دراسة تواجد المايكوبلازما التناسلية والمتدثرة الحثرية في الذكور العقيمين[+]

STUDY OF GENITAL MYCOPLASMA AND CHLAMYDIA TRICHOMATIS WHICH PRESENCE IN INFERTILE MALES

د.محمد هشام شريف يحيى الكاتب [*] د. ضياء عبد الحي يونس السراج*

المستخلص

تضمنت الدراسة عزل وتشخيص بكتريا المفطورة الإنسانية وبكتريا البولانية الحالة لليوريا وتشخيص بكتريا المتدثرة الحثرية في عينات السائل المنوي لـ (296) ذكراً عقيماً جميعهم من غير المصابين ببكتريا الأحليل السيلانية أو السفلس ولا يشكون من أي أعراض ظاهرة للقناة التناسلية البولية، والذين راجعوا بعض المختبرات الأهلية المتخصصة للفترة من كانون الأول (2004) ولغاية آذار (2006). أظهرت نتائج الدراسة أن بكتريا البولانية الحالة لليوريا كانت الأكثر تواجداً بين العينات قيد الدراسة ونسبتها (8.0%) وتليها المتدثرة الحثرية (4.0%) والمفطورة الإنسانية (1.7%). أعطت بكتريا البولانية الحالة لليوريا فقط فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($P< 0.05$) مقارنة مع عينة السيطرة ، وأظهرت النتائج تواجد هذه البكتريا في أكثر من (60%) من حالات الإصابة بالمفطورة الإنسانية، في حين أظهرت الأخيرة تواجد في (12.5%) من حالات الإصابة ببكتريا البولانية الحالة لليوريا، وكان معدوماً مع حالات الإصابة بالمتدثرة الحثرية.

أظهرت نتائج الدراسة التأثير المحدود والمتدرج لجميع معلقات عزلات المفطورات التناسلية المعزولة وبالتراكيز المختلفة المستخدمة على النسب المئوية للنطف سريعة الحركة التقدمية في تجارب الزجاج وخلال أوقات زمنية مختلفة. لم تظهر معلقات نفس النطف تأثيراً على على تراص النطف. أكدت نتائج الدراسة أهمية استخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة في التحري السريع عن مستضد المتدثرة الحثرية في عينات السائل المنوي للذكور العقيمين.

الكلمات الدالة: المايكوبلازما، عقم الذكور، المتدثرة

Abstract

The study comprised isolation and identification of *Mycoplasma hominins* and *Ureaplasma urealyticum* bacteria and detection of *Chlamydia trichomatis* in seminal fluid samples of (296) infertile males, all of them are not infected with Gonorrheal urithritis and *Treponema pallidum* bacteria and with any symptoms to the urogenital tract that visiting some special privet laboratory in ninava governorate from December, (2004) till March (2006). The result of study demonstrated that

[+] تاريخ استلام البحث ٢٠٠٦/٥/٢ ، تاريخ قبول النشر ٢٠٠٦/٨/٢٢

[*] مدرس ، المعهد التقني –الموصل – العراق

***U.urealyticum* is the most presence among samples under study with percentage (8%) follow *C.trachomatis* (4%) and *M. hominis* (1.7%). only *U. urealyticum* showed significant relationship at ($p<0.05$) in comparation with control, and the results showed presence of that bacteria in more than (60%) infertiles infection with *M. hominis*. The *M. hominis* show presence of (12.5%) from cases of infection with *U. urealyticum* and absence in cases of infection with *C. trachomatis*.**

The study also demonstrated that there were gradual and limited effect of all the bacterial suspensions isolated in different concentrations used on the percentage of progressive motility of sperm *Invitro* on different periods. The same bacterial suspension not demonstrate any effect on sperm agglutination. The study results show the importance of the usage of thin layer chromatography technique in the rapid detection of *C. trachomatis* antigen in seminal fluid samples of infertile males.
Key words: Mycoplasma, Male infertility, Chlamydia.

المقدمة

اختلف الباحثون في تحديد دور بعض أنواع البكتريا ومدى تأثيرها على حركة النطف وعيوشيتها وبالتالي على العقم سواءً كان ذلك في الذكور أو في الإناث وما زال هذا الموضوع مثير للجدل ومحل بحث مستمر. إن السائل المنوي يتميز بتعدد أنواع الأحياء المجهرية التي يمكن أن تتواجد فيه إما بشكل متعايشات طبيعية في المسلك التناسلي البولي أو ممرضات له [1,2]. تعد مجموعة بكتريا الأمراض الجنسية الانتقالية من أهم تلك الأنواع ذات العلاقة بأمراض العقم المؤشرة لدى الباحثين وخصوصاً مجموعة بكتريا الأحليل اللاسيلانية (Non – Gonorrheal Urithritis) والتي تتضمن المفطورات التناسلية بنوعيها المفطورة الإنسانية *Mycoplasma hominis* والبولانية الحالة لليوريا *Ureaplasma urealyticam* والمتدثرة الحثرية (كلاميديا التراخوما) *Chlamydia trachomatis*.

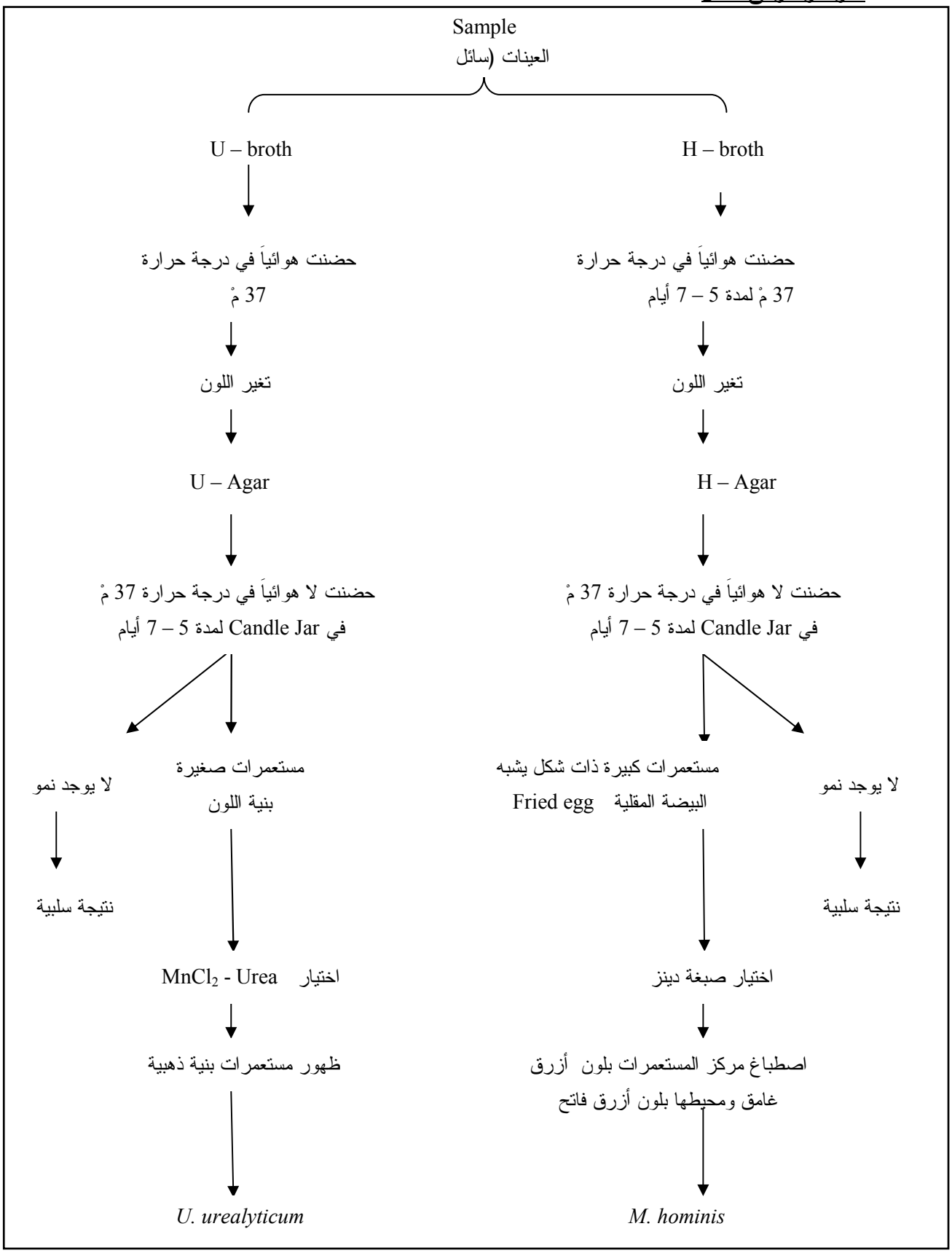
وعلى الرغم من تغاير نسب تواجدها إلا أن معظم الخمج بها يحدث في الإناث مقارنةً بالذكور ويترافق وجودها أحياناً مع خمج الأحليل السيلاني ووظائف النطفة الهزيلة وحالات العقم غير المفسر[3]. أهم الأخماج التي تسببها *C.trachomatis* في الذكور هو خمج الأحليل وخمج الخصية و البربخ 4]، كما إن تكرار الإصابة بها يزيد من خطورة الإصابة أو من تقبل المريض لفيروس العوز المناعي [5]. توالت البحوث في مختبرات مراكز العقم المتخصصة في مختلف أنحاء العالم حول أهمية المفطورات التناسلية في إحداث حالات التهاب الاحليل المزمن و التهاب حوض الكلية و التهاب البروستات المزمنة ، وهي المسبب لأكثر من (50%) من هذه الحالات مما يؤدي إلى العقم في الذكور [6] .

أكدت بعض الدراسات تأثير المفطورات التناسلية على حركة النطف وعيوشيتها عند حقن مزارع سائلة محضرة من هذهِ البكتريا في السائل المنوي[7]، كما أنها السبب في العديد من حالات العقم في النساء وأحد مسببات خمج عنق و حوض الرحم الرئيسية ، وأحد أسباب نشوء أضداد النطف[8] .

وأخيراً تهدف الدراسة إلى عزل و تشخيص المفطورات التناسلية في السائل المنوي للذكور العقيمين وملاحظة مدى تأثيرها على حركية النطف وتراصها خصوصاً لكونها من أنواع البكتريا التي تنتقل عن

طريق الاتصال الجنسي، وتشخيص تواجد المتدثرة الحثرية في السائل المنوي بطرق علمية معتمدة وحديثة، وبيان مدى العلاقة في التواجد بين كل من الأنواع الثلاثة في السائل المنوي للذكور ألعقيمين مقارنةً بالخصيبين .

المواد و طرائق العمل



الشكل (-1-) خطوات تشخيص بكتريا المفطورة

أجريت فحوصات الزرع و التشخيص للمفطورات التناسلية و التحري عن المتدثرة الحثرية في عينات السائل المنوي لـ (296) ذكراً عقيماً ، تم اختيارهم من مراجعي بعض المختبرات الأهلية المختصة في محافظة نينوى ، للمدة من كانون الأول (2004) و لغاية آذار (2006) والذين تراوحت أعمارهم بين (22 – 46) سنة و لمدة عقم تتراوح بين (4- 14) سنة. أجريت نفس الفحوصات أيضاً لـ (50) ذكراً خصيباً استخدموا كمجموعة سيطرة للمقارنة الإحصائية. جميع العقيمين من غير المصابين بأي أعراض ظاهرة للقناة التناسلية السفلى أو بكتريا الأحليل السيلانية أو بكتريا السفلس، طبقت كافة التعليمات المعتمدة من قبل منظمة الصحة العالمية فيما يتعلق بجمع و تحليل عينات السائل المنوي بقصد الاختبار و الزرع [9].

حضرت عينات منّي سوي و بمواصفات خاصة (عدد نطف لا تقل عن 50×10^6) / سم^3 و نسبة نطاف نشطة الحركة (≤50 %) وذلك قبل إجراء اختبار تأثير معلقات البكتريا المعزولة و المشخصة على حركية النطف و تراصها. استخدمت تقنية السباحة للأعلى (swim up) للحصول على نطف نشطة الحركة فقط[10]. وتم تضبيط أعداد النطف المتحركة ليتلائم مع الاختيار المطلوب .

عزلت وشخصت المفطورات التناسلية بنوعيها *M. hominis* و الـ *Ureaplasma-urealyticum* وذلك بعد تحضير الأوساط الزرعية و الكواشف الخاصة بذلك[11] كما موضح في الشكل (-1-).

حضرت معلقات حديثة للبكتريا المعزولة و المشخصة في أنابيب اختبار حاوية على المرق المغذي المعقم الخاص بها ، حضنت الأنابيب لحين ظهور التعكر . ضبطت و قورنت كثافة التعكر البكتيري مع محاليل أنابيب السيطرة (التعكر) القياسية (Macferland tubes) المحضرة لهذا الغرض[12]. تم انتقاء ثلاثة أنابيب تعكر لكل معلق بكتيري وذات تراكيز مساوية لـ (1×10^8 و 3×10^8 و 6×10^8) و المكافئة لأنابيب ماكفيرلند رقم (1) و (2) و (3) على التوالي . أختبر تأثير كل تركيز من هذه المعلقات على حركية النطف و تراصها .

طريقة الاختبار:

مُزجت (0.5) سم^3 من معلقات البكتريا المراد اختبارها مع (0.5) سم من عينة المني السوي المحضرة بعدما ثبتت كثافتها التقريبية في ذلك المعلق ، نقلت (0.5) سم^3 من عينة المني السوي إلى أنبوبة اختبار أخرى و استخدمت كعينة سيطرة . استخدمت ماصة باستور المعقمة لنقل قطرة واحدة من كل مزيج إلى شرائح زجاجية فحصت تحت قوة (×40) . سجلت القراءات المتضمنة قياس حركية النطف و تراصها و ذلك في أوقات زمنية مختلفة تراوحت بين (zero _ 120) دقيقة وبواقع (10) دقيقة بين فحص و أخر، ثم أجريت نفس خطوات العمل السابقة مع كل التراكيز الأخرى و لكل أنواع البكتريا المعزولة و المشخصة .

استخدمت عدة الفحص المجهزة من شركة Biokit للتحري عن *C. trachomatis* باستخدام طريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin layer chromatography) وهي طريقة متخصصة للنوع (species specific) تعتمد على الكشف السريع لمستضد الكلاميديا في مسحات عنق الرحم و الاحليل و الإدرار و السائل المنوي .

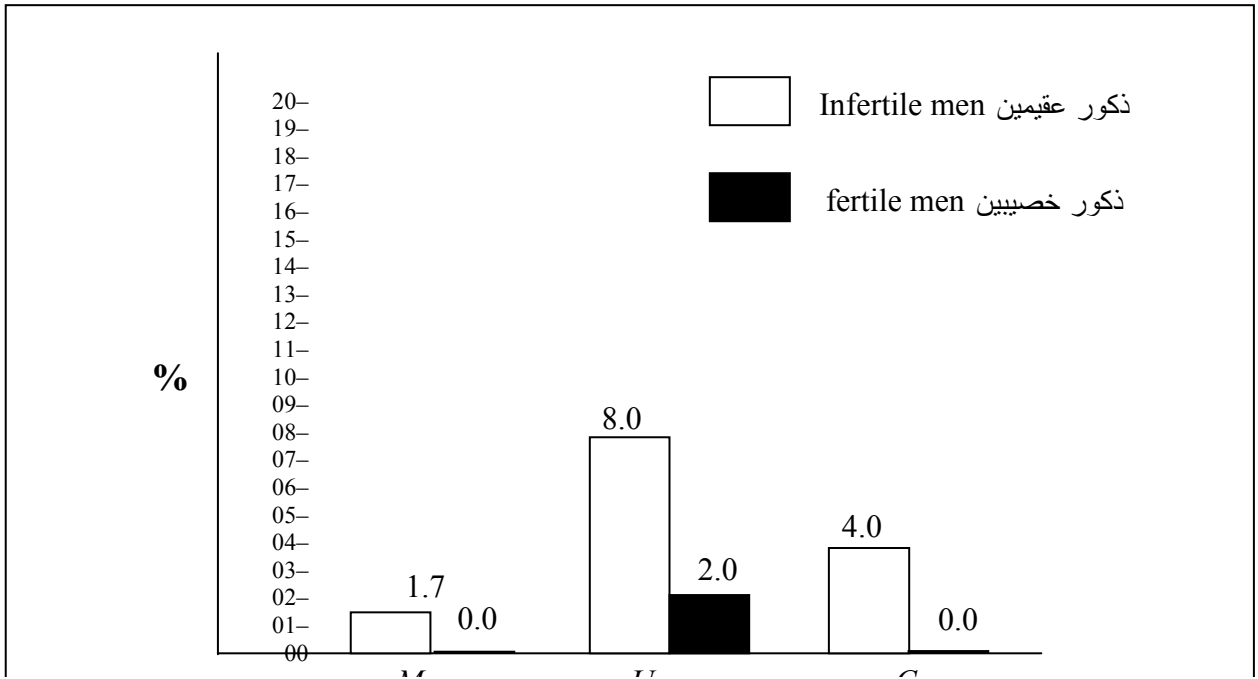
طريقة إجراء الاختبار :

- استخدمت المسحات المأخوذة بواسطة قطيلات بلاستيكية مغلفة ووضعت في (0.9) سم^3 من المحلول المستخلص الخاص بالفحص و الموجود في حاويات بلاستيكية ذات أغطية بشكل قطارات .
- حركة القطيلات بحركة دورا نية لمدة (15) ثانية داخل المحلول و تركت لمدة (20) دقيقة في درجة حرارة (25) مْ ، ثم رفعت القطيلة . سدت فوهة الأنبوبة بالقطارة الخاصة بها .
- رشحت 7 قطرات من المحلول على الحفرة A (حفرة النموذج) البلاستيكية و تركت لمدة (15) دقيقة لإكمال التفاعل إلى أن ظهرت حزمة بنفسجية اللون في الحفرة B (حفرة المحلول القياسي) تركت الشرائح لمدة ساعة من ظهور الحزمة .

أستخدم اختبار مربع كاي عند مستوى احتمالية($P<0.05$) للمقارنة بين نتائج العوامل المقاسة بين الذكور العقيمين و الخصيبين .

النتائج و المناقشة

أظهرت نتائج الدراسة (الشكل –2–) تواجد بكتريا *U. urealyticum* بنسب أعلى من *M . hominis* و الـ *C. trachomatis* في السائل المنوي للذكور العقيمين، وهي تتواجد في (60 %) من حالات الإصابة ببكتريا *M. hominis* في حين لا تتواجد الأخيرة في أكثر من (12.5%) من حالات الإصابة بـ *U. urealyticum* و تنعدم في حالات الإصابة بـ *C. trachomatis* (الجدول –1–) .



شكل (-2-): النسب المئوية للإصابة ببكتريا *M. hominis* و *U. urealyticum* والـــ *C. trachomatis* للذكور العقيمين والخصيبين قيد الدراسة

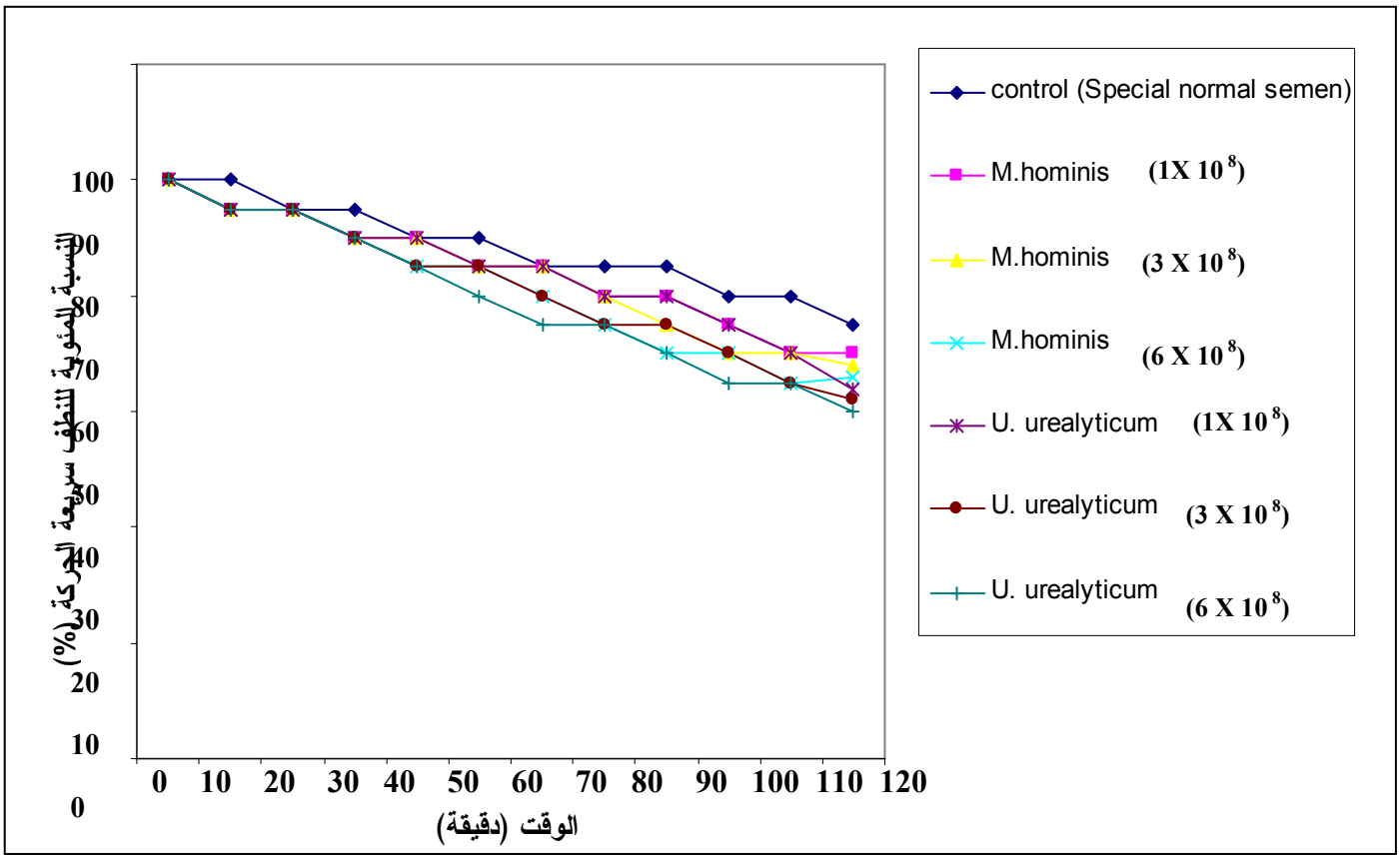
الجدول (1) : النسب المئوية لحالات الإصابة الايجابية وعدمها لكل من *M . hominis* والـ *U. urealyticum* والـ *C. trachomatis* مع حالات الإصابة لكل واحدة منهم على انفراد لـ (296) ذكراً عقيماً .

الإصابة بالممرضات التناسلية	الذكور العقيمين المصابين بـــ					
	M . hominis		*U. urealyticum*		*C. trachomatis*	
	+	−	+	−	+	−
C. trachomatis	00		4	96		
M. hominis			12.5	87.5	0.0	0.0
U. urealyticum	60	40			7.7	92.3

وعلى الرغم من التواجد القليل نسبياً للمفطورات التناسلية والـ C. trachomatis في العقيمين إلا أن أهمية الإصابة بها تأتي من كونها ضمن مجموعة بكتريا الأمراض الجنسية الانتقالية و بالتالي يكون تأثيرها أكثر خصوصا مع العقيمين الذين يعانون أصلا من ضعف في الفعالية الحركية و الحيوية و نقصان في عدد النطف ، وإن الإناث هم الأكثر إصابة بها و تؤدي إلى مضاعفات عدة لديهم وهي من مسببات العقم و قلة الإصابة بها تعود إلى قلة الاختلاطات الجنسية المتعددة للعقيمين قيد الدراسة مقارنة مع الذكور العقيمين في دراسات أخرى[3]. وذلك يعود إلى الالتزام الديني و التقاليد و الأعراف الاجتماعية. يكون تواجد الـ *U. urealyticum* بنسب أكثر من غيرها ومرافقتها لـ (60%) من حالات الإصابة بـ *M. hominis* يعود إلى كونها احد المتعايشات الطبيعية للجهاز التناسلي الأنثوي وبالتالي يمكن انتقالها بسهولة عن طريق الاتصال الجنسي للذكور هذا بالإضافة إلى كونها بكتريا انتهازية قد تتحول إلى ممرضة في ظروف خاصة[7]. قلة الإصابة بالـ *C. trachomatis* تعود لمرافقة هذه البكتريا في كثير من الأحيان للإصابة بالمكورات السيلانية وهذا يتفق مع بحثنا في كون جميع العقيمين قيد الدراسة هم من غير المثبت لديهم إصابة بها، وان ظهور الإصابة يعود ربما للانتقال عبر الاتصال الجنسي خصوصا من زوجات يعانون من افرازات تناسلية شديدة[14] .

استخدمت طريقة الزرع البكتريولوجي لكونها مـــن أفـــضل الطرائـــق التشخيـــصية لعـــزل الـــــ Mycoplasma لحد الآن. و كذلك للاستفادة من معلقات البكتريا المشخصة لدراسة تأثيرها علـــى حركيـــة النطف و تراصها فيما بعد.

أظهرت عزلات البكتريا المشخصة من *M hominis* والـــ *U. urealyticum* وفي كل التراكيز المستخدمة تأثير محدود و تدريجي مع الوقت على حركية النطف السريعة مقارنة بعينة السيطرة (الشكل –3–).



شكل(–3–) تأثير معلقات عزلات البكتريا المشخصة على حركية النطف سريعة الحركة و بالتراكيز (1 و 3 و $10x6^{8}$) خلية / سم^{3}

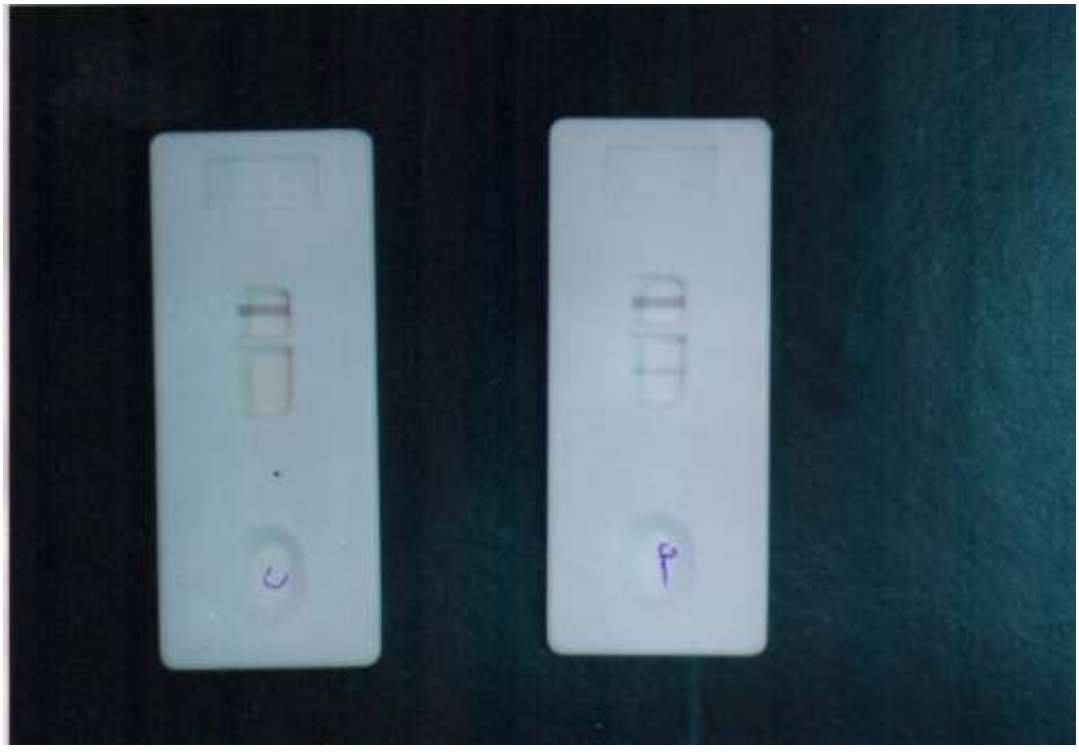
أن انخفاض نسبة حركة النطف سريعة الحركة من (10–15 %) بعد الساعة الأولى من تميعه و بحدود (25–30 %) بعد ساعتين من تميعه هي ظاهرة سوية. أظهرت عزلات بكتريا *U. urealyticum* تأثيراً على حركية النطف أكثر من (5–10 %) مقارنةً مع عزلات *M. hominis* و على عينة المني السوي الخاصة (السيطرة) . و لم تظهر نتائج البحث أي تأثير لنفس المعلقات المعزولة و المشخصة بالتراكيز المختلفة على تراص النطف مما يؤكد ضرورة التوسع في هذا المجال خصوصا مع حالات العقم المناعي و العقم غير المفسر[15].

استخدم اختيار التحري السريع عن مستضد *C.trachomatis* كونه أفضل الطرائق العالمية لتشخيصها (9) وتصل حساسيته إلى (99%) فيما تبلغ خصوصيته أعلى من (95%) و توضح الصورة رقم (1) قراءة النتائج :

أ- التفاعل الموجب : ظهور حزمة لونية في الحفرتين B,A .

ب- التفاعل السالب : ظهور حزمة لونية في B .

وفي حالة التفاعل غير الكفوء لا تظهر حزمة لونية في كلتا الحفرتين.



الصورة رقم (-1-) توضح طريقة التحري السريع عن مستضد الكلاميديا بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة أ: التفاعل الموجب ب: التفاعل السالب

ولم تستخدم طريقة الفحص ألمجهري في دراستنا لكونها غير حساسة أو تخصصية ولم تستخدم طريقة المزارع الحية لأنها صعبة وبطيئة جدا ومكلفة ولم تستخدم طريقة المقايسة الإنزيمية المناعية وتقنية (DNA Prob –) لشيوع النتائج الموجبة الكاذبة، أما طريقة (Polymerase- chain reaction) فهي أحدث الطرق العالمية للتشخيص ولكنها لم تستخدم في دراستنا لعدم توفرها وغلاء ثمنها .

وأخيراً فإن أهم الاستنتاجات تتضمن فعالية الكشف السريع عن مستضد *C.trachomatis* في السائل المنوي باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة و حساسيتها العالية. وتواجد *U. urealyticum* كان الأكثر بين عينات السائل المنوي مقارنة بالأنواع الأخرى قيد الدراسة، و هي فقط التي أعطت فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($p<0.05$) مقارنة بعينة السيطرة، وهي الأكثر نسبة تواجد (60%) مع حالات الإصابة بالـ *M . hominis*. والتأثير المحدود و المتدرج لمعلقات المفطورات التناسلية المعزولة و المشخصة وبالتراكيز و الأوقات المختلفة على حركية النطف السريعة فقط بحدود (5–15%) أكثر مقارنة بعينة السيطرة، و لم تظهر نفس المعلقات في نفس الأوقات و بنفس التراكيز أي تأثير مسجل على تراص النطف .

المصادر :

1. Egret–Kruse W., Pohi S., Naher H., Tilgen W. and Runnebaum B., "Microbial colonization and sperm – mucus interaction results in 1000 infertile couples". *Hum. Reprod*, Vol.7, pp. 612 – 620, 1992.
2. Munuce M.J., Bregni C., Carizza C. and Mendel Uk G., "Semen cuture, leukopcytospermia and the presence of sperm antibodies in seminal hyperviscosity". *Arch. Androl*, Vol. 42, No. 1, pp. 21 – 28, 1999.
3. Koch A., Bilina A., Teodorowicz L. and stary A., "Mycoplasa hominis and Urea plasma urealyticum in patient with sexually transmitted disease". *Wien. Klin. Wochenschr*, Vol. 109, No. 14, pp. 584 – 589, 1997.
4. Paavonen J. and Eggert Kruse W., "Chlamydia trachomatis impact on human reproduction". *Hum. Reprod. Update*, Vol. 5, No. 5, pp. 433 – 477, 1999.
5. Stigum H. and Magnus P., "Arsik index for sexually transmited disease. *Sex". Transm. Dis*, Vol. 24, No. 2, pp. 102 – 108, 1997.
6. Jensen J.S., Orsum R. Dohn B., "Mycoplasma: Acause of male urethritis". *Genit. owin. Med*, Vol.69, pp. 265 – 269, 1993.
7. Yu P., Zhang L., Dai H., cha G., Sun Y. and Shu M., "Research in the relationship between Chlamydia and Mycoplasma and infertility Human". *– I – Ko – Ta – H suech – Pao*, Vol. 23, No.1, pp. 67 – 69, 1998. .
8. Ross J.D.C., "Pelvic inflammatory disease Clinical Evidence". Vol.1, pp. 630 – 6333, 1999.
9. W.H.O. "*Laboratory manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction*".3rd. Cambridge university press, U.K, 2000.
10. Lopata, A., Paullo, M.J., Chang, A and James, B., "A Method for collecting motile spermatozoa from semen". *Fertile. Steril*., Vol. 27, pp. 677- 678, 1987..
11. Koneman E.W., Allen S.D., Dowell V.R., Janda W.C., "*Color Atlas and text book of Diagnostic Microbiology*". 3rd., J.B. Lippiincott Camp., Philadelphia. 1998.

12. Baron, E.J., Peterson, L.R. and Fingold, S.M., "*Diagnosis Microbiology*" . 9th ed. Von Hoffman Press U.S.A. 1994.

13. Armitage P. and Berry G., "*statistical methods in medical research*". 2nd ed. Oxford: Blackwell Science. 1985.

14. Zapata M.T., A humada F., G., Gordoba P.and Grutaddauria S.T., "Isolation of C. Trachomatis and immunoresponse in different population. Medecina". – *B – Aires*., Vol. 57, No. 1, pp. 7 – 24, 1997.

15. Kim, H.H. and Hornstein, M.D., "Unexplained infertility : Defining the problem and understanding stand design". *Infert. Reprod. Med*., Vol. 8, No. 4, pp. 487 – 498, 1997.