تشخیص باکتریهای اوره آپلاسما اورالیتیکم و مایکوپلاسما هومینیس در بیماران دارای عفونت دستگاه تناسلی با روش PCR

احمد حسنی[1]، نادرشاهرخی[*2]، صغری خظردوست[3]، میثم سرشار[4]، نسرین تک روستا[5]، جمیله نوروزی[6]

1.کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات
2. دکترای بیوتکنولوژی پزشکی، استادیار بخش بیولوژی مولکولی، انستیتو پاستور ایران
3. متخصص زنان و زایمان، دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران، مجتمع بیمارستانی امام خمینی، بخش پری ناتولوژی
4. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)
5.کارشناس مامایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، مجتمع بیمارستانی امام خمینی
6. دکترای میکروبیولوژی، استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

*** نشانی برای مکاتبه:** تهران، انستیتو پاستور ایران، بخش بیولوژی مولکولی تلفن: 09123847794، نمابر:021-66953311، پست الکترونیک : nader.shahrokhi@gmail.com

دریافت مقاله: اردیبهشت نود و یک پذیرش برای چاپ: مرداد نود و یک

چکیده

سابقه و هدف: *گونه های اوره آپلاسما اورالیتیکم و مایکوپلاسما هومینیس در خانواده مایکوپلاسماسه، به عنوان مهم ترین عوامل پاتوژن فرصت طلب در دستگاه تناسلی زنان شناخته شده اند. باکتری های مذکور عامل التهاب مجرای ادرار، عفونت لگن، سندرم دستگاه تنفسی، پنومونی در نوزادان نارس، سقط جنین، ناباروری و عفونت لوله فالوپ می باشند. هدف از این مطالعه بررسی فراوانی باکتری اوره آپلاسما اورالیتیکم و مایکوپلاسما هومینیس در زنان دارای عفونت واژینال مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی تهران می باشد.*

روش کار: *در یک مطالعه توصیفی- مقطعی طی سالهای 1389 الی1390، از ناحیه اندوسرویکس واژن 191 بیمار با علائم بالینی عفونت دستگاه تناسلی، نمونه گیری انجام گردید. فرم اطلاعات بیمار طی پروسه پذیرش توسط متخصص زنان تکمیل شد. پس از استخراج DNA، تشخیص باکتری از نمونه های بیماران، با استفاده از PCR مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج با استفاده از آزمون آماری مربع کای توسط نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شد.*

یافته ها: *باکتری های اوره آپلاسما اورالیتیکم و مایکوپلاسما هومینیس به ترتیب در 30 و 27 درصد از بیماران وجود داشت، که از این میان، 18 مورد آلودگی مشترک با هر دو باکتری را داشتند. همچنین بیش ترین شیوع باکتری های ذکر شده درگروه سنی 31 تا 45 سال مشاهده شد. اختلاف معنی داری بین افراد خود درمانی شده با کرم واژینال و شیوع باکتری های اوره آپلاسما اورالیتیکم و مایکوپلاسما هومینیس وجود داشت.*

نتیجه گیری: *با توجه به تاثیر بالقوه مایکوپلاسماها در عوارض ناشی از عفونت در بارداری مادران، مرگ و میر نوزادان و هم چنین جداسازی مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اورالیتیکم از بیماران مبتلا به عفونت های ژنیتال، ضرورت تشخیص و درمان به موقع این بیماران بیش از پیش مورد نیاز است.*

واژگان کلیدی: ***اوره آپلاسما اورالیتیکم ، مایکوپلاسما هومینیس، عفونت دستگاه تناسلی، PCR***

مقدمه

مایکوپلاسما ها کوچکترین اورگانیسم های تک سلولی هستند که بصورت کومنسال یا بیماری زا از گیاهان، حیوانات و انسان جداسازی شده اند. برخی از این باکتری ها فلور نرمال دستگاه تنفسی و دستگاه تناسلی می باشند(۲،۱). گونه های مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اورالیتیکم در خانواده مایکوپلاسماسه به عنوان مهم ترین عوامل پاتوژن فرصت طلب در دستگاه تناسلی زنان شناخته شده اند(4-2). شرایط غیر معمول بارداری و تهاجم باکتری های بیماری زا، باعث تکثیر و بیماری زایی مایکوپلاسما های دستگاه تناسلی می شوند(1). انتقال این باکتری ها بین شرکای جنسی و بین مادر و نوزاد صورت می گیرد و نوزادان متولد شده از مادران مبتلا در40% موارد با همان مایکوپلاسما آلوده می شوند(۴،۳). مایکوپلاسما هومینیس در هنگام تولد از مادر به نوزاد منتقل شده و باعث پنومونی، سندرم تنفسی مزمن و مننژیت نوزادان می گردد. همچنین این باکتری در مواردی عامل تب پس از زایمان در زنان شده و همراه با سایر باکتری ها در ادرار و عفونت های لوله فالوپ یافت می شود(۴،۱).

باکتری اوره آپلاسما اورالیتیکم یکی از عوامل منتقله جنسی(Sexually Transmitted Diseases) می باشد که عامل عوارض قبل و بعد از زایمان، پنومونی در نوزادان، التهاب لگن، سندرم دستگاه تنفسی، کوریوآمنیوئیت و تولد کودکان کم وزن می باشد(۲،۱). باکتری اوره آپلاسما اورالیتیکم عامل 10 تا 20 درصد از عفونت های غیرگنوکوکی التهاب مجاری ادراری و پروستات می باشد(3). ارزیابی بیماری زایی این باکتری با توجه به حضور باکتری در زنان سالم مشکل می باشد، اگرچه مطالعات زیادی رابطه بین کلونیزاسیون اوره آپلاسما اورالیتیکم و بیماری زایی را به اثبات رسانده اند (۲،۱).

مایکوپلاسما ها سخت رشد بوده و برای تکثیر در محیط های کشت، به شرایط ویژه ای نیازمند می باشند. کشت باکتری روش استاندارد تشخیص مایکوپلاسما ها است با این حال این روش بسیار سخت بوده و نیازمند محیط های کشت اختصاصی می باشد(۴،۲). مطالعات صورت گرفته نشان می دهد که روش PCR به عنوان یک روش مولکولی تشخیصی کارامد در مقایسه با کشت در تشخیص این باکتری ها می باشد(۵،۴،۱). جهت کشت مایکوپلاسما هومینیس به زمانی در حدود 8 هفته و برای اوره آپلاسما اورالیتیکم در حدود 2 تا 5 روز نیاز است، درحالیکه با روش PCR در مدت کمتر از 4 ساعت عامل عفونت قابل تشخیص می باشد. عدم رشد با تغییر کوچک ترین فاکتور مؤثر در کشت این باکتری ها یکی از دلایل مهم استفاده از روش های مولکولی تشخیصی همچون PCR است(۷،۶،۴). ژن gap (glyceraldehydes 3-phosphate) و ژن اوره آز به عنوان شاخص مناسب جهت تشخیص مولکولی باکتری های مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اورالیتیکم مشخص شده است(۹،۸). هدف از این مطالعه بررسی شیوع باکتری اوره آپلاسما اورالیتیکم و مایکوپلاسما هومینیس با روش مولکولی PCR در زنان دارای عفونت واژینال از بیمارستان امام خمینی شهر تهران می باشد.

روش کار

در یک مطالعه توصیفی- مقطعی از آبان 1389 الی شهریور 1390، تحت نظر پزشک متخصص زنان 191 نمونه از ناحیه اندوسرویکس دستگاه تناسلی زنان مبتلا به عفونت های واژینال با میانگین سنی 18تا 60 سال از بیمارستان امام خمینی تهران جمع آوری گردید. معیار ورود بیماران به این مطالعه، وجود یک یا چند علامت مربوط به عفونت ژنیتال از جمله سوزش و خارش در مجرای تناسلی، افزایش ترشحات و تغییر رنگ ترشحات و عدم استفاده از آنتی بیوتیک و کرم واژینال در مدت دو روز قبل از مراجعه بود. پرسش نامه ای جهت جمع آوری اطلاعات لازم از بیماران، شامل سن بیمار، وضعیت تاهل، سابقه عفونت ادراری، سقط جنین، سابقه پاپ اسمیر، استفاده از کرم واژینال، آنتی بیوتیک و قرص ضد بارداری و همچنین اطلاعات تشخیص پزشک مربوطه و علائم کلینیکی بیمار تنظیم گردید. نمونه گیری با رضایت شرکت در مطالعه و بدون تحمیل هیچ گونه هزینه یا وقت اضافه از بیماران صورت گرفت. نمونه گیری توسط دو سوآپ استریل و اسپکولوم از ناحیه اندوسرویکس و واژن جمع آوری و در 500 میکرولیتر PBS قرار گرفت و با صرف کمترین زمان (5 ساعت از زمان جمع آوری) به آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی انستیتو پاستور ایران جهت آزمون های تشخیصی منتقل شد.

از نمونه های بیماران منتقل شده به آزمایشگاه، استخراج DNA طبق دستورالعمل کیت تجاری استخراج ژنوم شرکت کیاژن (ساخت ایران) انجام گرفت. برای تایید حضور باکتری در نمونه های گرفته شده، PCR از ژن *16S rRNA* انجام شد. سویه استاندارد باکتری های مایکوپلاسما هومینیس *به عنوان کنترل مثبت در مطالعه*، از کلکسیون کشت میکروبی انستیتو پاستور ایران (ATCC 23114) و اوره آپلاسما اورالیتیکم سروتایپ VIII از دانشگاه تربیت مدرس تهران تهیه گردید.

توالی های ژن *gap* از بانک ژنی NCBI با نرم افزار AlignX از مجموعه نرم افزار Vector NTI Ver.11 مورد آنالیز قرار گرفت و از توالی محافظت شده ژنوم، پرایمر های MH-F و MH-R به عنوان پرایمرهای اختصاصی *مایکوپلاسما هومینیس* طراحی گردید. با توجه به هم ردیفی توالی *16S rRNA* در بین باکتری های موجود در دستگاه تناسلی بانوان، پرایمرهای UF و UR به عنوان پرایمرهای یونیورسال طراحی گردید. از میان پرایمر های ثبت شده ژن اوره آز در مطالعات صورت گرفته، پرایمرهای UU-F و UU-R جهت تشخیص باکتری اوره آپلاسما اورالیتیکم انتخاب گردید(۴،۳،۱). در جدول1 توالی پرایمرهای استفاده شده آورده شده است.

واکنش Hot-start PCR در حجم 25 میکرولیتر (شامل 1X PCR buffer، 1/5 میلی مولار MgCl2 ، 200 میکرو مولار dNTP ، 1/5 واحد آنزیم DNA پلیمراز(Taq)، 20 پیکو مول از هر پرایمر و مقدار 5 میکرولیتر از DNA الگو) طبق برنامه جدول 2 انجام گردید (تمام مواد مورد استفاده در PCR از شرکت GeNet-Bio کره خریداری شد). از پارافین به عنوان جدا کننده DNA الگو و پرایمرها، جهت اختصاصیت اتصال بیشتر پرایمر ها در دمای مناسب استفاده شد(10). جهت بررسی نتایج از الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز 1% و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید استفاده گردید. محصول PCR ژنهای مورد نظر سویه های استاندارد پس از انتقال به T پلاسمید (فرمنتاس، لیتوانی) و همچنین 3 مورد از محصول PCR نمونه های بالینی انتخاب و تعیین توالی گردید (تعیین توالی سویه ها توسط شرکت GATC آلمان انجام گرفت).

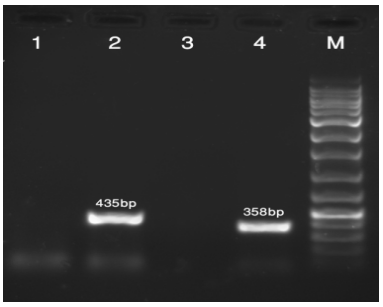
بررسی های آماری این مطالعه با استفاده از نرم افزار (spss Inc., Chicago, IL., USA ver 18) spssآزمون های کای دو و دقیق فیشر صورت گرفت. مرز معنا دار بودن ($p<0/05$) در نظر گرفته شد.

جدول1: توالی پرایمرهای اختصاصی و یونیورسال باکتری های مورد مطالعه

منابع	محصولPCR (جفت باز)	توالی پرایمرها	نام پرایمر	نام باکتری
این مطالعه	358	5´TTATTGAAATACGATACAGCTCATGGA3´ 5´CGTTGGCAATAGGAGCTAAACAG3´	MH-F MH-R	مایکوپلاسما هومینیس
این مطالعه	791	5´TAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG3´ 5´GGACTACCAGGGTATCTAATCC3´	UF UR	16S rRNA
1 ,2 ,8	435	5´TGCAATCTGCTCGTGAAGTATTAC3´ 5´CGAAACGACGTCCATAAGCAACT3´	UU-F UU-R	اوره آپلاسما اورالیتیکوم

جدول 2: برنامه ی دمایی دستگاه ترموسایکلر

چرخه	زمان	دما	نام مرحله	مرحله
1 بار	7 دقیقه	94 درجه	واسرشت اولیه	اول
30 بار	30ثانیه	94 درجه	واسرشت شدن	دوم
	30ثانیه	62 درجه	اتصال پرایمر ها	
	30ثانیه	72 درجه	گسترش	
1 بار	5 دقیقه	72 درجه	گسترش نهایی	سوم



شکل1: کنترل منفی ژن اوره آز (ردیف 1)، آمپلیکون قطعه 435bp ژن اوره آز باکتری اوره آپلاسما اورالیتیکوم (ردیف 2)، کنترل منفی ژن gap باکتری مایکوپلاسما هومینیس (ردیف3)، آمپلیکون قطعه 358bp ژن gap باکتری مایکوپلاسما هومینیس (ردیف4)، ردیف M : مارکر 1kb

یافته ها

باکتری اوره آپلاسما اورالیتیکم در 58 مورد (30%) از بیماران با استفاده از روش PCR یافت شد. از بین افراد آلوده با اوره آپلاسما اورالیتیکم، 18 مورد (31%) از آنتی بیوتیک های متداول و 12 مورد (20%) از کرم واژینال کلوتریمازول بدون تجویز پزشک و در زمان 3 تا 5 روز قبل از مراجعه استفاده کرده بودند. آزمون آماری نشان داد که اختلاف معنی داری بین افراد خود درمانی شده با کرم واژینال و شیوع باکتری اوره آپلاسما اورالیتیکم وجود دارد($p<0/05$). اختلاف معنی داری بین افراد خود درمانی شده با آنتی بیوتیک و شیوع باکتری مشاهده نشد.

باکتری مایکوپلاسما هومینیس در 52 مورد (27%) از بیماران با استفاده از روش PCR یافت شد. از بین افراد آلوده با مایکوپلاسما هومینیس، 20 مورد (38%) از آنتی بیوتیک های متداول و 14 مورد (27%) از کرم واژینال کلوتریمازول بدون تجویز پزشک و در زمان 3 تا 5 روز قبل از مراجعه استفاده کرده بودند. آزمون آماری نشان داد که اختلاف معنی داری بین افراد خود درمانی شده با کرم واژینال و شیوع باکتری مایکوپلاسما هومینیس وجود دارد($p<0/05$). اختلاف معنی داری بین افراد خود درمانی شده با آنتی بیوتیک و شیوع باکتری مشاهده نشد.

توزیع بیماران براساس گروه های سنی و ارگانیسم جدا شده در جدل 3 نشان داده شده است. نتایج تعیین توالی سویه های کنترل و نمونه های بالینی کاملا با توالی کسب شده از بانک ژنی NCBI منطبق بود(شکل 1).

جدول3: توزیع زنان مبتلا به عفونت واژینال براساس گروه سنی و ارگانیسم جدا شده

گروه سنی	36-18	45-31	60-46
تعداد کل بیماران	29	89	72
بیماران آلوده با اوره آپلاسما اورالیتیکوم	8 (28%)	32 (36%)	18 (25%)
بیماران آلوده با مایکوپلاسما هومینیس	6 (21%)	27 (30%)	19 (26%)

بحث

باکتری های اوره آپلاسما اورالیتیکم و مایکوپلاسما هومینیس از خانواده مایکوپلاسماسه، پاتوژن های فرصت طلب دستگاه ادراری- تناسلی می باشند. حضور این باکتری ها به عنوان عضوی از فلور میکروبی در افراد سالم و هم چنین نقش آنها در بیماری زایی دستگاه ادراری- تناسلی همواره به عنوان یک چالش بحث بر انگیز مطرح بوده است(۲،۱). از دلایل عمده بیماری زایی این باکتری ها می توان به تغییر شرایط واژن و جایگزینی آنها به جای فلور نرمال از جمله لاکتوباسیلوس ها اشاره نمود(11). تشخیص سریع مایکوپلاسماهای تناسلی در بیماران دارای عفونت دستگاه تناسلی به دلیل نقش این باکتری در سقط جنین، تب بعد از زایمان، زایمان پیش از موعد و کوریوآمنیوئیت بسیار حائز اهمیت است(۱۳،۱۲).

در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از PCR نشان داد که 30% از بیماران، حامل اوره آپلاسما اورالیتیکم و 27% حامل مایکوپلاسما هومینیس می باشند. بر اساس مطالعات صورت گرفته در نقاط مختلف دنیا، فراوانی باکتری های اوره آپلاسما اورالیتیکم و مایکوپلاسما هومینیس به ترتیب 40 تا 80% و 21 تا 53% در دستگاه تناسلی زنان گزارش شده است(۹،۱). فراوانی این باکتری ها در دستگاه تناسلی زنان با وضعیت اقتصادی و اجتماعی نامناسب، فقر مالی، رابطه با چند شریک جنسی، استفاده از قرص ضد بارداری و سن زنان فعال جنسی رابطه مستقیم دارد (6).

مظفری و همکاران در طی سال 1386 به بررسی میزان شیوع مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اورالیتیکم در عفونت دستگاه تناسلی بانوان در سطح شهر تهران پرداختند. در این مطالعه با روش کشت، شیوع باکتری های مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اورالیتیکم در 205 نمونه مورد بررسی به ترتیب 7/76 % و 31/18 % مشاهده شد(14). موسویان و همکاران در سال 1387 به بررسی فراوانی مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اورالیتیکم در زنان مبتلا به عفونت های دستگاه ادرای- تناسلی پرداختند. این مطالعه بر روی 155 نمونه واژینال گرفته شده از شهر اهواز صورت گرفت که نتایج بررسی مولکولی این گروه نشان داد که مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اورالیتیکم به ترتیب در 7/1 و 8/4 درصد از بیماران وجود دارد و حضور این دو باکتری ارتباط معنا داری با بیماران دارای سقط جنین دارد (15). نتایج دیگر مطالعات در مقایسه با بررسی حاضر حاکی از افزایش شیوع مایکوپلاسما هومینیس و عدم تغییر شیوع اوره آپلاسما اورالیتیکم می باشد.سخت رشد بودن، نیاز به محیط های کشت اختصاصی و مکمل های غذایی مخصوص، دمای نامناسب انتقال نمونه، مواد محدود کننده رشد، تاثیر دیگر میکروارگانیسم ها در زمان انکوباسیون، فقدان دیواره سلولی در این باکتریها، و به طبع آن حساسیت در برابر خشکی، دما و pH، از مشکلات معمول در کشت مایکوپلاسما ها می باشد. از طرفی تشخیص کلنی های این باکتری نیاز به مهارت و تجربه کافی دارد و یک فرایند تشخیصی نسبتاً طولانی می باشد(۱۷،۱۶)، لذا استفاده از روش های مولکولی هم چون PCR با توجه به حساسیت بیشتر و صرف زمان کمتر در بسیاری از مطالعات اثبات گردیده است(۳،۱). نتایج مقایسه روش کشت و آنالیز PCR در مطالعه موسویان و همکاران نشان داد که روش PCR نسبت به کشت این میکروارگانیسم ها بسیار دقیق تر و نتایج آن قابل اطمینان می باشد(15). مطالعات مختلفی نشان می دهد که حساسیت روش PCR در مقایسه با روش معمول کشت برای جداسازی مایکوپلاسماهای تناسلی، بالاتر است(۱۹،۱۸،۱). برای مثال در مطالعه نجار پیرایه و همکاران در سال 2007 حساسیت روش PCR و روش کشت، به ترتیب 91/8 و 53 درصد گزارش شد که حاکی از حساسیت و سرعت بالای PCR در برابر کشت برای جداسازی این باکتری ها می باشد(1). وطنی و همکاران نیز طی سال های 1383 الی 1384 به بررسی آلودگی با مایکوپلاسماهای ژنیتال در زنان مبتلا به واژینوز باکتریای پرداختند و نتایج حاصل از کشت باکتری های اوره آپلاسما اورالیتیکوم، مایکوپلاسما هومینیس، مایکوپلاسما ژنیتالیوم را با روش PCR مورد مقایسه قرار دادند. این گروه با استفاده از روش کشت توانستند 71 نمونه (40/8%) مایکوپلاسماهای ژنیتال را تشخیص دهند. در حالیکه PCR از نمونه های کشت منفی، نشان داد که 14 نمونه دیگر نیز از نظر حضور باکتری در نمونه، مثبت می باشند که این نکته نشان دهنده برتری روش های تشخیص مولکولی، همانند PCR در تشخیص و شناسایی این باکتری ها می باشد(20). با توجه به نتایج مطالعات محققان ذکر شده که حاکی از حساسیت و دقت بالای PCR نسبت به کشت در تشخیص باکتری های اوره آپلاسما اورالیتیکم و مایکوپلاسما هومینیس می باشد، در این مطالعه نیز از روش PCR جهت تشخیص و شیوع مایکوپلاسما ها استفاده گردید.

از دیگر یافته های این پژوهش ارتباط آماری معنی دار میان افراد خود درمانی شده با کرم واژینال و شیوع باکتری های اوره آپلاسما اورالیتیکم و مایکوپلاسما هومینیس بود، به طوریکه از 22 بیمار خود درمانی شده با کرم واژینال، 54% حامل باکتری اوره آپلاسما اورالیتیکم و 64% حامل باکتری مایکوپلاسما هومینیس بودند، که این مسئله، احتمالاً به دلیل تغییر فلور طبیعی دستگاه تناسلی این افراد، طی استفاده از کرم های واژینال و در نتیجه فراهم شدن شرایط رشد بیشتر این پاتوژن ها و بیماری زایی آنها می باشد.

نتیجه گیری

نتایج بررسی حاضر نشان داد شیوع باکتری های اوره آپلاسما اورالیتیکوم و مایکوپلاسما هومینیس با شیوع جهانی آن مطابقت دارد. خود درمانی با آنتی بیوتیک تاثیر چشمگیری بر شیوع باکتری ها نداشت، ولی استفاده از کرم های واژینال بدون تجویز پزشک بر شیوع باکتری اوره آپلاسما اورالیتیکم و مایکوپلاسما هومینیس اثر داشته است. با توجه به تاثیر بالقوه مایکوپلاسما ها در عوارض ناشی از عفونت مادران باردار و مرگ نوزادان و همچنین جداسازی مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اورالیتیکم از بیماران مبتلا به عفونت های ژنیتال، ضرورت تشخیص به موقع و درمان بیماران در مقابل این عوامل عفونی، بیش از پیش احساس می شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان این مقاله از کلیه کارمندان بخش زنان درمانگاه ولیعصر بیمارستان امام خمینی تهران و همچنین همکاران بخش بیولوژی مولکولی انستیتو پاستور کمال تشکر و امتنان را دارد. از سرکار خانم دکتر نجار پیرایه نیز به دلیل فراهم کردن سویه استاندارد باکتری اوره آپلاسما اورالیتیکم تشکر و قدردانی بعمل می آید.

REFERENCES

1. Najar Peerayeh SH, Samimi R, Detection of Ureaplasma Urealyticum in Clinical Samples from Infertile Women by Polymerase Chain Reaction. IJPT. 2007; 6(1): 23-26.

2. Kayser F H. Mycoplasma.In: Kayser F H, Bienz K A, Eckert J, Zinkernagel R M. Medical Microbiology. 9th edition, Germany, 2005; 340-42.

3. Oh KJ, Lee SE, Jung H, Kim G, Romero R, Yoon BH. Detection of ureaplasmas by the polymerase chain reaction in the amniotic fluid of patients with cervical insufficiency. J Perinat Med. 2010; 38(3): 261–68.

4. 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

5. Teng K, Li M, Yu W, Li H, Shen D, Liu D. Comparison of PCR with Culture for Detection of Ureaplasma urealyticum in Clinical Samples from Patients with Urogenital Infections. J Clin Microbiol. 1994; 32(9): 2232-34.

6. Blanchard A, Hentschel J, Duffy L, Baldus K, Cassell GH. Detection of Ureaplasma urealyticum by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults, in amniotic fluid, and in the respiratory tract of newborns. Clin Infect Dis. 1993; 17(1): 148–53.

7. Blanchard A, Yanez A, Dybvig K, Watson H L, Griffiths G, Cassell G H, Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of Mycoplasma hominis and detection by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1993; 31(5): 1358–61.

8. Baczynska A, Svenstrup HF, Fedder J, Birkelund S, Christiansen G. Development of real-time PCR for detection of Mycoplasma hominis. BMC Microbiol. 2004; 6(4): 35-40.

9. Najar Peerayeh Sh, Samimi R. Comparison of culture with the polymerase chain reaction for detection of genital Mycoplasma. Eur J Gen Med 2008; 5(2): 107-11.

10. Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Res.1992; 20(7): 1717-23.

11. CIGNA. DNA Hybridization Assays and other Gene-Based Tests for vaginitis. Cigna Health Care Coverage Position. 2005; 3(40): 1-7.

12. 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): 431-437.

13. Yoon BH, Romero R, Kim M, Kim EC, Kim T, Park JS, Jun JK. 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.

14. Amirmozafari N., Jeddi F., Masjedian F., Haghighi L. Prevalence of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in Genital Tract Infections, Razi Journal of Medical Sciences, 2009; 15(60) :19-25.

15. Moosavian S M, 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. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences & Health Services. 2011; 33(5): 91-7.

16. Jawetz, Melnick, Adelberg. Medical Microbiology 24th edition. McGraw-Hill Companies. 2007; 545-53.

17. Murray P R, Rosenthal K S, Pfaller M A. Medical Microbiology 5th edition, Elsevier Mosby. 2005; 443-47.

18. 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.

19. Ahmadi M H, Amirmozafari N, Kazemi B, Sadighi Gilani M A, 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. 2010; 12(3): 311-437.

20. Vatani Sh, Ghazisaidi K, Mohamadi M, Naji AR, Fateminasab F, Zeraati H, Mohraz M . The survey of contmination with genital mycoplasma in women with bactrial vaginalis by PCR method**.** Journal of Gorgan University of Medical Sciences, 2006; 8(1):45-50.