Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 2:50 +0330 on Saturday November 18th 2017

Tabari Journal of Preventive Medicine

Volume 1, Issue 3, Winter 2015



Original article

# Identification of *Mycoplasma Pneumonia* Isolated from the Respiratory Secretions of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Using Polymerase Chain Reaction in Kerman Province, Iran

Saharnaz Amirian[1], Kumarss Amini[2*], Mahdi Parviz[2]

1. MSc, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Iran
2. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Iran

**Corresponding Author:**
Kioumars Amini, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Islamic Azad University, Saveh Branch, Iran

**Email:** kamini@iau-saveh.ac.ir

Received: 25 September 2015
Revised: 7 December 2015
Accepted: 1 January 2016

## ABSTRACT

**Background & Objectives:** Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) involves the severe obstruction of the airways. Polymerase chain reaction (PCR) is a method with high sensitivity, specificity, accuracy and time-efficiency, which could be used for the identification of different pathogens, especially Mycoplasma pneumonia. This study was performed for the molecular detection of *M. pneumonia* isolated from the pulmonary secretions of patients with COPD.
**Materials and Methods:** This descriptive cross-sectional study was conducted during 12 months (November 2013-2014) in Kerman, Iran. After genomic DNA extraction using CinnaPure DNA kit, molecular detection of *M. pneumonia* strains was performed with a specific primer for P1 gene using a gradient thermocycler.
**Results:** In total, 100 respiratory secretion samples were collected from COPD patients. Analysis of agarose gel electrophoresis for the evaluation of PCR products of the P1 gene indicated 76 samples (76%) to be positive for this gene. Therefore, *M. pneumonia* genome could be detected in these samples.
**Conclusion:** *M. pneumonia* is considered as a significant risk factor in patients with COPD. In comparison with other methods, PCR has higher sensitivity and specificity as opposed to culture, which requires live bacteria.

**Keywords:** Chronic obstructive pulmonary disease, *M. pneumonia*, P1, PCR

▶ **Citation**: Amirian S, Amini K, Parviz M. Identification of Mycoplasma Pneumonia Isolated from the Respiratory Secretions of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Using Polymerase Chain Reaction in Kerman Province, Iran. Tabari J Prev Med. Winter 2015;1(3):8-15.

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 2:50 +0330 on Saturday November 18th 2017



مقاله پژوهشی

# شناسایی مایکوپلاسما پنومونیه از ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به سندرم انسدادی مزمن ریوی با استفاده از روش PCR در استان کرمان، ایران

سحرناز امیریان[۱]، کیومرث امینی[۲*]، مهدی پرویز[۲]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سیرجان، سیرجان، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

**نویسنده مسئول:** کیومرث امینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران

**پست الکترونیک:**
**kamini@iau-saveh.ac.ir**

**دریافت:** ۹۴/۷/۳
**اصلاحیه:** ۹۴/۹/۱۶
**ویراستاری:** ۹۴/۱۰/۱۱

## چکیده

**سابقه و هدف:** بیماری مزمن انسدادی ریه نوعی بیماری مزمن انسدادی است که با مسدود بودن مسیر هوایی مشخص می‌شود. PCR به‌دلیل داشتن حساسیت، دقت بالا و صرفه‌جویی در زمان یک روش مناسب برای تشخیص پاتوژن‌ها به‌ویژه مایکوپلاسما پنومونیه (Mycoplasma pneumonia) می‌باشد. هدف از مطالعه‌ی حاضر، شناسایی مولکولی مایکوپلاسما پنومونیه از ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به COPD است.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه‌ی توصیفی-مقطعی، در یک بازه زمانی ۱۲ ماهه از آذر ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ در استان کرمان انجام شد. پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت سیناژن (Cinna Pure-DNA)، شناسایی مولکولی سویه‌های مایکوپلاسما پنومونیه با استفاده از پرایمر اختصاصی برای ژن P1 و با کمک گرادیانت ترموسایکلر انجام شد.

**نتایج:** در مجموع، تعداد ۱۰۰ نمونه‌ی تنفسی از بیماران مبتلا به COPD به‌دست آمد. نتیجه آنالیز الکتروفورز ژل آگارز برای بررسی محصول PCR ژن P1، نشان داد که ۷۶ نمونه (۷۶ درصد) از نظر وجود این ژن مثبت بودند و از نظر ژنوم مایکوپلاسما پنومونیه قابل‌ردیابی بودند.

**نتیجه‌گیری:** مایکوپلاسما پنومونیه یک فاکتور خطر در افراد مبتلا به COPD می‌باشد. PCR در مقایسه با روش‌های دیگر از حساسیت و اختصاصیت بسیار بالاتری برخوردار است و برای انجام آن برخلاف روش کشت، نیازی به زنده بودن باکتری در نمونه نیست.

**واژه‌های کلیدی:** سندرم انسدادی مزمن ریوی، مایکوپلاسما پنومونیه، P1، PCR

◀ **استناد:** امیریان، سحرناز؛ امینی، کیومرث؛ پرویز، مهدی. شناسایی مایکوپلاسما پنومونیه از ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به سندرم انسدادی مزمن ریوی با استفاده از روش PCR در استان کرمان، ایران. مجله طب پیشگیری طبری، زمستان ۱۳۹۴؛۱(۳):۸-۱۵.

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 2:50 +0330 on Saturday November 18th 2017

## مقدمه

بیماری مزمن انسدادی ریه (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD) نوعی بیماری انسدادی ریوی است که با مسدود بودن مسیر هوایی به‌صورت مزمن مشخص می‌شود (۱). علائم این بیماری با افزایش سن تشدید می‌یابد. اصلی‌ترین نشانه‌های این بیماری تنگی نفس، سرفه و خلط می‌باشد. از معمول‌ترین عوامل مسبب COPD استعمال دخانیات بوده؛ اما عواملی دیگر از قبیل آلودگی هوا و وراثت نیز در ایجاد آن نقش دارند (۲). حدود پنج درصد از جمعیت کره زمین به این بیماری مبتلا هستند و تخمین زده می‌شود که در سال ۲۰۱۲، سومین عامل مرگ بیش از سه میلیون نفر در جهان بوده است (۳). افزایش سن، جنسیت (مذکر بودن)، سابقه بستری و وجود بیماری‌های همراه مانند: آسم، فشار خون و آلرژی از عوامل خطرساز در بستری شدن مکرر بیماران و مرگ در اثر Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (AECOPD) می‌باشند (۴). همچنین عامل ۷۵-۵۰ درصد AECOPD، مربوط به عفونت‌ها است که در این میان باکتری‌ها و ویروس‌ها هر کدام به‌تنهایی و با هم ۲۵ درصد را به خود اختصاص داده‌اند. هموفیلوس آنفلوآنزا (Haemophilus influenzae)، استرپتوکوکوس پنومونیه (Streptococcus pneumoniae)، موراکسلا کاتارالیس (Moraxella catarrhalis) و کلامیدیا تراکوماتیس (Chlamydia trachomatis) از عوامل مسبب این بیماری محسوب می‌شوند (۵).

نقش احتمالی مایکوپلاسما پنومونیه (Mycoplasma pneumonia) در بیماری انسدادی ریه مورد بررسی قرار گرفته است (۶). مایکوپلاسماها باکتری‌های فاقد دیواره سلولی هستند و تنها ارگانیسم‌های دارای استرول در غشای سیتوپلاسمی بوده که خود توان سنتز آن را ندارند و از محیط کسب می‌کنند. نداشتن دیواره سلولی باعث مقاوم شدن این باکتری‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر دیواره مانند پنی‌سیلین‌ها شده است.

در انسان گونه‌ی از مایکوپلاسما پنومونیه گاهی سبب سینه‌پهلو (پنومونی) می‌شود. در ابتدا مایکوپلاسما به سلول‌های محافظ غشای مجرای هوایی نفوذ می‌کند (۷). سپس با کشتن این سلول‌ها شروع به ایجاد یک واکنش التهابی در سراس‌ر ناحیه شده و در برخی از موارد نیز به درون جریان خون نفوذ می‌کند. مایکوپلاسما پنومونیه یکی از عوامل عفونت بخش فوقانی و تحتانی در انسان بوده و تابلوی بالینی آن به‌صورت تراکئوبرونشیت کندپیشرونده همراه با بی‌قراری و سرفه‌های خشک است (۸). بیماری‌زایی این میکروارگانیسم شامل یک فارنژیت ساده و تراکئوبرونشیت تا پنومونی حاد می‌باشد. مطالعات نشان داده که مایکوپلاسما پنومونیه مسئول بیش از ۲۰ درصد موارد پنومونی‌های کسب‌شده از جامعه (Community Acquired Pneumonia: CAP) است (۹). علاوه‌بر عوارض ریوی این باکتری طیفی وسیعی از عوارض سیستمیک غیرریوی مانند: راش، سندرم استیونس-جانسن، آنسفالیت، مننژیت آسپتیک؛ بیماری‌های قلبی-عروقی مانند آترواسکلروزیس و بیماری‌های خودایمن مانند: مننگوآنسفالیت، میلیت عرضی، آتاکسی مخچه‌ای، کری، فلج بل، سندرم ساقه مغزی، سندرم گیلن باره و مننژیت آسپتیک را ایجاد می‌کند (۱۰). عفونت‌های حاصل از این پاتوژن به اریترومایسن خوراکی و یا ماکرولیدهای جدید مانند آزیترومایسین و یا کلاریترومایسین پاسخ می‌دهد و در مواردی هم کورتیکواستروئید توصیه می‌شود (۹). روش‌های معمول قابل‌دسترس برای تشخیص روزمره عفونت‌های مایکوپلاسما پنومونیه شامل: کشت، سرولوژی و تکنیک‌های مبتنی بر تکثیر اسید نوکلئیک (NAAT) می‌باشند (۱۱). روش‌های مبتنی بر کشت، وقت‌گیر، هزینه‌بر با اختصاصیت نسبتاً پایین هستند که نیازمند تجهیزات آزمایشگاهی و کارشناس باتجربه جهت تفسیر نتایج می‌باشد. آزمایشات سرولوژیک نیز به‌دلیل بروز واکنش‌های متقاطع (مثبت و منفی کاذب)، حساسیت نسبتاً پایین و نیازمندی به سرم‌های مختلف فاز بیماری (حاد و مزمن) ایده‌آل نیستند. به همین دلیل، در سال‌های اخیر برای غلبه بر چنین مشکلاتی، استفاده از آزمایشات NAAT مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 2:50 +0330 on Saturday November 18th 2017

(PCR) توسعه فراوانی یافته است (۱۲). PCR به‌دلیل داشتن حساسیت، دقت بالا و صرفه‌جویی در زمان روش مناسبی جهت مقاصد تشخیصی باکتری‌های پاتوژن به‌ویژه مایکوپلاسما پنومونیه می‌باشد.

چاکر (Chalker) و همکاران در سال ۲۰۰۵ و ملهوترا (Malhotra) و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند، روش‌های مرسوم سرولوژیک که برای تشخیص IgM،IgG و IgA استفاده می‌شوند، نیازمند ۷ تا ۱۰ زمان می‌باشند؛ بنابراین از ژن P1 برای تشخیص مایکوپلاسما نمونیه در نمونه‌های بالینی استفاده کردند (۱۳،۱۴). در سال‌های اخیر، شناسایی این ارگانیسم با طراحی پرایمرهای اختصاصی برای ژن‌های ۱۶s rRNA، ژن اپران ATPase، فاکتور اتصالی P1 (ادهسین اصلی ارگانیسم در اتصال)، فاکتور طویل‌سازی tuf و پروتیئن شوک حرارتی (HSP60)، P4A، P4B، P11 و P12 امکان‌پذیر شده است (۱۵)؛ بنابراین هدف از مطالعه‌ی حاضر، شناسایی مولکولی مایکوپلاسما پنومونیه از ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به سندرم انسدادی مزمن ریوی (COPD) با استفاده از تکثیر پرایمرهای P1 در روش PCR می‌باشد.

## مواد و روش ها

پژوهش حاضر از نوع مقطعی-توصیفی به مدت یک سال (۱۳۹۳) در استان کرمان (بیمارستان‌های شهید باهنر، افضلی‌پور و سیدالشهدا) به منظور شناسایی مولکولی مایکوپلاسما پنومونیه از ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به COPD با روش نمونه‌گیری آسان انجام شد. نمونه‌گیری از ۱۰۰ بیمار (۵۴ مرد و ۴۶ زن) پذیرش شده به دلیل COPD انجام گردید. ملاک ورود (Inclusion Criteria) این افراد به مطالعه، وجود حداقل ۲۴ ساعت نشانه پایداری از ترشح چرک، خلط و یا هر دو علامت، خس خس و یا تنگی نفس و معیار خروج (Exclusion Criteria) عدم ابتلای بیماران به بیماری سل ریوی، آسم، آلرژی و یا بیماری قلبی طبق نظر پزشک متخصص ریه بود. پس از اخذ نمونه‌ها به منظور غنی-سازی در محیط و انتقال به محیط آزمایشگاه، تمامی آن‌ها بر روی محیط انتقالی (organism Broth: PPLO Broth Pleuro Pneumonia–Like) به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۵ درصد $CO_2$ گرمخانه‌گذاری شدند. به منظور شناسایی مولکولی سویه‌های مایکوپلاسما پنومونیه از نمونه‌های حاصله، ابتدا DNA ژنومی سویه‌ها با استفاده از کیت باکتری‌های گرم منفی سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR۸۸۱۶۱۳) استخراج گردید. درجه خلوص DNA استخراج‌شده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (ترمو،آمریکا) براساس نسبت A۲۶۰/A۲۸۰ مورد بررسی قرار گرفت. همچنین برای ارزیابی یک‌پارچگی و سلامت DNA سلولی استخراج‌شده از نمونه‌ها بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، الکتروفورز انجام گردید. پرایمرهای مورد استفاده برای شناسایی مولکولی مایکوپلاسما پنومونیه در جدول ۱ عنوان شده است. پس از BLAST آغازگرهای انتخاب‌شده در سایت NCBI، واکنش PCR چندگانه‌ای (Multiplex-PCR) به حجم نهایی ۲۵µl با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۱ سیکل انجام گرفت (۱۶). در پایان، محصولات واکنش PCR در ژل آگارز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) در مقایسه با سویه استاندار مایکوپلاسما پنومونیه ATCC ۲۹۳۴۲ الکتروفورز گردید (جدول ۲ و ۳).

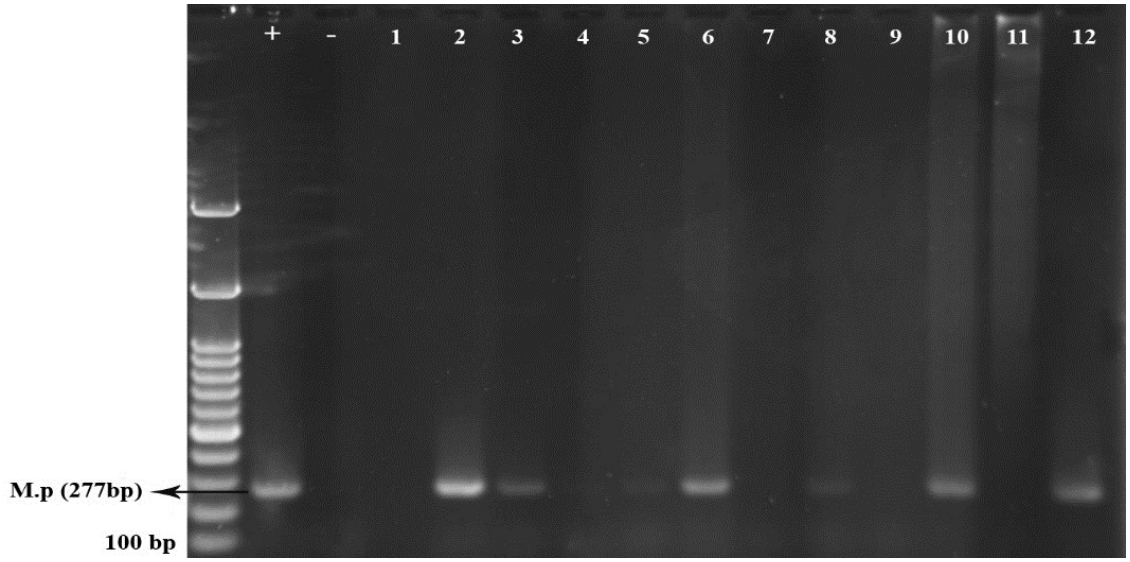
## نتایج

نتایج مطالعه حاضر مشخص کرد که از ۱۰۰ نمونه

**جدول ۱: توالی الیگونوکلئوتیدی آغازگرهای استفاده شده**

| ژن هدف | توالی نوکلئوتیدی(۵'→۳') | غلظت* | طول قطعه (bp) | منبع |
|---|---|---|---|---|
| P۱ | F=۵'-AGGCTCAGGTCAATCTGGCGTGGA-۳' | ۱/۰Pmol | ۲۷۷ | ۱۶ |
| | R= ۵'-GGATCAAACAGATCGGTGACTGGGT-۳' | ۱/۰Pmol | | |

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 2:50 +0330 on Saturday November 18th 2017




**شکل ۱: نتایج آزمون PCR. از سمت چپ به راست به‌ترتیب: ۱۰۰ bp Plus DNA size marker، $C^+$ (مایکوپلاسما پنومونیه ATCC ۲۹۳۴۲)، $C^-$ (اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲)**

جمع‌آوری‌شده ۷۶ نمونه (۷۶ درصد) از نظر مایکوپلاسما پنومونیه مثبت بودند و ژن P۱ را حمل می‌کردند. از مجموع تمامی سویه‌های تحت مطالعه، ۳۴ سویه (۴۴/۷ درصد) از مردان و ۴۲ سویه (۵۵/۳ درصد) از زنان به‌دست آمد. این نتایج آمار بالای آلودگی با این نوع از مایکوپلاسما را در بیماران مبتلا به سندرم انسدادی مزمن ریوی نشان می‌دهد. در شکل ۱ نتیجه ژل الکتروفورز محصول PCR را در ۱۲ نمونه نشان داده شده است.

## بحث و نتیجه گیری

کشت و جداسازی مایکوپلاسماها در ایران به‌دلیل زمان‌بر، وقت‌گیر و پرهزینه بودن با مشکلاتی همراه است؛ بنابراین اغلب پژوهش‌ها براساس تست‌های سرولوژیک و بر پایه‌ی اندازه‌گیری IgM و IgG ضدمایکوپلاسمایی استوار هستند (۱۷). در تحقیق حاضر از یک‌صد نمونه‌ی جمع‌آوری‌شده، ۷۶ درصد آن‌ها از نظر مایکوپلاسما پنومونیه مثبت بودند که نشان‌دهنده‌ی آمار بالای آلودگی با این نوع مایکوپلاسما در بیماران مبتلا به COPD می‌باشد. شریفی و همکاران (۱۸) در سال ۱۳۹۰ در پژوهشی با مقایسه روش‌های PCR، الایزا و کشت نشان دادند که از ۱۲ نمونه مثبت (۶ درصد) با روش PCR، ۱۰ نمونه (۵ درصد) از نظر IgM و ۴ نمونه (۲ درصد) از نظر کشت مثبت بودند. این محققین دریافتند که PCR در مقایسه با روش‌های الایزا و کشت حساس‌ترین روش بوده و از

**جدول ۲: اجزای مخلوط واکنش PCR**

| مقدار مورد نیاز | اجزای دخیل در واکنش |
|---|---|
| ۶ lμ | PCR master mix ۵X |
| ۰/۷ lμ | آغازگرها به غلظت ۰/۸ μM |
| ۰/۸ lμ | الگو DNA ۱۰ ng |
| ۱۷/۵ lμ | آب دوبار تقطیر |
| ۲۵ lμ | حجم نهایی |

**جدول۳: دستورالعمل دمایی مربوط به سیکل‌های دستگاه ترمال سایکلر**

| زمان | دما (درجه سلسیوس) | مرحله انجام PCR |
|---|---|---|
| ۵ دقیقه | ۹۵ | دناتوراسیون اولیه |
| ۴۵ ثانیه | ۹۵ | واسرشتگی (Denaturation) |
| ۶۰ ثانیه | ۵۸ | اتصال پرایمرها (Annealing) |
| ۶۰ ثانیه | ۷۲ | طویل‌سازی (Extension) |
| ۵ دقیقه | ۷۲ | تکثیر نهایی |

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 2:50 +0330 on Saturday November 18th 2017

طرفی روش الایزا نیز حساس‌تر از کشت می‌باشد. این یافته‌ها با مطالعه کنونی هم‌ارز است و نشان می‌دهد که PCR بر روی نمونه‌های سوآپ گلو سریع، حساس و اختصاصی است و تشخیص عفونت تنفسی با عامل مایکوپلاسما پنومونیه را مقدور می‌نماید. تولی (Tully) و همکاران (۱۹) اظهار کردند که اگرچه کشت مایکوپلاسماها همچنان روش استانداردی برای شناسایی این ارگانیسم می‌باشد؛ اما دارای معایبی از قبیل نیاز به محیط‌های اختصاصی و روند تهیه محیط کشت، مدت زمان انکوباسیون طولانی (۴-۱ هفته) نیاز به آزمایشگاه تخصصی، باکتری زنده و احتمال ابتلای کارکنان آزمایشگاه می‌باشد. شاه‌حسینی و همکاران (۲۰) در پژوهش خود دریافتند که مایکوپلاسماها سخت‌رشد و نیازمند به شرایط ویژه‌ای برای کشت می‌باشند که در گونه‌های مختلف، متفاوت است و باید نیازمندی هر گونه فراهم شود. در نتایج تحقیق معظمی و همکاران (۲۱) مشخص شد که از ۱۷۰ نمونه خلط در بیماران مشکوک به آنفولانزا هیچ سویه‌ای از مایکوپلاسما پنومونیه یافت نشد که با مطالعه پیش رو مغایرت دارد و دلیل این اختلاف می‌تواند در نوع بیماران تحت مطالعه (آنفلوانزا در مقابل COPD) باشد. در راستای بررسی عوامل عفونی مایکوپلاسمایی و کلامیدیایی با بیماری‌های مزمن ریوی، مطالعاتی انجام شده است. برای مثال گور (Gurr) و همکاران (۲۲) ارتباط مایکوپلاسما پنومونیه را با بیماری مزمن ریوی نشان دادند؛ اما بوکولتز (Bucholtz) و همکاران (۲۳) این ارتباط را رد نمودند. عطایی و همکاران (۲۴) در پژوهش خود نشان دادند که از ۱۳۱ نمونه سینوویال، ۲۲/۹ درصد از نظر وجود مایکوپلاسما پنومونیه مثبت بودند که این فراوانی با مطالعه‌ی حاضر مغایرت دارد و علت این اختلاف می‌تواند در نوع نمونه باشد. زندولکاوآ (Zendulkova) و همکاران (۲۵) دریافتند که آزمایش‌های معمول جهت تشخیص گونه‌های مایکوپلاسما عمدتاً بر پایه روش‌های کلاسیک مانند آزمایشات بیوشیمیایی و ایمونوفلورسنت استوار است. این روش‌ها گرچه سودمند می‌باشند؛ اما ممکن است با واکنش‌های مثبت کاذب همراه باشند. در نتیجه روش‌های مولکولی از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دارای پتانسیل بالایی جهت تشخیص دقیق و سریع عوامل بیماری‌زا بوده و می‌تواند امکان شروع هر چه سریع‌تر درمان آنتی‌بیوتیکی بیماری را فراهم نمایند. هم‌ارز با نتایج مطالعه پیش رو، وایترز (Waiters) و همکاران (۲۶) نشان داد که تکنیک کشت وقت‌گیر و دارای نتایج منفی کاذب زیادی در مقایسه با PCR می‌باشد. در مواردی هم که درمان آنتی‌بیوتیکی پیش از نمونه‌گیری انجام شود، نتیجه‌ی کشت منفی گزارش می‌گردد؛ بنابراین برای تعیین هویت مایکوپلاسما پنومونیه، روش کشت دارای نتایج ضعیفی بوده و کاربرد روش‌های مولکولی همچون PCR در اولویت است. موروزومی (Morozumi) و همکاران (۲۷) نشان دادند که مایکوپلاسما پنومونیه عامل گرفتاری‌های تنفسی مانند: گلودرد، فارنژیت، رینیت، تراکئوبرونشیت و همچنین مسئول بیش از ۲۰ درصد پنومونی‌های کسب‌شده از جامعه است؛ بنابراین PCR روش دقیق، سریع، قابل‌اعتماد و حساس برای تشخیص سریع مایکوپلاسما پنومونیه در نمونه‌های عفونت‌های تنفسی می‌باشد.

نتایج تحقیق پیش رو نشان داد که مایکوپلاسما پنومونیه یک فاکتور خطر در افراد مبتلا به بیماری انسداد ریه می‌باشد. همچنین واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یک واکنش سریع و حساس برای تشخیص DNA به‌عنوان شاخص حضور یک میکروارگانیسم در مقادیر بسیار کم نمونه است. این روش در مقایسه با روش‌های دیگر به‌ویژه روش کشت، از حساسیت و اختصاصیت بسیار بالاتری برخوردار است و برخلاف روش کشت، برای انجام نیازی به زنده بودن باکتری در نمونه مورد آزمایش نیست. همچنین مزیت آن بر روش‌های سرولوژیک عدم بروز واکنش‌های متقاطع و استفاده از سرم‌های مختلف فاز بیماری (حاد و مزمن) می‌باشد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از همکاران و کارکنان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی پاسارگاد در انجام کار عملی پژوهش حاضر کمال تشکر و قدردانی نمایند.

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 2:50 +0330 on Saturday November 18th 2017

## References

1. Siafakas NM, Vermeire P, Pride NB, Paoletti P, Gibson J, Howard P, et al. Optimal assessment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The European Respiratory Society Task Force. Eur Respir J 1995; 8(8):1398–1420.
2. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 1995; 152(5 Pt 2):S77–S121.
3. Rodriguez-Roisin R, MacNee W. Pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir Mono 1998; 3:107–126.
4. Celli BR, Halbert RJ, Isonaka S, Schau B. Population impact of different definitions of airway obstruction. Eur Respir J 2003; 22(2):268–273.
5. Schols AM, Soeters PB, Dingemans AM, Mostert R, Frantzen PJ, Wouters EF. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. Am Rev Respir Dis 1993; 147(5):1151–1156.
6. Erkan L, Uzun O, Findik S, Katar D, Sanic A, Atici AG. Role of bacteria in acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis 2008; 3(3):463–467.
7. Spuesens EB, Fraaij PL, Visser EG, Hoogenboezem T, Hop WC, van Adrichem LN, et al. Carriage of Mycoplasma pneumoniae in the upper respiratory tract of symptomatic and asymptomatic children: an observational study. PLOS Med 2013; 10(5):e1001444.
8. Ursi D, Ieven M, Noordhoek GT, Ritzler M, Zandleven H, Altwegg M. An interlaboratory comparison for the detection of Mycoplasma pneumoniae in respiratory samples by the polymerase chain reaction. J Microbiol Methods 2003; 53(3):289–294.
9. Wenzel RP, Craven RB, Davies JA, Hendley JO, Hamory BH, Gwaltney JM Jr. Protective efficacy of an inactivated Mycoplasma pneumoniae vaccine. J Infect Dis 1977; 136(Suppl):S204–S207.
10. Esposito S, Blasi F, Bellini F, Allegra L, Principi N. Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia pneumoniae infections in children with pneumonia. Mowli Study Group. Eur Respir J 2001; 17(2):241–245.
11. Nilsson AC, Bjorkman P, Persson K. Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute Mycoplasma pneumoniae infection and reveals a high rate of persistent infection. BMC Microbiol 2008; 8:93-101.
12. Wadowsky RM, Castilla EA, Laus S, Kozy A, Atchison RW, Kingsley LA, et al. Evaluation of Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae as etiologic agents of persistent cough in adolescents and adults. J Clin Microbiol 2002; 40(2):637–640.
13. Pitcher D, Chalker VJ, Sheppard C, George RC, Harrison TG. Real-time detection of Mycoplasma pneumoniae in respiratory samples with an internal processing control. J Med Microbiol 2006; 55(Pt 2):149–155.
14. Chaudhry R, Sharma S, Javed S, Passi K, Dey AB, Malhotra P. Molecular detection of Mycoplasma pneumoniae by quantitative real-time PCR in patients with community acquired pneumonia. Indian J Med Res 2013; 138:244-251.
15. Giono-Cerezo S, Eatrada-Gutierrez G, Rivere-Tapia JA, Yanez-Santos JA, Diaz-Garcia FJ. Current status of the mollicute (Mycoplasma) lung disease: pathogenesis, diagnostics, treatment and prevention. Lung Dis 2012; 2012:331-358.
16. Kong F, Gordon S, Gilbert GL. Rapid-cycle PCR for detection and typing of Mycoplasma pneumoniae in clinical specimens. J Clin Microbiol 2000; 38(11):4256–4259.
17. Chaudhry R, Sharma S, Javed S, Passi K, Dey AB, Malhotra P. Molecular detection of Mycoplasma pneumoniae by quantitative real-time PCR in patients with community acquired pneumonia. Indian J Med Res 2013; 138:244-251.
18. Sharifi S, Ghotaslou R, Akhi MT, Sorush MH, Ansarin K, Shaboanpur J, et al. Detection of pulmonary infections due to Mycoplasma pneumoniae by culture, ELISA and PCR methods at hospital of Tabriz University of Medical Sciences. Med J Tabriz Univ Med Sci 2011; 33(3):3641- (Persian).
19. Tully JG, Rose DL, Whitcomb RF, Wenzel RP. Enhanced isolation of Mycoplasma pneumonia from throat washings with a newly-modified culture medium. J Infect Dis 1979; 139(4):478-482.

Downloaded from tjpm.mazums.ac.ir at 2:50 +0330 on Saturday November 18th 2017



20. Shah-Hosseini MH, Mardany M, Hosseini Z, Khoram Khourshid HR, Rahimi AA, Jalilvand Y. Comparison of culture with PCR tests for detection of Mycoplasma pneumoniae respiratory infections. J Zanjan Univ Med Sci 2006; 56(14):12-23 (Persian).
21. Moazemi A, Shirazi MH, Pourmand MR, Akbari N, Afshar D, Hjikhani S. Simultaneous specific detection of streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Mycoplasma pneumoniae in sputum samples from patients with suspected influenza by multiplex-PCR. Iran J Infect Dis 2013; 63(18):25-29 (Persian).
22. Gurr PA, Chakraverty A, Callanan V, Gurr SJ. The detection of Mycoplasma pneumonia in nasal polyps. Clin Otolaryngol Allied Sci 1996; 21(3):269-273.
23. Bucholtz GA, Salzman SA, Bersalona FB, Boyle TR, Ejercito VS, Penno L, et al. PCR analysis of nasal polyps, chronic sinusitis, and hypertrophied tubinates for DNA encoding bacterial 16s rRNA. Am J Rhinol 2002; 16(3):169-173.
24. Golmohammadi R, Ataee RA, Alishiri GH, Mirnejad R, Najafi A, Tate M, et al. Molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae in synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. Iran J Med Microbiol 2014; 8(1):1-8.
25. Zendulkova D, Madanat A, Lany P, Rosenbergova K, Pospisil Z. Detection of Mycoplasma agalactiae by polymerase chain reaction in Jordanian Sheep and goat herds. Acta Vet Brono 2007; 76(1):71-77.
26. Waiters KB, Talkington DF. Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev 2004; 17(4):697-728.
27. Morozumi M, Hasegawa K, Kobayashi R, Inoue N, Iwata S, Kuroki H, et al. Emergence of macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae with a 23S rRNA gene mutation. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(6):2302-2306.