Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:49 +0330 on Friday September 22nd 2017

مقاله پژوهشی

تعیین ژنوتیپ مولکولی گونه های اوره آپلاسما در زنان مبتلا به عفونت های ژنیتال باروش 16S-23S rDNA PCR- RFLP

دکتر رضا میرنژاد* ، دکتر نور امیرمظفری** ، دکتر بهرام کاظمی*** ، میرشمس الدین حسینی****

دریافت : ۸۹/۷/۱۹ ، پذیرش : ۸۹/۱۰/۱۵

چکیده:

مقدمه و هدف: علیرغم روشهای وسیعی که تاکنون از متدهای آنالیتیکی برای تمایز مایکوپلاسما استفاده شده است، تشخیص مایکوپلاسماها درحد گونه هنوز با مشکل روبرو می باشد. عموماً قدرت تمایز پائین روشهای سرولوژی به دلیل تغییرات سریع در اندازه و فاز آنتی ژنهای ایمنی غالب موجود در سطح سلولی مایکوپلاسماها، آن را بـه عنـوان یـک روش تایپینـگ مایکوپلاسـماها محدود کرده است. در مقابل روشهای مولکولی این مشکلات را ندارند و می توانند برای تایپینـگ مایکوپلاسـماها مـورد استفاده قرار بگیرند. هدف از این مطالعه، تعیین ژنوتیپ مولکولی گونه های اوره آپلاسما بـا تکنیـک 16S-23S rRNA PCR- RFLP در زنان مبتلا به عفونت های ژنیتال بود.

روش کار: دراین مطالعه توصیفی ـ مقطعی ۲۱۰ فرد بیمار مراجعه کننده به درمانگاه زنان و زایمان بیمارستان دانشگاهی حـضرت رسول اکرم (ص) تهران در طی سالهای ۸۸-۱۳۸۷ انتخاب و از هر بیمار نمونه گیری انجام و به آزمایشگاه ارسال شد. برای انجام PCR- RFLPبا استفاده از پرایمر اختصاصی جنس اوره آپلاسما برای تکثیر نواحی 559bp ژن 16S-23S rRNA استفاده گردید. بعد از انجام PCR و سکانس کردن، نمونه های مثبت تحت اثر آنزیم های محدودالاثر مختلفی قرار گرفتند.

نتایج: از ۲۱۰ نمونه با PCR ، ۹۳ مورد (۴۴/۳٪) و با کشت ۶۹ نمونه (۳۲/۹٪) گونه اوره آپلاسما ایزوله گشت. در مطالعه حاضـر تنها بیووار ۱(اوره آپلاسما پاروم) از نمونه های کلینیکی جدا شدند و این نتایج با استفاده از برش آنزیمی TaqI (آنزیم اختـصاصی گونه های اوره آپلاسما) تائید گردید. هم چنین آنالیز نتایج PCR-RFLP و سکانس کردن نمونه های اوره آپلاسما نشان داد کـه همگی از سروار ۳ اوره آپلاسما پاروم بودند.

نتیجه نهایی: بطورکلی می توان گفت که اوره آپلاسما پاروم از نمونه ای ژنیتال ایزولـه مـی گـردد و چـون در الگوهـای آنزیمـی ایزوله های اوره آپلاسما تفاوتی مشاهده نشده لذا در بین آنها هتروژنیستی ژنتیکـی وجـود نـدارد و عفونتهـا در افـراد مختلـف می تواند ناشی از انتشار یک سویه تکی یعنی بیووار ۱ باشد. هم چنین این مطالعـه نـشان داد کـه تکنیـک PCR-RFLP یـک روش سریع، قابل اجرا و اختصاصی برای جداسازی، شناسائی و تایپینگ ایزوله های اوره آپلاسما می باشد.

کلید واژه ها: اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم / اوره آپلاسما پاروم / ژنوتایپینگ / واکنش زنجیره ای پلیمراز

مقدمه :

مایکوپلاسماها عموماً مخـاط دوسـت هـستند کـه در دستگاه اورژنیتال و تنفسی میزبانشان در تماس نزدیک بـا سلولهای اپی تلیال ساکن می شوند و عفونت های مختلف در دستگاههای تنفسی و تناسلی ایجاد می کننـد. در ایـن بین، مایکوپلاسماهای تناسلی در ارتبـاط بـا عفونـت هـای دستگاه ادراری ، تناسلی، اختلالات تولیـد مثـل و مـرگ و میر نوزادان می باشند، بطوریکه امروزه آنها یکی از عوامـل مهم ایجاد کننده سرویسیت، واژینیت و PID از عفونتهـای شایع در زنان مراجعه کننده به کلینیک های زنان ـ زایمان به شمار می روند(۴-۱). این ارگانیسم ها بوسیله ارگانلهای سطحی خود به سطوح مخاطی مجاری تناسلی می چسبند و با توجه به قدرت بالای کلونیزاسـیون در اندوسـرویکس، احتمال ایجاد عوارض خطر آفرین برای مـادر و نـوزادش را

* استادیار میکروب شناسی مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج) (rmirnejadreza@yahoo.com)
** دانشیار گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
*** استاد انگل شناسی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
**** کارشناس آزمایشگاه مرجع دانشگاه علوم پزشکی قزوین

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:49 +0330 on Friday September 22nd 2017

بدنبال دارند. اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم یکی از عوامل اصلی اورتریت غیرگنوککی(NGU)، پروستاتیت حاد و آرتریت اکتسابی در مردان است(۵-۳). هم چنین این ارگانیسم در زنان حامله و غیرحامله سبب کوریوآمنیوناتیس، زایمان پیش از موعد، سقط جنین خودبه خودی، تولد نوزاد نارس، واژینیت وسرویسیت می گردد. در مطالعات کلینیکی مشخص شده است که دستگاه تنفسی نوزادان متولد شده از مادران آلوده به این باکتری ها آلوده می شوند و نوزادان دچار سندرم پنومونی، دیسترس تنفسی و مننژیت می گردند(۶).

در طی سالهائی که اوره آپلاسماها شناسائی و ویژگی آنها مشخص شد، آنها به چندین سروتیپ (چهارده سروتیپ) متفاوت طبقه بندی شدند. مطالعات بعدی با استفاده از سکانس کردن16S RNA در طی چندین سال نشان دادند که چهارده سروتیپ در دو بیووار (Biovar) یا دسته تقسیم قرار می گیرند: بیووار یک که اغلب بیووار پاروم نامیده می شد و شامل سروتیپهای۱،۳،۶،۱۴ است، درحالیکه بیووار دو (اغلب به آن بیووار T960 می گویند) شامل سروتیپ های ۱۳،۱۲،۱۱،۱۰،۹،۸،۷،۵،۴، ۲ می باشد. اخیراً دو بیووار بدلیل اینکه همولوژی DNA آنها حدود کمتر از ۶۰ می باشد در دو گونه جداگانه قرار گرفته اند. بیووار یک را اوره آپلاسما پاروم و بیووار دو را اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم نامیدند. بیووار یک (اوره آپلاسما پاروم) بیشتر از بیووار دو از نمونه های کلینیکی جدا می شوند، ولی هر دو گونه به طور همزمان ممکن است در بعضی از افراد وجود داشته باشند (۹-۷).

امروزه به منظور فهمیدن نقش بالقوه بیوارهای مختلف اوره آپلاسما در انسان و در پاسخ به سؤال هائی که در این زمینه وجود دارد، ضروری است که اپیدمیولوژی این باکتریها در مردان و زنان بالغ مشخص گردد. به همین منظور تکنیک های آمپلی فیکاسیون اسید نوکلئیک(مانند PCR) جایگزینی کشت و روشهای تایپینگ مرسوم(مانند روشهای سرولوژی) برای جداسازی و تایپینگ هر یک از این مایکو پلاسماهای ژنیتال از نمونه های کلینیکی شده است(۱۰،۱۱). مطالعات نشان داده اند که روش های ژنوتایپینگ براساس چندین هدف هردو گونه اوره آپلاسما را از هم متمایز می کند و این می تواند بطورکارآمد جایگزین شمای سروتایپینگ ۱۴ گروهی که در آن سرم پلی والانت استفاده می شود، گردد. هردو بیووار با روشهایAP-PCR و PCR-RFLP که هدف آن ژنهای ساب یونیت اوره آز آنتی ژن چند باندی (MBa)،16S rRNA و نواحی فاصله ای داخلی 16S-23S rRNA می باشند، قابل تمایز هستند(۱۲،۱۳).

این مطالعه جهت تعیین ژنوتیپ مولکولی گونه های اوره آپلاسما و تمایز آنها از همدیگر با روش 16S-23S rDNA PCR- RFLP در زنان مبتلا به عفونت های ژنیتال انجام شد.

روش کار:

در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی ۲۱۰ فرد بیمار با علائم کلینیکی که از آذر۸۷ تا شهریور۸۸ به درمانگاه زنان و زایمان بیمارستان دانشگاهی حضرت رسول اکرم (ص) تهران مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. پس از پذیرش، این افراد توسط متخصص زنان از نظر علائم کلینیکی مورد بررسی قرار گرفته و با توجه به نتایج تستهای آزمایشگاهی و بالینی، در آنهائی که وجود سایر عوامل ایجاد کننده واژینیت و سرویسیت به جز مایکوپلاسماها رد شده بودند توسط سواپ از واژن و سرویکس نمونه برداری انجام گردید. یک سوآپ به محیط انتقال PPLO براث (حاوی ۵٪ سرم اسب، پنی سیلین G و بدون رنگ و اوره و آرژینین و گلوکز) تلقیح شده و سوآپ دیگر در میکروتیوپ حاوی PBS تلقیح گردید. نمونه ها سریعاً به آزمایشگاه جهت کشت و انجام PCR ارسال گردید. نمونه های PBS تا انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند(۱۴).

به منظور جداسازی اوره آپلاسما مورد نظر و به منظور حذف فلور طبیعی باکتریائی و قارچی، محیط انتقال PPLO حاوی نمونه را از فیلترهای ۰/۴۵ میکرون (ساخت کمپانیeknokroma کشور اسپانیا) عبور داده و به محیط های حاوی PPLO براث (شامل سرم اسب (۲۰٪)، ۱۰ml عصاره مخمر (۱٪) ۱۴۰ml محیط پایه PPLO،۲ml فنل رد(۰/۲٪)، ۱ mlپنی سیلینG(۵۰۰۰u/ml)، ۲۰ml اوره (۱۰٪) تلقیح گردید. pH محیط کشت باید حدود ۶/۰ تنظیم گردد. تمام محیط ها در اتمسفر حاوی ۵٪Co_2 (در کندل جار) و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت۵ روز انکوبه گردیدند.

هر روز لوله ها به لحاظ تغییر رنگ و عدم کدورت مورد بررسی قرار می گرفتند(۱۵،۱۴). در صورت داشتن تغییر رنگ نمونه ها به محیط جامد (شامل همان ترکیبات محیط مایع به اضافه ۱٪ آگار) انتقال داده شده و در ۳۷ درجه سلسیوس در اتمسفر ۵٪Co_2 انکوبه گردیدند. بعداز ۷۲-۴۸ ساعت، ویژگیهای کلنی های اوره آپلاسما با رنگ آمیزی Diennes و بررسی میکروسکوپی (با عدسی ۱۰X)

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:49 +0330 on Friday September 22nd 2017

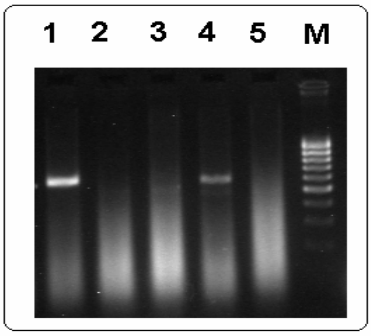
تعیین شدند. محیط ها تا ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفتـه و بعد از ۱۰ روز اگر کلنی مشاهده نمـی گردیـد منفـی در نظر گرفته می شدند(۱۴،۱۵).

در آزمایشگاه استخراج DNA از نمونه ها با استفاده از کیـت high pure PCR template Preparation Kit (ساخت شرکت Roche کشور آلمان با Cat. No. 11 796 828 001) انجام شد. واکنش PCR در حجم نهـائی ۳۰µL در نظر گرفته شد. هـر نمونـه شـامل: ۱۵µL 2X Master mix (ساخت کمپانیAmpliqon III کشور دانمارک) حاوی $1.5mM\ MgCl_2$ ، ۱ µgr DNA الگو، ۲۰pmol از هرپرایمر reverse وforward و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم ۳۰ µL بود. پرایمر مورد استفاده که در آزمایشگاه ما طراحی گردید و توسط شرکت سیناژن سنتز شد عبارت بود از :

MyUuF 5`-TGG AGT TAA GTC GTA ACA AG
MyUu R 5`- CTG AGA TGT TTC ACT TCA CC

فرایند PCR در دستگاه ترموسـایکلر شـامل ۵ دقیقـه ۹۴ درجه سلسیوس، بـدنبال آن ۳۰ سـیکل ۳۰ ثانیـه در ۹۴ درجه سلسیوس ، ۶۰ ثانیه در ۵۶ درجه سلسیوس مرحلـه Annealing و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام گرفت.

بـرای بررسـی محـصولات PCR از الکتروفـورز در ژل آگاروز ۳٪ و رنگ آمیزی DNA با رنـگ SYBR® Green از تولیدات شرکت QIAGeen و مارکر100bp(خریداری شده از شرکت سیناژن ایران) انجام شد. ژلها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند(شـکل ۱) و در نهایت محصول PCR بدست آمـده (قطعـه ۵۵۹bp) اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم جهت تأئید تعیین توالی شـــد (توسط شرکت سیناژن) و با شماره GQ411532.2 در ژن بانک جهانی ثبت گردید.

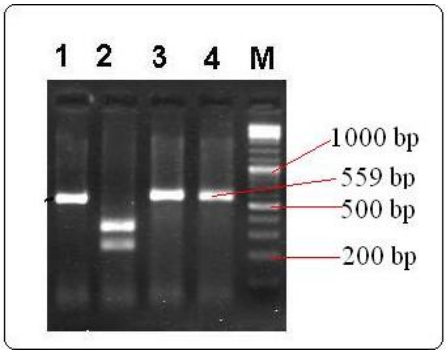


تصویر ۱: ژل الکترفورز اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم

نمونه های ۱ و ۴ از نظر اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم مثبت می باشند. ردیـف ۶ مـارکر(100bp DNA ladder, SM#333). بقیـه نمونـه هـا از نظـر اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم منفی می باشند.

جهت تایپینگ، بعد از دریافت سکانس DNA آمپلـی فای مایکوپلاسما ژنیتالیوم بـا اسـتفاده از برنامـه BLAST ژنوتیپ آن بـا تـوالی ژنـوم سـکانس شـده Algin شـدند. سکانس مورد مطالعه به نرم افـزار Web Cutter داده شـد کـه آن لیـست آنـزیم هـا بعـلاوه محـل اثـر آنـزیم هـای محدودالاثر مختلف را ارائه نمود. در این مطالعه برای انجام PCR-RFLP محصولات PCR بدسـت آمـده مایکوپلاسـما ژنیتالیوم، تحت اثر آنزیم های محدودالاثر AluI ,Taq I, CacI8, BbsI ,EcoRI قرار گرفتند.

روش اجرای برش آنزیمی یا PCR-RFLP : برای انجـام بـرش آنزیمـی یـا PCR-RFLP ابتـدا واکـنش 15 µl زیـر بـرای نمونه هائیکه مثبت شده بودند تهیه شدند: 6.3µl آب مقطر استریل عاری از نوکلئاز، 1.5 µl بـافر آنـزیم، 0.2 µl آنـزیم محـدودالاثر(10-20 u) ، 7µl محـصولPCR. بعـداز تهیـه واکـنش بـالا حـاوی آنـزیم هـای فـوق بطورجداگانـه، میکروتیوپ های حاوی تمام آنزیم ها به جـز آنـزیم TaqI در بن مـاری ۳۷ درجـه سلـسیوس بـه مـدت۲ سـاعت و میکروتیوپ حاوی آنزیم TaqI در ترموسایکلر در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت قرار گرفتنـد. بعـد از دو ساعت محصول RFLP روی ژل آگاروز ۳٪ همراه با مـارکر و محصول PCR آنـزیم نخـورده الکتروفـورز گردیدنـد. در نهایت اندازه قطعات حاصل از برش آنزیمی تمـامی نمونـه هـای PCR مثبـت بـا یکـدیگر مقایـسه شـدند و ژنوتیـپ مربوطه براساس آنها تعیین گردید(شکل ۲).



تـــصویر ۲: ژل الکترفـــورز بـــرش آنزیمـــی اوره آپلاســـما اوره آلیتیکوم. ردیف ۱ محصولPCRمثبت اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم که تحت برش آنزیمی قرار نگرفته و به عنوان کنترل مثبت در نظـر گرفتـه شـد. ردیف ۲ محـصول هـضم آنزیمـی محـصول PCR مثبـت اوره آ پلاسـما اوره آلیتیکوم که با آنزیم TaqI برش خورده و دو قطعه ۳۳۲ bp و ۲۲۷bp ایجـاد شده است. ردیف های ۳و ۴ نشان دهنده محصول PCR مثبت اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم که به ترتیب با آنزیم های Cac8Iو BbsI برش نخوردند. ردیف ۴ مارکر (100bp DNA ladder, SM#333).

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:49 +0330 on Friday September 22nd 2017

نتایج:

از ۲۱۰ زن بـا میـانگین سـنی (±۹/۷) ۳۱/۹ سـال نمونه ها دریافت شد. ۹۴/۳٪ آنـان متاهـل بودنـد، ۷۶/۷٪ زایمان نداشتند و تنها ۲/۹٪ آنان سابقه سـزارین داشـتند. میزان علائم و عوارض در جدول ۱ نشان داده شـده اسـت. لازم بـذکر اسـت کـه هیچکـدام سـابقه ابـتلا بـه سـندرم TORCH، تریکوموناس، کاندیدا و کوکسی های گرم منفی نداشتند.

جدول۱: میزان علائم وعوارض در زنان مبتلا به مایکوپلاسماهای ژنیتال مراجعه کننده به کلینیک زنان و زایمان بیمارستان حضرت رسول(ص)

	تعداد	درصد
سوزش	۲۲	۱۰/۵
خارش	۲۴	۱۱/۴
ترشح فراوان	۱۷۱	۸۱/۴
تکرر ادرار	۷	۳/۳
درد زیر شکم	۱۱	۵/۲
واژینیت	۱۳۲	۶۲/۹
سرویسیت	۵۵	۲۶/۲
اندومتریک	۲	۱/۰
PID	۲	۱/۰

از ۲۱۰ نمونه کشت داده شده روی محیط های کشت اختصاصی اوره آپلاسماها ، ۶۹ نمونه(۳۲/۹٪) کشت مثبت بودند و تکنیک PCR در ۹۳ نمونه (۴۴/۳٪) مثبت بود. در این بین ۶۱ نمونه هم کشت و هم PCR مثبت بودند و در ۸ نمونه کشت مثبت ولی PCR منفی بودند.

نتایجPCR-RFLP نشان داد که پس از برش آنزیمـی محصول PCR مثبت نمونه های بالینی، در الگوهای بـرش آنزیمی بدست آمده تفاوتی وجود نداشـت و همگـی دارای یک الگو بودند، لـذا PCR-RFLP عـلاوه بـر تائیـد نتیجـه PCR نشان داد که اوره آ پلاسما اوره آلیتیکـوم همگـی از یک ژنوتیپ(سروار ۳) می باشند و تیـپ هـای مختلـف در نمونه های مطالعه حاضر مشاهده نشد. هم چنـین بعـد از انجام سکانس و BLAST کردن مشخص گردید که نمونـه های ژنیتال مورد بررسی تنها بیووار۱(اوره آپلاسما پـاروم) را داشـتند و بیـووار T960(اوره آپلاسـما اورآلیتیکـوم) از نمونه ها ایزوله نشد.

بحث:

علیرغم روشهای وسیعـــــی که تاکنون از متدهـای آنالیتیکی برای تمایز مایکوپلاسما استفاده شده است، ولی تشخیص مایکوپلاسماها درحد گونه هنوز با مـشکل روبـرو می باشد. عموماً قدرت تمایز پائین روشهای سـرولوژی بـه دلیل تغییرات سریع در انـدازه و فـاز آنتـی ژنهـای ایمنـی غالب موجـود در سـطح سـلولی مایکوپلاسـماها، آن را بـه عنوان یـک روش تایپینـگ مایکوپلاسـماها محـدود کـرده است (۱۰،۱۱،۱۳). روشهای پروفایل پروتئین همانند آنالیز ایزوآنزیم، الکتروفورز یک بعدی و دوبعدی و ایمونوبلاتینگ هرچند دارای قدرت تمایز بـالا مـی باشـند، ولـی نیازمنـد تعداد نمونه های زیادی برای آنالیز، زمان بر بودن و مشکل در گزارش دهی هستند. در مقابل روشهای مولکـولی ایـن مشکلات را ندارند و می توانند برای تایپینگ مایکوپلاسماها مورد استفاده قرار بگیرند. یکـی از روشـهای مولکـولی کـه برای همه انواع متفاوت میکرارگانیسم ها شـامل باکتریهـا، قارچ ها قابل استفاده می باشد، PCR-RFLP اسـت (۱۰). در این تکنیک آنزیم های محـدودالاثر کـه بـرای شکـست DNA کرومـوزمی بـاکتری بکـار مـی رونـد، اغلـب بـرای شکست آمپلی کون ها (محـصولات PCR) هـم بکـار مـی روند. انتخاب آنزیم اصولاً براساس دانش قبلی ما و براساس سکانس محصولات PCR در خصوص سایت های بـرش در محصول PCR بستگی دارند که متغیر مـی باشـند و ابـزار مفیدی در مقایسه کردن سویه ها هستند (۱۱).

مطالعه حاضر تطابق نسبی با مطالعات مختلفی که در ارتباط با بررسی میزان جداسازی مایکوپلاسماهای تناسلی در نقـاط مختلـف دنیـا انجـام گرفتـه اسـت، دارد. میـزان جداسازی اوره آپلاسـما بـا روش کـشت، از ۱۰ درصـد در کشور چین (۱۶) تا ۵۴ درصد در آمریکا (۱۷) متغیر بـوده است که در این بین مطالعه انجـام گرفتـه در هنـد(۱۸) و ایران(۱۹) به ترتیب با میزان شـیوع ۳۲ و۳۶/۷ درصـد، بـا مطالعه حاضر شباهت بیشتری دارد. میزان جداسـازی اوره آپلاسما با روش PCR ، از ۲۰ درصد در کشور اتریش(۲۰) تا ۶۱/۹ درصد در روسیه(۲۱) متغیر اسـت. در اینجـا نیـز میزان جداسازی بدست آمـده در ایـران و هنـد(بـا میـزان شیوع حدوداً۴۵٪) به درصد جداسازی که در ایـن مطالعـه بدست آمده است نزدیک تر می باشد. اخـتلاف داده هـای بدست آمده از دو روش، در شناسایی اوره آپلاسـماها (کـه در این مطالعه ۱۱/۴٪ بـود) بـا اخـتلاف بدسـت آمـده در مطالعات دیگر همخـوانی داشـت. بطـور کلـی همانطورکـه مشاهده میشود، در مطالعات مختلف شیوع اوره آپلاسماها

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:49 +0330 on Friday September 22nd 2017

متفاوت گزارش شده است که این امر مـی توانـد ناشـی از نوع مطالعه، جمعیـت مـورد مطالعـه، تعـداد نمونـه، روش نمونه گیری، سن بیماران، نژاد، فرهنگ، منطقه جغرافیایی و روش آزمایشگاهی(کـشت و نـوع PCR) باشـد. مـثلا در مطالعـه ای کریـستوپلوس و همکـارانش در سـال ۲۰۰۶ نشان دادند که بهداشت ضعیف ناحیه ژنیتـال افـراد مـورد بررسـی در تهـاجم و التهـاب واژن توسـط اوره آپلاسـماها نقش دارد(۱۵).

مطالعه حاضر نشان داد ترادف ژنی گونه های مختلف اوره آپلاسما دارای محـل بـرش خـاص خـود مـی باشـند، بطوریکه اگر در نمونه های کلینیکی گونـه هـای مختلفـی وجود داشته باشد، بعد از PCR نمـودن، مـی تـوان بـراین اساس آنها را از همدیگر متمـایز کـرد. ایـن نتـایج مـشابه مطالعات کنـگ و همکـارانش مـی باشـد(۲۲) کـه مطـرح نمودند بـا اسـتفاده از ژنهـای 16S rRNA نـواحی فاصـله اندازه داخل ژنی 16S rRNA -23S rRNA، زیـر مجموعـه های ژن اوره آز و انتهای ´۵ MBA می تـوان گونـه هـای اوره آپلاسما را شناسائی و ساب تیپ کرد و بـا اسـتفاده از این ژنها می توان این دو گونه(اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم و اوره آپلاسما پاروم) را از همدیگر متمایز نمـود. در مطالعـه حاضر با توجه به این نکتـه از روی ژنهـای نـواحی فاصـله انداز داخلی 16S-23S rRNA پرایمر هـا طراحـی شـدند و نتایج PCR و سکانس آنها نشان داد که تنها بیووار ۱ (اوره آپلاسما پاروم) از نمونه های کلینیکی ما جدا شـده ا نـد و این نتایج بـا اسـتفاده از بـرش آنزیمـی TaqI تائیـد شـد. چراکه تمامی نمونه های PCR مثبت بعد از برش آنزیمـی یک الگو را نشان دادند و تفاوتی در الگوهای بدسـت آمـده مـشاهده نـشد. هـم چنـین آنـالیز نتـایج PCR-RFLP و سکانس کردن نمونه هـــای اوره آپلاسما نشان داد کـــه همگی از سروار ۳ اوره آپلاسما پاروم بودند که ایـن نتـایج تقریبا مشابه نتایج مطالعات دیگر در این زمینه بودنـد کـه مطرح کرده بودند اوره آپلاسما پاروم نـسبت بـه بیـووار ۲ (بیـووار T960 یـا اوره آپلاسـما اوره آلیتیکـوم) بیـشتر از نمونه های کلینیکی به خصوص از زنان جدا مـی شـود. در مطالعه ای ابل هورن و همکارانش در آلمان گزارش کردند که ۸۱٪ اوره آپلاسـماهای ایزولـه شـده از زنـان مراجعـه کننده به کلینیک زنان و زایمـان شـهر مـونیخ بیـووار اوره آپلاسـما پـاروم بودنـد(۲۳). هـم چنـین در مطالعـه ای پاولسن و همکارانش نشان دادند که از ۶۸۰ اوره آپلاسمای ایزوله شده از نمونه های اورژنیتال ۸۰٪ بیـووار ۱ ، ۱۳/۵٪ بیووار ۲ و ۶/۵٪ از هر دو بیووار را داشتند(۲۴). لازم بذکر اسـت کـه مطالعـات کنـگ و همکـارانش(۲۲)، نایـسن و همکارانش(۲۵)، یـی و همکـارانش(۲۶) نـشان دادنـد کـه بیووار اوره آپلاسما پاروم نیز از نمونه های بـالینی از زنـان مبتلا به عفونت های ژنیتال بیشتر ایزوله مـی گـردد. لازم بذکر است کـه تفـاوت هـای مـشاهده شـده در مطالعـات ممکن است ناشی از روش مطالعه، مکـان نمونـه گیـری و نوع نمونه باشد.

نتیجه نهایی:

بطورکلی نتایج تکنیک PCR-RFLP در مطالعه حاضر نشان داد که هتروژنسیتی بین اوره آپلاسماها ایزوله شـده مشاهده نمـی گـردد و همگـی از یـک بیـوار (بیـووار اوره آپلاسما پاروم) می باشند، لذا میتوان گفت که عوامل ایجاد کننده عفونت های تناسلی در بین زنان مـورد مطالعـه در تهران ناشی از انتشار یک بیوار تکی می باشند که این کـار درمان بیماران و پیگیری منشاء آلودگی را در آنهـا آسـانتر مـی کنـد. در نهایـت مـی تـوان بیـان کـرد کـه تکنیـک PCR-RFLP یک سیستم تیپ بندی ساده، قابل تکرارپذیری با قدرت تمایز بـالا مـی باشـد کـه مـی تـوان از آن بـرای مطالعات مختلف از جمله ارزیـابی شکـست هـای درمـانی بدلیل ظهور سویه جدید یا سویه قبلی، در ثبت سـویه هـای اوره آپلاسماها جدید که در آزمایشگاه ایزوله شده اند و در پیشگیری و درمان اوره آپلاسماها با یافتن منشاء آلـودگی استفاده کرد. همچنین روش مناسبی جهت شناسائی و درک بهتر اپیدمیولوژی عفونت های اوره آپلاسماها می باشد.

سپاسگزاری :

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولـــی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که ما را در اجرای این مطالعه یاری نمودند تشکر می نماینـد. در ضـمن از آقـای دکتر Dohn از کشور دانمارک به خاطر ارسال نمونه DNA خالص اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، قدردانی می گردد.

منابع :

1. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev 2005; 18(4): 757-89.
2. Taylor-Robinson D. The role of mycoplasmas in pregnancy outcome. Best Practice Res Clin Obstet Gynaecol 2007; 21(3): 425-38.

Downloaded from sjh.umsha.ac.ir at 11:49 +0330 on Friday September 22nd 2017

3. Razin S, Herrmann R. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. New York : Kluwer Academic/Plenum , 2002.
4. Zdrodowska-Stefanow B, Kłosowska WM, Ostaszewska-Puchalska I. Ureaplasma urealyticum and mycoplasma hominis infection in women with urogenital diseases. Adv Med Sci 2006; 51:250-53.
5. Razin S, Yogev D, Noat Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol. Mol Biol Rev 1998; 62(4):1094- 1156.
6. Taylor- Robinson D, Furr PM. Update on sexually transmitted mycoplasmas. Lanct 1998; 351: 12- 15.
7. Robertson JA, Stemke GW. Expanded serotyping scheme for ureaplasma urealyticum strains isolated from humans. J Clin Microbiol 1982; 15: 873–878.
8. Robertson JA, Vekris A, Bebear C, Stemke GW. Polymerase chain reaction using 16S rRNA gene sequences distinguishes the two biovars of ureaplasma urealyticum. J Clin Microbiol 1993; 31: 824–830.
9. Halbedel S, Stulke J. Tools for the genetic analysis of mycoplasma. Int J Med Microbiol 2007; 297 (1):37-44.
10. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. Clin Microbiol Rev 2006; 19(3): 512–30.
11. Belkum AV. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. Clin Microbiol Rev 1994; 7(2): 174–84.
12. Glass JI, Lefkowitz EJ, Glass JS, Heiner CR, Chen EY, Cassell GH. The complete sequence of the mucosal pathogen ureaplasma urealyticum. Nature 2000; 407:757–762.
13. Sung H, Kang SH, Bae YJ , Hong JT, Chung YB, Lee CK, et al. PCR-based detection of mycoplasma species. J Microbiol 2006;44(1):42-49.
14. Amirmozafari N, Mirnejad R, Kazemi B, Sariri E, Bojari MR, Dehdar Darkahi F. Comparison of polymerase chain reaction (PCR) and culture for detection of genital mycoplasma in clinical samples from patients with genital infections. Saudi Med J 2009;30(11):1401-05.
15. Christopoulos P, Deligeoroglou E, Papadias K. Genital mycoplasmas in non-sexually active young females with vaginal discharge. Int J Gynaecol Obstet 2007; 97(1):49-50.
16. Teng K, LiM, Yu, LiH, Shen D, Liu D. Comparison of PCR with culture for detection of ureaplasma urealyticum in clinical samples from patients with urogenital infection. J Clin Microbe 1994; 32(9):2232- 4.
17. 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 cervicits symptoms in La Crosse, Wisconsin. J Clin Microbiol 2004; 10: 4636- 40.
18. Dhawan B, Gupta V, Khanna N, Singh M, Chaudhry R. Evaluation of the diagnostic efficacy of PCR for ureaplasma urealyticum infection in Indian adults with symptoms of genital discharge. Jpn J Infect Dis 2006; 59:57- 58.
19. Vatani Sh, Ghazi Saeidi K, Mohammadi M, Naji AR, Fatemi Nasab F, Zeraati H, et al. [The survey of contamination with genital mycoplasma in women with bacterial vaginalis by PCR method]. Journal of Gorgan University of Medical Science 2006;8(17): 45-50 (Persian)
20. Imudia AN, Detti L, Puscheck EE, Yelian FD, Diamond MP. The prevalence of ureaplasma urealyticum, mycoplasma hominis, chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae infection, and the rubella status of patients undergoing an initial infertility evaluation. Assist Reprod Genet 2008; 25:43-6.
21. Solov'eva SV, Tsoi EG, Zigangirova NA, Gamova NA, Rakovskaia IV, Gintsburg AL. Detection of tetracycline- and erythromycin – resistant urogenital mycoplasma strains using PCR. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol 1998; 6:3- 7.
22. Kong F, Zhenfang MA, James G, Gordon S, Gilbert G. Species identification and subtyping of ureaplasma parvum and ureaplasma urealyticum using PCR-based assays. J Clin Microbiol 2000; 38(3): 1175–79.
23. Abele-Horn MC, Wolff P, Dressel FP, Zimmermann A. Association of ureaplasma urealyticum biovars with clinical outcome for neonates, obstetric patients, and gynecological patients with pelvic inflammatory disease. J Clin Microbiol 1997; 35:1199–1202.
24. Povlsen K, Jensen JS, Lind I. Detection of ureaplasma urealyticum by PCR and biovar determination by liquid hybridization. J Clin Microbiol 1998; 36(11): 3211–3216.
25. Naessens A, Foulon W, Breynaert J, Lauwers S. Serotypes of ureaplasma urealyticum isolated from normal pregnant women and patients with pregnancy complications. J Clin Microbiol 1988; 26:319–322.
26. Yi J, Yoon B H, Kim EC. Detection and biovar discrimination of ureaplasma urealyticum by real-time PCR. Mol Cell Probes 2005; 19:255-260.