835	083†	1	1	1	+	+	+
S0841	084†	2	7	3	+	+	−
S0853	085†	1	4	1	+	+	+
S0901	090†	2	7	3	+	+	−
S0903	090†	1	4	1	+	+	+
S0925	092†	1	4	1	+	+	+

جدول ۱ .

نتایج

ابداع و روایی سازی عمیات qPCR خص گونه ی G. vaginalis

با استفاده از توالی های ژنومی G. vaginalis ذخیره شده در بانک GenBank، ما در جستجوی ژنهای کروموزومی حفاظت شده در همه چهار دسته بودیم. در میان ژنهای انتخابی چندگونه شامل tuf و vly و GyrA و polB و gyrB و recA و سایر موارد، ژن tuf که کدگذاری کننده فاکتور طویل شدگی ترجمه Tu می باشد برای ابداع عملیات qPCR خاص گونه G. vaginalis انتخاب گردید. پرایمرهای qPCR و پروب های TaqMan با هدف توالی های tuf حفاظت شده در میان دستجات G. vaginalis و مجزای از گونه جنس

کاملا نزدیک بیفیدوباکتریوم توسط آنالیز BLAST طراحی گردیدند. پرایمرهای مختلف و ترکیبات پرایمر TaqMan در عملیات PCRمعمولی و qPCR با استفاده از DNA کروموزومی سوش ۱۴۰۱۸ ATCC نوع G. vaginalis به عنوان الگو تست گردیدند.

Microbial species	ATCC strain
Atopobium vaginae	BAA-55
Bacteroides ureolyticus	33387
Bifidobacterium angulatum	27535
Bifidobacterium animalis	25527
Bifidobacterium bifidum	29521
Bifidobacterium dentium	27534
Bifidobacterium longum	15707
Candida albicans	90028
Chlamydia trachomatis	VR-901B
Corynebacterium genitalium	33030
Cryptococcus neoformans	32045
Enterobacter aerogenes	13048
Enterococcus faecalis	700221
Enterococcus faecium	19434
Escherichia coli	11303
Klebsiella oxytoca	13182
Lactobacillus crispatus	33197
Lactobacillus gasseri	19992
Lactobacillus iners	55195
Lactobacillus jensenii	25258
Lactococcus lactis	19435
Leptotrichia buccalis	14201
Listeria monocytogenes	7644
Moraxella catarrhalis	25238
Mycoplasma hominis	15488
Neisseria gonorrhoeae	19424
Peptococcus niger	27731
Peptostreptococcus anaerobius	27337
Prevotella bivia	29303
Proteus mirabilis	29906
Pseudomonas aeruginosa	BAA427
Salmonella typhimurium	49416
Staphylococcus aureus	25923
Staphylococcus epidermidis	12228
Streptococcus agalactiae	A909
Streptococcus pyogenes	BAA595
Trichomonas vaginalis	30246
Ureaplasma urealyticum	27618

جدول ۲ .

معیارهای رد عملیات شامل اختصاصی بودن PCR، کارایی تکثیر، خروجی فلورسنتی و تشکیل دایمر پرایمر بوده است. پرایمرهای Gv_tuf_S۴ و Gv_tuf_AS۳ و پروب TaqMan با نشانگذاری فلورسنت از نوع Gv_tuf_TM۱ بهترین عملکرد را نشان داده اند (جدول ۳).

عملیات qPCR خاص گونه ی G. vaginalis از لحاظ واکنش بینابینی، صحت، LOD و کارایی PCR تست گردید. DNA کروموزومی انسان به اضافه DNA کروموزومی استخراجی از دو مجموعه میکروارگانیسم در غلظت های ۲۵ng در هر واکنش برای تعیین واکنش بینابینی استفاده گردید: ۱۵ سوش G. vaginalis متشکل از ۳

سویه ATCC و ۱۲ سویه که قبلا توضیح داده شد (جدول ۱)، و تعداد ۳۸ سوش گونه های باکتریایی، قارچی و پروتوزوا (جدول ۲) که بومی محیط واژن بوده اند. هیچ واکنش بینابینی برای عملیات qPCR ی G. vaginalis با هدفگیری tuf علیه همه گونه های تست شده نشان داده نشد. همه ۱۵ عملیات qPCR حاوی DNAی G. vaginalis باعث تولید سیگنالهای مثبت با امتیازات حداستانه چرخه مشابه Ct شده اند. برای تعیین صحت، محصولات تکثیر ژن tuf که از عملیات PCR با استفاده از DNA ۱۴۰۱۸ ATCC ی G. vaginalis به عنوان الگو ایجاد شده بودند و پرایمرهای Gv_tuf_S۴ و Gv_tuf_AS۳ به پلاسمید pCR۲,۱ کلونسازی و تعیین توالی گردید. پلاسمید tuf شاهد تعیین کمیت گردید و سریالی رقیق شد و برای تعیین کارایی تکثیر qPCR و LOD با استفاده از دامنه غلظت الگوی صفر تا 10^7 نسخه در هر واکنش استفاده گردید. پایین ترین غلظت که تحت آن سنجش نشان دهنده ۱۰۰ درصد مثبت بودن در سه عملیات qPCR بوده است برابر با ۱۰ نسخه در هر واکنش بوده است که LOD درنظر گرفته شد. کارایی تکثیر E برابر با ۱۱۰,۴٪ و ضریب تعیین R۲ برابر با ۰,۹۹۹ بوده و رگرسیون خطی هم $y=-3.096\log x+37.86$ بوده است.

حساسیت و اختصاصی بودن بین سنجش در عملیات qPCR خاص گونه در G. vaginalis توسط تحلیل تطبیقی ۶۰ نمونه DNA استخراجی از نمونه های سواب واژینال بالینی کشت نشده تعیین گردید. دو سنجش qPCR توضیح داده شده قبلی با هدفگیری ژنهای ۱۶S rRNA در G. vaginalis و cpn۶۰ در این آزمایش استفاده گردیده است. از ۶۰ نمونه تست شده، تعداد ۵۹ تست برای G. vaginalis بنا به عملیات qPCR از نوع tuf توضیح داده شده در این مقاله مثبت بودند، ۵۸ نمونه با عملیات ۱۶S rRNA qPCR مثبت بودند و ۴۴ نمونه با عملیات cpn۶۰ qPCR مثبت بودند. حساسیت بین سنجش و اختصاصی بودن بین سنجش طبق ۱۶S rRNA qPCR به شکل صددرصد (95 % CI 0.938 to 1.00) و ۵۰ درصد (95 % CI 0.013 to 0.987) به ترتیب محاسبه گردید. حساسیت و اختصاصی بودن بین سنجش طبق روش Cpn۶۰ qPCR به اندازه ۱۰۰ درصد (95 % CI 0.920 to 1.00) و ۶ درصد (95 % CI 0.002 to 0.302) به ترتیب محاسبه گردید. نتایج برای سه qPCR استفاده شده برای تعیین حساسیت و اختصاصی بودن در جدول ۴ نشان داده شده است. ارزیابی کمی DNAی گونه G. vaginalis با عملیات tuf qPCR یک دامنه وسیعی از غلظت ها را از نسخه

های منفرد تا حدود 10^7کپی ژنوم μl^{-1}را در نمونه های DNA استخراجی اشکار کرده است. غلظت های میانه در نمونه های BV منفی و BV مثبت بنا به تعریف معیارهای Amsel برابر با به ترتیب 1.9×10^4 و 1.6×10^7 copies μl^{-1}بوده است. وقتی سه گروه نمونه طبق امتیازات ۳-۰ و ۶-۴ و ۱۰-۷ تقسیم بندی گردید، غلظت های DNA میانه G. vaginalis مربوطه به ترتیب برابر با 2.0×10^3 و 2.4×10^6و 1.7×10^7 کپی ژنوم μl^{-1} بوده است. نتایج کمی بارهای باکتریایی در نمونه های بالینی در شکل ۱ خلاصه سازی شده است.

برای تایید اختصاصی بودن گونه عملیات qPCR از نوع tuf ایجاد شده برای G. vaginalis، ما یک کسر بزرگتری از ژن tuf را با استفاده از پرایمرهای Gv_tuf_S۶ و Gv_tuf_AS۷ (جدول ۳) تکثیر کرده ایم. همان نمونه های DNA از نمونه های سواب واژینال بالینی کشت نشده در آزمایشات حساسیت و اختصاصی بودن بین سنجشی استفاده گردیده بود به عنوان الگو بکار گرفته شد. قطعات PCR نتیجه شده با استفاده از پرایمر فوروارد Gv_tuf_S۶ تعیین توالی گردید. آنالیز BLAST شباهت ۹۵ الی ۱۰۰ درصدی را با توالی های ژن tuf در G. vaginalis ذخیره سازی شده آشکار کرده است. هویت کمتر از صددرصد به دلیل ناهمگنی توالی مربوط به تنوع خاص دسته درون ژن tuf بوده است (داده ها نشان داده نشده است).

G. vaginalis clade	Primer/probe	Sequence	Amplicon (bp)	Gene	Protein	Database ID
1, 2, 3, 4	Gv_tuf_S4	5′-TCCCAACCCCAACTCACGATCTT-3′	149	*tuf*	Translation elongation factor Tu	GI:311114364
	Gv_tuf_AS3	5′-RCGCAAACCAACRATCTCAACTGG-3′				
	Gv_tuf_TM1	5′-FAM-CCATCTCCGGTCGTGGTACCGTTG-BHQ1-3′				
	Gv_tuf_S6	5′-GAGGGCTCGCTGACCTACCG-3′	344			
	Gv_tuf_AS7	5′-GGCACTCGCACACACCAAGG-3′				
1	**Gv1_fuc1_S**	5′-CCAGTCATAAGTTTGCGTTTTACC-3′	139	*fuc1*	Putative α-L-fucosidase	GI:311113989
	Gv1_fuc1_AS	5′-TGGCACTGGCAAAGTTTACAAC-3′				
	Gv1_fuc1_TM	5′-FAM-CTCGCCGCAAGCACCATCAAGCCA-BHQ1-3′				
	Gv1_galK_S	5′-TTCTAGATTATTCGCCGCCAAATC-3′	108	*galK*	Galactokinase	GI:311115066
	Gv1_galK_AS	5′-TTGCGATGTGTTGAAGGTAATGC-3′				
2	**Gv2_hyp_S**	5′-GCAAAGCAGACTGAGCGTATTAG-3′	124	ND	Hypothetical protein	GI:388060098
	Gv2_hyp_AS	5′-GTAATAATCAGGCTCCTCATCGC-3′				
	Gv2_hyp_TM	5′-5MAXN-CGCAGGCGCTCGCATAACAGTGCA-BHQ1-3′				
	Gv2_cel_S	5′-GCTTGGGGTTCATATGGTGATGG-3′	137	ND	Cellulosome anchoring protein	GI:388059846
	Gv2_cel_AS	5′-TCTTTATCAGACACGCCCTTAGC-3′				
3	**Gv3_thi_S**	5′-TTCTGCTTCTTCTGCTATTTGCTG-3′	142	ND	Thioredoxin	GI:388062216
	Gv3_thi_AS	5′-TTCGTTGACTTTTGGGCAACATG-3′				
	Gv3_thi_TM	5′-ROXN-CGGTCCGTGCCGTTCATTTGGTCC-3BHQ2-3′				
	Gv3_a-b_S	5′-TGATTACGCTCACGCTCTCG-3′	149	ND	α/β Hydrolase fold protein	GI:388063058
	Gv3_a-b_AS	5′-CGGCAACAGCTTTAGGAAGAAG-3′				
4	**Gv4_cic_S**	5′-CCTACGCAAGCTCCAGACGAC-3′	74	ND	Chloride transporter, CIC family	GI:283783343
	Gv4_cic_AS	5′-ACAAGTTGCACTCTTCGAGCTGG-3′				
	Gv4_cic_TM	5′-Cy5-ACTCGGCTGAAGCACACCACCACT-BHQ2-3′				
	Gv4_all_S	5′-CACGCTGGCACAACAATGATG-3′	139	ND	Allantoate amidohydrolase	GI:283783238
	Gv4_all_AS	5′-TTGGAACTACGCTGATTCTACCG-3′				

جدول ۳ .

جدول ۴ .

Sample	Nugent score	Amsel criteria	*tuf* qPCR C_t	16S rRNA qPCR C_t	*cpn60* qPCR C_t	Clade by qPCR
001	10	4	14.9	16.3	16.1	1, 3, 4
002	0	0	35.3	37.3	35.5	1
003	8	4	13.4	16.8	17.9	1, 2, 4
004	0	0	35.5	39.0	–	4
005	10	4	13.1	15.9	18.3	1, 4
006	0	0	25.4	25.4	28.5	1, 4
007	1	1	23.5	25.9	–	4
008	8	4	13.4	16.6	17.6	1, 4
009	4	0	29.6	32.4	35.9	4
010	0	1	27.1	29.1	32.0	1, 4
011	3	0	25.0	28.2	26.0	1
012	8	4	13.0	16.0	–	4
013	8	3	15.0	18.9	15.7	1, 4
014	6	0	14.4	17.4	21.5	2, 4
015	10	4	14.8	17.1	17.1	1, 3, 4
016	2	0	14.4	17.2	–	2, 4
017	0	0	35.0	35.6	–	4
018	8	4	14.1	16.9	19.8	2, 4
019	10	4	14.2	16.1	18.6	1, 3, 4
020	10	4	15.0	16.7	16.0	3, 4
021	7	4	13.1	16.5	14.0	1
022	8	4	15.1	17.3	19.2	1, 3, 4
023	0	0	23.8	23.8	23.6	1, 3, 4
024	10	4	15.6	17.3	18.5	3, 4
025	ND	0	19.4	22.3	24.8	1, 2, 4
026	8	4	14.0	15.8	16.1	1, 3, 4
027	4	0	20.0	22.6	25.3	3, 4
028	4	0	16.2	19.7	17.9	1, 2, 3, 4
029	0	0	24.6	27.0	25.4	1, 3
030	2	1	29.5	37.7	–	4
031	4	1	16.7	19.6	21.2	1, 4
032	0	0	26.5	31.8	–	4
033	0	0	–	–	–	–
034	0	0	26.1	28.6	–	4
035	0	0	36.1	39.3	–	4
036	10	4	16.1	18.3	17.8	1, 3
037	0	0	36.1	39.3	–	4
038	0	0	21.1	23.5	–	2, 4
039	0	0	20.9	23.5	26.6	3, 4
040	10	4	17.5	19.5	24.2	2, 4
041	7	4	15.7	17.0	17.7	3, 4
042	4	1	19.7	23.3	–	2, 4
043	7	4	14.9	18.8	15.8	1, 2, 4
044	3	0	30.9	32.9	–	4
045	10	4	15.4	18.1	18.9	1, 4
046	5	4	17.8	20.8	20.4	2, 3
047	0	0	29.3	29.7	30.6	3, 4
048	0	0	18.1	20.8	–	4
049	4	3	15.4	18.2	18.0	1, 3
050	8	4	14.3	16.8	19.4	1, 4
051	0	1	32.0	34.5	32.4	1
052	7	3	13.6	16.6	16.0	1, 3, 4
053	4	0	14.7	18.2	15.8	1, 4

Sample	Nugent score	Amsel criteria	*tuf* qPCR C_t	16S rRNA qPCR C_t	*cpn60* qPCR C_t	Clade by qPCR
054	4	1	17.3	20.0	21.0	2, 3
055	4	1	15.2	19.2	16.5	1, 4
056	7	4	13.6	16.8	15.5	1, 2, 4
057	4	0	37.6	–	–	4
058	0	0	30.8	33.0	35.5	1, 4
059	6	0	17.1	19.8	24.5	1, 2, 4
060	0	0	18.7	20.4	20.2	1, 2, 4

جدول ۵ .

از اینرو آنالیز توالی تاییدکننده اختصاصی بودن qPCR خاص گونه ی G. vaginalis ابداعی است و نیز نشان دهنده وجود دستجات G. vaginalis چندگانه در ۱۵ تا از ۲۱ نمونه سواب واژینال آنالیز شده بوده است.

ایجاد qPCR و روایی سازی خاص دسته از نوع Multiplex در G. vaginalis

یک مجموعه با هشت ژن خاص دسته G. vaginalis منحصر به فرد در یک مطالعه تعیین توالی قبلی شناسایی شده بود برای ایجاد qPCR خاص دسته multiplex استفاده گردید. نشانگرهای ژنتیکی، پروتئین های مربوطه

و شماره شناسایی پایگاه داده در جدول ۳ آمده است. اختصاصی بودن هشت جفت پرایمر به چهار دسته G. vaginalis با آنالیز BLAST و در آزمایشات qPCR از نوع SYBR Green با استفاده از نمونه های DNA کروموزومی از ۱۲ سویه های G. vaginalis مشخصه قبلی نمایانگر هر چهار دسته تایید گردید. همه هشت هدف ژنتیکی نشان داده شد که برای دستجات مربوطه ویژه بوده و یک استثنا وجود داشته است که سویه B۴۸۲ی G. vaginalis بوده است که قبلا تحت عنوان دسته ۲ شناسایی شده است و هیچ سیگنالی را در هیچ یک از روشهای SYBR Green qPCR (جدول ۱) تولید نکرده است. در ازمایشات واکنش بینابینی ، تکثیر غیراختصاصی برای پرایمرهای Gv۴_all_S و Gv۴_all_AS با هداف ژن کدگذاری کننده آمیدوهیدرولاز آلانتوآت فرضی مشاهده گردید، وقتی DNA از گونه های بیفیدوباکتریوم به عنوان یک الگو استفاده گردید (جدول ۲). براساس نتایج واکنش بینابینی و اختصاصی بودن تکثیر، ما چهار جفت پرایمر خاص دسته از هشت تا را برای آنالیز بیشتر انتخاب کرده ایم.

چهار پروب TaqMan نشاندار فلورسنت برای هدفگیری آمپلی کونهای ایجاد شده با پرایمرهای ویژه دسته طراحی شدند (جدول ۳). qPCR از نوع Multiplex نتیجه شده هشت پرایمر و چهار پروب را برای چهار ژن خاص دسته کدگذاری کننده یک آلفا-ال-فوکوزیداز فرضی (دسته ۱)، یک پروتئین فرضیه ای (دسته ۲)، تیوردوکسین (دسته ۳) و یک ناقل کلرید (دسته ۴) ترکیب کرده است. آزمایشات واکنش بینابینی، حساسیت بین سنجش و اختصاصی بودن به صورت شرح داده شده برای qPCR خاص گونه G. vaginalis انجام شد. هیچ واکنش بینابینی برای DNA انسانی یا گونه های باکتریال، پروتوزوآ، و قارچی در جدول ۲ شناسایی نشده است. هماهنگی صددرصد بین qPCR از نوع multiplex خاص دسته و qPCR ی tuf خاص گونه وجود داشته است: دستجات G. vaginalis در انواع مختلف ترکیبات در ۵۹ نفر از ۶۰ نفر نمونه DNA با سواب واژینال آنالیز شده، شناسایی گردید. نمونه شماره ۰۳۳ در هر دو qPCRها منفی بوده است. حساسیت و اختصاصی بودن بین سنجش از اینرو به شکل صددرصد تعیین شده است. توزیع دسته G. vaginalis در ۶۰ نمونه واژینال در جدول ۴ نشان داده شده است.

شکل ۱ .

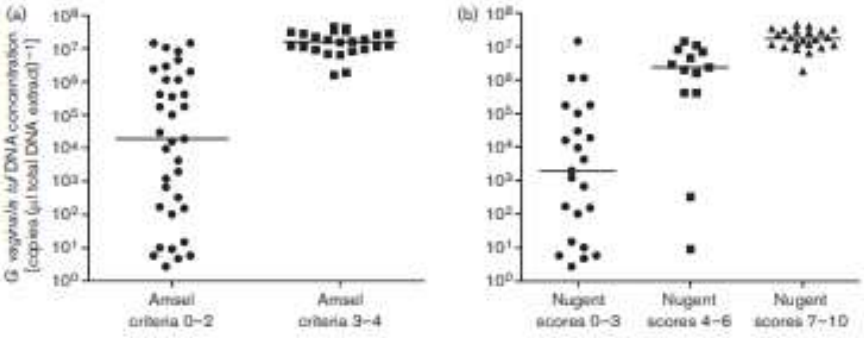

Table 5. Association between *G. vaginalis* clades in 60 vaginal-swab specimens and BV diagnoses by Nugent scores and Amsel criteria

The association analysis was performed using the Pearson *r* correlation test; *r* values greater than 0.25 indicative of positive association and lower than −0.25 indicative of negative association are in bold.

Clade	Clade 1 (n=32)	Clade 2 (n=15)	Clade 3 (n=19)	Clade 4 (n=50)	Nugent scores 0–3 (n=24)	Nugent scores 4–6 (n=13)	Nugent scores 7–10 (n=22)	Amsel criteria ⩾3 (n=24)
Single clade (n=17)	**−0.376**	**−0.363**	**−0.428**	−0.116	**0.468**	−0.151	**−0.325**	**−0.362**
Two or more clades (n=42)	**0.408**	**0.378**	**0.446**	0.195	**−0.505**	0.168	**0.347**	**0.386**
Clade 1 (n=32)		−0.077	0.062	−0.149	**−0.259**	−0.076	**0.296**	**0.286**
Clade 2 (n=15)			−0.145	0.052	−0.236	**0.257**	−0.040	0.000
Clade 3 (n=19)				−0.176	**−0.263**	0.077	0.226	**0.322**
Clade 4 (n=50)					−0.091	−0.090	0.155	0.000

برای تعیین تداخل، ما نمونه های DNA کروموزومی را از چهار سوش G. vaginalis که قبلا توضیح داده شده است یعنی سوش B۴۷۲ (دسته ۱)، سوش B۵۱۳ (دسته ۲)، سوش B۴۸۳ (دسته ۳)، و سوش B۴۷۵ (دسته ۴) استفاده کرده ایم. عصاره DNA در ترکیبات مختلف دو و سه یا هر چهار دسته همراه با غلظت های ۱۰ ng در هر عملیات PCR ترکیب شد و به شکل الگو برای تکثیر استفاده گردید. هیچ گونه تداخلی میان شناسایی دستجات مختلف مشاهده نگردید. صحت qPCR خاص دسته multiplex با یک مقایسه نتایج qPCR با داده های تعیین توالی DNAی tuf تعیین گردید که برای ۲۱ نمونه سواب واژینال طی روایی سازی qPCR خاص گونه تولید شده بود. آنالیز تعیین توالی DNAی tuf نشان داده است که همه نمونه های توالی مربوط به فراوان ترین دستجات G. vaginalis شناسایی شده توسط پایین ترین امتیازات Ct در qPCRهای خاص دسته می باشد.

جداسازی و تعیین نوع سوش بالینی G. vaginalis

برای تایید نتایج qPCR از نوع multiplex خاص دسته و نشان دادن عفونت های G. Vaginalis چنددسته ای، ما کشت های باکتریال را از نمونه های واژنی جداسازی کرده ایم. نه نمونه که با معیارهای Amsel و امتیازات Nugent مشخص شده است، و نه نمونه مشخص نشده که در جدول ۱ آمده است مورد استفاده قرار گرفت. بیش از ۸۰ سویه اولیه به طور پیش فرض تحت عنوان G. vaginalis بوسیله بتاهمولیز خون انسان

شناسایی گردید و میکروسکوپ گرم مثبت با qPCRهای خاص گونه و خاص دسته تست گردید. براساس نتایج qPCR ، ما یک سوش G. vaginalis را در هر دسته به ازای هر نمونه سواب انتخاب کرده ایم که منجر به ۲۴ سویه مستقل آمده در جدول ۱ شده است. اغلب سوشهای بالینی جداسازی شده متعلق به دسته ۱ (تعداد ۱۴) می باشد. سوشهای دسته ۲ (تعداد ۵) و دسته ۴ (تعداد ۵) به فراوانی کمتری جداسازی شدند. ما هیچ سوش دسته ۳ را در میان سویه های بالینی G. vaginalis پیدا نکردیم.

با یک استثنای منفرد، اختصاصی بودن دسته سویه های G. vaginalis با نتایج سنجش qPCR خاص دسته مولتی پلکس که روی کل نمونه DNA استخراجی از نمونه های واژینال غیرکشت شده انجام گرفته بود، منطبق بوده است. سوش S۰۲۴۴ گونه G. vaginalis که تحت عنوان دسته ۱ تعیین نوع شده است از نمونه شماره ۰۲۴ جداسازی شده است، که حاوی دسته ۳ و دسته ۴ طبق qPCR می باشد. همه سویه های دیگر G. vaginalis از نمونه های واژینال مشخص شده متعلق به دستجات شناسایی شده در سواب های واژینال مربوطه توسط qPCR بوده و در جدول ۴ آمده است. یک نمونه به شماره ۰۰۷ یک دسته ۴ از G. vaginalis منفرد را طبق qPCR مخصوص دسته در خود داشته است، یک سوش S۰۰۷۰ را از همان دسته بدست داد. سویه های G. vaginalis از دو دسته مختلف از نمونه های مشخصه سازی شده شماره ۰,۱۵ و ۰۲۸ و ۰۵۲ و نمونه های مشخص نشده ۰۷۶ و ۰۷۷ و ۰۹۰ جداسازی شده است، بنابراین نتایج qPCR را تایید کرده و نشان دهنده وجود دستجات G. vaginalis چندتایی در میکروفلور واژینال می باشد.

۲۴ سوش G. vaginalis جداسازی شده درون این مطالعه با سه سویه ATCC و دوازده سوش G. vaginalis که قبلا توضیح داده شد، ترکیب شد و در معرض بیوتایپینگ فنوتیپی و ژنوتایپینگ توسط ARDRA قرار گرفت. تنها چهار بیوتیپ یعنی ۱ و ۴ و ۵ و ۷ در میان ۳۹ سوش G. vaginalis تحلیل شده یافت گردید. رابطه محکمی میان دستجات و بیوتایپ G. vaginalis وجود دارد. ۲۰ سوش دسته اول تحت عنوان بیوتایپ ۱ یا ۴ تعیین نوع شده اند. دو سوش از دسته ۱ شامل S۰۱۹۱ و S۰۸۲۲ به دلیل رشد ضعیف روی آگار زرده تخم مرغ تعیین بیوتایپ نگردید. سویه های دسته ۲ (تعداد ۶) به عنوان بیوتایپ شماره ۵ یا ۷ شناسایی گردید. سوشهای دسته ۳ (تعداد ۳) نیز تحت عنوان بیوتایپ شماره ۵ یا ۷ شناسایی شده است. هفت سویه دسته ۴ متعلق به بیوتایپ ۵ می باشد. سنجش ARDRA تنها سه ژنوتیپ را نشان داده است: ژنوتیپ ۱، ژنوتیپ ۳ و ژنوتیپ ۴. ما

ژنوتیپ ۲ را در میان ۳۹ سویه آنالیز شده G. vaginalis ندیده ایم. مشابه با روش بیوتایپینگ، ما یک همبستگی را میان دستجات G. vaginalis و ژنوتیپ های آن مشاهده کردیم. بیست سوش دسته ۱ متعلق به ژنوتیپ ۱ بوده است. پنج سویه دسته ۲ متعلق به یا ژنوتیپ ۳ یا ژنوتیپ ۴ بوده است. سه سوش دسته ۳ تحت عنوان ژنوتیپ ۳ شناسایی شده است. شش سویه دسته ۴ نیز تحت عنوان ژنوتیپ ۳ شناسایی گردیدند. سوشهای B۴۷۸ از G. vaginalis (دسته ۱)، سوش S۰۱۵۱ (دسته ۱)، S۰۲۸۴ (دسته ۲) و S۰۳۸۰ (دسته ۴) ایجاد الگوهای قطعه ای محدودیت مبهم حدواسط بین ژنوتیپ ۱ و ژنوتیپ ۳ کرده است (جدول ۱).

رابطه دستجات G. vaginalis با بیماری BV

توزیع دستجات G. vaginalis در ۶۰ نمونه سواب واژینال که مشخصه اش qPCR خاص دسته از نوع multiplex شرح داده شده می باشد، با تشخیص های BV بیمار براساس علائم بالینی BV یا ارزیابی میکروبیولوژیکی معمول (جدول ۴) مقایسه گردید. تفاوتهای قابل ذکری بین چهار دسته و روابط آنها با BV وجود دارد (جدول ۵). دستجات ۱ و ۳ هر دو در ارتباط منفی با فلور میکروبی طبیعی واژن قرار گرفتند که توسط امتیازات Nugent به اندازه صفر تا ۳ تعریف شده است و به طور مثبت با امتیازات بالای Nugent به اندازه ۷ الی ۱۰ و معیارهای بالای Amsel در ارتباط بودند. وجود دسته دوم G. vaginalis به طور منفی با میکروفلور طبیعی مشخصه با امتیازات Nugent به اندازه ۳-۰ مرتبط بوده و به طور مثبت با میکروفلور حدواسط با امتیازات Nugent به اندازه ۴ الی ۶ مرتبط بوده است. ولیکن، هیچ همبستگی بین دسته ۲ و هیچ یک از علائم BV یا امتیازات Nugent برابر با ۷ الی ۱۰ وجود ندارد. هیچ رابطه ای بین دسته ۴ و BV تعریف شده توسط معیارهای Amsel و یا امتیازات Nugent وجود ندارد. ما تعداد ۵۹ نمونه واژن مثبت G. vaginalis را طبق تعداد دستجات G. vaginalis شناسایی شده به دو گروه تقسیم بندی کردیم: یک گروه با یک دسته منفرد حاضر (تعداد برابر با ۱۷) و یک گروه با دو یا چند دستجات مختلف بیشتر (تعداد ۴۲). یک تفاوت اساسی در رابطه با این دو گروه مبتلا به BV وجود داشت. حضور دسته منفرد G. vaginalis (یا دسته ۱ یا دسته ۴) به طور منفی با بیماری BV بنا به تعریف امتیاز Nugent و یا معیارهای Amsel و به طور مثبت با میکروفلور واژینال طبیعی با امتیاز Nugent از صفر تا ۳ مرتبط بوده است. برعکس، جمعیت G. vaginalis

چند دسته ای به طور مثبتی با علائم BV بالینی و میکروفلور غیرطبیعی با امتیازات Nugent برابر با ۱۰-۷ و به طور منفی با امتیازات Nugent از ۰ تا ۳ مرتبط بوده است.

بحث

علی رغم اینکه G. vaginalis اولین میکروارگانیسم مرتبط با BV توسط Gardner و Dukes بوده است، همچنان ضدونقیض ترین گونه است و خصوصیات مجزای فنوتیپی و ژنوتیپی و نیز نقش مبهمی در آسیب شناسی BV دارد. ماهیت مبهم این گونه ها از مشخصات خیلی پایه آن مانند رنگ امیزی گرم شروع می شود. این باکتری که از لحاظ مشخصه اولتراساختاری اش و ترکیب شیمیایی آن به شکل گرم مثبت می باشد، دارای دیواره سلولی است که نمی تواند کریستال ویوله را طی عملیات رنگ امیزی گرم معمولی نگه دارد که باعث می شود سلولهای باکتری تحت عنوان گرم مثبت و گرم منفی بسته به شرایط رشد مانند محیط کشت استفاده شده و فاز رشد شناسایی بشوند. متغیرپذیری بزرگ فنوتیپی مشاهده شده میان سویه های G. vaginalis برای تعیین نوع اپیدمیولوژیکی این گونه ها استفاده شده است که منجر به هشت زیست نمونه براساس بتاگالاکتوزیداز، لیپاز و واکنش های هیدرولیز هیپورات می شود. ولی هیچ کدام از زیست نوع ها به طور قابل اتکایی با بیماری BV همراه نبوده است. عمیق ترین تفاوتهای میان سوشهای بالینی G. vaginalis تنها همین اواخر با استفاده از روش تعیین توالی ژنومی تطبیقی کشف گردیده است. میزان تنوع میان ژنوم های ۱۷ سویه G. vaginalis متشکل از چهار دسته مجزا که توسط Ahmed و همکارانش شرح داده شده است به طرز عجیبی بالا و دور از آنی است که در سایر گونه های باکتریایی مشاهده شده است که بحث قوی را برای جداسازی این چهار دسته به گونه های منفرد فراهم ساخته است.

در این کار، ما درباره ابداع و روایی سازی سنجش تعیین ژنوتیپ qPCR جدید که قادر به شناسایی و کمیت سنجی G. vaginalis می باشد، توضیحاتی داده ایم و تعیین نوع چهار زیرنوع مجزا یا دسته مجزا در مقاله دیگری با تحلیل ژنومی آشکار شده است. روش مطرح شده یک تعداد کمبودهای روشهای تعیین نوع جدید را مطرح کرده است. شمای تعیین نوع فنوتیپی مطرح شده توسط Piot و همکارانش در سال ۱۹۸۴ براساس واکنش های انزیمی است که کمبودهای آن می تواند تا حد معنی داری بستگی به شرایط داشته باشد. برای نمونه هیپورات هیدرولیز حساس به pH است و در یک pH بالاتر از ۶,۴ نادرست است، درصورتیکه صحت

واکنش لیپازی تا حد زیادی بستگی به سوبسترا استفاده شده با زیست نوع های بی شمار تولید کننده ۴-متیلوم بلی فریل اولئات به نحو فراوان دارد. روش تعیین ژنوتیپ ARDRA که توسط Ingianni و همکارانش ابداع گردید کمتر مستعد خطا می باشد. هر دو روش نیازمند جداسازی کشت های خالص G. vaginalis می باشند. جداسازی ترجیحی سوشهای یک زیست نوع خاص یا ژنوتیپ خاص با درنظرگیری تفاوتها در قابلیت های متابولیکی آنها امکانپذیر است، که به نوبه خود می تواند سوگیری را در یک ارزیابی از توزیع زیرنمونه G. vaginalis در نمونه های بالینی وارد سازد. محدودیت های تکنیک های تعیین نوع کنونی می تواند دست کم تا اندازه ای توضیح دهنده عدم تطابق در فراوانی های زیست نوع های G. vaginalis در میان مطالعات مختلف و نتایج ضدونقیض رابطه های زیست نوع های خاص با بیماری BV باشد. تعیین نوع دسته توسط روش qPCR که در اینجا مطرح گردید نیازی به کشت ندارد و از اینرو می تواند در نمونه های بالینی کشت نشده بکار گرفته شود که امکان ارزیابی کمّی بارهای باکتری و شناسایی کیفی دستجات G. vaginalis را در یک نمونه معین بدست می دهد. بعلاوه، چون هیچ جداسازی سلولهای باکتریایی زنده در کار نیست، این سنجش می تواند در انواع نمونه ها از جمله DNAهای بایگانی شده یا نمونه های واژنی جمع آوری شده و ذخیره سازی شده در شرایط نیمه بهینه انجام گیرد.

ارزیابی کمّی G. vaginalis در نمونه های واژن توسط عملیات qPCR بنا به اثبات برای تشخیص مولکولی BV مهم بوده است. ولیکن، کشف اخیر یک سطح بالای تنوع پذیری ژنتیکی در میان دستجات G. vaginalis، باعث مطرح سازی سوال اختصاصی بودن چنین سنجشهایی می شود. همانگونه که طی فرایند روایی سازی نشان داده شد، عملیات cpn۶۰ qPCR خاص گونه G. vaginalis شرح داده شده قبلی برای تعیین حساسیت و اختصاصی بودن بین سنجش قادر به شناسایی تنها دو تا از چهار دسته اکنون تشخیص داده شده G. vaginalis بوده اند که شامل دسته ۱ و دسته ۳ می باشند (جدول ۱)، که طبق ناهمگنی توالی cpn۶۰ در میان دسته ها توضیح داده شده است. در غربالگری ۶۰ نمونه واژینال عملیات cpn۶۰ qPCR تولید نتایج کاذب منفی برای تعدادی نمونه های مستقر در دسته ۲ و ۴ G. vaginalis کرده است (جدول ۴). سنجش مبتنی بر ژن tuf که در اینجا توضیح داده شد، و عملیات دیگر خاص گونه ۱۶S rRNA qPCR که در مقاله دیگری توضیح داده شد، توالی های حفاظت شده این ژنها را هدف گرفته است و خاص هر چهار دسته بوده است. در

میان ژنهای خانگی متعدد تست شده در این مطالعه و استفاده شده به عنوان نشانگرهای ژنتیکی حفاظت شده در سایر مطالعات فیلوژنتیکی مولکولی باکتریال، ژن Tuf بالاترین میزان همولوگی را میان دستجات G. vaginalis نشان داده است. مشابه با سایر مطالعات روی انواع مختلف گروه های تاکسونومیکی باکتریال، شامل جنس خیلی نزدیک بیفیدوباکتریوم، فایده Tuf برای شناسایی G. vaginalis خاص گونه در این کار نشان داده شد. چون تنها یک نسخه از ژن کدگذاری کننده Tuی عامل طویل سازی ترجمه در هر ژنوم G. vaginalis وجود دارد، Tuf یک هدف مناسب تر برای ارزیابی کمی بارهای باکتریال بوسیله qPCR در مقایسه با ژن ۱۶S rRNA می باشد که برایش تعداد نسخه در هر ژنوم تا حد زیادی در میان گونه های باکتریال متغیر است.

یکی از یافته های غیرمعمول مشاهده شده طی روایی سازی سنجش میزان مثبت بودن خیلی بالای G. vaginalis در زنان سالم بدون نشانه بالینی از بیماری BV می باشد. از ۳۶ نمونه واژینال آنالیز شده BV منفی، حدود ۳۵ (۹۷ درصد) با عملیات tuf qPCR مثبت بودند، ۳۵ (۹۷ درصد) با عملیات tuf qPCR مثبت بودند و ۳۴ (۹۴٪) با عملیات ۱۶S rRNA qPCR مثبت بودند (جدول ۴). شیوع بالای G. vaginalis که به ۱۰۰ درصد در بیماران مبتلا به BV می رسد یک پدیده شناخته شده است که به تایید این مطالعه و سایر مطالعات رسیده است. ولی فراوانی گزارش شده G. vaginalis در میان زنان سالم به طور معنی داری پایین تر بوده است (حدود ۴۷ الی ۸۵ درصد شامل ۶۲,۵٪ مثبت در بیماران بعد از درمان با عملیات ۱۶S rRNA qPCR که توسط Fredricks و همکارانش توضیح داده شده است.) میزان شیوع بالاتر G. vaginalis می تواند با کوهورت بیماران ثبت نامی برای این مطالعه توضیح داده شود. تشخیص BV در زمان پذیرش در بیمارستان براساس معیارهای Amsel یا امتیازات Nugent انجام گرفته است. مراحل قبلی غیرمستند بیماری BV ممکن است به عفونت های G. vaginalis نسبت داده شود. توضیح احتمالی دیگر ممکن است همتراز با یک کارایی استخراج DNA تقویت شده باشد. پیش درمانی نمونه های بالینی با پروتئیناز K و هموژنیزاسیون مکانیکی می تواند منجر به لیز سلولی کارامدتر و استخراج DNA بهتر بشود، از اینرو باعث بهبود شناسایی سطوح پایین میکروارگانیسم بشود. ارزیابی کمی بارهای G. vaginalis در نمونه های واژینال (شکل ۱) نشان دهنده غلظت های پایین تر و متغیرتر DNAی پاتوژن در نمونه های غیرBV مشابه با رابطه وابسته به دوز گزارش شده توسط سایر محققان بود.

تکنیک تازه سنجش تعیین نوع G. vaginalis مبتنی بر عملیات qPCR که در این مقاله توضیح داده شده است براساس تقسیم بندی این گونه بین چهار دسته مجزای ژنتیکی مطرح شده توسط Ahmed و همکارانش در سال ۲۰۱۲ می باشد. در مطالعه تازه شان، این نویسندگان یک ژنوم هسته ای G. vaginalis را شامل تنها ۷۴۶ ژن مشترک بین ۱۷ سوش و مجموعه هایی از ژنهای خاص دسته توزیع شده روشن کرده اند. در مقاله مان، فایده اهداف ژنتیکی حفاظت شده آنالیز شده را برای تعیین نوع سویه های G. vaginalis بالینی تایید کرده ایم. اثبات شده است که ژنهای هدفگیری عملیات qPCR لوله منفرد Multiplex ابداعی که الفا-ال-فوکوزیداز فرضی، یک پروتئین فرضیه ای، تیوردوکسین، و ناقل کلریدی خانواده ClC را کدگذاری می کنند (جدول ۳) خاص دسته می باشند و قادر به تعیین نوع سوش و شناسایی چهار دسته G. vaginalis در نمونه های واژینال بالینی کشت نشده هستند. به استثنای یکی، ۳۹ سوش G. vaginalis از منابع مختلف (جدول ۱) با موفقیت توسط عملیات qPCR تعیین نوع شده و به عنوان دارنده فقط یکی از چهار ژن خاص دسته حفاظت شده مورد هدف همتراز با جداسازی ژنتیکی گزارش شده و فقدان انتقال افقی ژنهای توزیع شده در میان چهار دسته G. vaginalis شناسایی شدند. اگر تخصیص تاکسونومیکی دستجات G. vaginalis به سمت جداسازی آنها به چهار گونه جنس Gardnerella اصلاح گردد، طبق گفته Amed و همکارانش در ۲۰۱۲، عملیات qPCR از نوع multiplex توضیح داده شده می تواند برای تمایز گونه ای به جای اهداف تعیین نوع بیشتر بکار بسته شود. سنجش ژنوتایپینگ عملیات qPCR خاص دسته نشان دهنده یک رابطه قوی بین برخی دستجات G. vaginalis ، زیست نوع ها و ژنوتیپ ها (جدول ۱) می باشد. همانگونه که می توان از تحلیل تطبیقی انواع روشهای تایپینگ دید، سوشهای G. vaginalis دسته ۱ مرکب از یک گروه خیلی مجزا است که متفاوت از سایر دستجات طبق هر سه تکنیک تعیین نوع شناسایی شده است. این امر می تواند نشان دهنده فاصله فیلوژنتیکی بزرگتر میان دسته ۱ و سایر دستجات G. vaginalis بشود که به نوبه خود مبین نیازی برای تخصیص مجدد تاکسونومیکی است.

آنالیز توزیع دسته G. vaginalis در ۶۰ نمونه واژینال توسط عملیات qPCR خاص دسته multiplex یک غلبه دسته ۴ (تعداد ۵۰) را نشان داده است که بعد از آن دسته ۱ با فراوانی کمتر (تعداد ۳۲)، دسته ۳(تعداد ۱۹) و دسته ۲ (تعداد ۱۵) می آید. هیچ رابطه ای بین دستجات مختلف وجود نداشت که حاکی از فقدان روابط

دوجانبه و آنتاگونیستی در جوامع چنددسته ای می باشد (جدول ۵). ولیکن، جوامع G. vaginalis پلی کلونال مرکب از بیش از یک دسته (تعداد ۴۲) در نمونه های آنالیز شده شایع است. میزان کلنی سازی همزمان توسط دستجات G. vaginalis چندگانه (۷۰ درصد) به طور معنی داری بالاتر از حضور قبلا توضیح داده شده انواع زیستی متعدد و ژنوتیپ ها در نمونه های واژینال می باشد. در ۱۷ سواب واژینال، G. vaginalis توسط یک دسته منفرد نمایش داده شد: یا دسته ۱ (تعداد ۴) یا دسته ۴ (تعداد ۱۳). مشخص گردید که دسته ۲ و دسته ۳ تنها به عنوان بخش هایی از جوامع چنددسته ای بوده اند که ممکن است نشان دهنده وابستگی آنها به فعالیت های مهم برای بقا در محیط واژینال باشد که توسط سایر دستجات فراهم شده است. ولیکن سوشهای G. vaginalis این دو دسته نشان دهنده هیچ گونه کمبودهای رشد هنگام کشت در محیط آزمایشگاهی نبود.

یک مزیت اصلی روش تعیین نوع qPCR خاص دسته مطرح شده همان مستقل بودن آن از کشت می باشد. این ویژگی در کنار فرمت تک لوله ای multiplex باعث می شود که این ابزار تعیین نوع مولکولی شرایط یک سنجش تشخیصی سطح بالا را داشته باشد. اهمیت بالینی سنجش توضیح داده شده از لحاظ اسیب شناسی BV توسط تفاوتهای آشکار در رابطه با دستجات G. vaginalis و این اختلال نشان داده شده است. یک همبستگی مثبت بالایی با بیماری BV بنا به تعریف معیارهای میکروبیولوژیکی و نیز علائم بالینی در دسته ۱ و ۳ مشاهده شده است درصورتیکه دسته ۴ هیچ رابطه ای با این بیماری نداشته است. دسته ۲ نشان دهنده یک رابطه منفی با میکروفلور واژینال سالم و یک رابطه مثبت با میکروفلور حدواسط به جای BV می باشد (جدول ۵). شیوه مولکولی جدید مطرح شده در اینجا ممکن است دست کم تا اندازه ای توضیح دهنده موارد ضدو نقیض رابطه انواع مختلف زیست نوع های معمولی با BV باشد که در تعدادی مطالعات گزارش گردیده است. طبق مقاله Briselden & Hillier در سال ۱۹۹۰، نوع زیستی مثبت لیپاز ۱ و ۲ و ۳ و ۴ خیلی اوقات از زنان مبتلا به BV به جای زنان با فلور میکروبی واژینال طبیعی بازیابی شده است. در مطالعه ما، دسته ۱ که مرکب از نوع زیستی ۱ و نوع زیستی ۴ بود رابطه مثبتی با این اختلال نشان داد. Numanovic و همکارانش در ۲۰۰۸ گزارش کردند که نوع زیستی ۷ همراه با نوع زیستی ۲ و ۳، خیلی اوقات از زنانی جداسازی شده است که از بیماری BV رنج برده اند. دسته ۳ که بیشترین ارتباط را با بیماری BV دارد، شامل نوع زیستی ۷ بنا به مقایسات روشهای تعیین نوع می باشد. Aroutcheva و همکارانش در سال ۲۰۰۱ دریافتند که نوع زیستی ۵ در میان بیماران مبتلا به

میکروفلور واژینال نرمال غلبه دارد. در کار ما، سویه های نوع زیستی ۵ به سه دسته مختلف تعیین نوع بیشتری شدند: دسته ۲ و دسته ۳ و دسته ۴. دسته ۴ با بیشترین فراوانی در نمونه های واژینال شناسایی شده است و هیچ رابطه ای را با این اختلال نشان نداده است.

ولیکن مهمترین تفاوت در رابطه با بیماری BV برای دسته جات فردی کشف نشده است بلکه برای گروه های دسته ای مشخص شده است. کلنی سازی همزمان با دستجات متعدد اساسا رابطه بالاتری با بیماری BV در مقایسه با G. vaginalis موجود به عنوان یک دسته منفرد دارد (جدول ۵). یکی از دلایل احتمالی برای چنین ناهمخوانی ممکن است این باشد که جوامع چنددسته ای اغب مرکب از دستجات مرتبط به BV بودند درصورتیکه نمونه های حاوی یک دسته منفرد مکررا با دسته ۴ G. vaginalis کلنی سازی شده اند که پایین ترین رابطه را با بیماری BV داشته است. وجود دستجات بیشمار در محیط واژینال ممکن است در نتیجه داشتن شرکای جنسی متعدد باشد. طبق شواهد مربوط به روش تعیین نوع زیستی و تحلیل تنوعات نوکلئوتیدی درون ژن ۱۶S rRNA، زنان تک شریک و شرکای مرد آنها تمایل به کلنی سازی همان سوش G. vaginalis یا نوع زیستی آن دارند. آمیزش جنسی بدون حفاظت کاندومی با یک شریک جنسی جدید عامل خطر تایید شده بیماری BV می باشد. نهایتا، عفونت های پلی کلونال G. vaginalis ممکن است دربردارنده قابلیت بالاتر بیماریزایی در سطح جمعیت به موازات یک فرضیه ژنومی توزیع شده باشد که بیان می کند تنوع ژنتیکی زیرگونه ای باعث بهبود بقای جمعیت شده است و تناسب آنرا برای شرایط محیطی متنوع به حداکثر می رساند همانگونه که در مقاله Ehrlich و همکرانش مطرح گردیده است. سایر یافته ها مانند شیوع جوامع چنددسته ای و ساختارهای آنها، می تواند همچنین از این نقطه نظر توضیح داده شود.

محدودیت اصلی این مطالعه تعداد اندک نمونه های بالینی بوده است. هرچند تعداد ۶۰ نمونه واژینال آنالیز شده به خوبی با روشهای مرسوم و مولکولی تعیین مشخصات شده بود، سایر گروه های تحت مطالعه بیماران ممکن است تولید نتایج متفاوت توزیع دسته G. vaginalis یا رابطه آن با بیماری BV بسته به وضعیت سلامت آنان، نژاد، سن یا محل جغرافیایی شان بنماید. ولیکن، روایی سازی کامل روش توضیح داده شده در اینجا تضمین کننده کاربرد آن برای شناسایی G. vaginalis ، کمیت سنجی و تعیین نوع در یک شرایط آزمایشگاهی با هدف بهبود تشخیص پاتوژن و نظارت اپیدمیولوژیکی است. مطالعات طولی توزیع دسته در زنان غیرمبتلا و بیماران

دچار BV عودکننده یا متحمل درمان انتی بیوتیکی مستلزم روشن سازی بیشتر پیچیدگی G. vaginalis به عنوان یک گونه و نقش آ« در سلامت واژن می باشد.

در نتیجه گیری، مطالعه ما درباره ایجاد و روایی سازی یک شیوه مولکولی تازه برای تعیین نوع بیشتر G. vaginalis بطور مستقل از روش کشت براساس تکنیک qPCR توضیحاتی را می دهد. دو سنجش مطرح شده قادر به شناسایی G. vaginalis و کمیت سنجی و تعیین نوع در نمونه های واژینال غیرکشت شده می باشند. فایده این روش با شناسایی بارهای باکتریال G. vaginalis و توزیع دسته در ۶۰ نمونه سواب بالینی با حذف کشت پاتوژن نشان داده شده است. رابطه خاص دسته با بیماری BV و شیوع عفونت های پلی کلونال که در اینجا آشکار شده است ممکن است باعث روشن شدن نقش G. vaginalis در پاتوژنز و آسیب شناختی BV بشود و دانش ما را نسبت به این شرایط سردرگم کننده بیشتر کند و گزینه های تشخیصی و درمانی بهتری را ترویج نماید.

ترجمه فا
TarjomeFa.Com

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

✔ لیست مقالات ترجمه شده

✔ لیست مقالات ترجمه شده رایگان

✔ لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی