Al-Kufa University Journal for Biology / VOL.8 / NO.1 / Year: 2016
Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544

*تشخيص جزيئي لأنزيم الـ sialidase المنتج من قبل بكتريا *Gardnerella vaginalis* المسببة لخمج المهبل البكتيري*

حنان خالد دايخ الظالمي , د. احلام كاظم نعيم الياسين

جامعة الكوفة - كلية التربية للبنات - قسم علوم الحياة

الخلاصة

شملت الدراسة جمع 100 مسحة افراز مهبلي لنساء حوامل وغير الحوامل ، المجهضات وغير المجهضات تراوحت اعمارهن بين (16-48) سنة من اللواتي يراجعن مستشفى الزهراء (ع) التعليمي والعيادات الخارجية في مدينة النجف الاشرف للفترة من تشرين الثاني 2012 لغاية اذار 2013 .

بينت نتائج فحوصات امسل انتشار خمج المهبل البكتيري بين النساء الحوامل وغير الحوامل المجهضات وغير المجهضات ، وكانت اعلى نسبة اصابة بخمج المهبل البكتيري بين النساء الحوامل المجهضات لأكثر من مرة واحدة واللاتي تراوحت اعمارهن بين (16-22) سنة اذ بلغت 43% , على حين انّ اقل نسبة كانت بين النساء غير الحوامل وغير المجهضات واللاتي تراوحت اعمارهن بين (37-48) سنة اذ بلغت 11%.

اثبتت نتائج العزل والتشخيص المختبري وبعض الفحوصات البايوكيمياوية عائديه 10 عزلات الى بكتريا *G. vaginalis* على حين اثبتت نتائج التشخيص الوراثية للجين 16S rRNA عائديه25 عزلة بكتيرية لبكتريا *G. vaginalis* ثبت تواجدها في عينات الافرازات المهبلية .

تم التحري عن وجود الجين SI المسؤول عن انتاج انزيم الـ Sialidase في جميع عينات الافرازات المهبلية للنساء الحوامل اللواتي يعانين من خمج المهبل البكتيري باستخدام تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) ، وأوضحت النتائج وجود الجين في 24 عينة افراز مهبلي كما بينت النتائج ان 24 عزلة لبكتريا *G. vaginalis* كانت حاملة لهذا الجين .

*البحث مستل من رسالة ماجستير

المقدمة :

تعد بكتيريا *G.vaginalis* المسبب الرئيسي لخمج المهبل البكتيري إذ تكون مسؤولة عن 95% من حالات الأصابة بهذا المرض (Menard *et al*., 2010) ,وترافقها أنواع البكتيرية لاهوائية أخرى منها *vaginae, provetella spp* ,*Atopium* *Mobiluneus spp* و *Peptostreptococcus* والـ Mycoplasma مثل *Ureplasma urelyticum* (Menard *et al* ., 2008).إذ بين Dukes و Gardner (1955) فشل العزلات النقية من البكتيريا *G.vaginalis* على أحداث (BV) مقارنة مع العزلات السريرية التي قد تلعب دوراً مهماً في أحداث خمج المهبل البكتيري . تنتج بكتيريا *G. vaginalis* أنزيم الـ sialidase ذي الوزن الجزيئي 7500KD وهو واحد من عوامل الضراوة المهمة المفرزة من قبل هذه البكتيريا يطلق على هذا الأنزيم العديد من التسميات فقد يسمى Acycle neuraminocyle hydrolose neuramidase .

أنزيم الـ sialidase له اثرٌ في زيادة إمراضيه بكتيريا *G. vaginalis* إذ يعمل على تحطيم الطبقة المخاطية للخلايا الطلائية المهبلية , كما يعمل على تثبيط الاستجابة المناعية للمضيف وذلك من خلال شطر متبقيات حامض السياليك (Sialic acid residues) الموجودة في الكلوبيولينات المناعية IgM وIgA (Cauci *et al*.,1998) ,هذا فضلاً عن اثره الفعال في تغذية البكتيريا Bacterial nutrition وتداخل الخلايا البكتيرية Bacterial interaction.

يعد وجود أنزيم الـ sialidase في الإفرازات المهبلية دليلاً على الإصابة بخمج المهبل البكتيري ,إذ يلعب هذا الأنزيم دوراً مهماً في حالات الإجهاض القاسية عند الحوامل، فقد أشار Cauci وجماعته (1998) وجود علاقة بين أنتاج أنزيم sialidase والفيلم الحيوي كما لاحظ وجود هذا الأنزيم بنسبة 75% في السوائل المهبلية عند النساء اللواتي يعانين من خمج المهبل البكتيري والنساء المصابات بفايروس نقص المناعة المكتسبة HIV وبنسبة 5% في النساء السليمات على حين يختفي الأنزيم في الأفرازات المهبلية في حالة الأصالة بالخمائر *Candidia spp* (Briselden *et al*.,1992)، كما وجد Lopes وجماعته (2011) ان جميع الأنماط والسلالات التابعة لبكتيريا *G. vaginalis* تنتج أنزيم الـ sialidase ما عدا السلالة الثانية.Two geno type . يرتبط انتاج أنزيم sialidase مع أنتاج أنزيم الـ protease وذلك لأن كلاالأنزيمين يعملان على شطر الكلوبيولين المناعي IgA و IgM مما يؤدي إلى تثبيط الاستجابة المناعية للمضيف (Mulkes and shoberq , 1994).

هدفت الدراسة الى تسليط الضوء على بكتريا *G. vaginalis* كأحد اهم اسباب خمج المهبل البكتيري عند النساء ودورانزيم السياليديز (sialidase) في زيادة ضراوة هذه البكتريا .

المواد وطرق العمل

جمع العينات :

جمعت 100مسحة افراز مهبلي لنساء تعاني من حالات خمج المهبل البكتيري للفترة من 25/10/2012لغاية 17/3/2013 زرعت العينات على وسط اغار الكولومبيا الصلب المضاف اليه 5%دم الانسان و1مل من المضاد الحيوي Gentmycineو المضاد الحيوي Nalidixic acid.شخصت عزلات بكتيريا Gardnerella vaginalis وفقاً للفحوصات المظهرية, المجهرية والاختبارات الكيمو حيوية (Okowli *et al.*,2002)

التشخيص الجزيئي لبكتيريا *G.vaginalis* :

شخصت عزلات بكتيريا *G.vaginalis*في عينات الافراز المهبلي للنساء اللاتي تعاني من خمج المهبل البكتيري جزيئيا وذلك بتضخيم الجين 16SrRNA وذلك بأستخدامGVF (F- GGGCGGGCTAGAGTGCA) و GVR (R- GAACCCGTGGAATGGGCC) حيث تبلغ نواتج التضخيم 118 زوج قاعدي .

استخلص DNA البكتيري من عينات الافرازات المهبلية باستخدام عدة استخلاص الـ DNA Magazorb (DNA Mini-prepkit) واستخدام ال DNAالمستخلص كقالب لتضخيم الجين 16S rRNA (Zariffied *et al*, 2000), شمل مزيج التفاعل 12.5مايكروليتر, 7.5مايكروليتر لكلاً من F,R و12.5مايكروليتر من قالب الـ DNA اكمل مزيج التفاعل الى 50مايكروليتر باستخدام (nuclease free water).اجري تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل كما يلي : 5دقائق بدرجة 95°م ثم 40 دورة لكلاً من1دقيقة بدرجة 95°م, 1 دقيقة بدرجة 65°م و1دقيقة بدرجة 72°م .

التشخيص الجزيئي لأنزيم Sialidase:

تم تشخيص انزيم الـ Sialidase جزيئيا في جميع عينات الافرازات المهبلية بأستخدام الـ DNAالمستخلص كقالب لتضخيم الجين (16S rRNA) بأستخدام البادئات GVS.F (F-GACGACGGCGAATGGCACGA) وGVSR (R- AGTCGCACTCCGCGCAAGTC) إذ تبلغ نواتج تضخيم الجين (116) زوج قاعدي شمل مزيج التفاعل 12.5مايكروليتر, 7.5مايكروليتر لكلاً من F,Rو12.5مايكروليتر من قالب الـ DNA اكمل مزيج التفاعل الى 50 مايكروليتر باستخدام nuclease free water.اجري تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل كما يلي : 5 دقائق بدرجة 94°م ثم 30 دورة لكلاً من1دقيقة بدرجة 94°م , 1دقيقة بدرجة 55°م و1دقيقة بدرجة 72°م و5دقيقة بدرجة 72°م .

الترحيل الكهربائي على الاكاروز :

فحص نواتج تضخيم الجينات التشخيصية لعزلات *G . vaginalis* المنتجة لانزيم الـSialidase على هلام الاكاروز مذلك باذابة 2% غرام من هلام الاكاروز في 100 مل منTBE 1X صب الهلام بعد اذابته واضافة صبغة بروميد الاثيديوم اليه في قالب الترحيل المثبت عليه المشط camb رحلت نواتج التضخيم بعد تحميلها على هلام الاكاروز كهربائيا بفولتية 80 فولت ولمدة ساعة ونصف ظهرت الحزم باستخدام وحدة الاشعة فوق البنفسجية على طول موجي 280نانوميتر .

النتائج والمناقشة:

URL: http://www.uokufa.edu.iq/journals/index.php/ajb/index
http://iasj.net/iasj?func=issues&jId=129&uiLanguage=en
http://www.drji.org/JournalProfile.aspx?jid=2073-8854
Email: biomgzn.sci@uokufa.edu.iq

تشخيص اخماج المهبل البكتيري:

شملت الدراسة الحالية 100مسحة أفرازات مهبلية من نساء حوامل وغير حوامل تراوحت أعمارهن بين (16-48)سنة من المراجعات لمستشفى الزهراء(ع) للولادة والأطفال والعيادات الخارجية شخصت حالات خمج المهبل البكتيري اعتماداً على معايير أمسل والمبينة في الجدول (1) , تعد النتيجة حالة مرضية ضمن حالات اخماج المهبل البكتيري إذا كانت نتيجة اختبارات أمسل الموجبة هي ثلاثة من أصل أربعة اختبارات والتي تشمل لون الأفرازات المهبلية قيم الأس الهايدروجيني وجود الخلايا المفتاحية clue cell ونتيجة التفاعل مع هيدروكسيد البوتاسيوم KOH . اوضحت النتائج ان الأفرازات المهبلية كانت متغايرة اللون فبعضها كانت بيضاء أو كريمية والبعض الأخر تلونت باللون البني, بينما تراوحت قيم الأس الهايدروجيني بين(3.4-7) وتغايرت نتيجة الفحص مع هيدروكسيد البوتاسيوم إذ أعطت بعض حالات اخماج المهبل رائحة تشبيه رائحة السمك الفاسد عند مزج أفرازات المهبل مع (KOH) على حين لم تعطِ بعض الأفرازات هذه الرائحة .

جدول (1) تشخيص اللتهاب المهبل البكتيري وفقاً لمعايير أمسل.

نوع الحالة	لون الأفراز	التفاعل مع KOH	قيم الأس الهايدروجيني	وجود الخلايا المفتاحية
التهاب المهبل البكتيري (BV)	*V	V*	3.4 7 -	+
التهاب المهبل اللابكتيري	أصفر مخضر	v-	6 - 5.5	-

* تراوحت لون الأفرازات من الأبيض ، الأصفر ، الأصفر المخضر ، كريمي ، بني .

** بعضها أعطي رائحة السمك وبعضها لم يعطِ .+ نتيجة موجبة .- نتيجة سالبة

أثبت الفحص المجهري لأفرازات المهبل بطريقة المسحة الرطبة وجود الخلايا المفتاحية في جميع حالات اخماج المهبل البكتيري التي عزلت منها بكتيريا الـ *G.vaginalis* إذ تظهر الخلايا لمفتاحية على هيئة خلايا حرشفية محاطة بالخلايا البكتيرية المصبغة بصبغة غرام. بينت النتائج ارتفاع نسبة الأصابة بخمج المهبل البكتيري بين النساء الحوامل والمجهضات لأكثر من مرة واحدة مقارنة مع النساء الحوامل والمجهضات لمرة واحدة إذ بلغت 37% و33% وعلى التوالي مقارنة مع النساء غير حوامل وغير مجهضات 30%كما لوحظ ارتفاع نسبة الأصابة بخمج المهبل البكتيري عند النساء اللواتي تراوحت اعمارهن بين (16-26) سنة إذ بلغت 44 حالة على حين تلتها النساء الذين تراوحت أعمارهن (27-38) سنة إذ بلغت عدد حالات المصابات بخمج المهبل البكتيري 38 حالة على حين أقل نسبة أصابة بالتهاب المهبل البكتيري كانت لدى النساء في عمر(39-48) سنة إذ بلغت18 حالة فقط .

اوضحت النتائج ان اعلى نسبة اصابة بخمج المهبل البكتيري كانت لدى النساء الحوامل والمجهضات لأكثر من مرة واحدة واللواتي تراوحت اعمارهن بين (16-26) سنة اذ بلغت 19(43%) على حين ان اقل نسبة اصابة كانت لدى النساء غير حوامل وغير مجهضات واللواتي تراوحت اعمارهن بين (39-48) حيث بلغت 2(11%).

جدول (2) النسب المئوية لحالات اخماج المهبل البكتيري.

الحالات	الفئات العمرية (%)			المجموع الكلي للعينات
	(16-26)سنة	(27-38)سنة	(39-48) سنة	
نساء حوامل ومجهضات لأكثر من مرة واحدة	19 (43%)	14 (37%)	4(22%)	37

Al-Kufa University Journal for Biology / VOL.8 / NO.1 / Year: 2016
Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544

نساء حوامل ومجهضات لمرة واحدة	10 (23%)	11 (29%)	12 (67%)	33
نساء غير حوامل غير مجهضات	15 (34%)	13 (34%)	2 (11%)	30
المجموع الكلي للعينات(%)	44(100%)	38(100%)	18(100%)	100(100%)

إنّ نتائج انتشار خمج المهبل البكتيري جاءت متقاربة مع العديد من الدراسات , فقد اشار Dadhwal وجماعته (2010) إلى ان نسبة انتشار التهاب المهبل البكتيري عند النساء في دلهي هي 23%على حين بين soble (2000) أن نسبة انتشار التهاب الهبل البكتيري بين النساء الأفريقيات(30-50)% بينما لم تتفق نتائج الدراسة مع sheikh وجماعته (2013) الذين أشارو إلى ان نسبة تفشي التهاب المهبل البكتيري في كراتشي هي 55% . اعتمدت معايير امسل في تشخيص خمج المهبل البكتيري وبينت النتائج إنّ اعتماد وجود الخلايا المفتاحية ونتائج التفاعل مع KOH تعد من الأختيارات الضرورية لتشخيص خمج المهبل البكتيري عن غيره من حالات اخماج المهبل. وجاءت هذه النتائج غير متوافقة مع Alshemety (2006)الذي اعتمد على اختبارات أمسل كافة في تشخيص خمج المهبل البكتيري, وكانت متوافقة مع Mittal (2012) الذي أشار إلى ضرورة اعتماد اختبارين فقط من فحوصات أمسل لتشخيص اخماج المهبل البكتيري .إن تغاير الوان الأفرازات المهبلية لا يرتبط مع حالات اخماج المهبل البكتيري الناتج عن الأصابة ببكتيريا *G.vaginalis* فقد أشار Begumوجماعته (2010) إن لون الأفرازات المهبلية الناتجة عن الأصابة ببكتيريا *G.vaginalis* تراوح بين الأبيض – الرصاصي على حين بين Gibbes و Sweet (1990) إن لون الأفرازات المهبلية الرمادية يرتبط مع وجود بكتيريا *G.vaginalis*.

بينت نتائج الدراسة أختلاف في قيم الأس الهايدروجيني المرتبط مع حالات اخماج المهبل البكتيري إذ تراوحت بين (4.3-7) وهذا لا يتفق مع Begum وجماعته (2010) الذي أشار إلى إن قيم الأس الهايدروجيني الناتجة عن التهاب المهبل البكتيري تزيد عن 4.5 . إن ارتفاع قيم الأس الهايدوجيني للأفرازات المهبلية عن 5.5 ممكن إن يعود إلى اختلاط افرازات المهبل مع افرازات عنق الرحم (Amsel *et al.*,1983), أو قد يعزى إلى نشاط كائنات مجهرية أخرى مثل طفيلي *T. vaginlis* أو الخمائر *Candida spp* التي تسبب أعراض سريرية مشابهة إلى الأعراض الناتجة عن الأصابة ببكتيريا *G.vaginalis* . كما إنها تسبب رفع قيم الأس الهايدروجيني (Shelia *et al.* , 2001).

اظهرت النتائج إن تفاعل الأفرازات المهبلية مع هيدروكسيد البوتاسيوم KOH أدى إلى إنبعاث رائحة تشبه رائحة السمك الفاسد مما يشير إلى إنتاج الامين (Trimethylamine) كناتج نهائي من هذا التفاعل جاءت نتائج الدراسة متوافقة مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى إن إنبعاث رائحة الأمين من الأفرازات المهبلية بعد أضافة هيدروكسيد البوتاسيوم اليها يعزى إلى وجود بكتيريا *G.vaginalis* (Alzubadi,2012, wolarth *et al.* ,2002 , weatheral *et al.* 1996), من ناحية أخرى أشارت بعض دراسات إلى إن إنبعاث رائحة الأمين من الأفرازات المهبلية فضلاً عن وجود بكتيريا *G.vaginalis* ممكن إن يعزى إلى وجود طفيلي *T. vaginalis* أو وجود الحيامن في الأفرازات المهبلية فضلاً عن وجود بكتيريا *G.vaginalis* (Meijden.,1984 ; Blaekwell and Barlow ,1982). إنّ وجود الحيامن في الأفرازات المهبلية ممكن إن تكون حلقة أورماتية عند تفاعلها مع هيدروكسيد البوتاسيوم مما يؤدي إلى تداخلها مع بكتيريا *G. vaginalis* (السعدي ، 2001), كما إن وجود طفيلي *Trichomonas vaginalis* يؤدي إلى تطاير بعض المركبات منها سائل (cadaverine) وبلورات (pustersine) التي تعطي رائحة الأمين وتتداخل مع بكتيريا *G.vaginalis* (Eschenbach,1986)

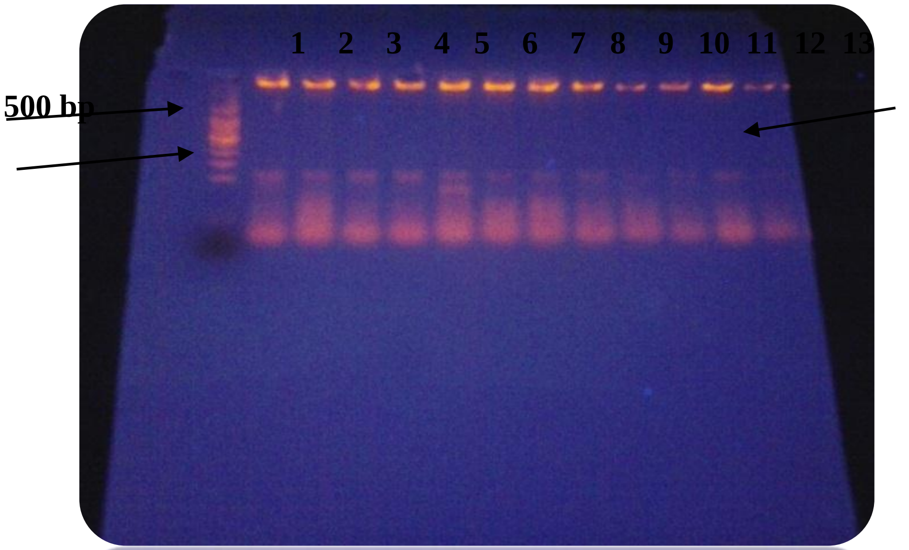
اوضحت النتائج الجدول (2) وجود الخلايا المفتاحية في جميع عينات افرازات المهبل التي عزلت منها البكتيريا, وجاءت هذه النتائج متوافقة مع العديد من الدراسات التي اشارت إلى وجود علاقة بين وجود الخلايا المفتاحية ووجود بكتيريا *G.vaginalis* (Spinillo *et al.*,1997; Priestly *et al.* ,1996) أستخدمت طريقة المسحة الرطبة للأفرازات المهبلية في التحري المباشر عن وجود الخلايا المفتاحية في الأفرازات المهبلية والتي تعد مؤشراً لحدوث الأصابة بخمج المهبل البكتيري وجاءت النتائج متوافقة مع العديد من الدراسات التي أشارت إلى وجود الخلايا المفتاحية في 94% من حالات خمج المهبل البكتيري (Begum *et al* , 2010;Cook *etal.*,1989; Amsel *et al.*,1983) كما

URL: http://www.uokufa.edu.iq/journals/index.php/ajb/index
http://iasj.net/iasj?func=issues&jId=129&uiLanguage=en
http://www.drji.org/JournalProfile.aspx?jid=2073-8854
Email: biomgzn.sci@uokufa.edu.iq

أستخدمت طريقة التصبيغ المباشر للعينة بأستخدام صبغة غرام وتعد هذه الطريقة أفضل من طريقة المسحة الرطبة إذ تعتمد هذه الطريقة على مشاهدة اشكال الخلايا البكتيرية في العينة فضلاً عن حساب أعداد الخلايا في الحقل المجهري , وجاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع Begum وجماعته (2010) الذين أشارو إلى اعتماد التصبيغ المباشر بصبغة غرام في التحري عن وجود بكتيريا *G.vaginalis* في الأفرازات المهبلية, كما جاءت النتائج متفقة مع Nugeut وجماعته (1991) الذي أكد اعتماد طريقة التصبيغ المباشر بصبغة غرام للأفرازات المهبلية في الكشف عن خمج المهبل البكتيري .

عزل وتشخيص بكتيريا *G. vaginalis* :

بينت نتائج الدراسة الحالية عائدية 10 عزلات بكتيرية لبكتيريا *G.vaginalis* إذ ظهرت مستعمرات هذه البكتيريا النامية على وسط أكار الكولومبيا المجهزة بـ 5% من دم الإنسان الطازج مضافاً إليه المضادين Nalidixic acid و Gentamycin, على هيئة مستعمرات صغيرة الحجم (بحجم رأس الدبوس) دائرية ملساء معتمة تعطي تحلل للدم من نوع β يعمل المضادان Nalidixic acid و Gentamycin على تثبيط نمو مدى واسع من الأحياء المجهرية مما يسمح للعزل الإنتقائي لبكتيريا *G.vaginalis* . (Emmerson and jones.,2003; singhal *et al.*, 1992). تم تشخيص بكتيريا *G.vaginalis* جزيئياً بأستخدام تقنية تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل (PCR) باستعمال الجين (16S rRNA). أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز لنواتج تضخيم الجين عائدية (25) عزلة لبكتيريا *G.vaginalis* بظهور حزمة ذات وزن جزيئي 118 زوج قاعدي شكل (1) .



شكل(2): الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنواتج تضخيم الجين 16S rRNA لتشخيص بكتيريا *Gardnerella vaginalis* (80 فولت لمدة ساعة واحدة)

العمود1: دليل الـ DNA (100bp)

العمود 2- 13 : عزلات بكتيريا *Gardnerella vaginalis*

يبين الجدول (3) النسب المئوية لأعداد بكتيريا*G.vaginalis*. المعزولة من النساء المصابات بخمج المهبل البكتيري وفقاً للتشخيص الجزيئي ويشير الجدول إلى إن أعلى نسبة عزل لهذه البكتيريا كان في النساء الحوامل المجهضات لأكثر من مرة واحدة إذ بلغت 32% بينما أقل نسبة عزل كانت من النساء غير الحوامل غير المجهضات إذ بلغت نسبة العزل (20%).

جدول (3) النسبة المئوية لأعداد بكتيريا *G.vaginalis* المعزولة من النساء المصابات بخمج المهبل البكتيري.

الحالة	العدد	عدد البكتيريا (%)
نساء حوامل مجهضات لأكثر من مرة واحدة	37	12 (48%)
نساء حوامل مجهضات لمرة واحدة	33	8(32%)
نساء غير حوامل غير مجهضات	30	5 (20%)
المجموع الكلي (%)	100	25(100%)

تعتبر بكتيريا *G.vaginalis* أهم الإنواع البكتيرية المسببة لألتهاب المهبل البكتيري (DiGiulio *et al.* ,2008) أشار الباحث Nester وجماعته (1998) إلى إن حدوث مثل هذه الاخماج بشكل متكرر أثناء عمر المرأة يعزى الى الاختلاف في التوزان المايكروبي بين الأحياء المتعايشة والتي تشكل النبيت الطبيعي Normal Flora وزيادة نوع معين من تلك الاحياء على الإنواع الاخرى ، فضلاً عن اختزال عدد من الإنواع ذات التأثير المثبط على الاحياء الموجودة الاخرى ، فضلاً عن اسباب اخرى مثل تناول حبوب منع الحمل وغيرها مما يشجع عملية الاصابة بالبكتيريا مع ظهور الاعراض المرضية مثل الافرازات المهبلية والحكة وتغير الاس الحامضي(pH)

تفاوت نسب عزل هذه البكتيريا في دراسات أخرى فقد أشار Adimn وجماعته (2000) إلى إن نسبة عزل هذه البكتيريا كانت 40.8% من حالات خمج المهبل البكتيري لدى النساء في نيجيريا, بينما وجد McGregor (1993) وThomson وجماعته (1990) إن 50% من أصابات القناة التناسلية تعود إلى الإصابة ببكتيريا *G.vaginalis* ، أما في بنغلادش فقد عزلت البكتيريا بنسبة 24% من نساء مصابات بخمج المهبل البكتيري, بينما كانت بكتيريا *G.vaginalis* هي المسؤولة عن 40-45% من حالات الخمج المهبل البكتيري عند النساء في عمر الإنجاب في أمريكا وأوربا (Marrazzo *et al.*,2009).إن هذا التفاوت في نسب عزل بكتيريا *G.vaginalis* ربما يعزى إلى حجم وطبيعة المناطق الجغرافية التي تم أخذ العينات منها. او قد يعزى الى تعاطي المرضى بعض المضادات الحيوية التي أدت إلى قتل البكتيريا وعدم ظهورها عند الزرع فضلاً عن عوامل أخرى تؤثر على إبقاء وكثافة الأحياء المجهرية في القناة التناسلية الإنثوية ومنها إنخفاض الرقم الهيدروجيني وشدة الأوكسجين وإنتاج مواد مثبطة من قبل كل الأحياء والقناة التناسلية وتنافس مجاميع الأحياء المجهرية على الغذاء (1977 , Corbishley ;السعدي, 2001). يعزى ارتفاع نسبة عزل البكتيريا من النساء الحوامل بصورة عامة مقارنة مع النساء غير الحوامل إلى أختلال هرمون الأستروجين أثناء الحمل الذي يعمل على تحويل الكلايكوجين إلى حامض اللاكتك والذي يعطي pH حامضي للمهبل, فضلاً عن تأثيره على إنتاج بيروكسيد الهيدروجيني والذي له اثر كبير في منع استعمار البكتيريا يؤدي التغيير في حامضية المهبل إلى توفير بيئة ملائمة لمنو بكتيريا *G.vaginalis* إذ تعمل هذه البكتيريا على المهاجمة والاتصاق بالخلايا الطلائية المبطنة للرحم , من ناحية أخرى تهاجم هذه البكتيريا أغشية الجنين السليمة أو تهاجم منطقة chorioamnotic membrane area المسؤولة عن الإنتاج الموضعي لإنزيم phospholipaseA2 وتحرير prostoglandin وهو الهرمون المهم يسهم في عملية حدوث الولادة المبكرة أو الأجهاض وتمزيق الأغشية غير الناضجة (Gravet *et al.* , 1986) .

بينت دراسات أخرى إن وجود بكتيريا *Lactobacillus* يعمل على تثبيط نمو الإنواع البكتيرية المرضية الأخرى بما فيها *G.vaginalis* وذلك بسبب قابلية هذه البكتيريا على إنتاج H_2O_2 واليكتريوسين, والتي تؤمن بيئة حامضية للمهبل لذا فإن إنخفاض أعداد هذه البكتيريا سوف يؤدي إلى نمو ونشاط الإنواع البكتيرية المرضية الأخرى (Linhares *et al.*,2010 ؛ لسلطاني ، 2012). كما بين AL- Malik وجماعته (2009) إنّ الأضطرابات الهرمونية المرافقة للعقم عند النساء يجعل النساء أكثر عرضة للأصابة ببكتيريا *G.vaginalis* أو الفطريات مثل *Monelliae*.

جاءت نتائج التشخيص الجزيئي لبكتيريا *G.vaginalis* بتقنية الـPCR بأستخدام الجين 16S r RNA متوافقة مع العديد من الدراسات , فقد أشار Backer وجماعته (2007) إلى إن 68% من عزلات بكتيريا *G.vaginalis* شخصت بأستخدام

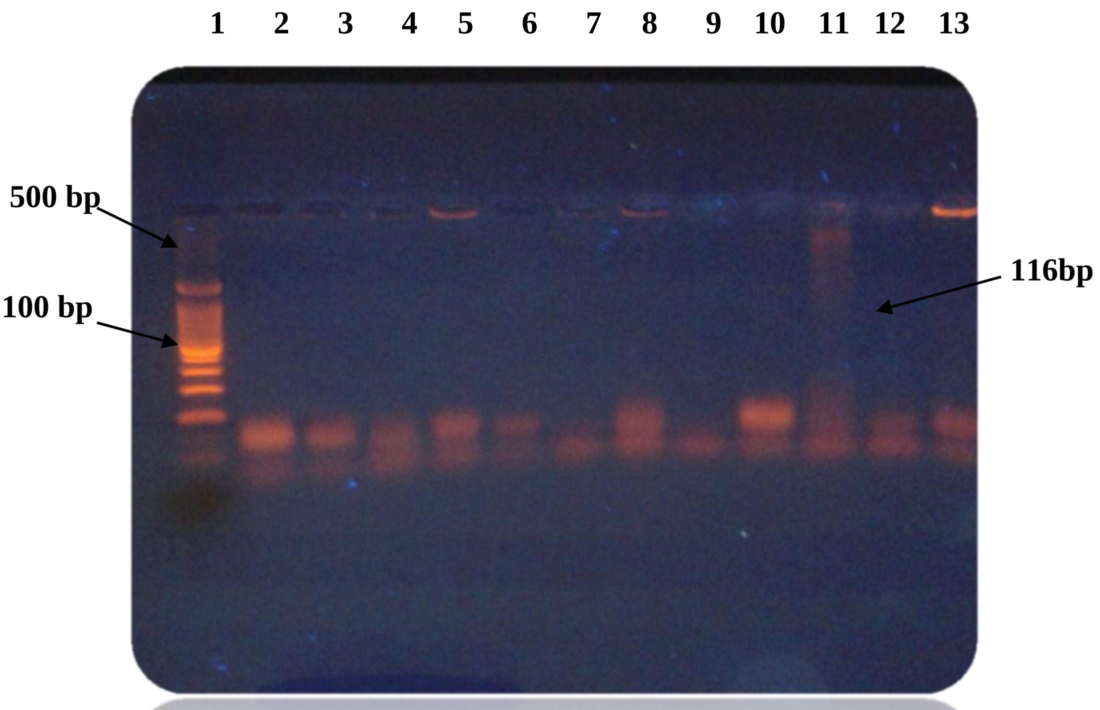
URL: http://www.uokufa.edu.iq/journals/index.php/ajb/index
http://iasj.net/iasj?func=issues&jId=129&uiLanguage=en
http://www.drji.org/JournalProfile.aspx?jid=2073-8854
Email: biomgzn.sci@uokufa.edu.iq

16Sr RNA كما بين Menard وجماعته (2010) إن تقنية PCR أعطت حساسية 100% وخصوصية 93% في تشخيص عزلات بكتيريا *G.vaginalis* في مختلف العينات وأشار Menard وجماعته (2008) إلى إن 70% من عزلات بكتيريا *G.vaginalis* شخصت بأستخدام *cpn* 60.

تعد تقنية الـPCR من التقنيات الجزيئية الدقيقة في تشخيص الإنواع البكتيرية بما فيها بكتيريا الـ *G.vaginalis* إذ تسمح هذه التقنية بالكشف عن البكتيريا الميتة أو غير الفعالة اوحتى في حالة كون البكتيريا في حالة سكون (Beaker *et al.*, 2007). بين Menard وجماعته (2010) إن تقنية الـ PCR كانت أكثر دقة في تشخيص بكتيريا *G.vaginalis* في العينات التي أعطت نتائج سالبة بأستخدام الطرق التقليدية أو في العينات التي أعطت نتيجة سالبة بأستخدام فحوصات Amsel.

الكشف الجزيئي عن إنزيم الـ Sialidase

تم التحري عن قابلية بكتيريا *G.vaginalis* على إنتاج إنزيم الـ saildiase جزيئياً بأستخدام بادئات الجين (16S rRNA) اذ تم الكشف عن هذا الإنزيم جزيئياً في جميع عينات الأفراز المهبلي التي جمعت من حالات اخماج المهبل البكتيري . أظهرت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز لنواتج تضخيم الجين(16S rRNA) قابلية 24 عزلة لبكتيريا *G.vaginalis* المشخصة جزيئياً على إنتاج إنزيم الـ sialidase وذلك بظهور حزمة ذات وزن جزيئي 116 زوج قاعدي شكل (2) .



شكل(2): الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز لنواتج تضخيم الجين 16S rRNA لتشخيص إنزيم Sialidase في بكتيريا *Gardnerella vaginalis* (80 فولت لمدة ساعة واحدة)

العمود1: دليل الـ DNA (100bp)

العمود 2-6 و8 و10-13: عزلات بكتيريا *Gardnerella vaginalis* الحاملة للجين المسؤول عن إنتاج إنزيم الـ Sialidase

العمود 7 و9 : عزلات بكتيريا *Gardnrella vaginalis* غير الحاملة للجين المسؤول عن إنتاج إنزيم الـ Sialidase .

كانت نتائج التشخيص الجزيئي لإنزيم الـ sialidase غير متوافقة مع Lopes وجماعته (2011) الذي أشار إلى قابلية 51% من عزلات بكتيريا *G.vaginalis* على إنتاج إنزيم الـ sialdiase كما إنها لم تتوافق مع Monkela و Pryke (2009) اللذان أشارا إلى إن 39% فقط من عزلات بكتيريا *G.vaginalis*لها القابلية على إنتاج هذا الإنزيم. يعمل إنزيم الـ Sialidaseعلى تحطيم طبقة Mucine الموجودة في الطبقة الطلائية المهبلية وتعزيز التصاق البكتيريا كما إنه يعمل على أضعاف المناعة عن طريق شطر بقايا حامض السياليك الطرفية الموجودة في جزيئة IgA و IgM . بينت النتائج وجود الإنزيم في عينات الأفراز المهبلية التي شخصت بها بكتيريا *G.vaginalis* وجاءت هذه النتيجة متوافقة مع Lopes وجماعته 2011 الذي أشار إلى وجود علاقة بين إنتاج إنزيم الـ sialidase والنمط الوراثي اذ بين إن النمط الوراثي الثاني ليس له القابلية على إنتاج إنزيم الـsialidase مما يشير إلى إن عدم وجود إنزيم الـ sialdiase في عينة الافراز المهبلي التي شخصت فيها بكتيريا *G.vaginalis* جزيئياً إن تكون تلك البكتيريا هي من النمط الوراثي الثاني genotype2 *G.vaginalis* .

المصادر العربية :

- السلطاني ,شيماء جاسم محميد .(2012).دراسة عوامل الضراوه لبكتريا *Gardnerella vaginalis*المعزولة من نساء مصابات بالتهاب المهبل البكتيري . اطروحة دكتوراه , كلية العلوم ,جامعة بابل .
- السعدي,ريا عزت معروف .(2001). دراسة بكتيرولوجية ووراثية لبكتريا *Gardnerella vaginalis* المعزولة محليا.

- **References**:

- Adinma, J.I.; Okwoli,R.N.;Agbai,A.O. and Unaeze ,N.C .(2000) .*Gardnerella vaginalis* in Nigeran Igbo women .Trop .J.Obstet . Gynaecol., 17:21-23.
- AL-Shimerty,E.E.A.(2006).Microbiological study of cervicitis among women in Najaf AL-Ashraf city . Msc. thesis. College of .Kufa University.
- Al-Zubaidi, Rawaa Abdul jabbar Muhammed.(2012). Isolation and identification of *Gardnerella vaginalis* from Genital infections among women in Baghdad area Hospitals, and study the effects of antibiotics and some chemicals,thesis, College of Science, Al- Mustansiriyah University
- Amsel, R.; Totten, P.A.; Spiegal, C.A. (1983). Non specific vaginitis: Diagnostic criteria microbial and epidemiological associations. and with bacterial vaginosis. Obstet Gynecol., 67:229–23.
- Blackwell, A. and Barlow, D.(1982).clinic diagnosis of anaerobic vaginosis (non-Specific Vaginitis). Br.J. Vener.Dis.,58(6):387-393.
- Backer,E.D.;Verhels,R.; Verstraelen ,H.;Alqumber,M.A.;Burton ,J.P.;Temmerman,M.and Vaneechotte,M.(2007).Quantitative determination by real-time PCR of for vaginal Lactobacillus species , *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L.gasseri* and *L.iners*.BMC Micro.,7:115.
- Begum,N.;Muazzam.N.;Shamsuzzaman . S.M.;Chowdhury .A. ;Rashid .AandIslam.R.(2010).Diagnosis of bacterial vaginosis by Acridine Orange staining and it,s comparison,to conventional methods and association of Gardnerella vaginalis with bacterial vaginosis .J.Med.Micro .4(01) :37 – 42.
- Briselden ,A.N.;Moucla,B.J.;Stevens, C.E.;Hillier ,S.L.(1992) .Sialidase (neuraminidase)in bacterial vaginosis and bacterial vaginosis .associated microflora .J.Clin .Micro.,30:663-666.

- Cauci, S .;Driussi,S.;Monte,R.Lanzafame,P.;pitzus,E.;and Quadrifoglio ,f.(1998).Immunoglobulin Aresponse against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and sialidase activity in bacterial vaginosis .Am.j.Obstet . Gyne . 178:511-515.
- Cook,R.L.;Reid,G.; Pond,D.G.;Schmitt,C.A.and Sobel,J.D .(1989).Clue cell in bacterial vaginosis :immunofluorescent identification of the adherent-gram negative bacteria as *Gardnerella vaginalis* .J.Infect.Dis .160(3):490 – 496.
- Corbishley ,C.M.(1977).Microbial flora of vagina and cervix .J.Clin .Patho.30:745 – 748.
- Dadhwal ,V.; Hariparsad, R.; Mittal, S.and Kapil, A.(2010) .Prevalence value of clinical diagnosis. Arch gynccol Obstet; 281:101-4.
- DiGiulio, D.B.; Romero, R.; Amogan, H.P.; Kusanovic, J.P.; Bike, E.M.; Gotsch, F.; Kim, C.J.; Erez, O.; Edwin, S. and Relamn, D.A. (2008) Microbiol prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during pretetm labor: a molecular and culture-based investigation. Plos one., 3(8): p. e3056.
- Gardner, H.L. and Dukes C.D. (1955).*Haemophilus vaginalis* vaginitis: A newly defined specific infection previously classified "non specific vaginitis. Am.J Obstet. Gynec. 69(5): 962-976.
- Gravett, M.G.; Hummel, D. and Eschenbach, D.A. (1986). Preterm labor associated with subclinical Amniotic fluid infection.
- Linhares,L.M.;Giralod,P.C. and Baracat,E.C.(2010). New findings about vaginal bacterial flora.Rev . Assoc.med.Bras., 56(3):370-4.
- Lopes,G.;Deschaght,P.;Alia,N.E.;Kama,T.N.and vaneechoutte,M .(2011). *Gardnerella vaginalis* comprises three distinct genotypes of which only two produce sialidase.Amer.,J. of obst. an Gyneco.pag.450 el – 450 e7 .
- Marrazzo, J.M.; Antonio ,M.; Agnew ,K.and Hillier ,S.L.;(2009) Distribution of genital Lactobacillus strains shared by female sex partners. J Infect Dis; 199(5):680-683.
- McGregor J.A.; David L.; Amalia, F.B. and James K.T.(1991). Phospholipase C activity in microorganisms associated with reproductive tract infection. Am J ObstetGynecol,164:682-6.
- Meijden,W.I.(1984). Clinical Aspects of *Gardnerella vaginalis* – associated vaginitis .Scand .j.Urol.Nephro.Suppl.,86:135-141.
- Menard, J.P.; Fenollar, F.; Henry, M.; Bretelle, F. and Raoult, D.(2008). Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and Atopobium vaginae loads to predict bacterial vaginosis. Clin. Infect. Dis., 47:33-43.
- Menard,J.P.;Mazouni,C.;Fenollar,F.;Raoult ,B.and Bretella.F .(2010) .Dignostic accurancy of real-time PCR assay versus clinical and Gram stain identification of bacterial vaginosis Eur.Clin. Micro. Infect.Dis.
- Mittal,V.;Jain ,A. and PRADEEP ,y.(2012).Development of modified diagnostic criteria for bacterial vaginosis at peripheral health centres in developing countries .J. Infect.Dev .Ctries .,6(5):373 – 377.
- Moncla, B.J.and Pryke, K.M.(2009). Oleate lipase activity in Gardnerella vaginalis and reconsideration of existing biotype schemes. BMC Microbiol., 9:78-82.
- Mulks,M.H. and Shoberg,R.H.(1994).Bacterial immunoglobulin A protease.methods Enzymol.,235:55.
- Nester,E.;Pearsall,N.and Anderson.(1998).Ahuman perspective .2nd ed .WCB.McGra-Hill.

- Okowli ,R.N.; Brain-D Adinma,J.I. And Nnaeze ,C.N.(2002) Laboratory diagnosis of *Gardnerella vaginalis* vaginosis . WAJM.Vol.21.no.,3:244-247.
- Priestley ,C.J.F.and Kinghorn,G.R.(1996).Bacterial vaginosis .B.J.C.P.,50(6):331-334.
- Shaikh, S.; Shaikh, S.A. and Zia, B.(2013).Bacterial vaginosis; Frequency of asymptomatic pregnant women. Professional Med J.,20(2): 214-219.
- Shelia,A.;Lima,R.;Sawan,Z.;Silva,M.;Souza,M.;Saldaha.J.;Falco,v.;Cunha,A .and Murta.E.(2001). Freqaency of *Trichomonas vaginalis* ,Candida sp, *Gardnerella vaginalis* and cervical –vaginal smears in four different decades Sao .Paulo .Med.J .,119 (6) :200-5.
- Spinillo , A.; Bernuzzi, A.M.;cevini,C.; Gulminetti ,R.;Luzi,S.and Desantolo A .(1997): The relationship infection to symptomatic vaginitis in post menopausal women attending avaginitis clinic.Maturitas.Jul.,27(3):253-60.
- Sweet,R.L.and Gibbs,R.S.(1990) Ifection disease of the female gental tract ,2ndedition .Williams and wilkins London.
- Thomason,J.L.;Gelbart.S.M.;Anderson,R.J.;Walt,A.K.;Osypwoski,P.J.and Broekhuizen,F.F.(1990).Statistical evaluation of diagnostic criteria for bacterial vaginosis .Am.J .Obstet .Gynecol ., 162:155-160.
- Weatherall,D.J.;Ledingham ,J.G.G. and Warrell ,D.A .(1996) .Oxford textbook of medicine .Vol.1(3rd ed). Oxford University Press Inc .New Y0rk.
- Wolrath,H.;Boren,H.;Hallen,A. and Forsum,U.(2002) .Trimethylamine content in vaginal secretion and its relation to bacteria l vaginosis .APMIS. ,110:819 – 824.
- Zariffard,M.R.;Saifuddin,M.;Sha,B.E.and Spear ,G.T.(2002). Detection of Becterial vaginosis-related organism . by real time PCR for Lactobacilli,Gardnerella vaginolis and Mycoplasma hominins FE immune med microbial .,34(4):277-281.

***Molecular characterization of sialidase produce by Gardnerella vaginalis associated with bacterial vaginosis ***

Summary

Include study of 100 swab of vaginal secretion from pregnant and non pregnant women, abortifacient or not abortifacien about(16-48)years old whom administered to the AL-Zahraa teaching hospital and outpatient in AL-Najaf AL-Ashraf city has been collected during the period from Octobrt 2012 to March 2013.According to Amsel test the results showed highly distribution of BVamong pregnant and non-pergnant as well as abortifacient for one or more than one .The percent of BV infection among pregnant women ,abortifacient more than one about (16-26)years old was higher (%43) than its among non pergnant women ,non abortifacient about(37-48) years old which was(%11).The results of primary isolation and laboratory diaginosis as well as some biochemical test improved that only 10 isolates were belong to G.vaginalis ,while the results of amplification of 16S rRNA for genetic diagnosis of G.vaginalis by polymerase chain reaction(PCR) showed that 25 isolates were belong to G.vaginalis in vaginal secretion The presence of IS gene encoding sialidase was detected in all vaginal secretion of women suffering from BV by polymerase chain reaction (PCR).The results revealed the presence of SI gene in 24 vaginal secretion samples and only 24 isolates of G.vaginalis had this gene .The study aimed to shed light on bacteria *G. vaginalis* as one of the most important causes of bacterial infection of the vagina when women and Doranzim the (sialidase) to increase the ferocity of these bacteria.