Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol.13, No.1, Spring 2013, Pages 86-92

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

Irajian GR[1], Mirnejad R*[2], Jalali Nodoshan MR[3], Ghorbanpour N[4]

[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. gentialium*. 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*:* Prostatits; *Mycoplasma genitalium*; PCR-RFLP;16S rRNA

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

تعیین میزان شیوع *مایکوپلاسما 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[٤]

[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
[٤]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 *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* با تکنیک PCR در بیماران مبتلا به پروستاتیت انجام گرفت.

روش کار: دراین 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 ازپرایمر اختصاصی *مایکوپلاسما 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 محدودالاثر (TaqI، AluI ، EcoRI، BbsI،Cac8I) قرار گرفتند.

یافته ها: ٤ 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 *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* تیپ G_{37} می باشند.

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

دریافت: ۹۰/۹/۲٤ **پذیرش:** ۹۱/۱۰/۱۲

مقدمه

پروستاتیت از بیماری‌های 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)[1] وکانسر پروستات است[۱]. تخمین زده شده که نیمی از مردان در طول زندگی خود از علائم پروستاتیت رنج می‌برند 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

[1] Benign prostatic hyperplasia

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

بین نقش باکتری های گرم منفی بیشتر مشخص شده است. هم چنین در سالهای اخیر مطالعاتی در خصوص نقش *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* انجام شده و مشخص گردیده که این عامل علاوه بر ایجاد بیماریهائی مانند، اورتریت، اندومتریت، 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 [۳-۷].

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 ۳-۲ هفته و ایجاد واکنش های متقاطع با سایر میکروبها به خصوص با سایر مایکوپلاسماها 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 می‌گردد [۱۰]. لذا این مطالعه با هدف شناسائی مایکوپلاسما ژنیتالیوم 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 میکروتیوپ‌های استریل انتقال داده شد. استخراج DNA از نمونه ها با استفاده از کیت مخصوص بافت پارافینه ساخت شرکت QIA Geen انجام شد.

واکنش PCR در حجم نهائی ۳۰µL در نظر گرفته شد. هر نمونه شامل: ۱۵µL 2X Master mix (ساخته کمپانی Ampliqon III کشور دانمارک) حاوی $MgCl_2$ 1.5mM ، DNA ۱ µgr الگو، ۲۰pmol از هر پرایمر R,F ، آنزیم Taq پلی مراز و آب مقطر دوبار تقطیر استریل تا حجم۳۰ µL 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 ۹٤ 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.

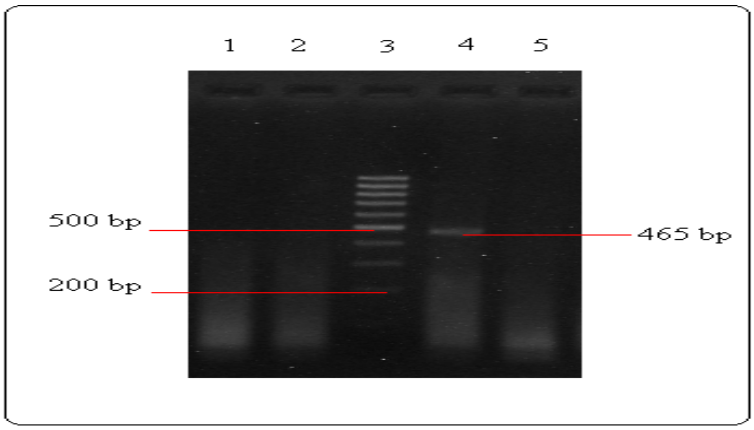
برای بررسی محصولات PCR از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ و رنگ آمیزی DNA با رنگ اتیدیوم برماید استفاده گردید. ژلها با استفاده از دستگاه Gel Documentation مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱) و در نهایت محصول PCR بدست آمده (قطعه ٤۶۵ bp) مایکوپلاسما ژنیتالیوم جهت تأیید تعیین توالی شد. هم چنین در نهایت با استفاده از روش های آمارتوصیفی نتایج آنالیز گردیدند.

انجام برش آنزیمی یا PCR-RFLP :

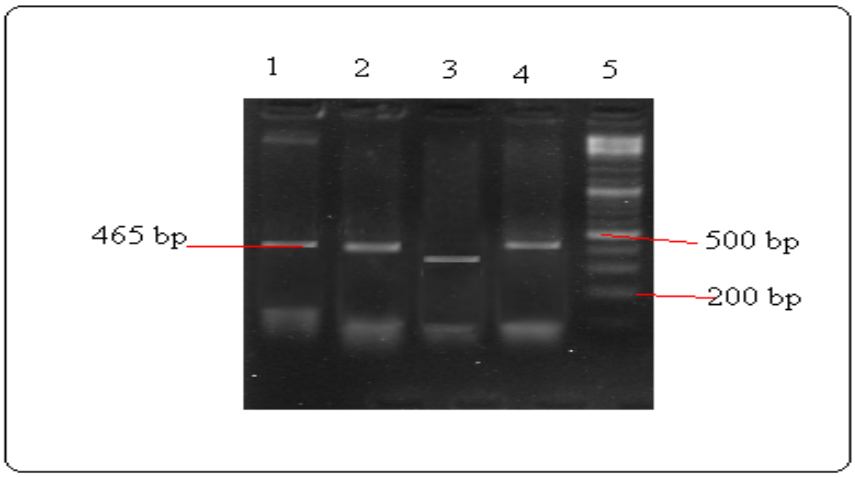
بعد از دریافت سکانس DNA آمپلی فای *مایکوپلاسما ژنیتالیوم*، با استفاده از برنامه BLAST ژنوتیپ آن با توالی ژنوم سکانس شده Algin شدند. سکانس مورد مطالعه به نرم افزار Web Cutter داده شد و لیست آنزیم‌ها بعلاوه محل اثر آنزیم‌های محدودالاثر مختلف به دست آمد. در این مطالعه برای انجام PCR-RFLP محصولات PCR بدست

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

آمده از *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* تحت اثر آنزیم های محدودالاثر *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 محدودالاثر، ۷µL محصول PCR. بعد از تهیه واکنش های فوق به طور جداگانه، میکروتیوپ های حاوی تمام آنزیم ها به جز آنزیم Taq I در بن‌ماری ۳۷ درجه سلسیوس و میکروتیوپ 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 (شکل۲).



شکل ۱. تصویر ژل الکترفورز *مایکوپلاسما ژنیتالیوم*.نمونه ٤ از نظر *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* مثبت می باشد. ردیف ۳ مارکر (100bp DNA ladder, SM#333). بقیه نمونه ها از نظر *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* منفی می باشند.



شکل ۲. تصویر ژل الکترفورز برش آنزیمی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم*. ردیف های ۱ و۲ نشان دهنده محصول PCR مثبت مایکوپلاسما ژنیتالیوم که با آنزیم های TaqI و آنزیم BbsI برش نخوردند. ردیف ۳ محصول هضم آنزیمی محصول PCR مثبت *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* که با آنزیم اختصاصی خود یعنی Cac8I برش خورده و دو قطعه ۳۹۲ bp و ۷۲bp ایجاد شده است. ردیف ٤ محصول PCRمثبت *مایکوپلاسما 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

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

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، ٤ 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 ٤ نمونه *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* هتروژنیسیتی ژنتیکی وجود ندارد و عفونت ها در افراد مختلف می تواند ناشی از یک سویه *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* G37 باشند. لازم بذکر است که سکانس به دست آمده محصول PCR با سکانس ژنوم سویه *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* G37 (به عنوان سکانس پروتایپ رفرانس)یکسان می باشند، لذا می توان گفت که گونه شایع *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* G37 می باشد.

بحث

در مطالعه حاضر *مایکوپلاسما 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 *مایکوپلاسما 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، ٤ نمونه *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* از این افراد جدا شد که این نتیجه مشابه مطالعه حاضر بود و نشان داد که *مایکوپلاسما 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، ٤ مورد *مایکوپلاسما 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 *مایکوپلاسما 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 *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* از نمونه های کلینیکی مطالعه کمی انجام شده است [۱٤،۱۵].

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

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

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 *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* می تواند یکی از عوامل احتمالی پروستاتیت باشد و سنجش PCR برمبنای سکانس های ژن 16S rRNA یک تکنیک ارزشمند و قابل اعتماد جهت شناسایی *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* در بیماری پروستاتیت می باشد. از طرفی مطالعه حاضر نشان داد که تمامی ایزوله های *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* یکسان بودند و تفاوتی در الگوهای آنزیمی این باکتری بعد از PCR-RFLP مشاهده نشد و همگی از نوع *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* 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 می‌شود محققان دیگر این کار را انجام دهند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله ازمعاونت محترم دانشگاه علوم پزشکی تهران و کارکنان محترم گروه میکروب شناسی که ما را در اجرای این مطالعه یاری نمودند تشکر می نماید. 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.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]

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 cytadherence-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.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-04-13]