

Investigation of Frequency of *Mycoplasma hominis* and Biological Parameters in Semen Sample of Men Referred to Qom Jihad Daneshgahi Infertility Treatment Center in 2016 (Iran)

Ali Asgari¹, Raziieh Nazari^{1*}, Seyed Mohammad Hossein Razavian¹

¹Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Abstract

Background and Objectives: *Mycoplasmas hominis* is one of the important causes of bacterial infections of the reproductive system, which through changes in the volume, pH, motility, morphology, and sperm count in men, can lead to reduction in the level of fertility or infertility and sterility. In this research, the frequency of *Mycoplasma hominis*, was assessed by PCR method, and biological parameters, were investigated in the semen samples of infertile men referred to Qom jihad daneshgahi infertility treatment center.

Methods: In this descriptive-analytic study, a total of 187 semen samples were collected from infertile men referred to Qom jihad daneshgahi infertility treatment center from April to September 2016. Semen analysis was performed according to the guideline of World Health Organization. After the extraction of genomic DNA, detection of *Mycoplasma hominis*, was performed by PCR method using 16S rRNA specific primers. Data were analyzed using dependent and independent t-test.

Results: Among 187 semen samples studied by PCR, 71 samples (38%), were positive for *Mycoplasma hominis*. In the assessment of parameters, there was a significant association between bacterial infection and C class mean difference (in situ sperm motility) ($p=0.008$).

Conclusion: The results of the present study showed that high percentage of infertile men are infected with *Mycoplasma hominis*, which may lead to pelvic inflammatory diseases, urethritis, and infertility. PCR method is a rapid and efficient technique for detection of mycoplasma, which can be useful in the control of sexual transmitted diseases.

Keywords: *Mycoplasma hominis*; Infertility; Polymerase chain reaction.

*Corresponding Author:
Raziieh Nazari, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Email:
nazari1102002@yahoo.com

Received: 16 Apr, 2017

Accepted: 16 Jul, 2017

بررسی فراوانی مایکوپلازما هومینیس و مطالعه شاخص‌های بیولوژیک در مایع منی مردان نابارور مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم، سال ۱۳۹۵

علی عسگری^۱، راضیه نظری^{۱*}، سیدمحمدحسین رضویان^۱

چکیده

زمینه و هدف: مایکوپلازما هومینیس، از عوامل مهم عفونت‌های باکتریایی دستگاه تناسلی بوده که با ایجاد تغییرات در حجم، pH، تحرک، شکل و تعداد اسپرم در مردان می‌تواند باعث کاهش سطح باروری یا ناباروری و نازایی گردد. در این تحقیق، فراوانی مایکوپلازما هومینیس به روش PCR و شاخص‌های بیولوژیک در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم بررسی گردید.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی، ۱۸۷ نمونه مایع منی از مردان نابارور مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم از فروردین ماه تا شهریورماه سال ۱۳۹۵ جمع آوری شد. بررسی اسپرم‌ها طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی انجام گرفت. پس از استخراج DNA، برای شناسایی مایکوپلازما هومینیس، از پرایمرهای اختصاصی ژن 16SrRNA در روش PCR استفاده گردید. داده‌ها به کمک آزمون‌های تی تست وابسته و مستقل تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: از مجموع ۱۸۷ نمونه مایع منی بررسی شده با استفاده از روش PCR، ۷۱ نمونه (۳۸٪) از نظر مایکوپلازما هومینیس مثبت بود. در بررسی شاخص‌ها، بین آلودگی باکتریایی و اختلاف میانگین کلاس C (حرکت اسپرم درجا)، رابطه معنی داری وجود داشت (p=۰/۰۰۸).

نتیجه گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد درصد بالایی از مردان نابارور، آلوده به مایکوپلازما هومینیس می‌باشند که ممکن است منجر به بیماری‌های التهابی لگن، اورتریت و نازایی گردد. همچنین روش PCR در تشخیص مایکوپلازما، یک تکنیک کارآمد و سریع بوده که می‌تواند در کنترل بیماری‌های مقاربتی مفید باشد.

کلید واژه‌ها: مایکوپلازما هومینیس؛ ناباروری؛ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

گروه میکروبی‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

راضیه نظری، گروه میکروبی‌شناسی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
nazari1102002@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۲۵

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Asgari A, Nazari R, Razavian SMH. Investigation of frequency of *Mycoplasma hominis* and biological parameters in semen sample of men referred to Qom jihad daneshgahi infertility treatment center in 2016 (Iran).
Qom Univ Med Sci J 2018;12(4):81-88. [Full Text in Persian]

نمونه‌های مایع منی مردان نابارور مراجعه‌کننده به پژوهشکده رویان، با استفاده از روش PCR میزان آلودگی را ۱۵/۵٪ اعلام کردند (۲). گرچه عفونت ناشی از مایکوپلازما هومینیس اغلب بی‌علامت است، اما بر سلامت دستگاه تناسلی تأثیر منفی می‌گذارد. تحقیق حاضر با هدف بررسی فراوانی مایکوپلازما هومینیس و شاخص‌های بیولوژیک در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی، مقطعی، تعداد ۱۸۷ نمونه مایع منی مردان نابارور مراجعه‌کننده به مرکز فوق تخصصی درمانی ناباروری جهاد دانشگاهی قم، انتخاب و بررسی شدند. حجم نمونه با توجه به درصد شیوع متوسط این باکتری (۲) به روش زیر محاسبه گردید.

$$n=4pq/d^2=(4 \times 0.02 \times 0.08) \div (0.06)^2 \approx 178$$

در این فرمول:

P: فراوانی وجود باکتری (۲۰٪)؛

q: فراوانی عدم وجود باکتری (۸۰٪)؛

d: سطح دقت (دقت مطلوب جهت تعمیم نتایج نمونه به جامعه می‌باشد). که ۰/۰۶ در نظر گرفته شد.

در ابتدا اطلاعات مربوط به بیماران طی یک پرسشنامه به همراه رضایت‌نامه آنها گردآوری شد، سپس نمونه‌های مایع منی در ظرف‌های مخصوص جمع‌آوری و برای هر نمونه در مرحله اول، تست اسپرموگرام (طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۰) انجام گرفت (۹). در بررسی شاخص‌های بیولوژیک در نمونه‌های مایع منی جمع‌آوری شده در آزمایش اسپرموگرام، شاخص‌هایی مانند حجم، تعداد، pH، شکل و حرکت اسپرم سنجیده شد (۹). بررسی حرکت اسپرم براساس معیار سازمان بهداشت جهانی، در چهار کلاس (a, b, c, d) تقسیم‌بندی شده است (۱۰). اسپرم‌ها در کلاس a حرکت مستقیم روبه جلو؛ در کلاس b حرکت مستقیم رو به جلو، نه مستقیم؛ در کلاس c حرکت درجا و در کلاس d فاقد حرکت و مرده می‌باشند (۱۰).

برای ردیابی و شناسایی مایکوپلازما هومینیس از نمونه‌های مایع منی جمع‌آوری شده، روش PCR به کار برده شد.

مایکوپلازماها، کوچکترین پروکاریوت‌هایی هستند که ویژگی شاخص آنها، فقدان دیواره سلولی است (۱، ۲). مایکوپلازماهای تناسلی به فراوانی در مجرای تناسلی و مایع منی هر دو گروه مردان (افراد با قدرت باروری و افراد فاقد قدرت باروری) یافت می‌شوند (۳، ۴). مایکوپلازما هومینیس به همراه کلامیدیا تراکوماتیس، جزء شایع‌ترین عوامل ایجادکننده اورتریت غیرگونوکوکی است (۱، ۲)، که در بیماری‌های التهابی لگن، واژنوز باکتریایی، تب پس از زایمان و تب پس از سقط نیز نقش دارند (۲، ۵، ۶). مایکوپلازما هومینیس یکی از مهم‌ترین مایکوپلازماهایی است که از دستگاه تنفسی و ادراری - تناسلی جدا می‌شود. عفونت ناشی از این باکتری اغلب بی‌علامت بوده، اما تأثیراتی منفی بر سلامت دستگاه تناسلی مردان مانند تأثیر بر حجم، pH، تحرک، شکل، تعداد و قابلیت حیاتی اسپرم می‌گذارد. این باکتری با اتصال به سر، دم و بخش میانی اسپرم‌ها جهت کسب آستروئیدهای مورد نظر خود سبب بی‌حرکت شدن آنها و حتی نفوذ به داخل اسپرم می‌گردد، همچنین این باکتری با تولید یون‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن موجب آسیب غشایی سلولی و با آزادکردن آنزیم اوره‌آز باعث تولید آمونیاک و نابودی اسپرم‌ها می‌شود. در اثر سموم، آنزیم‌ها، یا اتصال باکتری به اسپرم و یا از طریق تحریک سیستم ایمنی علیه اسپرم، آسیب به تمام نواحی دستگاه تناسلی ادراری می‌تواند وارد شود که در نتیجه منجر به آسیب عملکرد اسپرم و تخریب آن، سپس تنگی مجاری سمینال می‌گردد. این باکتری با تولید نورآمینیداز، از مرحله لانه‌گزینی بلاستوسیت نیز ممانعت می‌کند. علاوه بر این، با تغییر pH ناحیه مهبل موجب سقط جنین، اختلال در خصوصیات فیزیولوژیک مایع مهبل و نفوذپذیری اسپرم می‌شود. از آنجایی که کشت مایکوپلازما دشوار بوده و هزینه بالایی نیز دارد؛ بنابراین روش PCR در تشخیص این باکتری به‌عنوان روشی حساس، سریع، آسان و کاملاً اختصاصی بسیار مورد توجه است (۷). گلشنی و همکاران در تهران (سال ۱۳۸۶) با روش PCR به بررسی آلودگی مایکوپلازما هومینیس در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور پرداخته و میزان آلودگی با مایکوپلازما هومینیس را ۱۱٪ گزارش کردند (۸). احمدی و همکاران نیز در بررسی آلودگی مایکوپلازما هومینیس

جهت شناسایی مایکوپلازما هومینیس، از توالی‌های پرایمر اختصاصی مربوط به ژن 16 SrRNA استفاده گردید (جدول شماره ۱) (۱۲).

برای این منظور ابتدا از مایع منی، DNA به روش فنل - کلروفرم استخراج شد (۱۱)، سپس نمونه‌های DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی ژن 16 SrRNA

ژن هدف پرایمر توالی پرایمر (5' 3') محصول PCR (bp)
334 F: CAATGGCTAATGCCGGATACGC RNA H1 16SrRNA
R: GGTACCGTCAGTCTGCAAT

۵۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه، تکثیر در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه با ۳۷ بار تکرار و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه با یک تکرار انجام گرفت. در نهایت، جهت بررسی نتیجه PCR، از روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵٪ استفاده گردید.

جهت انجام PCR، DNA استخراج شده از نمونه‌های مایع منی به همراه پرایمرهای مربوطه در واکنش PCR وارد شدند (جدول شماره ۲). در مرحله بعد از برنامه PCR شامل: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه با یک تکرار و دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ ثانیه، اتصال پرایمرها در

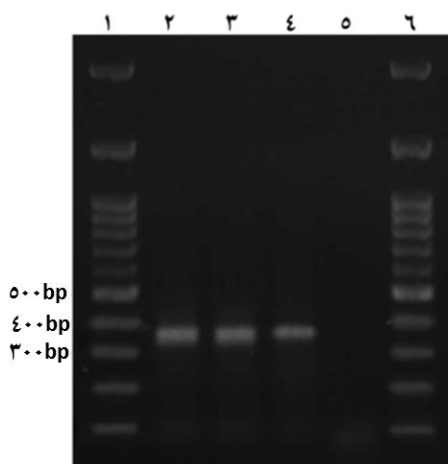
جدول شماره ۲: مواد واکنش PCR

Material	Sample	Negative control
Buffer PCR	21.5µl	21.5µl
Forward primer	1µl	1µl
Reverse primer	1µl	1µl
DNA	15ng	0
H ₂ O	0	1µl
(Taq DNA Polymerase 5Unit/µl)	0.25µl	0.25µl

یافته‌ها

نتایج ردیابی و شناسایی مایکوپلازما هومینیس در نمونه‌های منی مردان نابارور نشان داد از ۱۸۷ نمونه مایع منی، ۷۱ نمونه (۳۸٪) به مایکوپلازما هومینیس آلوده‌اند که در واکنش PCR، بانندی در محدوده ۳۳۴ جفت باز ایجاد شده بود (شکل). ۱۱۶ نمونه (۶۲٪) نیز فاقد آلودگی با مایکوپلازما هومینیس بودند.

در این تحقیق، از DNA سویه استاندارد مایکوپلازما هومینیس (ATCC 23114) تهیه شده از مؤسسه تحقیقات واکنس و سرم‌سازی رازی، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲، آزمون تی تست وابسته و مستقل تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p < 0/05$ در نظر گرفته شد.



شکل: نتایج الکتروفورز محصول PCR.

ستون ۱، ۶ مارکر (۱۰۰ bp)، ستون ۲ سویه استاندارد مایکوپلازما هومینیس (ATCC 23114)؛ ستون ۳، ۴ نمونه آلوده با مایکوپلازما هومینیس؛ ستون ۵ کنترل منفی.

مایکوپلازما هومینیس در عفونت‌های باکتریایی مهبل و لوله‌های تخم‌بر، عفونت زخم سزارین، پیلونفریت، همچنین اورتریت نقش دارد (۷)، که در صورت عدم درمان، به ناباروری و نازایی منتهی می‌شود (۱۴، ۱۵).

در مطالعات مختلف گزارش شده است برای شناسایی مایکوپلازماهای تناسلی، روش PCR در مقایسه با روش کشت، روش تشخیصی کارآمدتری است؛ زیرا مایکوپلازماها به دلیل فقدان دیواره سلولی در برابر شرایط محیطی (pH، خشکی، دما) بسیار حساس هستند. همچنین مایکوپلازماها سخت رشد بوده و نیازمند محیط‌های کشت اختصاصی با مکمل‌های غذایی می‌باشند؛ بنابراین ممکن است در مراحل نمونه‌برداری، انتقال به آزمایشگاه و کشت دادن، باکتری‌ها از دست رفته و نتیجه کشت منفی کاذب ایجاد کنند. از طرف دیگر، کشت مایکوپلازما هومینیس در شرایط مطلوب به ۲-۵ روز زمان نیاز دارد، درحالی‌که با روش PCR می‌توان در چند ساعت با حساسیت بالا، چندین نمونه را مورد بررسی قرار داد و نتایج را منعکس کرد که به دلایل فوق در تحقیق حاضر، از روش PCR برای شناسایی این باکتری استفاده شد (۱۶).

در مطالعه‌ای توسط Gadoura و همکاران در کشور تونس با بررسی آلودگی مایکوپلازما هومینیس در مایع منی مردان نابارور با روش PCR، میزان شیوع مایکوپلازما هومینیس، ۱۰/۸٪ گزارش شد (۱۷). از آنجایی‌که در تحقیق حاضر میزان شیوع مایکوپلازما هومینیس، ۳۸٪ بود؛ لذا مقایسه نتایج با مطالعات فوق نشان داد میزان آلودگی در شهر قم بالاتر از کشور تونس بوده است. گلشنی و همکاران نیز در تهران در بررسی آلودگی مایکوپلازما هومینیس در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور با روش PCR، میزان آلودگی را ۱۱٪ گزارش کردند (۸)، که در مقایسه با مطالعه حاضر پایین‌تر بود. در تحقیق دیگری توسط نیاکان و همکاران در تهران (سال ۱۳۸۶) بر روی نمونه‌های مایع منی ۴۰ مرد نابارور، فراوانی مایکوپلازما هومینیس، ۱۷/۵٪ اعلام شد، اما این یافته به علت محدود بودن تعداد افراد مورد بررسی، نمی‌تواند آمار صحیحی از شیوع این ارگانسیم را دربرداشته باشد (۱۸).

میانگین حجم مایع منی در مردان آلوده با مایکوپلازما هومینیس، $3/5 \pm 1/6$ ، تعداد اسپرم $(10^6 \times) 79/7 \pm 45/6$ و میزان درصد تحرک $50/2 \pm 19/6$ بود.

میانگین حجم مایع منی در مردان فاقد آلودگی با مایکوپلازما هومینیس، $3/9 \pm 1/6$ ، تعداد اسپرم $(10^6 \times) 67/5 \pm 49/9$ و میزان درصد تحرک $44/8 \pm 22/4$ برآورد شد.

براساس نتایج کلاس a، b و c در مردان آلوده با مایکوپلازما هومینیس، میانگین حرکت اسپرم‌ها در کلاس a، $5/7 \pm 1/8$ ؛ میانگین حرکت اسپرم‌ها در کلاس b، $24/4 \pm 11/9$ و میانگین حرکت اسپرم‌ها در کلاس c، $30 \pm 8/4$ بود. بین آلودگی باکتریایی و اختلاف میانگین مشاهده‌شده در حرکت کلاس c، رابطه معنی‌داری وجود داشت ($p=0/008$). در مردان فاقد آلودگی با مایکوپلازما هومینیس، میانگین حرکت اسپرم‌ها در کلاس a، $8/5 \pm 5/9$ ؛ میانگین حرکت اسپرم‌ها در کلاس b، $26/1 \pm 12/6$ و میانگین حرکت اسپرم‌ها در کلاس c، $26/1 \pm 10/7$ برآورد شد. فقط در کلاس c این دو گروه با هم اختلاف معنی‌داری داشتند ($p=0/007$).

میانگین pH در مردان آلوده با مایکوپلازما هومینیس، $7/7 \pm 0/06$ و در مردان فاقد آلودگی با مایکوپلازما هومینیس، $7/7 \pm 0/05$ بود.

بررسی شکل اسپرم‌ها نشان داد در مردان آلوده با مایکوپلازما هومینیس، به‌طور میانگین درصد شکل طبیعی، $4/1 \pm 3/6$ و شکل غیرطبیعی $94/7 \pm 11/6$ بوده است. در مردان فاقد آلودگی با مایکوپلازما هومینیس، به‌طور میانگین درصد شکل طبیعی، $4/2 \pm 4/3$ و شکل غیرطبیعی، $94/8 \pm 9/7$ به دست آمد.

بحث

عفونت مجرای ادراری - تناسلی مردان، یکی از مهم‌ترین عوامل ناباروری در مردان است، به‌طوری‌که ۳۵-۸٪ موارد ناباروری مردان در سراسر جهان ناشی از این نوع عفونت‌ها می‌باشد. مایکوپلازماها همراه با کلامیدیا به‌عنوان مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب در دستگاه تناسلی شناخته شده‌اند که از راه تماس جنسی منتقل و باعث ایجاد بیماری در دستگاه تناسلی می‌شوند (۱۳).

مطالعات آزمایشگاهی نشان می‌دهند گرماگذاری اسپرم‌ها با مایکوپلازماها می‌تواند با آسیب رساندن به فیزیولوژی اسپرم‌ها، باعث تأثیرات منفی بر روی قدرت تحرک، شکل و قابلیت حیاتی آن‌ها گردد (۲). براساس یک مطالعه، گرماگذاری همزمان مایکوپلازما هومینیس و اسپرم‌ها به مدت یک‌شنبه‌روز از نظر آماری، اثر واضحی روی حرکت، شکل و قدرت باروری آنها دارد (۲۳،۴). در مطالعه احمدی و همکاران در تهران نشان داده شد بین آلودگی مایکوپلازما هومینیس در مایع منی، شاخص‌های pH و قدرت تحرک اسپرم، ارتباط معنی‌داری وجود دارد (۲). در تحقیق حاضر با توجه به نتایج آنالیز آماری مشخص گردید بین آلودگی باکتریایی و اختلاف میانگین در کلاس c (حرکت درجا)، رابطه معنی‌داری وجود دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق، درصد نسبتاً بالایی از مردان نابارور در شهر قم به این باکتری آلوده‌اند که در صورت عدم تشخیص و درمان می‌تواند باعث عفونت دستگاه تناسلی - ادراری و ناباروری گردد. لذا درمان آنتی‌بیوتیک و تست‌های میکروبی برای مردان نابارور، ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کارکنان مرکز درمان فوق تخصصی ناباروری جهاد دانشگاهی قم، به‌ویژه جناب آقای مهندس کلهر، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند، تشکر و قدردانی می‌نماییم.

احمدی و همکاران در تهران با بررسی آلودگی مایکوپلازما هومینیس در نمونه‌های مایع منی مردان نابارور با استفاده از روش PCR، میزان آلودگی مایکوپلازما هومینیس را ۱۵/۵٪ گزارش کردند (۲). از آنجایی که در تحقیق حاضر، میزان شیوع مایکوپلازما هومینیس، ۳۸٪ بود؛ بنابراین، مقایسه این یافته با نتایج مطالعات فوق نشان داد میزان آلودگی در شهر قم بالاتر از تهران بوده است.

در مطالعه دیگری که توسط جمالی‌زاده و همکاران در سیرجان انجام گرفت، در بررسی آلودگی مایکوپلازما هومینیس با روش PCR، میزان آلودگی مایکوپلازما هومینیس، ۳۷/۵٪ اعلام شد (۱۹)، که این یافته با نتیجه تحقیق حاضر همخوانی داشت. از طرف دیگر، با مقایسه نتایج محققان در سال‌های مختلف می‌توان به این نکته اشاره کرد که آلودگی با مایکوپلازما هومینیس در افراد نابارور در سال‌های اخیر به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافته است. همچنین تأکید می‌گردد کلونیزه شدن مایکوپلازما هومینیس در دستگاه ادراری - تناسلی و آلودگی با آن، ارتباط معنی‌داری با عواملی نظیر شرایط اجتماعی - اقتصادی پایین، فقر، عفونت‌های باکتریایی دیگر و تفاوت در توزیع جغرافیایی جمعیت‌ها دارد (۲۰).

در مورد تأثیر مایکوپلازما‌های تناسلی بر شاخص‌های اسپرم و نقش آن‌ها در ایجاد تغییرات آندروژنی مایع منی و ایجاد ناباروری در مردان، دیدگاه‌های متفاوت و بعضاً متناقضی وجود دارد (۲۱، ۲۲)؛ به‌عنوان مثال، برخی گزارش‌ها حاکی از آن است که حضور مایکوپلازماها در مایع منی می‌تواند سبب ایجاد تأثیرات منفی بر حجم، pH، تحرک، شکل، تعداد و قابلیت حیاتی اسپرم‌ها شود (۲۳)، درحالی که برخی از محققان هیچ‌گونه ارتباطی را بین حضور این باکتری‌ها در مایع منی و ایجاد تغییرات در شاخص‌های اسپرم نیافته‌اند (۲).

References:

1. Kilic D, Basar M, Kaygusuz S, Yilmaz E, Basar H, Batislam E. Prevalence and treatment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in patients with non-gonococcal urethritis. *Jpn J Infect Dis* 2004;57(1):17-20. PubMed
2. Ahmadi MH, Amirmozafari N, Sedighi-Gilani MA, Kazemi B, Masjedian-Jazi F. Comparison of culture with PCR for detection of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in semen samples of infertile men referring to the Royan Institute in 2009. *Razi J Med Sci* 2010;17(76):15-29. [Full Text in Persian] Link
3. Andrade-Rocha FT. *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in men attending for routine semen analysis, prevalence and incidence by age and clinical settings, influence on sperm characteristics, relationship with the leukocyte count and clinical value. *Urol Int* 2003;71(4):377-81. PubMed
4. Fanaei H, Mardaneh J, Khayat S. An overview of the role of bacterial infection in male infertility Zahedan University of Medical Sciences, Iran. *J Fasa Univ Med Sci* 2012;2(4):227-34. [Full Text in Persian] Link
5. Yoshida T, Maeda S, Deguchi T, Miyazawa T, Ishiko H. Rapid detection of *Mycoplasma enitulum*, by PCR-microtiter plate hybridization assay. *J Clin Microbiol* 2003;41(5):1850-55. PubMed
6. Soffer Y, Ron-El R, Golan A, Herman A, Caspi E, Samra Z. Male genital mycoplasmas and *Chlamydia trachomatis* culture: its relationship with accessory gland function, sperm quality, and autoimmunity. *Fertil Steril* 1990;53(2):331-6. PubMed
7. Vosoughi S, gaergaha B, Karimi nek A, Mirshekari T. Mycoplasma infections in human role in infertility review. *New Cell Mol Biol Biotechnol* 2012;2(8):9-20. [Full Text in Persian] Link
8. Golshani M, Eslami G, Mohammadzadeh Ghobadloo Sh, Fallah F, Goudarzi H, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* by Multiplex PCR in semen sample of infertile men. *Iran J Publ Health* 2007;36(2):50-57. Link
9. Trevor C. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. 2010. Geneva: WHO; 2010. Link
10. Basirat Z, Jour Sarayee SGh. The Effects of Swim up Method on Sperm Parameters. *Iranian J Obstet Gynecol Infertil* 2008;11(4):1-7. [Full Text in Persian]
11. Anvar Z, Namavar-Jahromi B, Ebrahimi S, Gharesi-Fard B. Genomic DNA extraction from sperm. *J Adv Med Sci Appl Technol* 2015;1(1):120-21. Link
12. Blanchard A, Yanez A, Dybvig K, Watson HL, Griffiths G, Cassell GH. Evaluation of interspecies genetic variation within the 16S rRNA gene of *Mycoplasma hominis* and detection by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993;31(5):1358-61. PubMed
13. Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *J Clin Microbiol* 2004;42(4):1528-33. PubMed
14. Vosoughi S, Benevolent B, Mirshekari TR, Karimi Nick A, Hmydavy Pour S, Moghadam N. Molecular detection of *Mycoplasma hominis* from genital secretions of infertile men referred to the Kerman infertility center. *J Microbial World* 2013;14(1):14-22. [Full Text in Persian] Link
15. Wang Y, Liang CL, Wu JQ, Xu C, Qin SX, Gao ES. Do *Ureaplasma urealyticum* infections in the genital tract affect semen quality? *Asian J Androl* 2006;8(5):562-68. PubMed
16. Luki N, Lebe PM, Boucher M, Doray B, Turgeon J, Brousseau R. Comparison of PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas in perinatal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17(4):255-63. PubMed

17. Gadoura R, Kchaou W, Ammar-keskes L, Chacroun N, Sellemi A, Znazen A, et al. Assessment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma genitalium* in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. J Androl 2008;29(2):198-206. PubMed
18. Niakan M, Forootan SK, Fallah N, Shafiei M, Sedighi MA, Nejad Moghaddam MR, et al. Detection the frequency of *M. Hominis* in infertile men with control group. Scien-Res Shahed Univer 2005;56(12):65-72. [Full Text in Persian]
19. Jamalizadeh S, Mohseni N, Kheirkhah B, Farsinejad A, Habibzadeh V. Isolation and molecular identification of *Mycoplasma hominis* in infertile female and male reproductive system. NephroUrol Mon 2014;6(6):1-6. PubMed
20. Clegg A, Passey M, Yoannes M, Michael A. High rates of genital Mycoplasma infection in the Highlands of Papua New Guinea determined both by culture and by a commercial detection Kit. J Clin Microbiol 1997;35(1):197-200. PubMed
21. Potts JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A. Association of *Ureaplasma urealyticum* with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. J Urol 2000;163(6):1775-8. PubMed
22. Sanocka-Maciejewska D, Ciupinska M, Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. J Reprod Immunol 2005;67(1-2):51-56. PubMed
23. Rose BI, Scott B. Sperm motility, morphology, hyperactivation and ionophore- induced acrosome reactions after overnight incubation with *Mycoplasma*. Fertil Steril 1994;61(2):341-46. PubMed