بررسی شیوع آتوپوبیوم واژینا در نمونه‌های واژینال زنان غیرباردار دارای علائم

حمیده مفتون [۱](M.Sc)، نور امیرمظفری [*۱](Ph.D)، مریم کاشانیان [۲](M.D)، مژگان عشاقی [۳](Ph.D)

۱- گروه میکروب‌شناسی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲- گروه زنان و زایمان، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۳- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: واژینوز باکتریایی یک عفونت تک عاملی نبوده بلکه مخلوط سینرژیک از باکتری‌های میکروآئروفیل، گونه‌های مایکوپلاسما و بی‌هوازی‌ها مانند: آتوپوبیوم واژینا، پورفیرومواناس، باکتروئیدس‌ها، پرووتلا و سایر باکتری‌ها می‌باشد. هدف از این مطالعه، تشخیص شیوع باکتری آتوپوبیوم واژینا در زنان غیر باردار دارای علائم در سنین مختلف می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این بررسی، ۱۰۲ زن مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید اکبرآبادی شهر تهران، از نظر ابتلا به واژینوز باکتریایی مورد آزمایش قرار گرفتند. به منظور جداسازی باکتری آتوپوبیوم واژینا کشت از نمونه ترشحات واژینال در محیط کلمبیا آگار حاوی ۳ آنتی‌بیوتیک آمفوتریسین B، نالیدیکسیک اسید و کلیستین و هم‌چنین در محیط بلاد آگار با خون تازه انسانی به اضافه‌ی آمفوتریسین B در شرایط بی‌هوازی انجام شد. پس از استخراج DNA از کشت و نمونه بالینی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با پرایمر اختصاصی صورت گرفت.

یافته‌ها: از میان ۱۰۲ مورد بالینی، ۳۸ نمونه مبتلا به واژینوز باکتریایی تشخیص داده شد. از این ۳۸ مورد، آتوپوبیوم واژینا در ۲۵ مورد (۶۵٪) از نمونه‌ها توسط تست PCR مثبت بود.

نتیجه‌گیری: این مطالعه، اولین گزارش از آتوپوبیوم واژینا در ارتباط با واژینوز باکتریایی در ایران می‌باشد، نتایج این تحقیق نشان داد که آتوپوبیوم واژینا در ایجاد واژینوز باکتریایی نقش بسزایی دارد و باید از نظر بالینی و آزمایشگاهی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: التهاب باکتریایی واژن، مونث، زنان، واکنش زنجیره ای پلیمراز

مقدمه

واژینوز باکتریایی، عمومی‌ترین عفونت مجرای ژنیتال در زنان در سنین بلوغ می‌باشد و یک سندرمی در ارتباط با تغییرات فلور نرمال واژن است که باعث ایجاد ترشحات بدبو، سوزش و خارش در زنان می‌شود [۱-۴]. غالب‌ترین باکتری که عامل واژینوز باکتریایی بوده گاردنرلا واژینالیس به همراه آتوپوبیوم واژینا می‌باشد که اخیراً در ارتباط با واژینوز باکتریایی شناسایی شده است [۵-۷]. تشخیص واژینوز باکتریایی بدین گونه می‌باشد که اگر در بیماری ۳ مورد از موارد زیر مثبت باشد مبتلا تشخیص داده خواهد شد [۸-۱۰]: ترشحات واژینال سفید- خاکستری هموژن، pH بالای ۴/۵، تولید بوی گندیده‌ی ماهی با افزودن هیدروکسید پتاسیم ۱۰٪

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۸۷۷۹۸۸

Email: amirmozafari@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۴

به ترشحات واژن تست ویف (Whiff) مثبت، حضور Clue cell. در واژینوز باکتریایی تعداد لاکتوباسیل‌ها به شدت کاهش می‌یابد و تعداد باکتری‌های بی‌هوازی اجباری گرم منفی و سایر باکتری‌ها مانند: گاردنرلا واژینالیس، آتوپوبیوم واژینا، موبیلینکوس، فوزوباکتریوم، باکتروئیدس و پرووتلا زیاد می‌شوند [۱۱-۱۳]. کلمه‌ی آتوپوبیوم به زبان یونانی به معنای "موجود زنده‌ی عجیب" می‌باشد [۱۳]. آتوپوبیوم اولین بار در سال ۱۹۹۲ توسط کولینز و والبنک پیشنهاد شد که قبلاً به عنوان لاکتوباسیل طبقه‌بندی می‌شد و در سال ۱۹۹۹ از زنان سالم بر اساس ارتباطات فیلوژنیک توسط سکانس ژن ۱۶ S rRNA شناسایی شد [۱۴،۱۳]. جنس آتوپوبیوم شامل گونه‌های ریما، پاروولوس، مینوتوم، فوسور و واژینا می‌باشد [۱۷،۱۶،۱۵،۸]. تمام گونه‌های آتوپوبیوم برای انسان بیماری‌زا می‌باشند به‌جز آتوپوبیوم فوسور که برای انسان بیماری‌زا نیست و از اسب جدا می‌شود [۱۵]. آتوپوبیوم یک باکتری بی‌هوازی اجباری، کاتالاز منفی و اکسیداز منفی می‌باشد و به صورت کوکسی‌های گرم مثبت بیضوی به صورت تکی، دوتایی یا زنجیره‌های کوتاه مشاهده می‌شود و مقدار زیادی لاکتیک اسید تولید می‌کنند [۱۵،۱۱،۸]. اندازه‌ی این باکتری ۳-۸/۰×۱-۶/۰ میکرومتر می‌باشد [۱۵]. هیدرولیز آرژینین، لوسین آمینوپپتیداز، تخمیر گلوکز مثبت بوده و بیش‌ترین محصولی که در تخمیر گلوکز تولید می‌کند اسید لاکتیک، اسید فرمیک و اسید استیک می‌باشد [۱۱]. این باکتری به راحتی توسط روش‌های میکروب‌شناسی جداسازی نشده [۵-۷] و برای آن محیط کشت اختصاصی وجود ندارد [۱۱]. اطلاعات در مورد ژنتیک و ویرولانس باکتری محدود می‌باشد. در روش استاندارد برای تشخیص واژینوز باکتریایی از معیارهای وضع شده توسط Amsel و همکاران استفاده می‌شود [۱۸،۹-۱۶]. کشت، کمک خیلی زیادی به تشخیص واژینوز باکتریایی نمی‌کند، زیرا در افراد سالم نیز ممکن است بی‌هوازی‌ها، گاردنرلا واژینالیس و آتوپوبیوم واژینا از ترشحات واژن به دست آید. برخی از مطالعات انجام شده در ایران بیانگر شیوع بالای واژینوز باکتریایی در برخی از مناطق ایران هستند. در کشور ما روش‌های متعارف تشخیص باکتری‌ها بر پایه تشخیص بیوشیمیایی هستند که محدودیت‌های فراوانی دارند. این محدودیت‌ها شامل ضرورت انجام چندین مرحله آزمایش، نیاز به وسایل خاص و مواد گران‌قیمت، نیاز به مهارت و دقت بالای فرد آزمایش‌کننده و زمان طولانی لازم برای انجام برخی آزمایشات تشخیصی و در نهایت ابهام‌آمیز بودن پاسخ برخی آزمایش‌ها می‌باشند. روش‌های مولکولار ژنتیکی که برای تشخیص عوامل واژینوز مورد استفاده قرار می‌گیرند متعدد هستند. در این راستا، هدف از این مطالعه، تشخیص شیوع باکتری آتوپوبیوم واژینا در زنان غیر باردار دارای علائم در سنین مختلف مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید اکبرآبادی شهر تهران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه. در این مطالعه توصیفی- مقطعی، ۱۰۲ زن مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید اکبرآبادی شهر تهران از آذر ماه ۱۳۹۳ تا آبان ماه ۱۳۹۴، به مدت ۱۲ ماه مورد بررسی قرار گرفت. با تهیه پرسش‌نامه‌هایی حاوی مشخصات بیمار مانند سن، دلیل مراجعه، تعداد زایمان، نحوه زایمان، استفاده از آنتی‌بیوتیک در یک هفته‌ی اخیر، سوابق بیماران جمع‌آوری شد. نمونه‌برداری با استفاده از اسپکولوم از دهانه‌ی رحم زنان مراجعه‌کننده به وسیله سوآپ استریل توسط متخصص زنان و زایمان انجام شد. به منظور تشخیص واژینوز باکتریال از چند روش تشخیص آزمایشگاهی شامل اندازه‌گیری pH، تست Whiff، تهیه اسمیر مستقیم از ترشحات و مشاهده Clue cells کلوسل‌ها در گاردنرلا واژینالیس مشاهده می‌شوند ولی برای تشخیص واژینوز باکتریایی مهم می‌باشد و کشت بر روی محیط بلاد آگار، کلمبیا آگار و PBS بررسی مستقیم مولکولی) استفاده شد [۱۹،۱۷،۵].

استخراج DNA . پس از گذشت ۷۲-۴۸ ساعت از انکوباسیون نمونه بالینی کشت داده شده بر روی محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های رشد یافته باکتریایی که از نظر شکل و رنگ کلنی‌ها (سفید مایل خاکستری)

مشکوک به باکتری آتوپوبیوم واژینا برای تشخیص مولکولی انتخاب شدند. جهت استخراج مستقیم DNA از نمونه‌های بالینی و کلنی‌های مشکوک به باکتری آتوپوبیوم واژینا از کیت تخلیص شرکت یکتا تجهیز تحت عنوان (YTA Genomic Extraction Mini Kit for Blood/CulturedCell# YT9040) استفاده شد و میزان خلوص DNA توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز. پس از استخراج DNA ژنومی واکنش زنجیره‌ای پلیمرازPCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. پس از استخراج DNA ژنومی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر انجام گرفت. هر واکنش شامل ۲,۵ میکرولیتر بافر ۱۰X ، ۰,۵ میکرولیتر $Mgcl_2$ با غلظت ۱۰۰mm ، ۰,۵ میکرولیتر dNTP با غلظت ۲۰ mm ، ۱ میکرولیتر از غلظت ۱۰ pmol از آغازگرهای SrRNA ۱۶ که توالی آن ها در جدول شماره ۱ ذکر گردیده است (با محصول آمپلیکون ۱۵۵جفت بازی)، یک واحد آنزیم Taq polymerase و یک میکرولیتر از DNA ژنومی که با آب مقطر دو بار تقطیر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید.

واکنش در ۳۰ سیکل شامل مراحل واسرشت اولیه (Initial Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، واسرشت (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمرها (Annealing)در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، سنتز (Extension) در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و سنتز نهایی (Final Extension) به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس انجام شد. برای مشاهده نتیجه تکثیر هر یک از ژن‌های مورد مطالعه، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۲٪ در شرایط ۱۵۰ ولت در بافر TBE×10 تجاری (Fermentase) انجام شد [۱۹].

سکانسینگ محصول PCR . پس از مشاهده قطعه تکثیر یافته در محدود bp 155 بر روی ژل آگاروز به منظور تایید نهایی قطعه تکثیر یافته به‌همراه پرایمر فورووارد قطعه تکثیر یافته برای شرکت پیشگام (نمایندگی شرکت بایونیر کره جنوبی) ارسال شد. توالی‌های به‌دست آمده در موتور جستجوگر بانک جهانی ژن (NCBI) برای مقایسه و تراز کردن توالی‌های به‌دست آمده نوکلئوتید BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) شدند.

آنالیز آماری. آنالیز آماری با استفاده از ویرایش از نرم‌افزار SPSS، ورژن ۱۶ تحت ویندوز انجام گرفت. نتایج در متغیرهای کیفی به صورت فراوانی و فراونی نسبی و در مورد متغیرهای کمی به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان گردید. برای بررسی متغیرها بر حسب مورد از آزمون دقیق فیشر استفاده شد. سطح معنی‌داری بودن آزمون‌های آماری P<۰/۰۵ منظور گردید. حساسیت و ویژگی آزمایش مستقیم، کشت و روش مولکولی PCR تعیین گردید.

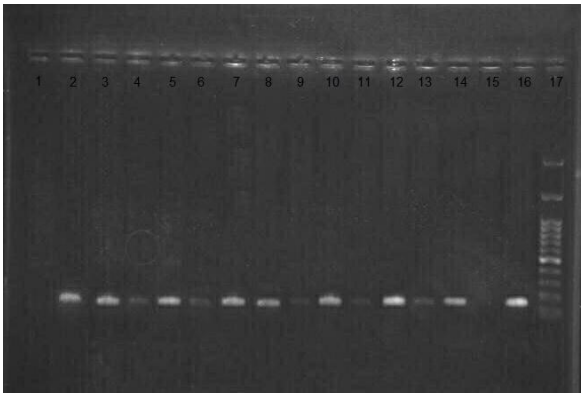
جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص آتوپوبیوم واژینا

اندازه ی جفت باز	سکانس	پرایمرها	دمای انلینگ	هدف
۱۵۵	AV F AV R	5′-TAGGTCAGGAGTTAAATCTG-3′ 5′-TCATGGCCCAGAAGACCGCC-3′	۶۰°C	تشخیص آتوپوبیوم واژینا

نتایج

در میان ۱۰۲ زن مراجعه‌کننده به بیمارستان شهید اکبر آبادی تهران، واژینوز باکتریایی در ۳۸ نمونه (۳۷٪)، ۲۵ (۶۵٪) با عامل آتوپوبیوم واژینا تا روش‌های تشخیص آزمایشگاهی تشخیص داده شد. میانگین سنی افراد تحت مطالعه ۲/۵±۲۸ (در محدوده سنی بیماران ۳۵–۱۸ سال) بود. میزان pH در زنان تحت مطالعه ۰/۵±۴/۵ بود. در آزمایش مستقیم با افزودن محلول ۱۰٪ KOH بر روی ترشحات

واژینال، بوی ماهی گندیده بـه وضـوح قابـل استشـمام بـود. حساسیت و ویژگی آزمایش مستقیم به ترتیـب ۸۰٪ و ۸۷٪ و کشت (کلنی‌های ریز سفید- خاکستری، برآمده، بدون همولیز) ۹۰٪ به‌دست آمد. پس از تکثیر و الکتروفورز محصول PCR مشاهده باند در ناحیه ۱۵۵ bp (شکل-۱)، ۳۸ نمونه با عامـل آتوپوبیوم واژینا شناسایی شد. نتایج مثبـت PCR مسـتقیم از نمونه بالینی و کشت دارای حساسـیت و ویژگـی ۹۵٪ و ۸۰٪ بود. پس از بلاست نمودن توالی سکانس ایزوله‌های بـه‌دسـت آمده مطالعه ما با سکانس ثبت شده از باکتری آتوپوبیوم واژینا در بانک ژنی با شماره ثبـت شـده KU513754.1 همولـوژی ۹۸٪ مشـاهده شـد. بـین آزمـایش مسـتقیم، کشـت و روش مولکولی PCR ارتباط معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵).



شکل۱. عکس ژل آگاروز الکتروفورز شده نمونه های واژینال. لاین۱ نمونه ی منفی آتوپوبیوم واژینا. لاین ۵،۷،۸،۱۰،۱۲،۱۴،۲،۳ نمونه های مثبت از نظر آتوپوبیوم واژینا به دست آمده از ژنوم استخراج شده مستقیم از نمونه های واژینال در بافرفسفات (PBS).لاین ۴،۶،۹،۱۱،۱۳ نمونه های مثبت از نظر آتوپوبیوم واژینا به دست آمده از ژنوم استخراج شده از کلنی های کشت شده باکتری آتوبوبیوم واژینا.لاین ۱۵ کنترل منفی. لاین ۱۶ نمونه کنترل مثبت (155bp)، لاین ۱۷ استاندارد وزن مولکولی DNA (1 kb Ladder).

بحث و نتیجه‌گیری

واژینوز باکتریایی در اثر رشد بـیش از حـد بـاکتری‌هـای بی‌هوازی، گاردنلا واژینالیس و آتوپوبیوم واژینا ایجاد می‌شود. عارضه شایع واژنی در سن باروری زنان اسـت. ایـن عارضـه موجب پارگی زودتر از موعد غشاها، درد زایمانی و تولد قبل از موعـد نـوزادان مـی‌گـردد. بـاکتری گـاردنلا واژینـالیس، آتوپوبیوم واژینا و گونه‌های موبیلونکوس به طور اختصاصی با این عارضه در ارتباط بوده‌اند. واژینوز باکتریال از شایع‌تـرین اختلالات واژن و در میان زنان سنین باروری اسـت کـه ۵۰-۴۰٪ زنـان سـنین بـاروری بـه آن دچـار مـی‌شـوند. افتـراق آتوپوبیوم واژینا از سایر باکتری‌های جنس آتوپوبیوم بر مبنای ژن srRNA 16 می‌باشد کـه تفـاوت ایـن ناحیـه ژنـی بـرای آتوپوبیوم واژینا با سایر باکتری‌های ایـن جـنس حـدود ۸-۳ درصد متفاوت است [۲۰،۵]. مطالعه‌ی حاضر، اولین مطالعه در ارتباط با آتوپوبیـوم واژینـا در واژینـوز باکتریـایی در ایـران می‌باشد. اگرچه واژینوز باکتریایی یک عفونت حاد نمی‌باشد و عفونت خفیف محسوب می‌شود اما باعـث وزن کـم نـوزاد در هنگـام تولـد، زایمـان زودرس، عفونـت‌هـای التهـابی لگـن، سیستیت، پیلونفریت و عفونت‌های ادراری می‌شود [۱-۴]. در بررسی حاضر، تمامی بیماران مبتلا بـه واژینـوز باکتریـایی در سنین باروری در حد فاصل ۳۵-۱۸ سال قرار داشتند. در این پـژوهش از محـیط اختصاصـی کلمبیـا آگـار حـاوی سـه آنتی‌بیوتیک و محیط بلادآگار برای کشت و روش PCR برای جداسازی باکتری آتوپوبیـوم واژینـا اسـتفاده گردیـد. محـیط کلمبیا آگار حاوی ۳ آنتی‌بیوتیک آمفوتریسـین، نالیدیکسـیک اسید و کلیستین بوده که مانع رشد باکتری‌هـای گـرم منفـی و گرم مثبت فلور نرمال واژن و قـارچ‌هـا مـی‌شـود. آتوپوبیـوم واژینا در ۷۸-۵۰٪ زنـان دارای واژینـوز باکتریـایی مشـاهده می‌شود [۲۱-۲۴]. که با مطالعه‌ی حاضـر همخـوانی دارد. در ایـن مطالعـه از ۱۰۲ نمونـه‌ی ترشـحات واژینـال، ۳۸ مـورد واژینوز باکتریـایی تشـخیص داده شـد کـه از ایـن ۳۸ مـورد واژینوز باکتریایی، ۲۵ مورد (۶۵٪) آتوپوبیوم واژینا یافت شد. در مطالعه‌ای که توسط فردریک و مارازو صورت گرفت [۲۵]، حساسـیت و اختصاصـیت آتوپوبیـوم واژینـا را در واژینـوز باکتریـایی ۹۶٪ و ۸۰٪ گـزارش کردنـد. تشـخیص آتوپوبیـوم واژینا از مایع واژن زنان سالم دشوار می‌باشد امـا در بیمـاران دارای واژینوز باکتریایی طبق مطالعـات بورتـون حـدود ۵۰٪ [۲۷،۲۶،۲۳] که با مطالعه‌ی حاضر تقریباً همخوانی دارد. طبق

مطالعات فریس حدود ۷۰٪ وجود این باکتری در واژینوز باکتریایی تشخیص داده شد که با مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد [۲۱]. در مطالعه ورهلست [۷] در بیش از ۹۵٪ موارد واژینوز این باکتری مشاهده گردید. این میزان با مطالعه‌ی حاضر همخوانی ندارد که به نظر می‌رسد تفاوت در تعداد نمونه‌ها و کم‌تر بودن این مقدار در مطالعه‌ی حال حاضر دلیل این امر باشد. Bradshaw و همکارانشان در سال ۲۰۰۶ به شناسایی عوامل واژینوز باکتریایی با استفاده از روش real time PCR پرداختند. از بین ۳۵۸ نفر مورد بررسی ۹۶٪ در گروه بیمار مبتلا به واژینوز باکتریایی گونه آتوپوبیوم واژینا شناسایی شد در حالی‌که این میزان در افراد سالم ۱۲٪ به‌عنوان فلور نرمال گزارش گردید [۱۷]. میزان حساسیت و اختصاصیت روش مولکولی در تشخیص باکتری آتوپوبیوم واژینا به ترتیب ۹۶٪ و ۷۷٪ گزارش شد که این میزان حساسیت و ویژگی با مطالعه حاضر قابل مقایسه و مشابه بود.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که ممکن است دیگر گونه‌های میکروبی عامل واژینوز با گزارش کم‌تر وجود داشته باشند که مستلزم تشخیص دقیق می‌باشد. هم‌چنین نکته حائز اهمیت افتراق آتوپوبیوم واژینا عامل غیر شایع از گاردنرلا واژینالیس می‌باشد که این شناسایی دقیق به منظور درمان صحیح بیماران، جلوگیری از عوارض جانبی ابتلاء به این باکتری مستلزم استفاده از روش‌های تشخیصی دقیق مانند مولکولی PCR امکان‌پذیر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول می‌باشد. هزینه مالی این تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران طبق طرح شماره ۹۳-۰۳-۳۰-۲۵۰۷۲ تامین گردیده است که بدین وسیله از این معاونت کمال تشکر و سپاس‌گذاری را داریم.

منابع

[1] Gergova RT, Strateva TV, Mitov IG. Gardnerella vaginalis-associated bacterial vaginosis in Bulgarian women. Braz J Infect Dis 2013; 17: 313-318.

[2] Dermendjiev T, Pehlivanov B, Hadjieva K, Stanev S. [Epidemiological, clinical and microbiological findings in women with aerobic vaginitis]. Akush Ginekol (Sofiia) 2014; 54: 4-8.

[3] Mitchell CM, Haick A, Nkwopara E, Garcia R, Rendi M, Agnew K, Fredricks DN, Eschenbach D. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. Am J Obstet Gynecol 2015; 212: 611.e1-e9.

[4] Machado A, Salgueiro D, Harwich M, Jefferson KK, Cerca N. Quantitative analysis of initial adhesion of bacterial vaginosis-associated anaerobes to ME-180 cells. Anaerobe 2013; 23: 1-4.

[5] Polatti F. Bacterial vaginosis, Atopobium vaginae and nifuratel. Curr Clin Pharmacol 2012; 7: 36-40.

[6] Livengood CH. Bacterial vaginosis: an overview for 2009. Rev Obstet Gynecol 2009; 2: 28-37.

[7] Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Simaey L, De Ganck C, Temmerman M, Vaneechoutte M. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between Atopobium vaginae, Gardnerella vaginalis and bacterial vaginosis. BMC Microbiol 2004; 4: 16.

[8] Aminzadeh Z, Fadaeian A. Reactive arthritis induced by bacterial vaginosis: prevention with an effective treatment. Int J Prev Med 2013; 4: 841.

[9] Africa CW. Efficacy of methods used for the diagnosis of bacterial vaginosis. Expert Opin Med Diagn 2013; 7: 189-200.

[10] Discacciati MG, Simoes JA, Amaral RG, Brolazo E, Rabelo-Santos SH, Westin MC, Montemor EB. Presence of 20% or more clue cells: an accurate criterion for the diagnosis of bacterial vaginosis in Papanicolaou cervical smears. Diagn Cytopathol 2006; 34: 272-276.

[11] Chan JF, Lau SK, Curreem SO, To KK, Leung SS, Cheng VC, Yuen K-Y, Woo PC. First report of spontaneous intrapartum Atopobium vaginae bacteremia. J Clin Microbiol 2012; 50: 2525-2528.

[12] Collins M, Wallbanks S. Comparative sequence analyses of the 16S rRNA genes of Lactobacillus minutus, Lactobacillus rimae and Streptococcus parvulus: proposal for the creation of a new genus Atopobium. FEMS Microbiol lett 1992; 95: 235-240.

[13] Jovita MR, Collins MD, Sjödén B, Falsen E. Characterization of a novel Atopobium isolate from the human vagina: description of Atopobium vaginae sp. nov. Int J Syst Bacteriol 1999; 49: 1573-1576.

[14] Kageyama A, Benno Y, Nakase T. Phylogenic and phenotypic evidence for the transfer of Eubacterium fossor to the genus Atopobium as Atopobium fossor comb. nov. Microbiol Immunol 1999; 43: 389-395.

[15] Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman W. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes: Springer Science & Business Media; 2011.

[16] Mohammadzadeh F, Dolatian M, Jorjani M, Majd HA. Diagnostic value of amsel's clinical criteria for diagnosis of bacterial vaginosis. Glob J Health Sci 2015; 7: 8-14.

[17] Bradshaw C, Tabrizi S, Fairley C, Morton A, Rudland E, Garland S. The association of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. J Infect Dis 2006; 194: 828-836.

[18] Djukić S, Ćirković I, Arsić B, Garalejić E. [Diagnosis of bacterial vaginosis]. Srp Arh Celok Lek 2012; 141: 560-564.

[19] Ferris MJ, Masztal A, Martin DH. Use of species-directed 16S rRNA gene PCR primers for detection of Atopobium vaginae in patients with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol 2004; 42: 5892-5894.

[20] Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Alqumber MA, Burton JP, Tagg JR, Temmerman M, Vaneechoutte M. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal Lactobacillus species, Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae indicates an inverse relationship between L. gasseri and L. iners. BMC Microbiol 2007; 7: 1.

[21] Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, Temmerman M, Vaneechoutte M. Culture-independent analysis of vaginal microflora: the unrecognized association of Atopobium vaginae with bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 2004; 191: 1130-1132.

[22] Ferris MJ, Masztal A, Aldridge KE, Fortenberry JD, Fidel PL, Martin DH. Association of atopobium vaginae, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. BMC Infect Dis 2004; 4: 5.

[23] Burton JP, Devillard E, Cadieux PA, Hammond J-A, Reid G. Detection of Atopobium vaginae in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation. J Clin Microbiol 2004; 42: 1829-1831.

[24] Haahr T, Jensen J, Thomsen L, Duus L, Rygaard K, Humaidan P. Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes: A prospective study in IVF patients. Hum Reprod 2016; 31: 795-803.

[25] Fredricks DN, Marrazzo JM. Molecular methodology in determining vaginal flora in health and disease: its time has come. Curr Infect Dis Rep 2005; 7: 463-470.

[26] Cartwright CP, Lembke BD, Ramachandran K, Body BA, Nye MB, Rivers CA, Schwebke JR. Development and validation of a semiquantitative, multitarget PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. J Clin Microbiol 2012; 50: 2321-2329.

[27] Burton JP, Chilcott CN, AL-QUMBER M, Brooks HJ, Wilson D, Tagg JR, Devenish C. A preliminary survey of Atopobium vaginae in women attending the Dunedin gynaecology out-patients clinic: Is the contribution of the hard-to-culture microbiota overlooked in gynaecological disorders? Aust N Z J Obstet Gynaecol 2005; 45: 450-452.

Prevalence *Atopobium vagina* in vaginal samples of symptomatic non-pregnant women

Hamideh Maftoon (M.Sc)[1], Nour Amirmozafari (Ph.D)[*2], Maryam Kashanian (M.D)[3], Mojgan Oshaghi (Ph.D)[4]
1 - Microbiology Dept., School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2 - Microbiology Dept., School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3 - Obstetrics and Gynecology Dept., School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4 - Laboratory Science Dept., School of Paramedicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 20 Feb 2016; Accepted: 25 Jul 2016)

Introduction*:* Bacterial vaginosis is not a mono-factorial infection. A synergism of microaerophilic bacteria, *Mycoplasma* spp., and anaerobic bacteria such as *Atopobium vaginae*, *Porphyromonas* spp., *Bacteroides* spp., *Prevotella* spp., and others are involved in these infections. The aim of present study was to determine the prevalence of *Atopobium vaginae* in non-pregnant women suffering from bacterial vaginosis.

Materials and Methods*:* A total of 102 non-pregnant women who referred to ShahidAkbarabadi hospital in Tehran were tested for bacterial vaginosis. In order to isolate *Atopobiumvaginae* the sample was cultured on Colombia agar containing Amphotericin B, Nalidixic acid and Colistin. Additionally, they were simultaneously cultured on blood agar plates containing fresh human blood and Amphotericin B under anaerobic conditions. After extraction DNA from colonies and vaginal specimens, PCR amplification was performed by using specific primers for detection of *Atopobiumvaginae*.

Results*:* From a total of 102 women who referred to the hospital, 38 cases were confirmed for bacterial vaginosi. With PCR assay, 25 of these 38 cases (%65) were positive for *Atopobiumvaginae*.

Conclusion*:* This is the first report of isolation of *Atopobiumvaginae* in Iran.The results of this investigation points to a clear association of*Atopobiumvaginae*with bacterial vaginosis and *Atopobiumvaginae* should also be considered as a probable etiological agent.

Keywords: Bacterial Vaginosis, Female, Women, Polymerase Chain Reaction

* Corresponding author. Tel: +98 9123877988
amirmozafari@yahoo.com