NCMBJ
Research article

New Cell Mol Biotech
j.9/35 , 2019

Scan online to view this article

Study of infertility in female with *Staphylococcus aureus* infection and its relation with some bacreria superantigens

Siasi Elham *[1], Hajari Reihaneh [1] , Sohrabvand Farnaz [2].

1- Department of Microbiology, School of science, North Tehran Branch- Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Department of Medical, School of Medical science, Tehran University, Tehran, Iran.

Abstract

Aim and Background - *Staphylococcus aureus* can be caused different infections in human. Bacterial infection of the cervix can be effective in spermatozoid parameters change and may be come infertility in women. The aim of this study was identification of *Staphylococcus aureus* super-antigenes from infertile women with unexplained infertility.

Materials and Methods - Hundred vaginal samples were isolated from unexplained infertile women. Positive samples for *Staphylococcus aureus* with at least three antibiotic resistances were analyzed by PCR. For identification of infection effect on infertility, after incubation of fresh sperm samples ubated with the *Staphylococcus aureus* consist one of *seg*, *sei* or *Tsst-1* genes, were measured sperm parameters.

Results – *Staphylococcus aureus* was selected from 52 samples. After antibiogram test, 19 *Staphylococcus aureus* samples were identified with resistance to three or more antibiotics. Frequency of *Tsst-1*, *sei* and *seg* genes were, (26.3%) ,(21.1%) and (10.5%), respectively. There were in 11 (57.9%) isolates, *sei*, *seg* or *Tsst-1* genes. As also, 10.5% of isolates had both of *seg* and *sei* genes. One strain (5.3%) with *seg*, *sei* and *Tsst-1* genes, could be agglutinated 50% of fresh sperms without any significant changes on motility and viability.

Conclusion - The results were indicated *Sphylococcus aureus* that is caused vaginal infection could be damage the morphology and motility of male spermatozoa. In summary, treatment of bacterial vaginosis could be effective for prevention of idiopathic infertilities in infertile couples rates.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Super antigen, infertility, PCR.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021

Corresponding author:
Department of Immunology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan , Iran

Email: emi_biotech2006@yahoo.ca

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۹ - شماره ۳۵ - تابستان ۱۳۹۸
مقاله تحقیقی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

بررسی ناباروری در زنان مبتلا به عفونت استافیلوکوکوس اورئوس و ارتباط آن با برخی از سوپر آنتی ژن‌های باکتری

الهام سیاسی*[1]، ریحانه هاجری [1]، فرناز سهراب‌وند[2]

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

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021

چکیده

سابقه و هدف: *استافیلوکوکوس اورئوس* عامل عفونت‌های مختلفی در انسان است. عفونت باکتریایی دهانه رحم می‌تواند در تغییر پارامترهای اسپرماتوزوا نقش داشته باشد و ممکن است منجر به ناباروری در زنان شود. هدف این تحقیق بررسی حضور سوپر آنتی-ژن‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در زنان نابارور با علت ناشناخته بود.

مواد و روش‌ها: صد نمونه واژینال از زنان نابارور بدون علت مشخص جمع‌آوری شد. نمونه‌های مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* با حداقل سه مقاومت آنتی‌بیوتیکی، به‌وسیله PCR بررسی شدند. جهت بررسی تأثیر عفونت بر ناباروری، پس از انکوباسیون نمونه‌های تازه اسپرم با سویه‌های دارای یکی از ژن‌های *sei* , *seg* و یا *Tsst-1* ، پارامترهای اسپرم اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از ۵۲ نمونه جدا شد. پس از انجام تست آنتی‌بیوگرام، ۱۹ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به سه یا بیش‌تر آنتی‌بیوتیک، شناسایی شدند. فراوانی ژن‌های *Tsst-1*، *sei* و *seg* به ترتیب ۲۶/۳٪، ۲۱/۱٪ و ۱۰/۵٪ بود. در ۱۱ سویه (۵۷/۹٪) ، ژن‌های *sei* , *seg* و یا *Tsst-1* حضور داشتند. هم‌چنین در ۱۰/۵٪ نمونه‌ها، هر دو ژن *sei* و *seg* وجود داشت. یک سویه (۵/۳٪) دارای هر سه ژن *sei* , *seg* و *Tsst-1*، توانایی اگلوتیناسیون ۵۰٪ اسپرم‌های تازه را بدون تغییر قابل ملاحظه‌ای در حرکت و قابلیت زنده ماندن داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد *استافیلوکوکوس اورئوس* عامل عفونت واژ ینال می‌تواند سبب آسیب به مورفولوژی و تحرک اسپرم شود. در نتیجه، درمان واژینوز باکتریال جهت پیشگیری از ناباروری‌ها با علل ناشناخته در زوجین نابارور می‌تواند نقش مؤثری ایفا نماید.

واژه‌های کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، سوپر آنتی‌ژن، ناباروری، PCR.

مقدمه

از نظر پزشکی ناباروری عدم توانایی یک زوج در باردار شدن یک جنین است و برای یک زوج اگر پس از یک سال مقاربت جنسی منظم و بدون استفاده از روش‌های جلوگیری از بارداری، حاملگی صورت نپذیرد، به این زوج نابارور اطلاق می شود. در حدود ۴۰٪ موارد ناباروری به‌علت مشکلات و اختلال-های مربوط به مردان، ۴۰٪ به‌علت مشکل‌های زنان و ۲۰٪ نتیجه مشکل‌های مربوط به زوجین است (۲۴ ، ۲۸). ناباروری به‌علل متفاوتی می‌تواند به‌وجود آیدکه در برخی موارد علت آن نامشخص است. فاکتورهایی که می‌تواند در مردان و زنان به

نویسنده مسئول:
گروه میکروبیولوژی،دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی ،واحد تهران شمال، تهران، ایران.
پست الکترونیکی: emi_biotech2006@yahoo.ca
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۳

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021

یک میزان نازایی ایجاد نماید شامل آسیب به DNA، فاکتورهای ژنتیکی، بیماری‌های عمومی نظیر دیابت ملیتوس و اختلال‌های تیروئید، فاکتورهای محیطی و عادات رفتاری مانند سیگار کشیدن، افزایش ناباروری را موجب می‌گردد. برخی دلایل ناباروری تنها در زنان یافت می‌شود. از علل رایج ناباروری در زنان، آندومتریوز، مشکل‌های تخمک گذاری، فاکتورهای مرتبط با سن، انسداد لوله‌های فالوپ، بیماری التهاب لگن، بیماری‌های رحمی، بستن لوله‌های رحمی در گذشته و واژنیت است (۲۴ ، ۲۸). واژینیت عبارت استاز التهاب واژن که در حدود یک سوم زنان در طول زندگی خود گاهی به علائم آن دچار می‌شوند. زنان در هر سنی ممکن است به واژینیت مبتلا شوند ولی بیش‌تر از همه در سن باروری شایع است. تغییر در تعادل باکتری‌ها و مخمرهایی که به‌طور طبیعی در محیط واژن زندگی می‌کنند، می‌تواند باعث ایجاد واژینیت گردد (۳۰). عفونت‌های واژینال در صورت عدم درمان علاوه‌بر این که می‌توانند منجر به ناباروری زوجین (باعث ناباروری زنان و با اثر بر اسپرم سبب ناباروری مردان) شوند، سبب افزایش ریسک ابتلا به بیماری‌هایی هم‌چون ایدز و تب‌خال هرپس ویروسی نوع ۲ هستند (۱ ، ۱۱). طبق تعریف سازمان بهداشت جهانی سه عامل کاندیدا، تریکوموناس و باکتری‌ها عوامل اصلی ایجاد کننده واژنیت محسوب شده و در حدود ۹۰٪ علل عفونت‌های واژینال را تشکیل می‌دهند (۳۰). واژینوز باکتریال شایع‌ترین علت واژینیت در زنان در سنین باروری است و عوارضی چون ناباروری، افزایش میزان سقط جنین و زایمان زودرس، اندومتریوز و پارگی زودرس غشاء اندومتر را به‌دنبال دارد (۲۹). واژینوزیس باکتریایی علاوه‌بر گونه‌های لاکتوباسیلوس ها توسط کوکسی‌های گرم مثبت و باسیل‌های گرم منفی نظیر گونه های *استافیلوکوکوس‌ها و استرپتوکوکوس‌ها*، برخی *انتروباکتریاسه‌ها* به‌خصوص *اشریشیاکلی* و برخی از گونه‌های بی‌هوازی نظیر گونه‌های *باکتریوئیدس، بیفیدوباکتریوم، ویلونلا، پپتواستریتوکوکوس، گاردنلا واژینالیس و مایکوپلاسما هومینیس* ایجاد می‌شود (۲۶). در میان سویه‌های مختلف، *استافیلوکوکوس اورئوس* در حال حاضر ارگانیسم غالب در واژینال شناخته شده است و شیوع بالای *استافیلوکوکوس اورئوس* (در ۹۰٪ موارد) در عفونت گردن رحم گزارش شده است (۲۵). تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که ۸۰-۱۵ درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از منابع مختلف، خانواده‌ای از توکسین‌های پیروژنیک شامل انتروتوکسین‌ها (se)، توکسین سندرم شوک سمی و توکسین اکسفولیاتیو را ترشح می‌کنند (۲۷). هر دو توکسین استافیلوکوکی (انتروتوکسین و *توکسین شوک سمی*) به‌عنوان سوپر آنتی‌ژن (SAgs) عمل می‌کنند و مقاوم به حرارت هستند (۷) . سوپر آنتی‌ژن‌ها با فعال‌سازی ناحیه زنجیره متغیر بتا در گیرنده سلول‌های T و MHC کلاس دو خارج از جایگاه اتصالشان متصل می‌شوند در نهایت باعث ایجاد پاسخ‌های شبه اتو ایمیون تهدید کننده حیات می‌شوند (۱۶). ایجاد عفونت واژینال توسط دسته‌ایی از *استافیلوکوکوس اورئوس*ها که توکسین شوک سمی را ایجاد می‌کنند در ۱ تا ۳ مورد از ۱۰۰۰۰۰ خانم گزارش شده است (۹).

استافیلوکوکوس‌های بیماری‌زا علاوه‌بر اطلاعات ژنتیک بر روی کروموزوم می‌توانند واجد پلاسمیدها و باکتریوفاژها باشند. ژن‌های رمز کننده انتروتوکسین استافیلوکوکوسی توسط عناصر ژنتیکی متحرک مثل باکتریوفاژها (*sea, see, sep*) و یا توسط جزیره‌های بیماری‌زائی بر روی قطعات کروموزومی *استافیلوکوکوس اورئوس* (*seb, sec,she,sei,sek,sel,sem*) رمز می‌شوند (۳). سویه‌های *استافیلوکوکوسی* با کسب ژن‌های مقاوم جدید (به‌طور معمول با ترانسداکشن فاژی) مقاومت‌به دارو ها پیدا می‌کنند. ژن‌های مقاومت یا مارکرها گاهی روی کروموزوم باکتری قرار دارند ولی بیش‌تر با پلاسمیدها یا عناصر خارج کروموزومی کد می‌شوند. مقاومت نسبت به چند دارو یا مقاومت چندگانه به‌طور معمول به‌علت وجود ژن‌های مقاومت چند دارو روی یک پلاسمید ایجاد می‌شود (۳۱). بنابراین امروزه پیدایش سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم‌به دارو که در ایجاد واژنیت باکتریال شایع باشد به‌عنوان یک معزل مطرح است که می‌تواند عواقبی هم‌چون ناباروری زنان را به‌دلیل تأثیر مخرب عامل باکتریایی به پارامترهای اسپرم و کاهش حرکت اسپرم یا آگلوتیناسیون اسپرم به‌وجود آورد (۱۲). اسپرم‌های غیر متحرک قادر به عبور از مجاری تناسلی و فعال‌سازی تخمک نبوده و می‌توانند به‌عنوان عاملی در ناباروری خانم‌ها با عفونت واژینوزیز مطرح باشند (۱۳ ، ۱۴ ، ۱۸). هم‌چنین سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* علاوه‌بر اثر بر عملکرد اسپرم می‌توانند سبب عفونت‌های مایع سمن شده و در روند اسپرماتوزنز و ناباروری مردان دخالت داشته باشند که منجر به ایجاد زوج‌های نابارور می‌گردد (۵ ، ۲۳).

هدف از این مطالعه بررسی ارتباط حضور سوپر آنتی‌ژن‌های سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در زنان نابارور و تأثیر آن بر

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021

آگلوتیناسیون و کاهش تحرک اسپرم، به‌عنوان عاملی در ایجاد ناباروری زوج ها بود.

روش کار

۱-نمونه‌گیری- نمونه‌ها، باکتری‌های ناحیه سرویکس زنان نابارور با علل ناشناخته بود که در مدت ۶ ماه از فروردین تا شهریور ۱۳۹۶ به کلینیک‌های خصوصی و مراکز درمانی مراجعه نموده بودند. پس از نمونه‌گیری، سواب‌های واژینال در سرم فیزیولوژی استریل و در مواقع لازم در محیط‌های انتقالی قرار داده شدند و پس از درج شماره و تاریخ به محل آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌گیری از تمامی افراد مورد مطالعه، با کسب اجازه و دریافت رضایت‌نامه کتبی انجام شد.

۲-جداسازی باکتری- سواب‌های جمع‌آوری شده در سرم فیزیولوژی استریل پس از انتقال به آزمایشگاه ابتدا رنگ آمیزی گرم و سپس در محیط‌های افتراقی کشت داده شدند. نمونه‌های کوکسی گرم مثبت روی محیط کشت مانیتول سالت آگار (شرکت مرک آلمان) کشت داده و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. از نمونه‌های مثبت در مانیتول سالت آگار با انجام ساب کالچر، نمونه‌های تک کلون *استافیلوکوکوس اورئوس* خالص‌سازی شدند و با استفاده از روش‌های استاندارد میکروبیولوژی (تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، کواگولاز و کشت در محیط‌های کشت بلاد آگار (شرکت مرک آلمان) و DNase آگار (شرکت مرک آلمان) شناسائی و تأیید کلنی‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفت.

۳-بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها- برای بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی آزمایش آنتی‌بیوگرام با روش انتشار دیسک برای نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام گرفت. به این ترتیب که از سوسپانسیون باکتری برابر با استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند روی محیط کشت مولر هینتون آگار (شرکت مرک آلمان) کشت متراکم انجام گرفت و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی روی سطح محیط قرار داده شدند. پس از آن پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون پلیت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج بررسی هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک‌های آنتی‌بیوتیک‌ها با استفاده از معیارهای CLSI تفسیر شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی استفاده شده در این تحقیق ونکومایسین، پنی‌سیلین، جنتامایسین، آمپی‌سیلین، اریترومایسین، سفازولین و استرپتومایسین بودند.

۴- استخراج DNA از باکتری مقاوم- نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*های مقاوم به سه آنتی‌بیوتیک و بیش-تر دوباره در محیط مایع Brain Heart Infusion (BHI) (شرکت مرک آلمان) کشت داده شدند و DNA آن‌ها با استفاده از روش فنل- کلروفورم استخراج شد. DNA نمونه‌های مقاوم پس از تعیین غلظت در ۲۶۰ نانومتر، برای بررسی حضور ژن‌های سوپر آنتی‌ژنی مورد استفاده قرار گرفتند.

۵- انجام PCR برای تکثیر ژن‌های سوپر آنتی ژنی- برای بررسی حضور سوپرآنتی‌ژن‌ها، ژن‌های *seg*، *sei* و *Tsst-1* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با واکنش PCR تکثیر شدند. مشخصه‌های پرایمرها و مواد مورد استفاده و برنامه دستگاه PCR به‌ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ و ۳ آورده شده است.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرها برای تکثیر ۳ ژن *seg*، sei و *tsst-1* (۲)

نام ژن	توالی پرایمر (5'→3')	طول محصول PCR
seg	F- ACGTCTCCACCTGTTGAAGG R- TGAGCCAGTGTCTTGCTTTG	۴۰۰bp (۱)
sei	F- TTGATACTGGAACAGGACAAG R- ACACCAATATCACCTTGAGC	۲۵۰ bp (۱)
Tsst-1	F- ATGGCAGCATCAGCTTGATA R- TTTCCAATAACCACCCGTTT	۳۵۰ bp (۱)

جدول ۲- مواد مورد نیاز برای واکنش PCR

مواد مورد استفاده در واکنش PCR	حجم مواد
آب	۱۷ میکرولیتر
بافر PCR	۲/۵ میکرولیتر
dNTP	۱ میکرولیتر
پرایمر چپ (غلظت ۰/۵ ng/µl)	۱ میکرولیتر
پرایمر راست (غلظت ۰/۵ ng/µl)	۱ میکرولیتر
DNA ژنومی (غلظت ۱۰۰ ng/µl)	۱ میکرولیتر
آنزیم Taq پلیمراز	۰/۵ میکرولیتر
حجم نهایی	۲۵ میکرولیتر

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021

جدول ۳- برنامه دستگاه PCR برای هر سه ژن *seg*، sei و *Tsst-1*

نام ژن	واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال	طویل شدن	طویل شدن نهایی	تعداد چرخه	طول محصول PCR
seg sei *Tsst-1*	۹۵ °C به‌مدت ۵ دقیقه	۹۵ °C به‌مدت ۳۰ ثانیه	۵۲°C به‌مدت ۳۰ ثانیه	۷۲°C به‌مدت ۵۰ ثانیه	۷۲ °C به‌مدت ۵ دقیقه	۲۷	bp ۴۰۰ bp ۲۵۰ bp ۳۵۰

۶-الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪- نمونه‌های ژنوم استخراج شده و نمونه‌های PCR شده با استفاده از سیستم الکتروفورز افقی بر روی ژل آگاروز ۱٪ درون بافر TAE 1X در ۱۰۰ ولت، الکتروفورز گردید و از حضور ژنوم و صحت استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اطمینان حاصل شد. برای الکتروفورز از مارکر مولکولی bp ۲۵۰، نمونه کنترل مثبت استافیلوکوکوس اورئوس GCSC/4469 و نمونه کنترل منفی ویال حاوی آب مقطر به جای نمونه DNA استفاده شد.

۷-تأثیر نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم دارای ژن‌های سوپر آنتی‌ژنی بر اسپرم نرمال- از طریق آنالیز اسپرم تعداد، میزان تحرک، مورفولوژی و غلظت اسپرم، برای بارور سازی تخمک مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. غیر طبیعی بودن آنالیز اسپرم به سادگی احتمال کاهش باروری را مطرح می‌کند. از بین حداقل مقادیر شاخص‌های کیفیت اسپرم مقادیر حرکت اسپرم بیش از بقیه با میزان باروری مرتبط است و از اهمیت بیش‌تری برخوردار است. برای این منظور پس از جمع-آوری نمونه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* که برای یک ژن، دو ژن به‌صورت هم‌زمان و یا هر سه ژن *seg*، sei و *Tsst-1* مثبت بودند، دوباره در محیط Brain Heart Infusion (BHI) به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند و کشت ۴۸ ساعته در مجاورت نمونه تازه سمن با غلظت مشخص و شسته شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت انکوبه شد و فاکتورهای غلظت اسپرم‌های زنده در واحد حجم (میلی لیتر)، درصد اسپرم‌های متحرک، تعداد اسپرم‌های دارای حرکت پیش‌رونده، چسبندگی اسپرم‌ها به هم (سر به دم، سر به سر، دم به دم) در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از مجاورت بین گروه شاهد و کنترل در روی لام نئوبار شمارش و اندازه‌گیری شد. در جدول ۴ کلاس‌بندی درجات تحرک اسپرم آورده شده است. در نمونه اسپرموگرام نرمال باید ۵۰ تا ۶۰ درصد اسپرم‌ها، متحرک و با حداقل سرعتی برابر با کلاس ۳ باشند.

جدول ۴-کلاس بندی درجات تحرک اسپرم

کلاس	توصیف	نمره
Class A	اسپرم‌هایی که با سرعت یک میدان میکروسکوپی را به‌طور مستقیم طی می‌کنند.	خوب
Class B	اسپرم‌هایی که در میدان میکروسکوپی حرکت رو به جلو دارند ولی یک میدان را به‌طور مستقیم طی نمی‌کنند.	معمولی
Class C	اسپرم‌هایی که حرکت رو به جلو ندارند یا به‌صورت لرزشی حرکت داشته و یا به‌صورت حرکت دورانی یا رفت و برگشتی دارند .	ضعیف
Class D	اسپرم‌هایی که هیچ‌گونه حرکتی ندارند.	بد

روش کار برای این مرحله- ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع باکتری‌های ایزوله شده (که در بالا ذکر شده) در ۱۰ میلی‌لیتر محیط Brain Heart Infusion (BHI) در فلاسک کشت سلول با درب فیلتردار استریل به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با سرعت ۱۵۰ rpm کشت داده شد. نمونه اسپرم در محیط کشت Brain Heart Infusion (BHI) به‌عنوان کنترل محیط کشت در نظر گرفته شد (۱۷). نمونه کشت اسپرم با کشت ۴۸ ساعته باکتری *استافیلوکوکوس* کواگولاز منفی به-عنوان کنترل منفی باکتری در نظر گرفته شد (یک نمونه). نمونه کشت اسپرم با کشت ۴۸ ساعته باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* که در مورد هر سه ژن *seg*، sei و *Tsst-1* منفی است برای کنترل منفی ژن استفاده شد (یک نمونه). برای بررسی اثر سینرژیسم ژن‌ها کشت بقیه نمونه‌ها که حداقل برای یک ژن مثبت بودند با اسپرم مجاورت داده شد (از هر کدام ۲ نمونه). حجم مساوی از نمونه اسپرم حاوی ۴۰×۱۰^{۶} /ml و کشت ۴۸ ساعته باکتری‌ها، مخلوط شد (نسبت ۱:۱) و برای ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباسیون قرار داده شد (۱۳). بر اساس مطالعه اولیه بهترین زمان سنجش فاکتورهای اسپرم ۲ ساعت بعد از انکوباسیون است و بعد از آن زمان، فاکتورهای سنجش نمونه‌های اسپرم شاهد به‌شدت افت می‌کند. نمونه‌ها پس از گذشت دو ساعت جمع‌آوری شده و فاکتورهای حرکت (immobilization)، اگلوتیناسیون (agglutination) و زنده ماندن (viability) با درشت‌نمایی ۱۰۰ مشاهده شد.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021

آزمایش‌ها به‌صورت دوتایی بوده و با سه نمونه اسپرم سالم تکرار شد و میانگین نتایج گزارش شد.

۸- آنالیز آماری- تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS16 انجام شد. آنالیزهای آماری شامل two-tailed chi square test ,fisher`s exact test بود. در آنالیز داده‌ها مقادیر ($P<0.05$) معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

۱-جداسازی و شناسایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از نمونه‌ها- از ۱۰۰ نمونه بالینی جداشده از زنان نابارور مشکوک به واژینوز باکتریال، ۵۲ نمونه با روش‌های کشت و تست‌های بیوشیمیائی، *استافیلوکوک اورئوس* تشخیص داده شد.

۱-۱-نتایج رنگ آمیزی گرم- با رنگ آمیزی گرم و استفاده از درشت‌نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری کوکسی‌های گرم مثبت بنفش رنگ مشاهده شد.

۱-۲-نتایج کشت تشخیصی باکتریایی درمحیط‌های افتراقی - نتایج تست‌های بیوشیمیایی جداسازی *استافیلوکوکوس اورئوس* از سایر باکتری‌ها به‌خصوص کوکسی‌های گرم مثبت را تأیید نمود.

۲-نتایج سنجش حساسیت به آنتی بیوتیک ها به روش انتشار از دیسک- نتایج تست آنتی‌بیوگرام روی ۵۲ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد ۱۹ نمونه به سه آنتی‌بیوتیک و یا بیش‌تر مقاومت دارویی داشتند. با توجه به جدول CLSI نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام در جدول ۵ آمده است. بالاترین مقامت آنتی‌بیوتیکی به پنی‌سیلین و کم‌ترین مقامت دارویی به جنتامایسین دیده شد و بالاترین حساسیت دارویی به جنتامایسین و کم‌ترین حساسیت دارویی به استرپتومایسین به‌دست آمد. یک نمونه کواگولاز مثبت حساس به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها دیده شد. حداکثر مقاومت به پنج آنتی‌بیوتیک و حداقل به دو آنتی‌بیوتیک (آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین) دیده شد. ۱۹ نمونه به سه آنتی‌بیوتیک و بیش‌تر مقامت نشان دادند که در تمام آن‌ها مقاومت به آمپی‌سیلین و پنی‌سیلین دیده شد. بعد از جنتامایسین کم‌ترین مقاومت دارویی نسبت‌به وانکومایسین مشاهده شد.

جدول۵-حساسیت و مقاومت *استافیلوکوکوس اورئوس*های جدا شده از سواب واژینال به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

آنتی‌بیوتیک	علامت اختصاری	غلظت دیسک میکروگرم (µg)	قطر هاله حساس میلی‌متر (mm)	قطر هاله نیمه حساس میلی‌متر (mm)	قطر هاله مقاوم میلیمتر (mm)
Vancomicin	V	۳۰	۴۴	-	۸
Penicillin	P	۱۰	۹	-	۴۳
Gentamicin	GM	۱۰	۵۰	-	۲
Erytromicin	AM	۱۰	۳۳	۴	۱۵
Ampicillin	E	۱۰	۱۳	-	۳۹
Cefazolin	CZ	۳۰	۶	۴۶	-
Streptomycin	S	۳۰۰	۲	۴۳	۷

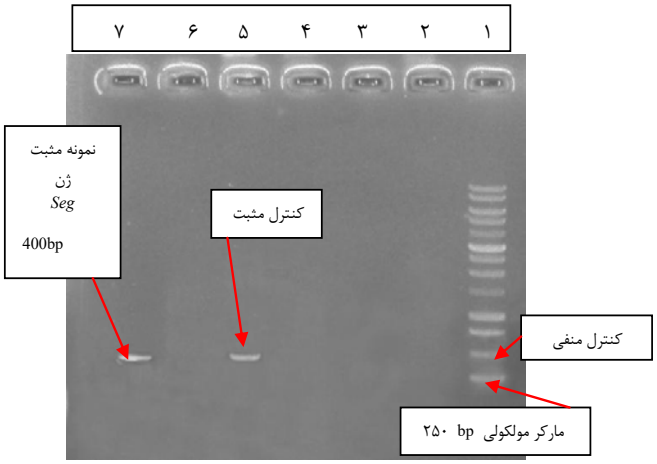
۳- نتایج تکثیر ژن‌های *seg*، sei و *tsst-1* با انجام واکنش PCR- پس از تکثیر سه ژن مذکور با واکنش PCR تمامی محصول‌های PCR روی ژل آگارز برده شد و با استفاده از مارکر مولکولی و کنترل مثبت و کنترل منفی، نمونه‌های مثبت شناسایی شدند. نتایج فراوانی حضور سه ژن مورد مطالعه بعد از انجام PCR در جدول ۶ و نمونه‌هایی از محصول تکثیر ژن‌های *seg*، sei و *Tsst-1* با واکنش PCR در شکل‌های ۱و ۲ و ۳ آورده شده است.

جدول ۶- پروفایل ژنوتایپیک سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از زنان نابارور

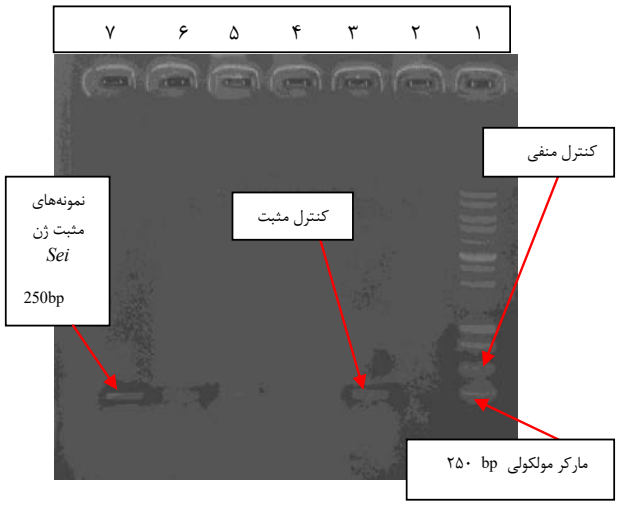
پروفایل ژنوتایپیک	تعداد سویه‌ها
Sei	۴ (٪۲۱/۱)
Seg	۲ (٪۱۰/۵)
Tsst	۵ (٪۲۶/۳)
seg+sei	۲ (٪۱۰/۵)
seg+sei+Tsst	۱ (٪۵/۳)
هیچ ژنی جدا نشده است	۵ (٪۲۶/۳)
تعداد کل نمونه های مقاوم (دارا و فاقد حضور ژن ها)	۱۹ (٪۱۰۰)

*مطابق جدول بالا ۱۱ سویه (۵۷/۹ درصد) حداقل دارای یکی از ژن‌های *seg*، sei و *Tsst-1* هستند. فقط یک سویه هر سه ژن را دارد.

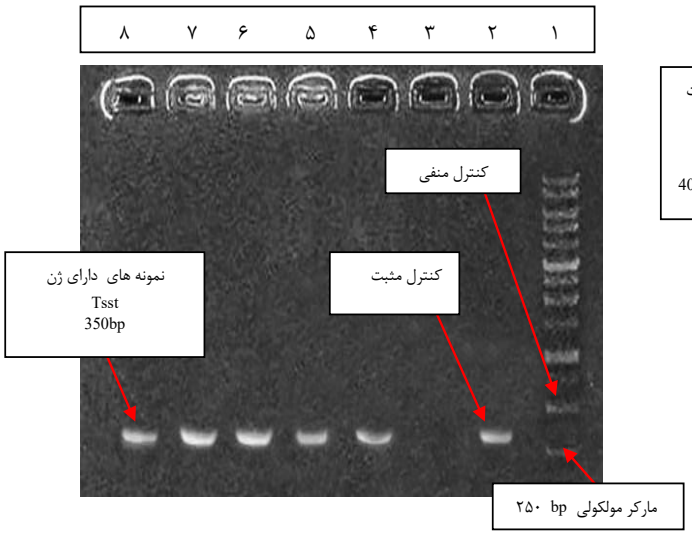
Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021



شکل ۱- نتایج حاصل از تکثیر ژن *seg* قطعه‌ایی به‌طول ۴۰۰ bp. از سمت راست به چپ به‌ترتیب خانه ۱: مارکر مولکولی ۲۵۰ bp، خانه ۲: کنترل منفی، خانه ۵: کنترل مثبت، خانه ۷: نمونه دارای ژن *seg* با طول ۴۰۰ bp.



شکل ۲- نتایج حاصل از تکثیر ژن *sei* قطعه‌ایی به‌طول ۲۵۰ bp. از سمت راست به چپ به‌ترتیب خانه ۱: مارکر مولکولی ۲۵۰ bp، خانه ۲: کنترل منفی، خانه ۳: کنترل مثبت، خانه ۵ و ۶ و ۷: نمونه دارای ژن *sei* با طول ۲۵۰ bp.



شکل۳-نتایج حاصل از تکثیر ژن *Tsst-1* قطعه‌ایی به‌طول ۳۵۰ bp. از سمت راست به چپ به‌ترتیب خانه ۱: مارکر مولکولی ۲۵۰ bp، خانه ۲: نمونه کنترل مثبت، خانه ۳: نمونه کنترل منفی، خانه‌های ۴ تا ۸: نمونه‌های دارای ژن *Tsst-1* با طول ۳۵۰ bp.

۵-نتایج آنالیز فاکتورهای اسپرم- نتایج حاصل از آنالیز اسپرم و نمونه‌های کشت باکتریال که شامل سنجش تحرک، قابلیت حیات و اگلوتیناسیون است در جدول ۷ آورده شده است. آنالیز آماری نشان داد در هیچ کدام از متغیرهای فاکتورهای اسپرم سالم و اسپرم کشت داده شده در کشت باکتری هم‌بستگی معنی‌دار آماری مشاهده نشد و در تمام موارد $p > 0.05$ بود. میزان آگلوتیناسیون فقط در نمونه مثبت برای هر سه ژن با شدت ۵۰ درصد در اسپرم‌های متحرک مشاهده شد.

جدول ۷- میانگین آنالیز اسپرم سالم شسته شده پس از ۲ ساعت انکوباسیون در کشت ۴۸ ساعته باکتری

نمونه اسپرم	حرکت پیش‌رونده (درصد)	حرکت درجا (درصد)	بدون حرکت (درصد)	قابلیت حیات	آگلوتیناسیون
اسپرم + BHI	۴۸/۹۳±۱۹/۵۴	۱۱/۰۳±۲/۸۷	۴۳/۸۹±۱۶/۲۱	۶۷/۳۴±۱۱/۵۴	منفی
اسپرم+ باکتری *استافیلوکوکوس کواگولاز منفی*	۴۳/۷۷±۱۰/۳	۱۱/۸۹±۲/۳۲	۵۰/۰۸±۱۵/۶	۶۰±۱۰/۷۷	منفی
اسپرم + باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس منفی* برای ژن های *SEG/SEI/TSST1*	۴۲/۶۶±۱۱/۲۱	۱۲/۶۷±۲/۹	۴۷/۶۵±۱۰/۸۷	۶۱/۹۲±۱۲/۴۵	منفی
اسپرم + باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس مثبت SEI*	۴۵/۶۵±۱۶/۸۷	۱۲/۰۵±۱/۸	۴۹/۴۴±۱۲/۵۴	۵۸/۷۶±۹/۴۳	منفی

اسپرم + باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت *TSST1*	۴۷/۸۳±۱۵/۲۱	۱۱/۹۰±۲/۸	۴۸/۳۳±۱۱/۰۸	۶۰/۴۲±۸/۰۵	منفی
اسپرم + باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت *SEG/SEI*	۴۳/۵۶±۱۶/۴۳	۱۳/۸۷±۲/۰۹	۴۹/۸۷±۱۳/۶۵	۶۰/۸۷±۱۰/۹۸	منفی
اسپرم + باکتری مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مثبت *SEG/SEI/TSST1*	۴۵/۸۱±۱۶/۳۴	۱۲/۴۳±۱/۹	۴۴/۵۴±۱۰/۹۸	۵۹/۶۵±۴۳	مثبت

بحث

واژینوز باکتریایی نوعی تغییر در فلور باکتریایی طبیعی واژن است که به از بین رفتن لاکتوباسیل‌های مولد پراکسید هیدروژن و رشد بیش از حد باکتری‌ها با غلبه بی‌هوازی‌ها می‌انجامد که می‌تواند دلیلی بر ناباروری زنان باشد (۶). در بررسی عوامل ناباروری زوجین فاکتورهایی که سبب می‌گردد شانس لقاح کم شود تعداد کم اسپرم، عدم بلوغ اسپرم، شکل غیرطبیعی اسپرم، عدم توانایی حرکت مناسب اسپرم است. بعضی از مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک در مردان نابارور با عفونت نمونه اسپرم (باکتریواسپرمی) ارتباط دارد. در بیش‌تر موارد، این عفونت‌ها باعث اختلال در پارامترها (مانند تعداد، تحرک، قابلیت حیات و مورفولوژی) و عملکرد اسپرم، هم‌چنین ایجاد التهاب اپیدیدیم و پروستات می‌شود که در نتیجه قدرت باروری را کاهش می‌دهد. عفونت‌های باکتریال در زنان باعث به‌هم چسبیدن اسپرم (اگلوتیناسیون) می‌شوند، که این امر می‌تواند باعث بی‌تحرکی اسپرم‌ها گردد و میزان بی‌تحرکی به تجمع باکتری‌ها در نمونه اسپرم بستگی دارد که تمامی این موارد می تواند در ناباروری زوجین مطرح باشند (۴ ، ۱۲). حضور باکتری‌هایی هم‌چون *استافیلوکوکوس اورئوس، مایکوپلاسما هومینیس، کلامیدیا تراکوماتیس و اشریشیاکلی* در ازمایشگاه مانع عملکرد اسپرم می‌شود و می‌توانند در عفونت-های مایع سمن نیز دخالت داشته باشند (۵). براساس تحقیقات انجام شده، حضور باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان باکتری غالب در ۳۸/۷٪ از سواپ‌های واژینال خانم‌ها و ۷۵٪ از کشت میکروبی مایع سمن آقایان در نمونه‌های حاصل از زوج های نابارور گزارش شده است (۲۳). بنابراین تست‌های آزمایشگاهی در زوجین نابارور که بتواند علائم عفونت را مشخص نماید، می‌تواند از هر دو جنبه (ناباروری زنان و ناباروری مردان) در تشخیص علل ناباروری زوجین مؤثر باشند.

بنابراین تحقیق حاضر به بررسی ارتباط عفونت واژینوزیز در زنان نابارور و تأثیر آن بر روی پارامترهای حیاتی اسپرم نرمال پرداخته است. در این مطالعه، از بین ۱۰۰ نمونه سواب واژن جمع‌آوری شده از زنان نابارور بدون علت بالینی که به‌نظر می‌رسد بر اساس علائم کلینیکی دارای واژینوز باکتریال هستند، ۹۵ نمونه (۹۵٪) دارای کشت مثبت باکتریال در روی محیط مانیتول سالت آگار بودند. ۵۲ نمونه (۵۲٪) نمونه‌ها با کمک تست‌های تشخیصی و بیوشیمیایی *استافیلوکوکوس اورئوس* تشخیص داده شدند. پس از انجام آنتی‌بیوگرام، ۱۹ نمونه (۳۶/۵٪) حداقل به ۳ دارو مقامت آنتی‌بیوتیکی نشان دادند. پس از انجام واکنش PCR برای بررسی حضور ژن‌های سوپر آنتی‌ژنی در سویه‌های مقاوم، از ۱۹ نمونه دارای مقامت آنتی‌بیوتیکی، ۱۱نمونه (۵۷/۹٪) حداقل یکی از ژن‌های انترتوکسین *sei/seg* و یا *Tsst1* را دارا بودند. پس از مجاورت این ۱۱ نمونه با نمونه اسپرم نرمال و بررسی تغییرهای فاکتورهای حرکت، قابلیت حیات و اگلوتیناسیون اسپرم، تنها یک نمونه که واجد هر سه ژن *Tsst1+sei+seg* بود قدرت اگلوتیناسیون ۵۰٪ اسپرم سالم را داشت و در بقیه نمونه‌ها اگرچه میزان حرکت و قدرت حیات کاهش پیدا کرده بود ولی در مقایسه با گروه کنترل تغییر معناداری مشاهده نشد.

از نتایج تحقیقات انجام گرفته در خصوص واژینوزیز باکتریال و مقایسه آن‌ها با مطالعه حاضر می توان به موارد زیر اشاره نمود.

Ranjit و همکارانش در تحقیقی که بر روی عوامل ایجاد کننده واژینوزیس و تأثیر ان بر ناباروری زنان انجام دادند مشخص نمودند عوامل اصلی در ایجاد وازینیت باکتری‌های *سودوموناس، اشریشیاکلی، اسینتوباکتر، پروتئوس، کلبسیلا، نایسریا گونورواه، انتروباکتر، سیتروباکتر، استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس‌های کواگولاز منفی و استرپتوکوکوس اگالاکتیا* در ایجاد عفونت واژینیت باکتریایی به‌طور معنی‌داری دخالت دارند و می‌توانند در صورت عدم درمان منجر به سقط جنین، تولد نوزاد مرده و ناباروری در زنان شوند (۲۶). در مطالعه‌ایی که Prabha و همکارانش روی نمونه‌های واژینال زنان نابارور بدون علت بالینی انجام دادند مشخص شده است *استافیلوکوکوس اورئوس* شایع‌ترین میکرو ارگانیسم بوده و *اشرشیاکلی، سودوموناس، استرپتوکوکوس، میکروکوکوس* و *باسیلوس* در رتبه‌های بعدی قرار دارد (۲۵). ۶۳ درصد سویه‌ها پس از ۴۸ ساعت کشت حرکت اسپرم را کاهش می‌دهند. ۱۸٪ سویه‌ها قادر به اگلوتیناسیون اسپرم بودند. اگرچه Prabha و همکارانش بر روی تمام ایزوله‌های جدا شده از ناحیه سرویکس کار کردند و نتایج مختص به

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021

استافیلوکوکوس اورئوس نبود، ولی از آنجائی‌که ۵۲ درصد سویه‌های جداشده آن‌ها *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند (۲۵)، با مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت و از نظر کاهش حرکت اسپرم و اگلوتیناسیون اسپرم در راستای این تحقیقات انجام شد. در مطالعه‌ای که قیاسی و همکارانش در سال ۲۰۱۴ در شهر قم روی نمونه‌های واژن زنان نابارور انجام دادند، نتیجه گرفتند که شیوع واژینوز باکتریال ۷۰/۳۴ درصد است. آن‌ها هم‌چنین گزارش دادند شیوع باکتری‌های گرم مثبت به‌طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از باکتری‌های گرم منفی بوده‌اند. به‌طوری‌که *استافیلوکوکوس اورئوس* بالاترین شیوع را در بین باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت واژینال داشته (۵۷/۳۳ درصد) و اشریشیا*کلی* در خانواده باکتری‌های پاتوژن گرم منفی ۲۵/۳۳ درصد را تشکیل داده است. هم‌چنین *استافیلوکوکوس اورئوس* حداکثر حساسیت را به پنی‌سیلین و جنتامایسین نشان داده است و هیچ سویه جدا شده‌ای مقاومت به پنی‌سیلین را کسب نکرده است (۷). در تحقیقات رمضانی و همکاران که بر روی ۱۱۰۰ زن از مناطق جغرافیایی مختلف ایران انتخاب شده بودند، شیوع واژینوز باکتریال در جامعه برابر ۱۳/۷ درصد بوده است (۶). مطالعه حاضر با یافته‌های رمضانی و همکاران در استفاده از علایم بالینی در تشخیص اولیه واژینوز هم‌خوانی دارد. هم‌چنین مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۰ در اردبیل انجام گرفته، نشان داد که طبق معاینات بالینی شیوع واژینوز باکتریال ۱۳/۴ درصد بوده است (۱۶).

Mc lauchlin و همکاران نشان دادند که در بین سوپر آنتی‌ژن‌ها، ژن‌های *sea, seg, seh* و *sei* دارای فراوانی بیش‌تری بوده و اغلب در ایزوله‌هایی که منشأ مسمومیت غذایی دارند با هم جدا می‌شوند (۱۹). بر اساس یافته‌های تحقیق انجام گرفته در سویه‌های جدا شده از ناحیه سرویکس ژن *Tsst-1* بالاترین شیوع را داشته (۲۶/۳٪) و ژن *seg* تنها در دو ایزوله مشاهده شد و کم‌ترین فراوانی را داشت. به نظر می‌رسد منشأ جداسازی سویه (واژن و مواد غذایی) بر روی حضور ژن‌ها تأثیر دارد، لذا نمی‌توان این دو فراوانی را با هم مقایسه نمود. Jarraud و همکارانش گزارش کردند از ۱۲ سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* که از بیماران با سندرم شوک توکسیک جمع‌آوری شده‌اند فقط ژن‌های *sei* و *seg* جداسازی شده‌اند. آن‌ها هم‌چنین توزیع ژن‌های *sei* و *seg* در ۲۳۰ نمونه جدا شده از منابع بالینی مختلف را مورد بررسی قرار دادند، نتایج آنان نشان داد این ژن‌ها اغلب از ناقلین مثبت بینی و بیماران مبتلا به مسمومیت جدا می‌شوند (۱۰). در ایران به‌علت عدم استفاده از تامپون موارد سندرم شوک توکسیک بسیار ناچیز است، با این وجود همراهی ژن *Tsst1+sei+seg* در یکی از ایزوله‌ها دیده شده است که می‌تواند زنگ خطری برای در نظر گرفتن احتمال شوک سپتیک باشد. Omoe و همکاران نشان دادند ۷۷/۴ درصد سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* حداقل برای یک ژن se مثبت هستند. ژن‌های *sei* و *seg* اغلب در سویه‌ها به‌صورت هم‌زمان وجود داشته و بیش‌تر سویه‌هایی که *seg* و در حدود ۶۰ درصد سویه‌هایی که *sei* را دارند سطوح قابل اندازه‌گیری از *seg* و *sei* را با روش الایزا نمی‌توان جدا کرد. این در حالی‌است‌که RT-PCR نشان‌دهنده mRNA ژن‌های *sei* و *seg* در این سویه‌ها است (۲۲). در تحقیق انجام گرفته شده نیز ۳۱/۶٪ نمونه‌ها برای ژن‌های se مثبت بودند و همراهی دو ژن *sei* و *seg* در ۱۰/۵ درصد نمونه‌ها مشاهده شد. در مطالعه‌ای که Banks و همکارانش روی نمونه‌های بالینی مختلف انجام دادند، نتیجه گرفتند که انتروتوکسین‌های *seg* و *sei* به‌طور انحصاری از سویه‌های ژنیتال جدا می‌شوند. سطح آنتی‌بادی‌های سرم این دو ژن در زنان سالم بالاتر از مردان سالم است و به‌نظر می‌رسد، میزان تیتر آنتی‌بادی IGg فاکتور مستقلی از حضور *sei/seg* در زنان دارای واژینوز باکتریال با *استافیلوکوکوس اورئوس* است. به نظر می‌رسد حضور ژن‌های *sei/seg* به‌عنوان فاکتوری برای سازش باکتری با موکوس ژنیتال است (۲). در تحقیق انجام گرفته تنها در ۱۰/۵ درصد نمونه‌ها همراهی دو ژن دیده شده است که نشان دهنده عدم سازگار شدن بقیه سویه‌ها با محیط واژن است. با مراجعه‌به اطلاعات بیماران در سویه‌های بدون همراهی ژن‌های *sei/seg*، مدت زمان عفونت کوتاه (در حدود چند هفته) گزارش شد و هیچ کدام سابقه عفونت مزمن در گذشته که نیاز به درمان داشته باشد را نداشتند و به‌نظر می‌رسد این سویه‌ها هنوز با محیط واژن سازش پیدا نکرده‌اند.

هم‌چنین در خصوص ارتباط عفونت واژینوزیز در زنان با ناباروری در زوجین که می‌تواند با تاثیر عامل عفونت باکتریالی بر کاهش حرکت و آگلوتیناسیون اسپرم صورت گرفته باشد، می‌توان به مطالعات زیر اشاره نمود.

در تحقیقی که اسماعیل خانی و همکاران روی عفونت با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در مردان نابارور انجام داده‌اند مشخص شده است که عفونت باکتریایی به‌عنوان عامل با اهمیتی در ناباروری مردان محسوب می‌شود و در مطالعه آنان

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021

حضور باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان باکتری غالب در کشت میکروبی مایع سمن مردان نابارور گزارش شده است که می‌تواند بر تخریب روند اسپرماتوژنز و عملکرد اسپرم مؤثر باشد (۵). Papava و همکارانش بر روی عفونت با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در مردان نابارور و ارتباط آن بر روی کیفیت و کمیت اسپرم مطالعه‌ایی را انجام دادند. نتایج آنان مشخص نمود که در ۵۲٪ از نمونه‌های مردان اولیگو اسپرم و ۱۵٪ از نمونه‌های مردان ازواسپرم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد و پس از ۳ تا ۴ هفته درمان با آنتی‌بیوتیک آنالیز نمونه‌های سمن این بیماران روند بسیار معنی‌داری را در بهبود کیفیت و کمیت و مورفولوزی نمونه‌های اسپرم آنان مشخص نمود (۲۳). Kaur و Prabha در مطالعه‌ایی که روی عفونت باکتریال دستگاه ادراری- تناسلی مردان انجام داده بودند گزارش نمودند چنانچه تعداد اشرشیاکلی از $۱۰^{۸}$ عدد در مایع سمن تجاوز کند باعث تخریب پارامترهای اسپرم می‌شود این نتایج حاکی از آن است که بار میکروبی واژن و مایع سمن در نتایج فاکتورهای اسپرم تأثیرگذار است و احتمال آن می‌رود در عفونت‌های سنگین بر باروری فرد نیز اثرگذار باشد (۱۴). خلیلی و همکارانش مردان نابارور با علت نامشخص را مورد بررسی قراردادند، بیش‌ترین شیوع با ۱۶/۹ درصد مربوط‌به *استافیلوکوکوس اورئوس* و کم‌ترین شیوع مربوط‌به *سودوموناس و انتروکوک* با ۱/۵ درصد بود. آنالیز پارامترهای حجم، تعداد، حرکت، موفولوژی و قابلیت حیات در نمونه اسپرم مردان آلوده به عفونت میکروبی و بدون آلودگی اختلاف آماری معنی‌داری نداشت (۱۵). با وجودی که مطالعه حاضر در شرایط in vitro انجام گرفته است، نتایج آن با مطالعه خلیلی و همکارانش هم-راستا بود. هم‌چنین تحقیقات نشان داده است مواد مختلفی می‌توانند حرکت اسپرم را متوقف و یا کند کنند. در این میان میکروارگانیسم‌ها می‌توانند حرکت اسپرم را به‌طور مستقیم از طریق اگلوتیناسیون و یا به‌صورت غیر مستقیم از طریق ترشحات خارج سلولی تحت تأثیر قرار داده و حرکت آن را متوقف کنند. نقش میکرو ارگانیسم‌هایی مختلفی مانند *اشریشیاکلی، باسیلوس سوبتی لیس، مایکوپلاسما، سودوموناس ائروژینوزا، کاندیدا آلبیکانس، میکسوویروس و گونوکوک‌ها* در اگلوتیناسیون اسپرم گزارش شده است (۱۳). Ohri و همکارانش از بین ده نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جداشده از ناحیه سرویک زنان تنها در یک نمونه توانستند فاکتور اگلوتینه کننده اسپرم Spermatozoal Agglutinating Factor (SAF) را جدا کنند (۲۱). بررسی با میکروسکوپ الکترونی حاکی از چسبیدن *استافیلوکوکوس اورئوس* فقط به ناحیه دم اسپرم بود. تست‌های in vitro، در بررسی اثرهای بازدارندگی قندهای مختلف نشان داد هیچ اثری روی مهار اگلوتیناسیون اسپرم ندارند. آن‌ها توانستند پروتئین SAF را به کمک سونیکاسیون باکتری و کروماتوگرافی تعویض یونی جدا کنند. آنها هم‌چنین پیشنهاد کردند از آنجایی‌که پروتئین SAF می‌تواند سبب اگلوتیناسیون ۱۰۰ درصد اسپرم‌های متحرک شود، به‌نظر می‌رسد می‌تواند فعالیت ضد باروری داشته باشد (۲۱). بررسی‌های بیش‌تر نشان داد پروتئین SAF هیچ‌یک از خصوصیت‌های مربوط به باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مانند کاتالاز، فسفولیپاز C، نوکلئاز، پروتئاز و همولیزین را ندارد. در ادامه سایر تحقیقات نشان داد پروتئین SAF در روی اسپرم رسپتور داشته و باعث اتصال مستقیم باکتری به ناحیه دم اسپرم می‌شود (۱۴). نتایج تحقیقات Kaur و Prabha روی موش‌های بالب سی نشان داد اگر ناحیه ژنیتال موش‌های ماده با سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* که توانایی اگلوتینه کردن و بی‌حرکت کردن اسپرم را داشته باشد، آلوده شوند می‌توانند ۱۰۰٪ در روی باروری موش‌ها در مقایسه با گروه کنترل اثرگذار باشد (۱۳). بر اساس نتایج کسب شده در تحقیق ما هم بعضی از سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* می توانند حرکت اسپرم را کم‌تر کرده و در بعضی موارد باعث اگلوتیناسیون آن شود و در این راستا چگونگی ارتباط ژن‌های اندوتوکسین با اگلوتیناسیون اسپرم نیازمند تحقیقات بیش‌تر است. هم‌چنین لزوم بررسی روی بیان ژن‌های سوپر آنتی‌ژن‌ها نیز در مطالعات بعدی مشخص است.

بنابراین با توجه به این نکته که گام اصلی در تولید مثل انسان جابجائی اسپرم از واژن به جایگاه لقاح و برخورد با تخمک است. اسپرم‌ها در ناحیه سرویکس ذخیره شده و به‌طور مداوم به قسمت فوقانی رحم منتشر می‌شوند. بنابراین اختلالات سرویکس و ترشحات آن می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور مهم در ناباروری‌های بدون علت بالینی مطرح باشد.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق و سایر مطالعات در این زمینه نشان داد سوپر آنتی‌ژن‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*‌های مقاوم‌به دارو به عنوان باکتری شایع در واژنیت زنان مطرح است و با تأثیری که بر دستگاه تناسلی و سلول جنسی بانوان و آقایان دارد می‌تواند به‌عنوان عاملی برای ناباروری مطرح باشد و لذا می‌بایست نسبت به درمان آن توجه بیش‌تری معطوف گردد.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021

سپاسگزاری

از کلیه مسئولان و همکاران محترم گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و به‌خصوص آزمایشگاه بیواکستریم که ما را در انجام مراحل این پروژه یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌گردد.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021

منابع

1-Anas M, Wiyasa WA, Riyanto S, Sardjono TW, Aulani'am A, Prawiro SR. Microorganism spectrum of nonspecific vaginitis in women of infertile couples recognized by s-IgA uterine cervix secretion. A P J R. 2016; 5(6): 467–470.

2-Banks MC, Kamel NS, Zabriskie JB, Larone DH, Ursea D, Posnett DN. *Staphylococcus aureus* express unique superantigens depending on the tissue source. J Infec Dis. 2003; 187(1): 77-86.

3-Barnett SY, Hattotuwa KL, Teare L. Lung and pharyngeal abscess caused by enterotoxin G-and I-producing *Staphylococcus aureus*. J Infec. 2012; 64(5): 525-8.

4.Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W. Influence of urogenital infection on sperm function. Curren opinio uro. 2000; 10(1): 39-44.

5-Esmailkhani A, Akhi MT, Sadeghi J, Niknafs B, Zahedi Bialvaei A, Farzadi L, Safadel N. Assessing the prevalence of Staphylococcus aureus in infertile male patients in Tabriz, northwest Iran. Int J Reprod Bio Med. 2108; 16(7): 469-474.

6-.Farahmand M, Abedini M, Hashemi Z. Prevalence of vaginitis in Iranian women--symptoms and clinical association. Med Sci J Islam Azad Uni Tehran Med. 2012; 22(1): 62-8.

7- Ghiasi M, Fazaeli H, Kalhor N, Sheykh-Hasan M, Tabatabaei-Qomi R. Assessing the prevalence of bacterial vaginosis among infertile women of Qom city. Iran J microb. 2014; 6(6): 404.

8- Hajishafiha M, Salari Lac S, Khairi Tabar M, Naji S, Sadaghiani M, Asadi N. Evaluation of relationship between bacterial vaginosis and embryo implantation and early abortion in infertile couple curing with intra cytoplasmic sperm injection. J Ardabil Uni Med Sci.2011; 11(1): 33-42.

9-Jacquemond I, Muggeo A, Lamblin G, Tristan A, Gillet Y,Bolze PA, Bes M, Gustave CA, Rasigade J, Golfier F, Ferry T, Dubost A, Abrouk D, Barreto A, Prigent-Combaret C, Thioulouse J, Lina G, Muller D. Complex ecological interactions of *Staphylococcus aureus* in tampons during menstruation. Sci Rep. 2018; 8(9942): 1-11.

10- Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes Ml, Mougel C, et al. egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J Immun. 2001; 166(1): 669-77.

11-Kaambo E, Africa C, Chambuso R, Shelley Passmore JA. Vaginal microbiomes associated with aerobic vaginitis and bacterial vaginosis. Fron Pub Healt. 2018; 6(78): 1-6.

12-Kamel R M. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. Reprod Biol Endocrinol. 2010; 8: 21.

13-Kaur S, Prabha V. Infertility as a consequence of spermagglutinating *Staphylococcus aureus* colonization in genital tract of female mice. PlOS one. 2012; 7(12): e52325.

14-Kaur S, Prabha V. Characterization of Sperm Agglutinating Factor Isolated from *Staphylococcus aureus* and its Corresponding Receptor from Spermatozoa. Advanc Study Med Sci. 2013; 1: 61-8.

15-Khalili MB, Sharifi-Yazdi MK. The effect of bacterial infection on the quality of humanâ€™s spermatozoa. Iran J Pub Health. 2001; 30(3-4): 119-22.

16-Kheirkhah MEG. Prevalance of candida, trichomona, gardenella and gonorrhoea vaginitis and comparison of clinical and paraclinical diagnostic in Ardebil. Ardebil Med Uni J. 2001; 1: 7-11.

17-Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A.,Aoki, K.-i. and Nagai, Y. Whole genome sequencing of meticillin-resistant< i> *Staphylococcus aureus*. The Lancet . 2001; 357(9264): 1225-1240.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021

18-Liu J-H, Li H-Y, Cao Z-G, Duan Y-F, Li Y, Ye Z-Q. Influence of several uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters in vitro. Asian J andro. 2002; 4(3): 179-82.

19-McLauchlin J, Narayanan GL, Mithani V, O'Neill G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. J Food Protec. 2000; 63(4): 479-88.

20-Naik S, Smith F, Ho J, Croft NM, Domizio P, Price E, et al. Staphylococcal enterotoxins G and I, a cause of severe but reversible neonatal enteropathy. Clinic Gastro Hepato. 2008; 6(2):251-4.

21-Ohri M, Prabha V. Isolation of a sperm-agglutinating factor from *Staphylococcus aureus* isolated from a woman with unexplained infertility. Ferti steril. 2005; 84(5): 1539-41.

22-Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu D-L, Ueda S, Shinagawa K. Detection of *seg*, seh, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of S. aureus isolates harboring *seg*, seh, or *sei* genes. J clinic microb. 2002; 40(3): 857-62.

23-Papava V, Didbaridze T, Khvakhajelidze V, Shanidze L. Isolation of Staphylococcus aureus in seminal fluid and its impact on semen quality/quantity. W W J M R D. 2017; 3(8): 269-272.

24-Park Sh. Genetic Factors and Environmental Factors Affecting Male Infertility. Inter Res J Advanc Engineer Sci. 2016; 1(3): 115-118.

25-Prabha V, Aanam, Dhir Tand Siftjit Kaur. Bacteriological Study of the Cervix of Females Suffering from Unexplained Infertility. Am. J. Biomed. Sci. 2011; 3(2): 84-89.

26-Ranjit E, Raghubanshi BR, Maskey S, Parajuli P. Prevalence of Bacterial Vaginosis and Its Association with Risk Factors among Nonpregnant Women: A Hospital Based Study. Inter J Microb. 2018; 8349601: 1-9.

27-Schlievert PM, Case LC, Strandberg KL, Tripp TJ, Lin Y-C, Peterson ML. Vaginal *Staphylococcus aureus* superantigen profile shift from 1980 and 1981 to 2003, 2004, and 2005. J clinic microb. 2007; 45(8): 2704-7.

28-Sekhon L H, Gupta S, Kim Y, Agarwal A. Female Infertility and Antioxidants. Curren Women's Health Rev. 2010; 6: 84-95.

29-Vancutsem E. Genital tract colonization with Ureaplasma spp. and its association with abnormal vaginal flora. J Med Microb. 2015; 64: 654-656.

30-Wah RM. The American Congress of Obstetricians and Gynecologists and the American Medical Association: Common Ground Makes Common Sense. Obstet Gyneco. 2014; 124(1): 134-7.

31-Wilkinson, B.J., Muthaiyan, A. and Jayaswal, R.K. The cell wall stress stimulon of *Staphylococcus aureus* and other gram-positive bacteria. Curren Med Chem Anti Infec Agen. 2005; 4(3): 259-276.

Downloaded from ncmbjpiau.ir at 1:49 +0430 on Thursday June 17th 2021