دراسة مقارنة لأنواع مختلفة من بكتريا Mycoplasma

بطريقتي العزل الجرثومي MDCS وال PCR

ا.م.د. غيداء جاسم عبدالنبي الغزاوي رواء صادق مجيد

كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة البصرة المعهد التقني الطبي/العمارة

الخلاصة :

جمعت ١٥٠ عينة (٥٠ عينة من القشع ، ٥٠ مسحة من اللثة و ٥٠ مسحة من المهبل) من المرضى المراجعين لمستشفى البصرة العام و المركز التخصصي لطب الأسنان الأول في محافظة البصرة للفترة من كانون الأول ٢٠١٥ ولغاية أيار ٢٠١٥ ومن الذكور والإناث ، تراوحت أعمارهم من(٦ - ٧٠ سنة) .جُمعت تلك العينات و زُرعت بطريقة الزرع الاحادي- الثنائي الطور Monophasic-Diphasic Culture Setup (MDCS). عُزلت ثلاث أنواع من المايكوبلازما:

Mycoplasam pneumoniae من القشع ، *Mycoplasma salivarium* من مسحات اللثة و *Ureaplasma urealyticum*من المسحات المهبلية . تم تشخيص هذه العزلات بواسطة الاختبارات البايو-كيميائية و تقنيةPCR . تم تحليل النتائج إحصائيا باستخدام مربع كاي وتحت مستوى معنوية $P\leq 0.05$. وجدت المايكوبلازما في ٧٦ حالة مرضية من عينات الدراسة البالغة ١٥٠ عينة و التي شُخصت بواسطة الاختبارات البايو-كيميائية ، ٢٥ حالة منها شُخصت ك *M .pneumoniae* بنسبة (٥٠%) ١٣ حالة منها شُخصت ك *M. salivarium* بنسبة (٢٦%) و ٣٨ حالة شُخصت ك *U .urealyticum* بنسبة (٧٦%) .أظهرت نتائج التشخيص بال PCR ثلاث أنواع من المايكوبلازما في ٦٨ عينة من أصل ١٥٠ عينة من الذكور والاناث ولأول مرة في العراق ، هذه الأنواع هي *M. pneumoniae* ظهرت في ٢٣ عينة و بنسبة(٤٦%) *M.salivarium* ظهرت في ١٣ عينة و بنسبة (٢٦ %) وأخيرا ظهرت urealyticum. *U* في ٣٢ عينة وبنسبة (٦٤ %).

Abstract

A 150 samples were collected (50 samples of sputum , 50 swabs of the gingiva and 50 of vaginal swabs) from patients who admitted Al -Basra general hospital and the specialist center of the first dental medicine in the governorate of Basra for the period from January 2015 to May 2015 from males and females , their age of patients ranged from 6-70 years old . Samples were collected and

cultured by monophasic-diphasic culture setup method (MDCS) .Three types of *Mycoplasma* were isolated : *Mycoplasma pneumoniae* from sputum , *Mycoplasma salivarium* from the swabs of the gingiva and *Ureaplasma urealyticum* from the vaginal swabs. Isolated Mycoplasma were diagnosed by biochemical tests and PCR technique .Results were statistical analysis by chi – square at $P \leq 0.05$ level . *Mycoplasma* spp . were isolated from 76 individuals out of 150 samples with biochemical tests. Twenty five cases were diagnosed as *M. pneumoniae* (50%) , 13 cases were diagnosed as *M. salivarium* (26%) and 38 cases were diagnosed as *U.urealyticum* (76%) .Sixty eight isolates of *Mycoplasma* spp. were diagnosed by PCR at first time in Iraq , 23 were diagnosed as *M. pneumoniae* (46%) , 13 were diagnosed as *M. salivarium* (26%) and 32 were diagnosed as *U. urealyticum* (64%).

Keywords : PCR , *Mycoplasma* spp. **,** vagina **,** gingiva **,** sputum **.**

المقدمة :

ال Mycoplasma هو اسم جاء من اليونانية، mykes (فطر) و plasma(مكون).أول من استعمل هذا الاسم هو العالم ألبرت بيرنهارد فرانك عام ١٨٨٩ . اعتقد بأنها فطر بسبب خصائصها التي تشبه خصائص الفطر (١).ال Mycoplasma هي نوع فريد من البكتريا وعُرفت بأنها كائن حي طليق صغير جدا (٢).يشير هذا المصطلح إلى جنس البكتريا التي تفتقر إلى جدار الخلية. لاتتأثر هذه البكتريا بالعديد من المضادات الحيوية مثل البنسلين أو البيتا لاكتم - beta-lactum التي تستهدف جدار الخلية . وقد تعيش هذه البكتريا متطفلة أو مترممة (٣). إن المايكوبلازما لا تمتلك تركيب جدار خلايا صلب ولا يمكن أن تنمو على أوساط زرعيه بسيطة وتكون غير مثبطة بواسطة البنسلين(٤) و(٥). فقدان جدار الخلية يستعمل لتمييز هذه البكتريا عن البكتريا الأخرى و وضعها في صنف ناعمة الجلد Mollicutes (٦). يمكن أن تتخذ هذه الكائنات الحية المجهرية أشكالا كروية ، منتفخة وحتى خيطية (٧) و(٨).

تتكون هذه البكتريا من ثلاث عضيات فقط هي غشاء البلازما plasma membrane، الرايبوسومات ribosomes والكروموسوم chromosome. توجد هذه البكتريا بشكل رئيسي في الأغشية المخاطية للجهاز التنفسي والجهاز البولي(٩).

هدف الدراسة :

١. عزل ال Mycoplasma من عينات القشع ومسحات اللثة والمسحات المهبلية .
٢. تشخيص الأنواع المعزولة من Mycoplasma بطريقتين هما MDCS و PCR .
٣. اجراء تحويرات على وسط ال (MDCS) بغية الوصول الى وسط نموذجي من نواح مختلفة.

المواد وطرائق العمل :

- **مجتمع الدراسة**

شملت الدراسة ١٥٠ عينة من المرضى المراجعين الى مستشفى البصرة العام والمركز التخصصي لطب الاسنان الاول في مركز محافظة البصرة وبواقع ٥٠ عينة لكل من القشع ومسحات اللثة والمسحات المهبلية ولجميع الاعمار ومن كلا الجنسين.

- **جمع وتلقيح العينات**

جمعت عينات القشع في اوعية خاصة معقمة ثم لحقت في الوسط الاحادي-الثنائي الطور Monophasic-Diphasic Culture Setup (MDCS) (Al-Ghizawi , 2001) بواسطة اللاقح الحلقي . علما بان هذا الوسط يتكون من (pplo agar + broth، مصل دم الخيل ، خلاصة الخميرة ،DNA ، البنسلين، خلات الثاليوم، الكلوكوز، cresol red) . حضنت هوائيا في درجة ٣٧ م لمدة ٢٤ ساعة في مختبر الاحياء المجهرية في قسم علوم الحياة. جمعت المسحات المهبلية بواسطة مسحات قطنية معقمة ثم لقحت في الوسط الاحادي-الثنائي الطور (MDCS).وحضنت هوائيا في درجة حرارة ٣٧ م ولمدة ٢٤ ساعة. شخصت العينات بواسطة الاختبارات البايوكيميائية

- **الاختبارات الجزيئية**

تضمنت الاختبارات الجزيئية استخلاص ال(DNA) وتضخيمه بطريقة ال(PCR). أذ تم اجراء التشخيص بواسطة ال PCR في مختبرات ال PCR التابعة لقسم علوم الحياة

- **التحليل الإحصائي**

لتحديد الفروق المعنوية الاحصائية بين المتغيرات المختلفة ، اعتمد البرنامج الاحصائي SPSS (Statistical Package for Social Science) (Ver. 11) وبالاعتماد على تحليل مربع كاي X^2 وتحت مستوى احتمال $P \leq 0.05$.

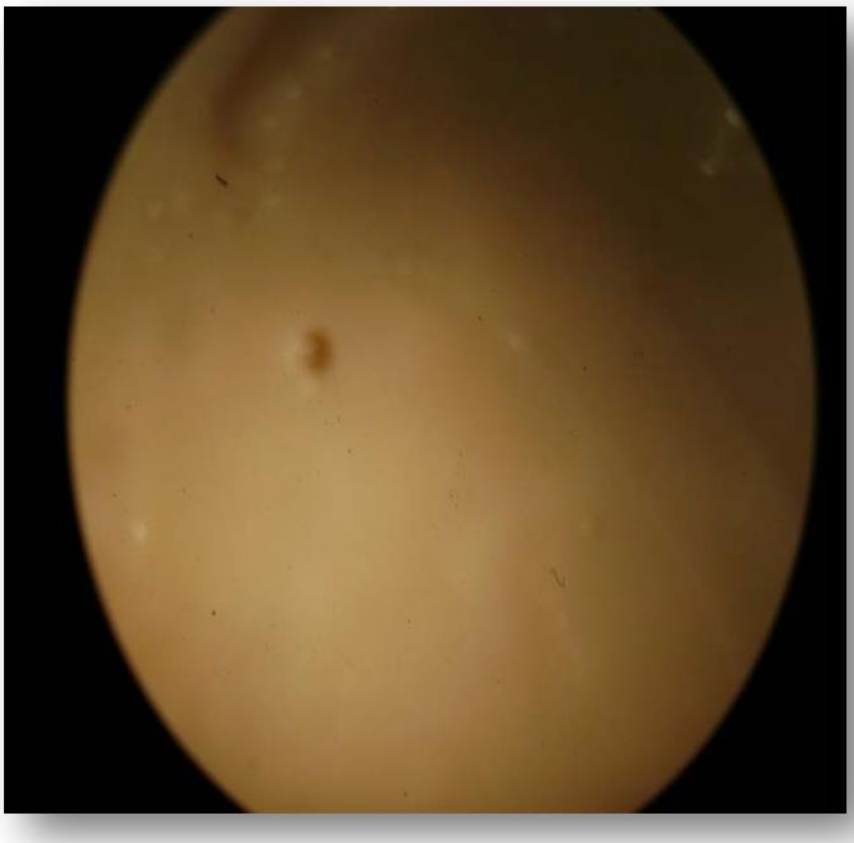
النتائج والمناقشة :

أظهرت نتائج التشخيص المختبري ثلاث أنواع من المايكوبلازما في ٧٦ عينة من أصل ١٥٠ عينة من الذكور والاناث وهذه الأنواع هي *M. pneumoniae* ظهرت في ٢٥ عينة من أصل ٥٠ وبنسبة (٥٠%) ، *M.salivarium* ظهرت في ١٣ عينة من أصل ٥٠ عينة و بنسبة(٢٦%) وأخيرا ظهرت *U.urealyticum* في ٣٨ عينة من اصل ٥٠ عينة وبنسبة (٧٦%) ويمكن توضيح الأنواع الثلاثة المعزولة وعددها ونسبها في جدول (١). علما بان عينات القشع (٥٠) اخذت من الذكور والاناث وكذلك الحال بالنسبة للمسحات الفمية في حين اقتصرت المسحات المهبلية على الاناث فقط.

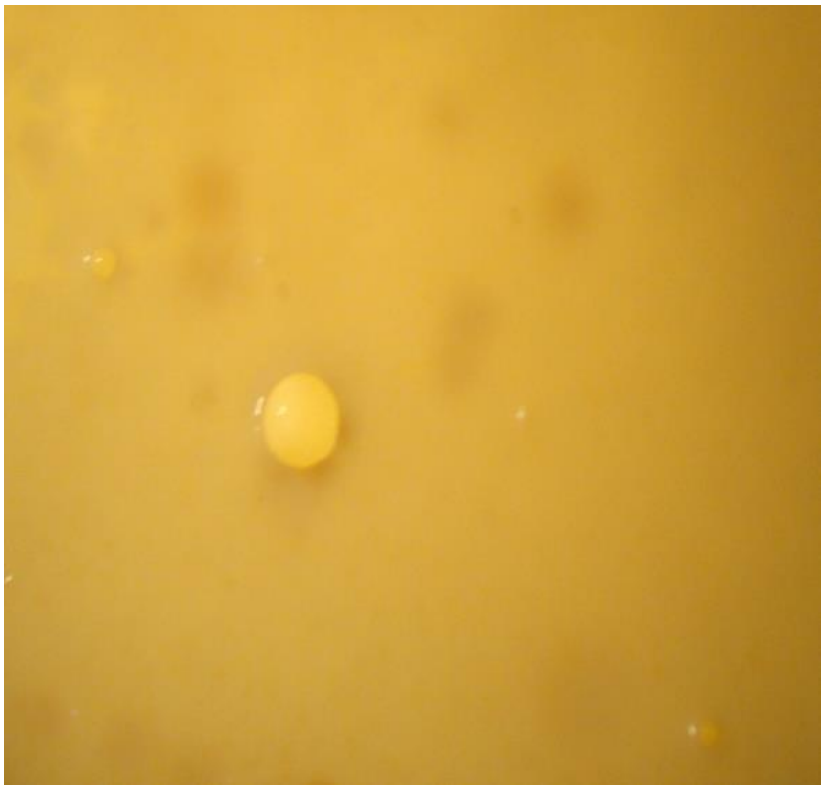
جدول (١) : أنواع المايكوبلازما المعزولة وعددها ونسبها

المسبب المرضي	عدد النماذج المصابة	النسبة المئوية
M. pneumonia	٢٥	% ٥٠
M. salivarium	١٣	% ٢٦
U. urealyticum	٣٨	% ٧٦

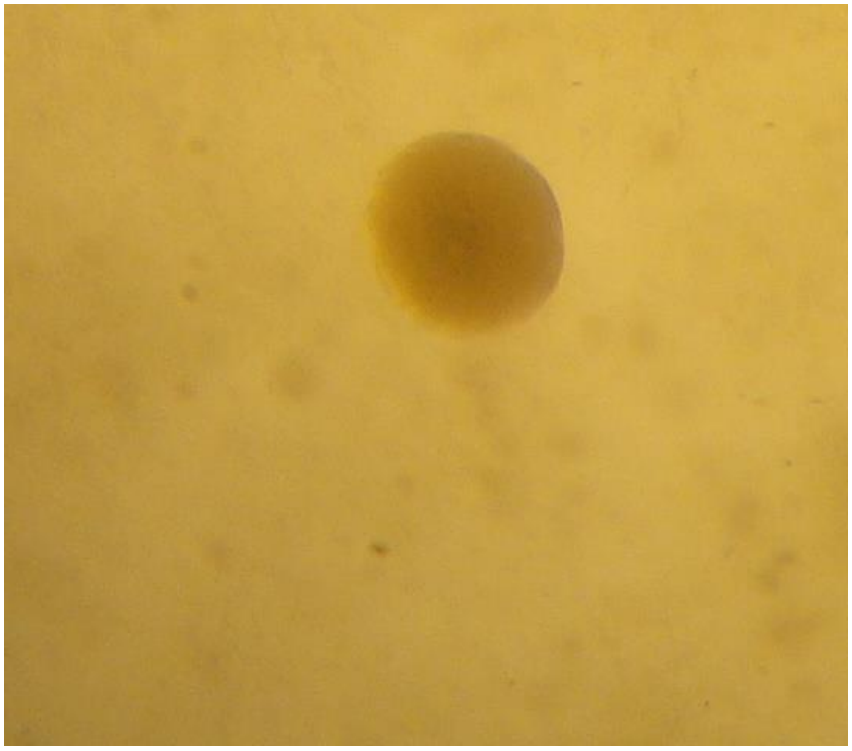
يمكن توضيح أشكال المستعمرات لأنواع المايكوبلازما المعزولة في الأشكال ١ ، ٢ ، ٣ .



شكل (١) : مستعمرة M. pneumonia نامية على وسط ال MDCS (٤٠X)



شكل (٢) : مستعمرة M. salivarium نامية على وسط ال MDCS (٤٠X)



شكل (٣) : مستعمرة U. urealyticum نامية على وسط ال MDCS (٤٠X)

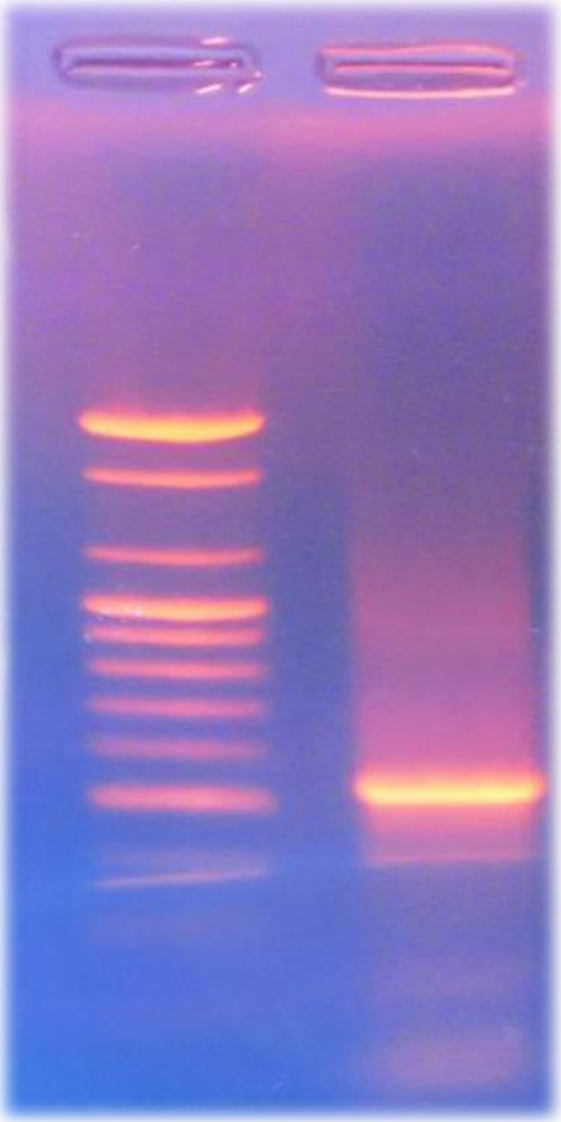
أظهرت نتائج التشخيص بال PCR ثلاث أنواع من المايكوبلازما في ٦٨ عينة من أصل ١٥٠عينة من الذكور والاناث وهذه الأنواع هي M. pneumoniae ظهرت في ٢٣عينة من أصل ٥٠ وبنسبة (٤٦%)، M.salivarium ظهرت في ١٣ عينة من أصل ٥٠ عينة و بنسبة (٢٦%) وأخيرا ظهرت U.urealyticum في ٣٢ عينة من اصل ٥٠ عينة وبنسبة (٦٤%) ويمكن توضيح نتائج التشخيص باستخدام تقنية ال PCR في جدول (٢) وفي الأشكال ٤ ، ٥، ٦ .

جدول (٢) : نتائج التشخيص الجزيئي باستخدام تقنية PCR

أنواع المايكوبلازما المعزولة	عدد العينات الكلية	عدد العينات المشخصة باستخدام PCR والنسبة المئوية
M. pneumonia	٥٠	٢٣ (٤٦ %)
M. salivarium	٥٠	13 (%26)
U. urealyticum	٥٠	٣٢ (٦٤ %)

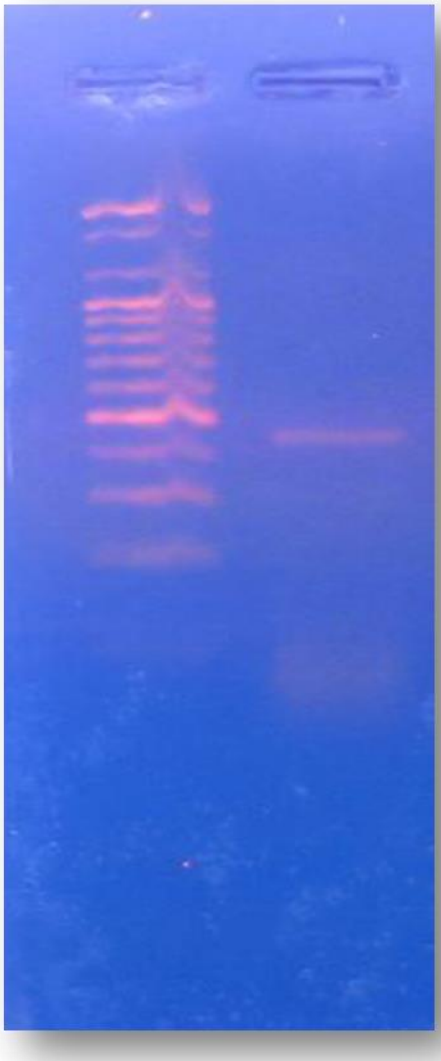
شكل (٤) : الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الأگاروز (٣ %) وناتج تضخيم

M. pneumoniae



شكل (٥) : الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الأگاروز (٣ %) وناتج تضخيم

M. salivarium



شكل (٦) : الترحيل الكهربائي باستخدام هلام الأگاروز وناتج تضخيم

U. urealyticum

تم استخدام الوسط الأحادي-الثنائي الطور Setup Monophasic-Diphasic Culture (MDCS) لعزل بكتريا المايكوبلازما حيث يُعد وسطا انتقائيا للمايكوبلازما. يتميز هذا الوسط بعدد من المزايا هي الحصول على نتائج سريعة إذ يتطلب وقتا قليلا للحضن و يُغني عن استخدام الوسط الناقل و إمكانية التعرف على المستعمرات وتشخيصها بسهولة و يُعد غير مكلف من الناحية الاقتصادية ؛ وذلك لاستخدام كميات قليلة من الوسطين الصلب و السائل في انبوبة اختبار واحدة وأخيرا التخلص من التلوث (١٠).عزلت الباهلي ,(1993) وبنجاح نوعين من المايكوبلازما هما M.hominis و urealyticum. U من مسحات مهبلية وذلك باستخدام وسط U9B لعزل النوع الأول ووسط agar A7 لعزل النوع الثاني لكن الوقت اللازم لعزل تلك الانواع كان أطول إذا ما قورن بوقت وسط MDCS (11).استخدمت الموسوي, (2005) وسط MDCS لعزل الانواع M. penetrans و M. genitalium و M. fermentansمن مسحات مأخوذة من عنق الرحم فضلا عن M. hominis وU. urealyticum(12).

قام كاظم ، (2010) بعزل الانواع M. salivarium و M. fermentans و U.urealyticum من السائل المفصلي و باستخدام وسط MDCS (13). تمكنت Ghanim، (2014) من عزل M. hominis و M. fermentans U. urealyticum من عينات الادرار وباستخدام وسط MDCS (14). تم استخدام تقنية PCR لتشخيص أنواع المايكوبلازما الثلاث *M.pneumoniae* و*M. salivarium* و *U. urealyticum* ولأول مرة في العراق حيث تم استخدام بادئ متخصص Specific primer في التشخيص وذلك لاختبار كفاءتها في تحديد الانواع المختلفة من المايكوبلازما وشيوع استخدامها لهذا الغرض. لم تعطي جميع العينات نتيجة موجبة بعد التضخيم ربما يُعزى إلى كون كميةDNA أو العزلة المأخوذة من المايكوبلازما صغيرة فتعطي نتيجة سالبة أو إن السلالات المعزولة المحلية تختلف ببعض الصفات الجينية genotypic عن السلالات التي صُنعت لأجلها البادئات(١٥) و(١٦)، لذا تعد طريقة الزرع هي الطريقة الاساسية للكشف عن المايكوبلازما والتحري عن شكل المستعمرات (شكل البيض المقلي) المميز لها (١٧) ، كما تعد طريقة الزرع هي الطريقة المفضلة للكشف عن المايكوبلا زما في الكثير من المختبرات ذات المستوى المتوسط والمستوى البسيط لحجم الاختبارات التي تجريها وذلك لقلة تكلفتها (١٨). تفضل تقنية PCR في الكثير من الاختبارات البحثية و تعد طريقة مكملة للزرع المختبري و طريقة مثالية للكشف عن الانواع التي تكون طريقة عزلها صعبة أو تتطلب الكثير من الوقت و للتمييز بين الأنواع المتقاربة العائدة لنفس الجنس (١٩).

الاستنتاجات :

١ _ يُعد وسط ال MDCS وسطا ملائما لعزل الأنواع المختلفة من المايكوبلازما.

٢ _ إن نسبة الاصابة ب *M. pneumoniae* عالية كمسبب مرضي لذات الرئة مقارنة بالدراسة السابقة قبل أكثر من خمسة عشر عاما .

٣ _ على الرغم من وجود أكثر من نوع واحد من أنواع المايكوبلازما المسببة للإصابات التناسلية لدى النساء ، تم عزل بكتريا *U. urealyticum* فقط .

٤ _ ظهرت *M.salivarium* كبكتريا انتهازية لدى المرضى المصابين بأمراض الفم .

٥ _ تشخيص المايكوبلازما بواسطة PCR يحتاج إلى جهد وكلفة مادية ولم تتطابق نتائجه تماما مع التشخيص البيو كيميائي للبكتريا المعزولة في هذه الدراسة.

المصادر :

Quirk, J. Kupinski, J. and Dicioccio, R. (2001). Detection of Mycoplasma ribosomal DNA sequences in ovarian. Gynecol. Onc. 83: 560 – 562.

Ryan, K.J. and Ray, C.G. (2004). Sherris Medical Microbiology (4th ed.). Mc Graw Hill. P 409-12.

Levashev, V. S. and Shevlyagin , V . Y.(1962). The isolation of microorganisms (PPLO) of pleuropneumoinia – like illnss from tissue cultures. Bulleten. Exsper. Bio. Med. , 55 : 70- 72.

Held, P. (2008). Clean culture. Drug. Disco. Develop. Maga., 11: 30 – 32.

Rivera – Tapia, J. A. and Rodriguez – Preval, N. (2006). Possible role of Mycoplasmas in pathogenesis of gastrointestinal diseases. Rev. Bio. Med. , 17: 132 – 139.

Kandson ,D. and Macleod , R.(1970). Mycoplasma pneumoniae and mycoplasma salivarium : Electron Microscopy of Colony Grwth in aga .J. Bacteriol .2: 609 – 617.

Pelczar, M.J.,Reid, R.D.and Chan,E .C.S.(1977).Microbiologlogy , 4th ed.Tata. Mcgraw. Hill Publlshing Co. New delhi .952 pp.

Krass , C.J. and Gardner , M.W.(1973).Etymology of the Term Mycoplasma. Int. J.Syst.Bact.23(1):62-64.

Khan ,J. ;Farzand ,R. ;.and Ghumro ,P.B. (2010). Antibiotic sensitivity of human genital mycoplasmas. J.Micro. Res.4(9):704-707.

AL – Ghizawi , G. (2001). Typical and atypical pneumonia characteristic bacterial profile of Cassese .Ph.D. thesis, college of Education , Basra university .P 108.

AL – Bahli, S. (1993). Prevalence of genital Mycoplasma in women with selected abstenic gnecological conditions .M.Sc . thesis , College of medicine ,Basrah university .P103

AL- Mossawi, R. M. (2005). Genital mycoplasmas among women attending Basra general hospital with an evaluation of their role in selected clinical cases .M.Sc. thesis, College of Education . Basra University .P125.

Kadhim, M. (2010). Isolation and identification of some Mycoplasma spp. from septic arthritis in Basra city. M.Sc. Thesis ,College of Education, University of Basra, Iraq.P71.

Ghanim , I. A. (2014) . Detection the Role of Mycoplasmas in Urinary Tract infection of both Sexes in Basra city by MDCS method and PCR. M.Sc. thesis, Collage of Education, University of Basra , Iraq. P: 57-65.

Tully, J. and Razin , S. (1996). Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology, Academic Press, San Diego, California.P 29-39.

Timenetsky, J.; Santos, L.; Buzinhani, M . (2006) Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. Braz J Med Biol Res 39:907–914.

Waites, K. B.; Katz, B. and Schelonka, R. (2005). Mycoplasma and Ureaplasma as neonatal pathogene. Clin. Micrbiol. Rev. 18: 757 – 789.

Waites, K, ;Xiao, L.; Paralanov, V.; Viscardi, R and Glass, J(2012) Molecular Methods for the Detection of Mycoplasma and Ureaplasma Infections in Humans. A Paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on Molecular PathologyJ.Mol.Diagn.14:437-450.

Blanchard, A. and Bébéar C. (2002) Mycoplasma of humans in Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. pp. 45–71, Razin,S and Herrmann,R.(eds), New York: Kluwer Academic ,Plenum Publishers.