مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره۵، مرداد ۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۱۲)

شناسایی مولکولی مایکوپلاسما پنومونیه با استفاده از ژن P1 در بیماران مبتلا به سندرم انسدادی مزمن ریوی

سحرناز امیریان، کیومرث امینی*، مهدی پرویز

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد ساوه ، ساوه، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۱۲/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۳

چکیده

مقدمه و هدف: بیماری‌های انسداد مزمن ریه(COPD) یک بیماری مزمن ریوی است که مشخصه آن انسداد پیشرونده مجاری تنفسی به صورت برگشت‌ناپذیر است که به سه صورت آمفیزم، برونشیت مزمن و بیماری راه‌های هوایی کوچک رخ می‌دهد. مایکوپلاسما پنومونیه عامل گرفتاری‌های تنفسی از قبیل؛ گلودرد، فارنژیت، تراکئوبرونشیت و سایر عفونت‌های تنفسی به ویژه در افراد با انسداد مزمن ریه مطرح می‌باشد. روش‌های متداول در تشخیص مایکوپلاسما پنومونیه دارای محدودیت‌هایی است، بنابراین به کاربردن یک روش حساس و قابل اطمینان لازم است، لذا هدف این مطالعه تشخیص مایکوپلاسما پنومونیه در ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به COPD به روش PCR بود.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی- مقطعی تعداد ۱۲۰نمونه از ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به COPD (عفونت‌های مزمن ریوی) طی یک سال(۱۳۹۴-۱۳۹۳) جمع‌آوری گردید. پس از استخراج ژنوم، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز(PCR) شناسایی باکتری انجام شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آماری آنالیز آماری تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: بیشترین فراوانی عفونت تنفسی مایکوپلاسما پنومونیه در گروه سنی ۴-۲۱ سال و کمترین فراوانی در گروه سنی ۰ تا ۳ سال بود. نتایج نشان داد که از ۱۲۰ نمونه جمع‌آوری شده ۸ نمونه(۶/۶ درصد) از نظر مایکوپلاسما پنومونیه مثبت بودند و ژن P1 را حمل می‌کردند. این نتایج نشان داد که مایکوپلاسما پنومونیه در بیماران مبتلا به سندرم انسدادی مزمن ریوی وجود دارد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد، مایکوپلاسما پنومونیه می‌تواند یکی از عوامل احتمالی ایجاد COPD باشد. هم‌چنین روش مولکولی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قادر است مایکوپلاسما پنومونیه را در ترشحات تنفسی شناسایی نماید. این نتایج ممکن است درمان اختصاصی بخشی از بیماران با علایم COPD را تسهیل نماید.

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

* **نویسنده مسئول:** کیومرث امینی، ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد ساوه، گروه میکروبیولوژی

Email:dr_kumarss_amini@yahoo.com

مقدمه

عفونت‌های مزمن مجاری تنفسی در بسیاری موارد با عوارضی مانند؛ فیبروز کیستیک، آسم و آلرژی همراه است. در تمام این موارد، عوامل محرک محیطی مانند عفونت‌ها، عوامل التهابی مانند سینوزیت و اختلالات متابولیک، زمینه ساز بروز این مشکلات بوده که در حدود ۱ تا ۴ درصد مردم مبتلا به آن هستند. بیماری مزمن انسدادی ریه[۱] که هم‌چنین به نام‌های دیگری هم‌چون بیماری مزمن انسدادی شش[۲] و بیماری مزمن انسدادی مسیر هوایی[۳] معروف است، نوعی بیماری انسدادی ریوی است که با محدود بودن علامت مسیر هوایی به صورت مزمن شناسایی می‌شود. این بیماری به مرور زمان بدتر می‌شود. اصلی‌ترین نشانه‌های این بیماری شامل مواردی هم‌چون تنگی نفس، سرفه و ایجاد خلط سینه است(۱). بیشتر افرادی که "برونشیت مزمن" دارند، به COPD مبتلا می‌شوند. عفونت‌های مزمن مجاری تنفسی فوقانی، از زمره علل مهم تلقی شده و از این میان میکروب‌هایی مانند مایکوپلاسماها، مؤثر است. مایکوپلاسماها ریزترین و ساده‌ترین اجرام آزادزی شناخته شده می‌باشند. این باکتری‌ها احتمالاً از باکتری‌های گرم مثبت منشأ گرفته و از نظر فیلوژنی با کلستریدیم‌ها ارتباط دارند. ژنوم آن ها کوچک بوده و از یک مولکول اسید دی‌اکسی‌ریبونوکلئیک دو رشته‌ای حلقوی تشکیل شده است که حاوی ۵۰۰ تا ۱۰۰۰ ژن می‌باشد (۲). مایکوپلاسما پنومونیه برخلاف بقیه گونه‌های مایکوپلاسما، به عنوان بخشی از فلور طبیعی حضور ندارد و از میان ده گونه انسانی پذیرفته شده جنس مایکوپلاسما، فقط این گونه به‌طور آشکار در بروز بیماری اثبات شده است. این باکتری یکی از عوامل عفونت بخش فوقانی و تحتانی تنفسی در انسان بوده و تصویر بالینی آن به صورت تراکئو برونشیت کند پیشرونده، همراه با بی‌قراری و سرفه‌های خشک است(۴ و۳) طیف بیماری‌زایی این باکتری از شکل‌های ملایم فارنژیت و تراکئو برونشیت تا موارد پنومونی حاد را شامل می‌شود(۵). طیف گسترده‌ای از تظاهرات خارج تنفسی مانند عوارض هماتولوژیک، گوارشی، کلیوی، عضلانی ـ اسکلتی، قلبی ـ عروقی، ایمونولوژیک، درماتولوژیک و نورولوژیک در ارتباط با این باکتری گزارش شده است(۶). در حال حاضر کشت، روش‌های تشخیص سرولوژیک و تکنیک‌های تکثیر اسید نوکلئیک، سه روش قابل دسترس برای تشخیص روتین عفونت‌های مایکوپلاسما پنومونیه محسوب می‌شوند. اصولاً روش‌های مبتنی بر کشت، تکنیک‌های وقت‌گیر با حساسیت نسبتاً پایین و نیازمند امکانات و نیز تجربه کافی جهت تفسیر نتایج هستند(۷). امروزه روش‌های تشخیصی بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به دلیل داشتن حساسیت، ویژگی و دقت

1-Chronic obstructive pulmonary disease(COPD)
2- chronic obstructive airways disease (COAD)
3- Chronic obstructive lung disease (COLD)

بیشتر، روش‌هایی مناسب جهت تشخیص عواملی هم‌چون مایکوپلاسما پنومونیه به شمار می‌روند(۸). تشخیص آزمایشگاهی عفونت‌های مایکوپلاسماها براساستست‌های باکتریولوژیک شامل؛ مورفولوژی، خصوصیات کشت، خواص فیزیولوژی و سرولوژی می‌باشد. با وجود این که این تست‌ها هنوز بخش مهمی از تشخیص مایکوپلاسماها را تشکیل می‌دهند، ولی تست‌های جدید براساس آنالیز مولکولی DNA ژنومی، RNAهای ریبوزومی، پروتئین‌های سلولی و لیپیدها تست‌های کلاسیک را در تنگنا قرار داده و به دلیل رشد آرام و سخت‌گیر بودن گونه‌ها، استفاده از تست‌های مولکولی که به زمان کمتری جهت تشخیص نیاز دارند محبوب‌تر می‌شود(۹). ژن P1 پروتئینی با وزن مولکولی ۱۶۹ KDa را در باکتری مایکوپلاسما پنومونیه کد می‌کند که نقش مهمی را در شدت بیماری‌زایی این باکتری از جهت چسبیدن به سلول‌های هدف ایفا می‌نماید(۱۰). اگرچه ژن‌های مشابهی در سایر گونه‌های مایکوپلاسما پنومونیه مشاهده می‌شود، ولی بخش‌های به شدت ثابت موجود در توالی ژن P1 مایکوپلاسما پنومونیه، آن را از نظر طراحی پرایمرهای مخصوص گونه، جذاب نموده است(۱۱). هدف این مطالعه طراحی یک روش سریع برای شناسایی مایکوپلاسما پنومونیه در نمونه‌های بیماران و نهایتاً ارایه یک روش تشخیصی دقیق، سریع و در عین حال قابل انجام در همه مراکز تشخیصی در سطح کشور، برای تشخیص زود هنگام مایکوپلاسما پنومونیه بود.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی ـ مقطعی و طی یک بازه زمانی ۱۲ ماهه در طول سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴، تعداد ۱۲۰ نمونه از ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به COPD مشکوک به عفونت مایکوپلاسما پنومونیه زیر نظر پزشک متخصص ریه به دست آمد. تمامی افراد مراجعه کننده به مراکز درمانی شهید باهنر، افضلی پور و سیدالشهدا استان کرمان با معیار ورود حداقل ۲۴ ساعت نشانه بالینی به نفع عفونت تنفسی از قبیل؛ ضعف و بی حالی، سردرد و سرفه خشک پایدار، تب، لرز، خلط خس‌خس و یا تنگی نفس، درد عضلانی (پلورداینی) به عنوان جمعیت مورد مطالعه انتخاب شدند. معیار خروج افراد برای خروج از مطالعه شامل؛ ابتلا به آسم، آلرژی و بیماری سل بود. هم‌چنین تمامی بیمارانی که در دو هفته اخیر آنتی‌بیوتیک مصرف کرده‌اند نیز از مطالعه حذف شدند. تمامی نمونه‌های حاصل از مایع شستشوی ریه[1] در محیط PPLO Broth به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و حضور ۵ درصد CO_2 غنی‌سازی شده و سپس تشخیص مستقیم (Direct Detection) بر اساس آزمایش تکثیر اسید نوکلئیک (PCR) انجام گردید. استخراج ژنوم از ترشحات تنفسی با استفاده از کیت

1- Bronchoalveolar Lavage-BAL

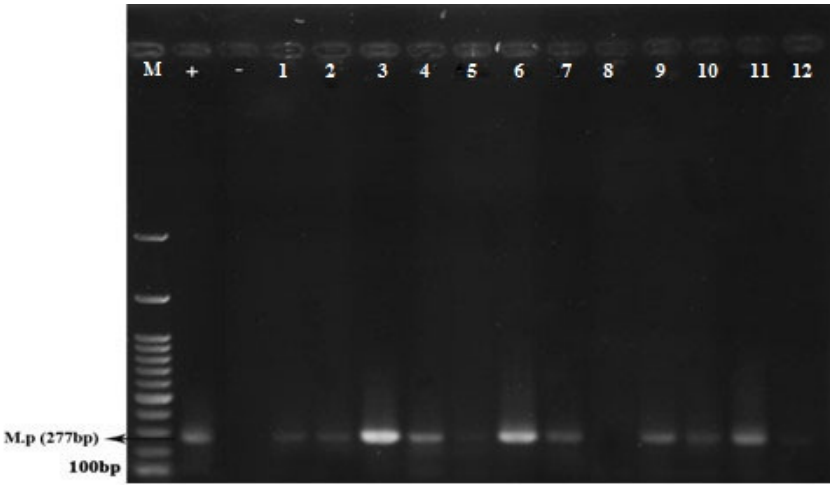
استخراج DNG-Plus (سیناژن)، داکسی ریبونوکلئیک اسید[1] انجام و نمونه‌ها تحت بررسی‌های مولکولی قرار گرفتند. برای این منظور واکنش PCR استاندارد با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن P1 شامل؛ P_1A: F: 5□-AGGCTCAGGTCAATCTGGCGTGGA-3□ و P_1B:R:5□-GGATCAAACAGATCGGTGACTGGGT-3□ انجام گردید(۱۲). جهت تأیید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad, USA) و OD260/280nm استفاده گردید. در نهایت، واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۶/۲ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی (۰/۰۵ واحدآنزیم (U/µl)) Taq DNA polymerase، (۳ میلی مول بر لیتر $MgCl_2$) و (۰/۴ میلی مول بر لیتر dNTPs)، ۰/۷ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها(جلویی(F) و برگشتی(R)) به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۰/۷ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۰/۳ میکرولیتر آب دیونیزه استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر(اپندورف، آلمان) برای ۳۰ سیکل به صورت زیر انجام گرفت، مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ثانیه. در پایان، محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید(۰/۵میکروگرم بر میلی لیتر) در مقایسه با سویه استاندارد مایکوپلاسما پنومونیه ATCC 15531 از کلکسیون میکروبی دانشگاه علوم پزشکی ایران الکتروفورز گردید.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری آنالیز آماری تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این مطالعه ۴۸/۹ درصد بیماران مرد و ۵۰/۱ درصد زن بودند و هیچ تفاوت معنی‌داری از نظر جنسیت وجود نداشت($p=۰/۷$). محدوده سنی بیماران حداقل ۶ ماه و حداکثر ۶۱ سال و میانگین سنی بیماران۲/۲±۲۵ سال بود. بیشترین فراوانی عفونت تنفسی مایکوپلاسما پنومونیه در گروه سنی۴-۲۱ سال و کمترین فراوانی در گروه سنی ۰ تا ۳ سال بود. ۵۹ درصد بیماران سرپایی (outpatients) و ۴۱ درصد (hospitalized) آنها بستری بودند. فراوانی مایکوپلاسما پنومونیه در گروه سنی صفر تا ۳ سال(۱/۱۹ درصد)، گروه سنی ۴ تا ۲۱ سال(۱۳/۱۸ درصد) و گروه سنی ۲۱ تا ۶۱ سال(۸/۰۸ درصد) بود. نتایج مطالعه حاضر مشخص کرد که از ۱۲۰ نمونه جمع‌آوری شده ۸ نمونه(۶/۶ درصد) از نظر مایکوپلاسما پنومونیه مثبت بودند و ژن P1 را حمل می‌کردند. این نتایج نشان داد که مایکوپلاسما پنومونیه در بیماران مبتلا به سندرم انسدادی مزمن ریوی وجود دارد(شکل ۱).

1- Deoxyribonucleic acid (DNA)



شکل ۱: الکتروفورز ژل آگارز محصولات PCR نمونه های بیماران با استفاده از پرایمر مایکوپلاسما. ستون M: سایز مارکر، +C (مایکوپلاسما پنومونیه)، -C (سالمونلا)، ستون ۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱: نمونه های بیماران که PCR آن ها مثبت شده است، ستون ۵، ۸ و ۱۲: نمونه های بیماران که PCR آن ها منفی شده است.

بحث

یکی از عواملی که موجب کاهش مورتالیتی، موربیدیتی و نیز کاهش هزینه‌های بیماری‌های عفونی می‌گردد، تشخیص سریع و دقیق می‌باشد. روش‌های سنتی مبتنی بر کشت گرچه در مواردی هنوز به عنوان استاندارد طلایی مطرح است، ولی عموماً ویژگی‌های یک روش مطلوب در شناسایی میکروارگانیسم‌ها و از جمله مایکوپلاسما پنومونیه را ندارند(۱۴ و ۳۴). تحقیق حاضر به منظور طراحی روش مولکولی دقیق و سریع جهت تشخیص مایکوپلاسما پنومونیه در ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به سندرم انسداد مزمن ریوی طراحی و اجرا گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد با پرایمر طراحی شده در آن می‌توان وجود مایکوپلاسما پنومونیه را در ترشحات تنفسی برخی از بیماران نشان داد. چنانچه بررسی مولکولی ۱۲۰ نمونه ترشحات تنفسی بیماران مبتلا به سندرم انسدادی مزمن ریوی ۹۶ مورد(۸۰ درصد) وجود ژن گونه مایکوپلاسما پنومونیه را نشان داد که این امر حکایت از آن دارد که به دلیل فراوانی گونه‌های مایکوپلاسماها روشی که از کارآیی مناسب برخوردار باشد و بتواند در واحد زمان همه گونه‌ها را ردیابی نماید الزامی‌است. در این مطالعه روش PCR بر پایه پرایمرهای مخصوص گونه مایکوپلاسما پنومونیه و

هدف ژنی P1 Cytadhesin طراحی و اجرا شده است. بر این مبنا با بررسی توالی پرایمرهای مایکوپلاسما و مقایسه آن‌ها با توالی‌های دیگر پروکاریوت‌ها، پرایمرهای P4A و P4B انتخاب شدند(۱۲). در این بررسی مناسب بودن این پرایمرها جهت تشخیص مایکوپلاسما پنومونیه در نمونه‌های بالینی ثابت گردید. شرایط بهینه شده این مطالعه صرفاً موجب تولید محصول اختصاصی با درجه بالایی از ویژگی و حساسیت و بدون هیچ محصول ناخواسته‌ای به مانند مطالعه شارما(۱۵)، و ژوو(۱۶) گردید. هندا و همکارانش نیز سه نمونه خلط، BAL و سوآپ‌های گلو را با تکنیک Capillary PCR مقایسه کرده‌اند و بالاترین جواب مثبت را با نمونه سوآپ گلو گرفته‌اند(۱۷). پرایمرهای ژن P1 Adhesion حساس تر از پرایمرهای ۱۶ S rRNA ارزیابی شده است که شاید علت این امر وجود کپی‌های متعدد ژن P1-Cytadhesin باشد. در این مطالعه هم به دلیل ویژه بودن و همین طور توالی ژن P1، از آن به عنوان هدف تکثیر استفاده گردید. نقش مایکوپلاسما پنومونیه در ایجاد بیماری‌های متعدد باعث شده است این باکتری بیش از پیش مورد توجه قرار گیرند. این در حالی است که کشت و جداسازی مایکوپلاسماها زمان‌بر پرهزینه و طاقت فرسا است. در ایران کشت و جداسازی مایکوپلاسماها از نمونه‌های بالینی با مشکلاتی همراه بوده است، لذا اغلب تحقیق‌ها بر اندازه‌گیری IgM و IgG ضد مایکوپلاسماها متمرکز شده است. چنان که بهار و همکاران با استفاده از کیت الیزا نشان دادند در سرم خون ۶۵ درصد بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس آنتی‌بادی ضدمایکوپلاسما قابل تشخیص است(۱۸) این پژوهشگران اثر واکنش‌های متقاطع و نیز مایکوپلاسماهای ساپروفیت را مد نظر قرار ندادند. در هر حال در مقایسه با سایر تحقیق‌های انجام شده در کشور روش طراحی شده در این تحقیق نتایج دقیق‌تری را ارایه داده است. زیرا درصد بالاتری از آلودگی مایکوپلاسمایی را در ترشحات تنفسی بیماران نشان داده است. در این تحقیق در مجموع ۸۰ درصد از نظر مایکوپلاسما مثبت بوده‌اند، در حالی که هادی و همکاران از نتایج ۱۰ درصدی نام برده و تنها در ۲ درصد عفونت‌های تنفسی مایکوپلاسما پنومونیه را گزارش کرده است(۱۹). نوربخش و همکاران با بررسی ۴۰ نمونه از بیماران مبتلا به آدنو تونسیلیت به روش PCR و سرولوژی نشان دادند به ترتیب با PCR حدود ۳۵ درصد و با الیزا ۲۰ درصد موارد مثبت برای مایکوپلاسما پنومونیه گزارش کردند(۲۰). بر اساس نتایج این تحقیق روش مولکولی PCR ژن‌های معرف مایکوپلاسما پنومونیه را در ترشحات تنفسی بیماران با سرعت و دقت تشخیص داده است. در نتایج تحقیق معظمی‌و 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، مطالعه‌هایی انجام شده است. برای مثال گور و همکاران(۲۲) ارتباط مایکوپلاسما پنومونیه را با بیماری مزمن ریوی نشان دادند، اما بوکولتز و همکاران(۲۳) این ارتباط را رد نمودند. گل محمدی 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 مطالعه حاضر مغایرت دارد و علت این اختلاف می‌تواند در نوع نمونه باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان گفت روش‌های کلاسیک تشخیصی، به دلایل محدودیت‌های ذاتی (صرف وقت زیاد، حساسیت کم، نیاز به مهارت و تجربه زیاد و همین طور مراحل دشوار و پرزحمت) فاقد معیارهای یک روش ایده آل جهت شناسایی مایکوپلاسما پنومونیه است، ولی روش‌های مولکولی هم چون روش‌های تکثیر اسیدنوکلئیک در شرایط آزمایشگاه به دلیل پتانسیل بالقوه و بالفعل کاربرد فراوانی در تشخیص عواملی هم چون مایکوپلاسماها دارند. نتایج این مطالعه به طور روشنی دلالت بر این نکته دارد که روش PCR قادر است در مدت زمان بسیار کوتاهی باکتری مورد نظر را شناسایی کند و این روش می‌تواند به عنوان یک تکنیک تکمیلی مفید، خصوصاً زمانی که نتایج رنگ‌آمیزی، کشت باکتری و یا سرولوژی منفی بوده به کار گرفته شود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد گرایش میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی‌واحد ساوه می‌باشد.

REFERENCES

1.Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, et al. International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. Lancet 2007; 370: 741–50.
2.Barker BL, Haldar K, Patel H, Pavord ID, Barer MR, Brightling CE, et al. Association between pathogens detected using quantitative polymerase chain reaction with airway inflammation in COPD at stable state and exacerbations. Chest 2015; 147: 46–55.
3. Marin A, Monso E, Garcia-Nunez M, Sauleda J, Noguera A, Pons J, et al. Variability and effects of bronchial colonization in patients with moderate COPD. Eur Respir J 2010; 35: 295–302.
4.Fricker M, Deane A, Hansbro PM. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. Expert Opin Drug Discov 2014; 9: 629–45.
5.Bebear C, Pereyre S, Peuchant O. *Mycoplasma pneumoniae*: susceptibility and resistance to antibiotics. Future Microbiol 2011; 6: 423–31.
6.Bebear C, Raherison C, Nacka F, Barbeyrac B, Pereyre S, Renaudin H, et al. Comparison of *Mycoplasma pneumoniae* infections in asthmatic children versus asthmatic adults. Pediatr Infect Dis J 2014; 33: e71–e5.
7.Becker A, Kannan TR, Taylor AB, Pakhomova ON, ZhangY, Somarajan SR, et al. Structure of CARDS toxin, a unique ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin from *Mycoplasma pneumoniae*. Proc Natl Acad Sci 2015; 112: 5165–170.
8.Daxboeck F, Blacky A, Seidl R, Krause R, Assadian O. Diagnosis, treatment, and prognosis of *Mycoplasma pneumoniae* childhood encephalitis: systematic reviewof58cases. J Child Neurol 2004; 19: 865–71.
9.Domenech C, Leveque N, Lina B, Najioullah F, Floret D. Role of *mycoplasma pneumoniae* in pediatric encephalitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28: 91–4.
10.Dorigo-Zetsma JW, Wilbrink B, Nat H, Bartelds AI, Heijnen ML, Dankert J. Results of molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* among patients with acute respiratory infection and in their household contacts reveals children as human reservoirs. J Infect Dis 2001*;* 183: 675–8.
11.Hausner M, Schamberger A, Naumann W, Jacobs E, Dumke R. Development of protective anti-*Mycoplasma pneumoniae* antibodies after immunization of guinea pigs with the combination of a P1-P30 chimeric recombinant protein and chitosan. Microb Pathog 2013; 64: 23–32.
12.Zhen Zhu, Wenbo Xu, Emily S, Abernathy, Min-Hsin Chen, Qi Zheng, et al. Comparison of Four Methods Using Throat Swabs To Confirm Rubella Virus Infection. J Clin Microbiol 2007; 45(9): 2847-52.
13.Yamazaki T, Narita M, Sasaki N, Kenri T, Arakawa Y, Sasaki T. Comparison of PCR for sputum samples obtained by induced cough and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children. Clin Vaccine Immunol 2006; 13(6):708-10.
14.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): 149-55.
15.Saharan P, Dhingolia S, Khatri P, Singh Duhan J, Gahlawat S. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: a review. Afr J Biotechnol 2014; 13(19): 1920-8.
16. Zhu Z, Xu W, Abernathy ES, Chen MH, Zheng Q, Wang T, et al. Comparison of Four Methods Using Throat Swabs to Confirm Rubella Virus Infection. J Clin Microbiol 2007; 45(9): 2847-52.
17.Honda J, Yano T, Kusaba M, Yonemitsu J, Kitajima H, Masuoka M, et al. Clinical use of capillary PCR to diagnose Mycoplasma pneumonia. J Clin Microbiol 2000; 38(4):1382-4.
18.Bahar M, Ashtari F, Aghaei M, Akbari M, Salari M, Ghalamkari S. Mycoplasma pneumonia seroposivity in Iranian patients with relapsing-remitting multipl sclerosis: a randomized case-control study. J Pak Med Assoc 2012; 62: S6-S8.
19.Hadi N, Kashef S, Moazzen M, Pour MS, Rezaei N. Survey of *Mycoplasma pneumoniae* in Iranian children with acute lower respiratory tract infections. Braz J Infect Dis 2011; 15: 97-101.
20.Noorbakhsh S, Farhadi M, Tabatabaei A, Darestani SG, Nia SJ. Searching Mycoplasma pneumonia by serology & PCR in children with adenoid hypertrophy and rhinosinusitis: A case control study, Tehran, Iran. Iran J Microbiol 2013; 5: 63-7.
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): 25-9.

22.Gurr PA, Chakraverty A, Callanan V, Gurr SJ. The detection of *Mycoplasma pneumonia* innasal polyps. Clin Otolaryngol Allied Sci 1996; 21(3): 269-73.
23.Bucholtz GA, Salzman SA, Bersalona FB, BoyleTR, Ejercito VS, Penno L, et al. PCR analysis of nasal polyps, chronic sinusitis, and hyper trophiedtubinates for DNA encoding bacterial 16s rRNA. Am J Rhinol 2002; 16(3):169-73.
24.Golmohammadi R, Ataee RA, Alishiri GH, Mirnejad R, Najafi A, Tate M, et al. Moleculardiagnosis of Mycoplasma pneumoniae insynovial fluid of rheumatoid arthritis patients. Iran J Med Microbiol 2014; 8(1):1-8.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Molecular Detection of *Mycoplasma Pneumoniae* Using P1 Gene in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Syndrome

Amirian S[1], Amini K[2*], Parviz M[2]

[1]Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran, [2]Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.

Received: 28 Feb 2016 Accepted: 24 Jul 2016

Abstract:

Background & aim: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a chronic lung disease characterized by irreversible progressive obstruction of the airways which occur in three forms including; emphysema, chronic bronchitis, and small airways disease. *Mycoplasma pneumoniae* causes respiratory problems such as sore throat, pharyngitis, tracheobronchitis and other respiratory infections, especially in patients with COPD. Conventional methods for detection of *M. pneumoniae* have restrictions so that, the use of a reliable and sensitive method is essential. Therefore, the aim of this study was to identify *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory secretions of patients with COPD by PCR method.

Methods: In the present cross-sectional study, a total of 120 respiratory secretions samples were collected from patients with COPD during a one year duration (2014-2015). Bacterial identification was performed by the PCR method and confirmed by DNA sequencing. Collected data were analyzed by cross-sectional analysis.

Results: The most occurrence of Mycoplasma pneumoniae respiratory infections was in the age group of 4-21 years and the lowest rate was presented in the age group of 0 to 3 years. The results also indicated that of the collected 120 samples, 8 samples (6.6%) were positive for *Mycoplasma pneumoniae* and carried the P1 gene. These high rates of infection with these types of Mycoplasma were indicated in patients with chronic obstructive pulmonary syndrome.

Conclusion: The results of the present study revealed that *Mycoplasma pneumoniae* can be one of the factors likely to develop COPD. The PCR method used with specific primers was able to detect *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory secretions. This may facilitate the treatment portion of patients with symptoms of COPD.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*, Multiplex PCR, Chronic Obstructive Pulmonary Syndrome.

[*]**Corresponding Author: Amini K,** Department of Microbiology, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.
Email: kamini@iau-saveh.ac.ir

Please cite this article as follows:
Amirian S, Amini K, Parviz M. Molecular Detection of Mycoplasma Pneumoniae Using P1 Gene in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Syndrome. Armaghane-danesh 2016; 21 (5): 455-464.