مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان / دوره هشتم / شماره ۱ / بهار ۱۳۸۵ / صفحات ۴۵ تا ۵۰

تحقیقی

بررسی آلودگی با مایکوپلاسماهای ژنیتال در زنان مبتلا به واژینوز باکتریایی کشت منفی با روش PCR

شیده وطنی
کارشناس ارشد میکروب‌شناسی گروه پاتوبیولوژی
دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر کیومرث قاضی سعیدی
استاد گروه میکروب‌شناسی و ایمونولوژی دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی گرگان
مریم محمدی
کارشناس ارشد میکروب‌شناسی گروه پاتوبیولوژی
دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
علیرضا ناجی
دانشجوی دکترای ویروس‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی
دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر فرحدخت فاطمی‌نسب
استادیار گروه ایمنولوژی دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی ایران
دکتر حجت زراعتی
دکترای آمار، گروه آمار و اپیدمیولوژی دانشکده بهداشت
دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر مینو محرز
دانشیار گروه بیماری‌های عفونی دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران

نویسنده مسؤول : دکتر کیومرث قاضی سعیدی
پست الکترونیکی : kiumarsghazisaidi@yahoo.com
نشانی : گرگان ، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گرگان
گروه میکروب‌شناسی
تلفن : ۴۴۲۱۶۵۳و۴۴۲۱۶۵۱-۰۱۷۱
نمابر : ۴۴۲۱۲۸۹

وصول مقاله : ۸۴/۱۱/۲
اصلاح نهایی : ۸۵/۲/۱۷
پذیرش مقاله : ۸۵/۳/۳

چکیده

زمینه‌وهدف : *مایکوپلاسماهای ژنیتال عامل عفونت دستگاه ادراری - تناسلی می‌باشند. این ارگانیسم‌ها در ارتباط با واژینوز باکتریایی، بیماری التهابی لگن، اندومتریت، سرویسیت، اورتریت غیرگنوکوکی، سقط‌جنین خودبخودی، تولد نوزاد نارس، پنومونی و مننژیت نوزادی می‌باشند. این مطالعه برای تعیین میزان توانایی PCR در شناسایی و تشخیص مایکوپلاسماهای ژنیتال در نمونه‌های کشت منفی زنان مبتلا به واژینوز باکتریایی صورت گرفت.*

روش بررسی : *مطالعه روی ۱۷۴ بیمار مبتلا به واژینوز باکتریایی مراجعه کننده به یکی از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی تهران از بهمن ۸۳ تا آذر ۸۴ صورت گرفت. از دو نمونه سوآب ترشحات ژنیتال، یکی روی محیط‌های کشت اختصاصی مایکوپلاسما منتقل شده و سوآب دیگر پس از حل شدن در بافر PBS جهت استخراج DNA فریز گردید. برای انجام PCR از پرایمرهای اختصاصی جنس مایکوپلاسما و اوره‌آپلاسما (MGSO, UGSO, My-ins) برای تکثیر ناحیهٔ ۵۲۰ bp ژن 16S rRNA استفاده شد.*

یافته‌ها : *از ۱۷۴ نمونه، ۷۱ نمونه (۴۰/۸ درصد) از نظر وجود مایکوپلاسما و یا اوره‌آپلاسما با استفاده از کشت، مثبت شده و ۱۰۳ نمونه (۵۹/۲ درصد) منفی شدند. روی این ۱۰۳ نمونه، PCR انجام شد. با استفاده از تکنیک PCR ، ۸۹ نمونه (۸۶/۴ درصد) منفی و۱۴ نمونه (۱۳/۶درصد) مثبت شدند.*

نتیجه‌گیری: *با روش PCR می‌توان مواردی از عفونت میکوپلاسمائی را شناسائی کرد که در روش کشت تشخیص داده نمی‌شود.*

کلیدواژه‌ها : *مایکوپلاسما هومینیس - مایکوپلاسماژنیتالیوم - اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم- واژینوز باکتریایی - PCR*

مقدمه

مایکوپلاسماهای ژنیتال عامل عفونت دستگاه ادراری – تناسلی می‌باشند. مایکوپلاسماهومینیس در ارتباط با واژینوز باکتریایی (BV)، بیماری التهابی لگن (PID)، اندومتریت، پیلونفریت، پروستاتیت، تب پس از زایمان و تب پس از سقط جنین، سقط جنین خودبخودی تکرار شونده، تولد نوزاد با وزن پایین و منتژیت نوزادی می‌باشد (۳-۱).

اوره‌آ پلاسما اوره‌آلیتیکوم یکی از عوامل اصلی اورتریت غیرگنوکوکی (NGU) در مردان می‌باشد. همچنین عامل ایجاد اپیدیمیت، پروستاتیت و آرتریت اکتسابی از طریق تماس جنسی (سندرم رایتر) (Reiter's syndrome) می‌باشد.

اوره‌آ پلاسما اوره‌آلیتیکوم در دوران بارداری در ایجاد کوریوآمنیونیت، زایمان پیش از موعد، سقط جنین خودبخودی و تولد نوزاد نارس نقش دارد. در نوزادان نارس به ویژه نوزادانی که به هنگام تولد دارای وزن کمتر از ۱۵۰۰ گرم می‌باشند، این ارگانیسم ممکن است سبب ایجاد سندرم دیسترس تنفسی، پنومونی و منتژیت گردد (۶-۴).

یکی دیگر از عوامل ایجاد کننده اورتریت غیرگنوکوکی، مایکوپلاسما ژنیتالیوم می‌باشد. این ارگانیسم به طور مستقیم مرتبط با سرویسیت، اندومتریت و بیماری التهابی لگن می‌باشد (۷و۸).

واژینوز باکتریایی (BV) که قبلاً به نام واژینیت گاردنرلایی نامیده می‌شد، عبارتست از تغییر در فلور باکتریایی طبیعی واژن که به کاهش لاکتوباسیل‌ها به ویژه سویه‌های مولد پراکسیدهیدروژن و جایگزینی آنها با تعداد زیادی از باکتری‌ها از جمله (گاردنرلا واژینالیس، مایکوپلاسما هومینیس، اوره‌آ پلاسما اوره‌آ لیتیکوم، باسیل‌های گرم منفی بی‌هوازی، گونه‌های پپتواستریتوکوک و موبیلونکوس) می‌انجامد (۹). زنان باردار مبتلا به واژینوز باکتریایی در معرض خطر پارگی زود هنگام غشاءهای جنینی، زایمان پیش از موعد، کوریوآمنیونیت، اندومتریت پس از سزارین و سقط جنین خودبخودی قرار دارند (۱۰و۱۱). خطر زایمان زودرس در زنان مبتلا به واژینوز باکتریایی تا ۵ برابر (۱۲) و خطر سقط جنین خودبخودی تا ۵/۵ برابر افزایش می‌یابد (۱۳). مایکوپلاسما هومینیس در واژن ۲/۳ زنان مبتلا به واژینوز باکتریایی یافت می‌شود. امروزه شکی وجود ندارد که مایکوپلاسما هومینیس به طور قوی در ارتباط با واژینوز باکتریایی می‌باشد (۱۴). اوره‌آ پلاسما اوره‌آ لیتیکوم نیز در ایجاد واژینوز باکتریایی نقش دارد اما نه به گستردگی مایکوپلاسما هومینیس (۳).

با توجه به اهمیت بیماری‌های ایجاد شده توسط این ارگانیسم‌ها و عواقب وخیمی که به دنبال دارند لازم است که افراد آلوده به سرعت شناسایی و درمان شوند. بنابراین تشخیص این ارگانیسم‌ها مسأله بسیار مهمی است. تشخیص این میکروارگانیسم‌ها معمولاً از طریق کشت صورت می‌گیرد، اما جداسازی آنها از طریق کشت مشکلاتی در پی دارد از جمله زمان طولانی جداسازی که امکان تشخیص سریع و آسان عفونت‌های ژنیتال را فراهم نمی‌کند (برای جداسازی گونه‌های اوره‌آ پلاسما و مایکوپلاسما هومینیس به ۲ تا ۵ روز و برای کشت مایکوپلاسماژنیتالیوم گاهی به بیش از ۸ هفته زمان نیاز داریم). همچنین این ارگانیسم‌ها به دلیل سخت رشد بودن به محیط‌های کشت اختصاصی نیاز دارند و می‌توان به گرانی و ناپایداری این محیط‌ها، نیاز به عوامل رشد ضروری و دشواری تهیه این مواد مکمل برای افزودن به محیط کشت، کنترل دقیق PH محیط و غیره اشاره کرد. تست‌های سرولوژیکی به کار رفته در تشخیص عفونت‌های ژنیتال اختصاصی نمی‌باشند [میان مایکوپلاسماژنیتالیوم و مایکوپلاسما پنومونیه از نظر آنتی‌ژنی واکنش متقاطع وجود دارد (۱۵)]. از جمله روش‌های مؤثر تشخیص می‌توان به واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) اشاره کرد. این روش سریع و اختصاصی بوده و قادر به افتراق میان گونه‌های مختلف مایکوپلاسما می‌باشد (۱و۲).

هدف از انجام این مطالعه تعیین میزان توانایی PCR در شناسایی و تشخیص مایکوپلاسماهای ژنیتال در نمونه‌های کشت منفی زنان مبتلا به واژینوز باکتریایی می‌باشد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی، ۱۷۴ زن مبتلا به واژینوز باکتریایی مراجعه کننده به یکی از آزمایشگاه‌های تشخیص طبی تهران که بیماری آنان با توجه به علائم بالینی توسط پزشک متخصص بیماری‌های عفونی و پس از تست‌های آزمایشگاهی

تأیید شده بود از بهمن ۸۳ تا آذر ۸۴ مورد بررسی قرار گرفتند.

با دوسوآب پنبه‌ای از ترشحات واژن نمونه گرفته می‌شد. بلافاصله یکی از سوآب‌ها در محیط ترانسپورت PPLO Broth بدون کریستال ویوله برای کشت مایکوپلاسما قرار داده می‌شد. سوآب دیگر را در لوله حاوی بافر PBS برای آزمایش PCR قرار داده و کاملاً تکان دادیم و پس از خارج کردن سوآب درب لوله را بسته و نمونه تا انجام PCR در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد فریزر نگهداری می‌شد.

به منظور جداسازی میکوپلاسماهای مورد نظر، محیط ترانسپورت PPLO را از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده و به محیط‌های مایع اوره، محیط آرژنین مایع و محیط مایع گلوکز تلقیح می‌کردیم. شیشه‌های درپیچ‌دار را در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد در Candle Jar قرار داده و هر روز لوله‌ها را به لحاظ تغییر رنگ و ایجاد رنگ صورتی مایل به ارغوانی بدون وجود کدورت مورد بررسی قرار دادیم. اگر تغییر رنگی در محیط ایجاد می‌شد، پاساژ آنها به محیط‌های کشت تازه حاوی یکی از ترکیبات اوره ،آرژنین یا گلوکز صورت می‌گرفت. سپس پلیت‌ها در Candle Jar و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفت و رشد باکتری‌ها در سطح محیط تا ۱۰ روز بررسی می‌گردید. اگر در طی این مدت کلنی ایجاد نشد، به عنوان منفی و در صورت ظهور کلنی مثبت در نظر گرفته می‌شد (۱۶).

استخراج DNA : ۱ ml از نمونه (بافر حاوی ترشحات واژینال) را در لوله ۱/۵ ml ریخته و در دور ۱۵۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ نمودیم. رسوب با بافر PBS شستشو داده شد. به نمونه بافر هضم کننده (Digestion buffer) و پروتئیناز k اضافه شده و سپس به مدت ۲ ساعت در بن ماری ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. برای استخراج DNA از روش فنل – کلروفرم استفاده گردید (۱۶).

PCR :

– پرایمرهای مورد استفاده:

Forward Primer : (نوکلئوتیدهای ۵۲۰ تا ۵۴۵ -5´) My-ins
GTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATC-3´

Reverse Primers : (نوکلئوتیدهای ۱۰۱۲ تا ۱۰۳۶ MGSO-2
(5´-CACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3´

(نوکلئوتیدهای ۹۸۸ تا ۱۰۱۲ -5´) UGSO
CACCACCTGTCATATTGTTAACCTC-3´

این پرایمرها برای تکثیر ناحیهٔ‌حدود 520 bp ژن rRNA 16S مایکوپلاسما و اوره آ پلاسما بکار رفت.

ترکیب PCR Master mix برای هر نمونه : ۵ میکرولیتر، ۱۰ X PCR buffer ، ۲ میکرولیتر، ۵۰mM Mgcl2

۲ میکرولیتر، (۱۰ mM) dNTP mix

۲/۵ میکرولیتر (۱۰ میکرومولار) Primer My- ins

۱/۲۵ میکرولیتر (۱۰میکرومولار) Primer UGSO

۱/۲۵ میکرولیتر (۱۰میکرومولار) Primer MGSO

۲۵/۵ میکرولیتر (DDW) آب مقطر دوبار تقطیر استریل

۱۰ میکرولیتر، DNA ، الگو

۵۰ میکرولیتر، حجم نهایی

فرایند PCR در یک برنامه سه قسمتی به ترتیب زیر انجام گرفت:

برنامه اول شامل:

۱ سیکل، ۱۰ دقیقه ، ۹۵°c ،Initial Cycle

برنامه دوم شامل :

۵۰ سیکل، ۳۰ ثانیه، ۹۴°c ، Denaturation

۳۰ ثانیه ، ۵۵ °c ، Annealing

۱ دقیقه ، ۷۲ °c ، Extension

برنامه سوم:

شامل ۱ سیکل ، ۷ دقیقه ، ۷۲° c ، Final Cycle

برای بررسی محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد به همراه اتیدیوم بروماید ۱ میکروگرم/میلی‌لیتر استفاده شد. سپس ژل در زیر دستگاه ترانس لومیناتور مورد بررسی قرار گرفت (۱۸).

یافته‌ها

۱۷۴ نمونه (سوآب واژن) به دست آمده از زنان مبتلا به واژینوز باکتریایی کشت داده شدند. ۷۱ نمونه (۴۰/۸ درصد) از نظر وجود ارگانیسم‌های مایکوپلاسما هومینیس، مایکوپلاسما ژنیتالیوم و اوره‌آ پلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت شده که انواع جنس‌ها و گونه‌های جدا شده به تفکیک در جدول یک ذکر گردید و ۱۰۳ نمونه (۵۹/۲ درصد) منفی شدند. ۱۰۳ نمونه کشت منفی با تکنیک PCR بررسی شدند. با استفاده از این تکنیک ۸۹ نمونه (۸۶/۴ درصد) منفی و ۱۴ نمونه (۱۳/۶

درصد) از نظر وجود این ارگانیسم‌ها مثبت شدند.

جدول ۱. توزیع فراوانی مطلق و نسبی افراد مورد بررسی برحسب نتایج کشت و نوع باکتری جدا شده

نتیجه کشت	تعداد	درصد
مایکوپلاسما هومینیس	۸	۱۱/۳
مایکوپلاسما ژنیتالیوم	۴	۵/۷
اوره آ پلاسما اوره آ لیتیکوم	۴۳	۶۰/۶
بیش از یک مایکوپلاسما	۱۶	۲۲/۴
جمع	۷۱	۱۰۰

همچنین بیماران از نظر وجود سوابق عفونت مورد بررسی قرار گرفتند. ۶۵ نفر از بیماران (۵۷درصد) دارای سابقه سقط جنین خودبخودی بودند. ارتباط هر یک از سوابق عفونت به تفکیک با نتیجه PCR و کشت بررسی شد. نتایج نشان داد ۷درصد از بیماران دارای سابقه سقط‌جنین خودبخودی دارای نتیجه PCR مثبت بوده و تفاوت ازنظر آماری معنی‌دار بود (جدول ۲) ($P<0/05$).

جدول ۲ : توزیع فراوانی مطلق و نسبی نمونه‌های کشت منفی مورد بررسی برحسب سابقه سقط‌جنین خودبخودی و نتیجه PCR

PCR	+		−		جمع	
سابقه سقط جنین خودبخودی	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
داشته	۳	۷/۰	۴۰	۹۳/۰	۴۳	۱۰۰
نداشته	۸	۲۵/۸	۲۳	۷۴/۲	۳۱	۱۰۰
جمع	۱۱	۱۴/۸۷	۶۳	۸۵/۱۳	*۷۴	۱۰۰

*از ۱۰۳ نفر که نتیجه PCR آنها مورد بررسی قرار گرفت، ۷۴ نفر به سؤالات پرسشنامه پاسخ دادند.

بحث

مایکوپلاسماهای ژنیتال عامل عفونت دستگاه ادراری-تناسلی بوده و در ایجاد بیماری‌های مختلف دستگاه تناسلی، اختلالات باروری، بیماری و مرگ و میر نوزادان نقش دارد. بنابراین تشخیص این ارگانیسم‌ها مسأله بسیار مهمی است که باید مورد توجه قرار گرفته و روش تشخیصی مناسبی برای شناسایی این ارگانیسم‌ها به کار رود. با توجه به نتایج به دست آمده از ۱۰۳ نمونه کشت منفی که با تکنیک PCR بررسی شدند، ۸۹ نمونه (۸۶/۴ درصد) منفی و ۱۴ نمونه (۱۳/۶درصد) از نظر وجود مایکوپلاسما و اوره‌آپلاسما مثبت شدند. این نتیجه نشان‌دهنده حساسیت بیشتر PCR در مقایسه با کشت در جداسازی مایکوپلاسماهای ژنیتال می‌باشد. نتایج مشابهی در مطالعات انجام شده توسط سایرمحققین به دست آمد. مثلاً DA SILVA و همکارانش پژوهشی برای تعیین نقش اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم و کلامیدیاتراکوماتیس در ایجاد bronchopulmonary dysplasia (BPD) (دیسپلازی برونکوپولمونواری) در نوزادانی که با وزن بسیار کم به دنیا آمده‌اند، انجام دادند. در این مطالعه آسپیره‌های Endotracheal،Nasopharyngeal و اطلاعات بالینی از ۱۰۸ نوزاد با وزن کمتر از ۱۵۰۱ گرم در زمان تولد به دست آمد و از نظر وجود اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم و کلامیدیا تراکوماتیس به وسیله کشت و PCR بررسی شد. اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم به وسیله کشت در ۴۰ نوزاد (۳۷درصد) و به وسیله PCR در ۴۹ نوزاد (۴۵درصد) جدا شد (۱۹).

N-Luki و همکارانش در کشور کانادا با استفاده از تکنیک PCR و کشت مطالعه‌ای برای جداسازی اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم، مایکوپلاسما هومینیس و مایکوپلاسما ژنیتالیوم در نمونه‌های بالینی (ترشحات واژن، ترشحات گلو، اندوسرویکس و سوآب‌های پوست) به دست آمده از ۴۷ زن باردار در معرض خطر و ۸ نوزاد تازه بدنیا آمده، انجام دادند. با استفاده از تکنیک PCR جداسازی DNA اوره‌آپلاسما در ۳۱ بیمار از ۵۵ بیمار مطالعه شده و مایکوپلاسما هومینیس در ۷نمونه و مایکوپلاسما ژنیتالیوم در ۲ نمونه، تسهیل شد. ۴ بیمار PRC مثبت ، نتیجه کشت منفی نشان دادند (۲۰).

در تحقیق Yoon و همکارانش، مایع آمنیوتیک به دست آمده از ۱۵۴ بیمار که دچار شکاف زود هنگام غشاء آمنیون شده بودند، از نظر وجود اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم به وسیله کشت و PCR بررسی و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم به وسیله PCR در ۲۸درصد بیماران و به وسیله کشت در ۱۶درصد بیماران جدا شد (۲۱).

یکی از نکات بسیار مهم ، تشخیص سریع مایکوپلاسماهای ژنیتال به ویژه در زنان باردار و نوزادان نارس می‌باشد. این ارگانیسم‌ها در صورت عدم تشخیص و عدم درمان در زنان باردار می‌توانند منجر به سقط‌جنین خودبخودی، تب پس از

زایمان، کوریوآمنیونیت، زایمان پیش از موعد و تولد نوزاد نارس گردند. همچنین در نوزادانی که با وزن پایین به دنیا آمده‌اند (به ویژه نوزادانی که هنگام تولد دارای وزن کمتر از ۱۵۰۰ گرم می‌باشند) ممکن است سبب ایجاد سندرم دیسترس تنفسی، پنومونی، مننژیت و مرگ گردند.

در این موارد لازم است که عامل عفونت‌زا به سرعت شناسایی و درمان شود. روش تشخیصی کشت وقت‌گیر بوده و دستیابی به نتایج به زمان طولانی ۷-۳ روز در مورد مایکوپلاسماهومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم و گاهی ۸هفته در مورد مایکوپلاسما ژنیتالیوم نیاز دارد. با استفاده از PCR دستیابی سریع‌تر به نتایج امکان‌پذیر شده و زمان سنجش به ۱ تا۲ روز کاهش می‌یابد. روش PCR در مقایسه با کشت از اختصاصیت و حساسیت بالاتری برخوردار است.

در این مطالعه PCR میزان شناسایی مایکوپلاسماهای ژنیتال را تا ۱۳/۶ درصد افزایش داد. این حساسیت افزایش یافته در نمونه‌های زنان دیده شد و با توجه به میزان بالای انتقال این ارگانیسم‌ها از مادر به جنین و ارتباط آنها با مرگ و میر نوزادان نتایج قابل تأمل است.

نتایج نشان داد که بیشترین افراد مبتلا به واژینوز باکتریایی مطالعه شده (۵۷درصد) دارای سابقه سقط‌جنین خودبخودی می‌باشند. همچنین این سابقه با نتیجه PCR مقایسه شد. نتایج نشان می‌دهد ۷ درصد از افراد دارای سابقه سقط‌جنین خودبخودی دارای نتیجه کشت منفی و PCR مثبت بودند (جدول۲). یعنی با استفاده از روش کشت آلودگی این بیماران با مایکوپلاسماهای ژنیتال تشخیص داده نشد و با توجه به نقش مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در ایجاد سقط جنین این مسأل حائز اهمیت است.

نتیجه‌گیری

در مجموع در زنان مبتلا به واژینوز باکتریال در ۸۵ مورد (۴۸/۹درصد) آلودگی با میکوپلاسماهای ژنیتال وجود دارد که روش کشت در ۷۱ مورد (۴۰/۸درصد)اثبات شد، ولی با روش PCR ، ۱۴ مورد دیگر نیز شناسایی گردید. به همین دلیل استفاده از کشت به تنهایی می‌تواند منجر به عدم شناسایی و تشخیص مواردی از عفونت میکوپلاسمایی گردد. براین اساس انجام PCR برای ترشحات واژینال مشکوک پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از کلیه همکاران آزمایشگاه که در این پروژه ما را یاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1) Serin MS, Evruke C, Kibar F, Koksal F. *Comparison of PCR and cultivation methods to determine the incidence of infections due to mycoplasma hominis and mycoplasma fermentans in women genitourinary tract.* Eastern Journal of Medicine. 2001;6(2): 48-52.

2) Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. *Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas*. J Clin Microbiol. 2004; 42(4):1528-33.

3) Taylor-Robinson D, Furr PM. Update on sexually transmitted mycoplasmas. Lancet. 1998;351 Suppl 3:12-5.

4) Potts JM, Ward AM, Rackley RR. *Association of chronic urinary symptoms in women and Ureaplasma urealyticum*. Urology. 2000;55(4):486-9.

5) Povlsen K, Jensen JS, Lind I. *Detection of Ureaplasma urealyticum by PCR and biovar determination by liquid hybridization.* J Clin Microbiol. 1998; 36(11):3211-6.

6) Cordova CM, Cunha RA. *Relevant prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum serogroups in HIV-1 infected men without urethritis symptoms*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2000;42(4):185-8.

7) Jensen JS. *Mycoplasma genitalium: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases*. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2004;18(1):1-11.

8) Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK, Dutro SM, Eschenbach DA, Stevens CE, et al. *Mucopurulent cervicitis and Mycoplasma genitalium*. J Infect Dis. 2003;187(4):650-7.

9) CIGNA، DNA Hybridization Assays and other Gene-Based Tests for vaginitis. Cigna Health Care Coverage Position. 2005. Coverage position Number 0340:1-7.

10) Donders GG, Van Bulck B, Caudron J, Londers L, Vereecken A, Spitz B. *Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion*. Am J Obstet Gynecol. 2000;183(2):431-7.

11) Kurki T, Sivonen A, Renkonen OV, Savia E, Ylikorkala O. *Bacterial vaginosis in early pregnancy and pregnancy outcome*. Obstet Gynecol. 1992;80(2):173-7.

12) Hay PE, Morgan DJ, Ison CA, Bhide SA, Romney M, McKenzie P, et al. *A longitudinal study of bacterial vaginosis during pregnancy*. Br J Obstet Gynaecol. 1994; 101(12):1048-53.

13) Donders GG. *Bacterial vaginosis during pregnancy: screen and treat?* Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 1999;83(1):1-4.

14) Rosenstein IJ, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Taylor-Robinson D. *Bacterial vaginosis in pregnancy: distribution of bacterial species in different gram-stain categories of the vaginal flora*. J Med Microbiol. 1996;45(2):120-6.

15) Lind K, Lindhardt BO, Schutten HJ, Blom J, Christiansen C. *Serological cross-reactions between Mycoplasma genitalium and Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol. 1984;20(6):1036-43.

۱۶) وطنی ، ش. بررسی نتایج PCR در نمونه‌های کشت منفی مایکوپلاسما ژنیتالیوم ، مایکوپلاسما هومینیس و اوره آ پلاسما اوره آ لیتیکوم در زنان مبتلا به واژینوز باکتریایی. پایان نامه برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی دانشکده بهداشت. دانشگاه علوم پزشکی تهران. سال ۱۳۸۴. صفحات ۵۶ تا ۶۵.

17) 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.

18) Yoshida T, Maeda S, 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.

19) Da Silva O, Gregson D, Hammerberg O. *Role of Ureaplasma urealyticum and Chlamydia trachomatis in development of bronchopulmonary dysplasia in very low birth weight infants*. Pediatr Infect Dis J. 1997;16(4):364-9.

20) 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.

21) Yoon BH, Romero R, Kim M, Kim EC, Kim T, Park JS, et al. *Clinical implications of detection of Ureaplasma urealyticum in the amniotic cavity with the polymerase chain reaction*. Am J Obstet Gynecol. 2000;183(5):1130-7.