

Nghiên cứu xây dựng quy trình chẩn đoán vi khuẩn gây nhiễm khuẩn âm đạo bằng phương pháp Multiplex PCR

Triệu Tiến Sang^{1*}, Vũ Hương Ly², Trần Văn Khoa¹, Nguyễn Thị Việt Hà¹,
Nguyễn Thị Trang³, Nguyễn Thị Mai Hương⁴

¹Bộ môn Sinh học và Di truyền y học, Học viện Quân y

²Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội

³Bộ môn Y sinh học - Di truyền, Trường Đại học Y Hà Nội

⁴Khoa Di truyền và Sinh học phân tử, Bệnh viện Nhi Trung ương (NHP)

Ngày nhận bài 10/7/2018; ngày chuyển phản biện 16/7/2018; ngày nhận phản biện 20/8/2018; ngày chấp nhận đăng 31/8/2018

Tóm tắt:

Nhiễm khuẩn âm đạo (*Bacterial vaginosis* - BV) là một trong những bệnh viêm nhiễm đường sinh dục phổ biến nhất ở phụ nữ trong độ tuổi sinh sản, có thể dẫn đến nhiều biến chứng nghiêm trọng. Đặc biệt, bệnh còn ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển phôi của bệnh nhân làm hỗ trợ sinh sản. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, BV không phải do một tác nhân cụ thể nào gây ra, mà do sự mất cân bằng của hệ vi khuẩn trong âm đạo. Tuy nhiên, các kỹ thuật hiện nay như nuôi cấy và nhuộm gram tỏ ra kém hiệu quả, với thời gian kéo dài, không đủ nhạy để xác định đồng thời các tác nhân. Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xây dựng phương pháp Multiplex PCR (M-PCR) để phát hiện đồng thời và chính xác các tác nhân gây bệnh, góp phần giảm tối đa chi phí và thời gian xét nghiệm. Quy trình đã phát hiện được 10 loài vi khuẩn gây bệnh dựa trên vùng gene đặc hiệu 16s-rRNA và tối ưu hóa M-PCR thành 3 phản ứng với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Kết quả bước đầu đã xây dựng thành công quy trình M-PCR, chứng tỏ tiềm năng của phương pháp trong xét nghiệm chẩn đoán BV trong tương lai gần.

Từ khóa: BV, chẩn đoán, Multiplex PCR, nhiễm khuẩn âm đạo, PCR.

Chỉ số phân loại: 3.2

Đặt vấn đề

Nhiễm khuẩn âm đạo (*Bacterial vaginosis* - BV) là một trong những bệnh viêm nhiễm đường sinh dục phổ biến nhất ở phụ nữ trong độ tuổi sinh sản (15-44 tuổi) [1]. Nếu không được đề phòng và điều trị kịp thời, bệnh có thể dẫn đến nhiều biến chứng nghiêm trọng, ảnh hưởng đến khả năng sinh sản và sức khỏe lâu dài của phụ nữ. BV là yếu tố làm tăng tỷ lệ mắc bệnh viêm vùng chậu (PID) [2], căn bệnh đau đớn và có thể dẫn tới vô sinh [3], tăng nguy cơ lây truyền HIV và các bệnh lây truyền qua đường tình dục (STD) [4, 5]. Ở những phụ nữ đang mang thai, BV có thể khiến họ tăng nguy cơ sảy thai, sinh non hoặc sinh con nhẹ cân [6, 7]. Đặc biệt, một nghiên cứu gần đây đã phát hiện ra BV còn ảnh hưởng tiêu cực đến tỷ lệ có thai của những bệnh nhân làm thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) [8]. Do đó, điều trị và sàng lọc BV là vô cùng cần thiết, đặc biệt đối với phụ nữ đang mang thai và bệnh nhân trước khi làm hỗ trợ sinh sản.

Các chuyên gia y tế chưa thực sự chắc chắn nguyên nhân gây ra tình trạng viêm nhiễm này. Tuy nhiên, các nghiên cứu

đã chỉ ra rằng không có một tác nhân đặc biệt nào gây bệnh, mà do sự mất cân bằng của hệ vi khuẩn trong âm đạo [9]. Sự phát triển quá mức của nhiều loài vi khuẩn kỵ khí có hại sẽ phá vỡ sự cân bằng tự nhiên, làm giảm số lượng của vi khuẩn có lợi, được biết đến chủ yếu là *Lactobacillus* [10]. Sự tăng lên quá nhiều về số lượng và số loài vi khuẩn gây bệnh đã tạo các hình thái bệnh khác nhau, từ đó cần các cách chẩn đoán và điều trị khác nhau.

Hiện nay, phương pháp chẩn đoán BV thường được dùng dựa vào tiêu chuẩn Amsel [11], khi có ít nhất 3 trong 4 tiêu chí sau: khí hư loãng đồng nhất màu trắng, pH âm đạo >4,5, có tế bào chỉ điểm Clue (>20%) và Whiff test (+) (có mùi cá ươn khi nhỏ vài giọt KOH 10% vào khí hư). Ngoài ra, tiêu chuẩn Nugent cũng được dùng để chẩn đoán BV dựa trên kết quả nhuộm gram của mẫu dịch âm đạo [12]. Trên thực tế, các phương pháp vi sinh thông thường chỉ đánh giá sự xuất hiện của tác nhân gây bệnh, mà không xác định được chính xác từng loài. Do đó, hướng nghiên cứu sinh học phân tử đang được phát triển và tỏ ra có nhiều ưu thế hơn khi xác định đặc hiệu các tác nhân gây bệnh chính. Các kỹ thuật

*Tác giả liên hệ: Email: trieusangk83@yahoo.com.vn

Establishment of clinical method for diagnosing bacterial vaginosis by using Multiplex PCR

Tien Sang Trieu^{1*}, Huong Ly Vu², Van Khoa Tran¹,
Thi Viet Ha Nguyen¹,
Thi Trang Nguyen³, Thi Mai Huong Nguyen⁴

¹Department of Biology and Medical Genetic, Military Medical University

²Faculty of Biology, University of Natural Sciences, Vietnam National University, Ha Noi

³Department of Medical Biology and Genetic, Ha Noi Medical University

⁴Department of Genetics and Molecular Biology, National Children's Hospital

Received 10 July 2018; accepted 31 August 2018

Abstract:

Bacterial vaginosis (BV) is one of the most common vaginal infection among women of reproductive age, and it can lead to serious complications. Specially, it affects the embryo transfer efficiency of patients who apply assisted reproductive technology. Studies have shown that BV is not caused by a specific bacterium but a consequence of vaginal bacteria imbalance. However, current techniques, such as culture and Gram staining, have been shown to be ineffective for prolonged periods of time and not sufficiently sensitive to simultaneously identify the agents. This study was conducted to develop Multiplex PCR (M-PCR) for simultaneous and accurate detection of agents, to reduce costs and time for testing. The process identified 10 species of pathogenic bacteria based on 16s-rRNA gene fragments and split analysis into 3 assays with high sensitivity and specificity. Initial results showed the successful establishment of the M-PCR method, demonstrating the potential of this approach in the diagnosis of vaginal infections in the near future.

Keywords: Bacterial vaginosis, BV, diagnosis, Multiplex PCR, PCR.

Classification number: 3.2

xét nghiệm như PCR, M-PCR, real-time PCR, broad-range PCR kết hợp với lai huỳnh quang tại chỗ (FISH) đã phát hiện được một số chủng vi khuẩn mới bên cạnh các chủng vi khuẩn phổ biến như *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Atopobium vaginae* và *Bacteroides fragilis* [13, 14]. Sự phát triển quá mức nhiều chủng vi khuẩn khác nhau ảnh hưởng đến hướng điều trị khác nhau do các chủng vi khuẩn có sự đề kháng với kháng sinh khác nhau. Vì vậy, cần xác định rõ các loài vi khuẩn gây bệnh để chọn kháng sinh thích hợp trong điều trị.

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm xác định đồng thời và chính xác tác nhân gây bệnh BV bằng phương pháp M-PCR, nhằm nâng cao hiệu quả chẩn đoán và giảm tối đa thời gian và chi phí xét nghiệm. Quy trình chuẩn hóa PCR đơn mỗi sử dụng từng cặp mỗi đặc hiệu cho vùng gene 16s-rRNA để phát hiện 10 loài vi khuẩn: *G. vaginalis*, *Mobiluncus mulieris*, *B. fragilis*, *A. vaginae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Megasphaera* type I, BVAB (Clostridia-like bacteria vaginosis-associated bacteria) 1, BVAB 2, BVAB 3 và *Sneathia sanguinegens*. Từ đó, khảo sát những điều kiện tối ưu để xây dựng quy trình M-PCR. Quy trình này có tiềm năng được ứng dụng để hỗ trợ chẩn đoán trong xét nghiệm BV.

Đối tượng, vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu

Mẫu bệnh phẩm dịch âm đạo của bệnh nhân làm hỗ trợ sinh sản tại Trung tâm Mô phôi, Học viện Quân y và Trung tâm Hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện 16A.

Đối chứng dương được lấy từ mẫu lâm sàng dương tính được phát hiện bằng phương pháp PCR đơn mỗi.

Vật liệu

Hóa chất và trang thiết bị: bộ kit tách chiết QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Đức); GoTaq Green Mastermix 2X của hãng ProOmega (Hoa Kỳ); dung dịch TBE 0.5X, Agarose 2% và EtBr; hệ thống trang thiết bị và máy móc đạt yêu cầu về kỹ thuật và an toàn phòng thí nghiệm tại Labo thuộc Bộ môn Sinh học và Di truyền y học, Học viện Quân y.

Hệ mỗi: hệ mỗi được xây dựng dựa trên vùng đặc hiệu 16s-rRNA của 10 loài vi khuẩn phổ biến gây BV đã được công bố trên NCBI và được khảo sát điều kiện tối ưu cho việc xây dựng quy trình M-PCR (bảng 1).

Bảng 1. Hệ thống cặp mồi của 10 loài vi khuẩn gây bệnh.

	Ký hiệu	Vi khuẩn	Cặp mồi xuôi - ngược	Sản phẩm PCR (bp)
Nhóm G1	BV4	<i>G. vaginalis</i>	T TACTGGTGTATCACTGTAA CCGTCACAGGCTGAACAGT	330
	BV5	<i>M. type I</i>	GATGCCAACAGTATCCGTCCG CCTCTCCGACACTCAAGTTCGA	211
	BV6	<i>B. fragilis</i>	TTCGCTTTTCTGTTTCTGTGT CAGCAACCAACCAACATTATT	842
	BV7	<i>A. vaginae</i>	TAGGTCAGGAGTTAAATCTG TCATGGCCCAGAAGACCGCC	155
Nhóm G2	BV2	<i>U. urealyticum</i>	AGAAGACGTTTAGCTAGAGG ACGACGTCCATAAGCAACT	541
	BV8	BVAB 1	GGAGTGTAGGCGGCACTA CTCTCCGATACTCCAGTCTA	90
	BV9	BVAB 2	TTAACCTTGGGGTTCATTACAA GAATACTATTGTGTTAACTGCGC	260
Nhóm G3	BV10	BVAB 3	CATTAGTTGGGCACTCAGGC ACATTTGGGGATTGCTTCGCC	160
	BV12	<i>M. mulieris</i>	ATGGATATGCGTGTGGATGG CCAGGCATGTAAGCCAAA	80
	BV13	<i>S. sanguineus</i>	AATTATTGGGCTTAAAGGGCATC AGTACTCTAGTTATACAGTTTGTAG	102

Tách chiết ADN

Mẫu bệnh phẩm dịch âm đạo được thu và bảo quản trong ống tampon vô trùng, sau đó ADN được tách chiết bằng bộ kit mini QIAamp DNA (Qiagen, Hilden, Đức) theo khuyến nghị của nhà sản xuất. Sau khi thêm 400 µl CL Buffer, 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) và 5 µl RNAase, mẫu tampon được ủ ở 56°C trong 30 phút. Tiếp theo, cho thêm 400 µl BL Buffer và ủ ở 70°C trong 5 phút. ADN sau đó được rửa bằng 400 µl Ethanol và toàn bộ dung dịch được chuyển sang cột lọc được cung cấp. Cuối cùng, dung dịch được tách rửa với W1 và W2. ADN được thu bằng 100 µl dung dịch CE và được bảo quản ở -20°C.

Chuẩn hóa phương pháp PCR đơn mồi

Phản ứng PCR đơn mồi được thiết lập trong 12,5 µl phản ứng với 6,25 µl GoTaq Green Mastermix 2X, 3,75 µl nước khử ion, 0,25 µl mỗi mồi (đặc hiệu cho từng loài vi khuẩn theo bảng 1), 2 µl dịch ADN tách chiết.

Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR đơn mồi như sau: 95°C trong 10 phút, 40 chu kỳ với 94°C - 30s, 55°C (nhóm G1 và G2) hoặc 63°C (nhóm G3) - 30s, 72°C - 30s và 72°C - 10 phút.

Sản phẩm PCR được kiểm tra độ đặc hiệu của mồi sau

khí điện di trên gel agarose 2% trong thời gian 30 phút với cường độ dòng điện 110V và nhuộm với Ethidium bromide 1 µl/ml.

Tối ưu hóa phương pháp M-PCR

Sau khi kiểm tra toàn bộ 10 cặp mồi, tiến hành thực hiện phản ứng M-PCR nhằm xác định đồng thời các tác nhân gây bệnh, giúp tiết kiệm thời gian và chi phí. Dựa trên kích thước băng và nhiệt độ gắn mồi, quy trình được chia thành 3 phản ứng với 3 nhóm vi khuẩn khác nhau: i) Nhóm G1: BV4, BV5, BV6, BV7; ii) Nhóm G2: BV2, BV8, BV9; iii) Nhóm G3: BV10, BV12, BV13.

Phản ứng M-PCR được tối ưu trong 12,5 µl phản ứng với nồng độ các cặp mồi khác nhau (bảng 2) cùng với 6,25 µl GoTaq Green Mastermix 2X và 2 µl dịch ADN tách chiết.

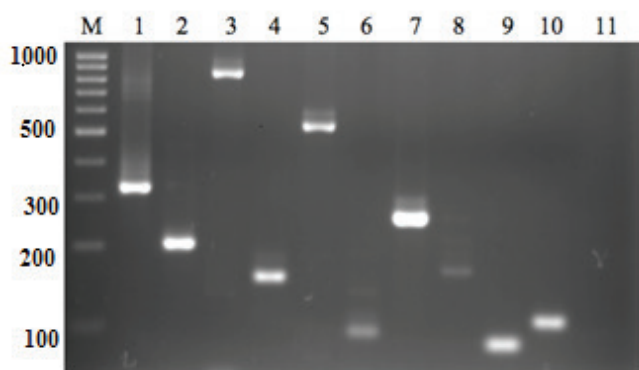
Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 3% trong 45 phút với cường độ dòng điện 110V và nhuộm với Ethidium bromide 1 µl/ml.

Bảng 2. Nồng độ của các cặp mồi trong phản ứng M-PCR.

	Vi khuẩn	Nồng độ cặp mồi xuôi - ngược	Nhiệt độ gắn mồi
Nhóm G1	BV4	0,3 µl	55°C
	BV5	0,2 µl	
	BV6	0,3 µl	
	BV7	0,2 µl	
Nhóm G2	BV2	0,3 µl	55°C
	BV8	0,2 µl	
	BV9	0,2 µl	
Nhóm G3	BV10	0,5 µl	63°C
	BV12	0,2 µl	
	BV13	0,5 µl	

Kết quả và bàn luận**Chuẩn hóa phương pháp PCR đơn mồi**

Sau khi khảo sát điều kiện phản ứng, chúng tôi chọn nhiệt độ gắn mồi tối ưu là 55°C và 63°C cho tùy loài vi khuẩn (bảng 2). Kết quả điện di trên gel agarose 2% các sản phẩm của phản ứng PCR đơn mồi cho thấy, sản phẩm PCR thu được có một băng duy nhất tương ứng với từng loài vi khuẩn, không có sản phẩm phụ, hình ảnh băng sản phẩm thu được rõ nét. Trình tự mồi có độ đặc hiệu cao, chỉ bắt cặp với vùng gene 16s-rRNA của mỗi vi khuẩn mà không bắt cặp với vi sinh vật khác. Đối chứng âm cho kết quả (-), chứng tỏ trong quá trình làm không bị nhiễm chéo (hình 1).

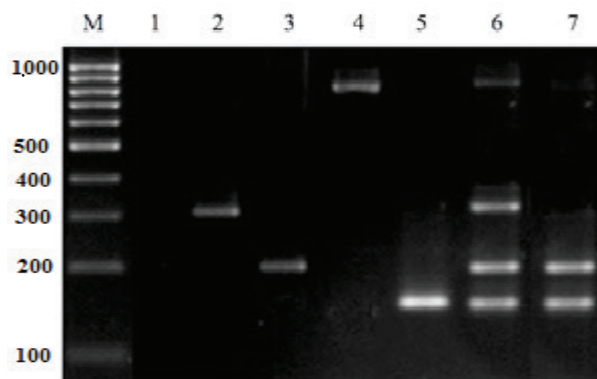


Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR đơn mỗi. M: thang chuẩn ADN 100 bp; 1: *G. vaginalis* - BV4 (330 bp); 2: *M. type I* - BV5 (211 bp); 3: *B. fragilis* - BV6 (842 bp); 4: *A. vaginae* - BV7 (155 bp); 5: *U. urealyticum* - BV2 (541 bp); 6: BVAB 1 - BV8 (90 bp); 7: BVAB 2 - BV9 (260 bp); 8: BVAB 3 - BV10 (160 bp); 9: *M. mulieris* - BV12 (80 bp); 10: *S. sanguinegens* - BV13 (102 bp); 11: đối chứng âm.

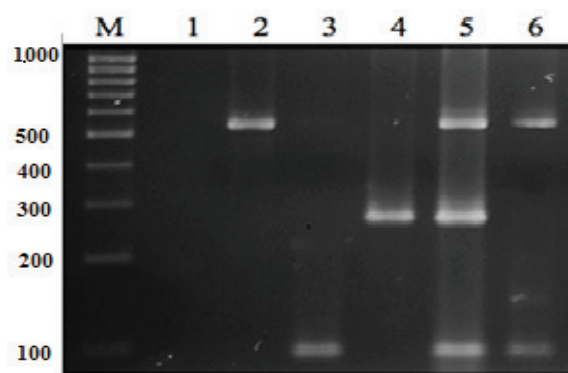
Về lựa chọn phương pháp và hệ môi PCR, có nhiều phương pháp truyền thống có thể xác định sự xuất hiện của các tác nhân gây BV như dựa trên tiêu chuẩn Amsel [11], nhuộm gram, nuôi cấy, kỹ thuật sinh học phân tử như PCR kết hợp lai FISH nhưng mỗi phương pháp đều có ưu, nhược điểm riêng. Nuôi cấy là phương pháp cổ điển, cho kết quả chính xác nhưng yêu cầu cao về điều kiện thu nhận và bảo quản mẫu. Phương pháp nuôi cấy có thể cho kết quả muộn (5-7 ngày), còn phương pháp PCR cho kết quả chỉ sau 5-7 giờ. Ngoài ra, một số loài vi khuẩn kỵ khí không thể xác định được bằng nuôi cấy mà cần được nghiên cứu bằng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại [15]. Với quy trình PCR đơn mỗi, chúng tôi đã xác định được chính xác 10 loài vi khuẩn phổ biến gây BV: BV4, BV5, BV6, BV7, BV2, BV8, BV9, BV10, BV12 và BV13. Với tiềm năng có thể trở thành tiêu chuẩn để chẩn đoán bệnh BV, các chuyên gia y tế sẽ có cơ sở để điều trị với kháng sinh đồ thích hợp cho từng tác nhân.

Tối ưu hóa phương pháp M-PCR

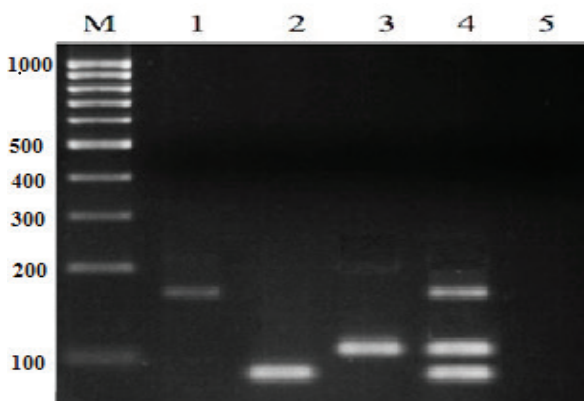
Sau khi chuẩn hóa phương pháp PCR đơn mỗi, chúng tôi thực hiện tối ưu hóa phương pháp M-PCR nhằm xác định đồng thời và chính xác 10 tác nhân gây bệnh. Quy trình được chia thành 3 phản ứng với nhiệt độ gắn mỗi là 55°C (nhóm G1 và G2) và 63°C (nhóm G3). Cụ thể, nhóm G1 xác định BV4, BV5, BV6, BV7; nhóm G2 xác định BV2, BV8, BV9; và nhóm G3 xác định BV10, BV12, BV13 (hình 2, 3 và 4). Tiến hành thử nghiệm quy trình M-PCR chẩn đoán trên 22 mẫu bệnh phẩm cho các kết quả dương tính với các loài vi khuẩn đã xác định được bằng phương pháp PCR đơn mỗi.



Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm M-PCR với nhóm vi khuẩn G1. M: thang chuẩn ADN 100 bp; 1: đối chứng âm; 2: BV4; 3: BV5; 4: BV6; 5: BV7; 6: nhóm vi khuẩn G1 (BV4, BV5, BV6, BV7); 7: mẫu bệnh nhân dương tính với BV5 và BV7.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm M-PCR với nhóm vi khuẩn G2. M: thang chuẩn ADN 100 bp; 1: đối chứng âm; 2: BV2; 3: BV8; 4: BV9; 5: nhóm vi khuẩn G2 (BV2, BV8, BV9); 6: mẫu bệnh nhân dương tính với BV2, BV8.



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm M-PCR với nhóm vi khuẩn G3. M: thang chuẩn ADN 100 bp; 1: BV10; 2: BV12; 3: BV13; 4: nhóm vi khuẩn G3 (BV10, BV12, BV13); 5: đối chứng âm.

Phản ứng M-PCR cho các sản phẩm riêng biệt và có tính ổn định như trong phản ứng PCR đơn mỗi, không có phản ứng chéo giữa các cặp mỗi. Thử nghiệm trên các mẫu bệnh

phẩm cho thấy xuất hiện băng sáng ứng với vị trí của các loài vi khuẩn đã xác định, bao gồm kết quả dương tính với 1 loài hay đồng nhiễm với nhiều loài. Như vậy, nghiên cứu đã bước đầu xây dựng thành công quy trình M-PCR để phát hiện đồng thời 10 loài vi khuẩn phổ biến gây BV.

Theo nghiên cứu mới đây của K. Tosheva-Daskalova và cs [16], 3 cặp môi đã được sử dụng cho phản ứng M-PCR nhằm phát hiện 3 loài vi khuẩn gây bệnh là *G. vaginalis* - BV4, *A. vaginae* - BV7 và *Mobiluncus* spp. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã sử dụng 4 cặp môi trong phản ứng G1 nhằm phát hiện BV4, BV5, BV6 và BV7. Kết quả cho thấy, đã phát hiện đồng thời hơn 2 tác nhân gây bệnh là BV4 và BV7 mà vẫn đảm bảo được độ chính xác và chất lượng băng điện di, mang lại hiệu quả xét nghiệm cao hơn.

Tuy không thể hoàn toàn thay thế các phương pháp xét nghiệm cổ điển, song quy trình này mang nhiều ưu thế vượt trội. Nổi bật là có thể xác định chính xác và đồng thời nhiều tác nhân gây bệnh, làm cơ sở để có hướng điều trị bệnh hiệu quả. Các mẫu dùng trong PCR chỉ cần bảo quản lạnh, không yêu cầu nghiêm ngặt như trong phương pháp nuôi cấy và nhuộm gram. Hơn nữa, phương pháp này còn giảm tối đa chi phí và thời gian xét nghiệm.

Kết luận

Đã ứng dụng kỹ thuật PCR đơn môi trong chẩn đoán và xác định được 10 loài vi khuẩn phổ biến gây BV. Đồng thời tối ưu hóa thành công phương pháp M-PCR nhằm phát hiện đồng thời các tác nhân gây bệnh và được ứng dụng thử nghiệm để hỗ trợ chẩn đoán cho bệnh nhân làm hỗ trợ sinh sản.

Kiến nghị tiếp tục chuẩn hóa kỹ thuật M-PCR để có thể phát hiện đồng thời các tác nhân gây bệnh khác, mở rộng quy mô thí nghiệm với cỡ mẫu lớn để có thể đánh giá tính đặc hiệu của kỹ thuật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] J. Schwebke (2009), "New concepts in the etiology of bacterial vaginosis", *Current Infectious Disease Reports*, **11**(2), pp.143-147.
- [2] H. Sharma (2014), "Microbiota and pelvic inflammatory disease", *Seminars in Reproductive Medicine*, **32**(1), pp.43-49.
- [3] N. Van Oostrum, et al. (2013), "Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-

analysis", *Human Reproduction*, **27**(7), pp.809-815.

- [4] H.L. Martin, et al. (1999), "Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition", *Journal of Infectious Diseases*, **180**(6), pp.1863-1868.

- [5] C. Mitchell, et al. (2009), "Detection of fastidious vaginal bacteria in women with HIV infection and bacterial vaginosis", *Infectious Diseases in Obstetric and Gynecology*, **2009**, pp.1-6, doi: 10.1155/2009/236919.

- [6] M.G. Gravett, et al. (1986), "Independent associations of bacterial vaginosis and chlamydia trachomatis Infection with adverse pregnancy outcome", *JAMA (The Journal of the American Medical Association)*, **256**(14), pp.1899-1903.

- [7] P.E. Hay, et al. (1994), "Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage", *BMJ*, **308**, pp.295-298.

- [8] T. Haahr, et al. (2016), "Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes: a prospective study in IVF patients", *Human Reproduction*, **31**(4), pp.795-803.

- [9] J.M. Marrazzo (2011), "Interpreting the epidemiology and natural history of bacterial vaginosis: are we still confused?", *Anaerobe*, **17**(4), pp.186-190.

- [10] D.A. Eschenbach, et al. (2000), "Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora", *Clinical Infectious Diseases*, **30**(6), pp.901-907.

- [11] R. Amsel, et al. (1983), "Nonspecific vaginitis - Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations", *American Journal of Medicine*, **74**(1), pp.14-22.

- [12] R.P. Nugent, M.A. Krohn, S.L. Hillier (1991), "Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation", *Journal of Clinical Microbiology*, **29**(2), pp.297-301.

- [13] D.N. Fredricks, T.L. Fiedler, J.M. Marrazzo (2005), "Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis", *The New England Journal of Medicine*, **353**, pp.899-1911.

- [14] D.N. Fredricks, et al. (2007), "Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis", *Journal of Clinical Microbiology*, **45**(10), pp.3270-3276.

- [15] D.N. Fredricks, J.M. Marrazzo (2005), "Molecular methodology in determining vaginal flora in health and disease: its time has come", *Curent Infectious Disease Reports*, **7**(6), pp.463-470.

- [16] K. Tosheva-Daskalova, et al. (2017), "Multiplex PCR detection of problematic pathogens of clinically heterogeneous bacterial vaginosis in Bulgarian women", *Turkish Journal of Medical Sciences*, **47**, pp.1492-1499.