Original Article

Use of PCR to Detect *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from Semen Samples of Infertile Men who Referred to Royan Institute in 2009

Mohammad Hossein Ahmadi, M.Sc.[1, 2*], Nour Amirmozafari, Ph.D.[1], Bahram Kazemi, Ph.D.[3], Mohammad Ali Sadighi Gilani, M.D.[4], Faramarz Masjedian Jazi, M.Sc.[1]

1. Microbiology Department, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran
2. Microbiology Laboratory, Royan Cord Blood Bank, Tehran, Iran
3. Molecular Biology Research Center, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Department of Andrology, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran

**** Corresponding Address: P.O.Box: 16765-3165, Microbiology Laboratory, Royan Cord Blood Bank, Tehran, Iran***
Emails: taha504@gmail.com

Received: 12/Apr/2010, Accepted: 25/Aug/2010

Abstract

Objective: Infection with genital Mycoplasmas may have harm effects on the reproductive health of men, thus leading to male infertility. This study was performed to detect the prevalence of these bacteria and to study the sperm parameters in infertile men who referred to Royan Institute during 2009.

Materials and Methods: Semen samples were collected from 220 infertile men and divided into three sections. The first section was used for semen analysis, the second section for polymerase chain reaction (PCR) in which U4 and U5 primers were used for the amplification of the urease gene of *U. urealyticum*, and RNAH1 and RNAH2 primers were used for amplification of the 16S rRNA gene of *M. hominis*.

Results: From a total of 220 semen samples cultured, 15.5% of *M. hominis* and 40.5% of *U. urealyticum* were isolated. Evaluation of semen parameters showed a lower pH in the *U. urealyticum* positive group and the group which was positive for both bacteria, rather than the group which contained no bacteria (p=0.007 and p=0.000, respectively). Also, the mean sperm motility was lower in the group which was positive for both bacteria when compared with the *U. urealyticum* positive group (p=0.009).

Conclusion: The results of this study show that a high percent of infertile men are infected with these bacteria which may lead to pelvic inflammatory disease (PID) and infertility, thus isolation of these bacteria in infertile couples with no clinical symptoms is necessary and can be a part of a sexual transmitted disease (STD) control program.

Keywords: *M. hominis*, *U. urealyticum*, Infertile Men, PCR

Yakhteh Medical Journal, Vol 12, No 3, Autumn 2010, Pages: 371-380

شناسایی مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم در مایع منی مردان نابارور مراجعه کننده به پژوهشگاه رویان توسط روش PCR در سال ۱۳۸۸

محمدحسین احمدی M.Sc.[۱،۲*]، نورامیرمظفری Ph.D.[۱]، بهرام کاظمی Ph.D.[۳]،
محمدعلی صدیقی گیلانی M.D.[۴]، فرامرز مسجدیان‌جزی M.Sc.[۱]

۱. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی، تهران، ایران
۲. بانک خون بندناف رویان، آزمایشگاه میکروب‌شناسی، تهران، ایران
۳. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی، تهران، ایران
۴. پژوهشگاه رویان، پژوهشکده علوم تولیدمثل، گروه آندرولوژی، تهران، ایران

* آدرس نویسندگان مسئول: ایران، تهران، صندوق‌پستی: ۳۱۶۵-۱۶۷۶۵، بانک خون بندناف رویان، آزمایشگاه میکروب‌شناسی
پست الکترونیک: Emails: taha504@gmail.com

دریافت مقاله: ۸۹/۱/۲۳، پذیرش مقاله: ۸۹/۶/۳

چکیده

* **هدف:** بررسی وجود مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم و تعیین شیوع این دو باکتری و بررسی پارامتر های اسپرم در نمونه های مایع منی مردان نابارور مراجعه کننده به پژوهشکده رویان

* **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه توصیفی-مقطعی، نمونه‌های مایع منی از ۲۲۰ مرد نابارور اخذ و به دو بخش تقسیم گردید؛ بخش اول جهت انجام تست اسپرموگرام (Semen Analysis) و بخش دوم به منظور انجام Polymerase Chain Reaction (PCR) استفاده شد. جهت انجام PCR برای شناسایی اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم از پرایمرهای U4 و U5 به منظور تکثیر ژن Urease این باکتری و جهت شناسایی مایکوپلاسما هومینیس از پرایمرهای RNAH1 و RNAH2 برای تکثیر ژن 16S rRNAاستفاده شد.

* **یافته‌ها:** از مجموع ۲۲۰ نمونه بررسی شده، به طور کلی ۱۵/۵ درصد مایکوپلاسما هومینیس و ۴۰/۵ درصد اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم از نمونه‌ها جدا شد. در بررسی پارامترهای مربوط به اسپرم، pH مایع منی در دو گروه «فقط اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم مثبت» و «هردو باکتری مثبت»، نسبت به گروه «هردو باکتری منفی»، پایین‌تر بود به ترتیب: (p= ۰/۰۰۷) و (p= ۰/۰۰۰)؛ هم‌چنین میانگین قدرت تحرک اسپرم‌ها در گروه «هردو باکتری مثبت» نسبت به گروه «فقط اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم مثبت»، پایین‌تر بود (p= ۰/۰۰۹).

* **نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج این تحقیق، درصد به نسبت بالایی از مردان نابارور به این باکتری‌ها آلوده بوده‌اند و با توجه به عواقب خطرناک این عفونت‌ها، انجام برنامه‌هایی جهت غربالگری زوج‌های نابارور بدون علایم بالینی، امری اجتناب‌ناپذیر بوده و می‌تواند به عنوان بخش مهمی از برنامه «کنترل بیماری‌های منتقله از راه جنسی» به شمار آید.

* **کلیدواژگان:** مایکوپلاسما هومینیس، اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم، مردان نابارور، PCR

فصلنامه پزشکی یاخته، سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۸۹، صفحات: ۳۸۰-۳۷۱

مقدمه

مایکوپلاسما هومینیس(*Mycoplasma hominis*) و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم (*Ureaplasma urealyticum*)، از کوچک‌ترین باکتری‌هایی هستند که فاقد دیواره پپتیدوگلیکانی بوده و توانایی رشد در محیط‌های کشت مصنوعی (سنتتیک) را دارند. این باکتری‌ها به همراه سایر باکتری‌ها مانند کلامیدیا تراکوماتیس (*C. trachomatis*) جزء شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده اورتریت غیرگنوکوکی (Non Gonococcal Urethritis; NGU) و سایر عوارض دستگاه ادراری-تناسلی می‌باشند (۱). این میکروارگانیسم‌ها، به خصوص اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم 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 ایفا می کنند (۵-۲).

عفونت مجرای ادراری-تناسلی مردان، یکی از مهم‌ترین عوامل ناباروری مردها می‌باشد (۶)؛ به طوری که ۸ تا ۳۵ درصد 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 اوره آپلاسماهای تناسلی می‌تواند به ناباروری و نازایی منتهی شود (۲، ۵، ۹-۷). عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها اغلب بدون علامت بوده که این امر می‌تواند تاثیرات منفی بر سلامت تناسلی مردان داشته باشد (۶، ۱۰) که شامل تاثیرات منفی بر حجم، pH، تحرک، مورفولوژی، تعداد و قابلیت حیاتی اسپرم‌ها می‌باشد (۱۵-۱۱).

مایکوپلاسما هومینیس علاوه بر نقش آن در بیماری‌های التهابی لگن، واژینوز باکتریایی و غیره (۱۶، ۱۷)، می‌تواند با اتصال به سر، دم و بخش میانی اسپرم‌ها (جهت کسب استروییدهای مورد نیاز خود)، سبب بی‌حرکت 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، ۲۰، ۲۱). 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 سبب در هم پیچیدن و ایجاد لخته‌ای متشکل از اسپرم‌ها (Multisperm Agglutination) شود که مجموعه این عوامل سبب از دست رفتن قدرت تحرک اسپرم‌ها می گردد (۲۲). هم‌چنین شواهد نشان می‌دهد که عفونت بدون علامت بالینی ناشی

از اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم می‌تواند سبب سوء عملکرد غدد ضمیمه‌ای جنسی (Accessory Sex Glands) گردد (۲۳). حضور این باکتری در مایع منی و یا مجرای تناسلی زنان، می‌تواند در فرایند لقاح خارج رحمی (*In Vitro* Fertilization) سبب افت و کاهش میزان حاملگی شود (۲۴، ۲۵). در کشورهای در حال توسعه، نقش این باکتری‌ها در ایجاد ناباروری هنوز به طور کامل مشخص نشده است (۲۶). مطالعات در سایر کشورها نشان می‌دهد در صورت عدم انجام برنامه‌های 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)؛ این امر در حالی است که در کشور ما به دلیل ملاحظات اخلاقی، مطالعات بسیار کمی در زمینه تشخیص این باکتری‌ها در نمونه‌های مایع منی صورت گرفته است، بنابراین شناسایی این باکتری‌ها در مردان نابارور فاقد علایم بالینی از اهمیت بالایی برخوردار بوده و می‌تواند به عنوان بخش مهمی از برنامه کنترل بیماری‌های منتقله از راه تماس جنسی (STD) به شمار آید.

در این امر، استفاده از روش تشخیصی PCR که دارای حساسیت بالاتر و مطلوب‌تری نسبت به روش معمول کشت می‌باشد (۲۸، ۲۹، ۳۰)، می‌تواند بسیار موثر واقع افتد؛ در این تحقیق، وجود مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم در نمونه‌ای مایع منی و ارتباط میان وجود این دو باکتری با پارامترهای اسپرم در مردان ناباروری که جهت درمان به پژوهشگاه رویان مراجعه کرده بودند مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جامعه و نمونه پژوهش

این مطالعه از نوع مطالعات توصیفی بوده و حاصل پایان‌نامه دانشجویی دارای مصوبه کمیته اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی ایران می‌باشد. جامعه پژوهش شامل ۲۲۰ مرد نابارور بودکه به مرکز درمان ناباروری پژوهشگاه رویان مراجعه کرده و با انجام معاینات و آزمایشات خاص (ازجمله اسپرموگرام)، ناباروری آنها توسط پزشک متخصص آندرولوژی اثبات شده بود و هم‌چنین دارای شرایط زیر بودند: (لازم به ذکر است که از قبل فرم اعلام رضایت توسط تمام بیماران دخیل در مطالعه، امضا شده است).

۱. فاقد هرگونه علایم بالینی مربوط به عفونت‌های مجاری ادراری- تناسلی و عدم دارا بودن عوارضی مانند واریکوسل (Varicocele)؛ ۲. عدم مواجهه با مواد توکسیک و عدم مصرف آنتی‌بیوتیک تا یک هفته قبل از زمان نمونه‌گیری؛ ۳. داشتن دوره پرهیز جنسی (Abstinence Duration) حد اقل به مدت ۴۸ ساعت.

نمونه‌گیری و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه

۲۲۰ نمونه مایع منی (Semen) از مردان نابارور، در داخل ظرف‌های استریل اخذ شده و هر نمونه به دو بخش تقسیم شد: بخش اول جهت انجام تست اسپرموگرام (Semen Analysis) مورد استفاده قرار گرفت و بخش دوم نیز به منظور انجام تست Polymerase Chain Reaction (PCR)، در دمای ۲۰-درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام تست، نگهداری شد.

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 دستورالعمل 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، مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سلسیوس انکوبه شد و هر ۳-۲ 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 پی‌درپی میکروتیوب، به آرامی به هم زده شد و سپس نمونه به مدت ۲ دقیقه ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه 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 د اخل 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 ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید.

۵. 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.

۶. سپس ۳۰۰ میکرولیتر اتانول سرد (۱۰۰-۹۶ درصد) به آن اضافه کرده و با قرار دادن آن در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، اجازه داده شد تا DNA رسوب کند و سپس با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴-۳ دقیقه سانتریفیوژ نموده و بعد اتانول را دور ریخته و رسوب باقی مانده را یک بار با اتانول سرد (۷۰ درصد) شست‌وشو داده و در نهایت، DNA در ۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به آرامی حل گردید. DNA تخلیص شده تا زمان انجام PCR در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

جست‌وجوی 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 Polymerase (۰/۰۵ واحد بین‌المللی بر میکرولیتر)، $MgCl_2$ (۴ میلی‌مول بر لیتر) و dNTPها (۰/۴ میلی‌مول بر لیتر) می‌باشد استفاده گردید. پرایمرهای مایکوپلاسما هومینیس که جهت تکثیر ناحیه ۳۳۴ bp ژن 16SrRNA این باکتری مورد استفاده قرار گرفت (۳۱) عبارت بودند از :

RNAH1: CAATGGCTAATGCCGGATACGC
RNAH2: GGTACCGTCAGTCTGCAAT

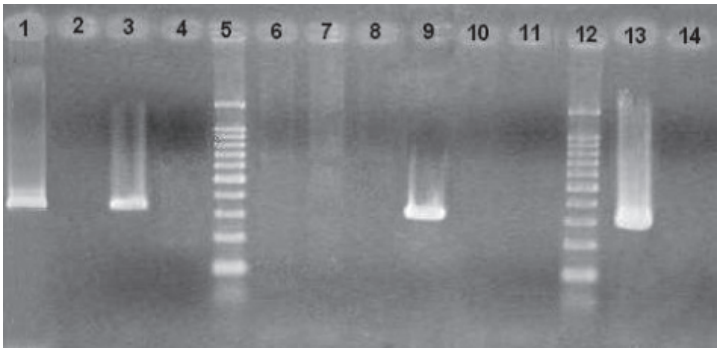
و توالی پرایمرهای اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم که به منظور تکثیر ناحیه ۴۲۹ bp ژن Urease این باکتری مورد استفاده قرار گرفت (۳۲) به صورت زیر بود:

U4: ACGACGTCCATAAGCAACT
U5: CAATCTGCTCGTGAAGTATTAC

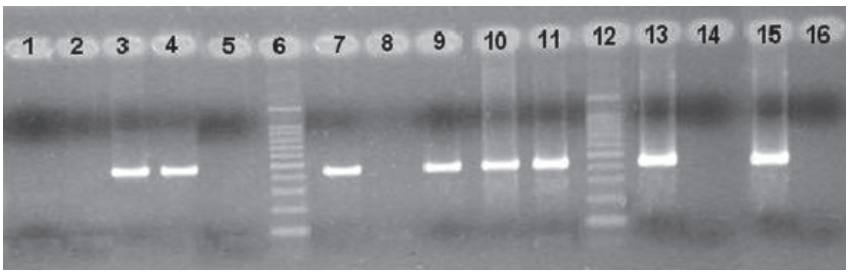
در این تحقیق، از DNA حاصل از محلول کلنی هر کدام از دو

باکتری مورد مطالعه در (1X) Phosphate Buffered Saline (PBS)، 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. ابتدا یک Master Mix ساخته و در حجم مورد نظر بین میکروتیوب‌ها تقسیم شد. ترکیب PCR Master Mix برای هر نمونه به این ترتیب بود: ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix (2x): و Primer Mix ۱ میکرولیتر: (۰/۴ میکرومول) و ۱/۵ میکرولیتر: Water (Nuclease Free) 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 جهت تکثیر ژن‌های مورد نظر (PCR Amplification) به ترتیب جدول زیر بود:

مراحل	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل
واسرشت اولیه (Initial Denaturation)	۹۵	۵ دقیقه	۱
واسرشت (Denaturation)	۹۵	۳۰ ثانیه	
اتصال پرایمرها (Annealing)	*U.urealyticum: 54* *M.hominis: 55*	٤٥ ثانیه	٤٠
سنتز (Extension)	۷۲	٤٥ ثانیه	
سنتز نهایی (Final Extension)	۷۲	۵ دقیقه	۱



شکل ۱: 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، ۴، ۶، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۱ از نظر این باکتری منفی هستند؛ نمونه‌های شماره ۵ و ۱۲ به عنوان مارکر، نمونه شماره ۱۳ کنترل مثبت (bp ۳۳۴) و نمونه شماره ۱۴، کنترل منفی می‌باشد.



شکل ۲: تصویر ژل الکتروفورز محصول PCR اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم: نمونه‌های شماره ۳، ۴، ۷، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۳ از نظر اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت بوده در حالی که نمونه‌های شماره ۱، ۲، ۵، ۸، و ۱۴ از نظر این باکتری منفی هستند؛ نمونه‌های شماره ۶ و ۱۲ به عنوان مارکر، نمونه شماره ۱۵ کنترل مثبت (bp ۴۲۹) و نمونه شماره ۱۶، کنترل منفی می‌باشد.

انجام الکتروفورز و آشکارسازی محصولات PCR

پس از تهیه ژل اگاروز ۱/۵ درصد و رسیدن دمای آن به حدود ۴۵ درجه سلسیوس، به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر ژل، ۳ میکرولیتر رنگ اتیدیوم بروماید به ژل اضافه شد 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 (۱۰۰ bp) به داخل یکی از چاهک‌ها اضافه گردید سپس جریان الکتریسیته با ولتاژ ۱۰۰ ولت برقرار شد. در پایان کار از ژل عکس تهیه شد (شکل ۱ و ۲).

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-16 انجام پذیرفت و در صورتی که p<۰/۰۵ بود، از لحاظ آماری معنی‌دار تلقی شد.

یافته ها

از مجموع ۲۲۰ نمونه مایع منی بررسی شده توسط روش PCR، ۹ مورد (۴/۱ درصد) از نمونه‌ها فقط از نظر مایکوپلاسما هومینیس، ۶۴ مورد (۲۹/۱ درصد) فقط از نظر اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم و ۲۵ مورد (۱۱/۴ درصد) نیز از نظر هر دو باکتری مثبت بودند؛ بنابراین ۹۸ مورد (۴۴/۵ درصد) از کل نمونه‌ها حد اقل از نظر یک باکتری مثبت بودند و به طور کلی ۳۴ مورد (۱۵/۵ درصد) مایکوپلاسما هومینیس و ۸۹ مورد (۴۰/۵ درصد) اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم از نمونه‌ها جدا شد. ۱۲۲ نمونه (۵۵/۵ درصد) نیز از لحاظ هر دو باکتری منفی بودند.

در بررسی پارامترهای اسپرم در نمونه‌ها، به طور کلی این نتایج به دست آمد: میزان قدرت تحرک اسپرم در نمونه‌ها، صفر تا ۴۰ درصد با میانگین ۱۶/۲۶ درصد بود و ۲۸/۶ درصد از نمونه‌ها دارای قدرت تحرک برابر با صفر (فاقد قدرت تحرک) بودند؛ میزان مورفولوژی نرمال در نمونه‌ها، صفر تا ۳۵ درصد با میانگین ۴/۵۸ درصد بود و ۲۴/۵ درصد آنها دارای مورفولوژی نرمال برابر با صفر درصد (فاقد مورفولوژی طبیعی) بودند. تعداد اسپرم در هر میلی‌لیتر مایع منی در نمونه‌ها، صفر تا ۱۴۰ میلیون و میانگین آن ۱۶/۶۳ میلیون بود. میزان pH در نمونه‌ها، ۶ تا ۸/۱ با میانگین ۷/۷۵ بود و ۶۳/۲ درصد از نمونه‌ها دارای pH برابر با ۷/۸ بودند؛ میزان حجم مایع منی در نمونه‌ها، ۱/۵ تا ۱۲ میلی‌لیتر با میانگین ۴/۰۷ میلی‌لیتر بود. دوره پرهیز جنسی در افراد مورد مطالعه از ۲ تا ۲۰ روز با میانگین ۵/۰۸ روز بود. ۷۶/۸ درصد از نمونه‌ها دارای چسبندگی طبیعی (Normal Viscosity)، ۱۵/۵ درصد Somewhat Thick (به نسبت غلیظ) و ۷/۷ درصد ویسکوزیته از نوع Thick (غلیظ) داشتند. ۲۰/۹ درصد از نمونه‌ها، شمارش اسپرم برابر با صفر داشتند (فاقد اسپرم در مایع منی) که این عارضه تحت عنوان آزوسپرمیا (Azoospermia) شناخته می‌شود. حداقل و حداکثر سن افراد مورد مطالعه به ترتیب۲۳ و ۵۴ سال و میانگین آن ۳۵/۲۳ سال بود. نتایج حاصل از PCR به چهار گروه تقسیم شد که عبارت بودند از: گروه ۱ هردو باکتری منفی؛ گروه ۲ فقط مایکوپلاسما هومینیس مثبت؛ گروه ۳ فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت و گروه ۴ هردو باکتری مثبت. نتایج حاصل از این بررسی‌ها در جدول ۱ آمده است.

جهت بررسی اختلاف میانگین متغیرها در این چهار گروه، از تست ANOVA (آنالیز واریانس) استفاده شد که نتایج نشان داد که فقط در مورد متغیر pH، رابطه معنی‌دار بود (p=۰/۰۰۴)؛ در حالی که در مورد سایر متغیر ها رابطه معنی‌داری مشاهده نشد. سپس از آزمون تعقیبی Post Hoc (LSD Test) جهت مقایسه اختلاف میانگین در بین گروه‌ها به صورت دو به دو باهم استفاده شد که نتایج، اختلاف معنی‌داری را در متغیر pH در بین دو گروه ۱ و ۳ نشان داد (p= ۰/۰۰۷)؛ هم‌چنین اختلاف معنی‌داری در این متغیر در بین دو گروه ۱ و ۴ مشاهده گردید (p=۰/۰۰۰) و این بدین معنی است که در دو گروه «فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت» و گروه «هردو باکتری مثبت»، میانگین pH نسبت به گروه «هردو باکتری منفی»، پایین‌تر بوده و اسیدی‌تر است؛ میانگین قدرت تحرک اسپرم‌ها (Total Motility) در گروه «هر دو باکتری مثبت» نسبت به گروه «فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت»، پایین‌تر بود (p=۰/۰۰۹)؛ در حالی که در بین سایر گروه‌ها اختلاف معنی‌داری از این نظر وجود نداشت.

جدول ۱: توزیع فراوانی نتایج حاصل از تست PCR

نتایج تست PCR	فراوانی	درصد
هر دو باکتری منفی	۱۲۲	۵۵/۵
فقط مایکوپلاسما هومینیس مثبت	۹	۴/۱
فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت	۶۴	۲۹/۱
هر دو باکتری مثبت	۲۵	۱۱/۴
مایکوپلاسما هومینیس مثبت (به طور کلی)	۳۴	۱۵/۵
اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت (به طور کلی)	۸۹	۴۰/۵
حداقل یک باکتری مثبت	۹۸	۴۴/۵

جدول ۲: مقایسه نتایج اسپرموگرام ۲۲۰ مرد نابارور در دو گروه «نمونه‌های منفی از نظر باکتری» و «نمونه‌های مثبت از نظر باکتری»

متغیرها	نمونه‌های منفی از نظر باکتری (میانگین± خطای استاندارد)	نمونه‌های مثبت از نظر باکتری (میانگین±خطای استاندارد)
سن	۳۵/۱۶ ± ۰/۵۳	۳۵/۳۱ ± ۰/۴۹
حجم مایع منی (میلی‌لیتر)	۴/۱۳ ± ۰/۱۴	۴/۰۰ ± ۰/۱۶
pH مایع منی	۷/۷۷ ± ۰/۰۰	۷/۷۲ ± ۰/۰۲
تعداد اسپرم (۱×۱۰^{۶} میلی‌لیتر)	۱۶/۹۸ ± ۲/۴۵	۱۶/۲۰ ± ۲/۶۳
تحرک اسپرم (درصد)	۱۵/۳۱ ± ۱/۱۷	۱۷/۴۴ ± ۱/۳۵
مورفولوژی طبیعی اسپرم (درصد)	۴/۹۳ ± ۰/۵۶	۴/۷۶ ± ۰/۴۹

جهت بررسی متغیرهای کیفی از آزمون Crosstabs استفاده شد که در آن، نتیجه PCR با هرکدام از سه متغیر گروه سنی، ویسکوزیته و آزوسپرمیا مورد بررسی قرار گرفت که وقتی از آزمون Chi-Square (۲ درصد) استفاده شد، اختلاف معنی‌داری در بین هیچ‌کدام از این موارد مشاهده نشد.

در تحقیق، هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین وجود لکوسیت‌ها در مایع منی (leukocytospermia) و نتیجه حاصل از PCR یافت نشد. هم‌چنین برای بررسی بیشتر، نتیجه PCR به دو گروه الف: «نمونه‌های منفی از نظر باکتری» و گروه ب: «نمونه‌های مثبت از نظر باکتری» تقسیم شد که پس از استفاده از آزمون‌های فوق جهت مقایسه این دو گروه، در این مورد نیز اختلاف معنی‌داری در پارامترها و متغیرهای ذکر شده مشاهده نگردید (جدول ۲).

بحث

طبق تعریف، ناباروری عبارت است از عدم ایجاد حاملگی با وجود یک سال نزدیکی جنسی بدون استفاده از هر گونه وسیله ممانعت از بارداری (۳۳). گفته می‌شود که ۵۰ تا ۸۰ میلیون زوج در سراسر جهان از ناباروری رنج می‌برند؛ به نظر می‌رسد که فاکتورهای مردانه، علت اصلی ناباروری در ۳۰ درصد از موارد بوده و در ۲۰ درصد موارد نیز در ایجاد ناباروری نقش مشارکتی دارد (۳۴). در این میان، یکی از مهم‌ترین عوامل ناباروری مردان، عفونت‌های مجرای ادراری-تناسلی می‌باشد (۶)؛ در مورد شیوع مایکوپلاسماهای تناسلی، گزارشات و آمارهای متفاوتی وجود دارد؛ به طوری که شیوع اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور در مقالات مختلف از ۵ تا ۴۲ درصد متغیر است (۵-۳، ۳۵، ۳۶). این محدوده وسیع مربوط به روش‌ها و تست‌های تشخیصی متفاوتی است که جهت بررسی جمعیت‌های مختلف به کار رفته است (۳۷). در تحقیق حاضر، شیوع اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در مایع منی مردان نابارور، ۴۰/۵ درصد به دست آمد که در محدوده گزارش شده مقالات فوق قرار دارد.

در مطالعه‌ای توسط گدورا و همکاران، وجود کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلاسماها و اوره آپلاسماهای تناسلی در مایع منی و قطرات اولیه دفع شده ادرار مردان نابارور در کشور تونس با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت که در آن، شیوع مایکوپلاسما هومینیس ۹/۶ درصد و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم ۱۵/۴ درصد گزارش شد (۲۶). در مطالعه ما، شیوع مایکوپلاسما هومینیس برابر با ۱۵/۵ درصد بود که بالاتر از یافته مطالعه فوق می‌باشد؛ هم‌چنین شیوع اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم در تحقیق حاضر، ۴۰/۵ درصد بود که در مقایسه با مطالعه فوق، بالاتر است.

در مطالعه دیگری از گدورا و همکاران، با استفاده از روش PCR، در ۶/۷ درصد از نمونه‌ها عفونت توام این دو باکتری مشاهده شده است (۳۷) و این در حالی است که عفونت توام این دو باکتری در مطالعه ما، در ۱۱/۴ در صد از نمونه‌ها یافت شد؛ وجود عفونت توام با این دو باکتری در مقالات مختلف، در ۷ تا ۱۴ درصد از نمونه‌های مایع منی مردان نابارور گزارش شده است (۱۷، ۳۵) که یافته‌های ما نیز در همین محدوده قرار دارد.

در تحقیقی که وانگ و همکاران در کشور چین انجام دادند، شیوع اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم را با استفاده از روش کشت، ۳۹/۳۱ درصد گزارش کردند (۵) که نزدیک به یافته ما با روش PCR (۴۰/۵ درصد) می‌باشد.

در مطالعه‌ای که در ایران 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 درصد از نمونه‌ها حداقل به یکی از این باکتری‌ها آلوده بود (۳۸). در تحقیق ما این آمار برای دو باکتری مورد بررسی، برابر با ۴۴/۵ درصد بود.

در تحقیق دیگری که توسط نیاکان و همکاران در پژوهشگاه رویان بر روی نمونه‌های مایع منی انجام شد، فراوانی مایکوپلاسما هومینیس در مردان نابارور ۱۷/۵ درصد در مقایسه با گروه کنترل (۵ درصد) تعیین شد (۳۹) که مشابه با یافته به دست آمده در تحقیق حاضر (۱۵/۵ درصد)، می‌باشد؛ البته در تحقیق فوق، تعداد افراد مورد بررسی محدود بود (۴۰ مرد نابارور و ۴۰ نفر مرد بارور) و بنابر این نمی‌تواند آمار صحیحی از شیوع این میکروارگانیسم‌ها را در بر داشته باشد.

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۸ در ایران توسط نجار پیرایه

و صمیمی بر روی نمونه‌های اندوسرویکس زنان نابارور انجام پذیرفت، در روش PCR، ۵۲/۹ درصد ازنمونه‌ها فقط از نظر اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم، ۲۷/۴ درصد فقط از نظر مایکوپلاسما هومینیس و ۱۹/۶ درصد از نظر هردو باکتری مثبت بود که آمار بالاتری را در زنان نسبت به مردان در مطالعه ما نشان می‌دهد (۴۰).

در تحقیق دیگری که توسط نجار پیرایه و همکاران در سال ۱۳۸۵ بر روی مردان نابارور انجام شد، آلودگی به اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم با استفاده از روش PCR در ۱۲ درصد از مردان نابارور و فقط در ۳ درصد از مردان بارور دیده شد (۴۱).

در سایر مطالعات، شیوع مایکوپلاسما هومینیس و اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم به ترتیب ۱۳-۵ درصد و ۳۵-۱۱ درصد گزارش شده است (۳۶، ۴۶-۴۲)که یافته‌های ما نیز نزدیک به همین محدوده می‌باشد؛ 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 مطالعات مختلف گزارش شده است که حساسیت روش PCR در مقایسه با روش معمول کشت برای جداسازی مایکوپلاسماهای تناسلی، بالاتر می‌باشد (۳۰-۲۸)؛ در مطالعه نجار پیرایه و صمیمی، حساسیت تست PCR و روش کشت به ترتیب ۹۱/۸ درصد و ۵۳ درصد تعیین شد که نشان دهنده حساسیت و سرعت بالای PCR در برابر کشت برای جداسازی این باکتری‌ها می‌باشد که در مطالعه دیگر نجار پیرایه و همکاران نتیجه مشابهی برای اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم به دست آمد (۴۰، ۴۱). علت حساسیت پایین کشت در برابر تکنیک PCR، وجود مشکلات معمول در فرایند کشت این باکتری‌ها می‌باشد (۴۷)؛ چنانکه پیش‌تر اشاره شد، این باکتری‌ها به دلیل فقدان دیواره سلولی در برابر شرایط محیطی از قبیل pH، خشکی، دما و سایر عوامل مهاری، بسیار حساس بوده و هم‌چنین سخت رشد بوده و نیازمند محیط‌های اختصاصی و مکمل‌های غذایی مخصوص می‌باشد؛ بنابراین، ممکن است باکتری در طی مراحل نمونه‌گیری و یا در حین انجام مراحل کشت از دست برود. از این رو نتیجه کشت به طور کاذب منفی می‌گردد. به علاوه، تشخیص کلنی‌های این باکتری نیز نیاز به مهارت و تجربه کافی دارد و یک فرایند به نسبت طولانی (در حد چند روز) می‌باشد؛ در حالی که روش PCR دارای حساسیت بالا بوده و در طی زمان نسبتا کوتاهی (در حد چند ساعت) می‌تواند DNA باکتری را حتی اگر باکتری مرده باشد، شناسایی کند؛ در تحقیق حاضر از روش PCR جهت شناسایی این باکتری‌ها استفاده گردید.

در مورد تاثیر مایکوپلاسماهای تناسلی بر پارامترهای اسپرم، نقش آنها در ایجاد تغییرات آندرولوژی مایع منی و ایجاد ناباروری در مردان، دیدگاه‌های متفاوت و متناقضی وجود دارد (۵، ۳۵، ۴۸، ۴۹)؛ به عنوان مثال، برخی گزارشات حاکی از آن است که حضور مایکوپلاسماها و اوره‌آپلاسماها در مایع منی، می‌تواند سبب ایجاد تاثیرات منفی بر حجم، pH، تحرک، مورفولوژی، تعداد و قابلیت حیاتی اسپرم‌ها گردد که این امر می‌تواند به ناباروری مردان منتهی گردد (۱۵-۱۱). در حالی که برخی از محققان هیچ گونه ارتباطی را بین حضور این باکتری‌ها در مایع منی و ایجاد تغییرات در پارامترهای اسپرم، نیافته‌اند (۴، ۵، ۱۹، ۴۲، ۵۰). در مورد آلودگی مایع منی با مایکوپلاسما هومینیس، در برخی از مطالعات تاثیراتی بر روی تعداد، مورفولوژی و قدرت تحرک اسپرم‌ها گزارش شده است (۱۸، ۳۷). هم‌چنین مطالعات آزمایشگاهی (*in vitro*) نشان می‌دهد که نگهداری اسپرم‌ها همراه با کلامیدیاها یا مایکوپلاسماها، می‌تواند باعث آسیب رساندن به فیزیولوژی اسپرم‌ها و به خصوص سبب تاثیرات منفی بر روی قدرت تحرک، مورفولوژی و قابلیت حیاتی آنها گردد (۱۱، ۱۹، ۵۱، ۵۲).

در تحقیق حاضر به دلیل ملاحظات اخلاقی، مقدور نبوده که از مردان سالم و بارور نیز نمونه‌های مایع منی اخذ شود و با استفاده از گروه کنترل، مطالعه به صورت مورد-شاهد درآید. بنابراین نمی‌توان به صرف وجود این باکتری‌ها را دلیل اصلی ناباروری در افراد مورد مطالعه دانست و با تکیه بر آن، تاثیر این باکتری‌ها را بر پارامترهای اسپرم سنجید. اما در مقایسه میانگین متغیرهای این مطالعه، در متغیر pH یک اختلاف معنی‌دار یافت شد؛ به این معنی که در دو گروه «هردو باکتری مثبت» و «فقط اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم مثبت»، میزان pH نسبت به گروه «هردو باکتری منفی»، پایین‌تر و اسیدی‌تر بود (به ترتیب، p=۰/۰۰۶ و p=۰/۰۳۱). در مطالعه‌ای که توسط وانگ و همکارانش در کشور چین انجام شد (۵)، در افراد آلوده، میزان pH نسبت به افراد منفی پایین‌تر بود (p<۰/۰۵)؛ که از این لحاظ تا حدی با یافته تحقیق حاضر، مشابهت دارد.

در مطالعه حاضر، بین محدوده سنی افراد مورد مطالعه و نتیجه حاصل از PCR، ارتباط معنی‌داری یافت نشد اما افراد با محدوده سنی ۳۴ تا ۴۳ سال نسبت به سایر گروه‌های سنی، آلودگی بیشتری به این باکتری‌ها داشتند؛ نتایج مطالعه گلشنی و همکارانش، بالاترین میزان آلودگی را در بین افراد دارای محدوده سنی ۲۰ تا ۳۰ سال نشان می‌دهد (۳۸).

در تحقیق حاضر هیچ گونه ارتباط معنی‌داری بین وجود لکوسیت‌ها در مایع منی (leukocytospermia) و نتیجه حاصل از PCR یافت نشد؛ نتایج حاصل از سایر مطالعات نیز نشان می‌دهد که وجود لکوسیت در مایع منی، شاخص قابل اعتمادی برای پیش‌بینی عفونت‌های مایکوپلاسمایی نمی‌باشد (۳۸، ۵۳، ۵۴).

زو و همکارانش گزارش کرده‌اند که عفونت تناسلی با اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم سبب کاهش قدرت تحرک اسپرم می‌شود (۵۵). در مطالعه حاضر، یک ارتباط معنی‌داری در مورد قدرت تحرک اسپرم، فقط در بین دو گروه «فقط اوره‌آپلاسما اوره‌آلیتیکوم مثبت» و گروه «هردو باکتری مثبت» یافت شد (p=۰/۰۳۲)؛ به این معنی که میانگین قدرت تحرک اسپرم در گروه «هردو باکتری مثبت» پایین‌تر بود.

علت گزارشات متناقض در مورد تاثیرات 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.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های این تحقیق، درصد به نسبت بالایی از

مردان نابارور به این دو باکتری آلوده‌اند. چنان که اشاره شد، حضور مایکوپلاسماها و اوره‌آپلاسماها در مجاری ادراری-تناسلی، اغلب بدون علامت بالینی می‌باشد و با نظر به اینکه عفونت‌های تناسلی ناشی از این باکتری‌ها در صورت عدم تشخیص و درمان، به طور مستمر باقی مانده و می‌تواند منجر به عواقب خطرناکی مانند بیماری‌های التهابی لگن و ناباروری گردد، غربال‌گری میکروبی برای مردان نابارور به خصوص در سنین جوانی، ضروری به نظر می‌رسد. هم‌چنین با توجه به اینکه در برخی از کلینیک‌ها، بررسی‌های میکروبی بر روی نمونه‌هایی انجام می‌پذیرد که دارای لکوسیت بالا باشند و این در حالی است که مطالعات نشان می‌دهد که وجود لکوسیت در مایع منی، شاخص قابل اعتمادی برای پیش‌بینی عفونت‌های مایکوپلاسمایی نمی‌باشد؛ بنابراین لازم است که غربال‌گری‌های میکروبی برای همه مردان نابارور به عنوان تست روتین در حضور یا غیاب لکوسیت‌ها در مایع منی، انجام پذیرد و در صورت آلوده بودن به این باکتری‌ها، درمان زوجین به صورت هم‌زمان صورت گیرد. با توجه به اینکه در کشور ما پایبندی به اصول اخلاقی مشهود است، شیوع مایکوپلاسماهای تناسلی آمار بالایی را نشان می‌دهد. شاید این امر ناشی از ملاحظات اخلاقی در مراجعه به پزشک و درمان عفونت‌های ناحیه تناسلی و یا کمبود آگاهی مردم در خصوص عفونت‌های ادراری-تناسلی و عواقب ناشی از آن باشد. بنابراین آگاهی دادن به مردم، به خصوص جوانان، در باره عفونت‌های ادراری-تناسلی و راه‌های حفاظت از سلامت جنسی و انجام برنامه‌هایی جهت غربال‌گری زوج‌های جوان به خصوص زوج‌های نابارور بدون علایم بالینی، امری اجتناب‌ناپذیر بوده و می‌تواند به عنوان بخش مهمی از برنامه «کنترل بیماری‌های منتقله از راه تماس جنسی» به شمار آید.

تقدیر و تشکر

هزینه‌های مالی این طرح توسط دانشگاه علوم پزشکی ایران و نمونه‌های مورد نیاز جهت آزمایش، توسط پژوهشگاه رویان تامین گردیده است.

بدین‌وسیله نهایت تشکر و قدردانی خود را از مسؤولین محترم پژوهشگاه رویان، به خصوص معاونت پژوهشی و هم‌چنین کارکنان آزمایشگاه روتین آن پژوهشگاه که ما را در انجام این تحقیق یاری داده‌اند اعلام می‌داریم.

References

1. Kilic D, Basar MM, 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: 304-308.
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: 127-131.
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: 377-381.
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: 562-568.
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: 691-697.
8. Paavonen J , Wolner-Hassen P: Chlamydia trachomatis: a major threat to reproduction. Hum Reprod. 1989; 4: 111-124.
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: 155-161.
10. Winn, Jr. W, Allen S, W Janda, Koneman E, Procop G, Schreckenrger P, Woods G. Mycoplasmas and Ureaplasma. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6thed USA Lippincott Williams & Wilkins. Wolters Kluwer Company; 2006; 1028-1033.
11. Rose BI, Scott B. Sperm motility, morphology, hyperactivation and ionophore- induced acrosome reactions after overnight incubation with Mycoplasmas. Fertil Steril. 1994; 61(2): 341-346.
12. Jakiel G, Robak- Cholubek D, Wieczorek P, Bokiniec M. Evaluation of some parameters of human semen with positive chlamydial reaction. Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med. 2004: 59(2): 61-64.
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): 656-660.
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): 267-270.
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): 175-8,184.
16. Yoshida T, Maeda S, Deguchi T, Miyazawa T, Ishiko H. Rapid detection of Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Ureaplasma parvum, and Ureaplasma urealyticum organisms in genitourinary samples by PCR-microtiter plate hybridization assay. J Clin Microbiol. 2003; 41: 1850-1855.
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: 331-336.
18. Svenstrup HF, Fedder J, Abraham-Peskir J, Birkelund S, Christiansen G. Mycoplasma genitalium attaches to human spermatozoa. Hum Reprod, 2003; 18(10): 2103-2109.
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): 1591-1598.
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: S12-16.
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): 161-168.
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: 727-729.
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 infection. Biol Reprod. 2000; 63: 1041-1048.
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. 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: 2232-2234.
29. Polveson K, Jensen JS, Lind I. Detection of Ureaplasma urealyticum by PCR and biovar determination by liquid hybridization. J Clin Microbiol. 1998; 36: 3211-3216.
30. 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.
31. 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: 1358-1361.
32. Blanchard A, , Hentschel J, 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 Infect Dis. 1993; 17 Suppl 1: S148-153.
33. Coskun E, Ozkan S, Vural B. Impact of Genital Infections on Fertility. J Turkish German Gynecol Assoc. 2005; 6(3): 197-203.
34. Amelar RD, Dubin L, Walsh PC. The varicocele and infertility. Male infertility Philadelphia, PA: WB Saunders Co; 1977. p. 57-68.
35. Knox CL, 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: 921-929.
36. 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): 125-129.
37. 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 Infect Dis. 2007; 7: 129.
38. 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.
39. 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 of Shahed University. 2005; 56(12): 65-72.
40. Najar peerayeh Sh, Samimi R. Comparison of culture with the polymerase chain reaction for detection of genital Mycoplasma; Eur J.Gen Med. 2008; 5(2): 107-111.
41. Najar peerayeh Sh, Zeighami H, Farshchiyan M, Otoufi J. Comparison of PCR and culture for diagnosis of Ureaplasma urealyticum in genital specimens of infertile men; Hakim Research Journal. 2007; 10(3): 48- 53.
42. 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): 118-121.
43. 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): 566-570.
44. Rodriguez R, Hernandez R, Fuster F, Torres A, Prieto P, Alberto J. Genital infection and infertility. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2001; 19(6): 261-266.
45. Pacey AA, Eley A. Chlamydia trachomatis and male fertility. Hum Fertil (Camb). 2004; 7(4): 271-276.
46. 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.
47. Lee AH, Ramanujam T, Ware P, Edelstein PH, Brooks JJ, Freundlich B, et al. Molecular diagnosis of Ureaplasma urealyticum septic arthritis in a patient with hypogammaglobulinemia. Arthritis Rheum. 1992; 35: 443-448.
48. 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: 1775-1778.
49. Sanocka-Maciejewska D, Ciupinska M, Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. J Reprod Immunol. 2005; 67: 51-56.
50. 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.
51. Nunez- Calonge R, Caballero P, Redondo C, Baquero F, Martiner- Ferrer M, Meseguer MA. Ureaplasma urealyticum reduces motility and induces membrane aitration in human spermatozoa. Hum Reprod. 1998; 13 (10): 2756-2761.
52. Eley A, Pacey AA, Galdiero M, Galdiero M, Galdiero F. Can Chlamydia trachomatis directly damage your sperm? Lancet Infect Dis. 2005; 5(1): 53-57.
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): 101-105.
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): 315-319.
55. Xu C, Sun GF, Zhu YF, Wang YF: The correlation of Ureaplasma urealyticum infection with infertility. Andrologia. 1997; 29: 219-226.