

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

مقایسه فراوانی مایکوپلازما هومینیس و اوره آپلازما 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 و زایمان، 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 مایکوپلازماها 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 عفونت، با روش مولکولی و کشت تعیین و مقایسه گردند.
مواد و روش ها: در این بررسی که به منظور مقایسه فراوانی مایکوپلازما هومینیس و اوره آپلازما 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 مایکوپلازماها 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 (۱۵۵ مورد) با روش Multiplex PCR، مایکوپلازما هومینیس در ۷/۱ درصد و اوره آپلازما اوره آلیتیکوم در ۸/۴ درصد از آن ها تشخیص داده شدند. این در حالی است که با روش کشت، میزان وفور مایکوپلازما هومینیس در این زنان ۳/۲ درصد بوده ولی اوره آپلازما اوره آلیتیکوم در هیچکدام از آنها مشاهده نگردید. علاوه بر این، بین حضور مایکوپلازما هومینیس و اوره آپلازما اوره آلیتیکوم در افراد بیمار دارای سابقه سقط جنین و افراد بیمار فاقد سابقه سقط، اختلاف معنی داری مشاهده گردید ($P < 0/001$) 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 مایکوپلازماهای تناسلی در بروز عفونت های دستگاه تناسلی زنان و عوارض حاصل از آنها را نشان داد.

کلید واژه ها: مایکوپلازما هومینیس، اوره آپلازما اوره آلیتیکوم، Multiplex PCR، عفونت اوروژنیتال

مقدمه

ادراری - تناسلی می باشند. این باکتری ها که به ارگانیسم های شبه پلوروپنومونی یا PPLO مشهور شده اند به واسطه بعضی

مایکوپلازما ها کوچکترین میکروارگانیسم های دارای زندگی آزاد بوده و غالباً به عنوان فلور نرمال دهان، دستگاه تنفسی و

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 هر نمونه 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 ۱۵-۱۰ روز انکوبه شدند و روزانه از نظر تغییر رنگ و ایجاد کدورت مورد بررسی قرار گرفتند. به محض شروع تغییر رنگ یا مشاهده کدورت در هر کدام از دو محیط مایع، نمونه ای از آن به محیط های جامد Hominis Agar و 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 مرغی و مشاهد و با رنگ دایس به خوبی رنگ گرفتند، به عنوان مایکوپلازما 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 اوره 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. مجدداً 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 ستنز شده و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده رقیق و آماده گردیدند. توالی پرایمر های مورد استفاده و ژن هدف آن ها در جدول ۱ ذکر شده است.

تهیه Master Mix: ابتدا با توجه به تعداد نمونه و حجم مورد نیاز از مواد PCR شامل dNTP، MgCl₂، بافر PCR، پرایمر ها، DNA Template، آنزیم Tag و آب استریل (dH₂O) 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 مایکوپلازما هومینیس و اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم، هر دو با هم در یک ویال) و کنترل منفی (آب مقطر استریل) در یک ویال دیگر

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 مایکوپلازماها به عنوان گونه های بالقوه پاتوژنی هستند که قادرند بیماری های تنفسی و تناسلی جدی در انسان ایجاد نمایند. بعضی نیز همچون مایکوپلازما 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 کلنی ها در آگار، میکروسکوپی بودن آن ها و نیاز به پرسنل آزمایشگاهی با تجربه، کشت و جداسازی مایکوپلازماها 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 می شود. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی مایکوپلازما هومینیس و اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم 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. ضمناً 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 سواب 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 سواب ها در لوله های حاوی محیط انتقال PPLO's broth استریل، تمام نمونه ها به آزمایشگاه میکروبیشناسی 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

ایزوله (۷/۱ درصد) با روش Multiplex PCR و ۵ ایزوله (۳/۲ درصد) با روش کشت و اوره 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 جدا شده از دستگاه ادراری، مایکوپلاسمای هومینیس ۷ ایزوله (۶/۴ درصد) با روش Multiplex PCR و ۳ ایزوله (۲/۷ درصد) با روش کشت و اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم ۱۵ ایزوله (۱۳/۶ درصد) با روش Multiplex PCR و ۲ ایزوله (۱/۸ درصد) از طریق کشت جداسازی گردید.

بررسی فراوانی مایکوپلاسماهای تفکیک گروه های سنی: نتایج این بررسی نشان داد که در نمونه های تناسلی مورد آزمایش، مایکوپلاسمای 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 مایکوپلاسمای هومینیس و اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم به ترتیب در گروه های سنی ۳۴-۳۰ سال (۷۱/۴ درصد) و ۳۹-۳۵ سال (۶۰ درصد) واقع بودند.

نتایج بررسی فراوانی مایکوپلاسمای جدا شده 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 اسکور نشان داد که در هر دو مورد مبتلا به عفونت دستگاه تناسلی و نیز عفونت دستگاه ادراری بین حضور مایکوپلاسمای هومینیس و نیز حضور اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم در افراد بیمار دارای سابقه سقط جنین و افراد فاقد سابقه سقط جنین، اختلاف معنی داری وجود دارد ($P < 0/001$).

مقایسه دو روش کشت و Multiplex PCR: در این بررسی از آزمون مک نمار برای مقایسه دو روش استفاده شد. با توجه به نتایج آماری حاصل از نرم افزار SPSS و روش کای-اسکور با سطح معنی داری ($P < 0/05$) 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.

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 (Fremontas) 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 ایلومینیاتور قرار گرفت و تصویر آن ثبت گردید (شکل ۱).

محاسبات آماری: نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار آماری SPSS 11.5 و به کارگیری روش آماری کای-اسکور با سطح معنی داری ($P < 0/05$) 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 سواب سرویکوواژینال و ۱۱۰ نمونه ادرار جمع آوری شده از بیماران بود. نتایج کلی جداسازی مایکوپلاسمای 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)، مایکوپلاسمای هومینیس ۱۱

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

نام میکروارگانیسم	توالی پرایمر	طول قطعه تکثیر شده	دمای ذوب °C	ژن هدف
مایکوپلاسمای 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
اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم	'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 اوره آز

جدول ۲: برنامه حرارتی تنظیم شده برای Multiplex PCR

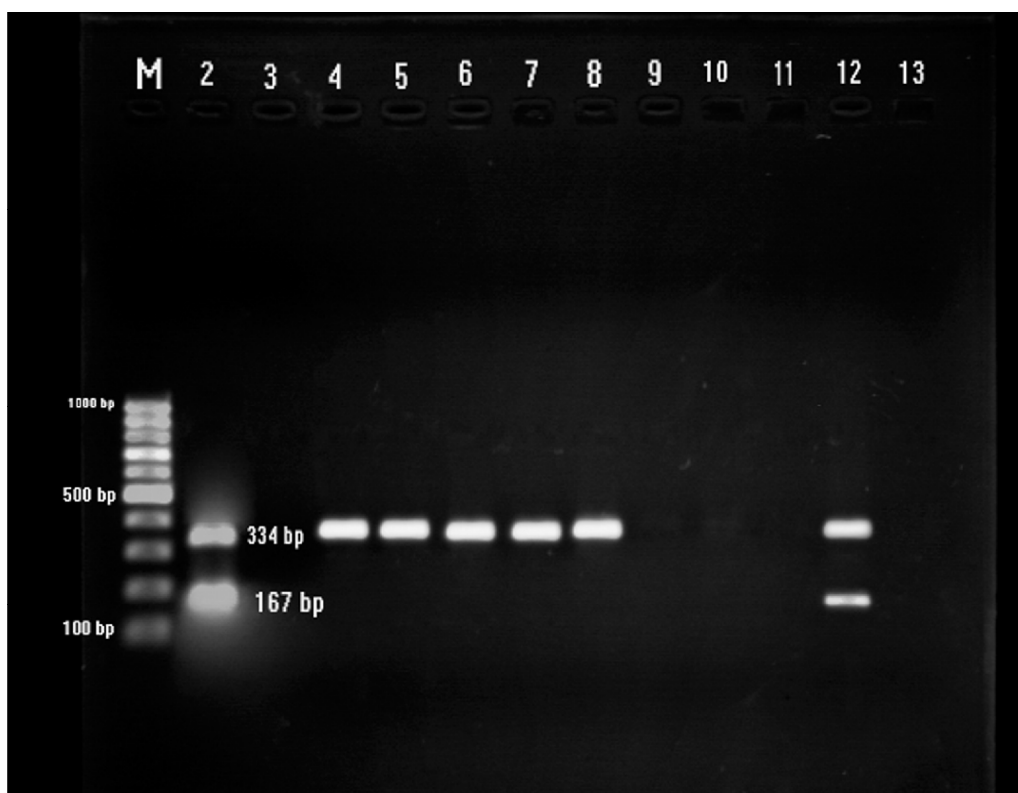
مراحل	دما	زمان	تعداد سیکل
مرحله اول	۹۵ درجه	۴ دقیقه	۱ سیکل
	۹۵ درجه	۵۰ ثانیه	
مرحله دوم	۵۳/۷ درجه	۵۰ ثانیه	۳۵ سیکل
	۷۲ درجه	۶۰ ثانیه	
مرحله سوم	۷۲ درجه	۷ دقیقه	۱ سیکل

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

نوع نمونه	Multiplex PCR				روش کشت
	تعداد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
دستگاه تناسلی	۱۵۵	۲۴	۹	۵	۱/۸۸
دستگاه ادراری	۱۱۰	۲۲	۸/۳	۵	۱/۸۸
جمع	۲۶۵	۴۶	۱۷/۳	۱۰	۳/۷۶

جدول ۴: توزیع فراوانی مایکوپلازما هومینیس و اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم در نمونه های اوروژنیتال، در زنان دارای سابقه سقط جنین.

نوع نمونه	تعداد بیمار	تعداد موارد سقط	درصد	مایکوپلازما هومینیس		اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم	
				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 نمونه های مثبت و منفی. چاهک شماره ۲، DNA سویه های استاندارد به عنوان کنترل مثبت، چاهک های شماره ۴ تا ۸ نمونه مثبت برای مایکوپلازما هومینیس، چاهک شماره ۱۲ نمونه مثبت برای هر دو باکتری و چاهک شماره ۱۳ کنترل منفی واکنش را نشان می دهند. چاهک شماره ۳ خالی و ۹-۱۱ نیز نشان دهنده نمونه های منفی از نظر وجود هر دو باکتری است.

بحث

در سال‌های اخیر با توجه به مشاهدات بالینی، مطالعات متعددی در خصوص توانایی بیماری زایی مایکوپلاسمای دستگاه اوروژنیتال صورت گرفته است و نتایج حاصل حاکی از نقش فرصت طلب آن‌ها در بیماری زایی و ایجاد عفونت‌های دستگاه ژنیتال، به ویژه در هنگام بارداری است (۱۰، ۱۱، ۱۲). استفاده از روش کشت برای جداسازی و شناسایی این ارگانیسم‌ها در نمونه‌های کلینیکی بسیار زمان‌بر و پرهزینه بوده و به دلیل سخت‌رشد بودن و نیازهای غذایی پیچیده، تشخیص این کلنی‌ها نیازمند تجربه و حوصله فراوان است. با توجه به نقش این میکروارگانیسم‌ها در بیماری‌های دستگاه ادراری - تناسلی و به ویژه ارتباط آن‌ها با سرطان و بیماری ایدز، امروزه تلاش بر این است که از راه‌های تشخیصی سریع، مقرون به صرفه و با حساسیت بالا به مطالعه این ارگانیسم‌ها پرداخته شود. یکی از تست‌های دقیق با حساسیت بالا برای شناسایی این باکتری‌ها، Multiplex PCR می‌باشد که می‌توان 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 عفونت‌های ادراری - تناسلی با دوروش مختلف مورد آزمایش قرار گرفتند. به طور کلی نتایج بررسی نمونه‌های واژینال و ادراری (۲۶۵ نمونه) منتهی به شناسایی ۴۶ سویه مایکوپلازما (۱۷/۳ درصد) 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 مایکوپلازما (۱۵/۵ درصد) از طریق Multiplex PCR شناسایی شد که ۷/۱ درصد آن مایکوپلازما هومینیس و ۸/۴ درصد اوره آپلازما اوره آلیتیوم بود. همین‌طور از ۵ سویه مایکوپلازما (۳/۲ درصد)، که از این نمونه‌ها به روش کشت جدا شدند، سهم باکتری‌های فوق به ترتیب ۳/۲ و صفر درصد بود. هم‌چنین در مبتلایان به عفونت ادراری (۱۱۰ نمونه)، به ترتیب ۶/۴ و ۱۳/۶ درصد مایکوپلازما هومینیس و اوره آپلازما اوره آلیتیوم از طریق Multiplex PCR و هومینیس و اوره آپلازما اوره آلیتیوم از طریق کشت جداسازی و شناسایی شدند. با توجه به فراوانی میکروارگانیسم‌های مذکور در دو روش مورد مقایسه و آزمون مک‌نمار، نتایج حاضر نشان دادند که بین دو روش کشت و Multiplex PCR در تشخیص باکتری‌های مذکور، تفاوت معنی‌داری وجود دارد. هم‌چنین 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 می‌دهند که جداسازی این باکتری‌ها در زنان بیش از مردان بوده و از طریق تماس جنسی یا از مادر به نوزاد در هنگام تولد منتقل می‌گردند (۱۴). از دلایل عمده بیماری زایی این باکتری‌ها می‌توان به تغییر شرایط واژن و جایگزینی آن‌ها به جای فلور نرمال واژن از جمله لاکتوباسیلوس‌های تولیدکننده پراکسید هیدروژن، اشاره نمود (۱۵).

در این زمینه مطالعه دیگری نیز در اهواز در سال ۱۳۸۲ صورت گرفته است که نتایج حاصل از آن فراوانی مایکوپلازما هومینیس و اوره آپلازما اوره آلیتیوم را به ترتیب ۳۳/۶ 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، مجموعاً ۴۸/۴ درصد مایکوپلاسمای تناسلی تشخیص دادند. در این بررسی از مقایسه دو روش کشت و PCR حساسیت و دقت PCR در تشخیص مایکوپلاسمای مورد تأیید قرار گرفت (۷).

Stellrecht و همکاران (۲۰۰۴)، با استفاده از روش Multiplex PCR، فراوانی مایکوپلاسمای 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 اوره آپلازما اوره آلیتیوم و ۱۱ درصد مایکوپلازما هومینیس با روش PCR تشخیص داده شدند (۶).

همان‌گونه که مشاهده می‌شود، 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 می‌باشد. میزان فراوانی مایکوپلازما‌های اوروژنیتال در چند مطالعه داخل کشور، ۴۸/۹، ۳۳ و ۲۸ درصد (۷، ۱۶ و ۱۷) و تحقیق حاضر ۱۶/۹ درصد در مقایسه با کشور‌های خارج از ایران که ۶۴، ۷۳ و ۳۷ درصد (۱۸، ۱۹، ۲۰) اعلام گردیده نشان می‌دهد که فراوانی این باکتری‌ها در داخل کمتر می‌باشد. عوامل فرهنگی و اجتماعی رایج در کشور‌های دیگر و تفاوت این عوامل با ایران، آزادی در روابط جنسی و تعداد شرکای جنسی در این کشورها را می‌توان از جمله دلایل افزایش فراوانی مایکوپلازما‌های اوروژنیتال در آن‌ها ذکر نمود (۲۱، ۲۲).

از نتایج دیگر و بارز این مطالعه می‌توان به ارتباط حضور مایکوپلاسمای اوروژنیتال و سقط جنین اشاره نمود. بر اساس نتایج حاصل، در افراد مبتلا به عفونت تناسلی ۱۵ نفر و مبتلا به عفونت ادراری ۱۰ نفر دارای سابقه سقط جنین بودند که در این میان، بین حضور مایکوپلازما هومینیس و اوره آپلازما اوره آلیتیوم در افراد بیمار دارای سابقه سقط، اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید ($P < 0/001$). مطالعات بعضی از محققین دیگر نیز نشان دهنده ارتباط معنی‌داری بین حضور میکروارگانیسم‌های مذکور و سقط جنین می‌باشد (۲۳، ۲۴). اگر چه چنین ارتباطی در مواردی (۲۵، ۲۶) نیز حاصل نگردید.

در تشخیص افتراقی بیماری های عفونی تناسلی ضروری است. از آن جا که کشت این باکتری ها 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

- 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.
- Stefanow ZB, Kłosowska WM, Puchalska OI, Koziół BV, Kotowicz B. Urea plasma urealyticum and Mycoplasma hominis infection in women with urogenital diseases. *Adv Med Sci* 2006; **51**: 250-253.
- Cimolai N. Do mycoplasmas cause human cancer? *Can J Microbiol* 2001; **47**: 691-697.
- Cimolai N. Serodiagnosis of the infectious diseases: *Mycoplasma pneumonia*. Norwell, Kluwer Academic Pub, 1999; PP: 5-10.
- 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.
- 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.
- 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).
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th ed. Missouri USA, Mosby-Elsevier, 2007; PP: 525-532.
- Golshani M, Eslami G, Mohammadzadeh 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.
- 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.
- 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.
- Larsen B, Hwang J. Mycoplasma, Ureaplasma, and Adverse Pregnancy Outcomes: A Fresh Look. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2010; **8**: 1-7.
- Diaz N, Dessi D, Dessole S, Luigi Fiori P, Rappelli P. Rapid detection of confectons by Trichomonas vaginalis, Mycoplasma hominis, and Urea plasma urealyticum by a new multiplex polymerase chain reaction. *Diag Mic Infect Dis* 2010; **67**: 30-36.
- Waites KB. Urea plasma infection. *E Med J* 2001; **2**: 1-17.
- Beverly E, Zariffard MR, Wang QJ, Chen HY, Bremer J, Cohen M, et al. Female genital-tract HIV load correlates Mycoplasma hominis. *J Infect Dis* 2004; **191**: 25-32.
- 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).
- 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).
- 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.
- Sweet RL, Mills J, Hadlery KW. Use of laparoscopy to determine the microbiologic etiology of acute salpingitis. *Am J Obstet Gynecol* 1976; **1**: 68-72.

با این حال نکته مهم در مورد این بیماران تشخیص سریع مایکوپلازما 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 کوریو آمینیوت منجر گردند (۶، ۲۷، ۱۲).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان دهنده اهمیت شیوع مایکوپلازما های تناسلی در بروز عفونت های دستگاه اورژینیتال زنان و عوارض حاصل از آنها است. لذا توجه به این عوامل در تشخیص عفونت های ادراری-تناسلی زنان و در نظر گرفتن آنها

20. Serin MS, Evruke C, Kibar F, Koksall 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, Ibtesam 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.