

Molecular Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in Synovial Fluid of Rheumatoid Arthritis Patients

Reza Golmohammadi^{1,4}, Ramezan Ali Ataee^{1,2}, Gholam Hossein Alishiri³, Reza Mirnejad⁴, Ali Najafi⁴, Mehdi Tate⁵, Davoud Esmaili¹, Nematollah Jonaidi-Jafari²

1. Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Health Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3. Department of Rheumatology, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
5. Applied Virological Research, Faculty of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Article Information

Article history:

Received: 2014/04/01
Accepted: 2014/06/20
Available Online: 2014/05/05

Article Subject:

Medical Bacteriology

IJMM 1393; 8(1): P 1-8

Corresponding author at:

Dr. Ramezan Ali Ataee

Health Research Center and
Department of Medical
Microbiology, Baqiyatallah
University of Medical Sciences,
Tehran, Iran.

Email:

ataee@bmsu.ac.ir

Abstract

Background and Aim: The role of *Mycoplasma* super antigens in inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis (RA) is taken into consideration. Therefore, the aim of this study was to diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in synovial fluid (SF) of patients with RA.

Materials and Methods: In this study, 131 synovial fluid samples of patients with RA were collected during 3 years (2011- 2013). *Mycoplasma pneumoniae* ATCC: 29342 strain was used as control. The genome of samples is extracted separately and PCR protocol by *M. pneumoniae* species and mycoplasma genus identifier primers was carried out. The PCR product was confirmed by sequencing.

Results: The results of this study showed that this molecular diagnosis method is able to detect *M. pneumoniae* in the synovial fluid of patients with RA. So that *M. pneumoniae* species was confirmed in 30 samples (22.9%) and *Mycoplasma* genus detected in the 70 sample (53.4%).

Conclusions: based on the results of this study, the PCR molecular method was able to detect of the *Mycoplasma* genus and also *M. pneumoniae* species in the synovial fluid of patients with RA. The results indicated that *M. pneumoniae* can be a probable cause of rheumatoid arthritis disease. This finding may help the specific treatment of RA.

Key Words: *Mycoplasma pneumoniae*, PCR, Rheumatoid arthritis, Synovial fluid

Copyright © 2014 Iranian journal of medical microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Golmohammadi R, Ataee R A, Alishiri G H, Mirnejad R, Najafi A, Tate M, et al . Molecular Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* in Synovial Fluid of Rheumatoid Arthritis Patients. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (1) :1-8

تشخیص مولکولی مایکوپلازما پنومونیه در مایع مفصل بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید

رضا گل محمدی^{۱،۴}، رمضانعلی عطایی^{۱،۲}، غلامحسین علیشیری^۳، رضا میرنژاد^۴، علی نجفی^۴، مهدی تات^۵، داود اسماعیلی^۱،
نعمت الله جنیدی جعفری^۲

۱. گروه میکروپلاسماتشناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران
۳. گروه روماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران
۴. مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران
۵. مرکز تحقیقات کاربردی ویروس و واکسن، دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و اهداف: در سالهای اخیر نقش مایکوپلازماها به عنوان یکی از تولید کنندهای سوپراآنتیژن در ایجاد بیماریهای التهابی از جمله آرتریت روماتوئید مورد توجه قرار گرفته است؛ لذا، هدف این مطالعه تشخیص مایکوپلازما پنومونیه در مایع مفصل بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید به روش PCR بود.

مواد و روش کار: در این تحقیق ۱۳۱ نمونه مایع مفصل بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید طی ۳ سال (از ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲) جمع آوری گردیدند. پس از استخراج ژنوم با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه مایکوپلازما پنومونیه، PCR اجرا گردید. در نهایت محصول PCR با تعیین توالی تأیید شد. نتایج به صورت توصیفی آنالیز و تحلیل شدند. از مایکوپلازما پنومونیه سویه ATCC: 29342 به عنوان کنترل استفاده شد.

یافته‌ها: در این مطالعه با استفاده از پرایمر اختصاصی جنس ۷۰ نمونه (۵۳/۴٪) از نظر جنس مایکوپلازما و با استفاده از پرایمر اختصاصی گونه ۳۰ نمونه (۲۲/۹٪) از نظر وجود گونه مایکوپلازما پنومونیه مثبت گزارش گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد، مایکوپلازما پنومونیه می‌تواند یکی از عوامل احتمالی ایجاد آرتریت روماتوئید باشد. همچنین روش مولکولی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه قادر است مایکوپلازما پنومونیه را در مایع مفصل شناسایی نماید. این نتایج ممکن است درمان اختصاصی بخشی از بیماران با علائم آرتریت روماتوئید را تسهیل نماید.

کلمات کلیدی: مایکوپلازما پنومونیه، PCR، آرتریت روماتوئید و مایع مفصل

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروپلاسماتشناسی پزشکی ایران محفوظ است.

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۲۰

پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۱۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۰۳/۲۰

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1392; 7(4): P 1-8

نویسنده مسئول:

دکتر رمضانعلی عطایی

مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه

و گروه میکروپلاسماتشناسی،

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی بقیه...^(ع)، تهران، ایران.

تلفن: ۰۹۱۲۲۱۹۰۴۱۸

پست الکترونیک:

ataee@bmsu.ac.ir

مقدمه

بزرگسال را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲). بیماری در زنان و افراد مسن شایع‌تر است. بیماری آرتریت روماتوئید سپتیک توسط عوامل مختلف عفونی از جمله: برخی از باکتری‌های بی‌هوازی دهان مثل پورفیروموناس ژینژیوآلیس (۳)، برخی از باکتری‌های روده‌ای مثل اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی (۴) گزارش شده است. در موارد غیر سپتیک انواع مختلف سوپراآنتی ژن‌ها از جمله

بیماری آرتریت روماتوئید یک بیماری ناتوان‌کننده و همراه با سینوویت مزمن و اختلال التهابی سیستمیک می‌باشد (۱). تاکنون هیچ روش قطعی جهت پیشگیری از بیماری وجود نداشته و درمان‌های موجود باعث ریشه‌کنی کامل بیماری نشده است؛ لذا، بیماران می‌بایست به مدت طولانی تحت درمان دارویی قرار گیرند. در کشورهای صنعتی این بیماری ۰/۵ تا ۱٪ افراد

مایکوپلازماها (۵) و نیز عوامل غیرعفونی مثل سن، جنس، زمینه‌های ژنتیکی و فاکتورهای محیطی در ایجاد این عارضه دخالت دارند (۶). تصور می‌شود که مایکوپلازماها بعنوان یکی از عوامل مسبب آرتریت روماتوئید مطرح باشند، اما شواهد قوی در این زمینه وجود ندارد (۷). باکتری‌های جنس‌های مایکوپلازما فاقد دیواره سلولی می‌باشند (۸) و در انسان بیماری‌های مختلفی از جمله پنومونی، واژنیت، سرویسیت و سایر عفونت‌های ژنیتال را ایجاد می‌کنند (۹، ۱۰). در بین مایکوپلازماها، گونه مایکوپلازما پنومونیه رایج‌ترین گونه مایکوپلازما می‌باشد (۱۱)، اریترما انسانی، از جمله: عفونت آتپیک ریوی در بچه‌ها (۱۱)، اریترما ندوزوم (۱۲)، میولیز و ضایعات عصبی عضلانی می‌باشد (۱۳). پروتئین P1 این باکتری بعنوان ادهسین اصلی ارگانیسم در اتصال به سلول میزبان نقش دارد (۱۴). در یک تحقیق عوارض ایمونوژیک عفونت ناشی از مایکوپلازما پنومونیه و ابتلا به سندروم هموفگوسیتیک گزارش شده است (۱۵). به نظر می‌رسد، ایجاد این بیمارها با دخالت سوپراآنتی‌ژن‌های مایکوپلازما مرتبط باشد. لذا، اخیراً آنالیزهای کمی- کیفی متابولیسمی و پروتئومیکی مایکوپلازما پنومونیه منجر به ظهور دیدگاه‌های علمی جدیدی شده است مبنی بر این‌که در این باکتری یک ماده بیولوژیک قادر است انواع مختلفی از واکنش‌ها را ایجاد نماید شده است (۱۶). این شواهد فرضیه منشأ التهابی بودن این بیماری‌ها را قوت بخشیده است. در حقیقت این تصور که مایکوپلازما پنومونیه ممکن است ترکیبی با خاصیت سوپراآنتی‌ژن داشته باشد قوت گرفته و باعث شده است که برخی از محققین، در بیماری‌های التهابی مشخص از جمله بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید بدنبال تشخیص و ردیابی مایکوپلازما پنومونیه باشند. چنانکه، در سال ۲۰۰۸ میلادی ۴ بیمار نوجوان مبتلا به آرتریت دارای عفونت مایکوپلازما پنومونیه با استفاده از روش ایمونولوژیک تشخیص داده شدند (۱۷). در تحقیق دیگری، با استفاده از روش مولکولی PCR در مایع مفصل ۱۹ نفر از ۲۴ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید، وجود مایکوپلازما پنومونیه تأیید شده است (۱۸)، این امر احتمال دخالت سایر مایکوپلازماها را نیز مطرح می‌کند. در یک مطالعه روی ۱۲۵۹ بیمار که یافته‌های سرولوژی آن‌ها عفونت با مایکوپلازما پنومونیه را تأیید کرده بود، ۱۱ نفر (۰/۹٪) به آرتریت مبتلا بودند (۶). در مطالعه دیگری که روی سرم خون ۲۸ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید انجام شده مایکوپلازما پنومونیه در ۵ مورد (۱۸٪) مثبت گزارش شده است (۱۹).

همچنین، در بیماران نوجوان اسپوندیلوآرتروپاتی افزایش تیترا آنتی‌بادی ضد مایکوپلازما پنومونیه نشان داده شده است که نقش احتمالی این باکتری را در ایجاد بیماری نشان می‌دهد (۲۰). طی یک مطالعه Case-Control با استفاده از روش‌های ایمونولوژیک نشان داده اند که مایکوپلازما پنومونیه به عنوان یک کوفاکتور در بیماری‌زایی روماتوئید آرتریت نقش دارد، هر چند تأیید قطعی با انجام مطالعات بیشتر لازم است (۲۱). با وجود مطالعات محدود روی سرم بیماران و کشت مایع مفصلی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید در ایران (۲۲)، مطالعه مشابهی صورت نگرفته است. در هر حال با توجه به نتایج تحقیقات فوق و نیز نقش این باکتری در ایجاد بیماری‌های التهابی، توجه بیش از پیش به طراحی روش تشخیص سریع این باکتری را حائز اهمیت نموده است.

نظر به اینکه توجه بیشتر به این باکتری اجتناب ناپذیر شده است و از طرفی بیشتر مطالعات انجام شده مبتنی بر روش‌های سرولوژیک با اندازه‌گیری آنتی بادی بوده است، از این رو، انجام تحقیقات بیشتر و راه اندازی روش‌های مولکولی دقیق و حساس می‌تواند بسیار سودمند باشد. مطالعات مختلفی بر پایه روش‌های تشخیص مولکولی بر مبنای PCR برای تشخیص مایکوپلازماهای انسانی (۲۳، ۲۴) صورت گرفته است که سریع بودن زمان تشخیص و عدم نیاز به کشت باکتری با توجه به نیازهای غذایی پیچیده و کند رشد بودن باکتری از مزایای این روش‌ها می‌باشد. بنابراین، هدف این مطالعه تشخیص مایکوپلازما پنومونیه در مایع مفصل بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید به روش مولکولی PCR می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

جمع‌آوری نمونه‌ها

طی سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲ در مجموع تعداد ۱۳۱ نمونه مایع مفصل بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید که بر اساس معیارهای سال ۲۰۱۰ انجمن روماتولوژی آمریکا (2010 ACR: American College of Rheumatology) فاقد هرگونه بیماری عفونی همراه و تب دار بودند توسط همکار روماتولوژیست جمع‌آوری گردید. استخراج ژنوم از مایع مفصل انجام و نمونه‌ها تحت بررسی‌های مولکولی قرار گرفتند. در این تحقیق، سویه استاندارد مایکوپلازما پنومونیه (ATCC:29342)

راه اندازی روش مولکولی PCR

در این مطالعه برای شناسایی مایکوپلازما پنومونیه در حد جنس از پرایمر GPO1 و MGSO (۲۶) استفاده گردید. جهت شناسایی باکتری مذکور در حد گونه با استفاده از سکانس ژن رفرانس P1 موجود در بانک ژنی با GeneID:877268 پرایمر طراحی و آنالیزهای بیوانفورماتیک انجام گردید. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر گردیده است.

از آزمایشگاه رفرانس مایکوپلازما مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی تهیه گردید.

همچنین، اجرای این پروژه در جلسه شماره ۲۴ بند ۲۸ مورخ ۸ آذر ۱۳۹۰ کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) مورد تأیید قرار گرفته است.

استخراج DNA از نمونه ها

استخراج به روش ترکیبی جوشاندن و فتل - کلروفرم هم از مایع رویی و هم از رسوب کشت انجام گردید. همچنین برای استخراج ژنوم از مایع مفصل از روش مذکور استفاده گردید (۲۵).

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای انتخاب یا طراحی شده برای این مطالعه

منبع	ژن هدف	طول محصول	غلظت *	توالی پرایمر	نام پرایمر	نوع پرایمر
26	16SrRNA	۷۱۳bp	۰/۱ Pmol	Forward primer: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'	GPO1	جنس
			۰/۱ Pmol	Reverse primer: 5' TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3'	MGSO	
این مطالعه	P1	۴۵۰bp	۰/۱ Pmol	Forward primer: 5'-AAAGGAAGCTGACTCCGACA-3'	MPP1F	گونه
			۰/۱ Pmol	Reverse primer: 5'-TGGCCTTGCGCTACTAAGTT-3'	MPP1R	

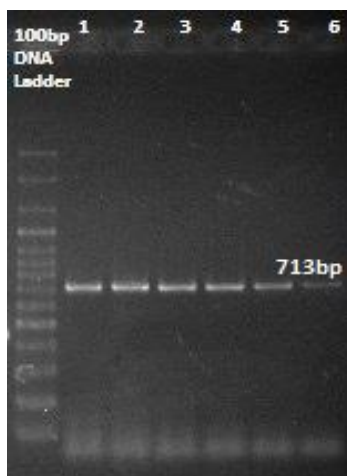
* غلظت پرایمر در ۲۵ میکرولیتر واکنش

میکرولیتر)، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در داخل میکروتیوب ۰/۲ میلی لیتر استریل آماده گردید. میکروتیوب های حاوی ترکیبات مذکور، به طور مختصر مخلوط و سپس به مدت ۱۰ ثانیه در ۱۲۰۰۰ rpm چرخانده شدند و سپس در دستگاه ترموسایکلر با قابلیت شیب دمایی قرار داده شدند و پس از انجام چندین بار PCR، چرخه حرارتی طبق جدول ۲ بهینه سازی گردید.

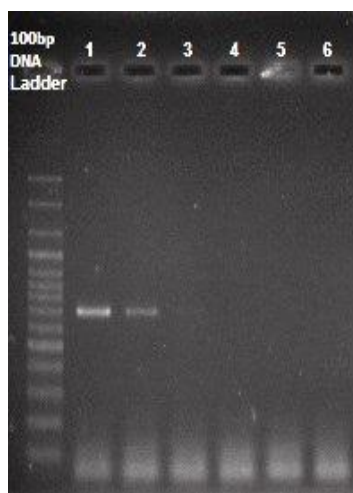
به منظور راه اندازی PCR، ژنوم استخراج شده مایکوپلازما پنومونیه (با حجم ۲ میکرولیتر)، Master Mix (ساخت شرکت Ampliqon دانمارک) محتوی ۱.۵ mM MgCl₂، 0.2% Tween، 0.05 unite/μl Ampliqon Taq DNA، 0.4 mM dNTPs، 20 Polymerase و Inert red dye and a stabilizer (۱۲/۵) میکرولیتر)، پرایمرهای جلویی و عقبی جنس مایکوپلازما و پرایمرهای اختصاصی جلویی و عقبی گونه مایکوپلازما پنومونیه (هرکدام ۰/۲۵ میکرولیتر) و آب مقطر دیونیزه استریل (۱۰)

جدول ۲: پروتکل دمایی مربوط به سیکل های دستگاه ترموسایکلر

مرحله ۱ (Pre Denaturation)	مرحله ۲ (Denaturation)	مرحله ۳ (Annealing)	مرحله ۴ (Extention)	مرحله ۵ (Final Extention)
۹۵ °C	۹۵ °C	۵۸ °C (برای جنس)، ۵۶ °C (برای گونه)	۷۲ °C	۷۲ °C
۵ دقیقه	۳۵ ثانیه	۴۰ ثانیه	۴۵ ثانیه	۵ دقیقه



شکل ۱: نتایج PCR با شیب دمایی برای مایکوپلازما پنومونیه با پرایمر جنس مایکوپلازما؛ ۱: دمای 54°C ، ۲: دمای 56°C ، ۳: دمای 58°C ، ۴: دمای 60°C ، ۵: دمای 62°C ، ۶: دمای 64°C



شکل ۲: نتیجه حاصل از PCR شیب غلظت DNA الگو با پرایمر جنس مایکوپلازما در دمای 58°C : ۱: غلظت اولیه، ۲: غلظت 10^{-1} ، ۳: غلظت 10^{-2} ، ۴: غلظت 10^{-3} ، ۵: غلظت 10^{-4} ، ۶: غلظت 10^{-5}

نتایج راه اندازی PCR برای تشخیص مایکوپلازما پنومونیه با پرایمر اختصاصی گونه

نتایج راه اندازی PCR با شیب دمایی از 54°C تا 64°C جهت شناسایی مایکوپلازما پنومونیه با پرایمر گونه در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به تصویر و شرایط PCR، دمای 56°C به عنوان دمای مطلوب و بهینه برای انجام PCR انتخاب گردید. نتایج تعیین حساسیت PCR جهت شناسایی گونه مایکوپلازما پنومونیه (شکل ۴ و ۵)، شیب غلظت DNA الگو در دمای اتصال 58°C حاکی از آن بود که با توجه به غلظت اولیه DNA الگو، واکنش PCR توانایی تشخیص DNA با غلظت

پس از انجام PCR، محصول آن در کنار DNA Ladder ۱۰۰ bp، در ژل آگارز ۱/۵٪ با ۹۰ ولت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شد. سپس رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید و توسط دستگاه ژل داک (BioRad) تصویربرداری گردید. جهت تعیین حساسیت PCR، ابتدا غلظت اولیه DNA الگو توسط دستگاه نانودراپ مشخص گردید و سپس واکنش PCR با شیب غلظت DNA الگو از غلظت اولیه، 10^{-1} ، 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} و 10^{-5} در دمای بهینه شده 58°C (برای جنس) و 56°C (برای گونه) انجام شد. پس از انجام PCR شیب غلظت، الکتروفورز و تصویربرداری از ژل، محصول PCR حاصل از Set up این روش مولکولی با سویه استاندارد و نیز نمونه مایع مفصل بیمار تعیین سکانس شدند.

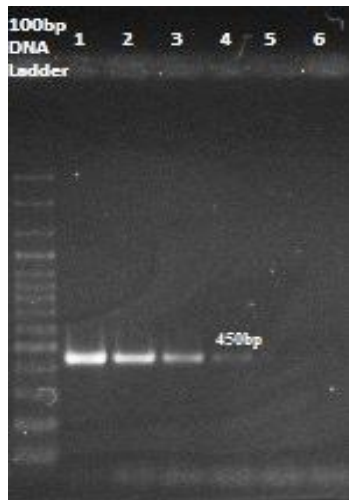
جهت بررسی اختصاصیت واکنش، آزمایش PCR با ژنوم تخلیص شده باکتری های مایکوپلازما اورال، مایکوپلازما آرژینینی، مایکوپلازما هومینیس، مایکوپلازما گالی سپتیکوم، مایکوپلازما ژنیتالایوم، اوره آپلازما اوره آلیتیکوم، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس پنومونیه، اشیریشیا کلی، شیگلا سونئی، سالمونلا تیفی موریوم و کلبسیلا پنومونیه انجام گردید و باندها مشاهده نگردید.

نتایج :

نتایج راه اندازی روش PCR جهت تشخیص جنس مایکوپلازما با پرایمر جنس

نتایج راه اندازی PCR با شیب دمایی از 54°C تا 64°C جهت شناسایی جنس مایکوپلازما در شکل ۱ نشان شده است. با توجه به تصویر و شرایط PCR، دمای 58°C به عنوان دمای مطلوب و بهینه برای انجام PCR انتخاب گردید.

برای تعیین حساسیت PCR جهت شناسایی جنس مایکوپلازما، شیب غلظت DNA الگو در دمای اتصال 58°C حاکی از آن بود که با توجه به غلظت اولیه DNA الگو (۱۲۳/۳ ng/μl)، این واکنش PCR توانایی تشخیص DNA با غلظت ۰/۰۴۹۲ ng/μl را در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر (معادل $5/58 \times 10^4$ کپی از ژنوم مایکوپلازما پنومونیه در هر میکرولیتر) را دارد.



شکل ۴: نتیجه حاصل از PCR شیب غلظت DNA الگو در دمای ۵۶ درجه سلسیوس ۱۰: غلظت اولیه، ۲: غلظت 10^{-1} ، ۳: غلظت 10^{-2} ، ۴: غلظت 10^{-3} ، ۵: غلظت 10^{-4} ، ۶: غلظت 10^{-5} .

PCR ژن مورد نظر، مایکوپلازما پنومونیه می‌باشد. همچنین، تعیین توالی محصول PCR با پرایمر گونه و همترازی توالی محصول PCR تعیین توالی شده (شکل ۵)، تطابق آن را با ژن P1 مایکوپلازما پنومونیه (۹۸ درصد شباهت) تأیید نمود.

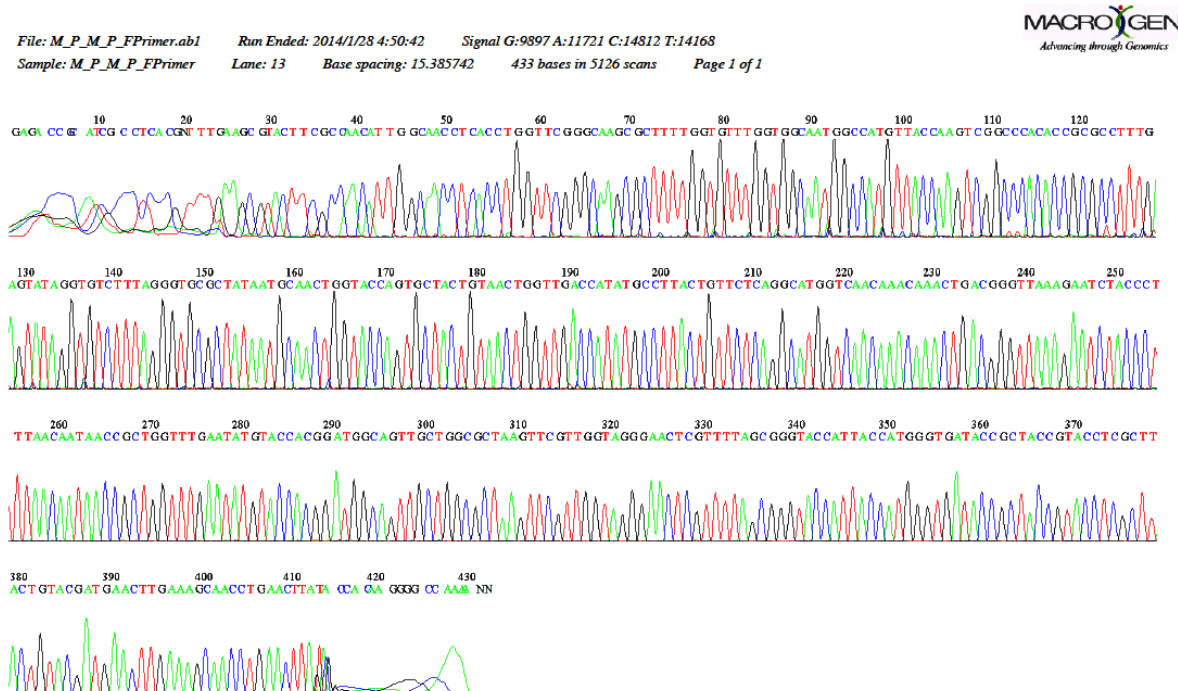
۰/۰۰۴۹۲ ng/μl در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر (معادل 5×10^3 کپی از ژنوم مایکوپلازما پنومونیه در هر میکرولیتر) را دارد.



شکل ۳: نتایج PCR شیب دما برای مایکوپلازما پنومونیه با پرایمر اختصاصی گونه. ۱: دمای ۵۴ درجه، ۲: دمای ۵۶ درجه، ۳: دمای ۵۸ درجه، ۴: دمای ۶۰ درجه، ۵: دمای ۶۲ درجه، ۶: دمای ۶۴ درجه سلسیوس.

نتایج تعیین توالی محصول PCR مایکوپلازما پنومونیه

محصول PCR جهت تعیین توالی ارسال گردید و پس از مشخص شدن توالی، همترازی توالی ها نشان داد که محصول



شکل ۵: توالی حاصل از تعیین توالی محصول PCR مایکوپلازما پنومونیه

التهابی را بدنبال داشته باشد. زیرا، نمونه های بررسی شده در این مطالعه همگی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید تأیید شده بودند. البته این تنها تحقیقی نیست که وجود مایکوپلازما پنومونیه را در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید گزارش می نماید، بلکه در سال ۲۰۱۱ ارتباط مایکوپلازما پنومونیه با آرتریت آیدیوپاتیک گزارش شده است (۲۸). پژوهش دیگری با بررسی ۲۴ نمونه مایع مفصل بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید با پرایمر یونیورسال نشان داد ۷۹٪ موارد از نظر مایکوپلازما مثبت می باشد (۲۹) که با نتایج این تحقیق، همخوانی دارد. اختلاف تحقیق حاضر با تحقیق مذکور آن است در این تحقیق ۲۲/۹٪ گونه مایکوپلازما پنومونیه و ۵۳/۴٪ جنس مایکوپلازما گزارش کرده در حالی که در تحقیق مذکور تنها جنس مایکوپلازما گزارش شده است. در گزارش موردی دیگری نقش کوفاکتوری مایکوپلازما پنومونیه را در ایجاد آرتریت روماتوئید منتشر کرده است. علاوه براین، در مطالعه دیگری که روی سرم خون ۲۸ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید انجام شد، مایکوپلازما پنومونیه تنها در ۵ مورد (۱۸٪) مثبت گزارش شده است (۳۰).

در هر حال، در مقایسه با سایر تحقیقات انجام شده در کشور روش طراحی شده در این تحقیق نتایج دقیق تری را ارائه داده است. زیرا، اولاً محصول PCR تعیین سکانس شده، در ثانی درصد بالاتری از آلودگی مایکوپلازمایی را در مایع مفصل بیماران نشان داده است. در این تحقیق در مجموع ۵۳/۴٪ از نظر مایکوپلازما مثبت بوده اند، در حالی که Hadi در سال ۲۰۱۱ میلادی از نتایج ۱۰ درصدی نام برده (۳۱) و تنها در ۲٪ عفونت های تنفسی مایکوپلازما پنومونیه را گزارش کرده است (۳۲). Nourbakhsh و همکاران با بررسی ۴۰ نمونه از بیماران مبتلا به آدنو تونسیلیت به روش PCR و سرولوژی نشان دادند به ترتیب با PCR حدود ۳۵٪ و با الیزا ۲۰٪ موارد مثبت برای مایکوپلازما پنومونیه گزارش کردند (۳۳). نتایج گزارش منتشر شده ی دیگری حاکی از آن است که در خون محیطی ۵۳/۶٪ بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید جنس مایکوپلازما ردیابی شده است که با این تحقیق همخوانی دارد (۳۴)، تنها اختلاف در آن است که در آن تحقیق نمونه های خون بیماران مورد بررسی قرار گرفته است و تحقیق حاضر نمونه های مایع مفصل را مطالعه کرده است.

بر اساس نتایج این تحقیق، روش مولکولی PCR ژن های معرف جنس مایکوپلازما (۵۳/۴٪) و گونه مایکوپلازما پنومونیه

نتایج PCR تعداد ۱۳۱ نمونه بالینی مایع مفصل، از نظر مایکوپلازما پنومونیه با پرایمرهای اختصاصی گونه، در دما ۵۶ درجه سلسیوس نشان داد که ۳۰ نمونه (۲۲/۹٪) دارای ژن P1 مایکوپلازما پنومونیه می باشند. نمونه ها با تکثیر قطعه مورد نظر وجود ژن را نشان دادند و نتیجه تعیین سکانس نیز آن را تأیید کرد. در این مطالعه با استفاده از پرایمر اختصاصی جنس ۷۰ نمونه (۵۳/۴٪) جنس مایکوپلازما مثبت حاصل گردید.

بحث

نقش مایکوپلازما پنومونیه در ایجاد بیماری های متعدد باعث شده است این باکتری بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد. این در حالی است که کشت و جداسازی مایکوپلازماها زمانبر، پرهزینه و طاقت فرساست. در ایران کشت و جداسازی مایکوپلازماها از نمونه های بالینی با مشکلاتی همراه بوده است. لذا، اغلب تحقیقات بر اندازه گیری IgM و IgG ضد مایکوپلازماها متمرکز شده است. چنانکه Bahar و همکاران با استفاده از کیت الیزا، نشان دادند در سرم خون ۶۵٪ بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس آنتی بادی ضد مایکوپلازما قابل تشخیص است (۲۷)، این پژوهشگران اثر واکنش های متقاطع و نیز مایکوپلازماهای ساپروفیت را مد نظر قرار ندادند.

تحقیق حاضر، به منظور طراحی روش مولکولی دقیق و سریع جهت تشخیص مایکوپلازما پنومونیه در مایع مفصل بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید طراحی و اجرا گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، با پرایمر طراحی شده در آن می توان وجود مایکوپلازما پنومونیه را در مایع مفصل برخی از بیماران نشان داد. چنانچه بررسی مولکولی ۱۳۱ نمونه مایع مفصل بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید تنها ۳۰ مورد (۲۲/۹٪) وجود ژن گونه مایکوپلازما پنومونیه را نشان داد. در حالی که بررسی نمونه ها با پرایمر جنس نشان داد، حدود ۷۰ مورد از نمونه های مایع مفصل (۵۳/۴٪) وجود ژن معرف جنس مایکوپلازما را نشان دادند. این امر حکایت از دو نکته اساسی دارد. اول اینکه به دلیل فراوانی گونه های مایکوپلازماها روشی که از کارآیی مناسب برخوردار باشد و بتواند در واحد زمان همه گونه ها را رد یابی نماید، الزامی است. دوم آنکه ممکن است گونه های مایکوپلازما در ایجاد التهاب مفاصل نقش داشته باشند. به عبارت دیگر مایکوپلازماها نیز ترکیباتی تولید می نمایند که قادر است با تحریک لنفوست های T ترشح سیتوکین ها و در نتیجه مکانیسم های

مالی، از رئیس مرکز تحقیقات کاربردی ویروس و واکسن و رئیس مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج) به خاطر مساعدت ها و از آقای دکتر سید علی پوربخش به خاطر فراهم نمودن سویه استاندارد مایکوپلازما پنومونیه، تشکر و قدردانی می نمایند.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ گونه تعارض منافع وجود ندارد.

(۲۲/۹٪) را در مایع مفصل بیماران با سرعت و دقت تشخیص داده است. این یافته حاکی از آن است که در ۳۰/۵٪ موارد که ژن معرف جنس مایکوپلازما وجود داشته گونه‌های مربوطه نامشخص هستند. این امر نشان می دهد علاوه بر گونه مایکوپلازما پنومونیه سایر گونه های مایکوپلازما نیز در مایع مفصل بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید حضور دارند که باید شناسایی شده و مورد توجه قرار گیرند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از رئیس دانشکده پزشکی و رئیس مرکز تحقیقات بهداشت و تغذیه دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... به خاطر حمایت

References

1. Zeman N Merissa, and Peter JH Scott . Current imaging strategies in rheumatoid arthritis. Am J Nucl Med Mol Imaging. 2012;2(2):174-220.
2. Clements JN. Treatment of rheumatoid arthritis: A review of recommendations and emerging therapy. Forulary 2011; 46(12): 532.
3. Ogrendik M. Rheumatoid arthritis is linked to oral bacteria: etiological association. Mod Rheumatol. 2009;19(5):453-6.
4. Aoki S, Yoshikawa K, Yokoyama T, Nonogaki T, Iwasaki S, Mitsui T, et al. Role of enteric bacteria in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: evidence for antibodies to enterobacterial common antigens in rheumatoid sera and synovial fluids. Ann Rheum Dis. 1996;55(6):363-9.
5. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. N Engl J Med. 2011;365(23):2205-19.
6. Hakkarainen K, Turunen H, Miettinen A, Karppelin M, Kaitila K, Jansson E. Mycoplasmas and arthritis. Ann Rheum Dis. 1992;51(10):1170-2.
7. Hoffman RW, O'Sullivan FX, Schafermeyer KR, Moore TL, Roussell D, Watson-Mckown R, et al. Mycoplasma infection and rheumatoid arthritis. Analysis of their relationship using immunoblotting and an ultrasensitive polymerase chain reaction detection method. Arthritis & Rheumatism. 1997;40(7):1219-28.
8. Krieg R Noel, Staley T James, Brown R Daniel, Hedlund P Brian, B Paster J ruce, Ward L Naomi, and et al. BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume Four. Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 2010. P: 607
9. Waites KB, Katz B, Schelonka RL. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):757-89.
10. Taylor-Robinson D, Tully J. Mycoplasma, Ureaplasma, Spiroplasma, and related organisms, in: Topley and Wilson's microbiology and microbial infection: Systematic Bacteriology. 9th ed. London: Arnold; 1998. p. 799- 823.
11. Pietro N, Rapino D, Scaparrotta A, Attanasi M, Di PS, Chiarelli F, Savini V: *Mycoplasma pneumoniae* infection with rhabdomyolysis in a child. Infez Med 3-1-2014;22:48-50.
12. Kano Y, Mitsuyama Y, Hirahara K, Shiohara T: *Mycoplasma pneumoniae* infection-induced erythema nodosum, anaphylactoid purpura, and acute urticaria in 3 people in a single family. J Am Acad Dermatol 2007;57:S33-S35.
13. Ramírez A, Rosas A, Hernández-Beriain J, Orengo J, Saavedra P, de La Fe C, et al. Relationship between rheumatoid arthritis and *Mycoplasma pneumoniae*: a case-control study. Rheumatology. 2005;44(7):912-4.
14. Ubukata K: [Rapid identification of meningitis due to bacterial pathogens]. Rinsho Shinkeigaku 2013; 53:1184-1186.
15. Kim GH, Seo WH, Je BK, Eun SH: *Mycoplasma pneumoniae* associated stroke in a 3-year-old girl. Korean J Pediatr 2013;56:411-415.
16. Syrjanen J, Puolakkainen M, Jarvinen A: [Fever, skin rash and blood bullae of the ears in a middle-aged woman]. Duodecim 2013;129:1932-1941.
17. Liu YF, Chen MF, Gao Y, Cao B, Dong JP, Zhang YX, et. Al. [Etiologic characteristics of adult patients with community-acquired pneumonia in Beijing]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2013;93:2043-2047.
18. Schmucker RD, Ehret A, Marshall GS. Cerebellitis and Acute Obstructive Hydrocephalus Associated With *Mycoplasma pneumoniae* Infection. Pediatr Infect Dis J 2014;33:529-532.
19. Haier J, Nasralla M, Franco AR, Nicolson GL. Detection of mycoplasmal infections in blood of patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology. 1999;38(6):504-9.
20. Harjacek M, Ostojic J, Djakovic RO. Juvenile spondyloarthropathies associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. Clin Rheumatol 2006;25:470-475.
21. Ramirez AS, Rosas A, Hernandez-Beriain JA, Orengo JC, Saavedra P, de la Fe C, Fernandez A, Poveda JB. Relationship between rheumatoid arthritis and

- Mycoplasma pneumoniae: a case-control study. Rheumatology (Oxford) 2005;44:912-914.
22. Shah hosseini M, Gharib dust F, Allahyary E, Khoram khourshid H, Vand yosefi J. Detection Of Mycoplasmal DNA in Rheumatoid Arthritis Patients Serum by PCR. Journal of Medical Council of IR of Iran 2007. 25(2): 178- 191.
23. Loens K, van Loon A, Coenjaerts F, van Aarle Y, Goossens H, Wallace P, et al. Performance of different mono-and multiplex nucleic acid amplification tests on a multipathogen external quality assessment panel. Journal of clinical microbiology. 2012;50(3):977-87.
24. McIver CJ, Rismanto N, Smith C, Naing ZW, Rayner B, Lusk MJ, et al. Multiplex PCR testing detection of higher-than-expected rates of cervical mycoplasma, ureaplasma, and trichomonas and viral agent infections in sexually active australian women. Journal of clinical microbiology. 2009;47(5):1358-63.
25. Mirnejad R, Babavalian H, Moghaddam MM, Khodi S, Shakeri F. Rapid DNA extraction of bacterial genome using laundry detergents and assessment of the efficiency of DNA in downstream process using polymerase chain reaction. African Journal of Biotechnology. 2013;11(1):173-8.
26. Van Kuppeveld F, Van Der Logt J, Angulo A, Van Zoest M, Quint W, Niesters H, et al. Genus-and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. Applied and environmental microbiology. 1993;59(2):655.
27. Bahar M, Ashtari F, Aghaei M, Akbari M, Salari M, Ghalamkari S: *Mycoplasma pneumonia* seropositivity in Iranian patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomized case-control study. J Pak Med Assoc 2012;62:S6-S8.
28. Aslan M, Kasapcopur O, Yasar H, Polat E, Saribas S, Cakan H, and et al. Do infections trigger juvenile idiopathic arthritis? Rheumatol Int 2011;31:215-220.
29. Johnson SM, Bruckner F, Collins D: Distribution of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma salivarium* in the synovial fluid of arthritis patients. J Clin Microbiol 2007;45:953-957.
30. Haier J, Nasralla M, Franco AR, Nicolson GL. Detection of mycoplasmal infections in blood of patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology. 1999;38(6):504-9.
31. Hadi N, Kashef S, Moazzen M, Pour MS, Rezaei N. Survey of *Mycoplasma pneumoniae* in Iranian children with acute lower respiratory tract infections. Braz J Infect Dis 2011;15:97-101.
32. Naghipour M, Cuevas LE, Bakhshinejad T, Mansour-Ghanaei F, Noursalehi S, Alavy A, Dove W, Hart CA. Contribution of viruses, Chlamydia spp. and *Mycoplasma pneumoniae* to acute respiratory infections in Iranian children. J Trop Pediatr 2007;53:179-184.
33. Noorbakhsh S, Farhadi M, Tabatabaei A, Darestani SG, Nia SJ. Searching *Mycoplasma pneumonia* by serology & PCR in children with adenoid hypertrophy and rhinosinusitis: A case control study, Tehran, Iran. Iran J Microbiol 2013;5:63-67.
34. Haier J, Nasralla M, Franco AR, Nicolson GL. Detection of mycoplasmal infections in blood of patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 1999;38:504-509.