ترجمه فا

TarjomeFa.Com

ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

شناسایی و مشخصات فیلوژنتیکی واژینولیزین Gardnerella vaginalis در نمونه های برگرفته از زنان بلغاری مبتلا به واژینوز باکتریال

چکیده

اخیرا، استفاده شدید از روشهای پیشرفته تر شامل آنالیز ژنتیک مولکولی به مطالعات در زمینه نقش سبب شناختی Gardnerella vaginalis به عنوان پاتوژن اصلی واژینوز باکتریال یا BV کمک کرده است. هدف از مطالعه ما مطرح نمودن روش مبتنی بر واکنش زنجیره پلی مرازی PCR برای شناسایی ژن واژینولیزین (vly) در باکتری G. vaginalis و انجام یک آنالیز فیلوژنتیکی برای یافتن همبستگی های احتمالی بین تظاهرات بالینی و موتاسیون ژنی می باشد. نمونه های واژینال از ۱۱۴۵ زن دارای نشانه های واژینیتیز و ۳۷۸ زن بدون علائم به سن باروری جمع آوری گردید. بعد از شناسایی PCRی G. vaginalis ، تعداد ۲۸۹ نمونه DNAی از لحاظ vly با استفاده از پرایمرهایی که هدفشان تکثیر کل ژن بوده است، تست گردیدند. وجود vly در کلیه ۲۸۹ نمونه دارای PCR مثبت برای G. vaginalis شناسایی گردید. شانزده محصول PCR با vly مثبت تعیین توالی شدند. تحلیل فیلوژنتیکی که براساس توالی های اسیدنوکلئیک مرجع در بانک اطلاعاتی NCBI GenBank ذخیره سازی شده شامل ژن vly کامل G. vaginalis بود، سویه های مورد مطالعه را در سه گروه اصلی قرار داد. در نتیجه، ازمایشات ما تایید می کند که فاکتور بیماریزایی G. vaginalis اصلی همان واژینولیزین می باشد. نتایج PCRی Multiplex نویدبخش بوده و مطالعات بیشتری باید انجام گیرد تا تایید کننده دامنه حساسیت روش و قابلیت کاربرد آن برای تشخیص ها باشد. نتایج تحلیل فیلوژنتیکی ما که برخی نمونه ها را با هم گروه بندی کرده است می تواند مبین یک همبستگی احتمالی بین علائم بالینی ، تمایل به مزمن شدن، سمیت واژینولیزین و موتاسیون های ژن vly باشد.

کلیدواژه ها: Gardnerella vaginalis، واژینولیزین، تحلیل فیلوژنتیکی

مقدمه

Gardnerella vaginalis یک کوکسی باسیل گرم متغیر غیرمتحرک است که می تواند در شرایط میکروهوازی رشد نماید. در سالهای بعد از کشف، حالت تاکسونومیکی این میکروب به دلیل برخی مشخصات ساختار دیواره سلولی اش همچنان ناشناخته باقی مانده بود. دیواره سلولی رنگ امیزی گرم مثبت را در مرحله رشد expotenial نشان می دهد ولیکن در کشت های قدیمی لایه پپتیدوگلیکان نازک تر بوده و رنگ امیزی گرم منفی را بدست می دهد. بنابراین، این میکروارگانیسم گرم متغیر در آغاز در جنس Corynebacterium و Haemophilus طبقه بندی گردیده است ولیکن بعدها به یک جنس جداگانه تحت نام G. vaginalis جابجا گردید. این گونه های باکتریایی بنا به اثبات یک عامل مسبب عفونت های مجرای تناسلی در مطالعات با داوطلبین و مدلهای حیوانی بوده است. همچنین در اپیتلیوم واژینال با ترشحات شناسایی شده است و در فقدان ترشحات التهابی بوده است. در سالهای اخیر استفاده زیاد از روشهای پیشرفته تر از جمله آنالیز مولکولی ژنتیکی به مطالعات در زمینه نقش سبب شناختی G. vaginalis کمک کرده است و آنرا پاتوژن اصلی (از لحاظ فراوانی و کمیت) در زنان مبتلا به واژینوز باکتریال BV شناسایی کرده است. چندین عضو از جنس Lactobacillus باعث مهار باکتریهای پاتوژنی در اکوسیستم واژینال زنان سالم گردیدند ولیکن برخی مواد تولید شده توسط G. vaginalis می توانند اثر سینرژتیکی را برای رشد سایر پاتوژن ها و اثر مهارکنندگی را علیه لاکتوباسیل ها تولید کنند. BV فراوان ترین عفونت واژینال در میان زنان در گروه به سن باروری می باشد و تحقیقات روی قاره های مختلف این اخطار را نشان می دهد که در زنان جوانتر زیر ۳۰ سال بویژه فراوانتر است.

چندین اقدام برای طبقه بندی سوش های G. vaginalis براساس فنوتیپ انجام شده است. ولیکن این مورد از لحاظ بالینی نامرتبط به اثبات رسیده است. عامل بیماریزایی G. vaginalis اصلی یک اگزوتوکسین با فعالیت سیتوتوکسیک (از جمله فعالیت همولیتیک) علیه سلولهای انسان می باشد. همولیزین باعث تحریک یک پاسخ ایمنی محلی می شود و سنتز ایمنوگلوبولین A ترشحی (sIgA) می تواند از اینرو به عنوان یک نشانگر تشخیصی برای BV استفاده شود. این محصول سمی یک عضو از خانواده سیتولیزین وابسته به کلسترول (CDC) از توکسین های تشکیل دهنده منفذ می باشد. همولیزین G. vaginalis به نام واژینولیزین (VLY) یک سمیت انتخابی را نشان می دهد و به طور اختصاصی سلولهای میزبان را هدف قرار می دهد که مولکول تنظیم کننده کمپلمانی CD۵۹ را حمل می کند. مکانیسم سیتوتوکسیته براساس اطلاعات منفذ با واسطه VLY می باشد، که

باقیمانده پرولین در اوندیکاپپتید دومین ۴ مولکول توکسین با نقش اصلی می باشد. موتاسیون های این ناحیه باعث ایجاد توکسویید VLY می شود و می تواند احتمالا به ساخت واکسن کمک کند.

هدف از مطالعه کنونی مطرح سازی روش مبتنی بر PCR واکنش زنجیره پلی مرازی برای شناسایی ژن G. vaginalis vly و اجرای یک تحلیل فیلوژنتیکی در اقدامی برای یافتن همبستگی های احتمالی میان برخی تظاهرات بالینی و برخی موتاسیون های ژنی می باشد.

مواد و روشها-تحلیل میکروسکوپی نوری-نمره Nugent از صفر تا ده برای طبقه بندی اسمیرهای رنگ امیزی گرم مستقیم از تعداد ۱۵۲۳ بیمار زن معاینه شده (۱۱۴۵ زن با علائم بالینی آشکار تخلیه واژینال و از ۳۷۸ زن بدون نشانه (بدون تخلیه واژینال) به سن باروری استفاده گردید (با طیف سنی ۱۶ الی ۴۵ سال در سه گروه برای راحتی کار). درجه یک (نمره Nugent از صفر تا سه) میکروفلور واژینال طبیعی را درنظر گرفته است (NF)؛ درجه دوم (امتیاز Nugent از ۴ تا ۶) که بین میکروفلور طبیعی و واژینوز باکتریال (IF) حالت حدوسط دارد و درجه سوم (امتیاز Nugent از ۷ تا ۱۰) نوع تیپیکال واژینوز باکتریال یا BV درنظر گرفته شد.

کشت سواب-سواب های واژینال در محیط کشت انتقالی توسط متخصص زنان و زایمان به موازات اسمیرهای مستقیم جمع آوری گردید. نمونه ها طبق شرح قبلی غربالگری گردیدند.

نمونه ها و استخراج DNA-DNA از سواب های واژینال با کیت استخراج اسیدنوکلئیک DNAsorb-AM طبق دستورالعمل کارخانه جداسازی گردید (کارخانه AmpliSens). DNA بدست آمده از کشت های خالص G. vaginalis ATCC ۱۴۰۱۸ و G. vaginalis ATCC ۴۹۱۴۵ به عنوان شاهد استفاده گردید. یک تعداد کل ۲۸۹ نمونه برای وجود واژینولیزین تست گردید: ۲۴۳ سواب واژینال از زنان دارای علائم بالینی عفونت تناسلی، که با میکروسکوپ تحت عنوان BV براساس امتیاز Nugent و نتایج PCR مثبت G. vagnialis به اثبات رسیده است؛ ۱۶ نمونه از زنان سالم بالینی که با میکروسکوپ و نتایج PCR منفی G. vaginalis تحت عنوان NF تشخیص داده شده اند، و ۲۸ نفر دیگر با IF براساس امتیاز Nugent مجددا و نتایج PCR منفی G. vaginalis و دو نمونه هم با BVی G. vaginalis بدون نشانه که توسط PCR به تایید رسیده است.

طراحی پرایمر و PCR- برای تکثیر به طول کل bp ۱۶۳۸ ژن vly از G. vaginalis ، پرایمرهای توضیح داده شده توسط GELBER و همکارانش همتراز را توالی های جدید ذخیره شده در بانک اطلاعاتی GenBank در مرکز NCBI (مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژیکی) اصلاح گردیدند: HQ593656; HQ593658; HQ593662; HQ593664, HQ593667, EU522486.1, EU522487.1، EU522488.1 . پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ آمده اند. PCR در حجم های µL ۲۵ (µL ۳,۰ از DNA، pmol ۱۰ از هر پرایمر، µL ۷,۵ از dH۲O ، µL ۱۲,۵ از MyFy MasterMix، کارخانه Bioline انگلیس) در یک دستگاه ترموسایکلر QB-۹۶ (شرکت LKB بلغارستان) انجام گردید. شرایط تنظیم شده ذیل بکار گرفته شد: عملیات Heated Lid در ۱۱۰ درجه سانتیگراد، عملیات Hot Start در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه، عملیات ۳۰ Start Cycles- دناتوراسیون در ۹۵ درجه و ۳۰ ثانیه، گرادیان ۵۰، درجه حرارت ۶۶,۳ درجه و ۳۰ ثانیه، مرحله Elongation ۷۲ درجه و ۴۵ ثانیه، و عملیات Final Elongation نهایی در ۷۲ درجه و ۷ دقیقه. پرایمرها از لحاظ همولوگی نزدیک با استفاده از ابزار جستجوی طویل شدن محلی پایه (BLAST) موجود در پایگاه داده NCBI آنالیز گردیدند (شرکت نرم افزاری Bethesda، MD). (وب سایت www.nbi.nlm.nih.gov/BLAST). نسخه های ۵ نرم افزار MUSCLE و MEGA برای همترازی متعدد تعیین توالی مرجع نوکلئوتیدی و طراحی پرایمرها استفاده گردیدند. قطعات داخلی ژن vly در G. vaginalis با جفت های پرایمر F۱-GVaglysRLong و F۱-GVaglysRshort تکثیر گردیدند. PCR گرادیان در حجم های µL ۲۵ با DNA کل از نمونه های بالینی (۳,۰ µL ی DNA)، pmol ۱۰ هر پرایمر، µL ۷,۵ از dH۲O، µL ۱۲,۵ از مخلوط MyTaq PCR ، شرکت Bioline انگلیس) و با DNA تکثیر شده ژن کل vly (µL ۱,۰ از DNA از PCR، pmol ۱۰ از هر پرایمر، ۹,۵ µL از dH۲O ، µL ۱۲,۵ از مخلوط MyTaq PCR، شرکت Bioline انگلیس) انجام گردید. واکنش های PCR در یک ترموسایکلر استارت QB-۹۶ (شرکت LKB بلغارستان) با شرایط ذیل انجام گردید: عملیات Heated Lid در ۱۱۰ درجه سانتیگراد، عملیات Hot Start در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، عملیات Start ۳۵ Cycles-دناتوراسیون در ۹۵ درجه و ۳۰ ثانیه، گرادیان ۵۰، درجه حرارت ۶۶,۳ درجه و ۴۵ ثانیه، مرحله Elongation ۷۲ درجه و ۴۵ ثانیه، و عملیات Final Elongation نهایی در ۷۲ درجه و ۷ دقیقه. بعد از بهینه سازی واکنش های PCR برای قطعات داخلی، PCR از نوع multiplex برای شناسایی آنها با مخلوط

PCR HS Mix (ساخت کارخانه Bioline انگلیس) در حجم های واکنش µL ۵۰ استفاده گردید. کیفیت و کمیت نمونه های DNA استخراج شده و محصولات PCR بوسیله دستگاه اندازه گیری کننده GeneQuant II RNA/DNA Calculators (ساخت کارخانه PharmaciaBiotech انگلیس) و دستگاه الکتروفورزیز ژل آگاروز ۲ درصد (کارخانه Bioline انگلیس) ارزیابی گردید: ng/ml ۱۰ از اتیدیوم بروماید (کارخانه سیگمای امریکا)، بافر تریس بورات EDTAی ×۱ (یا TBE)، مارکر DNAی HyperLadder ۵۰ bp (کارخانه Bioline انگلیس)، ۱۲۰V و mA ۷۰ و ۱۲W برای مدت ۴۰ دقیقه.

تعیین توالی و آنالیز فیلوژنتیکی-محصولات PCRی vly انتخاب شده (تعداد برابر با ۱۶ نفر) برای تعیین توالی DNA انتخاب گردیدند. آنها از زنان مبتلا به BV از گروه های سنی مختلف و با علائم بالینی مختلف بدست آمدند. همه این شانزده نمونه های DNA برای داشتن G. baginalis تولیدکننده واژینولیزین به عنوان عامل سبب شناختی BV تایید شده بودند. یک شرح مختصر نمونه ها به ترتیب ذیل می باشد: نمونه های ۶ و ۱۲ و ۱۵ و ۷۹ از زنان باردار جمع آوری گردیدند. نمونه های دیگر از زنان غیرباردار بود. نمونه های ۱۲ و ۷۹ به ترتیب بیماران ۳۸ ساله و ۲۳ ساله بدون علامت (بدون وجود تخلیه واژینال) بدست آمدند. اسمیر با رنگ امیزی گرم مستقیم و سنجش PCR نشان دهنده BV مربوط به G. vaginalis بوده است. منشا نمونه های شماره ۱۵ و ۱۹ و ۴۲ و ۸۴ و ۸۹ به ترتیب از بیماران به سنین ۲۷ و ۱۹ و ۲۵ و ۳۲ و ۳۶سال بوده اند که علائم بالینی و تشخیص میکروبیولوژیکی BV تیپیکال داشته اند. نمونه های شماره ۵۳ و ۱۸۱ از زنان به ترتیب ۲۸ و ۴۰ ساله با تشخیص بالینی واژینیت پیچیده با تخریب گردن رحم همراه بوده است. داده های میکروبیولوژیکی برای عفونت وجود داشته است که توسط اسمیر با رنگ امیزی گرم مانند Trichomonas vaginalis ی BV مثبت طبقه بندی شده است. نمونه های شماره ۶ و ۴۱ از افراد ۲۵ و ۲۷ ساله مبتلا به BV عودکننده مزمن (عود واژینیت بعد از درمان) جمع آوری گردید. آخرین نتایج میکروبیولوژیکی نشان دهنده BV و کاندیدیازیز اولیه بوده است (سویه های کاندیدا آلبیکانس $10^4 cfu/mL$ درهر دو مورد). نمونه های ۳۹ و ۱۰۰ و ۱۳۷و ۱۳۸ و ۱۴۵ و از زنان (۳۵ و ۲۹ و ۳۰ و ۳۳ و ۳۵ ساله) مبتلا به BV عودکننده مزمن بودند که برخی از آنها بعد از درمان قبلی بوده است.

جدول ۱-پرایمرهای الیگونوکلئوتیدی مکمل ژن vly در باکتری Gardnerella vagnialis. پرایمر F۱ قبل از کدون شروع آغاز گردیده و موقعیت ها براساس توالی مرجع HQ۵۹۳۶۵۸ تعیین گردیدند.

Primer name/ pairs	Sequence	Position	Size of product	Source
	5′-A KSCAGCGAAGCATGCCATGC-3′			
F1		4–24		Gelber et al., [9]x
R1	5′-TYAGTCGTTCTTTACAGTTTC-3′x	1641–1621		
	5′-AAGCCGTTCACTGCGGAAGT-3′	614–595		this study
GVaglysRLong *GVaglysRshort*xx	5′-GTTCTCAATGGTTTCGCCAT-3′	315–296	1638 bp	this study

xModified in this study in line with up-to-date GenBank data differences from the original primers are underlined

xxspecific for phylogenetic group 1

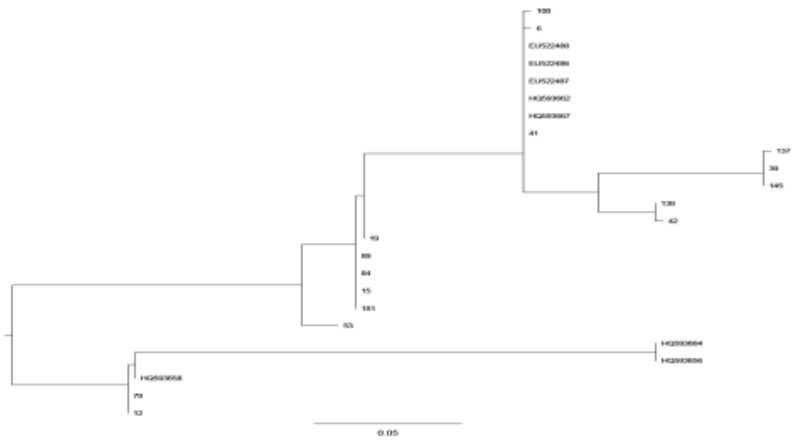
تکنیک های میکروبیولوژیکی و مولکولی تنها G. vaginalis (بدون کاندیدیوز) را شناسایی نموده اند. شانزده نمونه DNA شرح داده شده فوق توسط PCR به طور متوالی با جفت پرایمرهای F۱-R۱، F۱- GVaglysRLong و F۱-GVaglysRshort تقویت گردید. شانزده نمونه بالینی که نتایج تکثیر مثبت را با سه جفت پرایمر بدست داده با جفت پرایمر F۱-GvaglysRLong با استفاده از کیت تعیین توالی چرخه ترمیناتور رنگ DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (کارخانه GE Healthcare در شهر Giles انگلیس) و MegaBACE ۱۰۰۰ (کارخانه Amersham Biosciences) به ترتیب ذیل تعیین توالی گردیدند. محصولات PCR از طریق ستون های S۴۰۰ تخلیص گردید (شرکت GE Healthcare در شهر Giles انگلیس). مخلوط PCR تعیین توالی کننده شامل موارد ذیل بوده است: pmol/mL ۵ از پرایمر، ۳,۵µ از DNA، ۸,۰µL از محلول پیش مخلوط DYEnamic ET Dye Terminator و dH۲O تا ۲۰µL. برنامه ذیل استفاده گردید: ۲۵ دور در ۹۵ درجه برای ۳۰ ثانیه، ۵۴ درجه برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه برای ۱ دقیقه. دو کنترل انجام گردید: یک کنترل برای واکنش و یک کنترل برای شناسایی تعیین توالی. آنالیز فیلوژنتیکی شامل محصولات PCR تعیین توالی شده قطعات ژن vly بین پرایمرهای F۱-GVaglysRLong در پنج نمونه بالینی و توالی های مرجع مرتبط در بانک اطلاعاتی GenBank ی NCBI بوده است. همترازی متعدد انجام شده با MUSCLE توسط تست J Model Test ۰,۱,۱ در نرم افزار نسخه پنج شرکت MEGA برای یافتن بهترین مدل برای ساخت درخت های فیلوژنتیکی براساس نوکلئوتید اسیدها بکار گرفته شد. PHYML ۳,۰ توسط نرم

افزار ۲ Phylemon و هزار نسخه برداری تسمه ای برای ساخت درخت فیلوژنتیکی استفاده گردید. برای نمایش گرافیکی درخت های فیلوژنتیکی از نرم افزار FigTree۱,۴,۰ استفاده شد (http://tree.bio.ed.ac.uk/). توالی های انتخابی به بانک اطلاعاتی GenBank در NCBI با شماره های دسترسی ذیل ارسال شده است:

KM221028, KM221029, KM221030, KM221032.

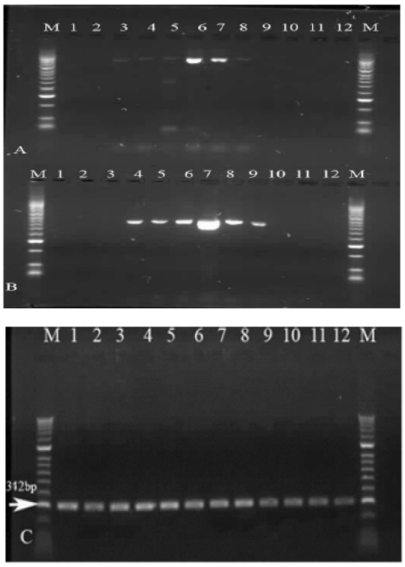
ما رضایت نامه مطلعانه امضا شده توسط هر بیمار بررسی شده را بدست اورده ایم. هیچ اطلاعات فردی در پایگاه داده وجود نداشت. بیماران در ازمونهای پزشکی یا هر گونه درمان ازمایشی قرار نداشتند. درمان تجویزی طبق طبابت روزمره بالینی و خط مشی های به اثبات رسیده طبق پاتوژن کنونی بوده است.

نتایج-آنالیز BLAST پرایمرها یک ارزش هویت صددرصدی را با ژن vly در G. vaginalis فراهم کرده است. حضور ژن vly در همه نمونه های تست شده با PCR مثبت برای G. vaginalis شناسایی شده است. نتایج از تحلیل فیلوژنتیکی براساس توالی های اسیدنوکلئیک مرجع ذخیره شده در بانک اطلاعاتی GenBank در NCBI که ژن کامل vly را در G. vaginalis تحت پوشش قرار داده است، سویه های مطالعه شده را به سه گروه اصلی تقسیم بندی کرده است (شکل ۱). اولین گروه کوچکترین گروه است (که شامل تنها دو توالی vly بلغاری (۱۲ و ۷۹)از بیماران دچار BV بدون نشانه می باشد). دومین گروه (نمونه های ۵ و ۱۹ و ۸۴ و ۸۹ و ۵۳ و ۱۸۱) هتروژنیک تر بوده است (از زنانی که دارای BV نشانه دار با یا بدون عفونت همزمان T. vaginalis و ناراحتی های آن بوده اند) اخیرین گروه (۶ و ۳۹ و ۴۱ و ۴۲ و ۱۰۰ و ۱۳۷ و ۱۳۸ و ۱۴۵) شامل بیماران با BV عودکننده بوده است. همان توپولوژی با آنالیز فیلوژنتیکی اسیدآمینه بدست آمده است.



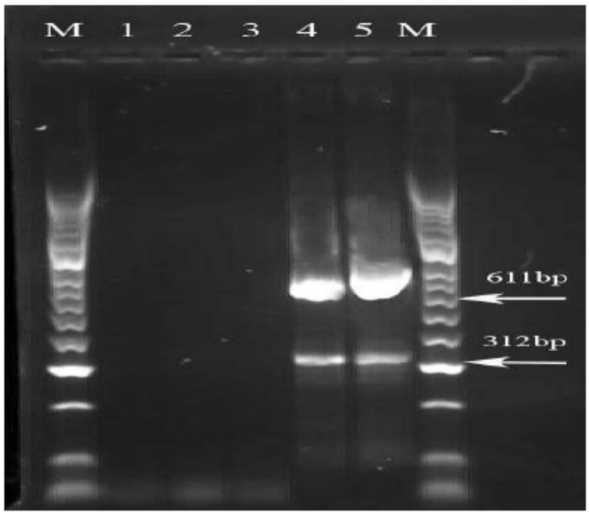
شکل ۱

بحث–تکثیر ژن vly کل یک سوش مرجع G. vaginalis با پرایمرهای PCR گرادیان و F۱-R۱ تولید یک قطعه به طول bp ۱۶۳۸ در درجه حرارت حرارت دهی در دامنه ۵۱,۴ درجه تا ۶۱,۱ درجه با نتایج بهینه در ۵۵,۸ درجه (شکل ۲) نموده است. وقتی واکنش PCR با پرایمرهای F۱-GvaglysRLong روی کل vly از اولین واکنش تکثیر و روی DNA سوش مرجع انجام گردید، درجه حرارت حرارت دهی بهینه برای تکثیر یک قطعه bp ۶۱۱ در یک دامنه درجه حرارت ۶۳,۵-۵۳ درجه سانتیگراد (شکل ۲) بدست آمد. برای تمایز میان گروه های فیلوژنتیکی، ما پرایمر GvaglysRshort را ساخته ایم که اختصاصی گروه ۳ بوده و در ترکیب با پرایمر F۱ یک قطعه bp ۳۱۲ را پوشانده است. با استفاده از PCR گرادیان، یک محصول ویژه در همه درجه حرارت های حرارت دهی تست شده از ۵۰ درجه الی ۶۶,۳ درجه سانتیگراد (شکل ۲) تکثیر شده است. درجه حرارت حرارت دهی که برای ازمایشات بعدی ما انتخاب گردید برابر با ۵۷,۷ درجه سانتیگراد مطابق با نتایج PCR با اولین پرایمر داخلی بوده است. بعد از بهینه سازی شرایط واکنش برای تکثیر قطعات داخلی ژن vly، ما PCR ی multiplex را برای تایید نتایج انجام داده ایم (شکل ۳). همترازی توالی چندتایی شانزده نمونه مثبت و پروتکل PCR مقرون به صرفه بستگی به اجزای واکنش دارد (Taq DNA پلی مراز، بافرها، داکسی نوکلئوزید تری فسفات ها یا dNTPها، غلظت MgCl۲، الگوی DNA و پرایمرهای الیگونوکلئوتید)، که باید با دقت تنظیم شوند.



شکل ۲

اجزایی که برای حساسیت و اثربخشی واکنش تکثیر بیشترین اهمیت را دارند شامل پرایمرها و Taq DNA پلی مراز و دیدگاه کارخانه از فرمولاسیون های مختلف، شرایط سنجش و یا تعاریف واحدهای سنجش می باشد. به همین دلیل در ازمایشات مان مخلوط های واکنش PCR آماده را که مناسب تکثیر قطعات به طول مورد انتظار می باشد، انتخاب کرده ایم. برای اینکه پرایمر ثابت باشد، انتهای '۳ آن باید بی ثبات باشد و انتهای '۵ آن باید ثابت باشد که می تواند با انتخاب G یا C که در ۵ باز آخر '۵ وجود دارد و بوسیله مکمل شدگی حاصل شود. برای هدف مطالعه مان دو باز را در پرایمر فوروارد اصلاح کردیم که توسط مقاله دیگری توضیح داده شد و یک باز را در انتهای '۵ پرایمر معکوس همتراز با داده های نوین موجود در بانک اطلاعاتی GenBank اصلاح کرده ایم. نتیجه این شد که واکنش از لحاظ اختصاصی بودن بالاتر و دامنه وسیعتر واریته های ژن vly شناسایی شده در G. vaginalis بهبود داده شد و از اینرو به ما امکان داد تا پروتکل PCR مطرح شده را بهبود دهیم. با استفاده از پرایمرهای هدف گرفته شده در تکثیر کل ژن vly، ازمایشات ما تایید کننده عامل بیماریزایی G. vaginalis اصلی به عنوان واژینولیزین در همه نمونه های بالینی با تشخیص BV بوده است. این نتایج با جفت پرایمر F۱-GvaglysRLong که اثبات کننده اختصاصی بودن و حساسیت آنها می باشد، تایید گردید. محصولات PCR بدست آمده در همه درجه حرارت های حرارت دهی که با پرایمرهای F۱-GVaglysRShort تست گردید، به احتمال قوی در حضور GC در انتهای '۳ نقش دارد و منجر به قابلیت ثبات و کینتیک تغییر یافته می شود که آنها را غیرقابل کاربرد در دامنه درجه حرارت حرارت دهی وسیعتری می نماید.



شکل ۳

نتایج PCRی multiplex نویدبخش بوده و مطالعات بیشتری باید انجام گیرد تا دامنه حساسیت این روش و قابلیت کاربرد تشخیصی را تعیین نماید. نتایج تحلیل فیلوژنتیکی ما نشان دهنده توزیع نمونه ها به سه گروه اصلی می باشد. نمونه ها در گروه اول (با بیماریزایی پایین و چسبندگی جزئی احتمالی G. vaginalis) از BV بدون علامت بوده اند. این توالی ها خیلی مشابه با توالی شناخته شده vly بوده است (شماره دسترسی GenBank برابر با HQ۵۹۳۶۵۸). چهار نمونه (۵ و ۱۹ و ۸۴ و ۸۹) در گروه دوم از بیماران مبتلا به BV تیپیکال شناسایی شده برای اولین بار بدست آمد. نمونه های ۳۸ و ۱۸۱ از گروه دوم نیز از زنان BV مثبت مبتلا به عفونت همزمان T. vaginalis جمع آوری گردید. هیچ آنالوگی برای این توالی گروه هتروژنیکی ذخیره شده در بانک اطلاعاتی NCBI GenBank وجود ندارد. توالی های vly به شماره ۶ و ۴۱ و ۱۰۰ (بیماران با BV عودکننده) دارای ۱۰۰ درصد شباهت با پنج توالی ذخیره شده در بانک اطلاعاتی NCBI GenBank بوده و زیرگروه اول از گروه سوم اصلی را تشکیل می دهد. زیرگروه دوم (۱۳۷ و ۱۴۵ و ۳۹) و سوم (۴۲ و ۱۳۸) شامل نمونه هایی از زنان دارای عفونت شدید طولانی بوده است. در اینجا یک همبستگی احتمالی بین بارزترین علائم بالینی BV ، تمایل به ایجاد عفونت (مزمن) طولانی مدت، سیتوتوکسیته واژینولیزین، موتاسیون های ژن vly، و اثر چسبندگی مشاهده شده توسط سایر نویسندگان وجود داشته است. مطالعات دیگر مانند تست های کشت سلولی، سیستم های هیبرید دوتایی و میکروسکوپ الکترونی برای اثبات یا عدم اثبات این فرضیه مورد نیاز است. نتایج نشان دهنده برخی تفاوتهای میان قابلیت سیتوتوکسیته vly از بیماران دچار BV مزمن شدید و از زنان با علائم بالینی با بیانایین که به طور پیش فرض به دلیل تغییر زنجیره اسیدآمینه بوده است، می باشد. واژینولیزین به تنهایی مسئول همه قابلیت های پاتوژنتیکی در سبب شناختی BV نیست. تغییرات قابلیت سمیت مانند تشکیل بیوفیلم و ظرفیت چسبندگی، تولید سیالیداز و توانایی تجزیه موسین، تعیین کننده G. vaginalis به عنوان پاتوژن بیماریزاتر نسبت به سایر مجموعه میکروبی مرتبط با BV می باشد.

در نتیجه، سه گروه اصلی با استفاده از آنالیز فیلوژنتیکی براساس ژن کامل vly و قطعه بین پرایمرهای F۱-GVaglysRLong شناسایی گردید. توزیع مشاهده شده به گروه ها اساسا به دلیل تفاوت ها در موقعیت های اسیدآمینه A۳۲T N۸۳D D۱۱۲N می باشد که به همین دلیل جفت پرایمر F۱-GVaglysRLong می تواند برای شناسایی ژن vly و برای آنالیز فیلوژنتیکی مناسب درنظر گرفته شود. بعلاوه، این جفت پرایمر می توانست

با پرایمرهای F۱-GvaglysRshort برای شناسایی ژن vlyی G. vaginalis در سویه ها استفاده بشود و نمونه های بالینی و نتایج می تواند برای تحلیل سیستماتیک یک رابطه احتمالی میان تظاهرات بالینی و برخی فنوتیپ های G. vaginalis استفاده بشود. این اولین مطالعه شناسایی و مشخصات فیلوژنتیکی vly از G. vaginalis مانند عامل پیشروی بیماریزایی مربوط به پاتوژنز BV در زنان بلغاری می باشد.

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