

شناسایی مولکولی همزمان نایسریا گونوره آ و توکسوپلازما گوندی از سواب‌های واژینال زنان نابارور با روش زنجیره ای پلی مرز چندگانه

الناز فاروقی^۱ کیومرث امینی^{۲*}

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
^۲ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۹۹/۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: نایسریا گونوره آ و توکسوپلازما گوندی از عوامل واژینوز به صورت نادر و کم می باشند که از طریق تماس جنسی ممکن است انتقال یابند. هدف از انجام این مطالعه شناسایی مولکولی نایسریا گونوره آ و توکسوپلازما گوندی با استفاده از روش مولتی پلکس پی سی آر می باشد.

مواد و روش: در این مطالعه توصیفی- مقطعی بر روی ۶۰ بیمار زن نابارور مبتلا به عفونت علامتدار واژن مراجعه کننده به بیمارستان پیامبراعظم کرمان انجام شد. پس از تکمیل پرسشنامه جمعیت شناختی، ۶۰ نمونه سواب از بیماران مبتلا به عفونت واژینال با استفاده از سواب استریل جمع آوری شد. استخراج DNA با استفاده از دستورالعمل شرکت سازنده کیت سیناکلون انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمرز بصورت مولتی پلکس (M-PCR) بر اساس پرایمرهای اختصاصی برای نایسریا گونوره آ و توکسوپلازما انجام شد.

یافته ها: نتایج PCR، فراوانی عفونت با نایسریا گونوره و توکسوپلازما گوندی را به ترتیب ۶/۶٪ و ۱۰٪ نشان داد. عفونت همزمان با نایسریا گونوره آ و توکسوپلازما گوندی در هیچ یک از نمونه های مورد بررسی تشخیص داده نشد.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که روش مولتی پلکس PCR برای تشخیص نایسریا گونوره آ و توکسوپلازما در عفونت واژن مناسب بود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که شیوع عفونت واژن با عوامل اتیولوژیک نایسریا گونوره آ و توکسوپلازما گوندی در تهران پایین بود.

کلمات کلیدی: نمونه واژینال، توکسوپلازما گوندی، نایسریا گونوره آ، Multiplex-PCR.

نویسنده مسئول:

دکتر کیومرث امینی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴

E-mail_kumarss_amine@yahoo.com

مقدمه

ناباروری یکی از مشکلات مهم در زندگی حدود ۲۵٪ از زوج ها می باشد. عفونت های سیستم تناسلی یکی از عوامل ناباروری می باشد و طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها، با درجات مختلف، در ایجاد ناباروری نقش دارند.^۱ گونوره یا سوزاک، به عنوان یکی از شایعترین و قدیمی ترین بیماری های منتقل شونده از طریق جنسی (STDs) شناخته شده است.^۲ عفونت گونوکوکی در زنان تقریباً بدون علامت می باشد که در موارد علامت دار معمولاً ترشحات واژینال، تکرر ادرار و در صورت گسترش ارگانیسم به لوله های فالوپ و شکم، دردهای شکمی ایجاد می شود. عوارض بیماری در صورت عدم درمان بموقع شامل زایمان زودرس، پارگی کیسه آمنیوتیک و انتقال به جنین در حین زایمان و سوزاک چشمی نوزاد، از عوارض حین بارداری این دیپلوکوک است.^{۳-۵} توکسوپلازما گوندی یک پارازیت داخل سلولی اجباری از شاخه آپی کمپلکس است که انتشار جهانی دارد. ابتلا به این عفونت در زمان بارداری می تواند منجر به سقط، مرگ جنین و ناهنجاری مادرزادی شود. همچنین عفونت مادر با افزایش چهار برابر در زایمان قبل از موعد همراه است. احتمال از بین رفتن جنین و همچنین میزان بروز و شدت عفونت مادرزادی به سن جنین در زمان ابتلای زن حامله بستگی دارد.^۶ این انگل از طریق خوردن آب و سبزی های آلوده به اوویست و یا از طریق خوردن گوشت های خام یا نیم پخته آلوده به انگل، به انسان منتقل می شود. جنین زنان بارداری که عفونت را برای اولین بار کسب می کنند، ممکن است سقط شود یا با عوارض مغزی شدید و عقب افتادگی به دنیا بیاید.^۷ در این میان توکسوپلازما گوندی یکی از تک یاختگانی است که قادر به آلوده نمودن سیستم تناسلی جنس مذکر و مؤنث است و بیشترین تحقیقات در مورد توکسوپلازمازادگی و انتقال داخل رحمی آن انجام شده است.^۸ یکی از روش های شناسایی گونوکوک و توکسوپلازما، انجام PCR روی نمونه سواب های واژینال می باشد که بر طبق مطالعات متفاوت حساسیت و ویژگی آن نزدیک به ۱۰۰٪ گزارش شده است. در حال حاضر با انجام

غربالگری، شیوع عفونت ها در کشورهای توسعه یافته رو به کاهش است؛ اما شیوع گونوکوک در نواحی مدیترانه ای و با وضعیت اقتصادی و تحصیلی پایین، بالاتر گزارش شده است.^۹ اصلاح و پیشرفت راه های تشخیص، درمان و پیشگیری بیماری های منتقله از راه مقاربتی ضروری می باشد، هنوز این بیماریها از مشکلات بهداشت عمومی در دنیا به شمار می آیند.^{۱۰} لذا با توجه به ایجاد عوارض پرهزینه ناشی از این بیماری در زنان و عدم وجود آمار مشخص فراوانی ابتلا در خانمهای بارور و نابارور ایرانی، این مطالعه با هدف بررسی مولکولی میزان شیوع عفونت نایسریا گونوره آ و توکسوپلازما گوندی در نمونه های سواب واژینال زنان نابارور طراحی گردید.

مواد و روش

نمونه برداری

در این مطالعه توصیفی - مقطعی که در طی یک بازه زمانی ۱۲ ماهه، سال ۱۳۹۴ انجام شد. تعداد ۶۰ نمونه سواب واژینال از زنان نابارور با عفونت علامت دار واژن (واژینوز) مراجعه کننده به درمانگاه بیمارستان پیامبراعظم کرمان در لوله های استریل حاوی سرم فیزیولوژی استریل توسط پزشک متخصص زنان و زایمان جمع آوری شد.

واکنش زنجیره ای پلیمرز

DNA سلولی با استفاده از کیت DNA سینازن (Cell culture, Tissues, Gram negative Bacteria and CSF) استخراج گردید. تست M-PCR برای شناسایی ژنهای اختصاصی توکسوپلازما گوندی و نایسریا گونوره آ با استفاده از پرایمر های اختصاصی انجام شد (جدول-۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش PCR شامل ۲۰۰ میکرومول dNTP، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر، ۱/۵ میلی مول در لیتر MgCl₂، ۰/۵ واحد آنزیم Taq و ۵۰ نانوگرم DNA الگو می باشد. واکنش مالتی پلکس PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد. یک سیکل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس (دنا تورا سیون اولیه) سپس ۳۵ سیکل شامل مرحله واسرشت شدن ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، مرحله

بروز گونوره در مراجعین به کلینیک در اروپای غربی ۵-۱٪ و در استرالیا ۲۰-۱۵٪ گزارش شد و زنان آفریقایی از بقیه ملل، بیش تر دچار این عفونت بودند.^{۱۱} مردانه و همکارانشان (۲۰۱۳) به تشخیص نایسریا گونوره آ در زنان باردار به کمک روش کشت و انجام PCR بر روی ژن *cppB* پرداختند. در این مطالعه مقطعی، دو نمونه سواب اندوسرویکس از ۱۱۰۰ زن باردار مراجعه کننده به بیمارستان‌های شیراز گرفته شد. کشت بر روی محیط‌های انتخابی و غیرانتخابی نایسریا گونوره آ و آزمایش تکثیر اسید نوکلئیک (NAAT) به منظور جستجوی ژن *cppB* نایسریا گونوره آ صورت پذیرفت. نتیجه کشت کلیه نمونه‌های سواب اندوسرویکس بر روی محیط‌های کشت انتخابی و غیرانتخابی از نظر نایسریا گونوره آ منفی بود. نتیجه آزمایش PCR بر روی نمونه‌های سواب جهت ژن *cppB* نایسریا گونوره آ در ۱۳ مورد (۱/۱۸ درصد) مثبت بود.^{۱۲} Mahoney و همکارانش در سال ۱۹۹۵ روش multiplex PCR را برای نایسریا گونوره آ و کلامیدیا تراکوماتیس راه اندازی نمودند و در سال ۱۹۹۷ این روش را به گونه ای تغییر دادند که بتواند برای شناسایی همزمان چهار باکتری بکار رود.^{۱۳} در مطالعه سال ۱۹۹۵ آقای Mahoney و همکارانش حساسیت و ویژگی multiplex PCR نسبت به PCR نایسریا گونوره آ ۹۲/۳٪ و ۱۰۰٪ و نسبت به PCR کلامیدیا تراکوماتیس ۱۰۰٪ مشخص گردید در صورتیکه در مطالعه سال ۱۹۹۷ این محقق و همکارانش حساسیت و ویژگی multiplex PCR نسبت به PCR نایسریا گونوره آ ۱۰۰٪ و ۱۰۰٪ نسبت به PCR کلامیدیا تراکوماتیس ۹۷/۸٪ و ۱۰۰٪ به دست آوردند.^{۱۴} مطالعات اپیدمیولوژی مختلفی در ارتباط با این دو باکتری کلامیدیا تراکوماتیس و نایسریا گونوره آ انجام شده است. به طور مثال آقای Hayakawa و همکارانش در سال ۲۰۰۲ توانستند ۴۹/۸٪ آلودگی به نایسریا گونوره آ، ۱۱/۳٪ آلودگی به کلامیدیا تراکوماتیس و ۱۱/۱٪ آلودگی همزمان به این دو باکتری را در افراد مبتلا به اورتریت با روش PCR در کشور ژاپن شناسایی نمایند.^{۱۵} در همان سال آقای Zachariah و همکارانش در کشور ملاوی با روش PCR آلودگی به نایسریا گونوره آ را ۸۰٪ و آلودگی به کلامیدیا تراکوماتیس را ۲٪ در افراد مبتلا به اورتریت به دست آوردند.^{۱۶} در صورتیکه Pepin و همکارانش در ۷ کشور آفریقایی غربی و با روش PCR آلودگی به نایسریا گونوره آ را ۱۶/۹٪ و آلودگی به کلامیدیا

اتصال ۴۰ ثانیه در ۵۷ درجه سلسیوس و مرحله طویل شدن ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و نهایتاً یک سیکل ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس. محصولات PCR از نظر حضور ژن های مورد نظر با انجام الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شدند.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که اجرای فرآیند واکنش زنجیره ای پی سی آر برای شناسایی DNA توکسوپلازما گوندی و نایسریا گونوره آ در نمونه های مطالعه ما مناسب می باشد. میانگین سنی افراد تحت مطالعه $2/3 \pm 56$ بود. از ۶۰ نمونه تحت بررسی ۶ نمونه (۱۰٪) از نظر وجود DNA توکسوپلازما گوندی و ۴ نمونه (۶/۶٪) از نظر وجود نایسریا گونوره آ مثبت بودند. در هیچ یک از نمونه های تحت بررسی وجود هر دو ژن یافت نشد. موارد مثبت PCR در ژل آگاروز برای توکسوپلازما گوندی باند در ناحیه bp ۵۸۷ و برای نایسریا گونوره آ ۱۶۲ bp مشاهده شد (شکل -۱).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد، فراوانی عفونت با توکسوپلازما گوندی و نایسریا گونوره آ به ترتیب ۱۰٪ و ۶/۶٪ بود. ضمن این که آلودگی هم زمان به توکسوپلازما گوندی و نایسریا گونوره آ مشاهده نشد. براساس مطالعات انجام شده قبلی در ایران میزان فراوانی این دو میکروارگانیسم قرار نگرفته است. فتح الله زاده و همکارانشان (۲۰۰۴) فراوانی نایسریا گونوره آ در بیماران مبتلا به اورتریت را ۴۶٪ گزارش نمودند. میزان عفونت گنوکوک در زنان شیرازی مبتلا به سرویسیت ۱/۹۴٪ و در کرمان در زنان علامت دار و بدون علامت ۴٪ گزارش شد.^{۱۲} در مطالعه دیگری در بابل میزان عفونت با نایسریا گونوره آ در زنان غیر باردار ۲٪ گزارش شد.^{۱۳} در مطالعه ای که به وسیله رشیدی و همکاران با عنوان بررسی فراوانی نایسریا گونوره آ در زنان نابارور و بارور تهرانی انجام شد، در هر دو گروه، موردی از عفونت مشاهده نشد.^{۱۴} گونوره دومین بیماری شایع مقاربتی در آمریکاست.^{۱۵} در زنان باردار استرالیایی، شیوع گونوره ۶/۱٪ گزارش شد^{۱۶} که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. به طور کلی

تحریک تشکیل جفت، اختلال فولیکول در تخمدان، آتروفی رحم و نهایتاً شکست باروری به علت اختلال در عملکرد هیپوتالاموس به عنوان نتیجه ابتلا به عفونت توکسوپلازما موزم من است.^{۲۸}

Dvorakova-Hortova و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده اند یک ارتباط مستقیم بین عفونت با توکسوپلازما گوندی و کاهش تناسب اندام تناسلی موش نر مشاهده می شود.^{۲۹} تفاوت در نتایج بعلت تفاوتهای فرهنگی در مناطق مختلف باعث گزارش های متفاوت در زمینه شیوع انگل ها و باکتریها می باشد. مطالعه حاضر بر روی افراد مبتلا به واژینوز علامت دار زنان نابارور انجام شده است و این موضوع هم می تواند، دلیلی بر تفاوت در میزان شیوع عفونت میکروبی های نایسریا گونوره آ و توکسو پلازما گوندی با سایر مناطق کشور ایران باشد. در مجموع این مطالعه نشان داد، فراوانی عفونت با دو عامل میکروبی نایسریا گونوره آ و توکسوپلازما گوندی در بیماران مبتلا به عفونت واژن در تهران کم می باشد. به نظر می رسد این موضوع به دلایلی مانند؛ حجم نمونه، متأهل بودن افراد شرکت کننده در مطالعه، کوچک بودن محدوده سرزمینی اجرای مطالعه و بسته بودن روابط به دلیل نظارت و کنترل بر جوانان، آگاهی نسل جوان با بهداشت و راههای پیشگیری از بیماریهای منتقله از راه جنسی و از طرفی فرهنگ و آداب رسوم سنتی این منطقه ارتباط داشته باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله تمامی نویسندگان این مقاله از پرسنل محترم گروه میکروبی شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، بخش زنان بیمارستان پیامبر اعظم کرمان و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد که ما را در اجرای این پروژه یاری رساندند صمیمانه تقدیر و تشکر می نمایم.

تضاد و تعارض (Conflict of interest)

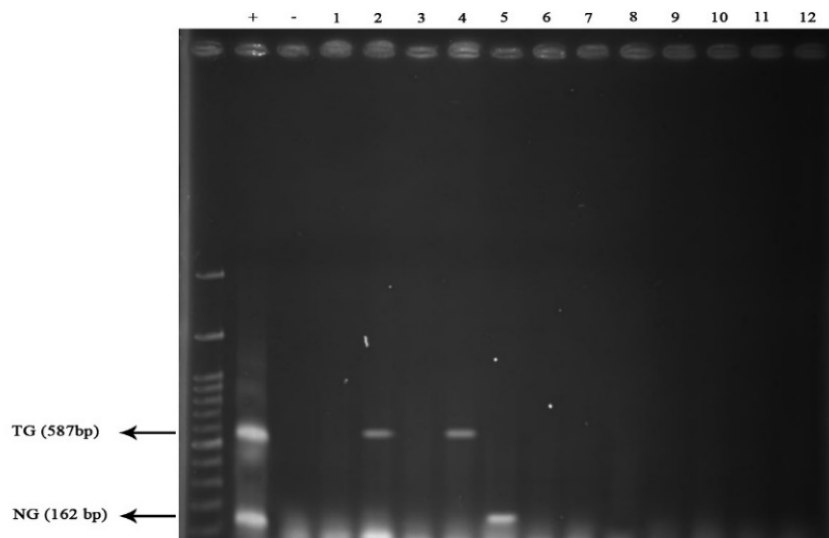
در بین نویسندگان مقاله هیچ گونه تضاد و تعارضی وجود ندارد.

تراکوماتیس را ۱۳/۸٪ در سال ۲۰۰۱ مشخص نمودند.^{۳۲} آقای آلودگی به نایسریا گونوره آ در افراد مبتلا به اورتریت در آفریقا را ۶۹٪ و آلودگی به کلامیدیا تراکوماتیس را ۱۷٪ به دست آوردند.^{۱۹}

در مطالعه ای که توسط الزهرانی و همکاران در عربستان سعودی روی غربالگری زنان باردار از نظر عفونت های ناشی از کلامیدیا تراکوماتیس و نایسریا گونوره آ انجام شده، نایسریا از زنان باردار جدا نشده است.^{۳۳} چرخه زندگی انگل توکسوپلازما شامل دو مرحله تکثیر جنسی در میزبان نهایی (گره) و تکثیر غیرجنسی در میزبان واسط (انسان و مهره داران خونگرم) است. خوردن کیست نسجی از طریق گوشت آلوده نیم پز راه دیگر ابتلا به عفونت است. از راههای دیگر انتقال عفونت در انسان، انتقال از مادر به جنین، انتقال سلول های آلوده خونی یا پیوند اعضای آلوده است. توکسوپلازما گوندی یکی از تک یاختگانی است که قادر به آلوده نمودن سیستم تناسلی جنس مذکر و مؤنث است و بیشترین تحقیقات در مورد توکسوپلازما موزیس مادرزادی و انتقال داخل رحمی آن انجام شده است.^{۳۴} فراوانی انگل توکسوپلازما در نمونه های سواب واژن ۶ مورد (۱۰٪) بوده است. Bessières و همکارانشان (۲۰۰۹) مطالعه ای با هدف تعیین شیوع توکسوپلازما موزیس مادرزادی (CT) و در دوران بارداری انجام دادند. نمونه ها از سال ۲۰۰۵-۱۹۹۴ در دانشگاه تولوز فرانسه از مایع آمنیوتیک زنان باردار در دوران بارداری از ۳۵۲ نفر جمع آوری شد. در این میان ۶۶ نفر (۲۴٪) در روش PCR برای توکسوپلازما موزیس مثبت گزارش شدند.^{۳۵} Zhou و همکارانشان (۲۰۰۲) به بررسی آلودگی به توکسوپلازما گوندی در زوج های نابارور در حومه سوژو پرداختند.^{۳۶} Qi و همکارانشان (۲۰۰۵) در مطالعه دیگری در چین میزان شیوع توکسوپلازما موزیس در ناحیه تناسلی مردان را ۱۱٪ گزارش نمودند.^{۳۷} Kaňková و همکارانشان (۲۰۱۵) اظهار داشتند توکسوپلازما موزیس موزم نسبت به توکسوپلازما موزیس مادرزادی بر روی ناباروری در زنان موثرتر می باشد.^{۳۸} Akarsu و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده اند که مکانیزم ناباروری توکسوپلازما شامل توسعه عفونت به ناحیه آندومتریت و سقط جنین به دلیل انتشار عفونت کیست توکسوپلازما از بافت آندومتر و بدنبال آن

جدول ۱: توالی های نوکلئوتیدی پرایمر جهت شناسایی نایسریا گونوره آ^{۳۰} و توکسوپلازما گوندی^{۳۱}

نام ژن	توالی اولیگونوکلئوتیدی (۵'→۳')	طول قطعه (bp)
پرایمر اختصاصی نایسریا گونوره آ	CGGCAGCATTCAATTTGTT AAAAAGCCGCCATTTTGTGA	bp ۱۶۲
پرایمر اختصاصی توکسوپلازما گوندی	TOX4(CGCTGCAGGGAGGAAGACGAAAGTTG) TOX5 (CGCTGCAGACACAGTGCATCTGGATT)	bp ۵۸۷



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی توکسوپلازما گوندی (۵۸۷ BP) و نایسریا گونوره آ (۱۶۲ BP)
M: Marker 100bp; +: Positive Control; -: Negative Control

References

- Purvis K, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. International journal of andrology 1993;16(1):1-13.
- Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial vaginosis is a strong predictor of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis infection. Clinical Infectious Diseases 2003;36(5):663-8.
- WHO. Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in Neisseria gonorrhoeae. 2012.
- Kahn RH, Mosure DJ, Blank S, Kent CK, Chow JM, Boudov MR, et al. Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae prevalence and coinfection in adolescents entering selected US juvenile detention centers, 1997–2002. Sexually transmitted diseases 2005;32(4):255-9.
- Datta SD, Sternberg M, Johnson RE, Berman S, Papp JR, McQuillan G, et al. Gonorrhea and chlamydia in the United States among persons 14 to 39 years of age, 1999 to 2002. Annals of internal medicine 2007;147(2):89-96.
- Hill D, Dubey J. Toxoplasma gondii: transmission,

- diagnosis and prevention. *Clinical microbiology and infection* 2002;8(10):634-40.
7. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International journal for parasitology* 2000;30(12):1217-58.
 8. Kaňková Š, Flegr J, Calda P. The influence of latent toxoplasmosis on women's reproductive function: four cross-sectional studies. *Folia parasitologica* 2015;62:041.
 9. Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews* 2000;13(4):559-70.
 10. Control CfD, Prevention. Update to CDC's Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010: oral cephalosporins no longer a recommended treatment for gonococcal infections. *MMWR Morbidity and mortality weekly report* 2012;61(31):590.
 11. Islami-nejad Z, Safarian S. A preliminary study of the prevalence of Gonococcal genital infection in 500 non-pregnant women referring to a private and a public clinic in Kerman, Iran. *Journal of Kerman University of Medical Sciences* 1995;2(3):135-9.
 12. Bakhtiari A, Firoozjahi A. The prevalence of gonococcal infection in non pregnant women. *Iranian Journal of Public Health* 2007;36(2):64-7.
 13. Rashidi BH, Tabriz LC, Haghollahi F, Jeddi-Tehrani M, Ramezanzadeh F, Foroushani AR, et al. Prevalence of *Neisseria gonorrhoea* in Fertile and Infertile Women in Tehran. *Journal of Reproduction & Infertility* 2009;9(4).
 14. Workowski KA, Berman S. Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2010.
 15. Panaretto KS, Lee HM, Mitchell MR, Larkins SL, Manassis V, Buettner PG, et al. Prevalence of sexually transmitted infections in pregnant urban Aboriginal and Torres Strait Islander women in northern Australia. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2006;46(3):217-24.
 16. Ghadimi Z, Soleimani M, Mohseni A, MAJIDZADEH AK. Design of a PCR method for rapid detection of *Neisseria Meningitidis* bacterium. 2012.
 17. Mardaneh J, Hasanzadeh P, Motamedifar M, Ahmadi K, Nikkhahi F. Diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* among pregnant women by culture method and PCR on *cppB* gene. *Iranian South Medical Journal* 2013;16(5):288-95.
 18. Morency P, Dubois M, Gresenguet G, Frost E, Masse B, Deslandes S, et al. Aetiology of urethral discharge in Bangui, Central African Republic. *Sexually transmitted infections* 2001;77(2):125-9.
 19. Mahony J, Song X, Chong S, Faught M, Salonga T, Kapala J. Evaluation of the NucliSens Basic Kit for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Genital Tract Specimens Using Nucleic Acid Sequence-Based Amplification of 16S rRNA. *Journal of clinical microbiology* 2001;39(4):1429-35.
 20. Hayakawa T, Mitsuya H, Kojima M, Hayase Y. [The clinical evaluation of 414 cases of male urethritis]. *Nihon Hinyokika Gakkai zasshi The Japanese journal of urology* 2002;93(3):450-6.
 21. Zachariah R, Harries A, Nkhoma W, Arendt V, Nchingula D, Chantulo A, et al. Behavioural characteristics, prevalence of *Chlamydia trachomatis* and antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in men with urethral discharge in Thyolo, Malawi. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2002;96(3):232-5.
 22. Pépin J, Sobéla F, Deslandes S, Alary M, Wegner K, Khonde N, et al. Etiology of urethral discharge in West Africa: the role of *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis*. *Bulletin of the World Health Organization* 2001;79(2):118-26.
 23. Alzahrani AJ, Obeid OE, Hassan MI, Almulhim AA. Screening of pregnant women attending the antenatal care clinic of a tertiary hospital in eastern Saudi Arabia for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections. *Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS* 2010;31(2):81.
 24. Guerina NG, Hsu H-W, Meissner HC, Maguire JH, Lynfield R, Stechenberg B, et al. Neonatal serologic screening and early treatment for congenital *Toxoplasma gondii* infection. *New England Journal of Medicine* 1994;330(26):1858-63.
 25. Bessieres M, Berrebi A, Cassaing S, Fillaux J, Cambus J, Berry A, et al. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: prenatal and neonatal evaluation of methods used in Toulouse University Hospital and incidence of congenital toxoplasmosis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009;104(2):389-92.
 26. Zhou Y, Lu Y, Wang R, Song L, Shi F, Gao Q, et al. [Survey of infection of *Toxoplasma gondii* in infertile couples in Suzhou countryside]. *Zhonghua nan ke xue= National journal of andrology* 2001;8(5):350-2.
 27. Qi R, Su X, Gao X, Liang X. [Toxoplasma infection in males with sterility in Shenyang, China]. *Zhonghua nan ke xue= National journal of andrology* 2005;11(7):503-4.
 28. Aral AG, Elhan HA, Akarsu C. [Retrospective

- evaluation of *Toxoplasma gondii* seropositivity in fertile and infertile women]. *Mikrobiyoloji bulteni* 2011;45(1):174-80.
29. Dvorakova-Hortova K, Sidlova A, Ded L, Hladovcova D, Vieweg M, Weidner W, et al. *Toxoplasma gondii* decreases the reproductive fitness in mice. *PloS one* 2014;9(6):e96770.
30. Muvunyi CM, Dhont N, Verhelst R, Crucitti T, Reijns M, Mulders B, et al. Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STDFinder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted disease pathogens. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2011;71(1):29-37.
31. Zhang H, Thekiso OM, Aboge GO, Kyan H, Yamagishi J, Inoue N, et al. *Toxoplasma gondii*: sensitive and rapid detection of infection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Experimental parasitology* 2009;122(1):47-50.

Elnaz Faroughi¹, Kumarss Amini^{2*}

¹ Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

² Association Professor, Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Molecular identification of *Neisseria gonorrhoeae* and *Toxoplasma gondii* isolated from infertile women with vaginal swab samples by Multiplex-PCR

Received:17 Apr 2020; Accepted:6 Jan 2021

Abstract

Background: *Toxoplasma gondii* and *Neisseria gonorrhoeae* are the rare causes of sexually transmitted infections. The aim of this study was detection of *N. gonorrhoeae* and *T. gondii* in patients with vaginal infection using Multiplex PCR.

Materials and methods: This cross sectional study was conducted in 60 infertile female patients with symptomatic vaginal infection, referring to Tehran Emam Khomeini hospital. After completing a demographic questionnaire, sixty vaginal swabs were obtained from each participant using individual sterile swabs. DNA extraction was performed according to manufacture CinnaGen kit. The multiplex polymerase chain reaction (M-PCR) was conducted based on specific primers for *N. gonorrhoeae* and *T. gondii*.

Results: Our finding indicated the frequency of infection with *N. gonorrhoeae* and *T. gondii* was 6.6% and 10%, respectively. No coinfection with *N. gonorrhoeae* and *T. gondii* was detected.

Conclusion: The Multiplex PCR is a good results for detection of *N. gonorrhoeae* and *T. gondii* in vaginal infection. The results of this study showed a relatively low frequency of *N. gonorrhoeae* and *T. gondii* in Tehran.

Key words: Vaginal samples, *Toxoplasma gondii*, *Neisseria gonorrhoeae*, Multiplex-PCR

***Corresponding Author:**

Dr. Kumarss Amini,
Department of Microbiology,
Saveh Branch, Islamic Azad
University, Saveh, Iran.

Tell: 09125454074
E-mail: dr_kumarss_amini@yahoo.com