مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۳ شماره ۵ آذر و دی ۱۳۹۰ صفحات ۹۷- ۹۱

مقایسه فراوانی مایکوپلاسما هومینیس و اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم در زنان مبتلا به عفونت های اوروژنیتال با استفاده از تکنیک Multiplex PCR و روش های کشت باکتریایی

سید مجتبی موسویان: گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران، نویسنده رابط:

Email: moosavian_m@yahoo.com

حسین معتمدی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
سوسن ملکی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران
ناهید شهبازیان: بخش زنان وزایمان، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

دریافت: ۸۹/۸/۲۶ پذیرش: ۹۰/۴/۱

چکیده

زمینه و اهداف : باتوجه به نقش مایکوپلاسماها در ایجاد عفونت های اوروژنیتال در این بررسی تلاش بر این است که میزان وفور این ارگانیسم ها به تفکیک گونه های هومینیس و اوره آلیتیکوم در ایجاد عفونت ژنیتال و ادراری زنان مبتلا به به عفونت، با روش مولکولی و کشت تعیین و مقایسه گردند.

مواد و روش ها : در این بررسی که به منظور مقایسه *فراوانی مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* در زنان مبتلا به عفونت های اوروژنیتال با استفاده از تکنیک Multiplex PCR و روش کشت باکتریایی انجام شد، در کل ۱۵۵ نمونه تناسلی و ۱۱۰ نمونه ادراری جمع آوری گردیده و با هر دو روش ذکر شده، مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها : نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان جداسازی مایکوپلاسماها از ۲۶۵ نمونه (واژینال و ادراری) مورد آزمایش، ۴۶ مورد (۱۷/۳ درصد) با روش Multiplex PCR و ۱۰ مورد (۳/۷ درصد) با روش کشت بودند. این نتایج همچنین حاکی از آن بود که در زنان مبتلا به عفونت ژنیتال (۱۵۵مورد) با روش Multiplex PCR ، *مایکوپلاسما هومینیس* در ۷/۱ درصد و *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در ۸/۴ درصد از آن ها تشخیص داده شدند. این در حالی است که با روش کشت، میزان وفور *مایکوپلاسما هومینیس* در این زنان ۳/۲ درصد بوده ولی *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در هیچکدام از آنها مشاهده نگردید. علاوه بر این، بین حضور *مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در افراد بیمار دارای سابقه سقط جنین و افراد بیمار فاقد سابقه سقط، اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P < ۰/۰۰۱$) بر اساس تست مک نمار در مقایسه دو روش، نتایج نشان داد که روش Multiplex PCR دقیق تر بود.

نتیجه گیری : نتایج حاصل از این تحقیق اهمیت شیوع مایکوپلاسماهای تناسلی در بروز عفونت‌های دستگاه تناسلی زنان و عوارض حاصل از آنها را نشان داد.

کلید واژه ها : *مایکوپلاسما هومینیس، اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم*، Multiplex PCR، عفونت اوروژنیتال

مقدمه

مایکوپلاسما ها کوچکترین میکروارگانیسم های دارای زندگی آزاد بوده و غالبا" به عنوان فلور نرمال دهان، دستگاه تنفسی و ادراری- تناسلی می باشند. این باکتری ها که به ارگانیسم های شبه پلوروپنومونی یا PPLO مشهور شده‌اند به واسطه بعضی

Archive of SID

www.SID.ir

خصوصیات نظیر فقدان دیواره سلولی از باکتری های دیگر متمایز می شوند و به علت اندازه بسیار کوچک و نیز مشکلاتی که در زمینه کشت و جداسازی آن ها وجود دارد، کمتر مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته اند. بعضی از مایکوپلاسماها به عنوان گونه های بالقوه پاتوژنی هستند که قادرند بیماری های تنفسی و تناسلی جدی در انسان ایجاد نمایند. بعضی نیز همچون مایکوپلاسما هومینیس و اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم می توانند در عفونت های لگنی، تب بعد از زایمان و برخی بیماری های دیگر در زنان و مردان نقش داشته باشند (۲،۱).

مطالعات نشان می دهند که بعضی از این میکروارگانیسم ها در بیماری های انسانی به ویژه با سرطان خون، رحم، تخمدان و بیماری ایدز نیز ارتباط داشته اند و بنابراین مورد توجه خاص قرار گرفته و به تدریج روش های مختلفی جهت تشخیص سریع آن ها در نمونه های کلینیکی ارائه می گردد (۵،۴،۳). به علت سخت رشد بودن، نیازهای غذایی پیچیده، فرورفتن کلنی‌ها در آگار، میکروسکپی بودن آن‌ها و نیاز به پرسنل آزمایشگاهی با تجربه، کشت و جداسازی مایکوپلاسماها بویژه در کشور ما به طور معمول انجام نگرفته و بنابراین اهمیت و ضرورت بررسی این میکروارگانیسم ها با روش های نوین و سریع بیش از پیش احساس می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آ پلاسما اوره آ لیتیکوم در زنان مبتلا به عفونت های اوروژنیتال با استفاده از تکنیک Multiplex PCR در مقایسه با کشت بود.

مواد و روش ها

در این بررسی که تحت نظر پزشک متخصص زنان انجام گرفت با مراجعه به کلینیک های زنان و زایمان در بیمارستان های امام خمینی و امیرالمومنین و هم چنین مطب های مامائی سطح شهر اهواز نسبت به جمع آوری نمونه از بیماران اقدام گردید. ضمنا" پرسش نامه ی طراحی شده جهت جمع آوری اطلاعات لازم از بیماران نیز تکمیل گردید. معیار ورود بیماران به مطالعه، وجود یک یا چند علامت مربوط به عفونت اوروژنیتال از جمله سوزش در مجرای تناسلی، افزایش ترشحات، تغییر رنگ ترشحات، رگل، خارش در مجرای تناسلی و در عفونت های ادراری سوزش، تکرر و خارش در ناحیه مجرای تناسلی بود.

در عفونت های اوروژنیتال با استفاده از اسپکولوم و سوآب پنبه ای استریل نمونه ترشحات سرویکوواژینال و در عفونت های ادراری از لوله های شیشه ای استریل جهت جمع آوری ادرار میان راهی(midstream) بیماران استفاده گردید. با قرار دادن سوآب ها در لوله های حاوی محیط انتقال PPLO`s broth استریل، تمام نمونه ها به آزمایشگاه میکروبشناسی دانشکده پزشکی انتقال و مورد بررسی قرار گرفتند. پس از سانتریفوژ کردن نمونه های ادراری و خارج کردن سوپرناتانت آنها، ۲ میلی لیتر آب مقطر استریل به رسوب آن اضافه گردید (۷،۶). با استفاده از فیلترهای ۲۲/. میکرون، محیط های PPLO broth و نیز رسوب حاصل از نمونه های ادراری فیلتر گردیدند. سپس هر نمونه به دو قسمت تقسیم شده، یک بخش از آن به محیط های اختصاصی Hominis broth حاوی آرژنین و Ureaplasma broth حاوی اوره تلقیح شد. بخش دیگر هرنمونه تا هنگام استخراج DNA در ۷۰- درجه سانتیگراد ذخیره گردید.

محیط های تلقیح شده در ۳۷ درجه سانتیگراد و در حضور ۵ درصد گاز Co2 به مدت ۱۵-۱روز انکوبه شدند و روزانه از نظر تغییر رنگ و ایجاد کدورت مورد بررسی قرار گرفتند. به محض شروع تغییر رنگ یا مشاهده کدورت در هرکدام از دو محیط مایع، نمونه ای از آن به محیط های جامد Hominis Agar و یا Ureaplasma Agar تلقیح گردیده و این محیط ها در شرایط ذکر شده انکوبه شدند. کلنی های آرژنین مثبت که به فاصله ۵-۱ روز رشد کرده و به شکل کلنی هایی با ظاهر تخم مرغ نیمرو مشاهده و با رنگ دایینس به خوبی رنگ گرفتند، به عنوان مایکوپلاسما هومینیس تعیین هویت شدند (۸). کلنی های کوچک رشد کرده در محیط اوره آ پلاسما آگار حاوی اوره، که با کلرید منگنز- اوره رنگ آمیزی شدند، به عنوان آوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم شناسایی گردیدند.

استخراج DNA: از بخش دوم نمونه های ذخیره شده برای استخراج DNA استفاده گردید. به منظور جوشانیدن و استخراج DNA، ابتدا میکروتیوب های حاوی سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ X g دور در دقیقه سانتریفوژ و سپس رسوب حاصل با ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل مخلوط گردید. با قرار دادن میکروتیوب ها در بن ماری ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، DNA باکتری در محیط آزاد گردید. مجددا" با سانتریفوژ کردن میکروتیوب ها به مدت ۵ دقیقه، نسبت به رسوب بقایای باکتری از محلول رویی حاوی DNA اقدام گردید. با انتقال محلول رویی به ویال های جدید، DNA استخراج شده تا هنگام انجام PCR در ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند (۹).

Multiplex PCR: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه از مقالات معتبر(۹،۶) انتخاب و پس از بررسی در نرم افزار NCBI Blast، توسط شرکت طوبی نگین سنتز شده و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده رقیق و آماده گردیدند. توالی پرایمر های مورد استفاده وزن هدف آن ها در جدول۱ ذکر شده است.

تهیه Master Mix: ابتدا با توجه به تعداد نمونه و حجم مورد نیاز از مواد PCR شامل $Mgcl_2$، dNTP، بافر PCR پرایمر ها، DNA Template، آنزیم Tag و آب استریل (dH_2O) در یک ویال ترکیب Master Mix تهیه شد. سپس این مخلوط اصلی بین میکروتیوب ها تقسیم گردید. به منظور کنترل شرایط واکنش و اطمینان از عدم آلودگی، کنترل مثبت (ژنوم سویه های استاندارد مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، هر دو با هم در یک ویال) و کنترل منفی (آب مقطر استریل) در یک ویال دیگر

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شد. مقادیر مورد استفاده در واکنش بعد از انجام پایلوت و رسیدن به نتیجه مطلوب و بهینه سازی بطور دقیق مشخص گردیدند.

برنامه ترموسایکلر و بهینه سازی Multiplex PCR: با استفاده از برنامه گرادیانت دستگاه ترموسایکلر، دمای مناسب برای اتصال پرایمر ها به DNA الگو با توجه به نقطه ی ذوب پرایمر های مورد استفاده بین ۶۵–۵۱ درجه سانتی گراد تعیین گردید. برنامه حرارتی نیز برای تکثیر قطعات مورد نظر بطور خلاصه در جدول ۲ ذکر شده است.

الکتروفورزیس: برای جداسازی محصول PCR و مشاهده قطعات DNA براساس اندازه مختلف، ابتدا ژل آگارز ۱٪ با استفاده از پودر آگارز (Frementas) و محلول (TBE IX) (Sigma) و اضافه کردن اتیدیوم بروماید (Gibco) تهیه و به سینی ژل اضافه گردید. با قرار دادن شانه در اندازه مناسب تا بسته شدن ژل، سینی ژل به حال خود گذاشته شده و بعد از بیرون آوردن شانه، سینی حاوی ژل درون تانک الکتروفورز قرار داده شد و با اضافه کردن بافر TBE سطح ژل پوشانیده شد. به هر چاهک ۳ میکرولیتر از هر نمونه که با ۲ میکرولیتر loading buffer مخلوط شده بود به آرامی اضافه گردید. به یکی از چاهک ها نیز DNA size marker اضافه گردید. بعد از load کردن نمونه ها جریان الکتریکی به ولتاژ ۸۵ ولت برقرار و الکتروفورز به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد. در پایان الکتروفورز برای مشاهده باندهای مربوط به محصول PCR، ژل در دستگاه Gel Document مجهز به ترانس ایلومینیتور قرار گرفت و تصویر آن ثبت گردید (شکل۱).

محاسبات آماری: نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزارآماری SPSS 11.5 و به کارگیری روش آماری کای– اسکوئر با سطح معنی داری ($P < ۰/۰۵$) و فاصله اطمینان ۹۵ درصد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسه دو روش کشت و Multiplex PCR با استفاده از آزمون مک نمار (Macnemar) انجام شد.

یافته ها

به طور کلی در این بررسی ۲۶۵ نمونه مورد آزمایش قرار گرفت که شامل ۱۵۵ نمونه سوآب سرویکوواژینال و ۱۱۰ نمونه ادرار جمع آوری شده از بیماران بود. نتایج کلی جداسازی مایکوپلاسما از نمونه های فوق در جدول ۳ خلاصه شده است.

این نتایج نشان داد که از بین مایکوپلاسماهای جدا شده از نمونه های دستگاه تناسلی (۱۵۵ نمونه)، مایکوپلاسما هومینیس ۱۱ ایزوله (۷/۱ درصد) با روش Multiplex PCR و ۵ ایزوله (۳/۲ درصد) با روش کشت واوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم ۱۳ ایزوله (۸/۴ درصد) فقط با روش Multiplex PCR جدا سازی شدند ولی هیچ موردی از اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم از طریق کشت جدا نشد. همچنین از بین مایکوپلاسماهای جداشده از دستگاه ادراری، مایکوپلاسما هومینیس ۷ ایزوله(۶/۴ درصد) باروش Multiplex PCR و ۳ ایزوله (۲/۷درصد) با روش کشت و اوره آپلاسما اورهٔ آ لیتیکم ۱۵ ایزوله (۱۳/۶ درصد) باروش Multiplex PCR و ۲ایزوله (۱/۸ درصد) از طریق کشت جداسازی گردید.

بررسی فراوانی مایکوپلاسماها به تفکیک گروه های سنی: نتایج این بررسی نشان داد که در نمونه های تناسلی مورد آزمایش، مایکوپلاسما هومینیس در بین ۸ گروه سنی، بیشترین فراوانی را در گروه سنی ۳۳– ۲۸ با ۶ مورد مثبت (۵۴/۵ درصد) و اوره آ پلاسما در گروه سنی ۳۹–۳۴ سال با ۷ مورد مثبت (۵۳/۸ درصد) واجد بودند. هم چنین در نمونه های ادراری مورد آزمایش، بیشترین فراوانی مایکوپلاسما هومینیس و اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم به ترتیب در گروه های سنی ۳۴–۳۰ سال (۷۱/۴درصد) و ۳۹–۳۵ سال (۶۰درصد) واقع بودند.

نتایج بررسی فراوانی مایکوپلاسما های جداشده در افراد دارای سابقه سقط جنین: همانطور که جدول ۴ نشان می دهد، از زنان مبتلا به عفونت دستگاه تناسلی، ۱۵ نفر(۹/۷ درصد) و از زنان مبتلا به عفونت ادراری ۱۰ نفر (۹/۱ درصد) دارای سابقه سقط جنین بوده اند. نتایج آزمون کای اسکوئر نشان داد که در هردو مورد ابتلا به عفونت دستگاه تناسلی و نیز عفونت دستگاه ادراری بین حضور مایکوپلاسما هومینیس و نیز حضور اوره آ پلاسما اوره آ لیتیکوم در افراد بیمار دارای سابقه سقط جنین و افراد فاقد سابقه سقط جنین، اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < ۰/۰۰۱$).

مقایسه دو روش کشت و Multiplex PCR: دراین بررسی از آزمون مک نمار برای مقایسه دو روش استفاده شد. با توجه به نتایج آماری حاصل از نرم افزار SPSS و روش کای– اسکوئر با سطح معنی داری ($P < ۰/۰۵$) و فاصله اطمینان ۹۵ درصد بر اساس ضریب مک نمار مشخص گردید که بین دو روش کشت (به عنوان استاندارد) و روش Multiplex PCR اختلاف معنی داری وجود داشت و روش Multiplex PCR دقیق تر بود.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده (۶، ۹).

نام میکروارگانیسم	توالی پرایمر	طول قطعه تکثیر شده	دمای ذوب C°	ژن هدف
مایکوپلاسما هومینیس	**'RNH1**: 5'- CAA TGG CTA ATG CCG GAT ACG C-3 **RNH2**: 5'- GGT ACC GTC AGT CTG CAA T- 3'	۳۳۴ bp	۵۸	۱۶S rRNA
اورهآپلاسما اورهآلیتیکوم	**'U9**: 5'- GAG ATA ATG ATT ATA TGT CAG GAT CA-3 **'U8**: 5'- GAT CCA ACT TGG ATA GGA CGG-3	۱۶۷ bp	۶۲	آنزیم اورهآز

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲: برنامه حرارتی تنظیم شده برای Multiplex PCR

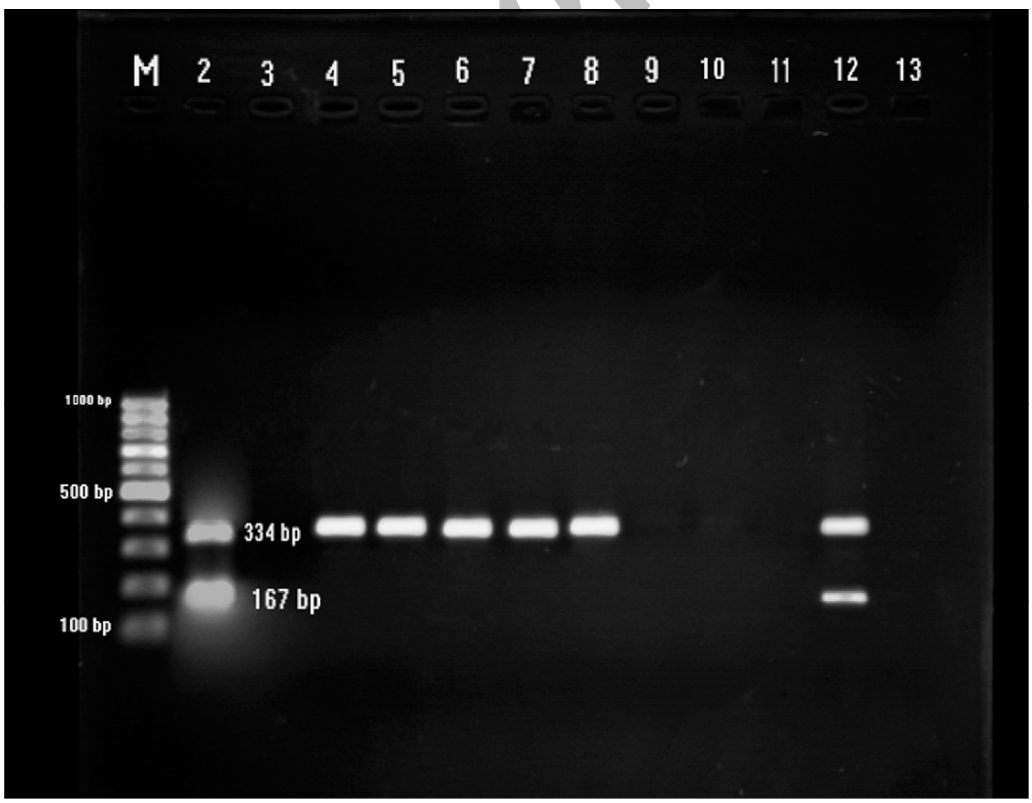
مراحل	دما	زمان	تعداد سیکل
مرحله اول	۹۵ درجه	۴ دقیقه	۱ سیکل
	۹۵ درجه	۵۰ ثانیه	
مرحله دوم	۵۳/۷ درجه	۵۰ ثانیه	۳۵ سیکل
	۷۲ درجه	۶۰ ثانیه	
مرحله سوم	۷۲ درجه	۷ دقیقه	۱ سیکل

جدول ۳: نتایج فراوانی مایکوپلاسماهای جدا شده از نمونه های دستگاه اوروژنیتال به روش Multiplex PCR و کشت

نوع نمونه	Multiplex PCR		روش کشت	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
دستگاه تناسلی	۲۴	۹	۵	۱/۸۸
دستگاه ادراری	۲۲	۸/۳	۵	۱/۸۸
جمع	۴۶	۱۷/۳	۱۰	۳/۷۶

جدول۴: توزیع فراوانی *مایکوپلاسما هومینیس* و *اوره‌آ پلاسما اوره‌آلیتیکوم* در نمونه‌های اوروژنیتال، در زنان دارای سابقه سقط جنین.

نوع نمونه	تعداد بیمار	تعداد موارد سقط	درصد	*مایکوپلاسما هومینیس*		*اوره‌آ پلاسما اوره‌آلیتیکوم*	
				تعداد	درصد	تعداد	درصد
تناسلی	۱۵۵	۱۵	۹/۷	۵	۳۳/۳	۱۰	۶۶/۷
ادراری	۱۱۰	۱۰	۹/۱	۲	۲۰	۷	۷۰



شکل ۱: نتایج حاصل از Multiplex PCR برخی از نمونه‌های مثبت و منفی. چاهک شماره ۲، DNA سویه‌های استاندارد به عنوان کنترل مثبت، چاهک‌های شماره ۴ تا ۸ نمونه مثبت برای *مایکوپلاسما هومینیس*، چاهک شماره ۱۲ نمونه مثبت برای هر دو باکتری و چاهک شماره ۱۳ کنترل منفی واکنش را نشان می‌دهند. چاهک شماره ۳ خالی و ۱۱–۹ نیز نشان دهنده نمونه‌های منفی از نظر وجود هر دو باکتری است.

www.SID.ir

بحث

در سال‌های اخیر با توجه به مشاهدات بالینی، مطالعات متعددی در خصوص توانایی بیماری زایی مایکوپلاسماهای دستگاه اوروژنیتال صورت گرفته است و نتایج حاصل حاکی از نقش فرصت طلب آن ها در بیماری زایی و ایجاد عفونت های دستگاه ژنیتال، به ویژه در هنگام بارداری است (۱۰، ۱۱، ۱۲). استفاده از روش کشت برای جداسازی و شناسایی این ارگانیسم ها در نمونه های کلینیکی بسیار زمان بر و پر هزینه بوده و به دلیل سخت رشد بودن و نیاز های غذایی پیچیده، تشخیص این کلنی ها نیازمند تجربه و حوصله فراوان است. با توجه به نقش این میکروارگانیسم ها در بیماری های دستگاه ادراری – تناسلی و به ویژه ارتباط آن ها با سرطان و بیماری ایدز، امروزه تلاش بر این است که از راه های تشخیصی سریع، مقرون به صرفه و با حساسیت بالا به مطالعه این ارگانیسم ها پرداخته شود. یکی از تست های دقیق با حساسیت بالا برای شناسایی این باکتری ها، Multiplex PCR می باشد که می توان حتی با توسعه آن تا حد ۱۰ سلول از *U. urealyticum* و یک سلول از *M. hominis* را شناسایی کرد (۱۳). در این مطالعه ۲۶۵ نمونه کلینیکال شامل ۱۵۵ نمونه سرویکوواژینال و ۱۱۰ نمونه ادراری از زنان مبتلا به عفونت های ادراری– تناسلی با دوروش مختلف مورد آزمایش قرار گرفتند. به طور کلی نتایج بررسی نمونه های واژینال و ادراری (۲۶۵ نمونه) منتهی به شناسایی ۴۶ سویه مایکوپلاسما (۱۷/۳درصد) از طریق Multiplex PCR و ۱۰ سویه (۳/۷ درصد) از طریق کشت گردید. براساس این نتایج فقط در افراد مبتلا به عفونت ژنیتال (۱۵۵ نمونه)، ۲۴ سویه مایکوپلاسما (۱۵/۵درصد) از طریق Multiplex PCR شناسایی شد که ۷/۱ درصد آن مایکوپلاسما هومینیس و ۸/۴ درصد اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم بود. همین طور از ۵ سویه مایکوپلاسما (۳/۲ درصد)، که از این نمونه ها به روش کشت جدا شدند، سهم باکتری های فوق به ترتیب ۳/۲ و صفر درصد بود. هم چنین در مبتلایان به عفونت ادراری (۱۱۰ نمونه)، به ترتیب ۶/۴ و۱۳/۶ درصد مایکوپلاسما هومینیس و اوره آ پلاسما اوره آلیتیکم از طریق Multiplex PCR و ۲/۷ و۱/۸ درصد از طریق کشت جداسازی و شناسایی شدند. با توجه به فراوانی میکروارگانیسم های مذکور در دو روش مورد مقایسه وآزمون مک نمار، نتایج حاضر نشان دادند که بین دو روش کشت و Multiplex PCR در تشخیص باکتری های مذکور، تفاوت معنی داری وجود دارد. هم چنین مشخص گردید که این دو باکتری در دستگاه ژنیتال زنانی که در سن فعالیت جنسی هستند بیشتر از سایر سنین مورد آزمایش بوده است. بعضی از گزارشات نیز نشان می دهند که جداسازی این باکتریها در زنان بیش از مردان بوده و از طریق تماس جنسی یا از مادر به نوزاد در هنگام تولد منتقل می گردند (۱۴). از دلایل عمده بیماری زایی این باکتری ها می توان به تغییر شرایط واژن و جایگزینی آن‌ها به جای فلور نرمال واژن از جمله لاکتوباسیلوس‌های تولید کننده پراکسیدهیدروژن، اشاره نمود (۱۵).

در این زمینه مطالعه دیگری نیز در اهواز در سال ۱۳۸۲ صورت گرفته است که نتایج حاصل از آن فراوانی مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم را به ترتیب۳۳/۶ و ۴۰/۴ درصد در زنان بیمار شهر اهواز نشان داد (۱۶). می‌توان نتیجه گرفت که در فاصله سال‌های ۸۲ تا ۸۷ (تحقیق حاضر)، درصد فراوانی باکتری‌های مذکور در شهر اهواز به میزان قابل توجهی کاهش یافته است.

از جمله مطالعات دیگر، بررسی وطنی و همکاران (۱۳۸۵) بود که از ۱۷۴ بیمار مبتلا به التهاب باکتریایی واژن مراجعه‌کننده به یکی از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی تهران، مجموعا ۴۸/۴ درصد مایکوپلاسماهای تناسلی تشخیص دادند. در این بررسی از مقایسه دو روش کشت و PCR حساسیت و دقت PCR در تشخیص مایکوپلاسماها مورد تأیید قرار گرفت (۷).

Stellrecht و همکاران (۲۰۰۴)، با استفاده از روش Multiplex PCR، فراوانی مایکوپلاسماهای دستگاه تناسلی را در ۳۳ نمونه ادراری و سوآب تناسلی از زنان مبتلا به عفونت اوروژنیتال مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی ۸۲ درصد اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم و ۱۱ درصد مایکوپلاسما هومینیس با روش PCR تشخیص داده شدند(۶).

همان گونه که مشاهده می شود، نتایج حاصل از تحقیق حاضر از نظر دقت روش Multiplex PCR نسبت به کشت، با نتایج حاصل از تحقیقات فوق مطابقت دارد. تفاوتی که مشهود است در میزان فراوانی مطالعات داخل کشور و خارج از ایران می باشد. میزان فراوانی مایکوپلاسما های اوروژنیتال در چند مطالعه داخل کشور، ۴۸/۹، ۴۳ و ۲۸ درصد (۷، ۱۶ و ۱۷) و تحقیق حاضر ۱۶/۹ درصد در مقایسه با کشور های خارج از ایران که ۶۴، ۷۳ و ۳۷ درصد (۱۸،۱۹، ۲۰) اعلام گردیده نشان می دهد که فراوانی این باکتری ها در داخل کمتر می باشد. عوامل فرهنگی و اجتمایی رایج در کشورهای دیگر و تفاوت این عوامل با ایران، آزادی در روابط جنسی و تعداد شرکای جنسی در این کشورها را می توان از جمله دلایل افزایش فراوانی مایکوپلاسما های اوروژنیتال در آن ها ذکر نمود (۲۲،۲۱).

از نتایج دیگر و بارز این مطالعه می توان به ارتباط حضور مایکوپلاسماهای اوروژنیتال و سقط جنین اشاره نمود. بر اساس نتایج حاصل، در افراد مبتلا به عفونت تناسلی ۱۵ نفر و مبتلا به عفونت ادراری ۱۰نفر دارای سابقه سقط جنین بودند که در این میان، بین حضور مایکوپلاسما هومینیس و اوره آ پلاسما اوره آلیتیکم در افراد بیمار دارای سابقه سقط، اختلاف معنی داری مشاهده گردید ($P < ۰/۰۰۱$). مطالعات بعضی از محققین دیگر نیز نشان دهنده ارتباط معنی داری بین حضور میکروارگانیسم های مذکور و سقط جنین می باشد (۲۳، ۲۴). اگر چه چنین ارتباطی در مواردی (۲۶،۲۵) نیز حاصل نگردید.

Archive of SID

www.SID.ir

با این حال نکته مهم در مورد این بیماران تشخیص سریع مایکوپلاسما های تناسلی به ویژه در زنان باردار می باشد. مطالعات نشان داده اند که در صورت عدم تشخیص به موقع و درمان زنان باردار، این میکروارگانیسم ها می توانند به سقط جنین خود به خودی، تب بعد از زایمان، زایمان پیش از موعد و کوریوآمنیونیت منجر گردند (۶، ۱۲،۲۷).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده اهمیت شیوع مایکوپلاسماهای تناسلی در بروز عفونت های دستگاه اوروژنیتال زنان و عوارض حاصل از آن‌ها است. لذا توجه به این عوامل در تشخیص عفونت های ادراری–تناسلی زنان و در نظر گرفتن آن‌ها در تشخیص افتراقی بیماری های عفونی تناسلی ضروری است. از آن جا که کشت این باکتری‌ها مشکل، وقت گیر و غالباً ناموفق است، لذا روش Multiplex PCR به عنوان یک روش سریع، حساس و قابل اعتماد و مطابق با شرایط موجود در منطقه به عنوان روشی جایگزین پیشنهاد می گردد.

تقدیر و تشکر

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز که با تصویب (مجوز شماره ۸۶۱۰۹) و تأمین هزینه های طرح و امکانات لازم ما را در انجام این پروژه تحقیقاتی یاری رسانیده اند، سپاسگزاری می نمائیم.

References

1. Zariffard MR, Saifuddin M, Beverly E, Spear GT. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for Lactobacilli, Gardnerella vaginalis and Mycoplasma hominis. *FEMS Immunology Med Microbial* 2002; **34**: 277-281.
2. Stefanow ZB, Kłosowska WM, Puchalska OI, Kozioł BV, Kotowicz B. *Urea plasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in women with urogenital diseases. *Adv Med Sci* 2006; **51**: 250-253.
3. Cimolai N**.** Do mycoplasmas cause human cancer? *Can J Microbiol* 2001; **47**: 691-697.
4. Cimolai N. Serodiagnosis of the infectious diseases: *Mycoplasma pneumonia*. Norwell, Kluwer Academic Pub, 1999; PP: 5-10.
5. Lemaitre M, Henin Y, Destouesse F, Ferrieux C, Montagnier L, Blanchard A. Role of mycoplasma infection in the cytopathic effect induced by human immunodeficiency virus type 1 in infected cell lines. *Infect Immun* 1992; **60**: 742-748.
6. Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. Comparison of Multiplex PCR Assay with Culture for Detection of Genital Mycoplasmas. *J Clin Microbiol.* 2004; **42**: 1528-1533.
7. Vatani Sh, Ghazisaeidi K, Mohamadi M, Naji A, Fateminasab F, Zeraati H, et al. [Survey of genital Mycoplasma contamination in negative cultures of women with bacterial vaginosis by PCR method]. *Sci J Gor Univ Med Sci* 2006; **8**(1): 45-50 (Persian).
8. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott`s Diagnostic Microbiology*. 12th ed. Missouri USA, Mosby-Elsevier, 2007; PP: 525-532.
9. Golshani M, Eslami G, Mohhammadzadeh Ghobadloo SH, Fallah F, Goudarzi H, Soleimani Rahbar AA, et al. Detection of Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum by multiplex PCR in semen sample of infertile men. *Iran J Public Health* 2007**; 36**: 50-57.
10. Pastural M, Audard V, Bralet MP, Remy Ph, Salomon L, Tankovic J, et al. Mycoplasma hominis infection in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2002; **17**: 495-496.
11. Blanchard A, Yanez A, Dybvig K, Watson HL. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of Mycoplasma hominis and detection by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 1358- 1361.
12. Larsen B, Hwang J. Mycoplasma, Ureaplasma, and Adverse Pregnancy Outcomes: A Fresh Look. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010; **8**: 1-7.
13. Diaz N, Dessì D, Dessole S, Luigi Fiori P, Rappelli P. Rapid detection of confections by Trichomonas vaginalis, Mycoplasma hominis, and Urea plasma urealyticum by a new multiplex polymerase chain reaction. *Diag Mic Infect Dis* 2010; **67**: 30–36.
14. Waites KB. Urea plasma infection. *E Med J* 2001; **2**: 1-17.
15. Beverly E, Zariffard MR, Wang QJ, Chen HY, Bremer J, Cohen M, et al. Female genital-tract HIV load correlates Mycoplasma hominies. *J Infect Dis* 2004; **191**: 25-32.
16. Moosavian SM, Pordeli HR. [Survey of Mycoplasma infections in respiratory and urogenital tracts of patients in Ahvaz Emam Khomeini hospital] *J Ker Univ Med Sci* 2003; **10**(4): 185-192 (Persian).
17. Ahmadi A, Badami N, Moazami N [The role of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in acute pelvic inflammatory diseases]. *Sci J Ahv Univ Med Sci* 1994; **17**: 64-70 (Persian).
18. Mardh PA, Westrom L. Tubal and cervical cultures in acute salpingitis with special reference to *Mycoplasma* hominis and T-strain Mycoplasmas. *Br J Vener Dis Genitourin Med* 1970; **46**: 179-186**.**
19. Sweet RL, Mills J, Hadlery KW. Use of laparoscopy to determine the microbiogic etiology of acute salpingitis. *Am J Obstet Gynecol* 1976; **1**: 68-72.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Serin MS, Evruke C, Kibar F, Koksal F. Comparison of PCR and cultivation method to determine the incidence of infections due to Mycoplasma hominis and Mycoplasma fermentans in women genitourinary tract. *East J Med* 2001; **6**: 48-52.
21. Najar Peerayeh SH, Samimi R. Detection of *Urea plasma* urealyticum in clinical samples from infertile women by polymerase chain reaction. *Iran J Pharmacology Ther* 2007; **6**: 23-26.
22. Domingus D, Tavira LT, Duarte A. Genital Mycoplasmas in women attending a family planning clinic in Guine-Bissau and their susceptibility to antimicrobial agents. *Acta Tropica* 2003; **86**: 19-24.
23. Karamastji A, Badami N, Salari MH. [Prevalence study of genital Mycoplasma and *Chlamydia trachomatis* in women with abortion]. MSc Thesis, Health school, Teh Univ Med Sci, 1998 (Persian).
24. 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 cervicitis symptoms in La Crosse, Wisconsin. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(10): 4636–4640.
25. Samimi R. [Survey of genital Mycoplasma in women with abortion frequency and infertile in comparison with control group]. MSc Thesis, Tehran Tarbiat Modarres Univ. 1994 (Persian).
26. Bayoumi FS, Ibtessam MRH, Hind MG. The role of Mycoplasmal infection and anticardiolipin antibodies as autoimmune parameters in pregnancy loss. *J Med Sci* 2006; **6**: 585-590.
27. Kuppeveld FJM, Logt JTM, Angulo AF, Zoest MJ, Quint WGV, Niesters HGM, et al. Genus-and species-specific identification of Mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 1992; **58**: 2606-2615.

Archive of SID

www.SID.ir