دوره ۲۳، شماره ۷۳، بهار ۱۳۹۹، صفحات: ۱۳-۱

مقاله پژوهشی

بررسی اثر عفونت القایی *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بر پارامترهای اسپرم انسان

مریم احمدیان محمودآبادی[۱]، نسیم قربانمهر[۲*]، منصوره موحدین[۲]، آمنه الیکایی[۳]

[۱] کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
[۲] استادیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
[۳] استاد تمام، گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
[۴] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۰۷ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۸/۱۰/۰۲

چکیده

مقدمه: ناباروری یکی از شایع‌ترین مشکلات بهداشت جهانی است. عفونت‌های باکتریایی مایع منی و دستگاه تناسلی به‌عنوان یکی از دلایل کاهش باروری در مردان مطرح می‌باشند. اختلال در اسپرماتوژنز و نقص در عملکرد اسپرم می‌تواند حاصل واکنش‌های سلولی علیه عوامل میکروبی و تأثیر مستقیم باکتری بر سلول‌های جنسی باشد. شناخت نحوه تداخل عفونت‌های باکتریایی با فرایندهای فیزیولوژیک تولید مثل، نقش مهمی در درمان مردان مبتلا دارد. در این ارتباط، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر مستقیم هریک از سویه‌های باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بر حرکت، مورفولوژی و قدرت بقای اسپرم در شرایط In vitro و مقایسه اثرات این دو باکتری با یکدیگر انجام شد.

مواد و روش‌ها: ۳۳ نمونه مایع منی از مردان مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری "نیکان" تهران در سال ۱۳۹۷ جمع‌آوری گردید. اسپرم‌های متحرک به روش Swim up جدا شدند و در ادامه هر نمونه به سه بخش مساوی تقسیم گشت. بخش‌های اول و دوم به‌عنوان گروه‌های آزمون به‌ترتیب با سویه‌های باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت مشخص انکوبه شدند و بخش سوم به‌عنوان گروه کنترل بدون افزودن باکتری تحت شرایط مشابه قرار گرفت. پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، پارامترهای اسپرم سنجیده شدند و یافته‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری مقایسه گردیدند.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که آلودگی با باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* باعث کاهش معنادار مورفولوژی و حرکت و بقای اسپرم‌های گروه کنترل نسبت به گروه آزمون می‌شود ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: تماس باکتری‌ها با اسپرم می‌تواند منجر به آسیب و کاهش کیفیت و عملکرد آن (حرکت، مورفولوژی و زنده‌بودن) شده و بر پتانسیل باروری مردان به شکل منفی تأثیر بگذارد.

کلمات کلیدی: اسپرم، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، عفونت‌های باکتریایی، ناباروری مردان

* **نویسنده مسئول:** نسیم قربانمهر، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران. تلفن: ۰۹۱۲۱۴۹۹۳۸۹؛ ایمیل: n.ghorbanmehr@alzahra.ac.ir

مقدمه

امروزه ناباروری یکی از شایع‌ترین مشکلات بهداشت جهانی بوده و از عوامل مهم ایجاد نگرانی در زوج‌ها است. براساس معیار سازمان جهانی بهداشت، از پارامترهای مشخصی برای بررسی باروری در مردان استفاده می‌شود. اندازه‌گیری حجم، PH و غلظت مایع منی، بررسی سرعت و کیفیت حرکت اسپرم، مورفولوژی آن و آگلوتیناسیون سلول‌های اسپرم، پارامترهای اولیه و پیش‌بینی‌کننده باروری هستند. عفونت دستگاه تناسلی (GTI: Genital Tract Infection) به‌عنوان یکی از دلایل ناباروری مردان مطرح شده است که علاوه بر تأثیر بر عملکرد اسپرم، بر فرایند اسپرماتوژنز نیز تأثیر می‌گذارد (۳-۱). اختلال در اسپرماتوژنز، انسداد مجاری دستگاه تناسلی و نقص در عملکرد اسپرم ممکن است ناشی از فعال‌سازی لکوسیت‌های مایع منی و یا واکنش‌های سلولی بر عوامل میکروبی از طریق تأثیر مستقیم سویه‌های باکتریایی بر سلول‌های جنسی باشد (۴). یافتن نحوه تداخل عفونت‌های باکتریایی با فرایندهای فیزیولوژیک سیستم تولید مثل، نقش مهمی در درمان مردان نابارور در اثر عفونت‌های باکتریایی دستگاه تناسلی دارد. مطالعات نشان داده‌اند که طیف وسیعی از باکتری‌ها با درجات مختلف در ایجاد ناباروری در مردان نقش دارند (۵). تعدادی از میکروارگانیسم‌هایی که به‌عنوان پاتوژن‌های عفونت دستگاه تناسلی شناخته شده‌اند و ارتباط معناداری با ناباروری در مردان دارند عبارت هستند از: *اشریشیا کلی* (*Escherichia coli*)، *اورئوپلاسما اورئولیتیکوم* (*Ureaplasma urealyticum*)، *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus*)، *مایکوپلاسما هومینیس* (*Mycoplasma hominis*) و *کلامیدیا تراکوماتیس* (*Chlamydia trachomatis*) که تقریباً ۱۵ درصد از عوامل ناباروری مردان در عفونت دستگاه تناسلی را شامل می‌شوند (۳،۶). اخیراً مشخص شده است که وجود عوامل عفونی می‌تواند حتی نتایج درمان‌های ناباروری را تحت تأثیر قرار دهد (۷). تاکنون تأثیر باکتری‌های گرم و مثبت عفونت دستگاه تناسلی بر مورفولوژی و عملکرد اسپرم چندان مورد بررسی قرار نگرفته است. Mehta و همکاران در پژوهشی گزارش نمودند که کوکوسی‌های هوازی در (تقریباً) ۵۰ درصد از نمونه‌های مایع منی مردان نابارور یافت می‌شوند. در پژوهش آن‌ها *انتروکوکوس فکالیس* (*Entrococcus faecalis*) در ۵۳ درصد از بیماران، *میکروکوکسی‌ها* (*Micrococci*) در ۲۰ درصد و *استرپتوکوک‌های آلفا همولیتیک* (*Alpha-haemolytic streptococci*) در ۱۶ درصد از بیماران عفونی شناسایی شدند (۸). *استافیلوکوک*‌ها باکتری‌هایی هستند که اغلب در مجاری ادراری مردان یافت می‌شود و می‌توانند باعث آلودگی مایع منی شوند (۹). شایع‌ترین باکتری جداسازی‌شده از مایع منی مردان نابارور، *اشریشیا کلی* است (۱۰) که موجب کاهش حرکت اسپرم از طریق اتصال به آن و آگلوتیناسیون شده (۱۱،۱۲) و منجر به تغییرات مورفولوژیکی در سطح گردن، غشای پلاسمایی و آکروزوم (۱۳)، تغییر در عملکرد اسپرم و افزایش انتقال فسفاتیدیل‌سرین (Phosphatidylserine) می‌گردد (۱۴). در مطالعات صورت‌گرفته، کاهش حرکت اسپرم به وسیله *اشریشیا کلی* و دیگر میکروارگانیسم‌ها گزارش شده است (۱۵،۱۶).

باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از پاتوژن‌های حیاتی انسان است که باعث ایجاد عفونت‌های متنوع می‌شود (۱۷،۱۸) و یکی از میکروارگانیسم‌های شایع جداشده از مایع منی است. این باکتری به‌عنوان یکی از علل ناباروری مردان مطرح شده است (۱۹) مطالعات معدودی در ارتباط با اثر *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اسپرم و مکانیسم‌های تعامل بین باکتری و اسپرم انجام شده است.

نتایج پژوهش Li و همکاران نشان دادند که حضور *استافیلوکوکوس اورئوس* در مایع منی در ویژگی‌های حرکتی اسپرم نقش داشته و در پی هم‌کشتی اسپرم با محیط کشت حاصل از کشت *استافیلوکوکوس اورئوس*، کاهش شدیدی در حرکت اسپرم ایجاد می‌شود (۲۰). در مطالعات صورت‌گرفته گزارش شده است که باکتری‌ها قادر به تولید فاکتورهای اسپرم‌کش محلول در محیط کشت هستند (۲۱،۲۲). باکتری‌های آلوده‌کننده مایع منی به‌طور کلی از دستگاه ادراری بیماران مبتلا و یا توسط شریک جنسی از طریق مقاربت منتقل می‌شوند (۲۳). اگرچه اهمیت بالینی عفونت‌های باکتریایی مایع منی در ناباروری مردان شناخته شده است؛ اما اثر مخرب هریک از گونه‌ها و سویه‌های میکروبی به‌صورت مجزا بسیار کم مورد بحث قرار گرفته است. اکثر مطالعات انجام‌شده تاکنون به‌صورت مقایسه بین نمونه‌های بیماران دارای عفونت و نمونه‌های افراد فاقد عفونت صورت گرفته‌اند و از آنجایی که ممکن است در هریک از این نمونه‌ها مجموعه‌ای از باکتری‌های متفاوت بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا وجود داشته باشد (که بر همکنش‌های مختلفی دارند)، نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده اثرات انحصاری یک باکتری خاص نخواهند بود. شناخت دقیق این برهمکنش‌ها ما را در راستای درک بهتر وقایع اثرگذار بر باروری یاری نموده و می‌تواند منجر به ابداع درمان‌های مؤثرتر گردد. در این ارتباط، پژوهش حاضر با هدف تعیین اثرات انفرادی و مستقیم سویه‌های باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* بر کیفیت و پارامترهای اسپرم (تحرک، مورفولوژی و زنده‌بودن) در شرایط In vitro و مقایسه اثرات مخرب این دو سویه بر پارامترهای اسپرم انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر از نمونه‌های مایع منی ۳۳ مرد نرمال (Normozoospermic) در محدوده سنی ۲۵ تا ۵۱ سال با میانگین سنی ۳۶/۶ سال که در تابستان ۱۳۹۷ به مرکز درمان ناباروری بیمارستان "نیکان" تهران مراجعه کرده بودند، استفاده شد. جمع‌آوری نمونه‌ها به‌صورت اتفاقی و در روزهای مختلف صورت گرفت. نمونه‌های مایع منی پس از ۵-۳ روز خودداری زوجین از مقاربت، پس از آموزش نمونه‌گیری صحیح به افراد در ظروف پلاستیکی استریل جمع‌آوری گردید. پس از ۳۰-۲۰ دقیقه مایع‌شدن (لیکوئیفکشن) نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، بررسی میکروسکوپی انجام شد. اسپرموگرام نیز با استفاده از سیستم CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) توسط میکروسکوپ نوری متصل به مانیتور (OLYMPUS،CX33RTFS2) و نرم‌افزار (Sperm 2.1, Video Test Russia) صورت گرفت (۲۴). نمونه‌های نرمال براساس نتایج اسپرموگرام مطابق با معیار ارائه‌شده از سوی سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۰ انتخاب شدند (۲۵). در شواهد میکروسکوپی، آلودگی میکروبی مشاهده نگردید.

آماده‌سازی سویه‌های باکتری

به‌منظور انجام این مطالعه، دو سویه باکتری استاندارد *اشریشیا کلی* (ATCC25922) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (ATCC25923) در محیط نوترین براث (Merck، آلمان) کشت داده شدند و پس از گذشت سه ساعت با استفاده از محیط HTF-HSA (Human Tubal Fluid- Human Serum Albumin) ۱۰ درصد و به روش نیم مک‌فارلند (۲۶)، غلظت ۵×۱۰^{۶} واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر از باکتری‌ها تهیه گردید. انتخاب این غلظت با توجه به مطالعات قبلی در زمینه غلظت باکتری در عفونت‌های مایع منی و غلظت‌های آسیب‌زای آن انجام شد (۲۹-۲۷). شایان ذکر است که در این مطالعه از کشت سه ساعته باکتری

استفاده گردید تا از تازه‌بودن باکتری‌ها و قرارداشتن آن‌ها در فازنمایی منحنی رشد اطمینان حاصل شود.

آماده‌سازی اسپرم

بلافاصله پس از مایع‌شدن و تعیین ویژگی‌های نمونه، اسپرم‌های متحرک به روش مهاجرت اسپرم (Swim up) جدا شدند. در مجموع، ۱ میلی‌لیتر از نمونه مایع منی با ۴ میلی‌لیتر محیط کشت HTF (Human Tubal Fluid) (شرکت ژن و سلول ایده‌آل، ایران) غنی‌شده با سرم آلبومین انسانی (۱۰ درصد HTF-HSA) مخلوط شد و در ادامه به مدت ۳ دقیقه در دور ۳۰۰g سانتریفیوژ گردید. پس از دورریختن سرریز، ۱ میلی‌لیتر از محیط فوق به رسوب اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتوری با دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری گردید. در این زمان، اسپرم‌های با حرکت پیشرونده به سمت فوقانی محیط حرکت نمودند. محیط سطح بالایی این اسپرم‌ها به آرامی با استفاده از پیپت پاستور استریل برداشته شد و به یک لوله استریل منتقل گردید (۳۰). پس از شمارش و تعیین غلظت اسپرم با استفاده از محیط ۱۰ درصد HTF-HSA، ۱/۵ میلی‌لیتر از حجم نمونه با غلظت نهایی $۱۰^{۶}\times۱۴$-۱۲ بخش بر میلی‌لیتر از اسپرم تهیه شد.

هم‌کشتی باکتری و اسپرم

به‌منظور بررسی اثر باکتری‌ها بر پارامترهای اسپرم، سوسپانسیون اسپرم به سه تیوب ۵۰۰ میکرولیتری تقسیم شد. به تیوب اول و دوم به‌ترتیب ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آماده‌شده باکتری *اشریشیا کلی* در محیط HTF-HSA (گروه آزمون *E.coli*) و ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون آماده‌شده باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط HTF-HSA (گروه آزمون *S.aureus*) افزوده شد. به‌عنوان گروه کنترل، به تیوب سوم هر نمونه ۵۰۰ میکرولیتر محیط HTF-HSA بدون باکتری اضافه گردید (۳۱). در ادامه، نمونه‌ها پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با سرعت ۲۳۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس از رسوب اسپرم برای بررسی پارامترها و نتایج آزمایش استفاده گردید.

بررسی پارامترهای اسپرم

جهت بررسی اثرات سویه‌های باکتریایی بر اسپرم‌های انزالی، پس از هم‌کشتی باکتری با اسپرم، پارامترهای اصلی اسپرم از جمله تعداد، درصد زنده‌بودن، مورفولوژی نرمال، میزان و کیفیت تحرک اسپرم‌ها با استفاده از روش‌های مورد تأیید و میکروسکوپ نوری متصل به سیستم کامپیوتری CASA (پس از کدگذاری اتفاقی جهت جلوگیری از هرگونه جهت‌گیری در نتایج) اندازه‌گیری شدند. برای این منظور، از روش‌های استاندارد ذکرشده در دستورالعمل کار در آزمایشگاه اندرولوژی سازمان جهانی بهداشت استفاده گردید (۲۵).

رنگ‌آمیزی اسپرم

به‌منظور بررسی کیفیت حیاتی اسپرم از رنگ‌آمیزی ائوزین- نیگروزین و برای بررسی مورفولوژی در گروه‌های مختلف از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا استفاده شد (۳۲). به‌طور خلاصه، برای تهیه رنگ ابتدا ۰/۶۷ گرم ائوزین Y (Bio-Optica Milano S.p.a.) و ۰/۹ گرم سدیم کلرید در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و در ادامه ۱۰ گرم نیگروزین (Merck، آلمان) به آن اضافه گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از رنگ با ۱۰ میکرولیتر از نمونه به روش پیپتینگ درون میکروتیوب مخلوط شد. بلافاصله از محلول، گسترش تهیه شد و توسط میکروسکوپ نوری بررسی گردید. شایان ذکر است اسپرم‌هایی که رنگ گرفته و قرمز یا صورتی شده بودند، مرده و آن‌هایی که رنگ نگرفته بودند، زنده در نظر

گرفته شدند (۲۵). در مجموع، ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و نتایج به‌صورت درصد ثبت گردید.

جهت بررسی مورفولوژی اسپرم از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا (مطابق با دستورالعمل ارائه‌شده از سوی سازمان جهانی بهداشت در سال ۲۰۱۰) استفاده شد (۲۵). به‌منظور ارزیابی مورفولوژی ابتدا از هر نمونه، گسترش تهیه شد و سپس رنگ‌آمیزی پاپانیکولا (Merck، آلمان) روی آن‌ها صورت گرفت (۳۳). در ادامه، ۲۰۰ اسپرم با بزرگنمایی X ۱۰۰۰ بررسی شد و نتایج ثبت گردید (شکل ۲).

به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 20 استفاده شد. نرمال‌بودن پراکندگی داده‌ها توسط آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شد و از آزمون‌های توصیفی و مقایسه‌ای (از قبیل One Way ANOVA و آزمون t زوجی) به‌منظور بررسی اختلاف بین گروه‌ها استفاده گردید. داده‌های کمی براساس میانگین و انحراف معیار (Mean±SD) و در قالب جدول و نمودار ارائه شدند. مقدار (P<۰/۰۵) نیز به‌عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

نتایج

همان‌طور که اشاره شد، در این مطالعه نمونه‌های مایع منی ۳۳ نفر با پارامترهای نرمال مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها به سه گروه تقسیم شدند: دو گروه به‌ترتیب تیمارشده با *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و یک گروه به‌عنوان گروه شاهد. در هر گروه حجم اسپرم، غلظت اسپرم، درصد حرکت، مورفولوژی طبیعی و غلظت لوکوسیت براساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت ارزیابی گردید و نتایج با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱: ویژگی های اولیه نمونه‌های جمع‌آوری شده

ویژگی‌های مایع منی	میانگین± انحراف‌معیار	دامنه
حجم مایع منی (ml)	۲/۴±۱/۰	۱/۰ -۵/۰
PH	۷/۶±۰/۵	۷/۲-۸/۰
تراکم اسپرم ($\times 10^6$ ml^{-1})	۷۶/۷±۱۹/۵	۴۸/۰ -۱۱۸/۰
تحرک اسپرم(٪)		
پیشرونده(کلاس A+B)	۱۱/۲۵±۵/۰	۰ -۲۸/۰
غیر پیشرونده(کلاس C+D)	۱۳/۹±۴/۲	۱/۰ -۳۸/۰
غیر متحرک	۴۹/۷±۹/۴	۳۵/۰ -۷۲/۰
اسپرم زنده(٪)	۷۳/۷±۷/۸	۵۰/۰ -۸۳/۰
مورفولوژی(٪)	۴/۲±۱/۳	۲/۰ -۸/۰
لوکوسیت‌ها ($\times 10^6$ ml^{-1})	۲/۵±۲/۸	۰ -۱۶/۰

اثر تیمار اسپرم با اشریشیا کلی

پس از انکوباسیون اسپرم‌ها با *اشریشیا کلی*، کاهش قابل‌توجهی در درصد اسپرم‌های متحرک (۲۵/۵±۴۳/۷ در برابر ۱۵/۸±۷۸/۳)، درصد اسپرم زنده (۲۶/۸±۵۴/۵ در برابر ۱۱/۷±۸۸/۸) و مورفولوژی طبیعی اسپرم (۱/۶±۴/۳ در برابر ۱/۵±۶/۹) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد (جدول ۲). نتایج آزمون One Way ANOVA نشان دادند که در سه پارامتر ذکرشده، اختلاف از نظر آماری معنادار می‌باشد (P<۰/۰۰۱). در این نمونه‌ها افزایش در میزان آگلوتیناسیون مشاهده شد (شکل A-B.۱). شکستگی گردن اسپرم و اتصال باکتری به سر و دم آن نیز با استفاده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا به‌طور واضح قابل‌مشاهده بود (شکل B.۲).

اثر تیمار اسپرم با استافیلوکوکوس اورئوس

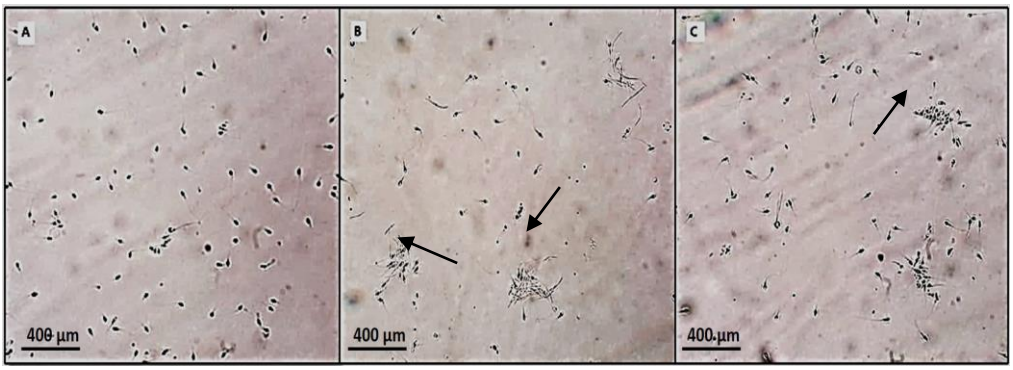
در اسپرم‌های تیمارشده با *استافیلوکوکوس اورئوس* کاهش قابل‌توجهی در حرکت اسپرم (۲۴/۵±۵۴/۷ در برابر ۱۵/۸±۷۸/۳) در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. همچنین کاهش درصد زنده‌بودن اسپرم (۲۵/۴±۶۶/۵ در برابر ۱۱/۷±۸۸/۸) و مورفولوژی طبیعی (۱/۷±۴/۷ در برابر ۱/۵±۶/۹) در مقایسه با گروه کنترل قابل‌مشاهده می‌باشد.

جدول ۲: مقایسه پارامترهای اسپرم بین گروه های تیمارشده با *اشیرشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* با گروه کنترل

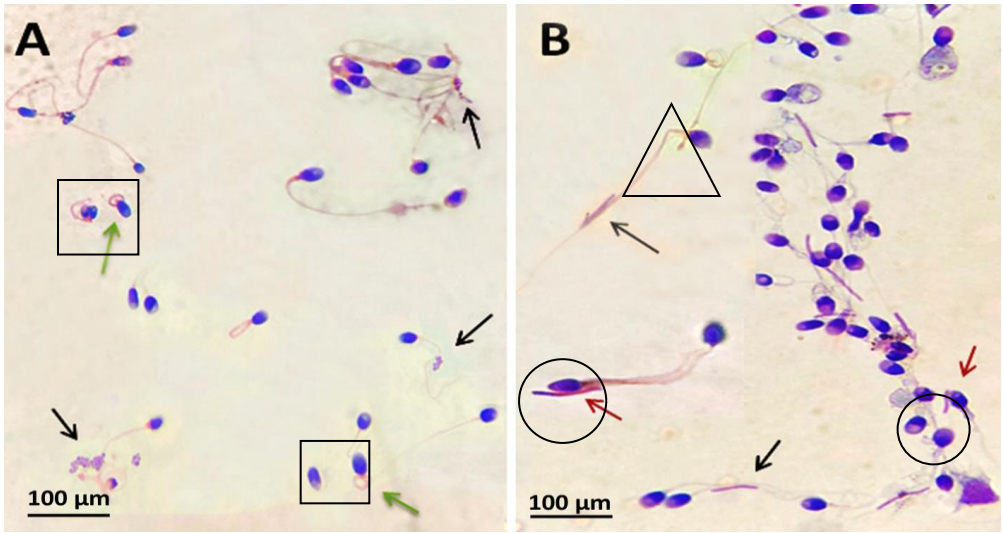
پارامترهای اسپرم	کنترل	آزمون *Ecoli*	آزمون *S.aureus*
تحرک اسپرم(٪)	۷۸/۳ ±۱۵/۸	۴۳/۷ ±۲۵/۵*	۵۴/۷ ±۲۴/۵ *
پیشرونده	۴۴/۹ ±۲۳/۴	۱۸/۴ ±۱۹/۴*	۲۴/۴ ±۱۹/۶*
غیرپیشرونده	۳۳/۸ ±۱۳/۰	۲۶/۳ ±۱۲/۵*	۳۰/۱ ±۱۳/۱
زنده‌بودن(٪)	۸۸/۸ ±۱۱/۷	۵۴/۵ ±۲۶/۸*	۶۶/۵ ±۲۵/۴*
مورفولوژی نرمال(٪)	۶/۹ ±۱/۵	۴/۳ ±۱/۶*	۴/۷ ±۱/۷*

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

*اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل

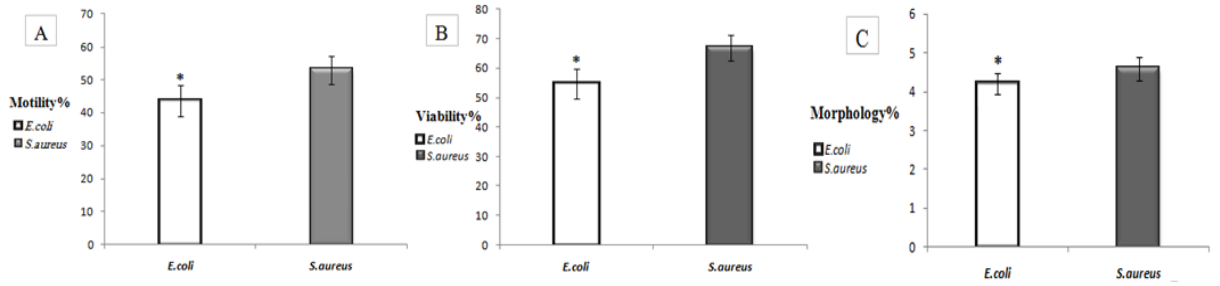


شکل ۱: A. نمونه اسپرم کنترل؛ B. نمونه اسپرم تیمارشده با *اشریشیا کلی* (در تصویر ارائه‌شده، آگلوتیناسیون یا به هم چسبیدگی اسپرم (فلش سیاه) قابل‌مشاهده است)؛ C. نمونه اسپرم تیمارشده با *استافیلوکوکوس اورئوس* (به هم چسبیدگی اسپرم (فلش سیاه) مشاهده می‌شود)



شکل ۲: مشاهده مورفولوژی و اتصال باکتری به اسپرم از طریق رنگ‌آمیزی پاپانیکولا: A. اتصال باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به اسپرم (در تصویر اتصال باکتری به دم (فلش سیاه) و پیچ‌خوردگی دم (مربع) قابل‌مشاهده است)؛ B. اتصال *اشریشیا کلی* به اسپرم (اتصال باکتری به دم (فلش سیاه)، سر (دایره) و شکستگی گردن (مثلث) در تصویر به‌طور واضح مشاهده می‌شود)

تمام پارامترها از نظر آماری اختلاف معناداری داشتند (P<۰/۰۰۱)؛ اگرچه این اثرات تا حدی کمتر از مواردی بودند که در آن‌ها اسپرم با *اشریشیا کلی* تیمار شده بود (جدول ۲). اثر این باکتری بر اسپرم با افزایش آگلوتیناسیون همراه بود



نمودار ۱: مقایسه پارامترهای اسپرم در دو گروه آزمون *E.coli* و *S.aureus*: A. درصد تحرک اسپرم؛ B. درصد زنده‌بودن اسپرم؛ C. درصد مورفولوژی نرمال اسپرم (*اختلاف معنادار با گروه *S.aureus*، P<۰/۰۵) (SE=Error bar)

(شکل C.۱). همان‌طور که در شکل (A.۲) با رنگ‌آمیزی پاپانیکولا مشاهده می‌شود، اتصال باکتری به دم و پیچ‌خوردگی آن قابل‌مشاهده می‌باشد.

مقایسه تغییرات پارامترهای اسپرم تیمارشده با اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس

مقایسه پارامترهای گروه آزمون *S.aureus* با گروه *E.coli* با استفاده از آزمون t زوجی نشان داد که از نظر میانگین پارامترهای مربوط به میزان (درصد) مورفولوژی طبیعی، میزان (درصد) زنده‌بودن و ویژگی‌های حرکتی اسپرم، بین دو گروه آزمون اختلاف آماری معناداری (P<۰/۰۵) وجود دارد (نمودار ۱).

بحث

مطالعه حاضر با هدف بررسی و مقایسه اثر دو باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌عنوان باکتری‌های شایع عفونت دستگاه تناسلی بر پارامترهای اسپرم انجام شد. به‌طور کلی، *اشریشیا کلی* یکی از فراوان‌ترین باکتری‌های یافت‌شده در نمونه‌های بالینی مبتلایان به عفونت سیستم ادراری و دستگاه تناسلی است (۳۴،۳۵). در مطالعه منتشرشده در سال ۲۰۱۹ اعلام شد که از میان گونه‌های آلوده‌کننده مایع منی، گونه‌های *اشریشیا کلی* (۴۰/۳ درصد) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۹/۴ درصد) به‌ترتیب فراوان‌ترین گونه‌ها هستند (۲). مشابه با این یافته، Sanocka و همکاران *اشریشیا کلی* (۲۰ درصد) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۷ درصد) را به‌عنوان شایع‌ترین سویه‌های باکتریایی استخراج‌شده از نمونه‌های مایع منی افراد نابارور گزارش کرده‌اند (۳۶). پیش از آن‌ها نیز Dalet و همکاران در مطالعه خود نشان داده بودند که *اشریشیا کلی* یکی از فراوان‌ترین باکتری‌های یافت‌شده در بین نمونه‌های بالینی عفونت دستگاه تناسلی می‌باشد (۳۷). یافته‌های پژوهش حاضر نشان‌دهنده تأثیر قابل‌توجه *اشریشیا کلی* بر پارامترهای اسپرم بودند. با وجود اینکه در برخی از مطالعات دیگر به نقش باکتری *اشریشیا کلی* در کاهش باروری مردان اشاره شده است (۳۸)؛ اما اختلاف نظراتی در این زمینه وجود داشته و در برخی از مطالعات گزارش شده است که بین عفونت *اشریشیا کلی* و ناباروری مردان ارتباطی وجود ندارد (۳۹)؛ به‌عنوان مثال ترکی و همکاران در مطالعه خود بیان نمودند که با وجود شیوع بالای *اشریشیا کلی* در مایع منی مردان نابارور در مقایسه با مردان بارور، به نظر می‌رسد که این باکتری مسئول ایجاد تغییرات در مورفولوژی و ویژگی‌های حرکتی اسپرم‌ها نبوده و احتمالاً ارتباطی با بروز ناباروری در مردان ندارد. این پژوهشگران بیان نمودند که این نتایج ممکن است ناشی از نادیده‌گرفتن حضور احتمالی سایر میکروارگانیسم‌ها در مایع منی افراد و برهمکنش‌های متفاوت باکتری‌های

مختلف در آن‌ها باشد (۴۰)، این موضوع از اهمیت به‌سزایی برخوردار بوده و در سال‌های اخیر مطالعاتی در زمینه اثر میکروبیوم مایع منی بر باروری مردان صورت گرفته است (۴۱). در بررسی‌های انجام‌شده توسط پژوهشگران مشاهده گردید که اکثر قریب به اتفاق مطالعات به بررسی اثر آلودگی‌های میکروبی با نمونه‌های مربوط به افراد آلوده و غیرآلوده پرداخته‌اند و اثر میکروب‌های زمینه‌ای که می‌توانند به‌عنوان یک عامل مداخله‌گر در این زمینه نقش داشته باشند، نادیده گرفته شده است؛ به همین دلیل، در مطالعه حاضر با تقسیم یک نمونه به سه گروه کنترل، آزمون *اشریشیا کلی* و آزمون *استافیلوکوکوس اورئوس* سعی در حذف اثر باکتری‌های زمینه‌ای و بررسی اثر اختصاصی باکتری‌های فوق بر اسپرم گردید؛ از این رو با اطمینان می‌توان گفت که تفاوت مشاهده‌شده بین گروه‌های آزمون و کنترل صرفاً به دلیل حضور باکتری‌های مذکور است.

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های انسانی است که موجب ایجاد عفونت‌های مختلف در انسان می‌شود (۳۱) و همان‌طور که ذکر شد، یکی از میکروارگانیسم‌های شایع جداشده از مایع منی به‌ویژه در مردان نابارور می‌باشد (۴۲،۴۳)؛ از این رو می‌تواند به‌عنوان یکی از عوامل احتمالی کاهش باروری در مردان مورد مطالعه قرار بگیرد (۱۹). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند به‌طور معناداری باعث کاهش تحرک، مورفولوژی طبیعی و درصد اسپرم‌های زنده شود. نتایج مشابهی در مطالعات دیگر نیز گزارش شده است؛ به‌عنوان مثال Liu و همکاران با بررسی اثر میکروارگانیسم‌های اوروپاتوژنیک بر حرکت اسپرم دریافتند که *استافیلوکوکوس اورئوس* به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از سایر باکتری‌ها باعث کاهش حرکت و زنده‌ماندن اسپرم می‌شود (۳۷). مطالعات نشان داده‌اند که *استافیلوکوکوس اورئوس* یکی از باکتری‌های شایع جداشده از اندوسرویکس است (۴۴). یک گروه تحقیقاتی در سال ۲۰۰۵ اعلام نمودند که در برخی از زنان مبتلا به ناباروری با دلایل ناشناخته، باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* با ایجاد آگلوتیناسیون و بی‌حرکتی اسپرم‌ها می‌تواند به‌عنوان فاکتور مؤثر در ناباروری در نظر گرفته شود (۴۵).

یکی از ویژگی‌های پژوهش حاضر، استفاده و آلوده‌سازی نمونه‌های انزالی بود که حضور لوکوسیت در آن‌ها پایین بود (جدول ۱) و نشان از این موضوع داشت که نمونه به احتمال زیاد فاقد آلودگی میکروبی می‌باشد؛ به همین دلیل اثر پاسخ ایمنی ناشی از عفونت بر اسپرم به حداقل رسیده و به نظر می‌رسد که نتایج به‌دست‌آمده به‌طور بارزی ناشی از اثرات مستقیم باکتری‌ها بر اسپرم بوده‌اند و حاصل واکنش‌های ایمونولوژیک و اثر آن‌ها بر سلول اسپرم نمی‌باشند؛ بنابراین تغییرات مشاهده‌شده می‌تواند نتیجه برهمکنش مستقیم باکتری با سلول اسپرم و در عین حال تأثیر فاکتورهای ترشحی آزادشده از باکتری باشد.

در مطالعات صورت‌گرفته اتصال مستقیم *اشریشیا کلی* به اسپرم و القای آگلوتیناسیون که به‌طور غیرمستقیم موجب کاهش حرکت اسپرم می‌شود، گزارش شده است (۴۶). در مطالعه حاضر نیز اتصال *اشریشیا کلی* به قسمت دم و سر اسپرم مشاهده گردید و افزایش میزان آگلوتیناسیون اسپرم در نمونه‌های آلوده به باکتری به‌ویژه در نمونه‌هایی که در معرض *اشریشیا کلی* قرار گرفته بودند، بارز بود. در این راستا، Fraczek و همکاران در مطالعه خود با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی، تماس مستقیم باکتری *اشریشیا کلی* با سطح اسپرم را تشخیص دادند (۱۵). مشاهده شده است که میکروب‌ها به سطح سر و دم (گردن و قطعه اصلی) اسپرم متصل می‌شوند و به این طریق می‌توانند به‌طور مستقیم عملکرد تولید مثل مردان را تحت تأثیر قرار دهند و موجب آگلوتیناسیون اسپرم‌های متحرک، کاهش توانایی واکنش آکروزوم و ایجاد تغییرات

در مورفولوژی سلول شوند (۴۷). به‌طور دقیق‌تر، اثر مهاری *اشریشیا کلی* بر حرکت اسپرم به واکنش فیمبریای باکتریایی با گیرنده‌هایی در سطح فلاژلوم یا آکروزوم نسبت داده شده است (۴۸) و همان‌طور که ذکر شد این پدیده باعث آگلوتیناسیون اسپرم می‌شود.

در مطالعه Schulz و همکاران نشان داده شد که فاکتورهای محلول ترشح‌شده توسط *اشریشیا کلی* منجر به تغییر عملکرد اسپرم‌های انسانی می‌شوند (۴۹). این امر بدین‌معنا است که مکانیسم‌هایی که توسط *اشریشیا کلی* بر اسپرم تأثیر می‌گذارند، نمی‌توانند به‌طور انحصاری به پدیده‌های ناشی از چسبندگی باکتری‌ها مرتبط باشند و این احتمال وجود دارد که ناشی از بخشی از فاکتورهای محلول ترشح‌شده از باکتری باشند. در میان فاکتورهای ترشح‌شده به وسیله *اشریشیا کلی* که ممکن است مسئولیت این اثرات را داشته باشد، α-همولیزین با کاهش حرکت اسپرم در ارتباط است (۵۰). علاوه‌براین ثابت شده است که همولیزین می‌تواند باعث از دست دادن یکپارچگی غشای پلاسما و یا کاهش عملکرد میتوکندریایی شود (۱۳،۴۹).

کاهش قابل‌توجهی که در پژوهش حاضر در حرکت اسپرم در گروه آزمون *اشریشیا کلی* نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید، در مطالعات دیگر نیز تأیید شده است (۵۱). مطالعات نسبتاً کمی در مورد اثر مستقیم *استافیلوکوکوس اورئوس* بر اسپرم و مکانیسم‌های بین واکنش باکتری با سلول اسپرم انجام شده است. بررسی‌های انجام‌شده توسط نویسندگان نشان‌دهنده اتصال مستقیم این باکتری به سلول اسپرم به‌ویژه به سطح دم آن بودند. پیچ‌خوردگی دم نیز قابل‌مشاهده بود (شکل ۲.A) که این امر می‌تواند یکی از دلایل کاهش تحرک اسپرم باشد. مطالعه اولیه Li و همکاران حاکی از آن بودند که کاهش توانایی زنده‌بودن اسپرم ممکن است مربوط به ترکیبات مهارکننده *استافیلوکوکوس اورئوس* (SCIN: S.aureus Complement Inhibitors) باشد. در مطالعات بعدی مشاهده گردید که سوپرناتانت بدون سلولی *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند حرکت اسپرم را کاهش دهد (۲۰). در بررسی‌های صورت‌گرفته، انواع مختلف تغییرات مورفولوژیک در اسپرم پس از انکوباسیون با سوپرناتانت *استافیلوکوکوس اورئوس* از طریق TEM (Transmission Electron Microscopy) نشان داده شده است که این امر می‌تواند دلیل خوبی برای تغییرات حرکتی اسپرم باشد (۳۱).

هرچند در مطالعه حاضر این موضوع بررسی نشده است؛ اما باید در نظر داشت که عفونت‌های باکتریایی می‌توانند بر ساختارهای درون سلولی و حتی DNA (Deoxyribonucleic Acid) اسپرم تأثیرگذار باشند. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که درمان‌های درست آنتی‌بیوتیکی در مردان مبتلا به عفونت مایع منی می‌تواند یکپارچگی ساختار DNA اسپرم را بهبود بخشد (۵۲). بهبود پارامترهای میکروسکوپی اسپرم مانند مورفولوژی نیز در مردان با عفونت دستگاه تناسلی ادراری پس از دوره طولانی درمان با آنتی‌بیوتیک نیز مشاهده شده است (۵۳). تمامی این یافته‌ها اهمیت شناخت و درمان عفونت‌های مایع منی در بهبود قدرت باروری و حتی افزایش نتایج حاصل از درمان‌های ناباروری را مشخص می‌کنند؛ از این رو پیشنهاد می‌شود در مطالعات بعدی به بررسی آثار مستقیم و غیرمستقیم عفونت‌های باکتریایی بر ژنوم اسپرم که نقش کلیدی در قدرت باروری آن دارند، پرداخته شود.

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان دادند که تماس اسپرم انسان با باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و یا فرآورده‌های حاصل از آن منجر به کاهش قابل‌توجه کیفیت پارامترهای اسپرم و از دست دادن پارامترهای طبیعی آن

می‌شود؛ در نتیجه می‌تواند موجب جلوگیری و یا به تأخیر انداختن لقاح در حالت طبیعی شود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که باکتری *اشریشیا کلی* نسبت به *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌تواند به‌طور معناداری اثرات مخرب‌تری را بر اسپرم تحمیل نماید.

حمایت مالی

مطالعه حاضر با استفاده از بودجه پژوهشی دانشگاه الزهرا انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

مطالعه حاضر پس از دریافت مجوز از کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس (با کد ۱۳۹۷/۰۸۷) انجام شده و تمامی ملاحظات اخلاق پزشکی و پژوهشی در آن رعایت شده است.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافعی در پژوهش حاضر وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از تمامی کارکنان مرکز درمان ناباروری بیمارستان نیکان تهران به دلیل همکاری صمیمانه در راستای اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. Sanocka D, Frączek M, Jędrzejczak P, Szumała-Kąkol A, Kurpisz M. Male genital tract infection: an influence of leukocytes and bacteria on semen. J Reprod Immunol. 2004; 62(1-2):111-24.
2. Agyepong E, Bedu-Addo K. Semen parameters and the incidence and effects of bacteriospermia in male partners of infertile couples attending a fertility clinic in the Kumasi Metropolis, Ghana. Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol. 2019; 8(1):99-107.
3. Pellati D, Mylonakis I, Bertoloni G, Fiore C, Andrisani A, Ambrosini G, et al. Genital tract infections and infertility. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2008; 140(1):3-11.
4. Keck C, Gerber-Schäfer 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.
5. Dahlberg B. Asymptomatic bacteriospermia: cause of infertility in men. Urology. 1976; 8(6):563-6.
6. Kline KA, Lewis AL. Gram-positive uropathogens, polymicrobial urinary tract infection, and the emerging microbiota of the urinary tract. Microbiol Spectr. 2016; 4(2):1128.
7. Ricci S, De Giorgi S, Lazzeri E, Luddi A, Rossi S, Piomboni P, et al. Impact of asymptomatic genital tract infections on in vitro Fertilization (IVF) outcome. PloS One. 2018; 13(11):e0207684.
8. Mehta R, Sridhar H, Vijay Kumar B, Kumar TA. High incidence of oligozoospermia and teratozoospermia in human semen infected with the aerobic bacterium Streptococcus faecalis. Reprod Biomed Online. 2002; 5(1):17-21.
9. Virecoulon F, Wallet F, Fruchart-Flamenbaum A, Rigot JM, Peers MC, Mitchell V, et al. Bacterial flora of the low male genital tract in patients consulting for infertility. Andrologia. 2005; 37(5):160-5.
10. Bhatt CP, Mishra S, Bhatt A, Lakhey M. Bacterial pathogens in semen culture and their antibiotic susceptibility pattern in vitro. Int J Biomed Res. 2015; 6(11):909-14.
11. Wolff H, Panhans A, Stolz W, Meurer M. Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*. Fertil Steril. 1993; 60(1):154-8.
12. Monga M, Roberts JA. Spermagglutination by bacteria: receptor-specific interactions. J Androl. 1994; 15(2):151-6.
13. Diemer T, Huwe P, Michelmann H, Mayer F, Schiefer H, Weidner W. *Escherichia coli*-induced alterations of human spermatozoa. An electron microscopy analysis. Int J Androl. 2000; 23(3):178-86.
14. Villegas J, Schulz M, Soto L, Sanchez R. Bacteria induce expression of apoptosis in human spermatozoa. Apoptosis. 2005; 10(1):105-10.
15. Fraczek M, Piasecka M, Gaczarzewicz D, Szumala-Kakol A, Kazienko A, Lenart S, et al. Membrane stability and mitochondrial activity of human-ejaculated spermatozoa during in vitro experimental infection with *Escherichia coli*, *Staphylococcus haemolyticus* and Bacteroides

ureolyticus. Andrologia. 2012; 44(5):315-29.
16. Kaur K, Prabha V. Sperm impairment by sperm agglutinating factor isolated from *Escherichia coli*: receptor specific interactions. Biomed Res Int. 2013; 2013:548497.
17. Becker R, Bubeck JW. *Staphylococcus aureus* and the skin: a longstanding and complex interaction. Skinmed. 2015; 13(2):111-9.
18. Goetghebeur M, Landry PA, Han D, Vicente C. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a public health issue with economic consequences. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2007; 18(1):27-34.
19. Gupta S, Prabha V. Human sperm interaction with Staphylococcus aureus: a molecular approach. J Pathog. 2012; 2012:81536.
20. Li B, Yang X, Ye JZ, Chen HL, Hou YB, Du J, et al. Spermatozoal immobilization ability and virulence genes of Staphylococcus aureus isolated from the semen of infertile men. Zhonghua Nan Ke Xue. 2015; 21(10):881-6.
21. Liu JH, Li HY, Cao ZG, Duan YF, Li Y, Ye ZQ. Influence of several uropathogenic microorganisms on human sperm motility parameters *in vitro*. Asian J Androl. 2002; 4(3):179-82.
22. Paulson JD, Polakoski KL. Isolation of a spermatozoal immobilization factor from *Escherichia coli* filtrates. Fertil Steril. 1977; 28(2):182-5.
23. Purvis K, Christiansen E. Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. Int J Androl. 1993; 16(1):1-13.
24. Robinson C, Roberts P, Matson P. Sperm motility assessment using computer assisted semen analysis (CASA): a comparison of standard microscope slides and coverslips and the 20 µm MicroCell™. J Reprod Stem Cell Biotechnol. 2018; 7:1-8.
25. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization; 2010.
26. Eduardo LG, Ramirez BS, Maribel CF, Pescador M, Nieto IG, Cruz JM. Low accuracy of the McFarland method for estimation of bacterial populations. Afr J Microbiol Res. 2018; 12(31):736-40.
27. Althouse GC, Lu KG. Bacteriospermia in extended porcine semen. Theriogenology. 2005; 63(2):573-84.
28. Morrell J, Wallgren M. Removal of bacteria from boar ejaculates by Single Layer Centrifugation can reduce the use of antibiotics in semen extenders. Anim Reprod Sci. 2011; 123(1-2):64-9.
29. Pinart E, Domènech E, Bussalleu E, Yeste M, Bonet S. A comparative study of the effects of *Escherichia coli* and Clostridium perfringens upon boar semen preserved in liquid storage. Anim Reprod Sci. 2017; 177:65-78.
30. Joshi C. Sperm preparation techniques and its modification according to different sperm seminopathy. Practical Guide in Andrology and Embryology. London: JP Medical Publishers; 2018. P. 56.
31. Li J, Li B, Song J, Liu H, Bi W, Dong G, et al. Characteristic and mechanism of immobilization effect of *Staphylococcus aureus* on human spermatozoa. Microb Pathog. 2018; 119:28-34.
32. Chomean S, Sukanto T, Piemsup A, Chaiya J, Saenguthai K, Kaset C. Evaluation of black glutinous rice (Oryza sativa L) extract as a novel nuclear stain for human sperm head assessment by microscopic examination. Clin Exp Reprod Med. 2019; 46(2):60-6.
33. Czubaszek M, Andraszek K, Banaszewska D, Walczak-Jędrzejowska R. The effect of the staining technique on morphological and morphometric parameters of boar sperm. PloS One. 2019; 14(3):e0214243.
34. Abera B, Biadegelgen F, Bezabih B. Prevalence of *Salmonella typhi* and intestinal parasites among food handlers in Bahir Dar Town, Northwest Ethiopia. Ethiopian J Health Dev. 2010; 24(1):47-50.
35. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nat Rev Microbiol. 2010; 8(1):26-38.
36. Sanocka-Maciejewska D, Ciupińska M, Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. J Reprod Immunol. 2005; 67(1-2):51-6.
37. Dalet F, Segovia T, Del Rio G. Frequency and distribution of uropathogenic *Escherichia coli* adhesins: a clinical correlation over 2,000 cases. Eur Urol. 1991; 19(4):295-303.
38. Kaur K, Prabha V. Spermagglutinating Escherichia coli and its role in infertility: *in vivo* study. Microb Pathog. 2014; 69-70:33-8.
39. Fowler JE, Mariano M. Bacterial infection and male infertility: absence of immunoglobulin A with specificity for common *Escherichia coli* 0-serotypes in seminal fluid of infertile men. J Urol. 1983; 130(1):171-4.
40. Torki A, Khalili MB, Ghasemzadeh J. Association of *E. coli* in the semen with male infertility in Infertility Research Center of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences in Yazd. Res Med. 2016; 40(1):12-6.
41. Baud D, Pattaroni C, Vulliemoz N, Castella V, Marsland B, Stojanov M. Sperm microbiota and its impact on semen parameters. Front Microbiol. 2019; 10:234.
42. Onyebuchi AK, Ifeoma EC, Mamah J, Iwe B, Afogu E, Obi VO. Seminal fluid analysis of male partners of infertile couples in Abakaliki, Ebonyi State, Nigeria. Trop J Obstet Gynaecol. 2018; 35(3):261-5.
43. Nasrallah YS, Anani M, Omar HH, Hashem AA.

Microbiological profiles of semen culture in male infertility. Hum Androl. 2018; 8(2):34-42.
44. Sule-Odu A, Oladapo O, Jagun O, Awosile J. Microbial isolates and HIV infection in couples attending fertilityclinics in Sagamu, Nigeria. J Obstet Gynaecol. 2005; 25(7):685-8.
45. Ohri M, Prabha V. Isolation of a sperm-agglutinating factor from *Staphylococcus aureus* isolated from a woman with unexplained infertility. Fertil Steril. 2005; 84(5):1539-41.
46. Teague NS, Boyarsky S, Glenn JF. Interference of human spermatozoa motility by *Escherichia coli*. Fertil Steril. 1971; 22(5):281-5.
47. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility--a clinical perspective. Hum Reprod Update. 2008; 14(3):243-58.
48. Diemer T, Huwe P, Ludwig M, Schroeder-Printzen I, Michelmann H, Schiefer H, et al. Influence of autogenous leucocytes and *Escherichia coli* on sperm motility parameters *in vitro*. Andrologia. 2003; 35(2):100-5.
49. Schulz M, Sánchez R, Soto L, Risopatrón J, Villegas J. Effect of *Escherichia coli* and its soluble factors on mitochondrial membrane potential, phosphatidylserine translocation, viability, and motility of human spermatozoa. Fertil Steril. 2010; 94(2):619-23.
50. Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W. Influence of urogenital infection on sperm function. Curr Opin Urol. 2000; 10(1):39-44.
51. Prabha V, Gupta T, Kaur S, Kaur N, Kala S, Singh A. Isolation of a spermatozoal immobilization factor from *Staphylococcus aureus* filtrates. Can J Microbiol. 2009; 55(7):874-8.
52. Moskovtsev SI, Lecker I, Mullen JB, Jarvi K, Willis J, White J, et al. Cause-specific treatment in patients with high sperm DNA damage resulted in significant DNA improvement. Syst Biol Reprod Med. 2009; 55(2-3):109-15.
53. Menkveld R. Leukocytospermia. In: Daya S, Harrison RF, Kempers RD, editors. Advances in fertility and reproductive medicine. New York: International Congress Series; 2004.

Volume 23, Issue 73, Spring 2020, Pages: 1-13

Original Article

Effects of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Inoculation on Human Sperm Parameters

Maryam Ahmadian Mahmoudabadi[1], Nassim Ghorbanmehr[2*], Mansoureh Movahedin[3], Ameneh Elikaei[4]

[1] MSc, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran
[3] Full Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran

Received: 29 October 2019 **Accepted:** 31 December 2019

Abstract

Introduction: Infertility is one of the global health problems. The bacterial infection of semen and genital tract is one of the causes of the decline in male fertility. Defects in spermatogenesis and sperm function may be due to cellular reactions against microbial agents, as well as the direct effect of bacteria on germ cells. The recognition of the interaction between bacteria and reproductive system plays an important role in treating infertile men. The aim of this study was to examine the in vitro direct effect of *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) on the motility, morphology, and viability of human spermatozoa, and compare the effect of these bacteria on the quality of sperm.

Materials and Methods: The study was carried out on swim-up-separated spermatozoa from 33 men referred to the Nikan Infertility Treatment Center in Tehran, Iran, in 2018. After the removal of seminal plasma, the sperm suspension of each sample was divided into three parts. The first and second parts (i.e., experimental groups) were coincubated with *E. coli* and *S. aureus*, respectively, for 90 min at 37°C, and the third part (i.e., control group) was incubated at the same condition but without bacteria. Sperm parameters were assessed after the incubation. Statistical analysis was done to find the significant differences between the experimental groups and control group.

Results: The results showed that *E. coli* and *S. aureus* infection caused a significant decline in the morphology, motility, and viability of two experimental groups in comparison to that reported for the control group ($P<0.05$).

Conclusion: The results of this study revealed that the contact of bacteria with ejaculated spermatozoa can decrease sperm motility, morphology, and viability, with potential consequences for male fertility.

Keywords: Bacterial Infections, *Escherichia coli*, Male Infertility, Sperm, *Staphylococcus aureus*

*** *Corresponding Author:*** Nassim Ghorbanmehr, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran. Tel: 09121499389; Email: n.ghorbanmehr@alzahra.ac.ir