Archive of SID

مقاله پژوهشی

تعیین ژنوتیپ مولکولی گونه های اوره آپلاسما در زنان مبتلا به عفونت های ژنیتال با روش 16S-23S rDNA PCR- RFLP

دکتر رضا میرنژاد* ، دکتر نور امیرمظفری** ، دکتر بهرام کاظمی*** ، میرشمس الدین حسینی****

دریافت : ۸۹/۷/۱۹ ، پذیرش : ۸۹/۱۰/۱۵

چکیده:

مقدمه و هدف: علیرغم روشهای وسیعی که تاکنون از متدهای آنالیتیکی برای تمایز مایکوپلاسما استفاده شده است، تشخیص مایکوپلاسماها درحد گونه هنوز با مشکل روبرو می باشد. عموماً قدرت تمایز پائین روشهای سرولوژی به دلیل تغییرات سریع در اندازه و فاز آنتی ژنهای ایمنی غالب موجود در سطح سلولی مایکوپلاسماها، آن را به عنوان یک روش تایپینگ مایکوپلاسماها محدود کرده است. در مقابل روشهای مولکولی این مشکلات را ندارند و می توانند برای تایپینگ مایکوپلاسماها مورد استفاده قرار بگیرند. هدف از این مطالعه، تعیین ژنوتیپ مولکولی گونه های اوره آپلاسما با تکنیک 16S-23S rRNA PCR- RFLP در زنان مبتلا به عفونت های ژنیتال بود.

روش کار: دراین مطالعه توصیفی ـ مقطعی ۲۱۰ فرد بیمار مراجعه کننده به درمانگاه زنان و زایمان بیمارستان دانشگاهی حضرت رسول اکرم (ص) تهران در طی سالهای ۸۸-۱۳۸۷ انتخاب و از هر بیمار نمونه گیری انجام و به آزمایشگاه ارسال شد. برای انجام PCR- RFLPبا استفاده از پرایمر اختصاصی جنس اوره آپلاسما برای تکثیر نواحی 559bp ژن 16S-23S rRNA استفاده گردید. بعد از انجام PCR و سکانس کردن، نمونه های مثبت تحت اثر آنزیم های محدودالاثر مختلفی قرار گرفتند.

نتایج: از ۲۱۰ نمونه با PCR ، ۹۳ مورد (۴۴/۳٪) و با کشت ۶۹ نمونه (۳۲/۹٪) گونه اوره آپلاسما ایزوله گشت. در مطالعه حاضر تنها بیووار ۱(اوره آپلاسما پاروم) از نمونه های کلینیکی جدا شدند و این نتایج با استفاده از برش آنزیمی TaqI (آنزیم اختصاصی گونه های اوره آپلاسما) تائید گردید. هم چنین آنالیز نتایج PCR-RFLP و سکانس کردن نمونه های اوره آپلاسما نشان داد که همگی از سروار ۳ اوره آپلاسما پاروم بودند.

نتیجه نهایی: بطورکلی می توان گفت که اوره آپلاسما پاروم از نمونه ای ژنیتال ایزوله می گردد و چون در الگوهای آنزیمی ایزوله های اوره آپلاسما تفاوتی مشاهده نشده لذا در بین آنها هتروژنیستی ژنتیکی وجود ندارد و عفونتها در افراد مختلف می تواند ناشی از انتشار یک سویه تکی یعنی بیووار ۱ باشد. هم چنین این مطالعه نشان داد که تکنیک PCR-RFLP یک روش سریع، قابل اجرا و اختصاصی برای جداسازی، شناسائی و تایپینگ ایزوله های اوره آپلاسما می باشد.

کلید واژه ها: اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم / اوره آپلاسما پاروم / ژنوتایپینگ / واکنش زنجیره ای پلیمراز

مقدمه :

مایکوپلاسماها عموماً مخاط دوست هستند که در دستگاه اورژنیتال و تنفسی میزبانشان در تماس نزدیک با سلولهای اپی تلیال ساکن می شوند و عفونت های مختلف در دستگاههای تنفسی و تناسلی ایجاد می کنند. در این بین، مایکوپلاسماهای تناسلی در ارتباط با عفونت های دستگاه ادراری ، تناسلی، اختلالات تولید مثل و مرگ و میر نوزادان می باشند، بطوریکه امروزه آنها یکی از عوامل مهم ایجاد کننده سرویسیت، واژینیت و PID از عفونتهای شایع در زنان مراجعه کننده به کلینیک های زنان ـ زایمان به شمار می روند(۴-۱). این ارگانیسم ها بوسیله ارگانلهای سطحی خود به سطوح مخاطی مجاری تناسلی می چسبند و با توجه به قدرت بالای کلونیزاسیون در اندوسرویکس، احتمال ایجاد عوارض خطر آفرین برای مادر و نوزادش را

* استادیار میکروب شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) (rmirnejadreza@yahoo.com)
** دانشیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
*** استاد انگل شناسی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
**** کارشناس آزمایشگاه مرجع دانشگاه علوم پزشکی قزوین

www.SID.ir

Archive of SID

بدنبال دارند. اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم یکی از عوامل اصلی اورتریت غیرگنوککی(NGU)، پروستاتیت حاد و آرتریت اکتسابی در مردان است(۵-۳). هم چنین این ارگانیسم در زنان حامله و غیرحامله سبب کوریوآمنیونیتیس، زایمان پیش از موعد، سقط جنین خودبه خودی، تولد نوزاد نارس، واژینیت و سرویسیت می گردد. در مطالعات کلینیکی مشخص شده است که دستگاه تنفسی نوزادان متولد شده از مادران آلوده به این باکتری ها آلوده می شوند و نوزادان دچار سندرم پنومونی، دیسترس تنفسی و مننژیت می گردند(۶).

در طی سالهائی که اوره آپلاسماها شناسائی و ویژگی آنها مشخص شد، آنها به چندین سروتیپ (چهارده سروتیپ) متفاوت طبقه بندی شدند. مطالعات بعدی با استفاده از سکانس کردن16S RNA در طی چندین سال نشان دادند که چهارده سروتیپ در دو بیووار (Biovar) یا دسته تقسیم قرار می گیرند: بیووار یک که اغلب بیووار پاروم نامیده می شد و شامل سروتیپهای۱،۳،۶،۱۴ است، درحالیکه بیووار دو (اغلب به آن بیووار T960 می گویند) شامل سروتیپ های ۲ ،۴،۵،۷،۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳ می باشد. اخیراً دو بیووار بدلیل اینکه همولوژی DNA آنها حدود کمتر از ۶۰ می باشد در دو گونه جداگانه قرار گرفته اند. بیووار یک را اوره آپلاسما پاروم و بیووار دو را اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم نامیدند. بیووار یک (اوره آپلاسما پاروم) بیشتر از بیووار دو از نمونه های کلینیکی جدا می شوند، ولی هر دو گونه به طور همزمان ممکن است در بعضی از افراد وجود داشته باشند (۹-۷).

امروزه به منظور فهمیدن نقش بالقوه بیوارهای مختلف اوره آپلاسما در انسان و در پاسخ به سؤال هائی که در این زمینه وجود دارد، ضروری است که اپیدمیولوژی این باکتریها در مردان و زنان بالغ مشخص گردد. به همین منظور تکنیک های آمپلی فیکاسیون اسید نوکلئیک(مانند PCR) جایگزینی کشت و روشهای تایپینگ مرسوم(مانند روشهای سرولوژی) برای جداسازی و تایپینگ هر یک از این مایکو پلاسماهای ژنیتال از نمونه های کلینیکی شده است(۱۰،۱۱). مطالعات نشان داده اند که روش های ژنوتایپینگ براساس چندین هدف هردو گونه اوره آپلاسما را از هم متمایز می کند و این می تواند بطورکارآمد جایگزین شمای سروتایپینگ ۱۴ گروهی که در آن سرم پلی والانت استفاده می شود، گردد. هردو بیووار با روشهایAP-PCR و PCR-RFLP که هدف آن ژنهای ساب یونیت اوره آز آنتی ژن چند باندی (MBa)،16S rRNA و نواحی فاصله ای داخلی 16S-23S rRNA می باشند، قابل تمایز هستند(۱۲،۱۳).

این مطالعه جهت تعیین ژنوتیپ مولکولی گونه های اوره آپلاسما و تمایز آنها از همدیگر با روش 16S-23S rDNA PCR- RFLP در زنان مبتلا به عفونت های ژنیتال انجام شد.

روش کار:

در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی ۲۱۰ فرد بیمار با علائم کلینیکی که از آذر۸۷ تا شهریور۸۸ به درمانگاه زنان و زایمان بیمارستان دانشگاهی حضرت رسول اکرم (ص) تهران مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. پس از پذیرش، این افراد توسط متخصص زنان از نظر علائم کلینیکی مورد بررسی قرار گرفته و با توجه به نتایج تستهای آزمایشگاهی و بالینی، در آنهائی که وجود سایر عوامل ایجاد کننده واژینیت و سرویسیت به جز مایکوپلاسماها رد شده بودند توسط سواپ از واژن و سرویکس نمونه برداری انجام گردید. یک سوآپ به محیط انتقال PPLO براث (حاوی ۵٪ سرم اسب، پنی سیلین G و بدون رنگ و اوره و آرژینین و گلوکز) تلقیح شده و سوآپ دیگر در میکروتیوپ حاوی PBS تلقیح گردید. نمونه ها سریعاً به آزمایشگاه جهت کشت و انجام PCR ارسال گردید. نمونه های PBS تا انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند(۱۴).

به منظور جداسازی اوره آپلاسما مورد نظر و به منظور حذف فلور طبیعی باکتریائی و قارچی، محیط انتقال PPLO حاوی نمونه را از فیلترهای ۰/۴۵ میکرون (ساخت کمپانیeknokroma کشور اسپانیا) عبور داده و به محیط های حاوی PPLO براث (شامل سرم اسب (۲۰٪)، ۱۰ml عصاره مخمر (۱٪) ۱۴۰ml محیط پایه PPLO،۲ml فنل رد(۰/۲٪)،۱ ml پنی سیلینG(۵۰۰۰u/ml)، ۲۰ml اوره (۱۰٪) تلقیح گردید. pH محیط کشت باید حدود ۶/۰ تنظیم گردد. تمام محیط ها در اتمسفر حاوی ۵٪Co_2 (در کندل جار) و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت۵ روز انکوبه گردیدند.

هر روز لوله ها به لحاظ تغییر رنگ و عدم کدورت مورد بررسی قرار می گرفتند(۱۵،۱۴). در صورت داشتن تغییر رنگ نمونه ها به محیط جامد (شامل همان ترکیبات محیط مایع به اضافه ۱٪ آگار) انتقال داده شده و در ۳۷ درجه سلسیوس در اتمسفر ۵٪Co_2 انکوبه گردیدند. بعداز ۷۲-۴۸ ساعت، ویژگیهای کلنی های اوره آپلاسما با رنگ آمیزی Diennes و بررسی میکروسکوپی (با عدسی X۱۰)

www.SID.ir

Archive of SID

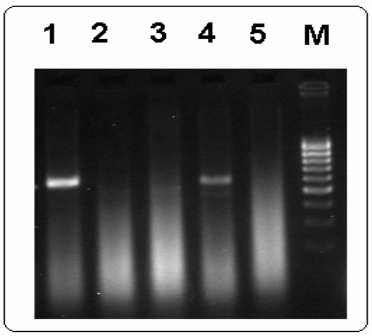
تعیین شدند. محیط ها تا ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفته و بعد از ۱۰ روز اگر کلنی مشاهده نمی گردید منفی در نظر گرفته می شدند(۱۴،۱۵).

در آزمایشگاه استخراج DNA از نمونه ها با استفاده از کیت high pure PCR template Preparation Kit (ساخت شرکت Roche کشور آلمان با Cat. No. 11 796 828 001) انجام شد. واکنش PCR در حجم نهائی ۳۰µL در نظر گرفته شد. هر نمونه شامل: ۱۵µL 2X Master mix (ساخت کمپانی Ampliqon III کشور دانمارک) حاوی $MgCl_2$ 1.5mM ، ۱ µgr DNA الگو، ۲۰pmol از هرپرایمر reverse وforward و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم ۳۰ µL بود. پرایمر مورد استفاده که در آزمایشگاه ما طراحی گردید و توسط شرکت سیناژن سنتز شد عبارت بود از :

MyUuF 5`-TGG AGT TAA GTC GTA ACA AG
MyUu R 5`- CTG AGA TGT TTC ACT TCA CC

فرایند PCR در دستگاه ترموسایکلر شامل ۵ دقیقه ۹۴ درجه سلسیوس، بدنبال آن ۳۰ سیکل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس ، ۶۰ ثانیه در ۵۶ درجه سلسیوس مرحله Annealing و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام گرفت.

برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگاروز ۳٪ و رنگ آمیزی DNA با رنگ SYBR® Green از تولیدات شرکت QIAGeen و مارکر100bp(خریداری شده از شرکت سیناژن ایران) انجام شد. ژلها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند(شکل ۱) و در نهایت محصول PCR بدست آمده (قطعه ۵۵۹bp) اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم جهت تأئید تعیین توالی شد (توسط شرکت سیناژن) و با شماره GQ411532.2 در ژن بانک جهانی ثبت گردید.

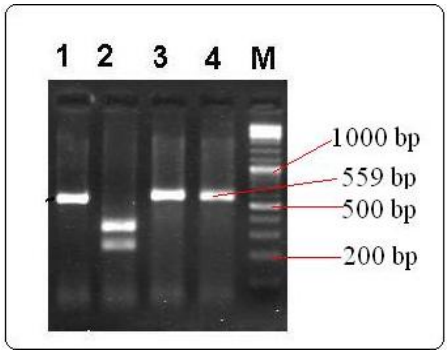


تصویر ۱: ژل الکترفورز اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم

نمونه های ۱ و ۴ از نظر اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم مثبت می باشند. ردیف ۶ مارکر(100bp DNA ladder, SM#333). بقیه نمونه ها از نظر اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم منفی می باشند.

جهت تایپینگ، بعد از دریافت سکانس DNA آمپلی فای مایکوپلاسما ژنیتالیوم با استفاده از برنامه BLAST ژنوتیپ آن با توالی ژنوم سکانس شده Algin شدند. سکانس مورد مطالعه به نرم افزار Web Cutter داده شد که آن لیست آنزیم ها بعلاوه محل اثر آنزیم های محدودالاثر مختلف را ارائه نمود. در این مطالعه برای انجام PCR-RFLP محصولات PCR بدست آمده مایکوپلاسما ژنیتالیوم، تحت اثر آنزیم های محدودالاثر AluI ,Taq I, CacI8, BbsI ,EcoRI قرار گرفتند.

روش اجرای برش آنزیمی یا PCR-RFLP: برای انجام برش آنزیمی یا PCR-RFLP ابتدا واکنش µl 15 زیر برای نمونه هائیکه مثبت شده بودند تهیه شدند: 6.3µl آب مقطر استریل عاری از نوکلئاز، µl 1.5 بافر آنزیم، µl 0.2 آنزیم محدودالاثر(u 10-20) ، 7µl محصولPCR. بعداز تهیه واکنش بالا حاوی آنزیم های فوق بطورجداگانه، میکروتیوپ های حاوی تمام آنزیم ها به جز آنزیم TaqI در بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس به مدت۲ ساعت و میکروتیوپ حاوی آنزیم TaqI در ترموسایکلر در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. بعد از دو ساعت محصول RFLP روی ژل آگاروز ۳٪ همراه با مارکر و محصول PCR آنزیم نخورده الکتروفورز گردیدند. در نهایت اندازه قطعات حاصل از برش آنزیمی تمامی نمونه های PCR مثبت با یکدیگر مقایسه شدند و ژنوتیپ مربوطه براساس آنها تعیین گردید(شکل ۲).



تصویر ۲: ژل الکترفورز برش آنزیمی اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم. ردیف ۱ محصولPCRمثبت اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم که تحت برش آنزیمی قرار نگرفته و به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. ردیف ۲ محصول هضم آنزیمی محصول PCR مثبت اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم که با آنزیم TaqI برش خورده و دو قطعه bp ۳۳۲ و ۲۲۷bp ایجاد شده است. ردیف های ۳و ۴ نشان دهنده محصول PCR مثبت اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم که به ترتیب با آنزیم های Cac8Iو BbsI برش نخوردند. ردیف ۴ مارکر (100bp DNA ladder, SM#333).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج:

از ۲۱۰ زن با میانگین سنی (±۹/۷) ۳۱/۹ سال نمونه ها دریافت شد. ۹۴/۳٪ آنان متاهل بودند، ۷۶/۷٪ زایمان نداشتند و تنها ۲/۹٪ آنان سابقه سزارین داشتند. میزان علائم و عوارض در جدول ۱ نشان داده شده است. لازم بذکر است که هیچکدام سابقه ابتلا به سندرم TORCH، تریکوموناس، کاندیدا و کوکسی های گرم منفی نداشتند.

جدول۱: میزان علائم وعوارض در زنان مبتلا به مایکوپلاسماهای ژنیتال مراجعه کننده به کلینیک زنان و زایمان بیمارستان حضرت رسول(ص)

	تعداد	درصد
سوزش	۲۲	۱۰/۵
خارش	۲۴	۱۱/۴
ترشح فراوان	۱۷۱	۸۱/۴
تکرر ادرار	۷	۳/۳
درد زیر شکم	۱۱	۵/۲
واژینیت	۱۳۲	۶۲/۹
سرویسیت	۵۵	۲۶/۲
اندومتریک	۲	۱/۰
PID	۲	۱/۰

از ۲۱۰ نمونه کشت داده شده روی محیط های کشت اختصاصی اوره آپلاسماها ، ۶۹ نمونه(۳۲/۹٪) کشت مثبت بودند و تکنیک PCR در ۹۳ نمونه (۴۴/۳٪) مثبت بود. در این بین ۶۱ نمونه هم کشت و هم PCR مثبت بودند و در ۸ نمونه کشت مثبت ولی PCR منفی بودند.

نتایجPCR-RFLP نشان داد که پس از برش آنزیمی محصول PCR مثبت نمونه های بالینی، در الگوهای برش آنزیمی بدست آمده تفاوتی وجود نداشت و همگی دارای یک الگو بودند، لذا PCR-RFLP علاوه بر تائید نتیجه PCR نشان داد که اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم همگی از یک ژنوتیپ(سروار ۳) می باشند و تیپ های مختلف در نمونه های مطالعه حاضر مشاهده نشد. هم چنین بعد از انجام سکانس و BLAST کردن مشخص گردید که نمونه های ژنیتال مورد بررسی تنها بیووار۱(اوره آپلاسما پاروم) را داشتند و بیووار T960(اوره آپلاسما اورآلیتیکوم) از نمونه ها ایزوله نشد.

بحث:

علیرغم روشهای وسیعی که تاکنون از متدهای آنالیتیکی برای تمایز مایکوپلاسما استفاده شده است، ولی تشخیص مایکوپلاسماها درحد گونه هنوز با مشکل روبرو می باشد. عموماً قدرت تمایز پائین روشهای سرولوژی به دلیل تغییرات سریع در اندازه و فاز آنتی ژنهای ایمنی غالب موجود در سطح سلولی مایکوپلاسماها، آن را به عنوان یک روش تایپینگ مایکوپلاسماها محدود کرده است (۱۰،۱۱،۱۳). روشهای پروفایل پروتئین همانند آنالیز ایزوآنزیم، الکتروفورز یک بعدی و دوبعدی و ایمونوبلاتینگ هرچند دارای قدرت تمایز بالا می باشند، ولی نیازمند تعداد نمونه های زیادی برای آنالیز، زمان بر بودن و مشکل در گزارش دهی هستند. در مقابل روشهای مولکولی این مشکلات را ندارند و می توانند برای تایپینگ مایکوپلاسماها مورد استفاده قرار بگیرند. یکی از روشهای مولکولی که برای همه انواع متفاوت میکرارگانیسم ها شامل باکتریها، قارچ ها قابل استفاده می باشد، PCR-RFLP است (۱۰). در این تکنیک آنزیم های محدودالاثر که برای شکست DNA کروموزمی باکتری بکار می روند، اغلب برای شکست آمپلی کون ها (محصولات PCR) هم بکار می روند. انتخاب آنزیم اصولاً براساس دانش قبلی ما و براساس سکانس محصولات PCR در خصوص سایت های برش در محصول PCR بستگی دارند که متغیر می باشند و ابزار مفیدی در مقایسه کردن سویه ها هستند (۱۱).

مطالعه حاضر تطابق نسبی با مطالعات مختلفی که در ارتباط با بررسی میزان جداسازی مایکوپلاسماهای تناسلی در نقاط مختلف دنیا انجام گرفته است، دارد. میزان جداسازی اوره آپلاسما با روش کشت، از ۱۰ درصد در کشور چین (۱۶) تا ۵۴ درصد در آمریکا (۱۷) متغیر بوده است که در این بین مطالعه انجام گرفته در هند(۱۸) و ایران(۱۹) به ترتیب با میزان شیوع ۳۲ و۳۶/۷ درصد، با مطالعه حاضر شباهت بیشتری دارد. میزان جداسازی اوره آپلاسما با روش PCR ، از ۲۰ درصد در کشور اتریش(۲۰) تا ۶۱/۹ درصد در روسیه(۲۱) متغیر است. در اینجا نیز میزان جداسازی بدست آمده در ایران و هند(با میزان شیوع حدوداً۴۵٪) به درصد جداسازی که در این مطالعه بدست آمده است نزدیک تر می باشد. اختلاف داده های بدست آمده از دو روش، در شناسایی اوره آپلاسماها (که در این مطالعه ۱۱/۴٪ بود) با اختلاف بدست آمده در مطالعات دیگر همخوانی داشت. بطور کلی همانطورکه مشاهده میشود، در مطالعات مختلف شیوع اوره آپلاسماها

www.SID.ir

Archive of SID

متفاوت گزارش شده است که این امر می تواند ناشی از نوع مطالعه، جمعیت مورد مطالعه، تعداد نمونه، روش نمونه گیری، سن بیماران، نژاد، فرهنگ، منطقه جغرافیایی و روش آزمایشگاهی(کشت و نوع PCR) باشد. مثلا در مطالعه ای کریستوپلوس و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که بهداشت ضعیف ناحیه ژنیتال افراد مورد بررسی در تهاجم و التهاب واژن توسط اوره آپلاسماها نقش دارد(۱۵).

مطالعه حاضر نشان داد ترادف ژنی گونه های مختلف اوره آپلاسما دارای محل برش خاص خود می باشند، بطوریکه اگر در نمونه های کلینیکی گونه های مختلفی وجود داشته باشد، بعد از PCR نمودن، می توان براین اساس آنها را از همدیگر متمایز کرد. این نتایج مشابه مطالعات کنگ و همکارانش می باشد(۲۲) که مطرح نمودند با استفاده از ژنهای 16S rRNA نواحی فاصله اندازه داخل ژنی 16S rRNA -23S rRNA، زیر مجموعه های ژن اوره آز و انتهای ´۵ MBA می توان گونه های اوره آپلاسما را شناسائی و ساب تیپ کرد و با استفاده از این ژنها می توان این دو گونه(اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم و اوره آپلاسما پاروم) را از همدیگر متمایز نمود. در مطالعه حاضر با توجه به این نکته از روی ژنهای نواحی فاصله انداز داخلی 16S-23S rRNA پرایمر ها طراحی شدند و نتایج PCR و سکانس آنها نشان داد که تنها بیووار ۱ (اوره آپلاسما پاروم) از نمونه های کلینیکی ما جدا شده ا ند و این نتایج با استفاده از برش آنزیمی TaqI تائید شد. چراکه تمامی نمونه های PCR مثبت بعد از برش آنزیمی یک الگو را نشان دادند و تفاوتی در الگوهای بدست آمده مشاهده نشد. هم چنین آنالیز نتایج PCR-RFLP و سکانس کردن نمونه های اوره آپلاسما نشان داد که همگی از سروار ۳ اوره آپلاسما پاروم بودند که این نتایج تقریبا مشابه نتایج مطالعات دیگر در این زمینه بودند که مطرح کرده بودند اوره آپلاسما پاروم نسبت به بیووار ۲ (بیووار T960 یا اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم) بیشتر از نمونه های کلینیکی به خصوص از زنان جدا می شود. در مطالعه ای ابل هورن و همکارانش در آلمان گزارش کردند که ۸۱٪ اوره آپلاسماهای ایزوله شده از زنان مراجعه کننده به کلینیک زنان و زایمان شهر مونیخ بیووار اوره آپلاسما پاروم بودند(۲۳). هم چنین در مطالعه ای پاولسن و همکارانش نشان دادند که از ۶۸۰ اوره آپلاسمای ایزوله شده از نمونه های اورژنیتال ۸۰٪ بیووار ۱ ، ۱۳/۵٪ بیووار ۲ و ۶/۵٪ از هر دو بیووار را داشتند(۲۴). لازم بذکر است که مطالعات کنگ و همکارانش(۲۲)، نایسن و همکارانش(۲۵)، یی و همکارانش(۲۶) نشان دادند که بیووار اوره آپلاسما پاروم نیز از نمونه های بالینی از زنان مبتلا به عفونت های ژنیتال بیشتر ایزوله می گردد. لازم بذکر است که تفاوت های مشاهده شده در مطالعات ممکن است ناشی از روش مطالعه، مکان نمونه گیری و نوع نمونه باشد.

نتیجه نهایی:

بطورکلی نتایج تکنیک PCR-RFLP در مطالعه حاضر نشان داد که هتروژنسیتی بین اوره آپلاسماها ایزوله شده مشاهده نمی گردد و همگی از یک بیوار (بیووار اوره آپلاسما پاروم) می باشند، لذا میتوان گفت که عوامل ایجاد کننده عفونت های تناسلی در بین زنان مورد مطالعه در تهران ناشی از انتشار یک بیوار تکی می باشند که این کار درمان بیماران و پیگیری منشاء آلودگی را در آنها آسانتر می کند. در نهایت می توان بیان کرد که تکنیک PCR-RFLP یک سیستم تیپ بندی ساده، قابل تکرارپذیری با قدرت تمایز بالا می باشد که می توان از آن برای مطالعات مختلف از جمله ارزیابی شکست های درمانی بدلیل ظهور سویه جدید یا سویه قبلی، در ثبت سویه های اوره آپلاسماها جدید که در آزمایشگاه ایزوله شده اند و در پیشگیری و درمان اوره آپلاسماها با یافتن منشاء آلودگی استفاده کرد. همچنین روش مناسبی جهت شناسائی و درک بهتر اپیدمیولوژی عفونت های اوره آپلاسماها می باشد.

سپاسگزاری :

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که ما را در اجرای این مطالعه یاری نمودند تشکر می نمایند. در ضمن از آقای دکتر Dohn از کشور دانمارک به خاطر ارسال نمونه DNA خالص اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، قدردانی می گردد.

منابع :

1. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev 2005; 18(4): 757-89.
2. Taylor-Robinson D. The role of mycoplasmas in pregnancy outcome. Best Practice Res Clin Obstet Gynaecol 2007; 21(3): 425-38.

www.SID.ir

Archive of SID

3. Razin S, Herrmann R. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. New York : Kluwer Academic/Plenum , 2002.
4. Zdrodowska-Stefanow B, Kłosowska WM, Ostaszewska-Puchalska I. Ureaplasma urealyticum and mycoplasma hominis infection in women with urogenital diseases. Adv Med Sci 2006; 51:250-53.
5. Razin S, Yogev D, Noat Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol. Mol Biol Rev 1998; 62(4):1094- 1156.
6. Taylor- Robinson D, Furr PM. Update on sexually transmitted mycoplasmas. Lanct 1998; 351: 12- 15.
7. Robertson JA, Stemke GW. Expanded serotyping scheme for ureaplasma urealyticum strains isolated from humans. J Clin Microbiol 1982; 15: 873–878.
8. Robertson JA, Vekris A, Bebear C, Stemke GW. Polymerase chain reaction using 16S rRNA gene sequences distinguishes the two biovars of ureaplasma urealyticum. J Clin Microbiol 1993; 31: 824–830.
9. Halbedel S, Stulke J. Tools for the genetic analysis of mycoplasma. Int J Med Microbiol 2007; 297 (1):37-44.
10. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 2006; 19(3): 512–30.
11. Belkum AV. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. Clin Microbiol Rev 1994; 7(2): 174–84.
12. Glass JI, Lefkowitz EJ, Glass JS, Heiner CR, Chen EY, Cassell GH. The complete sequence of the mucosal pathogen ureaplasma urealyticum. Nature 2000; 407:757–762.
13. Sung H, Kang SH, Bae YJ , Hong JT, Chung YB, Lee CK, et al. PCR-based detection of mycoplasma species. J Microbiol 2006;44(1):42-49.
14. Amirmozafari N, Mirnejad R, Kazemi B, Sariri E, Bojari MR, Dehdar Darkahi F. Comparison of polymerase chain reaction (PCR) and culture for detection of genital mycoplasma in clinical samples from patients with genital infections. Saudi Med J 2009;30(11):1401-05.
15. Christopoulos P, Deligeoroglou E, Papadias K. Genital mycoplasmas in non-sexually active young females with vaginal discharge. Int J Gynaecol Obstet 2007; 97(1):49-50.
16. Teng K, LiM, Yu, LiH, Shen D, Liu D. Comparison of PCR with culture for detection of ureaplasma urealyticum in clinical samples from patients with urogenital infection. J Clin Microbe 1994; 32(9):2232- 4.
17. Schlicht MJ, Lovrich SD, Sartin JS, Karpinsky P, Callister SM, Agger WA. High prevalence of genital mycoplasmas among sexually active young adults with urethritis or cervicits symptoms in La Crosse, Wisconsin. J Clin Microbiol 2004; 10: 4636- 40.
18. Dhawan B, Gupta V, Khanna N, Singh M, Chaudhry R. Evaluation of the diagnostic efficacy of PCR for ureaplasma urealyticum infection in Indian adults with symptoms of genital discharge. Jpn J Infect Dis 2006; 59:57- 58.
19. Vatani Sh, Ghazi Saeidi K, Mohammadi M, Naji AR, Fatemi Nasab F, Zeraati H, et al. [The survey of contamination with genital mycoplasma in women with bacterial vaginalis by PCR method]. Journal of Gorgan University of Medical Science 2006;8(17): 45-50 (Persian)
20. Imudia AN, Detti L, Puscheck EE, Yelian FD, Diamond MP. The prevalence of ureaplasma urealyticum, mycoplasma hominis, chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae infection, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation. Assist Reprod Genet 2008; 25:43-6.
21. Solov'eva SV, Tsoi EG, Zigangirova NA, Gamova NA, Rakovskaia IV, Gintsburg AL. Detection of tetracycline- and erythromycin – resistant urogenital mycoplasma strains using PCR. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1998; 6:3- 7.
22. Kong F, Zhenfang MA, James G, Gordon S, Gilbert G. Species identification and subtyping of ureaplasma parvum and ureaplasma urealyticum using PCR-based assays. J Clin Microbiol 2000; 38(3): 1175–79.
23. Abele-Horn MC, Wolff P, Dressel FP, Zimmermann A. Association of ureaplasma urealyticum biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. J Clin Microbiol 1997; 35:1199–1202.
24. Povlsen K, Jensen JS, Lind I. Detection of ureaplasma urealyticum by PCR and biovar determination by liquid hybridization. J Clin Microbiol 1998; 36(11): 3211–3216.
25. Naessens A, Foulon W, Breynaert J, Lauwers S. Serotypes of ureaplasma urealyticum isolated from normal pregnant women and patients with pregnancy complications. J Clin Microbiol 1988; 26:319–322.
26. Yi J, Yoon B H, Kim EC. Detection and biovar discrimination of ureaplasma urealyticum by real-time PCR. Mol Cell Probes 2005; 19:255-260.

www.SID.ir