نقش *گاردنرلا واژینالیس، آتوپوبیوم واژینه و موبیلونکوس* در ایجاد زایمان زودرس؛ یک مطالعه مورد- شاهدی

صدیقه لیوانی[1*]، دکتر سپیده بخشنده نصرت[2]، مهدیه نقوی‌الحسینی[3]، آمنه سادات شیخ‌الاسلامی[4]، دکتر محمدعلی وکیلی[5]، دکتر عزت ا... قائمی[6]

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۲. دانشیار گروه زنان و مامایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۳. کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۴. کارشناس ارشد آمار، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۵. دانشیار گروه آمار زیستی، مرکز تحقیقات مدیریت سلامت و توسعه اجتماعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
۶. استاد گروه باکتری‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۶/۰۷

خلاصه

مقدمه: زایمان زودرس، یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر در نوزادان و کودکان زیر ۵ سال می‌باشد. علل زایمان زودرس به‌درستی شناسایی نشده است، اما می‌توان به عفونت‌های باکتریایی مانند واژینوز باکتریایی اشاره کرد که در میان زنان باردار بسیار شایع می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف تعیین نقش باکتری‌های مرتبط با واژینوز باکتریایی در ایجاد زایمان زودرس انجام شد.

روش‌کار: این مطالعه مورد- شاهدی در سال ۹۴-۱۳۹۳ بر روی ۱۰۰ زن با زایمان زودرس و ۱۰۰ زن با زایمان به‌موقع در بیمارستان آموزشی- درمانی شهید صیاد شیرازی گرگان انجام شد. استخراج DNA از نمونه‌های واژینال انجام شده و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی برای باکتری‌های *آتوپوبیوم واژینه*، *گاردنرلا واژینالیس* و جنس *موبیلونکوس*، PCR انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) و آزمون کای اسکوئر و رگرسیون لوجستیک انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد..

یافته‌ها: فراوانی *گاردنرلا*، *آتوپوبیوم* و *موبیلونکوس* در گروه زایمان به‌موقع به‌ترتیب برابر ۸۶٪، ۱۵٪ و ۲۵٪ و در گروه زایمان زودرس به‌ترتیب ۷۴٪، ۱۴٪ و ۴۵٪ بود. توزیع *موبیلونکوس* در دو گروه زایمان زودرس و به‌موقع، از نظر آماری ارتباط معنی‌داری داشت (p=۰/۰۰۳). نسبت شانس زایمان زودرس در افرادی که از نظر *موبیلونکوس* مثبت بودند، ۲/۴۶ برابر (فاصله اطمینان ۹۵٪ ۴/۴۷-۱/۳۵) افرادی بود که از نظر *موبیلونکوس* منفی بودند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این مطالعه، نسبت شانس زایمان زودرس با حضور *موبیلونکوس* در واژن افزایش معناداری داشت. بهتر است روش‌هایی برای تشخیص سریع این باکتری و در نتیجه پیشگیری از زایمان زودرس مدنظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *آتوپوبیوم*، زایمان زودرس، *گاردنرلا*، *موبیلونکوس*

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** صدیقه لیوانی؛ مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران. **تلفن:** ۰۱۷-۳۲۴۵۲۶۵۱؛ **پست الکترونیک:** livani_s@yahoo.com

مقدمه

زایمان زودرس به زایمان پیش از کامل شدن ۳۷ هفته بارداری گفته می‌شود (سازمان جهانی بهداشت). تولد زودرس یکی از نشانه‌های اصلی سلامت در جوامع است؛ چراکه مهم‌ترین عامل مرگ‌ومیر نوزادان و دومین عامل مرگ در کودکان زیر ۵ سال است. سالانه ۱۵ میلیون تولد زودرس رخ می‌دهد که یک میلیون مرگ به همراه دارد. نوزادانی که زنده می‌مانند، در معرض خطر ابتلاء به اختلالات عصبی- حرکتی و رشد و نموی مانند اختلال شناختی، کری، کوری و عقب افتادگی ذهنی هستند (۳-۱).

میزان شیوع زایمان زودرس در مناطق مختلف دنیا متفاوت و از ۴٪ در کشورهای اروپایی تا ۱۸٪ در برخی کشورهای آفریقایی و جنوب آسیا متغیر است (۳). شیوع آن در ایران نیز متفاوت است؛ به‌طوری‌که مطالعه متاآنالیز توسط وکیلیان و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی ۱۴ مقاله، شیوع حدود ۹٪ را نشان داد (۴).

زایمان زودرس عوامل خطر متعدد پزشکی، ژنتیکی، عوامل محیطی و اجتماعی- اقتصادی دارد. از جمله این عوامل می‌توان به برخی عفونت‌های مجاری ادراری- تناسلی، شرایط خاص مادر یا جنین شامل جدا شدن زودهنگام جفت، پره‌اکلامپسی، کوتاهی گردن رحم، نقص عضو جنین، سابقه زایمان زودرس، چندقلوزایی، سن زیر ۱۷ و بالای ۳۵ سال مادر، قومیت (مانند تبار آفریقایی)، سیگاری بودن و نوشیدن مشروبات الکلی اشاره کرد (۵).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند در ۴۰-۲۵٪ از موارد زایمان زودرس، عفونت مشاهده می‌شود (۶). به‌طور کلی اپی‌تلیوم واژن با باکتری *لاکتوباسیلوس* پوشیده شده است. در شرایطی مانند بارداری، به‌هم خوردن تعادل هورمونی سبب تغییر در پوشش میکروبی واژن می‌شود. به این ترتیب ممکن است باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی مختلفی غیر از *لاکتوباسیلوس*ها، جایگزین شده و ایجاد عفونت نمایند که از آن جمله می‌توان به باکتری‌هایی مانند *استرپتوکوکوس* گروه بی، *استافیلوکوکوس*، *کلبسیلا*، *کلامیدیا*، *نیسریا*، *مایکوپلاسماهای* ژنیتال، *گاردنرلا واژینالیس*، *آتوپوبیوم واژینه* و *موبیلونکوس* اشاره کرد (۷). مطالعه حاضر با هدف تعیین نقش *گاردنرلا واژینالیس*، *آتوپوبیوم واژینه* و *موبیلونکوس* در زایمان زودرس زنان مراجعه کننده به بیمارستان آموزشی- درمانی صیاد شهرستان گرگان انجام شد.

روش‌کار

این مطالعه مقطعی از نوع مورد- شاهدی اجرا شد. جامعه مورد بررسی شامل زنان باردار با زایمان به‌موقع و زودرس بود که در فاصله زمانی اسفند ۱۳۹۳ تا شهریور ۱۳۹۴ با شکایت از درد زایمان، به زایشگاه مرکز آموزشی درمانی شهید صیاد شیرازی گرگان مراجعه کردند. نمونه‌ها به شیوه در دسترس انتخاب شدند؛ بدین‌صورت که به ازای هر زایمان زودرس، یک نمونه زایمان به‌موقع وارد مطالعه شد. گروه مورد شامل ۱۰۰ زن بود که با شکایت از درد زایمان به پذیرش زایشگاه مرکز آموزشی درمانی شهید صیاد شیرازی گرگان مراجعه کرده و ختم بارداری آنها پیش از کامل شدن هفته ۳۷ بارداری صورت گرفت و گروه شاهد شامل ۱۰۰ زن بود که پس از پایان هفته ۳۷ بارداری با درد زایمان مراجعه کردند. معیارهای خروج از مطالعه شامل: تب، میوم، بیماری پریودنتال شدید، آزار جسمی یا جنسی، مصرف آنتی‌بیوتیک در ۳ روز گذشته و مصرف سیگار یا تنباکو بود. فرم جمع‌آوری داده‌ها حاوی اطلاعات فردی، تعداد بارداری، تعداد زایمان، سابقه سقط و ... تکمیل گردید. نمونه‌گیری در مرحله درد و قبل از خروج جنین و در ابتدای پذیرش توسط مامای مستقر در زایشگاه بیمارستان آموزشی- درمانی صیاد شیرازی انجام شد. نمونه‌ها با سواب داکرونی استریل از یک سوم تحتانی دیواره واژن تهیه و در لوله‌های درپیچ‌دار حاوی سرم فیزیولوژی استریل قرار گرفته، و طی ۲ ساعت به آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی گلستان منتقل گردید. یک سواب برای تهیه لام رنگ‌آمیزی گرم (Gram) استفاده شد و سایر سواب‌ها تا زمان استخراج DNAدر فریزر در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. استخراج DNA از نمونه‌های بالینی با روش فنل کلروفرم با کمی اصلاح انجام شد (۸)؛ به این‌صورت که ابتدا نمونه جمع‌آوری شده به‌مدت ۱۰

دقیقه در دور ۳۰۰۰ جی سانتریفیوژ شده، سپس محلول رویی تخلیه و ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز (حاوی سوکروز ۳۲۰ میلی‌مولار (Merck co/ Germany)، تریس ۱۰ میلی‌مولار (Merck co/Germany)، منیزیم کلراید ۵ میلی‌مولار (Merck co/Germany)، سدیم دودسیل سولفات ۱٪ (Merck co/Germany) و پروتئیناز k ۴۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر (سیناکلون/ ایران) به رسوب اضافه و به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۵۵ درجه سلسیوس انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر فنل (Merck co/ Germany) به آن اضافه و به‌مدت ۵ دقیقه در دور ۸۰۰۰ جی سانتریفیوژ شده و محلول رویی (فاز آبی) به میکروتیوب استریل دیگر منتقل شده و به آن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم (کیان کاوه آزما/ایران) اضافه گردید. این محلول ۵ دقیقه در ۸۰۰۰ جی سانتریفیوژ و محلول رویی به میکروتیوب استریل دیگر منتقل شده و به آن ۴۰۰ میکرولیتر اتانول خالص و سرد اضافه و به‌مدت ۱ ساعت در فریزر در دمای ۲۰- قرار داده و بعد به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۹۰۰۰ جی سانتریفیوژ شده، سپس اتانول تخلیه شده و اتانل اضافی در هیتر ۴۵-۴۰ درجه سلسیوس خشک گردیده و در انتها به آن ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد.

وجود DNA در نمونه با خواندن OD نمونه در دستگاه بیوفتومتر (Eppendorf co/Germany) در طول موج ۲۶۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور ردیابی اسیدنوکلئیک *گاردنرلا واژینالیس*، جنس *موبیلونکوس* و *آتوپوبیوم واژینه* در نمونه‌ها، از پرایمرهای اختصاصی هرکدام استفاده گردید (جدول ۱). ویژگی و کارایی پرایمرها در پایگاه اینترنتی BLAST[1] بررسی شد. PCR مطابق شیوه‌نامه ذکر شده در منابع (۸ و ۹) با تغییر مختصری انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

باکتری	ژن هدف	توالی الیگونوکلئوتیدی	اندازه محصول (bp)	رفرنس
Gardnerella vaginalis	16S rRNA	GGAAACGGGTGGTAATGCTGG CGAAGCCTAGGTGGGCCATT	۱۲۵	(۹)
Mobiluncus spp.	16S rRNA	GGT TGT GAA CTC CTT TTT CTC GYG AA CGC AGA AAC ACA GGA TAG CAT CC	۴۲۷	(۱۰، ۱۱)
Atopobium vaginae	16S rRNA	GTT AGG TCA GGA GTT AAA TCT G TCA TGG CCC AGA AGA CC	۱۵۷	(۹)

مخلوط اصلی واکنش حاوی: مخلوط PCR آماده استفاده حاوی منیزیم کلرید ۱/۵ میلی‌مولار (Ampliqon co/Belgium)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر فوروارد و ریورس (غلظت ۱۰پیکومول بر میکرولیتر) و ۱ میکرولیتر از DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. واکنش‌ها در دستگاه Mastercycler personal (Eppendorf co/Germany) انجام شد. دما و زمان واکنش‌ها در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- پروتکل دما و زمان PCR

سویه باکتری	تعداد سیکل	زمان	دما
Gardnerella vaginalis	۳۵	۵۰ ثانیه	۹۴
		۵۰ ثانیه	۶۵
		۵۰ ثانیه	۷۲
Mobiluncus spp.	۳۵	۵۰ ثانیه	۹۴
		۵۰ ثانیه	۶۰
		۵۰ ثانیه	۷۲
Atopobium vaginae	۳۵	۳۰ ثانیه	۹۴
		۲۰ ثانیه	۵۸
		۲۰ ثانیه	۷۲

[1] Basic Local Alignment Search Tool

تعیین توالی محصول PCR

جهت اطمینان از صحت انجام آزمون PCR، دو محصول PCR از هر جفت پرایمر به‌صورت اتفاقی برای توالی‌یابی به شرکت ایرانی پیشگام بیوتکنولوژی ارسال شد. پس از تأیید توالی‌ها، این نمونه‌ها به‌عنوان کنترل مثبت نیز استفاده گردید. برای کنترل منفی از آب مقطر استریل بدون نوکلئاز استفاده شد.

بررسی میکروسکوپی لام رنگ‌آمیزی گرم (Gram)

رنگ‌آمیزی گرم به‌منظور بررسی مورفولوژی باکتری‌ها در نمونه بالینی به‌ویژه از جهت حضور کوکوباسیل‌های گرم متغیر با آرایش حروف چینی به‌عنوان گاردنرلا فرم‌ها و باسیل‌های گرم مثبت به‌عنوان لاکتوفرم‌ها مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. تعداد این باکتری‌ها نیز به‌صورت کم (کمتر از ۱۰ باکتری در هر میدان) و متوسط (۵۰-۱۰ باکتری در هر میدان) و زیاد (۱۰۰-۵۰ باکتری در هر میدان) گزارش شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۱۶) انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌های عددی از آزمون تی مستقل، برای تعیین رابطه بین دو متغیر رده‌ای از آزمون کای اسکوئر، از آزمون رگرسیون لوجستیک تک‌متغیره برای بررسی رابطه زایمان زودرس با متغیرهای مستقل و برآورد نسبت شانس و از آزمون رگرسیون لوجستیک چندمتغیره برای تعدیل اثر سایر متغیرها استفاده شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه توسط کمیته تحقیقات معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی استان گلستان با کد اخلاق IR.GOUMS.REC.1395.309 مورد تأیید قرار گرفته است.

یافته‌ها

در این مطالعه، نمونه واژن ۲۰۰ زن باردار مورد بررسی قرار گرفت که ۱۰۰ زن زایمان به‌موقع و ۱۰۰ زن زایمان زودرس داشتند. میانگین سنی افراد در دو گروه حدود ۲۷ سال بود که تفاوت آماری معنی‌داری نداشت (p=۰/۲۴). سن بارداری ۲۰ زن (۱۰٪) برابر یا بالای ۳۵ سال بود و سایرین (۹۰٪) زیر ۳۵ سال سن داشتند. ۱۰۳ نفر (۵۱/۵٪) از کل افراد مورد مطالعه قومیت فارس و سایرین قومیت ترکمن، سیستانی، قزاق و ترک داشتند که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نداشت (p=۰/۱۲). ۲۰ نفر (۱۰٪) دچار خونریزی واژینال بودند که ۵ نفر (۲۵٪) آنها در گروه زایمان به‌موقع و ۱۵ نفر (۷۵٪) باقی‌مانده در گروه زایمان زودرس بوده و از نظر آماری معنی‌دار بود (p=۰/۰۱۸). همچنین برای ۴ نفر (۲٪) سرکلاژ انجام شده بود که همگی در گروه زایمان زودرس قرار داشتند و از نظر آماری معنی‌دار بود (p=۰/۰۴۳). فراوانی نشانه‌های بالینی و برخی عوامل دموگرافیک در دو گروه زایمان به‌موقع و زودرس در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- فراوانی نشانه‌های بالینی و عوامل دموگرافیک در دو گروه زایمان به‌موقع و زودرس

فاکتورهای مادری / نوع زایمان		به‌موقع (تعداد=۱۰۰)	زودرس (تعداد=۱۰۰)	سطح معنی‌داری
میانگین سنی		۲۶/۹۵/±۶/۱۷	۲۷/۰۷/±۴/۸۳	۰/۸۷
سن مادر (سال)	بیشتر یا مساوی ۳۵ (تعداد=۲۰)	۱۳ (۶۵)	۷ (۳۵)	۰/۲۴
	کمتر از ۳۵ (تعداد=۱۸۰)	۸۷ (۴۸/۳)	۹۳ (۵۱/۷)	
سابقه سقط (تعداد=۴۴)		۲۲ (۵۰)	۲۲ (۵۰)	۱
بارداری ناخواسته (تعداد=۲۰)		۱۱ (۵۵)	۹ (۴۵)	۰/۶
خونریزی واژینال (تعداد=۲۰)		۵ (۲۵)	۱۵ (۷۵)	۰/۰۱۸*
سرکلاژ (تعداد=۴)		۰ (۰)	۴ (۱۰۰)	۰/۰۴۳*
قومیت	فارس (تعداد=۱۰۳)	۴۶ (۴۴/۷)	۵۷ (۵۵/۳)	۰/۱۲
	غیرفارس (تعداد=۹۷)	۵۴ (۵۵/۷)	۴۳ (۴۴/۳)	

تحصیلات	پیش از دیپلم (تعداد=۱۲۱)	۶۹ (۵۷)	۵۲ (۴۳)	۰/۰۲۳*
	دیپلم (تعداد=۵۲)	۲۳ (۴۴/۲)	۲۹ (۵۵/۸)	
	بالاتر از دیپلم (تعداد=۲۷)	۸ (۲۹/۶)	۱۹ (۷۰/۴)	

آزمون آماری تی مستقل برای مقایسه میانگین سنی و آزمون کای اسکوئر برای مقایسه فراوانی فاکتورهای مادری استفاده شد. * از نظر آماری معنی‌دار بود.

نتایج PCR ترشحات واژینال از نظر *گاردنرلا واژینالیس*، *آتوپوبیوم واژینه* و جنس *موبیلونکوس*

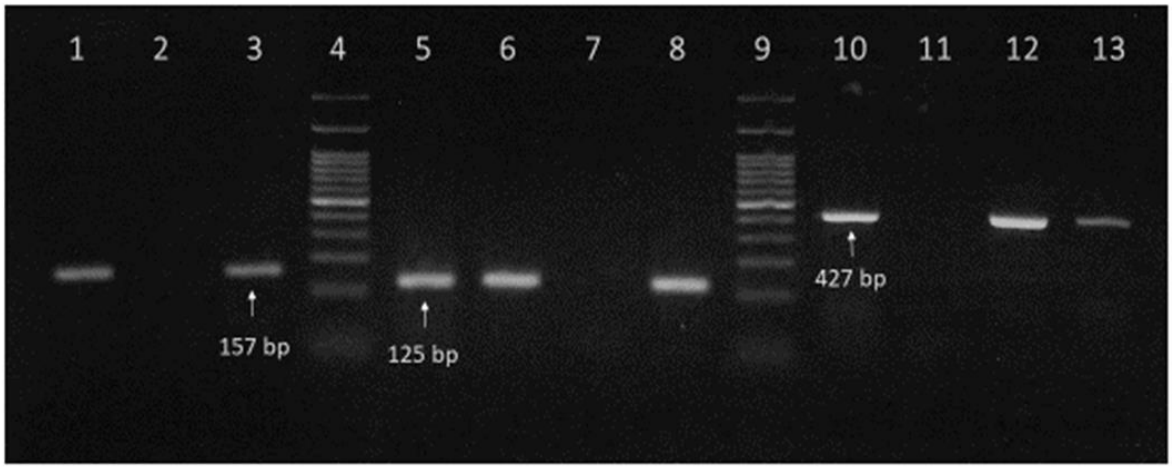
گاردنرلا در ۸۴٪ از نمونه‌های زایمان به‌موقع و در ۷۶٪ از نمونه‌های زایمان زودرس شناسایی شد. از ۲۹ مورد *آتوپوبیوم واژینه*، ۱۵ مورد در گروه زایمان به‌موقع و ۱۴ مورد در گروه زایمان زودرس بودند. از ۷۰ مورد جنس *موبیلونکوس*، ۲۵ مورد در گروه زایمان به‌موقع و ۴۵ مورد در گروه زایمان زودرس بودند (جدول ۴). شکل ۱، تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR سه ناحیه ژنی موردنظر می‌باشد.

طبق نتایج به‌دست آمده در جدول ۴، فراوانی جنس *موبیلونکوس* در دو گروه زایمان زودرس و به‌موقع، از نظر آماری ارتباط معنی‌داری داشت (p=۰/۰۰۳) و نسبت شانس (Odds ratio) برابر ۲/۴۶ با فاصله اطمینان ۹۵٪ برابر ۴/۴۷-۱/۳۴ بود. بین باکتری‌های *گاردنرلا واژینالیس* و *آتوپوبیوم واژینه* با زایمان زودرس ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

جدول ۴- فراوانی گاردنرلا واژینالیس، آتوپوبیوم واژینه و جنس موبیلونکوس در دو گروه زایمان به‌موقع و زودرس

باکتری / زایمان	به‌موقع (۱۰۰ مورد) تعداد (درصد)	زودرس (۱۰۰ مورد) تعداد (درصد)	تعداد کل تعداد (درصد)	سطح معنی‌داری
گاردنرلا واژینالیس	۸۴ (۵۲/۸)	۷۶ (۴۷/۲)	۱۶۰ (۱۰۰)	۰/۱۶
آتوپوبیوم واژینه	۱۵ (۵۱/۷)	۱۴ (۴۸/۳)	۲۹ (۱۰۰)	۰/۸
جنس *موبیلونکوس*	۲۵ (۳۵/۷)	۴۵ (۶۴/۳)	۷۰ (۱۰۰)	*۰/۰۰۳

آزمون کای اسکوئر برای مقایسه فراوانی‌ها استفاده شد. * از نظر آماری معنی‌دار بود.



تصویر ۱- چاهک ۴ و ۹ حاوی 100 bp DNA ladder؛ چاهک‌های ۱ و ۳ نمونه مثبت از ناحیه ۱۵۷bp *آتوپوبیوم واژینه*؛ چاهک‌های ۵، ۶ و ۸ نمونه مثبت از ناحیه ۱۲۵bp *گاردنرلا واژینالیس*؛ چاهک‌های ۱۰، ۱۲ و ۱۳ نمونه مثبت از ناحیه ۴۲۷bp جنس *موبیلونکوس*؛ چاهک‌های ۲، ۷ و ۱۱ حاوی کنترل منفی (آب مقطر).

جهت تأیید واکنش PCR و باندهای مشاهده شده، ۶ نمونه مثبت (۲ *گاردنرلا واژینالیس*، ۲ *موبیلونکوس*، ۲ *آتوپوبیوم واژینه*) بعد از تعیین توالی، در پایگاه اینترنتی https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi در قسمت Nucleotide blast درج شده و با توالی ژن-های ثبت شده در این بانک ژنی مقایسه و درصد تشابه ژنی مورد نظر با نمونه‌های موجود در بانک مشخص گردید. تشابه ژنی برای نمونه‌های *آتوپوبیوم واژینه* ۱۰۰٪ و ۹۸٪، *گاردنرلا واژینالیس* ۹۹٪ و ۹۸٪ و برای *موبیلونکوس* ۹۹٪ و ۹۹٪ بود. همچنین توالی محصول PCR *موبیلونکوس*، با شماره دسترسی MT798825 و MT798824 در پایگاه اینترنتی فوق ثبت گردید.

بر اساس نتایج رگرسیون لوجستیک تک‌متغیره، *موبیلونکوس* با نسبت شانس ۲/۴۶ (فاصله اطمینان ۹۵٪= ۱/۳۵-۴/۴۷) و خونریزی واژن با نسبت شانس ۳/۳۵ (فاصله اطمینان ۹۵٪= ۱/۱۷-۹/۶۲) به‌ترتیب با سطح معنی‌داری برابر ۰/۰۰۳ و ۰/۰۲۴، اثر افزایشی در زایمان زودرس داشتند. در تحلیل رگرسیون لوجستیک تک‌متغیره از میان سایر متغیرها، وجود *گاردنرلا*، وجود *آتوپوبیوم*، سن بالای ۳۵ سال مادر و بارداری ناخواسته، اثر کاهشی در زایمان زودرس داشتند، ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). همچنین قومیت غیر از فارس و سرکلاژ، اثر افزایشی داشتند که از نظر آماری اثر معناداری نداشت (p>۰/۰۵). پس از تحلیل رگرسیون لوجستیک چندمتغیره، اثر افزایشی ایجاد زایمان زودرس تنها برای *موبیلونکوس* قابل مشاهده بود (نسبت شانس ۲/۴۱ با فاصله اطمینان ۹۵٪ برابر ۱/۲۹-۴/۴۸؛ p=۰/۰۰۶). از طرف دیگر، تحصیلات کمتر از دبیرستان مادر، از نظر آماری معنی‌دار بود (p=۰/۰۱۴) و با نسبت شانس ۳/۲۳ (فاصله اطمینان ۹۵٪ برابر ۱/۲۷-۸/۱۹) اثر کاهشی در ایجاد زایمان زودرس داشت.

تعیین ارتباط باکتری‌ها با یافته‌های میکروسکوپی در لام رنگ‌آمیزی گرم ترشحات واژینال

از ۲۰۰ لام رنگ‌آمیزی گرم، در ۲۷ لام، باکتری‌های گاردنرلا- فرم مشاهده شد که با هیچ‌کدام از باکتری-های جدا شده در PCR، ارتباط معنی‌داری نداشت. وجود باکتری‌های لاکتوفرم با جداسازی جنس *موبیلونکوس* ارتباط معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۰۱). جدول ۵ توزیع فراوانی باکتری‌های لاکتوفرم و گاردنرلا فرم در لام گرم ترشحات واژینال زنان باردار برحسب باکتری‌های شناسایی شده به روش PCR را نشان می-دهد.

جدول ۵- توزیع فراوانی یافته‌های آزمایشگاهی لام گرم ترشحات واژینال زنان باردار برحسب باکتری‌های شناسایی شده از ترشحات واژینال به روش PCR

باکتری شناسایی شده در روش PCR / لام رنگ‌آمیزی گرم		*گاردنرلا واژینالیس*			*موبیلونکوس*			*آتوپوبیوم واژینه*		
		مثبت (درصد)	منفی (درصد)	سطح معنی‌داری	مثبت (درصد)	منفی (درصد)	سطح معنی‌داری	مثبت (درصد)	منفی (درصد)	سطح معنی‌داری
لاکتوفرم	کم (۹۱)	۸۰/۲	۱۹/۸	۰/۷	۱۸/۷	۸۱/۳	<۰/۰۰۱*	۱۵/۴	۸۴/۶	۰/۹
	متوسط و زیاد (۱۰۹)	۷۹/۸	۲۰/۲		۴۸/۶	۵۱/۴		۱۳/۸	۸۶/۲	
گاردنرلا فرم	دارد (۲۷)	۷۷/۸	۲۲/۲	۰/۷	۳۷	۶۳	۰/۸	۲۲/۲	۷۷/۸	۰/۲
	ندارد (۱۷۳)	۸۰/۳	۱۹/۷		۳۴/۷	۶۳/۳		۱۳/۳	۸۶/۷	

آزمون کای اسکوئر برای مقایسه فراوانی‌ها استفاده شد. * از نظر آماری معنی‌دار بود.

بحث

در این پژوهش زنان باردار از نظر آلودگی با باکتری‌های *گاردنرلا*، *موبیلونکوس* و *آتوپوبیوم* مورد بررسی قرار گرفتند که توزیع واژینال هرکدام به‌ترتیب برابر با ۸۰٪، ۳۵٪ و ۱۴/۵٪ بود. مطالعات مختلف، فراوانی‌های متفاوتی را برای این باکتری‌ها ذکر کرده‌اند؛ به‌طوری‌که حدود ۹۴-۱۸٪ برای *گاردنرلا* (۱۲، ۱۳)، ۸۳-۳۵٪ برای *آتوپوبیوم* (۱۳، ۱۴) و حدود ۶۰-۲٪ برای *موبیلونکوس* بود (۱۳، ۱۵). از علل احتمالی تفاوت‌های موجود در مطالعات مختلف می‌توان به روش‌های متفاوت تشخیص، تفاوت‌ها در رفتار جنسی (۱۶) و میزان خدمات سلامت و بهداشت جوامع (۱۷) اشاره کرد. همچنین تفاوت در میانگین سنی جامعه مورد مطالعه و تفاوت در ماه بارداری در هنگام نمونه‌گیری، می‌تواند در پاسخ مربوطه، مؤثر باشد (۱۸).

تنها باکتریی که در این مطالعه در همراهی معنی‌دار با زایمان زودرس بود، *موبیلونکوس* بود و درباره *گاردنرلا* و *آتوپوبیوم* چنین همراهی مشاهده نشد. *موبیلونکوس*، یک باکتری گرم متغیر متحرک با شکل میله‌ای خمیده است. در مقالات مختلف از نظر ارتباط با عفونت‌های زنان به‌ویژه واژینوز باکتریایی مورد توجه است، با این‌حال هم از موارد واژینوز و هم غیرواژینوز باکتریایی جدا شده است. این باکتری شامل دو گونه *موبیلونکوس مولیِریس* و *موبیلونکوس کورتیسی* می‌باشد (۱۹). در مطالعه دود و همکاران (۲۰۲۰)، مکانیزم احتمالی که *موبیلونکوس* طی آن می‌تواند زایمان زودرس ایجاد نماید، توضیح داده شد. در آن مطالعه تیمار سلولی با باکتری، منجر به افزایش نفوذپذیری اپی‌تلیوم سرویکس شد و متعاقب آن، افزایش بیان سایتوکاین‌های التهابی از جمله IL-6 و IL-8 و تغییر بیان miRNAهای مرتبط با زایمان زودرس، سبب کوتاه شدن زمان بارداری گردید (۲۰). نتیجه برخی مطالعات در راستای مطالعه حاضر بوده و همراهی معنی‌داری بین *موبیلونکوس* و زایمان زودرس مشاهده نمودند (۲۳-۲۱). از جمله مطالعه کوهورت الویتز و همکاران (۲۰۱۹) که شامل زنان باردار اغلب آفریقایی- آمریکایی بود، نشان داد *موبیلونکوس*، قوی‌ترین ارتباط را با زایمان زودرس دارد (۲۴). در مطالعه هوسوار و همکاران (۲۰۱۹) در اسلوونی که ۱۰۷ زن با زایمان به‌موقع و ۴۸ زن با زایمان زودرس و با هدف بررسی مقایسه‌ای جمعیت میکروبی واژن از نظر انواع و تعداد انجام شد، برخلاف مطالعه حاضر، بین *موبیلونکوس* با زایمان زودرس ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد، ولی بین *گاردنرلا* و *آتوپوبیوم* با زایمان زودرس ارتباط معنی‌داری مشاهده شد (۲۵). علت اصلی این اختلاف نتایج برای ما مشخص نیست، اما ممکن است به‌علت تفاوت در تعداد افراد شرکت کننده در هر کدام از گروه‌ها و یا تفاوت‌های سلامت و بهداشت باشد. به‌علاوه نباید تفاوت در روش-های آزمایشگاهی و آماری را از نظر دور نگاه داشت. همچنین در مطالعه جوزف و همکاران (۲۰۲۳) که بر روی موش آزمایشگاهی انجام شد، تزریق *موبیلونکوس*، ارتباطی با ایجاد عارضه یا زایمان زودرس در مادر و جنین نداشت و تزریق *گاردنرلا* با افزایش عوارض و مرگ‌ومیر مادر همراه بود، اما با زایمان زودرس ارتباطی نداشت (۲۶). از طرف دیگر در مطالعه نلسون و همکاران (۲۰۱۸)، هیچ‌کدام از باکتری‌های *آتوپوبیوم*، *گاردنرلا* و *موبیلونکوس* همراهی با زایمان زودرس نداشتند، با این‌حال شیوع *موبیلونکوس* در زنانی که سابقه زایمان زودرس قبلی داشتند، به‌طور معنی‌داری با زایمان زودرس مرتبط بود (۱۳) که این علت تفاوت ممکن است مربوط به زمان نمونه‌گیری باشد؛ چراکه نمونه‌گیری ۲ بار در قبل از هفته ۱۶ بارداری و بین ۲۰-۲۴ انجام شد.

در رابطه با نقش جمعیت میکروبی در ایجاد زایمان زودرس، مطالعاتی درباره نقش پپتیدهای ضدمیکروبی میزبان انجام شده است. از جمله در مطالعه الویتز و همکاران (۲۰۱۹)، زنان آفریقایی- آمریکایی که دچار زایمان زودرس شده بودند، سطح بتا-دفنسین۲ پایین‌تری داشتند. به‌علاوه سطح این پپتید در زنان غیرآفریقایی- آمریکایی با زایمان به‌موقع از همه گروه‌ها پایین‌تر بود و مشخص شد بتا-دفنسین۲ خطر ابتلاء به زایمان زودرس را تنها در حضور برخی باکتری‌ها تنظیم می‌کند؛ به‌طوری‌که حتی در محیط واژن غالب با *لاکتوباسیلوس* نیز حضور کم بتا- دفنسین۲ با افزایش زایمان زودرس همراه است (۲۴). این یافته نشان می‌دهد تخمین خطر زایمان زودرس نه‌تنها نیاز به بررسی ترکیب

جمعیت میکروبی دارد، بلکه ماهیت پاسخ ایمنی و ژنوتایپ میزبان نیز باید مورد توجه قرار گیرد. می‌توان گفت حتی بهترین روش‌ها که جمعیت میکروبی و مقادیر آنها نسبت به همدیگر را نشان دهد نیز نمی‌تواند به‌طور کامل بیانگر فعالیت و عملکرد و در نهایت پیامد حضور این باکتری‌ها در واژن باشد. مکانیزم‌هایی که جمعیت باکتری‌ها طی آن سبب پایداری و سلامت واژن می‌گردند، همچنان ناشناخته است. شاید به‌همین علت، اغلب تلاش‌هایی که برای درمان واژینوز باکتریایی در جهت جلوگیری از زایمان زودرس انجام می‌گیرد، با شکست مواجه می‌شود (۲۷، ۲۸).

برخی مطالعات نشان دادند بین بروز زایمان زودرس و غلظت باکتری ارتباط معنی‌داری وجود دارد که در این مطالعه به آن پرداخته نشد. در مطالعه منارد و همکاران (۲۰۱۰)، پژوهشگران بین حضور باکتری‌های مورد مطالعه با زایمان زودرس همراهی معنی‌داری نیافتند، اما به این نتیجه رسیدند *آتوپوبیوم* در غلظت‌های بالای 10^5 کپی در میلی‌لیتر و *گاردنرلا* در غلظت‌های بالاتر از 10^7 کپی در میلی‌لیتر در همراهی با زایمان زودرس بوده و عامل خطر آن می‌باشد (۱۴). همچنین مطالعه برتل و همکاران (۲۰۱۵) نیز بیان کرد غلظت بالای 10^8 کپی در میلی‌لیتر از باکتری *آتوپوبیوم*، در همراهی با خطر افزایش زایمان زودرس است (۲۹).

در مطالعه حاضر در هر دو گروه شاهد و نمونه، قومیت-های مختلف فارس، سیستانی، ترکمن و قزاق حضور داشتند که ارتباط معنی‌داری بین قومیت آنها و زایمان زودرس مشاهده نشد. مطالعه سلطانی و همکاران (۲۰۱۹) که در چندین استان ایران انجام شد، نشان داد زایمان زودرس با قومیت بلوچ در ارتباط است (۳۰). علت این تفاوت‌های آماری کاملاً مشخص نیست، اما می‌تواند مبتنی بر تفاوت‌های اجتماعی و اقتصادی بین این اقشار باشد (۳۱). به‌طور کلی در برخی یافته‌های تحقیقاتی، نرخ زایمان زودرس با توجه به زمینه نژادی و قومیتی زنان متغیر است. برخی مطالعات نژاد سیاه‌پوست را جزء عوامل خطر دانستند. از جمله مطالعه اسچاف و همکاران (۲۰۱۲) که نشان داد خطر زایمان زودرس در نژاد سیاه‌پوست ۲ برابر سفیدپوست است، ولی ارتباط معنی‌داری در زنان آسیایی، لاتین یا قفقازی یافت نشد (۳۲). برخی مطالعات نیز ارتباط معنی‌داری بین نژاد سیاه و سفید مشاهده نکردند (۱۶، ۳۳).

علی‌رغم مطالعات قبلی که نشان داده بودند زایمان زودرس در زنان با تحصیلات پایین‌تر شایع‌تر است، نتایج این مطالعه نشان داد زایمان زودرس در زنان با سطح سواد پایین‌تر، کمتر است. شاید یکی از عللی که سبب چنین رابطه معنی‌دار معکوسی گردید، تعداد کم افراد بالای دیپلم باشد؛ به‌طوری‌که افراد با تحصیلات بالای دیپلم تنها ۱۶٪ افراد را شامل می‌شدند. بیمارستان آموزشی- درمانی صیاد شیرازی گرگان یک بیمارستان دولتی بوده که خدمات رایگان ارائه می‌نماید و محل رجوع غالب خانواده‌های کمتر برخوردار از نظر اقتصادی و اجتماعی می‌باشد. برای تأیید یافته فوق، مطالعه‌ای دیگر که متشکل از جمعیتی با تحصیلات بالاتر باشد، ضروری به‌نظر می‌رسد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه که به‌منظور تعیین ارتباط میان حضور باکتری‌های *گاردنرلا*، *آتوپوبیوم واژینه* و *موبیلونکوس* در واژن زنان باردار با زایمان زودرس انجام شد، بین حضور *موبیلونکوس* در نمونه واژن زنان باردار با زایمان زودرس ارتباط معنی‌داری وجود داشت. مطالعات مختلف، به ترکیب متغیر فلور میکروبی محیط واژن اشاره می‌کنند، با این‌حال نقش باکتری‌ها در ایجاد زایمان زودرس، نقشی پذیرفته شده بوده و بهتر است تلاش برای یافتن راه‌هایی جهت تشخیص ساده و اقتصادی، و همچنین راه‌هایی برای پیشگیری از زایمان زودرس ادامه داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم آزمایشگاهی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان انجام شد. بدین‌وسیله از خانم حسینی مامای محترم زایشگاه بیمارستان شهید صیاد گرگان جهت همکاری در نمونه‌گیری و آقای صابر علی‌نژاد جهت انجام بخشی از فعالیت آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Chawanpaiboon S, Vogel JP, Moller AB, Lumbiganon P, Petzold M, Hogan D, et al. Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: a systematic review and modelling analysis. The Lancet global health 2019; 7(1):e37-46.
2. Frey HA, Klebanoff MA. The epidemiology, etiology, and costs of preterm birth. InSeminars in fetal and neonatal medicine 2016; 21(2):68-73.
3. Liu L, Oza S, Hogan D, Chu Y, Perin J, Zhu J, et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. The Lancet 2016; 388(10063):3027-35.
4. Vakilian K, Ranjbaran M, Khorsandi M, Sharafkhani N, Khodadost M. Prevalence of preterm labor in Iran: A systematic review and meta-analysis. International Journal of Reproductive BioMedicine 2015; 13(12):743.
5. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. The lancet 2008; 371(9606):75-84.
6. Nadeau HC, Subramaniam A, Andrews WW, editors. Infection and preterm birth. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine; 2016: Elsevier.
7. Daskalakis G, Psarris A, Koutras A, Fasoulakis Z, Prokopakis I, Varthaliti A, et al. Maternal Infection and Preterm Birth: From Molecular Basis to Clinical Implications. Children 2023;10(5):907.
8. Golshani M, Eslami G, Goudarzi H, Soleymani RA, Fayaz F, Mohammadzadeh GS, et al. Detection of Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum by multiplex PCR in semen sample of infertile men. Iranian Journal of Public Health 2007; 36(2):50-7.
9. Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH, Ferris MJ. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. Journal of clinical microbiology 2010; 48(5):1812-9.
10. Pépin J, Deslandes S, Giroux G, Sobéla F, Khonde N, Diakité S, et al. The complex vaginal flora of West African women with bacterial vaginosis. PLoS One 2011; 6(9):e25082.
11. Tiveljung A, Forsum U, Monstein HJ. Classification of the genus Mobiluncus based on comparative partial 16S rRNA gene analysis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 1996; 46(1):332-6.
12. Nkembe NM, Kamga HG, Baiye WA, Chafa AB, Njotang PN. Streptococcus agalactiae prevalence and antimicrobial susceptibility pattern in vaginal and anorectal swabs of pregnant women at a tertiary hospital in Cameroon. BMC research notes 2018; 11:1-6.
13. Nelson DB, Hanlon A, Nachamkin I, Haggerty C, Mastrogiannis DS, Liu C, et al. Early pregnancy changes in bacterial vaginosis-associated bacteria and preterm delivery. Paediatric and perinatal epidemiology 2014; 28(2):88-96.
14. Menard JP, Mazouni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, et al. High vaginal concentrations of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis in women undergoing preterm labor. Obstetrics & Gynecology 2010; 115(1):134-40.
15. Bahar H, Torun MM, Öçer F, Kocazeybek B. Mobiluncus species in gynaecological and obstetric infections: antimicrobial resistance and prevalence in a Turkish population. International journal of antimicrobial agents 2005; 25(3):268-71.
16. Vodstrcil LA, Twin J, Garland SM, Fairley CK, Hocking JS, Law MG, et al. The influence of sexual activity on the vaginal microbiota and Gardnerella vaginalis clade diversity in young women. PloS one 2017; 12(2):e0171856.
17. Kamga YM, Ngunde JP, Akoachere JF. Prevalence of bacterial vaginosis and associated risk factors in pregnant women receiving antenatal care at the Kumba Health District (KHD), Cameroon. BMC pregnancy and childbirth 2019; 19(1):1-8.
18. Mohammed RA, Elmukashfi ST, Khalifa OA, Eltaib HA. Detection of Vaginosis causing by Gardnerella vaginalis among Pregnant Women attending a Khartoum State Hospitals by using conversional method. Journal of Drug Delivery and Therapeutics 2019; 9(3):384-7.
19. Arries C, Ferrieri P. Mobiluncus curtisii bacteremia: case study and literature review. Infectious Disease Reports 2022; 14(1):82-7.
20. Dude CM, Saylany A, Brown A, Elovitz M, Anton L. Microbial supernatants from Mobiluncus mulieris, a bacteria strongly associated with spontaneous preterm birth, disrupts the cervical epithelial barrier through inflammatory and miRNA mediated mechanisms. Anaerobe 2020; 61:102127.
21. Freitas AC, Bocking A, Hill JE, Money DM. Increased richness and diversity of the vaginal microbiota and spontaneous preterm birth. Microbiome 2018; 6(1):1-5.
22. Dunlop AL, Satten GA, Hu YJ, Knight AK, Hill CC, Wright ML, et al. Vaginal microbiome composition in early pregnancy and risk of spontaneous preterm and early term birth among African American women. Frontiers in cellular and infection microbiology 2021; 11:641005.
23. Romero R, Tarca A, Gomez-Lopez N, Winters A, Panzer J, Lin H, et al. The Vaginal Microbiota in Early Pregnancy Identifies a Subset of Women at Risk for Early Preterm Prelabor Rupture of Membranes and Preterm Birth. Research Square; 2022.

24. Elovitz MA, Gajer P, Riis V, Brown AG, Humphrys MS, Holm JB, et al. Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery. Nature communications 2019; 10(1):1305.
25. Hočevar K, Maver A, Vidmar Šimic M, Hodžić A, Haslberger A, Premru Seršen T, et al. Vaginal microbiome signature is associated with spontaneous preterm delivery. Frontiers in medicine 2019; 6:201.
26. Joseph A, Lewis EL, Ferguson B, Guan Y, Anton L, Elovitz MA. Intrauterine colonization with Gardnerella vaginalis and Mobiluncus mulieris induces maternal inflammation but not preterm birth in a mouse model. American Journal of Reproductive Immunology 2023; 90(2):e13749.
27. Shimaoka M, Yo Y, Doh K, Kotani Y, Suzuki A, Tsuji I, et al. Association between preterm delivery and bacterial vaginosis with or without treatment. Scientific reports 2019; 9(1):509.
28. Bretelle F, Loubière S, Desbriere R, Loundou A, Blanc J, Heckenroth H, et al. Effectiveness and Costs of Molecular Screening and Treatment for Bacterial Vaginosis to Prevent Preterm Birth: The AuTop Randomized Clinical Trial. JAMA pediatrics 2023.
29. Bretelle F, Rozenberg P, Pascal A, Favre R, Bohec C, Loundou A, et al. High Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis vaginal loads are associated with preterm birth. Clinical Infectious Diseases 2015; 60(6):860-7.
30. Soltani M, Tabatabaee HR, Saeidinejat S, Eslahi M, Yaghoobi H, Mazloumi E, et al. Assessing the risk factors before pregnancy of preterm births in Iran: a population-based case-control study. BMC pregnancy and childbirth 2019; 19:1-8.
31. Yang S, Reid G, Challis JR, Kim SO, Gloor GB, Bocking AD. Is there a role for probiotics in the prevention of preterm birth?. Frontiers in Immunology 2015; 6:62.
32. Schaaf JM, Liem SM, Mol BW, Abu-Hanna A, Ravelli AC. Ethnic and racial disparities in the risk of preterm birth: a systematic review and meta-analysis. American journal of perinatology 2012: 433-50.
33. Tabatabaei N, Eren AM, Barreiro LB, Yotova V, Dumaine A, Allard C, et al. Vaginal microbiome in early pregnancy and subsequent risk of spontaneous preterm birth: a case–control study. BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology 2019; 126(3):349-58.