ردیابی هرپس سیمپلکس ویروس، کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلاسما ژنیتالیوم در نمونه منی مردان نابارور در استان کرمان به روش Multiplex-PCR در سال ۱۳۹۵

آیدا پورمحمدی سیاهکلی[۱]، دکتر کیومرث امینی[۲*]

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.
۲. استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۶ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۷/۰۲/۱۰

خلاصه

مقدمه: عفونت‌های دستگاه تناسلی - ادراری، یکی از عوامل مهم ایجاد ناباروری در مردان می‌باشد. این عفونت‌ها با اختلال در پارامترها (مانند تعداد، تحرک، قابلیت حیات و مورفولوژی) و عملکرد اسپرم و همچنین ایجاد التهاب اپی‌دیدیم موجب ناباروری در مردان می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف تعیین فراوانی عفونت هرپس ویروس، کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلاسما ژنیتالیوم در مایع منی افراد نابارور با علت نامشخص انجام شد.

روش‌کار: در این مطالعه توصیفی - تحلیلی، مایع منی ۶۰ مرد نابارور مراجعه‌کننده به مرکز درمان ناباروری کرمان در طی یک بازه زمانی ۶ ماهه (از ابتدای خرداد تا انتهای آبان ۱۳۹۵) مورد بررسی قرار گرفت. سپس multiplex-PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جهت شناسایی هرپس ویروس، کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلاسما ژنیتالیوم انجام شد. تمامی نتایج حاصل از مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: در این مطالعه در مجموع ۸ نمونه (۱۳/۳٪) از ۶۰ نمونه مورد آزمایش از نظر وجود ارگانیسم‌های مورد مطالعه مثبت بودند. در بین نمونه‌های مثبت، ۳ مورد (۳۷/۵٪) HSV-1، ۳ مورد (۳۷/۵٪) کلامیدیا تراکوماتیس (CT)، ۱ مورد (۱۲/۵٪) مایکوپلاسما ژنیتالیوم (Mg) و ۱ مورد (۱۲/۵٪) HSV-2 جدا شد.

نتیجه‌گیری: بررسی فراوانی ارگانیسم‌های مورد مطالعه در نمونه مایع منی مردان می‌تواند راهنمایی برای غربالگری‌های بعدی از نظر عفونت‌های بدون علامت و درمان مناسب قبل از شروع درمان‌های کمک باروری باشد.

کلمات کلیدی: عفونت‌های میکروبی، مایع منی، ناباروری

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر کیومرث امینی؛ دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران. **تلفن:** ۰۹۱۲۵۴۵۴۰۷۴؛ **پست الکترونیک:** dr_kumarss_amini@yahoo.com

مقدمه

ناباروری، یکی از مشکلات مهم در زندگی زوجین است و این در حالی است که تقریباً علت ۶۰٪ از موارد ناباروری مربوط به مرد و باقی موارد مربوط به زن یا هر دو است (۱). از عوامل عمده مربوط به مردان می‌توان به آسیب‌های اندام تناسلی، عفونت‌های مایع منی، بیضه‌ها، مجاری تناسلی و غدد تناسلی ضمیمه، واریکوسل، انسداد مجاری تناسلی، بیماری‌های اندوکرین و متابولیک اشاره کرد. در این میان، عفونت‌های باکتریایی و ویروسی سیستم تناسلی از عوامل شایع می‌باشند و طیف وسیعی از باکتری‌ها با درجات مختلف، در ایجاد ناباروری در مردان نقش دارند (۲، ۳). عفونت‌ها، با مکانیسم‌های مختلفی باعث اختلال در فرآیند باروری می‌شوند. این مکانیسم‌ها شامل آسیب به فرآیند اسپرماتوژنز، اختلال در عملکرد اسپرم و انسداد مجاری تناسلی می‌باشند (۴). مطالعات نشان داده‌اند که فرآیند اسپرماتوژنز در ۶۰٪ بیماران با التهاب حاد اپی‌دیدیم به طور موقت مختل می‌شود و درمان آنتی‌بیوتیکی، پارامترهای مایع منی را به مقادیر نرمال باز می‌گرداند (۵). میکروب‌ها و ویروس‌های مختلفی باعث عفونت سیستم تناسلی در مردان می‌شوند. بیماری سوزاک در گذشته، شایع‌ترین عامل انسداد مجاری تناسلی در مردان بود که البته امروزه به ندرت مواردی از انسداد در اثر سوزاک مشاهده می‌شود. مایکوپلاسماهای تناسلی به فراوانی در مجرای تناسلی و منی هر دو گروه مردان (افراد دارای قدرت باروری و افراد فاقد قدرت باروری) حضور دارند (۶). به طور واضح مشخص نشده است که مایکوپلاسما هومینیس و اوره آپلاسما آوره آلیتیکوم عوامل سبب‌ساز واقعی بیماری‌های تناسلی (اورتریت، پروستاتیت و در موارد نادری اورکیت) باشند، اما حضور مایکوپلاسما ژنیتالیوم اغلب با بیماری مرتبط می‌باشد (۷). نتایج مطالعات بر روی حیوانات و انسان‌ها نشان می‌دهد که مایکوپلاسماها عاملین ایجاد کننده اورتریت غیرکلامیدیایی و غیرگونوکوکی (NGU)[1] در مردان می‌باشند (۸). کلامیدیا تراکوماتیس، یک باکتری گرم منفی، فاقد اسپور و درون سلولی اجباری است. بیماری ناشی از کلامیدیا تراکوماتیس، فراوان‌ترین بیماری باکتریایی منتقل‌شونده از طریق جنسی در کشورهای صنعتی می‌باشد و تخمین زده می‌شود که سالانه در ایالات متحده آمریکا در حدود ۴×۱۰^{۶} مورد بیماری رخ دهد. کلامیدیا تراکوماتیس را می‌توان در ۷۰٪ از بیماران مبتلا به اورتریت حاد و مزمن شناسایی کرد. کلامیدیا تراکوماتیس دارای انتشار جهانی است و هر دو جنس را درگیر می‌کند. عفونت‌های کلامیدیایی در بسیاری از موارد به صورت خاموش باقی می‌مانند. این پاتوژن، به‌ویژه زنان جوان و بالغین فعال از نظر جنسی را درگیر می‌کند (۹). ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ و ۲ می‌تواند از طریق تماس پوستی، بوسیدن، تماس جنسی و سکس دهانی منتقل شود که در این بین، تیپ ۱ اغلب از راه بوسیدن و تیپ ۲ اغلب از طریق تماس جنسی اشاعه می‌یابد، لذا اشاعه تیپ ۲ در افراد مبتلا به ایدز باعث شده که شیوع این بیماری به عنوان شاخصی از بیماری‌های مقاربتی به شمار آید. علاوه بر این، ویروس هرپس سیمپلکس، اغلب اعضای بدن مانند چشم، مغز، پوست و دستگاه تناسلی را درگیر نموده و باعث بیماری‌های مختلفی از قبیل انسفالیت هرپسی، کراتوکونژکتیویت، عقربک هرپسی، سقط عفونی و سقط خودبه‌خودی می‌شود. هرپس تناسلی معمولاً به‌وسیله HSV-2 ایجاد می‌شود، اما می‌تواند توسط HSV-1 در بیشتر از ۱۵٪ موارد نیز ایجاد شود (۱۰). در مطالعه والد و همکاران (۱۱) در واشنگتن، ۷۴٪ افراد واجد علائم بالینی هرپس ژنیتال با HSV-2 و ۲۶٪ افراد با HSV-1 آلوده بودند. اکثر عفونت‌های تناسلی اولیه بدون علائم هستند. در هنگام بروز ضایعه، تعداد ضایعات متفاوت بوده و دردناک هستند. در افراد مذکر، ضایعات به‌طور مشخص در روی glans یا shaft از penis و گاهی در پیشابراه توسعه می‌یابد. عوارض این عفونت، شامل ضایعات خارج تناسلی (در حدود ۲۰٪ موارد) و مننژیت آسپتیک (در حدود ۱۰٪ موارد) می‌باشد. پس از رخ دادن عفونت اولیه، ویروس در بدن باقی می‌ماند و عفونت نهفته ایجاد می‌کند و این مسئله تا زمان حیات میزبان ادامه می‌یابد (۱۲). با توجه به

[1] Nongonococcal urethritis

نقش عفونت‌های تناسلی در ناباروری مردان، جستجوی عوامل شایع عفونت میکروبی در مایع منی مردان نابارور و تلاش برای درمان عفونت ادراری - تناسلی از ضروریات محسوب شده، لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی میزان شیوع آلودگی برخی باکتری‌ها و ویروس‌ها در نمونه‌های منی مردان نابارور به روش Multiplex-PCR انجام شد.

روش‌کار

در این مطالعه توصیفی- مقطعی (cross-sectional)، ۶۰ مایع منی غیر تکراری از مردان نابارور مراجعه کننده به مرکز فوق تخصصی درمان ناباروری نجمیه و مرکز درمان نازایی و ناباروری در مرکز آموزشی درمانی افضلی‌پور کرمان در طی یک بازه زمانی ۶ ماهه (از ابتدای خرداد تا انتهای آبان ۱۳۹۵) به صورت کاملاً تصادفی (راندوم) اخذ شد. با انجام معاینات و آزمایشات خاص (از جمله اسپرموگرام) ناباروری آن‌ها توسط پزشک متخصص آندرولوژی ثابت شده بود. معیارهای ورود به مطالعه شامل: عدم وجود هرگونه علائم بالینی مربوط به عفونت‌های مجاری ادراری- تناسلی، نداشتن عوارضی مانند واریکوسل و عدم قرار گرفتن در معرض مواد توکسیک و عدم مصرف آنتی‌بیوتیک تا یک هفته قبل از نمونه‌گیری بود. لازم به ذکر است که قبل از نمونه‌گیری، فرم اعلام رضایت توسط تمام بیماران امضاء شد. نمونه توسط بیمار در داخل ظرف استریل جمع‌آوری می‌شد. قبل از نمونه‌گیری از بیماران خواسته شد که ادرار کنند و دست‌ها، آلت و بیضه خود را با آب و صابون بشویند تا بدین‌وسیله احتمال انتقال باکتری‌های هم زیست پوست به داخل نمونه مایع منی به حداقل برسد (۱۳). استخراج DNA باکتری و ویروس با استفاده از کیت Bioneer (محصول کشور کره جنوبی) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. در مرحله بعدی ردیابی ژن‌های باکتری و ویروس با استفاده از PCR چندگانه انجام شد. ابتدا پرایمرهای اختصاصی از شرکت سیناکلون (تهران، ایران) تهیه (جدول ۱) و واکنش Multiplex-PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی (۰/۰۵ U/µl) Taq DNA polymerase، (3 mM) MgCl2 و dNTPs (۰/۴ mM)، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) به صورت زیر انجام گرفت.

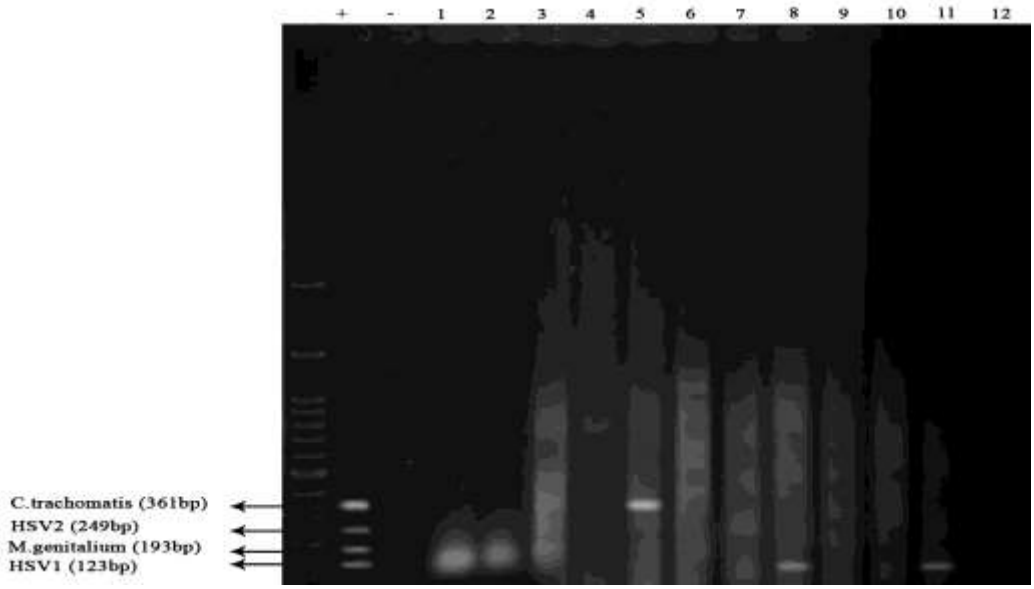
واکنش Multiplex- PCR شامل یک سیکل دناچوراسیون اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ سیکل شامل ۳۰ ثانیه دناچوراسیون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه Annealing در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ ثانیه Extention در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد و با Final extention به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه یافت. الکتروفورز محصولات تکثیر شده در PCR بر روی آگارز ۱/۵٪ انجام شد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده (جدول ۱) (۱۴)

Primer	Oligonucleotide Sequence (5′→ 3′)	Amplicon size (bp)
C. trachomatis	Forward: 5′ -TCTTTTTAAACCTCCGGAACCCACTT- 3′ Reverse: 5′ -GGATGGCATCGCATAGCATTCTTTG- 3′	361
M. genitalium	Forward: 5′ -ACCTTGATGGTCAGCAAAACTT- 3′ Reverse: 5′ - CCTTTGATCTCATTCCAATCAGTA- 3′	193
HSV-2	Forward: 5′ - CATGGGGCGTTTGACCTC - 3′ Reverse: 5′ - TACACAGTGATCGGGATGCT - 3′	249
HSV-1	Forward: 5′ - CTGTGGTGTTTTTGGCATCA - 3′ Reverse: 5′ - GGTTGTGGAGGAGACGTTG - 3′	123

یافته‌ها

تمامی ۶۰ نمونه منی به‌دست آمده با استفاده از روش Multiplex-PCR تحت مطالعه قرار گرفتند. در مجموع، تعداد ۸ نمونه (۱۳/۳٪) از نظر وجود عفونت با هرپس ویروس، کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلاسما ژنیتالیوم مثبت بودند. نتایج نشان داد که فراوانی هرپس سیمپلکس تیپ ۱، کلامیدیا تراکوماتیس، هرپس سیمپلکس تیپ ۲ و مایکوپلاسما ژنیتالیوم به ترتیب برابر ۳ (۳۷/۵٪)، ۳ (۳۷/۵٪)، ۱ (۱۲/۵٪) و ۱ (۱۲/۵٪) بود.



تصویر ۱- نتیجه آزمایش M-PCR بر روی تعدادی از نمونه‌های منی اخذ شده از مردان نابارور، به ترتیب از چپ به راست: مارکر ۱۰۰ bp DNA pluse marker، + کنترل مثبت، - کنترل منفی، HSV-1 با طول باند ۱۲۳ bp، مایکوپلاسما ژنیتالیوم با طول باند ۱۹۳ bp، HSV-2 با طول باند ۲۴۹ bp و کلامیدیا تراکوماتیس با طول ۳۶۱ bp می‌باشند.

بحث

عفونت‌های دستگاه تناسلی یکی از علل بسیار مهم ناباروری در مردان هستند؛ به‌طوری‌که ۳۵-۸٪ ناباروری مردان در سراسر جهان مربوط به عفونت‌های مجرای ادراری - تناسلی می‌باشد (۱۵).

در مطالعه حاضر فراوانی کلامیدیا ۵٪ و مایکوپلاسما ژنیتالیوم ۱/۶٪ بود. صدرپور و همکاران (۲۰۱۳) در جمعیت مردان نابارور، فراوانی کلامیدیا و مایکوپلاسما ژنیتالیوم را به ترتیب ۱۲/۵٪ و ۲۳/۳٪ گزارش کردند (۱۳). در مطالعه گدورا و همکاران (۲۰۰۸، ۲۰۰۷) شیوع کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلاسما ژنیتالیوم در مردان نابارور به ترتیب ۴۲/۳٪ و ۵٪ گزارش گردید (۱۶، ۱۷). در مطالعه دادی و همکاران (۲۰۰۴) در فرانسه، ۲/۷٪ از نمونه‌های مایع منی شرکای جنسی مرد فاقد علامت در زوجین نابارور برای کلامیدیا تراکوماتیس مثبت گزارش شد که از شیوع کلامیدیا نسبت به مطالعه حاضر کمتر بود (۱۸). در مطالعه لی و همکاران (۲۰۰۷) در کره، فراوانی کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلاسما ژنیتالیوم به ترتیب ۲۲/۹٪ و ۲۷/۱٪ گزارش شد (۱۹). مطالعه گلشنی و همکاران (۲۰۰۷) در ایران نیز شیوع عفونت کلامیدیا تراکوماتیس را در مردان نابارور را ۱۷٪ گزارش کرد (۲۰).

مطالعات مختلف در کشورهای صنعتی، شیوع کلامیدیا تراکوماتیس و مایکوپلاسماهای ژنیتالیوم را در همسران مردان نابارور و نقش با اهمیت این عفونت‌ها را در برخی موارد ناباروری اثبات کرده‌اند، اما هنوز در کشورهای در حال توسعه موقعیت این مسئله به‌طور مشخص بیان نشده است (۱۳).

در مطالعه حاضر، فراوانی HSV-1 و HSV-2 به ترتیب ۵٪ و ۱/۶٪ بود. در مطالعه کاپرانوس و همکاران (۲۰۰۳) در یونان که بر روی مردان نابارور انجام شد، با استفاده از

روش Nested-PCR، HSV DNA را در ۵۶ نمونه (۴۹/۵٪) منی ردیابی کردند. وجود HSV به‌طور معناداری در نمونه‌های منی با شمارش کم و حرکت ضعیف مرتبط بود (۲۱). در مطالعه والد و همکاران (۱۹۹۸) در واشینگتن (آمریکا) که با هدف شناسایی DNA ویروس هرپس سیمپلکس در منی مردان با عفونت ژنیتال HSV-2 با استفاده از روش PCR انجام شد، DNA ویروس هرپس در ۸ مورد (۳/۱٪) از نمونه‌های منی به‌دست آمد (۲۲). در مطالعه شیخ و همکاران (۲۰۱۴) در هندوستان، در جمعیت مردان نابارور در ۶۹ نمونه منی به‌دست آمده، ۱۳ نمونه (۱۸/۸٪) از نظر هرپس سیمپلکس مثبت بودند (۲۳). در مطالعه صالحی وزیری و همکاران (۲۰۱۰) در ایران که بر روی ۷۰ نمونه منی مردان نابارور HSV-1 Real Time PCR انجام شد، فراوانی ژنوم ویروس HSV-1 ۲۲/۸۶٪ بود (۲۴). تفاوت در شیوع ارگانیسم‌های مورد مطالعه در مطالعات مختلف احتمالاً ناشی از تفاوت‌های موجود در جمعیت مورد مطالعه از نظر نژاد و منطقه جغرافیایی، تفاوت در طراحی مطالعه از جمله روش‌های بررسی نمونه‌ها، تفاوت در حساسیت پرایمرهای مورد استفاده و حجم نمونه مورد بررسی می‌باشد.

امروزه قبل از انجام تکنیک‌های درمان ناباروری، درمان آنتی‌بیوتیکی خاصی برای مردان پیشنهاد نمی‌شود، لذا بررسی فراوانی این ارگانیسم‌ها در نمونه مایع منی مردان می‌تواند راهنمایی برای غربالگری‌های بعدی از نظر عفونت‌های بدون علامت و درمان مناسب قبل از شروع درمان‌های کمک باروری باشد. همچنین از آنجا که عوامل میکروبی متعددی در ایجاد عفونت‌های ژنیتال در هر دو جنس دخالت دارند، استفاده از تکنیک Multiplex-PCR برای ردیابی طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های مرتبط با بیماری‌های ژنیتال در طی تنها یک واکنش، علاوه بر اینکه می‌تواند کمک شایانی که در شناسایی موارد عفونت همزمان و متعاقباً درمان کامل افراد آلوده و جلوگیری از حضور افراد بیمار درمان نشده در جامعه کند و اطلاعاتی را در خصوص چگونگی وضعیت پنل پاتوژن‌های متعدد دخیل در اختیار سیستم بهداشتی جامعه قرار دهد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر از ۶۰ نمونه منی مورد مطالعه، ۸ نمونه (۱۳/۳٪) دارای عفونت میکروبی بودند و گونه‌های هرپس سیمپلکس تیپ-۱ و کلامیدیا تراکوماتیس دارای بیشترین فروانی بودند که می‌تواند عامل ناباروری با علت ناشناخته در این افراد باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمام پرسنل محترم بخش آزمایشگاه خصوصی تحقیقاتی پاسارگاد واقع در استان تهران که ما را در انجام این پروژه یاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Glasier A, Gülmezoglu AM, Schmid GP, Moreno CG, Van Look PF. Sexual and reproductive health: a matter of life and death. Lancet 2006; 368(9547):1595-607.
2. Koneman EW. Sexullay transmitted diseases. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G, editors. Textbook of diagnostic microbiology. Missouri: Andrew Allen; 2007. P. 1031-46.
3. Nguyen TV, Van Khauu N, Thi Le TT, Vguyen AP, Cao V, Tham DC, et al. Sexually transmitted infections and risk factors for gonorrhea and chlamydia in female sex workers in Soc Trang, Vietnam. Sex Transm Dis 2008; 35(11):935-40.
4. Heis M, Amarin Z, Ibrahim AY, Obeidat N, Obeidat B, Omari M. Uterine and tubal anatomical abnormalities in infertile women: diagnosis with routine hysterosalpingography prior to selective laparoscopy. SA J Radiol 2011; 15(4):121-2.
5. Ballow D, Meistrich ML, Matzuk M, Rajkovic A. Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation. Dev Biol 2006; 294(1):161-7.
6. Lindan C, Mathur M, Kumta S, Jerajani H, Gogate A, Schachter J, et al. Utility of pooled urine specimens for detection of chlamydia trachomatis and neisseria gonorrhoeae in men attending Mumbai, India, by PCR. J Clin Microbiol 2005; 43(4):1674-7.

7. Honey E, Augood C, Templeton A, Russell I, Paavonen J, Mardh PA, et al. Cost effectiveness of screening for Chlamydia trachomatis: a review of published studies. Sex Transm Infect 2002; 78(6):406-12.
8. Horner P, Thomas B, Gilroy CB, Egger M, Taylor-Robinson D. Role of Mycoplasma genitalium and Ureaplasma urealyticum in acute and chronic nongonococcal urethritis. Clin Infect Dis 2001; 32(7):995-1003.
9. Adachi K, Nielsen-Saines K, Klausner JD. Chlamydia trachomatis infection in pregnancy: the global challenge of preventing adverse pregnancy and infant outcomes in sub-saharan Africa and Asia. Biomed Res Int 2016; 2016:9315757.
10. Piret J, Boivin G. Resistance of herpes simplex viruses to nucleoside analogues: mechanisms, prevalence, and management. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55(2):459-72.
11. Caviness AC, Demmler GJ, Almendarez Y, Selwyn BJ. The prevalence of neonatal herpes simplex virus infection compared with serious bacterial illness in hospitalized neonates. J Pediatr 2008; 153(2):164-9.
12. Lafferty WE, Coombs RW, Benedetti J, Critchlow C, Corey L. Recurrences after oral and genital herpes simplex virus infection. Influence of site of infection and viral type. N Engl J Med 1987; 316(23):1444-9.
13. Sadrpour P, Bahador A, Asgari S, Bagheri R, Chamani-Tabriz L. Detection of Chlamydia trachomatis and Mycoplasma genitalium in semen samples of infertile men using multiplex PCR. Tehran Univ Med Sci 2013; 70(10):623-9.
14. Souza RP, de Abreu AL, Ferreira EC, Rocha-Brischiliari SC, de B Carvalho MD, Pelloso SM, et al. Simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in human immunodeficiency virus–infected Brazilian women by multiplex polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg 2013; 89(6):1199-202.
15. Vosooghi S, Kheirkhah B, Karimi NA, Mirshekari TR. A review of the role of Mycoplasma infections in humans' infertility. N Cell Mol Biotechnol J 2012; 2(8):9-20.
16. Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, Chakroun N, Sellemi A, Znazen A, et al. Assessment of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis, and Mycoplasma genitalium in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. J Androl 2008; 29(2):198-206.
17. Gdoura R, Kchaou W, Chaari C, Znazen A, Keskes L, Rebai T, et al. Ureaplasma urealyticum, Ureaplasma parvum, Mycoplasma hominis and Mycoplasma genitalium infections and semen quality of infertile men. BMC Infect Dis 2007; 7:129.
18. Hamdad-Daoudi F, Petit J, Eb F. Assessment of Chlamydia trachomatis infection in asymptomatic male partners of infertile couples. J Med Microbiol 2004; 53(Pt 10):985-90.
19. Lee SR, Chung JM, Kim YG. Rapid one step detection of pathogenic bacteria in urine with sexually transmitted disease (STD) and prostatitis patient by multiplex PCR assay (mPCR). J Microbiol 2007; 45(5):453-9.
20. Golshani M, Eslami G, Ghobadloo SM, Fallah F, Goudarzi H, Rahbar AS, et al. Detection of Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum by Multiplex PCR in Semen Sample of Infertile Men. Iran J Publ Health 2007; 36(2):50-7.
21. Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou C, Kotronias D. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. Fertil Steril 2003; 79(3):1566-70.
22. Wald A, Matson P, Ryncarz A, Corey L. Detection of herpes simplex virus DNA in semen of men with genital HSV-2 infection. Sex Transm Dis 1999; 26(1):1-3.
23. Sheikh SH, Waqqar S, William GP, Aziz S, Bano S, David A, et al. Herpes simplex & cytomegalo viruses inflicted semen substantiates infertility among men. IOSR J Dental Med Sci 2014; 13(3):74-7.
24. Salehi-vaziri M, Monavari SH, Khalili M, Shamsi-Shahrabadi M, Keyvani H, Mollaei H, et al. Detection of HSV-1 DNA in the semen of infertile men and evaluation of its correlation with semen parameters in Iran. Iran J Virol 2010; 4(2):1-6.