

ارتباط ژن های *fim H*، *pap* و *afa* در *E.coli* ایجادکننده عفونت های ادراری با ناباروری مردان

الهام سیاسی^{۱*}، فرناز سهراب وند^۲، ندا گوهری^۱

۱ - گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲ - گروه مامایی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: عفونت های ادراری مردان فاکتور بسیار مهمی در ناباروری مردان است. از فراوان ترین و مهم ترین عامل باکتریای تخریب کننده اسپرماتوزن، باکتری *E.coli* می باشد. هدف این تحقیق بررسی حضور ژن های *fim H*، *pap* و *afa* در نمونه های semen آلوده به *E.coli* در مردان نابارور بود.

مواد و روش ها: ۱۰۰ نمونه semen آنالیز و کشت داده شد. با تست های بیوشیمیایی نوع پاتوژن ها شناسایی گردید. نمونه های *E.coli* جهت استخراج ژنوم جداسازی شدند و با PCR فراوانی ژن های *fim H*، *pap* و *afa* در آن ها بررسی گردید.

یافته ها: از ۱۰۰ نمونه semen، ۵۳ نمونه باکتریایی شامل: *E.coli* ۱۸/۸۶٪، استافیلوکوک، ۴۵/۰۹٪، استرپتوکوک و ۵/۸۸٪ کلبسیلا جداسازی گردید. نمونه های آلوده به *E.coli* دارای تحرک و مورفولوژی اسپرم غیر نرمال بودند. حضور ژن های *fim H* و *pap* با فراوانی بالا ۱۰۰٪ در نمونه های *E.coli* مشاهده شد، اما ژن *afa* در هیچ یک از نمونه ها مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که نمونه های semen مردان نابارور آلوده به باکتری *E.coli* بود. از آن جایی که این باکتری یک پاتوژن مهم دستگاه تناسلی است، شناسایی موقعیت و شیوع ژن های بیماری زا از جمله کدکننده ادھزین ها می تواند در کنترل عفونت و راه های درمان مؤثر باشد. بنابراین بررسی حضور ژن های *fimH* و *pap* در نمونه های مردان نابارور آلوده با *E.coli* می تواند ارتباط عفونت باکتریایی با ناباروری را مطرح نماید.

واژه های کلیدی: ژن *fim H* و *pap* و *afa* عفونت ادراری، ناباروری مردان، *E.coli*

مقدمه

قبل و یا عفونت های بدون علامت ایجاد گردد. عفونت های ساده نظیر عفونت های ادراری در زنان و مردان می تواند در دراز مدت منجر به ناباروری گردد (۶). تأثیر این عفونت ها در باروری یک زوج امروزه بسیار قابل توجه بوده و مورد بررسی قرار دارد (۱۶). در حدود ۳۵٪ از علت های ناباروری در مردان، عفونت های دستگاه ادراری - تناسلی می باشد (۶). عفونت های ادراری - تناسلی به طور رایج توسط میکروبهایی نظیر کلامیدیا تراکوماتیس، مایکوپلاسما هومینس، *E.coli*، استافیلوکوک ها، استرپتوکوک ها،

علت ۲۰٪ موارد ناباروری ها، هنوز مشخص نشده است. گاهی علل ناشناخته ناباروری می تواند به دنبال عفونت های

نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

پست الکترونیکی: emi_biotech2006@yahoo.ca

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۲۷

گونوکوکوسی، کاندیدیا و کلبسیلا ایجاد می گردد (۸). این عفونت‌ها در ابتدا بسیار ساده و قابل درمان هستند اما در صورتی که درمان به موقع صورت نگیرد و یا بیمار درمان آنتی‌بیوتیکی را کامل نکند، می‌تواند گسترش یافته و ضمن کسب مقاومت به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در دستگاه تناسلی اختلال‌هایی ایجاد نماید (۶). از میان میکروارگانسیم‌های نام‌برده شده، باکتری *E. coli* یکی از رایج‌ترین میکروب‌های جدا شده از سمن می‌باشد. این باکتری مهم‌ترین پاتوژن مسبب التهاب پروستات و اپیدیدیمیس است (۸). در مردان نیز این عفونت‌ها می‌تواند از طریق مثانه، بیضه‌ها، مجاری اسپرم‌ساز، مایع سمن و در نهایت اسپرم‌ها و اسپرماتوزوا را آلوده کند. این عفونت‌ها می‌توانند روی عملکرد اسپرم، اختلال در حرکت آن از طریق تخریب اکروزوم‌ها، تغییر مورفولوژی اسپرم و کاهش میزان اسپرماتوزوا در مایع سمن تأثیرگذار باشند و عاملی در ایجاد ناباروری گردد (۱۰، ۱۸، ۲۱). تأثیر منفی سویه‌های مختلف باکتری *E. coli* روی تحرک و مورفولوژی اسپرم انسانی در آزمایش‌های *in vitro* مکانیسمی را نشان می‌دهد که باکتری از طریق ادهزین‌های موجود در سطح سلول خود، اتصالی محکم و مقاوم با اسپرماتوزوای انسانی برقرار می‌کند (۸). باکتری *E. coli* ادهزین‌های مقاومی دارد که برای اتصال به سلول میزبان و بیماری‌زایی از آن‌ها استفاده می‌نماید (۴). در نتیجه این ادهزین‌ها بسیار مورد توجه محققین قرار داشته و طی بررسی‌های انجام شده، در باکتری *E. coli* ادهزین اختصاصی جهت اتصال به اسپرم انسانی مشاهده شده‌است. این فاکتور اختصاصی با اتصال به اسپرماتوزوا و تخریب غشای اکروزوم‌ها در تحرک اسپرم اختلال ایجاد کرده و از این رو فاکتور عدم تحرک اسپرم *sperm immobilization factor* (SIF) نامیده می‌شود (۸، ۱۸). هم‌چنین مشخص شده که فاکتورهای عدم تحرک اسپرم می‌توانند نقش بسیار مهمی در کاهش تعداد اسپرم داشته باشند (۹، ۱۵). مشاهده شده است که در روش (In IVF) (*in vitro fertilization*) که مهم‌ترین درمان نازایی می‌باشد، باکتری *E. coli* می‌تواند موجب شکست در درمان و

اختلال حاملگی خارج رحمی باشد. با کشت سلول‌های IVF رایج‌ترین میکروارگانسیم‌های جدا شده شده باکتری *E. coli* و قارچ‌ها بوده‌اند (۱۶). *E. coli* هم‌چنین شایع‌ترین عامل عفونت بیمارستانی می‌باشد که در مردان و زنان حضور یکسان داشته و همراه با استفاده از سوندهای ادراری اتفاق می‌افتد. عفونت مجاری ادراری می‌تواند به مثانه محدود شده و یا به سمت سیستم جمع‌کننده کلیه‌ها گسترش یابد. در صورتی که فقط مثانه مبتلا باشد، بیماری سیستمیت نامیده می‌شود و اگر کلیه‌ها گرفتار شده باشند، بیماری پیلونفریت خوانده می‌شود. مشخص‌ترین نشانه‌های سیستمیت، درد و تکرر ادرار می‌باشد ولی پیلونفریت با تب، لرز و درد پهلوها تظاهر می‌یابد. درمان عفونت‌های ناشی از *E. coli*، به محل بیماری و الگوی مقاومت دارویی بستگی دارد. به‌عنوان مثال، درمان عفونت‌های بدون عارضه مجرای ادراری تحتانی را می‌توان به مدت ۱ تا ۳ روز با تری متوپریم، سولفامتوکسازول خوراکی و یا یک پنی‌سیلین خوراکی مثل آمپی‌سیلین، درمان نمود (۱۲، ۱۴، ۱۹).

به‌علت تأثیر عفونت‌های ایجاد شده توسط باکتری *E. coli* در ناباروری مردان و اختلال‌های اسپرمی در این تحقیق به بررسی روش‌های شناسایی و تشخیص باکتری *E. coli* و فاکتورهای ویروالانس آن پرداخته شده است. برخی سروتیپ‌های آنتی‌ژن *E. coli* O بیش از سایرین علت ایجاد عفونت‌های مجاری ادراری می‌باشند. این سویه‌های ایجادکننده عفونت ادراری با داشتن مژک‌ها و پروتئین‌های اتصالی مشخص می‌شوند و قادرند به گیرنده‌های ویژه‌ای بر روی اپیتلیوم مجاری ادراری متصل شوند. محل اتصال بر روی گیرنده‌ها، از ساختارهای دوگانه متشکل از گالاکتوز (دایمرهای Gal-Gal) تشکیل یافته است. توانایی تحرک باکتری به احتمال به آن کمک می‌کند تا از راه پیشابراه به مثانه و از مثانه به حالب و کلیه‌ها صعود نماید (۷).

ادهزین‌های *E. coli* ادراری، می‌تواند بیماری‌زایی را از راه‌های گوناگون شامل راه‌اندازی مسیرهای سیگنال‌دهی بین سلول

به خصوص سویه های بیماری زای *E. coli*، می توان مکانیسم های ایجاد عفونت و راه های انتقال بیماری توسط این باکتری را شناسایی نمود و سبب پیشگیری و درمان به موقع عفونت ها و التهابات ناشی از آن شد. در مطالعه حاضر با بررسی ارتباط ژن-های *afa*، *pap* و *fim H* در *E. coli* ایجادکننده عفونت های ادراری با ناباروری در مردان، به نقش عفونت های ادراری آلوده به باکتری ها به عنوان یکی از مهم ترین علل ناباروری پرداخته شده است.

مواد و روش ها

جمعیت مورد مطالعه و روش های جمع آوری نمونه - در این مطالعه علمی- پژوهشی، در مجموع ۱۰۰ نمونه semen آنالیز و کشت داده شد. نمونه های مایع سمینال از مردان نابارور مراجعه کننده در گروه سنی ۲۳-۴۵ سال، دریافت گردید. در مرحله اول نمونه ها توسط میکروسکوپ الکترونی TEM از نظر پارامترهای semen بررسی و آنالیز گردیدند و سپس به آزمایشگاه میکروبی شناسی منتقل شدند و روی محیط های کشت میکروبی کشت داده شدند. پس از ۲۴-۴۸ ساعت نگهداری در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد پلیت ها از نظر رشد باکتری ها بررسی شدند. سپس جهت شناسایی دقیق پاتوژن، تست های افتراقی و بیوشیمیایی انجام گردید.

کشت باکتریایی - در ابتدا نمونه های semen توسط لوپ استریل شده روی محیط های کشت بلادآگار (برای تفکیک استرپتوکوک ها)، نوترین آگار و مانیتول سالت آگار (برای استافیلوکوک ها)، بایل اسکولین آگار (برای انتروکوک ها) و EMB (برای انتروباکتریاسه ها از جمله *E. coli* و کلبسیلا) کشت داده شد. بعد از کشت دادن نمونه ها و نگهداری پلیت ها در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت، کلنی رشد یافته ابتدا با کشت های ۴ مرحله ای، خالص شد و توسط رنگ آمیزی گرم نوع و خلوص کلنی ها مورد بررسی قرار گرفت.

تست های بیوشیمیایی کلنی های خالص، از نظر تست های مختلف بیوشیمیایی مانند: TSI، اکسیداز، کاتالاز، MR-VP،

باکتری و میزبان، تسریع در دریافت پروتئین های باکتریایی به بافت های میزبان و تسریع در تهاجم باکتری ایجاد نماید (۷). در این تحقیق از میان ژن های ویروالانس *E. coli* و مرتبط با عفونت های ادراری، سه ژن *pap*، *fim H* و *afa* که تولیدکننده ادھزین های بیماری زا در *E. coli* ژن های ایجاد کننده عفونت ادراری می باشند، مورد بررسی قرار گرفته است.

ژن *fimH* در *E. coli* برای تولید پیلی نوع ۱ ضروری بوده و مشخص شده است که در تنظیم مرحله طویل سازی و خاصیت چسبندگی دخالت دارند. از آن جایی که پیلی نوع ۱، در هر دو سویه های بیماری زا و غیر بیماری زا بیان می شود، نقش این پیلی در بیماری زایی دستگاه ادراری به سختی آشکار می شود. در یک مدل موش مبتلا به عفونت دستگاه ادراری، پیلی نوع ۱، افزایش بقای باکتری، تحریک التهاب مخاط و افزایش تهاجم و رشد باکتری را به عنوان بیوفیلم نشان داده است (۲۰). ژن *pap* کدکننده پیلی وابسته به پیلونفریت (پیلی *p*) در باکتری های مسبب عفونت کلیه می باشد. پیلی *p* دومین فاکتور ویروالانس رایج در *E. coli* است و نقش مهمی در بیماری زایی عفونت ادراری و عفونت کلیه در انسان دارد. این پیلی ها مسئول چسبندگی به ماتریکس مخاط و بافت و تولید سیتوتوکسین ها می باشند. این پیلی، گلیکواسفنگولپیدی های کلیه را در سلول های اپیتلیوم کلیه شناسایی می کند که به نوبه خود، منجر به توسعه التهاب و درد موضعی همراه با عفونت می شود (۱). ژن *afa* کدکننده عوامل چسبندگی پیلی است که توسط باکتری *E. coli* پاتوژن ادراری و سویه های عامل ایجاد کننده اسهال بیان می شود. عوامل چسبندگی وابسته به *afa* با عفونت دستگاه ادراری مرتبط هستند و سویه های ایجادکننده عفونت های ادراری به طور منحصر به فرد این فاکتورها را در بافت کلیه بیان می کنند، این سویه ها دارای توانایی زیاد برای استقرار عفونت های مزمن یا حاد می باشند (۵،۱۱،۱۳).

در سال های اخیر پیشرفت تکنولوژی و افزایش روش های شناسایی و تشخیص مولکولی، برای بررسی فاکتورهای ویروالانس و حضور ژن های بیماری زا به کار گرفته شده است. در این صورت با شناسایی ژن ها و فاکتورهای ویروالانس باکتری ها

است و بر اساس اتصال اسید نوکلئیک بر یک غشای سیلیکا می باشد. حضور DNA با استفاده از ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفت.

انجام PCR - پس از استخراج ژنوم باکتری، جهت بررسی فراوانی ژن های *afa*، *pap* و *fim H* از واکنش زنجیره ای پلی-مرز استفاده شد. پرایمرها و مواد مورد نیاز و برنامه دستگاه ترموسایکلر در جدول ۱ و ۲ و ۳ آورده شده است. جهت اطمینان از درستی واکنش، از ژنوم باکتری *E.coli* ایزوله شده از عفونت ادراری مردان به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. هم چنین نمونه بدون DNA باکتری، به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن های *afa* و *pap* *fim H*.

نام ژن	توالی نوکلئوتیدی آغازگرها 5' - 3'	تعداد نوکلئوتید آغازگر	طول قطعه تکثیر یافته	شماره رفرنس
<i>fim H</i>	F- TGCAGAACGGATAAGCCGTGG R- GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	21 nt	508 bp	۱۹
<i>pap</i>	F- GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT R- AGAGAGAGCCACTTTATACGGACA	25 nt	336 bp	۷
<i>afa</i>	F- GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC R- CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG	25 nt	750 bp	۷

جدول ۲- نوع و میزان مواد مورد نیاز برای PCR

حجم مورد استفاده	مواد مورد نیاز برای PCR
۱۷ میکرولیتر	آب مقطر استریل
۲/۵ میکرولیتر	PCR buffer 10x*
۱ میکرولیتر	پرایمر چپ ۰/۱-۱ میکرومولار
۱ میکرولیتر	پرایمر راست ۰/۱-۱ میکرومولار
۱ میکرولیتر	نمونه DNA
۱ میکرولیتر	dNTP ۱۰۰ میکرومولار
۱ میکرولیتر	MgCl ₂
۱ میکرولیتر	**آنزیم Taq پلی مراز 5u/μl
۰/۵ میکرولیتر	حجم نهایی واکنش
۲۵ میکرولیتر	

* بافر شامل ۵۰۰ میلی مولار KCL، ۱۰۰ میلی مولار Tris-Hcl با pH برابر ۰/۸، ۴/۸، ۱/۵ میلی مولار کلرید منیزیم (Mgcl₂) و ۱ میلی گرم در هر میلی لیتر ژلاتین می باشد.

** محصولات از شرکت Fermentas تهیه شده اند.

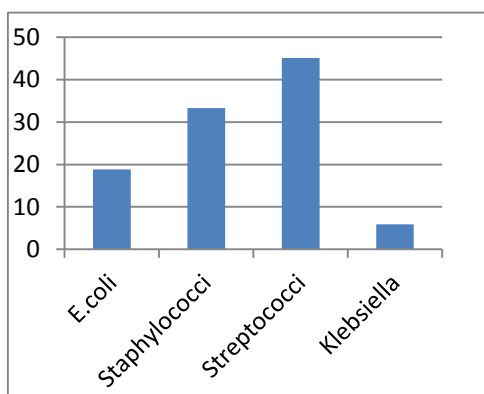
جدول ۳- برنامه PCR مورد استفاده برای تکثیر ژن های *afa* و *pap fim H*

نام ژن	واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال	بسط	بسط نهایی	تعداد چرخه	طول محصول PCR
<i>fim H</i>	۹۶°C به مدت ۵ دقیقه	۹۴°C به مدت ۱ دقیقه	۶۳°C به مدت ۱ دقیقه	۷۲°C به مدت ۲ دقیقه	۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه	۳۰	508 bp
<i>pap</i>	۹۶°C به مدت ۵ دقیقه	۹۴°C به مدت ۱ دقیقه	۶۷,۲°C به مدت ۱ دقیقه	۷۲°C به مدت ۲ دقیقه	۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه	۳۰	336 bp
<i>afa</i>	۹۶°C به مدت ۵ دقیقه	۹۴°C به مدت ۱ دقیقه	۶۸°C به مدت ۱ دقیقه	۷۲°C به مدت ۲ دقیقه	۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه	۳۰	750 bp

ژل را در ظرف آب قرارداده و برای مشاهده باندهای DNA موجود، ژل رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید روی دستگاه ترانس لومیناتور با اشعه UV قرار داده می شود.

نتایج

باکتری های ایزوله شده از نمونه ها - از ۱۰۰ نمونه مایع سمن جمع آوری شده، ۵۳ نمونه حاوی پاتوژن های باکتریایی بودند و از این تعداد، حدود ۱۸,۸۶٪ باکتری *E. coli*، ۳۳/۳۳٪ باکتری *استافیلوکوک*، ۴۵/۰۹٪ باکتری *استرپتوکوک* و ۵/۸۸٪ باکتری *کلبسیلا* جداسازی گردید (شکل ۱).



شکل ۱- نوع و تعداد گونه های باکتری های جدا شده از نمونه های Semen روی محور افقی نوع باکتری های جدا شده از semen که به ترتیب از چپ به راست شامل: *E. coli*، *استافیلوکوکوس* اورئوس، *استرپتوکوکوس* آلفا همولیتیک و *کلبسیلا* پنومونیه-

تأیید حضور ژن ها - بعد از انجام عمل PCR، برای بررسی تکثیر یا عدم تکثیر ژن های مورد نظر، محصول های حاصل از PCR مربوطه با بافر نمونه^۱ یا بافر بارگیری DNA در ژل که شامل: برموفنل بلو ۰/۲۵٪، ساکارز ۵۰٪، تریس بازی یک مولار ۲ میکرولیتر است مخلوط می گردد. برای وارد کردن نمونه های حاوی DNA به درون چاهک های ژل، با توجه به نوع آزمایش، مقدار خاصی از نمونه PCR شده (حدود ۲-۵ میکرولیتر) با حجم مساوی از بافر بارگیری مخلوط شده و با استفاده از میکروپیپت به داخل چاهک های ژل منتقل می گردد. رنگ موجود در بافر بارگیری که کمابیش رنگ برومو فیل بلو است، علاوه بر سنگین کردن DNA برای ته نشین شدن در چاهک ها، میزان حرکت نمونه های DNA تکثیر شده (PCR Products) را مشخص می کند. سپس همراه ۵ میکرولیتر مارکر مولکولی (*Ledder metabion*) ۳۰۰ bp (ساخت کشور آلمان) بر روی ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز گردید. به دلیل کوچک بودن طول محصول PCR از ژل آگاروز ۲٪ استفاده شد زیرا از صحت باند تشکیل شده بر روی ژل اطمینان حاصل شود و برای این منظور پس از برقراری جریان در تانک الکتروفورز، زمان داده می شود تا مواد موجود در چاهک ها به آرامی در طول ژل به سمت پایین حرکت نمایند (حدود ۶۰-۴۵ دقیقه). قبل از این که ماده رنگی به انتهای ژل برسد دستگاه را خاموش کرده و جهت رنگ آمیزی و مشاهده باندهای DNA، ژل برای مدت ۲۰-۱۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید قرار داده می شود. سپس به مدت ۱۰-۵ دقیقه

^۲- UV Tranilluminator

^۱- Loding Buffer

پاتوژن ها، کمترین میزان تحرک اسپرمها در نمونه های آلوده به *E.coli* با ۲۹/۳۷٪ و بیشترین تحرک اسپرمی در نمونه های آلوده به کلبسیلا مشاهده گردید (جدول ۵). در بررسی مورفولوژی نرمال اسپرمها در نمونه های semen آلوده به باکتری ها، بیشترین مورفولوژی نرمال در نمونه های آلوده به باکتری *استافیلوکوکوکوک* ها با ۱۲/۹۴٪ و کمترین میزان مورفولوژی در نمونه های آلوده به باکتری کلبسیلا مشاهده گردیده است (شکل ۲).

روی محور عمودی تعداد باکتری جدا شده از ۵۳ نمونه semen مردان نابارور دارای آلودگی باکتریایی.

بررسی پارامترهای نمونه های اسپرم های

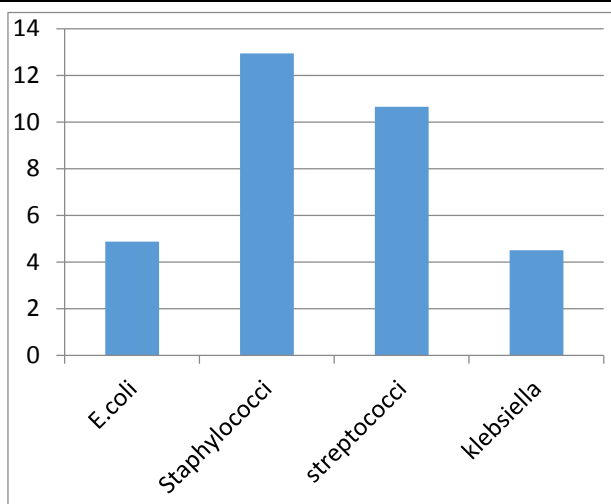
بیماران - با بررسی پارامترهای میزان تحرک، مورفولوژی و تعداد اسپرم نمونه های بیماران مقادیر متفاوت از مقادیر استاندارد سازمان بهداشت جهانی به دست آمد (جدول ۴). با بررسی پارامترهای اسپرم در نمونه های سمینال آلوده به

جدول ۴ - مقایسه پارامترهای سمن در نمونه های جمع آوری شده

نمونه	درصد مورفولوژی اسپرم	درصد تحرک اسپرم	درصد میزان تعداد اسپرم
نمونه های آلوده به <i>E.coli</i>	۲۹/۳۷	۴/۸۷	31×10^6
نمونه های فاقد آلودگی به باکتری	۹/۱۵	۴۲/۲۳	33×10^6
استاندارد مرکز WHO	۳۰	۵۰	20×10^6

جدول ۵ - میزان تحرک اسپرمها در نمونه های آلوده به باکتری ها

میانگین درصد تحرک اسپرم	باکتری های جدا شده از semen
۲۹/۳۷	<i>E.coli</i>
۴۳/۶۴	<i>staphylococci</i>
۳۳/۷۸	<i>streptococci</i>
۴۶/۶۶	<i>klebsiella</i>
۴۲/۲۳	نمونه های غیر آلوده



شکل ۲ - مقایسه میزان مورفولوژی نرمال اسپرمها در نمونه های Semen

های جدا شده، آورده شده است. در تمام نمونه‌های مورد بررسی، ژن‌های *fim H* و *pap* به میزان ۱۰۰٪ وجود داشتند. ژن *afa* که ژنی بسیار کمیاب در باکتری‌های *E.coli* ایزوله شده از ادرار می‌باشد، در هیچ‌یک از نمونه‌های ایزوله شده از نمونه‌های *semen* یافت نگردید. از نتایج مشاهده باند حاصل از محصول‌های PCR و با توجه به فراوانی بالای دو ژن *fim H* و *pap* در تمام نمونه‌های *E.coli* ایزوله شده از سمینال مردان نابارور و عدم حضور ژن *afa* در ایزوله‌ها می‌توان چنین نتیجه گرفت که بین حضور دو ژن *fim H* و *pap* در باکتری *E.coli* ایجادکننده عفونت در سمینال مردان نابارور ارتباط وجود دارد که این امر می‌تواند به‌عنوان عاملی برای ایجاد ناباروری در آن مردان مطرح باشد.

روی محور افقی نوع باکتری‌های جدا شده از *semen* که به- ترتیب از چپ به راست شامل: *E.coli*، استافیلوکوکوس اورئوس، استرپتوکوکوس *آلفا* همولیتیک و کلبسیلا پنومونیه- روی محور عمودی I میزان درصد مورفولوژی نرمال اسپرم در *semen* مردان نابارور دارای آلودگی باکتریایی.

بررسی حضور ژن‌های *fim H* و *pap* در

باکتری *E.coli* نمونه‌ها- ژنوم سویه‌های *E.coli* شناسایی

شده با آزمون‌های شیمیایی، جهت حضور ژن‌های کدکننده- ادهزینی *fim H* و *pap* PCR شدند و برای تکثیر منطقه ژنتیکی مربوطه مورد بررسی قرار گرفتند. در جدول ۶ طول محصول‌های حاصل از PCR برای هر ژن در DNA باکتری-

جدول ۶ - بررسی فراوانی ژن‌های کدکننده‌ی ادهزینی‌های *E.coli* جدا شده از Semen

نوع ژن	طول محصول‌های PCR	فراوانی ژن در باکتری
<i>fim H</i>	508 bp	٪ ۱۰۰
<i>pap</i>	336 bp	٪ ۱۰۰
<i>afa</i>	750 bp	-

بحث

عفونت روی اسپرماتوزوا فراهم می‌کند (۲۲، ۱۷). عفونت‌های مزمن یا حاد روی اسپرماتوزن اثر گذاشته و موجب کاهش کمی و کیفی اسپرم‌ها می‌شود. هم‌چنین عفونت‌های دستگاه ادراری، با تغییرهای بیولوژی و بیوشیمیایی مایع سمینال مرتبط هستند که می‌تواند برای عملکرد و پتانسیل لقاح با تأثیر در اسپرما توزوا، تخریب‌کننده باشد (۸). بررسی‌های مختلف دلالت بر این دارد که در میان گونه‌های باکتریایی که روی اسپرماتوزوا اثر می‌کنند، فراوان‌ترین و مهم‌ترین پاتوژن عفونت‌های ادراری، باکتری *E.coli* می‌باشد. این باکتری قادر است در محیط *in vitro* و *in vivo* به سرعت به اسپرماتوزوای انسانی بچسبد که نتیجه آن آگلوتیناسیون اسپرماتوزوا می‌باشد و کاهش زیاد در حرکت اسپرماتوزوا، نتیجه تغییرهای متناوب در مورفولوژی اسپرم است که توسط *E.coli* ایجاد می‌شود. تأثیر مهارکنندگی *E.coli* روی حرکت اسپرماتوزوا، به غلظت‌های باکتریایی وابسته است (۱۶، ۸).

عفونت‌های دستگاه ادراری- تناسلی مردان، در سراسر جهان، یکی از بیش‌ترین علت‌های ناباروری می‌باشد (۱۶). عفونت و التهاب دستگاه ادراری، مکانیسم قدرتمندی است که می‌تواند در صورت کنترل نشدن، بخش‌های متفاوتی از دستگاه تناسلی مردان را در بر گرفته و از راه‌های گوناگونی منجر به ناباروری شود و به پیشرفت آن کمک کند. برخی مکانیسم‌های آسیب شناسی که در سال‌های اخیر در این زمینه مورد بررسی قرار گرفته‌اند، آلودگی‌ها و عفونت‌های باکتریایی می‌باشند که عفونت‌ها می‌توانند یا به‌طور مستقیم روی عملکرد اسپرم (در تحرک یا مورفولوژی) و یا در زوال و تخریب اسپرماتوزن تأثیر گذاشته و در برخی موارد، این عفونت‌ها قادرند مکانیسم‌های خودایمنی را القا کنند که منجر به عمل غیرمعمول غده‌های جنسی مردان می‌گردد. واکنش مستقیم بین باکتری‌های پاتوژن و سلول‌های کمپلمان ایمنی، شرایطی را برای افزایش

ویروئاس متعدد دارد که در روند بیماریزایی باکتری نقش مهمی بر عهده دارند، از جمله این ویژگی‌ها، فاکتورهای ویروئاس سطحی و توکسین‌ها هستند که در ایجاد عفونت‌های دستگاه ادراری تناسلی موثر می‌باشند (۷). آدهزین‌های سطحی باکتری با اتصال به سطح اسپرماتوزوای انسانی، به آگلوتیناسیون اسپرم‌ها کمک نموده و نتیجه آن کاهش تحرک اسپرم‌ها و تغییر مورفولوژی آن‌ها می‌باشد. در چنین شرایطی پتانسیل باروری اسپرم کاهش یافته و به افزایش ناباروری مردان کمک می‌نماید (۱۸، ۱۰، ۸). از میان ژن‌های کدکننده آدهزینی باکتری، ژن‌های *fim H* و *pap* با شیوع بالا، کدکننده آدهزین‌های باکتری بوده که به باکتری خاصیت هم‌آگلوتیناسیونی و چسبندگی به ماتریکس مخاط و بافت را می‌دهد (۱۰، ۲۰). ژن *afa* در باکتری با شیوع کم‌تر یافت می‌شود و با عفونت‌های دستگاه ادراری مرتبط می‌باشد (۵، ۱۳).

در مطالعه حاضر از ۱۰۰ نمونه مایع semen جمع آوری شده، ۵۳ نمونه حاوی پاتوژن‌های باکتریایی بودند و از این تعداد، حدود ۱۱۸/۸۶٪ باکتری *E. coli*، ۳۳/۳۳٪ باکتری استافیلوکوک، ۴۵/۰۹٪ باکتری استریپتوکوک و ۵/۸۸٪ باکتری کلبسیلا ایزوله گردید. نمونه‌های مایع سمینال آلوده به باکتری *E. coli* از نظر پارامترهای اسپرم نرمال بررسی گردید و مشاهده شد که میزان تحرک اسپرم در نمونه‌های آلوده به *E. coli* با ۲۹/۳۷٪ و مورفولوژی نرمال با ۴/۸۷٪، نسبت به استاندارد مرکز WHO، بسیار کم‌تر می‌باشد که می‌تواند نشان از تأثیر قابل توجه باکتری بر روی تحرک و مورفولوژی اسپرم‌ها باشد. همچنین با استفاده از PCR فراوانی ژن‌های *fim H* و *pap* در نمونه‌ها بررسی شد و مشخص شد که ژن‌های آدهزینی *fim H* و *pap* با حضور ۱۰۰٪ بالاترین میزان را در ژنوم نمونه‌های آلوده به باکتری *E. coli* داشتند، اما ژن *afa* که ژنی بسیار کمیاب در باکتری می‌باشد، در هیچ‌یک از نمونه‌های مورد آزمایش مشاهده نگردید.

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد، که میزان کل گونه‌های میکروبی ایزوله شده از semen ۵۳٪ و میزان سویه‌های *E. coli* جداسازی شده از ۵۳ نمونه، ۱۰٪ می‌باشد و این

گزارش با شیوع *E. coli* ایزوله شده از semen، در سایر کشورها کمابیش مطابقت دارد، به‌طورکه میزان *E. coli* جداسازی شده از نمونه‌های semen، در کشور نیجریه در سال ۲۰۰۸، ۶/۹٪، در کشور ایتالیا در سال ۲۰۰۶، ۲۰/۳٪، در کشور نیجریه در سال ۲۰۱۰، ۱۲/۵٪، در کشور عراق در سال ۲۰۱۱، ۱۸/۳۵٪، گزارش شده است (۲۱، ۱۸، ۱۵، ۱۴، ۲۰). در کشور ایران نیز شیوع باکتری *E. coli* در semen، در سال ۲۰۰۱، ۲۰/۴٪ و در سال ۲۰۰۶، ۱۰/۲۲٪ گزارش گردیده است (۹، ۱۲). در مقایسه مطالعه حاضر با کشورهای مختلف، میزان جداسازی *E. coli* متغیر می‌باشد. این تغییر ممکن است بر حسب موقعیت جغرافیایی، نوع محیط‌های به‌کار رفته و تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده و نیز شرایط بیماران مراجعه‌کننده به محل نمونه‌گیری، قابل توجیه باشد. در مطالعه حاضر میزان جداسازی *E. coli* از نمونه‌های semen با میزان جداسازی باکتری در پژوهش‌های گذشته که در ایران صورت پذیرفته، مطابقت دارد (۱۲) هم‌چنین در این بررسی تأثیر *E. coli* بر روی پارامترهای اسپرم، در نمونه‌های آلوده مورد بررسی قرار گرفت. این پارامتر با میانگین ۲۹/۳۷٪ نسبت به سایر باکتری‌ها و نیز نسبت به نمونه‌های غیر آلوده، کم‌ترین تحرک را نمایش می‌دهد که نشان از تأثیر قابل توجه باکتری بر روی تحرک اسپرم‌ها در نمونه‌های semen دارد. در مقایسه با مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۸، توسط ابادیان و همکارانش در نیجریه، که به بررسی ۸۷ مرد نابارور، با هدف شناسایی باکتریواسپرمیا و کیفیت اسپرم در مردان نابارور پرداخته شده بود، شیوع باکتری *E. coli* در نمونه‌های semen ۶/۹٪ و میزان تأثیر این باکتری بر روی تحرک اسپرم ۳۰٪ و میزان مورفولوژی غیر نرمال اسپرم‌ها ۹۰٪ گزارش شده است، که این میزان با آنچه در این مطالعه از شیوع باکتری و میزان تحرک مشاهده شده از اسپرم‌ها مشاهده گردیده، مطابقت دارد (۷). در مطالعه انجام شده توسط انمو و همکارانش در سال ۲۰۱۰، ۲۲۹ نمونه semen از مردان نابارور تهیه گردید و از نظر میکروبی شناسی و ارتباط آن با پارامترهای اسپرم مورد بررسی قرار گرفتند. شیوع باکتری‌های *E. coli* ایزوله شده در مطالعه نام برده ۱۲/۵٪ و تحرک اسپرمی مشاهده شده ۳۰/۵٪

گزارش گردیده است که این میزان با بررسی حاضر از نظر شیوع باکتری و تحرک اسپرمها کمابیش مطابقت دارد (۱۵). در کشور ایران، نیز در سال ۲۰۰۱ مطالعه‌ای تحت عنوان تأثیر عفونت‌های باکتریایی بر روی اسپرماتوزوای انسانی در شهر یزد انجام شده است، که در این مطالعه با آزمایش بر روی ۱۶۰ نمونه semen، مشخص گردید ۳۴/۴٪ آن‌ها آلوده به گونه‌های مختلف باکتریایی بودند و از این تعداد ۲۴/۱۰٪ باکتری *E. coli*، ۲۷/۵۳٪ باکتری استرپتوکوکوس پایوزن و ۴۸/۱۹٪ باکتری‌های استافیلوکوک بودند (۱۲). در سال ۲۰۰۶، نیز در شهر تهران مطالعه‌ای بر روی عفونت دستگاه ادراری- تناسلی در مردان نابارور بدون علامت و تأثیر آن بر روی semen صورت گرفت و نتیجه آن بدین صورت گزارش گردید که از میان ۸۸ نمونه semen، ۱۰/۲۲٪ باکتری *E. coli* و ۶/۸۱٪ باکتری استرپتوکوکوس گروه B، ۱/۱۳٪ کلبسیلا و ۱۰/۲۱٪ باکتری‌های استافیلوکوک ها ایزوله گردید (۶). تفاوت‌هایی در نتایج مطالعه‌های انجام گرفته طی سال‌های اخیر با آنچه در این مطالعه مشاهده گردیده، وجود دارد و این تفاوت آماری در بین گونه‌های میکروبی ایزوله شده می‌تواند ناشی از سن بیماران، موقعیت اجتماعی آنان، سطح آگاهی و مکان زندگی مراجعه کنندگان باشد.

در این تحقیق از ۵۳ نمونه باکتری‌های جدا شده هدف بررسی گونه‌های باکتری *E. coli* (۱۰٪) بود. اما سایر باکتری‌ها که در میان ۵۳ نمونه باکتریایی حضور داشتند شامل ۱۷/۶۶٪ باکتری استافیلوکوک، ۲۳/۸۹٪ باکتری استرپتوکوک و ۳/۱٪ باکتری کلبسیلا بودند. در میان باکتری استرپتوکوک ها، ۲۳/۸۹٪ سویه‌های آگالاکتیه- α همولیتیک ایزوله گردید که در مقایسه با تحقیقی در کشور ایتالیا میزان ۲۲/۷٪ بود و در مطالعات صورت گرفته در ایران توسط خلیلی و همکارانش، ۲۷/۵۳٪ گزارش شده بود، بسیار مطابقت داشته است (۱۲، ۱۴). هم‌چنین در این بررسی نمونه‌های آلوده به استرپتوکوک ها میزان تحرک اسپرمها ۳۳/۷۸٪ و میزان مورفولوژی نرمال آن‌ها ۱۰/۶۵٪ مشاهده شد، در صورتی که این میزان در نمونه‌های غیر آلوده به باکتری‌ها، میزان تحرک

اسپرمها ۴۲/۲۳٪ و میزان مورفولوژی نرمال ۹/۱۵٪ بود. در خصوص بررسی میزان جداسازی استافیلوکوک‌ها، در کشور عراق ۲۸/۰۲٪ (استافیلوکوکوس اورئوس ۱۴/۴۹٪- استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی ۱۳/۵۳٪)، در کشور نیجریه در سال ۲۰۰۸ (۲۵/۲٪) و در کشور ایتالیا ۹/۷٪ گزارش شده است (۷، ۱۴، ۱۸). در ایران نیز طی مطالعه انجام شده میزان جداسازی استافیلوکوک‌ها (استافیلوکوکوس اورئوس- استافیلوکوکوس کوآگولاز منفی) از نمونه‌های semen به- ترتیب ۱۱/۳۶٪ و ۱۹/۴۸٪ گزارش شده است (۹)، که در مقایسه با مطالعه حاضر که استافیلوکوک‌ها ۱۷/۶۶٪ جداسازی شده‌اند، این میزان کمابیش مطابقت دارد. با بررسی میزان تحرک و مورفولوژی نرمال اسپرمها در نمونه‌های آلوده به استافیلوکوک‌ها، درصد تحرک اسپرمها ۴۳/۶۴٪ و میزان مورفولوژی آن‌ها ۱۲/۹۴٪ مشاهده شد. طی مقایسه صورت گرفته بین نمونه‌های آلوده به باکتری‌های استافیلوکوک‌ها و نمونه‌های غیر آلوده، تأثیر باکتری‌های استافیلوکوک در این پژوهش بر روی پارامترهای semen (تحرک و مورفولوژی) تفاوت قابل توجهی مشاهده نگردید. هم‌چنین در مقایسه میان باکتری‌های ایزوله شده، اسپرم‌های نمونه‌های semen آلوده به باکتری‌های استافیلوکوک نسبت به سایر باکتری‌ها بالاترین مورفولوژی نرمال را دارا بودند. در بررسی نمونه‌های آلوده به کلبسیلا نیز، شیوع این باکتری ۳/۱٪، در مقایسه با مطالعه‌های انجام شده در کشور نیجریه (۲/۳٪) (۷) و در پژوهش‌های قبلی در ایران ۱/۱۴٪ (۹)، می‌توان مطابقت این گزارش‌ها را مشاهده نمود. هم‌چنین طی بررسی میزان تحرک اسپرمها و میزان مورفولوژی نرمال آن‌ها، در نمونه‌های حاوی کلبسیلا تحرک اسپرمها با ۴۶/۶۶٪ و مورفولوژی آن‌ها با ۷/۶۶٪ نسبت به نمونه‌های غیر آلوده تشابه‌هایی مشاهده می‌گردد. تحرک اسپرمها در نمونه‌های حاوی کلبسیلا (۴۶/۶۶٪) نسبت به نمونه‌های غیر آلوده (۴۲/۲۳٪) با تفاوت اندکی بالاتر بوده است، که از این مشاهده می‌توان نتیجه گرفت که باکتری کلبسیلا بر روی تحرک اسپرمها تأثیر قابل ملاحظه‌ای ندارد. در مقایسه میان گونه‌های میکروبی ایزوله شده، نمونه‌های آلوده به باکتری کلبسیلا بالاترین تحرک اسپرمی و کم‌ترین مورفولوژی

نرمال را دارا بودند. این احتمال وجود دارد که باکتری کلبسیلا می تواند از طریق تغییرهای مورفولوژی در اسپرمها در روند ناباروری و بیماری های دستگاه تناسلی در مردان تأثیرگذار باشد.

در سال های اخیر پیشرفت تکنولوژی مولکولی باعث توسعه روش های شناسایی فاکتورهای بیماری زا در عفونت های گوناگون شده است. این تکنیکها دارای حساسیت و اختصاصیت بالا و کاهش زمان آنالیز در تعیین موقعیت ژن های پاتوژن ها می باشد. در این تحقیق از معمول ترین این تکنیکها یعنی PCR برای بررسی حضور و فراوانی ژن ها به کار گرفته شده است. از این رو، سه ژن کدکننده ادهزین های باکتری به نام های *fim H*, *pap* و *afa* مورد بررسی قرار گرفتند که در افزایش ویروانس و بیماری زایی باکتری *E. coli* ایجادکننده عفونت ادراری نقش داشتند و می تواند به عنوان عاملی در ناباروری مردان مطرح باشد.

بر اساس مطالعه هایی که تاکنون صورت گرفته است، مشخص شده است که ژن های *fim H* پیلی اصلی باکتری و ژن *pap* دومین فاکتور ویروانس رایج در *E. coli* می باشند و نقش مهمی در بیماری زایی عفونت ادراری و عفونت کلیه در انسان دارند (۱،۲۰). در بررسی های بعدی نیز شیوع این ژن ها در باکتری *E. coli* که سبب عفونت های ادراری شده است، مشخص گردیده است. در مطالعه انجام گرفته توسط ریبریو تیبیا و همکارانش بر روی ویژگی های ژنتیکی فاکتورهای ویروانس در سویه های *E. coli* ایزوله شده از بیماران مبتلا به عفونت مثانه در سال ۲۰۰۸، حدود ۱۶۲ سویه از باکتری *E. coli* از نظر حضور ژن های *afa*, *fim H*, *sfa*, *pap*, *hemolysin*, *cnf-1* توسط تکنیک *multiplex PCR* بررسی شدند. در این مطالعه شیوع ژن های *fim H*, *pap* و *afa* به ترتیب ۹۷/۵٪، ۳۲/۷٪ و ۶/۲٪ گزارش گردید. در طی مقایسه شیوع ژن های مذکور در مطالعه حاضر با مطالعه صورت گرفته توسط ریبریو تیبیا، تشابهاتی مشاهده می گردد (۱۹). در مطالعه حاضر نیز ژن *fim H* با شیوع ۱۰۰٪ بالاترین شیوع را در باکتری های ایزوله شده از semen دارد. ژن *pap* در مطالعه

مذکور بعد از ژن *fim H* بیشترین میزان فراوانی ژن ها را در بر می گرفت و در مطالعه حاضر نیز این ژن با شیوع ۱۰۰٪ در کنار ژن *fim H* قرار دارد. در طی مقایسه بعدی، ژن *afa* در مطالعه نام برده با ۶/۲٪ کمترین شیوع را در بین ژن های بررسی شده داشته است که در نمونه های semen فراوانی کمتری نسبت به سویه های جدا شده از عفونت های ادراری دارند و در این فراوانی کم، حضور ژن کمیابی چون *afa* به سختی حاصل می گردد (۱۹).

همچنین در مطالعه های دیگری در ایران و سایر نقاط جهان، شیوع ژن های ویروانس باکتری *E. coli* در بیماران مبتلا به عفونت دستگاه ادراری بررسی شده است. در این مطالعه هایی روی سویه های باکتری *E. coli* که از بیماران مبتلا به عفونت ادراری ایزوله گردیده تحقیق به عمل آمده و توسط تکنیک مولکولی PCR از نظر حضور ژن های *hly A*, *afa*, *ompT*, *hly A*, *afa* بررسی شدند. نتایج حاصل از این پژوهش ها به این صورت گزارش گردیده که ژن *fim H* با ۶۹/۶۷٪ بالاترین شیوع را در باکتری های مورد بررسی داشته است. پس از آن ژن های *hly A* و *pap*, *cnf-1* با ۵۰/۴٪ بیشترین فراوانی و ژن های *afa*, *tsh* و *ompT* به ترتیب با ۸/۳۱٪ و ۴/۸۷٪ کمترین شیوع را در بین ژن های مورد آزمایش نشان دادند که ژن *fim H* با بالاترین شیوع و پس از آن ژن *pap* و در نهایت ژن *afa* با کمترین شیوع در سویه های مختلف *E. coli* مشاهده گردیده اند (۳،۹) و نتایج حاصل از این مطالعه ها نیز با آنچه در مطالعه حاضر مشاهده شد همخوانی داشت.

از این رو می توان چنین نتیجه گرفت که ژن *fim H* و ژن *pap* در سویه های متفاوت باکتری *E. coli* بالاترین شیوع را در ژنوم باکتری دارد و با بیان فاکتورهای ویروانس و ادهزین های بسیار چسبنده به بیماری زایی باکتری و افزایش التهاب و عفونت کمک می کند. بنابراین می توانند در ایجاد ناباروری از طریق تأثیر مخرب بر روند اسپرماتوژنز مؤثر باشند و در نتیجه به عنوان عاملی به ناباروری در مردان منجر گردند.

نتیجه گیری

عفونت ادراری باشند و همچنین با افزایش احتمال که در عفونت دستگاه ادراری- تناسلی ایجاد می نمایند و تأثیری که بر تخریب روند اسپرماتوژنز دارند (همچنین در semen مردان نابارور مشاهده شده اند) می توانند به عنوان یک عاملی برای ناباروری مردان در نظر گرفته شوند.

سپاسگزاری

از کلیه مسئولین محترم در دانشکده علوم زیستی و کارکنان آزمایشگاه محمودیه دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، بیمارستان امام خمینی و بیمارستان بهمن که در انجام کارهای آزمایشگاهی این تحقیق کمال همکاری را مبذول فرموده اند، سپاسگزاری و تشکر می گردد.

با توجه به روند رو به افزایش ناباروری در کشور و تأثیر قابل توجه آن در مسائل روحی و عاطفی خانواده ها، تحقیق و بررسی پیرامون علت های ناباروری و تأثیرهای عفونت های ساده و قابل درمان در ایجاد اختلال های بزرگی مانند ناباروری، می تواند کمک شایانی در جهت افزایش آگاهی مردم، افزایش سطح بهداشت در جامعه و پیشگیری و درمان زود هنگام عفونت ها باشد و در نهایت سبب کاهش هزینه های درمانی برای بهبود ناباروری گردد. از آنجایی که باکتری *E.coli* به عنوان پاتوژنی شناخته شده در semen افراد نابارور است، می توان با افزایش بررسی ها و تحقیق پیرامون مکانیسم بیماری زایی باکتری و شناسایی تأثیر آن در اختلال های پارامترهای اسپرم از جمله تحرک، مورفولوژی و حجم اسپرم ها در مایع semen، در کنترل و درمان به موقع عفونت های semen اقدامات پیشگیری به عمل آورد. به طوری که با شناسایی و بررسی پیرامون ژن های کدکننده فاکتورهای ویروالانس باکتری *E.coli* از جمله ادهزین های سطحی باکتری و با کنترل آن ها شاید بتوان سبب کاهش مکانیسم بیماری زایی گردید. از این رو، در مطالعه حاضر سه ژن کدکننده ادهزین های باکتری به نام های *pap fim H* و *afa* مورد بررسی قرار گرفتند که با افزایش چسبندگی در میزبان می توانند سبب بیماری زایی باکتری *E.coli* در ایجاد

منابع

- 1-Baga M, Norgren M, Normark S. Biogenesis of E. coli Pap pili: papH, a minor pilin subunit involved in cell anchoring and length modulation. *Cell*, 1987; 49(2): 241-51.
- 2-Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int J nephrol*, 2012; 2012: 1-15.
- 3-Blanco M, Blanco JE, Alonso MP, Mora A, Balsalobre C, Munoa F, et al. Detection of pap,afa, sfa adhesion-encoding operons in uropathogenic Escherichia coli strains. *RES MICROBIOL*, 1997; 148 (9): 745-55.
- 4-Carroll KC, Hobden JA, Miller S, Morse SA, Mietzner TA, Detrick B, Mitchell TG, McKerrow JH, Sakanari JA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 27th edition, U.S, McGraw-Hill Companies, 2016, 149-60.
- 5-Garcia M I, Labigne A , Le Bouguenec C. Nucleotide sequence of the afimbrial-adhesin-encoding afa-3 gene cluster and its translocation via flanking IS1 insertion sequences. *J Bacteriol*. 1994; 176(24): 7601-13.
- 6-Golshani M, Taheri S, Eslami G, Suleimani AA, Fallah F, Goudarzi H. Genital Tract Infection in Asymptomatic Infertile Men and Its Effect on Semen Quality. *I J P H*, 2006; 35(3): 81-4.
- 7-Ibadin O, Ibeh IN. Bacteriospermia and sperm quality in infertile male patient at University of Benin Teaching Hospital. *M J M*, 2008; 4(2): 65-7.
- 8-Kala S, Singh A, Probha V, Singh R, Sharma P. *Escherichia coli* attaches to human spermatozoa: affecting sperm parameters. *Arch Appl Sci Res*, 2011; 3(5): 618-23.
- 9-Karimian A, Momtaz H, Madani M. Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. *Afr J Microbiol Res*, 2012; 6(39): 6811-6.
- 10-Keck C, Gerber-Schafer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update*. 1998 ;4(6):891-903.
- 11-Keller R, Ordonez G, Rosana R. Afa, a Diffuse Adherence Fibrillar Adhesin Associated with Enteropathogenic *Escherichia coli*. *I A I*, 2002; 70(5): 2681-9.
- 12-Khalili MB, Sharifi-Yazdi MK . The Effect of Bacterial Infection on the Quality of Human's Spermatozoa. *I J P H*, 2001; 30(3): 119-22.
- 13-Le Bouguenec C, Garcia MI, Ouin V, Desperrier JM, Gounon P, Labigne A. Characterization of plasmid-borne afa-3 gene clusters encoding afimbrial adhesins expressed by *Escherichia coli* strains associated with intestinal or urinary tract infections. *Infect Immun*. 1993 ;61(12):5106-14.
- 14-Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *J Assist Reprod Genet*, 2006; 26: 47-56.
- 15-Onemu S, Ogbimi A , Ophori A. Microbiology and semen indices of sexually-active males in Benin City. *J Bacteriol Res*, 2010; 2(5): 55-9.
- 16-Prabha V, Sandhu R, Kaur S, Kaur K, Sarwal A, Mavuduru RS, et al. Mechanism of Sperm Immobilization by *Escherichia coli*. *A U A*, 2010; 2010: 1-6.
- 17-Purvis k, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract, impact ,diagnosis and treatment in relation to male reproductive infertility. *Int J Ander*, 1993; 16(1): 1-13.
- 18- Reissan Al-Husseiny KH. Genetourinary Tract Infections relationship with male infertility: a bacteriological study. *J A M S*, 2011; 25(2): 62-9.
- 19-Ribeiro Tiba M, Yano T, Silva D. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* Strains from Patients with Cystitis. *Rev Inst Med*, 2008; 50(5): 255-60.

- 20-Sokurenko EV, Courtney HS, Ohman DE, Klemm P, Hasty DL. FimH family of type 1 fimbrial adhesins: functional heterogeneity due to minor sequence variations among fimH genes. *J B*, 1994; 176(3): 748-55.
- 21-Wadile RG. Male genitourinary: Tract infections relationship with genitourinary: a bacteriological study. *I J P B S*, 2013; 4(4): 913-17.
- 22-Within S S, Toth A. Realationship between genital tract infections, sperm antibodies in seminal fluid and infertility. *Fert Stert*, 1983; 40(6): 805-8.
- 23- Yun KW, Kim DS, Kim W, Lim IS. Molecular typing of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Korean children with urinary tract infection. *Korean J Pediatr*. 2015; 58(1):20-7.