ORIGINAL ARTICLE

Detection of Ureaplasma urealyticum in Clinical Semen Samples in Infertile Men Using Molecular Method

Maryam Tohidpour[1],
Mohammadhassan Shahhosseiny[2,3],
Sedigheh Mehrabian[4],
AboTaleb Saremi[5]

[1] PhD Candidate in Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
[2] Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Shahr-e-Qods Branch, Tehran, Iran
[3] Iranian Gene Fanavar Institute (IGF), Tehran, Iran
[4] Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
[5] Gynecologist, Subspecialty of Infertility, IVF and Laparoscopic surgery, Sarem Fertility and Infertility Research Center (SAFIR), Sarem Cell Research Center, Sarem Hospital (SCRC), Tehran/ Iran

(Received January 15, 2018 ; Accepted June 11, 2018)

Abstract

Background and purpose: *Ureaplasma urealyticum* is one of the most common causes of Non-Gonococcal Urethritis (NGU). Asymptomatic clinical infection caused by this bacterium can cause malnutrition of the sexual attachment glands and its presence in semen contributes to lower fertility. The aim of this study was to identify *Ureaplasma urealyticum* in semen of infertile men using PCR method as an accurate diagnostic method.

Materials and methods: The PCR test was optimized by standard strain to detect *Ureaplasma urealyticum* and then was studied in terms of specificity and limit of detection (LOD). Semen samples were collected from 100 infertile men and each sample was divided into two parts: the first part was tested by semen analysis and the second part was tested by PCR method. DNA was extracted using phenol-chloroform method and the PCR test was done for detection of *Ureaplasma urealyticum*.

Results: Among the semen samples, 16 cases (16%) were found to be positive for *Ureaplasma urealyticum*. According to the spermogram test, the leukocyte level was also more than normal level in these samples (0-1 Mil/ml).

Conclusion: Screening of infertile couples for *Ureaplasma urealyticum* infection in those without clinical symptoms, thereby performing timely antibiotic therapy play key roles in treatment of infertility. Hence, PCR method is introduced as a valuable and reliable technique to identify *Ureaplasma urealyticum*.

Keywords: *Ureaplasma urealyticum*, infertile men, semen, molecular method

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28 (168): 10-21 (Persian).

*** Corresponding Author: Mohammadhassan Shahhosseiny -** Iranian Gene Fanavar Institute, Tehran, Iran
(E-mail: shahhosseiny@yahoo.com)

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هشتم شماره ۱۶۸ دی سال ۱۳۹۷ (۲۱-۱۰)

شناسایی *اوره آ پلاسما اوره آ لیتیکوم* در نمونه های کلینیکی مایع منی مردان نابارور با استفاده از روش مولکولی

مریم توحیدپور[۱]
محمدحسن شاه حسینی[۲و۳]
صدیقه مهرابیان[۴]
ابوطالب صارمی[۵]

چکیده

سابقه و هدف: *اوره آ پلاسما اوره آ لیتیکوم* جزء شایع‌ترین عوامل ایجادکننده اورتریت غیرگونوکوکی بوده که عفونت بدون علامت بالینی ناشی از این باکتری می‌تواند سبب سوء عملکرد غدد جنسی و حضور آن در مایع منی سبب افت در میزان باروری شود. هدف از این مطالعه، شناسایی *اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم* در مایع منی مردان نابارور با بهره‌گیری از روش PCR به عنوان روشی دقیق، با توجه به اهمیت موضوع ناباروری می‌باشد.

مواد و روش‌ها: تست PCR جهت شناسایی *اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم* ابتدا با استفاده از سوش استاندارد، بهینه و سپس به لحاظ ویژگی و حد تشخیص بررسی شد. نمونه‌های مایع منی از ۱۰۰ مرد نابارور اخذ و به دو بخش به منظور آنالیز اسپرم و نیز تست PCR تقسیم گردید. استخراج DNA با روش فنل- کلروفرم و تست PCR جهت شناسایی *اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم* به انجام رسید.

یافته‌ها: از مجموع ۱۰۰ نمونه مایع منی مردان نابارور مورد مطالعه، ۱۶ نمونه (۱۶ درصد) از نظر وجود *اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم* مثبت و این دسته از نمونه‌ها با توجه به نتایج حاصله از اسپرموگرام از نظر تعداد لوکوسیت بالاتر از حد نرمال (۱-۰ Mil/ml) گزارش شدند.

استنتاج: غربالگری زوج های نابارور بدون علائم بالینی و درمان به موقع آنتی‌بیوتیکی آن‌ها نقش مهم و به‌سزایی در درمان ناباروری دارد، لذا تکنیک PCR به عنوان یک روش تشخیصی با ارزش و قابل اعتماد جهت تشخیص این باکتری مطرح شده است.

واژه های کلیدی: *اوره آ پلاسما اوره آلیتیکوم*، مردان نابارور، مایع منی، روش مولکولی

مقدمه

ناباروری یکی از معضلات برخی از خانواده هاست و تقریباً از هر پنج زوج، یک زوج نابارور می‌شوند. علت نیمی از موارد ناباروری مربوط به علت مردانه است و بیماری‌های عفونی ناحیه تناسلی به طور مشخصی در

مولف مسئول: محمدحسن شاه حسینی- تهران: موسسه ایرانیان ژن فناور E-mail: shahhosseiny@yahoo.com
۱. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران
۲. استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس، تهران، ایران
۳. موسسه ایرانیان ژن فناور، تهران، ایران
۴. استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحدتهران شمال، تهران، ایران
۵. متخصص زنان و زایمان، فوق تخصص نازایی، IVF و لاپاراسکوپی، مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صارم، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و سلول های بنیادی صارم، بیمارستان فوق تخصصی صارم، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۶/۱۰/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :۱۳۹۶/۱۱/۲۳ تاریخ تصویب : ۱۳۹۷/۳/۲۱

بروز آن نقش دارند(۲،۱). عفونت مجرای ادراری- تناسلی مردان، یکی از مهم‌ترین عوامل ناباروری مردهاست، به طوری که ۸ تا ۳۵ درصد موارد ناباروری مردان در سراسر جهان مربوط به این عفونت‌ها می‌باشد(۳). از میان عوامل عفونی، می‌توان به *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* اشاره کرد. اوره آپلاسما از کوچک‌ترین باکتری‌ها به شمار می‌رود که فاقد دیواره پپتیدوگلیکانی بوده و توانایی رشد در محیط‌های کشت مصنوعی (سنتتیک) را دارد(۴).

این باکتری به همراه سایر باکتری‌ها از جمله *کلامیدیا تراکوماتیس* جزء شایع‌ترین عوامل ایجادکننده اورتریت غیر گونوکوکی (NGU: Non Gonococcal Urethritis) و سایر عوارض دستگاه ادراری- تناسلی محسوب می‌شود(۵)، به طوری که گزارشات زیادی در ارتباط با گونه‌های مختلف اوره آپلاسما از جمله *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* و *اوره آپلاسما پاروم* در ایجاد اورتریت غیرگونوکوکی ذکر شده است(۶). این میکروارگانیسم‌ها، به خصوص *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* با این که از ساکنان طبیعی مجرای ادراری مردان می‌باشند، گونه‌های بالقوه پاتوژنی هستند که نقش آن‌ها در ایجاد برخی از عفونت‌های دستگاه ادراری– تناسلی ثابت شده است(۲). این باکتری نقش اتیولوژیک مهمی در عفونت‌های تناسلی از جمله یورتریت، پروستاتیت و اپیدیدیمیت و هم در ناباروری مردان ایفا می‌کنند(۸،۷). عفونت‌های ناشی از این باکتری اغلب بدون علامت بوده که این امر می‌تواند تاثیرات منفی بر حجم، تحرک، مورفولوژی، تعداد و قابلیت حیاتی اسپرم و در نهایت سلامت تناسلی مردان داشته باشد(۹). *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* از پاتوژن‌های غالب مسبب بیماری‌های منتقله از راه جنسی (STD: Sexual Transmitted Diseases) بوده و بنابراین مشخص کردن شیوع آن در مردان بدون علامت (فاقد علائم بالینی) از اهمیت بالایی برخوردار است(۱۰)، هم‌چنین می‌تواند سبب(ASG:Accessory Sexual Glands) سوء عملکرد غدد ضمیمه‌ای جنسی شود(۱۲،۱۱). 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 باروری شود(۱۳). انتقال *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* به جنین و یا نوزاد تازه به دنیا آمده نیز ممکن است سبب ایجاد زایمان زودرس، سقط جنین خود به خودی، پنومونی نوزادی و عفونت‌های سیستم عصبی مرکزی گردد(۱۵،۱۴).

اوره آپلاسما با تولید O_2 و H_2O_2 موجب آسیب غشای سلولی شده و با آزاد کردن آنزیم اوره آز سبب تولید آمونیاک و نابودی اسپرم می‌شود(۱۶). عفونت ناشی از *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* باعث افزایش اسیدیته، ویسکوزیته و کاهش تعداد اسپرم می‌گردد. هم‌چنین 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 درهم پیچیدن و ایجاد لخته‌ای متشکل از اسپرم‌ها (Multisperm Agglutination) شود که مجموعه این عوامل سبب از دست رفتن قدرت تحرک اسپرم می‌گردد(۱۷). تست‌های آزمایشگاهی روتین جهت شناسایی *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* بسیار وقت گیر می‌باشند (برای تشخیص گونه های اوره آپلاسما ۲ تا ۵ روز وقت نیاز است)، در صورتی که با کاربرد تکنیک‌های مولکولی چون PCR در کم‌تر از ۸ ساعت می‌توان به نتیجه رسید. یک تحقیق ویژه به سمت توسعه و تکامل تست‌های تحقیقاتی خاص و حساسی چون تست‌های تکثیر اسیدهای نوکلئیک هدایت می‌شود که می‌توان از آن‌ها جهت تشخیص و شناسایی باکتری‌هایی چون *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم*، *کلامیدیا تراکوماتیس*، *مایکوپلاسما هومینیس* و *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* بهره جست(۱۸).

متاسفانه در حال حاضر برنامه‌ریزی پیشگیری زود هنگام در کشور ما وجود ندارد. با توجه به آن که در کشور ما پایبندی به اصول اخلاقی مشهود است، شیوع اوره آپلاسما 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. لذا آگاهی دادن به مردم، خصوصاً جوانان، در ارتباط با عفونت‌های ادراری– تناسلی و راه‌های حفاظت از سلامت جنسی و انجام برنامه‌هایی جهت غربالگری زوج‌های جوان به خصوص زوج‌های نابارور بدون علائم بالینی، امری اجتناب ناپذیر بوده و می‌تواند به‌عنوان بخش مهمی از برنامه «کنترل بیماری‌های منتقله از راه تماس جنسی» به شمار آید. وجود یک برنامه مدون از نظر شناخت وضعیت این عامل بیماری‌زا، شناخت عوامل مستعدکننده به این عفونت و برنامه‌ریزی جهت انجام تست‌های غربالگری و به دنبال آن درمان افراد عفونی، می‌تواند سبب کاهش آسیب‌های این بیماری در جامعه گردد. از این رو مطالعه حاضر برای تعیین میزان شیوع عفونت *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* در مردان نابارور مراجعه‌کننده به کلینیک ناباروری بیمارستان فوق تخصصی صارم، صورت گرفت تا ضرورت انجام غربالگری مردان نابارور خصوصا مردان نابارور بدون علامت مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

پس از هماهنگی‌های لازم در بیمارستان فوق تخصصی صارم، به صورت مقطعی از آذرماه ۱۳۹۵ تا مهرماه ۱۳۹۶ ، کار جمع آوری ۱۰۰ نمونه مایع منی مردان نابارور به انجام رسید. این این مردان در سنین باروری و متاهل (۶۰- ۲۱ سال) بوده و علت مشخصی (فیزیولوژیک، هورمونال و آناتومیکی) برای ناباروری نداشتند. (لازم به ذکر است که از قبل، فرم رضایت بیمار اخذ و امضاء شده است و این پژوهش دارای کد کمیته اخلاق پزشکی نیز می باشد) .

- نمونه گیری و انتقال نمونه ها به آزمایشگاه

۱۰۰ نمونه مایع منی از مردان متاهل نابارور مراجعه کننده به کلینیک ناباروی بیمارستان فوق تخصصی صارم که ناباروری آن‌ها توسط پزشک متخصص به اثبات رسیده و دارای شرایط زیر بودند، جمع‌آوری شد: (لازم به ذکر است که از قبل، فرم رضایت بیمار اخذ و امضاء شده است)

- عدم مصرف آنتی بیوتیک تا یک هفته قبل از نمونه‌گیری

- داشتن دوره پرهیز جنسی حداقل به مدت ۴۸ ساعت (Abstinence Duration)

نمونه‌های مایع منی در داخل ظرف های استریل اخذ شده و هر نمونه به دو بخش تقسیم شد: بخش اول جهت انجام تست اسپرموگرام (Semen Analysis) بلافاصله در بیمارستان به انجام رسید. آنالیز مایع منی برابر دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) سال ۲۰۱۰ انجام شد. تطبیق نتایج با معیارهای اعلام شده حاکی از طبیعی و یا غیر طبیعی بودن نمونه دارد.

بخش دوم نمونه‌ها تحت شرایط استاندارد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام تست نگهداری و سپس با حفظ دمای انجماد در جعبه مخصوص حمل نمونه همراه با یخ از بیمارستان فوق تخصصی صارم به موسسه تحقیقاتی ایرانیان ژن فناور جهت انجام آزمایشات لازم تست PCR، انتقال یافتند.

استخراج DNA بر روی نمونه‌ها پس از نگهداری آن‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد انجام شد. DNA نمونه‌های فریز شده پس از خروج از فریزر، بدون اینکه ذوب شوند، به روش استاندارد فنل- کلروفرم و به قرار زیر استخراج شدند:

۱- ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه مایع منی را به یک میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده و حجم آن با آب مقطر به ۵۰۰ میکرولیتر رسانده شد.

۲- هم حجم نمونه (۵۰۰ میکرولیتر) فنل اضافه شده، سپس به مدت یک دقیقه، کوتاه ورتکس می شود و ۱۰ بار Invert و بعد در دور ۱۳۵۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

۳- فاز رویی به آرامی به وسیله سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر

(بدون مخلوط شدن با فاز پایین) جدا و به لوله جدید منتقل گردید.

۴- هم حجم (حدود ۴۰۰ میکرولیتر) کلروفرم اضافه و ۱۰ بار Invert و سپس سانتریفوژ با دور ۱۳۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

۵- مایع رویی به آرامی به وسیله سمپلر ۱۰۰ میکرولیتر به لوله جدید منتقل گردید.

۶- مقدار ۲۰ میکرولیتر سدیم استات ۵ مولار به محلول اضافه کرده، سپس مقدار ۷۵۰ میکرولیتر اتانول مطلق سرد اضافه شده و ۱۰ بار Invert می‌شود و نهایتا در دور۱۳۵۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید.

۷- مایع رویی تخلیه و ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول سرد ۷۰ درصد اضافه و ۱۰ بار Invert و سپس سانتریفوژ در دور ۱۳۵۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

۸- مایع رویی تخلیه و در یک هیتر بلاک ۶۵ درجه سانتی‌گراد (لوله درب باز) جهت خشک کردن قرار گرفت.

۹- مقدار ۴۰ میکرولیتر بافر TE اضافه و ورتکس کوتاه با ضربات دست، تا DNA بیمار حل شود، نهایتاً محلول در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰-۵ دقیقه انکوبه شد.

۱۰- محلول DNA حاصل تا زمان استفاده در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌گردد.

توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ژنوم باکتری *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* که جهت تکثیر ناحیه ۴۲۹ bp ژن اوره آز (Urease) این باکتری مورد استفاده قرار گرفت(۱۹)، به شرح زیر است (جدول شماره ۱):

مراحل بهینه کردن تست PCR به شرح زیر به انجام رسید:

جهت انجام تست PCR، غلظت آنزیم Taq DNA Polymerase (۱/۵ واحد بین المللی بر میکرولیتر)، $MgCl_2$ (۱/۵ میلی‌مولار) و dNTP (۰/۲ میلی‌مولار) و پرایمرها (۰/۲ میکرومولار) مورد استفاده قرار گرفته شد.

DNA *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* نیز از بیمارستان بقیه‌الله تهیه گردید. سپس نمونه در دستگاه ترموسایکلر (مارک MyGene مدل MG96G) براساس برنامه دمایی و زمانی مشخص شده قرار گرفت، تا تکثیر(DNA Amplification) ژن مورد نظر به انجام برسد. برنامه دمایی PCR جهت تکثیر ژن مورد نظر (DNA Amplification) به ترتیب جدول زیر بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱: توالی نوکلئوتیدی و آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم*

ژن هدف	پرایمرها	اندازه جفت باز (bp)
Urease	Forward Primer: 5′-ACGACGTCCATAAGCAACT -3′ Reverse Primer: 5-CAATCTGCTCGTGAAGTATTAC-3′	429 bp

جدول شماره ۲: برنامه دمایی PCR جهت تکثیر ژن مورد نظر

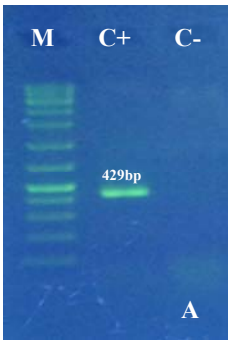
مراحل	دما	زمان	تعداد سیکل
Initial Denaturation (واسرشت اولیه)	۹۵°C	۵ دقیقه	۱
Denaturation (واسرشت)	۹۴°C	۳۰ ثانیه	-
Annealing (اتصال پرایمرها)	۵۴°C	۴۵ ثانیه	۴۰
Extention (سنتز)	۷۲°C	۴۵ ثانیه	-
Final Extention (سنتز نهایی)	۷۲°C	۵ دقیقه	۱

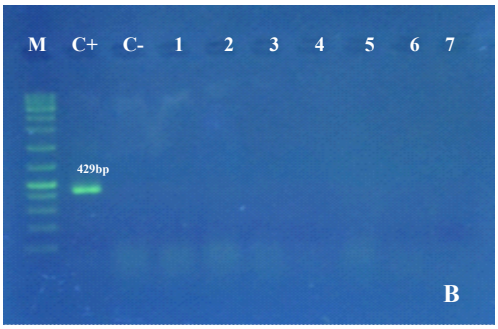
انجام الکتروفورز و آشکارسازی محصول PCR

پس از تهیه ژل آگارز ۱/۵ درصد و رسیدن دمای آن به حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد، به ازای هر ۱۰ میلی‌لیتر ژل، ۵ میکرولیتر رنگ سایبر گرین (SYBR-Safe Cinaclone) به ژل الکتروفورز ریخته شده و پس از بستن ژل، در داخل تانک الکتروفورز قرار گرفت. آن گاه ۸ میکرولیتر از محصول PCR با دقت به داخل چاهک‌های ایجاد شده در ژل ریخته شد. هم‌چنین حدود ۳ میکرولیتر از مارکر (1Kb Bioflux) به داخل یکی از چاهک‌ها اضافه گردید. پس از ریختن کنترل مثبت و هم‌چنین آب مقطر دو بار تقطیر استریل به عنوان کنترل منفی در چاهک‌های موردنظر، جریان الکتریسیته با ولتاژ ۹۰ ولت برقرار و محصولات تکثیر شده PCR با استفاده از الکتروفورز توسط ژل آگارز ردیابی شد. باندهای DNA توسط دستگاه UV Transilluminator (مارک Spectroline) مشاهده و عکس برداری شد.

یافته ها

نتایج آزمون بهینه‌سازی و اختصاصیت PCR جهت تشخیص *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* در تصویر شماره۱ نمایش داده شده است. هم‌چنین از مجموع حدود ۱۰۰ نمونه مایع منی مردان نابارور مورد مطالعه، ۱۶ نمونه (۱۶ درصد) از نظر وجود *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* مثبت ارزیابی شدند (تصویر شماره ۲).





تصویر شماره ۱: آزمون بهینه سازی و اختصاصیت PCR جهت تشخیص *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم*

A- تست PCR بهینه شده *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم*:

M : سایز مارکر 1 Kb DNA Ladder (Bioflux)

کنترل مثبت: C+

کنترل منفی :C-

B- تست PCR اختصاصیت *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم*:

M : سایز مارکر 1 Kb DNA Ladder (Bioflux)

کنترل مثبت : C+

کنترل منفی: C-

۱- *M. pneumoniae*

۲- *M.hominis*

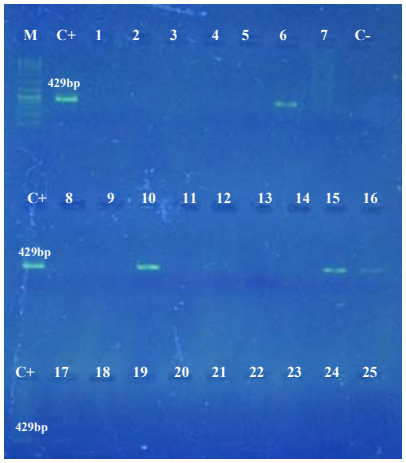
۳- *M.genitalium*

۴- *M.arginini*

۵- *Acholeplasma.laidlawii*

۶- *M.hyorhinis*

۷- Human DNA



تصویر شماره ۲: تست PCR *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* بر روی نمونه ها

M: سایز مارکر 1 Kb DNA Ladder (Bioflux)

کنترل مثبت : **C+**

کنترل منفی: **C-**

نمونه های مثبت : ۱۶و۱۵و۱۰و۶

نمونه های منفی: ۲۵-۱۷و۱۴-۱۱و۹-۷ و۵-۱

پس از بررسی و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نتایج زیر به دست آمد:

حداقل و حداکثر سن مردان متاهل نابارور مورد مطالعه به ترتیب ۲۱ و ۶۰ سال و میانگین آن ها ۳۴/۸۴ سال بود. مردان نابارور با محدوده سنی ۳۰ تا ۴۰ سال، ۱۶/۷ درصد نسبت به سایر گروه های سنی، آلودگی بیش‌تری به این باکتری داشتند (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: توزیع فراوانی مطلق و نسبی افراد بر حسب گروه سنی برای باکتری *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم*

گروه سن (سال)	اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم		کل
	مثبت (درصد)	منفی (درصد)	
۲۰-۳۰	(۱۶/۷)۴	(۸۳/۳)۲۰	(۱۰۰)۲۴
۳۰-۴۰	(۱۶/۷)۱۰	(۸۳/۳)۵۰	(۱۰۰)۶۰
۴۰-۵۰	(۱۳/۳)۲	(۸۶/۷)۱۳	(۱۰۰)۱۵
۵۰-۶۰	(۰)۰	(۱۰۰)۱	(۱۰۰)۱
کل	(۱۶)۱۶	(۸۴)۸۴	(۱۰۰)۱۰۰

تمامی نمونه ها، حداقل در یک یا دو پارامتر (تعداد اسپرم، تحرک و یا مورفولوژی) مورد بررسی در آنالیز اسپرم، نتایج غیر طبیعی داشته و هم‌چنین تمامی این مردان نابارور با توجه به بررسی عفونت باکتریایی در

این روش تحقیقاتی، براساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO,2010) دارای لوکوسیت بالاتر از حد نرمال (Mil/ml ۱-۰) بودند. در بررسی پارامترهای اسپرم در نمونه‌ها، به‌طور کلی این نتایج به دست آمد: در بین افرادی که از نظر حضور باکتری مثبت ارزیابی شدند، ۷۷/۸ درصد از افراد دارای تعداد اسپرم نرمال و ۲۲/۲ درصد، تعداد اسپرم غیر نرمال داشتند. هم‌چنین از نظر میزان تحرک، ۸۳ درصد از افراد نرمال و ۱۷ درصد غیر نرمال و از نظر مورفولوژی، ۸۲/۸ درصد از افراد طبیعی و ۱۷/۲ درصد از افراد مورفولوژی غیرطبیعی داشتند. با کاربرد آزمون Chi-Square، اختلاف معنی‌داری در بین هیچ‌کدام از آن‌ها مشاهده نگردید ($p > ۰/۰۵$).

بحث

ناباروری عبارتست از عدم ایجاد حاملگی با وجود یکسال نزدیکی جنسی بدون استفاده از هرگونه وسیله ممانعت از بارداری، این در حالی است که ۵۰ تا ۸۰ میلیون زوج در سراسر جهان از ناباروری رنج می‌برند(۲۰). در این میان یکی از مهم‌ترین عوامل ناباروری مردان، عفونت های مجرای ادراری– تناسلی می‌باشد(۲۱). *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* یکی از عوامل اصلی اورتریت غیرگنوکوکی بوده و نقش آن در ایجاد برخی از عفونت‌های دستگاه ادراری- تناسلی ثابت شده است. تعدادی از مطالعات نشان دهنده آنست که *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* نقش اتیولوژیک مهمی در ناباروری مردان و عفونت های تناسلی ایفاء می‌کند(۲۲). در ارتباط با میزان شیوع *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور در مقالات مختلف از ۵ تا ۴۲ درصد متغیر است(۲۳). در تحقیق حاضر، شیوع *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* در مایع منی مردان نابارور، ۱۶ درصد به دست آمد که در محدوده گزارش شده مقالات قرار دارد. هم‌چنین در این تحقیق با استفاده از روش مولکولی PCR میزان فراوانی *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* نشان داده شده است. PCR روشی آسان، سریع، بسیار حساس و اختصاصی است که برای تشخیص اوره آپلاسما در نمونه‌های بالینی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اوره آپلاسما در مقایسه با باکتری‌های دیگر به دلیل نداشتن دیواره سلولی به شرایط محیطی نظیر PH، دما و ترکیبات موجود در محیط کشت بسیار حساس است و به هنگام نمونه‌برداری و یا انتقال به آزمایشگاه ممکن است باکتری ضعیف و از بین رفته و در محیط‌های کشت قابل بازیابی نباشد، در حالی که در روش PCR برای انجام آزمایش نیازی به باکتری زنده نیست و بنابراین نتایج کم‌تر تحت تاثیر نمونه‌برداری و انتقال قرار می‌گیرند(۲۴).

در ارتباط با تحقیق حاضر، نتایج مشابهی در مطالعات انجام شده توسط محققین به دست آمد. براساس تحقیق صورت گرفته توسط Yun Heng Zhou و همکاران در ژوئن ۲۰۱۷، ۵۴۰ نمونه مایع منی مردان نابارور جهت شناسایی و تشخیص حضور گونه‌های مختلف اوره آپلاسما از جمله *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* با کاربرد روش PCR و هم‌چنین بر اساس تست اسپرموگرام بر طبق استانداردهای WHO سال ۲۰۱۰ مورد بررسی قرارگرفتند. بر اساس نتایج حاصل حدود ۳۹/۶ درصد از ۵۴۰ نمونه از نظر حضور گونه‌های اوره آپلاسما مثبت گزارش شده، که ۲۶/۲ درصد از آن‌ها مثبت از نظر حضور *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* می‌باشند. این امر بیانگر آنست که عفونت حاصل از گونه‌های مختلف اوره آپلاسما نقش پاتوژنیک بسیار مهمی در ناباروری مردان دارد. هم‌چنین با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز مایع منی، اوره آپلاسما می‌تواند کاهش چشمگیری را در میزان تحرک اسپرم به وجود آورد(۱). این نتایج با توجه به کاربرد روش PCR و نقش اوره آپلاسما بر پارامترهای اسپرم با نتایج ما تشابه دارد. در تحقیقی که Junjie Liu و همکارانش در سال ۲۰۱۴ برروی حدود ۶۲۱ مرد نابارور با هدف شناسایی *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* در کشور چین به انجام رساندند، تاثیر این

باکتری را در کاهش عملکرد پارامترهای اسپرم و در نهایت ناباروی به اثبات رساندند(۲۵). این نتایج با بررسی‌های به عمل آمده در تحقیق ما نیز تشابه دارد، به گونه‌ای که میزان اثرگذاری این باکتری بر پارامترهای اسپرم و در نهایت ناباروی مشاهده شد. در سال ۲۰۱۰ میلادی یک گروه محقق چینی به سرپرستی L.Xia JL و همکارانش با کاربرد روش مولکولی چون Real-Time PCR به شناسایی دو گونه اوره آپلاسما به نام‌های *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* و *اوره آپلاسما پاروم* در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور پرداختند و به این نتیجه دست یافتند که کاربرد روش‌های مولکولی در مقایسه با روش‌های سنتی از جمله کشت و روش‌های سرولوژیکی در تشخیص و شناسایی دقیق باکتری‌ها از جمله گونه‌های مختلف اوره آپلاسما بسیار موثرتر و کارآمدتر می‌باشد. به گونه‌ای که آن‌ها توانستند از نتایج منفی روش‌های کشت این دسته از باکتری‌ها نتایج مثبت حاصل از تست PCR را کسب نمایندکه این امر نشانه تقدم روش PCR بر روش کشت می‌باشد(۲۶). لذا با توجه به بالا بودن میزان حساسیت تست PCR، جواب‌های منفی کشت در تست PCR مثبت ارزیابی می‌شوند. کشت *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* در شرایط مطلوب بیش از ۲ تا ۴ روز طول می‌کشد و به محیط‌های کشت بسیار اختصاصی با مکمل‌های غذایی و کارشناس با تجربه آزمایشگاهی نیاز دارد که کار کشت آن را پرهزینه و با اتلاف وقت همراه می‌نماید، در حالی که با روش PCR می‌توان در عرض چند ساعت چندین نمونه را به طور همزمان مورد آزمایش قرار داد و نتایج را منعکس نمود(۲۷).

در مطالعه ای که ضیغمی و همکاران بر روی ۱۰۰ نمونه مایع منی از مردان نابارور در سال ۲۰۰۹ به انجام رساندند، حدود ۱۲ درصد از نمونه‌ها، اوره آپلاسما مثبت تشخیص داده شدند که بسیار نزدیک به نتایج به دست آمده در پژوهش ما با میزان ۱۶ درصد است. این دسته از نمونه‌های مردان نابارور کاهش چشمگیری در حجم مایع منی و غلظت سلول‌های اسپرم داشتند و مورفولوژی طبیعی آن‌ها نیز دستخوش تغییراتی شده بود. هم‌چنین در گروه مردان نابارور با نتیجه PCR مثبت از نظر حضور اوره آپلاسما میزان حجم، تعداد و مورفولوژی اسپرم بسیار پایین‌تر از نمونه‌های مردان نابارور با نتیجه PCR منفی گزارش شد(۲۸). در تحقیقی که نجار پیرایه و همکاران در سال ۲۰۰۷ با مقایسه دو روش کشت و روش مولکولی PCR جهت شناسایی *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* بر روی حدود ۱۰۰ نمونه مایع منی مردان نابارور به انجام رساندند، میزان فراوانی این باکتری را حدود ۱۲ درصد گزارش کردند که با نتایج به دست آمده در پژوهش ما که حدود ۱۶ درصد می‌باشد، هم‌خوانی دارد(۲۴).

در بررسی که D.Sanocka و همکاران در سال ۲۰۰۵ به انجام رساندند، به تاثیر مستقیم عفونت باکتریایی از جمله *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* بر روی کیفیت اسپرم پی بردند. نتایج حاصل از تحقیق آن ها بیانگر آنست که عفونت مجاری تناسلی با حضور لوکوسیت و سویه‌های باکتریایی پاتوژن تعریف می‌شود، به گونه‌ای که این عفونت‌ها بر حجم، غلظت اسپرم، تحرک و مورفولوژی تاثیر گذاشته و سبب کاهش کارایی آن‌ها می‌شوند(۲۹). از آن‌جایی‌که در این تحقیق از نمونه‌های مایع منی با لوکوسیت بالاتر از حد نرمال به دلیل بررسی عفونت باکتریایی استفاده شده می‌توان گفت با مطالعه D.Sanocka مطابقت دارد. در مطالعه حاضر، بین محدوده سنی افراد مورد مطالعه و نتیجه حاصل از PCR ارتباط معنی‌داری یافت نشد. اما افراد در محدوده گروه سنی ۴۰-۳۰ سال نسبت به سایر گروه‌های سنی، آلودگی بیش‌تری به این باکتری داشتند. شاید بتوان گفت که به دلیل بالا رفتن سن ازدواج و افزایش فعالیت جنسی، بیش‌ترین میزان آلودگی در این محدوده سنی قرار دارد. این نتایج با نتایج گلشنی و همکارانش در سال ۱۳۸۶ که بالاترین میزان آلودگی را بین افراد دارای محدوده سنی ۴۰-۳۰ سال نشان دادند(۳۰)، مشابهت دارد.

تشخیص به موقع *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* و درمان آنتی‌بیوتیکی عفونت ناشی از آن در مردان ناباور تاثیر مثبتی بر روی بهبود کارآیی پارامترهای اسپرم و نیز باروری آن‌ها دارد. بر اساس نتایج به دست آمده در سال ۲۰۱۷ توسط احمدی و همکارانش که بر روی حدود ۱۶۵ مرد نابارور به انجام رسید، مشخص گردید در بیمارانی که نتایج تست PCR آن‌ها از نظر حضور *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* مثبت ارزیابی شده بود، درمان آنتی بیوتیکی پاسخ مناسبی داده به طوری که تاثیر آن در روند بهبود پارامترهای اسپرم مشخص شد. هم‌چنین همسران ۳۷ نفر از مجموع ۱۶۵ نفر مردان، پس از گذشت ۶ ماه از پروسه درمان آنتی‌بیوتیکی، باردار شدند(۲۸). بر طبق مطالعات صورت گرفته توسط احمدی و همکارانش در سال ۲۰۱۰، از مجموع ۲۲۰ نمونه مایع منی مردان نابارور بررسی شده با استفاده از روش PCR، میزان فراوانی *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* در حدود ۴۰/۵ درصد گزارش شد. در بررسی پارامترهای مربوط به اسپرم، میانگین قدرت تحرک اسپرم در گروه‌های مورد مطالعه پایین بود(۳۱). اختلاف این میزان درصد با میزان درصد مطالعه حاضر می‌تواند دلیل بر تعداد نمونه‌های مورد مطالعه باشد. در پژوهشی که Gdoura و همکارانش در تانزانیا در سال ۲۰۰۸ بر روی ۱۰۴ نمونه مایع منی، جهت شناسایی و بررسی میکروارگانیسم‌هایی چون *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم*، *کلامیدیا تراکوماتیس*، *مایکوپلاسما هومینیس* و *مایکوپلاسما ژنیتالیوم* به انجام رساندند، ارتباط بین این دسته از باکتری‌ها و کیفیت مایع منی و هم‌چنین میزان شیوع این ارگانیسم‌ها در مردان نابارور را با استفاده از روش PCR به اثبات رساندند، که میزان فراوانی *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* در نمونه‌های مورد بررسی، ۲/۹ درصد گزارش شد. نتیجه این مطالعات در مقایسه با نتایج ما با میزان ۱۶ درصد پایین‌تر ارزیابی شد(۱۲). در تحقیقی که توسط نجار پیرایه و همکاران در سال ۱۳۸۵ بر روی مردان نابارور انجام شد، آلودگی به *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* با استفاده از روش PCR در ۱۲ درصد از مردان نابارور و فقط در ۳ درصد از مردان بارور دیده شد(۲۴). 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 مورد- شاهد درآید. به نظر می‌رسد تفاوت‌ها در نسبت این ارگانیسم، 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. از مقایسه نتایج این مطالعه با سایر مطالعات انجام شده چنین بر می‌آید که آلودگی در افراد نابارور وجود دارد. آلودگی در مردان باعث کاهش تعداد، کارآیی اسپرم و اختلال در نفوذپذیری آن می‌شود. افزایش تعداد لوکوسیت‌ها و به دنبال آن آسیب به غشای اسپرماتوزوآ و DNA می‌تواند در ارتباط با حضور *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* در مردان نابارور باشد(۳۲). هم‌چنین این آلودگی می‌تواند از طریق اسپرم به همسر نیز منتقل شود(۳۳). لذا لازم است تا غربالگری میکروبی برای تمامی مردان نابارور به عنوان تست روتین انجام پذیرد و در صورت آلوده بودن به این باکتری، درمان زوجین به صورت همزمان صورت گیرد. با توجه به یافته‌های به دست آمده در مطالعه حاضر مبنی بر حضور چشمگیر *اوره آپلاسما اوره آلیتیکوم* با میزان فراوانی ۱۶ درصد نزد افراد مورد مطالعه، می توان نتیجه گرفت که این باکتری نزد افراد نابارور مسئله ساز است. اصلاح روند بروز آلودگی و تشخیص و درمان در زمان مناسب می‌تواند مانع از بروز عقیمی و عواقب مهم آن شود. بنابراین، تجویز آنتی‌بیوتیک مناسب توسط پزشک و رفع عفونت میکروبی و برگشت پارامترهای اسپرم به حالت طبیعی می‌تواند باعث باروری این مردان گردد. بنابراین لازم است که غربالگری‌های میکروبی برای همه مردان نابارور به عنوان تست روتین در مایع منی انجام

پذیرد. لذا این امر می‌تواند بخش مهمی از برنامه "کنترل بیماری‌های منتقله از راه تماس جنسی" به شمار آید.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری و پشتیبانی اعضاء و پرسنل خوب بیمارستان فوق‌تخصصی صارم دربخش‌های کلینیک ناباروری و IVF، خصوصاً سرکار خانم زهرا کرمی که در جمع آوری نمونه ها نهایت همکاری را داشتند و هم چنین از راهنماییهای ارزنده جناب آقای دکتر احمدرضا تافتاچی (اورولوژیست) و نیز از پرسنل محترم آزمایشگاه موسسه ایرانیان ژن فناور، به ویژه سرکار خانم مهسا ملک محمدی کلهرودی تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Zhou YH, Ma HX, Shi XX, Liu Y. Ureaplasma spp. in Male Infertility and its Relationship with Semen quality and Seminal Plasma Components. J Microbiol Immunol Infection 2017; 1182(17): 1-6.
2. Abusarah EA, Awwad ZM, Charvalos E, Shehabi AA. Molecular detection of potential sexually transmitted pathogens in semen and urine specimens of infertile and fertile males. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 77(4): 283-286.
3. Mikkel F, Ferdinando F, Larry L, Wolfgang W. Sexually transmitted Disease and Male Infertility: A Systematic Review. Eur Urol Focus 2016; 2(4): 383-393.
4. Niakan M, Moradi B, Ragheb Sh. Assessment of *Ureaplasma urealyticum* in Infertility Men vs Control Group. Iranian J Microb 2009; 3(1): 31-35 (Persian).
5. Zhang N, Wang R, Lix X, Tang Z, Liu Z. Are Ureaplasma Spp. a Cause of Nongonococcal Urethritis? A Systematic Review and meta-analysis. PloS One 2014; 9(12): ell3771.
6. Askienazy-Elbhar M. Male genital tract infection: the point of view of the bacteriologist. Gynecol Obstet Fertil 2005; 33(9): 691-697.
7. Kilic D, Basar MM, Kaygusuz S, Yilmaz E, Basar H Batislam E. Prevalence and treatment of *Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum,* and *Mycoplasma homins* in patients with non-gonococcal urethritis. JPN Infect Dis 2004; 57(1): 17-20.
8. 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(5): 562-568.
9. 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(4): 377-381.
10. Panel J, Quanxian W, Xiaofei J, Shang G, Yanpeng D, ZhanZhang et al. Prevalence of *Ureaplasma Urealyticum, Mycoplasma Hominis, Chlamydia Trachomatis* Infections, and Semen Quality in Infertile and Fertile Men in China. Urology 2014; 83(4): 795-799.
11. 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): 1-23.
12. Gdoura R, Kchaou L, Ammar Keskes, Chakrouna 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.

13. Potts JM, Ward AM, Rackley RR. Association of chronic Urinary symptoms in women and *Ureaplasma urealyticum*. Urology 2000; 55(4): 486-489.
14. 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): 1-13.
15. Reichart M, Kahane I, Bartoov B. In vivo and in vitroimpairment of human and ram sperm nuclear chromatin integrity by sexually transmitted *Ureaplasma urealyticum* infection. Biol Reprod 2000; 63(4): 1041-1048.
16. Cordova CM, Cunha RA. Relevant prevalence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* serogroup in HIV-1 infected Men without urethritis symptoms. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2000; 42(4): 185-188.
17. Saheb Kashaf S. Infertility in Men. Teharan: Salem Pub. 2002. (Persian).
18. Kathleem A, Stellrecht M. Comparison of Multiplex PCR assay with Culture for Detection of Genital Mycoplasma and Ureaplasma. J Clin Microbial 2004; (42): 1528-1533.
19. Ahmadi M, Amirmozafari N, Kazemi B, Sadeghi A, Masjedian F. Use of PCR to Detect *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from Semen Samples of Infertile Men who Referred to Royan Institute in 2009. Yakhteh 2010; 12(3): 371-80 (Persian).
20. Coskun E, Ozkan S, Vural B. Impact of Genital Infections on Fertility. J Turkish German Gynecol Assoc 2005; 6(3): 197-203.
21. 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.
22. Zhang N, Wang R, Li X, Liu X, Tang Z, Liu Y. Are Ureaplasma spp. a cause of nongonococcal urethritis? A systematic review and meta-analysis. PLoS One 2014; 9(12): e113771.
23. 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.
24. 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 Res J 2007; 10(3): 48-53 (Persian).
25. Liu J, Wang Q, Ji X, Guo S, Dai Y, Zhang Z, et al. Prevalence of *Ureaplasma Urealyticum, Mycoplasma hominis, Chlamydia Trachomatis* Infections, and Semen Quality in Infertile and Fertile Men in China. Urology 2014; 83(4): 795-799.
26. Xiao L, Glass JI, Paralanov V, Yooseph S, Cassell GH, Duffy LB, et al. Detection and Charaterization of Human Ureaplasma Species and Serovars by Real-Time PCR. J Clin Microbiol 2010; 48(2): 2715-2723.
27. Teng K, Li M, W Yu, Li H, Shen D, Liu D. Comparision of PCR with culture for detection of *Ureaplasma urealyticum* in clinical samples from patients with urogenical infections. J Clin Microbiol 1994; 32(9): 2232-2234.

28. Zeighami H, Peerayeh N, Yazdi RS, Sorouri R. Prevalence of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* in semen of infertile and healthy men. Int J STD AIDS 2009; 20(6): 387-390.
29. Sanocka-Maciejewska D, Ciupińska M, Kurpisz M. Bacterial Infection and Semen Quality. J Reprod Immunol 2005; 67(1-2): 51-56.
30. Golshani M, Eslami G, Mohammadzadeh G, Fallah F, Goudarz H, Solemani 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. (persian).
31. Ahmadi M, Mirsalehian A, Sedighi M, Bahador A, Talebi M, Yazdi R. Antibiotic treatment of asymptomatic Ureaplasma infection improves semen parameters in infertile men. J Appl Med 2017; 15(2): 139-145.
32. Zhang Q, XiaoY, Zhuang W, Cheng B, Zheng L, Cai Y, et al. Effects of biovar I and biovar II of *Ureaplasma urealyticum* on sperm parameters, lipid peroxidation, and deoxyribonucleic acid damage in male infertility. Urology 2014; 84(1): 87-92.
33. Deguchi T, Shimada Y, Horie K, Mizutani K, Seike K, Tsuchiya T, et al. Bacterial loads of *Ureaplasma parvum* contribute to the development of inflammatory responses in the male urethra. Int J STD AIDS 2015; 26(14): 1035-1039.