

Determining the Prevalence Rate of *Mycoplasma genitalium* in Patients with Prostatitis by PCR-RFLP Technique

Iraji GR¹, Mirnejad R*², Jalali Nodoshan MR³, Ghorbanpour N⁴

¹ Department of Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Molecular Biology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Department of Anatomy and Pathology, School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

⁴ Department of Microbiology, Faculty of Basic and Medical Sciences, Islamic Azad University of Zanjan, Zanjan, Iran

* Corresponding Author. Tel/Fax: +982188039883 E-mail: rmirnejad@yahoo.com

Received: 15 December 2011 Accepted: 1 January 2013

ABSTRACT

Background & Objectives: Prostatitis is relatively one of the common diseases in elderly men. Treatment of this disease is difficult and because of frequent relapses, it provides complicated problems for patients and the physicians. Detection of reservoirs and determination of prevalence of involved microbes in prostatitis are important in the epidemiology and control of the disease. This study was conducted to determine the prevalence of *Mycoplasma genitalium* in patients with prostatitis by sequencing and PCR-RFLP techniques.

Methods: In this cross-sectional study, 200 paraffin-embedded prostate samples from patients with prostatitis during 2008-2011 were checked for *M. genitalium*. After cutting the tissues and homogenization, the genomic DNA was extracted and used as template in PCR. Primers targeting a 465 bp regions of 16S rRNA of *M. genitalium* were used in the assay. PCR products were sequenced and *Cac8I*, *Bbs I*, *EcoRI*, *AluI*, *TaqI* endonucleases were used in RFLP analysis.

Results: Of 200 samples, 4 were positive in PCR. The results of DNA sequencing and RFLP confirmed the amplified genes corresponded to *M. genitalium* G37.

Conclusion: The *Mycoplasma* genome present in tissue samples of prostate showed this bacterium could be one of the risk factors for prostatitis in men. However large studies and control groups are needed to prove this finding.

Key words: Prostatitis; *Mycoplasma genitalium*; PCR-RFLP; 16S rRNA

تعیین میزان شیوع مایکوپلازما ژنیتالیوم در بیماران مبتلا به پروستاتیت با روش مولکولی PCR

دکتر غلامرضا ایراجیان^۱، دکتر رضا میرنژاد^{۲*}، دکتر محمد رضا جلالی ندوشن^۳، نفیسه قربانپور^۴

^۱ گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۲ مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران
^۳ گروه علوم تشریح و پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
^۴ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه و پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان، زنجان، ایران
 *نویسنده مسئول: تلفاکس: ۰۲۱-۸۸۰۳۹۸۸۳ E-mail: rmirnejad@yahoo.com

چکیده

مقدمه و هدف: پروستاتیت از بیماری های نسبتاً شایع ارولوژی در بیماران مسن می باشد. درمان این بیماری مشکل است و اغلب به خاطر عودهای مکرر آن مشکلات پیچیده ای را برای بیمار و پزشک معالج به دنبال دارد. تشخیص مخازن بیماری و همچنین تعیین میزان شیوع سویه خاص در انسان در شناسایی جنبه های اپیدمیولوژیک بیماری و ارائه برنامه کنترل اهمیت زیادی دارد. این مطالعه با هدف تعیین میزان شیوع مایکوپلازما ژنیتالیوم با تکنیک PCR در بیماران مبتلا به پروستاتیت انجام گرفت.

روش کار: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، ۲۰۰ نمونه پارافینه پروستات که توسط متخصص پاتولوژی از بیماران دچار پروستاتیت که به بیمارستان های سطح تهران، در طی سال های ۸۷ تا ۹۰ مراجعه کرده بودند تهیه و به آزمایشگاه ارسال گردید. در آزمایشگاه پس از برش بافتها و استخراج ژنوم، با استفاده از پرایمر اختصاصی مایکوپلازما ژنیتالیوم برای تکثیر نواحی 465 bp ژن 16S، واکنش PCR انجام شد. بعد از انجام PCR و سکانس کردن، نمونه های مثبت تحت اثر آنزیم های محدودالانر (EcoRI، BbsI، AluI، TaqI) قرار گرفتند.

یافته ها: ۴ نمونه از ۲۰۰ نمونه دارای قطعه مورد نظر بوده و در PCR مثبت شدند که هر چهار نمونه بعد از برش آنزیمی و تعیین توالی مشخص شد که از نوع مایکوپلازما ژنیتالیوم تیپ G₃₇ می باشند.

نتیجه گیری: وجود ژنوم مایکوپلازما در نمونه های بافتی پروستات نشان می دهد که این میکروارگانیسم می تواند یکی از عوامل ایجاد کننده پروستاتیت در مردان باشد. هر چند که برای اثبات دقیق این موضوع نیازمند مطالعات وسیع تر و با داشتن گروه های کنترلی می باشد.

دریافت: ۹۰/۹/۲۴

پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۲

مقدمه

پروستاتیت از بیماری های نسبتاً شایع ارولوژی می باشد. این بیماری شایع ترین بیماری در مردان کمتر از ۵۰ سال و سومین بیماری در مردان بالای ۵۰ سال بعد از هیپرپلازی خوش خیم پروستات (BPH)^۱ و کانسر پروستات است [۱]. تخمین زده شده که نیمی از مردان در طول زندگی خود از علائم

پروستاتیت رنج می برند و تحت درمان قرار می گیرند [۲]. انسداد آناتومیک یا نوروفیزیولوژیک مجاری ادراری باعث اختلال جریان ادراری و باعث بروز سندرم پروستاتیت می شود و از طرفی ریفلاکس ادرار یا احتمالاً ورود باکتری به داخل مجاری پروستات مهمترین مکانیسم بروز پروستاتیت است [۳].

مطالعات مختلف نشان داده که عوامل باکتریایی مختلفی در ایجاد این عفونت نقش دارند و در این

^۱ Benign prostatic hyperplasia

بین نقش باکتری های گرم منفی بیشتر مشخص شده است. هم چنین در سالهای اخیر مطالعاتی در خصوص نقش مایکوپلازما ژنیالیوم انجام شده و مشخص گردیده که این عامل علاوه بر ایجاد بیماریهای مانند، اورتریت، اندومتريت، سرویسیت در ایجاد پروستاتیت نیز نقش دارد، ولی بدلیل اینکه تشخیص این عامل در آزمایشگاههای بالینی مشکل می باشد تاکنون نقش آن ها در هاله ای از ابهام باقی مانده است [۷-۳].

در حال حاضر استانداردهای تشخیص این عامل عفونی در آزمایشگاهها کشت و روشهای سرولوژی می باشد. این روش ها علاوه بر سرعت و حساسیت پایینی که دارند، دارای معایبی همچون کسب نتایج پس از ۲-۳ هفته و ایجاد واکنش های متقاطع با سایر میکروبها به خصوص با سایر مایکوپلازماها را نیز دارند [۸،۹]. به همین دلیل امروزه از تکنیکهای آمپلی- فیکاسیون اسید نوکلئیک (مانند PCR) بجای روش های کشت و سرولوژی برای جداسازی آن از نمونه های کلینیکی استفاده می گردد [۱۰]. لذا این مطالعه با هدف شناسائی مایکوپلازما ژنیالیوم با روش مولکولی PCR در نمونه های پارافینه شده بیماران مبتلا به پروستاتیت طراحی گردید.

روش کار

در این مطالعه ۲۰۰ نمونه بافت پارافینه که پس از جراحی توسط متخصص پاتولوژی از بیماران دچار پروستاتیت که به بیمارستان های سطح تهران در طی سال های ۸۷ تا ۹۰ مراجعه کرده بودند تهیه و به آزمایشگاه ارسال گردید. لازم بذکر است که تنها از افرادی که توسط متخصص معاینه و مبتلا به پروستاتیت بودند نمونه برداری انجام می شد.

آماده سازی نمونه و انجام PCR:

در آزمایشگاه با استفاده از میکروتوم و با تیغ های یکبار مصرف برش های ۱۰-۵ میکرونی از قالب های پارافینه تهیه و به داخل میکروتیوپ های استریل انتقال

داده شد. استخراج DNA از نمونه ها با استفاده از کیت مخصوص بافت پارافینه ساخت شرکت QIA Gen انجام شد.

واکنش PCR در حجم نهائی $30 \mu\text{L}$ در نظر گرفته شد. هر نمونه شامل: $15 \mu\text{L}$ Master mix 2X (ساخته کمپانی Ampliqon III کشور دانمارک) حاوی 1.5 mM MgCl_2 ، $1 \mu\text{g}$ DNA الگو، 20 pmol از هر پرایمر R، F، آنزیم Taq پلی مرز و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم $30 \mu\text{L}$ بود. پرایمرهای مورد استفاده که در آزمایشگاه ما طراحی گردید از ژن 16S rRNA انتخاب شدند و توسط شرکت سیناکلون سنتز شد عبارت بود از:

UuF 5-TGG AGT TAA GTC GTA ACA AG-3'
UuR 5-CTG AGA TGT TTC ACT TCA CC-3'

فرایند PCR در دستگاه ترموسایکلر شامل ۵ دقیقه ۹۵ درجه سلسیوس، به دنبال آن ۳۰ سیکل، ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۶۰ ثانیه در ۵۶ درجه سلسیوس مرحله اتصال پرایمر و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام گرفت.

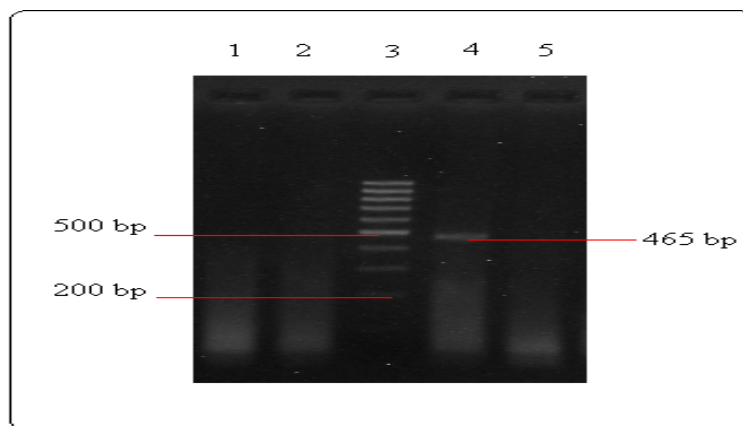
برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی DNA با رنگ اتیدیوم برماید استفاده گردید. ژلها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱) و در نهایت محصول PCR بدست آمده (قطعه ۴۶۵ bp) مایکوپلازما ژنیالیوم جهت تأیید تعیین توالی شد. هم چنین در نهایت با استفاده از روش های آمارتوصیفی نتایج آنالیز گردیدند.

انجام برش آنزیمی یا PCR-RFLP:

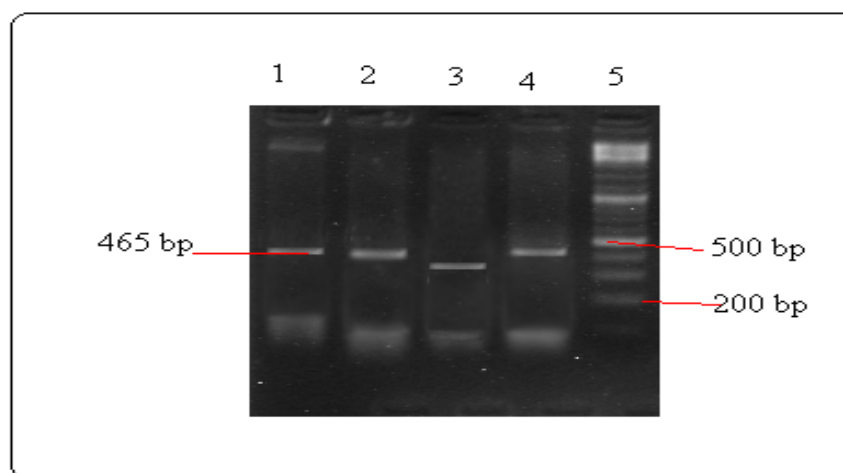
بعد از دریافت سکانس DNA آمپلی فای مایکوپلازما ژنیالیوم، با استفاده از برنامه BLAST ژنوتیپ آن با توالی ژنوم سکانس شده Algin شدند. سکانس مورد مطالعه به نرم افزار Web Cutter داده شد و لیست آنزیمها علاوه محل اثر آنزیمهای محدودالثر مختلف به دست آمد. در این مطالعه برای انجام PCR-RFLP محصولات PCR بدست

مایکروتیوپ های حاوی تمام آنزیم ها به جز آنزیم Taq I در بن‌ماری ۳۷ درجه سلسیوس و مایکروتیوپ حاوی آنزیم Taq I در ترموسایکلر در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. بعد از ۲ ساعت محصول RFLP روی ژل آگارز ۳٪ همراه با مارکر و محصول PCR بدون آنزیم محدود الاثر Taq I الکتروفورز گردیدند (شکل ۲).

آمده از مایکوپلازما ژنیتالیوم تحت اثر آنزیم های محدود الاثر *Cac8I*, *BbsI*, *EcoRI*, *AluI*, *TaqI* قرار گرفتند. برای انجام برش آنزیمی، ابتدا واکنش ۱۵ μL زیر برای نمونه هائی که مثبت شده بودند تهیه شدند: ۶/۳ μL آب مقطر استریل، ۱/۵ μL بافر آنزیم، ۰/۲ μL آنزیم محدود الاثر، ۷ μL محصول PCR. بعد از تهیه واکنش های فوق به طور جداگانه،



شکل ۱. تصویر ژل الکتروفورز مایکوپلازما ژنیتالیوم. نمونه ۴ از نظر مایکوپلازما ژنیتالیوم مثبت می باشد. ردیف ۳ مارکر (100bp DNA ladder, SM#333). بقیه نمونه ها از نظر مایکوپلازما ژنیتالیوم منفی می باشند.



شکل ۲. تصویر ژل الکتروفورز برش آنزیمی مایکوپلازما ژنیتالیوم. ردیف های ۱ و ۲ نشان دهنده محصول PCR مثبت مایکوپلازما ژنیتالیوم که با آنزیم های TaqI و آنزیم *BbsI* برش نخوردند. ردیف ۳ محصول هضم آنزیمی محصول PCR مثبت مایکوپلازما ژنیتالیوم که با آنزیم اختصاصی خود یعنی *Cac8I* برش خورده و دو قطعه ۳۹۲ bp و ۷۲bp ایجاد شده است. ردیف ۴ محصول PCR مثبت مایکوپلازما ژنیتالیوم که تحت برش آنزیمی قرار نگرفته و به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. ردیف ۵ مارکر (100bp DNA ladder, SM#333).

آزمون آماری

اطلاعات جمع آوری شده برای تعیین تعداد نمونه مثبت و منفی ارزیابی شدند. سپس با استفاده از آزمون های توصیفی این نتایج آنالیز گردیدند و اطلاعات بصورت تعداد (درصد) بیان شدند.

یافته ها

از ۲۰۰ نمونه بافت پارافینه افراد مبتلا به پروستاتیت، DNA استخراج شده، بعد از PCR، ۴ نمونه PCR مثبت بودند. که نتایج PCR-RFLP نشان داد پس از برش آنزیمی محصول PCR نمونه های بالینی مثبت، در الگوهای برش آنزیمی بدست آمده تفاوتی وجود نداشت و همگی دارای یک الگو بودند، لذا نتایج PCR-RFLP علاوه بر تأیید نتیجه PCR به همراه نتایج سکانسینگ نشان داد که در بین ۴ نمونه مایکوپلازما ژنیتالیوم هتروژنیسیته ژنتیکی وجود ندارد و عفونت ها در افراد مختلف می تواند ناشی از یک سویه مایکوپلازما ژنیتالیوم G37 باشند. لازم بذکر است که سکانس به دست آمده محصول PCR با سکانس ژنوم سویه مایکوپلازما ژنیتالیوم G37 (به عنوان سکانس پروتایپ رفرانس) یکسان می باشند، لذا می توان گفت که گونه شایع مایکوپلازما ژنیتالیوم G37 می باشد.

بحث

در مطالعه حاضر مایکوپلازما ژنیتالیوم از نمونه های تهیه شده از مردان مبتلا به پروستاتیت ایزوله شد که این برخلاف مطالعه ای که آقای Lee و همکارانش انجام دادند و از نمونه های پروستات هیچ موردی از مایکوپلازما ژنیتالیوم ایزوله نکرده بودند، بود. این اختلاف می تواند ناشی از نوع مطالعه، جمعیت مورد مطالعه، تعداد نمونه، روش نمونه گیری، سن بیماران، نژاد، فرهنگ، منطقه جغرافیایی و روش آزمایشگاهی (کشت و نوع PCR) باشد. برای مثال نمونه مورد بررسی آنها ادرار بود که در مطالعه حاضر نمونه

های مورد بررسی قالب های پارافینه نسج پروستات بود [۱۱].

در مطالعه ای که توسط Kim و همکاران با عنوان شناسایی ارگانیسم های ناشناخته در بیماران مبتلا به پروستاتیت با روش Multiplex PCR انجام شد از ۹۲ نمونه ادرار و ترشحات پروستات، ۴ نمونه مایکوپلازما ژنیتالیوم از این افراد جدا شد که این نتیجه مشابه مطالعه حاضر بود و نشان داد که مایکوپلازما ژنیتالیوم را می توان یک عامل موثر در پروستاتیت در نظر گرفت [۱۲].

در مطالعه حاضر برخلاف مطالعه ای که آقای Krienger و همکاران انجام دادند، از ۱۳۵ نمونه، ۴ مورد مایکوپلازما ژنیتالیوم از نمونه های تهیه شده از مردان مبتلا به پروستاتیت ایزوله شد که این تفاوت می تواند ناشی از تعداد نمونه مورد بررسی و شرایط و نوع PCR آن ها باشد [۱۳].

مطالعه حاضر تطابق نسبی با مطالعات مختلفی که در ارتباط با بررسی میزان جداسازی مایکوپلازما ژنیتالیوم در نقاط مختلف دنیا انجام گرفته است، دارد و لازم به ذکر است که تفاوت های مشاهده شده ممکن است ناشی از نوع نمونه گیری باشد، به این علت که در مطالعه حاضر از نمونه های بلوک های پارافینه شده پروستات استفاده شد. لازم به ذکر است که در کشور ما در مورد میزان جداسازی مایکوپلازما ژنیتالیوم از نمونه های کلینیکی مطالعه کمی انجام شده است [۱۴، ۱۵].

مشابه این مطالعه و بررسی با این آنزیم مطالعه ای صورت نگرفته، ولی سایر مطالعات که براساس برش آنزیمی ژن های دیگر به خصوص P110/MG192 انجام شده نشان می دهد که هتروژنیسیته در لوکوس سکانس P110/MG192 مشاهده می شود و چون بعد از برش آنزیمی، الگوهای متفاوتی ایجاد می گردد و هتروژنیسیته ژنتیکی وجود دارد، عفونت نمی تواند ناشی از انتشار یک سویه تکی باشد [۱۶].

مطالعه حاضر از نظر به دست آوردن یک تیپ در بین نمونه های کلینیکی مشابه مطالعه Hjorth و همکاران می باشد که سوش های کلینیکی مورد بررسی آن ها فاقد برش آنزیم مورد استفاده بوده و همگی از یک تیپ بودند [۱۷].

نتیجه گیری

به طور کلی می توان گفت که مایکوپلازما ژنیتالایوم می تواند یکی از عوامل احتمالی پروستاتیت باشد و سنجش PCR بر مبنای سکانس های ژن 16S rRNA یک تکنیک ارزشمند و قابل اعتماد جهت شناسایی مایکوپلازما ژنیتالایوم در بیماری پروستاتیت می باشد. از طرفی مطالعه حاضر نشان داد که تمامی ایزوله های مایکوپلازما ژنیتالایوم یکسان بودند و تفاوتی در الگوهای آنزیمی این باکتری بعد از PCR-RFLP مشاهده نشد و همگی از نوع مایکوپلازما

ژنیتالایوم G37 بودند. لازم بذکر است که با توجه به محدودیت های موجود در اجرای این مطالعه، مانند تهیه بافت پارافینه و بررسی عوامل میکروبی مختلف با توجه به بودجه ناکافی، عوامل میکروبی دیگر که امکان دارند در ایجاد پروستاتیت نقش داشته باشند مورد بررسی قرار نگرفتند که پیشنهاد می شود محققان دیگر این کار را انجام دهند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم دانشگاه علوم پزشکی تهران و کارکنان محترم گروه میکروب شناسی که ما را در اجرای این مطالعه یاری نمودند تشکر می نمایم. در ضمن از خانم دکتر میرکلانتری و آقای دکتر احمدی به خاطر زحمات بی دریغشان سپاس گزاریم.

References

- 1- Murphy AB, Macejko A, Taylor A, Nadler RB. Chronic prostatitis: management strategies. *Drugs*. 2009; 69(1):71-84.
- 2- Nickel JC. Treatment of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31(Suppl 1):S112-6.
- 3- Xia SJ, Cui D, Jiang Q. An overview of prostate diseases and their characteristics specific to Asian men. *Asian J Androl*. 2012; 14(3):458-64.
- 4- McGowin CL, Anderson-Smits C. *Mycoplasma genitalium*: an emerging cause of sexually transmitted disease in women. *PLoS Pathog*. 2011; 7(5): e1001324.
- 5- Jensen JS. *Mycoplasma genitalium*: the aetiological agent of urethritis and other sexually transmitted diseases. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2004; 18(1):1-11.
- 6- Ishihara S, Yasuda M, Ito S, Maeda S, Deguchi T. *Mycoplasma genitalium* urethritis in men. *Int J Antimicrob Agents*. 2004; 24(Suppl 1):S23-7.
- 7- Uusküla A, Kohl PK. Genital mycoplasmas, including *Mycoplasma genitalium*, as sexually transmitted agents. *Int J STD AIDS*. 2002; 13(2):79-85.
- 8- Baseman JB, Cagle M, Korte JE, Herrera C, Rasmussen WG, Baseman JG. Diagnostic assessment of *Mycoplasma genitalium* in culture-positive women. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(1): 203-11.
- 9- Sung H, Kang SH, Bae YJ, Hong JT, Chung YB, Lee CK, et al. PCR-based detection of *Mycoplasma* species. *J Microbiol*. 2006; 44(1):42-49.
- 10- Jensen JS, Borre MB, Dohn B. Detection of *Mycoplasma genitalium* by PCR amplification of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol*. 2003; 41(1): 261-66.
- 11- Lee SR, Chung JM, Kim YG. Rapid One Step Detection of Pathogenic Bacteria in Urine with Sexually Transmitted Disease (STD) and Prostatitis Patient by Multiplex PCR Assay (m PCR). *J Microbiol*. 2007; 45(5):453-9.

- 12- Kim TH, Kim HR, Lee MK, Myung SC, Kim YS. Detection of Cryptic Microorganisms in Patients with Chronic Prostatitis by Multiplex Polymerase Chain Reaction. Korean J Urol. 2007; 48(3):304-309.
- 13- Krieger JN, Riley DE. Prostatitis: what is the role of infection. Int J Antimicrob Agents. 2002; 19(6):475-9.
- 14- Vatani Sh, Ghazi Saeidi K, Mohammadi M, Naji AR, Fatemi Nasab F, Zeraati H, et al. The survey of contamination with genital Mycoplasma in women with bacterial vaginosis by PCR method. Journal of Gorgan University of medical sciences. 2006; 8(17): 45-50. (Full text in Persian)
- 15- Amirmozafari N, Mirnejad R, Kazemi B, Sariri E, Bojari MR, Dehdar Darkahi F. Simultaneous Detection of Genital Mycoplasma in Women with genital infections by PCR. Journal of Biological Science; 2009, 9(8):804-09.
- 16- Musatovova O, Herrera C, Baseman JB. Proximal region of the gene encoding cytoadherence-related protein permits molecular typing of *Mycoplasma genitalium* clinical strains by PCR-restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol. 2006; 44(2):598-603.
- 17- Hjorth SV, Björnelius E, Lidbrink P. Sequence-based typing of *Mycoplasma genitalium* reveals sexual transmission. J Clin Microbiol. 2006; 44(6):2078-83.