مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره ۳، پاییز۱۳۸۹، صفحات ۲۰-۱۴

شناسائی و تعیین ژنوتیپ مولکولی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* با روش PCR-RFLP در زنان مبتلا به عفونت های ژنیتال

رضا میرنژاد*[۱]، نور امیرمظفری[۲]، بهرام کاظمی[۳]

۱) مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
۲) گروه میکرب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۳) مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
نویسنده مسئول: رضا میرنژاد، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله(عج)
تلفن:۰۲۱-۸۲٤۸۲٥٥٤ rmirnejadreza@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۳/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۸/۳۰

چکیده:

زمینه و اهداف: به‌دلیل مشکلات زیاد جهت کشت *مایکوپلاسما ژنیتالیوم*، هیچ روش فنوتیپی برای تیپ بندی آن وجود ندارد. ولی قابل دسترس بودن سکانس ژنوم کامل آن فرصتی برای اهداف تیپ بندی ایجاد کرده است. این مطالعه جهت شناسائی و تعیین ژنوتیپ مولکولی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* با PCR- RFLP در زنان مبتلا به‌عفونت‌های ژنیتال انجام گرفت.

روش بررسی: از ۲۱۰ بیمار مراجعه کننده به‌درمانگاه زنان بیمارستان حضرت رسول(ص) طی سال‌های ۸۸-۱۳۸۷ نمونه سواب از ناحیه ژنیتال (واژن و سرویکس) تهیه شد. نمونه در بافر (PBS) به‌آزمایشگاه ارسال شد. برای انجام PCR- RFLP از یک جفت پرایمر اختصاصی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* برای تکثیر ناحیه ٤٦٥bp ژن 16S rRNA استفاده شد. بعد از انجام PCR و سکانس کردن محصول آن، نمونه‌های مثبت تحت اثر آنزیم‌های محدودالاثر AluI, Taq I, CacI8, BbsI, EcoRI قرار گرفتند. در نهایت ژنوتیپ *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* مشخص گردید.

یافته‌ها: از ۲۱۰ نمونه ژنیتال، ۱۱ نمونه (۵/۲٪) به‌روش PCR حاوی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* بود. نتایج PCR-RFLP نشان داد که همگی از یک ژنوتیپ بودند و سکانس تمام آنها با سکانس ژنوم سویه G37 *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* یکسان بود. از بین آنزیم‌های فوق تنها آنزیم محدودالاثر CacI8 توانایی تایپینگ و شناسائی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* را داشت.

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* از نمونه ژنیتال جدا می‌شود. تمام ایزوله‌ها یکسان هستند و در الگوهای آنزیمی آنها تفاوتی مشاهده نشد. لذا، در بین آنها هتروژنسیتی ژنتیکی وجود ندارد و عفونت در افراد مختلف می‌تواند ناشی از انتشار یک سویه منحصر بفرد باشد.

کلید واژه: *مایکوپلاسما ژنیتالیوم*، ژنوتایپینگ، PCR-RFLP

مقدمه:

مطالعات نشان می‌دهد کـه درک توزیـع و ارتبـاط پـاتوژن ضروری است. زیرا تعیین اپیدمیولوژی میکروارگانیسم‌ها و عفونت‌ها به طراحی روش‌هـای کنتـرل پـاتوژن‌هـا کمـک فراوان می‌کند. تایپینگ پاتوژن مشخص می‌کند ایزوله‌هـایی که از نظر اپیدمیولوژی وابسته هستند، آیا از نظر ژنتیکی نیز به‌هم مربوط می‌باشند؟ در گذشته از ویژگـی‌هـای فنـوتیپی مانند بیوتیپ، سروتیپ، باکتریوفاژ یـا باکتریوسـین تیـپ و الگـوی حساسـیت بـه آنتـی‌بیوتیـک جهـت تایپینـگ میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌شد. ولی با پیشرفت روش‌های مولکـولی در دو دهـه اخیـر، ایـن روش‌هـا در تایپینـگ مولکولی بسیار کارآمد شده‌اند. با تایپینگ مولکولی می‌توان شیوع عفونت‌های بیمارسـتانی، شناسـائی مخـازن آلـودگی ناشی از غذا یا انتشار سویه‌های پاتوژن گیـاهی در محـیط، جداسازی ژنوتیپ خاص در کونژوگاسیون با یـک بـاکتری خاص را مشخص کرد. هم‌چنین این روش‌ها به ما آگـاهی بیشتری از اصول اپیدمیولوژی و تکامل و انتشار بسیاری از بیماری‌های باکتریایی را می‌دهند. با اسـتفاده از تیـپ‌بنـدی مولکولی در بیمارستان‌ها با جلوگیری از شـیوع بسـیاری از عفونت‌های بیمارستانی به اقتصاد و سلامت جامعـه کمـک شایانی می‌شود. فناوری‌های مولکـولی کـه بـرای تایپینـگ میکروارگانیسـم‌هـا بکـار مـی‌رونـد عبارتنـداز: PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)، روش‌های متکـی بـر بـرش آنزیمـی، آنـالیز پلاسـمیدها و روش‌های تیپ‌بندی براساس PCR (٤-١).

*مایکوپلاسما*های تناسلی یکی از عوامل مهم ایجاد کننده عفونت‌های شایع واژینیت، سرویسیت و بیماری التهابی لگن (Pelvic Inflammatory Disease:PID) در زنان مراجعه کننده به کلینیک‌های زنان – زایمان هستند. این ارگانیسم‌ها به‌وسیله ارگانل‌های سطحی خود به‌سطوح مخاطی مجاری تناسلی می‌چسبند. با توجه به‌قدرت بالای کلونیزاسیون در اندوسرویکس، احتمال ایجاد عوارض خطر آفرین برای مادر و نوزادش را به‌دنبال دارند(۵و٦). *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* برای اولین بار در سال ۱۹۸۱ از نمونه‌های ادراری از مجاری ادراری مردان مبتلا به اورتریت غیرگنوککی (Non-gonococcal urethritis (NGU)) جدا گردید. این *مایکوپلاسما* شباهت‌های زیادی به *مایکوپلاسما پنمونیه* دارد و عامل PID، اورتریت، اندومتریت وسرویسیت است (۱۱-۷).

در حال حاضر به‌دلیل مشکلات زیاد جهت کشت *مایکوپلاسما ژنیتالیوم*، هیچ روش فنوتیپی و سرولوژی برای تیپ‌بندی آن وجود ندارد. ولی قابل دسترس بودن سکانس ژنوم کامل این ارگانیسم فرصتی را برای جستجوی مارکرها برای اهداف تیپ‌بندی و شناسائی آن ایجاد کرده است(١٤-١٢). یکی از روش‌های مولکولی که برای شناسائی، تمایز و تیپ‌بندی همه انواع میکرارگانیسم-ها قابل استفاده می‌باشد، PCR-RFLP است. استفاده از این فناوری در شناسائی و تمایز ارگانیسم بستگی به‌استفاده از پرایمرهای خیلی اختصاصی در PCR و آنزیم‌های محدودالاثر دارد(۲). این مطالعه جهت شناسائی و تعیین ژنوتیپ مولکولی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* با روش PCR-RFLP در زنان مبتلا به‌عفونت‌های ژنیتال انجام گرفت.

مواد و روش‌ها:

جمع‌آوری نمونه‌ها: در این مطالعه ۲۱۰ بیمار با علائم بالینی (جدول ۱) که از آذر ۱۳۸۷ تا شهریور ۱۳۸۸ به-درمانگاه زنان و زایمان بیمارستان دانشگاهی حضرت رسول اکرم (ص) مراجعه کرده بودند، انتخاب شدند. نحوه و شرایط انتخاب افراد این گونه بود که پس از معاینه توسط متخصص زنان و بررسی نتایج ازمایشگاهی آنها و عدم دریافت آنتی‌بیوتیک طی قبل از مراجعه، توسط سواب نمونه‌گیری از آنها انجام می‌گرفت. سواب نمونه‌های واژن

و سرویکس پس از تلقیح در میکروتیوپ حاوی **بافر** (PBS) سریعاً به آزمایشگاه ارسال می‌شد.

آماده سازی واکنش PCR و انجام آن:

استخراج DNA از نمونه‌ها با استفاده از کیت high pure PCR template Preparation Kit (ساخت شرکت Roche کشور آلمان) انجام شد. واکنش PCR در حجم نهائی ۳۰µL در نظر گرفته شد. هر نمونه شامل ۱۵µL 2X Master mix (ساخت کمپانی Ampliqon III کشور دانمارک) حاوی 1.5mM $MgCl_2$ ، ۱ µgr DNA الگو، ۲۰pmol از هر پرایمر R,F (جدول ۲) و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم۳۰ µL بود.

جدول ۱: توزیع فراوانی علائم در زنان مشکوک به ابتلا به مایکوپلاسماهای ژنیتال مراجعه کننده به کلینیک زنان و زایمان بیمارستان حضرت رسول(ص)

علامت	تعداد	درصد
سوزش	۲۲	۱۰/۵
خارش	۲٤	۱۱/٤
ترشح فراوان	۱۷۱	۸۱/٤
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

جدول ۲: سکانس پرایمرها جهت PCR-RFLP

Primers	Oligonucleotide sequences
MyUu F	5`- TGG AGT TAA GTC GTA ACA AG-3`
MyUu R	5`- CTG AGA TGT TTC ACT TCA CC-3`

فرآیند PCR در دستگاه ترموسایکلر شامل ۵ دقیقه ۹٤ درجه سانتی‌گراد، به‌دنبال آن ۳۰ سیکل ۳۰ ثانیه در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ٦۰ ثانیه در ٥٦ درجه سانتی‌گراد مرحله Annealing و ٦۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

سویه شاهد *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* G37 بود، که از کشور دانمارک و از طریق دکتر Dohn تهیه شد.

آنالیز محصول PCR:

برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگاروز ۳٪ و رنگ‌آمیزی DNA با رنگ SYBR® Green از تولیدات شرکت QIAGen (ساخت آمریکا) انجام شد. ژل‌ها با استفاده از دستگاه Gel Documentation بررسی شد. محصول PCR بدست آمده (قطعه ٤٦۰bp) *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* جهت تأئید تعیین توالی شد و با شماره GQ367563.1 در ژن بانک جهانی ثبت گردید.

ژنوتایپینگ *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* به‌روش-PCR RFLP :

جهت تایپینگ، بعد از دریافت سکانس DNA تکثیر (آمپلی‌فای) *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* با استفاده از برنامه BLAST ژنوتیپ آن با توالی ژنوم سکانس شده ردیف (Align) شدند. سکانس مورد مطالعه به‌نرم‌افزار Web Cutter داده شد، فهرست آنزیم‌ها و محل اثر آنزیم‌های محدودالاثر مختلف دریافت شد. برای انجام PCR-RFLP محصولات PCR بدست آمده *مایکوپلاسما ژنیتالیوم*، تحت اثر آنزیم‌های محدودالاثر AluI ,Taq I, CacI8, BbsI ,EcoRI قرار گرفتند(۱۵).

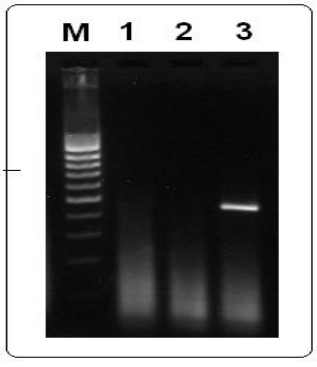
روش اجرای برش آنزیمی یا PCR-RFLP :

برای انجام برش آنزیمی یا PCR-RFLP ، ابتدا واکنش 15 µl ذیل برای نمونه‌های مثبت تهیه شد. 6.3µl آب مقطر استریل عاری از نوکلئاز، 1.5 µl بافر آنزیم، 0.2 µl آنزیم محدودالاثر (10-20 u) ، 7 µl محصول PCR. بعد از تهیه واکنش بالا حاوی آنزیم‌های فوق به‌طور جداگانه، میکروتیوپ‌های حاوی تمام آنزیم‌ها به‌جز آنزیم TaqI در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت و میکروتیوپ حاوی آنزیم TaqIدر ترموسایکلر در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. بعد از دو ساعت محصول RFLP روی ژل آگاروز ۳٪ همراه با مارکر و محصول PCR آنزیم نخورده الکتروفورز شدند. در نهایت اندازه قطعات حاصل از برش آنزیمی تمامی نمونه‌های PCR مثبت با یکدیگر مقایسه شدند و ژنوتیپ مربوطه براساس آنها تعیین گردید.

یافته ها:

نمونه‌ها از ۲۱۰ زن با دامنه سنی ١٦ تا ٦٥ سال (میانگین ۹/۷ ± ۳۱/۹ سال) جمع‌آوری شد. ۱۹۸ نفر (۹٤/۳٪) متاهل بودند، ١٦١ نفر(۷٦/۷٪) زایمان نداشتند و ٦ نفر(۲/۹٪) سابقه سزارین داشتند. علائم مراجعه کنندگان در جدول ۱ نشان داده شده است. هیچکدام سابقه ابتلا به سندرم TORCH، *تریکوموناس*، *کاندیدا* و کوکسی‌های گرم منفی نداشتند.

مایکوپلاسما ژنیتالیوم از ۱۱ نمونه (۵/۲٪) جدا شد. اندازه محصول PCR بدست آمده *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* ٤٦٠bp بود(شکل ۱).

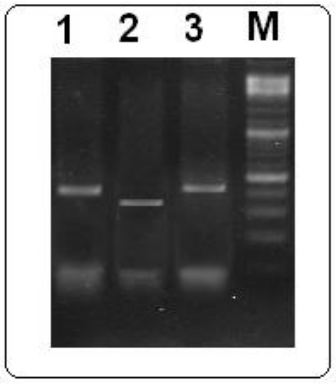


شکل ۱: تصویر ژل الکترفورز *مایکوپلاسما ژنیتالیوم*، ردیف ۱ مارکر (100bp DNA ladder, SM#333). نمونه ۳ از نظر *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* مثبت می‌باشد. بقیه نمونه‌ها منفی هستند.

نتایج PCR-RFLP نشان داد که پس از برش آنزیمی محصول PCR مثبت، در الگوهای برش آنزیمی تفاوتی وجود نداشت و همگی دارای یک الگو بودند (شکل۲). PCR-RFLP علاوه بر تائید نتیجه PCR نشان داد

مایکوپلاسما ژنیتالیوم در تمام نمونه‌های مثبت از یک سویه شاهد *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* G37 بود.

۱۸/ مجله میکرب شناسی پزشکی ایران (سال ۴ شماره ۳، پاییز۱۳۸۹) رضا میر نژاد و همکاران



شکل ۲: تصویر ژل الکترفورز برش آنزیمی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم*. ردیف های ۱ و۲ نشان دهنده محصول PCR مثبت *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* است که با آنزیم های TaqI و BbsI برش نخوردند. ردیف ۳ محصول هضم آنزیمی محصول PCR مثبت *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* است که با آنزیم Cac8I برش خورده و دو قطعه bp ۳۹۲ و bp۷۲ ایجاد شده است. ردیف ۱ محصول PCR مثبت *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* است که تحت برش آنزیمی قرار نگرفته و به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. ردیف ۵ مارکر (100bp DNA ladder, SM#333) است.

بحث:

در حال حاضر، هیچ روش فنوتیپی و سرولوژی معتبر برای تیپ بندی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* وجود ندارد. ولی قابل دسترس بودن سکانس ژنوم کامل این باکتری فرصتی را برای جستجو مارکرها برای اهداف تیپ‌بندی ایجاد کرده است(۱۵-۱۲).

مطالعه حاضر نشان داد بعد از PCR-RFLP ایزوله‌های *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* تفاوتی در الگوهای آنزیمی آنها مشاهده نشد. لذا، در بین آنها هتروژنسیتی ژنتیکی وجود ندارد، و تمام ایزوله‌ها یکسان هستند. لذا، عفونت در افراد مختلف می‌تواند ناشی از انتشار یک سویه منحصربفرد باشد. هم‌چنین، سکانس محصول PCR با سکانس ژنوم پروتوتیپ شاهد (سویه *مایکوپلاسما ژنیتالیوم*G37) یکسان است. بنابراین، می‌توان گفت که گونه شایع در ایران سویه *مایکوپلاسما ژنیتالیوم*G37 می‌باشد.

مطالعه‌ای مشابه مطالعه حاضر و بررسی با این آنزیم‌ها یافت نشد. ولی سایر مطالعات که براساس برش آنزیمی ژن‌های دیگر به‌خصوص MG192/P110 انجام شده نشان می‌دهند که؛ هتروژنسیتی در لوکوس سکانس MG192/P110 مشاهد می‌شود، چون بعد از برش آنزیمی، الگوهای متفاوتی ایجاد می‌گردد و هتروژنسیتی ژنتیکی وجود دارد، عفونت نمی‌تواند ناشی از انتشار یک سویه منحصربفرد باشد(۱۸-۱۶). مطالعه حاضر از نظر بدست آوردن یک تیپ در بین نمونه‌های بالینی مشابه مطالعه Hjorth و همکاران است که سویه‌های بالینی مورد بررسی آنها فاقد محل برش آنزیم مورد استفاده بوده و همگی از یک تیپ بودند(۱۹).

بیشتر بیماران مراجعه کننده از ترشح فراوان، خارش و سوزش رنج می‌برند. این نتایج مشابه مطالعات دیگر به‌خصوص مطالعاتStefanow – Zdrodowska و Christopoulos می‌باشد (۲۰،۲۱).

چون کشت *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* ۸ هفته طول می‌کشد مطالعات نشان داده که روش‌های آمپلی کردن (تکثیر کردن) DNA روش سریع و حساس تر از کشت است(۱۲-۱٤). نتایج مطالعه حاضر همانند مطالعه Stellrecht است که به‌جای کشت تشخیص *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* را فقط براساس فناوری PCR انجام داد. این

نتایج نشان می‌دهد کهPCR می‌تواند روش مناسبی برای جداسازی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* و سایر *مایکوپلاسما*های ژنیتال از نمونه‌های بالینی باشد(۲۲).

۵/۷ درصد از جامعه مورد مطالعه آلوده به *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* هستند. این نتایج تقریبا همانند مطالعه Luki و همکاران است که با فناوری PCR در زنان باردار انجام شد و از ۳/٦ درصد (۲مورد) *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* جدا کردند(۲۳). اختلافات مشاهده شده بین دو مطالعه می‌تواند ناشی از تعداد نمونه، گروه مورد مطالعه (زنان باردار) و نوع PCR باشد(۲۳).

مطالعه حاضر با مطالعاتی که در ارتباط با بررسی میزان جداسازی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* انجام گرفته است، مطابقت نسبی دارد. میزان جداسازی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* بین صفر درصد در انگلستان(۲٤) تا ۳٤/٤درصد در نیوزیلند(۸) متغیر است.

در مورد میزان جداسازی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* از نمونه‌های بالینی در ایران مطالعات اندک انجام شده است. در مطالعه افتخاری و وطنی(۲۵و۲٦) میزان جداسازی این باکتری از افراد دچار عفونت‌های تناسلی حدود ۲درصد است. نتایج با مطالعه حاضر تفاوت دارد، که ناشی از تعداد نمونه و نوع PCR می‌باشد.

در مطالعات مختلف شیوع *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* متفاوت گزارش شده است. این امر می‌تواند ناشی از نوع مطالعه، جمعیت مورد مطالعه (مصرف آنتی‌بیوتیک، ابتلاء به‌عفونت تناسلی، وجود شرکای جنسی متعدد و غیره)، تعداد نمونه، روش نمونه‌گیری، سن بیماران، نژاد، فرهنگ، منطقه جغرافیایی و روش آزمایشگاهی(کشت و نوع PCR) باشد.

نتیجه گیری:

نتایج فناوری PCR-RFLP نشان می‌دهد که بین *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* ایزوله شده هتروژنسیتی مشاهده نمی‌شود، لذا، می‌توان گفت که عوامل ایجاد کننده عفونت-های تناسلی ناشی از *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* در بین زنان مورد مطالعه ناشی از انتشار یک سویه منحصربفرد است. این امر درمان بیماران و پیگیری منشا آلودگی را آسان‌تر می‌کند. فناوریPCR-RFLP یک روش تیپ‌بندی ساده، قابل تکرارپذیری با قدرت تمایز بالا است. این روش می‌تواند برای مطالعات مختلف از جمله ارزیابی شکست‌های درمانی به‌دلیل ظهور سویه جدید یا سویه قبلی، در ثبت سویه‌های *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* جدیدی که جدا می‌شوند، در پیشگیری و درمان *مایکوپلاسما*های ژنیتال با یافتن منشاء آلودگی استفاده شود. هم‌چنین این روش جهت شناسائی و درک بهتر اپیدمیولوژی عفونت‌های *مایکوپلاسما*های ژنیتال مناسب است.

تشکر و قدردانی:

از معاونت محترم پژوهش دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی که ما را در اجرای این مطالعه یاری نمودند تشکر می‌شود. از آقای دکترDohn از کشور دانمارک به‌خاطر ارسال نمونه DNA خالص *مایکوپلاسما ژنیتالیوم*، قدردانی می‌گردد.

فهرست مراجع:

1. 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.

2. Belkum AV. DNA Fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7(2): 174–84.

3. Razin S, Herrmann R. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*, 1th ed , New york; Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2002; pp: 300-450.

4. Halbedel S, Stulke J. Tools for the genetic analysis of *Mycoplasma*. *Int J Med Microbiol* 2007;**297**(1):37-44.

5. Waites KB, Katz B, Schelonka RL: *Mycoplasmas* and *Ureaplasmas* as neonatal pathogens. *Clin Microbiol Rev*, 2005; **18**(4): 757-89.

6. Taylor-Robinson D. The role of *Mycoplasmas* in pregnancy outcome. *Best Practice Res Clin Obstet Gynaecol* 2007; **21**(3): 425-38.
7. Taylor-Robinson D. *Mycoplasma genitalum*- an up-date. *Int J STD AIDS* 2002; **13**(3):145-51.
17. Van Kuppeveld FJM, Van der Logt JTM, Angulo AF, Van Zoest MJ, Quint HGM, Niesters HG, *et al*. Genus and species-specific identification of *Mycoplasma* by 16S rRNA amplification. *Appl Environ Microbiol* 1993; **59**(9):2606-15.

Gaitanos LA, MacDonald EJ, Lund KA. High prevalence of *Mycoplasma genitalium* in women presenting for termination of pregnancy. *Contraception* 2008; **77**(4):294-98.
9.Uuskula A, Kohl PK. Genital Mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as sexually transmitted agents. *Int J STD AIDS* 2002; **13**(2): 79- 85.
10. Jensen JS: *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004; **18**(1): 1-11.
11. Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK, Dutro SM, Eschenbach DA, Stevens CE, *et.al*. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Dis* 2003 ; **18***7*(4):650-7
12. Sung H, Kang SH, Bae YJ , Hong JT, Chung YB, Lee CK, Song S. PCR-based detection of Mycoplasma species. *J Microbiol* 2006; **44**(1):42-49.
13. Jensen JS, Borre MB, Dohn B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2003, **41**(1): 261–66.
14. Baseman JB, Cagle M, Korte JE, Herrera C, Rasmussen WG, Baseman JG. Diagnostic assessment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(1): 203–11.
15. Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, Maes D, Baere TD, Verhelst R, *et al*. Evaluation of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for the identification of *Mycoplasma* species. *BMC Infect Dis* 2005; **5**(1):46-56.
16. Musatovova O, Herrera C, Baseman JB. Proximal region of the gene encoding cytadherence-related protein permits molecular typing of *Mycoplasma genitalium* clinical strains by PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 2006; **44**(2): 598–03.
polymorphisms in the rRNA operon and variable numbers of tandem repeats in the lipoprotein gene among *Mycoplasma genitalium* strains from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(10): 4876–78.
19. Hjorth SV, Bjo¨rnelius E, Lidbrink P, Falk L, Dohn B, Berthelsen L. Sequence-based typing of *Mycoplasma genitalium* reveals sexual transmission. *J Clin Microbiol* 2006; **44**(6): 2078–83.
20. Zdrodowska-Stefanow B, Kłosowska WM, Ostaszewska-Puchalska I, Bułhak-Kozioł V, Kotowicz B. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* infection in women with urogenital diseases. *Adv Med Sci* 2006; **51**:250- 53.
21. 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.
22. Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital *Mycoplasmas*. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(4): 1528- 33.
23. Luki N, Lebel P,Boucher M, Doray B, Turgeon J. Brousseau R. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital *Mycoplasmas* in perinatal infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; **17**(4):255 – 63.
24. Keane FE, Thomas BJ, Gilroy CB, Renton A, Robinson DT. The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observation on heterosexual women and their male partners. *Int J STD AIDS* 2000; **11**(6):356- 60.
۲۵. افتخاری ر. بررسی و مقایسه روش کشت و PCR در جداسازی *مایکوپلاسما*ها در زنان مبتلا به سرویسیت. پایان نامه برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد میکرب شناسی

دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران. شهریور ۸۰. شماره ۳۰۵۷.

۲۶. وطنی ش، قاضی سعید ک، محمدی م، ناجی ع، فاطمی نسب ف، زراعتی ح و همکاران. بررسی آلودگی با *مایکوپلاسما*های ژنیتال در زنان مبتلا به واژینوز باکتریایی کشت منفی با روش PCR. *مجله دانشگاه علوم پزشکی کرگان* ۱۳۸۵ ، دوره هشتم، شماره۱، ص ٤٥ تا ۵۰.