نشریه تازه ها در میکروب‌شناسی دامپزشکی
وبگاه: nfvm.uoz.ac.ir
دو فصلنامه - شاپا چاپی: ۲۶۴۵-۴۴۹۱ شاپا الکترونیکی: ۲۶۷۶-۵۰۰۴

دوره ٦، شماره ۲، پائیز و زمستان ۱٤۰۲، صفحات ۸- ۱۹

تعیین میزان آلودگی قارچی دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال (*Fleckvieh*) و ارتباط آن با زنده‌مانی و تحرک اسپرم و غلظت تستوسترون سرم خون و پلاسمای منی

امیر خاکی[۱]، حجت‌الله شکری[۲*]

۱- استادیار، گروه علوم بالینی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.
۲- استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

دریافت مقاله: ۱۴ دی ۱۴۰۱، بازنگری: ۲۷ دی ۱۴۰۱، پذیرش نهایی: ۰۲ بهمن ۱۴۰۱

10.22034/nfvm.2023.379656.1169 20.1001.1.26454491.1402.6.2.2.0

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی ارتباط بین میزان آلودگی قارچی بخش‌های مختلف دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال با زنده‌مانی و تحرک اسپرم و همچنین غلظت تستوسترون در سرم خون و پلاسمای منی است. نمونه‌گیری از پوست خارجی غلاف قضیب، پوست داخلی غلاف قضیب، آلت تناسلی قبل از انزال، مایع پیش انزالی، مایع انزالی (منی)، آلت تناسلی پس از انزال و مایع انزالی پس از یخ‌گشایی از گاوهای نر انجام شد. برای آزمایش قارچ‌شناسی، همهٔ نمونه‌ها بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (۰/۰۰۵ درصد) کشت داده شده و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ تا ۱۰ روز نگهداری شدند. تحرک اسپرم‌ها با استفاده از نرم‌افزار CASA و درصد اسپرم‌های زنده و غیر طبیعی با کمک رنگ‌آمیزی ائوزین نیگروزین انجام شد. همچنین، سطوح تستوسترون نمونه‌های سرم خون و پلاسمای منی با روش کمّی لومینسانس سنجش شدند. شایع‌ترین قارچ‌های جدا شده شامل گونه‌های *کاندیدا* (۳۵/۶ درصد)، *پنی‌سیلیوم* (۱۸/۶ درصد) و *آسپرژیلوس* (۱۴/۲ درصد) بودند. بیشترین و کمترین تعداد میانگین قارچ‌ها به‌ترتیب مربوط به پوست داخل قضیب (۱۶/۴۳ ± ۲۱/۰۸) و مایع انزالی پس از یخ‌گشایی (۲/۴۵ ± ۲/۰۰) بودند. اگرچه بین میزان کل آلودگی قارچی در دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال و پارامترهای تحرک اسپرم قبل و بعد از انجماد همبستگی وجود نداشت، اما ارتباط مثبت معنی‌داری بین درصد اسپرم‌های زنده پس از انجماد و غلظت تستوسترون پلاسمای منی مشاهده شد ($p< ۰/۰۵$). یافته‌ها نشان دادند که همبستگی معناداری بین میزان جمعیت قارچی و تعداد اسپرم‌های زنده و سطح تستوسترون مایع منی وجود دارد.

واژگان کلیدی: *آسپرژیلوس، اندام جنسی نر، فلور میکروبی، کاندیدا کروزئی، هورمون جنسی*

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبه: hshokri@ut.ac.ir

مقدمه

در شرایط آب و هوایی مرطوب، ممکن است عوامل قارچی و مخمری در خوراک دام و علوفه‌های استفاده شده در بستر دام کلونیزه شده و تولید توکسین‌های مختلفی کنند. این عوامل قارچی می‌توانند از طریق گوارش و تنفس وارد بدن دام‌ها شده و منجر به مسمومیت قارچی و عفونت اندام‌های مختلف بدن در دام‌ها شوند (۱). مهم‌ترین اثرات مستقیم یا غیر مستقیم قارچ‌ها بر دام‌ها شامل سقط جنین، کاهش باروری و کاهش تولید شیر می‌باشد (۲). مطالعات مختلف آلودگی قارچی را در دستگاه تناسلی حیوانات تأیید کرده‌اند. اغلب گونه‌های قارچی گزارش شده شامل *فوزاریوم*، *آسپرژیلوس*، *استاکی بوتریس* و *پنی‌سیلیوم* می‌باشند (۵-۳).

نژاد سیمنتال دو منظورهٔ شیری- گوشتی (فلکفیه) نژادی قدرتمند، کم‌هزینه و مقاوم در برابر تنش‌های گرمایی و متابولیک بوده که تولید بالای شیر و عضلانی بودن به‌عنوان دو عامل موفقیت این نژادِ ارزشمند در نظر گرفته می‌شود. بهبود ژنتیک در حیوانات اهلی با روش پذیرفته شدهٔ جهانی تلقیح مصنوعی در حال انجام است. این امر با استفاده از اسپرم‌های منجمد دام‌های نر انجام می‌شود. جدا از این که این روش خصوصیات ژنتیکی مطلوب را به ارمغان می‌آورد، اسپرم منجمد می‌تواند به‌عنوان ابزاری برای انتشار وسیع عوامل میکروبی بیماری‌زا باشد (۶). ماکروفاژها و گرانولوسیت‌ها اولین خط دفاعی بدن در برابر میکروارگانیسم‌ها بوده که با تولید رادیکال‌های آزاد موجب کشتار آنها می‌شوند. با این وجود رادیکال‌های آزاد ممکن است به خارج از سلول‌ها نیز رها شده و با مولکول‌ها و سلول‌هایی نظیر اسپرماتوزوئیدهای مجاورشان واکنش نشان دهند (۷). آنتی‌اکسیدان‌های سلولی هم اغلب در سیتوپلاسم قرار دارند و در اسپرم به جهت اینکه سیتوپلاسم اندکی وجود دارد در نتیجه جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد ناکافی هستند (۸). اسپرم منجمد شدهٔ حیوانات ممکن است قبل (آلودگی اولیه) و یا بعد (آلودگی ثانویه) از انجماد با قارچ‌ها آلوده شود. Tao و همکاران در سال ۲۰۲۰ گزارش کردند که اسپرم انسان می‌تواند به صورت اولیه آلوده به قارچ شود و انجماد اسپرم قادر به کاهش غلظت عوامل قارچی می‌گردد (۹). عدم وجود آلودگی در اسپرم‌های منجمد تهیه شده در مراکز تولید اسپرم گاو از نظر کیفیت اسپرم‌های تولیدی و میزان باروری اسپرم‌های تلقیح شده به گاوهای ماده حائز اهمیت می‌باشد. مشخص شده است که وجود باکتری، ویروس و قارچ در منی تأثیرات مخربی بر کیفیت اسپرم تولیدی دارد و همچنین ممکن است این پاتوژن‌ها به نسل‌های بعدی نیز انتقال یابند. با وجود بکارگیری تدابیر بهداشتی قابل قبول، میکروارگانیسم‌های فرصت‌طلب به علت انتشار گسترده‌شان قادرند در طول استحصال، پردازش و نگهداری اسپرم، به داخل مایع منی راه یابند (۱۰). منابع این عفونت‌ها می‌تواند متعدد باشد مثل آلودگی‌های محیطی مرتبط با جمع‌آوری و فرآیندهای انجمادی گامت‌ها (۱۱). انجماد منی و رویان این مزیت را دارد که از ذخیره طولانی مدت گامت‌ها اطمینان حاصل می‌شود، اما همزمان، اگر به خوبی کنترل نشوند، خطر انتشار برخی پاتوژن‌ها به واسطه انتقال رویان و تلقیح مصنوعی ممکن است افزایش یابد (۱۴-۱۲). در حقیقت، مشخص شده است که منی منجمد شدهٔ گاو یک منبع بالقوه برای میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای مختلف می‌باشد که می‌توانند به‌طور مخربی بر تحرک اسپرم و رشد رویان تأثیرگذار باشند (۱۷-۱۵). بنابراین مهم است که جمعیت میکروارگانیسم‌ها به‌طور مؤثری در طول تمامی مراحل فناوری‌های تولید مثلی کنترل شده تا از ورود عوامل بیماری‌زا به حیوانات، گله‌ها، مناطق و یا کشورهایی که قبلاً این عوامل وجود نداشتند، جلوگیری شود (۱۸).

تاکنون اطلاعات و گزارشات مستندی در مورد میزان آلودگی قارچی دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال در دسترس نمی‌باشد. بنابراین هدف این مطالعه، تعیین میزان آلودگی قارچی دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال و بررسی ارتباط آن با زنده‌مانی و تحرک اسپرم و همچنین غلظت تستوسترون در سرم خون و پلاسمای

منی بوده است. نتایج این مطالعه می‌تواند جهت اقدامات پیشگیرانه و امنیت زیستی در مراکز پرورش، پرواربندی و به‌ویژه مراکز تولید اسپرم منجمد کمک بسیار شایانی نماید، چرا که شرایط عاری از آلودگی از اصول اساسی و لازم‌الاجرای تمامی مراکز اصلاح نژاد در دنیا می‌باشد و یکی از معضلات اصلی هر واحد صنعتی تولید اسپرم، مبارزه با عوامل قارچی است، چرا که در صورت وجود آلودگی مرکز، احتمال تعلیق فعالیت آنها وجود خواهد داشت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: برای این مطالعه، تعداد ۱۲ راس گاو نر سیمنتال دومنظوره آلمانی (فلکفیه) در مرکز اصلاح نژاد گاو سیمنتال کشور واقع در شهرستان آمل در سال ۱۳۹۸ انتخاب شدند. همهٔ حیوانات یک برنامهٔ پیشگیرانه شامل درمان‌های ضد انگلی و واکسیناسیون‌های معمول را دریافت نمودند. این حیوانات فاقد هرگونه نارسایی‌های تناسلی بوده و درمان‌های ضد قارچی در طی ۶ ماه گذشته نداشتند. نمونه‌ها توسط سواب استریل از پوست خارجی غلاف قضیب، پوست داخلی غلاف قضیب، آلت تناسلی قبل از انزال، مایع پیش انزالی، مایع انزالی (منی)، آلت تناسلی پس از انزال و مایع انزالی پس از یخ‌گشایی جمع‌آوری شدند. سپس نمونه‌ها سریعاً جهت آزمایش قارچ‌شناسی به آزمایشگاه قارچ‌شناسی و برای آزمایشات تناسلی به آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل منتقل شدند. در این مطالعه، تمام آزمایشات انجام شده بر روی گاوها مطابق با دستورالعمل کمیتهٔ اخلاقی رای تحقیق روی حیوانات دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل بودند.

کشت نمونه‌ها و جداسازی قارچ‌ها: همهٔ نمونه‌ها بر روی سطح محیط سابورو دکستروز آگار (Merck Co., Darmstadt, Germany) حاوی کلرامفنیکل (۰/۰۰۵ درصد) کشت داده شده و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ تا ۱۰ روز نگهداری گردیدند. ارزیابی‌های چشمی از کلونی‌های قارچی انجام شد و مشخصات آنها شامل قوام، رنگدانه و سرعت رشد روی محیط ثبت گردید. تعداد کلونی‌های قارچی در هر پلیت آگار مثبت شمارش گردید. شناسایی قارچ‌ها بر اساس مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی آنها انجام شد. آزمایش مستقیم میکروسکوپی بر روی کلونی‌های قارچی شفاف شده با لاکتوفنل کاتن‌بلو صورت پذیرفت. مخمرها با استفاده از مشخصات مورفولوژیکی و کشت بر روی محیط کشت اختصاصی کروم آگار (CHROMagar Co., Paris, France) تعیین هویت شدند (۱۹).

انجماد اسپرم: نمونه‌های منی با استفاده از رقیق کنندهٔ Andromed (Minitube, Germany) منجمد شدند. بدین منظور، پس از اخذ نمونه‌های منی، ابتدا حجم انزال و سپس غلظت منی و در نهایت درصد تحرک پیشروندهٔ اسپرم‌ها بررسی شدند. پس از ارزیابی اسپرم و تأیید کیفیت قابل انجماد بودن آن، محلول Pre – extender تهیه شد. جهت تهیه محلول Pre – extender به نسبت ۱ به ۱ رقیق‌کننده به مایع انزالی اضافه شد. محلول تهیه شده در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری به مدت ۱۰ دقیقه باقی ماند. مراحل پرکردن و بستن نمونه‌ها توسط دستگاه automatic filling & sealing of straws - MPP Uno (Minitube, Germany) در دمای اتاق انجام شد. سپس نمونه‌ها بسته‌بندی شده و در سینی‌های پایت‌های اسپرم قرار داده شده و به مدّت ۴ – ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال به تعادل رسیدند. سپس اسپرم‌های بسته‌بندی شده به دستگاه MT Freezer (Minitube, Germany) جهت انجماد منتقل شدند. سه نمونه از هر پایت منجمد شده پس از یخ‌گشایی در بن‌ماری ۳۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مورد بررسی پارامترهای کیفی منی قرار گرفتند.

بررسی تحرک اسپرم‌ها پس از انجماد: تحرک اسپرم‌ها پس از انجماد با استفاده از نرم‌افزار CASA (HFT CASA, Hooshmand Fanaver, Iran) بررسی شد. بدین منظور، یک پایت از هر انزال در بن‌ماری تنظیم شده

در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شد و پس از خشک کردن پایت، مایع حاوی اسپرم در میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری که در رک‌های شناور در بن‌ماری قرار داشتند، ریخته شدند. برای تمامی مراحل ۵ میکرولیتر از نمونه جهت بررسی بر روی لام مخصوص دستگاه CASA قرار گرفت. پارامترهای تحرک اسپرم‌ها شامل موارد ذیل بودند: درصد تحرک پیشروندهٔ اسپرم‌ها بعد از انجماد (PMFT)، سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر واقعی طی شده بعد از انجماد (VCLFT)، سرعت مستقیم‌الخط اسپرم‌ها بعد از انجماد (VSLFT)، سرعت در مسیر منحنی میانگین اسپرم‌ها بعد از انجماد (VAPFT)، متوسط زاویهٔ چرخشی اسپرم‌ها بعد از انجماد (MADFT)، حداکثر دامنهٔ حرکت جانبی اسپرم‌ها بعد از انجماد (ALH.FT)، فرکانس حرکات جانبی اسپرم‌ها بعد از انجماد (BCFFT)، خطی بودن حرکت اسپرم‌ها بعد از انجماد (LINFT).

بررسی اسپرم‌های زنده و غیر طبیعی: به‌منظور بررسی درصد اسپرم‌های زنده و غیر طبیعی هر انزال، از رنگ‌آمیزی ائوزین نیگروزین (Eosin G, 15405/0025 - Nigrosin, 15405/0029, Minitube - Germany) استفاده شد. در این روش، پس از این که اسپرم‌ها در رقیق‌کنندهٔ نهایی قرار گرفتند، یک قطره از آن با یک قطره ائوزین ۲ درصد و دو قطره نیگروین ۴ درصد به آرامی با سمپلر ترکیب شده و بر روی لام شیشه‌ای قرار گرفته و از آن گسترش تهیه شد. گسترش‌های تهیه شده بر روی یک صفحهٔ گرم، خشک شده و سپس حداقل ۲۰۰ اسپرم در زیر میکروسکوپ بررسی شدند. اسپرم‌های مرده به علت نفوذپذیری بالای غشای سلولی خود، رنگ ائوزین را به خود گرفته و قرمز رنگ شده و از اسپرم‌های زنده که این رنگ را به خود نمی‌گیرند کاملاً متمایز شدند و به این ترتیب درصد اسپرم‌های مرده به دست می‌آمد. جهت بررسی اسپرم‌های منجمد نیز پس از یخ‌گشایی و ریخته شدن در میکروتیوب‌های شناور در بن‌ماری عیناً به مانند اسپرم‌های تازه عمل شد. حداقل ۲۰۰ اسپرم از هر لام مورد بررسی و شکل‌شناسی اسپرم‌ها از لحاظ موارد غیر طبیعی در قسمت‌های سر، بدنه و دم مورد توجه قرار گرفت.

اندازه‌گیری میزان تستوسترون خون و پلاسمای منی: به‌منظور اندازه‌گیری مقدار تستوسترون سرم خون، خونگیری از ورید دمی تمامی گاوهای تحت مطالعه انجام شد. نمونه‌های خون پس از لخته شدن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شده و سرم آنها جدا و تا اندازه‌گیری میزان تستوسترون در دمای منفی ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. یک میلی‌لیتر منی از هر انزال جهت تعیین میزان تستوسترون پلاسمای منی جدا شده و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع روی نمونه‌ها بعد از سانتریفیوژ با سمپلر برداشته شده و در نمونه‌هایی که پلاسمای منی آنها شفاف نبود، یک قطره از پلاسما از نظر وجود اسپرم در زیر میکروسکوپ بازرسی و در صورت وجود اسپرم دوباره سانتریفیوژ شد. سپس نمونه‌های پلاسمای منیِ به‌دست آمده توسط سمپلر برداشته و به میکروتیوب با ظرفیت ۱/۵ میلی‌لیتر انتقال داده شد و تا زمان آزمایش در دمای منفی ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. اندازه‌گیری مقادیر تستوسترون نمونه‌های سرم و پلاسمای منی به روش کمی لومینسانس و با دستگاه Siemens advia XPT (Siemens Co., Munich, Germany) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS تحت ویندوز نسخهٔ ۲۴ (SPSS Sciences، Chicago، IL، USA) انجام شد. برای بررسی رابطه همبستگی بین پارامترهای کیفی اسپرم و میزان تستوسترون سرم و منی با میزان آلودگی قارچی در نمونه‌های مختلف دستگاه تناسلی دام‌های نر و همچنین انواع مختلف قارچ‌های رشته‌ای و مخمری از ضریب همبستگی پیرسون استفاده گردید. داده‌هایی که دارای توزیع نرمال بودند و همگنی واریانس بین دو عامل رعایت شده بود از همبستگی پیرسون استفاده شد. فرض تصادفی

بودن نمونه‌ها یک اصل اساسی است. در مورد پارامترهایی که به صورت کمی و رتبه‌ای مورد آزمایش قرار گرفتند از Spearman's Rank-Order Correlation استفاده گردید. معنادار بودن جواب‌ها در حیطه P< ۰/۰۵ به دست آمد.

نتایج

عوامل قارچی از ۹۰/۴ درصد (۷۶ از کل ۸۴ نمونه) نمونه‌های تحت آزمایش جداسازی شدند. ارگانیسم‌های جدا شده و فراوانی هر جنس قارچی در جدول ۱ ارائه شده است. یک مجموعه‌ای از ۹۴۰ جدایهٔ قارچی از نمونه‌های تناسلی به دست آمد. بعد از بررسی قارچ‌شناسی، ۵۱۰ قارچ رشته‌ای (۵۴/۳ درصد) و ۴۳۰ مخمر (۴۵/۷ درصد) تشخیص داده شدند. ۳ قارچ مختلف در ۱ گاو، ۴ تا قارچ مختلف در ۱ گاو، ۶ قارچ مختلف در ۳ گاو، ۷ قارچ مختلف در ۳ گاو، ۸ قارچ مختلف در ۲ گاو و ۹ قارچ مختلف در ۲ گاو یافت شدند.

جدایه‌های قارچی متعلق به ۱۵ جنس مختلف شامل گونه‌های *کاندیدا* (۳۵/۶ درصد)، *پنی‌سیلیوم* (۱۸/۶ درصد)، *آسپرژیلوس* (۱۴/۲ درصد)، *کلادوسپوریوم* (۱۰/۵ درصد)، *ترایکوسپورون* (۷/۳ درصد)، *موکور* (۳/۲ درصد)، *آلترناریا* (۲/۷ درصد)، *فوزاریوم* (۲/۱ درصد)، *رودوتورولا* (۱/۵ درصد)، *ژئوتریکوم* و قارچ رنگی (۱/۳ درصد)، *اولوکلادیوم* (۰/۷ درصد)، *اوستیلاگو* (۰/۵ درصد)، *کورولاریا* (۰/۲ درصد) و *رایزوپوس* (۰/۱ درصد) بودند. تفاوت معناداری بین میزان شیوع گونه‌های *کاندیدا* با سایر جنس‌های قارچی مشاهده گردید (p< ۰/۰۵) (جدول ۱). از بین گونه‌های مختلف *کاندیدا*، *کروزئی* (۱۵۲ مورد)، *آلبیکنس* (۱۱۷ مورد)، *تروپیکالیس* (۴۲ مورد) و سایر گونه‌های *کاندیدا* (۲۲ مورد) از اصلی‌ترین مخمرهای جدا شده از دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال شناخته شده‌اند.

جدول ۱- فراوانی قارچ‌های جدا شده از بخش‌های مختلف دستگاه تناسلی گاوهای نر (تعداد، درصد)

قارچ	ناحیه	پوست خارجی غلاف قضیب	پوست داخلی غلاف قضیب	آلت تناسلی قبل از انزال	مابع پیش انزالی	مابع انزالی (منی)	آلت تناسلی پس از انزال	مابع انزالی پس از یخ‌گشایی	مجموع
قارچ‌های رشته‌ای	*آسپرژیلوس*	۱۷ (۱/۸)	۳۳ (۳/۵)	۲۳ (۲/۴)	۲۵ (۲/۷)	۹ (۰/۹)	۲۷ (۲/۹)	۰	۱۳۴ (۱۴/۲)
	پنی‌سیلیوم	۳۸ (۴)	۴۳ (۴/۶)	۱۳ (۱/۴)	۱۸ (۱/۹)	۱۲ (۱/۳)	۳۳ (۳/۵)	۱۸ (۱/۹)	۱۷۵ (۱۸/۶)
	موکور	۱۲ (۱/۳)	۶ (۰/۶)	۴ (۰/۴)	۱ (۰/۱)	۲ (۰/۲)	۵ (۰/۵)	۰	۳۰ (۳/۲)
	رایزوپوس	۰	۰	۱ (۰/۱)	۰	۰	۰	۰	۱ (۰/۱)
	فوزاریوم	۳ (۰/۳)	۲ (۰/۲)	۲ (۰/۲)	۲ (۰/۲)	۱ (۰/۱)	۱۰ (۱)	۰	۲۰ (۲/۱)
	آلترناریا	۱۴ (۱/۵)	۵ (۰/۵)	۱ (۰/۱)	۴ (۰/۴)	۰	۱ (۰/۱)	۰	۲۵ (۲/۷)
	کورولاریا	۲ (۰/۲)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲ (۰/۲)
	کلادوسپوریوم	۱۱ (۱/۲)	۱۵ (۱/۶)	۲۰ (۲/۱)	۱۵ (۱/۶)	۱۷ (۱/۸)	۲۱ (۲/۲)	۰	۹۹ (۱۰/۵)
	اولوکلادیوم	۰	۰	۰	۷ (۰/۷)	۰	۰	۰	۷ (۰/۷)
	اوستیلاگو	۰	۰	۵ (۰/۵)	۰	۰	۰	۰	۵ (۰/۵)
	قارچ رنگی	۱۲ (۱/۳)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۲ (۱/۳)
مخمرها	*ترایکوسپورون*	۰	۲۲ (۲/۳)	۲۱ (۲/۲)	۴ (۰/۴)	۱ (۰/۱)	۲۱ (۲/۲)	۰	۶۹ (۷/۳)
	ژئوتریکوم	۰	۳ (۰/۳)	۰	۹ (۰/۹)	۰	۰	۰	۱۲ (۱/۳)
	رودوتورولا	۵ (۰/۵)	۱ (۰/۱)	۴ (۰/۴)	۲ (۰/۲)	۰	۲ (۰/۲)	۰	۱۴ (۱/۵)
	کاندیدا	۳۹ (۴/۱)	۱۱۹ (۱۲/۷)	۶۸ (۷/۲)	۴۵ (۴/۸)	۵ (۰/۵)	۵۳ (۵/۶)	۶ (۰/۶)	۳۳۵ (۳۵/۶)
مجموع		۱۵۳ (۱۶/۳)	۲۴۹ (۲۶/۵)	۱۵۹ (۱۶/۹)	۱۳۵ (۱۴/۴)	۴۷ (۵)	۱۷۳ (۱۸/۴)	۲۴ (۲/۵)	۹۴۰ (۱۰۰)

بیشترین و کمترین تعداد میانگین عوامل قارچی جدا شده به‌ترتیب مربوط به پوست داخل قضیب (۱۶/۴۳ ± ۲۱/۰۸) و مایع انزالی پس از یخ‌گشایی (۲/۴۵ ± ۲/۰۰) بودند (جدول ۲). تعداد کل قارچ‌های شناسایی شده در پوست داخل قضیب به‌طور معناداری بیشتر از سایر بخش‌ها بود (p< ۰/۰۵).

جدول ۲- مقادیر میانگین عوامل قارچی مختلف براساس نمونه‌های مختلف دستگاه تناسلی گاوهای نر

متغیر	میانگین	انحراف استاندارد
پوست خارجی غلاف قضیب	۱۳/۵۸	۷/۳۴
پوست داخلی غلاف قضیب	۲۱/۰۸	۱۶/۴۳
آلت تناسلی قبل از انزال	۱۳/۵۰	۷/۷۸
مایع پیش انزالی	۱۱/۰۰	۱۰/۶۸
مایع انزالی (منی)	۴/۰۰	۲/۸۳
آلت تناسلی پس از انزال	۱۴/۵۸	۱۱/۳۶
مایع انزالی پس از یخ‌گشایی	۲/۰۰	۲/۴۵

نتایج یافته‌های این پژوهش نشان داد که آلودگی قارچی پوست خارجی غلاف قضیب با هیچ‌کدام از پارامترهای تحرک اسپرم در قبل و بعد از انجماد همبستگی معناداری نداشت. در مقابل، میزان آلودگی قارچی پوست داخلی غلاف قضیب با میل جنسی و تحرک پیشرونده اسپرم‌ها قبل از انجماد و تمامی پارامترهای تحرک اسپرم پس از انجماد (به غیر از LINFT) همبستگی مثبت معناداری داشتند. همچنین تمایل به همبستگی معنادار مثبت با LINFT (خطی بودن حرکت اسپرم‌ها) بعد از انجماد مشاهده شد (p< ۰/۰۵) (جداول ۳ و ۴). همچنین در این مطالعه مشخص شد که بین میزان کل آلودگی‌های قارچی و مخمری در مجموع بخش‌های تناسلی گاوهای نر سیمنتال با پارامترهای تحرک اسپرم قبل و بعد از انجماد همبستگی وجود ندارد (به استثنای همبستگی مثبت معنادار با متوسط زاویهٔ چرخشی اسپرم‌ها پس از انجماد).

جدول ۳- میانگین پارامترهای کیفی اسپرم‌های گاوهای نر بر اساس میزان آلودگی قارچی

متغیر	میانگین	انحراف استاندارد
Lib	۳/۲۵	۰/۶۲
Vol	۹/۸۵	۶/۹۳
Con	۱۲۴۹/۰۰	۴۱۶/۲۷
PM	۶۸/۵۰	۵/۹۳
VCLFT	۴۶/۲۱	۵/۲۱
VSLFT	۲۸/۰۳	۴/۳۴
VAPFT	۳۲/۷۹	۳/۹۸
MADFT	۲۱/۸۸	۴/۵۵
ALHFT	۲/۱۲	۰/۱۹
BCFFT	۰/۷۰	۰/۱۵
LINFT	۳۷/۲۸	۴/۱۱

درجه میل جنسی گاو نر (Lib)، حجم مایع انزالی (Vol)، غلظت مایع انزالی (Con)، درصد تحرک پیشرونده اسپرم‌ها قبل از انجماد (PM)، سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر واقعی طی شده بعد از انجماد (VCLFT)، سرعت مستقیم‌الخط اسپرم‌ها بعد از انجماد (VSLFT)، سرعت در مسیر منحنی میانگین اسپرم‌ها بعد از انجماد (VAPFT)، متوسط زاویه چرخشی اسپرم‌ها بعد از انجماد (MADFT)، حداکثر دامنه حرکت جانبی اسپرم‌ها بعد از انجماد (ALHFT)، فرکانس حرکات جانبی اسپرم‌ها بعد از انجماد (BCFFT) و خطی بودن حرکت اسپرم‌ها بعد از انجماد (LINFT).

جدول ۴- همبستگی بین آلودگی‌های قارچی بر اساس نمونه‌های مختلف دستگاه تناسلی گاوهای نر

	پوست خارجی غلاف قضیب	پوست داخلی غلاف قضیب	آلت تناسلی قبل از انزال	مایع پیش انزالی	مایع انزالی قبل از انجماد	آلت تناسلی پس از انزال	مایع انزالی پس از یخ‌گشایی
Lib	۰/۰۶	۰/۵۹*	۰/۰۵	۰/۱۸	-۰/۳۱	۰/۳۵	۰/۱۲
Vol	۰/۱۶	-۰/۰۳	۰/۳۹	-۰/۳۴	-۰/۴۲	۰/۱۶	-۰/۳۲
Con	-۰/۱۱	-۰/۲۷	-۰/۶۷*	۰/۴۰	-۰/۲۱	-۰/۲۳	-۰/۱۱
PM	۰/۳۹	۰/۵۹*	۰/۲۴	-۰/۲۴	۰/۳۵	۰/۲۰	۰/۴۴
PMFT	۰/۱۶	۰/۳۷	۰/۲۰	-۰/۳۳	-۰/۲۰	-۰/۰۸	۰/۵۰
VCLFT	۰/۰۵	۰/۵۵*	۰/۱۸	-۰/۱۳	-۰/۰۸	۰/۲۹	۰/۱۹
VSLFT	-۰/۰۶	۰/۵۴*	۰/۲۷	-۰/۱۲	۰/۰۹	۰/۰۸	۰/۵۰P
VAPFT	۰/۰۴	۰/۶۲*	۰/۳۱	-۰/۱۳	۰/۱۷	۰/۱۶	۰/۵۸*
MADFT	۰/۳۳	۰/۶۸*	۰/۲۶	-۰/۰۱	۰/۰۴	۰/۳۲	۰/۳۸
ALHFT	۰/۲۹	۰/۶۱*	۰/۲۲	-۰/۲۷	-۰/۰۵	۰/۴۷	۰/۲۴
BCFFT	۰/۰۴	۰/۷۲*	۰/۲۰	-۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۲۴
LIN.FT	-۰/۲۴	۰/۵۲P	-۰/۱۲	۰/۱۷	۰/۲۲	۰/۳۲	۰/۰۶

*:significantly correlation (p<0.05), P: tend to significantly (p<0.10)

نتایج آماری این مطالعه نشان دادند که میزان آلودگی قارچی پوست داخلی غلاف قضیب با درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها قبل از انجماد همبستگی مثبت معناداری داشت. همچنین با درصد اسپرم‌های غیر طبیعی قبل و پس از انجماد، همبستگی منفی معناداری نشان داد. میزان آلودگی قارچی آلت تناسلی قبل از انزال با میزان تستوسترون خون و پلاسمای منی همبستگی مثبت معنادار نشان داد (جدول ۵).

جدول ۵- میانگین پارامترهای کیفی اسپرم گاوهای نر در هنگام نمونه‌گیری جهت تعیین آلودگی قارچی

متغیر	میانگین	انحراف استاندارد
Viab	۸۴/۲۹	۷/۶۷
Morph	۱۶/۴۷	۱۲/۰۸
Head	۶/۷۵	۸/۷۰
MidP	۱/۱۴	۰/۶۵
Tail	۷/۸۶	۹/۲۶
CyD	۰/۷۲	۰/۵۹
HOST	۶۹/۳۹	۱۱/۴۳
ViabFT	۵۱/۵۱	۸/۵۲
HOSTFT	۳۸/۷۴	۶/۹۳
MorphFT	۲۱/۶۳	۱۳/۴۶
HeadFT	۹/۴۰	۱۳/۶۶
MidPFT	۲/۱۱	۰/۷۳
TailFT	۹/۳۴	۸/۶۳
CyDFT	۰/۷۸	۰/۴۹
BT	۸/۱۷	۲/۷۹
SPT	۷/۲۴	۵/۵۷

درصد اسپرماتوزوئیدهای زنده قبل از انجماد (Viab)، درصد کل اسپرماتوزوئیدهای غیرطبیعی قبل از انجماد (Morph)، درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در سر اسپرم قبل از انجماد (Head)، درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در قطعه میانی اسپرم قبل از انجماد (MidP)، درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در دم اسپرم قبل از انجماد (Tail)، درصد قطره سیتوپلاسمی قبل از انجماد (CyD)، درصد تورم هایپواسموتیک اسپرم‌ها قبل از انجماد (HOST)، درصد اسپرم‌های زنده بعد از

انجماد (ViabFT)، درصد تورم هایپواسموتیک اسپرم‌ها بعد از انجماد (HOSTFT)، درصد کل اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی بعد از انجماد (MorphFT)، درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در سر اسپرم بعد از انجماد (Head FT)، درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در قطعه میانی اسپرم بعد از انجماد (MidPFT)، درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در دم اسپرم بعد از انجماد (Tail FT)، درصد قطره سیتوپلاسمی بعد از انجماد (CyDFT)، میزان تستوسترون در سرم خون(BT) و میزان تستوسترون در پلاسمای منی (SPT).

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه جدایه‌های قارچی از بخش‌های مختلف دستگاه تناسلی گاو نر شامل پوست خارجی غلاف قضیب، پوست داخلی غلاف قضیب، آلت تناسلی قبل از انزال، مایع پیش انزالی، مایع انزالی (منی)، آلت تناسلی پس از انزال و مایع انزالی پس از یخ‌گشایی به دست آمدند. شایع‌ترین عوامل قارچی جدا شده شامل گونه‌های *کاندیدا* با فراوانی ۳۵/۶ درصد، *پنی‌سیلیوم* با فراوانی ۱۸/۶ درصد و *آسپرژیلوس* با فراوانی ۱۴/۲ درصد بودند. همچنین بیشترین و کمترین تعداد میانگین عوامل قارچی جدا شده به‌ترتیب مربوط به پوست داخل قضیب (۱۶/۴۳ ± ۲۱/۰۸) و مایع انزالی پس از یخ‌گشایی (۲/۴۵ ± ۲/۰۰) بودند. تا به امروز گزارشی از حضور و انتشار قارچها در دستگاه تناسلی گاوهای نر صورت نگرفته است و فقط مطالعات اندکی در زمینه آلودگی قارچی مایع منی تازه و یخ‌گشایی شده گاوها انجام شده است که با مطالعه ما همخوانی نزدیکی دارند. Seyedmousavi و همکاران در سال ۲۰۱۸ قارچهای *آسپرژیلوس* و *کاندیدا* را از دستگاه تناسلی حیوانات نر از جمله گاوها گزارش کردند (۲۰). در مطالعه Bielanski و همکاران در سال ۲۰۰۳، قارچ *آسپرژیلوس* از مایع منی یخ‌گشایی شده گاو جداسازی شد (۱۵). مخمرهای بیماری‌زای *کریپتوکوکوس نئوفورمنس* هم از نمونه‌های منی تازه و رقیق شده و غلاف قضیب گاوها و گاومیش‌های به ظاهر سالم و همچنین از مایع منی منجمد یخ‌گشایی شده گاوهای نر بومی و غیر بومی جدا گردید (۲۱). در مطالعه انجام شده توسط Zampieri و همکاران در سال ۲۰۱۳، قارچ *کاندیدا* از یک نمونه از ۱۱ نمونه اسپرم گاوی منجمد یخ‌گشایی شده یافت شد (۲۲). Mitra و همکاران در سال ۲۰۱۶ طی بررسی بر روی ۸۶۰ اسپرم منجمد یخ‌گشایی شدهٔ گاو، ۵ نمونهٔ آلوده به *آسپرژیلوس نایجر* تشخیص دادند (۲۳).

در دنیا نیز مطالعات بسیار کمی در مورد فلور قارچی دستگاه تناسلی نر حیوانات دیگر انجام شده است. در مطالعهٔ Rota و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی دستگاه تناسلی اسب‌های نر سالم، قارچهای رشته‌ای مثل گونه‌های *پنی‌سیلیوم* (۸/۵ درصد)، موکوراسه (۶/۱ درصد)، *آسپرژیلوس* و *اسکوپولاریوپسیس* (۵/۴ درصد) و مخمرهایی مانند گونه‌های *ترایکوسپورون* (۳ درصد) و *کاندیدا* (۰/۶ درصد) به‌عنوان مهم‌ترین و شایع‌ترین عوامل قارچی جدا شده از بخش‌های مختلف دستگاه تناسلی بودند (۵). در مطالعهٔ فوق، هیچ عوامل قارچی از مایع منی جداسازی نشده بود و این یافته با نتایج سایر محققین بر روی منی تازه (۱ تا ۵ درصد نمونه مثبت) (۲۴) و منی منجمد شده نریان (۶ تا ۳۳ درصد نمونه مثبت) (۲۵) و همچنین مطالعه ما بر روی گاوهای نر (۵ درصد) متفاوت است. علت جداسازی عوامل قارچی از منی تازه یا پس از یخ‌گشایی می‌تواند مربوط به آلودگی حین اسپرم‌گیری یا دستگاه‌های فرآوری‌کننده منی باشد. اگرچه این قارچها اغلب ساپروفیت هستند، اما تحت شرایط خاصی می‌توانند بیماری‌زا شده و با انتقال به حیوانات ماده منجر به آندومتریت، سقط جنین یا مرگ نوزاد گردند (۲۶). منبع عوامل قارچی در مادیان ممکن است منی یا بخش‌های آناتومیکی دام نر و یا تجهیزات آلودهٔ اسپرم‌گیری باشد. Xiaoping و همکاران در سال ۲۰۱۷ مطالعه‌ای را در خصوص جداسازی و شناسایی قارچهای موجود در اندام تناسلی پانداهای نر انجام دادند که طی آن ۲۴ گونهٔ قارچی از پوشش خارجی دستگاه تناسلی و ۵ گونهٔ قارچی از نمونه‌های منی پانداهای نر جداسازی شدند. بیشترین گونه‌های قارچی شناسایی شده شامل *آسپرژیلوس*، *ترایکوسپورون*، *پنی‌سیلیوم*، *کاندیدا* و *کلادوسپوریدیوم*

بودند (۲۷). نتایج مطالعه آنها نشان داد که قارچهای رشته‌ای (۶۴ مورد از کل ۷۶ مورد) به‌طور چشمگیری بیشتر از مخمرها (۱۲ مورد از ۷۶ مورد) در پوشش خارجی دستگاه تناسلی و منی پانداها بودند. با این حال، هیچ مخمری در منی پانداها یافت نشد که مشابه نتیجه به دست آمده توسط Rota و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی نریان سالم می‌باشد (۵). همان‌طور که مشاهده می‌شود انواع مختلفی از قارچها از منی تازه و رقیق‌شده و همچنین مایع شستشوی غلاف قضیب جداسازی شدند که این قارچها می‌توانند در ایجاد نارسایی‌های تولید مثلی تحت شرایط خاصی نقش داشته باشند.

در این مطالعه انواع متغیرهای کیفی اسپرم شامل درجه میل جنسی گاو نر (Lib)، حجم مایع انزالی (Vol)، غلظت مایع انزالی (Con)، درصد تحرک پیشروندهٔ اسپرم‌ها قبل از انجماد (PM)، سرعت واقعی اسپرم‌ها در مسیر واقعی طی شده بعد از انجماد (VCLFT)، سرعت مستقیم‌الخط اسپرم‌ها بعد از انجماد (VSLFT)، سرعت در مسیر منحنی میانگین اسپرم‌ها بعد از انجماد (VAPFT)، متوسط زاویهٔ چرخشی اسپرم‌ها بعد از انجماد (MADFT)، حداکثر دامنهٔ حرکت جانبی اسپرم‌ها بعد از انجماد (ALHFT)، فرکانس حرکات جانبی اسپرم‌ها بعد از انجماد (BCFFT) و خطی بودن حرکت اسپرم‌ها بعد از انجماد (LINFT) برحسب میزان آلودگی قارچی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. نتایج یافته‌های این پژوهش نشان داد که همبستگی مثبت معناداری بین میزان آلودگی قارچی پوست داخلی غلاف قضیب با میل جنسی و حرکت اسپرم‌ها قبل و پس از انجماد وجود دارد. میزان آلودگی قارچی آلت تناسلی قبل از انزال با غلظت منی همبستگی منفی معنادار داشت. میزان آلودگی قارچی مایع انزالی و آلت تناسلی پس از انزال با هیچ یک از پارامترهای تحرک اسپرم قبل و بعد از انجماد همبستگی نشان ندادند. میزان آلودگی قارچی اسپرم‌های منجمد یخ‌گشایی شده با سرعت در مسیر منحنی میانگین اسپرم‌ها پس از انجماد همبستگی مثبت معناداری داشت.

همچنین در این مطالعه مشخص شد که بین میزان کل آلودگی‌های قارچی و مخمری در مجموع بخش‌های تناسلی گاوهای نر سیمنتال با پارامترهای تحرک اسپرم قبل و بعد از انجماد همبستگی وجود ندارد (به استثنای همبستگی مثبت معنادار با متوسط زاویهٔ چرخشی اسپرم‌ها پس از انجماد).

نتایج آماری این مطالعه نشان داد که میزان آلودگی قارچی پوست داخلی غلاف قضیب با درصد زنده‌مانی اسپرم‌ها قبل از انجماد همبستگی مثبت معناداری داشت. همچنین با درصد اسپرم‌های غیر طبیعی قبل و پس از انجماد، همبستگی منفی معناداری نشان داد. میزان آلودگی قارچی آلت تناسلی قبل از انزال با میزان تستوسترون خون و پلاسمای منی همبستگی مثبت معنادار نشان داد. میزان آلودگی قارچی مایع پیش انزالی با درصد دم‌های غیر طبیعی اسپرم قبل و بعد از انجماد همبستگی مثبت معناداری نشان داد. میزان آلودگی قارچی مایع انزالی و آلت تناسلی پس از انزال با هیچ یک از پارامترهای کیفی اسپرم همبستگی نشان نداد. این پژوهش مشخص نمود که بین کل آلودگی‌های قارچهای رشته‌ای و مخمری در مجموع بخش‌های تناسلی گاوهای نر سیمنتال با پارامترهای کیفی اسپرم همبستگی وجود ندارد، اما ارتباط مثبت معناداری با میزان کل آلودگی قارچهای رشته‌ای با درصد اسپرماتوزوئیدهای زنده پس از انجماد و میزان تستوسترون پلاسمای منی و همچنین تمایل به ارتباط معنادار مثبت با یکپارچگی غشای اسپرم‌ها و درصد قطره سیتوپلاسمی اسپرم‌ها بعد از انجماد داشتند. میزان آلودگی قارچهای رشته‌ای تمایلی به ارتباط معنادار منفی با درصد اسپرماتوزوئیدهای غیر طبیعی در قسمت میانی اسپرم‌ها قبل از انجماد داشت. بر اساس بررسی‌های انجام شده توسط نویسندگان، تاکنون در زمینهٔ همبستگی بین میزان آلودگی قارچی بخش‌های مختلف دستگاه تناسلی گاوهای نر با پارامترهای کیفی اسپرم و همچنین میزان تستوسترون مایع منی مطالعات کمی انجام شده است، ولی تاکنون گزارشی از ارتباط بین

میزان سطح خونی تستوسترون و فراوانی قارچ‌های مستقر در دستگاه تناسلی حیوانات نر مشاهده نشده است. Tian و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که *کاندیدا آلبیکنس* و فیلترهٔ آن دارای یک اثر مهارکنندگی روی حرکت اسپرم، زنده‌مانی اسپرم و ناهنجاری‌های ساختاری اسپرم در مایع منی هستند (۲۸). برخی مطالعات آزمایشگاهی نیز افزایش شکستگی DNA اسپرم، تغییر میتوکندریال غشایی و آگلوتیناسیون اسپرم‌ها توسط گونه‌های قارچی را نشان دادند که منجر به کاهش کیفیت اسپرم و باروری موجودات نر و در نهایت اختلال در فرآیند باروری و تشکیل جنین می‌گردد (۲۹).

در مجموع یک شیوع متفاوتی از عوامل قارچی بین نمونه‌های مختلف دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال مشاهده شد. قارچ‌های رشته‌ای و مخمری به‌طور شایع در پوست داخل قضیب یافت شدند، در حالی‌که مایع انزالی پس از یخ‌گشایی کمترین میزان آلودگی را نشان داد. گونه‌های *کاندیدا* و *پنی‌سیلیوم* به‌ترتیب شایع‌ترین مخمر و قارچ رشته‌ای جدا شده از دستگاه تناسلی گاوهای نر سیمنتال بودند. این مطالعه نشان داد که بین میزان کل آلودگی‌های قارچی و مخمری در مجموع بخش‌های تناسلی گاوهای نر سیمنتال با پارامترهای تحرک اسپرم قبل و بعد از انجماد همبستگی وجود ندارد، اما ارتباط مثبت معناداری با درصد اسپرم‌های زنده پس از انجماد و میزان تستوسترون پلاسمای منی مشاهده شد. با توجه به اینکه این مطالعه بر روی تعداد محدودی از گاوهای نر سیمنتال انجام شده است پیشنهاد می‌شود که در آینده مطالعات گسترده‌تری بر روی نژادهای مختلف و تعداد بیشتری از گاوهای نر انجام پذیرد.

سپاسگزاری

از مدیریت شرکت آمارد دام طبرستان (مهندس حشمت‌الله جمالی و مهندس علی‌اکبر واحدی) بابت اجازه انجام این پژوهش و کارشناسان مرکز اصلاح نژادی و تولید اسپرم گاو سیمنتال ایران (مهندس مسعود بابایی، مهندس مرتضی فانی، مهندس آرمین خاکی، مهندس عابد ضرغامی و مهندس عادل علی‌نژاد) بابت همکاری در نمونه‌برداری جهت آزمایشات قارچ‌شناسی و تهیه اسپرم منجمد کمال قدردانی و تشکر را داریم.

تعارض منافع

این مطالعه هیچ‌گونه تعارض منافعی برای نویسندگان ندارد.

References

1- Abramson D, Mills J.T, Marquardt R.R, Frohlich A.A. Mycotoxins in fungal contaminated samples of animal feed from western Canada. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 1997; 61(1): 49-52.

2- Cafarchia C, Figueredo L.A, Otranto D. Fungal diseases of horses. *Veterinary Microbiology*. 2013; 167(1–2): 215-234.

3- Moraes I.A, Stussi J.S, Lilenbaum W, Pissinatti A, Luz F.P, Ferreira A.M.R. Isolation and identification of fungi from vaginal flora in three species of captive Leontopithecus. *American Journal of Primatology*. 2004; 64(3): 337-343.

4- Shokri H, Khosravi A, Sharifzadeh A, Tootian Z. Isolation and identification of yeast flora from genital tract in healthy female camels (*Camelus Dromedarius*). *Veterinary Microbiology*. 2010; 144(1–2): 183-186. [In Persian]

5- Rota A, Calicchio E, Nardoni S, Fratini F, Ebani V.V, Sgorbini M, *et al.* Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. *Theriogenology*. 2011; 76(3): 464-470.

6- Vinodh R, Raj G.D, Govindarajan R, Thiagarajan V. Detection of *Leptospira* and *Brucella*. *Tropical Animimal Health and Production*. 2008; 40(5): 323-329.

7- Ochsendrof F.R. Infection and reactive oxygen species. *Andrology*. 1998; 30(1): 81-86.

8- Drevius L.O. Bull spermatozoa as osmometers. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1970; 28(1): 29-39.

9- Tao Y, Sanger E, Saewu A, Leveille M.C. Human sperm vitrification: the state of the art. *Repruductive Biology and Endocrinology*. 2020; 18(17): 1-10.

10- Sannat C, Nair A, Sahu S.B, Sahasrabudhe S.A, Kumar A, Gupta A.K, *et al.* Effect of species, breed, and age on bacterial load in bovine and bubaline semen. *Veterinary World*. 2015; 8(4): 461-466.

11- Guerin B, Nibart M, Marquant-Le Guienne B, Humblot P. Sanitary risks related to embryo transfer in domestic species. *Theriogenology*. 1997; 47: 33-42.

12- Bailey J.L, Ois Bilodeau J.F, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomena. *Journal of Andrology*. 2000; 21(1): 1–7.

13- Karrow A.M, Critser J.K. Reproductive tissue banking: scientific principles. San Diego, CA: *Academic Press*. 1997.

14- Mortimer D. Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reproductive BioMedical Online*. 2004; 9(2): 134-151.

15- Bielanski A, Bergeronb H, Laub P.C.K, Devenish J. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*. 2003; 46(2): 146-152.

16- D'Angelo M, Pavão D.L, Melo G.M, Rojas N, Souza R.J, Athayde C, *et al.* Acceptable microorganisms concentration in a semen sample for *in vitro* embryo production. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006; 37(4): 571-572.

17- Bielanski A, Vajta G. Risk of contamination of germplasm during cryopreservation and cryobanking in IVF units. *Human Reproduction*. 2009; 24(10): 2457-2467.

18- Eanglesome M.D, Garcia M.M. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. *Revue Scientifique et Technique*. 1997; 16(1): 215-225.

19- Shokri H, Yadollahi M. Isolation and identification of fungal microbiota from genital tract of ewes. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2017; 168(4-6): 81-86. [In Persian]

20- Seyedmousavi S, Bosco S.M.G, Hoog S, Ebel F, Elad D, Gomes R.R. Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Medical Mycology*. 2018; 56(1): S165-S187.

21- Corona A, Cherchi R. Microbial quality of equine frozen semen. *Animal Reproduction Sciences*. 2009; 115(1-4): 103-109.

22- Zampieri D, Santos V.G, Braga P.A, Ferreira C.R, Ballottin D, Tasic L, *et al.* Microorganisms in cryopreserved semen and culture media used in the in vitro production (IVP) of bovine embryos identified by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (MALDI-MS). *Theriogenology*. 2013; 80(4): 337-345.

23- Mitra J, Chowdhury S.D, Panda S.K, Chakraborty M, Singha A. Microbiological evaluation of bovine frozen semen samples in west Bengal, India. *Exploratory Animal and Medical Research*. 2016; 6(2): 185-191.

24- Malmgren L, Olsson Engvall E, Engvall A, Albihn A. Aerobic bacterial flora of semen and stallion reproductive tract and its relation to fertility in under field conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 1998; 39(2): 173-182.

25- Pugh D.G, Martin M.T, Shull J.W, Bowen J.M. Endometrial candidiasis in five mares. *Journal of Equine Veterinary Sciences*. 1986; 6(1): 40-43.

26- Samanta I. Veterinary Mycology. 1st edn. Springer, 2015.

27- Xiaoping M, Changcheng L, Jiafa H, Yu G. Isolation and identification of culturable fungi from the genitals and semen of healthy giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *BMC Veterinary Research*. 2017; 13(1): 344.

28- Tian Y.H, Xiong J.W, Hu L, Huang D.H, Xiong C.L. *Candida albicans* and filtrates interfere with human spermatozoal motility and alter the ultrastructure of spermatozoa: an *in vitro* study. *International Journal of Andrology*. 2007; 30(5): 421-429.

29- Burrello N, Calogero A.E, Perdichizzi A, Salmeri M, D'Agata R, Vicari E. Inhibition of oocyte fertilization by assisted reproductive techniques and increased sperm DNA fragmentation in the presence of *Candida albicans*: a case report. *Reproduction Biomedicine Online*. 2004; 8(5): 569-573.

New Findings in Veterinary Medicine
Homepage: nfvm.uoz.ac.ir
Semiannual - Print ISSN: 2645-4491 Online ISSN: 2676-5004

Volume 6, Issue 2, Autumn & Winter 2023, pages: 8-19

Evaluation of fungal contamination rate of simental male cows (*Fleckvieh*) genital system and its correlation with viability and sperm motility and testosterone concentration of blood serum and semen plasma

Amir Khaki[1], Hojjatollah Shokri[*2]

1- Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.
2- Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran.

Receive: January 4, 2023; Revise: January 17, 2023; Accept: January 22, 2023

10.22034/nfvm.2023.379656.1169 20.1001.1.26454491.1402.6.2.2.0

Summary

The aim of this study was to evaluate the correlation between the fungal contamination rate of various parts of simental male cows genital system with viability and sperm motility and also testosterone concentration in blood serum and semen plasma. Sampling was performed from external skin of penis, internal skin of penis, penis before ejaculation, fluid pre ejaculation, ejaculation fluid (semen), penis after ejaculation, and ejaculation fluid after defreezing from male cows. For mycological examination, all samples were cultured onto sabouruad dextrose agar medium containing chloramphenicol (0.005%) and kept at 30^{o}C for 7-10 days. Sperms motility using CASA software and the percentage of abnormal and viable sperms using Eosin nigrosin were performed. Also, testosterone levels of blood serum and semen plasma samples were assessed by quantitative chemiluminescence method. The most frequently isolated fungi were *Candida* spp. (35.6%), *Penicillium* spp. (18.6%) and *Aspergillus* (14.2%). The highest and lowest mean rates of fungi were associated with internal skin of penis (21.08 ± 16.43) and ejaculation fluid after defreezing (2.00 ± 2.45), respectively. Although there was no correlation between the total amount of the fungal contamination and sperm motility parameters before and after freezing, a positive significant relationship was observed between viable sperms percent after freezing and testosterone concentration of semen plasma ($P<0.05$). The findings showed that there is a significant correlation between fungal community rate and viable sperms and testosterone level of semen fluid.

Keywords: *Aspergillus, Candida krusei, Male sexual organ, Microbial flora, Sex hormone*