

## مقایسه هویت مولکولی مایکوپلازما هومینیس ادرار بیماران مبتلا به عفونتهای با سایر جدایه‌های مشابه موجود در بانک ژن

حکیمه افتخاری مقدم<sup>1</sup>(MSc)، بابک خیرخواه<sup>2\*</sup>(PhD)، باقر امیرحیدری<sup>2</sup>(PhD)

1- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات کرمان

2- مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس، پژوهشکده نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دریافت: 94/1/12، اصلاح: 94/2/16، پذیرش: 94/4/2

### خلاصه

**سابقه و هدف:** مایکوپلازماها از عوامل مهم عفونتهای ادراری هستند. پژوهشهای زیادی بر پایه روش‌های کشت و بیوشیمیایی جهت جداسازی این باکتری از دستگاه ادراری تناسلی انجام شده اما مطالعه مولکولی و فیلوژنتیک آنها اساس بررسی‌های اپیدمیولوژیک خواهد بود. هدف از این تحقیق جداسازی و تعیین هویت مولکولی مایکوپلازما هومینیس جداسازی شده از ادرار بیماران مبتلا به عفونتهای ادراری شهر کرمان و مقایسه توالی آنها با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن می باشد.

**مواد و روشها:** در این مطالعه مقطعی 5 میلی لیتر ادرار میانی 50 بیمار مبتلا به عفونت ادراری پس از تأیید پزشک متخصص توسط آزمایشات پاراکلینیکی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه‌ای از ژن 16S rRNA مایکوپلازما هومینیس به روش PCR تکثیر و پس از خالص سازی محصول PCR، جدایه‌های باکتری تعیین توالی شدند و سپس با استفاده از نرم افزار Bio Edit هم ردیف کردن توالیها و مقایسه جدایه‌ها با یکدیگر و با سایر جدایه‌های موجود در بانک ژن انجام شد.

**یافته‌ها:** 3 جدایه مایکوپلازما هومینیس جدا گردید. همردیف کردن توالی ها و مقایسه آنها با توالی‌های موجود در بانک ژن تفاوت معنی داری نداشت. مطالعات فیلوژنتیک انجام گرفته در این پژوهش و درخت فیلوژنتیک ترسیم شده نشان می‌دهد که یکی از جدایه‌های این پژوهش (جدایه H6) با سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن قرابت بالایی دارد و در یک دودمان قرار می‌گیرد. در حالیکه دو جدایه دیگر (H11 و H15) در یک دودمان جداگانه و کاملاً مجزا از جدایه دیگر و سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن قرار گرفته و با تمام آنها قرابت ندارد.

**نتیجه گیری:** در این مطالعه پس از انجام PCR و جداسازی باکتری، با مقایسه توالی‌ها در بانک ژن تأیید گردید که هر سه جدایه بر اساس توالی ژن 16S rRNA، مایکوپلازما هومینیس هستند.

**واژه‌های کلیدی:** مایکوپلازما هومینیس، عفونت ادراری، واکنش زنجیره‌ای چندگانه، توالی نوکلئوتیدی، ژن 16S rRNA.

### مقدمه

عفونت‌های دستگاه ادراری (Urinary Tract Infections) دومین نوع معمول عفونت در بدن هستند که علت حدود 8/3 میلیون ویزیت پزشکی در سال به حساب می‌آیند. زنان به این نوع عفونت مستعدترند (1). از باکتری‌های عامل عفونت تناسلی و ناباروری در درجه اول می‌توان به کلامیدیاها، مایکوپلازماها و اوره‌پلازماها اشاره کرد. بعد از این گروه، گنوکوک، انتروباکتر، استرپتوکوک، انتروکوک، گاردنرلا واژینالیس و غیره هستند که 4 مورد آخر شیوع کمتری دارند (2). مایکوپلازماها عضو خانواده مایکوپلاسماتاسه بوده و به علت نداشتن دیواره سلولی در میان باکتری‌هایی که زندگی آزاد دارند از توانایی رشد و سنتز محدودی برخوردار هستند و برای رشد به محیط‌های غنی و پیچیده نیازمندند. این باکتریها در میزبانهای مختلف مثل انسان، حیوان، گیاهان و حشرات بیماریزا می‌شوند. این باکتریها با اینکه از ساکنان طبیعی مجرای ادراری مردان می‌باشند باقوه بیماریزا هستند. از 17 گونه جدا شده از انسان و در میان جنس‌های

مایکوپلازما و اوره پلازما چهارگونه مایکوپلازما پنومونیه، مایکوپلازما هومینیس، مایکوپلازما جنیتالیوم، اوره‌پلازما اوره‌لتیکوم در انسان دارای اهمیت بیشتری هستند. (3). مایکوپلازما هومینیس را می‌توان از دستگاه ادراری-تناسلی حدود 35% مردان و زنان بدون علامت جدا کرد اما عنوان شده که این ارگانیسم‌ها در ایجاد واژینوز باکتریایی، بیماری التهابی لگن، سیتی سمی پس از زایمان، سقط جنین خود به خودی، آندومتری، پیلونفریت و اورتریت نقش دارند (4). اکتساب مایکوپلازما هومینیس طی عبور از کانال زایمان ممکن است سبب مننژیت، عفونت خون، چشم و آبسه‌های مغزی در نوزادان گردد (6 و 5). این باکتری از آبسه‌های مغزی نیز جدا گردیده است (7). تحقیقات نشان داده که شیوع مایکوپلازما هومینیس در افرادی که علائم عفونت ادراری را نشان می‌دهند از افراد فاقد علامت بیشتر است (8). با این حال به علت مشکلاتی که در زمینه کشت و جداسازی این باکتری‌ها در آزمایشگاه‌ها وجود دارد نقش این ارگانیسم در

این مقاله حاصل پایان نامه حکیمه افتخاری مقدم دانشجوی رشته میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات کرمان می باشد.

\* مسئول مقاله: دکتر بابک خیرخواه

Kit-50 test استفاده شد. در این پژوهش از قطعه ای از ژن 16S rRNA به عنوان ژن هدف جهت ردیابی مایکوپلازما استفاده گردید. کنترل مثبت استفاده شده جهت انجام واکنش های PCR سویه استاندارد مایکوپلازما هومینیس (PG21) و کنترل منفی آب مقطر بود. توالی های نوکلئوتیدی و ویژگی آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص جنس مایکوپلازما و گونه مایکوپلازما هومینیس در این پژوهش و برنامه دمایی PCR جهت تکثیر ژنهای مورد نظر به ترتیب در جداول 1 و 2 نشان داده شده است. محصول PCR در ژل آگارز الکتروفورز گردید. ژل مورد استفاده یک درصد با محلول اتیدیوم بروماید به نسبت 0/5 میکروگرم به ازای هر میلی لیتر رنگ گردید. در این پژوهش از مارکر با bp 100 استفاده شد. پس از پایان مرحله الکتروفورز، ژل را از بافر خارج کرده و در دستگاه UV transilluminator قرار گرفت، با دوربین مخصوص عکس گرفته و از آن پرینت تهیه گردید. نمونه های مثبت گونه با استفاده از کیت High Performance Purification kit خالص سازی شده و جهت تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. توالیهای دریافتی ابتدا مورد ویرایش و آماده سازی قرار گرفتند، نواحی غیر قابل بررسی توالی ها، اصلاح و برای آنکه توالی ها در برنامه های بررسی توالی DNA قابل استفاده باشند فایل های مربوطه به فایل FASTA تبدیل گردیدند. با استفاده از برنامه BLAST موجود در سایت NCBI برای هر یک از توالی ها توالی های مشابه جستجو شد و توالی های مشابه و متفاوت دریافت گردید. پس از انجام بررسی های اولیه، توالی های مورد مطالعه و توالی های دریافت شده از بانک ژن NCBI، در نرم افزار Mega5 تحت بررسی هم ردیف سازی (Alignment) قرار گرفتند. برای این منظور ابتدا همه توالی ها با استفاده از نرم افزار مذکور در نواحی مشترک هم اندازه شدند و سپس نتایج هم ردیف سازی در نرم افزار BioEdit برای نمایش آماده گردیدند. نتایج مربوط به هم ردیف سازی بر مبنی توالی سوش ATCC23114 تنظیم شده و موقعیت قطعه مورد بررسی از جایگاه 197 تا 491 ژن 16S rRNA بررسی گردید. درخت فیلوژنیک بر اساس روش UPGMA با بکارگیری نرم افزار Mega 5 تهیه شد و فایل مربوطه بصورت عکس ذخیره شد.

ایجاد عفونت انسانی و به ویژه عوارض نامطلوبی که به دنبال خواهد داشت در کشور ما کمتر مورد توجه قرار گرفته است (9). پژوهشها نشان داده است که روش های مولکولی برای جدا سازی مایکوپلازماها از روش کشت حساستر بوده و ویژگی بالاتری دارند (10). تاکنون در خصوص جداسازی و مطالعات فیلوژنتیک مایکوپلازما هومینیس در بیماران مبتلا به عفونت های ادراری در ایران پژوهشی انجام نگرفته است، هر چند که این باکتری به روش واکنش زنجیره ای چندگانه (PCR) از نمونه مایع منی مردان نابارور مراجعه کننده به پژوهشکده رویان جدا سازی و مورد مطالعات فیلوژنتیک واقع شده است (11-13). در سایر نقاط جهان نیز هنوز از روش کشت جهت جداسازی این باکتری استفاده می گردد (8). جداسازی و شناخت مولکولی این باکتری در بیماران مبتلا به عفونت های ادراری از اهمیت بالایی برخوردار بوده و می تواند به عنوان بخش مهمی از برنامه های کنترل بیماری های منتقله از راه تماس جنسی به شمار آید. هدف از این تحقیق جداسازی مایکوپلازما هومینیس از دستگاه ادراری زنان و مردان مبتلا به عفونت های ادراری و مقایسه توالی جدایه ها با توالی های موجود در بانک ژن می باشد.

## مواد و روش ها

این مطالعه مقطعی در سه ماهه اول سال 1392 پس از تأیید در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کرمان بر روی کلیه بیمارانی که با تشخیص بالینی پزشک مبنی بر احتمال ابتلا به عفونت ادراری به آزمایشگاه بیمارستان شفا کرمان معرفی و با آزمایشات پاراکلینیکی عفونت دستگاه ادراری آنها تأیید شد، انجام گردید. علائم بالینی این افراد شامل تکرر ادرار، سوزش ادرار، درد ناحیه لگن و تغییر ظاهری رنگ ادرار بود. با توجه به اینکه روش PCR یک روش کاملاً اختصاصی و سریع جهت جداسازی عامل می باشد، در این مطالعه نمونه های اخذ شده غنی سازی نشده و مستقیماً مورد ارزیابی به روش PCR قرار گرفتند. پس از رسوب گیری نمونه های اصلی برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت کایژن به نام KIAGEN-PCR Template Purification

جدول 1. توالی های نوکلئوتیدی و آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص مایکوپلازما هومینیس به روش PCR

| Primer | Target gene | Sequence                              | Length |
|--------|-------------|---------------------------------------|--------|
| GSO    | 16S rRNA    | F: 5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT -3'   | 163    |
| MGSO   |             | R: 5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC -3' |        |
| RNA H1 | 16S rRNA    | F: 5'-CAATGGCTAATGCCGGATACGC-3'       | 344    |
| RNA H2 |             | R: 5'-GGTACCGTCAGTCTGCAAT-3'          |        |

جدول 2. برنامه دمایی آزمایش PCR

| چرخه | زمان (min) | دما  | مرحله                  |
|------|------------|------|------------------------|
| 1    | 6          | 94°C | Prog.1: Predenature    |
| 33   | 1          | 94°C | Seg.1: Denature        |
|      | 1          | 55°C | Seg.2: Annealing       |
|      | 1          | 70°C | Seg.3: Extension       |
| 1    | 7          | 72°C | Prog.3: Full extension |

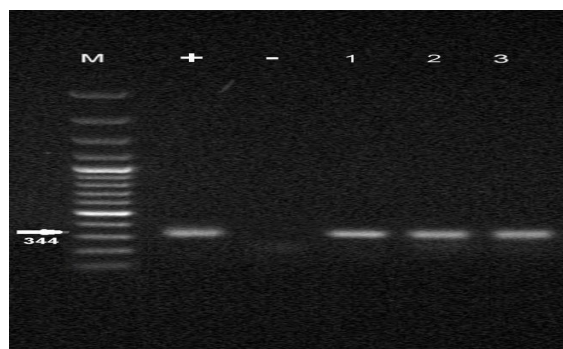
## یافته ها

پس از آزمایش PCR بر روی 50 نمونه ادرار بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری نمونه‌های مثبت جنس پس از مشاهده باند 163 bp در ژل آغاز تأیید شدند (شکل 1) و نمونه‌های جنس مثبت برای تعیین گونه مایکوپلاسما هومینیس، تحت واکنش PCR قرار گرفته و تشکیل باند 344 bp بر روی ژل آغاز نشان دهنده گونه‌های مثبت مایکوپلاسما هومینیس بود (شکل 2). نتایج آزمایشات PCR مایکوپلاسما نشان می‌دهد که در 30 مورد از 50 نمونه ادرار دریافتی، جنس مایکوپلاسما تأیید شد. همچنین با استفاده از آزمایش PCR، 3 مورد گونه مایکوپلاسما هومینیس مثبت شده است. که در جدول 3 نشان داده شده است.



شکل 1. تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغاز گر اختصاصی جنس مایکوپلاسما. (باندهای 163 در 8 نمونه جنس مثبت مشاهده می‌شود)

M: Marker 100bp; +: Positive Control. -: Negative Control. 1-8 positive Mycoplasma samples.



شکل 2. تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغاز گر اختصاصی گونه مایکوپلاسما هومینیس. (باندهای 344bp در 3 نمونه گونه هومینیس مثبت مشاهده می‌شود)

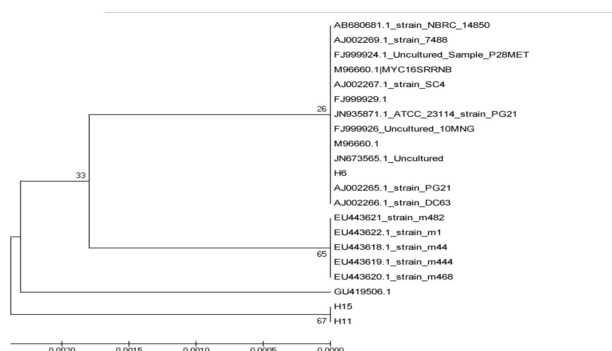
M: Marker 100bp; +: Positive Control. -: Negative Control. 1-3 positive Mycoplasma hominis samples.

همچنین هم‌ردیف سازی توالی‌ها و مقایسه آنها در بانک ژن نشان داد که جدایه‌های بدست آمده از لحاظ توالی ژن 16s rRNA، مایکوپلاسما هومینیس می‌باشند در جایگاه شماره 5 در پنج توالی دریافتی از بانک ژن که با شماره

دسترسی EU 443618 تا EU 443622 مشخص شده اند جایگزینی نوکلئوتید T با C دیده شد. در جایگاه 7 در توالی شماره 6 مربوط به همین مطالعه یک گپ مشاهده گردید که در مورد ژن 16s rRNA مورد نادری محسوب می‌شود. در جایگاه 246 در توالی جدایه GU 419506 یک مورد جایگزینی A با G دیده میشود و نیز در همین توالی در جایگاه 279 یک مورد گپ بچشم می‌خورد. در توالی های 11 و 15 مورد مطالعه ما در هر دو توالی در جایگاه 273 گپ و در جایگاه 276 جایگزینی A با T وجود داشت. در کل می‌توان گفت که توالی‌های مورد مطالعه با توالی‌های موجود در بانک ژن تفاوت چندانی ندارند و تفاوت‌های جزئی هم که وجود دارند برای اثبات اصالتشان نیاز به تکرار تعیین توالی می‌باشد. درخت فیلوژنیک، به دوشاخه اصلی تقسیم می‌گردد. شاخه اول که شامل دو نمونه مورد مطالعه با نامهای H 11 و H 15 می‌باشد و از دیگر شاخه‌ها جدا قرار گرفته است در قسمت دیگر درخت در مجموع سه شاخه دیده میشود یک شاخه با یک تک نمونه با شماره GU 419506 که نشان دهنده اختلاف این نمونه با دیگر موارد است و نیز دو شاخه شامل سایر نمونه‌ها که نمونه H6 مورد مطالعه در مجموعه اکثریت غالب توالی‌های مورد مطالعه قرار گرفته است (شکل 3).

جدول 3. فراوانی نمونه‌ها بر اساس، PCR جنس مایکوپلاسما و PCR

| نمونه ها | PCR جنس | PCR گونه     |                   |
|----------|---------|--------------|-------------------|
|          |         | تعداد (درصد) | تعداد در صد از کل |
| مثبت     | 30(60)  | 3            | 6%                |
| منفی     | 20(40)  | 27           | 54%               |
| جمع      | 50(100) | 30           | 60%               |



شکل 3. درخت فیلوژنیک مقایسه جدایه‌های این پژوهش با جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن، H6، H11 و H15 جدایه‌های پژوهش حاضر هستند

## بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق مشخص گردید که این باکتری به دلیل نداشتن دیواره سلولی به شرایط محیطی مثل pH، دما و ترکیبات موجود در محیط کشت بسیار حساس است و امکان دارد در هنگام نمونه برداری یا انتقال به آزمایشگاه باکتری ضعیف شده از بین برود و در محیط کشت قابل بازیابی نباشد. در خصوص مقایسه

کشت و PCR برای تشخیص بالینی این عفونت پژوهش‌های زیادی انجام شد و همه آنها روش PCR را برای تشخیص بهتر از کشت دانسته‌اند (14 و 15). همچنین در روش‌های مولکولی برای انجام آزمایش نیاز به باکتری زنده نیست و نتایج کمتر تحت تأثیر نمونه‌برداری و شرایط انتقال قرار می‌گیرد. از طرف دیگر نتایج کشت در شرایط بسیار مطلوب بیش از چندین روز طول می‌کشد و به محیط‌های کشت اختصاصی و پرهزینه نیاز دارد (16). جداسازی عامل عفونت در این تحقیق به روش PCR انجام شد که روش PCR را یک تست سریع و اختصاصی جهت جداسازی عوامل مایکوپلاسمایی عفونت‌های ادراری پیشنهاد می‌کند. در پژوهش‌های مشابه دیگری که در سایر نقاط دنیا صورت گرفته نیز این روش همواره برای تشخیص دقیق‌تر و بعنوان یک روش مناسب با حساسیت بالا پیشنهاد شده است (14-17) Ahmadi و همکاران در تحقیق خود عنوان می‌کنند که PCR از تست‌های معمول سریعتر است و می‌تواند بعنوان یک روش قابل اعتماد در جداسازی مایکوپلاسماهای تناسلی بکار رود (12) Vosoughi و همکاران در تحقیقی به جهت جداسازی مایکوپلاسمای هومینیس از ترشحات دستگاه تناسلی مردان نابارور که در مرکز ناباروری کرمان انجام گرفت نشان دادند که روش PCR از حساسیت و ویژگی بالایی نسبت به روش کشت برخوردار است و بدلیل دقت و سرعت بالا می‌تواند بعنوان یک تست تشخیصی مناسب در مرکز ناباروری کرمان در خصوص آزمایش مردان نابارور بکار برده شود (18). در پژوهش حاضر قطعاتی از ژن 16S rRNA جهت تکثیر با پرایمرهای تخصصی برای جداسازی جنس مایکوپلاسمای گونه مایکوپلاسمای هومینیس در آزمایش PCR مورد استفاده قرار گرفت. محققین زیادی نیز روش PCR را برای تشخیص انواع مایکوپلاسمای بر پایه تکثیر توالی‌های 16S rRNA استوار نموده‌اند که می‌تواند در سطح جنس و گونه مایکوپلاسمای تشخیص دهد (19). با توجه به اینکه در مطالعات قبلی خصوصاً در مطالعه Shahhoseini و همکاران نشان داده شده بود که پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش دارای حساسیت و ویژگی فوق العاده بالایی هستند، لذا حساسیت و ویژگی پرایمرها سنجیده نشد. مطالعه مذکور حساسیت بالا (100 درصد) و ویژگی خوب و مناسب (94 درصد) را برای جداسازی جنس مایکوپلاسمای گونه مایکوپلاسمای هومینیس را با پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه را نشان می‌دهد (20).

در مطالعه حاضر از 50 نمونه مورد بررسی مایکوپلاسماهای عامل عفونت ادراری در زنان و مردان مجموعاً در 60 درصد جنس مثبت مایکوپلاسمای تأیید شد که نشان می‌دهد عفونت مایکوپلاسمایی ادراری نقش بسزایی در بین عوامل این نوع عفونت‌ها در بین مردان و زنان دارد. Ghazisaeedi و همکاران نیز در پژوهشی عنوان نمودند که میزان عفونت مایکوپلاسمایی در بیماران مبتلا به عفونت ادرار 53 درصد است که نتایج تحقیق حاضر را تأیید می‌کند (21). نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد که شدت عفونت ادراری با عامل مایکوپلاسمای در شهر کرمان در زنان بیشتر از مردان می‌باشد. این نتایج در حالی است که بطور کلی نیز میزان عفونت‌های ادراری در زنان بیشتر از مردان است که دلیل آن را به وضعیت آناتومیک دستگاه ادراری-تناسلی زنان نسبت به مردان و طول کوتاه مجرای ادراری در زنان نسبت می‌دهند. در حقیقت نتایج این تحقیق با یافته‌های حاصل از سایر پژوهش‌های صورت گرفته مشابه است (22). در بررسی

Mosavyan و همکاران که به منظور جداسازی و تعیین وفورمایکوپلاسماهای عامل ایجاد عفونت در بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی اهواز صورت گرفت، از مجموع بیماران مبتلا به عفونت مایکوپلاسمایی ادراری-تناسلی، 31/4 درصد را مردان و 68/6 درصد را زنان تشکیل می‌دادند. نتایج این پژوهش نیز میزان ابتلاء زنان به عفونت‌های مایکوپلاسمایی را بیشتر از مردان می‌داند (23). در مطالعه حاضر نتایج نشان داد از مجموع 30 بیمار آلوده به مایکوپلاسماهای ادراری 3 بیمار (10 درصد) گونه مایکوپلاسمای هومینیس جدا گردید و 27 بیمار (90 درصد) به گونه‌های دیگر و یا احتمالاً به اوره پلاسمای اوره-لیتیوم آلوده بوده‌اند. البته تاکنون در خصوص جداسازی سایر گونه‌های مایکوپلاسمای عفونت‌های ادراری گزارشی بوده است. (24 و 12). در مجموع نتایج نشان می‌دهد که گونه مایکوپلاسمای هومینیس مهمترین عامل باکتریایی جدا شده در بیماران مبتلا به عفونت‌های ادراری در شهرستان کرمان نیست. با وجود پژوهش‌های مختلف انجام شده در ایران و جهان، در خصوص مایکوپلاسماهای ادراری-تناسلی، تعیین توالی نوکلئوتیدی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی مایکوپلاسمای بعنوان عامل عفونت‌های ادراری - تناسلی تاکنون در ایران انجام نشده بود. از اینرو با توجه به تفاوت سویه‌های مختلف در بیماری‌زایی و نیز تفاوت در تمایل باکتری به بافت‌های مختلف بررسی مولکولی و مطالعه هتروژنی آنها ضروری بنظر می‌رسید. لذا در این پژوهش پس از انجام PCR و جداسازی باکتری، جدایه‌های مثبت جهت انجام مطالعات مولکولی انتخاب شدند و با خالص سازی DNA توالی اسیدهای نوکلئوتیدی آنها مشخص شد. با مقایسه توالی‌ها در بانک ژن تأیید گردید که هر سه جدایه بر اساس توالی ژن 16S rRNA، مایکوپلاسمای هومینیس هستند. مطالعات فیلوژنتیک انجام گرفته در این پژوهش درخت فیلوژنتیک ترسیم شده نشان می‌دهد که یکی از جدایه‌های این پژوهش (جدایه H6) با سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن قرابت بالایی دارد و در یک دودمان قرار می‌گیرد. در حالیکه دو جدایه دیگر (H11 و H15) در یک دودمان جداگانه و کاملاً مجزا از جدایه دیگر و سایر جدایه‌های ثبت شده در بانک ژن قرار گرفته و با تمام آنها قرابت ندارد. لذا می‌توان این جدایه‌ها را، جدایه‌های بومی شهر کرمان معرفی نمود. نتایج این تحقیق علاوه بر این که می‌تواند راهگشای درمان‌های صورت گرفته در مورد این بیماری باشد بلکه دسترسی به جدایه‌های مایکوپلاسمای هومینیس با هویت مولکولی مشخص جهت استفاده در تحقیقات آینده و شناسایی عوامل عفونی دستگاه ادراری انسان را امکان پذیر نمود. جداسازی و تعیین هویت مایکوپلاسمای هومینیس از ادرار بیماران مبتلا به عفونت ادراری برای اولین بار در استان کرمان انجام گرفت. پیشنهاد می‌گردد توالیهای بدست آمده با سایر توالیهای این باکتری موجود در بانک ژن مقایسه و قرابت‌های بین آنها مشخص گردد.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از اساتید دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان و همکاران محترم بیمارستان شفا کرمان و همچنین از خانم سحر امیرپور رستمی بدلیل کمک‌های علمی تشکر و قدردانی می‌گردد.

## A Comparison between the Molecular Identity of *Mycoplasma Hominis* in Urine Samples of Patients with Urinary Tract Infections and Similar Strains Available in GenBank

H. Eftekhari Moghaddam (MSc)<sup>1</sup>, B. Kheirkhah (PhD)<sup>\*2</sup>, B. Amirheidari (PhD)<sup>2</sup>

1. Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Kerman Science and Research Branch, Azad Islamic University of Kerman, I.R.Iran

2. Pharmaceutics Research Center, Neuropharmacology Research, Azad Islamic University of Kerman, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 17(10); Oct 2015; PP:67-73

Received: Apr 1<sup>st</sup> 2015, Revised: May 6<sup>th</sup> 2015, Accepted: Jun 23<sup>rd</sup> 2015.

### ABSTRACT

**BACKGROUND AND OBJECTIVE:** Mycoplasmal infections are one of the most important urinary infections. Various studies have applied culture studies and biochemistry to separate the bacteria from the urinary tract. However, it should be noted that molecular and phylogenetic analyses are based on epidemiologic evaluations. The purpose of this study was to determine the molecular identity of *Mycoplasma hominis*, separated from the urine samples of patients with urinary tract infections in Kerman, Iran and compare the sequences with other strains in GenBank.

**METHODS:** In this cross-sectional study, 5 ml mid-stream urine samples of 50 patients with urinary tract infections were collected. After the specialists confirmed the diagnosis of urinary tract infections in patients via paraclinical tests, segments of 16S rRNA gene were amplified, using specific primers of *Mycoplasma hominis* via polymerase chain reaction (PCR) technique. After purifying the PCR product, the sequences of bacterial strains were determined. Then, the sequences were aligned and the strains were compared with each other and other strains available in GenBank, using BioEdit software.

**FINDINGS:** Three *Mycoplasma hominis* strains were separated in this study. The alignment of sequences and comparison with strains available in GenBank did not indicate a significant difference between the strains. Based on phylogenetic analyses in this study and the phylogenetic tree, one of the strains (H6) was highly similar to the strains of GenBank and belonged to the same family. On the other hand, two strains (H11 and H15) were of a different lineage and were completely different from other strains in the present study and those recorded in GenBank.

**CONCLUSION:** In this study, after applying the PCR technique and bacterial separation, the sequences were compared with those in GenBank. All three strains were *Mycoplasma hominis*, based on 16S rRNA gene sequence.

**KEY WORDS:** *Mycoplasma hominis*, Urinary tract infection, Polymerase chain reaction, Nucleotide sequence, 16S rRNA gene.

### Please cite this article as follows:

Eftekhari Moghaddam H, Kheirkhah B, Amirheidari B. A Comparison between the Molecular Identity of *Mycoplasma Hominis* in Urine Samples of Patients with Urinary Tract Infections and Similar Strains Available in GenBank. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(10):67-73.

\*Corresponding Author: B. Kheirkhah (PhD)

Address: Department of Microbiology, Science and Research Branch, Azad Islamic University of Kerman, Jopari Street, Kerman, I.R.Iran

Tel: +98 34 13241601

Email: b.kheirkhah@srbiau.ac.ir

## References

1. Maleki S, Motamedi H, Moosavian SM, Shahbaziyan N. Frequency of mycoplasma hominis and ureaplasma urealyticum in females with urogenital infections and habitual abortion history in Ahvaz, Iran; Using Multiplex PCR. Jundishapur J Microbiol. 2013; 6(6):e10008.
2. Solimani Rahbar A, Golshani M, Fayaz F, RafieeTabatabaei S, Moradi A. Detection of mycoplasma DNA from the sperm specimens of infertile men by PCR. Iran J Med Microbiol. 2007;1(1): 47-53. [In Persian]
3. Ross JDC, Jensen JS. Mycoplasma genitalium as a sexually transmitted infection: implications for screening, testing, and treatment. Sex Transm Infect. 2008; 82(4):269-71.
4. Wetmore CM, Manhart LE, Lowens MS, Golden MR, Jensen NL, Astete SG, et al. Ureaplasma urealyticum is associated with nongonococcal urethritis among men with fewer lifetimes sexual partners: a case-control study. J Infect Dis. 2011; 204(8):1274-82.
5. Amir Mozaffari N, Ahmadi MH, Sedighi Gilani MA, Kazemi B, Masjedian Jazi F. Detection of mycoplasma hominis and ureaplasma urealyticum from semen samples of infertile men referred to royan institute in 2008. Razi J Med Sci. 2009;17(71):14-26. [In Persian]
6. Najar Peerayeh Sh, Samimi R. Detection of Mycoplasma Hominis in Endocervix Specimens from Infertile Women by PCR. Daneshvar. 2006;14(66):63-8. [In Persian]
7. Pailhorie H, Rabier V, Eveillard M, Mahaza C, Joly-Guillou ML, Chennébault JM, et al. A case report of Mycoplasma hominis brain abscess identified by MALDI-TOF mass spectrometry. Int J Inf Dis. 2014;29(5):166-8.
8. Abdul Wahab OM, Al-Shyarba MH, Assiry MM. Detection of Mycoplasma hominis in patients with urinary tract infections. Amr J Inf Dis. 2014;10(2):77-83.
9. Vosooghi S, Kheirkhah B, Kariminik A, Mirshekari T. A review of the role of Mycoplasma infections in human's infertility. N Cell Mol Biotech J. 2012;2(8):9-20. [In Persian]
10. Ratliff AE, Duffy LB, Waites KB. Comparison of the illumigene Mycoplasma DNA amplification assay and culture for detection of Mycoplasma pneumoniae. J Clin Microbiol. 2014;52(4):1060-3.
11. Najar Pirayeh Sh, Al Yasin A. Comparison of PCR with culture for detection of Mycoplasma hominis in infertile women. Kowsar Med J. 2005;10(3):183-90. [In Persian]
12. Ahmadi MH, Amir Mozaffari N, Kazemi B, Sedighi Gilani MA, Masjedian Jazi F. Use of PCR to Detect Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum from Semen Samples of Infertile Men who Referred to Royan Institute in 2009. Yakhteh Med J. 2010;12(3):371-80. [In Persian]
13. 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.
14. Mousavi A, Farhadifar F, Mirnejad R, Ramazanzadeh R. Detection of genital mycoplasmal infections among infertile females by multiplex PCR. Iran J Microbiol. 2014;6(6):398-403.
15. Moosavian SM, Motamedi H, Maleki S, Shahbazian N. Comparison between prevalence of mycoplasma hominis and ureaplasma urealyticum in women with urogenital infections by multiplex PCR and culture methods. Med J Tabriz Med Sci Univ. 2011;33(5):91-7. [In Persian]
16. Najar Peerayeh Sh, Zeyghami H, Farshchian M, Atoofi J. Comparison of PCR and culture for diagnosis of Ureaplasma urealyticum in genital specimens of infertile men. Hakim Res J. 2007;10(3):48-53. [In Persian]
17. Gdoura R, Kchaou W, Ammar Keskes L, Chakronn N, Sellemi A, Znazen A, Rebai T, Hammami A. Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. J Androl. 2008;29(2):198-206.

- 18.Vosooghi S, Kheirkhah B, Mirshekari T, Kariminik A, Soudabeh Hamidavi Mohammadpour1 , Naeimeh Mohseni Moghadam. Molecular detection of *Mycoplasma hominis* from genital secretions of infertile men referred to the Kerman infertility center. *J Microbial world*. 2013;6(1):14-22. [In Persian]
- 19.Ferguson NM, Hepp D, Sun S, Ikuta N, Levisohn SH, Kleven SH, et al. Use of molecular diversity of *Mycoplasma gallisepticum* by gene-targeted sequencing (GTS) and random amplified polymorphism DNA (RAPD) analysis for epidemiological studies. *Microbiology*. 2005;151(Pt 6):1883-93.
- 20.Shahhosseiny MH, Hosseiny Z, Tabarraii B, Akhlaghi F, Shokrgozar M, Moslemi A. PCR detection of *Mycoplasma* spp. contamination in cell culture. *Iran J Med Microbiol*. 2008;2(2):15-25. [In Persian]
- 21.Ghazisaidi K, Fateminasab F, Vatani Sh, Azimi Y, Bakhshande Nosrat S, Mohamadi M. Prostatic massage method versus first -void Urine samples to isolate *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from urinary tract infection. *Lab Med J*. 2008;2(1):14-8.[In Persian]
- 22.Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik G, Vanezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital *Mycoplasma*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(4):1528-33.
- 23.Moosavian SM, Pordeli HR. Survey of respiratory and urogenital infections due to *Mycoplasma* in the hospitalized patients in Ahwaz Imam Khomeini Hospital. *Kerman Univ Med Sci J*. 2003;10(4):185-92.[In Persian]
- 24.Liu J, Wang Q, Ji X, Guo S, Dai Y, Zhang Z, et al. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis* infections, and semen quality in infertile and fertile men in China. *Urology*. 2014;83(4):795-9.