

Molecular Detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia trachomatis* in Women with Endometriosis

Samira Dahaghin¹, Reza Hosseini Doust¹, Reza Mirnejad^{2*}

1. Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Molecular Biology Research Center, Systems biology and poisonings institute, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Article Information

Article Subject:

Molecular Microbiology

DOI:

Corresponding author:

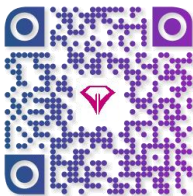
Reza Mirnejad,

Research Center for Molecular Biology, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email:

rmirnejad@bmsu.ac.ir

Use your device to scan and read the article online



Abstract

Background and Aims: Endometriosis is considered to be one of the most common women's diseases in the world. The exact cause of endometriosis is unknown. In this study, the bacterial agents were considered as the probable factors influencing this disease and the frequency of two bacteria *U. urealyticum* and *C. trachomatis* was studied in this disease.

Materials and Methods: This study was performed on Pap smear samples of 50 women with endometriosis, 48 healthy women referred to hospitals in north of Tehran. The recommend samples were transferred to the laboratory, their DNA was extracted, and PCR method was performed. They were analyzed by descriptive statistics.

Results: Performing PCR test for *U. urealyticum* detection among the pap smears of people with endometriosis and non_endometriosis, 27 samples (54%) and 25 samples (52%) were positive respectively but none of the samples had contamination with *C. trachomatis*. The highest prevalence of *U. urealyticum* in both endometriosis and healthy subjects was observed in the age group of 30-35 years.

Conclusion: The prevalence of *U. urealyticum* in patients with endometriosis and healthy subjects (non_endometriosis) was relatively similar and the same as normal flora. There was no infection with *C. trachomatis* in these individuals, therefore there was no significant association between these bacteria and endometriosis. For more accurate results such studies should be done in a higher statistical society.

Keywords: PCR, *U. urealyticum*, *C. trachomatis*, Endometriosis

Received: 2017/06/03 Accepted: 2019/07/31 Available online: 2019/08/23

Copyright © 2019 Iranian Journal of Medical Microbiology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Dahaghin S, Hosseini Doust R, Mirnejad R. Molecular Detection of *Ureaplasma urealyticum* and *Chlamydia trachomatis* in Women with Endometriosis. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (2) :125-131



شناسایی مولکولی *Chlamydia trachomatis* و *Ureaplasma urealyticum* در زنان مبتلا به اندومتريوز

سمیرا دهاقین^۱، رضا حسینی دوست^۱، رضا میرنژاد^{۲*}

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی پژوهشکده بیولوژی و سموم، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: اندومتريوز یکی از شایع ترین بیماری های زنان در جهان است که علت و منشأ دقیق آن ناشناخته است. در این مطالعه عامل باکتریایی به عنوان یکی از عوامل فرضی و احتمالی مؤثر در این بیماری در نظر گرفته شده و میزان فراوانی دو باکتری *Chlamydia trachomatis* و *Ureaplasma Urealyticum* در این بیماری بررسی شد.

مواد و روش کار: این مطالعه روی نمونه های پاپ اسمیر ۵۰ زن مبتلا به اندومتريوز، ۴۸ زن سالم (غیراندومتريوز) مراجعه کننده به بیمارستان های شمال شهر تهران در سال ۱۳۹۶ تا ۱۳۹۷ انجام شد. نمونه ها پس از انتقال به آزمایشگاه و استخراج DNA، با روش PCR بررسی و از طریق آمار توصیفی تجزیه و تحلیل شدند. معیار انتخاب نمونه براساس تعداد نمونه هایی بود که مراکز در اختیار ما قرار دادند.

یافته ها: در این پژوهش با انجام تست PCR برای باکتری *U. urealyticum*، از بین پاپ اسمیر افراد مبتلا به اندومتريوز و افراد غیراندومتريوز به ترتیب ۲۷ نمونه (۵۴٪) و ۲۵ نمونه (۵۲٪) مثبت شدند، در صورتی که هیچ کدام از نمونه ها آلودگی به *C. trachomatis* نداشتند. بیشترین فراوانی باکتری *U. urealyticum* در هر دو گروه اندومتريوز و سالم، در گروه سنی ۳۰-۳۵ سال مشاهده شد.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه میزان شیوع *U. urealyticum* در افراد مبتلا به اندومتريوز و افراد سالم (غیراندومتريوز) در مطالعه حاضر نسبتاً مشابه و به اندازه فلور نرمال بوده است و از سوی دیگر هیچ گونه آلودگی با باکتری ها *C. trachomatis* نیز در بین این افراد یافت نشد، ارتباط معنی داری بین این باکتری ها و بیماری اندومتريوز یافت نشد. لذا این گونه مطالعات باید در جامعه آماری بالاتر برای نتایج دقیق تر انجام شود.

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۸/۰۳/۱۳
پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۹
انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۰۶/۰۱
موضوع:
میکروبیولوژی مولکولی
IJMM1398;13(2): 125-131

نویسنده مسئول:

رضا میرنژاد

مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، تهران، ایران

پست الکترونیک:

rmimejad@bmsu.ac.ir

کلمات کلیدی: PCR، *Chlamydia trachomatis*، *Ureaplasma Urealyticum*، اندومتريوز

کپی رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

تا ۲۰ درصد اعلام شد (۳). اندومتريوز به طور قابل ملاحظه ای بر کیفیت زندگی زنان و خانواده های آنها تأثیر می گذارد و هزینه هایی همانند سایر بیماری های مزمن مانند دیابت نوع ۲، بیماری کرون و آرتریت روماتوئید برای جامعه دربردارد. علت، منشأ دقیق و پاتوفیزیولوژی اندومتريوز ناشناخته است، با این حال ممکن است عوامل ژنتیکی و محیطی در آن دخالت داشته باشند (۴). در این مطالعه نیز فرضیه عامل باکتریایی به عنوان یکی از عوامل فرضی و احتمالی مؤثر در این بیماری همانند مطالعه خالقیق نواز خان

اندومتريوز به حضور و رشد بافت رحم در جایی خارج از حفره رحمی اطلاق می شود که یک بیماری مزمن و پیچیده ای بوده و زنان در سنین باروری به آن مبتلا می شوند (۱،۲). این بیماری با ناباروری و دردهای مزمن لگنی (در هنگام سیکل قاعدگی و هنگام مقاربت و پس از آن) ارتباط دارد و به عنوان یکی از شایع ترین بیماری های زنان در جهان است که حدود ۱۷۶ میلیون زن، مبتلا به آن هستند (۳). شیوع تقریبی اندومتريوز در شهر تهران در سال ۱۳۹۱ در زنان در سنین باروری، حدود ۵

با پرسش‌نامه تهیه شد که براساس آن، هیچ یک از گروه‌های مورد مطالعه حاضر، از یک هفته پیش از تست، آنتی‌بیوتیک مصرف نکرده بودند. همچنین ۵۷٪ از زنان مبتلا به اندومتريوز دارای سابقه بارداری و زایمان و ۲۴٪ دارای سقط جنین بودند. در افراد غیراندومتريوز نیز ۸۳/۳٪ سابقه بارداری داشتند و ۱۰/۴٪ دارای سابقه سقط جنین بودند. این مطالعه بارضایت بیماران و بدون هیچ گونه تحمیل برای نمونه‌گیری، پرداخت هزینه یا صرف وقت اضافه از آنان انجام شد و دارای کد اخلاق ۸۵۹ از کمیته اخلاق در پژوهش واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی است.

نمونه‌گیری سوآب اندوسرویکال توسط متخصص زنان انجام شد و این نمونه‌ها بلافاصله پس از نمونه‌گیری به داخل محلول پاپ‌اسمیر منتقل و سپس به آزمایشگاه فرستاده شدند. سپس ژنوم این نمونه‌ها توسط کیت استخراج (TIANGEN, China) و براساس پروتکل آن استخراج و کیفیت استخراج آن با نانودراپ اندازه‌گیری شد؛ غلظت DNA استخراج شده نمونه‌ها با یکدیگر متفاوت بود. سپس نمونه DNAهای استخراج شده به فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شدند. پرایمرهای مورد استفاده برای واکنش PCR در این پژوهش برای *U. urealyticum*، ژن اوره‌آز با توالی:

F 5' - TGG AGT TAA GTC GTA ACA AG-3'

R 5' - CTG AGA TGT TTC ACT TCA CC-3'

بوده که دارای طول قطعه ۵۵۹bp (۱۷) و برای *C. trachomatis* ژن orf8 با توالی:

F: 5'-CTAGGCGTTTGTACTCCGTCA-3'

R: 5'-TCCTCAGGAGTTTATGCACT-3'

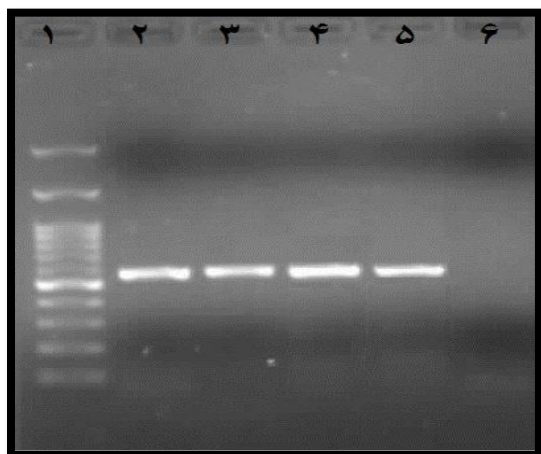
و طول قطعه ۲۰۰bp است (۱۸). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر برای هر نمونه انجام شد که شامل ۱۲ میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon Co, Skovlunde, Denmark, Cat. No. 180301)، ۱ میکرولیتر از هر جفت پرایمر، ۶ میکرولیتر آب مقطر آمپولی و ۵ میکرولیتر DNA الگو بود. برنامه زمانی و دمایی PCR برای *U. urealyticum* شامل دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سلسیوس ۵ دقیقه یک سیکل، دناتوراسیون ۹۵ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها ۵۶ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، اتصال ۷۲ درجه سلسیوس ۱ دقیقه ۳۰ سیکل و اتصال نهایی ۷۲ درجه سلسیوس ۵ دقیقه بوده و برای *C. trachomatis* نیز شامل دناتوراسیون اولیه ۹۴ درجه سلسیوس ۵ دقیقه یک سیکل، دناتوراسیون ۹۴ درجه سلسیوس ۴۰ ثانیه، اتصال پرایمرها ۶۱ درجه سلسیوس ۴۵ ثانیه،

و همکارانش (Khaleque Newaz Khan) در نظر گرفته شد و بررسی شد که آیا ارتباطی بین عفونت با بعضی از عوامل ژنیتهال مانند *Ureaplasma urealyticum* و *Chlamydia trachomatis* و بیماری اندومتريوز وجود دارد یا خیر. *U. urealyticum* فاقد دیواره سلولی و متعلق به خانواده مایکوپلاسماتاسه (*Mycoplasmataceae*) است. این میکروارگانیسم به عنوان فلور نرمال در مجرای ژنیتهال زنان به میزان ۸۰-۴۰٪ وجود دارد و یکی از مهم‌ترین عوامل پاتوژنی فرصت‌طلب در این ناحیه است. *C. trachomatis* نیز باکتری گرم منفی و بی‌حرکت بوده و به عنوان یک پاتوژن داخل سلولی اجباری شناخته شده است. این دو باکتری از شایع‌ترین عوامل منتقل شده از راه جنسی هستند که مرتبط با بیماری‌های متعددی از جمله بیماری التهابی لگن، ناباروری و اندومتريت هستند (۶-۱۱). استاندارد طلایی برای شناسایی این دو باکتری روش کشت است که معایبی دارد. از جمله به پرزحمت بودن و وقت‌گیر بودن این شیوه می‌توان اشاره کرد به طوری که رشد *U. urealyticum* به طور میانگین به ۲-۵ روز زمان نیاز داشته و همچنین این روش نیاز به محیط‌های کشت اختصاصی دارد که گرانی، ناپایدار بودن و نیاز به افزودن مواد مکمل به این محیط‌ها از معایب دیگر تکنیک کشت است. کشت *C. trachomatis* بسیار سخت بوده و نیازمند ۲-۳ روز زمان است و از سوی دیگر زندگی آن در طول مراحل جمع‌آوری نمونه، انتقال و مراحل مختلف در روش کشت به خطر می‌افتد و بر حساسیت روش کشت تأثیر می‌گذارد. با وجود معایب روش کشت، تکنیک‌های آمپلیفیکاسیون از جمله PCR به دلیل حساسیت و اختصاصیت بالایی که دارند، به عنوان روشی رایج، کارآمد و مؤثر برای شناسایی این باکتری‌ها به شمار می‌روند و از نظر زمان و هزینه حتی برای تعداد زیاد نمونه نیز مناسب‌تر هستند (۱۲-۱۶).

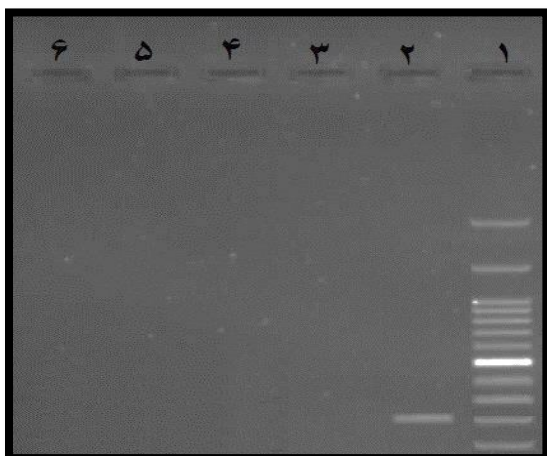
هدف از این مطالعه بررسی فراوانی *U. urealyticum* و *C. trachomatis* در بیماران مبتلا به اندومتريوز در ایران و بررسی وجود یا عدم وجود ارتباط بین این باکتری‌ها و این بیماری است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش از خرداد ۱۳۹۶ تا شهریور ۱۳۹۷ روی ۵۰ نمونه پاپ‌اسمیر افراد اندومتريوز (که بیماری آنها را متخصص زنان تأیید کرده بود) و ۴۸ نمونه پاپ‌اسمیر افراد سالم (غیراندومتريوز) مراجعه‌کننده به مراکز درمانی شمال شهر تهران که در محدوده سنی ۲۸ تا ۴۱ سال بودند انجام شد. همچنین مشخصات و اطلاعات بیماران شامل سن، سابقه بارداری، سابقه سقط جنین و مصرف آنتی‌بیوتیک نیز



شکل ۱. PCR برای ژن اوره‌آز: چاهک ۱: لدر ۱۰۰bp (SMO Bio)، چاهک ۲: کنترل مثبت *U. urealyticum* (559bp)، چاهک ۳-۵: نمونه‌های بالینی (مثبت)، چاهک ۶: کنترل منفی



شکل ۲. PCR برای Orf8: چاهک ۱: لدر ۱۰۰bp (SMO Bio)، چاهک ۲: کنترل مثبت *C. trachomatis* (۲۰۰bp)، چاهک ۳: کنترل منفی، چاهک ۴-۶: نمونه‌های بالینی (منفی)

اتصال ۷۲ درجه سلسیوس ۸۰ ثانیه ۴۰ سیکل و اتصال نهایی ۷۲ درجه سلسیوس ۵ دقیقه است.

سپس برای بررسی نتایج PCR، از الکتروفورز روی ژل ۱٪ استفاده شده و ژل الکتروفورز شده توسط دستگاه ژل داک مشاهده شد. پس از تأیید باندهای مورد نظر برای محصولات PCR شده، تعدادی از این نمونه‌ها جهت تأیید و اطمینان، برای تعیین توالی به شرکت پیشگام فرستاده و با استفاده از آمار توصیفی نتایج تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این پژوهش بیشترین فراوانی در گروه اندومتريوز، در افراد بالای ۳۵ سال و بیشترین فراوانی در گروه سالم (غیراندومتريوز) بین ۳۰-۳۵ سال بود. با انجام تست PCR برای باکتری *U. urealyticum*، از بین ۵۰ نمونه پاپ‌اسمیر افراد مبتلا به اندومتريوز و از بین ۴۸ نمونه پاپ‌اسمیر افراد غیراندومتريوز به ترتیب ۲۷ نمونه (۵۴٪) و ۲۵ نمونه (۵۲٪) مثبت شدند، در صورتی که هیچ کدام از نمونه‌ها آلودگی به *C. trachomatis* نداشتند. شکل ۱ چند نمونه بالینی را نشان می‌دهد که برای ژن اوره‌آز *U. urealyticum* مثبت شده‌اند. شکل ۲ نیز نشان‌دهنده عدم وجود باند و در نتیجه منفی بودن نمونه‌ها از نظر باکتری *C. trachomatis* است. توزیع افراد شرکت‌کننده در این مطالعه براساس گروه‌های سنی و ارگان‌سیم‌های جدا شده نیز در جدول ۱ نشان داده شده است و بیشترین فراوانی باکتری *U. urealyticum* در هر دو گروه اندومتريوز و سالم، در گروه سنی ۳۰-۳۵ سال مشاهده شد. همچنین نتایج تعیین توالی سویه‌های کنترل و نمونه‌های بالینی به دست آمده نیز با توالی کسب شده از بانک ژنی NCBI منطبق بودند.

جدول ۱. توزیع فراوانی باکتری‌ها بر اساس سن

محدوده سنی	تعداد نمونه	نمونه‌های سالم (غیراندومتريوز)		نمونه‌های اندومتريوز	
		تعداد مثبت شده <i>U.u</i>	تعداد مثبت شده <i>C.t</i>	تعداد مثبت شده <i>U.u</i>	تعداد مثبت شده <i>C.t</i>
زیر ۳۰	۸	۳	۰	۲	۰
۳۰-۳۵	۲۵	۱۴	۰	۱۵	۰
بالای ۳۵	۱۵	۸	۰	۱۰	۰
جمع کل	۴۸	۲۵	۰	۲۷	۰

بحث

عفونت واژینال (۱۹۱ نمونه)، آلودگی با باکتری *U. urealyticum* داشتند (۲۱).

تفاوت در نوع نمونه های مطالعه Saigal (ادرار و سواب مجاری ادراری) و نیز استفاده از بیماران در دو جنس مرد و زن نیز می تواند دلیلی بر تفاوت میزان شیوع این مطالعه نسبت به پژوهش فوق باشد. همچنین شیوع پایین تر این باکتری در مطالعه حسنی نیز می تواند به علت تفاوت در نوع بیماری افراد مورد مطالعه آنان باشد.

از سوی دیگر در پژوهشی که ذوالفقاری و همکاران با تکنیک Real time PCR انجام دادند، ۹۶ نمونه (۸۷/۲۷٪) از ۱۱۰ نمونه سواب اندوسرویکال از خانم های دارای عفونت واژینال (واژینیت و سرویسیت)، *Ureaplasma* مثبت گزارش شدند. شیوع بالای *Ureaplasma* در مطالعه آنها در مقایسه با مطالعه حاضر می تواند به دلیل بیشتر بودن افراد مورد مطالعه آنان و همچنین دقیق تر و کمی بودن تکنیک Real time PCR نسبت به PCR باشد (۲۰).

همچنین علیرغم عدم شیوع *C. trachomatis* در مطالعه حاضر، علاوه بر پژوهش های Cicinelli (۲۲) و Saigal (۲۳) که شیوع *C. trachomatis* را از طریق PCR به ترتیب ۲/۷۶٪ و ۶٪ گزارش کردند، در مطالعات دیگری که در ایران انجام شدند از جمله مطالعه افراسیابی و همکارانش که بر روی ۲۵۵ نمونه سواب اندوسرویکس زنان در کاشان با روش PCR انجام گرفت، شیوع این باکتری ۲/۴٪ بود (۲۴). همین طور در مطالعه چمنی تبریز و همکارانش نیز ۱۲/۳٪ از ۱۰۵۲ نمونه ادرار، از طریق تکنیک PCR مثبت گزارش شدند (۲۵). به نظر می رسد دلیل عدم وجود این باکتری در نمونه های مطالعه حاضر نسبت به پژوهش های ذکر شده، احتمالاً متفاوت بودن نوع نمونه و همچنین بیشتر بودن تعداد نمونه های آنان نسبت به پژوهش حاضر باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش در مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی بقیه الله انجام شد. از تمامی همکاران آزمایشگاه در این مرکز تقدیر و تشکر می کنیم. این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد سمیرا دهاقین تحت عنوان "شناسایی مولکولی *U. urealyticum* و *C. trachomatis* در زنان مبتلا به بیماری اندومتريوز مراجعه کننده به بیمارستان های شمال شهر تهران" می باشد که در تاریخ ۱۳۹۶/۴/۳۰ مصوب دانشگاه آزاد علوم دارویی تهران با کد ۸۵۹ است.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

در این پژوهش بیشترین فراوانی *U. urealyticum* در بین افراد ۳۵-۳۰ سال بود که با مطالعه نورامیرمظفري و همکاران که بیشترین شیوع را در بازه سنی ۲۹-۳۹ سال (۱۹) و همچنین مطالعه ذوالفقاری و همکاران که بیشترین شیوع را در ۳۰-۳۹ سال گزارش کردند (۲۰)، نسبتاً مشابه است و با مطالعه حسنی و همکاران که بیشترین شیوع را در سنین ۳۱-۴۵ سال مشاهده کردند (۲۱)، تفاوت دارد.

همچنین در مطالعه حاضر از بین افراد مبتلا به اندومتريوز و افراد غیر اندومتريوز به ترتیب ۵۴٪ و ۵۲٪ برای *U. urealyticum* مثبت شدند و هیچ یک از نمونه ها آلودگی به *C. trachomatis* نداشتند.

در مطالعه Khaleque Newaz Khan و همکارانش که مشابه مطالعه حاضر بر روی افراد اندومتريوز و غیر اندومتريوز با روش PCR انجام دادند (۲)، نوع نمونه های مورد بررسی آنان و همچنین نوع باکتری هایی که شناسایی کردند (استرپتوکوک ها و استافیلوکوک ها) با میکروارگانيسم های مورد بررسی در مطالعه حاضر متفاوت بود.

در مطالعاتی دیگر نوع بیماری افراد شرکت کننده با پژوهش حاضر متفاوت بوده و همچنین شیوع پایین تری از *U. urealyticum* را نشان دادند، از جمله مطالعه Cicinelli و همکارانش که بر روی سواب اندوسرویکس زنان با اندومتريت مزمن (CE) انجام دادند (۱۸۱ نمونه)، شیوع *U. urealyticum* از طریق کشت ۱۸/۷۸٪ گزارش گردید (۲۲). همچنین مطالعه ای دیگر در ایران که از طریق کشت سواب های اندوسرویکال ۲۰۵ بیمار مبتلا به عفونت دستگاه تناسلی توسط نورامیرمظفري و همکاران انجام گردید نیز ۳۱/۱۸٪ *U. urealyticum* مثبت بودند (۱۹). میزان فراوانی در مطالعه حاضر نسبت به مطالعه های مورد مقایسه که دارای نمونه های بیشتری بودند، شیوع بالاتری از *U. urealyticum* را نشان داده است که این امر می تواند به علت استفاده از تکنیک کشت در مطالعه Cicinelli و نورامیرمظفري باشد که حساسیت و دقت و اختصاصیت آن نسبت تکنیک PCR که در مطالعه حاضر انجام گردید، پایین تر است.

در پژوهشی که توسط Saigal و همکارانش بر روی ادرار و سواب مجاری ادراری مردان و اندوسرویکس زنان که هردو گروه (۱۶۸ نمونه)، مبتلا به عفونت دستگاه تناسلی بودند انجام شد، *U. urealyticum* از طریق کشت و multiplex PCR در ۱۵/۲٪ بیماران مشاهده شدند (۲۳). در مطالعه حسنی و همکارانش نیز که با روش PCR انجام گردید، در ۳۰٪ از نمونه های اندوسرویکس بیماران دارای

References

- Denny E. "I never know from one day to another how I will feel": pain and uncertainty in women with endometriosis. *Qual Health Res.* 2009; 19(7):985-95. [DOI:10.1177/1049732309338725] [PMID]
- Khan KN, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Nakashima M, Masuzaki H. Intra-uterine microbial colonization and occurrence of endometritis in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 2014; 29(11):2446-56. [DOI:10.1093/humrep/deu222] [PMID]
- Naji Omid F, Abolghasemi J, Chaichian S, Rimaz S, Najmi Z, Mehdizadehkashi A. Evaluation of the factors influencing endometriosis in reproductive age women. *MEDICAL SCIENCES.* 2016; 26(3) :188-194.
- Zondervan KT, Becker CM, Koga K, Missmer SA, Taylor RN, Vignano P. Endometriosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018; 4(1):9. [DOI:10.1038/s41572-018-0008-5] [PMID]
- Khan KN, Fujishita A, Masumoto H, Muto H, Kitajima M, Masuzaki H, et al. Molecular detection of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016; 199:69-75. [DOI:10.1016/j.ejogrb.2016.01.040] [PMID]
- O'Connell CM, Ferone ME. Chlamydia trachomatis genital infections. *Microb Cell.* 2016; 3(9):390-403. [DOI:10.15698/mic2016.09.525] [PMID] [PMCID]
- Ahmadi A, Khodabandehloo M, Ramazanzadeh R, Farhadifar F, Roshani D, Ghaderi E, et al. The relationship between Chlamydia trachomatis genital infection and spontaneous abortion. *JRI.* 2016; 17(2):110-116.
- Najar Peerayeh S, Samimi R. Detection of ureaplasma urealyticum in clinical samples from infertile women by polymerase chain reaction. *IJPT.* 2007; 6(1):23-0.
- Taylor-Robinson D. Mollicutes in vaginal microbiology: Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum and Mycoplasma genitalium. *Res Microbiol.* 2017; 168(9-10):875-81. [DOI:10.1016/j.resmic.2017.02.009] [PMID]
- Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. *PloS One.* 2015; 10(12):e0143304. [DOI:10.1371/journal.pone.0143304] [PMID] [PMCID]
- Kokkayil P, Dhawan B. Ureaplasma: current perspectives. *Indian journal of medical microbiology.* 2015; 33(2):205-214. [DOI:10.4103/0255-0857.154850] [PMID]
- Waites KB, Xiao L, Paralanov V, Viscardi RM, Glass JI. Molecular methods for the detection of Mycoplasma and ureaplasma infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *JMD.* 2012; 14(5):437-50.
- 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. [DOI:10.1128/JCM.42.4.1528-1533.2004] [PMID] [PMCID]
- Serin M, Evruke C, Kibar F, KÖKSAL F. Comparison of PCR and cultivation methods to determine the incidence of infections due to mycoplasma hominis and mycoplasma fermentans in women genitourinary tract. *Eastern J Med.* 2001; 6(2):48-52.
- Golshani M, Eslami G, Ghobadloo SM, Fallah F, Goudarzi H, Rahbar AS, et al. Detection of Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum by multiplex PCR in semen sample of infertile men. *Iran J Public Health.* 2007; 36(2):50-7.
- Goshayeshi L, Vahid Roodsari F, Ghazvini K, Namaee H, Amel jamedar S. Pilot study of Chlamydia trachomatis by PCR method in infertile women referring to Mashhad Infertility Research Center. *Iran South Med J.* 2015; 18(1):92-9. [In Persian]
- Mirnejad R, Amirmozafari N, Kazemi B. Simultaneous and rapid differential diagnosis of Mycoplasma genitalium and Ureaplasma urealyticum based on a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Indian J Med Microbiol.* 2011; 29(1):33. [DOI:10.4103/0255-0857.76521] [PMID]
- Hajikhani B, Motallebi T, Norouzi J, Bahador A, Bagheri R, Asgari S, et al. Classical and molecular methods for evaluation of Chlamydia trachomatis infection in women with tubal factor infertility. *J Reprod Infertil.* 2013; 14(1):29.
- Amirmozafari N, Jeddi F, Masjedian F, Haghghi L. Prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in Genital Tract Infections. *RJMS.* 2009; 15(60):19-25.
- Zolfaghari M, Khansarinejad B, Ganji A, Hamzehloo Z, Abtahi H. Frequency Determination of Ureaplasma and Mycoplasma Genitalium Species in Female with Vaginitis Infection using Real-Time PCR. *J Arak Uni Med Sci.* 2017; 19(116):39-46.
- Hasani A, Shahrokhi N, Khazar Doust S. Diagnosis of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis bacteria in patients with genital tract infection by PCR. *IJIDTM.* 1391; 17(58): 50-45. [In Persian]

22. Cicinelli E, De Ziegler D, Nicoletti R, Tinelli R, Saliani N, Resta L, et al. Poor reliability of vaginal and endocervical cultures for evaluating microbiology of endometrial cavity in women with chronic endometritis. *Gynecol Obstet Investig.* 2009; 68(2):108-15. [[DOI:10.1159/000223819](https://doi.org/10.1159/000223819)] [[PMID](#)]
23. Saigal K, Dhawan B, Rawre J, Khanna N, Chaudhry R. Genital Mycoplasma and Chlamydia trachomatis infections in patients with genital tract infections attending a tertiary care hospital of North India. *IJPM.* 2016; 59(2):194. [[DOI:10.4103/0377-4929.182019](https://doi.org/10.4103/0377-4929.182019)] [[PMID](#)]
24. Afrasiabi S, Moniri R, Samimi M, Khorshidi A, Mousavi SGA. The Prevalence of Endocervical Chlamydia trachomatis Infection Among Young Females in Kashan, Iran. *JJM.* 2015; 8(4):e15576. [[DOI:10.5812/jjm.8\(4\)2015.15576](https://doi.org/10.5812/jjm.8(4)2015.15576)]
25. Chamani Tabriz L, Jedi Tehrani M, Mousavi Jarahi A, Zeraati H, Ghasemi J, Asgari S, et al. Molecular evaluation of the frequency of Chlamydia trachomatis infection in women referred to Tehran obstetrics and gynecology clinics. *JRI.* 2006; 7(3):242-234.