مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره هفدهم، شماره 10، مهر1394، صفحه 59-53

مقایسه هویت مولکولی مایکو پلاسماهومینیس ادرار بیماران مبتلا به عفونتهای با سایر جدایه‌های مشابه موجود در بانک ژن

حکیمه افتخاری مقدم (MSc)[1]، بابک خیرخواه (PhD)[2*]، باقر امیرحیدری (PhD)[2]

1-گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاداسلامی واحدعلوم و تحقیقات کرمان
2-مرکزتحقیقات فارماسیوتیکس، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، ، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دریافت: 94/1/12، اصلاح:94/2/16، پذیرش:94/4/2

خلاصه

سابقه و هدف: مایکوپلاسماها از عوامل مهم عفونتهای ادراری هستند. پژوهشهای زیادی بر پایه روش‌های کشت و بیوشیمیائی جهت جداسازی این باکتری از دستگاه ادراری تناسلی انجام شده اما مطالعه مولکولی و فیلوژنتیک آنها اساس بررسی‌های اپیدمیولوژیک خواهد بود. هدف از این تحقیق جداسازی و تعیین هویت مولکولی مایکوپلاسماهومینیس جداشده از ادرار بیماران مبتلا به عفونتهای ادراری شهر کرمان و مقایسه توالی آنها با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن می باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه مقطعی 5 میلی لیتر ادرار میانی 50 بیمار مبتلا به عفونت ادراری پس از تأیید پزشک متخصص توسط آزمایشات پاراکلینیکی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه‌ای از ژن 16S rRNA مایکوپلاسما هومینیس به روش PCR تکثیر و پس از خالص سازی محصول PCR، جدایه‌های باکتری تعیین توالی شدند و سپس با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit هم ردیف‌کردن توالیها و مقایسه جدایه‌ها با یکدیگر و با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن انجام شد.

یافته‌ها: 3 جدایه مایکوپلاسما هومینیس جدا گردید. همردیف کردن توالی ها و مقایسه آنها با توالی‌های موجود در بانک ژن تفاوت معنی داری نداشت. مطالعات فیلوژنتیک انجام گرفته در این پژوهش و درخت فیلوژنتیک ترسیم شده نشان می‌دهد که یکی از جدایه‌های این پژوهش (جدایه H6) با سایر جدایه های ثبت شده در بانک ژن قرابت بالایی دارد و در یک دودمان قرار می‌گیرد. در حالیکه دو جدایه دیگر (H11 و H15) در یک دودمان جداگانه و کاملا مجزا از جدایه دیگر و سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن قرار گرفته و با تمام آنها قرابت ندارد.

نتیجه گیری: در این مطالعه پس از انجام PCR و جداسازی باکتری، با مقایسه توالی‌ها در بانک ژن تأیید گردید که هر سه جدایه بر اساس توالی ژن 16S rRNA، مایکوپلاسما هومینیس هستند.

واژه‌های کلیدی: مایکوپلاسما هومینیس، عفونت ادراری، واکنش زنجیره‌ای چندگانه، توالی نوکلئوتیدی، ژن 16S rRNA.

مقدمه

عفونت‌های دستگاه ادراری (Urinary Tract Infections) دومین نوع معمول عفونت در بدن هستند که علت حدود 8/3 میلیون ویزیت پزشکی در سال به حساب می‌آیند. زنان به این نوع عفونت مستعدترند (1). از باکتری‌های عامل عفونت تناسلی و ناباروری در درجه اول می‌توان به کلامیدیاها، مایکوپلاسماها و اوره‌پلاسماها اشاره کرد. بعد از این گروه، گنوکوک، انتروباکتر، استرپتوکوک، انتروکوک، گاردنرلا واژینالیس و غیره هستند که 4 مورد آخر شیوع کمتری دارند (2). مایکوپلاسماها عضو خانواده مایکوپلاسماتاسه بوده و به علت نداشتن دیواره سلولی در میان باکتری‌هایی که زندگی آزاد دارند از توانایی رشد و سنتز محدودی برخوردار هستند و برای رشد به محیطهای غنی و پیچیده نیازمندند. این باکتریها در میزبانهای مختلف مثل انسان، حیوان، گیاهان و حشرات بیماریزا می‌شوند. این باکتریها با اینکه از ساکنان طبیعی مجرای ادراری مردان می‌باشند بالقوه بیماریزا هستند. از 17 گونه جدا شده از انسان و در میان جنس‌های مایکوپلاسما و اوره پلاسماچهارگونه مایکوپلاسما پنومونیه، مایکوپلاسما هومینیس، مایکوپلاسما جنیتالیوم، اوره‌پلاسما اورەلتیکوم در انسان دارای اهمیت بیشتری هستند. (3). مایکوپلاسما هومینیس را می‌توان از دستگاه ادراری– تناسلی حدود 35% مردان و زنان بدون علامت جدا کرد اما عنوان شده که این ارگانیسم‌ها در ایجاد واژینوز باکتریایی، بیماری التهابی لگن، سپتی‌سمی پس از زایمان، سقط جنین خود به خودی، آندومتریت، پیلونفریت و اورتریت نقش دارند (4). اکتساب مایکوپلاسما هومینیس طی عبور از کانال زایمان ممکن است سبب مننژیت، عفونت خون، چشم و آبسه‌های مغزی در نوزادان گردد (6 و 5). این باکتری از آبسه‌های مغزی نیز جدا گردیده است (7). تحقیقات نشان داده که شیوع مایکوپلاسما هومینیس در افرادی که علائم عفونت ادراری را نشان می‌دهند از افراد فاقد علامت بیشتر است (8). با این حال به علت مشکلاتی که در زمینه کشت و جداسازی این باکتری‌ها در آزمایشگاه‌ها وجود دارد نقش این ارگانیسم در

▣ این مقاله حاصل پایان نامه حکیمه افتخاری مقدم دانشجوی رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد علوم وتحقیقات کرمان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر بابک خیرخواه
آدرس: کرمان، جاده جوپاری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه میکروبیولوژی. تلفن: 034-13241601
E-mail: b.kheirkhah@srbiau.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.53]

ایجاد عفونت انسانی و به ویژه عوارض نامطلوبی که به دنبال خواهد داشت در کشور ما کمتر مورد توجه قرار گرفته است (9). پژوهشها نشان داده است که روش‌های مولکولی برای جدا سازی مایکوپلاسماها از روش کشت حساستر بوده و ویژگی بالاتری دارند (10). تاکنون در خصوص جداسازی و مطالعات فیلوژنتیک مایکوپلاسما هومینیس در بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری در ایران پژوهشی انجام نگرفته است، هر چند که این باکتری به روش واکنش زنجیره‌ای چندگانه (PCR) از نمونه مایع منی مردان نابارور مراجعه کننده به پژوهشکده رویان جدا سازی و مورد مطالعات فیلوژنتیک واقع شده است (13-11). در سایر نقاط جهان نیز هنوز از روش کشت جهت جداسازی این باکتری استفاده می‌گردد (8). جداسازی و شناخت مولکولی این باکتری در بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری از اهمیت بالایی برخوردار بوده و می‌تواند به عنوان بخش مهمی از برنامه‌های کنترل بیماریهای منتقله از راه تماس جنسی به شمار آید. هدف از این تحقیق جداسازی مایکوپلاسما هومینیس از دستگاه ادراری زنان و مردان مبتلا به عفونتهای ادراری و مقایسه توالی جدایه‌ها با توالیهای موجود در بانک ژن می باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مقطعی در سه ماهه اول سال 1392 پس از تائید در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمان بر روی کلیه بیمارانی که با تشخیص بالینی پزشک مبنی بر احتمال ابتلا به عفونت ادراری به آزمایشگاه بیمارستان شفا کرمان معرفی و با آزمایشات پاراکلینیکی عفونت دستگاه ادراری آنها تأیید شد، انجام گردید. علائم بالینی این افراد شامل تکرر ادرار، سوزش ادرار، درد ناحیه لگن و تغییر ظاهری رنگ ادرار بود. با توجه به اینکه روش PCR یک روش کاملا اختصاصی و سریع جهت جداسازی عامل می‌باشد، در این مطالعه نمونه‌های اخذ شده غنی‌سازی نشده و مستقیماً مورد ارزیابی به روش PCR قرار گرفتند. پس از رسوب‌گیری نمونه‌های اصلی برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت کیاژن به نام KIAGEN-PCR Template Purification Kit-50 test استفاده شد. در این پژوهش از قطعه ای از ژن 16S rRNA به عنوان ژن هدف جهت ردیابی مایکوپلاسما استفاده گردید. کنترل مثبت استفاده شده جهت انجام واکنش‌های PCR سویه استاندارد مایکوپلاسما هومینیس (PG21) و کنترل منفی آب مقطر بود. توالی‌های نوکلئوتیدی و ویژگی آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص جنس مایکوپلاسما و گونه مایکوپلاسما هومینیس در این پژوهش و برنامه دمایی PCR جهت تکثیر ژنهای مورد نظر به ترتیب در جداول 1 و 2 نشان داده شده است. محصولPCR در ژل آگارز الکتروفورز گردید. ژل مورد استفاده یک درصد با محلول اتیدیوم بروماید به نسبت 0/5 میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر رنگ گردید. در این پژوهش از مارکر با bp 100 استفاده شد. پس از پایان مرحله الکتروفورز، ژل را از بافر خارج کرده و در دستگاه UV translluminator قرار گرفت، با دوربین مخصوص عکس گرفته و از آن پرینت تهیه گردید. نمونه‌های مثبت گونه با استفاده از کیت High Performance Purification kit خالص سازی شده و جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. توالیهای دریافتی ابتدا مورد ویرایش و آماده سازی قرار گرفتند، نواحی غیر قابل بررسی توالی‌ها، اصلاح و برای آنکه توالی‌ها در برنامه‌های بررسی توالی DNA قابل استفاده باشند فایلهای مربوطه به فایل FASTA تبدیل گردیدند. با استفاده از برنامه BLAST موجود در سایت NCBI برای هر یک از توالی‌ها توالی‌های مشابه جستجو شد و توالی‌های مشابه و متفاوت دریافت گردید. پس از انجام بررسی‌های اولیه، توالیهای مورد مطالعه و توالی‌های دریافت شده از بانک ژن NCBI، در نرم‌افزار Mega5 تحت بررسی هم‌ردیف سازی (Alignment) قرار گرفتند. برای این منظورابتداهمه توالی‌ها با استفاده از نرم افزار مذکور در نواحی مشترک هم اندازه شدند و سپس نتایج هم‌ردیف سازی در نرم افزار BioEdit برای نمایش آماده گردیدند. نتایج مربوط به هم‌ردیف سازی بر مبنی توالی سوش ATCC23114 تنظیم شده و موقعیت قطعه مورد بررسی از جایگاه 197 تا 491 ژنrRNA 16s بررسی گردید. درخت فیلوژنیک بر اساس روش UPGMA با بکارگیری نرم افزار Mega 5 تهیه شد و فایل مربوطه بصورت عکس ذخیره شد.

جدول 1. توالی‌های نوکلئوتیدی و آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص مایکوپلاسما هومینیس به روش PCR

Primer	Target gene	Sequence	Length
GSO MGSO	16S rRNA	F: 5′-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT -3′ R: 5′-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC -3′	163
RNA H1 RNA H2	16S rRNA	F: 5′-CAATGGCTAATGCCGGATACGC-3′ R: 5′-GGTACCGTCAGTCTGCAAT-3′	344

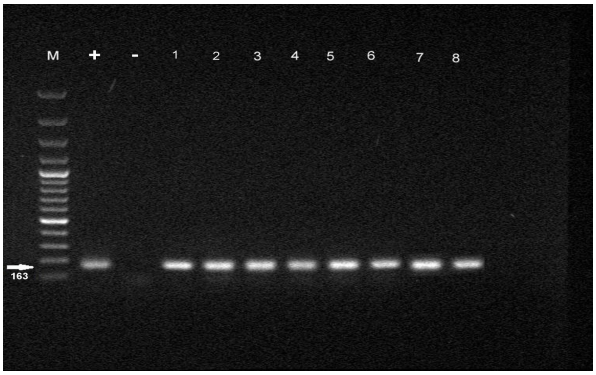
جدول2. برنامه دمایی آزمایش PCR

مرحله	دما	زمان(min)	چرخه
Prog.1: Predenature	94°C	6	1
Prog.2: Seg.1: Denature Seg.2: Annealing Seg.3: Extension	 94°C 55°C 70°C	 1 1 1	33
Prog.3: Full extension	72°C	7	1

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.53]

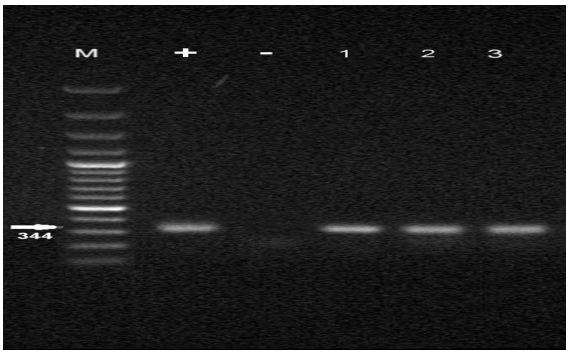
یافته ها

پس از آزمایش PCR بر روی 50 نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری نمونه‌های مثبت جنس پس از مشاهده باند 163 bp در ژل آگارز تأیید شدند (شکل 1) و نمونه‌های جنس مثبت برای تعیین گونه مایکوپلاسما هومینیس، تحت واکنش PCR قرار گرفته و تشکیل باند 344 bp بر روی ژل آگارز نشان دهنده گونه‌های مثبت مایکوپلاسما هومینیس بود (شکل 2). نتایج آزمایشات PCR مایکوپلاسما نشان می‌دهد که در 30 مورد از 50 نمونه ادرار دریافتی، جنس مایکوپلاسما تائید شد. همچنین با استفاده از آزمایش PCR، 3 مورد گونه مایکوپلاسماهومینیس مثبت شده است.که در جدول 3 نشان داده شده است.



شکل 1. تصویر ژل الکتروفورز محصولPCR با استفاده از آغازگر اختصاصی جنس مایکوپلاسما.(باندهای 163 در 8 نمونه‌جنس مثبت مشاهده می‌شود)

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



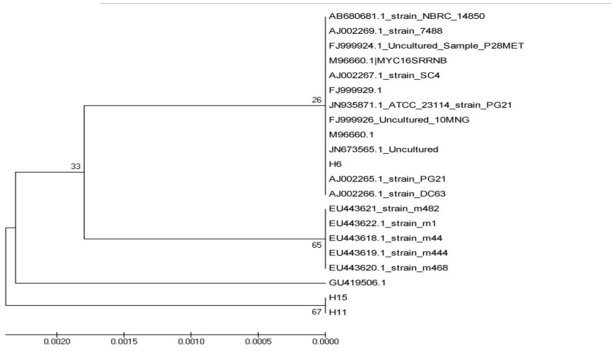
شکل 2. تصویر ژل الکتروفورز محصولPCR با استفاده از آغازگر اختصاصی گونه مایکوپلاسما هومینیس. (باندهای 344bp در 3 نمونه گونه هومنیس مثبت مشاهده می‌شود)

M: Marker 100bp; +: Positive Control. -: Negative Control. 1-3 positive Mycoplasma homenis samples.

همچنین همردیف سازی توالی‌ها و مقایسه آنها در بانک ژن نشان داد که جدایه‌های بدست آمده از لحاظ توالی ژن 16s rRNA، مایکوپلاسما هومینیس می‌باشند در جایگاه شماره 5 در پنج توالی دریافتی ازبانک ژن که با شماره دسترسی EU 443618 تا EU 443622 مشخص شده اند جایگزینی نوکلئوتید T با C دیده شد. در جایگاه 7 در توالی شماره 6 مربوط به همین مطالعه یک گپ مشاهده گردید که در مورد ژن 16s rRNA مورد نادری محسوب می‌شود. در جایگاه 246 در توالی جدایه GU 419506 یک مورد جایگزینی A با G دیده میشود و نیز در همین توالی در جایگاه 279 یک مورد گپ بچشم می خورد. در توالی های 11 و 15 مورد مطالعه ما در هر دو توالی در جایگاه 273 گپ و در جایگاه 276 جایگزینی A با T وجود داشت. درکل می‌توان گفت که توالی‌های مورد مطالعه با توالی‌های موجود در بانک ژن تفاوت چندانی ندارند و تفاوتهای جزئی هم که وجود دارند برای اثبات اصالتشان نیاز به تکرار تعیین توالی می‌باشد. درخت فیلوژنیک، به دوشاخه اصلی تقسیم می‌گردد. شاخه اول که شامل دو نمونه مورد مطالعه با نامهای H 15 و H 11 می‌باشد و از دیگر شاخه‌ها جدا قرار گرفته است در قسمت دیگر درخت در مجموع سه شاخه دیده میشود یک شاخه با یک تک نمونه با شماره GU 419506 که نشان دهنده اختلاف این نمونه با دیگر موارد است و نیز دو شاخه شامل سایر نمونه‌ها که نمونه H6 مورد مطالعه در مجموعه اکثریت غالب توالی‌های مورد مطالعه قرارگرفته است(شکل 3).

جدول 3. فراوانی نمونه‌ها بر اساس، PCR جنس مایکوپلاسما و PCR گونه مایکوپلاسما هومینیس

نمونه ها	PCRجنس	PCR گونه		
	تعداد(درصد)	تعداد	درصد از کل	درصد از جنس مثبت
مثبت	30(60)	3	%6	%10
منفی	20(40)	27	%54	%90
جمع	50(100)	30	%60	%100



شکل 3. درخت فیلوژنیک مقایسه جدایه‌های این پژوهش با جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن، H6، H11 و H15 جدایه‌های پژوهش حاضر هستند

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق مشخص گردید که این باکتری به دلیل نداشتن دیواره سلولی به شرایط محیطی مثل pH، دما و ترکیبات موجود در محیط کشت بسیار حساس است و امکان دارد در هنگام نمونه برداری یا انتقال به آزمایشگاه باکتری ضعیف شده از بین برود و در محیط کشت قابل بازیابی نباشد. در خصوص مقایسه

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.53]

کشت و PCRبرای تشخیص بالینی این عفونت پژوهش‌های زیادی انجام شد و همه آنها روش PCR را برای تشخیص بهتر از کشت دانسته‌اند(15و14). همچنین در روش‌های مولکولی برای انجام آزمایش نیاز به باکتری زنده نیست و نتایج کمتر تحت تأثیر نمونه‌برداری و شرایط انتقال قرار می‌گیرد. از طرف دیگر نتایج کشت در شرایط بسیار مطلوب بیش از چندین روز طول می‌کشد و به محیطهای کشت اختصاصی و پرهزینه نیاز دارد (16). جداسازی عامل عفونت در این تحقیق به روش PCR انجام شد که روش PCR را یک تست سریع و اختصاصی جهت جداسازی عوامل مایکوپلاسمایی عفونت‌های ادراری پیشنهاد می‌کند. در پژوهشهای مشابه دیگری که در سایر نقاط دنیا صورت گرفته نیز این روش همواره برای تشخیص دقیق‌تر و بعنوان یک روش مناسب با حساسیت بالا پیشنهاد شده است (14-17). Ahmadi و همکاران در تحقیق خود عنوان می‌کنند که PCR از تست‌های معمول سریعتر است و می‌تواند بعنوان یک روش قابل اعتماد در جداسازی مایکوپلاسماهای تناسلی بکار رود (12). Vosooghi و همکاران در تحقیقی به جهت جداسازی مایکوپلاسما هومینیس از ترشحات دستگاه تناسلی مردان نابارور که در مرکز ناباروری کرمان انجام گرفت نشان دادند که روش PCR از حساسیت و ویژگی بالایی نسبت به روش کشت برخوردار است و بدلیل دقت و سرعت بالا می‌تواند بعنوان یک تست تشخیصی مناسب در مرکز ناباروری کرمان در خصوص آزمایش مردان نابارور بکار برده شود (18). در پژوهش حاضر قطعاتی از ژن 16S rRNA جهت تکثیر با پرایمرهای تخصصی برای جداسازی جنس مایکوپلاسما و گونه مایکوپلاسما هومینیس در آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. محققین زیادی نیز روش PCR را برای تشخیص انواع مایکوپلاسما بر پایه تکثیر توالی‌های16S rRNA استوار نموده‌اند که می‌تواند در سطح جنس و گونه مایکوپلاسما را تشخیص دهد.(19) با توجه به اینکه در مطالعات قبلی خصوصاً در مطالعه Shahhoseini و همکاران نشان داده شده بود که پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش دارای حساسیت و ویژگی فوق العاده بالایی هستند، لذا حساسیت و ویژگی پرایمرها سنجیده نشد. مطالعه مذکور حساسیت بالا (100 درصد) و ویژگی خوب و مناسب (94 درصد) را برای جداسازی جنس مایکوپلاسما و گونه مایکوپلاسما هومینیس را با پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه را نشان می‌دهد (20).

در مطالعه حاضر از 50 نمونه مورد بررسی مایکوپلاسماهای عامل عفونت ادراری در زنان و مردان مجموعاً در 60 درصد جنس مثبت مایکوپلاسما تأیید شد که نشان می‌دهد عفونت مایکوپلاسمایی ادراری نقش بسزایی در بین عوامل این نوع عفونت‌ها در بین مردان و زنان دارد. Ghazisaeedi و همکاران نیز در پژوهشی عنوان نمودند که میزان عفونت مایکوپلاسمایی در بیماران مبتلا به عفونت ادرار 53 درصد است که نتایج تحقیق حاضر را تایید می‌کند (21). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که شدت عفونت ادراری با عامل مایکوپلاسما در شهر کرمان در زنان بیشتر از مردان می‌باشد. این نتایج در حالی است که بطور کلی نیز میزان عفونت‌های ادراری در زنان بیشتر از مردان است که دلیل آن را به وضعیت آناتومیکی دستگاه ادراری-تناسلی زنان نسبت به مردان و طول کوتاه مجرای ادراری در زنان نسبت می‌دهند. در حقیقت نتایج این تحقیق با یافته‌های حاصل از سایر پژوهش‌های صورت گرفته مشابه است (22). در بررسی Mosavyan و همکاران که به منظور جداسازی و تعیین وفورمایکوپلاسماهای عامل ایجاد عفونت در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی اهواز صورت گرفت، از مجموع بیماران مبتلا به عفونت مایکوپلاسمایی ادراری-تناسلی، 31/4 درصد را مردان و 68/6 درصد را زنان تشکیل می‌دادند. نتایج این پژوهش نیز میزان ابتلاء زنان به عفونت‌های مایکوپلاسمایی را بیشتر از مردان می‌داند (23). در مطالعه حاضر نتایج نشان داد از مجموع 30 بیمار آلوده به مایکوپلاسماهای ادراری 3 بیمار (10 درصد) گونه مایکوپلاسما هومینیس جدا گردید و 27 بیمار (90 درصد) به گونه‌های دیگر و یا احتمالاً به اوره پلاسما اوره-لیتیکوم آلوده بوده‌اند. البته تاکنون در خصوص جداسازی سایر گونه‌های مایکوپلاسما از عفونت‌های ادراری گزارشاتی بوده است. (24و12). در مجموع نتایج نشان می‌دهد که گونه مایکوپلاسما هومینیس مهمترین عامل باکتریایی جدا شده در بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری در شهرستان کرمان نیست. با وجود پژوهش‌های مختلف انجام شده در ایران و جهان، در خصوص مایکوپلاسماهای ادراری- تناسلی، تعیین توالی نوکلئوتیدی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی مایکوپلاسما بعنوان عامل عفونت‌های ادراری - تناسلی تاکنون در ایران انجام نشده بود. از اینرو با توجه به تفاوت سویه‌های مختلف در بیماریزائی و نیز تفاوت در تمایل باکتری به بافت‌های مختلف بررسی مولکولی و مطالعه هتروژنی آنها ضروری بنظر می‌رسید. لذا در این پژوهش پس از انجام PCR و جداسازی باکتری، جدایه‌های مثبت جهت انجام مطالعات مولکولی انتخاب شدند و با خالص سازی DNA توالی اسیدهای نوکلئوتیدی آنها مشخص شد. با مقایسه توالی‌ها در بانک ژن تأیید گردید که هر سه جدایه بر اساس توالی ژن 16S rRNA، مایکوپلاسما هومینیس هستند. مطالعات فیلوژنتیک انجام گرفته در این پژوهش و درخت فیلوژنتیک ترسیم شده نشان می‌دهد که یکی از جدایه‌های این پژوهش (جدایه H6) با سایر جدایه های ثبت شده در بانک ژن قرابت بالایی دارد و در یک دودمان قرار می‌گیرد. در حالیکه دو جدایه دیگر (H11 و H15) در یک دودمان جداگانه و کاملا مجزا از جدایه دیگر و سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن قرار گرفته و با تمام آنها قرابت ندارد. لذا می‌توان این جدایه‌ها را، جدایه‌های بومی شهر کرمان معرفی نمود. نتایج این تحقیق علاوه بر این که می‌تواند راهگشای درمان‌های صورت گرفته در مورد این بیماری باشد بلکه دسترسی به جدایه‌های مایکوپلاسما هومینیس با هویت مولکولی مشخص جهت استفاده در تحقیقات آینده و شناسایی عوامل عفونی دستگاه ادراری انسان را امکان پذیر نمود. جداسازی و تعیین هویت مایکوپلاسما هومینیس از ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری برای اولین بار در استان کرمان انجام گرفت. پیشنهاد می گردد توالیهای بدست آمده با سایر توالیهای این باکتری موجود در بانک ژن مقایسه و قرابتهای بین آنها مشخص گردد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از اساتید دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان و همکاران محترم بیمارستان شفا کرمان و همچنین از خانم سحر امیرپور رستمی بدلیل کمک‌های علمی تشکر و قدردانی می‌گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.53]

A Comparison between the Molecular Identity of Mycoplasma Hominis in Urine Samples of Patients with Urinary Tract Infections and Similar Strains Available in GenBank

H. Eftekhari Moghaddam (MSc)[1], B. Kheirkhah (PhD)*[2], B. Amirheidari (PhD)[2]

1.Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Kerman Science and Research Branch, Azad Islamic University of Kerman, I.R.Iran
2.Pharmaceutics Research Center, Neuropharmacology Research, Azad Islamic University of Kerman, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(10);Oct 2015; PP:67-73
Received: Apr 1th 2015, Revised: May 6th 2015, Accepted: Jun 23th 2015.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Mycoplasmal infections are one of the most important urinary infections. Various studies have applied culture studies and biochemistry to separate the bacteria from the urinary tract. However, it should be noted that molecular and phylogenetic analyses are based on epidemiologic evaluations. The purpose of this study was to determine the molecular identity of Mycoplasma hominis, separated from the urine samples of patients with urinary tract infections in Kerman, Iran and compare the sequences with other strains in GenBank.

METHODS: In this cross-sectional study, 5 ml mid-stream urine samples of 50 patients with urinary tract infections were collected. After the specialists confirmed the diagnosis of urinary tract infections in patients via paraclinical tests, segments of 16S rRNA gene were amplified, using specific primers of Mycoplasma hominis via polymerase chain reaction (PCR) technique. After purifying the PCR product, the sequences of bacterial strains were determined. Then, the sequences were aligned and the strains were compared with each other and other strains available in GenBank, using BioEdit software.

FINDINGS: Three Mycoplasma hominis strains were separated in this study. The alignment of sequences and comparison with strains available in GenBank did not indicate a significant difference between the strains. Based on phylogenetic analyses in this study and the phylogenetic tree, one of the strains (H6) was highly similar to the strains of GenBank and belonged to the same family. On the other hand, two strains (H11 and H15) were of a different lineage and were completely different from other strains in the present study and those recorded in GenBank.

CONCLUSION: In this study, after applying the PCR technique and bacterial separation, the sequences were compared with those in GenBank. All three strains were Mycoplasma hominis, based on 16S rRNA gene sequence.

KEY WORDS: *Mycoplasma hominis, Urinary tract infection, Polymerase chain reaction, Nucleotide sequence, 16S rRNA gene.*

Please cite this article as follows:

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 Sci. 2015;17(10):67-73.

***Corresponding Author: B. Kheirkhah (PhD)**
Address: Department of Microbiology, Science and Research Branch, Azad Islamic University of Kerman, Jopari Street, Kerman, I.R.Iran
Tel: +98 34 13241601
Email: b.kheirkhah@srbiau.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.53]

References

1.Maleki S, Motamedi H, Moosavian SM, Shahbaziyan N. Frequency of mycoplasma hominis and ureaplasmaurealyticum in females with urogenital infections and habitual abortion history in Ahvaz, Iran; Using Multiplex PCR. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(6):e10008.

2.Solimani Rahbar A, Golshani M, Fayaz F, RafieeTabatabaei S, Moradi A. Detection of mycoplasma DNA from the sperm specimens of infertile men by PCR. Iran J Med Microbiol. 2007;1(1): 47-53. [In Persian]

3.Ross JDC, Jensen JS. Mycoplasma genitalium as a sexually transmitted infection: implications for screening, testing, and treatment. Sex Transm Infect. 2008; 82(4):269-71.

4. Wetmore CM, Manhart LE, Lowens MS, Golden MR, Jensen NL, Astete SG, et al. Ureaplasmaurealyticum is associated with nongonococcal urethritis among men with fewer lifetimes sexual partners: a case-control study. J Infect Dis. 2011; 204(8):1274-82.

5.Amir Mozaffari N, Ahmadi MH, SedighiGilani MA, Kazemi B, MasjedianJazi F. Detection of mycoplasma hominis and ureaplasma urealyticum from semen samples of infertile men referred to royan institute in 2008. Razi J Med Sci. 2009;17(71):14-26. [In Persian]

6.Najar Peerayeh Sh, Samimi R. Detection of Mycoplasma Hominis in Endocervix Specimens from Infertile Women by PCR. Daneshvar. 2006;14(66):63-8. [In Persian]

7.Pailhorie H, Rabier V, Eveillard M, Mahaza C, Joly-Guillou ML, Chennebault JM, et al. A case report of Mycoplasma hominis brain abscess identified by MALDI-TOF mass spectrometry. Int J Inf Dis. 2014;29(5):166-8.

8.Abdul Wahab OM, Al-Shyarba MH, Assiry MM. Detection of Mycoplasma hominis in patients with urinary tract infections. Amr J Inf Dis. 2014;10(2):77-83.

9.Vosooghi S, Kheirkhah B, Kariminik A, Mirshekari T. A review of the role of Mycoplasma infections in human's infertility. N Cell Mol Biotech J. 2012;2(8):9-20. [In Persian]

10.Ratliff AE, Duffy LB, Waites KB.. Comparison of the illumigene Mycoplasma DNA amplification assay and culture for detection of Mycoplasmapneumoniae. J Clin Microbiol. 2014;52(4):1060-3.

11.Najar Pirayeh Sh, Al Yasin A. Comparison of PCR with culture for detection of Mycoplasma hominis in infertile women. Kowsar Med J. 2005;10(3):183-90. [In Persian]

12.Ahmadi MH, Amir Mozaffari N, Kazemi B, SedighiGilani MA, MasjedianJazi 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(3):371-80. [In Persian]

13. 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. Nephrourol Mon. 2014;6(6):e22390.

14.Mousavi A, Farhadifar F, Mirnejad R, Ramazanzadeh R. Detection of genital mycoplasmal infections among infertile females by multiplex PCR. Iran J Microbiol. 2014;6(6):398-403.

15.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(5):91-7. [In Persian]

16.Najar Peerayeh Sh, Zeyghami H, Farshchian M, Atoofi J. Comparison of PCR and culture for diagnosis of Ureaplasma urealyticum in genital specimens of infertile men. Hakim Res J. 2007;10(3):48-53. [In Persian]

17.Gdoura R, Kchaou W, AmmarKeskes L, Chakronn N, Sellemi A, Znazen A, Rebai T, Hammami A. Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, andMycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertilecouples. J Androl. 2008;29(2):198-206.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.53]

18.Vosooghi S, Kheirkhah B, Mirshekari T, Kariminik A, Soudabeh Hamidavi Mohammadpour1 , Naeimeh Mohseni Moghadam. Molecular detection of Mycoplasma hominis from genital secretions of infertile men referred to the Kerman infertility center. J Microbial world. 2013;6(1):14-22. [In Persian]

19.Ferguson NM, Hepp D, Sun S, Ikuta N, Levisohn SH, Kleven SH, et al. Use of molecular diversity of Mycoplasma gallisepticum by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphism DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. Microbiology. 2005;151(Pt 6):1883-93.

20.Shahhosseiny MH, Hosseiny Z, Tabarraii B, Akhlaghi F, Shokrgozar M, Moslemi A. PCR detection ofMycoplasma spp. contamination in cell culture. Iran J Med Microbiol. 2008;2(2):15-25. [In Persian]

21.Ghazisaidi K, Fateminasab F, Vatani Sh, Azimi Y, Bakhshande Nosrat S, Mohamadi M. Prostatic massage method versus first -void Urine samples to isolate Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum from urinary tract infection. Lab Med J. 2008;2(1):14-8.[In Persian]

22.Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik G, Vanezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital Mycoplasma. J Clin Microbiol. 2004;42(4):1528-33.

23.Moosavian SM, Pordeli HR. Survey of respiratory and urogenital infections due to Mycoplasma in the hospitalized patients in Ahwaz Imam Khomeini Hospital. Kerman Univ Med Sci J. 2003;10(4):185-92.[In Persian]

24.Liu J, Wang Q, Ji X, Guo S, Dai Y, Zhang Z, et al. Prevalence of Ureaplasmaurealyticum, Mycoplasma hominis, Chlamydia trachomatis infections, and semen quality in infertile and fertile men in China. Urology. 2014;83(4):795-9.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1394.17.10.8.3]
[DOI: 10.22088/jbums.17.10.53]