مقایسه دو روش کشت و PCR در جداسازی مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آ پلاسما اوره‌آلیتیکوم از مایع منی مردان نابارور مراجعه‌کننده به پژوهشکده رویان در سال ۱۳۸۸

*محمدحسین احمدی[I]

دکتر نور امیرمظفری[II]

دکتر محمدعلی صدیقی گیلانی[III]

دکتر بهرام کاظمی[IV]

فرامرز مسجدیان جزی[V]

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های ناشی از مایکوپلاسماهای تناسلی می‌تواند تأثیرات منفی بر سلامت تناسلی مردان داشته و به ناباروری منتهی گردد. هدف از این تحقیق، بررسی وجود مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور مراجعه‌کننده به پژوهشکده رویان توسط دو روش کشت و PCR و مقایسه این دو روش با یکدیگر بود.

روش کار: در این مطالعه توصیفی-تحلیلی مقطعی، نمونه‌های مایع منی از ۲۲۰ مرد نابارور اخذ و به سه بخش تقسیم گردید: بخش اول جهت انجام تست اسپرموگرام استفاده شد، بخش دوم به محیط کشت PPLO broth تلقیح و سریعاً از فیلترهای ۰/۴۵ میکرومتر(μm) عبور و طبق دستورالعمل، در محیط‌های اختصاصی مایع و جامد PPLO کشت و در دمای ۳۷°C و در مجاورت CO2 نگهداری شد و بخش سوم نمونه به منظور انجام PCR استفاده شد که برای شناسائی اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم از پرایمرهای U4 و U5 به منظور تکثیر ژن Urease این باکتری و برای مایکوپلاسما هومینیس از پرایمرهای RNAH1 و RNAH2 برای تکثیر ژن 16S rRNA استفاده گردید؛ سپس یافته‌ها توسط نرم‌افزار SPSS V.16 تحلیل شد. از آزمون‌های آماری ANOVA، Post Hoc، Crosstab، Chi Square و Mc Nemar استفاده شد.

یافته‌ها: از مجموع ۲۲۰ نمونه مایع منی بررسی شده با استفاده از روش کشت، ۳/۲٪ و با روش PCR ۴/۱٪ از نمونه‌ها فقط از نظر مایکوپلاسما هومینیس مثبت بود. با روش کشت، ۲۷/۷٪ و با PCR ۲۹/۱٪ فقط از نظر اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت بود؛ با روش کشت، ۵٪ نمونه‌ها و با PCR، ۱۱/۴٪ از نظر هر دو باکتری مثبت بودند. در بررسی متغیرها در دو روش کشت و PCR، در دو گروه "فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت" و "هر دو باکتری مثبت"، میانگین pH نسبت به گروه "هردو باکتری منفی"، پایین‌تر و اسیدی‌تر بود(Culture)(p=۰/۰۰۶) و(PCR)(p=۰/۰۰۰) و نیز قدرت تحرک اسپرم‌ها در گروه "هردو باکتری مثبت" نسبت به گروه "فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت"، پایین‌تر بود(Culture)(p=۰/۰۳۲) و(PCR)(p=۰/۰۰۹).

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های این تحقیق، درصد نسبتاً بالایی از مردان نابارور به این باکتری‌ها آلوده بوده‌اند و با توجه به عواقب خطرناک این عفونت‌ها، تشخیص به موقع این باکتری‌ها در مردان نابارور فاقد علائم بالینی، ضروری به نظر می‌رسد. PCR در مقایسه با کشت یک روش حساس‌تر، سریع‌تر و دارای ویژگی بالاتری می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: ۱-مایکوپلاسما هومینیس ۲-اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم ۳-مردان نابارور ۴-کشت مایع منی ۵-PCR مایع منی

تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۸، تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۳۱

مقدمه

مایکوپلاسما هومینیس (Mycoplasma hominis) و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم(Ureaplasma urealyticum)، از کوچک‌ترین باکتری‌هایی هستند که فاقد دیواره سلولی بوده و توانایی رشد در محیط‌های کشت معمولی را دارند. این باکتری‌ها به همراه کلامیدیا تراکوماتیس(Chlamydia trachomatis) جزء شایع‌ترین عوامل ایجادکننده اورتریت غیر گنوکوکی (Non Gonococcal Urethritis=NGU) و سایر عوارض

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه آقای محمد حسین احمدی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد میکروب شناسی به راهنمایی دکتر نور امیرمظفری و مشاوره دکتر محمد علی صدیقی گیلانی، دکتر بهرام کاظمی و آقای فرامرز مسجدیان جزی، سال ۱۳۸۸.

I) کارشناس ارشد میکروب شناسی، تقاطع بزرگراه‌های شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی -درمانی ایران، تهران، ایران (*مؤلف مسئول)

II) دانشیار و متخصص میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی -درمانی ایران، تهران، ایران

III) دانشیار و متخصص آندرولوژی، گروه ناباروری مردان، پژوهشکده رویان، تهران، ایران

IV) استاد و متخصص انگل شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی -درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

V) کارشناس ارشد میکروب شناسی، عضو هیأت علمی گروه میکروب شناسی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی ایران، تهران، ایران

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

دستگاه ادراری-تناسلی می‌باشند.[۱] این میکروارگانیسم‌ها، به خصوص اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم با اینکه از ساکنان طبیعی مجرای ادراری مردان می‌باشند، گونه‌های بالقوه پاتوژنی هستند که نقش اتیولوژیک مهمی در عفونت‌های تناسلی و هم در ناباروری مردان ایفاء می‌کنند.[۲-۵]

عفونت مجرای ادراری-تناسلی مردان، یکی از مهم‌ترین عوامل ناباروری مردان می‌باشد[۶]؛ به طوری که ۳۵-۸٪ موارد ناباروری مردان در سراسر جهان مربوط به این عفونت‌ها می‌باشد.[۷] مطالعات مختلف در کشورهای توسعه یافته نشان داده است که عفونت‌های ناشی از مایکوپلاسماها و اوره‌آپلاسماهای تناسلی می‌تواند به ناباروری و نازایی منتهی شود.[۲،۵و۷-۹] عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها اغلب بدون علامت بوده که این امر می‌تواند تأثیرات منفی بر سلامت تناسلی مردان داشته باشد[۶و۱۰]که شامل تأثیرات منفی بر حجم، pH، تحرک، مورفولوژی، تعداد و قابلیت حیاتی اسپرم‌ها می‌باشد.[۱۱-۱۵]

علاوه بر نقش مایکوپلاسما هومینیس در بیماری‌های التهابی لگن، واژینوز باکتریایی، غیره [۱۶و۱۷] می‌تواند با اتصال به سر، دم و بخش میانی اسپرم ها(جهت کسب استروئیدهای مورد نیاز خود) سبب بی حرکت شدن آن‌ها[۱۸] و حتی نفوذ به داخل اسپرم‌ها گردد.[۱۹]

اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم از پاتوژن‌های غالب مسبب بیماری‌های منتقله از راه جنسی (Sexual Transmitted Disease=STD) بوده و بنابراین مشخص کردن شیوع آن در مردان نابارور فاقد علامت بالینی از اهمیت بالایی برخوردار است.[۵، ۲۰و۲۱] این باکتری می‌تواند به مقدار فراوان به اسپرم، به خصوص به قسمت میانی آن، متصل گردد و یک نوع سنگینی هیدرودینامیکی در اسپرم ایجاد کرده و با در هم پیچیدن و ایجاد لخته‌ای متشکل از اسپرم‌ها (Multisperm agglutination) سبب از دست رفتن قدرت تحرک اسپرم‌ها می‌گردد.[۲۲] شواهد نشان می‌دهد که عفونت بدون علامت بالینی ناشی از این باکتری می‌تواند سبب سوء عملکرد غدد ضمیمه‌ای جنسی (Accessory sex glands) گردد.[۲۳] همچنین حضور این باکتری در مایع منی و یا مجرای تناسلی زنان، می‌تواند در فرآیند لقاح خارج رحمی (In Vitro Fertilization) سبب افت و کاهش میزان حاملگی شود.[۲۴و۲۵]

در کشورهای صنعتی، شیوع بالای کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلاسماهای تناسلی در بین شرکای جنسی مرد در زوج‌های نابارور و نقش مهم آن‌ها در ایجاد مواردی از ناباروری‌ها اثبات گردیده است[۲، ۵و۹-۷]؛ هرچند که در کشورهای در حال توسعه، این جایگاه هنوز به طور کامل مشخص نشده است.[۲۶]

مطالعات نشان می‌دهد در صورت عدم تشخیص، پیشگیری و درمان مناسب، عفونت‌های مایکوپلاسمایی به طور مستمر باقی مانده و منجر به عواقب خطرناکی مانند بیماری‌های التهابی لگن و ناباروری می‌گردند.[۲۷]

در کشور ما به دلیل ملاحظات اخلاقی، مطالعات بسیار کمی در زمینه تشخیص این باکتری‌ها در نمونه‌های مایع منی صورت گرفته است؛ لذا شناسایی این باکتری‌ها در مردان نابارور فاقد علائم بالینی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. در این امر، استفاده از روشی که دارای حساسیت و ویژگی بالاتر و مطلوب تری باشد بسیار مهم است.

در این تحقیق، حساسیت و ویژگی دو روش تشخیصی کشت و PCR برای جداسازی مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در نمونه‌های مایع منی و ارتباط میان وجود این دو باکتری با پارامترهای اسپرم در مردان ناباروری که جهت درمان به پژوهشکده رویان مراجعه کرده بودند، مورد بررسی قرار گرفت.

روش کار

جامعه و نمونه پژوهش

این مطالعه از نوع مطالعات توصیفی-تحلیلی و مقطعی بود. جامعه پژوهش شامل ۲۲۰ مرد نابارور که به مرکز

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

درمان ناباروری پژوهشکده رویان مراجعه کرده و با انجام معاینات و آزمایش‌های خاص (ازجمله اسپرموگرام)، ناباروری آن‌ها توسط پزشک متخصص آندرولوژی اثبات شده بود و همچنین دارای شرایط زیر بودند(لازم به ذکر است که قبلاً فرم اعلام رضایت توسط تمام بیماران دخیل در مطالعه، امضاء شده است):

۱- فاقد هرگونه علائم بالینی مربوط به عفونت‌های مجاری ادراری-تناسلی و نداشتن عوارضی مانند واریکوسل (Varicocele)؛ ۲- عدم مواجهه با مواد توکسیک و عدم مصرف آنتی بیوتیک تا یک هفته قبل از زمان نمونه گیری و ۳- داشتن دوره پرهیز جنسی (Abstinence duration) حداقل به مدت ٤٨ ساعت (لازم به ذکر است که همگی موارد فوق با معاینه مستقیم پزشک متخصص و گرفتن شرح حال احراز شد).

نمونه گیری و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه

نمونه‌های مایع منی مردان نابارور، در داخل ظرف‌های استریل اخذ شده و هر نمونه به سه بخش تقسیم شد: بخش اول جهت انجام تست اسپرموگرام (Semen Analysis) مورد استفاده قرار گرفت؛ بخش دوم به محیط کشت ترانسپورت (PPLO Broth) تلقیح شده و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد تا فرآیند کشت بر روی آن‌ها انجام پذیرد. به منظور تهیه محیط کشت ترانسپورت جهت انتقال نمونه‌ها، ابتدا ۲۱ گرم از پودر تجاری PPLO broth ساخت شرکت Difco (Difco™ PPLO Broth) در یک لیتر آب مقطر حل شده و سپس به ازای هر ۷۰ میلی‌لیتر از محیط PPLO broth، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول ۱۰٪ عصاره مخمر (Yeast extract) ساخت شرکت Merck آلمان اضافه شد و پس از اتوکلاو نمودن و رسیدن دمای آن به ٤٥°C-٤٠، ٥ میلی‌لیتر سرم اسب استریل و ۱ میلی‌لیتر پنی سیلین G (U ٥٠٠٠٠) به آن افزوده شد و pH نهایی با استفاده از HCl و NaOH (یک نرمال) روی ۷ تنظیم شد و سپس در داخل لوله‌های درپیچ دار استریل در حجم ٤ میلی لیتر توزیع گردید. بخش سوم نمونه‌ها نیز به منظور انجام تست PCR، در دمای °C ۲۰- تا زمان انجام تست، نگهداری شد.

کشت نمونه‌های مایع منی و جداسازی باکتری ها

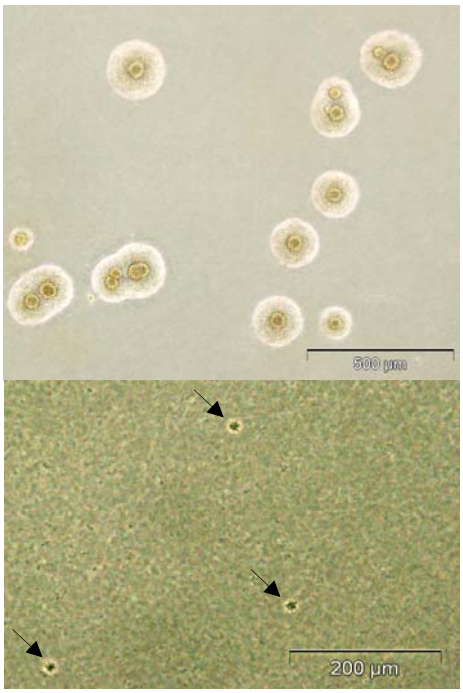
پس از انتقال محیط‌های ترانسپورت به آزمایشگاه، نمونه‌ها از فیلترهای سرسرنگی ۰/٤٥ میکرومتر عبور داده شده و به داخل محیط‌های اختصاصی Arginine PPLO broth (جهت جداسازی مایکوپلاسما هومینیس) و Urea PPLO broth (جهت جداسازی اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم) تلقیح شد و پس از قرار گیری در جار شمع دار (Candle jar) جهت تامین ۷-٥٪ CO2، در انکوباتور با دمای °C ۳۷ به مدت ٥ روز نگهداری شد. جهت تهیه محیط‌های Arginine/Urea PPLO broth، به ازای هر ۷۰ میلی‌لیتر از محیط پایه Difco™ PPLO Broth، مواد زیر افزوده شد:

۱۰ میلی‌لیتر عصاره مخمر ۱۰٪، ۱ میلی‌لیتر فنل رد ۲/.٪، ۲۰ میلی‌لیتر سرم اسب استریل، ۱ میلی‌لیتر پنی‌سیلین G (U ٥٠٠٠٠) و ۱۰ میلی‌لیتر آرژینین یا اوره ۱۰٪ که به جزء عصاره مخمر، بقیه مواد فوق پس از اتوکلاو نمودن محیط کشت و رسیدن دمای آن به °C٤٥-٤٠ در زیر هود به محیط افزوده شدند. pH نهایی برای محیط آرژینین دار روی ۷ و برای محیط اوره دار روی ٦/٥-٦ تنظیم و سپس در داخل لوله‌های درپیچ دار استریل در حجم ۲ میلی لیتر تقسیم گردید.

محیط‌های broth تلقیح یافته، به طور روزانه از نظر تغییر رنگ مورد بررسی قرار گرفته و به محض مشاهده تغییر رنگ(از زرد به صورتی یا ارغوانی)، بر سطح محیط‌های آگار اختصاصی (Arginine/Urea PPLO agar) کشت داده شدند؛ سپس پلیت‌ها در داخل Candle jar و در دمای °C ۳۷ به مدت ٥ تا ۷ روز نگهداری شدند و در طی این مدت از نظر وجود کلنی در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند؛ کلنی‌های مایکوپلاسما هومینیس در سطح محیط جامد شبیه تخم

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

مرغ نیمرو شده (Fried egg) بوده[۲۸]، در حالی که کلنی‌های اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم بسیار ریز و به شکل توت بوده و با رنگ آمیزی اختصاصی کلرور منگنز-اوره، در زیر میکروسکوپ به رنگ قهوه‌ای تیره دیده شدند (شکل شماره ۱).[۲۹]



شکل شماره۱- کلنی‌های مایکوپلاسما هومینیس بر سطح محیط کشت آرژینین آگار(**A**:۱۰۰X) و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم بر سطح محیط کشت اوره‌آگار (**B**:۲۰۰X)، که از مایع منی جداشده‌اند و در زیر میکروسکوپ فازکنتراست دیده می‌شوند (کلونی‌ها با نوک پیکان مشخص شده اند).

استخراج DNA مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم از نمونه‌های مایع منی:

جهت استخراج DNA این دو باکتری، از کیت تخلیص مربوط به شرکت Fermentas تحت عنوان (Genomic DNA Purification kit #K0512) استفاده شد. طبق دستور العمل شرکت سازنده کیت، DNA نمونه‌های فریز شده پس از خروج از فریزر بدون اینکه ذوب شوند، به صورت زیر استخراج شد:

۱- ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه، با ٤۰۰ میکرولیتر از محلول لیز (Lysis solution) در داخل یک میکروتیوب، مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری با دمای ٦٥ درجه سلسیوس انکوبه شد و هر ۳-۲ دقیقه یک بار به آرامی به هم زده شد.

۲- در این هنگام، ٦۰۰ میکرولیتر کلروفوم به آن افزوده و با ۳ تا ٥ بار برگرداندن پی در پی میکروتیوب، به آرامی به هم زده شد و سپس نمونه به مدت ۲ دقیقه در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه(rpm) سانتریفیوژ گردید.

۳- در یک میکروتیوب دیگر، با مخلوط نمودن ۷۲۰ میکرولیتر از آب دیونیزه استریل با ۸۰ میکرولیتر از محلول (10x Concentrated) موجود در کیت، محلول رسوب دهنده (Precipitation solution) آماده گردید.

٤- سپس مایع رویی نمونه سانتریفیوژ شده که حاوی DNA می‌باشد به داخل یک میکروتیوب دیگر منتقل و ۸۰۰ میکرولیتر از محلول رسوب دهنده تازه ساخته شده به آن افزوده شد و با چند بار برگرداندن (به مدت ۲-۱ دقیقه) در دمای اتاق به هم زده شد و پس از آن به مدت ۲ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید.

٥- آنگاه محلول رویی به طور کامل دور ریخته شد(بدون اینکه رسوب باقی مانده که همان DNA می‌باشد، خشک شود) و رسوب DNA (DNA pellet) در ۱۰۰ میکرولیتر از محلول NaCl (۱/۲ مولار)، به طور کامل و به آرامی حل گردید.

٦- سپس ۳۰۰ میکرولیتر اتانول سرد (۱۰۰-۹٦٪) به آن اضافه کرده و با قرار دادن آن در دمای C °۲۰- به مدت ۱۰ دقیقه، اجازه داده شد تا DNA رسوب کند و سپس با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ٤-۳ دقیقه سانتریفیوژ نموده و بعد اتانول را دور ریخته و رسوب باقی مانده را یک بار با اتانول سرد (۷۰٪) شستشو داده و در نهایت، DNA در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به آرامی حل گردید. DNA تخلیص شده تا زمان انجام PCR در فریزر C °۲۰- قرار گرفت.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

جستجوی ژنوم مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در نمونه‌های مایع منی به روش PCR:

جهت انجام PCR، از کیت (PCR Master Mix 2x)#k0171 مربوط به شرکت Fermentas که حاوی آنزیم Taq DNA Polymorase (۰/۰۵ واحد بین‌المللی بر میکرولیتر)، MgCl2 (٤ میلی مول بر لیتر) و dNTPها (۰/٤ میلی مول بر لیتر) می‌باشد، استفاده گردید. پرایمرهای مایکوپلاسما هومینیس که جهت تکثیر ناحیه ۳۳٤ bp ژن 16SrRNA این باکتری مورد استفاده قرار گرفت[۳۰] عبارتند از:

RNAH1: CAATGGCTAATGCCGGATACGC
RNAH2: GGTACCGTCAGTCTGCAAT

و توالی پرایمرهای اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم که به منظور تکثیر ناحیه ٤۲۹ bp ژن Urease این باکتری مورد استفاده قرار گرفت[۳۱] به صورت زیر بود:

U4: ACGACGTCCATAAGCAACT
U5: CAATCTGCTCGTGAAGTATTAC

در این تحقیق، از DNA حاصل از محلول کلنی هر کدام از دو باکتری مورد مطالعه در PBS(1X)، به عنوان "کنترل مثبت" و از آب مقطر دو بار تقطیر استریل به عنوان "کنترل منفی" استفاده شد. برای اجرای PCR، ابتدا نمونه‌های DNA از فریزر خارج و در دمای اتاق ذوب شد. سپس، ابتدا یک Master Mix ساخته شد و در حجم مورد نظر بین میکروتیوب‌ها تقسیم گردید. ترکیب PCR Master Mix برای هر نمونه به این ترتیب بود:

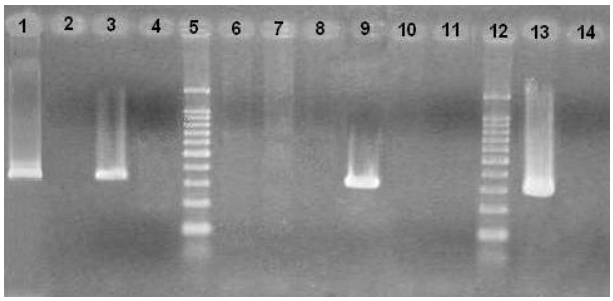
PCR Master Mix (۲x):۱۲/۵ µl، Primer Mix (۰/٤µM):۱ µl و Water (nuclease free):۱/۵ µl که به هر میکروتیوب، ۱۰ میکرولیتر (۲ میکروگرم) از DNA الگوی مخصوص به آن اضافه شد تا حجم نهایی PCR به ۲۵ میکرولیتر برسد. برنامه دمایی PCR (PCR Amplification) جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر مربوط به هر کدام از دو باکتری مورد مطالعه، با ترتیب نشان داده شده در جدول شماره ۱ انجام پذیرفت.

جدول شماره ۱- برنامه دمایی PCR (PCR Amplification) جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر برای هر دو باکتری مورد مطالعه

مراحل	دما (°C)	زمان	تعداد سیکل
۱- واسرشت اولیه (Initial Denaturation)	۹۵	۵ دقیقه	۱
۲- واسرشت (Denaturation)	۹۵	۳۰ ثانیه	٤۰
۳- اتصال پرایمرها (Annealing)	*U.urealyticum*: 54 *M.hominis*: 55	٤۵ ثانیه	
٤- سنتز (Extension)	۷۲	٤۵ ثانیه	
۵- سنتز نهایی (Final Extension)	۷۲	۵ دقیقه	۱

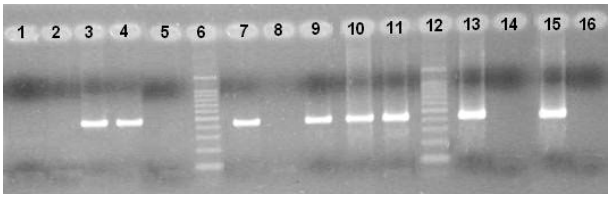
انجام الکتروفورز و آشکارسازی محصولات PCR:

پس از تهیه ژل اگاروز ۱/۵٪ و رسیدن دمای آن به حدود ٤۵°C، به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر ژل، ۳ میکرولیتر رنگ اتیدیوم بروماید به ژل اضافه شد و سپس محلول ژل آگاروز در داخل قالب الکتروفورز ریخته شده و پس از بستن ژل، در داخل تانک الکتروفورز قرار گرفت. آنگاه ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR را با ۳ میکرولیتر از Sample loading buffer مخلوط کرده و ۱۰ میکرولیتر از این مخلوط، با دقت به داخل چاهک‌های ایجاد شده در ژل ریخته شد. همچنین حدود ۵-۳ میکرولیتر از مارکر وزنی DNA (100 bp) به داخل یکی از چاهک‌ها اضافه گردید و سپس جریان الکتریسیته با ولتاژ ۱۰۰ ولت برقرار شد. در پایان کار از ژل عکس تهیه شد (اشکال شماره ۲ و ۳).



شکل شماره ۲- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR مایکوپلاسما هومینیس: نمونه‌های شماره ۱، ۳ و ۹ از نظر مایکوپلاسما هومینیس مثبت بوده در حالی که نمونه‌های شماره ۲، ٤، ٦، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۱ از نظر این باکتری منفی هستند؛ نمونه‌های شماره ۵ و ۱۲ به عنوان مارکر، نمونه شماره ۱۳ کنترل مثبت (۳۳٤ bp) و نمونه شماره ١٤، کنترل منفی می‌باشد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]



شکل شماره ۳- تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم: نمونه‌های شماره ۳، ٤، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۳ از نظر اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت بوده در حالی که نمونه‌های شماره ۱، ۲، ۵، ۸، و ١٤ از نظر این باکتری منفی هستند؛ نمونه‌های شماره ٦ و ۱۲ به عنوان مارکر، نمونه شماره ۱۵ کنترل مثبت (٤۲۹ bp) و نمونه شماره ١٦، کنترل منفی می‌باشد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آزمون آماری ANOVA و روش Post Hoc (LSD) Test جهت بررسی معنی‌دار بودن اختلاف میانگین در بین گروه‌ها و همچنین آزمون‌های آماری Crosstabs و Chi-Square به منظور بررسی متغیرهای کیفی و مقایسه درصد متغیرها توسط نرم‌افزار SPSS V.16 انجام پذیرفت. در صورتی که ۰/۰۵ >p بود، از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد. جهت مقایسه حساسیت دو روش کشت و PCR در جداسازی دو باکتری مورد مطالعه، از آزمون آماری McNemar استفاده گردید.

یافته‌ها

از مجموع ۲۲۰ نمونه مایع منی بررسی شده با استفاده از روش کشت، ۷ مورد (۳/۲٪) از نمونه‌ها فقط از نظر مایکوپلاسما هومینیس، ٦۱ مورد (۲۷/۷٪) فقط از نظر اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم و ۱۱ مورد (۵٪) نیز از نظر هر دو باکتری مثبت بودند. بنابراین، ۷۹ مورد (۳۵/۹٪) از کل نمونه‌ها حداقل از نظر یک باکتری مثبت بودند و به طور کلی ۱۸ مورد (۸/۲٪) مایکوپلاسما هومینیس و ۷۲ مورد (۳۲/۷٪) اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم از نمونه‌ها جدا شد.

در حالی که در روش PCR، از مجموع ۲۲۰ نمونه مایع منی بررسی شده، ۹ مورد (٤/۱٪) از نمونه‌ها فقط از نظر مایکوپلاسما هومینیس، ٦٤ مورد (۲۹/۱٪) فقط از نظر اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم و ۲۵ مورد (۱۱/٤٪) نیز از نظر هر دو باکتری مثبت بودند. بنابراین، ۹۸ مورد (٤٤/۵٪) از کل نمونه‌ها حداقل از نظر یک باکتری مثبت بودند و به طور کلی ۳٤ مورد (۱۵/۵٪) مایکوپلاسما هومینیس و ۸۹ مورد (٤۰/۵٪) اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم از نمونه‌ها جدا شد. در جدول شماره ۲، نتایج کلی حاصل از دو روش کشت و PCR آمده است.

جدول شماره ۲- نتایج کلی حاصل از دو روش کشت و PCR

نتایج	کشت (درصد)	PCR (درصد)
فقط مایکوپلاسما هومینیس مثبت	۳/۲	٤/۱
فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت	۲۷/۷	۲۹/۱
هردو باکتری مثبت	۵	۱۱/٤
مایکوپلاسما هومینیس مثبت (در کل)	۸/۲	۱۵/۵
اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت (در کل)	۳۲/۷	٤۰/۵
حداقل یک باکتری مثبت	۳۵/۹	٤٤/۵

در دو مورد از نمونه‌ها، مایکوپلاسما هومینیس با استفاده از روش کشت مثبت بود، در حالی که با روش PCR منفی بود. همچنین در سه مورد از نمونه‌ها، اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم با روش کشت مثبت بود، در حالی که با روش PCR منفی بود. مقایسه نتایج کشت و PCR در شناسایی دو باکتری مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در جدول شماره ۳ ارائه شده است.

جدول شماره ۳- مقایسه نتایج کشت و PCR در شناسایی دو باکتری مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم

باکتری جدا شده	PCR مثبت		PCR منفی	
	کشت مثبت	کشت منفی	کشت مثبت	کشت منفی
مایکوپلاسما هومینیس (تعداد)	١٦	۱۸	۲	۱۸٤
اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم (تعداد)	٦۹	۲۰	۳	۱۲۸

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

در بررسی پارامترهای اسپرم در نمونه‌ها، به طور کلی نتایج زیر به دست آمد:

میزان قدرت تحرک اسپرم در نمونه‌ها (Total motility) از صفر تا ٤٠٪ متغیر بود و ٢٨/٦٪ دارای قدرت تحرک برابر با صفر درصد (فاقد قدرت تحرک) بودند؛ میانگین قدرت تحرک در بین کل نمونه‌ها ١٦/٢٦٪ با انحراف معیار برابر با ١٣/١٦ بود. میزان مورفولوژی نرمال (Normal morphology) در نمونه‌ها از صفر تا ٣٥٪ متغیر بود و ٢٤/٥٪ آن‌ها دارای مورفولوژی نرمال برابر با صفر درصد (فاقد مورفولوژی طبیعی) بودند. میانگین مورفولوژی نرمال در نمونه‌ها ٤/٥٨٪ با انحراف معیار ٥/٦٣ بود.

تعداد اسپرم در هر میلی لیتر مایع منی (Sperm count/ml) در نمونه‌ها از صفر تا ١٤٠ میلیون متغیر بود و میانگین آن ١٦/٦٣ میلیون با انحراف معیار ٢٦/٦٢ بود.

میزان pH در نمونه‌ها از ٦ تا ٨/١ متغیر بود و ٦٣/٢٪ دارای pH برابر با ٧/٨ بودند؛ میانگین pH در نمونه‌ها ٧/٧٥ با انحراف معیار ٠/١٧ بود. ٧٦/٨٪ از نمونه‌ها دارای چسبندگی طبیعی (Normal viscosity)، ١٥/٥٪ Somewhat thick (نسبتاً غلیظ) و ٧/٧٪ ویسکوزیته از نوع Thick (غلیظ) داشتند.

٢٠/٩ ٪ از نمونه‌های دارای عارضه آزوسپرمیا (Azoospermia) بودند. حداقل و حداکثر سن افراد مورد مطالعه به ترتیب٢٣ و ٥٤ سال و میانگین آن ٣٥/٢٣ سال با انحراف معیار ٥/٥٠ بود.

نتایج حاصل از کشت و همچنین PCR به چهار گروه تقسیم شد که عبارتند از: گروه (١): هردو باکتری منفی، گروه (٢): فقط مایکوپلاسما هومینیس مثبت، گروه (٣): فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت و گروه (٤): هردو باکتری مثبت.

جهت بررسی اختلاف میانگین متغیرها در این چهار گروه، از تست ANOVA (آنالیز واریانس) استفاده شد که نتایج نشان داد که در هر دو روش کشت و PCR، فقط در مورد متغیر pH، رابطه معنی‌دار بود [p-value(Culture)= ٠/٠١٣ و [p-value(PCR)= ٠/٠٠٤]؛ در حالی که در مورد سایر متغیرها رابطه معنی‌داری مشاهده نشد.

سپس از آزمون تعقیبی Post Hoc (LSD Test) جهت مقایسه اختلاف میانگین در بین گروه‌ها (Multiple Comparison) به صورت دو به دو باهم استفاده شد که نتایج حاصل از کشت و PCR، اختلاف معنی‌داری را در متغیر pH در بین دو گروه (١) و (٣) نشان داد(Culture)(p=٠/٠٣١) و(PCR)(p=٠/٠٠٧). همچنین اختلاف معنی‌داری در این متغیر در بین دو گروه (١) و (٤) مشاهده گردید (Culture)(p=٠/٠٠٦) و (PCR)(p=٠/٠٠٠)؛ این بدین معنی است که در دو گروه (٣) و (٤) یعنی گروه "فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت" و گروه "هردو باکتری مثبت"، میانگین pH نسبت به گروه (١)، یعنی گروه "هردو باکتری منفی"، پایین‌تر بوده و اسیدی‌تر است. این در حالی است که در مقایسه میانگین pH در بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

همچنین در مورد قدرت تحرک اسپرم‌ها (Total motility)، فقط در بین گروه (٣) و (٤) اختلاف معنی‌داری در میانگین‌ها مشاهده شد(Culture)(p=٠/٠٣٢) و(PCR)(p=٠/٠٠٩)؛ این بدین معنی است که میانگین قدرت تحرک اسپرم‌ها در گروه "هردو باکتری مثبت" نسبت به گروه "فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت"، پایین‌تر بوده است؛ در حالی که در بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری از این نظر وجود نداشت.

جهت بررسی متغیرهای کیفی از آزمون Crosstabs استفاده شد که در آن، نتیجه حاصل از کشت و PCR، با هرکدام از سه متغیر گروه سنی(جداول شماره ٤ و ٥)، ویسکوزیته و آزوسپرمیا مورد بررسی قرار گرفت که وقتی از آزمون Chi-Square ($\chi 2$) استفاده شد، اختلاف معنی‌داری در بین هیچ کدام از این موارد مشاهده نشد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

جدول شماره ۴- توزیع نتایج کشت بر حسب گروه سنی

نتایج کشت	تعداد و درصد موارد بر حسب گروه سنی				تعداد و درصد کل بر حسب هر گروه
	۳۳- ۲۳ سال	۴۳-۳۴ سال	۵۳- ۴۴ سال	بالاتر از ۵۳ سال	
گروه (۱): هردو باکتری منفی	۶۳	۷۱	۶	۱	۱۴۱
	٪۴۴/۷	٪۵۰/۴	٪۴/۳	٪۰/۷	٪۱۰۰/۰
گروه (۲): فقط مایکوپلاسما هومینیس مثبت	۳	۴	۰	۰	۷
	٪۴۲/۹	٪۵۷/۱	٪۰	٪۰/۰	٪۱۰۰/۰
گروه (۳): فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت	۱۹	۳۷	۵	۰	۶۱
	٪۳۱/۱	٪۶۰/۷	٪۸/۲	٪۰/۰	٪۱۰۰/۰
گروه (۴): هردو باکتری مثبت	۳	۷	۱	۰	۱۱
	٪۲۷/۳	٪۶۳/۶	٪۹/۱	٪۰/۰	٪۱۰۰/۰
تعداد و درصد از کل نمونه ها	۸۸	۱۱۹	۱۲	۱	۲۲۰
	٪۴۰/۰	٪۵۴/۱	٪۵/۵	٪۰/۵	٪۱۰۰/۰

جدول شماره ۵- توزیع نتایج تست PCR بر حسب گروه سنی

نتایج PCR	تعداد و درصد موارد بر حسب گروه سنی				تعداد و درصد کل بر حسب هر گروه
	۳۳-۲۳ سال	۴۳-۳۴ سال	۵۳- ۴۴ سال	بالاتر از ۵۳ سال	
گروه (۱): هردو باکتری منفی	۵۶	۵۹	۶	۱	۱۲۲
	٪۴۵/۹	٪۴۸/۴	٪۴/۹	٪۰/۸	٪۱۰۰/۰
گروه (۲): فقط مایکوپلاسما هومینیس مثبت	۳	۶	۰	۰	۹
	٪۳۳/۳	٪۶۶/۷	٪۰/۰	٪۰/۰	٪۱۰۰/۰
گروه (۳): فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت	۲۱	۳۹	۴	۰	۶۴
	٪۳۲/۸	٪۶۰/۹	٪۶/۲	٪۰/۰	٪۱۰۰/۰
گروه (۴): هردو باکتری مثبت	۸	۱۵	۲	۰	۲۵
	٪۳۲/۰	٪۶۰/۰	٪۸/۰	٪۰/۰	٪۱۰۰/۰
تعداد و درصد از کل نمونه‌ها	۸۸	۱۱۹	۱۲	۱	۲۲۰
	٪۴۰/۰	٪۵۴/۱	٪۵/۵	٪۰/۵	٪۱۰۰/۰

در تحقیق حاضر هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین وجود لوکوسیت‌ها در مایع منی (Leukocytospermia) و نتیجه حاصل از کشت یا PCR یافت نشد. همچنین برای بررسی بیشتر، نتایج کشت و PCR به دو گروه الف): "هردو باکتری منفی" و گروه ب): "حداقل یک باکتری مثبت" تقسیم شد که پس از استفاده از آزمون‌های فوق جهت مقایسه این دو گروه، در این موارد نیز اختلاف معنی‌داری در پارامترها و متغیرهای ذکر شده، مشاهده نگردید.

بحث و نتیجه‌گیری

طبق تعریف ناباروری عبارت است از عدم ایجاد حاملگی با وجود یک سال نزدیکی جنسی بدون استفاده از هر گونه وسیله ممانعت از بارداری.[۳۲] گفته می‌شود ۵۰ تا ۸۰ میلیون زوج در سراسر جهان از ناباروری رنج می‌برند؛ به نظر می‌رسد که فاکتورهای مردانه، علت اصلی ناباروری در ۳۰٪ از موارد بوده و در ۲۰٪ موارد نیز در ایجاد ناباروری نقش مشارکتی دارد.[۳۳] در این میان، یکی از مهم‌ترین عوامل ناباروری مردان، عفونت‌های مجرای ادراری-تناسلی می‌باشد.[۶]

در مورد شیوع مایکوپلاسماهای تناسلی، گزارش‌ها و آمارهای متفاوتی وجود دارد؛ به طوری که شیوع اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور در مقالات مختلف از ۵ تا ۴۲٪ متغیر است.[۳-۵، ۳۴و۳۵] این محدوده وسیع، مربوط به روش‌ها و تست‌های تشخیصی متفاوتی است که جهت بررسی جمعیت‌های مختلف به کار رفته است.[۳۶] در تحقیق حاضر، شیوع اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در مایع منی مردان نابارور، با روش کشت ۳۲/۷٪ و با روش PCR ۴۰/۵٪ به دست آمد که در محدوده گزارش شده مقالات فوق قرار دارد.

در مطالعه‌ی Gdoura و همکاران که در تونس انجام شد، با استفاده از روش PCR مایع منی مردان نابارور مورد بررسی قرار گرفت که در آن، شیوع مایکوپلاسما

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

هومینیس ۹/٦٪ و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم ۱۵/٤٪ گزارش شد.[۲٦] در مطالعه حاضر، شیوع مایکوپلاسما هومینیس با روش کشت ۸/۲٪ بود که نزدیک به یافته مقاله فوق است، اما با استفاده از روش PCR شیوع این باکتری برابر با ۱۵/۵٪ بود که بالاتر از یافته مطالعه فوق می‌باشد. همچنین شیوع اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در تحقیق حاضر با روش کشت ۳۲/۷٪ و با استفاده از روش PCR، ٤۰/۵٪ بود که در مقایسه با مطالعه فوق، بالاتر است.

در مطالعه دیگری از Gdoura و همکاران، با استفاده از روش PCR، در ٦/۷٪ از نمونه‌ها عفونت توأم این دو باکتری مشاهده شده است[۳٦]؛ این در حالی است که عفونت توأم این دو باکتری در مطالعه حاضر با استفاده از روش کشت در ۵٪ از نمونه‌ها و با روش PCR در ۱۱/٤٪ از نمونه‌ها یافت شد. وجود عفونت توأم با این دو باکتری در مقالات مختلف، در ۷ تا ۱٤٪ از نمونه‌های مایع منی مردان نابارور گزارش شده است[۱۷و۳٤]که یافته‌های این مطالعه نیز از روش PCR، در همین محدوده قرار دارد.

در تحقیقی که Wang و همکاران در کشور چین انجام دادند، شیوع اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم را با استفاده از روش کشت ۳۹/۳۱٪ گزارش کردند[۵] که در مقایسه با یافته مطالعه حاضر از روش کشت (۳۲/۷٪)، آمار بالاتری را نشان می‌دهد.

در مطالعه‌ای که در ایران (تهران) توسط گلشنی و همکاران انجام شد، از روش PCR جهت بررسی سه باکتری کلامیدیا تراکوماتیس، مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور استفاده شد که در آن، ۳۳٪ از نمونه‌ها حداقل به یکی از این باکتری‌ها آلوده بود.[۳۷] در تحقیق حاضر، با استفاده از روش کشت، ۳۵/۹٪ و با روش PCR، ٤٤/۵٪ از کل نمونه‌ها حداقل از نظر یکی از دو باکتری مورد مطالعه، مثبت بودند.

در تحقیق دیگری که توسط دکتر نیاکان و همکاران در پژوهشکده رویان بر روی نمونه‌های مایع منی انجام شد، فراوانی مایکوپلاسما هومینیس در مردان نابارور با استفاده از روش کشت، ۱۷/۵٪ در مقایسه با گروه کنترل (۵٪) تعیین شد[۳۸] که نسبت به یافته مطالعه حاضر(۸/۲٪ در روش کشت)، میزان بالاتری را نشان می‌دهد؛ البته در تحقیق فوق، تعداد افراد مورد بررسی محدود بود(٤۰ مرد نابارور و ٤۰ نفر مرد بارور) و بنابراین نمی تواند آمار صحیحی از شیوع این میکروارگانیسم‌ها را در بر داشته باشد.

در سایر مطالعات شیوع مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم به ترتیب ۱۳-۵٪ و ۳۵-۱۱٪ گزارش شده است[۳۵و٤۳-۳۹]که یافته‌های مطالعه حاضر نیز نزدیک به همین محدوده است؛ شاید علت متغیر بودن شیوع این دو باکتری در مقالات مختلف، به دلیل روش‌های تشخیصی متفاوت، نمونه‌های مختلف و کار بر روی جمعیت‌های ناهمسان بوده باشد.

در مطالعه حاضر، مواردی از نمونه‌ها که با استفاده از روش PCR مثبت شدند اما نتیجه کشت آن‌ها منفی بود، به عنوان "مثبت کاذب" تلقی نشد؛ زیرا روش کشت به عنوان یک روش Gold standard نبوده و هیچگاه دارای حساسیت و ویژگی ۱۰۰٪ نمی باشد؛ زیرا با توجه به اینکه مایکوپلاسماها به دلیل فقدان دیواره سلولی در برابر شرایط محیطی حساسند، نتیجه کشت می‌تواند به طور کاذب منفی شود، در حالی که PCR می‌تواند حتی DNA باکتری‌های مرده را نیز شناسایی کند.

در سایر مطالعات مانند مطالعه Horn و همکارانش در سال ۱۹۹٦ در آلمان[٤٤] و نیز Luki و همکارانش در سال ۱۹۹۸ در کانادا[٤۵]، نتایج مثبت حاصل از PCR که کشت آن‌ها منفی بود به عنوان مثبت کاذب محسوب نگردید؛ لذا با لحاظ کردن موارد فوق، در مطالعه حاضر حساسیت و ویژگی روش PCR در برابر روش کشت برای شناسایی مایکوپلاسما هومینیس به ترتیب برابر ۸۸/۹ و ۹۸/۹ و

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

برای شناسایی اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم به ترتیب برابر ۹۵/۸ و ۹۷/۷ بـه دسـت آمـد. لـذا روش PCR جهـت شناسایی این دو باکتری حساس‌تر و دارای ویژگی بالاتر نسبت به روش کشت گزارش می‌گردد؛ نتـایج حاصـل از سایر مطالعات نیز این امر را تایید می‌کند.[٤٦و٤٧]

در تحقیـق حاضـر در دو مـورد از نمونـه‌هـا، مایکوپلاسـما هـومینیس و در سـه مـورد از نمونـه‌هـا، اوره‌آپلاسـما اوره‌آلیتیکـوم بـا اسـتفاده از روش کـشت مثبت، اما با روش PCR منفی بود. این امر، احتمالاً ناشـی از تجزیه DNA این باکتری‌ها و یا به واسطه وجود مهـار کننده‌های واکنش PCR (مانند مهار کننده‌های آنزیم Taq polymerase)در نمونـه‌هـای بـالینی باشـد. در سـایر مطالعات نیز نتایج مشابهی به دست آمده اسـت.[٤٤، ٤٨و٤٩] Petrikkos و همکـارانش در یونـان در سـال ۲۰۰۷ حساسیت و ویژگـی روشPCR را در برابـر کـشت بـه ترتیـب ٦٢/٨٪ و ٩٨/٨٪ بـرای مایکوپلاسـما هـومینیس و ٩٢/٤٪ و ٩٣/٨٪ برای اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم گـزارش کردند[٥٠] که نزدیک به یافته‌های مطالعه حاضر می‌باشد.

لازم به ذکر است که تـشخیص کلنـی مایکوپلاسـماها نیاز به مهارت و تجربـه کـافی دارد و یـک فرآینـد نـسبتاً طولانی(در حد چنـد روز) مـی‌باشـد؛ در حـالی کـه روش PCR دارای حساسیت بالا بـوده و در طـی زمـان نـسبتاً کوتاهی(در حد چند سـاعت) مـی‌توانـد DNA بـاکتری را حتی اگر باکتری مرده باشد، شناسایی کند.

برخـی گـزارش‌هـا حـاکی از آن اسـت کـه حـضور مایکوپلاسماها و اوره‌آپلاسماها در مـایع منـی مـی‌توانـد سـبب ایجـاد تـأثیرات منفـی بـر حجـم، pH، تحـرک، مورفولوژی، تعداد و قابلیت حیاتی اسپرم‌ها گـردد[١٥-١١]؛ در حالی که برخی از محققان هیچ گونـه ارتبـاطی را بـین حضور این باکتری‌ها در مایع منـی و ایجـاد تغییـرات در پارامترهای اسپرم نیافته اند[٤، ٥، ١٩، ٥١و٥٢].

در تحقیق حاضر به دلیـل ملاحظـات اخلاقـی، مقـدور نبود که از مردان سالم و بارور نیز نمونه‌های مـایع منـی اخذ شود و با استفاده از گروه کنترل، مطالعه به صـورت case/control درآید؛ بنابراین، نمی توان صرفاً وجود این باکتری‌ها را دلیل اصلی ناباروری در افراد مورد مطالعـه دانـسته و بـا تکیـه بـر آن، تـأثیر ایـن بـاکتری‌هـا را بـر پارامترهـای اسـپرم سـنجید. امـا در مقایـسه‌ی میـانگین متغیرهای این مطالعه، در متغیر pH یک اختلاف معنی‌دار یافت شد؛ به این معنی کـه در دو گـروه "هـردو بـاکتری مثبت" و "فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبـت"، میـزان pH نسبت به گـروه "هـردو بـاکتری منفـی"، پـایین‌تـر و اسـیدی‌تـر بـود (بـه ترتیـب، p= ۰/۰۰٦ و p=۰/۰۳۱). در مطالعه‌ای که توسط وانگ و همکـارانش در کـشور چـین انجام شد[٥]، در افراد آلوده، میـزان pH نـسبت بـه افـراد منفی پایین‌تر بود(p<۰/۰٥)؛ که از این لحـاظ تـا حـدی بـا یافته تحقیق حاضر، مشابهت دارد.

در مطالعه حاضـر، بـین محـدوده سـنی افـراد مـورد مطالعـه و نتیجـه حاصـل ازکـشت یـا PCR، ارتبـاط معنی‌داری یافت نشد؛ اما افراد با محدوده سنی ٣٤ تـا ٤٣ سال نسبت به سایر گروه‌های سنی، آلودگی بیشتری بـه ایـن بـاکتری‌هـا داشـتند؛ نتـایج مطالعـه Golshani و همکارانش، بالاترین میزان آلودگی را در بین افـراد دارای محدوده سنی ۲۰ تا ۳۰ سال نشان می‌دهد.[٣٧]

در تحقیق حاضر هـیچ گونـه ارتبـاط معنـی‌داری بـین وجود لوکوسیت‌ها در مایع منی (Leukocytospermia) و نتیجـه حاصـل از کـشت یـا PCR یافـت نـشد؛ در سـایر مطالعات نیز نتایج مشابهی حاصل شـده اسـت.[٣٧، ٥٣و٥٤] Xu و همکارانش گزارش کرده‌اند کـه عفونـت تناسـلی بـا اوره‌آپلاسـما اوره‌آلیتیکـوم سـبب کـاهش قـدرت تحـرک اسـپرم مـی‌شـود.[٥٥] در مطالعـه حاضـر، یـک ارتبـاط معنی‌داری در مورد قدرت تحرک اسپرم، فقط در بـین دو گروه "فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت" و گروه "هر دو باکتری مثبت" یافت شد (p= ۰/۰۳۲) ؛ به این معنی که میانگین قدرت تحرک اسـپرم در گـروه "هـر دو بـاکتری مثبت" پایین‌تر بود.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

علت گزارش‌های متناقض در مورد تأثیرات مایکوپلاسماهای تناسلی بر پارامترهای اسپرم، می‌تواند به واسطه عواملی همچون: نحوه انتخاب بیماران، تعداد نمونه‌های مورد مطالعه، استفاده از روش‌های تشخیصی متفاوت، تفاوت در توزیع جغرافیایی جمعیت‌ها، میزان و شدت کلونیزاسیون باکتری در مجاری ادراری-تناسلی و دخالت فاکتورهای ژنتیکی باشد.

با توجه به یافته‌های این تحقیق، درصد نسبتاً بالایی از مردان نابارور به این دو باکتری آلوده‌اند. چنانکه اشاره شد، حضور مایکوپلاسماها و اوره‌آپلاسماها در مجاری ادراری-تناسلی، اغلب بدون علامت بالینی می‌باشد؛ با نظر به عواقب خطرناک این عفونت‌ها از جمله PID و ناباروری، غربالگری میکروبی برای مردان نابارور و همسران آن‌ها به خصوص در سنین جوانی، امری اجتناب ناپذیر بوده و می‌تواند به عنوان بخش مهمی از برنامه "کنترل بیماری‌های منتقله از راه تماس جنسی" به شمار آید.

همچنین با توجه به اینکه وجود لوکوسیت در مایع منی، شاخص قابل اعتمادی برای پیش بینی عفونت‌های مایکوپلاسمایی نمی باشد؛ لذا لازم است که غربالگری‌های میکروبی برای همه مردان نابارور به عنوان تست روتین در حضور یا غیاب لوکوسیت‌ها در مایع منی، انجام پذیرد و در صورت آلوده بودن به این باکتری‌ها، درمان زوجین به صورت همزمان با هم صورت گیرد.

در این امر، هرچند که روش کشت روشی ارزان‌تر و قابل دسترس‌تر می‌باشد، اما به دلیل حساس بودن و "سخت رشد" بودن مایکوپلاسماها، می‌تواند دارای نتایج منفی کاذب باشد و همچنین یک روش نسبتاً طولانی بوده و درحد چند روز زمان لازم است تا نتیجه آن مشخص گردد. در حالی که روش PCR، یک روش حساس‌تر و سریع‌تر و دارای ویژگی بالا بوده و می‌تواند بر خلاف روش کشت، حتی DNA باکتری‌های مرده را نیز شناسایی کند.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نهایت تشکر و قدردانی خود را از مسئولین محترم پژوهشکده رویان، به خصوص معاونت پژوهشی و همچنین کارکنان آزمایشگاه روتین آن پژوهشکده که ما را در راه انجام این تحقیق یاری دادند، اعلام می‌داریم.

فهرست منابع

1- Kilic D, Basar M, Kaygusuz S, Yilmaz E, Basar H, Batislam E. Prevalence and treatment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, and Mycoplasma hominis in patients with non-gonococcal uretritis. Jpn J Infect Dis; 2004. 57: 17-20.

2- Upadhyaya M, Hibbard BM, Walker SM. The effect of Ureaplasma urealyticum on semen characteristics. Fertil Steril; 1984. 41: 304-08.

3- De Jong Z, Pontonnier F, Plante P, Perie N, Talazac N, Mansat A, et al. Comparison of the incidence of Ureaplasma urealyticum in infertile men and in donors of semen. Eur Urol; 1990. 18: 127-31.

4- Andrade-Rocha FT. Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in men attending for routine semen analysis. Prevalence, incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with the leukocyte count and clinical value. Urol Int; 2003. 71: 377-81.

5- Wang Y, Liang CL, Wu JQ, Xu C, Qin SX, Gao ES. Do Ureaplasma urealyticum infections in the genital tract affect semen quality? Asian J Androl; 2006. 8: 562-68.

6- Keck C, Gerber-Schafer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldf M. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. Hum Reprod Update; 1998. 4(6): 891-903.

7- Askienazy-Elbhar M. Male genital tract infection: the point of view of the bacteriologist. Gynecol Obstet Fertil; 2005. 33: 691-97.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

8- Paavonen J, Wolner-Hassen P. Chlamydia trachomatis a major threat to reproduction. Hum Reprod; 1989. 4: 111-24.

9- Vigil P, Morales P, Tapia A, Riquelme R, Salgado AM. Chlamydia trachomatis infection in male partners of infertile couples: incidence and sperm function. Andrologia; 2002. 34: 155-61.

10- Winn JrW, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenrger P, Woods G. Mycoplasmas and Ureaplasma; Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Company; 2006.p. 1028-33.

11- Rose BI, Scott B. Sperm motility, morphology, hyperactivation and ionophore- induced acrosome reactions after overnight incubation with Mycoplasmas. Fertil Steril; 1994. 61(2): 341-46.

12- Jakiel G, Robak- Cholubek, Wieczorek P, Bokiniec M. Evaluation of some parameters of human semen with positive chlamydial reaction. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska; 2004. 5(92): 644.

13- Veznik Z, Pospisil L, Svecova D, Zajicova A, Unzeitig V. Chlamydiae in the ejaculate: their influence on the quality and morphology of sperm. Acta Obstet Gynecol Scand; 2004. 83(7): 656-60.

14- Wang Y, Han XD, Hou YY, Chen JX. Ureaplasma urealyticum infection related to seminal plasma immunosuppressive factors, semen pH and liquefaction duration. Arch Androl; 2005. 51(4): 267-70.

15- Lu MG, Shi JL, Xu C. Establishment and application of the approach to detecting two biovars of Ureaplasma urealyticum in human semen. Zhonghua Nan Ke Xue; 2005. 11(3): 175-78, 184.

16- Yoshida T, Maeda S, Deguchi T, Miyazawa T, Ishiko H. Rapid detection of Mycoplasma genitalium, by PCR-microtiter plate hybridization assay. J Clin Microbiol; 2003. 41: 1850-855.

17- Soffer Y, Ron-El R, Golan A, Herman A, Caspi E, Samra Z. Male genital mycoplasmas and Chlamydia trachomatis culture: its relationship with accessory gland function, sperm quality, and autoimmunity. Fertil Steril; 1990. 53: 331-36.

18- Svenstrup HF, Fedder J, Abraham-Peskir J, Birkelund S, Christiansen G. Mycoplasma genitalium attaches to human spermatozoa. Hum Reprod; 2003. 18(10): 2103-109.

19- Diaz-Garcia FJ, Herrera-Mendoza AP, Giono-Cerezo S, Guerra-Infante FM. Mycoplasma hominis attaches to and locates intracellularly in human spermatozoa. Hum Reprod; 2006. 21(6): 1591-598.

20- Gerbase AC, Rowley JT, Heymann DH, Berkley SF, Piot P. Global prevalence and incidence estimates of selected curable STDs. Sex Transm Infect; 1998. 74: 12-16.

21- Gonzales GF, Munoz G, Sanchez R, Henkel R, Gallegos-Avila G, Diaz-Gutierrez O, et al. Update on the impact of Chlamydia trachomatis infection on male fertility. Andrologia; 2004. 36: 1-23.

22- O'Leary WM. Ureaplasmas and human disease. Crit Rev Microbiol; 1990. 17(3): 161-68.

23- Purvis K, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. Int J Androl; 1993. 16: 1–13.

24- Montagut JM, Lepretre S, Degoy J, Rousseau M. Ureaplasma in semen and IVF. Hum Reprod; 1991. 6: 727-29.

25- Reichart M, Kahane I, Bartoov B. In vivo and in vitro impairment of human and ram sperm nuclear chromatin integrity by sexually transmitted Ureaplasma urealyticum. Infect Biol Reprod; 2000. 63: 1041-48.

26- Gdoura R, Kchaou W, Ammar-keskesL, Chacroun N, Sellemi A, Znazen A, et al. Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. J Androl; 2008. 29(2): 198-206.

27- Dhawan B, Gupta V, Khanna N, Singh M, Chaudhry R. Evaluation of the diagnostic efficacy of PCR for Ureaplasma urealyticum infection in indian adults with symptoms of genital discharge. Jpn J Infect Dis; 2006. 59: 57-58.

28- Neyrolles O, Eliane JP, Ferri S, Da-cunda RA, Prevost MC, Blanchard A. Antigenic characterization and cytolocalization of P35, the major Mycoplasma penetrans antigen. Microbiology; 1999. 145: 343-55.

29- Colle JG, Duguid JP, Fraser AG, Marmion BP. Mackie and McCartney practical medical microbiology. 13th ed. UK: Churchill Livingstone; 1989.p. 300-311.

30- Blanchard A, Yanez A, Dybvig K, Watson HL, Griffiths G, Cassell GH. Evaluation of intraspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of Mycoplasma hominis and detection by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol; 1993. 31: 1358-61.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

31- Blanchard A, Duffy L, Baldus K, Cassel GH. Detection of Ureaplasma urealyticum by polymerase chain reaction in the urogenital tract of adults in amniotic fluid and in the respiratory tract of newborns; Clin Inf Dis; 1993. 17(Suppl 1): 148-53.

32- Coskun E, Ozkan S, Vural B. Impact of Genital Infections on Fertility. J Turkish German Gynecol Assoc; 2005. 6(3): 197-203.

33- Amelar RD, Dubin L, Walsh PC. The varicocele and infertility. Male Infertility. Philadelphia, PA: WB Saunders Co; 1977.p. 57-68.

34- Knox C L, Allan JA, Allan JM, Edirisinghe WR, Stenze DL, Lawrence FL, et al. Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum are detected in semen after washing before assisted reproductive technology procedures. Fertil Steril; 2003. 80: 921-29.

35- Rosemond A, Lanotte P, Watt S, Sauget AS, Guerif F, Royere D, et al. Systematic screening tests for Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in urogenital specimens of infertile couples. Pathol Biol (Paris); 2006. 54(3): 125-29.

36- Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, et al. Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men. BMC Infectious Diseases; 2007. 7: 129.

37- Golshani M, Eslami G, Mohhammadzadeh Ghobadloo Sh, Fallah F, Goudarzi H, Soleimani Rahbar AA, et al. Detection of Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum by Multiplex PCR in Semen Sample of Infertile Men. Iranian J Publ Health; 2007. 36(2): 50-57.

38- Niakan M, Forootan SK, Fallah N, Shafiei M, Sedighi MA, Nejad Moghaddam MR, et al. Detection the frequency of M. Hominis in infertile men with control group. Daneshvar, Scientific-Research Journal of Shahed University(in Persian); 2005. 56(12): 65-72.

39- Kjaergaard N, Kristensen B, Hansen ES, Farholt S, Schonheyder HC, Uldbjerg N, et al. Microbiology of semen specimens from males attending a fertility clinic. APMIS; 1997. 105(7): 566-70.

40- Rodriguez R, Hernandez R, Fuster F, Torres A, Prieto P, Alberto J. Genital infection and infertility. Enferm Infec Microbiol Clin; 2001. 19(6): 261-66.

41- Pacey AA, Eley A. Chlamydia trachomatis and male fertility. Hum Fertil (Camb); 2004. 7(4): 271-76.

42- Samra Z, Soffer Y, Pansky M. Prevalence of genital chlamydia and mycoplasma infection in couples attending a male infertility clinic. Eur J Epidemiol; 1994. 10(1): 69-73.

43- Potts JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A. Association of Ureaplasma urealyticum with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. J Urol; 2000. 163: 1775-78.

44- Abele-Horn M, Wolff C, Dressel P, Zimmermann A, Vahlensieck W, Pfaff F, et al. Polymerase Chain Reaction versus culture for detection of Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis in the urogenital tract of adults and the respiratory tract of newborns. Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 1996. 15: 595-98.

45- Luki N, Lebel P, Boucher M, Doray B, Turgeon J, Brousseau R. Comparison of Polymerase Chain Reaction assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections; Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 1998. 17: 255-63.

46-. Teng K, Li M, Yu W, Li H, Shen D, Liu D. Comparison of PCR with culture for detection of Ureaplasma urealyticum in clinical samples from patients with urogenital infections. J Clin Microbiol; 1994. 32: 2232-34.

47- Polveson K, Jensen JS, Lind I. Detection of Ureaplasma urealyticum by PCR and biovar determination by liquid hybridization. J Clin Microbiol; 1998. 36: 3211-16.

48- Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. J Clin Microbiol; 2004. 42: 1528-33.

49- Serin MS, Evruke C, Kibar F, Koksal F. Comparison of PCR and cultivation methods to determine the incidence of infections due to Mycoplasma hominis, and Mycoplasma fermentans in women genitourinary tract. Eastern J Med; 2001. 6: 48-52.

50- Petrikkos GL, Hadjisoteriou M, Daikos GL. PCR versus culture in the detection of vajinal Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis. Int J Gynecol Obstet; 2007. 10: 1-2.

51- Bornman MS, Mahomed MF, Boomker D, Schlenburg GW, Reif S, Crewe- Brown HH. Microbial flora in semen of infertile African men at Garankuwa hospital. Andrologia; 1990. 22(2): 118-21.

52- Ochsendorf FR, Ozdemir K, Rabennou H, Fenner T, Oremek R, Milbradt R, et al. Chlamydia trachomatis and male infertility: chlamydia- IgA antibodies in

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

seminal plasma are C. trachomatis specific and associated with an inflammatory response. J Eur Acad Dermatol Venereol; 1999. 12(2): 143-52.

53- Solis EA, Gatti VN, Bouvet BR, Brufman AS, Catalina Provenzal O, Feldman R. Round cells in semen and genital infections. Arch Esp Urol; 2000. 53(2): 101-05.

54- Trum JW, Mol BW, Pannekoek Y, Spanjaard L, Wertheim P, Bleker OP, et al. Value of detecting leukocytespermia in the diagnosis of genital tract infection in subfertile men. Fertil Steril; 1998. 70(2): 315-19.

55- Xu C, Sun GF, Zhu YF, Wang YF. The correlation of Ureaplasma urealyticum infection with infertility. Andrologia; 1997. 29: 219-26.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]

Comparison of Culture with PCR for Detection of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in Semen Samples of Infertile Men Referring to the Royan Institute in 2009

***M.H. Ahmadi, MSc[I] N. Amirmozafari, PhD[II]**
M.A. Sedighi-Gilani, MD[III] B. Kazemi, PhD[IV]
F. Masjedian-Jazi, MSc[V]

Abstract

Background: Infection due to genital Mycoplasmas such as *Mycoplasma hominis (M.hominis)* and *Ureaplasma urealyticum (U.urealyticum)* may have harmful effects on the reproductive health of men and may lead to male infertility. This study was performed to compare culture with PCR method for detection of these bacteria in infertile men who referred to the Royan Institute.

Methods: In this descriptive-analytic, cross-sectional study semen samples were collected from 220 infertile men and divided to 3 sections: first section was used for semen analysis, second section was inoculated into PPLO broth transport media and passed through 0.45µm pore-size filters, then filtrates were inoculated into specific PPLO broth and agar media and incubated at 37˚C under elevated CO2 atmosphere and the third section was used for PCR in which U4 and U5 primers were used for amplification of Urease gene of *U. urealyticum* and RNAH1 and RNAH2 for amplification of 16S rRNA gene of *M. hominis*. The results were analyzed with SPSS V.16 software. For data analysis ANOVA, Post Hoc, Crosstabs, Chi square and Mc Nemar tests were used.

Results: From a total of 220 semen samples tested, 3.2% were positive with culture and 4.1% with PCR method for only *M. hominis*; meanwhile 27.7% were positive with culture and 29.1% with PCR for only *U. urealyticum*. Also 5% of the samples in culture and 11.4% in PCR method were positive for both of the bacteria; evaluation of semen parameters showed that in both culture and PCR methods, pH was lower in the two groups of "only *U. urealyticum* positive" and "positive for both bacteria" as compared to the group "negative for both bacteria" (p=0.006 and p=0.000 respectively for culture and PCR) and the mean of sperm motility was lower in group "positive for both bacteria" than the group "only *U. urealyticum* positive" in two methods: p=0.032(culture), p=0.009(PCR).

Conclusion: Results of this study showed that higher percentage of infertile men are infected with these bacteria which may lead to infertility; thus, isolation of these bacteria in infertile men with no clinical symptoms is necessary. PCR as compared to culture is a more sensitive, quick, specific and fast method.

Keywords: 1) Mycoplasma hominis 2) Ureaplasma urealyticum 3) Infertile men 4) Semen culture 5) Semen PCR

This article is a summary of the thesis by M.H. Ahmadi for the degree of MSc in Microbiology under supervision of N. Amirmozafari, Ph.D and consultation with M.A. Sedighi-Gilani, MD, B. Kazemi, Ph.D and F. Masjedian-Jazi, MSc (2008).

*I) MSc in Microbiology, Microbiology Department, Crossing of Shahid Hemmat and Chamran Expressways, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran (*Corresponding Author)*
II) Associate Professor of Microbiology, Microbiology Department, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran
III) Associate Professor of Andrology, Male Infertility Department, Royan Institute, Tehran, Iran
IV) Professor of Parasitology, Molecular Biology Research Center, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran
V) MSc in Microbiology, Faculty Member, Microbiology Department, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2023-04-01]