

فراوانی عفونت با مایکوپلازما هومینیس، مایکوپلازما ژنیتالایوم و اوره پلازما اوره آلیتیکوم در زنان دارای عفونت دستگاه تناسلی به روش Multiplex PCR

زهرا سیف الهی ننه کران^۱، منوچهر ستاری نایینی^{۲*}، مرضیه نوروزی^۳ و آمیتیس رضانی^۴

۱- کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد نایین، دانشگاه آزاد اسلامی، نایین، ایران

۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نایین، نایین، ایران

۳- دانشجوی دکتری گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- متخصص بیماریهای عفونی، استاد انیستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

*نشانی برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، واحد نایین، دانشگاه آزاد اسلامی، نایین، ایران. تلفن ثابت ۰۳۱۴۶۲۶۵۲۰۰، فکس ۰۳۱۴۶۲۶۶۲۰۰، sattari

@naeiniau.ac.ir

پذیرش برای چاپ: مرداد نود و پنج

دریافت مقاله: خرداد نود و پنج

چکیده

سابقه و هدف: مایکوپلازما تاسه ها کوچکترین ارگانیسیم های بدون دیواره هستند. مایکوپلازما هومینیس، مایکوپلازما ژنیتالایوم و اوره پلازما اوره آلیتیکوم جزء مایکوپلازما تاسه های شایع تناسلی هستند و باعث بروز علائمی مانند درد های زیر شکمی، خارش مجرای تناسلی، سقط جنین، زایمان زودرس و ناباروری می شوند. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی عفونت با مایکوپلازما هومینیس، مایکوپلازما ژنیتالایوم و اوره پلازما اوره آلیتیکوم در زنان دارای عفونت دستگاه تناسلی به روش Multiplex PCR انجام شد.

روش کار: در این مطالعه توصیفی- مقطعی در فاصله زمانی خرداد ماه تا آبان ماه سال ۱۳۹۴ تعداد ۱۱۵ جفت نمونه از ترشحات واژن زنان دارای علائم بالینی عفونت دستگاه تناسلی مراجعه کننده به برخی آزمایشگاه ها در تهران جمع آوری شد. جهت تشخیص آلودگی مایکوپلازما هومینیس، مایکوپلازما ژنیتالایوم و اوره پلازما اوره آلیتیکوم از دو روش کشت و Multiplex PCR استفاده شد و با استفاده از آزمونهای آماری حساسیت و اختصاصیت این تکنیک تجزیه و تحلیل شد. همچنین کلیه نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و با استفاده از روش کای-اسکوئر و t مستقل تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: از مجموع ۱۱۵ نمونه، ۳۸ مورد (۳۳٪) به روش کشت و ۵۴ مورد (۴۶/۹٪) به روش Multiplex PCR دارای عفونت مایکوپلازمایی بودند. باکتری های مایکوپلازما هومینیس، مایکوپلازما ژنیتالایوم و اوره پلازما اوره آلیتیکوم به ترتیب در ۱۳/۹، ۷/۸ و ۲۳/۴ درصد از بیماران وجود داشت. همچنین دو مورد (۱/۸) آلودگی مشترک مایکوپلازمایی داشتند. بیشترین آلودگی در گروه سنی ۳۰ تا ۴۲ سال مشاهده گردید. حساسیت متد Multiplex PCR طراحی شده برای تشخیص مایکوپلازماها هومینیس، مایکوپلازما ژنیتالایوم و اوره پلازما اوره لیتیکوم ۱۰۰ درصد و اختصاصیت آن به ترتیب ۹۶/۱، ۹۷/۲ و ۹۲/۶۳ درصد می باشد. همچنین بین سن و ابتلا به مایکوپلازما تاسه های تناسلی مورد آزمایش، رابطه معنی داری وجود داشت (P < ۰/۰۰۱).

نتیجه گیری: با توجه به تاثیر مایکوپلازماهای تناسلی در عفونت های تناسلی و عواقب ناشی از آنها و از طرفی امکان عدم شناسایی دقیق عفونت های مایکوپلازمایی از طریق کشت، انجام روشهای مبتنی بر PCR که روش ساده و با پتانسیل زیاد می باشد برای ترشحات واژینال مشکوک جهت شناسایی سریع و درمان توصیه می شود.

واژگان کلیدی: مایکوپلازما هومینیس، مایکوپلازما ژنیتالایوم، اوره پلازما اوره آلیتیکوم، Multiplex PCR

مقدمه

مایکوپلازماها یک گروه منحصر بفرد از باکتریها هستند که فاقد دیواره سلولی بوده و دارای زندگی آزاد هستند. آن ها در حیوانات، انسان ها و گیاهان یافت می شوند. این گروه از باکتریها بسیار کوچک بوده و قادرند از فیلترهای باکتریایی عبور کنند. مایکوپلازما هومینیس، مایکوپلازما ژنیتالایوم و اوره پلازما اوره لیتیکوم گروهی از خانواده مایکوپلازماها هستند که نقش مهمی در ایجاد بیماریهای عفونی دارند. مایکوپلازما فرمنتانس نقش مهمی در ایجاد بیماری در افراد دارای سیستم ایمنی سرکوب شده دارد (۱). مایکوپلازما هومینیس باعث بیماری التهابی لگن، کوریو آمینویت ، تب پس از وضع حمل ، پیلونفریت، عفونت های سیستم عصبی مرکزی ، سپتیمی سمی ، عفونت های زخم، عفونت مفاصل، عفونت مجاری تنفسی فوقانی و تحتانی، اندوکاردیت، مننژیت و باکتری می دوره نوزادی و آبسه های دوره نوزادی میشود. مایکوپلازما ژنیتالایوم باعث التهاب دهانه رحم ، بیماری التهابی لگن (PID)، التهاب پروستات، تب بعد از زایمان، سقط های مکرر، تولد نوزادانی با وزن پایین و مننژیت نوزادان می باشد (۲). باکتری اوره آ پلازما اورالیتیکوم یکی از عوامل منتقله جنسی می باشد که باعث عفونت مجاری تحتانی تناسلی، و باعث اورتریت در مردان و ایجاد واژینوز باکتریایی و سرویسیت در زنان می کند (۳).

سخت رشد بودن، نیاز به محیط های کشت اختصاصی و مکمل های غذایی مخصوص، دمای نامناسب انتقال نمونه، مواد محدود کننده رشد، تاثیر دیگر میکروارگانیسم ها در زمان انکوباسیون، فقدان دیواره سلولی در این باکتریها و به تبع آن حساسیت در برابر خشکی، دما و pH ، از مشکلات معمول در کشت مایکوپلازماها می باشد. از طرفی تشخیص کلنی های این باکتری نیاز به مهارت و تجربه کافی دارد و یک فرایند تشخیصی نسبتا طولانی می باشد. تشخیص سریع مایکوپلازماهای تناسلی در بیماران دارای عفونت دستگاه تناسلی به دلیل نقش این باکتری در سقط جنین، تب بعد از زایمان، زایمان پیش از موعد و کوریوآمیوئیت بسیار حائز اهمیت است (۴).

این مطالعه با هدف تعیین فراوانی عفونت با مایکوپلازما هومینیس، مایکوپلازما ژنیتالایوم و اوره پلازما اوره آلیتیکوم در زنان دارای عفونت دستگاه تناسلی به روش Multiplex PCR انجام گرفت.

روش کار

در یک مطالعه توصیفی - مقطعی از خردادماه ۱۳۹۴ تا آبان ماه ۱۳۹۴ تعداد ۱۱۵ جفت نمونه از دستگاه تناسلی زنان مبتلا به عفونت های واژینال در محدوده سنی ۱۸ تا ۵۵ سال مراجعه کننده به مطب پزشکان زنان و زایمان و کلینیک های غرب تهران جمع

آوری شد. معیار ورود بیماران به این مطالعه، وجود یک یا چند علامت مربوط به عفونت ژنیتال از جمله سوزش و خارش در مجرای تناسلی، افزایش ترشحات و تغییر رنگ ترشحات و عدم استفاده از کرم واژینال و آنتی بیوتیک در مدت یک هفته قبل از مراجعه بود. پرسشنامه ای جهت جمع آوری اطلاعات لازم از بیماران شامل سن بیمار، وضعیت تاهل، سابقه عفونت ادراری، سقط جنین، سابقه ناباروری، استفاده از کرم واژینال، آنتی بیوتیک و قرص ضدباروری توسط بیمار تکمیل می شد.

با دوسوآپ پنبه ای از ترشحات واژن نمونه گرفته شد. بلافاصله یکی از سوآپها در محیط ترانسپورت PPLO Broth بدون کریستال ویوله برای کشت مایکوپلازما و سوآپ دیگر، در لوله حاوی بافر PBS برای آزمایش PCR قرار داده شد، و کاملاً تکان داده و پس از خارج کردن سوآپ درب لوله بسته شد. لوله های حاوی محیط ترانسپورت PPLO Broth برای کشت به بخش میکروب شناسی برده شد. لوله های حاوی بافر PBS تا انجام Multiplex PCR در دمای ۷۰- درجه سلیسیوس نگهداری شد. به منظور جداسازی مایکوپلازماهای مورد نظر، یک میلی لیتر از محیط ترانسپورت PPLO را از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده و به محیطهای PPLO دارای اوره ، محیطهای PPLO دارای آرژنین و محیطهای PPLO دارای گلوکز تلقیح گردید. شیشه های در پیچ دار در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده و هرروز لوله ها به مدت دو هفته از لحاظ تغییر رنگ و ایجاد رنگ صورتی مایل به ارغوانی بدون وجود کدورت مورد بررسی گردید. وقتی تغییر رنگی در محیط ایجاد شد، پاساژ آنها به محیط های کشت تازه حاوی یکی از ترکیبات اوره ، آرژنین یا گلوکز انجام گرفت. سپس پلیتهای در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تحت شرایط ۵٪ CO2 قرار داده ، و رشد باکتری ها در سطح محیط تا ۱۰ روز بررسی گردید. اگر در طی این مدت کلنی ایجاد نشد، به عنوان منفی، و در صورت ظهور کلنی، مثبت در نظر گرفته شد (۵).

سویه استاندارد مایکوپلازما هومینیس (ATCC 15056) و مایکوپلازما ژنیتالایوم (ATCC 33530) و اوره آپلازما اورالیتیکوم (ATCC 33175) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای انجام واکنش Multiplex PCR استخراج ژنوم باکتری با استفاده از کیت استخراج شرکت Roche طبق دستورالعمل کیت انجام شد. پس از استخراج، کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از نانودراپ ارزیابی گردید. برای تشخیص سویه های مایکوپلازما هومینیس، مایکوپلازما ژنیتالایوم و اوره پلازما اورالیتیکوم از ژنهای نامبرده و پرایمرهای جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی و یونیورسال باکتریهای مورد مطالعه

اندازه	توالی	پرایمر	نام ژن	نام باکتری	ردیف
281 bp	5' AGTTGTGAAACCTTAACCCCTTGG3'	Forward	140 KDa adhesion protein gene	مایکوپلازما ژنیتالایوم	۶
	5' CCGTT GAGGG GTTTTCCATT TTTGC 3'	Reverse			
344 bp	5' CAA TGG CTA ATG CCG GAT ACG C 3'	Forward	16S rRNA gene	مایکوپلازما هومینیس	۷
	5' GGT ACC GTC AGT CTG CAA T 3'	Reverse			
429 bp	5' ACGACGT CCATAAGCAACT 3'	Forward	Urease gene	اوره آپلازما اورالیتیكوم	۸
	5' CAATC TGCTC GTGAAGTATT AC 3'	Reverse			

Multiplex PCR در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (مقدار ۱۰۰ نانوگرم DNA ، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمرز Taq ، ۱۰ پیکومول buffer 10X ، dNTPmix ، میلی مولار ۰/۵ همراه ۲ میلی مولار MgCl₂) تهیه گردید و روی ژنوم استخراج شده طبق پروتکل گرمایی و با غلظت مشخص طبق جدول ۲ انجام گردید.

برای طراحی تکنیک Multiplex PCR ابتدا با استفاده از سویه های استاندارد بطور مجزا، پروتکل دمایی و غلظت اجزای واکنش با استفاده شیب دمایی در ترموسایکلر Peqlab تعیین گردید. طبق واکنش گرادیانت ، دمای اتصال مشترک برای هر پرایمر محاسبه شد و دمای اتصال پرایمرها از ۵۱ تا ۵۵ درجه سانتی گراد به دست آمد و بهترین دما برای Multiplex PCR نهایی انتخاب شد. واکنش

جدول ۲: برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر

چرخه	زمان	دما	نام مرحله
۱ سیکل	۷ دقیقه	۹۴ درجه	واسرشت اولیه
۳۵ سیکل	۱ دقیقه	۹۴ درجه	واسرشت شدن
	۱ دقیقه	۵۴/۵ درجه	اتصال پرایمرها
	۱ دقیقه	۷۲ درجه	گسترش
۱ سیکل	۱۰ دقیقه	۷۲ درجه	گسترش نهایی

ماکروژن کره جنوبی تعیین توالی گردید. همچنین با استفاده از نرم افزار SPSS آزمون کای دو و تی صورت گرفت و در صورتیکه $P < 0.05$ بود ارتباط معنادار تلقی گردید.

یافته ها

فراوانی آلودگی افراد بر اساس نتایج کشت و Multiplex PCR در جدول ۳ نشان داده شده است.

نهایتا محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ و همراه با مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ bp الکتروفورز شد و توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. سویه استاندارد مایکوپلازما هومینیس (ATCC 15056) و مایکوپلازما ژنیالیوم (ATCC 33530) و اوره آپلازما اورالیتیکوم (ATCC 29557) به عنوان کنترل مثبت تهیه شد. جهت اطمینان از عملکرد تکنیک مورد استفاده چهار مورد محصول PCR از نمونه های بالینی مثبت انتخاب و توسط شرکت

جدول ۳- فراوانی آلودگی مایکوپلازماهای تناسلی در افراد بر اساس نتایج کشت و Multiplex PCR

نتیجه	کشت (درصد)	Multiplex PCR (درصد)
<i>M.hominis</i>	۱۲	۱۰/۴
<i>M.genitalium</i>	۶	۵/۲
<i>U. urealyticum</i>	۲۰	۱۷/۴
<i>M.hominis</i> + <i>U.urealyticum</i>	۰	۰
<i>M.genitalium</i> + <i>U.urealyticum</i>	۰	۰
کل افراد	۱۱۵	۳۳

مراجعه هم که بدلیل ناباروری مراجعه کرده بود، *M.hominis* مشاهده شد. رده سنی افراد مراجعه کننده بین ۱۸ تا ۵۵ سال با میانگین سنی 34.7 ± 9.8 سال قرار داشت. بیشترین آلودگی در گروه سنی ۳۰ تا ۴۲ سال مشاهده می شود (جدول ۴). اختلاف معناداری بین سن و شیوع مایکوپلازماهای تناسلی مورد آزمایش وجود داشت ($P < 0.001$).

فراوانترین علایم بالینی در افراد آلوده به مایکوپلازماهای ژنیالی، بترتیب شامل درد زیر شکم، سوزش مجاری تناسلی و ترشح واژن بود و تنها در یک مورد از افراد مراجعه کننده آلوده دچار زایمان زود رس و یک مورد هم دچار سقط جنین شده بودند. در یکی از

جدول ۴- توزیع فراوانی مایکوپلازماهای تناسلی بر حسب سن

گروه سنی (سال)	تعداد کل افراد	تعداد افراد مبتلا	درصد ابتلا
۳۰-۱۸	۲۴	۶	۲۵
۳۱-۴۳	۵۱	۳۴	۶۶/۷
≥ 44	۴۰	۱۴	۳۵

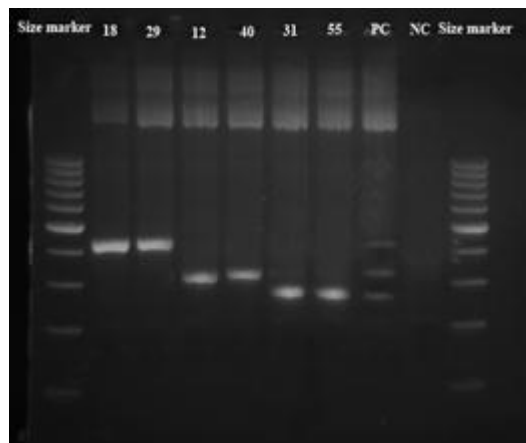
$P < 0.001$

۲۸۱ مشخص گردید (شکل ۱). نتایج تعیین توالی نمونه های بالینی کاملاً با توالی ثبت شده در بانک اطلاعات ژنی NCBI منطبق بود.

واکنش Multiplex PCR نتایج مثبت برای سویه های *M. hominis* و *M. genitalium* و *urealyticum* با تشکیل باندهای بترتیب ۴۲۹ bp و ۳۴۴ bp و ۲۸۱ bp

شکل ۱- تصویر باندهای بترتیب ۲۸۱ bp و ۳۴۴ bp جهت تشخیص سویه های میکوپلازما هومینیس، میکوپلازما ژنیتالایوم و اوره پلازما اورا لیتیکوم

Lane1,10: Size marker 100 bp, Lane 2,3:*M.hominis*, Lane 4,5: *M.genitalium*, Lane6,7:*U.urealyticum* Lane7: Positive controls, Lane8: Negative control



بحث

در مطالعه حاضر فراوانی میکوپلازما هومینیس، میکوپلازما ژنیتالایوم و اوره پلازما اورا لیتیکوم در زنان دارای عفونت دستگاه تناسلی به ترتیب ۲۲/۶ ، ۱۳/۹۲ ، و ۲۴/۳۴ بود. ر بین نمونه های مثبت میکوپلازماهای تناسلی، اوره پلازما اورالیتیکوم بیشتر از سایرین جدا شد. نتایج ما دقیقاً با مطالعات مشابه در ایتالیا، لهستان و یونان منطبق می باشد (۱۴-۱۲). همچنین در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ بر میزان شیوع میکوپلازماهای تناسلی زنان نابارور در سنجندج صورت گرفت شیوع اوراپلازما اورالیتیکوم از بقیه عوامل میکوپلاسمایی بیشتر بود (۱۵).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۳ در گینه نو انجام گرفت شیوع بالای هفتاد درصد میکوپلاسمای تناسلی گزارش شد (۱۶). این تفاوت گسترده در میزان شیوع می تواند به تکنیک های تشخیصی مختلف آزمایشگاهی و تنوع جغرافیایی و فرهنگی بیماران مورد مطالعه مربوط باشد. همچنین تعدادی

عفونت های منتقله از طریق جنسی (STI) در سراسر جهان روی می دهند و یکی از معضلات مهم بهداشت عمومی هستند. در کشورهای در حال توسعه STI در میان پنج عاملی است که باعث مراجعه افراد به مراکز بهداشتی می شود. سازمان بهداشت جهانی (WHO) تخمین زده است که هر ساله در حدود ۳۴۰ میلیون مورد STI روی میدهد (۹). مولیکوت ها یکی از عوامل STI می باشند اما بعنوان فلور نرمال در افراد سالم نیز حضور دارند (۱۰) میکوپلاسماسه ها متعلق به کلاس مولیکوت ها می باشند و کوچکترین میکروارگانیسم های دارای زندگی آزاد هستند. میکوپلاسماسه های تناسلی مانند میکوپلازما هومینیس، میکوپلازما ژنیتالایوم و اوره پلازما اورا لیتیکوم قسمتی از فلور طبیعی مجاری تناسلی بزرگسالان فعال از نظر جنسی هستند. آنها عامل اورتریت های غیر گونوکوکی، مشکلات بارداری، ناباروری، واژینوز با کتربایی و بیماریهای التهابی لگن می شوند (۱۱)

مایکوپلازماهای تناسلی در ناباروری اثبات شده است، به نظر می رسد در پژوهش حاضر احتمالاً تعداد نمونه های بیشتری از افراد نابارور مورد بررسی قرار می گرفت، تعداد بیشتری مایکوپلازما تناسلی شناسایی می شد.

نتیجه گیری

در مجموع در زنان مبتلا به واژینوز باکتریایی، احتمال آلودگی با مایکوپلازماها نیز وجود دارد. با توجه به عدم وجود امکانات کشت در اکثر آزمایشگاههای میکروبیولوژی امکان تشخیص این ارگانیسم ها در همه آزمایشگاهها وجود ندارد. از طرفی، در آزمایشگاههایی هم که امکان انجام کشت مایکوپلازماها را دارند استفاده از کشت می تواند منجر به عدم شناسایی عفونت های مایکوپلازمایی گردد. بر همین اساس انجام PCR برای ترشحات واژینال مشکوک توصیه می شود. با توجه به امکان کمی سازی و سرعت بخشیدن در Realtime PCR توصیه می شود در آزمایشگاههای که از تمکن مالی برخوردار هستند به سمت راه اندازی تستهای PCR معتبر و اعتبار سنجی شده بپردازند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس گزاری خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نایین به دلیل حمایت و هماهنگی های لازم در انجام این پژوهش اعلام می دارد.

از نمونه های آلوده بدلیل سختی کار از دست می روند. سخت رشد بودن، نیاز به محیط کشت های اختصاصی و مکمل های غذایی مخصوص، دمای نامناسب انتقال نمونه، مواد محدود کننده رشد، تاثیر دیگر میکرو ارگانیسم ها در زمان انکوباسیون، فقدان دیواره سلولی در این باکتری ها و به طبع آن حساسیت در برابر خشکی، دما و pH، از مشکلات معمول در کشت مایکوپلازماها می باشد. از طرفی تشخیص کلنی های این باکتری نیاز به مهارت و تجربه کافی دارد. لذا ارجحیت استفاده از تکنیک های مبتنی بر PCR با توجه به حساسیت بیشتر و صرف زمان کمتر ضروری به نظر می رسد. در مطالعه حاضر، بالاترین میزان شیوع مایکوپلازماهای مورد مطالعه در گروه سنی ۴۲-۳۰ بود (جدول ۲). ارتباط محدوده سنی افراد مورد مطالعه و نتایج حاصل از Multiplex PCR دارای رابطه معناداری بود. در مطالعه حسنی و همکاران (۱۷)، نیز هم راستا با این پژوهش فراوانی آلودگی مایکوپلازمایی در رده سنی ۳۱ تا ۴۵ سال بیشتر است لذا با توجه به همخوانی دو مطالعه می توان این طور نتیجه گیری کرد که دلیل فراوانی بالاتر آلودگی در این رده سنی می تواند به دلیل فعالیت جنسی بیشتر باشد. در این مطالعه تنها در یکی از مراجعین هم که بدلیل ناباروری مراجعه کرده بود، اوره پلازما اورالیتیوم مشاهده شد و ارتباط آماری معناداری میان ناباروری و شیوع مایکوپلازماهای تناسلی دیده نشد. از آنجاییکه در مطالعات متعددی (۱۸،۱۹) نقش

REFERENCES

- 1-Ryan KJ, Ray CG (editors) Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill. pp. 2004, 409-12. ISBN 0-8385-8529-9
- 2- Jensen, J.S., Mycoplasma genitalium: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. J Eur Acad Dermatol Venereol.2004 , 18(1), 1-11.
- 3- Esen B, Gozalan A, Sevindi DF, Demirbas A, Onde U, Erkayran U, Karakoc AE, Hasçiçek AM, Ergün Y, Adiloglu AK. UREAPLASMA UREALYTICUM: THE PRESENCE AMONG SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES. Jpn J Infect Dis. 2016 Mar 18. PMID:2700044
- 4- 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(4): 1528-33

- 5- Sakhaei, D., Pourbakhsh, S.A., Banani, M., Lotfi, M., Akhlaghi, F., Asli, E. Using PCR and culture methods for Mycoplasma testing in poliomyelitis vaccine Archives of Razi Institute, Vol. 64, No. 2, December (2009) 109-114
- 6- Jørgen Skov Jensen, Martin B. Borre, and Birthe Dohn: Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR Amplification of the 16S rRNA Gene J Clin Microbiol. 2003 Jan; 41(1): 261–266
- 7- Blanchard A, Yanez A, Dybvig K, Watson HL, Griffiths G, Cassell H. Evaluation of interspecies genetic variation within the 16SrRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1993;31(5): 1358-1361.
- 8- Blanchard A, Hentschel J, Duffy L, Baldus K, Cassell GH. Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. Clin Infect Dis. 1993; 17(1): 148–53.
- 9- Nakashima K, Shigehara K, Kawaguchi S, Wakatsuki A, Kobori Y, Nakashima K, et al. Prevalence of human papillomavirus infection in the oropharynx and urine among sexually active men: a comparative study of infection by papillomavirus and other organisms, including *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma* spp., and *Ureaplasma* spp. BMC Infect Dis. 2014;14:43. doi: 10.1186/1471-2334-14-43.
- 10- Campos GB, Lobão TN, Selis NN, et al. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma hominis* in urogenital tract of Brazilian women. *BMC Infectious Diseases*. 2015;15:60.
- 11- Skiljevic D, Mirkov D, Vukicevic J. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in genital samples collected over 6 years at a Serbian university hospital. Indian J Dermatol Venereol Leprol 2016;82:37-41
- 12- De Francesco MA, Caracciolo S, Bonfanti C, Manca N. Incidence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* isolated in Brescia, Italy, over 7 years. J Infect Chemother 2013;19:621-7.
- 13- Zdrodowska-Stefanow B, Kłosowska WM, Ostaszewska-Puchalska I, Bułhak-Koziół V, Kotowicz B. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in women with urogenital diseases. Adv Med Sci 2006;51:250-3.
- 14- Kechagia N, Bersimis S, Chatzipanagiotou S. Incidence and antimicrobial susceptibilities of genital mycoplasmas in outpatient women with clinical vaginitis in Athens, Greece. J Antimicrob Chemother 2008;62:122-5.
- 15- Mousavi A, Farhadifar F, Mirnejad R, Ramazanzadeh R. Detection of genital mycoplasma infections among infertile females by multiplex PCR. Iranian Journal of Microbiology. 2014;6(6):398-403

- 16- Domingues D, Távora Tavira L, Duarte A, Sanca A, Prieto E, Exposto F. Genital mycoplasmas in women attending a family planning clinic in Guiné-Bissau and their susceptibility to antimicrobial agents. *Acta Trop* 2003;86:19-24.
- 17- Hassani, Shahrokhi, Khezerdoust, Sarshar, Takroosta, ... Detection of *Ureaplasma Urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Clinical isolates from Women with Genital Tract Infection by PCR , *Iranian journal of infectious diseases and tropical medicine* 17 (58), 45-50
- 18- Fenkci V, Yilmazer M, Aktepe O. Have *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections any significant effect on women fertility? *Infez Med.* 2002;10:220–223.
- 19- Rosemond A, Lanotte P, Watt S, Sauget A, Guerif F, Royere D, et al. Systematic screening tests for *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in urogenital specimens of infertile couples. *Patholol Biol.* 2006;54:125–12

