مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۳ شماره‌های۲ و۳ تابستان و پائیز ۱۳۸۸، صفحات ۲۰- ۱۵

مقایسه فراوانی *هلیکوباکتر پیلوری* در زنان بارور و نابارور با استفاده از فناوری‌های ELISA و PCR

مریم ساده[۱*]، محمد باقر خلیلی[۱]، حسین فلاح زاده[۲]

۱) مرکز تحقیقات درمانی ناباروری یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
۲) گروه آمار و اپیدمیولوژی ،دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی
نویسنده رابط: مریم ساده، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
همراه:۰۹۱۳۲۵۲۷۶۷۹ sadeh_m20@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله : ۸۸/۶/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله : ۸۸/۱۲/۱۱

چکیده:

زمینه و اهداف: هرچند *هلیکوباکتر پیلوری* عامل گاستریت می باشد، اما با توجه به خصوصیات آن به‌نظر می رسد که بتواند در دستگاه تناسلی کلونیزه و خطر ناباروری را افزایش دهد. هدف از این مطالعه مقایسه فراوانی *هلیکوباکتر پیلوری* در زنان بارور و نابارور به روش‌های ELISA و PCR بود. تا بتوان به ارتباط بین *هلیکوباکتر پیلوری* با نازایی در زنان پرداخت.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی- مقطعی ۲۵۰ زن شامل ۱۳۱ (۵۲/۴٪) نابارور (مورد) و ۱۱۹(۴۷/۶٪) بارور (شاهد) مراجعه کننده به مرکز تحقیقات درمانی ناباروری یزد بررسی شدند. پس از جمع‌آوری نمونه خون آزمایش الیزا انجام شد و میزان IgG و IgM در افراد مشخص گردید. همزمان دو سوآب از واژن افراد جهت انجام آزمون PCR تهیه گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های T- test و مجذور کای استفاده شد.

یافته ها: از ۲۵۰ نفر تیتر آنتی بادی در ۱۵۸ نفر (۶۳/۲٪) شامل ۷۸ نفر گروه مورد (۶۵/۵۴٪) و ۸۰ نفر (۶۱/۱٪) گروه شاهد، مثبت بود(P=0.463). IgM در کلیه نمونه‌ها منفی بود. نتایج نشان داد که در ۳ نفر (۱۰۰٪) از افرادی که علت نازائی آنها Ovarian Factor بود، در ۲۶ نفر (۷۰/۲٪)با علت Polycystic Ovarian ، در ۱۸ نفر (۵۲/۵٪)با علت Tubal Factor و در ۲۱ نفر (50٪)با علت نازایی نامشخص تیتر آنتی‌بادی مثبت بود. بیشترین موارد مثبت تیتر آنتی بادی در گروه‌های سنی ۳۹-۳۰ سال بود (گروه‌های شاهدو مورد به ترتیب ۶۱/۲٪ و ۶۳/۶٪)، که معنی دار نبود(P >0.05).

نتیجه گیری : هر چند میانگین تیتر IgG در زنان نابارور بیشتر است اما معنی دار نیست. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* با نازایی ارتباط نداشته باشد. اما، موارد مثبت تیتر آنتی‌بادی در صورت Polycystic Ovarian بیشتر است. آیا ممکن است که باکتری مزبور در ایجاد آن نقش داشته باشد؟

کلید واژه ها: نازایی ، *هلیکوباکتر پیلوری*، زنان ، ELISA ، PCR

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

تحقیقات فراوان توانستند نقش چندین گونه باکتریایی در ایجاد نازایی زنان را به اثبات برسانند(۴-۱). امروزه مشخص شده که باکتری‌هایی همچون *کلامیدیاتراکوماتیس*، *نایسریاگونوره*، *اشریشیاکلی* و احتمالا *اورآپلاسما اوره‌آلیتیکوم* از جمله مهم‌ترین گونه‌های باکتریایی می‌باشند که مستقیم یا غیر مستقیم عامل معضل نازایی را موجب می‌شوند(۴،۳). اخیراً گزارشات معدودی اشاره نمودند که با توجه به خصوصیات *هلیکوباکتر پیلوری* مبنی بر خنثی سازی محیط اسیدی قادر است در واژن لانه گزینی نماید، و به مرور زمان التهابات بدون علائم را موجب شود(۵،۶). مطالعاتی که توسط Erick و همکاران (۶) انجام پذیرفت نشان داد که انتقال باکتری از راه تناسلی- دهانی(Oral-genital) صورت می‌گیرد. دردگان و همچنین متخصصین دیگر(۸-۶) توانستند *هلیکوباکتر پیلوری* را همزمان از بزاق دهان و واژن با استفاده از تکنیک PCR ایزوله نمایند. هر چند محققان فوق سعی کردند التهاب دستگاه تناسلی توسط *هلیکوباکتر پیلوری* را به نازایی نسبت دهند، اما گروه دیگری اعلام می‌دارند که علت نازایی ممکن است نتیجه واکنش سیستم ایمنی یا همولوژی خطی بین آنتی‌ژن‌های پروتئینی *هلیکوباکتر پیلوری* و پروتئین توبولین انسان باشد. نتیجه آن همانا اختلال در سیستم تناسلی است و نهایتاً موجب نازایی می‌گردد (۹،۶،۵).

مطالعه دیگری در مرکز تحقیقات درمانی ناباروری (IVF) یزد صورت پذیرفت میزان آنتی‌بادی IgG ضد *هلیکوباکتر پیلوری* در زنان نابارور انجام شد. نتایج نشان داد که وجود آنتی‌بادی مزبور در زنان نازا بیشتر از زنان سالم است. این مقدار در زنانی که به‌علت فاکتور لوله‌ای (Tubal Factor) و فاکتور تخمدان (Ovarian Factor) نازا بودند به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده است(۴).

در مطالعه حاضر سعی شد علاوه بر تعیین ارتباط حضور آنتی بادی ضد *هلیکوباکتر پیلوری* در زنان نازا وجود ژن‌های *هلیکوباکتر پیلوری* در واژن توسط تست PCR بررسی شود. تا در صورت وجود این باکتری در واژن اثبات ارتباط آن با نازایی ممکن گردد.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه توصیفی- مقطعی به صورت مورد- شاهدی انجام گرفت. با در نظر گرفتن سطح اطمینان ۹۵٪ و توان آزمون ۸۰٪ برای رسیدن به اختلاف معنی‌دار حداقل ۲۲٪ (با توجه به مطالعات مشابه قبلی) در تیتر آنتی بادی مثبت در گروه مورد نسبت به گروه شاهد، به تعداد ۱۱۵ نفر در گروه مورد و ۱۱۵ نفر در گروه شاهد نیاز داشتیم. در این مطالعه ۱۱۹ نفر مورد (نابارور) و۱۳۱ نفر شاهد (بارور) وارد مطالعه شدند.

معیارهای ورود در گروه شاهد (زنان بارور) داشتن حداقل یک فرزند و گروه مورد (زنان نابارور) تشخیص پزشک زنان مبنی بر نازایی آنان بود. به این ترتیب، گروه مورد شامل زنانی بود که به تشخیص پزشک متخصص زنان، نازایی آنها تائید شد و جهت درمان (IVF) به مرکز ناباروری وابسته به دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد مراجعه کردند. گروه شاهد شامل زنانی بود که حداقل یک باروری را تجربه کرده بودند.

از هر یک از افراد جامعه مورد مطالعه ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون جمع‌آوری شد و سدم آن جدا گردید. قبل از فریز مقداری از آن جهت آزمایش ELISA جدا شد. (کیت Captia H. pylori IgG ELISA از شرکت Biotech به شماره کاتالوگ ۲۳۴۶۴۰۰)

همزمان جهت انجام آزمایش PCR از هر دو گروه مورد و شاهد یک نمونه توسط سوآپ واژن اندوسرویکس برداشت شد. نمونه پس از انتقال به محیط ترانسپورت در ۲۰- درجه نگهداری شد. جهت انجام تست PCR از کیت ویژه *هلیکوباکتر پیلوری* شرکت پویا زیست تک استفاده شد. پرایمر مورد استفاده که ژن Cag A را تکثیر می‌نمود از شرکت ... راست وتهیه شد.

....5- CAC CAA CGC GTC CAA GAG TCC TGA -3

.... 5- TGT TGC CGT TTG GTC TCC AAT TTT -3

ابتدا ۱ میکرولیتر از مخلوط پرایمرها و ۵-۱۰ میکرولیتر از DNA از قبل استخراج شده را به یکی از لوله‌های PCR Premix اضافه گردید. سپس حجم محلول اضافه شده به هر لوله را با آب مقطر به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. به ازاء هر ۳ نمونه یک کنترل مثبت و یک کنترل منفی منظور گردید و با ۵ میکرو لیتر روغن پوشانده شد.

میکروتیوپ‌ها در ترموسایکلر قرار داده شد و درجه آنها به‌قرار ذیل تنظیم شد:

Archive of SID

www.SID.ir

1st Denaturation با ۱۸۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد با یک چرخه،Denaturation ۳۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد با ۴۰ چرخه، Annealing به‌مدت ۳۵ ثانیه با ۴۰ چرخه و بالاخره Final extension با دمای ۷۰ درجه به‌مدت ۱۸۰ ثانیه در یک چرخه انجام شد. در پایان محصولات بدست آمده در ژل آگاروز ۱٪ قرار داده شد و با باند bp ۲۹۴ در برابر DNA Ladder نتایج ثبت گردید.

روش تجزیه و تحلیل اطلاعات: پس از جمع آوری اطلاعات و کد گذاری، آنها را وارد رایانه نمودیم. با استفاده از نرم افزار SPSS 15 ، آزمون آماری مجذور کای برای مقایسه داده‌های کیفی در دو گروه و آزمون T-test برای مقایسه داده‌های کمی استفاده گردید.

یافته‌ها:

جمع افراد مورد آزمایش برای تشخیص آنتی بادی ضد *هلیکوباکتر پیلوری* از سرم و آزمایش سوآب از واژن آنها توسط فناوری PCR (شکل۱) ۲۵۰ نفر بود. از این تعداد ۱۳۱ (۵۲/۴٪) نفر بارور (شاهد) و ۱۱۹(۴۷/۶٪) نفر نابارور(مورد) بودند.

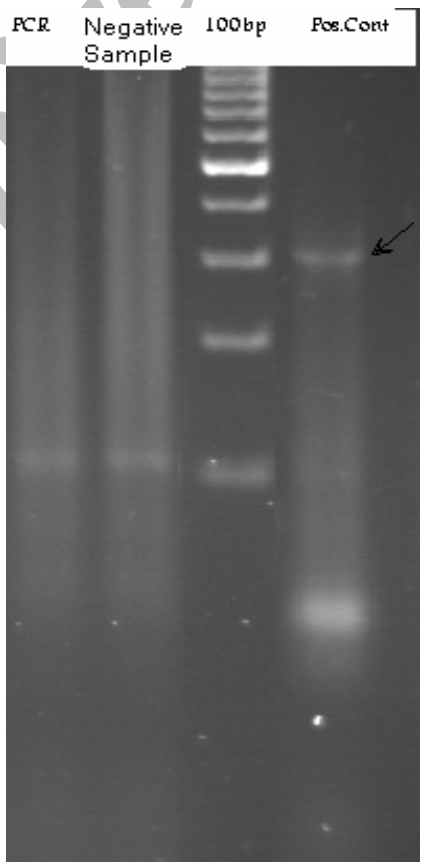
از هیچ نمونه‌ای DNA *هلیکوباکتر پیلوری* ایزوله نشد.

دربین افراد بارور ۸۰ نفر (۶۱/۱٪) دارای تیتر آنتی بادی مثبت و ۵۱ نفر (۳۸/۹٪) دارای تیتر منفی بودند. در صورتیکه ۷۸ (۶۵/۵۴٪) از افراد نابارور دارای تیتر مثبت و ۴۱ نفر (۳۴/۵٪) تیتر منفی داشتند. همانطور که جدول ۱ نمایش می‌دهد تفاوت با P=0.463 معنی‌دار نبوده است.

جدول ۲ توزیع فراوانی آنتی‌بادی *هلیکوباکتر پیلوری* به تفکیک گروه‌های سنی را نشان می‌دهد. البته، تفاوت معنی‌دار نبود (P=0.9).

بیشترین تیتر آنتی‌بادی در گروه‌های سنی زنان بارور هم در گروه سنی ۳۹-۳۰ مشاهده شد.

جدول ۳ توزیع فراوانی آنتی‌بادی *هلیکوباکتر پیلوری* به تفکیک علت نازایی را نشان می‌دهد. به‌نظر می‌رسد که تیتر آنتی بادی مثبت در بیماران با فاکتور PCO بیشتر است.



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: توزیع فراوانی آنتی بادی *هلیکو باکتر پیلوری* در زنان بارور و نابارور

گروه / نتیجه تست	بارور		نابارور	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
مثبت	۸۰	۶۱/۱	۷۸	۶۵/۵
منفی	۵۱	۳۸/۹	۴۱	۳۴/۵
کل	۱۳۱	۱۰۰	۱۱۹	۱۰۰

جدول ۲: توزیع فراوانی تیتر مثبت آنتی بادی(IgG) *هلیکو باکتر پیلوری* به تفکیک گروه‌های سنی

گروه / گروه سنی	بارور		نابارور	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۲۰ >	۸ N=13	۶۱/۵	۲ N=2	۱۰۰
۲۰-۲۹	۳۹ N=60	۶۵	۳۴ N=60	۵۶/۷
۳۰-۳۹	۳۰ N=44	۶۸/۲	۴۲ N=66	۶۳/۶
۴۰ >	۱ N=2	۵۰	۲ N=3	۶۶/۷
نتیجه آزمون	P=0.575		P=0.93	

جدول ۳: توزیع فراوانی تیتر مثبت آنتی‌بادی *هلیکوباکتر پیلوری* به تفکیک علت نازایی

علت نازایی	Tubal Factor (۳۷)	Ovarian Factor (۳)	Poly Cystic Factor (۳۷)	Unknown (۴۲)
تعداد	۱۸	۳	۲۶	۲۱
درصد	۵۲/۵	۱۰۰	۷۰/۲	۵۰

Archive of SID

www.SID.ir

بحث:

اخیرا گزارشات معدودی ارتباط عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* با مشکل نازایی در هر دو جنس مرد و زن را بیان نموده‌اند(۴،۵و۷).

در بررسی حاضر از جمع ۲۵۰ زن ۱۵۸نفر (۶۳/۲٪) دارای تیتر مثبت آنتی بودند که خود نمایانگر میزان شیوع عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در بین زنان می‌باشد. در یک بررسی که در مرکز IVF با ۱۸۰ نفر زن انجام پذیرفت. میزان شیوع *هلیکوباکترپیلوری* که توسط آزمایش الیزا قرار گرفت ۶۵٪ بوده است(۴). یک سنجش عمومی توسط تردست و همکاران (۱۰) در بین مراجعه‌کنندگان به آزمایشگاه مرکزی یزد انجام پذیرفت. نتایج آن نشان داد که شیوع عفونت *هلیکوباکترپیلوری* ۵۹/۸٪ است که با نتایج حاصل از این بررسی و مطالعه قبلی همخوانی ندارد. نتایج حاصله از بررسی‌های انجام شده در بسیاری از شهرهای ایران نشان می‌دهد که میزان درصد تیتر آنتی‌بادی مثبت شبیه به یکدیگر بوده (۸ و۱۱). اما در مقایسه با کشورهای صنعتی بسیار بالاتر است. زیرادر مطالعه سرواپیدمیولوژی وسیعی که در آمریکا انجام پذیرفته درصد آلودگی به *هلیکوباکترپیلوری* را ۱۷/۳ ٪ گزارش نموده‌اند(۱۲).

در بررسی حاضر میزان تیتر آنتی بادی مثبت در زنان نابارور ۶۵/۵٪ و در گروه شاهد(بارور) ۶۱/۱٪ بوده است (P=0.463). در مطالعه مشابهی که توسط خلیلی و همکاران (۴) انجام پذیرفته میزان شیوع باکتری در زنان نابارور ۶۶/۷٪ و در گروه شاهد ۶۳/۳٪ گزارش شده است. هر چند ارتباط معنی دار نبوده اما درصد شیوع *هلیکوباکتر پیلوری* در زنان نازا بیشتر بوده است. بنابراین هر دو مطالعه سرواپیدمیولوژی که در مرکز IVF یزد انجام پذیرفته شبیه به یکدیگر می‌باشد. اما، در مقایسه با نتایج Figura و همکاران (۵) مغایرت دارد. زیرا در بررسی ایشان نشان داده شد که ۴۹/۱ ٪ افراد نازا در مقابل ۳۳/۳٪ از افراد شاهد دارای تیتر آنتی بادی مثبت بر ضد *هلیکوباکتر پیلوری* بودند که این تفاوت معنی دار بوده است. هرچند کارشناس آمار تعداد نمونه را تائید نموده اما علت مغایرت با نتایج حاصله در یزد را با جبران در تعداد نمونه‌ها می‌توان توجیه نمود. زیرا Figura و همکاران (۵) از ۱۶۷ مورد و ۸۳۷ شاهد استفاده نموده‌اند که جمع آوری و انجام این تعداد نمونه در مرکز IVF یزد غیر ممکن می‌باشد.

بسیاری معتقدند که به‌دلیل وجه تشابه بین واژن و معده گونه فوق قادر به کلنیزه شدن در واژن نیز می‌باشد(۸-۶). اما این سئوال مطرح است که انتقال چگونه صورت می‌پزیرد؟ در یک مطالعه که توسط Guy D Eslik و همکاران (۶) صورت پذیرفت نشان داده شد که باکتری *هلیکوباکتر پیلوری* از راه‌های مختلفی از جمله دهانی- تناسلی ممکن است به شریک جنسی منتقل شود. محققین فوق فرضیه خود را با ردیابی هلیکوباکتر از واژن زنان مورد مطالعه توسط انجام آزمایش PCR ثابت نمودند، که گونه موجود در واژن از دهان فرد به شریک جنسی وی منتقل شده است.

با توجه به تحقیقات گذشته، در بررسی حاضر سعی شد تا با الگوبرداری از پرایمر ویژه که توسط Kerr و همکاران(۱۳) طراحی شده بود نمونه سوآب از واژن تهیه و مورد آزمایش PCR قرار گیرد. کلیه نمونه‌های مورد آزمایش قرار گرفت اما از هیچ نمونه DNA هلیکوباکتر ایزوله نشد. نتیجه حاصل شده از این بررسی با مطالعه دیگران (۶ ،۱۲) مغایرت دارد. زیرا بسیاری از مطالعات لانه گزینی *هلیکوباکتر پیلوری* را در واژن زنان به اثبات رسانده‌اند. دلیل توجیح‌کننده را شاید بتوان در روابط غیر متداول جنسی در غرب یا ضعف روش Single PCR دانست.

همانطور که نتایج نشان می‌دهند گروه نازا بر اساس علت نازایی به ۴ دسته تقسیم شدند. میزان شیوع آنتی بادی در زنان با عامل PCO بیشتر مشاهده شد. هرچند تفاوت معنی‌دار نبود اما شاید عامل PCO به‌دلیل نامعلومی در گسترش عفونت هلیکوباکتر دخیل باشد. البته این موضوع به بررسی با تعداد نمونه بیشتر نیاز دارد ، تا حقیقت آن مسلم گردد.

نتیجه‌گیری:

از هیچ نمونه‌ای DNA *هلیکوباکتر پیلوری* جدا نشد. نیتر آنتی بادی در دو گروه شاهد و مورد تفاوت معنی دار ندارد. این تیتر در گروه بارور و در گروه سنی دهه ۳۰ قابل توجه است. به‌نظر می‌رسد که عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* با نازایی ارتباط ندارد. اما، متاسفانه شیوع عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* در سطح استان در بین زنان با توجه به مطالعات انجام شده بالا اشد. لذا، مسئولین امر باید تدابیری اتخاذ تا این معضل به حد مناسب خود باز گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

شواهد و قرائن نشان می‌دهد که *هلیکوباکتر پیلوری* در بزاق و همچنین در خون انسان یافت می شود. بنابراین، احتمال انتقال آن به واژن مسلم شده است. از آنجا که معدودی از محققین آن را عامل غیر مستقیم در ایجاد نازایی زنان معرفی کرده‌اند، لازم است بررسی حاضر ادامه یابد. در این صورت به‌جای Single PCR بهتر است از Nested PCR استفاده تا حضور یا عدم حضور DNA *هلیکوباکتر پیلوری* مشخص گردد.

تقدیر و تشکر:

از کلیه همکاران در مرکز IVF یزد به‌ویژه جناب آقای دکتر عبدلی مدیر مرکز و همچنین آقای حسین فضلی و خانم قیصری سپاسگزاری می‌شود.

فهرست مراجع:

1.Khalili MB , Sharifi- Yazdi MK. The effect of Bacterial infection on the quality of Human's spermatozoa. *Iranian J Public Health*. 2001; **30:** 119-122.

2.Toth A, Lesser ML. Asymptomatic bacterio-spermia in fertile and infertile men. *Fertile Strile* 1981; **36**:68- 910.

3. Khalili MA, Pourshafie MR, Saifi M , Khalili MB. Bacterial infection of the reproductive tract of infertile men in Iran. *Mid East Fertile Soc J*. 2000; **5**(2): 126-131.

۴ . خلیلی م ، شریفی یزدی م و ساده م. ارتباط عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* با نازایی در زنان مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری یزد. *مجله دانشکده پزشکی تهران*. ۱۳۸۶،دوره ۶۵ ، شماره ۳، صص ۷۲تا ۷۴ .

5.Figura N. piombori P et al. H. pylori infection and infertility. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2002; **14**(8): 663-9.

6.Guy DE Eslick. H. pylori infection transmitted sexually via oral genital contact; a hypothetical model. *Sex Transm Infect*. 2000. **76**: 489-492.

7.Singh V, Trikha B, Vaiphel K, Nain CK, Thennarsu K, Singh K. *H. pylori*: evidence for spouse- to – spouse transmission. *J Gastroenterol Hepatol*. 1999; **14**: 519-22.

8.Ferguson DA, Li C, Patel NR. Isolation of *H. pylori* from saliva. *J Clin Microbiol*. 1993;**31**: 2802-4.

9.Figura N. piombori P, Gambera L, Renieri T, Ponzetto A,Giannace R *et al*. Presence of anti-*H. pylori* antibody in follicular liquid, sperm and vaginal mucus sample of infected patients with fertility disorders. European Helicobacter study group. strasbourg 2001;pp 9-12.

10.Chaudhury A, Rajasekhar D, Latheef SA, Subramanym G. Seroprevalence of Ig G to C. pneumonia and *H. pylori* among coronary heart disease patients and normal individuals in south Indian Population. *Indian J Pathol Microbiol*. 2004; **47**(3): 443-4.

۱۱. خلیلی م. میکروبیولوژی کلینیکی. چاپ اول، انتشارات سبحان، ۱۳۸۴ ، صص ۸۶ تا ۱۱۵.

12.Guillermo I. Perez-Perez, Steven S. Witkin, Michael D. Decker and Martin J. Blaser. Seroprevalence of *Helicobacter Pylori* infection in couples. *J Clin Microbiol*, 1991; **29**(3):642-644.

13. Kerr JR. AL-Khattaf A, Barson AJ, Burnie PJ. An association between sudden infant death syndrome and *H. pylori* infection. *Arch Dis child*. 2000; **83**: 429-434.

Archive of SID

www.SID.ir