مقاله پژوهشی

مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۳۳ شماره ۳ مرداد و شهریور ۱۳۹۰ صفحات ۴۱-۳۶

# شناسایی عفونتهای تنفسی ناشی از مایکوپلاسما نومونیه در بیماران مراکز آموزشی- درمانی تبریز به سه روش کشت، الیزا وPCR (واکنش زنجیره ای پلیمراز)

**سیمین شریفی**: گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**رضا قوطاسلو**: گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران: نویسنده رابط
**Email:** rzghottaslo@yahoo.com
**محمد تقی اخی**: گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**محمد حسین سروش**: گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**خلیل انصارین**: گروه بیماریهای ریه، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**جعفر شعبانپور**: گروه بیماریهای ریه، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**حبیب ضیغمی**: گروه میکروبشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران
**اکبر شریفی**: گروه بیماریهای ریه، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**محمدرضا غفاری**: گروه بیماریهای ریه، مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**حسین بیژن پور**: گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

**دریافت:** ۸۸/۱۰/ ۱۰ ، **پذیرش:** ۸۹/۸/۲۹

## چکیده

**زمینه و اهداف:** مایکوپلاسما نومونیه در دستگاه تنفسی فوقانی وتحتانی ایجاد بیماری نموده و بصورت اپیدمیک و اندمیک و نیز در تمام گروههای سنی ایجاد بیماری می‌کند. مایکوپلاسما نومونیه عامل ۱۵ تا ۲۰ درصد موارد پنومونی اکتسابی از جامعه است.

هدف از این مطالعه بررسی مقایسه ای روشهای کشت، الیزا و PCR جهت تشخیص مایکوپلاسما نومونیه و معرفی بهترین روش بود و با توجه به اهمیت موضوع عفونتهای تنفسی در کشور و بررسی عوامل ایجاد کننده پنومونی ها، عدم تحقیق کافی مشابه در منطقه آذربایجان شرقی، این مطالعه بر روی مایکوپلاسما نومونیه در مراکز آموزشی و درمانی شهر تبریز انجام گرفت.

**مواد و روش ها:** این مطالعه از خرداد تا آبان ماه سال ۱۳۸۸ بر روی ۲۰۰ بیمار (۵۰/۳ درصد مرد، ۴۹/۷ درصد زن، میانگین سنی ۲۵ سال و رنج سنی از کودک ۳ ماهه تا ۸۱ سال) در تبریز انجام شد. انتخاب بیماران مشکوک به عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه با تشخیص پزشک معالج بر اساس علائم بالینی انجام گرفت. برای آزمایش الیزا از نمونه های تک سرمی و برای PCR و کشت از نمونه های سواپ گلو یا مایع شستشوی ریه بیماران مشکوک به عفونت مایکوپلاسما نومونیه استفاده شد. تشخیص توسط روشهای کشت، PCR و اندازه گیری IgMوIgG سرم با روش الیزا انجام گرفت.

**یافته ها:** در این تحقیق از ۱۲ نمونه مثبت (۶٪) با روش PCR، نتیجه ۱۰ نمونه (۵٪) از نظر IgM و ۴ نمونه (۲٪) از نظر کشت مثبت بود. بیشترین فراوانی عفونت مایکوپلاسما نومونیه در گروه سنی ۵-۲۰ سال بود.

**نتیجه گیری:** این تحقیق که از سه روش PCR، الیزا و کشت برای تشخیص مایکوپلاسما نومونیه استفاده شد آزمایش PCR در مقایسه با روشهای الیزا و کشت حساسترین روش بوده و از طرفی روش الیزا نیز حساستر از کشت بود. نتایج این تحقیق نشان می دهد که آزمایش PCR بر روی نمونه‌های سواب گلو سریع، حساس و اختصاصی است و تشخیص عفونت تنفسی با عامل مایکوپلاسما نومونیه را تسهیل می‌کند.

**کلید واژه ها:** مایکوپلاسما نومونیه، الیزا، کشت و واکنش زنجیره ای پلیمراز

## مقدمه

عامل اغلب پنومونی اکتسابی از جامعه در کودکان، باکتریهایی مانند پنوموکوک، هموفیلوس آنفلوانزا و مایکوپلاسما نومونیه می‌باشند. عفونتهای ناشی از مایکوپلاسما نومونیه کمتر منجر به بستری شدن می‌شود ولی در مواقع نادری باعث دیسترس تنفسی

می‌شود. این باکتری مسئول حدود ۲۰ تا ۴۰ درصد موارد پنومونی‌های اکتسابی از جامعه در کودکان اروپایی است. این آمار در امریکای شمالی حدود صفر تا ۴۰ درصد می باشد (۲-۱). بیشترین فراوانی عفونت در کودکان سنین مدرسه و بالغین جوان وجود دارد و پنومونی مایکوپلاسمایی در گروه سنی ۵ تا ۲۰ سالگی بیشترین فراوانی را دارد (۶-۳) بر همین اساس، مشاهده می‌شود که با افزایش سن، شدت بیماری افزایش می‌یابد (۷). برآورد شده است که هر سال ۲ میلیون مورد از پنومونی ناشی از مایکوپلاسما نومونیه و ۱۰۰۰۰۰ مورد از بیماری که موجب بستری شدن فرد در بیمارستان می‌گردد، در ایالات متحده رخ می‌دهد. علائم بالینی عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه شامل: سرفه خشک، درد سینه، تب، فارنژیت، احساس خستگی می‌باشد (۸). در هر حال پنومونی ناشی از مایکوپلاسما نومونیه معمولاً گزارش نمی‌شود و از آنجایی که تست‌های تشخیصی سریع قابل اطمینان در دسترس نیستند، بنابراین آمار دقیق میزان بروز این بیماری در کل دنیا نامشخص می‌باشد (۹). متاسفانه تشخیص سریع و دقیق عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه به دلیل نبود روشی استاندارد، سریع و اختصاصی مشکل است. روشهای اختصاصی تشخیص عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه شامل کشت، سرولوژی و PCR می باشند.

هدف از این مطالعه بررسی مقایسه ای کشت، الیزا و PCR جهت تشخیص مایکوپلاسما نومونیه و معرفی بهترین روش بود و با توجه به اهمیت موضوع عفونتهای تنفسی در کشور و بررسی عوامل ایجاد کننده پنومونی ها، عدم تحقیق کافی مشابه در دانشگاه علوم پزشکی تبریز و منطقه آذربایجان شرقی تصمیم گرفتیم که چنین مطالعه ای را بر روی مایکوپلاسما نومونیه در مراکز آموزشی و درمانی شهر تبریز انجام دهیم.

## مواد و روشها

این مطالعه به صورت توصیفی در محدوده زمانی از خرداد ۱۳۸۸ تا آبان ماه ۱۳۸۸ از ۲۰۰ بیمار سرپایی و بستری معرفی شده مشکوک به عفونت مایکوپلاسما نومونیه انجام گرفت. شرایط ورود شامل کلیه بیمارانی‌که دارای علائم بالینی به نفع عفونت تنفسی بوده مانند (ضعف و بی‌حالی، سردرد و سرفه خشک پایدار، تب، لرز ، تنگی نفس، اسهال، وجود خلط، درد عضلانی و درد سینه) که توسط پزشکان متخصص ریه (۴ نفر) و < متخصص کودکان (یک نفر) معرفی می‌شدند، به عنوان جمعیت مورد مطالعه انتخاب شدند. بیمارانی که در دو هفته اخیر آنتی بیوتیک مصرف کرده بودند از مطالعه حذف شدند. تشخیص مایکوپلاسما نومونیه با استفاده از سه روش آزمایشگاهی کشت، الیزا و PCR انجام گرفت. نمونه بالینی جهت انجام الیزا سرم بیماران بود. نمونه بالینی مورد استفاده برای کشت، سواپ گلو و یا مایع شستشوی ریه بود. تعدادی از بیماران بستری و تعدادی سرپائی بودند. تعدادی از بیماران برونکوسکوپی می شدند که نمونه از لاواژ اخذ و در اغلب موارد نمونه گیری از طریق سواب گلو( ۸۹٪) بودند. به دلیل حساسیت مایکوپلاسماها به سواپ پنبه ای از سواپ داکرونی استفاده شد. در روش کشت از محیط کشت غنی شدهPPLO استفاده شد. جهت انجام کشت، با استفاده از سرنگ استریل حدود ۲ سی‌سی از محیط کشت انتقالی را توسط فیلتر سرنگی با اندازه پور ۰/۴۵ میکرومتر در شرایط استریل به محیط کشت مایع غنی شده اضافه کرده سپس به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل گردید. محیط های کشت هفته ای دو بار از نظر تغییر رنگ از قرمز به زرد کنترل شدند. در صورتی که این تغییر رنگ در طول سه روز اول پس از کشت روی دهد نشان دهنده آلودگی با سایر باکتری ها تلقی می شود، چون مایکوپلاسما نومونیه کند رشد بوده و در این مدت نمی تواند باعث تغییر رنگ محیط کشت مایع شود. محیط‌های کشت مایع تا چهار هفته نگهداری می شد و در صورت عدم تغییر رنگ کنار گذاشته می‌شدند. در صورت تغییر رنگ پس از چهار روز، از محیط کشت مایع به محیط کشت جامد ساب کالچر انجام می شد و محیط کشت جامد نیز تا زمان مشاهده کلنی مایکوپلاسما نومونیه هفته‌ای دو بار در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۵ یا ۱۰ بررسی شدند و در صورت مشاهده کلنی گرانولر یا توت فرنگی شکل، کشت مثبت گزارش می‌شدند (۱۰). برای انجام روش PCR از محیط کشت انتقالی حاوی نمونه بالینی استفاده شد.

روش استخراجDNA: یک سی‌سی از محیط کشت حاوی نمونه بالینی را با بافرPBS سه بار شستشو داده تا محیط کشت کاملا" از بین برود و فقط حدود۲۰ میکرولیتر از مایع در ته میکروتیوب باقی بماند سپس ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه به آن اضافه و پس از شیکر کردن، آن را به مدت ۱۵ دقیقه دردمای ۹۵ درجه قرار داده می شود (۱۱،۱۲).

با استفاده از دو پرایمر تهیه شده از شرکت سیناژن انجام شد که قطعه ای با طول ۳۴۵ جفت باز PCR واکنش را تکثیر می کند. توالی پرایمرهای پیشرو و معکوس در زیر نشان داده شده است:

Forward: P4A 5′ AGG CTC AGG TCA ATC TGG CGT GGA 3′

Reverse: P4B 5′ GGA TCA AAC AGA TCG GTG ACT GGG T 3

قابل ذکر است که این پرایمرها قبلا" در مطالعات دیگری نیز استفاده شده است (۱۷-۱۳).

برنامه ریزی دستگاه ترموسایکلر به ترتیب زیر بود:

۱.دناتوراسیون اولیه ۹۴°C به مدت ۲ دقیقه

۲. سیکل اصلی با ۴۰ بار تکرار شامل:

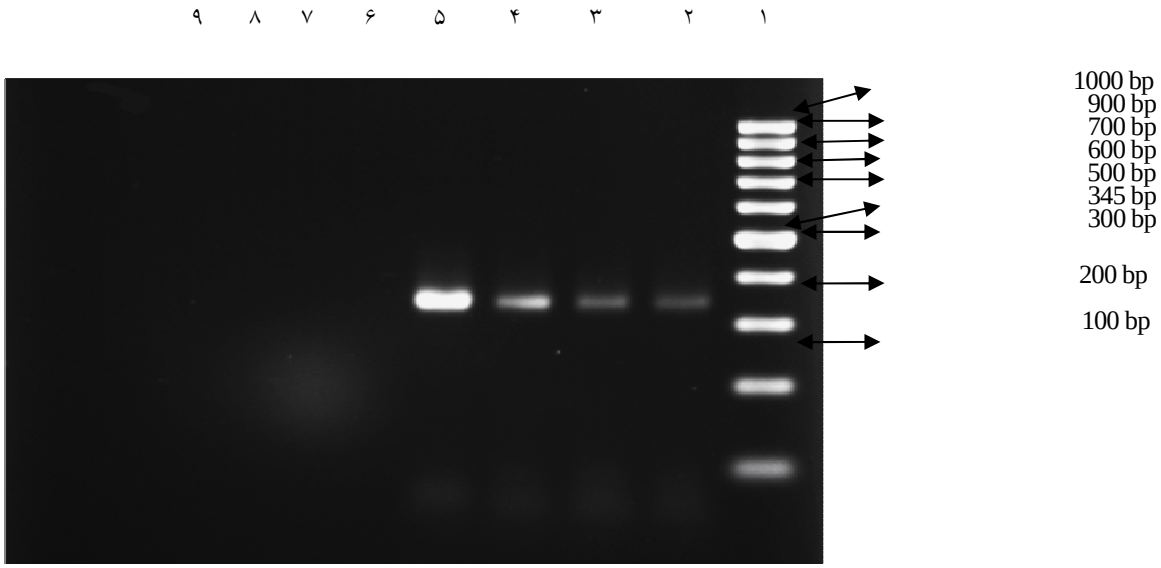
- دناتوراسیون ۹۴C به مدت ۱ دقیقه
- اتصال پرایمرها ۶۲C به مدت ۱ دقیقه
- تکثیر ۷۲C به مدت ۱ دقیقه

۳. تکثیر نهایی۷۲°C به مدت ۷ دقیقه

ترکیب مورد استفاده برای PCR در حجم ۲۵µl شامل موارد زیر است:

| ترکیبات | مقدار | غلظت نهایی |
|---|---|---|
| DW | 13.5 µl | – |
| PCR Buffer(10X) | 2.5 µl | 1X |
| $MgCl_2$ | 1 µl | 0.5mM |
| dNTP (10mM) | 0.5 µl | 50µM |
| Primer F | 1 µl | 0.4 µM |
| Primer R | 1 µl | 0.4 µM |
| Taq DNA polymerase | 0.5 µl | 2.5 U |
| DNA | 5 µl | – |

در روش سرولوژی با استفاده از کیت EUROIMMUN مقدار IgG و IgM سرم اندازه گیری شد. قابل ذکر است که نمونه برداری با اخذ رضایت نامه کتبی از بیماران انجام گرفت. روش آماری مورد استفاده برای تحلیل داده ها آزمون دقیق فیشر (با کمک نرم افزارSPSS ver 14)، محاسبه ارزش تشخیصی تست‌ها (حساسیت، ویژگی، ارزش اخباری مثبت و ارزش اخباری منفی) و آمار توصیفی (درصد و فراوانی) بود. در این مطالعه مقدار p کمتر از۰۵/ ۰ از لحاظ آماری معنی دار تلقی گردید.




**شکل شماره ۱:** نمایی از الکتروفورز محصول PCR برخی از نمونه های بیماران و کنترل مثبت و منفی مایکوپلاسما نومونیه.

۱. 100 bp ladder (Fermentas)
۲ ، ۳ و ۴ . نمونه هایی از مایکوپلاسما نومونیه های جدا شده از بیماران
۵. کنترل مثبت (سویه استاندارد مایکوپلاسما نومونیه ATCC 15531 )
۶،۷،۸. نمونه هایی از بیماران غیرمبتلا به عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه
۹. کنترل منفی

**جدول شماره ۱:** ارزش تشخیصی روش های کشت و الیزا که در آن روش PCR به عنوان روش استاندارد طلایی در نظر گرفته شده است.

| | ویژگی | حساسیت | ارزش اخباری منفی | ارزش اخباری مثبت |
|---|---|---|---|---|
| الیزا (IgM) | ٪۱۰۰ | ٪۸۳/۳ | ٪۹۷/۹ | ٪۱۰۰ |
| کشت | ٪۱۰۰ | ٪۳۳/۳ | ٪۹۵/۹ | ٪۱۰۰ |

## یافته

در این مطالعه ۵۰،۳ درصد بیماران مورد مطالعه مرد و۴۷/۷ درصد زن بودند. در مبتلایان به عفونت تفاوت آماری معنی داری از نظر جنسیت وجود نداشت ($P_{V=}$۰/۷ ). محدوده سنی بیماران حداقل ۳ ماه و حداکثر ۸۱ سال و میانگین سنی بیماران ۲/۲±۲۵ سال بود. ۶۴٪ بیماران سرپایی و ۳۶٪ درصد آنها بستری بودند. منبع کسب عفونت توسط بیماران مبتلا به عفونت مایکوپلاسما نومونیه در هر ۱۲ نفر اکتسابی از جامعه بوده و هیچکدام از آنها عفونت بیمارستانی نبودند. فراوانی مایکوپلاسما نومونیه در گروه

سنی صفر تا ۴ سال( ۲/۱۷ ٪)، گروه سنی ۵ تا ۲۰ سال (۱۱/۱۱ ٪) و گروه سنی ۲۱ تا ۸۱ سال (۶/۰۶٪) بود. بیشترین فراوانی عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه در گروه سنی ۵ تا ۲۰ سال و کمترین فراوانی عفونت در گروه سنی صفر تا ۴ سال بود.

در این تحقیق تشخیص آزمایشگاهی باکتری مایکوپلاسما نومونیه توسط سه روش کشت، الیزا و PCR مورد بررسی قرارگرفت. از ۲۰۰ نمونه بالینی، ۱۲ نمونه با روشPCR مثبت گزارش شدند که نشان دهنده وجود عفونت تنفسی با عامل مایکوپلاسما نومونیه با فراوانی ۶ درصد می باشد. نمایی از الکتروفورز محصول PCR برخی از نمونه های بیماران و کنترل مثبت و منفی مایکوپلاسما نومونیه در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. در روش کشت چهار مورد از نمونه های بالینی مثبت شدند که شامل ۳۳/۳٪ از نمونه های PCR مثبت بودند.

در روش الیزا که وجود IgG با تیتر بالای ۲۰RU/ml نشان دهنده عفونت قبلی با مایکوپلاسما نومونیه بود ۵۳ درصد (۱۰۶ نفر) بیماران دارای تیتر بالای RU/ml ۲۰ بودند. از ۱۲ بیماری که در این تحقیق عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه داشتند ۱۰ بیمار IgG و IgM مثبت داشتند که آزمایش PCR نیز در آنها مثبت بود. از ۱۲ بیمار مبتلا به عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه، IgM یک بیمار منفی ولی IgG وی مثبت بود. از ۱۲ بیمار مبتلا ۱ بیمار (۸/۳٪) IgG و IgM منفی داشت ولی نتیجه آزمایش PCR و کشت وی مثبت بود.

## بحث

روش کشت محدودیت های زیادی دارد مانند حساسیت پایین (۶۰-۳۰ درصد)، مدت زمان لازم طولانی جهت کشت (۱ تا ۴ هفته) و از طرفی نیاز به آزمایشگاه تخصصی و باکتری زنده دارد. از طرفی پروسه تهیه محیط کشت جهت رشد مایکوپلاسما نومونیه طاقت فرسا است، احتمال ابتلای کسانی که در آزمایشگاه این باکتری را کشت می دهند وجود دارد (۱۸). حساسیت روش کشت در این مطالعه نیز پایین بوده و فقط ۳۳/۳٪ نمونه هایی که دارای باکتری مایکوپلاسما نومونیه بوده اند توانستند در محیط کشت غنی شده رشد کنند (جدول شماره ۱). طبق تحلیل آماری به عمل آمده در این مطالعه، روش PCR در مقایسه با روش‌های الیزا و کشت حساسترین روش بود(P=۰۰۱).

از نظر تاریخی روش های سرولوژی معمولترین روش آزمایشگاهی جهت تشخیص مایکوپلاسما نومونیه می باشد. افزایش چهار برابری در تیتر آنتی بادی در سرم دوره حاد و نقاهت بیماری هنوز هم بعنوان استاندارد طلایی در تشخیص عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه می باشد (۱۹). در مطالعه‌ای که ما انجام دادیم بعلت مشکلاتی که در دستیابی مجدد به بیماران بعد از ۳ تا ۶ هفته از خونگیری مرحله اول و مخالفت آنان از خونگیری مجدد وجود داشت فقط یک نمونه سرمی از بیماران تهیه شد، بنابراین IgG و IgM هر دو یکبار اندازه گیری شد که یکی از محدودیت های این تحقیق به شمار می رود. زیرا حساسیت تست سرولوژیکی وابسته به این است که دو نمونه سرمی، یکی قبل و دیگری بعد از مرحله حاد بیماری، تهیه شود که در صورت وجود بیماری ، افزایش چهار برابر تیتر آنتی بادی را نشان می‌دهد (۲۰و ۷). پنجاه و سه درصد ( ۵۳٪) کل بیماران مورد مطالعه در خون خود آنتی بادی IgG علیه مایکوپلاسما نومونیه با تیتر ۲۰ RU/ml ≤ را داشتند که نشان دهنده وجود عفونت قبلی در بیش از ۵۰ درصد از افراد مورد مطالعه در این تحقیق است. از ۱۲ بیماری که در این تحقیق عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه داشتند ۱۰ بیمار IgG و IgM مثبت داشتند که آزمایش PCR نیز در آنها مثبت بود. پس۸۳/۳٪ از افراد مبتلا در این مطالعه برای اولین بار به این عفونت مبتلا شده‌اند. از ۱۲ بیماری که در این تحقیق عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه داشتند IgM یک بیمار منفی ولی IgG وی مثبت بود که نشان دهنده عفونت مجدد در این فرد می‌باشد. در ضمن آزمایش PCR در این بیمار مثبت بود. پس ۸/۳٪ از افراد مبتلا به عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه قبلا" نیز به این عفونت مبتلا شده‌اند. از ۱۲ بیمار مبتلا به عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه ۱ (۸/۳٪) بیمار IgG و IgM منفی داشت ولی نتیجه آزمایش PCR وکشت وی مثبت بود که احتمالا" به دلیل نمونه‌گیری از بیمار قبل از تولید آنتی بادی اختصاصی، پاسخ ایمنی ناکافی، تاخیر در تولید آنتی بادی و یا عدم تولید آنتی بادی بعلت ضعف سیستم ایمنی باشد (۲۱،۲۲).

زمانی که نتیجه PCR مثبت همراه با نتیجه سرولوژی منفی است این پدیده ممکن است در اثر پاسخ ایمنی ناکافی، درمان سریع آنتی بیوتیکی موفقیت آمیز و یا نمونه گیری از بیمار قبل از تولید آنتی بادی اختصاصی باشد. نتیجه PCR منفی همراه با نتیجه کشت یا سرولوژی مثبت ممکن است نشان دهنده اشکال تکنیکی در انجام PCR و یا وجود بازدارنده در واکنش باشد. در صورت تجویز آنتی بیوتیک نتیجه PCR ممکن است منفی شود که حتی ممکن است نتیجه سرولوژی مثبت باشد. استفاده از روش PCR همراه با اندازه گیری IgM ممکن است برای تشخیص عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه در کودکان مفید باشد ولی برای بزرگسالان که ممکن است به دلیل برخورد قبلی با این باکتری افزایش در تیتر IgM را نداشته باشند، مفید نباشد و فقط باعث بیشتر شدن هزینه تشخیص شود (۲۲). اگر چه روش PCR بطور معمول در آزمایشگاه‌ها در دسترس نیست و نسبتا" گران است ولی در مقایسه با روش کشت و تست‌های سرولوژیکی تک نمونه‌ای از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار است (۱۸). حساسیت روش PCR بسیار بالاست و از نظر تئوری می‌تواند DNA خالص حتی یک ارگانیسم را ردیابی کند. دیگر مزیت سرعت انجام آن است که در عرض یک روز قابل انجام است و نیازی به زنده بودن باکتری در نمونه مورد آزمایش نیست. این تست را می توان بر روی نمونه بافت نیز انجام داد (۲۲). از ۲۰۰ نمونه بالینی،۱۲ نمونه با روشPCR مثبت گزارش شدند که نشان

دهنده وجود عفونت تنفسی با عامل مایکوپلاسما نومونیه با فراوانی ۶درصد می‌باشد.

طبق تحقیقاتی که در کشورهای دیگر انجام شده عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه در گروه سنی ۵ تا ۲۰ سالگی بیشترین فراوانی را دارد (۶،۳،۴،۵). در مطالعه ما نیز بیشترین فراوانی عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه در گروه سنی ۵ تا ۲۰ سال بود که این نتیجه با نتایج بدست آمده در مطالعات دیگر همخوانی دارد. با توجه به این که درصد عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه در این مطالعه ۶٪ است، این آمار پایین تر از آماری است که از لهستان (۵۲٪)، آمریکا (۲۷٪ و ۲۹/۵٪)، دانمارک(۸٪)، کره (۴۰ ٪) و ژاپن (۲۴/۲٪) گزارش شده است (۲۸–۲۳).

در این مطالعه فراوانی عفونت تنفسی مایکوپلاسما نومونیه نسبت به کشورهای همسایه، عراق (۱۹/۴٪) و ترکیه (۱۶/۲٪) کمتر است (۳۰–۲۷). درکشور فراوانی این عفونت در تبریز ایران نسبت به شهر تهران (۴۳ ٪) پایین تر است اما نسبت به اهواز (۳درصد) و رشت (۱ درصد) فراوانی این عفونت بالاتر می‌باشد (۳۲،۳۱،۱۷). از طرفی در این تحقیق که از سه روش PCR، الیزا و کشت برای تشخیص مایکوپلاسما نومونیه استفاده شد آزمایش PCR در مقایسه با روشهای الیزا و کشت حساسترین روش بود.

# References


1. Cristiana MC, Nascimento C. Etiology of childhood community acquired pneumonia and its implications for vaccination. *BJID* 2001; **5**: 87-97.
2. Chaudhry R, Tabassum I, Kapoor L. A fulminant case of acute respiratory distress syndrome associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 2010; **53**(3): 561-563**.**
3. Foy HM, Kenny GE, McMaban R, Mansy AM and Grayston JT. Mycoplasma pneumoniae in an urban area. *JAMA* 1970; **214**: 1666-1672.
4. McCracken GH. Etiology and treatment of pneumonia. Pediatr. *Infect Dis J* 2000; **19**: 373-377.
5. Principi N and Esposito S. Emerging role of Mycoplasma pneumoniae and *Chlamydia pneumoniae* in paediatric respiratory-tract infections. *Lancet Infect Dis* 2001; **1**: 334-344.
6. Principi N, Esposito S, Blasi F, Allegra L. The Mowgli Study Group. Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children with community-acquired lower respiratory tract infections. *Clin Infect Dis* 2001; **32**: 1281-1289.
7. Willett HP, *Mycoplasma*. In: WK. Joklik, H.P. Willett, D.B. Amos and C.M. Wilfert, Editors. *Zinsser Microbiology*, 20th ed. London, Prentice-Hall International, 1992; PP: 730–737.
8. Huong Phan L, Ngo T, Thi T, Nguyen T. Nguyet T. First Report on Clinical Features of *Mycoplasma pneumoniae* Infections in Vietnamese children. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2007; **60**(6): 370-373.
9. Waites KB, Robinson DT. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolker RH. Manual of clinical. 7th ed. USA, ASM Press, 1999; PP: 782-794.
10. Taylor T. Recovery of Human Mycoplasmas. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 104: mycoplasma Protocols, Edited by: RA. J. Totowa, Nicholas Humana Press Inc, 1998; PP: 25-35.
11. Alfred W, Tanya AH, Charles K.Development of a Genomics-Based PCR Assay for Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in a Large Outbreak in New York State. *J Clin Microbiology* 2001; **8**: 1385–1390.
12. Nathali M, Ierrel E , Rolandb R. Use of a triplex polymerase chain reaction for the detection and differentiation of *Mycoplasma Pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in the presence of human DNA. *J General Microbiology* 1993; **139**, 2431-2437.
13. Fanrong K, Susanna G, Gwendolyn L. Rapid-Cycle PCR for Detection and Typing of *Mycoplasma pneumoniae* in Clinical Specimens .*J Clin Microbiology*, 2000; **38**: 4256-4259.
14. Wangxue C, Dong L, Barbara P, Ian W and Vinton SC. High Prevalence of *Mycoplasma Pneumoniae* in Intestinal Mucosal Biopsies from Patients with Inflammatory Bowel Disease and Controls. *Journal of Digestive Diseases and Sciences* 2001; **46**(11): 2529–2535.
15. Sharma S, Brousseau R, and Kasatiy S .Detection and Confirmation of *Mycoplasma Pneumoniae* in Urogenital Specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 1998; **36**(1): 277–280.
16. Daniele C, Marcello V, Danielle V, Veronique V, Alain L, Pier EV. Multiplex PCR for rapid and differential diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory infections. 1999; **35**(2):105-108.
17. Shah hoseini H, Mardani M, Hoseini Z, Khoramkhorshid HR, Rahimi AA,Vandeusefi J. Comparison of PCR and culture tests for diagnosis of Mycoplasma pneumoniae respiratory tract infections. *J Zanjan Uni Med* 2006; **14**(56): 12-23. (Persian)
18. Tully JG, Rose DL, Whitcomb RF, Wenzel RP. Enhanced isolation of Mycoplasma pneumoniae from throat washings with a newly-modified culture medium. *J Infect Dis* 1979; **139**(4): 478-482.

19. Gavranich JB and Chang AB. Antibiotics for community acquired lower respiratory tract infections (LRTI) secondary to *Mycoplasma pneumoniae* in children, 2005.http://www.cochrane.org/reviews/en/ab004875.html (Accessed Mars 2009).
20. Talkington DF, Shott S, Fallon MT, Schwartz SB and Thacker WL. Analysis of eight commercial enzyme immunoassay tests for detection of antibodies to *Mycoplasma Pneumoniae* in human serum. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; **11**: 862–867.
21. Ozaki T, Nishimura N, Ahn J. Utility of a rapid diagnosis kit for *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in children, and the antimicrobial susceptibility of the isolates. *J Infect Chemother* 2007; **13**: 204–207.
22. Atkinson TP, Mitchell F, Ken BW. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiology Reviews* 2008; **32**(6): 956-973.
23. Dorigo JW. Demonstration by a nested PCR for *Mycoplasma pneumoniae* that *M. pneumoniae* load in the throat is higher in patients hospitalised for *M. pneumoniae* infection than in non-hospitalised subjects. *J Med Microbiol* 1999;**48** .1115-1122.
24. Maczynska B, Matusiewicz K, Chiciak J, Stankiewicz M, Sozanska B, Boznanski A .Comparison of detectability of *Mycoplasma pneumoniae* infections in children, using PCR-test and serological methods: indirect immunofluorescence and immunoenzymatic assay. *Clin Microbiology Infec* 2002; **8**(1).
25. Block S. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pnemoniae* in pediatric community-acquiard pneumonia: comparative efficacy and safety of clarithromycin versus erythromycin ethylsuccinate. *Pediatr Infect Dis J* 1995; **14**: 471-477.
26. Harris JA. Safety and efficacy of azithromycin in the treatment of community-acquired pneumonia in children. *Pediatr Infect Dis J* 1998; **17**: 865-871.
27. Sohn JW, Park SC.Atypical pathogens as etiologic agents in hospitalized patients with community – aquared pneumonia in Korea: A prospective multicenter study. *J Korean Med Sci* 2006; **21**: 602-607.
28. Okazaki N, Ohya H.*Mycoplasma pneumoniae* isolated from patients with respiratory infection in Kanagava prefecture in 1976-2006: Emergence of macrolide-resistant strains. *Jpn J Infect Dis* 2007; **60**: 325-326.
29. Mujgan S, Ayse K, Emin U, Fatma O, Mustafa O. Frequency of *Clamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* Infections in Children. *J Trop Pediatrics* 2007; **53**(4): 225-231.
30. Al-Ghizawi GJ, Al-Sulami AA and Al-Taher SS. Profile of community- and hospital-acquired pneumonia cases admitted to Basra General Hospital, Iraq. *Eastern Mediterranean health journal*. 2007; **13** (2): 230-242.
31. Naghipour MR, Cuevas LE. Contribution of viruses, *Chlamydia spp*. and *Mycoplasma pneumoniae* to acute respiratory infections in Iranian children. *Journal of Tropical Pediatrics* 2007; **53**(3):179-184.
32. Moosavian SM, Pordeli HR. Survey of Respiratory and Urogenital Infections Due to *Mycoplasma* in the Hospitalized Patients in Ahwaz Imam Khomeini Hospital. *J Kerman University of Medical Sciences* 2003; **10**(4): 185-192.