بررسی مقایسه روش‌های کشت و PCR در تعیین شیوع مایکوپلاسما هومینس نمونه‌های اندوسرویکس بیماران مراجعه کننده به درمانگاه ناباروری بیمارستان فاطمیه همدان در سال ۱۳۹۵

فرزانه مرادی[۱]، دکتر رسول یوسفی مشعوف[۲*]، دکتر محمد یوسف علیخانی[۲]، دکتر صغرا ربیعی[۳]، دکتر حمیده پارساپور[۳]، سامان سعادت[۴]، جلال قادرخانی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.
۲. Ph.D باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.
۳. متخصص زنان و زایمان، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
۴. دانشجوی Ph.D باکتری‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۱۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۶/۱۱/۱۰

خلاصه

مقدمه: باکتری مایکوپلاسما هومینیس به‌طور همزیست در دستگاه تناسلی زنان زندگی می‌کند. بررسی‌های انجام شده در سال‌های اخیر نشان می‌دهد که حضور این باکتری مرتبط با اختلالاتی از قبیل واژینوز، ناباروری، سقط و زایمان زودرس می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی فراوانی مایکوپلاسما هومینیس در زنان مراجعه کننده به درمانگاه ناباروری بیمارستان فاطمیه همدان انجام شد.

روش‌کار: این مطالعه اپیدمیولوژیک - توصیفی در سال ۱۳۹۵ بر روی ۲۳۴ نفر از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه نازایی بیمارستان زنان فاطمیه شهر همدان انجام گرفت. با استفاده از سواب، از اندوسرویکس ۲۳۴ بیمار زن که حداقل یکی از علائم واژینوز، ناباروری، سقط و زایمان زودرس را داشتند، نمونه‌برداری انجام شد. از محیط کشت با حذف مرحله فیلتراسیون و از تکنیک مولکولی PCR برای ردیابی ژن 16s rRNA به‌عنوان دو روش تشخیص باکتری استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و آزمون مک نمار انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: فراوانی مایکوپلاسما هومینیس در هر دو روش، ۱۳/۷٪ به‌دست آمد. ضریب همبستگی بین روش‌های کشت و PCR برای تشخیص این باکتری نسبتاً مطلوب بود (k=۰/۵). تعداد ۴۱ نفر (۲۴/۴٪) از بیماران با سابقه حداقل یک بار سقط جنین و ۱۴۸ نفر (۱۴/۲٪) از بیماران دارای واژینوز، از نظر مایکوپلاسما آگار مثبت تشخیص داده شدند. بیشترین شیوع مایکوپلاسما هومینیس در محدوده سنی ۳۹-۳۰ سال مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: اگرچه تکنیک مولکولی PCR حساسیت بالایی در تشخیص مایکوپلاسما هومینیس دارد، ولی روش کشت تغییر یافته برای تشخیص این باکتری از حساسیت قابل قبولی برخوردار می‌باشد.

کلمات کلیدی: سقط، کشت، مایکوپلاسما هومینیس، ناباروری، PCR

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر رسول یوسفی مشعوف؛ دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران. **تلفن:** ۰۸۱-۳۸۳۸۰۵۷۲؛ **پست الکترونیک:** yousefimash@yahoo.com

مقدمه

مایکوپلاسما هومینیس، یکی از کوچک‌ترین باکتری‌های تک سلولی است که به صورت فلور طبیعی یا بیماری‌زا از گیاهان، حیوانات و انسان جداسازی می‌شود (۱) و به واسطه فقدان پپتیدوگلیکان در پوشش سلولی و استفاده از آرژنین برای تولید انرژی، با سایر باکتری‌ها متفاوت است (۲). برخی از این باکتری‌ها به صورت فلور نرمال در دستگاه تنفسی و ادراری- تناسلی ساکن هستند (۳) و به عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب مجاری ادراری- تناسلی شناخته شده‌اند. در انتقال این باکتری عواملی چون فعالیت‌های جنسی و تک یاخته‌هایی مانند تریکوموناس واژینالیس دخالت دارند (۴). کلونیزاسیون مایکوپلاسما هومینیس در مجاری تناسلی زنان، همزمان با شروع فعالیت‌های جنسی آغاز و در صورت فراهم بودن شرایط مناسب، می‌تواند میزبان خود را با تهدیدات جدی مواجه نماید. تغییرات فیزیولوژیک ناشی از دوران بارداری در زنان، اهمیت این باکتری فرصت‌طلب را در ایجاد آسیب-هایی مانند سقط جنین، زایمان زودرس، عفونت جنینی و تب‌های پس از زایمان برجسته می‌سازد، ضمن اینکه مواردی از ناباروری در بین زوجین جوان را نیز به این باکتری نسبت می‌دهند (۵، ۶). شرایط غیرمعمول بهداشتی و حضور باکتری‌های بیماری‌زا، باعث تکثیر و بیماری‌زایی مایکوپلاسماهای دستگاه تناسلی می‌شوند. در واقع این باکتری در دستگاه ادراری- تناسلی ۵۴-۲۱٪ زنان و ۱۳-۴٪ مردان مشاهده می‌شود. این باکتری در دستگاه تنفسی فوقانی ۳-۱٪ افراد سالم، بیش از ۸۰٪ افراد بزرگسال با بیماری‌های مزمن تنفسی و بیش از ۳۰٪ کودکان با التهاب مزمن لوزه، مشاهده می‌شود و موجب عفونت‌هایی مانند پنومونی (۷)، آبسه‌های مغزی (۸)، مننژیت (۹)، آرتریت عفونی (۱۰)، واژینوز (۱۱)، بیماری التهابی لگن و تولد نوزاد زودرس با وزن پایین (۵)، سقط جنین (۱۲)، ناباروری ناشی از عیوب لوله‌های فالوپ در زنان و اثرات منفی بر باروری مردان می‌شود. همچنین در بررسی‌های اخیر نیز به همراهی این باکتری با برخی بدخیمی‌ها از جمله سرطان پروستات اشاره شده است (۱۲). با وجود اهمیت بالینی مایکوپلاسما هومینیس در ایجاد بیماری‌های مختلف، هنوز تشخیص این باکتری در مراکز آزمایشگاهی ایران با مشکل روبروست و گزارش‌های اندکی در خصوص میزان شیوع آن در کشور وجود دارد (۱۳). روش‌های تشخیص ایمونولوژیک به دلیل هتروژنی و واکنش‌های متقاطع فراوان، با مشکلات زیادی همراه می‌باشند (۱۴). روش‌های مولکولی مرسوم مانند PCR، Multiplex PCR وReal -Time PCR از روش‌های تشخیص سریع با حساسیت و ویژگی بالا هستند که در تشخیص مایکوپلاسما هومینیس و سایر ارگانیسم‌های عامل واژینوز مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۵، ۱۶)، اما در مورد مایکوپلاسما هومیسنس، استفاده از این روش‌ها برای تشخیص به دلیل هزینه‌بر بودن و نبود تجهیزات مربوط به آزمایشات مولکولی در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی معمولی و مراکز دور و از طرف دیگر به دلیل تغییرات ژنتیکی عمده در این باکتری، از ویژگی کافی برخوردار نمی‌باشند (۱۴، ۱۷-۱۹). به دلایل ذکر شده روش کشت به عنوان یک روش استاندارد طلایی (۱۹)، ارزان بودن آن نسبت به تکنیک‌های مولکولی، عدم تأثیر تغییرات ژنتیکی بر فرآیند آزمایش و قابلیت انجام آن در آزمایشگاه‌های معمولی، با اهمیت می‌باشد، لذا ایجاد مکانیسمی مطلوب برای کشت این باکتری به گونه‌ای که حساسیت و ویژگی را بالا برده و امکان اجرا در مراکز آزمایشگاهی را داشته باشد، ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی شیوع مایکوپلاسما هومینیس در جمعیت زنان علامت‌دار مراجعه کننده به درمانگاه نازایی وابسته به بیمارستان فاطمیه همدان با به‌کارگیری تکنیک مناسبی برای کشت و مقایسه آن با روش PCR انجام گرفت.

روش‌کار

این مطالعه اپیدمیولوژیک - توصیفی در سال ۱۳۹۵ بر روی ۲۳۴ نفر از بیماران مراجعه کننده به درمانگاه نازایی بیمارستان زنان فاطمیه شهر همدان انجام گرفت. با توجه به مطالعات گذشته، جهت تعین حجم نمونه مورد نیاز با فرض حساسیت ۹۰٪ و دقت ۱۰٪ و سطح اطمینان ۹۵٪ و شیوع ۱۵٪ مایکوپلاسما هومینیس، حجم کل نمونه، ۲۳۴ نفر محاسبه گردید.

معیارهای ورود به مطالعه شامل: زنان متأهل در محدوده سنی ۵۰-۲۰ سال، دارای علائم بالینی واژینوز طبق معاینه پزشک متخصص زنان (داشتن ترشحات یا احساس سوزش و خارش در ناحیه واژن، وجود ترشحات سبز رنگ با بوی ماهی گندیده، تأیید واژینوز با گرفتن لام از ترشحات و ارسال به آزمایشگاه)، داشتن سابقه ناباروری (عدم باروری پس از یک‌سال مقاربت، بدون استفاده از روش‌های پیشگیری از بارداری)، سابقه سقط جنین، سابقه زایمان پیش از موعد، عدم مصرف آنتی‌بیوتیک طی یک ماه گذشته و عدم بارداری بود که پس از تکمیل پرسش‌نامه و گرفتن رضایت‌نامه کتبی، جهت نمونه‌برداری مناسب تشخیص داده شدند.

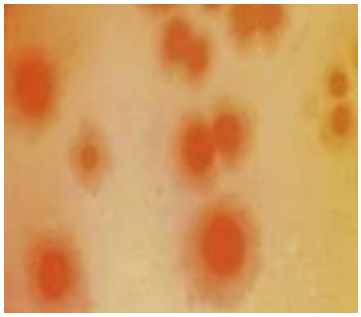
نمونه‌گیری با کمک سواب داکرون از ترشحات ناحیه داخلی دهانه‌رحم (اندوسرویکس) انجام گردید. از هر بیمار ۳ سواب گرفته شد. برای جلوگیری از آلودگی، هنگام خارج کردن سواب، از برخورد آن با سایر مناطق در مسیر نمونه‌گیری ممانعت به‌عمل آمد. سواب اول جهت اقدامات بعدی کشت با رعایت شرایط استریل در داخل ۳ میلی‌لیتر محیط انتقالی مایع قرار داده شد و بلافاصله در یخچال در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سواب دوم جهت اقدامات مولکولی در مراحل بعد و با رعایت شرایط استریل، داخل ۱ میلی‌لیتر بافر PBS قرار داده شد و بلافاصله در یخچال در دمای ۸-۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌های مذکور حداکثر ظرف ۲۴ ساعت پس از خارج کردن سواب، در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند. سواب سوم برای تهیه گسترش نازک و پس از فیکساسیون با متانول، به روش گرم (Gram) رنگ‌آمیزی گردید.

از محیط کشت PPLO به عنوان محیط پایه به دو صورت مایع و جامد استفاده شد. برای تهیه محیط PPLO[1]، مایع اصلاح شده به حجم ۱ لیتر، پس از اتوکلاو، در دمای حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد مکمل‌های مورد نیاز به شرح زیر و به کمک فیلترهای ۰/۲ میکرومتر به آن اضافه گردید: عصاره مخمر ۲۵٪ با pH=۶/۵، سرم اسب استریل به میزان ۲۰٪، ۱۰٪ L_Argenin با pH=۶/۷ به نسبت ۵٪، محلول سوکروز ۳۰٪ به نسبت ۱۰٪ و محلول فنل رد ۲۵٪ به نسبت ۲٪ به آن اضافه گردید و پنی‌سیلین G (U/ml 800 G) با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر به‌صورت مایع به نسبت ۰/۲۵٪ آمفوتریسین Bبا ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به صورت مایع به نسبت ۰/۱٪، بدون نیاز به فیلتر به آن اضافه شدند (۲۰، ۲۱).

برای تهیه محیط کشت PPLO جامد اصلاح شده با حجم یک لیتر، تمامی مکمل‌های مورد استفاده در محیط کشت مایع با همان نسبت به استثناء محلول سوکروز و معرف فنل رد، به محیط آگار نیز اضافه شدند. تمام محیط‌های کشت مایعی که پس از نمونه‌گیری داخل یخچال نگهداری شده بودند، حداکثر ظرف مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط آگار انتقال یافتند. برای این منظور، تحت شرایط استریل، سواب موجود در هر محیط پس از تخلیه مناسب محتویات آن در محیط مایع، از لوله مربوطه خارج و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. مایع رویی با رعایت شرایط استریل دور ریخته شد. به رسوب باقی‌مانده در ته لوله‌ها ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع جدید اضافه شد. به کمک سمپلر حداقل ۲۵ میکرولیتر از محیط مایع فوق به صورت نقطه‌ای بر روی محیط آگار بدون اینکه در سطح محیط پخش گردد، انتقال یافت. برای هر نمونه، سه نقطه کشت روی محیط آگار در نظر گرفته شد. لوله‌های محیط کشت مایع حاوی نمونه و پلیت‌های مربوطه، بلافاصله پس از کشت در انکوباتور CO_2دار (۵٪) در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. رطوبت محیط با قرار دادن یک مخزن آب مقطر استریل 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 بر روی محیط آگار به همان ترتیبی که ذکر گردید، کشت داده شدند. لوله‌های مذکور پس از ساب کالچر اولیه بلافاصله در انکوباتور CO_2دار قرار گرفتند و به صورت روزانه از نظر تغییر رنگ بررسی شدند. به محض مشاهده رنگ ارغوانی در این لوله‌ها، یک بار دیگر کشت در محیط آگار انجام می‌گرفت و پلیت‌ها از نظر تشکیل کلنی، مورد بررسی قرار می‌گرفتند. پلیت‌های

[1] pleuropneumonia-like organisms

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، زیرمیکروسکوپ نوری با عدسی ۱۰ و درشت نمایی ۱۰۰ برابر بررسی گردید. ملاک مثبت شدن کشت، مشاهده کلنی بر سطح محیط آگار بود. تغییر رنگ محیط کشت مایع به تنهایی و بدون رشد باکتری بر سطح محیط آگار، منفی گزارش گردید. مشاهده کلنی‌های ریز با مرکز متراکم یا برآمده شبیه تخم‌مرغ نیمرو، در سطح محیط آگار که در رنگ‌آمیزی گرم باکتری خاصی را نشان نمی‌داد، به عنوان کشت مثبت از نظر مایکوپلاسما هومینیس در نظر گرفته شد. برای تعیین هویت باکتری، هیدرولیز آرژنین در محیط مایع و تغییر رنگ از زرد به ارغوانی، شکل ظاهری کلنی-ها با نمای تخم‌مرغ نیمرو (Fried egg) در محیط آگار و عدم مشاهده باکتری در اسمیر رنگ‌آمیزی شده به روش گرم، برای تعیین هویت مایکوپلاسما هومینیس کفایت نمود. لازم به ذکر است که در تمام مراحل کشت از سویه استاندارد مایکوپلاسما هومینیس (PG21 ATCC23114) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. در این بررسی تمام نمونه‌ها صرف نظر از نتیجهٔ کشت، به روش PCR معمولی نیز مورد بررسی قرار گرفتند. برای استخراج DNA هم از نمونهٔ مستقیم بیمار نگهدار شده در بافر PBS و هم از محیط کشت مایع حاوی باکتری، می‌توان استفاده کرد (۲۲). از کیت استخراج DNA شرکت سینا کلون و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، استخراج DNA انجام گرفت. لازم به ذکر است جهت تأیید صحت مراحل DNA استخراج شده، از دستگاه Nano drap در طول موج nm ۲۸۰/۲۶۰ استفاده شد که جذبی در محدوده بین ۲۰- ۱/۸ داشتند. همچنین از الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸٪ به عنوان تست تأییدی و کنترل دستگاه استفاده گردید.



شکل ۱- کلنی مایکوپلاسما هومینیس بر روی محیط کشت PPLo آگار با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر

شکل ۲- کلنی مایکوپلاسما هومینیس بر روی محیط کشت PPLo آگار با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر

روش انجام PCR

ژن 16s rRNA به عنوان ژن هدف انتخاب شد. پرایمرهای مورد استفاده در این آزمون محصولی با طول ۱۰۱ جفت باز را تکثیر می‌کردند. به منظور اطمینان از تکثیر توالی مورد نظر، محصول PCR در کنار DNA Marker متعلق به شرکت Pars Tous الکتروفورز شد و اندازهٔ محصول مورد بررسی قرار گرفت. توالی و مشخصات پرایمرهای مستقیم و معکوس

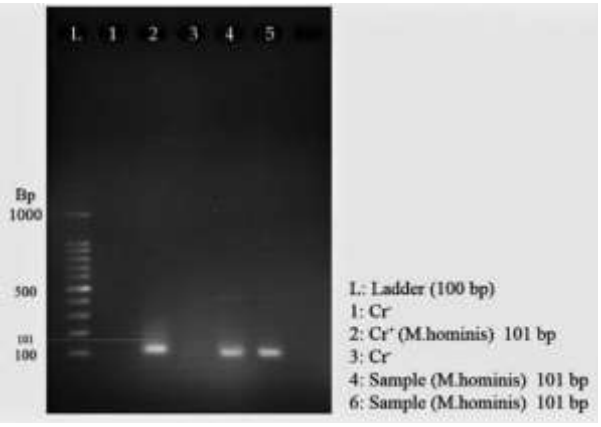
در جدول ۱ نشان داده شده است (۲۴-۲۲): پرایمرهای مذکور هر یک با غلظت ۰/۲ میکرومول در واکنش مربوطه مورد استفاده قرار گرفتند و واکنش با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گردید. مخلوط واکنش حاوی ۱ میکرولیتر از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۱۲ میکرولیتر از کیت شرکت Universal Master (Applied Biosystems) و ۵ میکرولیتر از DNA الگو بود. برای رساندن حجم مخلوط واکنش به ۲۵ میکرولیتر، ۶ میکرولیتر آب مقطر فاقد نوکلئاز نیز به مجموعهٔ فوق اضافه گردید. برنامه زمان‌بندی چرخه‌ها بدین ترتیب تنظیم گردید که هر واکنش ابتدا ۵ دقیقه در ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد و سپس ۳۰ ثانیه در ۵۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گیرد. بعد از آن، ۳۵ چرخه به صورت ۴۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد تعریف گردید.

جدول ۱- توالی پرایمرها و اندازه محصول مورد نظر در آزمایش PCR

منابع	محصول PCR	توالی پرایمر	پرایمر	باکتری
(۲۴)	nt: 2472–2493)	(5'- TTTGGTCAAGTCCTGCAACGA-3')	MH16s rRNA fwd	مایکوپلاسما هومینیس
	nt: 2553–2572)	(5'- CCCCACCTTCCTCCCAGTTA-3')	MH16s rRNA rev	

جدول ۲- برنامه زمان‌بندی دستگاه ترموسیکلر

نام مرحله	نام مرحله	دما (برحسب درجه سانتی‌گراد)	زمان (بر حسب دقیقه یا ثانیه)	تعداد چرخه
مرحله ۱	دناتواراسیون اولیه	۹۵	۵	۱
	دناتوراسیون ثانویه	۹۵	۳۰ ثانیه	۳۵
مرحله ۲	اتصال پرایمرها	۵۷	۴۵ ثانیه	۳۵
	گسترش	۷۲	۱	۳۵
مرحله ۳	گسترش	۷۲	۷	۱



شکل ۳- محصول آزمایش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪

یافته‌ها

در مطالعه حاضر از ۲۳۴ نمونه برداشت شده از دهانه رحم بیماران، ۱۴ نمونه (۶٪) از نظر کشت مایکوپلاسما هومینیس و تشکیل کلنی بر روی محیط کشت PPLO آگار، مثبت بودند (شکل‌های ۱، ۲). با PCR تمام نمونه‌ها، ۳۰ نمونه (۱۲/۸٪)، مثبت تشخیص داده شدند. ۲ نمونه فقط از نظر کشت و ۱۶ نمونه فقط به روش مولکولی تشخیص داده شدند. در نتیجه فراوانی مایکوپلاسما هومینیس در ترکیب هر دو روش، ۱۳/۷٪ به‌دست آمد. ضریب توافق بین دو روش (ضریب کاپا) نسبتاً مطلوب و معادل k=۰/۵ محاسبه گردید. از این تعداد بیمار بررسی شده طبق تشخیص پزشک متخصص زنان، ۲۴ نفر (۱۰/۳٪) نابارور، ۴۱ نفر (۱۷/۵٪) دارای سابقه سقط جنین و ۱۴۸ نفر (۶۳/۲٪) دارای ترشحات

یا سوزش در ناحیه واژن بودند. بدیهی است که برخی بیماران بیش از یک علامت بالینی را نشان می‌دادند. باکتری مذکور از ۴۱ نفر (۲۴/۴٪) از بیماران با سابقه حداقل یک بار سقط جنین و ۱۴۸ نفر (۱۴/۲٪) دارای واژینوز جدا گردید. بیشترین شیوع مایکوپلاسما هومینیس در محدوده سنی ۳۹-۳۰ سال مشاهده شد؛ به‌طوری‌که از ۸۲ بیمار در این گروه سنی، ۱۳ نفر (۱۵/۹٪) از نظر وجود این باکتری مثبت بودند.

بحث

در این پژوهش با استفاده از روش PCR و کشت، فراوانی مایکوپلاسما هومینیس در نمونه‌های اندوسرویکس زنان علامت‌دار نشان داده شد. با وجود گسترش تکنیک‌های مولکولی در تشخیص مایکوپلاسما هومینیس، هنوز روش کشت به عنوان استاندارد طلایی در شناسایی این ارگانیسم مطرح می‌باشد. به دلایلی چون فقدان دیواره در پوشش سلولی، حساسیت به شرایط محیطی نظیر دما، pH، ترکیبات موجود در محیط کشت و مشکل‌پسند بودن باکتری از لحاظ تغذیه‌ای، لازم است اصلاحاتی در تکنیک کشت و ساخت محیط‌های کشت داده شود تا با افزایش دادن حساسیت روش، شرایط بهتری برای نمونه‌برداری با استفاده از سواب داکرون فراهم و مهار کننده‌های رشد باکتریایی ناشی از سواب‌های پنبه‌ای با دسته چوبی حذف گردند. یکی از ویژگی‌های متمایز در این بررسی نسبت به سایر پژوهش‌های انجام شده، حذف مرحله فیلتراسیون با فیلترهای ۰/۴۵ میکرومتر از روند کشت می‌باشد. وجود ساختارهای متنوع آنتی‌ژنی در سطح مایکوپلاسما هومینیس از قبیل P120، P100، P50 که مسئول اتصال باکتری به سلول‌های مخاط دهانه رحم بیماران می‌باشند، برای حیات و حفاظت باکتری در برابر سیستم دفاعی میزبان ضروری هستند (۲۵، ۲۶). باکتری‌هایی که اتصال خود را به سلول از دست داده‌اند، همراه با بقایای سلولی و دفاعی میزبان در قالب ترشحات دهانه رحم یا واژن از بدن بیمار خارج می‌گردند که غالباً باکتری‌های مرده یا ضعیفی هستند که فاقد توانایی رشد بر روی محیط‌های کشت اختصاصی می‌باشند، بنابراین برای جداسازی و رشد باکتری بر روی محیط‌های کشت لازم است تا سلول‌های مخاطی دهانه رحم که باکتری‌های زنده و قابل رشد را بر روی خود حمل می‌نمایند، نمونه‌برداری و به محیط‌های کشت منتقل شوند. استفاده از فیلترهای مذکور که جهت حذف آلودگی به‌کار می‌روند، به‌علت ممانعت از عبور سلول‌های مخاطی که باکتری‌ها به سطح آن چسبیده‌اند، مانع از عبور باکتری‌های زنده شده و آنها را در پشت فیلتر نگه می‌دارند. در حالی که باکتری‌های جدا شده از سلول، یا مرده‌اند و یا قدرت کافی برای رشد بر روی محیط‌های کشت را ندارند، بنابراین از این فیلترها رد می‌شوند. با حذف مرحله فیلتراسیون می‌توان به باکتری‌های زنده‌ای که هنوز به سلول‌های مخاطی متصل می‌باشند، دست یافت و آنها را بر روی محیط‌های کشت مربوطه منتقل نمود. با این وجود انتظار می‌رود که در این روش، رشد سایر ارگانیسم‌های آلوده کننده، جداسازی و تشخیص مایکوپلاسما هومینیس را تحت تأثیر قرار دهند. اما در این بررسی نشان داده شد که با وجود آلودگی برخی از کشت‌ها، از آنجا که شرایط رشد برای ارگانیسم مورد نظر به صورت بهینه فراهم شده بود، رشد و جداسازی این باکتری در کنار سایر عوامل آلوده کننده امکان‌پذیر گردید. در مطالعه حاضر در کنار روش کشت، از تکنیک PCR برای تشخیص باکتری مایکوپلاسما هومینیس استفاده شد. به‌دلیل اینکه این باکتری در هنگام نمونه‌برداری و یا انتقال به آزمایشگاه ممکن است ضعیف و یا از بین برود و از طرف دیگر کشت مایکوپلاسما هومینیس در شرایط مطلوب بیش از ۲ تا ۵ روز طول کشیده و به محیط‌های کشت بسیار اختصاصی با مکمل‌های غذایی و پرسنل با تجربه آزمایشگاهی نیاز دارد (۲۷)، PCR روشی آسان، سریع، حساس و اختصاصی است و از این روش می‌توان برای تشخیص این باکتری از نمونه‌های بالینی استفاده کرد (۲۸، ۲۹). در روش PCR نتایج کمتر تحت تأثیر نمونه‌برداری و انتقال نمونه قرار می‌گیرند و می‌توان در کمتر از یک روز چندین نمونه را به طور همزمان مورد آزمایش قرار داد (۲۷، ۳۰، ۳۱)، اما مشکلاتی از قبیل تجزیه DNA باکتری و یا وجود مهارکننده‌های واکنش PCR در نمونه‌های بالینی و وجود هموگلوبین در نمونه‌های اندوسرویکس آلوده شده با خون (هنگام

نمونه‌گیری) می‌تواند با نتایج منفی کاذب همراه باشد. با وجود حساسیت بالای روش‌های مولکولی در تشخیص مایکوپلاسما هومینیس، یکی از مشکلات عمده، تغییرات ژنتیکی این ارگانیسم می‌باشد (۳۲، ۳۳). از این‌رو طراحی پرایمرهای اختصاصی با ویژگی لازم برای شناسایی ایزوله‌های مختلف این باکتری، کار دشواری است. در مقایسه با کشت، نتایج منفی کاذب عموماً به مهارکننده‌های آنزیم پلیمراز موجود در نمونه، احتمال تغییر در ژن هدف برای طراحی پرایمر در آزمایش PCR نسبت داده شده است (۳۴، ۳۵). در مطالعه حاضر به دلیل استفاده از روش کشت اصلاح شده در مقایسه با PCR به‌عنوان یک روش حساس، نشان داده شد که تکنیک کشت یاد شده حساسیتی به اندازه روش‌های مولکولی می‌تواند داشته باشد. در مطالعه پیرایه و همکار (۲۰۰۸)، مایکوپلاسما هومینیس به روش کشت تنها در ۲۰ مورد از ۳۱۲ نمونه (۶/۴٪) جداسازی شد و این در حالی است که طبق نتایج مولکولی در همین بررسی، موارد مثبت بیش از ۲ برابر این تعداد بوده است (۳۵). نتایج مشابهی نیز توسط امیرمظفری و همکاران (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 گردید (۱۴). حساسیت پایین کشت در این بررسی‌ها ضمن مشکلات اجتناب‌ناپذیر ناشی از شرایط تغذیه‌ای و رشد این باکتری، می‌تواند ناشی از فیلتراسیون نمونه بیمار باشد. مطالعه فراهانی و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که شیوع مایکوپلاسما هومینیس در زنان ایرانی بین ۴۰-۱۶٪ وابسته به روش‌های تشخیص است (۳۶). در مطالعه امیرمظفری و همکاران (۲۰۰۹) که بر روی ۲۰۵ بیمار در تهران انجام شد، مایکوپلاسما هومینیس از ۷/۷۶٪ نمونه‌ها به روش کشت جدا شد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی نداشت. در مطالعه امیرمظفری، باکتری مذکور در گروه سنی ۳۹-۲۹ سال بیشترین فراوانی را داشت که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت (۳۷). این یافته‌ها با نتایج مطالعه کاساری و همکاران (۲۰۱۰) در ایتالیا که از میان ۳۹۶ بیمار مبتلا به مشکلات ناباروری، تنها ۰/۲۵٪ افراد، باکتری مذکور را در دستگاه تناسلی خود حمل می‌کردند، متفاوت می‌باشد. این آمار پایین می‌تواند ناشی از تکنیک کشت باشد؛ چراکه در مطالعه کاساری، برای کشت از محیط‌های کشت تجاری استفاده می‌شد و ملاک مثبت شدن کشت، فقط تغییر رنگ محیط مایع بود (۳۸). همچنین نتایج مطالعه کاساری با نتایج مطالعه میکائیل (۲۰۰۴) در آمریکا (۲۰)، پتریکوس (۱۹۹۷) در یونان (۳۹) و لوکی (۱۹۹۸) در کانادا (۳۰) که در مطالعه آنها میزان کل جداسازی این ارگانیسم‌ها با روش کشت، بالای ۵۰٪ بود، همخوانی نداشت. این تفاوت می‌تواند ناشی از اختلاف در روش‌های آزمایشگاهی و خصوصیات جغرافیایی و فرهنگی این کشورها در مقایسه با ایران باشد. همچنین به دلیل اینکه میزان شیوع این ارگانیسم در افرادی که دارای شرکای جنسی متعددی می‌باشند بالاست، لذا بالا بودن میزان شیوع در کشورهای توسعه یافته که آزادی جنسی وجود دارد، دور از انتظار نیست. کلونیزه شدن مایکوپلاسما هومینیس در دستگاه ادراری - تناسلی زنان ارتباط آماری معنی‌داری با عواملی نظیر شرایط اجتماعی - فرهنگی پایین، فقر اقتصادی، عفونت‌های باکتریایی یا تک یاخته‌ای، استفاده از داروهای پیشگیری کننده از بارداری و فعالیت جنسی دارد که مطالعه حاضر مؤید این مطلب می‌باشد، اما تعدد شرکای جنسی در کشورهای توسعه یافته با افزایش میزان بروز این باکتری شرایطی است که کمتر در بیماران مورد مطالعه مطالعه حاضر وجود داشت. در مطالعه حاضر نتایج به‌دست آمده از نمونه‌های زنان بارور نشان داد که یک ارتباط آماری معنی‌داری بین ناباروری و حضور باکتری در واژن و یا سرویکس وجود دارد. در این مطالعه ارتباط آماری بین کلونیزاسیون مایکوپلاسما هومینیس بر اساس سن بیماران که در محدوده سنی ۳۹-۳۰ سال بودند، مشاهده گردید. در گزارشات آمده است که مایکوپلاسماهای تناسلی در زنان جوان با فعالیت جنسی زیاد بیشتر مشاهده می‌شود (۴۰، ۴۱). به‌نظر می‌رسد فعالیت جنسی بیش از سن در کلونیزه شدن باکتری نقش داشته باشد. مایکوپلاسما هومینیس در غیاب هر نوع بیماری در واژن یا سرویکس پیدا می‌شود، ولی با بیماری‌های مختلف ادراری- تناسلی

نظیر واژینوز باکتریایی، یورتریت، بیماری التهابی لگن، تب بعد از زایمان و سقط جنین، پیلونفریت و سالپنژیت ارتباط دارد (۱۹، ۲۷، ۴۱، ۴۲). نشان داده شده است که حضور این باکتری به هنگام بارداری می‌تواند سبب تولد نوزاد زودرس و یا کم وزن گردد (۴۳، ۴۴). در برخی مطالعات اکتساب مایکوپلاسما هومینیس طی عبور از کانال زایمان نیز سبب عفونت خون، پنومونی، مننژیت و آبسه‌های مغزی در نوزادان شده است (۴۶-۴۴). در مطالعه درادوسکا و همکاران (۲۰۰۶)، عفونت‌های جنسی اغلب در بیمارانی اتفاق افتاده بود که فعالیت جنسی داشتند و سن آنها بین ۳۰-۲۶ سال بود، در مطالعه آنها محدوده سنی در گروه شاهد ۴۲-۱۹ سال با میانگین ۸/۸۷±۴/۸۷ و در گروه مورد ۴۳-۱۹ سال با میانگین ۹/۶±۵/۹ سال بود. نتایج مطالعه آنها نشان دهنده حضور عفونت در زنان فعال از نظر جنسی بود، همچنین سابقه عفونت واژن در گروه مورد نسبت به گروه شاهد نسبت به گروه کنترل بیشتر بود، اما از نظر آماری معنی‌دار نبود، در حالی که وجود این میکروارگانیسم‌ها در فلور واژن ممکن است همراه با عوامل دیگر مانند واژینوز باکتریال یا مشکلات مربوط به سرویکس باشد که سقط خودبه‌خودی ایجاد می‌نماید (۴۷)، رویکرد دیگر این است که آیا درمان ضد میکروبی مایکوپلاسما هومینیس در زنان باردار می‌تواند نتایج حاملگی نامطلوب را کاهش دهد. شیوع مایکوپلاسما هومینیس با بسیاری از عوامل دیگر از جمله نژاد، وضعیت اجتماعی و اقتصادی، تغییرات هورمونی در دوران بارداری، تعداد شرکای جنسی، سن مادر و بارداری، محل نمونه‌برداری، روش تشخیصی و همکاری با سایر میکروارگانیسم‌ها مرتبط است. از سوی دیگر، این باکتری می‌تواند بخشی از فلور تناسلی طبیعی باشد و اکثر عفونت‌ها بدون علامت هستند. بنابراین نقش آنها در نتایج حاملگی نامطلوب، قابل بحث است (۴۹-۴۷). از این‌رو در بررسی شیوع این باکتری در زنان، تمام این عوامل باید در نظر گرفته شوند، زیرا تغییرات شایع در میان مطالعات مختلف را توضیح می‌دهند.

نتیجه‌گیری

از آنجا که تشخیص کلونیزاسیون و عفونت ناشی از مایکوپلاسما هومینیس در دستگاه تناسلی زنان در مراکز آزمایشگاهی کشور با دشواری صورت می‌گیرد، استفاده از تکنیک کشت تغییر یافته و فرمولاسیون ساخت محیط‌های کشت اختصاصی که در این تحقیق به تفصیل به آن اشاره شد، می‌تواند حساسیت روش را بهبود بخشیده و قابلیت جداسازی باکتری را از محیط-های کشت افزایش دهد. در این بررسی همچنین نشان داده شد که فراوانی ارگانیسم مذکور در همدان قابل توجه بوده و تحقیقات بیشتر در این زمینه بسیار ضروری به‌نظر می‌رسند. با توجه به اینکه هنوز در ایران شناسایی این ارگانیسم در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی به طور معمول انجام نمی‌شود، روش کشت معرفی شده به عنوان روش ساده، ارزان و در عین حال مطمئن برای راه‌اندازی در این آزمایشگاه‌ها پیشنهاد می‌شود تا بتوان با تشخیص به موقع، عواقب بعدی ناشی از این ارگانیسم را به حداقل رساند. لذا منطقی است که آزمایش‌های مربوط به شناسایی این ارگانیسم در آزمایشگاه‌هایی تشخیص طبی راه‌اندازی شوند تا ماماها و متخصصین زنان و زایمان برای تأیید مشاهدات بالینی خود از وجود این آزمون‌ها استفاده نمایند.

تشکر و قدردانی

این مطالعه منتج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی فرزانه مرادی از دانشگاه علوم پزشکی همدان بخش میکروب‌شناسی می‌باشد. بدینوسیله از مسئولین مربوطه و همچنین از زحمات همکاران مرکز ناباروری درمانگاه زنان بیمارستان فاطمیه همدان جهت مساعدت در زمینه نمونه‌گیری و تکمیل پرسش‌نامه بیماران و نیز از مسئولین آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی همدان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Peerayeh SN, Samimi R. Detection of ureaplasma urealyticum in clinical samples from infertile women by polymerase chain reaction. Iran J Pharmacol Ther 2007; 6(1):23-6.
2. Barbara DJ, Morton A, Clark MF, Davies DL. Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorante aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. Microbiology 2002; 148(1):157-67.
3. Razin S, Yogev D, Naot Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62(4):1094-156.
4. Stackebrandt SP. The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community. New York: Defining Taxonomic Ranks Springer; 2000. P. 29-57.
5. Stagey CM, Munday PE, Taylor-Robinson D, Thomas BJ, Gilchrist C, Ruck F, et al. A longitudinal study of pelvic inflammatory disease. Br J Obstet Gynaecol 1997; 99(12):994-9.
6. Peltier MR, Freeman AJ, Mu HH, Cole BC. Characterization and partial purification of a macrophage-stimulating factor from mycoplasma hominis. Am J Reprod Immunol 2005; 54(6):342-51.
7. Himmelreich R, Plagens H, Hilbert H, Reiner B, Herrmann R. Comparative analysis of the genomes of the bacteria Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium. Nucl Acids Res 1997; 25(4):701-12.
8. Herrmann R, Reiner B. Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium: a comparison of two closely related bacterial species. Curr Opin Microbiol 1998; 1(5):872-9.
9. Razin S, Jacobs E. Mycoplasma adhesion. J Gen Microbiol 1992; 138(3):407-22.
10. Regula J, Boguth G, Görg A, Hegermann J, Mayer F, Frank R, et al. Defining the mycoplasma 'cytoskeleton': the protein composition of the Triton X-100 insoluble fraction of the bacterium Mycoplasma pneumoniae determined by 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry. Microbiology 2001; 147(Pt 4):1045-57.
11. Koutsky LA, Stamm WE, Brunham RC, Stevens C, Cole B, Hale J, et al. Persistence of Mycoplasma hominis after therapy: importance of tetracycline resistance and of coexisting vaginal flora. Sex Transm Dis 1982; 10(4 Suppl):374-81.
12. Miyata M, Ryu WS, Berg HC. Force and velocity of Mycoplasma mobile gliding. J Bacteriol 2002; 184(7):1827-31.
13. Barykova YA, Logunov DY, Shmarov MM, Vinarov AZ, Fiev DN, Vinarova NA, 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 MR, Darkahi FD. Comparison of polymerase chain reaction and culture for detection of genital mycoplasma in clinical samples from patients with genital infections. Saudi Med J 2009; 30(11):1401-5.
15. Farhadifar F, Khodabandehloo M, Ramazanzadeh R, Rouhi S, Ahmadi A, Ghaderi E, et al. Survey on association between Mycoplasma hominis endocervical infection and spontaneous abortion using Polymerase Chain Reaction. Int J Reprod Biomed 2016; 14(3):181-6.
16. Milanezi F, Falconi A, Schnabel B, Ricardi LR, Monfredini PM, Ziliotto AT, et al. Prevalence of Mycoplasma hominis and ureaplasma spp. in routine gynecological care in Sao Paulo City, Brazil. Arch Clin Infect Dis 2016; 11(3):e36668.
17. McKechnie ML, Hillman RJ, Jones R, Lowe PC, Couldwell DL, Davies SC, et al. The prevalence of urogenital micro-organisms detected by a multiplex PCR-reverse line blot assay in women attending three sexual health clinics in Sydney, Australia. J Med Microbiol 2011; 60(7):1010-6.
18. Jamalizadeh Bahaabadi S, Mohseni Moghadam N, Kheirkhah B, Farsinejad A, Habibzadeh V. Isolation and molecular identification of Mycoplasma hominis in infertile female and male reproductive system. Nephrourol Mon 2014; 6(6):e22390.
19. Yoshida T, Maeda S, Deguchi T, Ishiko H. Phylogeny-based rapid identification of mycoplasmas and ureaplasmas from urethritis patients. J Clin Microbiol 2002; 40(1):105-10.
20. Schlicht MJ, Lovrich SD, Sartin JS, Karpinsky P, Callister SM, Agger WA. High prevalence of genital mycoplasmas among sexually active young adults with urethritis or cervicitis symptoms in La Crosse, Wisconsin. J Clin Microbiol 2004; 42(10):4636-40.
21. Ramazanzadeh R, Khodabandehloo M, Farhadifar F, Rouhi S, Ahmadi A, Menbari S, et al. A case–control study on the relationship between Mycoplasma genitalium infection in women with normal pregnancy and spontaneous abortion using polymerase chain reaction. Osong Public Health Res Perspect 2016; 7(5):334-8.
22. Pascual A, Jaton K, Ninet B, Bille J, Greub G. New diagnostic real-time PCR for specific detection of Mycoplasma hominis DNA. Int J Microbiol 2010; 2010:317512.
23. Taylor-Robinson D, Lamont RF. Mycoplasmas in pregnancy. BJOG 2011; 118(2):164-74.
24. Phillips L, Goodrich KH, Turner RM, Faro S. Isolation of Mycoplasma species and ureaplasma urealyticum from obstetrical and gynecological patients by using commercially available medium formulations. J Clin Microbiol 1984; 24(3):337-9.
25. Zhang Q, Wise KS. Molecular basis of size and antigenic variation of a Mycoplasma hominis adhesin encoded by divergent vaa genes. Infect Immun 1996; 64(7):2737-44.

26. Ladefoged SA, Christiansen G. Mycoplasma hominis expresses two variants of a cell-surface protein, one a lipoprotein, and one not. Microbiology 1998; 144(Pt 3):761-70.
27. Cultrera R, Roulland-Dussoix D, Romani R, Contini C. Use of PCR to detect mycoplasma DNA in respiratory tract specimens from adult HIV-positive patients. J Med Microbiol 1998; 47(11):983-6.
28. Yoshida T, Maeda SI, Deguchi T, Miyazawa T, Ishiko H. Rapid detection of Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, ureaplasma parvum, and ureaplasma urealyticum organisms in genitourinary samples by PCR-microtiter plate hybridization assay. J Clin Microbiol 2003; 41(5):1850-5.
29. Andrade-Rocha FT. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in men attending for routine semen analysis. Prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with the leukocyte count and clinical value. Urol Int 2002; 71(4):377-81.
30. Luki N, Lebel P, Boucher M, Doray B, Turgeon J, Brousseau R. Comparison of polymerase chain reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17(4):255-63.
31. Vojdani A, Franco AR. Multiplex PCR for the detection of mycoplasma fermentans, m. hominis, and m. penetrans in patients with chronic fatigue syndrome, fibromyalgia, rheumatoid arthritis, and Gulf War syndrome. J Chron Fatigue Syndrome 1999; 5(3-4):187-97.
32. Mygind T, Zeuthen Søgaard I, Melkova R, Boesen T, Birkelund S, Christiansen G. Cloning, sequencing and variability analysis of the gap gene from Mycoplasma hominis. FEMS Microbiol Lett 2000; 183(1):15-21.
33. Mygind T, Birkelund S, Christiansen G. DNA sequencing reveals limited heterogeneity in the 16S rRNA gene from the rrnB operon among five Mycoplasma hominis isolates. Int J Syst Bacteriol 1998; 48(Pt 3):1067-71.
34. Fenkci V, Yilmazer M, Aktepe OC. Have Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infections any significant effect on women fertility? Infez Med 2002; 10(4):220-3.
35. Peerayeh SN, Samimi R. Comparison of culture with the polymerase chain reaction for detection of gennital Mycoplasma. Eur J Gen Med 2008; 5:107-11.
36. Farahani MT, Hoseini F, Minai-Tehrani A, Novin MG. The effect of infection with genital Mycoplasma hominis and the presence of antisperm antibodies in Iranian women with unexplained infertility. Int J Womens Health Reprod Sci 2016; 4(1):18-22.
37. Amirmozafari N, Jeddi F, Masjedian F, Haghighi L. Prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in genital tract infections. Razi J Med Sci 2009; 15(60):19-25. (Persian).
38. 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 Microbiol 2010; 33(1):69-76.
39. Petrikkos GL, Hadjisoteriou M, Daikos GL. PCR versus culture in the detection of vaginal Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis. Int J Gynecol Obstet 2007; 97(3):202-3.
40. Zheng X, Olson DA, Tully JG, Watson HL, Cassell GH, Gustafson DR, et al. Isolation of Mycoplasma hominis from a brain abscess. J Clin Microbiol 1997; 35(4):992-4.
41. Clegg A, Passey M, Yoannes M, Michael A. High rates of genital mycoplasma infection in the highlands of Papua New Guinea determined both by culture and by a commercial detection kit. J Clin Microbiol 1997; 35(1):197-200.
42. Odendaal HJ, Popov I, Schoeman J, Grove D. Preterm labour--is Mycoplasma hominis involved? South Afr Med J 2002; 92(3):235-7.
43. Paul VK, Gupta U, Singh M, Nag VL, Takkar D, Bhan MK. Association of genital mycoplasma colonization with low birth weight. Int J Gynecolo Obstet 1998; 63(2):109-14.
44. Chua KB, Ngeow YF, Ng KB, Chye JK, Lim CT. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis isolation from cervical secretions of pregnant women and nasopharyngeal secretions of their babies at delivery. Singapore Med J 1998; 39(7):300-2.
45. Abdel-Haq N, Asmar B, Brown W. Mycoplasma hominis scalp abscess in the newborn. Pediatr Infect Dis J 2002; 21(12):1171-3.
46. Zheng X, Teng LJ, Watson HL, Glass JI, Blanchard A, Cassell GH. Small repeating units within the Ureaplasma urealyticum MB antigen gene encode serovar specificity and are associated with antigen size variation. Infect Immun 1995; 63(3):891-8.
47. Capoccia R, Greub G, Baud D. Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis and adverse pregnancy outcomes. Curr Opin Infect Dis 2013; 26(3):231-40.
48. Yeganeh O, Jeddi-Tehrani M, Yaghmaie F, Kamali K, Heidari-Vala H, Zeraati H, et al. A survey on the prevalence of Chlamydia trachomatis and Mycoplasma genitalium infections in symptomatic and asymptomatic men referring to urology clinic of Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. Iran Red Crescent Med J 2013; 15(4):340-4.
49. Zdrodowska-Stefanow B, Kłosowska WM, Ostaszewska-Puchalska I, Bułhak-Kozioł V, Kotowicz B. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis infection in women with urogenital diseases. Adv Med Sci 2006; 51(1):250-3.