

# مقایسه دو روش کشت و PCR در جداسازی مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم از مایع منی مردان نابارور مراجعه کننده به پژوهشکده رویان در سال ۱۳۸۸

## چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های ناشی از مایکوپلاسماهای تناسلی می‌تواند تأثیرات منفی بر سلامت تناسلی مردان داشته و به ناباروری متنه‌گردد. هدف از این تحقیق، بررسی وجود مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور مراجعه کننده 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 و سریعاً از فیلترهای ۰/۴۵ میکرومتر( $\mu\text{m}$ ) عبور و طبق دستورالعمل، در محیط‌های اختصاصی مایع و جامد PCR کشت و در دمای  $37^\circ\text{C}$  و در مجاورت  $\text{CO}_2$  تکه‌داری شد و بخش سوم نمونه به منظور انجام PPLO استفاده شد که برای شناسائی اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم 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 Post Hoc ANOVA، Crosstab و Chi Square استفاده شد.

یافته‌ها: از مجموع ۲۲۰ نمونه مایع منی شده با استفاده از روش کشت، ۴٪ و با روش PCR ۲/۲٪ از نمونه‌ها فقط از نظر مایکوپلاسما هومینیس مثبت بود. با روش کشت، ۷/۷٪ و با PCR ۹/۲٪ فقط از نظر اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم مثبت بود؛ با روش کشت، ۵٪ نمونه‌ها و با PCR، ۱۱٪ از نظر هر دو باکتری مثبت بودند. در بررسی متغیرها در دو روش کشت و PCR در دو گروه " فقط اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم مثبت" و "هر دو باکتری مثبت"، میانگین  $\text{pH}$  نسبت به گروه "هر دو باکتری منفی"، پایین‌تر و اسیدی‌تر بود( $p=0.006$ ). (PCR) و (PCR) و نیز قدرت تحرک اسپرمهای در گروه "هر دو باکتری مثبت" نسبت به گروه " فقط اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم مثبت" پایین‌تر بود( $p=0.022$ ) و ( $p=0.009$ ).

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

کلیدواژه‌ها: ۱- مایکوپلاسما هومینیس ۲- اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم ۳- مردان نابارور ۴- کشت مایع منی ۵- PCR

\* محمدحسین احمدی

دکتر نور امیرمظفری

دکتر محمدعلی صدیقی گیلانی

دکتر بهرام کاظمی

فرامرز مسجدیان جزی

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

## مقدمه

معمولی را دارند. این باکتری‌ها به همراه کلامیدیا تراکوماتیس (Chlamydia trachomatis) جزء شایع‌ترین عوامل ایجادکننده اورتیت غیر گنوکوکی (Non Gonococcal Urethritis=NGU) و سایر عوارض

مایکوپلاسما هومینیس (Mycoplasma hominis) و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم (Ureaplasma urealyticum)، از کوچکترین باکتری‌هایی هستند که قادر دیواره سلولی بوده و توانایی رشد در محیط‌های کشت

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

(I) کارشناس ارشد میکروب شناسی، تقطاع بزرگاه‌های 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 آنдрولوژی، 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

عفونت بدون علامت بالینی ناشی از این باکتری می‌تواند سبب سوء عملکرد غدد ضمیمه‌ای جنسی (Accessory sex glands) گردد.<sup>(۲۲)</sup> 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.<sup>(۲۳و۲۴)</sup>

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.<sup>(۲۵و۲۶)</sup> هرچند که در کشورهای در حال توسعه، این جایگاه هنوز به طور کامل مشخص نشده است.<sup>(۲۷)</sup>

مطالعات نشان می‌دهد در صورت عدم تشخیص، پیشگیری و درمان مناسب، عفونت‌های مایکوپلاسمایی به طور مستمر باقی مانده و منجر به عواقب خطربناکی مانند بیماری‌های التهابی لگن و ناباروری می‌گردد.<sup>(۲۸)</sup>

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 مایکوپلاسمما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلتیکوم 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

دستگاه ادراری-تناسلی می‌باشند.<sup>(۱)</sup> این میکروارگانیسم‌ها، به خصوص اوره آپلاسما اوره آلتیکوم 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.<sup>(۲-۵)</sup>

عفونت مجرای ادراری-تناسلی مردان، یکی از مهم‌ترین عوامل ناباروری مردان می‌باشد<sup>(۶)</sup>؛ به طوری که ۸-۲۵٪ موارد ناباروری مردان در سراسر جهان مربوط به این عفونت‌ها می‌باشد.<sup>(۷)</sup> مطالعات مختلف در کشورهای توسعه یافته نشان داده است که عفونت‌های ناشی از مایکوپلاسماهای اوره آپلاسماهای تناسلی می‌تواند به ناباروری و نازایی منتهی شود.<sup>(۷-۹و۵و۲)</sup> عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها اغلب بدون علامت بوده که این امر می‌تواند تأثیرات منفی بر سلامت تناسلی مردان داشته باشد<sup>(۱۰و۱۱)</sup> که شامل تأثیرات منفی بر حجم، pH، تحرک، مورفوЛОژی، تعداد و قابلیت حیاتی اسپرم‌ها می‌باشد.<sup>(۱۱-۱۵)</sup>

علاوه بر نقش مایکوپلاسما هو مینیس در بیماری‌های التهابی لگن، واژینوز باکتریایی، غیره<sup>(۱۷و۱۶)</sup> می‌تواند با اتصال به سر، دم و بخش میانی اسپرم‌ها (جهت کسب استروئیدهای مورد نیاز خود) سبب بی حرکت شدن آن‌ها<sup>(۱۸)</sup> و حتی نفوذ به داخل اسپرم‌ها گردد.<sup>(۱۹)</sup>

اوره آپلاسما اوره آلتیکوم 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.<sup>(۲۰و۲۱)</sup> 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 مشکل از اسپرم‌ها (Multisperm agglutination) تحرک اسپرم‌ها می‌گردد.<sup>(۲۲)</sup> شواهد نشان می‌دهد که

در پیچ دار استریل در حجم ۴ میلی لیتر توزیع گردید. بخش سوم نمونه‌ها نیز به منظور انجام تست PCR، در دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۲۰–تا زمان انجام تست، نگهداری شد.

#### کشت نمونه‌های مایع منی و جداسازی باکتری‌ها

پس از انتقال محیط‌های ترانسپورت به آزمایشگاه، نمونه‌ها از فیلترهای سرسرنگی ۴۵٪ میکرومتر عبور داده شده و به داخل محیط‌های اختصاصی Arginine PPLO Urea broth (جهت جداسازی مایکوپلاسمای هومینیس) و PPLO broth (جهت جداسازی اوره‌آپلاسمای اوره‌آلیتیکوم) (Candle jar) تلقیح شد و پس از قرار گیری در جار شمع دار  $^{\circ}\text{C}$  ۳۷ (جهت تامین  $\text{CO}_2$ ، در انکوباتور با دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۳۷) به مدت ۵ روز نگهداری شد. جهت تهیه محیط‌های به ازای هر ۷۰ میلی لیتر از Arginine/Urea PPLO broth محیط پایه Difco<sup>TM</sup> PPLO Broth، مواد زیر افزوده شد: ۱۰ میلی لیتر عصاره مخمر ۱۰٪، ۱ میلی لیتر فنل رد ۲٪، ۲۰ میلی لیتر سرم اسب استریل، ۱ میلی لیتر پنی‌سیلین G (U ۵۰۰۰) و ۱۰ میلی لیتر آرژینین یا اوره ۱٪ که به جزء عصاره مخمر، بقیه مواد فوق پس از اتوکلاو نمودن محیط کشت و رسیدن دمای آن به  $^{\circ}\text{C}$  ۴۵–۴ در زیر هود به محیط افزوده شدند. pH نهایی برای محیط آرژینین دار روی ۷ و برای محیط اوره دار روی ۶/۶ تنظیم و سپس در داخل لوله‌های در پیچ 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 (Arginine/Urea PPLO Candle agar) کشت داده شدند؛ سپس پلیت‌ها در داخل jar و در دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۳۷ به مدت ۵ تا ۷ روز نگهداری شدند و در طی این مدت از نظر وجود کلنی در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند؛ کلنی‌های مایکوپلاسمای هومینیس در سطح محیط جامد شبیه تخم

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

- ۱- فاقد هرگونه علائم بالینی مربوط به عفونت‌های مجرای 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 ۴۸ 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 آسپرموگرام (Semen Analysis) مورد استفاده قرار گرفت؛ بخش دوم به محیط کشت ترانسپورت (PPLO Broth) تلقیح شده و بلافضلله 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 Difco<sup>TM</sup> PPLO broth ساخت شرکت Difco<sup>TM</sup> (PPLo Broth) در یک لیتر آب مقطر حل شده و سپس به ازای هر ۷۰ میلی لیتر از محیط (Yeast extract) میلی لیتر از محلول ۱۰٪ عصاره مخمر (Merck آلمان) اضافه شد و پس از اتوکلاو نمودن و رسیدن دمای آن به  $^{\circ}\text{C}$  ۴۵–۴۰، ۵ میلی لیتر سرم اسب استریل و ۱ میلی لیتر پنی‌سیلین G (U ۵۰۰۰) به آن افزوده شد و pH نهایی با استفاده از HCl و NaOH (یک نرمال) روی ۷ تنظیم شد و سپس در داخل لوله‌های

مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۶۵ درجه سلسیوس انکوبه شد و هر ۲-۳ دقیقه یک بار به آرامی به هم زده شد.

۲- در این هنگام، ۶۰۰ میکرولیتر کلروفوم به آن افزوده و با ۳ تا ۵ 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.

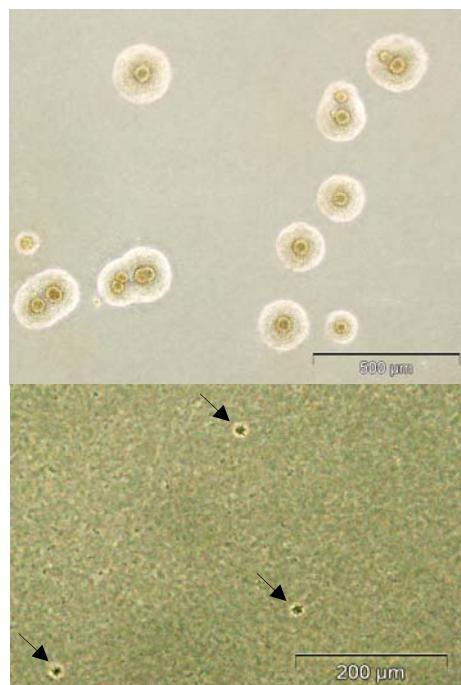
۳- در یک میکروتیوب دیگر، با مخلوط نمودن ۷۲۰ میکرولیتر از آب دیونیزه استریل با ۸۰ میکرولیتر از محلول (10x Concentrated) موجود در کیت، محلول رسوب دهنده (Precipitation solution) آماده گردید.

۴- 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 ۱-۲ دقیقه) در دمای اتاق به هم زده شد و پس از آن به مدت ۲ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید.

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

۶- سپس ۳۰۰ میکرولیتر اتانول سرد (۱۰۰٪-۹۶٪) 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 ۳-۴ 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.

مرغ نیمرو شده (Fried egg) بوده<sup>(۲۸)</sup>، در حالی که کلندی‌های 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).<sup>(۲۹)</sup>



شکل شماره ۱- کلندی‌های 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 (کلندی‌ها با نوک پیکان مشخص شده‌اند).

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

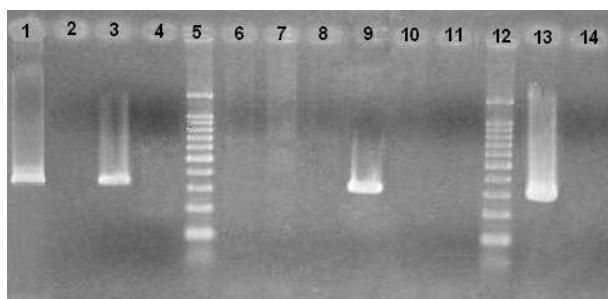
جهت استخراج DNA این دو باکتری، از کیت تخلیص (Genomic DNA Purification kit #K0512) مربوط به شرکت Fermentas تحت عنوان استفاده شد. طبق دستور العمل شرکت سازنده کیت، DNA نمونه‌های فریز شده پس از خروج از فریزر بدون اینکه ذوب شوند، به صورت زیر استخراج شد:

۱- ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه، با ۴۰۰ میکرولیتر از محلول لیز (Lysis solution) در داخل یک میکروتیوب،

جدول شماره ۱- برنامه دمایی PCR (PCR Amplification) جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر برای هر دو باکتری مورد مطالعه				
	تعداد	زمان	دما (°C)	مراحل
سیکل				
۱	۵ دقیقه	۹۵	۱- واسر شت اولیه (Initial Denaturation)	
۲۰	ثانیه	۹۵	۲- واسر شت (Denaturation)	
۴۰	۴۵ ثانیه	<i>U.urealyticum:</i> <i>M.hominis:</i>	۳- اتصال پرایمرها (Annealing)	
۱	۵ دقیقه	۵۴ ۵۵	۴- سنتز (Extension)	
		۷۲	۵- سنتز نهایی (Final Extension)	

### انجام الکتروفورز و آشکارسازی محصولات PCR:

پس از تهیه ژل اگاروز ۱/۵٪ و رسیدن دمای آن به حدود ۴۵°C، به ازای هر ۱۰ میلی لیتر 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 ۳-۵ 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، ۲، ۳ و ۱۹ از نظر مایکوپلاسما هومینیس مثبت بوده در حالی که نمونه‌های شماره ۴، ۶، ۸، ۷، ۱۰ و ۱۱ از نظر این باکتری منفی هستند؛ نمونه‌های شماره ۵ و ۱۲ به عنوان مارکر، نمونه شماره ۱۳ کنترل مثبت (۳۲۴ bp) و نمونه شماره ۱۴، کنترل منفی می‌باشد.

### جستجوی ژنوم مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما

اوره آلتیکوم در نمونه‌های مایع منی به روش PCR:

جهت انجام PCR، از کیت (PCR Master Mix) #k0171 مربوط به شرکت Fermentas که حاوی آنزیم Taq DNA Polymerase (۰/۰۵ واحد بین المللی بر میکرولیتر)، MgCl<sub>2</sub> (۴ میلی مول بر لیتر) و dNTP (۴ میلی مول بر لیتر) می‌باشد، استفاده گردید. پرایمرهای مایکوپلاسما هومینیس که جهت تکثیر ناحیه ۱۶S rRNA (۳۲۴ bp) این باکتری مورد استفاده قرار گرفت (۲۰) عبارتند از:

RNAH1: CAATGGCTAATGCCGGATAACGC

RNAH2: GGTACCGTCAGTCTGCAAT

و توالی پرایمرهای اوره آپلاسما اوره آلتیکوم که به منظور تکثیر ناحیه ۴۲۹ bp ژن Urease این باکتری مورد استفاده قرار گرفت (۲۱) به صورت زیر بود:

U4: ACGACGTCCATAAGCAACT

U5: CAATCTGCTCGTGAAGTATTAC

در این تحقیق، از DNA حاصل از محلول کانی 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 Master Mix در دمای اتاق ذوب شد. سپس، ابتدا یک ساخته شد و در حجم مورد نظر بین میکروتیوب‌ها تقسیم گردید. ترکیب PCR Master Mix برای هر نمونه به این ترتیب بود:

Primer Mix .PCR Master Mix (۲x): ۱۲/۵ μl Water (nuclease free): ۱/۵ μl (۰/۰۴ μM) و هر میکروتیوب، ۱۰ میکروگرم (۲ میکروگرم) از DNA الگوی مخصوص به آن اضافه شد تا حجم نهایی PCR به ۲۵ میکرولیتر برسد. برنامه دمایی PCR Amplification (جهت تکثیر ژن‌های مطالعه) مربوط به هر کدام از دو باکتری مورد نظر مذکور مذکور است. برای این PCR، مطالعه، با ترتیب نشان داده شده در جدول شماره ۱ انجام پذیرفت.

نظر اورهآپلاسما اورهآلیتیکوم و ۲۵ مورد (۱۱/۴٪) نیز از نظر هر دو باکتری مثبت بودند. بنابراین، ۹۸ مورد (۴۴/۵٪) از کل نمونه‌ها حداقل از نظر یک باکتری مثبت بودند و به طور کلی ۳۴ مورد (۱۵/۵٪) مایکوپلاسما هومینیس و ۸۹ مورد (۴۰/۵٪) اورهآپلاسما اورهآلیتیکوم از نمونه‌ها جدا شد. در جدول شماره ۲، نتایج کلی حاصل از دو روش کشت و PCR آمده است.

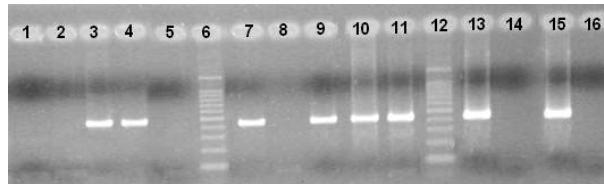
جدول شماره ۲- نتایج کلی حاصل از دو روش کشت و PCR

نتایج	کشت (درصد)	PCR (درصد)
فقط مایکوپلاسما هومینیس	۲/۲	۴/۱
مثبت		
فقط اورهآپلاسما اورهآلیتیکوم	۲۷/۷	۲۹/۱
مثبت		
هردو باکتری مثبت	۵	۱۱/۴
مایکوپلاسما هومینیس مثبت (در کل)	۸/۲	۱۵/۵
اورهآپلاسما اورهآلیتیکوم مثبت (در کل)	۲۲/۷	۴۰/۵
حداقل یک باکتری مثبت	۲۵/۹	۴۴/۵

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 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	باکتری جدا شده	کشت کشت کشت کشت
مایکوپلاسما هومینیس (تعداد)	۱۶	۱۸	۲	۱۸۴
اورهآپلاسما اورهآلیتیکوم (تعداد)	۶۹	۲۰	۳	۱۲۸



شکل شماره ۳- تصویر ژل الکتروفوروز محصول PCR اورهآپلاسما اورهآلیتیکوم: نمونه‌های شماره ۳، ۴، ۵، ۶ و ۱۳ از نظر اورهآپلاسما اورهآلیتیکوم مثبت بوده در حالی که نمونه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲ و ۱۴ از نظر این باکتری منفی هستند؛ نمونه‌های شماره ۶ و ۱۲ به عنوان مارکر، نمونه شماره ۱۵ کنترل مثبت (۴۲۹ bp) و نمونه شماره ۱۶، 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  $p < 0.05$  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، ۶۱ 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 (۴/۱٪) از نمونه‌ها فقط از نظر مایکوپلاسما هومینیس، ۶۴ مورد (۲۹/۱٪) فقط از

نتایج نشان داد که در هر دو روش کشت و PCR، فقط در مورد متغیر pH رابطه معنی‌دار بود [p<0.013]؛ در حالی [p-value(Culture)=0.004]؛ در مورد سایر متغیرها رابطه معنی‌داری مشاهده نشد. سپس از آزمون تعقیبی (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 (۱) و (۲) نشان داد (Culture) (p=0.031) و (PCR) (p=0.007). همچنین اختلاف معنی‌داری در این متغیر در بین دو گروه (۱) و (۴) مشاهده گردید (Culture) (p=0.006) و (PCR) (p=0.000). این بدين معنی است که در دو گروه (۳) و (۴) یعنی گروه "فقط اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم مثبت" و گروه "هردو باکتری مثبت"، میانگین pH نسبت به گروه (۱)، 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 (۳) و (۴) اختلاف معنی‌داری (p<0.032) (Culture) (p=0.009)؛ این بدين معنی است که میانگین قدرت تحرک اسپرم‌ها در گروه "هردو باکتری مثبت" نسبت به گروه "فقط اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم 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 هر کدام از سه متغیر گروه سنی (جداول شماره ۴ و ۵)، ویسکوزیته و آزوسپرمیا مورد بررسی قرار گرفت که وقتی از آزمون Chi-Square (2) معنی‌داری در بین هیچ کدام از این موارد مشاهده نشد.

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 ۴۰٪ متغیر بود و ۲۸/۶٪ دارای قدرت تحرک برابر با صفر درصد (فاقد قدرت تحرک) بودند؛ میانگین قدرت تحرک در بین کل نمونه‌ها ۱۶/۲۶٪ با انحراف معیار برابر با ۱۳/۱۶ بود. میزان مورفوЛОژی نرمال (Normal morphology) در نمونه‌ها از صفر تا ۲۵٪ متغیر بود و ۴/۵ آن‌ها دارای مورفوLOژی نرمال برابر با صفر درصد (فاقد مورفوLOژی طبیعی) بودند. میانگین مورفوLOژی نرمال در نمونه‌ها ۴/۵٪ با انحراف معیار ۵/۶۳ بود.

تعداد اسپرم در هر میلی لیتر مایع منی (Sperm count/ml) در نمونه‌ها از صفر تا ۱۴۰ میلیون متغیر بود و میانگین آن ۱۶/۶۳ میلیون با انحراف معیار ۲۶/۶۲ بود.

میزان pH در نمونه‌ها از ۶ تا ۸/۱ متغیر بود و ۶۳/۲٪ دارای pH برابر با ۷/۸ بودند؛ میانگین pH در نمونه‌ها ۷/۷۵٪ با انحراف معیار ۰/۱۷ بود. میانگین چسبندگی طبیعی (Normal viscosity) ۱۵/۵٪ دارای چسبندگی طبیعی (Somewhat thick) و ۷/۷٪ ویسکوزیته از نوع Thick (غلیظ) داشتند.

۲۰/۹٪ از نمونه‌های دارای عارضه آزوسپرمیا (Azoospermia) بودند. حداقل و حداکثر سن افراد مورد مطالعه به ترتیب ۲۳ و ۵۴ سال و میانگین آن ۳۵/۲۲ سال با انحراف معیار ۵/۵۰ بود.

نتایج حاصل از کشت و همچنین PCR به چهار گروه تقسیم شد که عبارتند از: گروه (۱): هردو باکتری منفی، گروه (۲): فقط مایکوپلاسما هومینیس مثبت، گروه (۳): فقط اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم مثبت و گروه (۴): هردو باکتری مثبت.

جهت بررسی اختلاف میانگین متغیرها در این چهار گروه، از تست ANOVA (آنالیز واریانس) استفاده شد که

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.<sup>(۲۲)</sup> 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.<sup>(۲۳)</sup> در این میان، یکی از مهم‌ترین عوامل ناباروری مردان، عفونت‌های مجرای ادراری-تناسلی می‌باشد.<sup>(۲۴)</sup>

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.<sup>(۲۵-۲۷)</sup> این محدوده وسیع، مربوط به روش‌ها و تست‌های تشخیصی متفاوتی است که جهت بررسی جمعیت‌های مختلف به کار رفته است.<sup>(۲۶)</sup> در تحقیق حاضر، شیوع اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در مایع منی مردان نابارور، با روش کشت ۳۲٪ و با روش PCR ۴۰٪ 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

جدول شماره ۴- توزیع نتایج کشت بر حسب گروه سنی

درصد	تعداد و درصد موارد بر حسب گروه سنی																	
نتایج کشت	تعداد	بالاتر	از	-۵۲	-۳۳	۴۳-۴۲	۲۲	از	۵۳	سال	سال	سال	سال	سال	سال	سال		
هر گروه	۱۴۱	۶	۱	۱	۶۳	۷۱	۴۴	۴۴	۵۳	۲۲	۴۳-۴۲	۳۴-۴۳	۲۲	۴۴	۴۴	۴۳-۴۲		
گروه (۱): هردو باکتری منفی	۷	۰	۰	۰	۳	۴	۰	۰	۵۳	۳	۴۲/۹	%۴۲/۹	%۴/۷	%۴۰/۴	%۴/۳	%۰/۷	%۱۰۰/۰	
گروه (۲): فقط مایکوپلاسما	۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	%۱۰۰/۰	
همینیس مثبت	۱۱	۰	۰	۰	۱۹	۲۷	۵	۰	۵۳	۰	۳۱/۱	%۳۱/۱	%۶۰/۷	%۵۷/۱	%۵۷/۱	%۸/۲	%۰/۰	%۱۰۰/۰
گروه (۳): فقط اوره‌آلیتیکوم	۲۲۰	۱	۱۲	۱۱۹	۸۸	۱۱۹	۱۲	۱۲	۵۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	%۰/۰	%۱۰۰/۰
مثبت	۱۱	۰	۰	۰	۳	۷	۱	۰	۵۳	۰	۲۷/۳	%۲۷/۳	%۶۳/۶	%۶۳/۶	%۹/۱	%۰/۰	%۱۰۰/۰	
گروه (۴): هردو باکتری مثبت	۱۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	%۰/۰	%۱۰۰/۰
تعداد و درصد از کل نمونه‌ها	۲۲۰	۱	۱۲	۱۱۹	۸۸	۱۱۹	۱۲	۱۲	۵۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	%۰/۰	%۱۰۰/۰

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

درصد	تعداد و درصد موارد بر حسب گروه سنی																	
نتایج PCR	تعداد	بالاتر	از	-۵۲	-۳۳	۴۴	۵۳	از	۵۳	سال	سال	سال	سال	سال	سال	سال		
هر گروه	۱۲۲	۱	۶	۵۹	۵۶	۵۹	۶	۱	۵۳	۰	۲۲-۳۳	%۴۵/۹	%۴۸/۴	%۴/۹	%۰/۸	%۱۰۰/۰		
گروه (۱): هردو باکتری منفی	۹	۰	۰	۰	۳	۶	۰	۰	۵۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	%۱۰۰/۰	
گروه (۲): فقط مایکوپلاسما	۹	۰	۰	۰	۰	۶	۰	۰	۵۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	%۱۰۰/۰	
همینیس مثبت	۶۴	۰	۴	۳۹	۲۱	۳۹	۴	۰	۵۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	%۱۰۰/۰	
گروه (۳): فقط اوره‌آلیتیکوم	۲۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	%۱۰۰/۰	
گروه (۴): هردو باکتری مثبت	۲۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۵۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	%۱۰۰/۰	
تعداد و درصد از کل نمونه‌ها	۲۲۰	۱	۱۲	۱۱۹	۸۸	۱۱۹	۱۲	۱	۵۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	%۰/۰	%۱۰۰/۰

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 (۰/۵٪) تعیین شد<sup>(۲۸)</sup> که نسبت به یافته مطالعه حاضر (۲/۸٪) در روش کشت، میزان بالاتری را نشان می‌دهد؛ البته در تحقیق فوق، تعداد افراد مورد بررسی محدود بود (۴۰ مرد نابارور و ۴۰ نفر مرد بارور) و بنابراین نمی‌تواند آمار صحیحی از شیوع این میکروارگانیسم‌ها را در برداشته باشد.

در سایر مطالعات شیوع مایکوپلاسما هومینیس و اورهآپلاسما اورهآلیتیکوم به ترتیب ۱۳-۵٪ و ۱۱-۳۵٪ گزارش شده است<sup>(۲۹-۳۰)</sup> 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٪ نمی‌باشد؛ 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 ۱۹۹۶ در آلمان<sup>(۴۴)</sup> و نیز Lukی و همکارانش در سال ۱۹۹۸ در کانادا<sup>(۴۵)</sup>، 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

۹/۶٪ و اورهآپلاسما اورهآلیتیکوم ۱۵/۴٪ گزارش شد.<sup>(۲۶)</sup> 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 ۷/۳۲٪ و با استفاده از روش PCR ۴۰/۵٪ بود که در مقایسه با مطالعه فوق، بالاتر است.

در مطالعه دیگری از Gdoura و همکاران، با استفاده از روش PCR در ۶/۷٪ از نمونه‌ها عفونت توأم این دو باکتری مشاهده شده است<sup>(۲۷)</sup>؛ 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 ۱۱/۴٪ از نمونه‌ها یافت شد. وجود عفونت توأم با این دو باکتری در مقالات مختلف، در ۷ تا ۱۴٪ از نمونه‌های مایع منی مردان نابارور گزارش شده است<sup>(۲۴-۲۶)</sup> 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<sup>(۵)</sup> که در مقایسه با یافته مطالعه حاضر از روش کشت (۷/۳۲٪)، 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.<sup>(۲۷)</sup> در تحقیق حاضر، با استفاده از روش کشت، ۹/۳۵٪ و با روش PCR، ۵/۴۴٪ از کل نمونه‌ها حداقل از نظر یکی از دو باکتری مورد مطالعه، مثبت بودند.

اخذ شود و با استفاده از گروه کنترل، مطالعه به صورت case/control درآید؛ بنابراین، نمی‌توان صرفاً وجود این باکتری‌ها را دلیل اصلی ناباروری در افراد مورد مطالعه دانسته و با تکیه بر آن، تأثیر این باکتری‌ها را بر پارامترهای اسپرم سنجید. اما در مقایسه‌ی میانگین متغیرهای این مطالعه، در متغیر pH یک اختلاف معنی‌دار یافت شد؛ به این معنی که در دو گروه "هردو باکتری مثبت" و " فقط اوره‌آپلاسمما اوره‌آلیتیکوم مثبت"، میزان pH نسبت به گروه "هردو باکتری منفی"، پایین‌تر و اسیدی‌تر بود (به ترتیب،  $p=0.006$  و  $p=0.021$ ). در مطالعه‌ای که توسط وانگ و همکارانش در کشور چین انجام شد<sup>(۵)</sup>، در افراد آلوده، میزان pH نسبت به افراد منفی پایین‌تر بود ( $p<0.05$ )؛ که از این لحاظ تا حدی با یافته تحقیق حاضر، مشابه است.

در مطالعه حاضر، بین محدوده سنی افراد مورد مطالعه و نتیجه حاصل از کشت یا PCR، ارتباط معنی‌داری یافت نشد؛ اما افراد با محدوده سنی ۲۴ تا ۴۳ سال نسبت به سایر گروه‌های سنی، آلودگی بیشتری به این باکتری‌ها داشتند؛ نتایج مطالعه Golshani و همکارانش، بالاترین میزان آلودگی را در بین افراد دارای محدوده سنی ۲۰ تا ۳۰ سال نشان می‌دهد.<sup>(۶)</sup>

در تحقیق حاضر هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین وجود لوکوسیت‌ها در مایع منی (Leukocytospermia) و نتیجه حاصل از کشت یا PCR یافت نشد؛ در سایر مطالعات نیز نتایج مشابهی حاصل شده است.<sup>(۷)</sup>  $Xu$  و همکارانش گزارش کردند که عفونت تناسلی با اوره‌آپلاسمما اوره‌آلیتیکوم سبب کاهش قدرت حرک اسپرم می‌شود.<sup>(۸)</sup> در مطالعه حاضر، یک ارتباط معنی‌داری در مورد قدرت حرک اسپرم، فقط در بین دو گروه " فقط اوره‌آپلاسمما اوره‌آلیتیکوم مثبت" و گروه "هر دو باکتری مثبت" یافت شد ( $p=0.022$ )؛ به این معنی که میانگین قدرت حرک اسپرم در گروه "هر دو باکتری مثبت" پایین‌تر بود.

برای شناسایی اوره‌آپلاسمما اوره‌آلیتیکوم به ترتیب برابر ۹۵/۸ و ۹۷/۷ به دست آمد. لذا روش PCR جهت شناسایی این دو باکتری حساس‌تر و دارای ویژگی بالاتر نسبت به روش کشت گزارش می‌گردد؛ نتایج حاصل از سایر مطالعات نیز این امر را تایید می‌کند.<sup>(۹،۱۰)</sup>

در تحقیق حاضر در دو مورد از نمونه‌ها، مایکوپلاسمما هومینیس و در سه مورد از نمونه‌ها، اوره‌آپلاسمما اوره‌آلیتیکوم با استفاده از روش کشت مثبت، اما با روش PCR منفی بود. این امر، احتمالاً ناشی از تجزیه DNA این باکتری‌ها و یا به واسطه وجود مهار Taq کننده‌های واکنش PCR (مانند مهار کننده‌های آنزیم polymerase) در نمونه‌های بالینی باشد. در سایر مطالعات نیز نتایج مشابهی به دست آمده است.<sup>(۱۱،۱۲)</sup> Petrikkos و همکارانش در یونان در سال ۲۰۰۷ حساسیت و ویژگی روش PCR را در برابر کشت به ترتیب ۶۲/۸٪ و ۹۸/۸٪ برای مایکوپلاسمما هومینیس و ۹۲/۸٪ و ۹۲/۸٪ برای اوره‌آپلاسمما اوره‌آلیتیکوم گزارش کردند<sup>(۱۰)</sup> که نزدیک به یافته‌های مطالعه حاضر می‌باشد. لازم به ذکر است که تشخیص کلی مایکوپلاسمها نیاز به مهارت و تجربه کافی دارد و یک فرآیند نسبتاً طولانی (در حد چند روز) می‌باشد؛ در حالی که روش PCR دارای حساسیت بالا بوده و در طی زمان نسبتاً کوتاه‌تر (در حد چند ساعت) می‌تواند DNA باکتری را حتی اگر باکتری مرده باشد، شناسایی کند.

برخی گزارش‌ها حاکی از آن است که حضور مایکوپلاسمها و اوره‌آپلاسمها در مایع منی می‌تواند سبب ایجاد تأثیرات منفی بر حجم، pH، تحرک، مورفوЛОژی، تعداد و قابلیت حیاتی اسپرم‌ها گردد<sup>(۱۳،۱۴)</sup>؛ در حالی که برخی از محققان هیچ گونه ارتباطی را بین حضور این باکتری‌ها در مایع منی و ایجاد تغییرات در پارامترهای اسپرم نیافته اند.<sup>(۱۵،۱۶)</sup>

در تحقیق حاضر به دلیل ملاحظات اخلاقی، مقدور نبود که از مردان سالم و بارور نیز نمونه‌های مایع منی

میکروبی برای همه مردان نابارور به عنوان تست روتین در حضور یا غیاب لوکوسیت‌ها در مایع منی، انجام پذیرد و در صورت آلوود 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 مایکوپلاسماهای، می‌تواند دارای نتایج منفی کاذب باشد و همچنین یک روش نسبتاً طولانی بوده و در حد 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 تحقیق یاری دادند، اعلام می‌داریم.

علت گزارش‌های متخاصم در مورد تأثیرات مایکوپلاسماهای تناسلی بر پارامترهای اسپرم، می‌تواند به واسطه عواملی همچون: نحوه انتخاب بیماران، تعداد نمونه‌های مورد مطالعه، استفاده از روش‌های تشخیصی مقاومت، 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 آلووده‌اند. چنانکه اشاره شد، حضور مایکوپلاسماهای و اوره آپلاسماهای در مجاری ادراری-تناسلی، اغلب بدون علامت بالینی می‌باشد؛ با نظر به عواقب خطرنگ 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 پیش‌بینی عفونت‌های مایکوپلاسمایی نمی‌باشد؛ لذا لازم است که غربالگری‌های

### 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 urethritis. 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.

- 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, Schreckenberger 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 Skłodowska*; 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, Birkeland 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, Bartov 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 cytological localization 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.

- 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, Mohammazadeh 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- Lukk 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- Petrikos GL, Hadjisoteriou M, Daikos GL. PCR versus culture in the detection of vaginal 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

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.

# *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<sup>I</sup>      N. Amirmozafari, PhD<sup>II</sup>  
 M.A. Sedighi-Gilani, MD<sup>III</sup>      B. Kazemi, PhD<sup>IV</sup>  
 F. Masjedian-Jazi, MSc<sup>V</sup>**

## **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 CO<sub>2</sub> 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