Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 3 (July - August)

Journal homepage: www.ijmm.ir

# Lack of relatedness between Human cytomegalovirus in semen and male infertility

**Farzaneh Tafvizi[1], Khatereh Baghdadi[2], Nasim Hayati Roodbari[3]**

1. Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran
2. Department of Biology, Islamic Azad University, Arak Branch, Arak, Iran
3. Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

## *Article Information*

**Article history:**
Received: 2016/16/16
Accepted: 2016/04/09
Available online: 2016/10/16

**Article Subject:**
Medical Virology

**IJMM 2016; 10(3): 39-46**

**Corresponding author at:**

**Dr. Farzaneh Tafvizi**

**Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran**

**Tel: : +989125709532**

**Email:**
**farzanehtafvizi54@gmail.com**

## *Abstract*

**Background and Aim:** Infertility refer to an inability to conceive (irrespective of causes) after having regular unprotected sex. Men are responsible for infertility in 50% of infertile spouses. Numerous factors contribute to male infertility including genital infections that may appear following microbial, fungal, and viral infections. The aim of the present study was detection of Human cytomegalovirus (HCMV) infection in the semen of infertile men and evaluation of its relation with sperm parameters such as motility, count and morphology.

**Materials and Methods:** In this study, 100 semen samples of fertile men (as a control group) and 100 semen samples of infertile men were collected from Infertility Center of Qom Jahad Daneshgahi, Iran. The semen samples were analyzed according to World Health Organization's standard methods (WHO). After DNA extraction, cytomegalovirus was detected using Nested polymerase chain reaction technique. The results were analyzed using SPSS (version 19) software (Significance level of $P<0.05$). Statistical assessments were conducted using descriptive statistics including the Chi-square test and *t* test. The difference was considered significant at the $P<0.05$ level.

**Results:** The analyzed sperm parameters of 100 infertile samples showed that 56%, 70%, and 82% of the samples had problems, respectively in terms of count, motility, and morphology. However, 60% of the infertile samples had problems in all three parameters. Human cytomegalovirus DNA was detected in six and four samples of infertile and fertile men respectively.

**Conclusions:** According to statistical analysis, no significant correlation was obtained between the cytomegalovirus infection and male infertility. Although the achieved results may vary with changes in population size.

**KeyWords:** *Male infertility, Human cytomegalovirus, sperm quality, Nested-PCR*

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

**How to cite this article**:

Tafvizi F, Baghdadi K, Hayati Roodbari N. Lack of relatedness between Human cytomegalovirus in semen and male infertility. Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (3) :39-46

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۳ – مرداد و شهریور ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

# عدم ارتباط وجود ویروس سایتومگال در مایع منی با ناباروری در مردان

فرزانه تفویضی[۱]، خاطره بغدادی [۲]، نسیم حیاتی رودباری[۳]

۱. گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران
۲. گروه زیست شناسی، واحد اراک ، دانشگاه آزاد اسلامی ، اراک، ایران
۳. گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

**اطلاعات مقاله**

**تاریخچه مقاله**
**دریافت:۱۳۹۴/۱۰/۱۱**
**پذیرش:۱۳۹۵/۰۱/۲۱**
**انتشار آنلاین:۱۳۹۵/۰۷/۲۵**
**موضوع:**
عفونت بیمارستانی
**IJMM 1395; 10(3): 39-46**

**نویسنده مسئول:**
**دکتر فرزانه تفویضی**

**گروه زیست شناسی ، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه ازاداسلامی واحد پرند ، پرند، ایران**

**تلفن:** **+989125709532**

**پست الکترونیک:**
farzanehtafvizi54@gmail.com

## چکیده

**زمینه و اهداف:** ناباروری ناتوانی زوجین در آبستنی (قطع نظر از علل آن) پس از طی یکسال از مقاربت‌های متوالی و بدون بهره گیری از روش‌های کنترل آبستنی می‌باشد. در ۵۰ درصد زوج‌های نابارور، مردان در ایجاد ناباروری دخیل می‌باشند. عوامل متعددی در بروز ناباروری مردان موثر می‌باشد که از آن جمله می‌توان به عفونت‌های تناسلی اشاره نمود. عفونت‌های تناسلی می‌توانند دراثر آلودگی‌های میکروبی، قارچی و ویروسی به وجود آیند. هدف از این تحقیق، شناسایی ویروس سایتومگال در مایع منی مردان نابارور و بررسی تأثیر آن بر پارامترهای عملکردی اسپرم از جمله حرکت، مورفولوژی و تعداد اسپرم‌ها می باشد.

**مواد و روش کار:** در این تحقیق، ۱۰۰ نمونه منی افراد بارور (به عنوان کنترل) و ۱۰۰ نمونه منی افراد نابارور از مرکز ناباروری جهاد دانشگاهی قم جمع آوری شد. آنالیز اسپرم، برطبق روش‌های استاندارد سازمان بهداشت جهانی ( World Health Organization یا WHO) مورد بررسی قرارگرفت. پس از استخراج DNA، جهت تعیین حضور ویروس سایتومگال از روش Nested- PCR استفاده شد. نتایج با استفاده از آزمون کای دو و تی تست جهت بررسی رابطه ویروس و ارتباط آن با ناباروری مردان و با استفاده از نرم افزار SPSS (version 19) و با احتساب P<۰/۰۵ بررسی شدند.

**یافته‌ها:** بررسی اسپرموگرام ۱۰۰ نمونه نابارور نشان‌داد که به ترتیب ۵۶٪، ۷۰٪، ۸۲٪ از نظر تعداد، حرکت، مورفولوژی دچار مشکل بودند و ۶۰٪ از ۱۰۰ نمونه نابارور در هر ۳ پارامتر اشکال داشتند. در بین نمونه‌های بارور و نابارور، در ۱۰ نمونه DNA ویروس سایتومگال تشخیص داده شد که ٦ نمونه آن در گروه افراد نابارور و ٤ نمونه در گروه افراد بارور مشاهده شد.

**نتیجه‌گیری:** از نظر آماری، ارتباطی معنی‌داری بین ناباروری در مردان و عفونت ویروس سایتومگال مشاهده نشد. اگرچه نتیجه بدست آمده ممکن است با تغییر جمعیت مورد بررسی تغییر کند.

**کلمات کلیدی:** ناباروری مردان، ویروس سایتومگال، کیفیت اسپرم، Nested-PCR

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

## مقدمه

ناباروری، یکی از مشکلات مهم در زندگی ۲۵ درصد از زوج ها است و این در حالی است که تقریباً علت ۵۰ درصد موارد ناباروری مربوط به مرد و باقی موارد مربوط به زن یا هر دو است (۱). ازعوامل عمده مربوط به مردان می توان به آسیب های اندام تناسلی، عفونت های مایع منی، بیضه‌ها، مجاری تناسلی و غدد تناسلی ضمیمه، واریکوسل، انسداد مجاری تناسلی، بیماری های اندوکرین و متابولیک اشاره نمود (۲). عفونت های دستگاه تناسلی یکی از علل مهم در ناباروری مردان به شمار می‌رود. در مردان عفونت در کیسه منی یا غده پروستات، از راه های خاصی می تواند بر اسپرم ها اثر کند. سلول های عفونی، توانایی تحرک اسپرم‌ها را کاهش می‌دهند. بعضی عفونت ها باعث انسداد مسیر اسپرم ها در دستگاه تناسلی مرد شده و در نتیجه منجر به توقف انتقال اسپرم می‌شوند. در این میان، عفونت های ویروسی سیستم تناسلی (منتقله جنسی) از جمله موارد زمینه ساز ناباروری مردان تلقی می‌گردند. از بین عوامل ویروسی می توان به سایتومگالوویروس (Human cytomegalovirus) که به

اختصار HCMV نامیده می شود، اشاره نمود که یکی از هرپس ویروس های انسانی است که به خانوادهٔ بتا هرپس ویرینه تعلق دارد (۳).

در واقع ۱۵ تا ۲۰٪ از موارد ناباروری تحت اثر آلودگی منی قراردارند. حتی مردان بدون علائم نیز می‌توانند دارای دوره نهفتگی در اسپرم خود باشند. این نوع آلودگی با کیفیت پایین خصوصیات اسپرم ارتباط دارد (۴). ویروس سایتومگال قادر به آلوده سازی بخش های مختلفی از اسپرم می‌باشد. یک مطالعه جدید بر روی کشت های ارگانوتایپیک آلوده به این ویروس، ایجاد اثر کشنده ناشی از حضور آنتی ژن های ویروسی و ذرات ویروسی در اسپرماتوگونیا، اسپرماتوسیت ها و اسپرماتیدها را تایید نمود. به عبارت دیگر، این ویروس شروع به فعالیت همانندسازی در تمام مراحل تکوین اسپرم می‌کند (۴). اخیرا تحقیقات مختلفی، در رابطه با عفونت سایتومگالوویروس و تاثیر آن بر پارامترهای عملکردی اسپرم از جمله حرکت، مورفولوژی، تعداد اسپرم ها و کاهش قدرت باروری مردان صورت گرفته است ولی ارتباط بین عفونت ویروس سایتومگال و ناباروری در مردان هنوز مبهم باقی مانده است.

هدف در این تحقیق شناسایی ویروس سایتومگال در مایع منی مردان نابارور مراجعه کننده به کلینیک ناباروری جهاد دانشگاهی قم، به عنوان یک فاکتور خطر در ناباروری زوجین و بررسی تاثیر ویروس بر پارامترهای مهم باروری در مردان از جمله تعداد اسپرم، حرکت و مورفولوژی آن می باشد. نتایج تحقیق می-تواند در کلینیک های ناباروری در گزینش افراد جهت انجام عمل IVF و حتی اهدا اسپرم کمک کننده باشد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه گیری

در این مطالعه موردی – شاهدی، نمونه گیری طی مدت شش ماه از تاریخ آبان ۱۳۹۲ تا اسفندماه ۱۳۹۲، پس از گرفتن رضایت نامه کتبی از افراد مراجعه کننده به کلینیک ناباروری مرکز جهاد دانشگاهی قم (در محدوده سنی ۲۵-۴۵ سال) انجام شد. ۱۰۰ فرد نابارور بدون داشتن سابقه واریکوسل (واریسی شدن عروق بیضه) و آسیب بیضوی که یکسال نزدیکی محافظت نشده داشتند و ۱۰۰ مرد بارور دارای حداقل یک فرزند به عنوان کنترل، وارد مطالعه شدند. موارد خروج از مطالعه بدین شرح بودند: مصرف الکل، مردان معتاد به هر گونه مواد مخدر، بیماری مزمن بدنی یا روانی شناخته شده، شامل بیماری قلبی، کلیوی، ایمنی، سرطان ها، هپاتیت، ایدز، دیابت و سابقهٔ جراحی در ناحیه تناسلی و لگن، از جمله واژکتومی، فتق و غیره. همچنین افراد آزواسپرمی و کسانی که گزارشی از مشکلات جنسی داشتند. نمونه برداری با در نظر گرفتن عدم آمیزش جنسی طی ۴۸ ساعت گذشته از افراد مراجعه کننده انجام گرفت. بر روی تمامی نمونه ها با توجه به معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO) یا به اختصار اسپرموگرام انجام شد (۵). خصوصیاتی از جمله حجم، pH، زمان مایع شدگی، حرکت، مورفولوژی و تعداد اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. نمونه های جمع آوری شده در فریزر ۸۰ - درجه سلسیوس به جهت استخراج DNA نگهداری شدند.

### استخراج DNA از مایع منی (اسپرم)

قبل از انجام استخراج DNA، شستشو مایع منی انجام شد. سپس، ۲۰ میکرولیتر از مایع منی با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شدد. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ بمدت۳۰ سانتریفوژ شدند و مایع رویی حذف گردید. مراحل ۱ و ۲ یک بار دیگر تکرار شدند. پس از انجام سانتریفوژ، رسوب سفید رنگی مشاهده گردید. ۵۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده اضافه گردید. ۲/۵ میکرولیتر از Triton-X100 (0.5%)، ۲۱ میکرولیتر DDT (1M) و ۴۰ میکرولیتر پروتئیناز K (10mg/ml) اضافه شد. نمونه ها به خوبی با بافر هضم کننده مخلوط شدند و در ۵۰ درجه سلسیوس به مدت یک شبانه روز انکوبه گردیدند. میکروتیوپ ها به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و مایع رویی به میکروتیوپ های جدید انتقال یافت. یک میکرولیتر گلیکوژن(۲۰mg/ml) و یک دهم حجم از استات سدیم ۳ مولار به نمونه ها اضافه گردید و با شدت مخلوط شدند. دو حجم اتانول سرد مطلق به نمونه ها اضافه گردید. نمونه ها در ۸۰- درجه سانتی گراد به مدت ۲-۱ ساعت برای انجام رسوب دهی DNA قرار داده شدند. سپس بمدت ۲۰ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به دقت دور ریخته شد و رسوب حفظ گردید. رسوب DNA توسط ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵٪ شستشو داده شد. نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۳۰۰۰ در دمای اتاق سانتریفوژ شدند. رسوب DNA در دمای اتاق خشک شد تا اتانول کاملا تبخیر شود. رسوب DNA در بافر TE حل گردید و غلظت و خلوص آن توسط نانو دراپ بررسی شد (۶).

### واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) ژن بتاگلوبین

واکنش واکنش زنجیره ای پلی مراز در حجم نهایی ۲۵ µl شامل، ۱۲/۵ µl بافر آمپلیکون، ۰/۵ µl (۰/۴ میکرومولار) از پرایمر اختصاصی ژن بتاگلوبین GH20 (5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3') PC04 (5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3')، ۵۰ ng از DNA نمونه های استخراج شده، جهت اثبات استخراج DNA از نمونه ها انجام شد. تکثیر DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad PCR System, USA) مطابق برنامه دمایی که در جدول ۱ نمایش داده شده است انجام گرفت. محصولات حاصل از واکنش زنجیره ای پلی مراز ، پس از رنگ آمیزی با ژل رد بر روی ژل آگارز ۲٪ در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE ( Tris Base, Boric acid, Na EDTA, Deionized Water) با ولتاژ ۱۰۰V به مدت ۱ ساعت مورد بررسی کیفی قرار گرفتند که نتایج به وسیله دستگاه ژل داک مشاهده گردید.

**جدول ۱- برنامه دمایی بهینه سازی شده جهت تکثیر ژن بتاگلوبین**

| | دناتوراسیون آغازی | دناتوراسیون در سیکل‌ها | اتصال پرایمر | طویل سازی نهایی |
|---|---|---|---|---|
| تعداد سیکل | ۱ | ۴۵ | | ۱ |
| زمان | ۳ دقیقه | ۳۰ ثانیه | ۴۰ ثانیه | ۴۰ ثانیه | ۵ دقیقه |
| دما | ۹۵ | ۹۵ | ۵۳ | ۷۲ | ۷۲ |

### شناسایی سایتومگالوویروس با استفاده از روش Nested-PCR

بر روی DNA استخراج شده PCR انجام شد. واکنش PCR اول، در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل، ۱۲/۵ میکرولیتر بافر آمپلیکون، ۰/۵ میکرولیتر (۰/۴ میکرومولار) از پرایمر اختصاصی CMV شامل 5'TCCAACACCCACAGTACCCGT-3' و 5'CGGAAACGATGGTGTAGTTCG-3' ، ۵۰ ng (۱۰ میکرولیتر) از DNA نمونه های استخراج شده، انجام شد (۷). کنترل مثبت از سرم فرد آلوده به ویروس سایتومگال از آزمایشگاه تشخیص طبی دنا تهیه شد. کنترل منفی شامل تمامی موارد واکنش PCR بود و به جای DNA الگو از آب مقطر استریل استفاده شد. تکثیر DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad PCR System, USA) مطابق برنامه دمایی ارایه شده در جدول ۲ انجام شد.

**جدول ۲- برنامه دمایی بهینه سازی شده جهت تکثیر ویروس سایتومگال در دور اول PCR**

| | دناتوراسیون آغازی | دناتوراسیون در سیکل‌ها | اتصال پرایمر | طویل سازی نهایی |
|---|---|---|---|---|
| تعداد سیکل | ۱ | ۲۰ | | ۱ |
| زمان | ۵ دقیقه | ۳۰ ثانیه | ۳۰ ثانیه | ۳۰ ثانیه | ۵ دقیقه |
| دما | ۹۵ | ۹۴ | ۵۵ | ۷۲ | ۷۲ |

واکنشPCRدوم، درحجم نهاییµL۲۵شامل، µL۱۲/۵بافر آمپلیکون، µL ۰/۵ (۰/۴ میکرومولار) از پرایمر اختصاصی CMV شامل 5'TCCAACACCCACAGTACCCGT-3' و 5'CGGAAACGATGGTGTAGTTCG-3'،۵ماکرولیتراز حصول PCR اول، انجام شد. تکثیر DNA با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad PCR System, USA) مطابق برنامه دمایی ارایه شده در جدول ۲ انجام شد. رعایت کنترل های مثبت و منفی بر طبق دور اول PCR که در بالا توضیح داده شد انجام گرفت.

**جدول۳- برنامه دمایی بهینه سازی شده جهت تکثیر ویروس سایتومگال در دور دوم PCR**

| | دناتوراسیون آغازی | دناتوراسیون در سیکل‌ها | اتصال پرایمر | طویل سازی نهایی |
|---|---|---|---|---|
| تعداد سیکل | ۱ | ۳۰ | | ۱ |
| زمان | ۵ دقیقه | ۳۰ ثانیه | ۳۰ ثانیه | ۳۰ ثانیه | ۵ دقیقه |
| دما | ۹۵ | ۹۴ | ۵۵ | ۷۲ | ۷۲ |

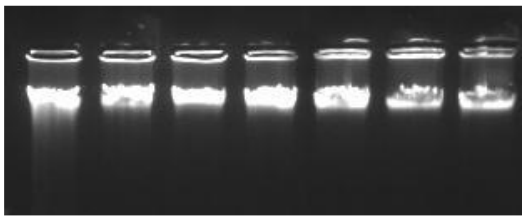
محصولات PCR، پس از رنگ آمیزی با gel red بر روی ژل آگارز ۲ درصد در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE ( Tris Base, Boric acid, Na EDTA, Deionized Water) با ولتاژ ۱۰۰V به مدت ۱ ساعت مورد بررسی کیفی قرار گرفتند که نتایج به وسیله دستگاه ژل داک و با اشعه UV مشاهده گردید.

## آنالیز آماری:

نتایج با استفاده از آزمون کای دو و تی تست جهت بررسی رابطه ویروس و ارتباط آن با ناباروری مردان و با استفاده از نرم افزار SPSS (version 19) و با احتساب P<۰/۰۵ از نظر آماری ارزیابی شدند.

## یافته‌ها

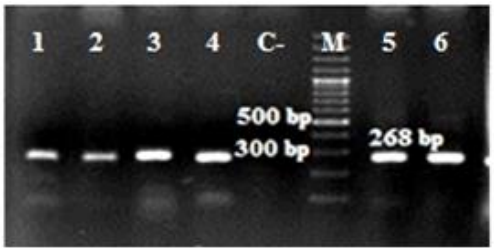
آنالیز اسپرموگرام در ۱۰۰ نمونه افراد بارور، بیانگر آنالیز طبیعی بود که به عنوان عنوان کنترل در نظر گرفته شدند و آنالیز غیر طبیعی در برخی پارامترهای اسپرم در ۱۰۰ نمونه بیمار مشاهده شد. سه عامل حرکت، تعداد و مورفولوژی اسپرم از جمله مهمترین عوامل در ارزیابی کیفیت اسپرم و ناباروری مد نظر قرار گرفت که به ترتیب ۷۰٪ از نظر حرکت، ۵۶٪ از لحاظ تعداد و ۸۲٪ از نظر مورفولوژی پایین تر از حد استاندارد گزارش شدند و به عنوان نابارور در نظر گرفته شدند. از بین ۱۰۰ نمونه نابارور، ۶۰٪ در هر ۳ عامل تعداد، مورفولوژی و حرکت اختلال داشتند. بررسی نمونه‌ها در این پژوهش ابتدا کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و نانودراپ ارزیابی‌شد. بررسی اسپکتروفتومتری بیانگر میزان جذب مناسب محلول DNA در طول موج ۲۶۰nm یعنی در محدوده ۲-۱/۸ بود که نشانگر مناسب بودن DNA استخراج شده از نمونه ها برای تکثیر با PCR بود. در شکل ۱ کیفیت چند نمونه از DNA نشان داده شده است.



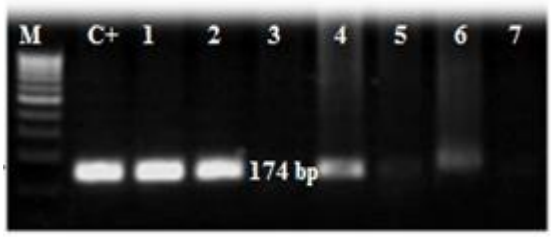
شکل ۱: کیفیت DNA استخراج شده تعدادی از نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد.

جهت تایید استخراج DNA از تکثیر ژن بتاگلوبین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد که تمامی نمونه‌ها با پرایمرهای اختصاصی ژن بتاگلوبین تکثیر شدند و محصول ۲۶۸ bp بر روی ژل آگارز تایید گردید (شکل ۲).

از ۲۰۰ نمونه DNA استخراج شده که شامل ۱۰۰ نمونه بارور و ۱۰۰ نمونه نابارور بود، در کل ۱۰ نمونه از نظر ویروس سایتومگال مثبت شدند که ۶ نمونه متعلق به گروه نابارور و ۴ نمونه متعلق به گروه بارور بودند. قطعه ۱۱۷ bp حاصل از تکثیر DNA ویروس برروی ژل اگارز ۲ درصد نمایش داده شده است (شکل۳).




شکل۲: نمایی از تکثیر ژن بتا گلوبین به عنوان کنترل داخلی جهت ارزیابی استخراج DNA بر روی ژل آگارز ۲ درصد. چاهک های ۶-۱: محصول PCR ژن بتاگلوبین (قطعه ۲۶۸ bp) در تعدادی از نمونه های بارور و نابارور، چاهک M: مارکر bp۱۰۰، -c: کنترل منفی.




شکل۳: نمایی از تکثیر ویروس سایتومگال توسط روش Nested- PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد. (مشاهدهٔ قطعه ۱۷۴ bpبر روی ژل آگارز ۲ درصد). چاهک M: مارکر ۱۰۰bp، چاهک C+: کنترل مثبت، چاهک ۱: چاهک های ۱، ۲، ۴، ۵،۶: نمونه های مثبت بارور و نابارور، چاهک ۳: کنترل منفی، چاهک ۷: نمونه منفی از نظر عفونت ویروسی.

## بحث

نتایج با استفاده از نرم‌افزار (SPSS version 19) و با استفاده از آزمون کای دو با احتساب P<۰/۰۵ ارزیابی شد که با محاسبه P = 0.70 ، ارتباطی معنی‌داری بین ناباروری در مردان و عفونت ویروس سایتومگال مشاهده نشد.

ناباروری مردان نقش مهمی در ناباروری زوج ها دارد. بسیاری از مردان که دچار کاهش قدرت باروری نسبت به حد طبیعی هستند مبتلا به عفونت های مزمن می باشند و از این روی عفونت های دستگاه تناسلی یکی از علل مهم در ناباروری مردان به شمار می رود. این عفونت ها بر قسمت های مختلف سیستم تولید مثل مردان از جمله بیضه ها، اپیدیدیم و غدد تناسلی ضمیمه اثر می گذارند. بنابراین، این عفونت ها در مراحل مختلف تکامل، بلوغ و انتقال برکیفیت اسپرم ها اثرات سوء برجای گذاشته و از این طریق منجربه کاهش توانایی باروری و در نتیجه، افزایش احتمال ناباروری می شوند. در این میان

عفونت های ویروسی (منتقله جنسی) سیستم تناسلی می تواند زمینه ساز ناباروری مردان گردند( **۹**و **۸**). طیف وسیعی از ویروس ها، در ایجاد ناباروری در مردان نقش دارند. عفونت ها با مکانیسم های مختلفی باعث اختلال در فرایند باروری می شوند. مطالعات نشان داده اند که فرآیند اسپرماتوژنز در ۶۰ درصد بیماران با التهاب حاد اپیدیدیم به طور موقت مختل می شود. بعضی از مطالعات نشان داده اند که عفونت مجاری تناسلی، منجر به انسداد نسبی مجاری منی ساز نیز می شود و حالا تشدید الیگوزواسپرمیا را ایجاد می نماید. از سوی دیگر، انسداد این مجاری باعث اختلال در عملکرد غدد تناسلی ضمیمه می شود و بدین طریق موجب تغییردر ترکیب و غلظت مواد تشکیل دهنده منی می گردد (**۱۰**).

عفونت در دستگاه تناسلی زنان و مردان می تواند نقش مهمی در ناباروری ایفا کند و ارگانیسم هایی که معمولاً با آمیزش جنسی منتقل می شوند احتمالاً از سایر ارگانیسم ها در این مسأله بیشتر دخالت دارند (**۱۱**).

مطالعات اپیدمیولوژیکی که توسط بسیاری از محققین صورت گرفت، نشان داده است که از مایع منی مردان نابارور میکروارگانیزم های بیشتری نسبت به مایع منی مردان بارور قابل جداسازی است (**۱۲**، **۱۱**).

عفونت های ویروسی سهم عمده ای از ناتوانی و میرایی مرتبط با جنین را به خود اختصاص داده اند. از بین عوامل ویروسی که به طرز محسوسی با مرگ داخل رحمی مرتبط می باشد می توان به ویروس سیتومگال اشاره نمود (**۳**).

محققان براین باورند که آلودگی ویروسی نهفته یک فاکتور سرولوژیکی است که در ناباروری مردان ناچیز پنداشته می شود. به عبارت دیگر، پزشکان وجود احتمال یک آلودگی ویروسی نهفته را بسیار کم در نظر می گیرند. آنگونه که محققین بیان نموده اندکه ویروس های قابل انتقال از طریق جنسی قادر به کلنی سازی در منی هستند و بنابراین یک نگرانی مهم برای متخصصین ناباروری ویروس هرپس (HSV)، ویروس سیتومگال انسانی (CMV) و ویروس های مرتبط با آدنو ویروس (AAV) است شیوع ویروس سایتومگال، در ناحیه تناسلی در مردان بارور و نابارور از ۸٪ تا ۶۵٪ در مطالعات مختلف گزارش شده است (**۱۳**، **۱۴**، **۱۵**). در تحقیق حاضر هم تنها ۶ درصد از افراد نابارور دارای ویروس سایتومگال بودند. از طرفی مشخص شد که عفونت ویروس سایتومگال، هیچ تاثیری در ناباروری و کاهش کیفیت پارامترهای اسپرم ندارد. به عبارت دیگر، هیچ تفاوت معنی اداری در پارامترهای اسپرم بویژه مورفولوژی، تعداد و تحرک اسپرم بین افراد دارای عفونت ویروسی و فاقد عفونت در گروه بیمار و کنترل مشاهده نشد. در مورد ارتباط ویروس سایتومگال و ناباروری مردان و تاثیر بر پارامترهای اسپرم نتایج مختلف و متناقضی گزارش شده است که بعضی از مطالعات در دخالت ویروس تاکید دارند و بعضی هم معتقدند که ارتباطی بین ویروس و ناباروری مردان و کاهش کیفیت اسپرم از جمله حرکت، مورفولوژی و تعداد اسپرم وجود ندارد که در ادامه مفصلا به آن اشاره می شود.

نتایج حاصل از این تحقیق، همسو با گزارشات منتشر شده دیگر در عدم تاثیر ویروس سایتومگال در ناباروری مردان می باشد و در تناقض با یافته‌های مطالعات قبلی در مورد نقش عفونت ویروس سایتومگال در ناباروری مردان می باشد.

Kapranos و همکاران در یک مطالعه مرتبط با ناباروری نشان دادند، ویروس سایتومگال در ۸ نمونه از ۱۱۳ نمونه منی (۷/۱ درصد)، شناسایی شد. نتیجه این مطالعه حاکی از عدم وجود رابطه معنی‌دار بین ویروس سایتومگال و ناباروری مردان بود (۱۶). به‌همین‌ترتیب Eggert-Kruse و همکارانش طی تحقیق خود جهت بررسی اثر ویروس سایتومگال در ناباروری زنان و مردان، ویروس سایتومگال را با استفاده از تکنیک Nested-PCR از نمونه منی تشخیص دادند و شیوع کلی DNA ویروس را در مایع منی ۶/۵ درصد گزارش نمودند. از بین ۱۷۰ نمونه، DNA ویروس در ۱۱ نمونه شناسایی شد و تاکید نمودند که عفونت ویروسی هیچ تاثیری بر فعالیت های عملکردی اسپرم از جمله تحرک و مورفولوژی اسپرم ها و نیز آنتی بادی های ضد اسپرم ندارد و به نظر نمی‌رسد که عفونت ویروسی نقش مهمی در ناباروری داشته باشد (**۱۳**). نتایج تحقیق حاضر بسیار نزدیک و شبیه به نتایج مطالعه Eggert-Kruse و Kapranos می باشد. در تحقیق ما نیز کلا ویروس سایتومگال در ۱۰ فرد (مجموع بارور و نابارور)، یعنی در ۵ درصد مشاهده شد.

طی مطالعه McGowan و همکاران نیز شیوع ویروس پایین بود، بطوریکه در ۴ نفر از ۱۷۰ فرد نابارور شرکت کننده در مطالعه شناسایی شد. بنابراین ارتباطی بین وجود ویروس و ناباروی مشاهده نشد (**۱۷**).

Yangو همکاران نشان دادند با وجود شیوع نسبتا بالای ویروس سایتومگال در افراد نابارور تایوانی، بااین حال تاثیری در کیفیت پارامترهای اسپرم دیده نشد (۱۸). در جهت تایید عدم تاثیر ویروس در حرکت اسپرم، Pallier طی انکوباسیون اسپرم در مجاورت با ویروس سایتومگال نشان داد که تغییری در حرکت اسپرم حاصل نشد (۱۹).

Habibi و همکارانش مطالعه‌ای بر روی ۲۰۰ بیمار انجام دادند که در ۱۵۴ نفر از مردان، ناباروری تشخیص داده شد در حالی که در ۴۶ نفر از آن‌ها ناباروری تشخیص داده نشد. ویروس سایتومگال در ۲۵ نفر از کل شرکت کنندگان مورد مطالعه وجود داشت. تفاوت‌های معنی داری در متغیرهای مورد مطالعه، بین افراد دارای عفونت ویروسی و بدون عفونت ویروسی نه در بیماران و نه در گروه کنترل دیده نشد. آن ها بیان نمودند اگرچه شیوع ویروس سایتومگال در بیماران مبتلا به ناباروری بالاتر بود، اما این مقدار از نظر آماری معنادار نبود (۲۰). یافته‌های ما نیز حاکی از عدم تاثیر در کیفیت پارامترهای اسپرم از جمله تحرک و مورفولوژی است.

در مقابل، مطالعاتی نیز وجود دارد که به تاثیر عفونت ویروس سایتومگال در ناباروری مردان تاکید دارد. Wuو همکاران نشان دادند که میزان ابتلا به عفونت سایتومگال در مردان نابارور با سلول‌های پاتولوژیک در مایع منی بیشتر است. سلول‌های زایای اسپرم آلوده به ویروس سایتومگال و ویروس هرپس سیمپلکس تیپ II (HSV-II) ممکن است ضایعات پاتولوژیک ایجاد کنند و اسپرماتوژنز را تحت تاثیر قرار دهند. با این‌حال، ایراد این مطالعه تعداد کم نمونه‌های مورد مطالعه است (۲۱).

در مطالعه دیگری که توسط Bezold و همکارانش انجام شد، DNA عوامل بیماریزای منتقله از راه جنسی درمایع منی در درصد بالایی از مردان بدون علامت نابارور تشخیص داده شد که با کاهش کیفیت مایع منی همراه بود. با این‌حال، تاثیر هر کدام از عفونت ها بطور جداگانه گزارش نشده است. محدودیت اصلی این مطالعه، تعداد کم افراد مورد مطالعه بود که مانع از مشخص شدن دقیق علت بود. در نتیجه، نقش مهمی برای ویروس سایتومگال در ناباروری مردان در این تحقیق نشان نداده شد (۲۲).

باتوجه به نتایج تحقیق حاضر، ارتباطی بین ویروس سایتومگال و تاثیر آن در بروز ناباروری یعنی تغییر در پارامترهای اسپرم دیده نشد. علت گزارش نتایج متفاوت در تحقیقات مختلف می‌تواند ناشی از عوامل مختلف از جمله بکارگیری روش های مختلف آزمون و جمعیت آماری مورد مطالعه و از همه مهم تر مکان جغرافیایی مورد مطالعه و نژاد مورد بررسی می‌باشد. روش Nested-PCR یک روش مولکولی قوی در شناسایی DNA ویروسی می‌باشد چراکه با بکارگیری دو جفت پرایمر اختصاصی در دو راند PCR، احتمال شناسایی میزان کم ویروس در مایع منی میسر خواهد بود، لذا دراین تحقیق، آزمون دقیق Nested-PCR جهت حذف جواب های کاذب مورد استفاده قرار گرفت. ارتباطی نیز بین کاهش پارامترهای اسپرم و ناباروری حاصل نشد. پیشنهاد می‌شود که بررسی در جمعیت های بزرگتر و نیز در مکان های جغرافیایی دیگر و استان های دیگر نیز مورد مطالعه قرارگیرد. همچنین پیشنهاد می شود که از تکنیک های دقیق دیگری نظیر Real time PCR که قادر به شناسایی دقیق پارتیکل های ویروسی است جهت بررسی حضور ویروس استفاده گردد. باتوجه به اینکه این ویروس قابل انتقال از طریق جنسی می‌باشد بنابراین شریک جنسی مرد آلوده، قادر به انتقال عفونت به زوجه و در نهایت جنین بوجود آمده خواهد بود (۲۳). از سوی دیگر، یکی از روش های درمانی در کلینیک های ناباروری استفاده از اسپرم های اهدایی می‌باشد، در صورت وجود آلودگی در اسپرم اهدایی امکان انتشار آلودگی به تخمک لقاح یافته و در نهایت سقط جنین وجود دارد. بنابراین توصیه می‌شود که غربالگری اولیه جهت شناسایی ویروس صورت‌گیرد و درصورت مشاهده ویروس از روش های شستشوی اختصاصی جهت حذف آن استفاده گردد تا خطرات بعدی ناشی از تاثیر ویروس کاهش یابد (۲۴، ۲۵).

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری صمیمانه پرسنل کلینیک ناباروری جهاد دانشگاهی قم قدردانی می گردد.

تعارض منافع: بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

## References


1. Ahmad MK, Mahdi AA, Shukla KK, Islam N, Jaiswar SP, Ahmad S. Effect of Mucunapruriens on semen profile and biochemical parameters in seminal plasma of infertile men. Fertil Steril. 2008; 90:627-3.
2. La Vignera S, Condorelli R, Vicari E, D'Agata R, Calogero AE. Diabetes mellitus and sperm parameters. J Androl. 2012;33:145-53.
3. Revello MG, Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. Clin Microbiol Rev. 2002; 15:680-715.
4. Garollaa A, Pizzola D, Bertoldoa A, Menegazzoa M, Barzonb L, Forestaa C. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. J Reprod Immunol. 2013; 100(1):20-9.
5. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Cambridge: Cambridge University Press; 2010; 1-271.
6. Weyrich A. Preparation of Genomic DNA from Mammalian Sperm. Current protocols in Molecular Biology. Berlin, Germany. 2012; 17: 1-4.
7. 7.Kühn JE, Wendland T, Eggers HJ, Lorentzen E, Wieland U, Eing B, Kiessling M, Gass P. Quantitation of human cytomegalovirus genomes in the brain of AIDS patients. J Med Virol. 1995; 47:70-82.
8. Berger RE. Epididymites. In Holmes, K.K., Märdh, P.A., Sparling, P.F. and Wiesner, P.J. (eds), Sexually Transmitted Diseases. McGraw-Hill, New York, 1984, pp. 650–662
9. Gimenes F, Souza RP, Bento JC, Teixeira JJ, Maria-Engler SS, Bonini MG, Consolaro ME. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. Nat Rev Urol. 2014;11(12):672-87. doi: 10.1038/nrurol.2014.285.
10. Keck C, Gerber-Schafer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M.,. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. Hum Reprod Update.1998; 4:6,891-903.
11. Friberg J. Mycoplasmas and ureaplasmas in infertility and abortion. Fertil Steril. 1980; 33(4):351-9.
12. Colpi GM, Negri L. Inflammatory pathology of the genital tract and male infertility.Acta Eur Fertil 1989; 20:6,125-127.
13. Eggert-Kruse W, Reuland M, Johannsen W, Strowitzki T. Schlehofer, JR. Cytomegalovirus (CMV) infection—related to male and/or female infertility factors? Fertil Steril. 2009*;* 91: 67–82.
14. Neofytou E, Sourvinos G, Asmarianaki M, Spandidos DA, Makrigian-nakis A. Prevalence of human herpes virus types 1–7 in these men of men attending an infertility clinic and correlation with semen parameters. Fertil Steril. 2009; 91: 2487–2494.
15. Bresson JL, Clavequin MC, Mazeron MC, Mengelle C, Scieux C, Segondy M, Houhou N; Fédération Française des CECOS. Risk of cytomegalovirus transmission by cryopreserved semen: a study of 635 semen samples from 231 donors. Hum Reprod. 2003; 18: 1881–1886.
16. Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronia. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. Fertil Steril. 2003; 79:1566-1570.
17. McGowan MP, Hayes K, Kovacs GT, Leydon JA. Prevalence of cytomegalovirus and herpes simplex virus in human semen. Int J Androl 1983; 6:331–336.
18. 18.Yang YS, Ho HN, Chen HF, Chen SU, Shen CY, Chang SF, Huang ES, Wu CW. Cytomegalovirus infection and viral shedding in the genital tract of infertile couples. J Med Virol. 1995; 45:179–82.
19. Pallier C, Tebourbi L, Chopineau-Proust S, Schoevaert D, Nordmann P, Testart J, Courtot AM. Herpesvirus, cytomegalovirus, human sperm and assisted fertilization. Hum Reprod. 2002; 17: 1281–1287.
20. Habibi M, Bahrami A, Morteza A, Sadighi Gilani MA, Hassanzadeh G, Ghadami M, Choobineh H. Study of cytomegalovirus infection in idiopathic infertility men referred to Shariati hospital, Tehran, Iran. Iran J Reprod Med. 2014; 12: 151-154.
21. Wu KH, Zhou QK, Huang JH, Lai RQ, Lin FH, Li B, Zhang CB, Zhou WN, Zhu ZP. Infection of cytomegalovirus and herpes simplex virus and morphology of the infected spermatogenic cells in infertile men. Zhonghua Nan Ke Xue. 2007; 13:1075-1079.
22. Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Aderson DJ. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. Fertile Steril. 2007; 87:1087-1097.
23. Fowler KB, Pass RF. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. Pediatrics. 2006;118:e286-92**.**
24. Francisse S, Revelard P, De Maertelaer V, Strebelle E, Englert Y, Liesnard C. Human cytomegalovirus seroprevalence and risk of se roconversion in a fertility clinic population. Obstet Gynecol. 2009;114 (2 Pt 1):285-91. doi: 10.1097/AOG.0b013e3181af3d6f.
25. Adler SP. Screening for cytomegalovirus during pregnancy. Infect Dis Obstet Gynecol. 2011;2011:1–9