View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Qazvin University of Medical Sciences Repository

فصلنامه بیماری های عفونی و گرمسیری وابسته به انجمن متخصصین بیماری های عفونی و گرمسیری
سال نوزدهم ، شماره ۶۴ ، صفحات ۵۵ تا ۶۱، بهار ۹۳

فراوانی مایکوپلاسما 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 میکروب‌شناسی 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: *به‌دلیل اهمیت بالینی مایکوپلاسما هومینیس به‌ویژه در طب زنان و دشواری تشخیص این ارگانیسم در مراکز آزمایشگاهی کشور، لازم است فراوانی باکتری مذکور در ایران بیشتر و دقیق‌تر 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 مایکوپلاسما هومینیس در جمعیت مورد مطالعه و نیز ارتباط بین حضور ارگانیسم در بدن و ایجاد علائم بالینی در بیماران بررسی شده است.*

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

یافته‌ها: *از ۲۲۶ نمونهٔ برداشت شده از دهانهٔ رحم بیماران، ۳۰ نفر (۱۳/۲٪) از نظر کشت مایکوپلاسما هومینیس و تشکیل کلنی بر روی محیط آگار، مثبت بودند.*

نتیجه‌گیری: *فراوانی مایکوپلاسما هومینیس در قزوین قابل توجه بوده و تحقیقات بیش تری را در این زمینه می‌طلبد. استفاده از تکنیک و فرمولاسیون ساخت محیط‌های کشت که در این تحقیق به جزئیات آن اشاره شده است، می‌تواند حساسیت روش را بهبود ببخشد و قابلیت محیط های کشت در جداسازی این باکتری را افزایش دهد.*

واژگان کلیدی: ***مایکوپلاسما هومینیس، واژینوزیس، ناباروری، سقط جنین***

مقدمه

مایکوپلاسما هومینیس از کوچک ترین پروکاریوت‌های با زندگی آزاد است و به‌واسطهٔ فقدان پپتیدوگلیکان در پوشش سلولی و استفاده از آرژنین به‌عنوان اصلی‌ترین منبع تأمین انرژی با سایر باکتری‌ها تفاوت دارد. این دو ویژگی سبب شده است تا تشخیص و درمان عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم پرنیاز با دشواری‌هایی هم راه باشد. استقرار این باکتری در مجاری ادراری – تناسلی زنان سالم، هم‌زمان با شروع فعالیت‌های 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 نادیده‌گرفت(۲). اگرچه همراهی مایکوپلاسما هومینیس با عفونت‌های مجاری ادراری - تناسلی به‌کرات نشان داده شده است(۳)، ، اما دخالت این باکتری در ایجاد عفونت‌هایی چون پنومونی(۴)، آبسه‌های مغزی(۵)، تشکیل هماتوم و عفونت زخم‌ها(۶)، مننژیت(۷)، آرتریت عفونی(۸)، سقط‌های خودبه‌خودی(۹)، عفونت‌های نوزادان(۱۰) و باکتریمی(۱۱) را نباید از نظر دور داشت. علاوه بر این، بررسی‌های اخیر هم راهی این باکتری با بدخیمی‌هایی از جمله سرطان پروستات را مطرح کرده‌اند(۱۲).

با وجود توانایی‌های بالقوهٔ مایکوپلاسما هومینیس در ایجاد بیماری‌های مختلف، هنوز تشخیص این باکتری در مراکز آزمایشگاهی کشور با اشکالات فراوانی هم راه است و تنها گزارش‌های معدودی در خصوص میزان شیوع آن در تهران وجود دارد(۱۳). روش‌های سرولوژی همچون الایزا به دلیل تغییرات آنتی‌ژن‌های سطحی باکتری از حساسیت و ویژگی کافی برخوردار نبوده و قادر به تعیین تیتر آنتی‌بادی‌های اختصاصی در بدن بیمار نیستند(۱۴). جداسازی و کشت مایکوپلاسما هومینیس از نمونه‌های بالینی به دلیل نیازهای رشدی پیچیده و دشواری‌های تکنیکی، از حساسیت کافی برخوردار نمی‌باشد. روش‌های مولکولی از جمله PCR از یک طرف هزینه تشخیص را بالا برده و از طرف دیگر به دلیل تغییرات ژنتیکی عمده‌ای که در ژنوم این باکتری روی می‌دهند، 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 می‌باشد و هم چنین روشی ارزان در تشخیص مایکوپلاسما هومینیس به شمار می‌رود، طراحی یک سیستم کشت استاندارد به نحوی که حساسیت روش را بهبود بخشیده و قابلیت به اجرا درآمدن در مراکز تشخیصی و آزمایشگاهی کشور را داشته باشد ضروری به نظر می‌رسد.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 مایکوپلاسما هومینیس در جمعیت مورد مطالعه و نیز ارتباط بین حضور ارگانیسم در بدن و ایجاد علائم بالینی در بیماران مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار

این پژوهش از نوع اپیدمیولوژیک توصیفی بوده که طی سال‌های 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 محدودهٔ سنی بین ۲۰ تا ۵۰ سال را تشکیل می‌دهد که پس از مراجعه به بیمارستان، طبق نظر پزشک متخصص زنان دارای علائم بالینی بودند و پس از تکمیل پرسش‌نامه و گرفتن رضایت‌نامهٔ 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 ناحیهٔ واژن -۲- سابقهٔ ناباروری -۳- سابقهٔ سقط جنین -۴- سابقهٔ زایمان پیش از موعد و معیارهای خروج از مطالعه شامل: ۱- مصرف آنتی بیوتیک طی یک ماه گذشته -۲- بارداری -۳- گذراندن دورهٔ قاعدگی بودند.

برای روش نمونه‌برداری و انتقال نمونه مجرای تناسلی بیمار به کمک یک اسپیکولوم استریل و یک‌بار مصرف باز می‌شد تا شرایط بهتری برای معاینه و نمونه‌برداری فراهم گردد. اگر ناحیه بیرونی دهانهٔ رحم (اگزوسرویکس) بیمار حاوی ترشحات بود، به کمک یک سواب استریل پاک سازی شد. از هر بیمار ۲ سواب گرفته شد. سواب‌ها از جنس داکرون (پلی‌استیرن) با دستهٔ پلاستیکی سفید رنگ بودند که در بسته‌بندی‌های استریل مجزا قرارداشتند. هر سواب به اندازهٔ تقریبی یک سانتی‌متر وارد ناحیهٔ ابتدایی دهانهٔ رحم (اندوسرویکس) 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 نمونه‌گیری ممانعت به‌عمل آمد.

سواب اول بلافاصله پس از برداشت نمونه، تحت شرایط استریل، در محیط‌های کشت مایع (نارنجی رنگ) قرار گرفت. نمونهٔ برداشت شده توسط سواب دوم برای تهیهٔ گسترش روی ۳ لام شیشه‌ای استفاده شد. لام‌ها از شمارهٔ یک تا سه شماره‌گذاری شدند. برای تهیهٔ 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 سانتی‌متر رسم شد و پس از تهیهٔ لام سوم، سواب مذکور دور انداخته شد. لام‌های مذکور تنها جهت اقدامات بعدی تهیه شدند و در این طرح مورد استفاده قرار نگرفتند.

محیط‌های کشت مایع که در این بررسی به عنوان محیط‌های انتقالی نیز مورد استفاده قرار گرفتند، به هم راه سواپ‌های خود، تا اقدامات بعدی حد اکثر تا ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۲ تا ۸ درجهٔ سانتی‌گراد 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 تهیهٔ محیط کشت PPLO مایع اصلاح شده با حجم یک لیتر ابتدا ۲۱ گرم محیط پایهٔ 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، 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 عمل کرد اتوکلاو از چسب مخصوص اتوکلاو استفاده شد. پس از اتوکلاو، اجازه داده شد تا دمای ارلن در حدود ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد پایین آید، سپس در این دما، مکمل‌های مورد نیاز به شرح زیر به آن اضافه گردید:عصارهٔ مخمر ۲۵٪ با حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر (متعلق به شرکت MERCK آلمان): ۲۵ گرم پودر عصارهٔ مخمر پس از توزین در یک بالن ژوژهٔ ۱۰۰ میلی‌لیتری 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 لولهٔ مناسب تقسیم شد. تمامی لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی لوله‌ها در ظرف مناسبی جمع‌آوری شد. pH این محلول با اسید کلریدریک ۱ نرمال روی ۶/۵ تنظیم گردید و بعد از اتوکلاو کردن محیط پایه، به کمک فیلترهای 0.2 µm (متعلق به شرکت millipore کشور امریکا) به نسبت ۱۰٪ به آن اضافه شد.

سرم اسب با حجم نهایی ۲۰۰ میلی‌لیتر (متعلق به شرکت بهار افشان ایران): سرم اسب 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 ^{o}C 56 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 ژوژۀ ۵۰ میلی لیتری 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 0.2 µm به نسبت ۵٪ به آن اضافه‌شد. سوکروز ۳۰٪ با حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر (متعلق به شرکت MERCK آلمان): ۳۰ گرم پودر سوکروز در یک بالن ژوژۀ 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 0.2 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 ژوژۀ 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 0.2 µm به نسبت ۲٪ به آن اضافه‌شد.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. آمفوتریسین 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 تهیۀ محیط کشت PPLO جامد اصلاح شده با حجم یک لیتر ابتدا ۲۱ گرم محیط پایۀ 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، دهانۀ ارلن به کمک پنبه و گاز بسته شد و ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجۀ 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 درجۀ 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 سوکرز 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. کلیۀ محیط‌های مایع و جامد پس از خنک شدن داخل یخچال قرار گرفتند.

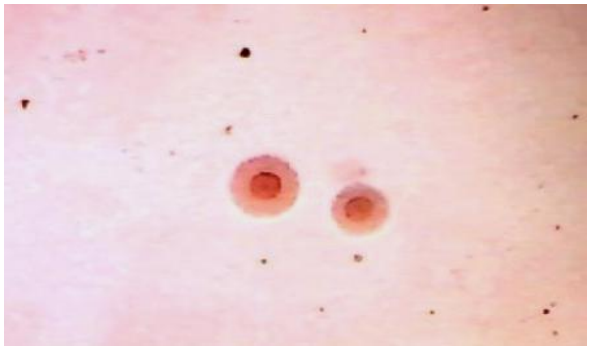
کلیۀ محیط‌های کشت مایع که پس از نمونه‌گیری، داخل یخچال نگهداری می‌شدند، حداکثر ظرف مدت ۲۴ ساعت روی محیط آگار انتقال یافتند. برای این منظور محیط‌های کشت مایع حاوی سواب، از یخچال خارج شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند. سپس تحت شرایط استریل، سواب داکرون موجود در هر محیط پس از تخلیۀ مناسب محتویات آن در محیط مایع، از لولۀ 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، به‌کار گرفته شد. پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد از یخچال خارج شده و ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند. به کمک لوپ‌های میکروب شناسی، حداقل ۲۵ میکرولیتر از محیط مایع فوق به‌صورت نقطه‌ای روی محیط آگار انتقال یافت، بدون اینکه در سطح محیط پخش گردد. برای هر نمونه، سه نقطۀ 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 CO_2 و درجه حرارت ۳۵ درجۀ 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 CO_2 قرار گرفته و به‌صورت روزانه از نظر تغییر رنگ بررسی شدند. به محض مشاهدۀ 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، مشاهدۀ 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. مشاهدۀ کلنی‌های ریز با مرکز متراکم یا برآمده شبیه به تخم مرغ نیمرو، در سطح محیط آگار که در رنگ امیزی گرم، باکتری خاصی را نشان نمی‌داد، به عنوان کشت مثبت از نظر مایکوپلاسما هومینیس در نظر گرفته شد.

در آنالیز داده‌ها از روش‌های آمار توصیفی استفاده شده است.

یافته ها

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



شکل ۱ . کلنی‌های مایکوپلاسما هومینیس رشد یافته بر روی محیط کشت آگار. (درشت نمایی X100)

با وجودی که در این مطالعه تعداد بیماران نابارور برای محاسبات دقیق‌تر آماری کافی نبود اما جداسازی مایکوپلاسما هومینیس از ۲۲/۲٪ این بیماران در خور توجه می‌باشد. ارتباط معنی‌داری بین حضور این باکتری و سابقهٔ سقط جنین یا زایمان پیش از موعد دیده نشد. با این حال باکتری مذکور از ۸ بیمار (۱۰/۹٪) با سابقهٔ حد اقل یک بار سقط جنین و ۳ بیمار (۱۵/۴٪) دارای سابقهٔ زایمان پیش از موعد جدا گردید.

از بین ۱۴۶ بیمار مبتلا به واژینوزیس با علائمی همچون ترشحات یا احساس سوزش و خارش در ناحیهٔ واژن، ۲۴ مورد (۱۶/۴٪) از نظر کشت مایکوپلاسما هومینیس بر روی محیط آگار و تشکیل کلنی‌های قابل مشاهده مثبت بودند. بیشترین شیوع مایکوپلاسما هومینیس در محدوهٔ سنی بین ۳۰ تا ۳۹ سال مشاهده گردید. به‌طوری‌که از ۸۹ بیمار در این گروه سنی ۱۷ نفر (۱۹/۱٪) از نظر کشت این باکتری مثبت بودند.

بحث

کلنیزاسیون مایکوپلاسما هومینیس در مجاری تناسلی زنان، هم زمان با شروع فعالیت‌های جنسی شروع می‌شود و درصورت فراهم بودن شرایط مناسب، می‌تواند تهدیدهای جدی را برای میزبان خود به دنبال داشته باشد. تغییرات فیزیولوژیک ناشی از بارداری در خانم‌ها، اهمیت این باکتری فرصت طلب در ایجاد آسیب‌هایی همچون سقط جنین، زایمان زودرس، عفونت نوزادان و تب‌های پس از زایمان را بیش از پیش مطرح می‌سازد، ضمن اینکه مواردی از ناباروری در بین زوج‌های جوان را نیز به این باکتری نسبت می‌دهند(۱۷). با وجود حساسیت بسیار بالای روش‌های مولکولی در تشخیص مایکوپلاسما هومینیس، یکی از مشکلات عمده‌ای که در این مسیر گریبان گیر آزمایشگاه‌ها و محققین می‌باشد، تغییرات ژنتیکی این ارگانیسم است که به وفور در ایزوله‌های مختلف مشاهده شده است(۱۶و۱۷). از این‌رو طراحی پرایمرهای اختصاصی که ویژگی لازم برای شناسایی ایزوله‌های 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 می‌خورد که عموماً به مهارکننده‌های آنزیم پلیمراز 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 مهارکننده‌های موجود در نمونه نمی‌باشد و احتمال تغییر در ژن هدف برای طراحی پرایمر را مطرح ساختند(۱۹).

در سال‌های اخیر با وجود گسترش تکنیک‌های مولکولی در تشخیص مایکوپلاسما هومینیس، روش کشت هنوز به‌عنوان استاندارد طلایی در شناسایی این ارگانیسم مطرح است. با توجه به فقدان دیوارهٔ سلولی در پوشش سلولی باکتری و در نتیجه حساسیت به شرایط محیطی و نیز پرنیاز بودن باکتری از لحاظ تغذیه‌ای، لازم است اصلاحاتی در تکنیک کشت و ساخت محیط‌های کشت مربوطه اعمال گردد تا حساسیت روش افزایش یافته و شرایط بهتری برای جداسازی و تشخیص این ارگانیسم فراهم آید.

در این مطالعه برای نمونه‌برداری از سواب‌های داکرون با دستهٔ پلاستیکی استفاده شد تا مهارکننده‌های رشد باکتری ناشی از سواب‌های پنبه‌ای با دستهٔ چوبی حذف گردند. یکی از ویژگی‌های متمایز در این بررسی نسبت به سایر پژوهش‌های انجام شده در ایران، حذف مرحلهٔ فیلتراسیون با فیلترهای 0.45 µm از روند کشت بود. ساختارهای آنتی‌ژنی متنوعی در سطح مایکوپلاسما هومینیس از قبیل vaa (Variable Adherence Associated Antigen)، P50، P100 و P120 وجود دارند که مسئول اتصال باکتری به سلول‌های مخاط دهانهٔ رحم بیماران هستند(۲۴-۲۱). این اتصال برای حیات باکتری در بدن و حفاظت از آن در برابر سیستم دفاعی میزبان ضروری است. باکتری‌هایی که اتصال خود به سلول‌ها را از دست داده‌اند هم راه با بقایای سلولی و دفاعی میزبان در قالب ترشحات دهانهٔ رحم یا واژن از بدن بیمار خارج می‌گردند؛ این‌ها غالباً باکتری‌های مرده یا ضعیفی هستند که توانایی رشد روی محیط‌های کشت اختصاصی را ندارند. بنابراین برای جداسازی و رشد باکتری روی محیط‌های کشت، لازم است تا سلول‌های مخاطی دهانهٔ رحم که باکتری‌های زنده و قابل رشد را روی خود حمل می‌نمایند، نمونه‌برداری شده و به محیط‌های کشت منتقل شوند. استفاده از فیلترهای مذکور که اکثراً برای حذف آلودگی مورد استفاده قرار می‌گیرند، با ممانعت از عبور سلول‌های مخاطی که باکتری‌ها به آنها چسبیده‌اند، مانع از عبور ارگانیسم‌های زنده شده و آنها را در پشت فیلتر نگه می‌دارند. در حالی‌که باکتری‌های جدا از سلول که یا مرده‌اند و یا قابلیت کافی برای رشد روی محیط‌های کشت را ندارند از این فیلترها رد می‌شوند. با حذف مرحلهٔ فیلتراسیون می‌توان به ارگانیسم‌های زنده که هنوز به سلول‌های مخاطی متصل می‌باشند دست یافت و آنها را روی محیط‌های کشت مربوطه منتقل نمود.

هرچند انتظار می‌رود در این روش، رشد سایر ارگانیسم‌های آلوده کننده، جداسازی و تشخیص مایکوپلاسما هومینیس را تحت تأثیر قرار دهد، اما در این بررسی نشان داده شد که با وجود آلودگی برخی از کشت‌ها، از آنجا که شرایط رشد برای ارگانیسم مورد نظر به‌صورت بهینه فراهم شده است، رشد و جداسازی این باکتری در کنار سایر عوامل آلوده کننده، امکان‌پذیر خواهد بود (شکل ۲)، ضمن اینکه آلودگی با سایر ارگانیسم‌ها تنها در ۱۴/۶ ٪ موارد دیده شد.در مطالعه‌ای که توسط نجارپیرایه و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد، مایکوپلاسما هومینیس به روش کشت تنها در ۲۰ مورد از ۳۱۲ نمونهٔ بیمار جدا شد (۶/۴٪) و این درحالیست که طبق نتایج مولکولی در همین بررسی موارد مثبت بیش از دو برابر این تعداد بوده است(۱۹). نتایج مشابه‌ای نیز توسط امیرمظفری و همکاران در سال ۲۰۰۹ ارائه شده است که طی آن از بین ۲۱۰ نمونه، مایکوپلاسما 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 بررسی‌ها ضمن مشکلات اجتناب ناپذیر ناشی از شرایط تغذیه‌ای و رشد این باکتری، می‌تواند ناشی از فیلتراسیون نمونهٔ بیمار نیز باشد.

در بررسی دیگری که توسط امیرمظفری و همکاران در سال ۱۳۸۷ بر روی ۲۰۵ بیمار در تهران انجام شد، مایکوپلاسما هومینیس از ۷/۷۶٪ نمونه‌ها به روش کشت جدا شد که با نتایج مطالعهٔ 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 مطالعهٔ حاضرتعداد بیماران با سابقهٔ ناباروری ۲۷ نفر بود که جهت محاسبات آماری کافی نمی‌باشد. با این حال از بین این افراد، ۶ بیمار (۲۲/۲٪) از نظر کشت مایکوپلاسما هومینیس مثبت بودند. این یافته با گزارشی که توسط Casari و همکاران از ایتالیا در سال ۲۰۱۰ منتشر شد متفاوت می‌باشد. طی آن بررسی از میان ۳۹۶ بیمار مبتلا به مشکلات ناباروری، تنها ۰/۲۵٪ افراد باکتری مذکور را در دستگاه تناسلی خود حمل می‌کردند. این آمار پایین می‌تواند ناشی از تکنیک کشت باشد، چراکه طی بررسی مذکور، برای کشت از محیط‌های کشت تجاری استفاده شد و ملاک مثبت بودن کشت فقط تغییر رنگ محیط مایع بود(۲۶).

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

نتیجه گیری

از آنجا که تشخیص کلنیزاسیون و عفونت ناشی از مایکوپلاسما هومینیس در دستگاه تناسلی زنان در مراکز آزمایشگاهی کشور با دشواری صورت می‌گیرد، استفاده از تکنیک و فرمولاسیون ساخت محیط‌های کشت اختصاصی که در این تحقیق به جزئیات آن اشاره شده است، می‌تواند حساسیت روش را بهبود ببخشد و قابلیت جداسازی باکتری از محیط‌های کشت را افزایش دهد.

در این بررسی هم چنین نشان داده شد که فراوانی ارگانیسم مذکور در قزوین قابل توجه بوده و تحقیقات بیش تری را در این زمینه می‌طلبد. پرداختن به این مهم می‌تواند در پیش گیری و کنترل عفونت‌های 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 نامهٔ 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 می‌آید. هم چنین از زحمات هم کاران درمانگاه زنان بیمارستان کوثر قزوین بابت مساعدت در زمینهٔ نمونه‌گیری و تکمیل پرسش‌نامهٔ بیماران و نیز همکاران آزمایشگاه مرجع سلامت قزوین تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Pereyre S, Sirand-Pugnet P, Beven L, Charron A, Renaudin H, Barre A, Avenaud 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, Jaton K, Hafen 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, Haghighi 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, Morenghi 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