



Scan online to view this article

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

Siasi Elham <sup>\*1</sup>, Hajari Reihaneh <sup>1</sup>, Sohrabvand Farnaz <sup>2</sup>.

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-antigens 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.

Corresponding author:

Department of Immunology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan , Iran

Email: emi\_biotech2006@yahoo.ca



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 ژن های باکتری الهام سیاسی\*<sup>۱</sup>، ریحانه هاجری<sup>۱</sup>، فرناز سهرابوند<sup>۲</sup>

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

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

### چکیده

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

**مواد و روش ها:** صد نمونه واژینال از زنان نابارور بدون علت مشخص جمع آوری شد. نمونه های مثبت استافیلوکوکوس اورئوس با حداقل سه مقاومت آنتی بیوتیکی، به وسیله PCR بررسی شدند. جهت بررسی تأثیر عفونت بر ناباروری، پس از انکوباسیون نمونه های تازه اسپرم با سویه های دارای یکی از ژن های *sei*، *seg* و یا *Tsst-I*، پارامترهای اسپرم اندازه گیری شد.

**یافته ها:** باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از ۵۲ نمونه جدا شد. پس از انجام تست آنتی بیوگرام، ۱۹ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به سه یا بیش تر آنتی بیوتیک، شناسایی شدند. فراوانی ژن های *sei*، *Tsst-I* و *seg* به ترتیب ۲۶/۳٪، ۲۱/۱٪ و ۱۰/۵٪ بود. در ۱۱ سویه (۵۷/۹٪)، ژن های *sei*، *seg* و یا *Tsst-I* حضور داشتند. هم چنین در ۱۰/۵٪ نمونه ها، هر دو ژن *sei* و *seg* وجود داشت. یک سویه (۵/۳٪) دارای هر سه ژن *sei*، *seg* و *Tsst-I*، توانایی آگلوتیناسیون ۵۰٪ اسپرم های تازه را بدون تغییر قابل ملاحظه ای در حرکت و قابلیت زنده ماندن داشت.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد استافیلوکوکوس اورئوس عامل عفونت واژینال می تواند سبب آسیب به مورفولوژی و تحرک اسپرم شود. در نتیجه، درمان واژینوز باکتریال جهت پیشگیری از ناباروری ها با علل ناشناخته در زوجین نابارور می تواند نقش مؤثری ایفا نماید.

**واژه های کلیدی:** استافیلوکوکوس اورئوس، سوپر آنتی ژن، 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 روش های جلوگیری از بارداری، حاملگی صورت نپذیرد، به این زوج نابارور اطلاق می شود. در حدود ۴۰٪ موارد ناباروری به علت مشکلات و اختلال های مربوط به مردان، ۴۰٪ به علت مشکل های زنان و ۲۰٪ نتیجه مشکل های مربوط به زوجین است (۲۴، ۲۸). ناباروری به علل متفاوتی می تواند به وجود آید که در برخی موارد علت آن نامشخص است. فاکتورهایی که می تواند 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.co

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۳

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 ایمنیون تهدید کننده حیات می‌شوند (۱۶). ایجاد عفونت واژینال توسط دسته‌ای 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 علاوه بر 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) مقاومت به دارو‌ها پیدا می‌کنند. ژن‌های مقاوم 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 مقاوم چند دارو روی یک پلاسمید ایجاد می‌شود (۳۱). بنابراین امروزه پیدایش سویه‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به دارو که در ایجاد واژینیت 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* علاوه بر اثر بر عملکرد اسپرم می‌توانند سبب عفونت‌های مایع سمن شده و در روند اسپرم‌توزن 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

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 واژینیت است (۲۴، ۲۸). واژینیت عبارت است از التهاب واژن که در حدود یک سوم زنان در طول زندگی خود گاهی به‌علائم آن دچار می‌شوند. زنان در هر سنی ممکن است به‌واژینیت 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 علاوه بر 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 واژینیت 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، آندومتریوز و پارگی زودرس غشاء آندومتر را به‌دنبال دارد (۲۹). واژینوزیس باکتریایی علاوه بر گونه‌های لاکتوباسیلوس‌ها توسط کوکسی‌های گرم مثبت و باسیل‌های گرم منفی نظیر گونه‌های *استافیلوکوکوس‌ها* و *استریپتوکوکوس‌ها*، برخی *انتروباکتریاسه‌ها* به‌خصوص *اشریشیاکلی* و برخی از گونه‌های بی‌هوازی نظیر گونه‌های *باکتریوئیدس*، *بیفیدوباکتریوم*، *ویلونلا*، *پیتواستریپتوکوکوس*، *گاردنلا واژینالیس* و *مایکوپلازما 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

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

## روش کار

۱- نمونه گیری- نمونه ها، باکتری های ناحیه سرویکس زنان نابارور با علل ناشناخته بود که در مدت ۶ ماه از فروردین تا شهریور ۱۳۹۶ به کلینیک های خصوصی و مراکز درمانی مراجعه نموده بودند. پس از نمونه گیری، سواب های واژینال در سرم فیزیولوژی استریل و در مواقع لازم در محیط های انتقالی قرار داده شدند و پس از درج شماره و تاریخ به محل آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه گیری از تمامی افراد مورد مطالعه، با کسب اجازه و دریافت رضایت نامه کتبی انجام شد.

۲- جداسازی باکتری- سواب های جمع آوری شده در سرم فیزیولوژی استریل پس از انتقال به آزمایشگاه ابتدا رنگ آمیزی گرم و سپس در محیط های افتراقی کشت داده شدند. نمونه های کوکسی گرم مثبت روی محیط کشت مانیتول سالت آگار (شرکت مرک آلمان) کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. از نمونه های مثبت در مانیتول سالت آگار با انجام ساب کالچر، نمونه های تک کلون /استافیلوکوکوس اورئوس خالص سازی شدند و با استفاده از روش های استاندارد میکروبیولوژی (تست های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، کواگولاز و کشت در محیط های کشت بلاد آگار (شرکت مرک آلمان) و DNase آگار (شرکت مرک آلمان) شناسائی و تأیید کلنی های استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت.

۳- بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک ها- برای بررسی الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی آزمایش آنتی بیوگرام با روش انتشار دیسک برای نمونه های استافیلوکوکوس اورئوس انجام گرفت. به این ترتیب که از سوسپانسیون باکتری برابر با استاندارد ۰/۵ مک فارلند روی محیط کشت مولر هینتون آگار (شرکت مرک آلمان) کشت متراکم انجام گرفت و سپس دیسک های آنتی بیوتیکی روی سطح محیط قرار داده شدند. پس از آن پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد سانتی گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون پلیت ها مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج بررسی هاله عدم رشد باکتری در اطراف دیسک های آنتی بیوتیک ها با استفاده از معیارهای CLSI تفسیر شدند. دیسک های آنتی بیوتیکی استفاده شده

در این تحقیق ونکومایسین، پنی سیلین، جنتامایسین، آمپی سیلین، اریترومایسین، سفازولین و استرپتومایسین بودند.

## ۴- استخراج DNA از باکتری مقاوم- نمونه های

استافیلوکوکوس اورئوس های مقاوم به سه آنتی بیوتیک و بیش تر دوباره در محیط مایع Brain Heart Infusion (BHI) (شرکت مرک آلمان) کشت داده شدند و DNA آن ها با استفاده از روش فنل- کلروفورم استخراج شد. DNA نمونه های مقاوم پس از تعیین غلظت در ۲۶۰ نانومتر، برای بررسی حضور ژن های سوپر آنتی ژنی مورد استفاده قرار گرفتند.

۵- انجام PCR برای تکثیر ژن های سوپر آنتی ژنی- برای بررسی حضور سوپر آنتی ژن ها، ژن های *sei*، *seg* و *Tsst-1* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی با واکنش PCR تکثیر شدند. مشخصه های پرایمرها و مواد مورد استفاده و برنامه دستگاه PCR به ترتیب در جدول های ۱ و ۲ و ۳ آورده شده است.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی پرایمرها برای تکثیر ژن *sei*، *seg* و *Tsst-1*

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

جدول ۲- مواد مورد نیاز برای واکنش PCR

حجم مواد	مواد مورد استفاده در واکنش PCR
۱۷ میکرولیتر	آب
۲/۵ میکرولیتر	بافر PCR
۱ 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)
۰/۵ میکرولیتر	آنزیم Taq پلیمرز
۲۵ میکرولیتر	حجم نهایی

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

نام ژن	واسرشت اولیه	واسرشت	اتصال	طول شدن	طول شدن نهایی	تعداد چرخه	طول محصول PCR
<i>seg</i>	۹۵ °C	۹۵ °C	۵۲ °C	۷۲ °C	۷۲ °C		۴۰۰ bp
<i>sei</i>	به مدت ۵ دقیقه	۳۰ ثانیه	به مدت ۳۰	به مدت ۵۰	به مدت ۵	۲۷	۲۵۰ bp
<i>Tsst-1</i>			ثانیه	ثانیه	دقیقه		۲۵۰ bp

جدول ۴- کلاس بندی درجات تحرک اسپرم

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

**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 به مدت 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* منفی است برای کنترل منفی ژن استفاده شد (یک نمونه). برای بررسی اثر سینرژیسیم 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  $4 \times 10^6$  /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)، آگلوتیناسیون (agglutination) و زنده ماندن (viability) با درشت‌نمایی ۱۰۰ مشاهده شد.**

**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 IX در ۱۰۰ ولت، الکتروفورز گردید و از حضور ژنوم و صحت استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز اطمینان حاصل شد. برای الکتروفورز از مارکر مولکولی ۲۵۰ bp، 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 *sei*، *seg* 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 به مدت 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

جدول ۵- حساسیت و مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس های جدا شده از

سواب واژینال به آنتی بیوتیک های مختلف

آنتی بیوتیک	علامت اختصاری	غلظت دیسک میکرو گرم ( $\mu\text{g}$ )	قطر هاله حساس میلی متر (mm)	قطر هاله نیمه حساس میلی متر (mm)	مقاوم میلی متر (mm)
Vancomycin	V	۳۰	۴۴	-	۸
Penicillin	P	۱۰	۹	-	۴۳
Gentamicin	GM	۱۰	۵۰	-	۲
Erythromycin	AM	۱۰	۳۳	۴	۱۵
Ampicillin	E	۱۰	۱۳	-	۳۹
Cefazolin	CZ	۳۰	۶	۴۶	-
Streptomycin	S	۳۰۰	۲	۴۳	۷

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

جدول ۶- پروفایل ژنوتایپیک سویه های استافیلوکوکوس اورئوس جدا شده از زنان نابارور

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

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

آزمایش ها به صورت 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 نرم افزار SPSS16 انجام شد. آنالیزهای آماری شامل two-tailed chi square test, fisher's exact test بود. در آنالیز داده ها مقادیر ( $P < 0.05$ ) معنادار در نظر گرفته شد.

## نتایج

۱- جداسازی و شناسایی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس از نمونه ها- از ۱۰۰ نمونه بالینی جدا شده از زنان نابارور مشکوک به واژینوز باکتریال، ۵۲ نمونه با روش های کشت و تست های بیوشیمیایی، استافیلوکوک اورئوس تشخیص داده شد.

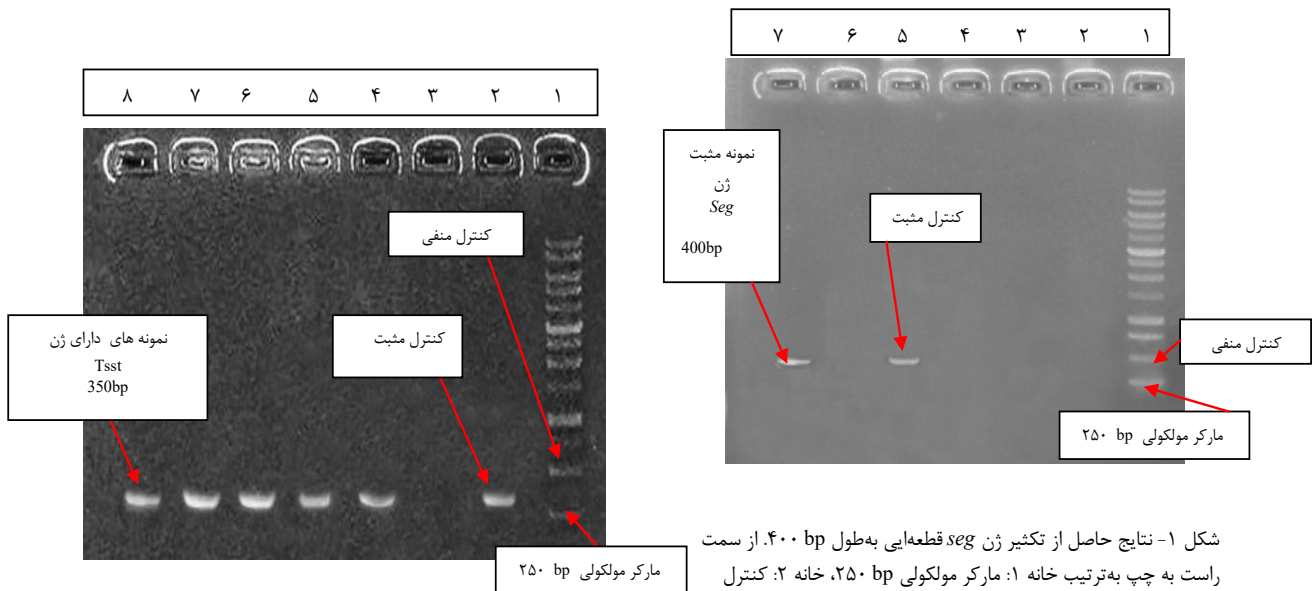
۱-۱- نتایج رنگ آمیزی گرم- با رنگ آمیزی گرم و استفاده از درشت نمایی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری کوکسی های گرم مثبت بنفش رنگ مشاهده شد.

۱-۲- نتایج کشت تشخیصی باکتریایی در محیط های افتراقی - نتایج تست های بیوشیمیایی جداسازی استافیلوکوکوس اورئوس از سایر باکتری ها به خصوص کوکسی های گرم مثبت را تأیید نمود.

۲- نتایج سنجش حساسیت به آنتی بیوتیک ها به روش انتشار از دیسک- نتایج تست آنتی بیوگرام روی ۵۲ نمونه استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد ۱۹ نمونه به سه آنتی بیوتیک و یا بیش تر مقاومت دارویی داشتند. با توجه به جدول CLSI نتایج آزمون آنتی بیوگرام در جدول ۵ آمده است. بالاترین مقام آنتی بیوتیکی به پنی سیلین و کم ترین مقام دارویی به جنتامایسین دیده شد و بالاترین حساسیت دارویی به جنتامایسین و کم ترین حساسیت دارویی به استرپتومایسین به دست آمد. یک نمونه کوگولاز مثبت حساس به تمام آنتی بیوتیک ها دیده شد. حداکثر مقاومت به پنج آنتی بیوتیک و حداقل به دو آنتی بیوتیک (آمپی سیلین و پنی سیلین) دیده شد. ۱۹ نمونه به سه آنتی بیوتیک و بیش تر مقام نشان دادند که در تمام آن ها مقاومت به آمپی سیلین و پنی سیلین دیده شد. بعد از جنتامایسین کم ترین مقاومت دارویی نسبت به وانکومایسین مشاهده شد.



A



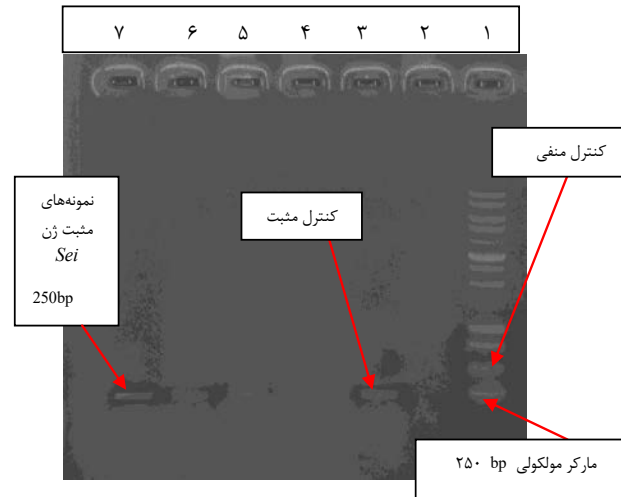
شکل ۳- نتایج حاصل از تکثیر ژن *Tsst-1* قطعهای به طول bp ۳۵۰ از سمت راست به چپ به ترتیب خانه ۱: مارکر مولکولی bp ۲۵۰، خانه ۲: نمونه کنترل مثبت، خانه ۳: نمونه کنترل منفی، خانه‌های ۴ تا ۸: نمونه‌های دارای ژن *Tsst-1* با طول bp ۳۵۰.

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

**۵- نتایج آنالیز فاکتورهای اسپرم- نتایج حاصل از آنالیز اسپرم و نمونه‌های کشت باکتریال که شامل سنجش تحرک، قابلیت حیات و آگلوتیناسیون 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	تکرار
اسپرم - BHI	۴۸/۹۳±۱۹/۵۴	۱۱/۰۳±۲/۸۷	۴۳/۸۹±۱۶/۳۱	۶۷/۳۴±۱۱/۵۴	منفی
اسپرم + باکتری استافیلوکوکوس کواگولاز منفی	۴۳/۱±۱۰/۳	۱۱/۸۹±۳/۳۲	۵۰/۰۸±۱۵/۶	۶۰±۱۰/۷۷	منفی
اسپرم + باکتری استافیلوکوکوس اورئوس منفی برای ژن‌های <i>SEG/SEI/TSST1</i>	۴۲/۶۶±۱۱/۳۱	۱۲/۶۷±۲/۹	۴۷/۶۵±۱۰/۸۷	۶۱/۹۲±۱۲/۴۵	منفی
اسپرم + باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مثبت <i>SEI</i>	۴۵/۶۵±۱۶/۸۷	۱۲/۰۵±۱/۸	۴۹/۴۴±۱۲/۵۴	۵۸/۶±۹/۴۳	منفی



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

اسپرم + باکتری استافیلوکوکوس اورئوس مثبت TSS/SEI	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 استافیلوکوکوس اورئوس مثبت SEG/SEI/TSS/SEI	۴۵/۸۱±۱۶/۳۴	۱۲/۴۳±۱/۹	۴۴/۵۴±۱۰/۹۸	۵۹/۶۵±۴/۳	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 به هم 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 می‌تواند در ناباروری زوجین مطرح باشند (۴، ۱۲). حضور باکتری‌هایی هم‌چون استافیلوکوکوس اورئوس، مایکوپلاسما هومینیس، کلامیدیا تراکوماتیس و اشریشیاکلی در آزمایشگاه مانع عملکرد اسپرم می‌شود و می‌توانند در عفونت‌های مایع سمن نیز دخالت داشته باشند (۵). براساس تحقیقات انجام شده، حضور باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به‌عنوان باکتری غالب در ۳۸/۷٪ از سوآپ‌های واژینال خانم‌ها و ۷۵٪ از کشت میکروبی مایع سمن آقایان در نمونه‌های حاصل از زوج‌های 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 باشد. بنابراین تحقیق حاضر به بررسی ارتباط عفونت واژینوز در زنان نابارور و تأثیر آن بر روی پارامترهای حیاتی اسپرم نرمل

پرداخته است. در این مطالعه، از بین ۱۰۰ نمونه سوآپ 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 مقاومت آنتی‌بیوتیکی نشان دادند. پس از انجام واکنش PCR برای بررسی حضور ژن‌های سوپر آنتی‌ژنی در سویه‌های مقاوم، از ۱۹ نمونه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی، ۱۱ نمونه (۵۷/۹٪) حداقل یکی از ژن‌های انترتوکسین *sei/seg* و یا *TsstI* را دارا بودند. پس از مجاورت این ۱۱ نمونه با نمونه اسپرم نرمل و بررسی تغییرهای فاکتورهای حرکت، قابلیت حیات و اگلوتیناسیون اسپرم، تنها یک نمونه که واجد هر سه ژن *TsstI+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 واژینوز باکتریال و مقایسه آن‌ها با مطالعه حاضر می‌توان به موارد زیر اشاره نمود.

Ranjit و همکارانش در تحقیقی که بر روی عوامل ایجاد کننده واژینوزیس و تأثیر آن بر ناباروری زنان انجام دادند مشخص نمودند عوامل اصلی در ایجاد واژینیت باکتری‌های سودوموناس، اشریشیاکلی، اسینتوباکتر، پروتئوس، کلبسیلا، نایسریا گونوروا، 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 مطالعه‌ای که Prabha و همکارانش روی نمونه‌های واژینال زنان نابارور بدون علت بالینی انجام دادند مشخص شده است استافیلوکوکوس اورئوس شایع‌ترین میکرو ارگانیسم بوده و اشریشیاکلی، 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



جدا می‌شوند (۱۰). در ایران به علت 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 به صورت 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 الیزا نمی‌توان جدا کرد. این در حالی است که 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 انترتوکسین‌های *sei* و *seg* به طور انحصاری از سویه‌های ژنیتال جدا می‌شوند. سطح آنتی‌بادی‌های سرم این دو ژن در زنان سالم بالاتر از مردان سالم است و به نظر می‌رسد، میزان تیتراژ آنتی‌بادی Igg فاکتور مستقلی از حضور *sei/seg* در زنان دارای واژینوز باکتریال با *استافیلوکوکوس اورئوس* است. به نظر می‌رسد حضور ژن‌های *sei/seg* به عنوان 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 مراجعه به 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 به نظر 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 باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در مردان نابارور انجام داده‌اند مشخص شده است که عفونت باکتریالی به عنوان عامل با اهمیتی در ناباروری مردان محسوب می‌شود و در مطالعه آنان

*استافیلوکوکوس اورئوس* نبود، ولی از آنجائی که ۵۲ درصد سویه‌های جدا شده آن‌ها *استافیلوکوکوس اورئوس* بودند (۲۵)، با مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت و از نظر کاهش حرکت اسپرم و آگلوتیناسیون 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 به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از باکتری‌های گرم منفی بوده‌اند. به طوری که *استافیلوکوکوس اورئوس* بالاترین شیوع را در بین باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت واژینال داشته (۵۷/۳۳ درصد) و اشریشیاکلی 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 رضانی 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 رضانی و همکاران در استفاده از علائم 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 آنتی-ژن‌ها، 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

حضور باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به عنوان باکتری غالب در کشت میکروبی مایع سمن مردان نابارور گزارش شده است که می تواند 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 مطالعه ای را انجام دادند. نتایج آنان مشخص نمود که در ۵۲٪ از نمونه های مردان اولیگو اسپرم و ۱۵٪ از نمونه های مردان ازواسپرم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* وجود دارد و پس از ۳ تا ۴ هفته درمان با آنتی بیوتیک آنالیز نمونه های سمن این بیماران روند بسیار معنی داری را در بهبود کیفیت و کمیت و مورفولوژی نمونه های اسپرم آنان مشخص نمود (۲۳). Kaur و Prabha در مطالعه ای که روی عفونت باکتریال دستگاه ادراری- تناسلی مردان انجام داده بودند گزارش نمودند چنانچه تعداد اشرشیاکلی از  $10^8$  عدد در مایع سمن تجاوز کند باعث تخریب پارامترهای اسپرم می شود این نتایج حاکی از آن است که بار میکروبی واژن و مایع سمن در نتایج فاکتورهای اسپرم تأثیرگذار است و احتمال آن می رود در عفونت های سنگین بر باروری فرد نیز اثرگذار باشد (۱۴). خلیلی و همکارانش مردان نابارور با علت نامشخص را مورد بررسی قرار دادند، بیشترین شیوع با ۱۶/۹ درصد مربوط به *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین شیوع مربوط به *سودوموناس* و *انتروکوک* با ۱/۵ درصد بود. آنالیز پارامترهای حجم، تعداد، حرکت، مورفولوژی و قابلیت حیات در نمونه اسپرم مردان آلوده به عفونت میکروبی و بدون آلودگی اختلاف آماری معنی داری نداشت (۱۵). با وجودی که مطالعه حاضر در شرایط *in vitro* انجام گرفته است، نتایج آن با مطالعه خلیلی و همکارانش هم- راستا بود. هم چنین تحقیقات نشان داده است مواد مختلفی می توانند حرکت اسپرم را متوقف و یا کند کنند. در این میان میکروارگانیسم ها می توانند حرکت اسپرم را به طور مستقیم از طریق آگلوتیناسیون و یا به صورت غیر مستقیم از طریق ترشحات خارج سلولی تحت تأثیر قرار داده و حرکت آن را متوقف کنند. نقش میکرو ارگانیسم هایی مختلفی مانند *اشرشیاکلی*، *باسیلوس سوبتی لیس*، *مایکوپلاسما*، *سودوموناس اثرژیوزا*، *کاندیدا آلبیکانس*، *میکسوپروس* و *گونوکوک* ها در آگلوتیناسیون اسپرم گزارش شده است (۱۳). Ohri و همکارانش از بین ده نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از ناحیه سرویک زنان تنها در یک نمونه توانستند فاکتور آگلوتینه 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. تست های *in vitro* در بررسی اثرهای بازدارندگی قندهای مختلف نشان داد هیچ اثری روی مهار آگلوتیناسیون اسپرم ندارند. آن ها توانستند پروتئین SAF را به کمک سونیکاسیون باکتری و کروماتوگرافی تعویض یونی جدا کنند. آنها هم چنین پیشنهاد کردند از آنجایی که پروتئین SAF می تواند سبب آگلوتیناسیون ۱۰۰ درصد اسپرم های متحرک شود، به نظر می رسد می تواند فعالیت ضد باروری داشته باشد (۲۱). بررسی های بیش تر نشان داد پروتئین SAF هیچ یک از خصوصیت های 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 می شود (۱۴). نتایج تحقیقات Kaur و Prabha روی موش های بلب سی نشان داد اگر ناحیه ژنیتال موش های ماده با سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* که توانایی آگلوتینه کردن و بی حرکت کردن اسپرم را داشته باشد، آلوده شوند می توانند ۱۰۰٪ در روی باروری موش ها در مقایسه با گروه کنترل اثرگذار باشد (۱۳). بر اساس نتایج کسب شده در تحقیق ما هم بعضی از سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* می توانند حرکت اسپرم را کم تر کرده و در بعضی موارد باعث آگلوتیناسیون آن شود و در این راستا چگونگی ارتباط ژن های اندوتوکسین با آگلوتیناسیون اسپرم نیازمند تحقیقات بیش تر است. هم چنین لزوم بررسی روی بیان ژن های سوپر آنتی ژن ها 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. اسپرم ها در ناحیه سرویکس ذخیره شده و به طور مداوم به قسمت فوقانی رحم منتشر می شوند. بنابراین اختلالات سرویکس و ترشحات آن می تواند به عنوان یک فاکتور مهم در ناباروری های بدون علت بالینی مطرح باشد.

### نتیجه گیری

نتایج این تحقیق و سایر مطالعات در این زمینه نشان داد سوپر آنتی ژن های *استافیلوکوکوس اورئوس* های مقاوم به دارو به عنوان باکتری شایع در واژنیت زنان مطرح است و با تأثیری که بر دستگاه تناسلی و سلول جنسی بانوان و آقایان دارد می تواند به عنوان عاملی برای ناباروری مطرح باشد و لذا می بایست نسبت به درمان آن توجه بیش تری معطوف گردد.

## سپاسگزاری

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



- 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 M, 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 Health*. 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. *PIOS 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 human spermatozoa. *Iran J Pub Health*. 2001; 30(3-4): 119-22.
- 16-Kheirikhah 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 *Staphylococcus aureus*. *The Lancet* . 2001; 357(9264): 1225-1240.

- 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-Sekhona 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.

