Elnaz Hamedi[1], Babak Kheirkhah[2*], Kumarss Amini[3]

[1] *Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran*
[2] *Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran*
[3] *Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran*

Comparative Study of Biochemical and PCR Tests in the Detection of Mycoplasma Contaminations of Genital Secretions of Infertile Women and Men

Received:19 Nov. 2016 ; Accepted:31 Oct. 2017

Abstract

Introduction: Mycoplasma are from cell culture the main polluters. Mycoplasma hominis is one of the most important human mycoplasmas are associated with infections of the genitourinary system in women and men. The aim of this study compare methods of detection of mycoplasma contamination in the genital secretions of men and women referring to infertility center is Kerman.

Materials and Methods: This descriptive cross-sectional study was performed on 100 women and 100 infertile men referred to Kerman Infertility Center during 6 months. Samples that were sent to the laboratory in the PPLO Broth filter 0.45 micrometers were passed and in accordance with the instructions, they were cultured in PPLO solid liquid and solid media and stored at 37 ° C, Co2 incubator. After the extraction of DNA by using PCR method and especial primers, the species and genus of *Mycoplasma hominis* were determined and studied.

Findings: Of the 200 samples examined by culture method, 17.5% of mycoplasma colonies were positive and using biochemical tests were mycoplasma hominis 6%. By PCR method, 44% of samples were infected with mycoplasma and 16.5% contaminated they were mycoplasma hominis.

Discussion & Conclusion: The results of this study show that PCR is a sensitive and rapid method for detecting Mycoplasma huminis in infertile women and men.

Keywords**:** *Mycoplasma hominis*, genitourinary tract, Polymerase chain reaction, Infertility

***Corresponding Author:**
Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

Tel: 0913-3454787
E-mail: Babakkheirkhah@yahoo.com

بررسی مقایسه‌ای تست‌های بیوشیمیایی و PCR در تشخیص آلودگی‌های مایکوپلاسمایی ترشحات دستگاه تناسلی زنان و مردان نابارور

الناز حامدی[۱]، بابک خیرخواه[۲*]، کیومرث امینی[۳]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران
[۳] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

تاریخ دریافت مقاله:۹۵/۸/۲۹؛ تاریخ پذیرش:۹۶/۱۰/۱۰

چکیده

مقدمه: مایکوپلاسماها از مهم‌ترین آلوده‌کنندگان اصلی کشت سلولی محسوب می‌شوند. *مایکوپلاسما هومینیس* یکی از مهم‌ترین مایکوپلاسماهای انسانی است که در ارتباط با عفونت‌های مختلف در دستگاه ادراری تناسلی زنان و مردان می‌باشد. هدف از این مطالعه مقایسه روش‌های تشخیص آلودگی‌های مایکوپلاسمایی ترشحات دستگاه تناسلی زنان و مردان نابارور مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری کرمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به‌صورت توصیفی- مقطعی بر روی ۱۰۰ زن و ۱۰۰ مرد نابارور مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری کرمان در طی ۶ ماه انجام گردید. نمونه‌هایی که در محیط PPLO Broth به آزمایشگاه ارسال شدند از فیلترهای ۰/۴۵ میکرومتر عبور و طبق دستورالعمل، در محیط‌های اختصاصی مایع و جامد PPLO کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در مجاورت انکوباتور Co_2 دار نگهداری شدند. پس از استخراج DNA با استفاده از روش PCR و به کمک پرایمرهای اختصاصی جنس مایکوپلاسما و گونه *مایکوپلاسما هومینیس* موردبررسی قرار گرفت.

یافته‌های پژوهش: از مجموع ۲۰۰ نمونه بررسی‌شده با روش کشت ۱۷/۵ درصد کلنی مایکوپلاسما مثبت و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی ۶ درصد *مایکوپلاسما هومینیس* بودند و با روش PCR ۴۴ درصد نمونه‌ها آلوده به جنس مایکوپلاسما و ۱۶/۵ درصد آلوده به گونه *مایکوپلاسما هومینیس* بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که PCR یک روش حساس و سریع برای تشخیص *مایکوپلاسما هومینیس* در نمونه‌های زنان و مردان نابارور است.

کلمات کلیدی: *مایکوپلاسما هومینیس*، دستگاه ادراری تناسلی، واکنش زنجیره‌ای چندگانه، ناباروری

***نویسنده مسئول:**
استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

۰۹۱۳-۳۴۵۴۷۸۷
E-mail: Babakkheirkhah@yahoo.com

مقدمه

مایکوپلاسماها عضو خانواده مایکوپلاسماتاسه و از کوچک‌ترین ارگانیسم‌هایی هستند که فاقد دیواره سلولی بوده و دارای زندگی آزاد می‌باشند. این باکتری به دلیل فقدان دیواره سلولی در برابر شرایط محیطی از قبیل pH ، خشکی، دما و سایر عوامل مهاری، بسیار حساس و سخت رشد بوده و نیازمند مکمل‌های غذایی مخصوص می‌باشد. این باکتری‌ها توانایی رشد در محیط‌های کشت معمولی را ندارند و بنابراین ممکن است باکتری در مراحل نمونه‌گیری و یا در حین انجام مراحل کشت از دست برود. اندازه ژنوم این باکتری‌ها ۶۰۰ تا ۲۲۰۰ کیلو باز است ولی روش PCR سریع و دارای حساسیت بالایی بوده و می‌تواند در طی زمان نسبتاً کوتاهی (در حد چند ساعت) DNA باکتری را حتی اگر باکتری مرده باشد، شناسایی کند. مایکوپلاسماها از مهم‌ترین و شایع‌ترین آلوده‌کنندگان اصلی کشت سلولی محسوب می‌شوند.[۱و۲] *مایکوپلاسما هومینیس* یکی از مهم‌ترین مایکوپلاسماهای انسانی است که بیشتر ساکن غشاهای مخاطی دستگاه تنفسی و دستگاه ادراری تناسلی هستند. این باکتری انتقال جنسی دارد و در ارتباط با عفونت‌های مختلف در دستگاه ادراری تناسلی مردان وزنان می‌باشد و شیوع این باکتری در مردان ۱۰ تا ۲۰ درصد و در زنان ۲۰ تا ۴۰ درصد است. میزان کلونیزاسیون تناسلی در مردان کمی پائین تر از زنان است. همچنین *مایکوپلاسما هومینیس* را می‌توان از ۱تا ۵ درصد از مردان بدون علائم بالینی و ۳۰ تا ۷۰ درصد از زنان بدون علائم بالینی شناسایی نمود. این میزان تا ۲۰ درصد افزایش یافته و بیش از ۹۰ درصد از مردان وزنانی که به کلینیک‌های بیماری‌های مقاربتی مراجعه می‌کنند با این باکتری آلوده هستند.[۳-۵] *مایکوپلاسما هومینیس* باعث پنومونی، سندرم تنفسی مزمن و منتژیت نوزادان می‌گردد. همچنین این باکتری باعث تب پس از زایمان، تب پس از سقط‌جنین، سقط‌جنین خودبه‌خود تکراری شونده، واژینوز باکتریایی، بیماری التهابی لگن، اندومتریت، پیلونفریت و پروستاتیت می‌شود. همچنین می‌تواند بااتصال به سر، دم و بخش میانی اسپرم‌ها (به‌منظور کسب استروئیدهای موردنیاز خود)، موجب بی‌حرکت شدن اسپرم و حتی نفوذ به درون آنها نیز گردد. عفونت بدون علائم بالینی ناشی از مایکوپلاسما می‌تواند موجب سوء عملکرد غدد ضمیمه جنسی گردد. حضور این باکتری در مایع منی و یا مجرای تناسلی زنان می‌تواند در فرآیند لقاح خارج رحمی سبب افت و کاهش میزان حاملگی شود.[۶و۷و۸] مطالعات نشان می‌دهد که با توجه به توانایی‌های بالقوه مایکوپلاسماها در ایجاد بیماری‌های مختلف، هنوز تشخیص این باکتری در مراکز آزمایشگاهی کشور با مشکلات فراوانی همراه است و تنها گزارش‌های معدودی در خصوص میزان شیوع آن وجود دارد.[۹و۱۰] در حال حاضر روش‌های مختلفی برای شناسایی و تشخیص مایکوپلاسماها به کار می‌رود ازجمله تکنیک نشانگر کشت سلولی، روش‌های ایمنولوژیکی، تست‌های بیوشیمیایی، غربالگری آدنوزین فسفوریلاز، رنگ‌آمیزی DNA بارنگ‌های فلوروکروم، الایزا و PCR می‌باشند که ازلحاظ حساسیت، ویژگی، قابلیت اعتماد و سرعت عمل تفاوت‌ها و اختلافاتی باهم دارند.[۱۱و۱۲و۱۳] PCR به‌عنوان یک روش مولکولی تشخیصی کارآمد در مقایسه با کشت در تشخیص این باکتری‌ها مطرح است.برای کشت *مایکوپلاسما هومینیس* به زمانی در حدود ۸ هفته نیاز است اما با روش PCR در مدت کمتر از ۴ ساعت عامل عفونت قابل‌تشخیص می‌باشد. همچنین عدم رشد با تغییر کوچک‌ترین فاکتور مؤثر درکشت این باکتری یکی از دلایل مهم استفاده از روش‌های مولکولی تشخیصی نظیر PCR است. PCR یک روش آسان، دقیق، حساس و سریع و دارای ویژگی بالا بوده و نیز می‌تواند برخلاف روش کشت، حتی DNA باکتری‌های مرده را نیز شناسایی کند.[۱۴و۱۵] شناسایی این باکتری‌ها در مردان نابارور فاقد علائم بالینی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و می‌تواند به‌عنوان بخش مهمی از برنامه کنترل بیماری‌های منتقله از راه تماس جنسی (STD) باشد. هدف از این مطالعه مقایسه روش‌های کشت، تست‌های بیوشیمیایی و PCR در تشخیص آلودگی‌های مایکوپلاسمایی در ترشحات دستگاه تناسلی زنان و مردان نابارور مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری کرمان است.

مواد و روش‌ها

روش‌های متعددی برای شناسایی و تشخیص این ارگانیسم به کار می‌رود. نخستین اقدام برای جداسازی باکتری تهیه یک محیط کشت مناسب و استاندارد اختصاصی برای مایکوپلاسماها است.

آزمایش‌های معمول جهت تشخیص گونه‌های مایکوپلاسما عمدتاً بر پایه روش‌های کلاسیک مانند تست‌های بیوشیمیایی و آزمایش‌های ایمونوفلورسنت استوار بوده است. این روش‌ها گرچه سودمند می‌باشند اما ممکن است با واکنش‌های مثبت کاذب همراه باشد درنتیجه استفاده از روش‌های دقیق‌تر در سال‌های اخیر مطرح‌شده است که یکی از آنها PCR است. چون مایکوپلاسماها ارگانیسم‌های سخت رشدی هستند باید محیط‌های مغذی جهت کشت آنها بکار رود، بهترین محیط کشت محیط PPLO است که به دو شکل براث و آگار استفاده می‌شود.[۱] تست‌های بیوشیمیایی نیز بر پایه تخمیر گلوکز، هیدرولیز اوره، هیدرولیز آرژنین و فعالیت فسفاتاز می‌باشند. به‌طورکلی باکتری‌ها در محیط کشت توانایی مصرف قند به روش تخمیر در غیاب هوا رادارند که مصرف قند همراه با تولید اسید است که باعث تغییر رنگ محیط کشت می‌شود و تغییر رنگ نشانه مثبت بودن تست است.[۱۴]

جمع‌آوری نمونه و جداسازی

در این مطالعه توصیفی- مقطعی، بر اساس مطالعات قبلی و سطح اطمینان ۹۵٪ با استفاده از فرمول $n=z^2P(1-P)/d^2$ و خطای قابل‌قبول ۰/۰۵، ۱۰۰ زن و ۱۰۰ مرد نابارور که به مرکز ناباروری کرمان در ۶ ماهه اول سال ۱۳۹۳ مراجعه کرده و با انجام معاینات و آزمایش‌های تخصصی، ناباروری آنها توسط پزشکان متخصص مرکز ناباروری تائید شده بود،شناسایی گردیدند. نمونه‌های بالینی از سوآپ واژینال ۱۰۰ زن نابارور توسط ماما گرفته شد و بلافاصله در لوله حاوی یک و نیم میلی‌مولار PBS به‌طور کامل حل شدند و تعداد ۱۰۰ نمونه مایع منی با معیارهای غیرطبیعی تست اسپرموگرام بر اساس استانداردهای سازمان بهداشت جهانی، مربوط به مردان نابارور اخذ شدند و در داخل ظرف‌های استریل قرارگرفته و نمونه‌ها به محیط کشت PPLO Broth تلقیح شده و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند و نیز به‌منظور انجام تست PCR تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از انتقال نمونه‌های حاوی محیط PPLO Broth به آزمایشگاه، در ۳۷ درجه سانتیگراد، در حضور ۵ درصد گاز Co_2 و ۵ درصد رطوبت به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس تمامی محیط‌های PPLO Broth حاوی نمونه، فیلتراسیون گشته که این عمل توسط فیلترهای مخصوص سرسرنگی PVDF که دارای روزنه‌هایی با قطر ۰/۴۵ میکرومتراند، انجام گردید. به این صورت که با استفاده از سرنگ‌های استریل، ۲ میلی‌لیتر از محلول براث کشت داده‌شده را برداشته، سرنگ را در دهانه فیلتر قرار داده و با فشار کم و به‌آرامی محلول وارد محیط کشت دوم که PPLO Broth (pH=۷/۶-۸) است گردید. سپس این محیط در ۳۷ درجه سانتیگراد، در حضور ۵ درصد گاز Co_2 و ۵ درصد رطوبت به مدت ۳-۵ روز گرمخانه گذاری شدند و روزانه ازنظر تغییر رنگ و ایجاد کدورت موردبررسی قرار گرفتند. این محیط به دلیل دارا بودن فنل‌رد قرمزرنگ است که در صورت رشد باکتری تغییر رنگ داده و به رنگ زرد متمایل می‌شود، علاوه بر این ایجاد کدورت دال بر رشد باکتری در محیط است. پس از گذشت زمان لازم تغییر رنگ یا ایجاد کدورت مشاهده و ثبت گردید و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، ۰/۲ میلی‌لیتر از هرکدام از محیط‌های مایع روی محیط PPLO Agar مایکوپلاسما در پلیت کشت داده‌شده، به انکوباتور Co_2 دار منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۱ روز انکوبه گردیدند. محیط‌های کشت PPLO Agar هر روز با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی×۴۰ ازنظر رشد و تشکیل کلنی‌های مخصوص تحت بررسی قرار گرفتند. چنانچه تغییر رنگ یا ایجاد کدورت در محیط PPLO Broth ناشی از آلودگی مایکوپلاسمایی باشد باید در محیط آگار نیز کلنی مخصوص تشکیل گردد. ایجاد کلنی شبیه به تخم‌مرغ نیمرو، حضور مایکوپلاسما در نمونه‌ها تلقی می‌شود.

تست بیوشیمیایی نمونه‌ها

برای انجام تست هیدرولیز آرژنین، ۴/۲۵ میلی‌لیتر آرژنین ۳۰ درصد را به ۱۲۸ میلی‌لیتر محیط PPLO Broth با pH ۷/۳ افزوده و این محیط به لوله‌های ۱۰ میلی‌لیتر، تقسیم شدند که مایکوپلاسما در آنها کشت داده شد و تحت شرایط هوازی و Co_2 به مدت ۴۸-۲۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون شدند. در تست تخمیر گلوکز محیط پایه همان PPLO Broth حاوی فنل‌رد با pH ۷/۳ می‌باشد. به ۱۲۸ میلی‌لیتر از محیط فوق ۱/۶ میلی‌لیتر گلوکز ۵

درصد اضافه گردید و در لوله در پیچ‌دار به مقدار ۱۰ سی‌سی به‌طور استریل تقسیم شد.

از کشت مایکوپلاسما ۲ تا ۵ قطره به لوله محتوی گلوکز افزوده و همراه یک لوله کنترل در محیط هوازی و Co_2 به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون شدند. در هیدرولیز اوره محیط پایه همان PPLO Broth حاوی فنل‌رد با pH ۷/۳ می‌باشد. به ۱۲۸ میلی‌لیتر از محیط فوق ۱/۵ گرم اوره اضافه گردید و در لوله در پیچ‌دار به مقدار ۱۰ سی‌سی به‌طور استریل تقسیم شد. از کشت مایکوپلاسما ۲ تا ۵ قطره به لوله محتوای اوره افزوده و همراه یک لوله کنترل در محیط هوازی و Co_2 به مدت ۷۲-۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون شدند. جهت انجام تست فسفاتاز به محیط PPLO Agar ۰/۰۱ درصد دی فسفات فنل فتالئین اضافه گردید و مایکوپلاسما روی آن کشت داده شد و به مدت ۷ روز در انکوباسیون ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد، پس از رشد سطح آگار با سود ۵ نرمال آغشته گردید و بعد از ۳۰ ثانیه رنگ قرمز صورتی در نقاط رشد کلنی‌ها نشان‌دهنده تست مثبت است.

آزمایش‌های مولکولی

درروش PCR تشخیص ژن‌های هدف و تعیین توالی پرایمرها در باکتری از اهمیت خاصی برخوردار است و از ژن 16s rRNA بعنوان DNA الگو، جهت ردیابی جنس مایکوپلاسما و گونه *مایکوپلاسما هومینیس* استفاده می‌شود.[۱۷و۱۸] مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از هر یک از نمونه‌ها را به درون میکرو تیوب منتقل کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۳۰۰ rpm سانترفیوژ گردید. پس از تخلیه مایع رویی رسوب باقیمانده برای استخراج DNA نگهداری شد. به‌منظور استخراج DNA باکتری از کیت تخلیص مربوط به شرکت سیناژن (Cinna Pure-DNA) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. ابتدا به منظور تشخیص جنس و گونه مایکوپلاسماهای آلوده‌کننده از پرایمرهای اختصاصی مطابق جدول ۱ استفاده گردید. DNA نمونه استاندارد باکتری *مایکوپلاسما هومینیس* (PG_{21})، به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر دو بار تقطیر استریل، به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

این مخلوط در دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad, USA) قرار گرفت و برنامه دمایی PCR به منظور تکثیر ژن‌های موردنظر به ترتیب طبق جدول ۲ می‌باشد. برای بررسی محصولات PCR از ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی به‌وسیله اتیدیوم بروماید استفاده گردید. سپس ژل در دستگاه ترانس لومیناتور (Bio-Rad, USA) که از خود نورماوراء بنفش ساطع می‌کند موردبررسی قرار گرفت.

جدول۱: توالی‌های نوکلئوتیدی و آغازگرهای مورداستفاده در تشخیص *مایکوپلاسما هومینیس* به روش PCR

نام پرایمر	ژن هدف	توالی پرایمر (5' to 3')	اندازه باند(bp)
GSO MGSO	16s rRNA	F: 5′-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3 R: 5′-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3′	۱۶۳
$RNAH_1$ $RNAH_2$	16s rRNA	F: 5′-CAATGGCTAATGCCGGATACGC-3′ R:5′-GGTACCGTCAGTCTGCAAT-3′	۳۴۴

جدول۲: برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل PCR جنس و گونه *مایکوپلاسما هومینیس*

مرحله	واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال	گسترش اولیه	گسترش نهایی
دما	۹۴°C	۹۴°C	۵۵°C	۷۰°C	۷۲°C
زمان	۶	۱	۱	۱	۷
چرخه	۱		۳۳		۱

سپس داده‌های آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه (version 19) و با استفاده از آزمون‌های آماری توصیفی مورد تجزیه‌وتحلیل قرارگرفت.

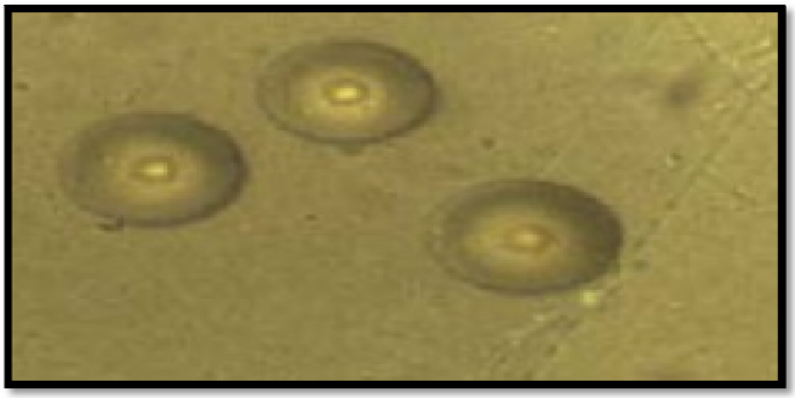
یافته‌ها

جهت جداسازی *مایکوپلاسما هومینیس* از روش‌های کشت (در محیط مایع و روی آگار)، تست بیوشیمیایی و PCR نمونه‌های اصلی استفاده گردید. منظور از کشت مثبت مشاهده کلنی‌های تخم‌مرغی شکل بر روی محیط کشت است که با میکروسکوپ نوری روی محیط کشت قابل‌مشاهده هستند. نمونه‌های موردنظر در محیط PPLO Broth کشت داده شدند و نمونه‌هایی که در آنها تغییر رنگ یا کدورت مشاهده شد به محیط PPLO Agar منتقل گردیدند. از ۲۰۰ نمونه موردبررسی پس از پاساژهای متوالی در ۳۵ نمونه (۱۷/۵ درصد) کلنی‌های تخم‌مرغ نیمرو مختص مایکوپلاسما روی محیط PPLO Agar مثبت بودند (شکل ۱).

از نمونه‌هایی که کشت آنها مثبت شد، تست بیوشیمیایی انجام شد، جدول ۳ نتایج کشت و تست بیوشیمیایی و PCR را نشان می‌دهد.

بر اساس تست‌های بیوشیمیایی ۱۲ مورد (۶ درصد) از نمونه‌ها *مایکوپلاسما هومینیس* مثبت بودند که *مایکوپلاسما هومینیس* نسبت به هیدرولیز اوره منفی شد که هیچکدام توانایی هیدرولیز اوره را نداشتند. *مایکوپلاسما هومینیس* در تست آرژینین مثبت گزارش شد. ازنظر تخمیر گلوکز *مایکوپلاسما هومینیس* منفی شد و تست فسفاتاز نیز منفی بود.

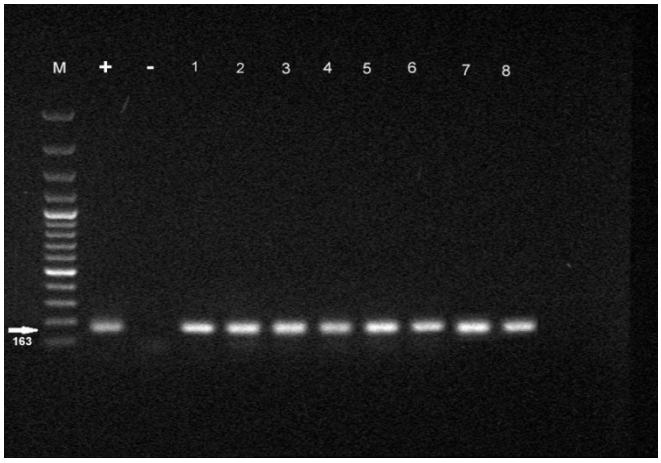
به منظور جداسازی جنس مایکوپلاسما ابتدا نمونه‌های مثبت پس از مشاهده باند ۱۶۳ جفت باز در ژل آگارز تائید شدند و نمونه‌های جنس مثبت برای تعیین گونه *مایکوپلاسما هومینیس*، تحت واکنش PCR قرارگرفته و تشکیل باند ۳۴۴ جفت باز بر روی ژل آگارز نشان‌دهنده گونه‌های مثبت *مایکوپلاسما هومینیس* بود (شکل‌های ۲ و ۳).



شکل ۱: تصویر میکروسکوپی (×۴۰) کلنی‌های مشاهده‌شده بر روی محیط PPLO Agar

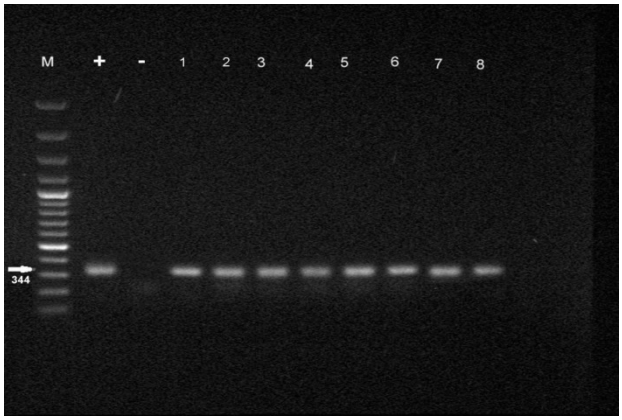
جدول ۳: نتایج کشت و تست بیوشیمیایی و PCR

ردیف	کلنی مایکوپلاسما	تست بیوشیمیایی گونه	نتایج PCR جنس	نتایج PCR گونه
مثبت	۳۵	۱۲	۸۸	۳۳
منفی	۱۶۵	۲۳	۱۱۲	۵۵
جمع	۲۰۰	۳۵	۲۰۰	۸۸



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی جنس مایکوپلاسما: باندهای ۱۶۳ جفت باز در ۸ نمونه‌ی مثبت مشاهده می‌شود.

M: Marker 100bp; +: Positive Control; - : Negative Control, 1-8 suspected samples.



شکل ۳: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی گونه‌ی *مایکوپلاسما هومینیس*: باندهای ۳۴۴ جفت باز در ۸ نمونه‌ی مثبت مشاهده می‌شود.

M: Marker 100bp; +: Positive Control. -: Negative Control. 1-8 positive *Mycoplasma homenis* samples.

از ۱۰۰ نمونه که از مردان نابارور اخذشده ۴۵ مورد جنس مایکوپلاسما تائید گردید که از این تعداد ۱۵ مورد آلوده به گونه *مایکوپلاسما هومینیس* بودند. و از ۱۰۰ نمونه که از زنان نابارور اخذشده ۴۳ مورد جنس مایکوپلاسما تائید گردید که از این تعداد ۱۸ مورد آلوده به گونه *مایکوپلاسما هومینیس* بودند. درمجموع تعداد ۸۸ نفر (۴۴ درصد) آلوده به جنس مایکوپلاسما و ۳۳ نفر (۱۶/۵ درصد) آلوده به باکتری *مایکوپلاسما هومینیس* بودند به‌بیان‌دیگر حدود ۳۳/۵ درصد از مردان و۴۱/۸ درصد از زنان که آلودگی مایکوپلاسمایی آنها تائید شده بود به گونه *مایکوپلاسما هومینیس* آلوده بودند. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش از ۲۰۰ نمونه تنها ۳۵ نمونه (۱۷/۵ درصد) جنس مایکوپلاسما ازنظر کشت مثبت شدند اما با استفاده از روش PCR ۸۸ نمونه (۴۴ درصد) جنس مایکوپلاسما و ۳۳ نمونه (۱۶/۵ درصد) گونه *مایکوپلاسما هومینیس* مثبت شدند و با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی در ۱۲ نمونه (۳۴/۲۸ درصد) گونه *مایکوپلاسما هومینیس* مثبت شدند. این نتایج حساسیت بیشتر و سرعت‌بالای PCR را در مقایسه با روش کشت و

تست‌های بیوشیمیایی برای جداسازی این باکتری تأیید می‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری

پژوهش‌های زیادی نیز در خصوص این باکتری به‌عنوان عامل پاتوژن در ایران و جهان انجام‌شده و تاکنون در افراد نابارور به‌عنوان یک عامل بیماری‌زا جداسازی و تعیین هویت شده است. مطالعه انجام‌شده بر روی نمونه اندوسرویکس بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان کوثر قزوین با استفاده از روش کشت به منظور شناسایی باکتری *مایکوپلاسما هومینیس* موردبررسی قرار گرفت. [۹] مطالعه‌ای که بر روی بیماران دستگاه تناسلی زنان مبتلابه عفونت‌های واژینال در بیمارستان امام خمینی تهران با استفاده از PCR انجام شد نشان می‌دهد که *مایکوپلاسما هومینیس* و *اورهآ پلاسما اورهآ لیتیکوم* بعنوان عامل میکروبی آلوده‌کننده دستگاه تناسلی زنان مطرح بوده‌اند. [۱۴] باکتری *مایکوپلاسما هومینیس* پاتوژن فرصت‌طلب دستگاه ادراری تناسلی می‌باشد و مطالعات مختلف در کشورهای توسعه‌یافته نشان داده که عفونت‌های ناشی از *مایکوپلاسما هومینیس* می‌تواند به ناباروری و نازایی منتهی شوند. [۱۹] در مطالعات مختلف دیگر نیز گزارش‌شده که حساسیت روش PCR در مقایسه با روش معمول کشت، برای جداسازی مایکوپلاسماهای تناسلی بالاتر می‌باشد. بنابراین می‌توان گفت نتایج حاصل از تحقیق حاضر با نتایج حاصل از تحقیقات ذکرشده در رابطه با حساسیت روش PCR و کشت، همخوانی دارد. درنتیجه با توجه به اینکه عفونت‌های ناشی از *مایکوپلاسما هومینیس* در دستگاه ادراری تناسلی زنان و مردان منجر به ناباروری و بیماری‌هایی از این قبیل می‌شود، لذا شناسایی و تشخیص این باکتری در افراد نابارور ضروری به نظر می‌رسد. استفاده از روش‌های کشت و تست‌های بیوشیمیایی به دلیل محدودیت‌هایی از قبیل حساسیت پایین، نیاز به مهارت و تجربه زیاد و هزینه‌بر بودن فاقد معیارهای یک روش مناسب برای تشخیص *مایکوپلاسما هومینیس* است درنتیجه روش‌های مولکولی نظیر PCR، یک روش حساس‌تر و سریع‌تر و با ویژگی بالا در تشخیص بیماری‌های عفونی می‌باشد. [۲۰] در مطالعه نجار پیرایه و همکارانش که جهت مقایسه دو روش آزمایشگاهی PCR و کشت روی نمونه‌های مایع منی مردان نابارور صورت گرفت، حساسیت روش PCR نسبت به روش کشت خیلی بیشتر سنجیده شد. [۲۱]

تست‌های بیوشیمیایی نیز به‌طور قطعی قادر به تشخیص گونه *مایکوپلاسما هومینیس* نیستند زیرا تست‌هایی که استفاده شد شامل تست هیدرولیز اوره، تخمیر گلوکز، هیدرولیز آرژنین و فعالیت فسفاتاز در بعضی از گونه‌های مایکوپلاسما نتایج مشابه دارند. بنابراین با توجه به اینکه در این پژوهش از ۴ تست بیوشیمیایی ذکرشده استفاده گردید بر اساس تست‌های بیوشیمیایی افتراق دادن بقیه گونه‌ها امکان‌پذیر نیست. پژوهش‌های زیادی در این خصوص انجام شد که در همه آنها حساسیت PCR نسبت به روش کشت بیشتر بوده است. [۲۱و۲۲]

روش PCR دارای حساسیت و ویژگی بالاتری است و می‌تواند آلودگی مایکوپلاسمایی را به میزان بیشتری نسبت به روش کشت ردیابی کند و از طرف دیگر نسبت به کشت، بسیار سریع‌تر و ارزان‌تر است، بنابراین می‌توان گفت که آزمایش PCR نمونه‌های اصلی بدون غنی‌سازی را می‌توان بعنوان روشی جایگزین برای کشت با توانایی بسیار بالا در ارائه آمار واقعی آلودگی کشت‌های سلولی به مایکوپلاسما توصیه کرد. [۲۳] مطالعه وثوقی و همکاران که با هدف جداسازی *مایکوپلاسما هومینیس* از ترشحات دستگاه تناسلی مردان وزنان نابارور در مرکز ناباروری کرمان صورت گرفت نشان داد که روش PCR از حساسیت و ویژگی بالایی نسبت به روش کشت برخوردار است و به دلیل دقت و سرعت‌بالا می‌تواند بعنوان یک تست تشخیصی مناسب در مرکز ناباروری کرمان در خصوص آزمایش مردان نابارور بکار برده شود. [۲۴] وطنی و همکاران به بررسی آلودگی با مایکوپلاسماهای تناسلی در زنان مبتلا به واژینوز باکتریایی پرداختند و نتایج حاصل از کشت باکتری‌های *اورهآ پلاسما اورهآ لیتیکوم*، *مایکوپلاسما هومینیس*، *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* را با روش PCR مورد مقایسه قراردادند. این گروه با استفاده از روش کشت توانستند ۷۱ نمونه (۴۰/۸ درصد) مایکوپلاسماهای تناسلی را تشخیص دهند. درحالی‌که PCR از نمونه‌های کشت منفی، نشان داد که ۱۴ نمونه دیگر نیز از نظر حضور باکتری در نمونه، مثبت می‌باشند که این نکته نشان‌دهنده برتری روش‌های تشخیصی مولکولی، همانند PCR در تشخیص و شناسایی این باکتری‌ها است. [۲۵] در تحقیقی که توسط Stellrech و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در افراد نابارور در آمریکا انجام شد، با روش PCR از ۲۱ نمونه اخذشده از مردان وزنان نابارور ۱۷ مورد از

آنها با آزمایش PCR ازلحاظ آلودگی به مایکوپلاسما مثبت بودند.[۲۶] دومینگوس و همکاران نیز با بررسی مایکوپلاسماهای تناسلی شیوع آن را با استفاده از روش کشت بیش از ۵۰ درصد ذکر کردند.[۲۷] گدورا و همکارانش نیز به بررسی وجود *کلامیدیا تراکوماتیس* و مایکوپلاسماها و اوره‌آپلاسماهای تناسلی در مایع منی و قطرات اولیه دفع شده ادرار مردان نابارور با روش PCR پرداختند که میزان *مایکوپلاسما هومینیس* ۹/۶ درصد و *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* ۱۵/۴ درصد اعلام گردید.[۲۸]

در این پژوهش تشخیص نمونه‌ها بر اساس خصوصیات کشت، تست‌های بیوشیمیایی و PCR انجام شد. با توجه به اینکه روش کشت به‌عنوان استاندارد طلایی مطرح است اما با مشکلاتی همراه است؛ استفاده از روش‌های کشت به‌تنهایی نیاز به مهارت و تجربه کافی دارد و یک فرایند به نسبت طولانی (در حد چند روز) است، همچنین برای تشخیص گونه مایکوپلاسما نیاز به رنگ‌آمیزی‌های متعارف (داینس و...) و تست‌های آزمایشگاهی (بیوشیمیایی و ...) است که از دقت و حساسیت بالایی برخوردار نیستند و احتمال خطا در این‌گونه تست‌ها بیشتر است.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان می‌باشد. بدین‌وسیله از حوزه پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان و کارکنان آزمایشگاه گروه میکروبیولوژی پاسارگاد تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1. Moosavian SM, Motamedi H, Maleki S, Shahbazian N. Comparison between prevalence of mycoplasma hominis and ureaplasma urealyticum in women with urogenital infections by multiplex PCR and culture methods. Med J Tabriz Med Sci Univ. 2011;33:91-7. [In Persian]
2. Soltanian B, Irani Sh, Hashemi S, Mozhgani SHR, Ajorloo M, Cheraghi Y, Gholami A. Mycoplasma contamination in cell culture treated with ciprofloxacin and enrofloxacin. Tehran University Medical Journal. 2015;72:794-798. [In Persian]
3. Sleha R, Bostikova V, Salavec M, Bostik P, Slehova E, Kukla R, Mosio P, Vydrzalova M, Mazurova J. Mycoplasma Infection In Humans. Mil. Med. Sci. Lett. 2013; 4;142-148.
4. Najar Peerayeh Sh, Samimi R. Detection of Mycoplasma Hominis in Endocervix Specimens from Infertile Women by PCR. Daneshvar. 2006;14:63-8. [In Persian]
5. Jamalizadeh Bahaabadi S, Mohseni Moghadam N, Kheirkhah B, Farsinejad A, Habibzadeh V. Isolation and Molecular Identification of Mycoplasma Hominis in Infertile Female and Male Reproductive System. J Microbial world. 2014;6:233-240. [In Persian]
6. Brown R, Chalker V, Spiller O. Mycoplasma hominis Variable Adherence-Associated Antigen: amajor adhesion and highly variable surface membrane protein. Advances in Microbiology. 2014;4:736-746.
7. Akya A, Aletaha M, Ghaidiri K, Rezaee M. The freguency of Mycoplasma hominis, Mycoplasma genitalium and Ureaplasma urealyticum in women with cervicitis. Journal NI. 2014; 2:31-37.
8. Redelinghuys M, Ehlers M, Dreyer A, Lombaard H, Kock M. Antimicrobial susceptibility patterns of Ureaplasma species and Mycoplasma hominis pregnant women. BMC Infectious Diseases. 2014;171:2-6.
9. Saadat S, Naserpourfarivar T, Aslanimehr M, Peymani A, Dabaghighale T, Jahanihashemi H, Bahrami H, Abasi F, Johari P. Prevalence of Mycoplasma hominis in the endocervical samples referred to kosar hospital in 2012. Journal of Infectious Diseases. 2014;19:55-61. [In Persian]
10. Rostamizadeh V, Pourbakhsh SA, Asli E, Hadadi A. Detection of Mycoplasma salivarium contamination in cell culture using PCR method. Modares Journal of Medical Science: Pathology. 2013;16:109-118. [In Persian]
11. Shahhosseiny MH, Hosseiny Z, Tabarraii B, Akhlaghi F, Shokrgozar M, Moslemi A. PCR detection of Mycoplasma spp. contamination in cell culture. Iran J Med Microbiol. 2008;2:15-25. [In Persian]
12. Mollakazemiha V, Mahdian R, Memarinejadian A, Shokrgozar MA, Mohajerani HR, Amanjadeh A, Azari Sh. Compare different methods (microbial, enzymatic and molecular) detection of mycoplasma contamination in human and animal cell lines stored in a cell bank of Iran Pasteur Institute. N Cell Mol Biotech J. 2012;3:37-59. [In Persian]
13. Arabestani MR, Rahimi F. Identification of mycoplasma infection in cell lines by PCR-Elisa method. Journal of Infectious Diseases. 2014;19:7-11. [In Persian]

14. ElmerW, koneman N, Koneman'S. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology book, clinical signification of the human Mycoplasmas. Washington city 6th ed,1535, Chapter 18 Mycoplasma.1997; 1023-1026.

15. Hasani A, Shahrokhi N, Khezerdoust S, Sarshar M, Takrousta N, Nourozi J. Identify bacteria Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in patients with genital tract infections by PCR method. Journal of Infectious Diseases. 2012;17:45-50. [In Persian]

16. Moazami A, shirazi MH, pourmand M, Akbari N, Afshar D, Hajikhani S. Simultaneous specific detection Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenza and Mycoplasma pneumoniae in sputum samples patients with suspected influenza by Multiplex PCR reaction. Journal of Infectious Diseases. 2013;18:25 -29. [In Persian]

17. Calcutt M, Foecking M. Complete genome sequence of Mycoplasma hominis strain sprott (ATCC 33131), isolated from a patient with Nongoncoccal urethritis. Genome Announcements. 2015; 3:1-2.

18. Ghiyasi MS, Shahhoseiny MH, Moharejani HR. Development of a PCR method for detection of mycoplasma contamination in cell lines and biological products. N Cell Mol Biotech J. 2014;14:41-46. [In Persian]

19. Ahmadi MH, Amir Mozaffari N, Kazemi B, Sedighi Gilani MA, Masjedian Jazi F. Use of PCR to Detect Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum from Semen Samples of Infertile Men who Referred to Royan Institute in 2009. Yakhteh Med J. 2010;12:371-80. [In Persian]

20. Roy A, Kumar P, Bhanderi BB. Detection of Mycoplasma capri antibodies in goats of Gujarat state. Vet World. 2010; 3: 471-472.

21. Najar Pirayeh Sh, Al Yasin A. Comparison of PCR with culture for detection of Mycoplasma hominis in infertile women. Kowsar Med J. 2005;10:183-90. [In Persian]

22. Eftekhari Moghaddam H, Kheirkhah B, Amirheidari B, A Comparison between the Molecular Identity of Mycoplasma Hominis in Urine Samples of Patients with Urinary Tract Infections and Similar Strains Available in GenBank. J Babol Univ Med. 2015; 17:67-73. [In Persian]

23. Fazli A, Pourbakhsh SA, Asli E, Hadadi A. Identification of mycoplasma contamination in cell cultures by PCR method . Iran J Med Microbiol. 2013;7:7-14. [In Persian]

24. Vosooghi S, Kheirkhah B, Mirshekari T, Kariminik A, Hamidavi Mohammadpour S, Mohseni Moghadam N. Molecular detection of Mycoplasma hominis from genital secretions of infertile men referred to the Kerman infertility center. J Microbial world. 2013;6:14-22. [In Persian]

25. Vatani Sh, Ghazisaeidi K, Mohamadi M, Naji A, Fateminasab F, Zeraati H , Mohrez M. Evaluation of genital mycoplasma infection in in women with vaginal infection with negative cultures by PCR. J Gorgan Uni Me ci. 2006;8:45-50. [In Persian]

26. Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Vanezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital Mycoplasma. J Clin Microbiol. 2004;42:1528-33.

27. Domingus D, Tavira LT, Duarte A, Sanca A, Prieto E, Exposto F. Genital Mycoplasma in women attending a family planning clinic in Guine-Bissau and their susceptibility to antimicrobial agents. Acta Trop. 2003; 86:19-24.

28. Gdoura R, Kchaou W, Ammar Keskes L, Chakronn N, Sellemi A, Znazen A, Rebai T, Hammami A. Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. J Andrology. 2008;29:198-206.