

فراوانی مایکوپلازما هومینیس در نمونه اندوسرویکس بیماران مراجعه کننده به بیمارستان کوثر قزوین در سال ۱۳۹۱

سامان سعادت^۱، تقی ناصرپور فریور^{۲*}، معصومه اصلانی مهر^۳، امیر پیمانی^۳، طلعت دباغی قلعه^۴، حسن جهانی هاشمی^۵، حمید بهرامی^۱، فرشته عباسی^۶، پوران جوهری^۷

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۲. دکترای میکروب شناسی پزشکی، استاد و مدیر گروه میکروب شناسی و رئیس مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۳. دکترای میکروب شناسی پزشکی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۴. متخصص زنان و زایمان، استادیار گروه زنان و زایمان دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۵. دکترای آمار حیاتی، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین
۶. کارشناس مامایی، بیمارستان کوثر قزوین
۷. کارشناس پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی قزوین

* نشانی برای مکاتبه: قزوین، اتوبان شهید بابایی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی taghin@yahoo.com
دریافت مقاله: مرداد نود و دو پذیرش برای چاپ: آبان نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: به دلیل اهمیت بالینی مایکوپلازما هومینیس به ویژه در طب زنان و دشواری تشخیص این ارگانیزم در مراکز آزمایشگاهی کشور، لازم است فراوانی باکتری مذکور در ایران بیشتر و دقیق تر مورد ارزیابی قرار گیرد. در این مطالعه تکنیک و فرمولاسیون محیط کشت طوری طراحی شده است که احتمال موفقیت در جداسازی باکتری از نمونه بالینی بیمار به نحو مطلوبی افزایش یابد. هم چنین میزان فراوانی مایکوپلازما هومینیس در جمعیت مورد مطالعه و نیز ارتباط بین حضور ارگانیزم در بدن و ایجاد علائم بالینی در بیماران بررسی شده است.

روش کار: این پژوهش از نوع اپیدمیولوژیک توصیفی بود که طی سال های ۹۲-۱۳۹۱ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین بر روی ۲۲۶ بیمار مراجعه کننده به درمانگاه زنان بیمارستان کوثر قزوین انجام شده است. نمونه مورد آزمایش، مخاط دهانه رحم (اندوسرویکس) بود که توسط سواب های داکرون نمونه برداری شد. سواب ها ابتدا در محیط های کشت مایع قرار گرفتند و حداکثر ظرف مدت ۲۴ ساعت به محیط کشت جامد انتقال یافتند. در این طرح ملاک مثبت شدن کشت، مشاهده کلنی های شبیه تخم مرغ نیمرو بر سطح محیط آگار بود و تغییر رنگ محیط کشت مایع به تنهایی منفی گزارش گردید.

یافته ها: از ۲۲۶ نمونه برداشت شده از دهانه رحم بیماران، ۳۰ نفر (۱۳/۲٪) از نظر کشت مایکوپلازما هومینیس و تشکیل کلنی بر روی محیط آگار، مثبت بودند.

نتیجه گیری: فراوانی مایکوپلازما هومینیس در قزوین قابل توجه بوده و تحقیقات بیش تری را در این زمینه می طلبد. استفاده از تکنیک و فرمولاسیون ساخت محیط های کشت که در این تحقیق به جزئیات آن اشاره شده است، می تواند حساسیت روش را بهبود ببخشد و قابلیت محیط های کشت در جداسازی این باکتری را افزایش دهد.

واژگان کلیدی: مایکوپلازما هومینیس، واژینوزیس، ناباروری، سقط جنین

مقدمه

مایکوپلازما هومینیس از کوچک ترین پروکاریوت های با زندگی آزاد است و به واسطه فقدان پپتیدوگلیکان در پوشش سلولی و استفاده از آرژنین به عنوان اصلی ترین منبع تأمین انرژی با سایر باکتری ها تفاوت دارد. این دو ویژگی سبب شده است تا تشخیص و درمان عفونت های ناشی از این ارگانسیم پرنیاز با دشواری هایی هم راه باشد. استقرار این باکتری در مجاری ادراری - تناسلی زنان سالم، هم زمان با شروع فعالیت های جنسی، آغاز شده و از همین طریق نیز قابل سرایت به دیگران است (۱). البته نقش پنهان تریکوموناس واژینالیس، به عنوان ناقل بیولوژیک این باکتری را نباید نادیده گرفت (۲). اگرچه همراهی مایکوپلازما هومینیس با عفونت های مجاری ادراری - تناسلی به کرات نشان داده شده است (۳)، اما دخالت این باکتری در ایجاد عفونت هایی چون پنومونی (۴)، آبسه های مغزی (۵)، تشکیل هماتوم و عفونت زخم ها (۶)، مننژیت (۷)، آرتریت عفونی (۸)، سقط های خودبه خودی (۹)، عفونت های نوزادان (۱۰) و باکتری می (۱۱) را نباید از نظر دور داشت. علاوه بر این، بررسی های اخیر هم راهی این باکتری با بدخیمی هایی از جمله سرطان پروستات را مطرح کرده اند (۱۲). با وجود توانایی های بالقوه مایکوپلازما هومینیس در ایجاد بیماری های مختلف، هنوز تشخیص این باکتری در مراکز آزمایشگاهی کشور با اشکالات فراوانی هم راه است و تنها گزارش های معدودی در خصوص میزان شیوع آن در تهران وجود دارد (۱۳). روش های سرولوژی همچون الایزا به دلیل تغییرات آنتی ژن های سطحی باکتری از حساسیت و ویژگی کافی برخوردار نبوده و قادر به تعیین تیتراژ آنتی بادی های اختصاصی در بدن بیمار نیستند (۱۴). جداسازی و کشت مایکوپلازما هومینیس از نمونه های بالینی به دلیل نیازهای رشدی پیچیده و دشواری های تکنیکی، از حساسیت کافی برخوردار نمی باشد. روش های مولکولی از جمله PCR از یک طرف هزینه تشخیص را بالا برده و از طرف دیگر به دلیل تغییرات ژنتیکی عمده ای که در ژنوم این باکتری روی می دهند، از ویژگی کافی برخوردار نیستند (۱۵) و (۱۶). از آنجا که روش کشت در تشخیص قطعی این باکتری هنوز از ارزش بالایی برخوردار است و به عنوان استاندارد طلایی مطرح می باشد و هم چنین روشی ارزان در تشخیص مایکوپلازما هومینیس به شمار می رود، طراحی یک سیستم کشت استاندارد به نحوی که حساسیت روش را بهبود بخشیده و قابلیت به اجرا در آمدن در مراکز تشخیصی و آزمایشگاهی کشور را داشته باشد ضروری به نظر می رسد. در این مطالعه تکنیک و فرمولاسیون محیط کشت طوری طراحی شده است که احتمال موفقیت در جداسازی باکتری از نمونه بالینی بیمار به نحو مطلوبی افزایش یابد. همچنین میزان فراوانی مایکوپلازما هومینیس در جمعیت مورد مطالعه و نیز ارتباط بین حضور ارگانسیم در بدن و ایجاد علائم بالینی در بیماران مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

این پژوهش از نوع اپیدمیولوژیک توصیفی بوده که طی سال های ۹۲-۱۳۹۱ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین بر روی ۲۲۶ بیمار مراجعه کننده به درمانگاه زنان بیمارستان کوثر قزوین انجام شده است. جمعیت مورد مطالعه زنان متأهل در محدوده سنی بین ۲۰ تا ۵۰ سال را تشکیل می دهد که پس از مراجعه به بیمارستان، طبق نظر پزشک متخصص زنان دارای علائم بالینی بودند و پس از تکمیل پرسش نامه و گرفتن رضایت نامه کتبی با امضای بیمار، جهت نمونه برداری مناسب تشخیص داده شدند. معیارهای

ورود به مطالعه شامل: ۱- داشتن ترشحات یا احساس سوزش و خارش در ناحیه واژن - ۲- سابقه ناباروری - ۳- سابقه سقط جنین - ۴- سابقه زایمان پیش از موعد و معیارهای خروج از مطالعه شامل: ۱- مصرف آنتی بیوتیک طی یک ماه گذشته - ۲- بارداری - ۳- گذراندن دوره قاعدگی بودند. برای روش نمونه برداری و انتقال نمونه مجرای تناسلی بیمار به کمک یک اسپیکولوم استریل و یک بار مصرف باز می شد تا شرایط بهتری برای معاینه و نمونه برداری فراهم گردد. اگر ناحیه بیرونی دهانه رحم (اگزوسروویکس) بیمار حاوی ترشحات بود، به کمک یک سواب استریل پاک سازی شد. از هر بیمار ۲ سواب گرفته شد. سواب ها از جنس داکرون (پلی استیرن) با دسته پلاستیکی سفید رنگ بودند که در بسته بندی های استریل مجزا قرار داشتند. هر سواب به اندازه تقریبی یک سانتی متر وارد ناحیه ابتدایی دهانه رحم (اندوسروویکس) بیمار شد و با وارد آوردن کمی فشار به مخاط ناحیه، سه بار چرخانده شد. هنگام خارج کردن سواب، از برخورد آن با سایر نقاط در مسیر نمونه گیری ممانعت به عمل آمد. سواب اول بلافاصله پس از برداشت نمونه، تحت شرایط استریل، در محیط های کشت مایع (نارنجی رنگ) قرار گرفت. نمونه برداشت شده توسط سواب دوم برای تهیه گسترش روی ۳ لام شیشه ای استفاده شد. لام ها از شماره یک تا سه شماره گذاری شدند. برای تهیه گسترش، از کشیدن سواب روی لام خودداری شد. با غلتاندن سواب در سطح لام (و نه کشیدن آن) سه خط مستقیم هریک به طول ۳ تا ۴ سانتی متر رسم شد و پس از تهیه لام سوم، سواب مذکور دور انداخته شد. لام های مذکور تنها جهت اقدامات بعدی تهیه شدند و در این طرح مورد استفاده قرار نگرفتند. محیط های کشت مایع که در این بررسی به عنوان محیط های انتقالی نیز مورد استفاده قرار گرفتند، به هم راه سواب های خود، تا اقدامات بعدی حد اکثر تا ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۲ تا ۸ درجه سانتی گراد نگه داری شدند. از محیط کشت PPLO متعلق به شرکت MERCK کشور آلمان به عنوان محیط پایه استفاده شد. محیط مذکور به دو صورت مایع و جامد تهیه گردید. برای تهیه محیط کشت PPLO مایع اصلاح شده با حجم یک لیتر ابتدا ۲۱ گرم محیط پایه PPLO مایع، در یک ارلن ۲ لیتری ریخته شد و ۱ لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. به کمک حرارت از حل شدن کامل پودر محیط کشت در آب مقطر اطمینان حاصل شد. پس از به دست آمدن محلول یک نواخت و شفاف، دهانه ارلن به کمک پنبه و گاز بسته شد و ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. برای اطمینان از عمل کرد اتوکلاو از چسب مخصوص اتوکلاو استفاده شد. پس از اتوکلاو، اجازه داده شد تا دمای ارلن در حدود ۴۵ درجه سانتی گراد پایین آید، سپس در این دما، مکمل های مورد نیاز به شرح زیر به آن اضافه گردید: عصاره مخمر ۲۵٪ با حجم نهایی ۱۰۰ میلی لیتر (متعلق به شرکت MERCK آلمان): ۲۵ گرم پودر عصاره مخمر پس از توزین در یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری ریخته شد. تا علامت مشخص روی بالن ژوژه، آب مقطر اضافه شد. بالن ژوژه ۱۵ دقیقه روی همزن مغناطیسی با دور مناسب قرار گرفت تا مخلوط یک نواختی حاصل آمد. مخلوط حاصل در ۱۰ لوله مناسب تقسیم شد. تمامی لوله ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی لوله ها در ظرف مناسبی جمع آوری شد. pH این محلول با اسید کلریدریک ۱ نرمال روی ۶/۵ تنظیم گردید و بعد از اتوکلاو کردن محیط پایه، به کمک فیلترهای ۰.۲ μm (متعلق به شرکت millipore کشور امریکا) به نسبت ۱۰٪ به آن اضافه شد.

و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند. سپس تحت شرایط استریل، سواب داکرون موجود در هر محیط پس از تخلیه مناسب محتویات آن در محیط مایع، از لولهٔ مربوطه خارج شد. لوله‌های حاوی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور 2000 rpm قرار گرفتند. مایع رویی هریک از لوله‌ها با رعایت شرایط استریل دور ریخته شد به نحوی که رسوب حاوی نمونه، در ته لوله‌ها باقی بماند. به رسوب باقی‌مانده در ته لوله‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع جدید اضافه شد. این محیط مایع جدید که قبلاً از یخچال خارج شده و دمای آن با دمای محیط یک سان است، برای یک نواخت شدن رسوب باقی‌مانده در ته لوله‌ها و رقیق کردن ترکیبات ضد باکتریایی احتمالی همراه نمونه، به کار گرفته شد. پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد از یخچال خارج شده و ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند. به کمک لوب‌های میکروپ شناسی، حداقل ۲۵ میکرولیتر از محیط مایع فوق به صورت نقطه‌ای روی محیط آگار انتقال یافت، بدون اینکه در سطح محیط پخش گردد. برای هر نمونه، سه نقطه کشت روی محیط آگار در نظر گرفته شد. لوله‌های محیط کشت مایع حاوی نمونه و پلیت‌های مربوطه، بلافاصله پس از کشت در انکوباتور (Memert آلمان) در مجاورت ۵٪ گاز CO₂ و درجه حرارت ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفتند. رطوبت محیط با قراردادن یک مخزن آب داخل انکوباتور فراهم گردید. تمامی لوله‌های حاوی محیط کشت مایع صرف نظر از تغییر رنگ، حداقل ظرف مدت ۲۴ ساعت و حداکثر پس از سپری شدن ۴۸ ساعت مجدداً روی محیط آگار به همان ترتیبی که ذکر شد کشت داده شدند. لوله‌های مذکور پس از ساب‌کالچر اولیه بلافاصله در انکوباتور CO₂ قرار گرفته و به صورت روزانه از نظر تغییر رنگ بررسی شدند. به محض مشاهده رنگ ارغوانی در این لوله‌ها، یک‌بار دیگر کشت در محیط آگار صورت گرفت و پلیت‌ها از نظر ایجاد کلنی مورد بررسی قرار گرفتند. پلیت‌های آگار حداقل ظرف مدت ۴۸ ساعت و حداکثر پس از سپری شدن ۴۸ ساعت از انکوباتور خارج شده و از نظر وجود کلنی بازبینی شدند. برای این کار سطح محیط جامد در نقاط کشت، زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۴ (درشت‌نمایی ۴۰ برابر) بررسی شد.

ملاک مثبت شدن کشت، مشاهدهٔ کلنی بر سطح محیط آگار بود و تغییر رنگ محیط کشت مایع به تنهایی و بدون رشد باکتری بر سطح محیط آگار منفی گزارش گردید. مشاهدهٔ کلنی‌های ریز با مرکز متراکم یا برآمده شبیه به تخم مرغ نیمرو، در سطح محیط آگار که در رنگ آمیزی گرم، باکتری خاصی را نشان نمی‌داد، به عنوان کشت مثبت از نظر میکوپلازما هومینیس در نظر گرفته شد.

در آنالیز داده‌ها از روش‌های آمار توصیفی استفاده شده است.

یافته‌ها

از ۲۲۶ نمونهٔ برداشت شده از دهانهٔ رحم بیماران، ۳۰ نمونه (۱۳/۲٪) از نظر کشت مایکوپلازما هومینیس و تشکیل کلنی بر روی محیط آگار، مثبت بودند (شکل ۱). از ۲۲۶ بیمار بررسی شده طبق تشخیص پزشکی متخصص زنان، ۲۷ نفر (۱۱/۹٪) نابارور، ۷۳ نفر (۳۲/۳٪) دارای سابقهٔ سقط جنین، ۱۴۷ نفر (۶۵٪) دارای ترشحات یا سوزش در ناحیهٔ واژن و ۳۵ نفر (۱۵/۴٪) دارای سابقهٔ زایمان پیش از موعد بودند. بدیهی است که برخی بیماران بیش از یک علامت بالینی را نشان می‌دادند

سرم اسب با حجم نهایی ۲۰۰ میلی‌لیتر (متعلق به شرکت بهار افشان ایران): سرم استریل از فریزر خارج شد و اجازه داده شد تا در دمای اتاق به حالت مایع درآید. پس از یک نواخت شدن، به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری شیکردار در دمای ۵۶ °C قرار گرفت. بعد از اتوکلاو کردن محیط پایه، سرم اسب استریل، به میزان ۲۰٪ به آن اضافه شد.

ال- آرژنین ۱۰٪ با حجم نهایی ۵۰ میلی‌لیتر (متعلق به شرکت MERCK آلمان): ۵ گرم پودر آرژنین در یک بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. تا علامت مشخص روی بالن ژوژه، آب مقطر اضافه گردید. بالن ژوژه مدت ۳۰ دقیقه روی هم‌زن مغناطیسی با دور مناسب قرار گرفت. pH این محلول با اسید کلریدریک ۱ نرمال روی ۶/۷ تنظیم شد و بعد از اتوکلاو کردن محیط پایه، به کمک فیلترهای ۰.۲ μm به نسبت ۵٪ به آن اضافه شد. سوکروز ۳۰٪ با حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر (متعلق به شرکت MERCK آلمان): ۳۰ گرم پودر سوکروز در یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد. تا علامت مشخص روی بالن ژوژه، آب مقطر اضافه گردید. بالن ژوژه به مدت ۳۰ دقیقه روی هم‌زن مغناطیسی با دور مناسب قرار گرفت و بعد از اتوکلاو کردن محیط پایه، به کمک فیلترهای ۰.۲ μm به نسبت ۱۰٪ به آن اضافه شد. فنل رد ۰/۲۵٪ با حجم نهایی ۲۵ میلی‌لیتر (متعلق به شرکت MERCK آلمان): ۰/۰۶۲ گرم پودر فنل رد در یک بالن ژوژه ۵۰ میلی‌لیتری تمیز ریخته شد. تا علامت مشخص روی بالن ژوژه، آب مقطر اضافه گردید. بالن ژوژه به مدت ۳۰ دقیقه روی هم‌زن مغناطیسی با دور مناسب قرار گرفت و بعد از اتوکلاو کردن محیط پایه، به کمک فیلترهای ۰.۲ μm به نسبت ۲٪ به آن اضافه شد. پنیسیلین G: ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به محتویات ویال پنیسیلین G 800 U/ml اضافه شد. بعد از اتوکلاو کردن محیط پایه، بدون نیاز به فیلتر، به نسبت ۰/۲۵٪ به آن اضافه گردید. آموتریسین B: ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به محتویات ویال اضافه شد. بعد از اتوکلاو کردن محیط پایه، بدون نیاز به فیلتر، به نسبت ۰/۱٪ به آن اضافه گردید. برای تهیهٔ محیط کشت PPLO جامد اصلاح شده با حجم یک لیتر ابتدا ۲۱ گرم محیط پایهٔ PPLO مایع و ۱/۳ گرم آگار (متعلق به شرکت MERCK آلمان)، در یک ارلن ۲ لیتری ریخته شد و ۱ لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. به کمک حرارت از حل شدن کامل پودر محیط کشت در آب مقطر اطمینان حاصل شد. پس از به دست آمدن محلول یک نواخت و شفاف، دهانهٔ ارلن به کمک پنبه و گاز بسته شد و ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. برای اطمینان از عملکرد اتوکلاو از چسب مخصوص اتوکلاو استفاده شد. پس از اتوکلاو، اجازه داده شد تا دمای ارلن در حدود ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد پایین آید، سپس در این دما، مکمل‌های مورد نیاز به آن اضافه گردید. تمامی مکمل‌های مورد استفاده در محیط کشت مایع با همان نسبت به استثنای محلول سوکروز و معرف فنل رد، در محیط آگار نیز اضافه شدند.

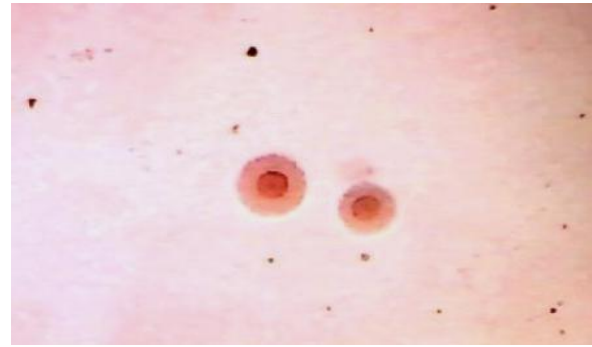
پس از آماده شدن محیط‌های کشت مایع و جامد، برای ریختن آنها در لوله‌ها و پلیت‌های استریل اقدام شد. حداقل ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع داخل لوله‌های شیشه‌ای ۱۰۰ × ۱۶ استریل با درب پنبه‌ای ریخته شد. همین مقدار از محیط کشت جامد نیز درون پلیت‌های ۶ سانتی‌متری ریخته شد. کلیهٔ محیط‌های مایع و جامد پس از خنک شدن داخل یخچال قرار گرفتند.

کلیهٔ محیط‌های کشت مایع که پس از نمونه‌گیری، داخل یخچال نگهداری می‌شدند، حداکثر ظرف مدت ۲۴ ساعت روی محیط آگار انتقال یافتند. برای این منظور محیط‌های کشت مایع حاوی سواب، از یخچال خارج شده

در سال های اخیر با وجود گسترش تکنیک های مولکولی در تشخیص مایکوپلازما هومینیس، روش کشت هنوز به عنوان استاندارد طلایی در شناسایی این ارگانیسم مطرح است. با توجه به فقدان دیواره سلولی در پوشش سلولی باکتری و در نتیجه حساسیت به شرایط محیطی و نیز پرنیاز بودن باکتری از لحاظ تغذیه ای، لازم است اصلاحاتی در تکنیک کشت و ساخت محیط های کشت مربوطه اعمال گردد تا حساسیت روش افزایش یافته و شرایط بهتری برای جداسازی و تشخیص این ارگانیسم فراهم آید.

در این مطالعه برای نمونه برداری از سواب های داکرون با دسته پلاستیکی استفاده شد تا مهارکننده های رشد باکتری ناشی از سواب های پنبه ای با دسته چوبی حذف گردند. یکی از ویژگی های متمایز در این بررسی نسبت به سایر پژوهش های انجام شده در ایران، حذف مرحله فیلتراسیون با فیلترهای $0.45 \mu\text{m}$ از روند کشت بود. ساختارهای آنتی ژنی متنوعی در سطح مایکوپلازما هومینیس از قبیل (Variable Adherence Associated Antigen, P100, P50, P120 وجود دارند که مسئول اتصال باکتری به سلول های مخاط دهانه رحم بیماران هستند (۲۴-۲۱). این اتصال برای حیات باکتری در بدن و حفاظت از آن در برابر سیستم دفاعی میزبان ضروری است. باکتری هایی که اتصال خود به سلول ها را از دست داده اند هم راه با بقایای سلولی و دفاعی میزبان در قالب ترشحات دهانه رحم یا واژن از بدن بیمار خارج می گردند؛ این ها غالباً باکتری های مرده یا ضعیفی هستند که توانایی رشد روی محیط های اختصاصی را ندارند. بنابراین برای جداسازی و رشد باکتری روی محیط های کشت، لازم است تا سلول های مخاطی دهانه رحم که باکتری های زنده و قابل رشد را روی خود حمل می نمایند، نمونه برداری شده و به محیط های کشت منتقل شوند. استفاده از فیلترهای مذکور که اکثراً برای حذف آلودگی مورد استفاده قرار می گیرند، با ممانعت از عبور سلول های مخاطی که باکتری ها به آنها چسبیده اند، مانع از عبور ارگانیسم های زنده شده و آنها را در پشت فیلتر نگه می دارند. در حالی که باکتری های جدا از سلول که یا مرده اند و یا قابلیت کافی برای رشد روی محیط های کشت را ندارند از این فیلترها رد می شوند. با حذف مرحله فیلتراسیون می توان به ارگانیسم های زنده که هنوز به سلول های مخاطی متصل می باشند دست یافت و آنها را روی محیط های کشت مربوطه منتقل نمود.

هرچند انتظار می رود در این روش، رشد سایر ارگانیسم های آلوده کننده، جداسازی و تشخیص مایکوپلازما هومینیس را تحت تأثیر قرار دهد، اما در این بررسی نشان داده شد که با وجود آلودگی برخی از کشت ها، از آنجا که شرایط رشد برای ارگانیسم مورد نظر به صورت بهینه فراهم شده است، رشد و جداسازی این باکتری در کنار سایر عوامل آلوده کننده، امکان پذیر خواهد بود (شکل ۲)، ضمن اینکه آلودگی با سایر ارگانیسم ها تنها در $14/6\%$ موارد دیده شد. در مطالعه ای که توسط نجارپیرایه و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد، مایکوپلازما هومینیس به روش کشت تنها در ۲۰ مورد از ۳۱۲ نمونه بیمار جدا شد ($6/4\%$) و این درحالیست که طبق نتایج مولکولی در همین بررسی موارد مثبت بیش از دو برابر این تعداد بوده است (۱۹). نتایج مشابهی نیز توسط امیرمظفری و همکاران در سال ۲۰۰۹ ارائه شده است که طی آن از بین ۲۱۰ نمونه، مایکوپلازما هومینیس در ۱۱٪ موارد از محیط کشت جدا شد در حالی که در بررسی مولکولی، موارد مثبت حدود ۲ برابر این میزان گزارش گردیده است (۱۴). حساسیت پایین کشت در این بررسی ها ضمن مشکلات اجتناب ناپذیر ناشی از شرایط تغذیه ای و رشد این باکتری، می تواند ناشی از فیلتراسیون نمونه بیمار نیز باشد.



شکل ۱. کلنی های مایکوپلازما هومینیس رشد یافته بر روی محیط کشت آگار. (درشت نمایی X100)

با وجودی که در این مطالعه تعداد بیماران نابارور برای محاسبات دقیق تر آماری کافی نبود اما جداسازی مایکوپلازما هومینیس از $22/2\%$ این بیماران در خور توجه می باشد. ارتباط معنی داری بین حضور این باکتری و سابقه سقط جنین یا زایمان پیش از موعد دیده نشد. با این حال باکتری مذکور از ۸ بیمار ($10/9\%$) با سابقه حد اقل یک بار سقط جنین و ۳ بیمار ($15/4\%$) دارای سابقه زایمان پیش از موعد جدا گردید. از بین ۱۴۶ بیمار مبتلا به واژینوزیس با علائمی همچون ترشحات یا احساس سوزش و خارش در ناحیه واژن، ۲۴ مورد ($16/4\%$) از نظر کشت مایکوپلازما هومینیس بر روی محیط آگار و تشکیل کلنی های قابل مشاهده مثبت بودند. بیشترین شیوع مایکوپلازما هومینیس در محدوده سنی بین ۳۰ تا ۳۹ سال مشاهده گردید. به طوری که از ۸۹ بیمار در این گروه سنی ۱۷ نفر ($19/1\%$) از نظر کشت این باکتری مثبت بودند.

بحث

کلینیزاسیون مایکوپلازما هومینیس در مجاری تناسلی زنان، هم زمان با شروع فعالیت های جنسی شروع می شود و در صورت فراهم بودن شرایط مناسب، می تواند تهدیدهای جدی را برای میزبان خود به دنبال داشته باشد. تغییرات فیزیولوژیک ناشی از بارداری در خانم ها، اهمیت این باکتری فرصت طلب در ایجاد آسیب هایی همچون سقط جنین، زایمان زودرس، عفونت نوزادان و تب های پس از زایمان را بیش از پیش مطرح می سازد، ضمن اینکه مواردی از ناباروری در بین زوج های جوان را نیز به این باکتری نسبت می دهند (۱۷). با وجود حساسیت بسیار بالای روش های مولکولی در تشخیص مایکوپلازما هومینیس، یکی از مشکلات عمده ای که در این مسیر گریبان گیر آزمایشگاه ها و محققین می باشد، تغییرات ژنتیکی این ارگانیسم است که به وفور در ایزوله های مختلف مشاهده شده است (۱۶ و ۱۷). از این رو طراحی پرایمرهای اختصاصی که ویژگی لازم برای شناسایی ایزوله های مختلف این باکتری را داشته باشند کار دشواری است. در برخی از مطالعات انجام شده در ایران مواردی از نتایج منفی کاذب با استفاده از روش PCR در مقایسه با کشت به چشم می خورد که عموماً به مهارکننده های آنزیم پلیمرز موجود در نمونه نسبت داده شده است (۱۸). در حالی که Stellrecht و همکاران در تحقیق خود نشان دادند که موارد منفی کاذب در روش PCR ناشی از مهارکننده های موجود در نمونه نمی باشد و احتمال تغییر در ژن هدف برای طراحی پرایمر را مطرح ساختند (۱۹).

نتیجه گیری

از آنجا که تشخیص کلینزاسیون و عفونت ناشی از مایکوپلازما هومینیس در دستگاه تناسلی زنان در مراکز آزمایشگاهی کشور با دشواری صورت می گیرد، استفاده از تکنیک و فرمولاسیون ساخت محیط های کشت اختصاصی که در این تحقیق به جزئیات آن اشاره شده است، می تواند حساسیت روش را بهبود ببخشد و قابلیت جداسازی باکتری از محیط های کشت را افزایش دهد.

در این بررسی هم چنین نشان داده شد که فراوانی ارگانیزم مذکور در قزوین قابل توجه بوده و تحقیقات بیش تری را در این زمینه می طلبد. پرداختن به این مهم می تواند در پیش گیری و کنترل عفونت های ناشی از این باکتری فرصت طلب، مؤثر واقع شده و از گسترش آن در جامعه ممانعت به عمل آورد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بر اساس پایان نامه کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی قزوین به انجام رسیده است که نهایت سپاس از مسئولین مربوطه به عمل می آید. هم چنین از زحمات هم کاران درمانگاه زنان بیمارستان کوثر قزوین بابت مساعدت در زمینه نمونه گیری و تکمیل پرسش نامه بیماران و نیز همکاران آزمایشگاه مرجع سلامت قزوین تشکر و قدردانی می گردد.

در بررسی دیگری که توسط امیرمظفری و همکاران در سال ۱۳۸۷ بر روی ۲۰۵ بیمار در تهران انجام شد، مایکوپلازما هومینیس از ۷/۷۶٪ نمونه ها به روش کشت جدا شد که با نتایج مطالعه حاضر اختلاف دارد. در همین بررسی نشان داده شد که باکتری مذکور در گروه سنی ۲۹ تا ۳۹ سال بیشترین فراوانی را دارد که با نتایج حاصل از این بررسی مطابقت دارد (۲۵).

در مطالعه حاضر تعداد بیماران با سابقه ناباروری ۲۷ نفر بود که جهت محاسبات آماری کافی نمی باشد. با این حال از بین این افراد، ۶ بیمار (۲/۲۲٪) از نظر کشت مایکوپلازما هومینیس مثبت بودند. این یافته با گزارشی که توسط Casari و همکاران از ایتالیا در سال ۲۰۱۰ منتشر شد متفاوت می باشد. طی آن بررسی از میان ۳۹۶ بیمار مبتلا به مشکلات ناباروری، تنها ۰/۲۵٪ افراد باکتری مذکور را در دستگاه تناسلی خود حمل می کردند. این آمار پایین می تواند ناشی از تکنیک کشت باشد، چراکه طی بررسی مذکور، برای کشت از محیط های کشت تجاری استفاده شد و ملاک مثبت بودن کشت فقط تغییر رنگ محیط مایع بود (۲۶).

در پژوهش مشابهی در ترکیه که توسط Bayraktar و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد، مایکوپلازما هومینیس از ۵٪ زنان باردار دارای علائمی چون ترشحات و سوزش یا خارش در ناحیه واژن جدا شد و فراوانی این باکتری در گروه سنی بین ۲۰ تا ۳۰ سال بیشتر از سایر گروه های سنی اعلام گردید (۲۷). در بررسی حاضر ضمن فراوانی بیشتر مایکوپلازما هومینیس در گروه سنی بین ۳۰ تا ۴۰ سال، باکتری مذکور از ۱۶/۳٪ زنان غیر باردار با علائمی مشابه مورد شناسایی قرار گرفت.

REFERENCES

1. Pereyre S, Sirand-Pugnet P, Beven L, Charron A, Renaudin H, Barre A, Avenaude P, et al. Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. *PLoS Genet* 2009; 5(10): e1000677.
2. Schlicht M, Lovrich S., Sartin J, Karpinsky P, Callister S, Agger W. High Prevalence of Genital Mycoplasmas among Sexually Active Young Adults with Urethritis or Cervicitis Symptoms in La Crosse, Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(10): 4636-4640
3. Dessı D, Delogu G, Emonte E, Rosaria C, Luigi F, Rappelli P. Long-Term Survival and Intracellular Replication of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* Cells: Potential Role of the Protozoon in Transmitting Bacterial Infection. *INFECTION AND IMMUNITY* 2005; 73 (2): 1180-1186.
4. Kilic D, Murad B, Kaygusuz S, Yilmaz E, Basar H, Batislam E. Prevalence and treatment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, and Mycoplasma hominis in patients with non-gonococcal urethritis. *Jpn. J. Infect. Dis* 2004; 57: 17-20.
5. Pascual A, Perez M.H, Jatón K, Hafén G, Di Bernardo S, Cotting J, et al. Mycoplasma hominis necrotizing pleuropneumonia in a previously healthy adolescent. *BMC Infectious Disease* 2010; 10: 335.
6. Al Masalma M, Drancourt M, Dufour H, Raoult D, Fournier P.E. Mycoplasma hominis brain abscess following uterus curettage: a case report. *J Medical Case Reports* 2011; 5: 278.

7. Koshiba H, Koshiba A, Daimon Y, Noguchi T, Iwasaku K, Kitawaki Jo. Hematoma and abscess formation caused by *Mycoplasma hominis* following cesarean section. *International Journal of Women's Health* 2011; 3: 15-8.
8. Hata A, Honda Y, Asada K, Sasaki Y, Kenri T, Hata D. *Mycoplasma hominis* meningitis in a neonate: Case report and review. *Journal of Infection* 2008; 57: 338-343.
9. Sendi P, Zimmerli W, Michot M. Spondylitis and Arthritis Due to *Mycoplasma hominis*: The Case for Awareness in Undefined Pleuropneumonia. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39: 1250-1251
10. Peltier M, Freeman A, Hong H, Cole B. Characterization and Partial Purification of a Macrophage-Stimulating Factor from *Mycoplasma hominis*. *American Journal of Reproductive Immunology* 2005; 54: 342-351
11. Aujard Y, Maury L. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections in newborns: personal data and review of the literature. *Arch Pediatr* 2005; 12 Suppl 1: S12-8.
12. Degirolamii P.C, Madoff S. *Mycoplasma hominis* Septicemia. *Journal of Clinical Microbiology* 1982; 16: 566-567.
13. Barykova Y.A, Logunov D, Shmarov Maxim M, Vinarov Andrei Z, Fiev Dmitry N. , Vinarova Natalia A. et al. Association of *Mycoplasma hominis* infection with prostate cancer. *Oncotarget* 2011; 2(4): 289-97.
14. Amirmozafari N, Mirnejad R, Kazemi B, Sariri E, Bojari M.R, Darkahi F. Comparison of polymerase chain reaction and culture for detection of genital mycoplasma in clinical samples from patients with genital infections. *Saudi Medical Journal* 2009; 30: 1402-1405.
15. Abdelmoumen M, Boutheina B, Ayari H, Béjaoui-Khiari A, Mlik B, Moalla I, Amouna F. Genetic variability of the P120' surface protein gene of *Mycoplasma hominis* isolates recovered from Tunisian patients with uro-genital and infertility disorders. *BMC Infectious Diseases* 2007; 7:142.
16. Mygind T , Zeuthen SÖgaard I , Melkova R , Boesen T , Birkelund S , Christiansen G. Cloning, sequencing and variability analysis of the gap gene from *Mycoplasma hominis*. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 183: 15-21.
17. Mygind T, Birkelund S, Christiansen G. DNA sequencing reveals limited heterogeneity v1 in the 16s rRNA gene from the *rrnB* operon among five *Mycoplasma hominis* isolates. *International Journal of Systemic Bacteriology* 1998; 48: 1067-1071.
18. Fenkci V, Yilmazer M, Cem Aktepe O. Have *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infections any significant effect on female fertility? *Le Infezioni in Medicina* 2002; 4: 220-223.
19. Najar Peerayeh S, Samimi R. Comparison Of Culture With The Polymerase Chain Reaction For Detection Of Gennital Mycoplasma. *European Journal of General Medicine*, 2008;Vol. 5, No. 2: 107-111
20. Stellrecht K.A, Woron Amy M, Mishrik Nada G, Venezia R.A. Comparison of Multiplex PCR Assay with Culture for Detection of Genital Mycoplasmas. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; 42(4): 1528–1533.
21. Zhang Q, Wise K S. Molecular basis of size and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesion encoded by divergent *vaa* genes. *Infection and Immunity* 1996; 64(7):2737-2744.

22. Henrich B, Feldmann R.C, Hadding U. Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infection and Immunity* 1996; 61: 2945-2951.
23. Henrich B, Hopfe M, Kitzerow A, Hadding U. The Adherence-Associated Lipoprotein P100, Encoded by an opp Operon Structure, Functions as the Oligopeptide-Binding Domain OppA of a Putative Oligopeptide Transport System in *Mycoplasma hominis*. *Journal of Bacteriology* 1999; 181(6): 4873 – 4878.
24. Ladefoged S.A, Christiansen G. *Mycoplasma hominis* expresses two variants of a cell-surface protein, one a lipoprotein, and one not. *Microbiology* 1998; 144: 761- 770.
25. Amirmozafari N, Jeddi F, Masjedian F, Haghghi L. Prevalence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in Genital Tract Infections. *Iran University of Medical sciences*, 2007; 61,62: 19-25.[Persian]
26. Casari E, Ferrario A, Morengi E, Montanelli A. Gardnerella, Trichomonas vaginalis, Candida, Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in the genital discharge of symptomatic fertile and asymptomatic infertile women. *NEW MICROBIOLOGICA*, 2010; 33: 69-76
27. Bayraktar MR, Ozerol IH, Gucluer N, Celik O. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. *International Journal of Infectious Diseases*, 2010; 14: 90-95