

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<sup>1</sup>, Kumarss Amini<sup>2\*</sup>, Mahdi Parviz<sup>2</sup>

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 pneumoniae*. This study was performed for the molecular detection of *M. pneumoniae* 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. pneumoniae* 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. pneumoniae* genome could be detected in these samples.

**Conclusion:** *M. pneumoniae* 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. pneumoniae*, 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.

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

سحرناز امیریان<sup>۱</sup>، کیومرث امینی<sup>۲\*</sup>، مهدی پرویز<sup>۲</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** بیماری مزمن انسدادی ریه نوعی بیماری مزمن انسدادی است که با مسدود بودن مسیر هوایی مشخص می‌شود. PCR به دلیل داشتن حساسیت، دقت بالا و صرفه‌جویی در زمان یک روش مناسب برای تشخیص پاتوژن‌ها به‌ویژه مایکوپلازما پنومونیه (*Mycoplasma pneumoniae*) می‌باشد. هدف از مطالعه‌ی حاضر، شناسایی مولکولی مایکوپلازما 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 مایکوپلازما پنومونیه با استفاده از پرایمر اختصاصی برای ژن P1 و با کمک گراداینت 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 مایکوپلازما پنومونیه قابل‌ردیابی بودند. **نتیجه‌گیری:** مایکوپلازما 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، مایکوپلازما پنومونیه، PCR، P1

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

◀ **استناد:** امیریان، سحرناز؛ امینی، کیومرث؛ پرویز، مهدی. شناسایی مایکوپلازما 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؛ ۱۱(۳): ۸-۱۵.

## مقدمه

بیماری مزمن انسدادی ریه (Chronic Obstructive Pulmonary Disease: COPD) نوعی بیماری انسدادی ریوی است که با مسدود بودن مسیر هوایی به صورت 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 خطر ساز 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 به تنهایی 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 مایکوپلازما پنومونیه (*Mycoplasma pneumoniae*) در بیماری انسدادی ریه مورد بررسی قرار گرفته است (۶). مایکوپلازماها 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 مایکوپلازما پنومونیه گاهی سبب

سینه‌پهلو (پنومونی) می‌شود. در ابتدا مایکوپلازما 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. مایکوپلازما پنومونیه یکی از عوامل عفونت بخش فوقانی و تحتانی در انسان بوده و تابلوی بالینی آن به صورت تراکتوبرونشیت کندپیشرونده همراه با بی‌قراری و سرفه‌های خشک است (۸). بیماری‌زایی این میکروارگانیسم شامل یک فارنژیت ساده و تراکتوبرونشیت تا پنومونی حاد می‌باشد. مطالعات نشان داده که مایکوپلازما پنومونیه مسئول بیش از ۲۰ درصد موارد پنومونی‌های کسب‌شده از جامعه (*Community Acquired Pneumonia*: CAP) است (۹). علاوه بر 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 اریترومایسین 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 مایکوپلازما 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 به دلیل 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 پلیمرز

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 غنی‌سازی در محیط و انتقال به محیط آزمایشگاه، تمامی آن‌ها بر روی محیط انتقالی (Pleuro Pneumonia-Like organism Broth: PLO Broth) به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۵ درصد CO<sub>2</sub> گرمخانه‌گذاری شدند. به منظور شناسایی مولکولی سویه‌های میکوپلازما پنومونیه از نمونه‌های حاصله، ابتدا DNA ژنومی سویه‌ها با استفاده از کیت باکتری‌های گرم منفی سیناژن (Cinna Pure DNA KIT-PR881613) استخراج گردید. درجه خلوص DNA استخراج‌شده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (ترمو، آمریکا) براساس نسبت A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 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 میکوپلازما پنومونیه در جدول ۱ عنوان شده است. پس از BLAST آغازگرهای انتخاب‌شده در سایت NCBI، واکنش PCR چندگانه‌ای (Multiplex-PCR) به حجم نهایی ۱۲۵ با استفاده از گرادینت 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 استاندارد میکوپلازما پنومونیه ATCC ۲۹۳۴۲ الکتروفورز گردید (جدول ۲ و ۳).

### نتایج

نتایج مطالعه حاضر مشخص کرد که از ۱۰۰ نمونه

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

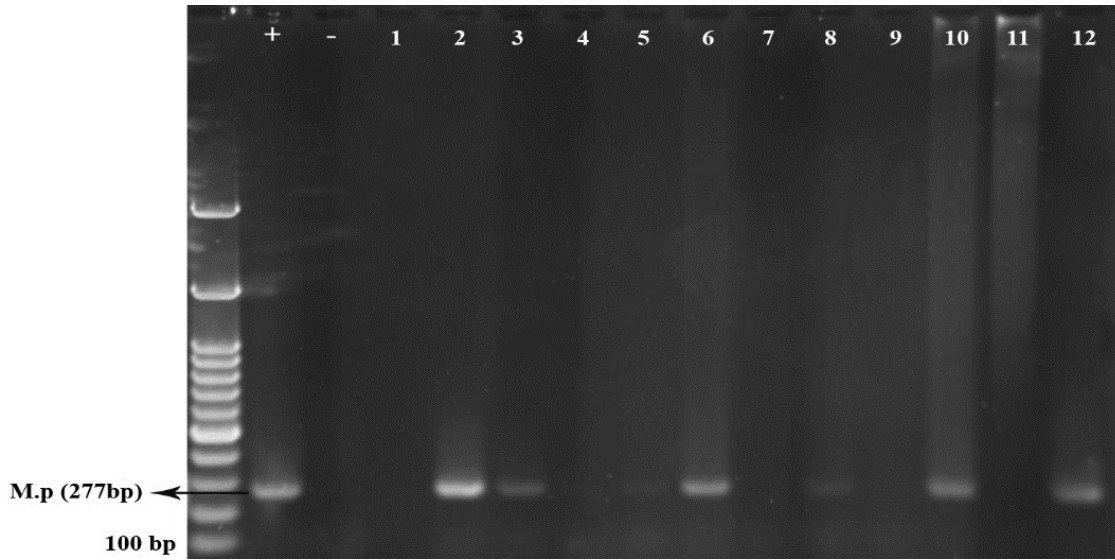
چاکر (Chalker) و همکاران در سال ۲۰۰۵ و ملهوترا (Malhotra) و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند، روش‌های مرسوم سرولولژیک که برای تشخیص IgM، IgG و IgA استفاده می‌شوند، نیازمند ۷ تا ۱۰ زمان می‌باشند؛ بنابراین از ژن P1 برای تشخیص میکوپلازما نمونیه در نمونه‌های بالینی استفاده کردند (۱۳، ۱۴). در سال‌های اخیر،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

### مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع مقطعی-توصیفی به مدت یک سال (۱۳۹۳) در استان کرمان (بیمارستان‌های شهید باهنر، افضل‌پور و سیدالشهدا) به منظور شناسایی مولکولی میکوپلازما 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

جدول ۱: توالی الیگونوکلوئوتیدی آغازگرهای استفاده شده

منبع	طول قطعه (bp)	غلظت*	توالی نوکلئوتیدی (۵'→۳')	ژن هدف
۱۶	۲۷۷	۱/۰ Pmol	F=۵'-AGGCTCAGGTC AATCTGGCGTGGGA-۳'	P1
		۱/۰ Pmol	R= ۵'-GGATCAAACAGATCGGTGACTGGGT-۳'	



شکل ۱: نتایج آزمون PCR. از سمت چپ به راست به ترتیب:  $C^+$  (مایکوپلازما پنومونیه ATCC ۲۹۳۴۲)،  $C^-$  (اشریشیا کلی ATCC ۲۵۹۲۲)

اندازه‌گیری IgM و IgG ضد مایکوپلازمایی استوار هستند (۱۷). در تحقیق حاضر از یک صد نمونه‌ی جمع‌آوری‌شده، ۷۶ درصد آن‌ها از نظر مایکوپلازما پنومونیه مثبت بودند که نشان‌دهنده‌ی آمار بالای آلودگی با این نوع مایکوپلازما 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

جمع‌آوری‌شده ۷۶ نمونه (۷۶ درصد) از نظر مایکوپلازما پنومونیه مثبت بودند و ژن P1 را حمل می‌کردند. از مجموع تمامی سویه‌های تحت مطالعه، ۳۴ سویه (۴۴/۷ درصد) از مردان و ۴۲ سویه (۵۵/۳ درصد) از زنان به دست آمد. این نتایج آمار بالای آلودگی با این نوع از مایکوپلازما 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 مایکوپلازماها در ایران به دلیل زمان‌بر، وقت‌گیر و پرهزینه بودن با مشکلاتی همراه است؛ بنابراین اغلب پژوهش‌ها براساس تست‌های سرولوژیک و بر پایه‌ی

جدول ۳: دستورالعمل دمایی مربوط به سیکل‌های دستگاه ترمال سایکلر

مرحله انجام PCR	دما (درجه سلسیوس)	زمان
دنا تورا سبون اولیه	۹۵	۵ دقیقه
واسرشتگی (Denaturation)	۹۵	۴۵ ثانیه
اتصال پرایمرها (Annealing)	۵۸	۶۰ ثانیه
طویل سازی (Extension)	۷۲	۶۰ ثانیه
تکثیر نهایی	۷۲	۵ دقیقه

جدول ۲: اجزای مخلوط واکنش PCR

اجزای دخیل در واکنش	مقدار مورد نیاز
PCR master mix ۵X	۶ $\mu$
آغازگرها به غلظت $0.8 \mu M$	$0.7 \mu$
۱۰ ng DNA الگو	$0.8 \mu$
آب دوبار تقطیر	$17.5 \mu$
حجم نهایی	۲۵ $\mu$

مولکولی از جمله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 میکوپلازما پنومونیه، روش کشت دارای نتایج ضعیفی بوده و کاربرد روش‌های مولکولی همچون PCR در اولویت است. موروزومی (Morozumi) و همکاران (۲۷) نشان دادند که میکوپلازما پنومونیه عامل گرفتاری‌های تنفسی مانند: گلودرد، فارنژیت، رینیت، تراکتوبرونشیت و همچنین مسئول بیش از ۲۰ درصد پنومونی‌های کسب‌شده از جامعه است؛ بنابراین PCR روش دقیق، سریع، قابل اعتماد و حساس برای تشخیص سریع میکوپلازما پنومونیه در نمونه‌های عفونت‌های تنفسی می‌باشد.

نتایج تحقیق پیش رو نشان داد که میکوپلازما پنومونیه یک فاکتور خطر در افراد مبتلا به بیماری انسداد ریه می‌باشد. همچنین واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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.

طرفی روش الیزا 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 میکوپلازما پنومونیه را مقدور می‌نماید. تولی (Tully) و همکاران (۱۹) اظهار کردند که اگرچه کشت میکوپلازماها همچنان روش استاندارد 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 میکوپلازماها 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 آنفلوآنزا هیچ سویه‌ای از میکوپلازما پنومونیه یافت نشد که با مطالعه پیش رو مغایرت دارد و دلیل این اختلاف می‌تواند در نوع بیماران تحت مطالعه (آنفلوآنزا در مقابل COPD) باشد. در راستای بررسی عوامل عفونی میکوپلازمایی و کلامیدیایی با بیماری‌های مزمن ریوی، مطالعاتی انجام شده است. برای مثال گور (Gurr) و همکاران (۲۲) ارتباط میکوپلازما 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 میکوپلازما پنومونیه مثبت بودند که این فراوانی با مطالعه‌ی حاضر مغایرت دارد و علت این اختلاف می‌تواند در نوع نمونه باشد. زندولکواوا (Zendulkova) و همکاران (۲۵) دریافتند که آزمایش‌های معمول جهت تشخیص گونه‌های میکوپلازما 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

## 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, Soroush 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 pneumoniae* from throat washings with a newly-modified culture medium. *J Infect Dis* 1979; 139(4):478-482.

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 Zanzan 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 pneumoniae* 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, Ataei 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.