

بررسی آلودگی باکتریایی در مایع منی مردان با علت ناباروری نامشخص

علی نبی^۱، محمدعلی خلیلی^{۲*}، ایمان حلوائی^۱

چکیده

زمینه و هدف: یکی از عوامل مهم ایجاد ناباروری در مردان، عفونت‌های دستگاه تناسلی - ادراری است. 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. بنابراین، شناسایی گونه‌های باکتریایی عامل عفونت و تجویز آنتی‌بیوتیک مناسب می‌تواند منجر به بهبود پارامترهای اسپرم و در نتیجه باروری شود. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی عفونت باکتریایی در مایع منی افراد نابارور با علت نامشخص انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی، مایع منی ۶۵ مرد نابارور با علت نامشخص، مراجعه کننده به پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا آنالیز مایع منی طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (WHO) انجام شد، سپس برای بررسی عفونت‌های باکتری مایع منی، از دو محیط کشت بلاد آگار و EMB (اٹوزین متیلن بلو) استفاده گردید. برای تشخیص گونه باکتری تست‌های تکمیلی میکروبی گذاشته شد. برای تعیین همبستگی پارامترهای اسپرم بین دو گروه با و بدون آلودگی، آزمون ضریب همبستگی پیرسون به کار برده شد. سطح معنی‌داری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: در این مطالعه، ۴۰ نمونه به باکتری آلوده بودند. شیوع ۷ گونه باکتری در این نمونه‌ها مشاهده شد که بیشترین شیوع با ۱۶/۹٪ مربوط به *استافیلوکوکوس اروتوس* و کمترین شیوع مربوط به *پسودوموناس* و *آنتروکوک* با ۱/۵٪ بود.

نتیجه گیری: با توجه به شیوع بالای عفونت مایع منی در مردان نابارور، گذاشتن تست‌های میکروبی برای مردان نابارور با علت ناشناخته و تلاش برای درمان عفونت ادراری - تناسلی پیشنهاد می‌شود.

کلید واژه‌ها: مایع منی؛ عفونت‌های باکتریایی؛ ناباروری.

^۱ دانشجوی دکتری بیولوژی تولیدمثل، مرکز تحقیقات درمانی و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

^۲ دکتری جنین‌شناسی، مرکز تحقیقات درمانی و ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.

* نویسنده مسئول مکاتبات:

محمدعلی خلیلی، مرکز تحقیقات درمان ناباروری، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

khalili59@hotmail.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۳

تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۸

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Nabi A, Khalili MA, Halvaei I. An investigation of bacterial infection of seminal fluid in men with infertility with unknown etiology. Qom Univ Med Sci J 2014;8(5):48-53. [Full Text in Persian]

مقدمه

طبق گزارشها از هر چهار زوج یک زوج نابارور است که حدود ۶۰٪ این ناباروریها مربوط به مرد و بقیه مربوط به همسر یا علت‌های ناشناخته می‌باشد (۱). یکی از مهم‌ترین علت‌های ناباروری مردان، عفونت‌های مایع منی و مجاری تناسلی است. بعضی از مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک در مردان نابارور با عفونت مایع منی (باکتریواسپرمی) ارتباط دارد. عفونت به‌طور مستقیم موجب کاهش غیرطبیعی تعداد اسپرماتوزوئید مایع منی، کاهش تحرک و تغییرات مورفولوژی در اسپرم می‌شود و در نتیجه قدرت باروری را کاهش می‌دهد. همچنین به‌طور غیرمستقیم می‌تواند موجب عفونت، آسیب به بیضه، التهاب و در پی آن تحریک سیستم ایمنی بر علیه آنتی‌ژن‌های خودی همراه با لکوسیتو - اسپرمی شود که همه این عوامل می‌توانند مرد را دچار معضل ناباروری کنند (۲). طیف وسیعی از باکتری‌ها با درجات مختلف، در ایجاد ناباروری مردان نقش دارند (۳-۴).

بیشترین میزان عفونت مایع منی که باعث ناباروری در مردان می‌شود در آفریقا و کمترین میزان مربوط به کشورهای صنعتی بوده است (۵). عفونت‌های باکتریایی باعث به‌هم چسبیدن اسپرم (آگلوتیناسیون) می‌شوند، که این امر می‌تواند باعث بی‌تحرکی اسپرم‌ها گردد. میزان بی‌تحرکی به تجمع باکتری‌ها در مایع منی بستگی دارد. یکی از باکتری‌هایی که ایجاد آگلوتیناسیون می‌کند باکتری اشرشیاکلی می‌باشد (۶-۸). همچنین ایجاد التهاب حاد اپیدیدیم در اثر عفونت باکتریایی، در بیشتر موارد باعث مختل شدن فرآیند اسپرماتوزنز می‌شود که در اکثر موارد با تجویز صحیح آنتی‌بیوتیک بهبود یافته و پارامترهای اسپرم به حد نرمال خود می‌رسند (۳، ۹). یکی از عواملی که باعث پدیدار شدن آنتی‌بادی ضد اسپرم در مایع منی و سرم می‌شود تخریب سد خونی - بیضه‌ای در اثر عفونت است که این آنتی‌بادی‌های ضد اسپرم در اختلال عملکرد اسپرم نقش دارند (۱۴-۱۰). همچنین انتروکوکوس‌ها در مجرای منی نسبت به انتروباکتریاسه به میزان بیشتری وجود دارند (۱۰). این جنس باکتری‌ها باعث ایجاد التهاب در مجاری اپیدیدیم و پروستات می‌شوند. انتروکوکوس‌ها که جزء کوکوسی‌های گرم مثبت هستند اغلب در مایع منی یافت شده و معمولاً باعث پایین آوردن پارامترهای اسپرم نسبت به حالت

نرمال می‌شوند (۱۱-۱۲). استافیلوکوک‌ها نیز جزء باکتری‌هایی هستند که اغلب در مجرای ادراری مردان یافت شده و می‌توانند باعث آلودگی مایع منی شوند (۱۲). بعضی از باکتری‌ها مانند اشرشیاکلی به‌طور مستقیم بر روی باروری مردان تأثیر می‌گذارند. عفونت اشرشیاکلی در مردان با ایجاد عواملی مانند بی‌تحرکی اسپرم، التهاب اپیدیدیم و پروستات، باعث ناباروری می‌شود (۱۳). پسودوموناس نیز می‌تواند با ایجاد التهاب اپیدیدیم و پروستات باعث اختلال در پارامترهای اسپرم گردد (۱۴). این مطالعه با هدف تعیین میزان شیوع عفونت باکتریایی در مایع منی افراد نابارور با علت نامشخص انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه توصیفی - تحلیلی، تعداد ۶۵ نمونه منی مردان نابارور به‌طور تصادفی از بین سنین ۲۴-۵۵ سال، با علت ناباروری ناشناخته، مراجعه‌کننده به آزمایشگاه آندروولوژی پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد از تاریخ ۱۳۹۲-۱۳۹۱ انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت. بعد از آموزش نمونه‌گیری صحیح به افراد؛ نمونه‌ها در ظروف استریل جمع‌آوری شد. سپس برای مایع شدن، به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه درون انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. آنالیز مایع منی طبق دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی سال ۲۰۱۰ (WHO) انجام شد. برای شمارش تعداد و تحرک از لام Makler Chamber (۱۵) و برای ارزیابی قابلیت حیات از رنگ‌آمیزی ائوزین استفاده گردید (۱۶). با استفاده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا (شکل شماره ۱) مورفولوژی اسپرم بررسی شد (۱۵). برای بررسی عفونت‌های میکروبی، قارچی، باکتریایی؛ مقدار ۱۰ میکرولیتر از نمونه سیمن با سر سمپلر استریل به دو محیط کشت [بلاد آگار برای بررسی باکتری‌های گرم مثبت و منفی، EMB (ائوزین متیلن بلو) برای بررسی باکتری‌های گرم منفی] انتقال داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت، بعد از ۲۴ ساعت کشت‌ها جهت کلنی‌های میکروبی، قارچی و باکتریایی بررسی شدند. جهت تشخیص هویت کلنی‌های مشاهده‌شده، برای کلنی‌ها رنگ‌آمیزی گرم انجام شد. در ادامه، پس از مشاهده لام رنگ‌آمیزی شده و بررسی مورفولوژی آن؛ برای کلنی‌های گرم مثبت برحسب

در لامهای حاوی باسیل گرم منفی، برای تشخیص هویت باکتری از تست‌های گالری (TSI، سیترات آگار، MRVP، اوره آگار، SIM و LIA) استفاده شد. برای تشخیص *اشرشیاکلی* که جزء باسیل گرم منفی است، تست‌های گالری انجام گرفت، که در نتیجه کلنی‌های *اشرشیاکلی* اندول و MR مثبت؛ سیترات آگار و VP منفی بود (۱۷). برای تعیین همبستگی پارامترهای اسپرم بین دو گروه با و بدون آلودگی، از آزمون ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. سطح معنی‌داری، کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

از ۶۵ مرد مورد بررسی، ۹/۵٪ سیگاری بودند. نتایج نشان داد از ۶۵ نمونه، ۴۰ نمونه آلوده به باکتری بوده‌اند. همچنین ۷ گونه باکتری در این نمونه‌ها مشاهده گردید که بیشترین فراوانی با ۱۶/۹٪ مربوط به *استافیلوکوکوس اروئوس* و کمترین فراوانی مربوط به *پسودوموناس* و *انتروکوک* با ۱/۵٪ بود (جدول شماره ۱).

کوکسی و باسیل بودن؛ تست‌های تشخیصی و برای کوکسی گرم مثبت؛ تست کاتالاز گذاشته شد؛ کلنی‌های کاتالاز مثبت، *استافیلوکوک* و کاتالاز منفی *استرپتوکوک* در نظر گرفته شدند. برای تشخیص گونه‌ای تست‌های کوآگولاز لوله‌ای؛ تخمیر مانیتول، حساسیت به دیسک‌های نوویوسین، همولیز روی بلادآگار، هیدرولیز هیپورات، هیدرولیز اسکولین و رشد روی نمک ۶/۵٪ صورت گرفت. کوکسی‌های گرم مثبت با تست کوآگولاز مثبت و تخمیر مانیتول مثبت، *استافیلوکوکوس اروئوس*؛ کوکسی‌های گرم مثبت با تست کوآگولاز منفی و تخمیر مانیتول منفی، *استافیلوکوکوس اپیدرمیس* و کوکسی‌های گرم مثبت با تست کوآگولاز منفی، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* در نظر گرفته شدند. همچنین کلنی‌هایی که روی Sheep Blood agar همولیز بتا ایجاد کردند و هیدرولیز هیپورات آنها مثبت بود، *استرپتوکوکوس بتا همولا تیک* و کوکسی‌های گرم مثبتی که تست هیدرولیز اسکولین آنها مثبت و روی محیط ۶/۵٪ نمک رشد کرده بودند *انتروکوک* در نظر گرفته شدند.

جدول شماره ۱: فراوانی انواع گونه‌های باکتریایی عفونت‌های مایع منی مردان نابارور با علت نامشخص

گونه‌های باکتریایی تشخیصی	تعداد	درصد
<i>استافیلوکوکوس اروئوس</i>	۱۱	۱۶/۹
<i>استافیلوکوکوس اپیدرمیس</i>	۹	۱۳/۸
<i>استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس</i>	۸	۱۲/۳
<i>اشرشیاکلی</i>	۸	۱۲/۳
<i>استرپتوکوکوس بتا همولا تیک</i>	۲	۳/۱
<i>پسودوموناس</i>	۱	۱/۵
<i>انتروکوک</i>	۱	۱/۵
بدون عفونت	۲۵	۳۸/۵
جمع	۶۵	۱۰۰

مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ آمیزی پاپانیکولا بررسی شد (شکل). نتایج حاصل از آنالیز مایع منی نمونه‌های مورد نظر که شامل حجم، تعداد، تحرک، مورفولوژی و قابلیت حیات می‌باشد در جدول شماره ۲ آورده شده است. بین عفونت باکتریایی و حجم نمونه، میزان حرکت پیشرونده، مورفولوژی، میزان قابلیت حیات، همبستگی معنی‌دار آماری مشاهده نشد (در تمام موارد $p > 0.05$).

در کشت میکروبی ۷۰٪ از نمونه‌های منی، تنها یک نوع باکتری و در ۳۰٪ بقیه، بیش از یک نوع باکتری رشد کرد. استافیلوکوکوس اروتوس و اپیدرمیس ۱۳/۴٪؛ اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اپیدرمیس ۸/۷٪؛ استافیلوکوکوس و اشرشیاکلی ۵/۶٪؛ اشرشیاکلی، انتروکوک و استافیلوکوکوس اروتوس ۲/۳٪ رشد کردند.

جدول شماره ۲: میانگین آنالیز مایع منی مردان آلوده به عفونت میکروبی و بدون آلودگی

پارامترهای اسپرم	حجم (cc)	تعداد ($\times 10^6$)	حرکت پیشرونده (%)	حرکت درجا (%)	بدون تحرک (%)	مورفولوژی (%)	قابلیت حیات (%)
مایع منی مردان آلوده	۳/۲۶ ± ۱/۳۳	۹۲/۱۵ ± ۶۵	۴۸/۹۸ ± ۱۸/۸۳	۱۰ ± ۳/۲۳	۴۰/۲۳ ± ۱۸/۴۸	۲۶/۴۳ ± ۱۰/۷۹	۶۹/۱۳ ± ۱۹/۳۹
مایع منی مردان بدون آلودگی	۳/۲۱ ± ۱/۲۵	۱۰۰/۷۶ ± ۴۳/۱۱	۶۲/۵۶ ± ۸/۸۹	۸/۲۸ ± ۲/۳۵	۲۹/۱۶ ± ۶/۴۵	۳۷/۷۲ ± ۱۲/۴۵	۸۲/۰۸ ± ۱۰/۸۹

داده‌ها بر اساس انحراف معیار \pm میانگین می‌باشد. در هیچ کدام از متغیرها بین دو گروه اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشده است.



شکل: مورفولوژی اسپرم انسانی با رنگ آمیزی پاپانیکولا

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد هفت گونه باکتریایی در ایجاد عفونت مایع منی مردان مراجعه‌کننده به پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد نقش داشته‌اند که بیشترین شیوع مربوط به گونه‌های استافیلوکوکوس و اشرشیاکلی بوده است، این باکتری‌ها از مهم‌ترین عوامل ایجادکننده ناباروری در مردان به شمار می‌آیند که این نتایج با یافته‌های مطالعه Holmes و همکاران همخوانی داشت. آنها گزارش کردند اشرشیاکلی یکی از مهم‌ترین عفونت‌های علامت‌دار و یا بدون علامت دستگاه ادراری - تناسلی بوده و می‌تواند پارامترهای اسپرم مانند تحرک و متابولیسم را تغییر دهد، همچنین نشان دادند وجود اشرشیاکلی

موجب مرگ ۸۰٪ اسپرم‌ها در شرایط خارج از بدن می‌شود (۱۸). در مطالعه‌ای مشابه که توسط McGowan انجام شد مشخص گردید مایع منی ۱۵٪ از مردان بارور و ۳۶٪ افراد نابارور دارای عفونت باکتریایی است (۲). همچنین Kessler و همکاران در گزارش خود اعلام کردند چنانچه تعداد اشرشیاکلی از 10^8 عدد در منی تجاوز کند باعث تخریب پارامترهای اسپرم می‌شود. البته این آزمایشها در *in vitro* انجام گرفته بود، بنابراین ارتباط دادن آن به *in vivo* نمی‌تواند توجیه‌پذیر باشد (۱۹). Merino و همکاران نیز (سال ۱۹۹۵) مایع منی مردانی را که به دلیل ناباروری به کلینیک آندروولوژی مراجعه کرده بودند مورد آزمایش میکروبی قرار دادند، نتایج نشان داد در بین باکتری‌های هوازی،

نتایج مطالعه دیگری که توسط ریحانی و همکاران بر روی ۵۸ نمونه مایع منی مردانی که به دلیل مشکل باروری به کلینیک IVF مراجعه کرده بودند انجام شد نشان داد از این تعداد ۲۵ نمونه دارای کشت مثبت بوده‌اند که باکتری‌های ایزوله شده عبارت بودند از: *اشرشیاکلی*، *استرپتوکوکوس بتا همولایتیک*، *مایکوپلاسما هومینیس* و *اوروپلاسما اورولیتیکوم* (۲۵).

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد بیشتر نمونه‌های مایع منی مردان نابارور با علت نامشخص، دارای آلودگی باکتریایی است. گونه‌های *استافیلوکوکوس* و *اشرشیاکلی* بیشترین میزان آلودگی را داشتند که می‌تواند عامل ناباروری با علت ناشناخته در این افراد باشد. بنابراین، تجویز آنتی‌بیوتیک مناسب توسط پزشک و رفع عفونت میکروبی و برگشت پارامترهای اسپرم به حالت طبیعی می‌تواند باعث باروری این مردان گردد. با توجه به شیوع بالای عفونت مایع منی در مردان نابارور؛ گذاشتن تست‌های میکروبی برای مردان نابارور با علت ناشناخته و تلاش برای درمان عفونت ادراری - تناسلی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از مدیریت پژوهشکده علوم تولیدمثل یزد به خاطر حمایت ایشان و راهنمایی‌های آقای محمدحسین رازی و آقای علی‌رضا ترکی در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

بیشترین باکتری‌ها؛ *استافیلوکوک* *اپیدرمیس* (۶۴٪)، *استرپتوکوکوس ویریدانس* (۲۸٪)، *اشرشیاکلی* (۹٪)، *استافیلوکوک اروئوس* (۴٪)، *استرپتوکوکوس فکالیس* (۵٪)، *انتروباکتر* (۴٪) و *استرپتوکوکوس بتا همولایتیک* (۴٪) بوده است. این محققین در مقاله خود تأکید داشتند وجود باکتری در منی؛ اثر نامطلوب مستقیم بر روی کیفیت اسپرم داشته و احتمال سوق بیمار به آرواسپرمی را پیش‌بینی می‌کند (۲۰).

بنابراین، یکی از دلایلی که باعث گردید بین پارامترهای اسپرم شامل حجم، حرکت پیشرونده، مورفولوژی و قابلیت حیات با عفونت‌های میکروبی همبستگی وجود نداشته و پارامتر اسپرم‌ها دارای عفونت نرمال باشد، فاکتورهای نامشخص ناباروری بود (۲۱-۲۲). همچنین احتمال دارد عفونت‌های باکتری در اشخاص، به دلیل فاکتورهای نامشخص ناباروری بر روی ساختار درون سلولی و بر روی DNA اسپرم تأثیرگذار باشد (۲۳)، لذا پیشنهاد می‌گردد در مطالعات بعدی اثر عفونت‌های باکتریایی بر روی DNA اسپرم افراد با علت نامشخص بررسی گردد. در یک مطالعه دیگر توسط اخلاقی و همکاران در انستیتو رازی، تعداد ۴۴ نمونه از مایع منی مردان نابارور مورد آزمایش قرار گرفت. در این بررسی، *مایکوپلاسما بوویس*، *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوک کوآگولاز منفی*، *میکروکوکوس* و *پروتئوس باکتریایی* از اسپرم مایع منی نمونه‌ها جدا شد. نکته جالب توجه در این مطالعه این بود که نوع *مایکوپلاسما جداسده* برخلاف گزارشهای کشورهای صنعتی که *اوروپلاسما اورولیتیکوم* می‌باشد نوع *بوویس* بود (۲۴).

References:

- Ahmad MK, Mahdi AA, Shukla KK, Islam N, Jaiswar SP, Ahmad S. Effect of *Mucuna pruriens* on semen profile and biochemical parameters in seminal plasma of infertile men. *Fertil Steril* 2008 Sep; 90(3):627-35.
- McGowan M, Burger H, Baker H, Kretser D, Kovacs G. The incidence of non-specific infection in the semen in fertile and sub-fertile males. *Int J Androl* 1981 Dec; 4(6):657-62.
- Keck C, Gerber-Schäfer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M. Seminal tract infections: Impact on male fertility and treatment options. *Hum Reprod Update* 1998;4(6):891-903.
- Skakkebaek NE, Giwercman A, De Kretser D. Pathogenesis and management of male infertility. *Lancet* 1994 Jun 11;343(8911):1473-9.
- Cates W, Farley TM, Rowe PJ. Worldwide patterns of infertility: Is Africa different? *Lancet* 1985 Sep 14;2(8455): 596-8.

6. Aurox M, Jacques L, Mathieu D, Auer J. Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: An in-vitro study in man with Escherichia coli. *Int J Androl* 1991 Aug; 14(4):264-70.
7. Monga M, Roberts JA. Spermagglutination by Bacteria: Receptor-specific Interactions. *J Androl* 1994;15(2):151-6.
8. Wølner-Hanssen P, Mårdh P. In vitro tests of the adherence of Chlamydia trachomatis to human spermatozoa. *Fertil Steril* 1984 Jul; 42(1):102-7.
9. Weidner W, Garbe C, Weissbach L, Harbrecht J, Kleinschmidt K, Schiefer H, et al. Initial therapy of acute unilateral epididymitis using ofloxacin. II. Andrological findings. *Urologe A* 1990 Sep; 29(5):277-80.
10. Svenstrup HF, Fedder J, Kristoffersen SE, Trolle B, Birkelund S, Christiansen G. Mycoplasma genitalium, chlamydia trachomatis, and tubal factor infertility-a prospective study. *Fertil Steril* 2008 Sep; 90(3):513-20.
11. Rodin DM, Larone D, Goldstein M. Relationship between semen cultures, leukospermia, and semen analysis in men undergoing fertility evaluation. *Fertil Steril* 2003 Jun; 79(Suppl 3):1555-8.
12. Virecoulon F, Wallet F, Fruchart-Flamenbaum A, Rigot JM, Peers MC, Mitchell V, et al. Bacterial flora of the low male genital tract in patients consulting for infertility. *Andrologia* 2005 Oct; 37(5):160-5.
13. 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 May; 75(5):800-4.
14. Lauper U, Schlatter C. Adnexitis und pelvic inflammatory disease. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch* 2005 Jan; 45(1):14-8.
15. Nabi A, Khalili M, Halvaei I, Roodbari F. Prolonged incubation of processed human spermatozoa will increase DNA fragmentation. *Andrologia* 2014 May; 46(4):374-9.
16. Halvaei I, Sadeghipour Roodsari HR, Naghibi Harat Z. Acute effects of ruta graveolens L. On sperm parameters and DNA integrity in rats. *J Reprod Infertil* 2012 Jan; 13(1):33-8.
17. Khalili M, Pourshafie M, Saifi M, Khalili M. Bacterial infection of the reproductive tract of infertile men in Iran. *Middle East Fertil Soc J* 2000;5:126-31.
18. Holmes K, Berger R, Alexander E. Acute epididymitis: Etiology and therapy. *Arch Androl* 1979 Dec; 3(4):309-16.
19. Kessler HH, Pierer K, Stuenzner D, Auer-Grumbach P, Haller E-M, Marth E. Rapid detection of chlamydia trachomatis in conjunctival, pharyngeal, and urethral specimens with a new polymerase chain reaction assay. *Sex Transm Dis* 1994;21(4):191-5.
20. Merino G, Carranza-Lira S, Murrieta S, Rodriguez L, Cuevas E, Moran C. Bacterial infection and semen characteristics in infertile men. *Arch Androl* 1995;35(1):43-7.
21. Berger R, Karp L, Williamson R, Koehler J, Moore D, Holmes K. The relationship of pyospermia and seminal fluid bacteriology to sperm function as reflected in the sperm penetration assay. *Fertil Steril* 1982 Apr; 37(4):557-64.
22. Dubin L, Amelar R. Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril* 1971 Aug; 22(8): 469-74.
23. Talebi A, Vahidi S, Aflatoonian A, Ghasemi N, Ghasemzadeh J, Firoozabadi R, et al. Cytochemical evaluation of sperm chromatin and DNA integrity in couples with unexplained recurrent spontaneous abortions. *Andrologia* 2012 May; 44(Suppl 1):462-70.
24. Akhlaghi F, Yousefi J. Isolation of Mycoplasma species of sperm. *Third Iran Congress of Microbiology*. 2000 Hamadan, Iran. [Text in Persian]
25. Rihani F, Badami N. Bacterial factors in seminal plasma of infertile patients admitted to the school of public health laboratories. *Third Iran Congress of Microbiology*. 2000, Hamadan, Iran. [Text in Persian]