

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

مریم سادۀ^{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 سادۀ، 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 به نظر 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 سواب از واژن افراد جهت انجام آزمون PCR تهیه گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون‌های T-test و مجذور کای استفاده شد.

یافته‌ها: از ۲۵۰ نفر تیتراژ آنتی بادی در ۱۵۸ نفر (۶۳/۲٪) شامل ۷۸ نفر گروه مورد (۵۴/۶٪) 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 نازایی 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 (۵۰٪) با علت نازایی نامشخص تیتراژ آنتی بادی مثبت بود. بیشترین موارد مثبت تیتراژ آنتی بادی در گروه‌های سنی ۳۰-۳۹ سال بود (گروه‌های شاهد و مورد به ترتیب ۶۱/۲٪ و ۶۳/۶٪)، که معنی دار نبود (P>0.05).

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

کلید واژه‌ها: نازایی، هلیکوباکتر پیلوری، زنان، ELISA، PCR

مقدمه:

تحقیقات فراوان توانستند نقش چندین گونه باکتریایی در ایجاد نازایی زنان را به اثبات برسانند (۴-۱). امروزه مشخص شده که باکتری‌هایی همچون *کلامیدیا تراکوماتیس*، *نایسریا گونوره*، *اشریشیا کلی* و احتمالاً *اورا پلاسما اوره‌آلیتیوم* از جمله مهم‌ترین گونه‌های باکتریایی می‌باشند که مستقیم یا غیر مستقیم عامل معضل نازایی را موجب می‌شوند (۳، ۴). اخیراً گزارشات معدودی اشاره نمودند که با توجه به خصوصیات هلیکوباکتر پیلوری مبنی بر خنثی سازی محیط اسیدی قادر است تا در واژن لانه گزینی نماید، و به مرور زمان التهابات بدون علائم را موجب شود (۵، ۶). مطالعاتی که توسط Elsieck و همکاران (۶) انجام پذیرفت نشان داد که انتقال باکتری از راه تناسلی - دهانی (Oral-genital) صورت می‌گیرد. نامبردگان 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 (۵، ۶، ۹).

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 به علت 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 آنتی‌بادی 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 تیتراژ آنتی‌بادی 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) و ۱۳۱ 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 تأیید 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 شماره کاتالوگ ۲۳۴۶۴۰۰ 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 سوآب از 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 درخواست تهیه شد.

....5- CAC CAA CGC CTC 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:

(۵۲/۴٪) نفر بارور (شاهد) و ۱۱۹ (۴۷/۶٪) نفر نابارور (مورد) بودند.

از هیچ نمونه ای DNA هلیکوباکتر پیلوری ایزوله نشد. در بین افراد بارور ۸۰ نفر (۶۱/۱٪) دارای تیتراژ آنتی بادی مثبت و ۵۱ نفر (۳۸/۹٪) دارای تیتراژ منفی بودند. در صورتیکه ۷۸ (۶۵/۵۴٪) از افراد نابارور دارای تیتراژ مثبت و ۴۱ نفر (۳۴/۵٪) تیتراژ منفی داشتند. همانطور که جدول ۱ نمایش می دهد تفاوت با $P=0.463$ معنی دار نبوده است.

جدول ۲ توزیع فراوانی آنتی بادی هلیکوباکتر پیلوری به تفکیک گروه های سنی را نشان می دهد. البته، تفاوت معنی دار نبود ($P=0.9$).

بیشترین تیتراژ آنتی بادی در گروه های سنی زنان بارور هم در گروه سنی ۳۹-۳۰ مشاهده شد.

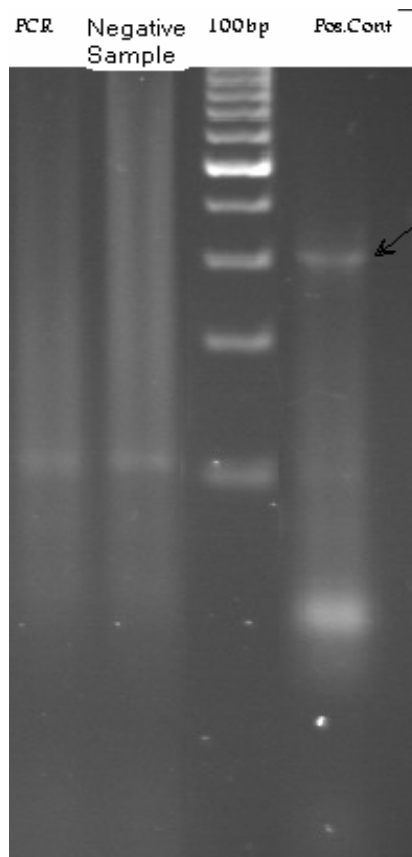
جدول ۳ توزیع فراوانی آنتی بادی هلیکوباکتر پیلوری به تفکیک علت نازایی را نشان می دهد. به نظر می رسد که تیتراژ آنتی بادی مثبت در بیماران با فاکتور PCO بیشتر است.

Denaturation 1st با ۱۸۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد با یک چرخه، Denaturation ۳۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد با ۴۰ چرخه، Annealing به مدت ۳۵ ثانیه با ۴۰ چرخه و بالاخره Final extension با دمای ۷۰ درجه به مدت ۱۸۰ ثانیه در یک چرخه انجام شد. در پایان محصولات بدست آمده در ژل آگاروز ۱٪ قرار داده شد و با باند ۲۹۴ bp 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 داده های کیفی در دو گروه و آزمون T-test برای مقایسه داده های کمی استفاده گردید.

یافته ها:

جمع افراد مورد آزمایش برای تشخیص آنتی بادی ضد هلیکوباکتر پیلوری از سرم و آزمایش سوآب از واژن آنها توسط فناوری PCR (شکل ۱) ۲۵۰ نفر بود. از این تعداد ۱۳۱



شکل ۱: تصویر ژل الکتروفورز محصولات PCR

جدول ۱: توزیع فراوانی آنتی بادی هلیکوباکتر پیلوری در زنان بارور و نابارور

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

جدول ۲: توزیع فراوانی تیتراژ مثبت آنتی بادی (IgG) هلیکوباکتر پیلوری به تفکیک گروه‌های سنی

نابارور		بارور		گروه گروه سنی
درصد	تعداد	درصد	تعداد	
۱۰۰	۲ N=2	۶۱/۵	۸ N=13	$20 <$
۵۶/۷	۳۴ N=60	۶۵	۳۹ N=60	۲۰-۲۹
۶۳/۶	۴۲ N=66	۶۸/۲	۳۰ N=44	۳۰-۳۹
۶۶/۷	۲ N=3	۵۰	۱ N=2	$40 >$
P=0.93		P=0.575		نتیجه آزمون

جدول ۳: توزیع فراوانی تیتراژ مثبت آنتی بادی هلیکوباکتر پیلوری به تفکیک علت نازایی

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

بحث:

اخیرا گزارشات محدودی ارتباط عفونت هلیکوباکتر پیلوری با مشکل نازایی در هر دو جنس مرد و زن را بیان نموده اند (۷۵، ۴).

در بررسی حاضر از جمع ۲۵۰ زن ۱۵۸ نفر (۶۳/۲٪) دارای تیتراژ مثبت آنتی بودند که خود نمایانگر میزان شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری در بین زنان می باشد. در یک بررسی که در مرکز IVF با ۱۸۰ نفر زن انجام پذیرفت. میزان شیوع هلیکوباکتر پیلوری که توسط آزمایش الیزا قرار گرفت ۶۵٪ بوده است (۴). یک سنجش عمومی توسط تر دست و همکاران (۱۰) در بین مراجعه کنندگان به آزمایشگاه مرکزی یزد انجام پذیرفت. نتایج آن نشان داد که شیوع عفونت هلیکوباکتر پیلوری ۵۹/۸٪ است که با نتایج حاصل از این بررسی و مطالعه قبلی همخوانی ندارد. نتایج حاصله از بررسی های انجام شده در بسیاری از شهرهای ایران نشان می دهد که میزان درصد تیتراژ آنتی بادی مثبت شبیه به یکدیگر بوده (۸ و ۱۱). اما در مقایسه با کشورهای صنعتی بسیار بالاتر است. زیرا در مطالعه سرواپیدمیولوژی وسیعی که در آمریکا انجام پذیرفته درصد آلودگی به هلیکوباکتر پیلوری را ۱۷/۳٪ گزارش نموده اند (۱۲).

در بررسی حاضر میزان تیتراژ 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 می باشد. 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 تیتراژ آنتی بادی مثبت بر ضد هلیکوباکتر پیلوری بودند که این تفاوت معنی دار بوده است. هر چند کارشناس آمار تعداد نمونه را تأیید نموده اما علت مغایرت با نتایج حاصله در یزد را با جبران در تعداد نمونه ها می توان توجیه نمود. زیرا Figura و همکاران (۵) از ۱۶۷ مورد و ۸۳۷ شاهد استفاده نموده اند که جمع آوری و انجام این تعداد نمونه در مرکز IVF یزد غیر ممکن می باشد.

بسیاری معتقدند که به دلیل وجه تشابه بین واژن و معده گونه فوق قادر به کلنیزه شدن در واژن نیز می باشد (۸-۶). اما این سؤال مطرح است که انتقال چگونه صورت می پذیرد؟ در یک مطالعه که توسط Guy D Eslik و همکاران (۶) صورت پذیرفت نشان داده شد که باکتری هلیکوباکتر پیلوری از راه های 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 نمونه های 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 رسانده اند. دلیل توجیه کننده را شاید بتوان در روابط غیر متداول جنسی در غرب یا ضعف روش Single PCR دانست. همانطور که نتایج نشان می دهند گروه نازا بر اساس علت نازایی به ۴ دسته تقسیم شدند. میزان شیوع آنتی بادی در زنان با عامل PCO بیشتر مشاهده شد. هر چند تفاوت معنی دار نبود اما شاید عامل PCO به دلیل نامعلومی در گسترش عفونت هلیکوباکتر دخیل باشد. البته این موضوع به بررسی با تعداد نمونه بیشتر نیاز دارد، تا حقیقت آن مسلم گردد.

نتیجه گیری:

از هیچ نمونه ای DNA هلیکوباکتر پیلوری جدا نشد. تیتراژ آنتی بادی در دو گروه شاهد و مورد تفاوت معنی دار ندارد. این تیتراژ در گروه بارور و در گروه سنی دهه ۳۰ قابل توجه است. به نظر می رسد که عفونت هلیکوباکتر پیلوری با نازایی ارتباط ندارد. اما، متأسفانه 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.

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.

شواهد و قرائن نشان می‌دهد که هلیکوباکتر پیلوری در بزاق و همچنین در خون انسان یافت می‌شود. 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.

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 bacteriospermia 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 ساد م. ارتباط عفونت هلیکوباکتر پیلوری با نازایی در زنان مراجعه‌کننده به مرکز ناباروری یزد. *مجله دانشکده پزشکی تهران*. ۱۳۸۶، دوره ۶۵، شماره ۳، صص ۷۲ تا 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.