

تعیین ژنوتیپ مولکولی گونه های اوره آپلازما 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 مایکوپلازما استفاده شده است، تشخیص مایکوپلازماها 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 مایکوپلازماها، آن را به عنوان یک روش تایپینگ مایکوپلازماها محدود کرده است. در مقابل روشهای مولکولی این مشکلات را ندارند و می توانند برای تایپینگ مایکوپلازماها مورد استفاده قرار بگیرند. هدف از این مطالعه، تعیین ژنوتیپ مولکولی گونه های اوره آپلازما با تکنیک 16S-23S rRNA PCR- RFLP در زنان مبتلا به عفونت های ژنیتال بود.

روش کار: دراین مطالعه توصیفی - مقطعی ۲۱۰ فرد بیمار مراجعه کننده به درمانگاه زنان و زایمان بیمارستان دانشگاهی حضرت 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- RFLP با استفاده از پرایمر اختصاصی جنس اوره آپلازما برای تکثیر نواحی 559bp ژن 16S-23S rRNA استفاده گردید. بعد از انجام PCR و سکانس کردن، نمونه های مثبت تحت اثر آنزیم های محدودالثر مختلفی قرار گرفتند.

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

نتیجه نهایی: بطور کلی می توان گفت که اوره آپلازما پاروم از نمونه های ژنیتال ایزوله می گردد و چون در الگوهای آنزیمی ایزوله های اوره آپلازما تفاوتی مشاهده نشده لذا در بین آنها هتروژنیستی ژنتیکی وجود ندارد و عفونتها در افراد مختلف می تواند ناشی از انتشار یک سویه تکی یعنی بیووار ۱ باشد. هم چنین این مطالعه نشان داد که تکنیک PCR-RFLP یک روش سریع، قابل اجرا و اختصاصی برای جداسازی، شناسائی و تایپینگ ایزوله های اوره آپلازما می باشد.

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

مقدمه:

میرنوزادان می باشند، بطوریکه امروزه آنها یکی از عوامل مهم ایجاد کننده سرویسیت، واژینیت و PID از عفونتهای شایع در زنان مراجعه کننده به کلینیک های زنان - زایمان به شمار می روند (۴-۱). این ارگانیزم ها بوسیله ارگانلهای سطحی خود به سطوح مخاطی مجاری تناسلی می چسبند و با توجه به قدرت بالای کلونیزاسیون در اندوسرویکس، احتمال ایجاد عوارض خطر آفرین برای مادر و نوزادش را

مایکوپلازماها عموماً مخاط دوست هستند که در دستگاه اورژنیتال و تنفسی میزبانشان در تماس نزدیک با سلولهای اپی تلیال ساکن می شوند و عفونت های مختلف در دستگاههای تنفسی و تناسلی ایجاد می کنند. در این بین، مایکوپلازماهای تناسلی در ارتباط با عفونت های دستگاه ادراری، تناسلی، اختلالات تولید مثل و مرگ و

* 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

16S-23S و نواحی فاصله ای داخلی 16S rRNA،(MBa) rRNA می باشند، قابل تمایز هستند(۱۲،۱۳).

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

روش کار:

در این مطالعه توصیفی - مقطعی ۲۱۰ فرد بیمار با علائم کلینیکی که از آذر ۸۷ تا شهریور ۸۸ 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 آنهایی که وجود سایر عوامل ایجاد کننده واژینیت و سرویسیت به جز میکوپلازماها رد شده بودند توسط سوآپ از واژن و سرویکس نمونه برداری انجام گردید. یک سوآپ به محیط انتقال PPLO برات (حاوی ۰.۵٪ سرم اسب، پنی سیلین G و بدون رنگ و اوره و آرژینین و گلوکز) تلقیح شده و سوآپ دیگر در میکروتیوب 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).

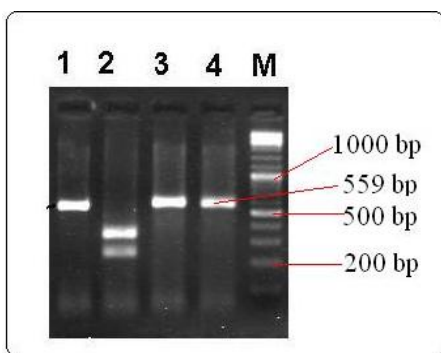
به منظور جداسازی اوره آپلازما مورد نظر و به منظور حذف فلور طبیعی باکتریائی و قارچی، محیط انتقال PPLO حاوی نمونه را از فیلترهای ۰/۴۵ میکرون (ساخت کمپانی eknokroma کشور اسپانیا) عبور داده و به محیط های حاوی PPLO برات (شامل سرم اسب ۲۰٪)، ۱۰ ml عصاره مخمر (۱٪) ۱۴۰ ml محیط پایه PPLO ۲ ml فنل رد (۲٪/۰)، ۱ ml پنی سیلین G (۵۰۰۰ u/ml)، ۲۰ ml اوره (۱۰٪) تلقیح گردید. pH محیط کشت باید حدود ۶/۰ تنظیم گردد. تمام محیط ها در اتمسفر حاوی ۵٪ CO₂ (در کندل جار) و در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز انکوبه گردیدند. هر روز لوله ها به لحاظ تغییر رنگ و عدم کدورت مورد بررسی قرار می گرفتند(۱۴، ۱۵). 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٪ CO₂ انکوبه گردیدند. بعد از ۲۲-۴۸ ساعت، ویژگیهای کلنی های اوره آپلازما با رنگ آمیزی Diennes و بررسی میکروسکوپی (با عدسی ۱۰X)

بدنبال دارند. اوره آپلازما اوره آلیتیکوم یکی از عوامل اصلی اورتریت غیرگنوککی(NGU)، پروستاتیت حاد و آرتريت اکتسابی در مردان است(۵-۳). هم چنین این ارگانسیم در زنان حامله و غیرحامله سبب کوریوآمنیونیتیس، زایمان پیش از موعد، سقط جنین خودبه خودی، تولد نوزاد نارس، واژینیت و سرویسیت 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 منژیت می گردند(۶). در طی سالهایی که اوره آپلازماها شناسائی و ویژگی آنها مشخص شد، آنها به چندین سروتیپ (چهارده سروتیپ) متفاوت طبقه بندی شدند. مطالعات بعدی با استفاده از سکانس کردن 16S 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 سروتیپهای ۱،۳،۶،۱۴ است، درحالیکه بیووار دو (اغلب به آن بیووار T960 می گویند) شامل سروتیپ های ۲،۴،۵،۷،۸،۹،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳ 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 آپلازما پاروم و بیووار دو را اوره آپلازما اوره آلیتیکوم نامیدند. بیووار یک (اوره آپلازما 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 آپلازما 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 پلازماهای ژنیتال از نمونه های کلینیکی شده است(۱۱، ۱۰). مطالعات نشان داده اند که روش های ژنوتایپینگ براساس چندین هدف هر دو گونه اوره آپلازما را از هم متمایز می کند و این می تواند بطور کارآمد جایگزین شمای سروتایپینگ ۱۴ گروهی که در آن سرم پلی والانت استفاده می شود، گردد. هر دو بیووار با روشهای AP-PCR و PCR-RFLP که هدف آن ژنهای ساب یونیت اوره آز آنتی ژن چند بانندی

جهت تایپینگ، بعد از دریافت سکانس DNA آمپلی فای مایکوپلازما ژنیالیوم با استفاده از برنامه BLAST ژنوتیپ آن با توالی ژنوم سکانس شده Algin شدند. سکانس مورد مطالعه به نرم افزار Web Cutter داده شد که آن لیست آنزیم ها بعلاوه محل اثر آنزیم های محدودالتر مختلف را ارائه نمود. در این مطالعه برای انجام PCR-RFLP محصولات PCR بدست آمده مایکوپلازما ژنیالیوم، تحت اثر آنزیم های محدودالتر Taq I, AluI, EcoRI, BbsI, CacI8 قرار گرفتند.

روش اجرای برش آنزیمی یا PCR-RFLP: برای انجام برش آنزیمی یا PCR-RFLP ابتدا واکنش 15 µl زیر برای نمونه هائیکه مثبت شده بودند تهیه شدند: 6.3µl آب مقطر استریل عاری از نوکلئاز، 1.5 µl بافر آنزیم، 0.2 µl آنزیم محدودالتر (10-20 u)، 7µl محصول PCR. بعداز تهیه واکنش بالا حاوی آنزیم های فوق بطور جداگانه، میکروتیوپ های حاوی تمام آنزیم ها به جز آنزیم TaqI در بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت و میکروتیوپ حاوی آنزیم TaqI در ترموسایکلر در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. بعد از دو ساعت محصول RFLP روی ژل آگاروز ۳٪ همراه با مارکر و محصول PCR آنزیم نخورده الکتروفورز گردیدند. در نهایت اندازه قطعات حاصل از برش آنزیمی تمامی نمونه های PCR مثبت با یکدیگر مقایسه شدند و ژنوتیپ مربوطه براساس آنها تعیین گردید(شکل ۲).



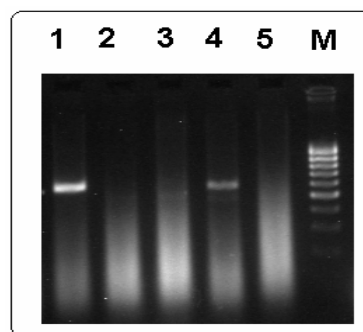
تصویر ۲: ژل الکتروفورز برش آنزیمی اوره آپلازما اوره آلیتیکوم. ردیف ۱ محصول PCR مثبت اوره آ پلازما اوره آلیتیکوم که تحت برش آنزیمی قرار نگرفته و به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. ردیف ۲ محصول هضم آنزیمی محصول PCR مثبت اوره آ پلازما اوره آلیتیکوم که با آنزیم TaqI برش خورده و دو قطعه ۳۳۲ bp و ۲۲۷bp ایجاد شده است. ردیف های ۳ و ۴ نشان دهنده محصول PCR مثبت اوره آ پلازما اوره آلیتیکوم که به ترتیب با آنزیم های Cac8I و BbsI برش نخوردند. ردیف ۴ مارکر (100bp DNA ladder, SM#333).

تعیین شدند. محیط ها تا ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفته و بعد از ۱۰ روز اگر کلنی مشاهده نمی گردید منفی در نظر گرفته می شدند(۱۴،۱۵).

در آزمایشگاه استخراج DNA از نمونه ها با استفاده از کیت high pure PCR template Preparation Kit (ساخت شرکت Roche کشور آلمان با Cat. No. 11 796) انجام شد. واکنش PCR در حجم نهائی ۳۰ µL 2X Master شامل: ۱۵µL mix (ساخت کمپانی Ampliqon III کشور دانمارک) حاوی ۱.5mM MgCl₂، ۱ µgr DNA الگو، ۲۰ pmol از هر پرایمر forward و reverse و آب مقطر دوبر تقطیر استریل تا حجم ۳۰ µL بود. پرایمر مورد استفاده که در آزمایشگاه ما طراحی گردید و توسط شرکت سینازن 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 ترموسایکلر شامل ۵ دقیقه ۹۴ درجه سلسیوس، بدنال آن ۳۰ سیکل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۶۰ ثانیه در ۵۶ درجه سلسیوس مرحله Annealing و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام گرفت.

برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگاروز ۳٪ و رنگ آمیزی DNA با رنگ SYBR® Green از تولیدات شرکت QIAGEN و مارکر 100bp (خریداری شده از شرکت سینازن ایران) انجام شد. ژلها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند(شکل ۱) و در نهایت محصول PCR بدست آمده (قطعه ۵۵۹bp) اوره آپلازما اوره آلیتیکوم جهت تأیید تعیین توالی شد (توسط شرکت سینازن) و با شماره GQ411532.2 در ژن بانک جهانی ثبت گردید.



تصویر ۱: ژل الکتروفورز اوره آپلازما اوره آلیتیکوم نمونه های ۱ و ۴ از نظر اوره آپلازما اوره آلیتیکوم مثبت می باشند. ردیف ۶ مارکر(100bp DNA ladder, SM#333). بقیه نمونه ها از نظر اوره آپلازما اوره آلیتیکوم منفی می باشند.

نتایج:

از ۲۱۰ زن با میانگین سنی (۹/۷) ± ۳۱/۹ سال نمونه ها دریافت شد. ۹۴/۳٪ آنان متاهل بودند، ۷۶/۷٪ زایمان نداشتند و تنها ۲/۹٪ آنان سابقه سزارین داشتند. میزان علائم و عوارض در جدول ۱ نشان داده شده است. لازم بذکر است که هیچکدام سابقه ابتلا به سندرم TORCH، تریکوموناس، کاندیدا و کوكسی های گرم منفی نداشتند.

جدول ۱: میزان علائم و عوارض در زنان مبتلا به مایکوپلاسمای ژنیتال مراجعه کننده به کلینیک زنان و زایمان بیمارستان حضرت رسول (ص)

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

از ۲۱۰ نمونه کشت داده شده روی محیط های کشت اختصاصی اوره آپلازماها ، 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.

نتایج PCR-RFLP نشان داد که پس از برش آنزیمی محصول PCR مثبت نمونه های بالینی، در الگوهای برش آنزیمی بدست آمده تفاوتی وجود نداشت و همگی دارای یک الگو بودند، لذا PCR-RFLP علاوه بر تأیید نتیجه PCR نشان داد که اوره آپلازما اوره آلیتیکوم همگی از یک ژنوتیپ (سروار ۳) می باشند و تیپ های مختلف در نمونه های مطالعه حاضر مشاهده نشد. هم چنین بعد از انجام سکانس و BLAST کردن مشخص گردید که نمونه های ژنیتال مورد بررسی تنها بیووار ۱ (اوره آپلازما پاروم) را داشتند و بیووار T960 (اوره آپلازما اوراآلیتیکوم) از نمونه ها ایزوله نشد.

بحث:

علیرغم روشهای وسیعی که تاکنون از متدهای

آنالیتیکی برای تمایز مایکوپلازما استفاده شده است، ولی تشخیص مایکوپلازماها در حد 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 مایکوپلازماها، آن را به عنوان یک روش تایپینگ مایکوپلازماها محدود کرده است (۱۰، ۱۱، ۱۳). روشهای پروفایل پروتئین همانند آنالیز ایزوآنزیم، الکتروفورز یک بعدی و دوبعدی و ایمونوبلاتینگ هرچند دارای قدرت تمایز بالا می باشند، ولی نیازمند تعداد نمونه های زیادی برای آنالیز، زمان بر بودن و مشکل در گزارش دهی هستند. در مقابل روشهای مولکولی این مشکلات را ندارند و می توانند برای تایپینگ مایکوپلازماها مورد استفاده قرار بگیرند. یکی از روشهای مولکولی که برای همه انواع متفاوت میکروارگانیسم ها شامل باکتریها، قارچ ها قابل استفاده می باشد، PCR-RFLP است (۱۰). در این تکنیک آنزیم های محدودالتر که برای شکست DNA کروموزمی باکتری بکار می روند، اغلب برای شکست آمپلی کون ها (محصولات PCR) هم بکار می روند. انتخاب آنزیم اصولاً براساس دانش قبلی ما و براساس سکانس محصولات PCR در خصوص سایت های برش در محصول PCR بستگی دارند که متغیر می باشند و ابزار مفیدی در مقایسه کردن سویه ها هستند (۱۱).

مطالعه حاضر تطابق نسبی با مطالعات مختلفی که در ارتباط با بررسی میزان جداسازی مایکوپلاسمای تناسلی در نقاط مختلف دنیا انجام گرفته است، دارد. میزان جداسازی اوره آپلازما با روش کشت، از ۱۰ درصد در کشور چین (۱۶) تا ۵۴ درصد در آمریکا (۱۷) متغیر بوده است که در این بین مطالعه انجام گرفته در هند (۱۸) و ایران (۱۹) به ترتیب با میزان شیوع ۳۲ و ۳۶/۷ درصد، با مطالعه حاضر شباهت بیشتری دارد. میزان جداسازی اوره آپلازما با روش PCR، از ۲۰ درصد در کشور اتریش (۲۰) تا ۶۱/۹ درصد در روسیه (۲۱) متغیر است. در اینجا نیز میزان جداسازی بدست آمده در ایران و هند (با میزان شیوع حدوداً ۴۵٪) به درصد جداسازی که در این مطالعه بدست آمده است نزدیک تر می باشد. اختلاف داده های بدست آمده از دو روش، در شناسایی اوره آپلازماها (که در این مطالعه ۱/۴٪ بود) با اختلاف بدست آمده در مطالعات دیگر همخوانی داشت. بطور کلی همانطور که مشاهده میشود، در مطالعات مختلف شیوع اوره آپلازماها

ایزوله شده از نمونه های اورژنیتال ۸۰٪، بیووار ۱، ۱۳/۵٪، بیووار ۲ و ۶/۵٪ از هر دو بیووار را داشتند (۲۴). لازم بذکر است که مطالعات کنگ و همکارانش (۲۲)، نایسن و همکارانش (۲۵)، یی و همکارانش (۲۶) نشان دادند که بیووار اوره آپلازما پاروم نیز از نمونه های بالینی از زنان مبتلا به عفونت های ژنیتال بیشتر ایزوله می گردد. لازم بذکر است که تفاوت های مشاهده شده در مطالعات ممکن است ناشی از روش مطالعه، مکان نمونه گیری و نوع نمونه باشد.

نتیجه نهایی:

بطور کلی نتایج تکنیک PCR-RFLP در مطالعه حاضر نشان داد که هتروژنوسیتی بین اوره آپلازماها ایزوله شده مشاهده نمی گردد و همگی از یک بیووار (بیووار اوره آپلازما پاروم) می باشند، لذا میتوان گفت که عوامل ایجاد کننده عفونت های تناسلی در بین زنان مورد مطالعه در تهران ناشی از انتشار یک بیوار تکی می باشند که این کار درمان بیماران و پیگیری منشاء آلودگی را در آنها آسانتر می کند. در نهایت می توان بیان کرد که تکنیک PCR-RFLP یک سیستم تیپ بندی ساده، قابل تکرار پذیری با قدرت تمایز بالا می باشد که می توان از آن برای مطالعات مختلف از جمله ارزیابی شکست های درمانی بدلیل ظهور سویه جدید یا سویه قبلی، در ثبت سویه های اوره آپلازماها جدید که در آزمایشگاه ایزوله شده اند و در پیگیری و درمان اوره آپلازماها با یافتن منشاء آلودگی استفاده کرد. همچنین روش مناسبی جهت شناسایی و درک بهتر اپیدمیولوژی عفونت های اوره آپلازماها می باشد.

سپاسگزاری:

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی که ما را در اجرای این مطالعه یاری نمودند تشکر می نمایند. در ضمن از آقای دکتر Dohn از کشور دانمارک به خاطر ارسال نمونه DNA خالص اوره آپلازما 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.

متفاوت گزارش شده است که این امر می تواند ناشی از نوع مطالعه، جمعیت مورد مطالعه، تعداد نمونه، روش نمونه گیری، سن بیماران، نژاد، فرهنگ، منطقه جغرافیایی و روش آزمایشگاهی (کشت و نوع PCR) باشد. مثلا در مطالعه ای کریستوپلوس و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که بهداشت ضعیف ناحیه ژنیتال افراد مورد بررسی در تهاجم و التهاب واژن توسط اوره آپلازماها نقش دارد (۱۵).

مطالعه حاضر نشان داد ترادف ژنی گونه های مختلف اوره آپلازما دارای محل برش خاص خود می باشند، بطوریکه اگر در نمونه های کلینیکی گونه های مختلفی وجود داشته باشد، بعد از PCR نمودن، می توان براین اساس آنها را از همدیگر متمایز کرد. این نتایج مشابه مطالعات کنگ و همکارانش می باشد (۲۲) که مطرح نمودند با استفاده از ژنهای 16S rRNA نواحی فاصله اندازه داخل ژنی 16S rRNA -23S rRNA، زیر مجموعه های ژن اوره آز و انتهای ۵' MBA می توان گونه های اوره آپلازما را شناسائی و ساب تیپ کرد و با استفاده از این ژنها می توان این دو گونه (اوره آپلازما اوره آلیتیکوم و اوره آپلازما پاروم) را از همدیگر متمایز نمود. در مطالعه حاضر با توجه به این نکته از روی ژنهای نواحی فاصله انداز داخلی 16S-23S rRNA پرایمر ها طراحی شدند و نتایج PCR و سکانس آنها نشان داد که تنها بیووار ۱ (اوره آپلازما پاروم) از نمونه های کلینیکی ما جدا شده اند و این نتایج با استفاده از برش آنزیمی TaqI تأیید شد. چراکه تمامی نمونه های PCR مثبت بعد از برش آنزیمی یک الگو را نشان دادند و تفاوتی در الگوهای بدست آمده مشاهده نشد. هم چنین آنالیز نتایج PCR-RFLP و سکانس کردن نمونه های اوره آپلازما نشان داد که همگی از سرور ۳ اوره آپلازما پاروم بودند که این نتایج تقریبا مشابه نتایج مطالعات دیگر در این زمینه بودند که مطرح کرده بودند اوره آپلازما پاروم نسبت به بیووار ۲ (بیووار T960 یا اوره آپلازما اوره آلیتیکوم) بیشتر از نمونه های کلینیکی به خصوص از زنان جدا می شود. در مطالعه ای ابل هورن و همکارانش در آلمان گزارش کردند که ۸۱٪ اوره آپلازماهای ایزوله شده از زنان مراجعه کننده به کلینیک زنان و زایمان شهر مونیخ بیووار اوره آپلازما پاروم بودند (۲۳). هم چنین در مطالعه ای پاولسن و همکارانش نشان دادند که از ۶۸۰ اوره آپلازما

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, Yogeve 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. Lancet 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 Microbiol 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 cervicitis 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, Garmova 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.