SJRM SAREM JOURNAL OF REPRODUCTIVE MEDICINE

eISSN: 2476-3470; Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2019;3(4):135-141

Comparison of Sensitivity and Specificity of Indirect Immunofluorescence Method with Culture and Real-Time PCR for Diagnosis of Mycoplasma hominis Infection in Genitalia of Women

ARTICLE INFO

Article Type
Original research

Authors
Saadat S.* *PhD,*
Pouladi A.[1] *PhD, MD*

How to cite this article
Saadat S, Pouladi A. Comparison of Sensitivity and Specificity of Indirect Immunofluorescence Method with Culture and Real-Time PCR for Diagnosis of Mycoplasma hominis Infection in Genitalia of Women. Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2019;3(4):135-141.

*Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR), Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[1]Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR), Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

***Correspondence**
Address: Sarem Women Hospital, Basij Square, Phase 3, Ekbatan Town, Tehran, Iran. Postal Code: 1396956111
Phone: +98 (21) 44670888
Fax: +98 (21) 44670432
samansaadat_2006@yahoo.com

Article History
Received: December 11, 2018
Accepted: July 25, 2019
ePublished: October 15, 2019

ABSTRACT

Aims *Mycoplasma* hominis has today been described as an opportunistic pathogenic bacterium in the human genital and it is not possible to detect infection by culture, molecular and serological methods because of genetic changes and surface antigens of the bacterium. The purpose of this study was to evaluate the efficacy of indirect immunofluorescence method for the detection of infection caused by this organism.

Materials & Methods A total of 300 serum and vaginal discharge samples were collected from patients referred to Sarem Hospital. Antibody titer against *Mycoplasma* hominis in human serum samples were measured using an indirect immunofluorescence kit and the presence of bacteria in vaginal discharge was assessed by two methods of culture and real-time PCR.

Findings Of the 300 samples tested, 36 cases (12%) were detected by culture and real-time PCR. Indirect immunofluorescence method showed false negative results in 19 cases and false positive results in 41 cases compared to the reference method. Therfore the sensitivity and specificity of this method were 47% and 85.5%, respectively

Conclusion Indirect immunofluorescence method is not suitable for screening purposes due to its low sensitivity and for the detection of *Mycoplasma hominis* infection, it is necessary to employ sensitive molecular methods such as real-time PCR.

Keywords Mycoplasma hominis; Bacterial Vaginosis; Genital; Infection; Immunofluorescence; PPLO; Real-Time PCR

CITATION LINKS

[1] Cervical cytopathological findings in Korean women with Chlamydia trachomatis, Mycoplasma ... [2] Frequency and antimicrobial sensitivity of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma ... [3] Prevalence of Mycoplasma genitalium and Mycoplasma ... [4] Accuracy of urethral swab and urine analysis for the detection of Mycoplasma ... [5] Mycoplasma hominis necrotizing pleuropneumonia ... [6] A case report of Mycoplasma hominis brain ... [7] Hematoma and abscess formation caused by Mycoplasma ... [8] A new case of Mycoplasma hominis mediastinitis and sternal ... [9] Intra-abdominal Mycoplasma hominis infection ... [10] Diagnosis and antimicrobial therapy of Mycoplasma ... [11] Hypogammaglobulinemic patient with polyarthritis mimicking rheumatoid arthritis ... [12] Congenital and opportunistic infections: Ureaplasma species ... [13] Mycoplasma hominis prosthetic valve endocarditis: the value of ... [14] Mycoplasma hominis empyema in an 18-year-old stem cell and lung ... [15] Association of Mycoplasma hominis ... [16] Life on arginine for Mycoplasma hominis: clues from its minimal genome and comparison ... [17] Simultaneous detection of Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma ... [18] Diversity of Mycoplasma hominis clinical isolates from ... [19] DNA sequencing reveals limited heterogeneity in the 16S rRNA gene ... [20] Molecular basis of size and antigenic variation of a Mycoplasma ... [21] Truncation as a novel form of variation of the p50 gene in Mycoplasma ... [22] The Mycoplasma hominis P120 membrane protein contains a 216 amino acid ... [23] Bailey & Scott's diagnostic ... [24] New diagnostic real-time PCR for specific detection of ... [25] Association between preterm labor and genitourinary tract infections ... [26] Mollicutes in vaginal microbiology: Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum ... [27] Isolation of Mycoplasma hominis from ... [28] Localized reversible frameshift mutation in an ... [29] Coupled phase-variable expression and epitope masking ... [30] The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Mycoplasma ... [31] Prevalence of Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis and Chlamydia ...

Copyright© 2019, ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

مقایسه حساسیت و ویژگی روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی ریل‌تایم برای تشخیص عفونت *مایکوپلاسما هومینیس* در مجاری تناسلی زنان

سامان سعادت* PhD
مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
آرش پولادی PhD, MD
مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

چکیده
اهداف: *مایکوپلاسما هومینیس* امروزه به‌عنوان یک باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب در مجاری تناسلی انسان مطرح بوده و تشخیص عفونت ناشی از آن با روش‌هایی همچون کشت، مولکولی و سرولوژی، به‌دلیل تغییرات ژنتیکی و آنتی‌ژن‌های سطحی باکتری به‌راحتی امکان‌پذیر نیست. هدف این پژوهش، بررسی کارآیی روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای تشخیص عفونت ناشی از این اُرگانیزم بود.
مواد و روش‌ها: تعداد ۳۰۰ نمونه سرم و ترشحات واژینال از مراجعین به بیمارستان صارم جمع‌آوری شد. تیتر آنتی‌بادی علیه *مایکوپلاسما هومینیس* در نمونه سرم افراد با استفاده از کیت تجاری ایمونوفلورسانس غیرمستقیم مورد سنجش قرار گرفت و حضور باکتری در ترشحات واژن با دو روش کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی ریل‌تایم ارزیابی شد.
یافته‌ها: از ۳۰۰ نمونه مورد آزمایش، باکتری مذکور در ۳۶ مورد (۱۲%) به‌روش کشت و واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی ریل‌تایم تشخیص داده شد. روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم در مقایسه با روش مرجع، در ۱۹ مورد نتایج منفی کاذب و در ۴۱ مورد نتایج مثبت کاذب نشان داد. بدین ترتیب حساسیت و ویژگی این روش به ترتیب ۴۷ و ۸۵/۵% محاسبه شد.
نتیجه‌گیری: روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با توجه به حساسیت پایین، روش مناسبی برای مقاصد غربالگری محسوب نمی‌شود و برای تشخیص عفونت ناشی از *مایکوپلاسما هومینیس* لازم است تا از روش‌های حساس مولکولی مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی ریل‌تایم استفاده شود.
کلیدواژه‌ها: مایکوپلاسما هومینیس، واژینوزیس باکتریایی، دستگاه تناسلی، عفونت، ایمونوفلورسانس، PPLO، واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی ریل‌تایم

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۰۳
*نویسنده مسئول: samansaadat_2006@yahoo.com

مقدمه

مایکوپلاسما هومینیس امروزه به‌عنوان یک باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب مطرح است و حضور آن در مجاری ادراری- تناسلی انسان و سهولت انتقال آن از طریق تماس‌های جنسی، اهمیت این باکتری را در مبحث بیماری‌های عفونی مقاربتی بیشتر می‌کند[1, 2]. اگرچه حضور *مایکوپلاسما هومینیس* در عفونت‌های مجاری ادراری- تناسلی در موارد زیادی توصیف شده است[3, 4]، اما توانایی این باکتری در ایجاد عفونت‌هایی همچون پنومونی[5]، آبسه‌های مغزی[6]، تشکیل هماتوم[7] و عفونت زخم‌ها[8]، عفونت‌های داخل شکمی[9]، مننژیت[10]، آرتریت عفونی[11]، سقط‌های خودبه‌خودی و عفونت نوزادان[12]، اندوکاردیت و باکتریمی[13] را نباید نادیده گرفت. عفونت ناشی از این باکتری در بیماران پیوندی نیز از اهمیت خاصی برخوردار است[14]. همچنین در بررسی‌های اخیر همراهی این باکتری با بدخیمی‌هایی از جمله سرطان پروستات نیز دیده شده است[15].
از آنجا که توان تولید انرژی در *مایکوپلاسما هومینیس* محدود بوده و ساختار مستحکم پپتیدوگلیکان در دیواره سلولی آن مشاهده نمی‌شود[16]، فراهم‌آوردن نیازهای تغذیه‌ای و تشخیص‌های متداول باکتریولوژیک از قبیل کشت و مشاهده مستقیم برای شناسایی این باکتری پُرنیاز با دشواری‌هایی مواجه است. به همین دلیل روش‌های مولکولی از قبیل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به‌دلیل کاهش زمان تشخیص و افزایش حساسیت سنجش، از سوی مراکز تشخیصی در سراسر دنیا از جمله ایران مورد استقبال قرار گرفته‌اند[17]؛ البته باید توجه داشت که این گونه روش‌ها با توجه به هزینه‌های سنگین، برای مقاصد غربالگری چندان مناسب نیستند. همچنین به‌دلیل تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای *مایکوپلاسما هومینیس* و تغییرات ژنتیکی فراوان در ژنوم این باکتری، انتخاب الگویی مناسب به‌عنوان هدف پرایمرهای مورد نیاز در روش PCR کار ساده‌ای نبوده و به بررسی ایزوله‌های منطقه‌ای نیاز دارد[18]. هتروژنیتی درون‌گونه‌ای این باکتری حتی در مورد ژن *16S rRNA* نیز به چشم می‌خورد[19]؛ به نحوی که توالی نوکلئوتیدهای این ژن در ایزوله‌های مختلف، تفاوت‌های مختصری را نشان می‌دهد.
روش‌های سرولوژی از جمله ایمونوفلورسانس و الایزا در تشخیص غیرمستقیم این باکتری یعنی سنجش آنتی‌بادی علیه آن در نمونه سرم بیمار، می‌توانند روش مناسبی برای مقاصد غربالگری به‌شمار روند. سهولت انجام روش، پایین‌بودن هزینه و سرعت تشخیص بالا از مزایای این گونه روش‌ها هستند. مشکل عمده‌ای که در مسیر تشخیص سرولوژیک *مایکوپلاسما هومینیس* وجود دارد، تغییرات آنتی‌ژن‌های سطحی این باکتری است. روش‌های سرولوژی، مبتنی بر آنتی‌ژن‌های سطحی بوده و همان گونه که اشاره شد باکتری مذکور در آنتی‌ژن‌های سطحی خود دارای تغییرات آنتی‌ژنی فراوان است[20-22].
با توجه به اهمیت بالینی *مایکوپلاسما هومینیس* و پیچیدگی روند تشخیص عفونت‌های ناشی از این اُرگانیزم، اتخاذ روشی که با حساسیت و اختصاصیت بالا قادر به برآورده‌کردن نیازهای تشخیصی باشد، ضروری به نظر می‌رسد.
هدف این پژوهش، ارزیابی حساسیت بالینی روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای سنجش آنتی‌بادی IgG در سرم زنان مراجعه‌کننده به بیمارستان تخصصی صارم، به‌عنوان یک تست غربالگری در تشخیص عفونت ناشی از *مایکوپلاسما هومینیس* با درنظرگرفتن کشت و real-time PCR به‌عنوان استاندارد طلایی بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش تجربی، تعداد ۳۰۰ نمونه سرم و نیز سوآب حاصل از مخاط یا ترشحات ناحیه واژن از زنان مراجعه‌کننده به بیمارستان صارم تهران طی سال‌های ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷ گرفته شد. کلیه مراجعین، زنان متاهل در محدوده سنی بین ۲۰ تا ۴۵ سال بودند که صرف نظر از علایم بالینی، پس از تکمیل پرسش‌نامه و گرفتن رضایت‌نامه کتبی، طبق نظر متخصص زنان، وارد مطالعه شدند.
نمونه‌برداری: از هر بیمار ۲میلی‌لیتر خون در لوله‌های فاقد ماده ضدانعقاد گرفته شد و سرم آنها پس سانتریفیوژ و جداسازی، در فریزر ۲۰°C- نگهداری شد. به‌منظور استخراج DNA و انجام تست‌های مولکولی، از هر بیمار یک سوآب واژینال گرفته شد و پس از تخلیه محتویات آن در ۳میلی‌لیتر محلول استریل بافر فسفات‌سالین (PBS)، در دمای ۲۰°C- نگهداری شد. همچنین در کنار سایر اقدامات متداول میکروب‌شناسی، به‌منظور کشت *مایکوپلاسما هومینیس*، از هر بیمار با استفاده از سوآب داکرون، یک نمونه واژینال گرفته شد.
کشت و تعیین هویت باکتری: از محیط‌های کشت PPLO مایع و جامد Cat#1262 (Condalab؛ اسپانیا) به‌عنوان محیط پایه

استفاده شد که مکمل‌های لازم از قبیل سرم اسب، عصاره مخمر و آرژینین، طبق دستورالعمل شرکت سازنده به آن اضافه شد. برای انجام کشت از سوآب‌های داکرون (پلی‌استیرن) با دسته پلاستیکی که در بسته‌بندی‌های استریل مجزا قرار داشتند استفاده شد. سوآب مذکور بلافاصله پس از برداشت نمونه واژینال در محیط کشت PPLO مایع قرار گرفت و چنانچه امکان ساب‌کالچر سریع روی محیط کشت PPLO آگار وجود نداشت، حداکثر تا ۲۴ ساعت در یخچال در دمای ۸°C-۲ نگهداری شد. به‌منظور ساب‌کالچر، حداقل ۲۵میکرولیتر از محتویات محیط کشت مایع، با استفاده از لوپ‌های استاندارد میکروب‌شناسی، به‌صورت نقطه‌ای روی محیط کشت PPLO آگار انتقال یافت، بدون این که در سطح محیط پخش شود. برای هر نمونه، ۳ نقطه کشت روی محیط آگار در نظر گرفته شد. محیط‌های کشت PPLO مایع و PPLO آگار بلافاصله پس از کشت، در انکوباتور حاوی ۵% گاز CO_2 و درجه حرارت ۳۵°C قرار گرفتند. رطوبت نسبی محیط با قراردادن یک مخزن آب داخل انکوباتور فراهم شد.

تمامی لوله‌های حاوی محیط کشت مایع صرف نظر از تغییر رنگ، حداقل ظرف مدت ۲۴ ساعت و حداکثر پس از سپری‌شدن ۴۸ ساعت مجدداً روی محیط کشت آگار انتقال داده شدند. لوله‌های مذکور پس از ساب‌کالچر اولیه بلافاصله در انکوباتور ۳۵°C و در مجاورت ۵% گاز CO_2 قرار گرفته و به‌صورت روزانه از نظر تغییر رنگ بررسی شدند. به محض مشاهده رنگ ارغوانی در این لوله‌ها، یک‌بار دیگر ساب‌کالچر در محیط کشت آگار صورت گرفت. پلیت‌های آگار حداقل ظرف مدت ۴۸ ساعت و حداکثر پس از سپری‌شدن ۵ روز، از انکوباتور خارج شده و از نظر وجود کلنی بازبینی شدند. برای این کار سطح محیط کشت جامد در نقاط کشت‌یافته، زیر میکروسکوپ نوری با عدسی ۴ (درشت‌نمایی ۴۰برابر) مورد مشاهده قرار گرفت. مشاهده کلنی‌های ریز با مرکز متراکم یا برآمده شبیه تخم‌مرغ نیمرو، در سطح محیط آگار که پس از تهیه لام و رنگ‌آمیزی گرم و بررسی میکروسکوپی با درشت‌نمایی ۱۰۰۰برابر، هیچ گونه میکروارگانیزمی قابل مشاهده نبود، به‌عنوان کشت مثبت از نظر *مایکوپلاسما هومینیس* در نظر گرفته شد[23]. تعیین هویت باکتری‌های جداشده به‌عنوان *مایکوپلاسما هومینیس*، به روش مولکولی و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *16S rRNA* انجام شد. تغییر رنگ محیط کشت مایع به‌تنهایی و بدون رشد باکتری روی محیط کشت آگار، منفی گزارش شد.

استخراج DNA و انجام تست real-time PCR: از روش real-time PCR به دو منظور استفاده شد: الف) برای تعیین هویت باکتری‌های رشدیافته روی محیط کشت PPLO آگار؛ ب) برای تشخیص *مایکوپلاسما هومینیس* در سوآب‌های واژینال

برای تعیین هویت و تشخیص *مایکوپلاسما هومینیس*، DNA باکتری‌های رشدیافته روی محیط کشت PPLO آگار و همچنین DNA نمونه‌های واژینال که توسط سوآب‌های داکرون برداشت شده بودند، با استفاده از کیت High Pure PCR Template Preparation Kit-Roche Life Science, Cat# 11796828001 (Roche؛ آلمان) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شدند. غلظت و کیفیت DNA استخراج‌شده با دستگاه نانودراپ اندازه‌گیری شد. نمونه‌های DNA استخراج‌شده، به‌عنوان الگو در تست‌های real-time PCR مورد آزمایش قرار گرفتند که برای این کار از توالی ژن *16S rRNA مایکوپلاسما هومینیس* به‌عنوان هدف پرایمرهای اختصاصی استفاده شد[24]. توالی پرایمرهای مورد استفاده و مشخصات محصول حاصل از آنها در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱) پرایمرهای مورد استفاده در روش مولکولی real-time PCR

ژن	پرایمر	طول (bp)	دمای ذوب (°C)
16S rRNA	F: TTTGGTCAAGTCCTGCAACGA R: CCCCACCTTCCTCCCAGTTA	۱۰۱	۷۸/۸

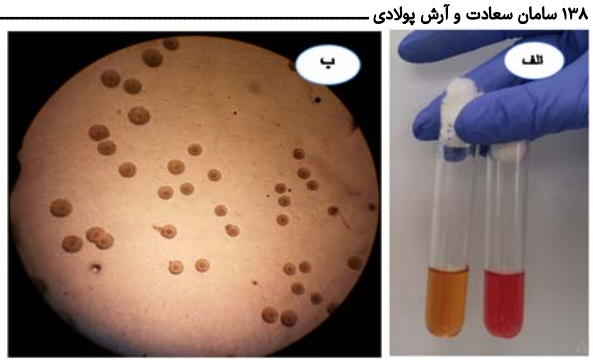
از آنجا که تست‌های real-time PCR با استفاده از دستگاه مدل Step one (Applied Biosystems؛ ایالات متحده) به انجام رسید، در تمامی واکنش‌ها از مسترمیکس (Ampliqon؛ دانمارک) حاوی سایبرگرین (رنگ گزارشگر) و Rox (رنگ مرجع) استفاده شد. به‌منظور اطمینان از اختصاصی‌بودن محصول واکنش، منحنی ذوب در تمامی موارد رسم شد.

مخلوط واکنش برای انجام تست real-time PCR شامل ۱۰میکرولیتر مسترمیکس، ۰/۲میکرومولار از هر یک از پرایمرهای پیشرو و معکوس و ۵میکرولیتر از الگو بود (با غلظت بین ۲ تا ۱۰۰نانوگرم در میکرولیتر) که حجم نهایی مخلوط واکنش با آب مقطر فاقد نوکلئاز به ۲۰میکرولیتر رسانده شد. برنامه زمان‌بندی واکنش نیز به این صورت تنظیم شد که ابتدا مخلوط واکنش ۱۵ دقیقه در ۹۵°C قرار گرفت و سپس ۴۵ سیکل به‌صورت ۱۵ ثانیه در ۹۵°C و یک دقیقه در ۶۱°C تعریف شد. در هر سری کاری، از DNA سویه استاندارد *مایکوپلاسما هومینیس* ATCC 23114 به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. به‌منظور اطمینان از اختصاصی‌بودن واکنش real-time PCR، محصول حاصل از واکنش در یک نمونه بالینی، پس از انجام PCR با مستر میکس Ampliqon فاقد سایبرگرین، تعیین توالی شد که برای این کار پرایمر پیشرو مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش آنتی‌بادی به‌روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم: نمونه‌های سرمی تمامی افراد از نظر وجود آنتی‌بادی اختصاصی کلاس IgG علیه *مایکوپلاسما هومینیس* مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این کار از کیت ایمونوفلورسانس غیرمستقیم Anti-Mycoplasma hominis IIFT (EUROIMMUN؛ آلمان) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در این روش به طور خلاصه، سلول‌های آلوده و غیرآلوده به *مایکوپلاسما هومینیس* در قالب میکروچیپ‌های کوچک روی لام‌های مخصوص تثبیت شده‌اند. نمونه سرمی رقیق‌شده افراد مورد مطالعه با رقت ۱:۱۰ روی لام‌های مذکور اضافه شد. در صورت وجود آنتی‌بادی اختصاصی علیه *مایکوپلاسما هومینیس*، به سلول‌های آلوده متصل می‌شدند. در مرحله بعد، میکروچیپ‌ها با آنتی‌هیومن نشاندارشده با ماده فلورسئین رنگ‌آمیزی شده و زیر میکروسکوپ فلورسانس مورد بررسی قرار گرفتند. موارد مثبت به‌صورت نقاط سبز درخشان در میکروچیپ سلول‌های آلوده به *مایکوپلاسما هومینیس* قابل مشاهده بود.

یافته‌ها

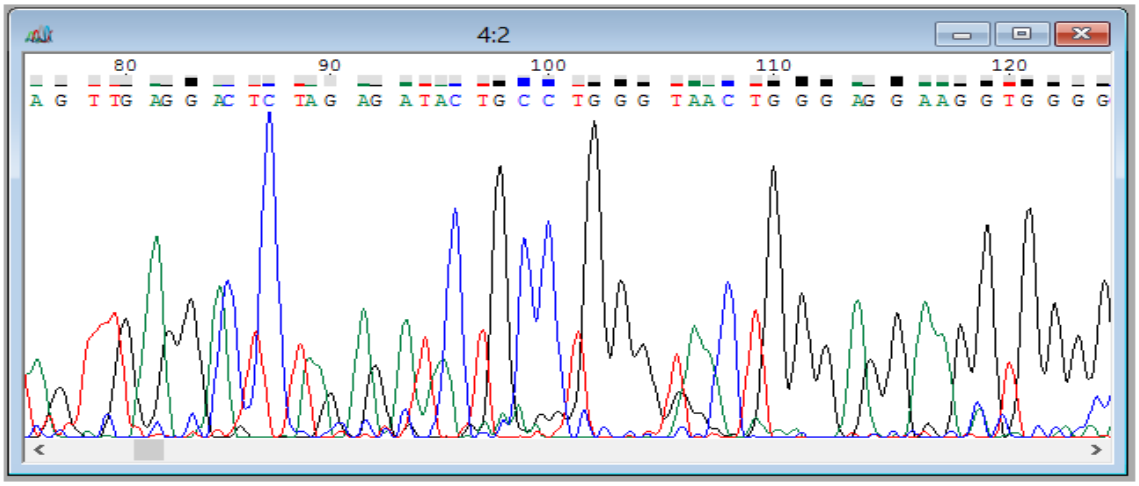
از بین ۳۰۰ نمونه واژینال، ۲۱ نمونه هم به روش کشت و هم به روش real-time PCR و ۱۵ نمونه فقط به روش real-time PCR مثبت شدند. بنابراین در کل، ۳۶ بیمار (۱۲%) از نظر *مایکوپلاسما هومینیس* در ترشحات واژن خود مثبت بودند. در این پژوهش، معیار مثبت‌شدن کشت، رشد باکتری روی محیط کشت PPLO آگار بود که با تشکیل کلنی‌های شبیه تخم‌مرغ نیمرو، به‌عنوان کلنی‌های مشکوک به *مایکوپلاسما هومینیس* در نظر گرفته شد. تغییر رنگ محیط کشت PPLO مایع به‌تنهایی و بدون رشد باکتری روی محیط کشت جامد، از نظر کشت *مایکوپلاسما هومینیس* منفی گزارش شد. نمونه‌ای از تصویر مربوط به یک کشت مثبت در محیط‌های کشت مایع و جامد در شکل ۱ قابل مشاهده است.



شکل ۱) رشد *مایکوپلاسما هومینیس* در محیط‌های کشت PPLO مایع و PPLO آگار؛ الف) محیط کشت PPLO مایع که حاوی آرژینین بوده و در صورت رشد *مایکوپلاسما هومینیس* و تبدیل این اسیدآمینه به آمونیاک و افزایش pH محیط، موجب تغییر رنگ معرف فنل‌رد از زرد به ارغوانی می‌شود؛ ب) ظاهر کلنی‌های *مایکوپلاسما هومینیس* روی محیط کشت PPLO آگار، با اندازه کوچک و شبیه تخم‌مرغ نیمرو که قطری بین ۲۰ تا ۳۰۰میکرومتر دارند (بزرگ‌نمایی ۴۰برابر)

تمامی ۲۱ ایزوله بالینی به‌روش real-time PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی *16S rRNA* مورد آزمایش قرار گرفتند و هویت آنها به‌عنوان *مایکوپلاسما هومینیس* تایید شد. تعیین توالی محصول واکنش PCR حاصل از یک ایزوله بالینی، اختصاصی‌بودن واکنش PCR را تایید کرد (شکل‌های ۲ و ۳).

از بین ۳۶ بیماری که حضور *مایکوپلاسما هومینیس* در نمونه واژینال آنها حداقل با یکی از روش‌های کشت و real-time PCR به اثبات رسیده بود، ۱۷ نفر از نظر آنتی‌بادی اختصاصی علیه این میکروارگانیزم مثبت و ۱۹ نفر دارای نتیجه منفی بودند. از طرفی از بین ۲۶۴ نمونه‌ای که هم به روش کشت و هم به روش مولکولی فاقد باکتری مذکور بودند، ۴۱ مورد علیه این میکروارگانیزم دارای تیتر مثبت آنتی‌بادی بودند. حساسیت و ویژگی روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای سنجش آنتی‌بادی علیه *مایکوپلاسما هومینیس* به ترتیب ۴۷ و ۸۴/۵% محاسبه شد (جدول ۲).



شکل ۲) کروماتوگرام حاصل از تعیین توالی محصول PCR یک ایزوله بالینی؛ محصول PCR حاصل از واکنش پرایمرهای اختصاصی با ژن *16S rRNA مایکوپلاسما هومینیس* در یک ایزوله بالینی، برای تعیین توالی در پژوهشکده صارم مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تکثیر قطعه ژنی *16S rRNA* تنها از پرایمر پیشرو استفاده شد. همان گونه که در کروماتوگرام مشاهده می‌شود، از توالی ۱۰۱ جفت‌بازی محصول PCR، ۴۹ نوکلئوتید تعیین توالی شدند.

Mycoplasma hominis ATCC 23114 strain PG21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gi|365822468|JN935871.1 **Length:** 1523 **Number of Matches:** 1

Range 1: 1090 to 1138 GenBank Graphics ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
89.7 bits(98)	2e-14	49/49(100%)	0/49(0%)	Plus/Plus

```
Query  76    AGTTGAGGACTCTAGAGATACTGCCTGGGTAACTGGGAGGAAGGTGGGG  124
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1090  AGTTGAGGACTCTAGAGATACTGCCTGGGTAACTGGGAGGAAGGTGGGG  1138
```

شکل ۳) نتیجه حاصل از BLAST توالی محصول PCR یک ایزوله بالینی؛ توالی ۴۹ نوکلئوتید حاصل از تعیین توالی محصول PCR، با هدف قراردادن ژن *16S rRNA* یک ایزوله بالینی مشکوک به *مایکوپلاسما هومینیس*، در پایگاه اطلاعاتی NCBI مورد BLAST واقع شد. نتیجه BLAST نشان داد که توالی مذکور با توالی ۴۹ نوکلئوتید از ژن *16S rRNA* سویه استاندارد *مایکوپلاسما هومینیس* به شماره ATCC 23114 به میزان ۱۰۰% همخوانی داشت.

جدول ۲) مقایسه روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با روش مرجع در تشخیص عفونت ناشی از *مایکوپلاسما هومینیس*

ایمونوفلورسنت غیرمستقیم	وضعیت نمونه‌ها براساس کشت و real-time PCR		جمع
	مثبت	منفی	
مثبت	۱۷	۴۱	۵۸
منفی	۱۹	۲۲۳	۲۴۲
جمع	۳۶	۲۶۴	۳۰۰

بحث

مایکوپلاسما هومینیس به‌عنوان یک باکتری بیماری‌زای فرصت‌طلب در دستگاه تناسلی ۲۰ تا ۵۰% زنان بالغ وجود دارد[25, 26] و روش‌های تشخیصی مرسوم از جمله کشت و روش‌های مولکولی در تشخیص عفونت ناشی از این باکتری، به‌دلیل تغییرات ژنتیکی فراوان[18, 22] و نیازهای تغذیه‌ای خاص این باکتری[27]، از موفقیت چندانی برخوردار نیستند. چنین به نظر می‌رسد که روش‌های سرولوژی با توجه به سهولت و هزینه پایین، در تشخیص غیرمستقیم عفونت ناشی از *مایکوپلاسما هومینیس*، گزینه‌های مناسب‌تری محسوب شوند. در این پژوهش با درنظرگرفتن کشت در کنار روش real-time PCR به‌عنوان روش مرجع در تشخیص و تعیین هویت *مایکوپلاسما هومینیس*، حساسیت یکی از روش‌های سرولوژی

معتبر در آزمایشگاه‌های ایران که به‌منظور سنجش آنتی‌بادی علیه باکتری مذکور در سرم بیماران مورد استفاده قرار می‌گیرد، بررسی شده است.

در این پژوهش ۳۶ بیمار از نظر حضور *مایکوپلاسما هومینیس* در ناحیه واژن، به‌عنوان افراد مثبت در نظر گرفته شدند. از آنجا که برای تشخیص عفونت در این افراد از روش استاندارد طلایی کشت در کنار روش تاییدی real-time PCR استفاده شد، می‌توان با استناد به آن، اعتبار یک روش تشخیصی دیگر مانند روش ایمونوفلورسانس را مورد ارزیابی قرار داد. انتظار می‌رود در سرم افراد آلوده به این باکتری، آنتی‌بادی اختصاصی علیه میکرواُرگانیزم مذکور وجود داشته باشد. از بین ۳۶ بیمار آلوده‌ای که به‌روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم مورد آزمایش قرار گرفتند، ۱۹ مورد نتیجه منفی داشتند، یعنی روش مذکور در ۵۳% موارد قادر به سنجش آنتی‌بادی در سرم افراد آلوده به *مایکوپلاسما هومینیس* نبود. به عبارت دیگر، حساسیت روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم در مقایسه با روش استاندارد طلایی تنها ۴۷% است.

روش‌های سرولوژی در تشخیص آنتی‌بادی علیه عوامل باکتریایی، بر مبنای آنتی‌ژن‌های سطحی میکرواُرگانیزم‌ها طراحی می‌شوند. چنانچه باکتری مورد نظر در آنتی‌ژن‌های سطحی خود دچار تغییر و پلی‌مورفیسم شود، خطای حاصل از روش‌های سرولوژی در بروز نتایج منفی کاذب دور از انتظار نخواهد بود. ادهسین‌ها یا پروتئین‌های اتصالی مستقر در غشای باکتری‌ها، اهداف مناسبی برای سیستم ایمنی میزبان بوده و چنانچه از ثبات آنتی‌ژنیک کافی برخوردار باشند، الگوهای مناسبی برای طراحی روش‌های سرولوژی به‌شمار می‌روند. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که *مایکوپلاسما هومینیس* عوامل اتصالی یا ادهسین‌های خود را با موتاسیون‌هایی که منجر به کوتاه یا بلندشدن این پروتئین‌ها می‌شود[21] تغییر داده یا با تغییر در قالب خوانش ژن‌های کدکننده، بیان این پروتئین‌ها را به‌طور برگشت‌پذیر متفاوت می‌سازد[28]. این تنوع در ساختار پروتئین‌های اتصالی اُرگانیزم، احتمالاً شرایط مناسب‌تری را برای اتصال باکتری به گیرنده‌های مختلف در اُرگان‌های مختلف بدن میزبان فراهم می‌کند[20]، به نحوی که باکتری را قادر می‌سازد تا در نواحی خارج از دستگاه تناسلی، عفونت‌هایی را ایجاد نماید[5, 10, 13, 17]. علاوه بر این، تغییر فاز پروتئین‌های مذکور در سطح باکتری یک راهکار مناسب برای انتشار عفونت در بدن و فرار از سیستم ایمنی میزبان به شمار می‌رود[29]. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که *مایکوپلاسما هومینیس* در پروتئین‌های سطحی خود دارای تغییرات آنتی‌ژنیک فراوانی بوده و از پلی‌مورفیسم بالایی برخوردار است بنابراین طراحی روش‌های ایمونواسی مانند الایزا و ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای سنجش آنتی‌بادی علیه این باکتری به‌راحتی امکان‌پذیر نبوده و نیاز به بررسی ایزوله‌های منطقه‌ای دارد.

باسینزکا و همکاران[30] پروتئین‌های غشایی *مایکوپلاسما هومینیس* را با استفاده از Triton X-114 استخراج نموده و سپس با استفاده از محلول پروتئینی حاصل، یک روش الایزا طراحی نمودند. همچنین با استفاده از لیزات باکتریایی و انتقال پروتئین‌های آن به غشای نیتروسلولوزی، یک تست وسترن‌بلات راه‌اندازی کردند. بیمارانی که سرم آنها در تست وسترن‌بلات، حداقل با یکی از ایزوله‌ها مثبت می‌شد، به‌عنوان نمونه‌های مثبت واقعی و افرادی که با هیچ یک از ایزوله‌ها واکنش نشان نمی‌دادند به‌عنوان نمونه‌های منفی در نظر گرفته شدند. سپس تمامی نمونه‌ها با روش الایزا نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. از میان ۳۰۴ نمونه مورد مطالعه در پژوهش ایشان، ۱۵ نمونه وجود داشتند که به روش وسترن‌بلات مثبت اما به روش الایزا منفی گزارش شدند. نتایج منفی کاذب می‌توانست به‌دلیل استفاده از تنها سه ایزوله بالینی به‌عنوان منبع آنتی‌ژن باشد که این نتایج با توجه به پلی‌مورفیسم شدید *مایکوپلاسما هومینیس* دور از انتظار نیست. از طرفی، تعداد ۲۸ نمونه وجود داشتند که الگوی باند آنها در وسترن‌بلات نشان‌دهنده منفی‌بودن تست بود، اما با روش الایزا مثبت گزارش شدند. نتایج مثبت کاذب نیز با درنظرگرفتن استفاده از پروتئین‌های کامل سطح باکتری و احتمال قرابت آنتی‌ژنی آنها با سایر پروتئین‌های مشابه، می‌تواند قابل توجیه باشد[30]. در مطالعه مذکور از روش استاندارد طلایی برای تعیین حساسیت و ویژگی روش‌های الایزا و وسترن‌بلات استفاده نشد. چنین به نظر می‌رسد که برای طراحی این گونه روش‌ها به‌منظور تشخیص آنتی‌بادی علیه *مایکوپلاسما هومینیس*، لازم است تا از ایزوله‌های بیشتری برای تامین منبع آنتی‌ژن استفاده شود. همچنین برای جلوگیری از موارد مثبت کاذب بهتر است تا آنتی‌ژن‌هایی که احتمال بروز واکنش‌های متقاطع دارند از مجموعه پروتئین‌های هدف خارج شوند. همین گروه، سه سال بعد در پژوهشی دیگر از دو روش PCR و الایزا برای تشخیص عفونت ناشی از باکتری مذکور استفاده کردند. از بین ۱۹ فرد آلوده که حضور *مایکوپلاسما هومینیس* در ناحیه اندوسرویکس آنها به‌روش PCR اثبات شده بود، تنها ۶ نفر از نظر آنتی‌بادی مثبت شدند. در این مطالعه نیز از پروتئین‌های سطحی سه ایزوله بالینی به‌عنوان منبع آنتی‌ژن استفاده شد و حساسیت روش الایزا در شناسایی افراد بیمار، فقط ۳۲% اعلام شد. این حساسیت پایین نشان می‌دهد که استفاده از آنتی‌ژن‌های تنها سه ایزوله بالینی در طراحی روش‌های ایمونواسی کافی نبوده و به نحو چشمگیری منجر به بروز نتایج منفی کاذب خواهد شد[31]. در پژوهش حاضر که از روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای شناسایی آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه *مایکوپلاسما هومینیس* استفاده شد، منبع آنتی‌ژن، باکتری‌های کاملی بودند که سلول‌های هدف را آلوده کرده و در قالب میکروچیپ‌هایی روی اسلاید تثبیت شده‌اند. تنوع سویه‌های مورد استفاده در این میکروچیپ‌ها مشخص نبود، اما حساسیت پایین این روش (۴۷%) نشان‌دهنده عدم کارآیی لازم این کیت در شناسایی موارد مثبت بود. از طرف دیگر، کیت ایمونوفلورسانس مورد استفاده در این پژوهش در ۱۵/۵% موارد نتیجه مثبت کاذب داشت که این امر را می‌توان به استفاده از سلول کامل باکتری به‌عنوان هدف آنتی‌بادی‌های موجود در سرم بیمار نسبت داد که به‌دلیل واکنش متقاطع با سایر آنتی‌ژن‌های مشابه در سایر باکتری‌ها می‌توانند منجر به بروز چنین نتایجی شوند. با توجه به پلی‌مورفیسم ذاتی اُرگانیزم، کیت‌های طراحی‌شده در یک منطقه جغرافیایی قابلیت استفاده در سایر مناطق را نداشته و چنانچه برای مقاصد تشخیصی و اپیدمیولوژیک مصرف شوند باید با توجه به ایزوله‌های منطقه‌ای بومی‌سازی شوند. این امر احتمال شناسایی آنتی‌بادی در جمعیت مورد مطالعه در یک منطقه جغرافیایی خاص را افزایش می‌دهد.

فراوانی *مایکوپلاسما هومینیس* در جمعیت مورد مطالعه با استفاده از روش مولکولی و صرف نظر از علایم بالینی ۱۲% بود، در حالی که این میزان در صورت استفاده از روش کشت، تنها ۷% به‌دست آمد. یکی از دلایل عمده جدانشدن باکتری در ترشحات واژن، مرگ باکتری در اثر pH اسیدی ناحیه واژن بوده که مانع رشد باکتری در محیط‌های کشت اختصاصی می‌شود. از این رو برای تشخیص *مایکوپلاسما هومینیس* در مجاری تناسلی بهتر است از نمونه حاصل از مخاط دهانه رحم استفاده شود که محیط مناسبی برای زیست این

باکتری محسوب می‌شود.

روش‌های ایمونواسی مانند ایمونوفلورسانس غیرمستقیم برای سنجش آنتی‌بادی علیه *مایکوپلاسما هومینیس* به‌ویژه در موارد غربالگری، با توجه به ماهیت متغیر و تغییرات آنتی‌ژن‌های سطحی باکتری، روش‌های مناسبی محسوب نشده و در صورت الزام به استفاده از این گونه روش‌ها باید با درنظرگرفتن ایزوله‌های منطقه‌ای نسبت به بومی‌سازی روش اقدام نمود.

نتیجه‌گیری

روش ایمونوفلورسانس غیرمستقیم با توجه به حساسیت پایین، روش مناسبی برای مقاصد غربالگری محسوب نمی‌شود و برای تشخیص عفونت ناشی از *مایکوپلاسما هومینیس* لازم است تا از روش‌های حساس مولکولی مانند real-time PCR استفاده شود.

تشکر و قدردانی: از کلیه همکاران بیمارستان فوق تخصصی صارم تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: این پژوهش به تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران رسیده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: سامان سعادت (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/ (۵۰%)؛ آرش پولادی (نویسنده دوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیل‌گر آماری/نگارنده بحث (۵۰%)

منابع مالی: توسط بیمارستان صارم تامین شده است.

منابع

1- Choi Y, Roh J. Cervical cytopathological findings in Korean women with Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, and Ureaplasma urealyticum infections. Sci World J. 2014;2014:756713.

2- Diaz L, Cabrera LE, Fernandez T, Ibanez I, Torres Y, Obregon Y, et al. Frequency and antimicrobial sensitivity of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in patients with vaginal discharge. MEDICC Rev. 2013;15(4):45-7.

3- Campos GB, Lobao TN, Selis NN, Amorim AT, Martins HB, Barbosa MS, et al. Prevalence of Mycoplasma genitalium and Mycoplasma hominis in urogenital tract of Brazilian women. BMC Infect Dis. 2015;15:60.

4- Humburg J, Frei R, Wight E, Troeger C. Accuracy of urethral swab and urine analysis for the detection of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in women with lower urinary tract symptoms. Arch Gynecol Obstet. 2012;285(4):1049-53.

5- Pascual A, Perez MH, Jaton K, Hafen G, Di Bernardo S, Cotting J, et al. Mycoplasma hominis necrotizing pleuropneumonia in a previously healthy adolescent. BMC Infect Dis. 2010;10:335.

6- Pailhories H, Rabier V, Eveillard M, Mahaza C, Joly-Guillou ML, Chennebault JM, et al. A case report of Mycoplasma hominis brain abscess identified by MALDI-TOF mass spectrometry. Int J Infect Dis. 2014;29:166-8.

7- Koshiba H, Koshiba A, Daimon Y, Noguchi T, Iwasaku K, Kitawaki J. Hematoma and abscess formation caused by Mycoplasma hominis following cesarean section. Int J Womens Health. 2011;3:15-8.

8- Le Guern R, Loiez C, Loobuyck V, Rousse N, Courcol R, Wallet F. A new case of Mycoplasma hominis mediastinitis and sternal osteitis after cardiac surgery. Int J Infect Dis. 2015;31:53-5.

9- Horiuchi K, Matsumoto T, Ohno Y, Kasuga E, Negishi T, Yaguchi T, et al. Intra-abdominal Mycoplasma hominis infection in a liver transplant recipient: A case report. Jpn J Infect Dis. 2014;67(3):232-3.

10- Lee EH, Winter HL, van Dijl JM, Metzemaekers JD, Arends JP. Diagnosis and antimicrobial therapy of Mycoplasma hominis meningitis in adults. Int J Med Microbiol. 2012;302(7-8):289-92.

11- Sato H, Iino N, Ohashi R, Saeki T, Ito T, Saito M, et al. Hypogammaglobulinemic patient with polyarthritis mimicking rheumatoid arthritis finally diagnosed as septic arthritis caused by Mycoplasma hominis. Intern Med. 2012;51(4):425-9.

12- Waites KB, Schelonka RL, Xiao L, Grigsby PL, Novy MJ. Congenital and opportunistic infections: Ureaplasma species and Mycoplasma hominis. Semin Fetal Neonatal Med. 2009;14(4):190-9.

13- Hussain ST, Gordon SM, Tan CD, Smedira NG. Mycoplasma hominis prosthetic valve endocarditis: the value of molecular sequencing in cardiac surgery. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013;146(1):e7-9.

14- Dixit A, Alexandrescu S, Boyer D, Graf EH, Vargas SO, Silverman M. Mycoplasma hominis empyema in an 18-year-old stem cell and lung transplant recipient: Case report and review of the literature. J Pediatric Infect Dis Soc. 2017;6(4):e173-6.

15- 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.

16- Pereyre S, Sirand-Pugnet P, Beven L, Charron A, Renaudin H, Barre A, 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.

17- Ataee RA, Golmohammadi R, Alishiri GH, Mirnejad R, Najafi A, Esmaeili D, et al. Simultaneous detection of Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma hominis and Mycoplasma arthritidis in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis by multiplex PCR. Arch Iran Med. 2015;18(6):345-50.

18- Ferandon C, Peuchant O, Renaudin H, Bebear C. Diversity of Mycoplasma hominis clinical isolates from Bordeaux, France, as assessed by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. BMC Microbiol. 2013;13:120.

19- 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.

20- 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.

21- Henrich B, Lang K, Kitzerow A, MacKenzie C, Hadding U. Truncation as a novel form of variation of the p50 gene in Mycoplasma hominis. Microbiology. 1998;144(Pt 11):2979-85.

22- Nyvold C, Birkelund S, Christiansen G. The Mycoplasma hominis P120 membrane protein contains a 216 amino acid hypervariable domain that is recognized by the human humoral immune response. Microbiology. 1997;143(Pt 2):675-88.

23- Tille P. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. 14th edition. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2017.

24- 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.
25- Hosny A, El-Khayat W, Kashef MT, Fakhry MN. Association between preterm labor and genitourinary tract infections caused by Trichomonas vaginalis, Mycoplasma hominis, Gram-negative bacilli, and coryneforms. J Chin Med Assoc. 2017;80(9):575-81.
26- Taylor-Robinson D. Mollicutes in vaginal microbiology: Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum and Mycoplasma genitalium. Res Microbiol. 2017;168(9-10):875-81.
27- Miranda C, Camacho E, Reina G, Turino J, Rodriguez-Granger J, Yeste R, et al. Isolation of Mycoplasma hominis from extragenital cultures. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2005;24(5):334-7.
28- Zhang Q, Wise KS. Localized reversible frameshift mutation in an adhesin gene confers a phase-variable adherence phenotype in mycoplasma. Mol Microbiol. 1997;25(5):859-69.
29- Zhang Q, Wise KS. Coupled phase-variable expression and epitope masking of selective surface lipoproteins increase surface phenotypic diversity in Mycoplasma hominis. Infect Immun. 2001;69(8):5177-81.
30- Baczynska A, Friis Svenstrup H, Fedder J, Birkelund S, Christiansen G. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Mycoplasma hominis antibodies in infertile women serum samples. Hum Reprod. 2005;20(5):1277-85.
31- Baczynska A, Hvid M, Lamy P, Birkelund S, Christiansen G, Fedder J. Prevalence of Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis and Chlamydia trachomatis among Danish patients requesting abortion. Syst Biol Reprod Med. 2008;54(3):127-34.