

ارزیابی مالون دی آلدئید به عنوان شاخصی برای آلودگی باکتریایی سیمن مردان

معصومه ملک شاهی^۱، سید محمد حسین رضویان^{۲*}، سید سهیل آقایی^۲

مقاله پژوهشی

مقدمه: حدود ۱۵٪ از زوجین نابارورند که ۶۰٪ مربوط به فاکتورهای مردانه است و سهم ناباروری به علت عفونت مجاری تناسلی ۲۰٪ است. در باکتریواسپریمی حضور باکتری و جلب لکوسیت ها تولید اشکال فعال اکسیژن و آسیب به سلول های اسپرم می نماید. در تحقیق حاضر تعیین نوع و فراوانی باکتری های دخیل در آلودگی مجاری تناسلی، تعیین میزان مالون دی آلدئید (MDA) در اسپرم و پلاسمای سیمن به عنوان شاخص میزان آسیب اکسیدان و رابطه آن با آلودگی میکروبی و نهایتاً تاثیر استرس اکسیداتیو و آلودگی میکروبی بر کیفیت نمونه سیمن در مردان نابارور ارزیابی شد.

روش بررسی: مطالعه مقطعی روی ۵۳ بیمار مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم انجام شد. پس از نمونه گیری، پارامترهای سیمن بر اساس روش WHO, 1999 و آلودگی باکتریایی به کمک کشت و تست های افتراقی و هم چنین غلظت MDA با روش فلوریمتری در اسپرم و پلاسمای سیمن تعیین و نتایج به کمک تست های ANOVA و تست T با نرم افزار spss16 آنالیز شدند.

نتایج: بر اساس نتایج حاصل ۹۲٪ از مردان آلودگی باکتریایی شامل استافیلوکوس اورئوس (۶۵٪)، استافیلوکوس اپیدرمیدیس (۲۴/۵٪)، پروتئوس میرابیلیس (۲/۴٪)، کلبسیلا (۴/۸٪) و انتروکوک (۴/۸٪) داشتند. باکتریواسپریمی نه تنها موجب افزایش معنی دار ($p < 0/01$) غلظت MDA در سلول و پلاسمای سیمن شد بلکه بر شاخص های کیفیت سیمن به خصوص تحرک اسپرم ($p < 0/01$) اثر داشت.

نتیجه گیری: عفونت باکتریایی کیفیت نمونه سیمن را کاهش و موفقیت روش های کمک باروری را تهدید می نماید. اندازه گیری MDA می تواند به عنوان شاخصی برای ارزیابی آلودگی باکتریایی در مردان نابارور استفاده شود.

واژه های کلیدی: ناباروری، باکتریواسپریمی، اشکال فعال اکسیژن، مالون دی آلدئید

ارجاع: رضویان سید محمد حسین، ملک شاهی معصومه، آقایی سید سهیل. ارزیابی مالون دی آلدئید به عنوان شاخصی برای آلودگی باکتریایی سیمن مردان، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۷؛ ۲۶ (۵): ۳۸-۴۲۶.

۱_ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران

۲_۳_ استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۲۲۵۱۰۰۲۳، پست الکترونیکی Razavian@qom-iau.ac.ir، کد پستی: ۳۷۱۵۶۶۳۷۱۹

تخریب غدد ضمیمه ای می تواند موجب ناباروری شود (۶). برخی نظیر نایسریا گونوره، آکلای و کلامیدیا تراکوماتیس موجب اتصال و تجمع اسپرم ها شده و از تحرک آن ها جلوگیری می کنند (۷). برخی باکتری ها با آسیب به سد غشائی بین بیضه و خون موجب عرضه آنتی بادی های ضد اسپرم شده و یا با آسیب به غدد ضمیمه ای موجب تغییر ترکیبات پلاسمای سیمین می شوند (۸). جنس های مختلف باکتریایی در التهاب پروستات و اپیدیدیم نقش داشته و فرآیند باروری را مختل نمایند (۹،۱۰).

از طرفی باکتری ها با تولید اشکال فعال اکسیژن موجب القاء استرس اکسیداتیو و تخریب اسپرم می شوند (۸). ناباروری رابطه تنگاتنگی با استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش غلظت اشکال فعال اکسیژن دارد (۱۵-۱۱) به طوری که غلظت بالای اشکال فعال اکسیژن ویژگی مشترک نمونه سیمین تقریباً نیمی از مردان نابارور است (۱۹-۱۶).

غشای اسپرم حاوی مقادیر زیادی اسیدهای چرب غیراشباع است که حساسیت و آسیب پذیری این سلول ها را در برابر استرس اکسیداتیو تشدید می کنند. امروزه نقش اسیدهای چرب غیر اشباع نه تنها در سیالت و استحکام غشا اسپرم بلکه در فرایند رونویسی و بیان ژن به اثبات رسیده است. میزان سیتوپلاسم اندک و در نتیجه غلظت بسیار ناچیز آنتی اکسیدان ها و توزیع نامتقارن سیتوپلاسم به علت شکل خاص اسپرم بالغ، این سلول ها را بیش از هر سلول دیگری مستعد بروز استرس اکسیداتیو می نماید و به ناچار بخشی از دفاع آنتی اکسیدانی اسپرم مدیون پلاسمایی ست که آن را احاطه کرده است (۸). اشکال فعال اکسیژن نقشی دو گانه در ناباروری دارند: از یک سو موجب اختلال در عملکرد فرآیندهای بیولوژیک نظیر واکنش آکروزوم و لقاح و تحرک و تکامل اسپرم شده و از طرف دیگر موجب آسیب به ترکیبات بیوشیمیایی سازنده اسپرم و القاء شکستگی در رشته های DNA می شوند (۲۱، ۲۰، ۴).

عفونت دستگاه ادراری- تناسلی باعث القای استرس اکسیداتیو در مایع سیمین می شود. در باکتریواسپرمی از یک

مایع سیمین با حجم حدود یک و نیم میلی لیتر در هر انزال به طور طبیعی از سلول های اسپرم و مجموعه موادی که لوله های واژودفران، وزیکول های سمینال، پروستات و غدد موکوسی ترشح می کنند تشکیل و بخش اصلی (حدود ۶۰٪) آن را پلاسمای سیمین تشکیل می دهد (۱). بیضه ها به عنوان گندهای مردانه سلول های اسپرم را ساخته و هورمون تستوسترون را ترشح می کنند. در نمونه سیمین نرمال حداقل نیمی از اسپرم ها شکل طبیعی دارند (۲). با آن که تنها یک اسپرم برای بارورسازی تخمک کافی است ولی در حالت طبیعی شمارش اسپرم در هر میلی لیتر سیمین حدود ۲۰ میلیون اسپرم است (۳). هم چنین تحرک مناسب اسپرم برای حرکت به سمت تخمک ضروری است و تحرک کم اسپرم شایع ترین علت ناباروری مردان است (۴). بنابراین چهار پارامتر حجم نمونه، شمارش، شکل و تحرک اسپرم شاخص های اصلی ارزیابی کیفیت نمونه سیمین را تشکیل می دهند.

ناباروری اولیه به معنای "عدم توانایی باروری طی یک دوره یک ساله مقاربت بدون محافظت" مشکلی جهانی است که حدود ۱۵٪ از کل زوجین را درگیر می کند (۵). تقریباً ۶۰٪ از موارد ناباروری مربوط به ناهنجاری و مشکلات مرد بوده و فاکتور مردانه ناباروری نامیده می شود. عوامل ناباروری مردان را به علل محیطی، ژنتیکی و عفونی تقسیم می کنند. عفونت های میکروبی مختلف شامل باکتری ها، ویروس ها، انگل ها و قارچ ها قادر به تداخل در فرآیند باروری هستند. محل عفونت می تواند بیضه ها، لوله های اپیدیدیم، مجاری تناسلی و حتی مجاری ادراری باشد. سازمان جهانی بهداشت (۱) معیار اطلاق عفونت مجاری تناسلی را آلودگی قابل توجه باکتریایی یا وجود نایسریا گونوره، آ، کلامیدیا تراکوماتیس، اوره آلیتیکوم یا مشاهده لکوسیت های زیاد (لکوسیتواسپرمیا) در سیمین اعلام کرده است. باکتری از راه های مختلف هم چون اختلال در روند اسپرماتوژنز، تخریب مجاری تناسلی، تولید عوامل اکسیدان و آسیب به بیوملکول های اسپرم، آگلوتینه کردن و چسباندن اسپرم ها و

کشت و تست های میکروبی: اگرچه روش های حساس و اختصاصی نظیر روش های مبتنی بر آنتی بادی و PCR برای تشخیص باکتری های هوازی وجود دارند ولی همچنان کشت سیمن رایج ترین روش برای شناسایی عفونت های دستگاه تناسلی است. در این مطالعه بررسی آلودگی نمونه ها به استافیلوکوس اورئوس و استافیلوکوس اپیدرمیدیس و پروتئوس میرابیلیس و اکلاوی و کلبسیلا و انتروکوک به کمک کشت و تست های افتراقی مورد بررسی قرار گرفت. کشت انبوه طی مدت یک ساعت پس از جمع آوری نمونه ها در محیط های اتوزین متیلن بلو و بلاد آگار انجام و برای ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس از کلونی های حاصل کشت خطی در محیط BHI برای ۲۴ ساعت صورت گرفت. نهایتاً رنگ آمیزی گرم و تست های تشخیصی شامل تست کاتالاز و اکسیداز و کوآگولاز و ایندول و متیل رد و سترات و IMVIC انجام شد.

اندازه گیری غلظت مالون دی آلدیید

غلظت مالون دی آلدیید به طور جداگانه در سلول های اسپرم و مایع پلاسمای سیمن آزمودنی ها از طریق واکنش با تیوباربتوریک اسید و اندازه گیری غلظت ماده فلورسنت حاصل با طیف سنجی فلورسانس طبق روش Yagi, 1997 و به کمک سیستم اسپکتروفلوریمتر (FP-6200) Jasco تعیین شد. به عنوان استاندارد از غلظت های مختلف تترا اتوکسی پروپان و برای تحریک از طول موج ۵۳۲ نانومتر استفاده و پرتوهای ساطع شده در طول موج ۵۴۳ نانومتر قرائت شدند. نتایج به صورت غلظت مالون دی آلدیید در هر ۱۰ میلیون سلول و در هر میلی لیتر پلازما گزارش شد.

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج به وسیله نرم افزار SPSS۱۶ و به کمک تستهای ANOVA و T-test با سطح معنی دار $p < 0.05$ مورد تحلیل آماری قرار گرفتند.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم تایید شده است. (IR.IAU.QOM.REC.1396.54).

سو متابولیسم باکتری ها و از سوی دیگر جلب لکوسیت ها به مجرای تناسلی و محل عفونت تولید اشکال فعال اکسیژن و به نوبه خود استرس اکسیداتیو را به دنبال دارد. ماکروفاژها و گرانولوسیت ها پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال های آزاد اکسیژن تولید می کنند که برای اسپرم ها بسیار سمی اند (۲۲). مالون دی آلدیید ترکیبی سمی و یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدهای غیراشباع در اسپرم و پلاسمای سیمن و رایج ترین شاخص برای ارزیابی پراکسیداسیون چربیهاست (۲۳، ۲۲). میزان مالون دی آلدیید به عنوان شاخص استرس اکسیداتیو در سیمن مردان نا بارور بالاتر و سطح آنتی اکسیدان ها در حد قابل توجهی پایین تر از مردان بارور است (۲۷-۲۴). در تحقیق حاضر، تعیین نوع و درصد باکتری های دخیل در آلودگی مجاری تناسلی، تعیین میزان مالون دی آلدیید در اسپرم و پلاسمای سیمن به عنوان شاخص میزان آسیب اکسیدان و رابطه آن با آلودگی میکروبی و همچنین تاثیر استرس اکسیداتیو و آلودگی میکروبی بر کیفیت نمونه سیمن در مردان مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی قم مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

جمع آوری سیمن: در این مطالعه مقطعی تعداد ۵۳ مرد به طور تصادفی از بین مراجعه کنندگان شیفت صبح مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم در ماه های خرداد و تیر سال ۱۳۹۶ انتخاب و اطلاعات دموگرافیک آن ها دریافت شد. سپس نمونه سیمن از طریق ماسچوربیشن با تاکید بر حداقل سه روز پرهیز از رابطه جنسی، جمع آوری و در دمای ۳۷ درجه به آزمایشگاه منتقل شد.

پس از مایع شدن نمونه قسمتی از آن جهت آنالیز سیمن و کشت و تست های میکروبی جداسازی شد. الباقی برای ۱۰ دقیقه در ۷۰۰g سانتیفریوژ و پلاسمای سیمن با دقت از رسوب سلولی تفکیک و هر دو جزء تا زمان اندازه گیری غلظت مالون دی آلدیید در فریزر ۸۰- درجه ذخیره شدند.

آنالیز سیمن: پارامترهای مختلف شاخص کیفیت سیمن شامل حجم و شمارش و شکل و تحرک سلولی بر اساس دستورالعمل سازمان جهانی بهداشت (۱) تعیین و گزارش شد.

نتایج

شده است. بر اساس نتایج حاصل، آلودگی میکروبی تاثیر معنی داری بر تمامی پارامترهای شاخص کیفیت سیمان به خصوص تحرک اسپرم ها (با سطح معنی داری ۰/۰۰۱) داشته و موجب تقلیل آنها شده است. در جدول ۳ مشاهده می شود که بیشترین تاثیر آلودگی میکروبی بر تحرک اسپرم ها و کمترین اثر بر شمارش سلولی نمونه بوده است. در این راستا تاثیر نوع آلودگی به تفکیک نوع میکروب بر هر یک از پارامترهای مختلف شاخص کیفیت سیمان بررسی و در جدول ۳ گزارش شد. نتایج حاصل بیانگر آنست که آلودگی با کلبسیلا بیشترین کاهش کیفیت سیمان به ویژه در کاهش تعداد اسپرم های با شکل طبیعی را به دنبال داشته است. به منظور اندازه گیری غلظت مالون دی آلدید با روش فلوری متری طول موج های ماکزیمم جذب و تابش، کمپلکس حاصل در طیف سنجی فلورسانس مورد ارزیابی قرار گرفت که نمودار حاصل در شکل ۱ ارائه شده است. بر این اساس طول موج های ۵۳۲ و ۵۴۳ نانومتر به ترتیب برای تحریک و قرائت تابش انتخاب شدند.

در این مطالعه به طور تصادفی از بین مردان مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم که حداقل شش ماه سابقه مصرف آنتی بیوتیک نداشتند تعداد ۵۳ مرد انتخاب شدند. میانگین ویژگی های دموگرافیک مردان مورد مطالعه در جدول (۱) ارائه شده است. از این میان بر اساس نتایج آنالیز میکروبی نمونه ۴۹ نفر معادل ۹۲/۵٪ دارای انواع آلودگی باکتریایی و الباقی فاقد عفونت بودند. بر اساس نتایج حاصل، از بین ۴۹ نمونه آلوده سیمان مردان، نمونه ۳۲ نفر معادل ۶۵/۳٪ به استافیلوکوکس اورئوس و ۱۲ نفر معادل ۲۴/۵٪ به استافیلوکوکس اپیدرمیدیس و ۲ نفر معادل ۴/۱٪ به کلبسیلا و ۲ نفر معادل ۴/۱٪ به انتروکوک و ۱ نفر معادل ۲٪ به پروتئوس میرابیلیس آلوده بودند. جالب توجه آن که به رغم تایید کارکرد محیط ائوزین متیلن بلو آگار با سویه استاندارد اشرشیا کلی، در هیچ یک از نمونه های آلوده اکتی یافت نشد. اسپرمیوگرام مردان دو گروه استریل و آلوده بر اساس دستورالعمل ۱۹۹۹، WHO بررسی و نتایج در به صورت مقادیر حداقل و حداکثر و میانگین در جدول ۲ ارائه

جدول ۱: مشخصات دموگرافیک مردان مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم در ماههای خرداد و تیر سال ۱۳۹۶

تعداد (نفر)	درصد (%)	میانگین سن (سال)	میانگین قد (Cm)	میانگین وزن (Kg)	متوسط مدت ناباروری (سال)
۴۹	۹۲/۵	۳۳±۴	۱۸۱±۱۲	۷۴±۷	۳/۱±۰/۷
۴	۷/۵	۳۴±۳	۱۷۶±۱۵	۷۸±۹	۲/۵±۰/۳

جدول ۲: نتایج حاصل از آنالیز پارامترهای مختلف نمونه سیمان (اسپرمیوگرام) مردان مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم در ماههای خرداد و تیر ۱۳۹۶

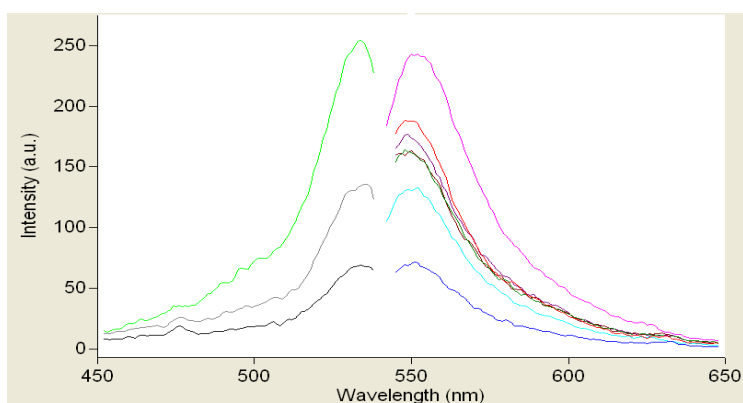
پارامتر	تعداد	حجم سیمان			تعداد اسپرم			تحرک اسپرم			مورفولوژی طبیعی اسپرم		
		حداکثر	میانگین	حداقل	حداکثر	میانگین	حداقل	حداکثر	میانگین	حداکثر	میانگین	حداکثر	حداقل
نمونه های دارای آلودگی میکروبی	۴۹	۰/۵	۱/۵	۰/۹۷±۰/۲	۵	۱۳۰	۷۳±۹	۵	۶۰	۹/۵۳±۴	۲	۱۰	۳/۹۱±۱/۱
نمونه های فاقد آلودگی میکروبی	۴	۱	۱/۵	۱/۴۵±۰/۱	۱۱۰	۱۵۰	۱۲۵±۷	۵۵	۶۵	۶۰±۱۲	۴	۱۰	۶/۵±۰/۸
درصد تغییر	---	---	۳۳/۱	---	---	۴۱/۶	---	۸۴/۱	---	---	---	---	۴۰
P value	---	---	۰/۱	---	---	۰/۰۵	---	۰/۰۰۱	---	---	---	---	۰/۰۵

مورفولوژی طبیعی اسپرم (درصد) و تحرک اسپرم (درصد) و تعداد اسپرم ($10^6/ml$) و حجم سیمان (ml) نتایج به وسیله نرم افزار SPSS ۱۶ و به کمک تستهای Anova و T-test با سطح معنی داری $p < 0/05$ مورد تحلیل آماری قرار گرفته اند.

جدول ۳: تاثیر آلودگی میکروبی بر پارامترهای مختلف سیمن مردان مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم در ماههای خرداد و تیر ۹۶

نوع آلودگی میکروبی	تعداد مشاهده	تعداد اسپرم			٪ تغییر	تحرک اسپرم			٪ تغییر	مورفولوژی طبیعی اسپرم			٪ تغییر
		حداقل	حداکثر	میانگین		حداقل	حداکثر	میانگین		حداقل	حداکثر	میانگین	
استافیلوکوس اورئوس	۳۲	۵۰	۱۳۰	۷۰/۴±	۱	۷۰	۵۵/۵±	-۴۳/۷	۱	۱۰	۳/۵۳±	-۴۵/۷	
استافیلوکوس اپیدرمیدیس	۱۲	۲۰	۱۳۰	۷۸/۹±	۱۵	۸۰	۵۲/۲۷±	-۳۶/۹	۱	۱۰	۴/۵±	-۳۰/۸	
پروتئوس میرابیلیس	۱		۶۰			۵۰		-۵۲		۸		+۲۳/۱	
کلبسیلا	۲	۳۵	۱۱۰	۷۲/۵	۵۰	۶۰	۵۵	-۴۲	۲	۳	۲/۵	-۶۱/۵۴	
انتروکوک	۲	۱۱۰	۱۲۰	۱۱۰	۶۰	۶۵	۶۲/۵	-۱۲	۵	۸	۶/۵	۰	
فاقد آلودگی	۴	۱۱۰	۱۵۰	۱۲۵±۴/۶	۵۵	۶۵	۶۰±۳		۴	۱۰	۶/۵±۱/۱		

مورفولوژی طبیعی اسپرم (درصد) و تحرک اسپرم (درصد) و تعداد اسپرم ($10^6/mL$)



شکل ۱: نمودار طول موجهای ماکزیمم تحریک (532^{nm}) و تابش (543^{nm}) کمپلکس فلورسنت حاصل از مالون دی آلدیید در طیف سنجی فلورسانس

جدول ۴: غلظت مالون دی آلدیید در پلاسمای سیمن (نانو مول بر میلی لیتر) و سلولهای اسپرم (نانومول در 10^7 سلول) مردان مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم در ماههای خرداد و تیر ۱۳۹۶

نوع نمونه	تعداد نمونه	غلظت مالون دی آلدیید در پلاسمای سیمن			p-Value	٪ تغییر	غلظت مالون دی آلدیید در سلولهای اسپرم			p-Value	٪ تغییر
		حداقل	حداکثر	میانگین			حداقل	حداکثر	میانگین		
دارای آلودگی میکروبی	۴۹	۰/۲	۱۵/۲۵	۵/۴±۱/۱	۰/۱	+۱۰/۷	۰/۱	۰/۹۸	۰/۶۴±۰/۱۲	۰/۲	+۲۷/۶
فاقد آلودگی میکروبی	۴	۰/۵	۳/۴				۰/۷	۰/۸۵		۰/۱۱۷±۰/۱	

نتایج به وسیله نرم افزار SPSS ۱۶ و به کمک تستهای Anova و T-test با سطح معنی داری $p < 0.05$ مورد تحلیل آماری قرار گرفته اند.

جدول ۵: غلظت مالون دی آلدئید در سلول ها (نانومول بر 10^7) و پلاسمای سیمن (نانو مول بر ماکرولیتتر) مردان مراجعه کننده به مرکز درمان ناباروری جهاد دانشگاهی استان قم در ماههای خرداد و تیر ۱۳۹۶ به تفکیک نوع عفونت

نوع آلودگی میکروبی سیمن	تعداد نمونه	غلظت مالون دی آلدئید در سلولهای اسپرم			غلظت مالون دی آلدئید در پلاسمای سیمن		
		حداقل	حداکثر	میانگین	حداقل	حداکثر	میانگین
استافیلوکوس اورئوس	۳۲	۰/۰۱	۰/۷۵	۰/۴۱±۰/۰۸	۰/۳	۱۵/۲۵	۶/۳۴±۲/۱
استافیلوکوس اپیدرمیدیس	۱۲	۰/۰۴	۰/۹۸	۰/۲۵±۰/۱۷	۰/۲	۹/۱۵	۵/۱۷±۰/۸
پروتئوس میرابیلیس	۱		۰/۸۵		۴۰۰	۴/۱	۵۷/۷
کلبسیلا پنومونیا	۲	۰/۴۴	۰/۵۸	۰/۵۱	۲۰۰	۸/۳	۷/۹
انتروکوک	۲	۰/۰۳۲	۰/۳۷	۰/۵۴	۲۱۷	۱۰/۴۲	۱۱/۴۸
استریل	۴	۰/۰۷	۰/۸۵	۰/۱۷±۰/۱	۰/۵	۳/۴	۲/۶±۰/۹

آنتی اکسیدان مختلف هم چون گلوکاتیون پراکسیداز، ویتامینهای C و E، آلومین، کارنیتین و برخی آمینواسیدها مجهزند (۱۷). لیکن حجم سیتوپلاسم اسپرم اندک و طبیعتاً مقادیر آنتی اکسیدان آن بسیار کم است، لذا غلظت های بالای اکسیدان ها و استرس اکسیداتیو می تواند عملکرد اسپرم را دچار اختلال کند. به دنبال عفونت مجاری تناسلی و تجمع لکوسیت ها در سیمن، نه تنها لکوسیت ها تولید اشکال فعال اکسیژن را به عنوان ابزار دفاعی در مقابله با حمله عوامل عفونی استفاده می کنند بلکه سیتوکین ها و سایر واسطه های ایمونولوژیک در پلاسمای سیمن تجمع یافته و عملکرد اسپرم را دچار اختلال می کنند (۸).

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی نوع و میزان شیوع آلودگی باکتریایی در نمونه سیمن مردان مراجعه کننده به مرکز ناباروری در قم، ارزیابی تاثیر آلودگی بر پارامترهای شاخص کیفیت سیمن و ارزیابی میزان القای استرس اکسیداتیو ناشی از حضور باکتری و یا جلب لکوسیت ها به نمونه سیمن صورت گرفت.

براساس نتایج حاصل، از بین شرکت کنندگان در این مطالعه، نمونه سیمن ۴۹ نفر معادل ۹۲٪ آلودگی باکتریایی داشت. فراوانترین آلودگی مربوط به استافیلوکوس اورئوس (۶۵/۳٪) و کمترین آن پروتئوس میرابیلیس (۲٪) بود. مطالعات مشابه توسط خلیلی، ۱۳۸۱ در ایران - یزد و ۲۰۰۹، Emokpae

مقایسه غلظت مالون دی آلدئید در سلول ها و پلاسمای سیمن افراد آلوده و استریل در جدول ۴ نیز حکایت از افزایش معنی دار (به ترتب با سطح معنی داری ۰/۲ و ۰/۱) غلظت شاخص استرس اکسیداتیو در اثر آلودگی میکروبی در افراد آلوده است که به نوبه خود می تواند ناشی از تولید اشکال فعال اکسیژن توسط باکتری و یا گلبول های سفید حاضر در نمونه باشد. در بررسی شدت استرس اکسیداتیو به تفکیک نوع باکتری آلوده کننده در جدول (۵) مشاهده می شود که نمونه های آلوده به آنتروکوک بیشترین مقادیر مالون دی آلدئید را هم درون سلول های اسپرم و هم در پلاسمای سیمن شامل می شوند.

بحث

ناباروری امروزه به مشکلی گسترده در بین زوجهای جوان بدل شده و می تواند بنیاد خانواده را مورد تهدید قرار دهد. طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت عفونت حاد یا مزمن مجاری تناسلی یکی از علل اصلی (۱۰ تا ۲۰٪) ناباروری مردان است. از طرفی استرس اکسیداتیو را عامل بیش از نیمی از ناباروری مردان می دانند (۱۳). در حالت طبیعی اسپرم ها همانند تمامی سلول های زنده طی تنفس هوازی در میتوکندری و اسپرم های نابالغ با انجام مداوم مسیر پنتوز فسفات تولید اشکال فعال اکسیژن می کنند. به همین دلیل پلاسمای سیمن، اسپرم و لوله های اپیدیدیم به سیستم های

۳/۳۰٪ از بیماران تشخیص دادند که در مقایسه با تحقیق حاضر (۱/۴٪) بالاترست. البته به رغم گزارش وجود اکلاهی در اغلب مطالعات مذکور در این مطالعه هیچ یک از نمونه‌ها به اکلاهی آلوده نبود. نتایج گزارش شده در تعدادی از تحقیقات مشابه در جدول (۶) خلاصه شده‌اند. تفاوت در نوع و فراوانی باکتری‌ها می‌تواند ناشی از اختلاف در سطح بهداشتی جوامع مختلف و هم‌چنین روش بررسی باشد.

در نیجریه - کانو و Al-Janabi A., ۲۰۱۴ در عراق - الانبار نیز شیوع استافیلوکوس ارئوس را در همین حدود گزارش کرده‌اند. تحقیقات گوناگونی ارتباط تنگاتنگ باکتریواسپرمی به خصوص آلودگی با استافیلوکوک ارئوس و ناباروری را گزارش کرده‌اند (۲۸-۳۲). انتروکوکسی باکتری رایج دستگاه گوارش است و طبیعتاً احتمال حضور آن در نمونه سیمن بالاست. Hillier, ۱۹۹۰ انتروکوکسی را در سیمن ۱۳٪ و Balmelli, ۱۹۹۴ در ۶/۱٪ و Eggert-Kruse, ۱۹۹۵ در

جدول ۶: مقایسه نتایج تحقیقات مختلف از نوع و درصد آلودگی باکتریایی نمونه سیمن مردان

تحقیق حاضر	Emokpae, 2009	Al-Janabi A., 2014	Eggert-Kruse, 1995	Balmelli, 1994	Eggert-Kruse, 1992	Hillier, 1990	Holmes K.K., 1979	Momoh A.R. M., 2009	Momoh A.R. M., 2011	فرانس	نوع باکتری
۶۵/۳	۶۸/۲	۱۱/۸۳			۱۱		۱۳/۶	۶۰	۳۸/۷		<i>Staphylococcus aureus</i>
۲			بررسی نشده	بررسی نشده	است						<i>Proteus Mirabilis</i>
۲۴/۵			بررسی نشده	بررسی نشده	است						<i>Staphylococcus Epidermis</i>
۴/۱		۳۷/۳۹	بررسی نشده	بررسی نشده	است		۳۵	۵۲/۴			<i>Klebsiella spp</i>
			بررسی نشده	بررسی نشده	است		۲۳	۴۵/۹۷			<i>Proteus spp</i>
۰	۱۷/۹	۱۱/۱۴	۱۳	۱/۷	۷/۳	<۱۰	۱۸/۲	۲۳	۷۱/۷۷		<i>E.coli</i>
۴/۱	بررسی نشده		۴۱	۶/۱	۳۰/۳	۱۱	۴۲	۴/۸۴			<i>Entereobacter spp</i>
			بررسی نشده	بررسی نشده	است			۸/۰۶			<i>Alkaligense spp</i>
			بررسی نشده	بررسی نشده	است			۱۲/۹			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
			بررسی نشده	بررسی نشده	است			۱/۶			<i>Providencia spp</i>
	۳/۴۹		بررسی نشده	بررسی نشده	است		۱۰				<i>Streptococcus spp</i>
	۹/۰۹		بررسی نشده	بررسی نشده	است		۱۱/۴	بررسی نشده			<i>Streptococcus pyogen</i>
	بررسی نشده		بررسی نشده	بررسی نشده	است		۱۳/۸	بررسی نشده			<i>Staphylococcus Coagulase -</i>

استافیلوکوکوس ارئوس معمولاً در مجرای ادراری یافت شده و می‌تواند باعث آلودگی مایع منی شوند. حضور کلبسیلا و باکتری‌های هوازی روده هم‌چون انتروکوکسی‌ها و اکلاهی نیز در نمونه سیمن رایج است (۳۳، ۳۴). خلیلی، ۱۳۸۱ نیز کاهش کیفیت سیمن در اثر آلودگی باکتریایی را تشخیص داد. او در نمونه‌های آلوده به انتروکوکسی، ۵۱/۰۴ درصد از اسپرم‌ها را با سرعت حرکت بالا (در مقایسه با گروه استریل ۵۳٪) گزارش

تفاوت معنی‌داری در پارامترهای مختلف شاخص کیفیت سیمن شامل حجم نمونه، شمارش، حرکت و شکل اسپرم بین افراد با نمونه آلوده و استریل (جدول ۳) حکایت از تاثیر قابل توجه عفونت باکتریایی بر قدرت باروری فرد دارد به طوری که بیشترین کاهش تعداد، تحرک و مورفولوژی سلولهای اسپرم در نمونه مردان آلوده به پروتئوس میرابیلیس و استافیلوکوکوس ارئوس مشاهده می‌شود. استافیلوکوک‌ها به خصوص

میزان اسیدهای چرب غیراشباع و در نتیجه سیالیت غشا اسپرم اختلال در فرآیند ترکیب اسپرم- اووسیت و ناباروری مورد انتظار است. در مجموع می توان نتیجه گرفت سطح بهداشتی مردان مورد مطالعه در وضع مطلوبی نیست و نیاز به توجه دارد. هم چنین غلظت مالون دی آلدئید می تواند به عنوان شاخصی برای ارزیابی سطح آسیب اکسیدانی نمونه سیمن مردان نابارور ناشی از عفونت میکروبی نمونه و به عنوان شاخصی برای پیش بینی میزان موفقیت روش های کمک باروری استفاده شود. در این راستا ثابت شده است که نه تنها آنتی اکسیدان هایی نظیر ویتامینهای C, E و گلوکاتینون مانع از کاهش تحرک اسپرم در نمونه سیمن فریز و ذوب شده می شوند بلکه افزودن ویتامینهای C و E و کوآنزیم Q₁₀ سرعت حرکت اسپرم را بهبود می بخشد و از تخریب DNA جلوگیری می کند (۳۷،۴۲،۴۴).

بر اساس نتایج تحقیق حاضر می توان توصیه نمود تا مراکز درمان ناباروری به جای استفاده از روش های طولانی، زمان بر، پرهزینه و بعضاً کم دقت بررسی آلودگی باکتریایی نمونه سیمن مردان تحت درمان از اندازه گیری مالون دی آلدئید به عنوان پارامتری سریع و دقیق در ارزیابی وضعیت اکسیدانی نمونه استفاده و در شرایط غیرطبیعی نسبت به ارزیابی آلودگی میکروبی اقدام و ادامه درمان را بر این اساس برنامه ریزی نمایند.

پیشنهاد می شود در مطالعات آتی اثر سایر عوامل اکسیدان محیط نیز در جهت تصحیح نتایج مورد توجه قرار گیرد. از جمله آلودگی نمونه بهت سایر میکروب ها نظیر: قارچ ها، ویروس ها که به نوبه خود می توانند موجب تولید اشکال فعال اکسیژن و جلب گلبول سفید به سیمن گردند. هم چنین نظر به توانایی این اشکال فعال در شکست DNA اسپرم بررسی ارتباط شکست DNA و آلودگی میکروبی می تواند مد نظر باشد.

نتیجه گیری

عفونت باکتریایی کیفیت نمونه سیمن را کاهش و موفقیت روشهای کمک باروری را تهدید می نماید. اندازه گیری MDA

نمود که با تحقیق حاضر مطابقت دارد (آلوده به آنتروکوکوسی ۶۲/۵٪ و استریل ۶۰٪). Momoh, ۲۰۱۱ نیز آلودگی میکروبی را بر تحرک اسپرم به عنوان مهم ترین شاخص باروری موثر اعلام کرده است. Tvrdá E., ۲۰۱۱ به ارتباط آلودگی سیمن با کلبسیلا و افزایش اسپرم های با اشکال غیر طبیعی اشاره کرده است. Holmes K.K., ۱۹۷۹ عامل عفونی شایع دستگاه تناسلی را آنتروکوک ها و باسیل های گرم منفی روده ای معرفی نمود (۳۸-۳۵). از سوی دیگر نتایج تحقیقات مختلف، رابطه عکس بین استرس اکسیداتیو و کیفیت سیمن و به خصوص شیوع قطعه قطعه شدن DNA اسپرماتوزوآ افراد نابارور به دلیل غلظت بالای اشکال فعال اکسیژن و مرگ اسپرم را نشان داده اند (۴۱-۳۹). امروزه نقش اسیدهای چرب غیر اشباع نه تنها در سیالیت و استحکام غشا اسپرم بلکه در فرایند رونویسی و بیان ژن به اثبات رسیده است. محصول پراکسیداسیون این اسیدهای چرب دو ترکیب سمی مالون دی آلدئید و ۴-هیدروکسی نونال است که به پراکسیداسیون و تخریب پروتئین ها، چربی ها و غشاء اسپرم و شکست DNA می پردازند (۴۵-۴۲).

اندازه گیری غلظت مالون دی آلدئید با روش حساس و دقیق طیف سنجی فلوری متری و ارتباط معنی دار غلظت مالون دی آلدئید اسپرم (عموماً با $p < 0.01$) و پلاسمای سیمن (عموماً با $p < 0.01$) با آلودگی های باکتریایی مورد بررسی حکایت از به روز استرس اکساتیو و در نتیجه اثر اکسیدانی آلودگی میکروبی بر نمونه سیمن دارد. نتایج این نتایج با داده های تحقیق Zarghami N., 2004 مطابقت دارد (۳۹). با مقایسه جداول (۳) و (۵) هم سویی کاهش تحرک اسپرم با افزایش شدت استرس اکسیداتیو مشاهده می شود که ناشی از کاهش فسفوریلاسیون پروتئین های آکسونمال اسپرم است.

از طرفی H₂O₂ با عبور از غشا اسپرم فعالیت آنزیم گلوکز-۶-فسفات دهیدروژناز (G6PD) و شانت پنتوز فسفات را مهار و سیستم آنتی اکسیدان آنزیمی گلوکاتینون پراکسیداز اسپرم را مختل می کند و طبیعتاً با تشدید استرس اکسیداتیو و کاهش

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی جهاد دانشگاهی استان قم و معاونت محترم آموزشی دانشگاه پیام نور استان قم که ما را در اجرای تحقیق حاضر یاری نمودند اعلام می نمایند.
تعارض در منافع: وجود ندارد.

می تواند به عنوان شاخصی برای ارزیابی آلودگی باکتریایی در مردان نابارور استفاده شود.

سیاسگزاری

تحقیق حاضر حاصل پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد و با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم اجرا شده است.

References:

- 1-Guyton AC. *Human Physiology and Mechanisms of Diseases*. 5th edition. W.B. Saunders Publishers 1992; 690-99.
- 2-World Health Organization (WHO). *Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*. 4th edition. Cambridge Uni Press 1999; 4-23.
- 3-Ganong W F, *Review of Medical Physiology*, 22nd Edition. McGraw Hill Company 2005; 912-943.
- 4-Gagnon C, Lamirande E. *Extrinsic factors affecting sperm motility: Immunological and infectious factors and reactive oxygen species in male sterility and motility disorders*. Springer. New York 1999; 37-44.
- 5-Hull M G, Glazener C M, Conway D I, Foster P A, Hinton R A, Coulson C. *Population study of causes treatment and outcome of infertility*. Br Med J 1995; 291(6510):1693-97.
- 6-Christiansen P. *Infection in the male reproductive tract, Impact, diagnosis and treatment in relation to male reproductive infertility*. Int J Androl 1993; 16: 1-13.
- 7-Gomez CI, Stenback WA, James AN, Criswell BS, Williams RP. *Attachment of Neisseria gonorrhoea to human sperm, Microscopical study of the effect of trypsin and iron*. Br J Vener Dis 1979; 55(4): 245-55.
- 8-Keck C, Gerber S C, Clod A, Wilhelm C, Breckwoldt M. *Seminal tract infection; impact on male fertility and treatment options*. Hum Reprod update 1998; 4(6): 891-903.
- 9-Virecoulon F, Wallet F, Fruchart-Flamenbaum A, Rigot J M, Peers M C, Mitchell V, et al. *Bacterial flora of the low male genital tract in patients consulting for infertility*. Andrologia 2005; 37(5): 160-65.
- 10- Rodin DM, Larone D, Goldstein M. *Relationship between semen cultures, leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation*. Fertil Steril 2003; 79(3): 1555-58.
- 11- Mancini A, Festa R, Silvestrini A, Nicolotti N, Di Donna V, et al. *Hormonal regulation of total antioxidant capacity in seminal plasma*. J Androl 2009; 30: 534-40.
- 12- Lanzafame FM, Vignera SL, Vicari E, Calogero AE. *Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility*. Reprod Biomed 2009; 19: 638-59.

- 13- Desai N E, Sabanegh J R, Kim T, Agarwal A. *Free radical theory of aging: Implications in male infertility*. Urology 2009; 75: 14-19.
- 14- Pons-Rejraji H, Sion B, Saez F, Brugnion F, Janny L. *Role of Reactive Oxygen Species (ROS) on human spermatozoa and male infertility*. Gynecol Obstet Fertil 2009; 37: 529-635.
- 15- Kefer JC, Agarwal A, Sabanegh E. *Role of antioxidants in the treatment of male infertility*. Int J Urol 2009; 16(5): 449-57.
- 16- Bozhedomov VA, Gromenko DS, Ushakova IV, Toroptseva MV, Galimov SN, Alekcandrova LA, et al. *Oxidative stress of spermatozoa in pathogenesis of male infertility*. Urologia 2009; 2: 51-6.
- 17- Tremellen K. *Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective*. Hum Reprod Update 2008; 14(3): 243-58.
- 18- Tempest H G, Homa ST, Routledge EJ, Garner A, Zhai XP, Griffin DK. *Plants used in Chinese medicine for the treatment of male infertility possess antioxidant and anti-oestrogenic activity*. Syst Biol Reprod Med 2008; 54(4-5): 185-95.
- 19- Gallardo JM. *Evaluation of antioxidant system in normal semen*. Rev Invest Clin 2007; 59: 42-7.
- 20- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. *Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction*. Fertil Steril 2003; 79(4): 829-43.
- 21- Sanocka D, Kurpisz M. *Reactive oxygen species and sperm cells*. Reprod Biol Endocrinol 2004; 2: 12.
- 22- Tavilani H, Doosti D, Saeidi H, Hosseinipannah M, Hasani H. *Relationship of sperm parameters with lipid peroxidation in asthenozoospermic and normozoospermic males*. MJIRI 2006; 19(4): 339-44.
- 23- Shang XJ, K Li, Z Q Ye, YG Chen, X Yu. *Analysis of lipid peroxidative levels in seminal plasma of infertile men by highperformance liquid chromatography*. Arch Androl 2004; 50: 411-16.
- 24- Antoine L, Karine L, Jérôme G, Anne-Marie P. *Values of sperm thiobarbituric acid-reactive substance in fertile men*. Clinica Chimica Acta 2002; 325: 113-15.
- 25- Kumar R, Venkatesh S, Kumar M, Tanwar M, Shasmsi MB, Kumar R, et al. *Oxidative stress and sperm mitochondrial DNA mutation in idiopathic oligoasthenozoospermic men*. Indian J Biochem Biophys 2009; 46(2): 172-77.
- 26- Fraczek M, Szkutnik D, Sanocka D, Kurpisz M. *Peroxidation components of sperm lipid membranes in male infertility*. Ginekol Pol 2001; 72(2): 73-9.
- 27- Yagi K. *Assay for blood plasma or serum*. Methods Enzymol 1984; 105: 328-31.
- 28- Emokpae M A, udaia P O, Sadigh N M. *Contribution of Bacteria Infection to Male Infertility in Nigerians*. JHAS 2009; 8(1): 124-32.

- 29- Cottle E, Mcmorrow J, Lennon B, Fawsey M, Cafferkey M, Harrison RF. *Microbial contamination in an IVF-embryo transfer system*. Fertil Steril 1996; 66(5): 776-80.
- 30- Naessens A, Foulon W, Debruckre P, Devroey P, Lauwers S. *Recovery of microorganisms in semen and relationship to smen evaluation*. Fertil Steril 1980; 45: 101-5.
- 31- Khalili MB, Sharifi MK. *The effect of bacterial infection on the quality of human's spermatozoa*. Iranian J pub Health 2001; 30(3-4): 119-22.
- 32- Khalili MB, Khalili MA. *Relation between asymptomatic urtrit with bacteriospermia in simen of fertile and infertile men*. J Fer Infer 2001; 81: 21-8.
- 33- Hillier SL, Rabe LK, Muller CH, Zarutskie P, Kuzan FB, Stenchever MA. *Relationship of bacteriologic characteristics to semen indices in men attending an infertility clinic*. Obstet Gynecol 1990; 75(5): 800-4.
- 34- Balmelli T, Stamm J, Dolina-Gludici M, Peduzzi R, Piffaretti-Yanez A, Balerna M. *Bacterqides ureolyticus in men consulting for infertility*. Andrologia 1994; 26(1): 35-8.
- 35- Eggert-Kruse W, Rohr G, Ströck W, Pohl S, Schwalbach B, Runnebaum B. *Anaerobes in ejaculates of subfertile men*. Hum Reprod Update 1995; 1(5): 462-78.
- 36- Momoh ARM, Okome GBO, Omorogbe F IO. *Association of bacteria and Chlamydia with primary infertility in males*. Nigerian Annals Natual Sci 2009; 8(2): 25-9.
- 37- Tvrdá E, Knazická Z, Bardos L, Massanyi P, Lukac N. *Impact of oxidative stress on male fertility*. Acta Vet Hung 2011; 59(4): 465-84.
- 38- Holmes K K, Brger R F, Alexander E R. *Acute epididymitis: etiology and therapy*. Arch Androl 1979; 3: 309-16.
- 39- Zarghami N, Khosrowbeygi A. *Evaluation of Lipid Peroxidation as an Indirect Measure of Oxidative Stress in Seminal Plasma*. Iran J Reproductive Med 2004; 2(1): 34-9.
- 40- Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC. *Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism*. Free Radic Biol Med 1999; 26(7-8): 869-80.
- 41- Hosseinzadeh Colagar A, Karimi F, Jorsaraei G A. *Correlation of sperm parameters with semen lipid peroxidation and total antioxidants levels*. Iran Red Crescent Med J 2013; 15(9): 780-85.
- 42- Park NC, Park HJ, Lee KM, Shin DG. *Free radical scavenger effect of rebamipide in sperm processing and cryopreservation*. Asian J Androl 2003; 5: 195-201.
- 43- Al-Janabi A, Abdul J, Pamaraju S, Pruthi P, Pruthi V. *The role of bacterial infections on male infertility in al-anbar province of IRAQ*. Bacterial Infections and Male Infertility 2014; 3(2): 23-31.
- 44- Akbari-Asbagh A, Mostafavi E, Hamdi K, Azmodeh O, Ghasemynejad A. *Relation of Serum and Semen Malondialdehyde and Total*

Anti-Oxidants with Sperm Parameters in Infertile Men. American J Immunology 2010; 6(3): 43-9.

45- Tavidani H, Goodarzi MT, Vaisi-raygani A, Salimi S, Hassanzadeh T. *Activity of*

antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. Int Braz J Urol 2008; 34(4):

485-91

Evaluation of malone-di-aldehyde as an indicator for semen bacterial contamination

Malekshahi Masoumeh¹, Razavian Mohammad Hussein^{*2}, Aghaee Soheil³

Original Article

Introduction: The statistics of infertility among couples is about 15%. 60% of infertility cases are related to male factors, and the share of infertility due to genital tract infection is 20%. In bacteriospermia, the presence of bacteria and leukocytes produce active forms of oxygen and damage to sperm cells. In the present study, determination of frequency and diversity of bacteria involved in urinary tract infection, determination of malondialdehyde in sperm and seminal plasma as an index of oxidative damage and its relation with microbial contamination and effect of oxidative stress and microbial contamination on the quality of semen was evaluated in infertile men.

Methods: This trans-sectional study performed on 53 patients referred to the Infertility Treatment Center of Jahad Daneshgahi. After sampling, semen parameters according to WHO (1999) protocol and bacterial contamination by culture and differential tests and also malondialdehyde concentration in sperms and seminal plasma via fluorimetric method were determined and results analyzed by ANOVA and T test in SPSS16 software.

Results: Based on the results, 92% of the patients had bacterial contamination, including *Staphylococcus aureus* (65%), *Staphylococcus epidermidis* (24.5%), *Proteus mirabilis* (2.4%), *Klebsiella* (4.8%) and *Enterococcus* (4.8%). Bacteriospermia had not only a significant effect on the quality of semen, especially sperm motility ($p < 0.01$), but significantly increased ($p < 0.01$) the malondialdehyde concentration in patients' cells and seminal plasma.

Conclusion: Infection affects semen quality and decreases the chance of a successful ART. Malondialdehyde can be used as a quick and accurate indicator for evaluating bacterial contamination in infertile men.

Keywords: Infertility, Bacteriospermia, Reactive oxygen species, Malondialdehyde.

Citation: Malekshahi M, Razavian M.H, Aghaee S. **Evaluation of malone-di-aldehyde as an indicator for semen bacterial contamination.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2017; 26(5): 426-38.

¹Department of Microbiology, Qom Branch, IAU, Qom, Iran

^{2,3}Department of Microbiology, Qom Branch, IAU, Qom, Iran

*Corresponding author: Tel: 09122510023, email: Razavian@qom-iau.ac.ir