

Frequency of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* among the women with vaginal infection in Robat Karim-Tehran (2013)

Onsory Kh^{1*}, Shahbani-Zahir H², Haji Mehdi Nouri Z³, Abdolahi M⁴

- 1- Department of Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Parand Branch, Parand, I. R. Iran.
2- Department of Microbiology, National Genetics Research Center, Tehran-Karaj Highway, Tehran, I. R. Iran.
3- Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Sirjan Branch, Sirjan, I. R. Iran.
4- Department of Cellular and Molecular Biology, Pardis Building, Tehran University, Tehran, I. R. Iran.

Received July 11, 2015; Accepted December 11, 2015

Abstract:

Background: *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* are among the major causes of vaginosis, which their detection is difficult in culture media. The aim of this study was to compare two detection methods (PCR and conventional culture media) for the determination of frequency of these bacteria among women with vaginal infection.

Material and Methods: For this purpose, we conducted a study for patients with bacterial vaginosis admitted to Imam Zaman and Imam Khomeini Hospitals ($n=250$) in comparison with healthy women with no vaginal infections ($n=150$). The extracted DNA was used as template to amplify 16srRNA coding gene using specific primers in two separate PCR reactions. Then the data were analyzed using the logistic regression at the $P<0.05$ significant level.

Results: The results indicated that 38% and 46.8% of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* were positive in culture, while this was the case in 68.8% and 77% of samples in PCR, respectively. The results show that the using PCR for molecular identification of bacteria is highly accurate, sensitive and particularly specific, where the culture negative samples were detected by this method.

Conclusion: For the detection of *Mycoplasma genitalium* and *hominis* among the vaginotic cases PCR is a highly reliable and sensitive method compared to the culture media. Using specific primers, PCR can confidently detect and separate infectious agents even in the genesis and species level.

Keywords: *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, Bacterial vaginosis, Culture, PCR

* Corresponding Author.

Email: onsory@gmail.com

Tel: 0098 0919 102 0890

Fax: 0098 216 607 0505

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2016; Vol. 20, No 3, Pages 244-251

Please cite this article as: Onsory Kh, Shahbani-Zahir H, Haji Mehdi Nouri Z, Abdolahi M. Frequency of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* among the women with vaginal infection in Robat Karim-Tehran (2013). Feyz 2016; 20(3): 244-51.

بررسی شیوع مایکوپلاسمای زنیتالیوم و مایکوپلاسمای هومینیس در بین زنان مبتلا به عفونت واژینال در شهر رباط کریم طی سال ۱۳۹۲

خديجه عنصري^۱، حسين شهبانی ظهير^۲، زهرا حاجي مهدى نوري^۳، منا عبدالله^۴

خلاصه:

سابقه و هدف: مایکوپلاسمای زنیتالیوم و هومینیس از عوامل مهم واژینوز محسوب می‌شوند و شناسایی آنها توسط روش سنتی کشت دادن با مشکل مواجه است. هدف از انجام این تحقیق، بررسی شیوع این باکتری‌ها با به‌کارگیری تکنیک PCR در مقایسه با کشت در زنان مبتلا به عفونت می‌باشد.

مواد و روش‌ها: برای انجام این مطالعه مقطعی ۲۵۰ نفر بیمار مراجعه کننده به بیمارستان‌های امام خمینی و امام زمان(ع) استان تهران و ۱۵۰ نفر فرد سالم مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج شده از نمونه‌ها به عنوان الگو جهت تکثیر ژن کد کننده rRNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در دو واکنش PCR جداگانه استفاده شد.

نتایج: نتایج بدست آمده نشان داد که کشت مایکوپلاسمای زنیتالیوم و مایکوپلاسمای هومینیس به ترتیب در ۳۸ و ۴۶/۸ درصد موارد مثبت بود، درحالی که با مطالعه نمونه‌ها به روش PCR به ترتیب ۶۲ و ۷۷/۲ درصد از نمونه‌ها مثبت گزارش شدند. نتایج نشان‌دهنده آن است که برای شناسایی مولکولی این باکتری‌ها PCR از دقت، حساسیت و اختصاصیت ویژه‌ای برخوردار است، به طوری که نمونه‌های کشت منفی نیز با این روش قابل تشخیص می‌باشند.

نتیجه‌گیری: برای شناسایی عوامل عفونی در مبتلایان به واژینوز، روش مولکولی PCR به‌طور معنی‌داری نسبت به کشت از حساسیت بالاتری برخوردار بوده و با به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی می‌توان این عوامل بیماری‌زا را در حد جنس و گونه با دقت بیشتری مورد شناسایی قرار داد.

واژگان کلیدی: مایکوپلاسمای زنیتالیوم، مایکوپلاسمای هومینیس، واژینوز باکتریایی، کشت، PCR

دو ماهنامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیستم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۵، صفحات ۲۴۴-۲۵۱

مایکوپلاسماهای قدرت رشد بسیار آرام و سخت در روی محیط‌های کشت مصنوعی دارند که سبب بیماری‌های مختلف در دستگاه ادراری-تناسلی، اختلال در تولید مثل و مرگ و میر نوزادان می‌شود [۳]. یکی از مهم‌ترین این گونه‌ها که سبب بیماری‌های متنوعی در مردان، زنان و نوزادان می‌شود، مایکوپلاسمای زنیتالیوم می‌باشد [۵،۶]. این باکتری به عنوان یکی از عوامل ایجاد‌کننده عفونت‌های منتقله از راه جنسی در قسمت اوروزنیتال در مردان و زنان در سراسر دنیا محسوب می‌شود و اغلب سبب اورتیت، سرویسیت، واژینیت و اندومنتریت حاد می‌شود [۶]. با روش PCR معمولی، میزان جداسازی مایکوپلاسمای زنیتالیوم در انگلستان بین صفر تا ۶ درصد و در کشور نیوزیلند تا ۳۴/۴ درصد گزارش شده است [۷]. مایکوپلاسمای هومینیس اولین باکتری با منشاء انسانی است که در سال ۱۹۷۳ جداسازی شد. این باکتری در واژن ۲/۳ درصد زنان مبتلا به واژینوز باکتریایی و ۱۰ درصد زنان سالم یافت می‌شود. در زنان باردار مبتلا به واژینوز باکتریایی، احتمال پارگی زودرس پرده‌های جنینی، زایمان زودرس و اندومنتریت پس از سزارین افزایش می‌یابد. مایکوپلاسمای هومینیس در پروستاتیت، تب پس از زایمان، سقط جنین خودبه‌خودی تکرار شونده، پیلونفریت، تولد نوزاد مرده، تولد نوزاد با وزن کم، پنومونی نوزادی و متزیت

مقدمه

واژینوز باکتریایی که قبلاً بنام واژنیت گاردنلایی نامیده می‌شد، عبارت است از تغییر در فلور باکتریایی طبیعی واژن که به کاهش لاکتوباسیل‌ها به‌ویژه سویلهای مولد پراکسید هیدروژن و جایگزینی آنها با تعداد زیادی از باکتری‌ها از جمله گاردنلای و اژنیتالیس، مایکوپلاسمای هومینیس، اوره آ پلاسمای اوره آلتیکوم، باسیل‌های بی‌هوایی، گونه‌های پیتواستریتوکوک، و موبیلونکوس) می‌اجامد [۲،۱].

^۱ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، ایران

^۲ گروه میکروبیولوژی، مرکز ملی تحقیقات ژنتیک، اتویان تهران-کرج، ایران

^۳ دانشجوی دکتری گروه سلولی-مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد واحد سیرجان، سیرجان، ایران

^۴ دانشجوی دکتری گروه سلولی-مولکولی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* لشانی نویسنده مسئول؛ پرند، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی دوچرخه؛ ۰۲۱۶۶۰۷۰۵۰۵. تلفن: ۰۹۱۹ ۱۰۲۰۸۹۰. پست الکترونیک: onsory@gmail.com

تاریخ پذیرش (هایی): ۹۴/۸/۲۰. تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۲۰.

ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این پژوهش مقطعی از ۲۵۰ نفر بیمار با علائم بالینی واژینوز باکتریایی و ۱۵۰ نفر فرد سالم بدون عفونت واژینال که از اردیبهشت ۱۳۹۲ تا آبان همان سال به بیمارستان‌های امام خمینی و امام زمان^(ع) واقع در شهرستان رباط کریم مراجعه کرده بودند، نمونه‌گیری صورت گرفت. از افراد مورد مطالعه دو سواب تهیه شد، یکی در محیط کشت انتقالی PPLO و سواب دیگر در بافر فسفات (PBS) به آزمایشگاه انتقال داده شدند. از آنجایی که قابلیت زنده ماندن مایکوپلاسمها با افزایش درجه حرارت به سرعت کاهش می‌یابد، در طی انتقال، نمونه‌ها در محیطی خنک حمل گردید. پرسشنامه‌ای شامل اطلاعات بیماران از قبل سن، سن ازدواج، سن اولین بارداری، دفعات بارداری، روش جلوگیری از بارداری، سابقه سقط جنین، استفاده از استخرهای عمومی، استفاده از پمادهای آنتی‌بیوتیک واژینال و استفاده از ژلهای معطر در اختیار افراد مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌هایی که در محیط کشت انتقالی به آزمایشگاه انتقال داده شدند، پلافالسه با استفاده از سرنگ‌های ۵ میلی‌لیتری از فیلترهای سرسرنگی با قطر منفذ ۰/۴۵ میکرون عبور داده شدند. ۲۰ میکرولیتر از محلول فیلتر شده به داخل ۱۸۰ میکرولیتر محلول Arginine PPLO broth برای مایکوپلاسما هومینیس و ۲۰ میکرولیتر از همان محلول فیلتر شده در ۱۸۰ میکرولیتر محلول Glucose PPLO broth تلقیح شدند و پس از قرارگیری در انکوباتور CO₂ دار به منظور تامین ۷ تا ۱۰ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محیط‌ها به مدت ۸ هفته نگهداری شده و به طور روزانه از نظر تغییر رنگ بررسی شدند. در صورت مثبت بودن کشت مایکوپلاسما ژنیتالیوم به دلیل تجزیه آنزیمی گلوکز توسط باکتری، اسید تولید می‌شود و pH محیط کشت را کاهش می‌دهد و رنگ قرمز محیط کشت بدلت وجود فنول رد به رنگ زرد تغییر می‌یابد. مایکوپلاسما هومینیس با مصرف آرژنین، مواد قلیایی تولید می‌کند و pH محیط کشت را افزایش داده و رنگ زرد محیط کشت بدلت وجود فنول رد به رنگ قرمز تغییر می‌یابد که از همین ویژگی به منظور شناسایی استفاده شد. به محض مشاهده تغییر رنگ محیط کشت مایع، از آنها برای کشت باکتری در محیط جامد استفاده شد و پلیت‌ها به مدت ۲ الی ۵ روز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور CO₂ دار گرمگذاری شدند. در طی این مدت پلیت‌ها در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. DNA کروموزومی از تمام

نوزادی نیز نقش دارد [۸]. مایکوپلاسمها به واسطه برخی از خصوصیات نظیر فقدان دیواره سلولی، از باکتری‌های دیگر متمایز می‌شوند و به علت اندازه بسیار کوچک و نیز مشکلاتی که در زمینه کشت و جداسازی آنها وجود دارد، تاکنون کمتر مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌اند [۱۰،۹]. به علت سخت رشد بودن، برای جدا-سازی گونه‌های آوره‌آپلاسما و مایکوپلاسما هومینیس به ۲ تا ۵ روز کشت بر روی محیط کشت‌های اختصاصی و برای مایکوپلاسما ژنیتالیوم گاهی به بیش از ۸ هفته زمان کشت نیاز می‌باشد. به علت گرانی و ناپایداری این محیط‌ها، نیازمندی به فاکتورهای ضروری رشد در تهیه این محیط‌ها، دشواری تهیه این فاکتورها، کنترل دقیق pH محیط، نیازهای غذایی پیچیده، فرورفتگن کلونی‌ها در آگار، میکروسکوپی بودن آنها و نیاز به پرستن آزمایشگاهی با تجربه، کشت و جداسازی مایکوپلاسماها در کشور ما به طور معمول انجام نمی‌گیرد. بنابراین اهمیت و ضرورت بررسی این میکروارگانیسم‌ها با روش‌های نوین و سریع بیش از پیش احساس می‌شود. با توجه به اهمیت بیماری‌های ایجاد شده توسط مایکوپلاسما ژنیتالیوم و مایکوپلاسما هومینیس و عواقب و خیمی که به دنبال دارد، لازم است افراد آلوده به سرعت شناسایی و درمان شوند. بنابراین تشخیص این ارگانیسم‌ها مسئله بسیار مهمی به شمار می‌آید. روش‌های مولکولی، از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) دارای پتانسیل زیادی جهت تشخیص دقیق و سریع این دو باکتری می‌باشد. و در نتیجه می‌تواند امکان شروع هرچه سریع‌تر درمان آنتی‌بیوتیکی بیماری را فراهم نماید. امروزه به طور گسترده‌ای از این تکنیک برای شناسایی عوامل میکروبی بیماری‌زا در نمونه‌های بدست آمده از بیماران استفاده می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که با به کارگیری این تکنیک عوامل بیماری‌زا در تعداد بیشتری از بیماران قابل شناسایی می‌باشند. اثبات عامل بیماری‌زا برای درمان بھینه بیماران بسیار ضروری است. روش‌های کشت فاقد حساسیت و اختصاصیت کافی هستند که این مشکلات ممکن است به واسطه درمان قبلی با آنتی‌بیوتیک‌ها و یا عوامل بیماری‌زایی باشد که کشت آنها ذاتاً مشکل می‌باشد. از این عوامل بیماری‌زا می‌توان به گونه‌هایی از جنس‌های بر دتلا، لژیونلا، کوکسیلا، و مایکوپلاسما اشاره کرد. بنابراین، هدف ما از انجام این تحقیق، بررسی به کارگیری تکنیک PCR برای تشخیص افترافق مایکوپلاسما هومینیس و مایکوپلاسما ژنیتالیوم در نمونه‌های به دست آمده از زنان مبتلا به عفونت واژینال مراجعة کننده به بیمارستان‌های امام خمینی و امام زمان^(ع) رباط کریم بود. هم‌چنین، حساسیت این تکنیک در مقایسه با تکنیک کشت که به طور سنتی در آزمایشگاه‌ها پوشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد مورد

PCR مورد استفاده قرار گرفت (جدول شماره ۱). واکنش PCR در حجم نهایی ۱۱۱ ۲۵ و در ۳۵ سیکل با دمای اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد، دمای ۶۲ درجه برای اتصال پرایمر در مايكوپلاسما ژنيتالیوم و ۵۹/۵ برای مايكوپلاسما هومینیس و دمای ۷۲ درجه برای ادامه واکنش هر یک به مدت یک دقیقه صورت گرفت.

نمونه های بافرهای انتقالی که بدین منظور تهیه شده بود، با استفاده از کیت استخراج DNA باکتری های گرم منفی (مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران)، استخراج گردید و به عنوان الگو برای تکثیر ژن 16s rDNA با استفاده از پرایمرهای اختصاصی [۱۱] مايكوپلاسما هومینیس (Mh) و مايكوپلاسما ژنيتالیوم (Mg) در تکنیک PCR شماره ۱- توالی پرایمرها

ژن هدف	کاربرد	جدول شماره ۱- توالی پرایمرها
F-Mg		3'-AGTTGATGAAACCTAACCCCTGG-5'
R-Mg		3'-GACCATCAAGGTATTCTAACAGC-5'
F-Mh		3'-TGAAAGGCGCTGTAAGGCAC-5'
R-Mh		3'-TAATCCTGTTGCTCCCCAC-5'

۴۴/۵ سال و محدوده سنی گروه کنترل بین ۱۹ تا ۷۵ سال با میانگین سنی ۴۷ سال بود. افراد رده سنی ۴۴-۱۸ سال درصد بیشتری (۶۹/۲) را در بین بیماران در مقایسه با گروه کنترل به خود اختصاص داده بودند. افرادی که رعایت بهداشت در تعویض به موقع لباس زیر نداشتند، درصد بیشتری از افراد مورد مطالعه بین دو گروه بیمار و کنترل را تشکیل می دادند. ارتباط معنی داری بین عدم رعایت وضعیت مناسب بهداشت و خطر ابتلا به عفونت باکتریایی مشاهده نشد ($P=0/49$). بیشترین تعداد شرکت کنندگان بیش از دو فرزند داشتند و از لحاظ آماری ارتباط مثبتی بین شیوع بیماری و تعداد زایمان وجود داشت ($P=0/01$) (جدول شماره ۲).

اطلاعات به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. متغیرهای کمی به صورت میانگین و انحراف معیار و متغیرهای کیفی به صورت درصد گزارش شدند. جهت مقایسه متغیرهای کیفی و مقایسه درصد آنها از آزمون های Chi Squire و Cross tabs استفاده شد. رگرسیون لجستیک، Odds Ratio، Confidence Interval (CI)، بررسی متغیرها استفاده شده است و سطح $P<0/05$ برای معنی دار بودن اختلاف در نظر گرفته شد.

نتایج

محدوده سنی بیماران بین ۱۸ تا ۷۱ سال با میانگین سنی

جدول شماره ۲- خصوصیات دموگرافیک افراد حاضر در گروه های مطالعه

P	OR (95% CI)	کنترل (درصد)	خصوصیات مورد بررسی	
			سن (سال)	
		۱۹-۷۵	۱۸-۷۱	
		۴۷±۱۴/۳۹	۴۴/۵±۱۲/۴۳	میانگین ± انحراف معیار
		۸۹ (۵۹/۳)	۱۷۳ (۶۹/۲)	
		۶۱ (۴۰/۶)	۷۷ (۳۰/۸)	
				تعویض به موقع لباس زیر
		۶۱ (۴۰/۶)	۹۳ (۳۷/۲)	مناسب
۰/۴۹	۰/۸۶ (۰/۰۵۷-۱/۳۰)	۸۹ (۵۹/۳)	۱۵۷ (۶۲/۸)	نامناسب
				تعداد زایمان
		۳۱ (۲۰/۶)	۲۹ (۱۱/۶)	۰
۰/۰۱	۰/۵۰ (۰/۰۲۹-۰/۸۷)	۱۱۹ (۴۷/۶)	۲۲۱ (۸۸/۴)	۲>

تعیین توالی ارسال شدند و توالی های به دست آمده با استفاده از نرم افزار BLAST در سایت NCBI مورد تایید قرار گرفت. نتایج نشان دادند که با استفاده از این توالی ها می توان به طور اختصاصی وجود باکتری های مايكوپلاسما ژنيتالیوم و مايكوپلاسما هومینیس را بدون نیاز به کشت در نمونه های بیمار تایید کرد.

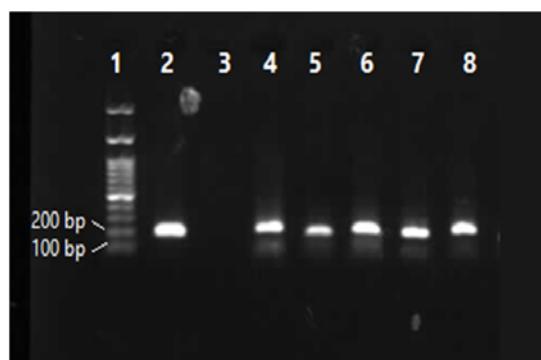
شناسایی سویه های مايكوپلاسما به روش PCR با تعیین توالی ژن 16s rDNA استفاده از PCR با پرایمرهای اختصاصی جهت تکثیر ژن 16s rDNA منجر به تولید قطعاتی به طول ۱۹۴bp برای مايكوپلاسما ژنيتالیوم (شکل شماره ۱) و ۵۸۹bp برای مايكوپلاسما هومینیس گردید که به صورت باند منفرد بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد مشاهده شدند (شکل شماره ۲). محصولات PCR برای

در این مطالعه حضور مایکوپلاسما ژنیتالیوم در گروه بیمار در محیط کشت ۹۵ نمونه (۳۸ درصد) مشاهده شد. نتایج PCR نشان می‌دهد که از ۲۵۰ بیمار مورد مطالعه، ۱۵۵ مورد (۶۲ درصد) PCR مثبت شدند. در مرحله کشت، ۱۱۷ مورد (۴۶/۸ درصد) کلونی تخم مرغی شکل مایکوپلاسما هومینیس جداسازی شده و مورد شناسایی قرار گرفت، درحالی که ۱۹۳ نمونه (۷۷/۲ درصد) در روش PCR مثبت اعلام گردید. در یک مورد با وجود مشاهده تغییر رنگ محیط PPLO مایع از زرد به قرمز، علی‌رغم حضور مایکوپلاسما، کلونی تخم مرغی شکل در محیط PPLO آگار مشاهده نگردید، ولی از طریق تکنیک PCR همین نمونه مثبت شده و حضور مایکوپلاسما هومینیس تایید گردید (جدول شماره ۳).

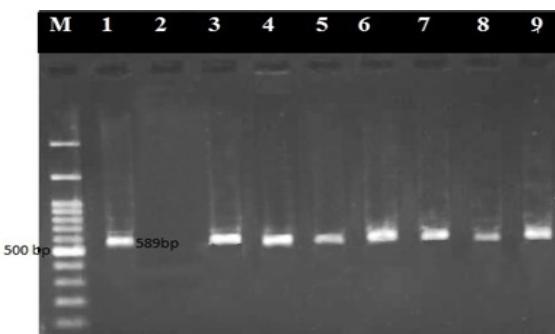
بحث

باتوجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، شناسایی مایکوپلاسما ژنیتالیوم و مایکوپلاسما هومینیس با روش PCR نسبت به روش کشت از اطمینان و دقت بیشتری برخوردار است. از طرف دیگر اطلاعات به دست آمده نشان‌دهنده ارتباط مستقیم این میکروارگانیسم با ابتلای افراد به بیماری واژینوز باکتریایی می‌باشد. در مطالعات مختلف شیوع متفاوتی از مایکوپلاسماهای تناслی در نقاط مختلف جهان گزارش شده است.

پلاسماهای جدا شده از انسان نقش مایکوپلاسما هومینیس، به عنوان ارگانیسم فرucht طلب ایجاد کننده عفونت در دستگاه ژنیتال به اثبات رسیده است. مایکوپلاسماهای ژنیتال به ویژه مایکوپلاسما هومینیس و مایکوپلاسما ژنیتالیوم ساکن طبیعی دستگاه ادراری- تناسلی مردان و زنانی است که فعالیت جنسی دارند [۱۸]. با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر، تعداد نسبتاً بالایی از زنان دارای عفونت واژینوز باکتریایی، آلوود به مایکوپلاسما هومینیس و مایکوپلاسما ژنیتالیوم می‌باشند. چنانچه اشاره شد حضور مایکوپلاسما هومینیس در مجاری ادراری- تناسلی اغلب بدون علامت بالینی می‌باشد و با عواقب خطرونک این عفونتها از جمله عفونت التهابی لگن و نا- باروری غربالگری میکروبی برای زنان و همسرانشان به خصوص در سنین جوانی امری اجتناب ناپذیر است [۲۰، ۱۹]. چون کشت مایکوپلاسما ژنیتالیوم ۸ هفته و کشت مایکوپلاسما هومینیس ۲ تا ۵ روز طول می‌کشد، مطالعات نشان می‌دهد که روش‌های تکثیر DNA، یک روش سریع و حساس‌تر از کشت است [۱۹، ۱۸]. نتایج نشان می‌دهد که روش مناسبی برای جداسازی مایکوپلاسما ژنیتالیوم و مایکوپلاسما هومینیس می‌باشد [۲۱]. از طرفی چون روش کشت بسیار طولانی و وقت‌گیر می‌باشد، امکان



شکل شماره ۱- ژل آگاروز محصول PCR مایکوپلاسما ژنیتالیوم
ردیف ۱: مارکر، ردیف ۲: کنترل مثبت، ردیف ۳: کنترل منفی، و
ردیف‌های ۴ تا ۸ نمونه‌های مثبت



شکل شماره ۲- ژل آگاروز محصول PCR مایکوپلاسما هومینیس
ردیف M: مارکر، ردیف ۱: کنترل مثبت، ردیف ۲: کنترل منفی، و
ردیف‌های ۳ تا ۹ نمونه‌های مثبت

جدول شماره ۳- فراوانی مایکوپلاسما هومینیس و مایکوپلاسما ژنیتالیوم در کشت و PCR نمونه‌های جدا شده از افراد شرکت کننده در مطالعه

PCR تعداد (درصد)	کشت		
	مایکوپلاسما ژنیتالیوم	مایکوپلاسما هومینیس	مایکوپلاسما ژنیتالیوم
۱۴۱(۹۴)	۹(۶)	۱۰۰(۱۰۰)	۰
۷۸(۳۱/۲)	۱۵۵(۶۲)	۱۷۲(۶۸)	۹۵(۳۸)
بیمار			
۱۵۰(۹۲/۶)	۱۱(۷/۳)	۱۰۰(۱۰۰)	۰
۵۷(۲۲/۸)	۱۹۳(۷۷/۲)	۱۳۳(۵۳/۲)	۱۱۷(۴۶/۸)
بیمار			

در مطالعاتی که بر روی سرویسیت انجام گرفته است فراوانی مایکوپلاسما ژنیتالیوم در نیوزیلنند ۴/۸ درصد [۱۲]، در فرانسه ۷/۶ درصد [۱۳]، در آمریکا ۷ درصد [۱۴]، در ونزوئلا [۱۵]، در کنیا ۱۷/۲ درصد [۱۵]، در نیروز ۴/۵ درصد [۱۶] و در سودان ۵ درصد [۱۷] گزارش شده است. در بین مایکو-

با مطالعه بر روی ۵۶ زوج جهت بررسی میزان فراوانی باکتری‌های مايكوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اورآلیتیکوم بین خانم‌های نابارور در مقایسه با آلوودگی همسران آنها با روش کشت انجام دادند، نشان دادند که $39/29$ درصد خانم‌ها و $19/64$ درصد مردان، مبتلا به مايكوپلاسما هومینیس هستند که نسبت به مطالعه حاضر میزان کمتری را نشان می‌دهد. البته در بررسی انجام شده توسط نیاکان تعداد افراد مورد بررسی محدود بوده (40 مرد نابارور) که نمی‌توانست آمار صحیحی از شیوع این میکروارگانیسم را نشان دهد [۲۷]. در مطالعه حاضر میانگین سنی بیماران $44/5$ بوده و ارتباط معنی‌داری بین کلونیزاسیون مايكوپلاسما هومینیس و مايكوپلاسما ژنيتالیوم بر اساس سن بیماران مشاهده شد، به طوری‌که بیشترین درصد کلونیزاسیون این ارگانیسم ($69/2$ درصد) در افرادی بود که در سنین 18 تا 44 سال بودند. در مطالعه موسویان و همکاران نشان داده شد در کسانی که در سن فعالیت جنسی هستند، میزان این باکتری بیشتر است که با مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. به‌نظر می‌رسد فعالیت جنسی زیاد، بیش از سن در کلوزیزاسیون این باکتری نقش داشته باشد [۹]. در مطالعه‌ای که مظفری و همکاران بر روی 205 بیمار دارای عفونت دستگاه تناسلی ادراری مراجعه کننده به بیمارستان‌های دانشگاه علوم پزشکی ایران در سال 1386 در تهران انجام دادند، 16 مورد ($7/7$ درصد) از نظر مايكوپلاسما هومینیس مثبت بودند. بیشترین موارد مثبت در گروه سنی $29-39$ سال دیده شد. این نتایج مشابه مطالعات صورت گرفته در کشورهای هند و ترکیه بود که ناشی از نزدیکی فرهنگ این کشورها با ایران می‌باشد [۲۶]. هم‌چنین، در بین بیماران، افرادی که عدم رعایت بهداشت در تعویض بهموقع لباس زیر خود داشتند، بیشترین درصد مبتلایان ($62/8$ درصد) را به‌خود اختصاص دادند و خطر آلوودگی آنها به این دو باکتری افزایش داشته، ولی از نظر آماری معنی‌دار نبوده است ($P=0/49$). در مطالعه حاضر $124/8$ نفر ($38/8$ درصد) از بیماران بیش از دو زایمان داشتند و ارتباط معنی‌دار بین حضور مايكوپلاسما هومینیس و مايكوپلاسما ژنيتالیوم و این متغیر مشاهده شد ($P=0/01$). در مجموع از بین 250 زن مبتلا به واژینوز باکتریال، در 155 مورد (62 درصد) آلوودگی به مايكوپلاسما ژنيتالیوم با روش PCR و در 95 مورد (38 درصد) در روش کشت مشاهده شد. آلوودگی به مايكوپلاسما هومینیس در PCR روش کشت در $46/8$ درصد موارد مثبت شد و در روش $77/2$ درصد نمونه‌ها شناسایی شدند. به‌همین دلیل استفاده از کشت به‌نهایی منجر به عدم شناسایی و تشخیص تعداد متابھی از عفونت مايكوپلاسمایی خواهد شد. بر این اساس استفاده از روش مولکولی PCR جهت شناسایی باکتری پیشنهاد می‌گردد. از

دسترسی به نتایج مطلوب در زمان کوتاه امکان پذیر نیست. با اینکه مايكوپلاسما هومینیس نسبت به سایر مايكوپلاسماهای انسانی در شرایط آزمایشگاهی آسان‌تر رشد می‌کند، ولی در مقایسه با باکتری‌های دیگر، به دلیل فقدان دیواره سلولی به شرایط محیطی از قبیل pH، دما و ترکیبات موجود در محیط کشت، بسیار حساس است و بهنگام نمونه برداری و یا انتقال به آزمایشگاه ممکن است باکتری ضعیف شده و یا از بین برود و در محیط‌های کشت قابل شناسایی نباشد. از طرفی، مايكوپلاسماها به‌دلیل فقدان دیواره سلولی، در برابر شرایط محیطی حساس‌اند و نتایج کشت می‌تواند به صورت کاذب منفی باشد، در حالی که PCR روشی حساس، سریع و دارای ویژگی‌های بالا و اختصاصی بوده و می‌تواند حتی DNA باکتری‌های مرده را نیز تشخیص دهد. در مطالعه Luki و همکاران با روش PCR، $3/6$ درصد مايكوپلاسما ژنيتالیوم در زنان باردار مشاهده شده است که از مطالعه حاضر کمتر می‌باشد و می‌تواند ناشی از تعداد نمونه، گروه مورد مطالعه و نوع PCR باشد [۲۲]. در مورد میزان جداسازی مايكوپلاسما ژنيتالیوم از نمونه‌های بالینی در ایران مطالعات اندکی صورت گرفته است. وطني و همکاران به جداسازی این باکتری از افراد مبتلا به عفونت‌های تناسلی پرداخته و این میزان را حدود 2 درصد گزارش نموده‌اند [۶]. در مطالعه دیگر، $5/7$ درصد از جمعیت مورد مطالعه آلووده به مايكوپلاسما ژنيتالیوم بودند [۲] که با مطالعه Luki و همکاران [۲۲] مطابقت نسبی داشته، ولی از مطالعه حاضر کمتر بود. در مطالعه حاضر شیوع مايكوپلاسما هومینیس توسط روش کشت $46/8$ درصد بوده، در حالی که با تکنیک PCR در درصد می‌باشد. شیوع این باکتری با روش کشت از 5 درصد در کشور مکزیک تا 26 درصد در ترکیه متغیر بوده است [۲۴، ۲۳]. در کانادا شیوع مايكوپلاسما هومینیس $10/9$ درصد گزارش شده است [۲۴]. در مطالعه‌ای که حسنی و همکاران در سال 1389 بر روی 191 بیمار مبتلا به عفونت دستگاه تناسلی با عالیم بالینی مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهران با روش PCR انجام دادند، 27 درصد از بیماران مبتلا به مايكوپلاسما هومینیس بودند [۲۵]. وطني و همکاران در سال 1385 روی 174 بیمار مطالعه‌ای مبنی بر بررسی آلوودگی با مايكوپلاسماهای ژنیتال در زنان مبتلا به واژینوز باکتریایی کشت منفی انجام دادند که در نتیجه $59/3$ درصد بیمارانی که نتیجه کشت آنها منفی بود، در PCR، مثبت اعلام شدند [۶]. در مطالعه دیگری که مظفری و همکاران در سال 1387 در دانشگاه ایران بر روی 205 نمونه گرفته شده از خانم‌ها انجام دادند، $7/76$ درصد مايكوپلاسما هومینیس توسط کشت مثبت شد [۲۶]. در مطالعه دیگری نیاکان و همکاران در سال 1388 در تهران

در زنان مبتلا به واژینوز باکتریال از کارایی قابل توجهی برخوردار می باشد، بطوری که علاوه بر نمونه هایی که با روش کشت شناسایی شده بودند، در تعداد زیادی از نمونه های کشت منفی نیز با این روش وجود عامل بیماری زا تشخیص داده شد. شاید بتوان PCR چنین نتیجه گیری کرد که علاوه بر حساسیت زیادتر، روش PCR از اختصاصیت کافی برای تفکیک این دو گونه بیماری زا از یکدیگر برخوردار می باشد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل بیمارستان های امام خمینی و امام زمان (عج) واقع در شهرستان رباط کریم که در جمع آوری نمونه ها ما را یاری دادند، نهایت تشکر و قدردانی را داریم. هم چنین، از بخش پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرنده که پشتیبانی مالی این طرح تحقیقاتی را بر عهده داشتند، صمیمانه قدردانی می گردد.

References:

- [1] Ganjavi T, Shahabi M. Epidemiology and Risk Factors of Bacterial Vaginosis in Women Visiting the Gynecologic Clinic of Bahonar Hospital of Kerman University of Medical Sciences in 2002. *J Kerman Univ Med Sci* 2003; 10(4): 200-10. [in Persian]
- [2] Manhart LE, Critchlow CW, Heales KK, Dutro SM, Eschenbach DA, Strens CE, et al. Mucopurulent cervitis and mycoplasma genitalium. *J Infect Dis* 2003; 187(4): 650-7.
- [3] Serin MS, Evruke C, Kibar F, Koksal F. Comparison of PCR and Cultivation Methods to Determine the Incidence of Infection Due to Mycoplasma hominis and Mycoplasma fermentans in Women Genitourinary Tract. *Eastern J Med* 2001; 6(2): 48-52.
- [4] Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4): 757-89.
- [5] Razin S, Herrmann R. Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. 1th ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers New York.
- [6] Vatani SH, Ghazisaidi K, Mohamadi M, Naji AR, Fateminasab F, Zeraati H, et al. The Survey of Contamination with Genital Mycoplasma in Women with Bacterial Vaginalis by PCR Method. *J Gorgan Univ Med Sci* 2006; 8(1): 45-50. [in Persian]
- [7] Lawton BA, Rose SB, Bromhead C, Gaitanos LA, MacDonald EJ, Lund KA. High prevalence of Mycoplasma genitalium in women presenting for termination of pregnancy. *Contraception* 2008; 77(4): 294-8.
- [8] Westberg J, Persson A, Holmberg A, Goesmann A, Lundeberg J, Johansson KE, et al. The genome sequence of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC type strain PG1T, the causative agent of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP). *Genome Res* 2004; 14(2): 221-7.
- [9] Mosavian M, Motamed H, Maleki S. A comparison of mycoplasma hominis and ureaplasma urealyticum in women with urogenital infection using multiplex PCR and culture methods. *Med J Tabriz Univ Med Sci* 2011; 33(5): 91-7.
- [10] Karimzadeh M, Taheripanah R. Infection agent in recurrent miscarriage. *J Reproduction Infertility* 1989; 24-34.
- [11] Naher HS, Said IH. Culturing and PCR Methods for Detection of *Mycoplasma Hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in Women with Genitourinary Tract Infections. *Int Res J Med Sci* 2013; 1(3): 25-9.
- [12] Oliphant J, Azariah S. Cervicitis: limited clinical utility for the detection of *Mycoplasma genitalium* in a cross-sectional study of women attending a New Zealand sexual health clinic. *Sexual Health* 2013; 10(3): 263-7.
- [13] Casin I, Vexiau-Robert D, De La Salmoniere P, Eche A, Grandry B, Janier M. High prevalence of *Mycoplasma genitalium* in the lower genitourinary tract of women attending a sexually transmitted disease clinic in Paris, France. *Sex Transm Dis* 2002; 29(6): 353-9.
- [14] Johannsson G, Enstrom Y, Lowhagen GB, Nagy V, Ryberg K, Seeberg S, et al. Occurrence and treatment of *Mycoplasma genitalium* in patients visiting STD clinics in Sweden. *Int J STD AIDS* 2000; 11(5): 324-6.
- [15] Arraiz RN, Colina CS, Marcucci JR, Rondon GN, Reyes SF, Bermudez PV, et al. *Mycoplasma genitalium* detection and correlation with clinical manifestations in population of the Zulia State, Venezuela. *Rev Chilena Infectol* 2008; 25(4): 256- 61.
- [16] Manhart LE, Mostad SB, Baeten JM, Astete SG, Mandaliya K, Totten PA. High *Mycoplasma genitalium* organism burden is associated with

آنچایی که نمونه ها از بیمارستان های امام خمینی و امام زمان (عج) واقع در شهرستان رباط کریم استان تهران جمع آوری شده است، پایین بودن سطح اجتماعی و فرهنگی مردم آن منطقه می تواند یکی از دلایل درصد بالای مبتلایان به عفونت واژینال در بین بیماران مراجعه کننده به این مرکز درمانی باشد. هم چنین، همان طور که مشاهده می شود در مطالعات گوناگون شیوع *مايكروپلاسمای نیتالیوم* متفاوت گزارش شده است که این امر می تواند ناشی از نوع مطالعه، جمعیت مورد مطالعه (صرف آنتی بیوتیک - وجود شرکای جنسی و غیره)، تعداد نمونه، روش نمونه گیری، سن بیماران، نژاد، فرهنگ و منطقه جغرافیایی و روش آزمایشگاهی (کشت و PCR) باشد.

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از تکنیک PCR برای شناسایی مولکولی *مايكروپلاسمای نیتالیوم* و *مايكروپلاسمای هومینیس*

- shedding of HIV-1 DNA from the cervix. *J Infect Dis* 2008; 197(5): 733-6.
- [17] Moi H, Reinton N, Moghaddam A. Mycoplasma genitalium is associated with symptomatic and asymptomatic non-gonococcal urethritis in men. *Sex Transm Infect* 2009; 85(1): 15-8.
- [18] Rosemond A, Lanotte P, Watt S, Sauget AS, Guerif F, Royere D, et al. Systematic Screening Tests for Chlamydia Trachomatis, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in Urogenital Specimens of Infertile Couples. *Pathol Biol (Paris)* 2006; 54(3): 125-29.
- [19] Coskun E, Ozkan S, Vural B. Impact of Genital Infection on Fertility. *J Turkish German Gynecol Assoc* 2005; 6(3): 197-203.
- [20] Gilbert GL. Treatment of chlamydial and mycoplasmal genital infections. *Med J Aust* 1987; 146(4): 205-8.
- [21] Luki N, Lebel P, Boucher M, Doray B, Turgeon J, Brousseau R. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital Mycoplasmas in perinatal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17(4): 255-63.
- [22] Robertson JA. Potential Virulence Factors of Ureaplasma urealyticum. *Pediatr Infect Dis* 1986; 5 (6 Suppl): 322-4.
- [23] Watson RA. Gonorrhea and Acute Epididymitis. *Mil Med* 1979; 144(12): 785-6.
- [24] Weidner W, Brunner H, Krause W. Quantitative Culture of Ureaplasma urealyticum in Patient With Chronic Prostatitis or Prostatosis. *J Urol* 1980; 124(5): 622-5.
- [25] Hasani A, Shahrokh N, Khazardust S, Sarshar M, Takrosta N, Norozi J. Detection of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis Bacteria in Patients with Genital Infection by PCR. *Faslname Bimarihaye Ofori va Garmsiri* 2012; 17(58): 45-50.
- [26] Amirmozafari N, Jeddi F, Masjedian F, Haghighi L. Prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in Genitourinary Tract Infections. *J Iran Med Sci* 2008; 60(15): 19-23.
- [27] Nikan M, Ghafari M, Abedi F. The Abundance of Bacteria, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum Infection in Women with Infertile Husbands. *J Kermanshah Univ Med Sci* 2009; 3(13): 197-202. [in Persian]