مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره ۴، زمستان۱۳۸۹، صفحات ۲۹-۲۱

بررسی امکان جایگزینی شیرخشک انسانی به‌جای سرم نرمال اسب به‌عنوان منبع کلسترول در محیط کشت اختصاصی *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم*

جعفر نویدمهر[۱]، سعید زیبایی [۱]، مسعود صالح مقدم [۲]، فضل الدین فهیمی مقدم [۳*]

۱) مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، مشهد
۲) دانشگاه پیام نور، مشهد
۳) آزمایشگاه تشخیص طبی بیمارستان حضرت ابوالفضل(ع)، کاشمر
نویسنده رابط: فضل الدین فهیمی مقدم، آزمایشگاه تشخیص طبی بیمارستان حضرت ابوالفضل(ع)، کاشمر
تلفن: ۰۵۳۲ -۸۲۳۸۳۰۰ fahimimf1@mums.ac.ir
تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۱۷ تاریخ پذیرش : ۸۹/۱۱/۱۲

چکیده:

زمینه و اهداف: *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* باکتری فرصت طلبی است که قادر به‌ایجاد بیماری‌هایی چون اورتریت، سقط جنین، سندروم تنفسی در نوزادان و ناباروری در انسان می‌باشد. راه اصلی تشخیص این باکتری، کشت نمونه‌های بالینی است که برای آزمایشگاه‌های روتین تشخیص طبی به‌دلیل هزینه زیاد مقرون به‌صرفه نیست. وجود سرم نرمال اسب به‌عنوان منبع کلسترول در محیط کشت از دلایل مهم گران و مشکل بودن کشت آن مطرح می‌شود. در این مطالعه تلاش شد تا با معرفی یک جایگزین ارزان و مناسب به‌جای سرم اسب از سختی و هزینه‌بری کشت کاسته شود. این مطالعه، شیرخشک انسانی را به‌عنوان ترکیب جایگزین مورد بررسی قرار داده است.

روش بررسی: برای به‌دست آوردن *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* از ۷۱ نمونه سرویکوواژینال و کشت بر روی PPLO Broth و PPLO Agar استفاده گردید. شیرخشک با غلظت‌های مختلف (۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ درصد) به‌محیط PPLO Broth قبل از اتوکلاو شدن، اضافه شد. برای تأیید *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* جدا شده از نمونه واژن و تأیید رشد آن بر روی محیط حاوی شیرخشک، علاوه بر توجه به‌ظاهر کلنی و استفاده از کلرور منگنز، از PCR استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* می‌تواند در محیط حاوی شیرخشک رشد نماید. محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های کم‌تر شیرخشک، رشد بیشتری از *اوره آپلاسما* را نشان دادند. به‌طوریکه در غلظت ۱/۲۵ درصد شیرخشک شاهد بیشترین رشد این ارگانیسم بودیم. این درحالی بود که محیط حاوی غلظت ۲۰درصد شیرخشک هیچ رشدی از *اوره‌آپلاسما* را نشان نداد.

نتیجه‌گیری: *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* قادر است در محیط کشت اختصاصی خود که در آن شیرخشک به‌عنوان منبع کلسترول (به‌جای سرم نرمال اسب) افزوده شده‌است رشد نماید.

واژگان کلیدی: *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم*، شیرخشک انسانی، سرم نرمال اسب.

مقدمه:

هرچند که عامل ۵۰ تا ۷۰ درصد از موارد اورتریت غیر گنوکوکی در ایالات متحده، ناشناخته است اما به‌نظر می‌رسد *مایکوپلاسما هومینیس* و *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* از عوامل معمول اورتریت باشند(۱). *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* تنها گونه *اوره‌آپلاسما* است که تاکنون از انسان جدا شده و نقش آن در بیماریزایی مورد بررسی قرار گرفته است(۲). این باکتری زیرمجموعه خانواده *مایکوپلاسماتاسه* است که اولین بار توسط شپارد(Shepard) در سال ۱۹۵۴ از اورتریت غیر گنوکوکی مردان جدا گردید(۳). کشت این باکتری پرنیاز (Fastidious)، نیازهای غذایی خاصی را می‌طلبد. در واقع به‌دلیل حضور کلسترول به‌عنوان بخش اساسی در ساختار غشایی *اوره‌آپلاسما*، این باکتری برای رشد، نیاز به‌حضور مواد غنی کننده همچون سرم اسب به‌عنوان منبع کلسترول در محیط کشت خود دارد. سرم اسب ماده‌ای است که استحصال و استریل کردن آن نسبتاً سخت و قیمت آن نیز نسبتاً گران است. از این‌رو، تلاش‌هایی برای جایگزین کردن ماده‌ای ارزان‌تر، سهل‌الوصول‌تر و فراوان‌تر از سرم اسب در محیط کشت *مایکوپلاسما* صورت پذیرفته است. مثلا می‌توان به‌بررسی جایگزینی شیرخشک و عصاره برخی دانه‌های گیاهی(مانند کنجد و بادام) به‌جای سرم اسب در محیط کشت *مایکوپلاسما* و یا زرده تخم‌مرغ در محیط کشت *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* (۵،۴) و یا جایگزینی زرده تخم‌مرغ در محیط کشت *مایکوپلاسما پنمونیه* به‌جای سرم اسب (۶) اشاره نمود.

در این مطالعه سعی گردید تا با بررسی امکان جایگزینی شیرخشک انسانی به‌جای سرم اسب در تهیه محیط کشت *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* و بررسی میزان رشد احتمالی باکتری، راهی برای پژوهش جهت ایجاد فرمولاسیونی جدید در تهیه محیط کشت *اوره‌آپلاسما* گشوده شود. به‌نحویکه آن فرمولاسیون، ارزان‌تر و قابل دسترس‌تر از آنچه هم اکنون موجود است باشد و بخش تشخیص آزمایشگاهی را برای کار بر روی کشت این باکتری راغب‌تر نماید. در نتیجه فرآیند درمانی با یک تشخیص صحیح و به‌موقع به‌سرانجامی مطلوب‌تر نایل گردد.

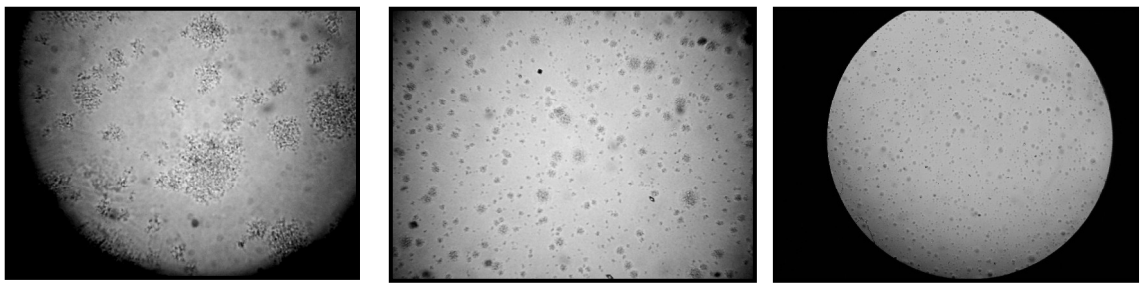
مواد و روش‌ها:

۱- کشت آزمایشگاهی: نمونه‌ها از کشت و بررسی سواب‌های تهیه شده از نواحی سرویکوواژینال ۷۱ زن مبتلا به اورتریت که به‌مطب یک متخصص زنان و سه مطب کارشناس مامایی در شهرستان کاشمر مراجعه کرده بودند، تهیه شد. بیماران حداقل یکی از علایم اورتریت یعنی ادرار کردن همراه با درد یا سوزش و یا حضور بیش از ۵ عدد لوکوسیت در نمونه ادرار (با توجه به‌نتیجه آزمایش کامل ادرار) را داشتند. از تمام بیماران، همزمان با کشت یک اسمیر مستقیم نیز بر روی لام تهیه شد (جهت بررسی عدم حضور *نایسریا گنوره* و اطمینان از اورتریت غیرگنوکوکی Non Gonococcal Urithritis یاNGU و افزایش احتمال *اوره‌آپلاسمایی* بودن اورتریت با توجه به‌انجام مطالعه آماری از میزان شیوع *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در زنان مبتلا به اورتریت غیرگونوکوکی در منطقه به‌موازات این مطالعه).

۷۳ نمونه اخذ شد که ۲ نمونه به‌دلیل حضور دیپلوکک‌های گرم‌منفی در لام مستقیم حذف گردید. نمونه‌ها توسط سوآب استریل جمع‌آوری شد و در محیط ترانسپورت (محیط PPLO Broth حاوی ۵ درصد سرم اسب و ۱۰۰۰ واحد پنی‌سیلین) به‌فاصله کمتر از ۲ ساعت در آزمایشگاه مورد آزمایش و بررسی قرار گرفتند. برای کشت نمونه‌ها از محیط PPLO Broth (محصول HI-Media M267) و PPLO Agar (محصول OXOID CM 401) که حاوی عصاره مخمر، فنل رد (اندیکاتور PH)، اوره و پنی‌سیلین (جهت ممانعت از رشد سایر ارگانیسم‌های مزاحم) بود. PH محیط حدود ۶ تنظیم شد. جهت پنی‌سیلین مصرفی برای محیط کشت و ترانسپورت از ویال ۲۰۰۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر نوع پن‌پتاسیم محصول داروسازی جابربن حیان استفاده شد. به‌ترتیب به‌میزان ۶۰۰ و۱۰۰۰ واحد پنی‌سیلین در هر میلی‌لیتر به‌محیط کشت اضافه گردید. بدین‌ترتیب که با افزودن ۰/۵ و ۰/۳ میلی‌لیتر از ویال فوق به ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت به‌ترتیب غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۶۰۰ واحد پنی‌سیلین در هر میلی‌لیتر محیط کشت حاصل شد. با توجه به‌عدم حضور دیواره

اسکلتی در گروه *مایکوپلاسما*، پنی‌سیلین که از آنتی-بیوتیک‌های مؤثر بر دیواره سلولی است بر این ارگانیسم‌ها فاقد اثر مهاری می‌باشد. نمونه هر بیمار با فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون به‌درون محیط‌های براث به‌طور جداگانه، فیلتر و تخلیه شد. محیط‌های کشت داده شده بلافاصله در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و به‌مدت یک هفته، هر روز از نظر تغییر رنگ (از زرد به ارغوانی) بررسی شدند. تجزیه اوره توسط *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* سبب ایجاد آمونیاک و قلیایی شدن محیط می‌شود. لذا، فنل رد از رنگ زرد به قرمز ارغوانی تغییر رنگ می‌دهد. به‌دست آوردن کلنی در مورد نمونه‌های مثبت بسیار حائز اهمیت است؛ چرا که ممکن است در اثر عوامل دیگری، تغییر PH و درنتیجه تغییر رنگ اندیکاتور PH در محیط حادث گردد.

برای تأیید رشد *اوره‌آپلاسما*، از محیط‌های تغییر رنگ یافته به‌میزان ۱۰۰ میکرولیتر بر روی محیط‌های جامد PPLO Agar مخصوص *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* تلقیح شد. ظروف پتری کشت داده شده در جای مرطوب تأمین کننده ۵ درصد CO_2 قرار داده شدند و ۴۸ ساعت پس از کشت، هر روز و به‌مدت یک هفته به لحاظ احتمال رشد باکتری مورد بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی قرار گرفتند. کلنی‌های *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* (شکل۱) بر روی محیط PPLO Agar معمولاً به‌صورت گرانولار و بسیار کوچک هستند و شکل تیپیک «تخم‌مرغ نیمرویی» را نشان نمی‌دهند.



شکل۱: عکس از کلنی‌های اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم با بزرگنمایی ۴۰*(راست) و ۱۰۰*(وسط) و ۴۰۰*(چپ)

برای اطمینان بیشتر، کلنی‌های حاصله با محلول کلرور منگنز (که حاوی اوره نیز هست) مجاورت داده شد. در اثر فعالیت اوره‌آز *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم*، اوره مصرف شده و با تولید آمونیاک و واکنش با $MnCl_2$ سبب تولید اکسید منگنز سیاه رنگ و تیره شدن کلنی می‌گردد.

۲- کشت بر روی محیط حاوی شیرخشک: به‌طور همزمان ۱۵ نمونه سرویکوواژینال به‌صورت تصادفی از میان نمونه-ها بر روی محیط حاوی سرم اسب و محیط‌های حاوی درصدهای مختلف شیرخشک (۲۰،۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵درصد)، کشت داده شد.

۳- انجام PCR: برای انجام PCR از پرایمرهای معرفی شده از ژن ساختمانی آنزیم اوره‌آز *اوره‌آپلاسما اوره-آلیتیکوم* (ناحیه‌ای با ۴۲۹ جفت باز) استفاده گردید(۸،۷) پرایمرها از کشور دانمارک (شرکت TAG Copenhagen) تهیه شد. ترادف بازی پرایمرها عبارتند از:

U5 Sense (forward; 5'-CAATCTGCT CGTGAAGTATTAC-3').
U4 Antisense (reverse; 5'-ACGACGTCCATAAGCAACT-3').

در این مطالعه، برای استخراج DNA از نمونه‌های کشتی که ظاهراً مثبت بودند (یعنی ایجاد تغییر رنگ در محیط Broth نموده بودند) از روش استخراج DNA از نمونه بالینی براساس روش Cadieux (۹) استفاده گردید: یک میلی‌لیتر نمونه براث تغییر رنگ یافته (ارغوانی شده) که ظاهراً از لحاظ *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* مثبت بود، ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰rpm سانتریفوژ شد و مایع رویی آن

خالی گردید. رسوب ته میکروتیوب توسط بافر PBS سه بار شستشو داده شد و پس از مخلوط نمودن رسوب مزبور با ۳۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر استریل، نمونه کاملاً هموژن گردید. سپس میکروتیوب مذکور، ۱۰ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و ۷ میکرولیتر از آن مستقیماً برای PCR استفاده گردید. PCR با استفاده از کیت خشک حاوی کلرور منیزیوم، دزوکسی‌نوکلئوتید تری‌فسفات‌ها و آنزیم Taq پلی مراز (که با نسبت‌های مشخصی با هم مخلوط گردیده‌اند) انجام شد. بدین‌ترتیب که ۱۰ میکرولیتر بافر به میکروتیوب آماده PCR افزوده شد. سپس ۲۰ پیکومول از هریک از پرایمرها به‌همراه ۷ میکرولیتر از DNA استخراج شده به میکروتیوب مزبور اضافه شد.

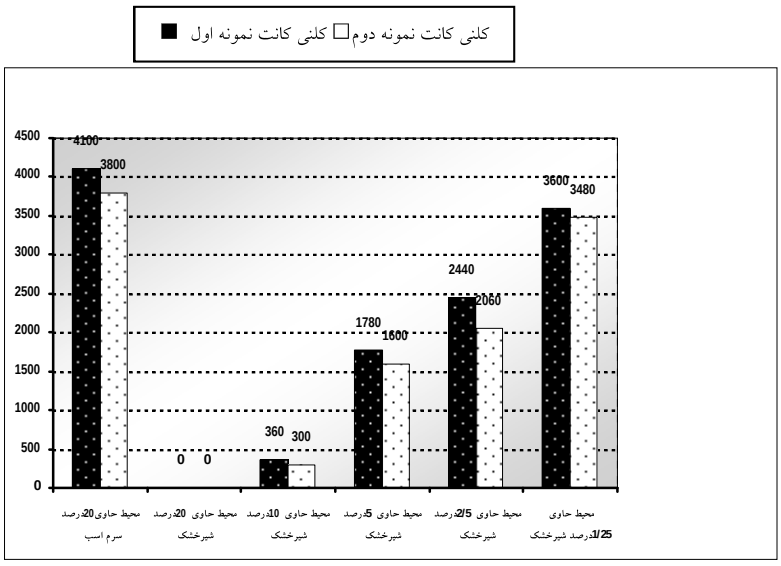
این مخلوط در دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف) قرار گرفت و برنامه چرخه‌های حرارتی به‌قرار ذیل تنظیم گردید: برنامه دناتوره شدن اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه با برنامه دناتوره شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها به DNA هدف در ۵۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه. مرحله extention نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی-گراد بود(۹).

یافته‌ها:

۲ نمونه از ۱۵ نمونه سرویکوواژینال که به‌طور همزمان بر روی محیط حاوی سرم اسب و بر روی محیط‌های حاوی غلظت‌های مختلف شیرخشک (۲۰، ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵درصد) کشت داده شده بودند، سبب تغییر رنگ در محیط براث گردیدند (از زرد به قرمز در محیط سرم‌دار و از سفید شیری به قرمز کدر در محیط‌های شیرخشک دار).

در ۲ نمونه فوق الگوی رشد جالبی رخ داد. پس از گذشت حدود ۶۰ ساعت، تغییر رنگ محیط در محیط‌های براث مشاهده شد، اما فقط در محیط سرم دار و همزمان در محیط حاوی ۱/۲۵ درصد شیر خشک. در روز چهارم تغییر رنگ محیط شیرخشک دار ۲/۵ درصد و در روز پنجم تغییر رنگ محیط شیرخشک دار ۵ درصد مشاهده گردید. در روز ششم هیچ تغییر رنگی در محیط ۱۰ و ۲۰ درصد شیرخشک دیده نشد. تا اینکه در روز هفتم (در یکی از نمونه‌ها ابتدای روز و در نمونه دیگر با حدود ۴ ساعت تأخیر)، در محیط ۱۰ درصد شیرخشک هم تغییر رنگ هرچند نه به‌شدت لوله‌های دیگر – مشاهده گردید. در محیط ۲۰ درصد شیرخشک حتی با افزایش زمان گرمخانه-گذاری تا ده روز هم تغییری در رنگ محیط مشاهده نشد. جالب اینجاست که PH محیط هم فقط حدود ۰/۳ در لوله۲۰ درصد شیرخشک افزایش یافته بود که این تغییر PH اولاً می‌توانست احتمالاً به‌دلیل تغییر غلظت محیط در اثر تبخیر و یا افزودن فیلتر به‌نمونه‌ها صورت گرفته باشد، ثانیاً آنقدر نبود که بتواند تغییری در رنگ اندیکاتور فنل رد ایجاد نماید.

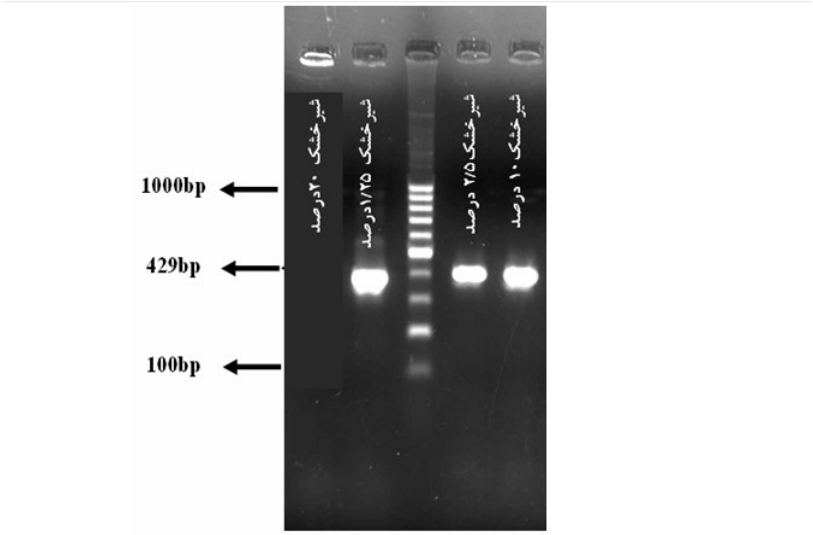
پس از شمارش کلنی‌های حاصل از هر دو نمونه، نتایج در نمودار ۱ منعکس شد.



نمودار۱- مقایسه نتایج حاصل از کلنی کانت *اوره آپلاسما* در محیط‌های کشت شیرخشک دار با محیط حاوی سرم نرمال اسب در دو نمونه جداگانه

در ادامه کار با توجه به کشت *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در محیط‌های کشت با غلظت‌های مختلف شیرخشک، رشد باکتری در غلظت‌های ۱۰، ۲/۵ و ۱/۲۵درصد و نیز عدم رشد باکتری در غلظت ۲۰ درصد شیرخشک، علاوه بر کشت و بررسی حضور کلنی، با PCR نیز مورد بررسی و تأیید نهایی قرار گرفتند(شکل ۲).

متذکر می‌شود رشد اولیه اغلب *مایکوپلاسماها* در محیط براث، با ایجاد کدورت جزئی تشخیص داده می‌شود. این مسأله با توجه به کدورت زیادی که شیرخشک در محیط ایجاد می‌نماید در تضاد است و عملاً تشخیص رشد اولیه باکتری را از روی وجود کدورت، غیرممکن می‌سازد. در طول انجام این مطالعه مشخص گردید باتوجه به آنکه رشد اولیه *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در محیط براث، با تغییر رنگ محیط از زرد به قرمز ارغوانی مشخص می‌شود، شیرخشک و کدورت ناشی از آن تأثیری در ایجاد و مشاهده این تغییر رنگ ندارد.



شکل۲-: باندهای حاصل از بررسی رشد *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* بر محیط‌های با غلظت‌های مختلف شیرخشک

بحث :

اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در دستگاه جنسی ۲۰-۵ درصد مردان دارای فعالیت جنسی و ۸۰-۴۰ درصد زنان دارای فعالیت جنسی یافت می‌شود(۱۰). لذا، از جمله باکتری-هایی است که انتقال جنسی دارد و قادر است سبب اورتریت، پروستاتیت، اپیدیدیمیت و ناباروری در مردان گردد(۱۴-۱۱). به‌طوریکه در تعدادی از موارد اورتریت غیرگنوکوکی مردان وجود *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* محرز گردیده است(۱).

بررسی‌های اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد *اوره‌آپلاسما اوره-آلیتیکوم* با ناباروری در انسان ارتباط دارد. در بعضی گزارشات میزان جداسازی *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* از سرویکس زنان نابارور و مایع منی همسران آنها بیشتر از زوج‌های سالم است (۱۱،۱۷-۱۵). چگونگی دخالت *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در ناباروری هنوز به‌خوبی روشن نشده است. مخصوصا که این باکتری از مایع منی مردان سالم نیز جدا می‌گردد(۱۰،۱۸). هرچند که گفته می‌شود تغییرات غشایی اسپرم ناشی از *اوره‌آپلاسما اوره-آلیتیکوم* می‌تواند سبب ارائه آنتی‌ژن‌های سطحی اسپرم‌ها به‌سیستم ایمنی بدن و تولید آنتی‌بادی علیه آن‌ها شود که به‌نظر می‌رسد از موارد مرتبط با ناباروری در مردان باشد(۱۹، ۲۰).

حضور *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در پارانشیم جفت در قبل از هفته ۲۸ حاملگی با احتمال خطر دردهای زایمانی زودهنگام یا زایمان زودرس، با خطر بیشتر التهابات جنینی و مادرزادی و افزایش خطر خونریزی‌های داخل عروقی و آسیب‌های مغزی جنین در ارتباط است(۲۱).

مایکوپلاسما هومینیس و *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در دستگاه تناسلی و ادراری و مجاری تنفسی ۱۸ تا ۴۵ درصد نوزادان متولد شده از مادر آلوده به *مایکوپلاسما هومینیس* و *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* یافت می‌شود. حدود ۳۰ درصد نوزادان آلوده به *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* دچار بیماری‌های مزمن ریوی شده و *مایکوپلاسما هومینیس* و *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* عامل اسپورادیک مننژیت نوزادان نیز می‌باشند(۲۲).

نشان داده شده است که در نوزادان نارس، کلونیزاسیون *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* با میزان شیوع بیماری‌های قبل از تولد و مرگ و میر حاصل از آن بیماری‌ها شامل پنمونی، سپسیس، مننژیت و بیماری ریوی مزمن(Chronic Lung Disease) ناشی از نارسی در ارتباط است(۲۳). در حقیقت کلونیزاسیون *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در مجاری تنفسی نوزادان نارس به‌طور قاطعی با پنمونی، دیس پلازی برونکوپولمونواری و بیماری ریوی مزمن در ارتباط است(۲۴).

گونه‌های *مایکوپلاسما* و *اوره‌آپلاسما* می‌توانند سبب بیماری تهاجمی به مفاصل و مجاری تنفسی همراه با انتشار از طریق خون(باکتریمی) گردند، به‌خصوص در بیمارانی که نقص و کمبود آنتی‌بادی دارند. گونه‌های *اوره‌آپلاسما* بیشترین عامل رایج در آرتریت‌های عفونی نزد بیماران هیپوگاماگلوبینمیک می‌باشد(۲۵). در سال‌های اخیر حتی نقش *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* به‌عنوان یکی از عوامل پریتونیت هم مطرح شده است(۲۶).

با توجه به‌آنچه بیان گردید و با وجود اهمیت فراوان *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم*، تشخیص این باکتری هنوز با چالش‌های فراوانی روبروست. راه اصلی تشخیص آزمایشگاهی *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* جداسازی از راه کشت است. کشت این باکتری، سخت، پر هزینه و با صرف نسبتاً زیاد وقت همراه است. زیرا کشت این باکتری پر نیاز، نیاز به‌محیط‌های اختصاصی و مکمل‌های غذایی مخصوص و کارشناس با تجربه دارد و ۲ تا ۴ روز طول می‌کشد تا نتیجه کشت معلوم گردد(۲۷).

از مهم‌ترین دلایل هزینه‌بری و سختی کشت این ارگانیسم حضور سرم نرمال اسب به‌عنوان منبع کلسترول در محیط کشت آن است. زیرا با توجه غشای حاوی کلسترول این باکتری، حضور یک منبع کلسترول در محیط کشت آن ضروری است. تلاش‌های متعددی برای حذف سرم نرمال اسب از محیط کشت *مایکوپلاسماها* و از جمله *اوره-آپلاسما* و جایگزینی آن با ترکیب دیگری که به‌عنوان منبع کلسترول، جایگزین مناسب و ارزان قیمتی نسبت به سرم اسب باشد انجام گرفته است. از جمله می‌توان به‌مطالعات نوید مهر و همکاران برای جایگزینی شیرخشک و عصاره برخی دانه‌های گیاهی(مانند کنجد و بادام) به‌جای سرم اسب در محیط کشت *مایکوپلاسما* و زرده تخم‌مرغ در محیط کشت *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* انجام داده‌اند اشاره نمود(۴، ۵). در مطالعه نوید مهر و همکاران نشان داده شده است که با جایگزینی شیرخشک به‌جای سرم نرمال اسب در محیط کشت *مایکوپلاسما آگالاکتیه* میزان رشد این باکتری تقریبا مشابه با محیط حاوی سرم اسب بوده و حتی قطر کلنی‌های رشد یافته برروی محیط حاوی شیرخشک از محیط سرم دار بزرگتر بوده است(۵). همچنین در سال ۱۹۸۳ ساساکی و همکاران تأثیر زرده تخم‌مرغ را در محیط کشت *مایکوپلاسما پنمونیه* به‌جای سرم اسب مورد بررسی قرار دادند و نتایج آن را مطلوب ارزیابی نمودند(۶).

حکیمی در سال ۱۳۸۷ بر روی میزان کلسترول موجود در منابع مختلف از جمله شیرخشک مطالعه‌ای انجام داد و میزان کلسترول شیرخشک را با دو روش مختلف حدود ۱۱/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه نموده است(۲۸). در مطالعه پیش‌رو، با بررسی قابلیت *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم*

در استفاده از کلسترول این ترکیب جهت رشد بدون حضور سرم نرمال اسب، نشان داده شد که اوره‌آپلاسما به‌احتمال زیاد قادر به‌چنین عملکردی می‌باشد. در این بررسی مشخص گردید *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در بین غلظت‌های بررسی شده شیرخشک در محیط کشت، غلظت ۱/۲۵ درصد (کم‌ترین غلظت مورد بررسی) بیشترین میزان رشد را نشان می‌دهد. نکته حائز اهمیت آن است که این باکتری علیرغم توانایی رشد بر روی محیط کشت حاوی شیرخشک، این توانایی تکثیر را در روی محیط‌های کشت با غلظت زیاد شیرخشک از دست می‌دهد. بررسی علل و عوامل دخیل در این امر می‌تواند یک فرصت مطالعاتی جدید محسوب شود.

نتیجه گیری:

نتایج این مطالعه نشان داد که *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در محیط فاقد سرم اسب که شیرخشک جایگزین آن شده است قادر به‌رشد است. این باکتری پرنیاز، به‌احتمال زیاد شیرخشک را به‌عنوان منبع کلسترول در محیط، می‌پذیرد. نشان داده شد که *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* در محیط حاوی غلظت ۱/۲۵ درصد شیرخشک بهترین رشد را دارد. به‌هرحال انجام مطالعات تکمیلی با تعداد نمونه‌های بیشتر و بررسی غلظت‌های بیشتر از شیرخشک می‌تواند نتایج دقیق‌تر و قابل اعتمادتری را به‌دست دهد.

فهرست مراجع:

کنگره میکرب‌شناسی، دانشگاه شاهد، دانشکده‌پزشکی، ۱۳۸۰.

6- Sasaki T, Shintani M, Kihara K; Utility of egg yolk medium for cultivation of *Mycoplasma pneumoniae* *J Clin Microbiol*. 1983; **18**: 1167–1173.

7-Cassell GH,Waites KB, Watson HL, Crouse DT , Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* interauterine infection: Role in prematurity and disease in newborns. *Clin Microbiol Rev* 1993 **6**: 69-87.

8-Blanchard, A ; *Ureaplasma urealyticum* urease gene: use a tryptophan codon. *Mol. Microbiol* 1990; **4**:669-676.

9-Cadieux N, Lebel P, Brousseau R. Use of a triplex polymerase chain reaction for the detection and differentiation of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in the presence of human DNA.*J Gen Microbiol* ;1993;**139**:2431-2437.

۱۰- بروکس ژ، آمورس؛ ترجمه ستوده نیا ع. *میکرب‌شناسی جاوتز*، چاپ اول، تهران، انتشارات ارجمند، ۱۳۸۷، صص ۳۴۱-۳۳۶.

۱-ادیب‌فر پ، *میکرب‌شناسی پزشکی*، چاپ چهارم، تهران، انتشارات نشر ایران، تهران، ۱۳۷۵، صص ۳۰-۲۹.

2- Blanchard A, Henstehel J , Duffy L,Blandus K,and Cassell G.H . Detection of *Ureaplasma urealyticum* by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. *Clin Infect Dis* 1993; **17** (suppll):48-53.

3-Shepard, M.C; Lunceford C.D., Ford D. K., R. Purcell H,. Taylor-Robinson D, Razin S, Black F.T.. *Ureaplasma urealyticum* gen.nov; *J. Syst. Bacteriol*. 1974(24):160-171.

۴- نویدمهر ج، بررسی امکان جایگزینی زرده تخم مرغ به‌جای سرم نرمال اسب در محیط *مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم*، سومین کنگره سراسری میکروبیولوژی ایران، دانشگاه علوم پزشکی همدان، ۱۳۷۹.

۵- نویدمهر ج، معرفی جایگزین‌های مناسب برای سرم نرمال اسب در محیط کشت *مایکوپلاسماها*، چهارمین

culture: its relationship with accessory gland function,sperm quality, and autoimmunity.*Fertil. Steril*; 1990 ;**53**:331-336.

21- Olomu N, L. Hecht J, O. Onderdonk A, N. Allred E, Leviton A. Extremely low gestational, perinatal correlates of *Ureaplasma urealyticum* in placenta parenchyma of singleton pregnancies that end before 28 weeks of gestation;*PEDIATRICS;*2009;**123**:1329-1336 (doi:10.1542/10.1542/peds.2008-1113).

۲۲-واکر ا. *میکرب‌شناسی واکر*. ترجمه میرنژاد ر ، رضوی ش؛ چاپ اول، تهران، انتشارات پیوند، ۱۳۸۷، صص ۳۱۸-۳۱۴.

23- Pandey A, Dhawan B, Gupta V, Chaudhry R & Deorari A.K;Clinical significance of airways colonization with *Ureaplasma urealyticum* in premature (34wk) neonates; *Indian J Med Res* 2007;**125**: 679-684.

24-Biernat-Sudolska M, Rojek-Zakrewska D ,Lauterbach R . Assesment of various diagnostic methods or *Ureaplasma* respiratory tract infections in newborns. *Acta Biochimica Polonica* 2006 ;**53:**:609-612.

25- Waites K. *Ureaplasma* Infection, *Emedicine from Web MD*; 2008,Mar 27.

26- A.Bailey E, R.Solomon L, Berry N. *Ureaplasma urealyticum* CAPD peritonitis following insertion of an intrauterine device: diagnosis by Eubacterial polymerase chain reaction; *Peritoneal Dialysis International*. 2002;**22**;No.3:422-423

۲۷- قاضی سعیدی ک و همکاران. بررسی ارزش تشخیصی قطرات اولیه ادرار در جداسازی *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* و *مایکوپلاسما هومینیس* در مجاری ادراری مردان و زنان مبتلا به اورتریت‌های غیرگنوکوکی و اورتریت‌های غیر اختصاصی. *مجله دانشگاه علوم*

۱۱ -نجار پیرایه ش و همکاران. مقایسه PCR با کشت برای تشخیص *اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم* در نمونه‌های تناسلی مردان نابارور. *مجله پژوهشی حکیم*. پاییز ۸۶ ، دوره دهم ؛ شماره سوم. صص۵۲-۴۸.

12- Badalyn RR, Fanarjyan SV , Aghajanyan IG. *Chlamydial* and *Ureaplasmal* infections in paitients with nonbacterial chronic prostatitis.*Andrologia* ;2003; **35** :263-265.

13- Jalil N, Doble A, Gilchrist C, Taylor-Robison D. Infection of epididymis by *Ureaplasma urealyticum. Genitourian Med;* 1988 ;**64**:367-368.

14-Salan MH, Kanmi A. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* in men with non-gonococcal urethritis. *Eastern Mediterranean Health J* ;2003;**9** :291-294.

15-Charpe H, Friberrgy M. *Mycoplasma* and human reproductive failure. *Am J Obstet Gynecol* ;1972 ; **114**:727-731.

16- Charpe H, Friberrgy M. T-*Mycoplasmas* as a possible cause for reproductive failure. *Nature;* 1973; **242**:120-121

17- Taylor- Robinson D. Evaluation of the rate of *Ureaplasma urealyticum* in infertility.*Pediatr Infect Dis* 1989;**5** (suppl):262-265.

18- de Jong Z, Pontonnier F , Plante P,Perie N,Talazac N,Mansat A, Chabanon G. Comparison of the incidence of *Ureaplasma urealyticum* in infertile men and in donors of semen. *Eur Urol;* 1990;**18**: 127-131.

19- Nunez- Calong R,Caballero P,Redondo C. *Ureaplasma urealyticum* reduces motility and induces membrane alterations in human spermatozoa; *Human Reproduction* ;1998; **13**:2756-2761.

20- Soffeer Y,Ron-EI R,Golan A,Herman A, Caspi E,Samra Z. Male genital *Mycoplasmas* and *Chlamydia trachomatis*

کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور مشهد، بهمن ۱۳۸۷، ص ۵۵.

پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد. تابستان ۱۳۸۶، دوره ۱۵، شماره دوم، صص ۷۰-۶۴.

۲۸-حکیمی ع. بررسی میزان کلسترول و استخراج آن از منابع مختلف جهت مصارف بیولوژیک، پایان نامه