



Scan online to view this article

## Molecular diagnosis of *Helicobacter pylori* in semen of infertile men

Mostafa khoshbin<sup>1\*</sup>, Mohammad hassan shahhosseiny<sup>1,2</sup>, Mansoureh Paknejadi.<sup>1</sup>

1. Department of Microbiology, Basic Sciences, shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2. Iranian Gene Fanavar Institute (IGF), Tehran, Iran

### Abstract

**Aim and Background:** Bacterial infections of the genital system are common causes of infertility. One of the most important causes of male infertility is seminal and genital tract infections. In the meantime, a wide range of bacteria, in varying degrees, contribute to infertility in men. *Helicobacter pylori* may be involve in infertility. Because antibodies against this bacteria have been significantly detected in the genital fluids of infertile patients. The aim of this study was to determine the presence of *Helicobacter pylori* in the semen of the infertile men with rapid molecular PCR method and determine its percentage.

**Materials and Methods:** 100 samples of semen collected from Saram hospital and DNA Extracted from these specimens using Boiling/DNG\_PLUS method. Optimized PCR test was performed on samples. PCR test evaluated from the respect sensitivity and specificity.

**Results:** In this study, amplicon with the size of 294 bp, observed with agarose electrophoresis. In the specificity test, primers created only a band for *H.pylori* DNA. Of the 100 samples tested, only 10 samples (10%) were positive for DNA of *H.pylori*.

**Conclusion:** According to the results of this study, *H.pylori* may be one of the bacterial agents that can be considered for male infertility, of course requires further studies. While PCR is suitable, quick and sensitive molecular technique for detection of *H.pylori* in infertile men.

**Keywords:** Molecular diagnosis, *Helicobacter pylori*, Infertile men, PCR

Corresponding author:

Department of Microbiology, Basic Sciences, shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Email: Mkhoshbin5134@yahoo.com



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

## تشخیص مولکولی هلیکوباکتریپیلوری در مایع منی مردان نابارور

مصطفی خوش بین<sup>۱\*</sup>، محمدحسن شاه حسینی<sup>۱و۲</sup>، منصوره پاکنژادی<sup>۱</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. مؤسسه ایرانیان ژن فناوری (IGF)، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** عفونت‌های باکتریایی سیستم تناسلی، از عوامل شایع ناباروری هستند. یکی از مهم‌ترین علت‌های ناباروری مردان، عفونت‌های مایع منی و مجاری تناسلی است. در این میان، طیف وسیعی از باکتری‌ها، با درجه‌های مختلف، در ایجاد ناباروری در مردان نقش دارند. هلیکوباکتریپیلوری ممکن است باعث ناباروری در مردان شود، زیرا به‌طور معنی‌داری آنتی‌بادی‌های ضد این باکتری در مایع تناسلی بیماران نابارور یافت شده است. هدف بررسی حضور هلیکوباکتریپیلوری در مایع منی مردان نابارور با روش سریع مولکولی PCR و تعیین درصد آن است.

**مواد و روش‌ها:** جمع‌آوری ۱۰۰ نمونه مایع منی (Semen) از بیمارستان صارم و استخراج DNA از این نمونه‌ها به روش Boiling/ DNG\_PLUS صورت گرفت. تست PCR بر روی DNA استخراج شده از نمونه‌ها انجام گرفت. هم‌چنین تست بهینه شده از نظر حساسیت و اختصاصیت مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** تست PCR بهینه و آمپلیکون ۲۹۴ bp با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هلیکوباکتریپیلوری تکثیر شدند. در بررسی تست ویژگی، پرایمرها فقط با DNA هلیکوباکتریپیلوری باند ایجاد کردند و با DNA سایر میکروارگانیسم‌ها باندی ایجاد نشد. میزان حد تشخیص تست ۱۰ Copy/reaction اندازه‌گیری شد. از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی، ۱۰ نمونه (۱۰٪) مثبت گردید.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، هلیکوباکتریپیلوری از عوامل باکتریایی است که ممکن است در زمینه بخشی از ناباروری آقایان در نظر گرفته شود، که البته نیاز به مطالعه بیشتر دارد. هم‌چنین روش PCR روش مولکولی مناسب، سریع و حساس نسبت به روش‌های سنتی برای تشخیص هلیکوباکتریپیلوری در مردان نابارور است.

**واژه‌های کلیدی:** تشخیص مولکولی، هلیکوباکتریپیلوری، مردان نابارور، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

### مقدمه

در کشورهای در حال توسعه با کشورهای پیشرفته به‌طور کامل متفاوت است و بروز ناباروری‌های قابل پیشگیری در کشورهای در حال توسعه بسیار زیاد است (۲). به‌طور متوسط فراوانی کلی ناباروری اولیه ۱۹-۱۳ درصد و ناباروری ثانویه ۱۰-۵ درصد گزارش شده است (۳). علل بروز ناباروری متعدد است. برخی از علت‌های آن تشریحی- فیزیولوژیک بوده و عوامل مختلف همانند اختلال‌های ژنتیکی در بروز آن‌ها دخالت دارند، اما بسیاری از عوامل محیطی و اکتسابی نیز در قدرت باروری تأثیرگذار بوده و می‌توانند باعث ناباروری شوند. به عنوان مثال عفونت‌های دستگاه تناسلی به‌خصوص در جنس مؤنث و نیز بیماری‌های مقاربتی از مهم‌ترین عوامل ایجاد

در بررسی که توسط سازمان بهداشت جهانی انجام گردیده نشان داده شده است که ۴۳ درصد از زنان و ۳۰/۷ درصد از مردان در دنیا از ناباروری رنج می‌برند (۱). الگوهای ناباروری

### نویسنده مسئول:

گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی،

تهران، ایران

پست الکترونیکی: mkhoshbin5134@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۸

سلامت تناسلی مردان داشته باشد که شامل تأثیر منفی بر حجم، pH و به طور مستقیم موجب کاهش غیرطبیعی تعداد اسپرماتوزوئید مایع منی، کاهش تحرک و تغییر مورفولوژی در اسپرم می شود و در نتیجه قدرت باروری را کاهش می دهد. هم چنین به طور غیر مستقیم می تواند موجب عفونت، آسیب به بیضه، التهاب و در پی آن تحریک سیستم ایمنی بر علیه آنتی-ژن های خودی همراه با لکوسیتو اسپرمی شود که همه این عوامل می توانند مرد را دچار معضل ناباروری کنند (۱۰، ۱۱، ۱۲).

در این میان، طیف وسیعی از باکتری ها، با درجه های مختلف، در ایجاد ناباروری در مردان نقش دارند. از جمله هلیکوباکتریپیلوری که به طور معنی داری بین مردان و زنان نابارور نسبت به گروه های کنترل سالم، شایع تر است و آنتی-بادی های ضد این باکتری در مایع تناسلی بیماران نابارور یافت شده است (۱۰۰ درصد مایع فولیکولار، ۵۰ درصد نمونه های اسپرم و میزان اندکی از ترشحات واژینال) آنتی-بادی های ضد هلیکوباکتر با دم و ناحیه دور سانتزیولی اسپرماتوزوآ انسانی واکنش می دهند. این در نتیجه این واقعیت است که این نواحی غنی از توبولین بوده و توبولین انسانی، همولوژی واضحی با پروتئین های باکتریایی دارد (۱۳). عفونت با این باکتری در سطح جهان گسترده است و به طور تقریبی نیمی از جمعیت جهان با این باکتری آلوده اند به طوری که آلودگی در کشورهای در حال توسعه به بیش از ۸۰ درصد و در کشورهای توسعه یافته به کم تر از ۴۰ درصد می رسد (۱۴). در بیش تر افراد آلودگی با عفونت هلیکوباکتریپیلوری علائم خاصی را نشان نمی دهد که این خود نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالای هلیکوباکتریپیلوری است (۱۵). پس تشخیص به موقع آن می تواند در درمان و پیشگیری مؤثر باشد. ساده ترین آزمایش جهت بررسی ناباروری مردان، بررسی وضعیت اسپرم است. در این بررسی، بسیاری از ناهنجاری های مربوط به اسپرم آشکار می شود.

وجود یک برنامه مدون از نظر شناخت وضعیت این عامل بیماری زا، شناخت عوامل مستعد کننده به این عفونت و برنامه ریزی جهت انجام تست های غربالگری و به دنبال آن درمان افراد عفونی می تواند سبب کاهش آسیب های این بیماری در جامعه گردد. از این رو مطالعه حاضر برای تعیین میزان شیوع عفونت هلیکوباکتریپیلوری در مردان نابارور مراجعه کننده به کلینیک ناباروری بیمارستان صارم صورت

اختلال در باروری محسوب می شوند. به دلیل تفاوت های بسیاری که در شرایط مختلف محیطی مرتبط با رفتار باروری همانند سن ازدواج، تعدد شریک جنسی، آلودگی های محیطی، مصرف الکل و سیگار، شیوع بیماری های عفونی و ... بین جوامع وجود دارد، سبب شناسی بروز ناباروری و الگوی فراوانی علل مختلف ناباروری در مناطق مختلف، متفاوت است (۴).

تا چند سال پیش، از هر ۵۰ زوج، سه مورد از ناباروری ها مربوط به مردان بودند، اما در حال حاضر از هر ۵۰ زوج، ۱۵ مورد ناباروری مربوط به مردان است. بر اساس جدیدترین داده های مطالعه ملی دکتر محمد، که در ۱۷ هزار زوج ایرانی انجام شد، ۲۰/۲ درصد زوجین ایرانی نابارورند و میزان ناباروری در مناطق شهری ۱۹/۹ و در مناطق روستایی ۲۲ درصد است که از میانگین جهانی بالاتر است (۵). طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت، شیوع ناباروری در کل دنیا ۱۲ تا ۱۵ درصد گزارش شده است که این آمار در کشوری مانند انگلیس ۷ درصد و در کشورهای آفریقایی ۳۰ درصد گزارش شده است، ولی این آمار در کشور ما حدود ۲۰ درصد است (۵). پس بیش ترین میزان عفونت مایع منی که باعث ناباروری در مردان می شود در آفریقا و کم ترین میزان مربوط به کشورهای صنعتی بوده است (۶).

بسیاری از مردم باور نمی کنند که برخی از عفونت ها می توانند بر قابلیت باروری شخص آسیب برسانند. برخی عفونت ها هم در زن و هم در مرد باعث ناباروری می شوند، برخی کاشته شدن رویان در داخل رحم را مختل می کنند و برخی باعث سقط می شوند. در مردها عفونت در کیسه منی یا غده پروستات، از راه های خاصی می اند بر اسپرم اثر کند. سلول های عفونی توانایی شناگری اسپرم ها را کاهش می دهند. بعضی عفونت ها باعث مسدود شدن مسیر اسپرم ها در دستگاه تناسلی مرد شده و منجر به توقف انتقال اسپرم می شوند (۷، ۸).

یکی از مهم ترین علت های ناباروری مردان، عفونت های مایع منی و مجاری تناسلی است. بعضی از مکانیسم های پاتوفیزیولوژیک در مردان نابارور با عفونت مایع منی (باکتریواسپرمی) ارتباط دارد. به طوری که ۸ الی ۳۵ درصد موارد ناباروری مردان در سراسر جهان مربوط به عفونت های مجرای ادراری - تناسلی است (۹). عفونت های ناشی از این باکتری ها اغلب بدون علامت بوده که این امر می تواند تأثیر منفی بر

گرفت تا ضرورت انجام غربالگری مردان نابارور مورد بررسی قرارگیرد.

## روش کار

### نمونه گیری

پس از انجام هماهنگی های لازم در بیمارستان فوق تخصصی صرم، جمع آوری نمونه های مایع منی مردان نابارور مراجعه کننده به کلینیک ناباروری بیمارستان صرم در مدت ۶ ماه (زمستان ۹۶ تا بهار ۹۷) انجام شد و تعداد ۱۰۰ نمونه از مایع منی مردان نابارور مراجعه کننده به کلینیک ناباروری مورد آزمایش قرار گرفت. این مردان در سنین باروری (۶۰-۲۱ سال) بوده و علت مشخصی (فیزیولوژیک، هورمونال و آناتومیک) برای ناباروری نداشتند (لازم به ذکر است که از قبل فرم رضایت بیمار اخذ و امضاء شده است).

این موارد هم در مورد نمونه ها رعایت شد:

- ۱) عدم مصرف آنتی بیوتیک تا یک هفته قبل از نمونه گیری
  - ۲) داشتن دوره پرهیز جنسی حداقل به مدت ۴۸ ساعت
- نمونه ها به منظور انجام تست PCR، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام تست نگهداری و سپس با حفظ شرایط دمای پایین به آزمایشگاه انتقال یافت.

### استخراج DNA

استخراج DNA از نمونه های فریز شده مایع منی به روش مخلوط Boiling/ DNG\_PLUS انجام شد. به این معنی که نمونه ها ابتدا در دمای جوش به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد و سپس بر اساس پروتکل کیت DNG\_PLUS سیناکلون استخراج DNA انجام گردید.

مراحل استخراج بدین قرار بود:

۱۰۰ میکرولیتر نمونه به یک لوله ۱/۵ میلی لیتری انتقال داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده DNG هم دما شده با محیط به نمونه اضافه گردید و سپس نمونه به مدت ۳۰-۲۰ ثانیه ورتکس شد. ۳۵۰ میکرولیتر محلول رسوب دهنده (ایزوپروپانول) به لوله فوق اضافه گردید و سپس لوله ۱۰ بار وارونه (اینورت) شد و در ادامه به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی تخلیه (دکانت) گردید و مقدار ۱ میلی لیتر محلول شستشو (الکل ۷۰ درصد) به نمونه اضافه و بعد از مخلوط شدن نمونه با محلول شستشو، ۱۰ مرتبه لوله وارونه گردید و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد (مرحله ۳ اگر لازم باشد تکرار می گردد). بعد از تخلیه محلول رویی، رسوب موجود در

ته لوله به مدت ۱۰-۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد (دستگاه هیتر بلاک) به طور کامل خشک شد (بوی الکل ندهد). بعد از خشک شدن رسوب، ۳۰ میکرولیتر بافر TE به لوله اضافه و به آرامی با ضربات انگشت و ورتکس، رسوب حاصل حل شد و سپس نمونه به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. DNA استخراج شده برای نگهداری و استفاده طولانی مدت در ۲۰- ذخیره شد.

### آزمون PCR

توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تشخیص ژنوم باکتری هلیکوباکتری پیلوری که جهت تکثیر ناحیه bp ۲۹۴ ژن فسفوگلوکز آمین موتاز این باکتری مورد استفاده قرار گرفت در جدول ۱ آمده است (۱۶، ۱۷، ۱۸).

جدول ۱- ترادف پرایمرهای مورد استفاده

پرایمر	توالی (5' → 3')	طول محصول
FH P PCR	5' AAGCTT TTAGGGGTGTTAGGGGTT T 3'	294 bp
RH P PCR	5' AAGCTTACTTTCTAACACTAACGC 3'	

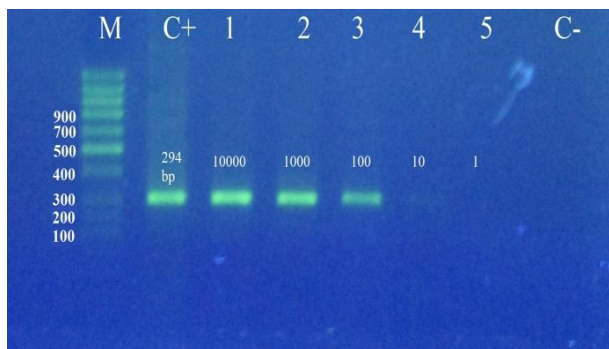
مواد لازم جهت یک تست PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر عبارت بود از:

آب دوبار تقطیر استریل دیونیزه (D.D.W) به مقدار ۱۵ میکرولیتر، PCR-Buffer ۱۰X به مقدار ۲/۵ میکرولیتر، پرایمرها با غلظت ۰/۲ mM و به مقدار ۰/۵ میکرولیتر، ۰/۷۵ میکرولیتر (۵۰ mM)، MgCl<sub>2</sub>، ۰/۵ میکرولیتر از (۱۰ mM) dNTP، ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase به مقدار ۰/۳ میکرولیتر از غلظت ۵U/μl، ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، و در آخر به مقدار ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی به آن ها اضافه گردید.

پروفایل حرارتی مورد استفاده در این مطالعه عبارت بود از:

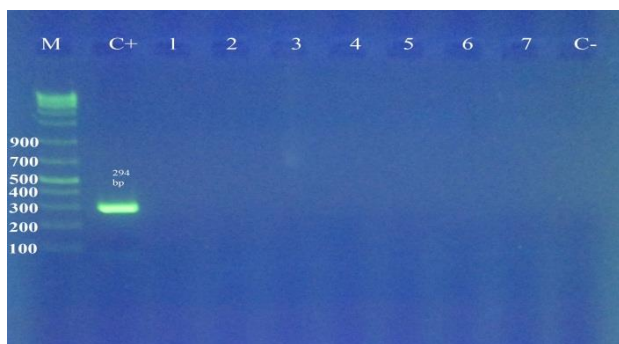
- ۱) مرحله دناتور: در دمای ۹۳ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه
- ۲) مرحله اتصال پرایمرها: در دمای ۵۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه
- ۳) مرحله سنتز: در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه که این مراحل در ۳۵ سیکل انجام شد. در آخر نیز مرحله طویل شدن نهایی، در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

حد تشخیص آزمون PCR برابر ۱۰ Copy/reaction در هر واکنش به دست آمد (شکل ۲).



شکل ۲: تست حد تشخیص هلیکوباکتر پیلوری  
M: سایزمارکر 1kb DNA Ladder (bioflux)  
C+: کنترل مثبت  
C-: کنترل منفی  
۱: ۱۰۰۰۰ DNA/reaction  
۲: ۱۰۰۰ DNA/reaction  
۳: ۱۰۰ DNA/reaction  
۴: ۱۰ DNA/reaction  
۵: ۱ DNA/reaction

در آزمون ویژگی، فقط DNA هلیکوباکتر پیلوری مثبت گردید و هیچ کدام از نمونه های دیگر در این تست، موجب تکثیر نگردید (شکل ۳).



شکل ۳: تست ویژگی PCR هلیکوباکتر پیلوری  
M: سایزمارکر 1kb DNA Ladder (bioflux)  
C+: کنترل مثبت  
C-: کنترل منفی  
۱: DNA/شرشیاکلی ۲: DNA مایکوپلازما پنومونیه  
۳: DNA هرپس سیمپلکس ویروس II  
۴: DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس  
۵: DNA سالمونلا تیفی موریوم  
۶: DNA ساکارومیسس سرویزیه  
۷: DNA انسان

از مجموع حدود ۱۰۰ نمونه مورد مطالعه، ۱۰ نمونه (۱۰٪) از نظر وجود یلوری مثبت ارزیابی شدند. افراد مورد بررسی در

محصول های تکثیر شده PCR با استفاده از آگاروز ژل الکتروفورز و رنگ سایبر سیف (سیناکلون)، در کنار سایز مارکر 1kb DNA Ladder (bioflux) مورد بررسی واقع شد.

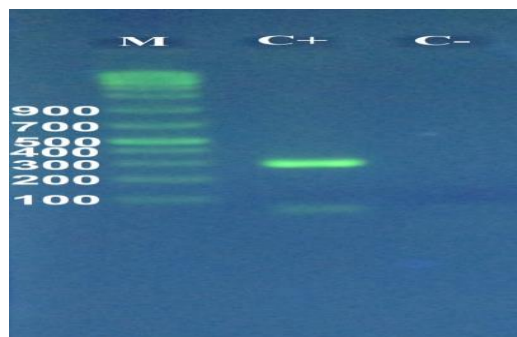
### تعیین حد تشخیص (LOD) و ویژگی

به منظور تعیین حد تشخیص آزمون PCR بهینه شده، باید رقت هایی از DNA با تعداد مشخص تهیه کرده تا با انجام واکنش PCR بر روی آنها، حداقل تعداد باکتری مورد نیاز برای انجام واکنش تعیین گردد. برای تعیین حد تشخیص، سوسپانسیون DNA استخراجی از هلیکوباکتر پیلوری با تعداد مشخصی به روش سریال رقیق شد. سپس بر روی رقت های به دست آمده با تعداد مشخصی آزمون PCR همراه با کنترل مثبت و کنترل منفی گذاشته شد. تعداد DNA موجود در لوله اولیه از طریق اندازه گیری غلظت DNA در تیوب به وسیله دستگاه نانودراپ و استفاده از فرمول ژنوم کپی نامبر (GCN) و اندازه ژنوم هلیکوباکتر پیلوری به دست آمد.

جهت تعیین اختصاصیت، از DNA انسان، ساکارومیسس سرویزیه، شرشیاکلی، مایکوپلازما پنومونیه، هرپس سیمپلکس ویروس، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و سالمونلا تیفی موریوم به همراه نمونه کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

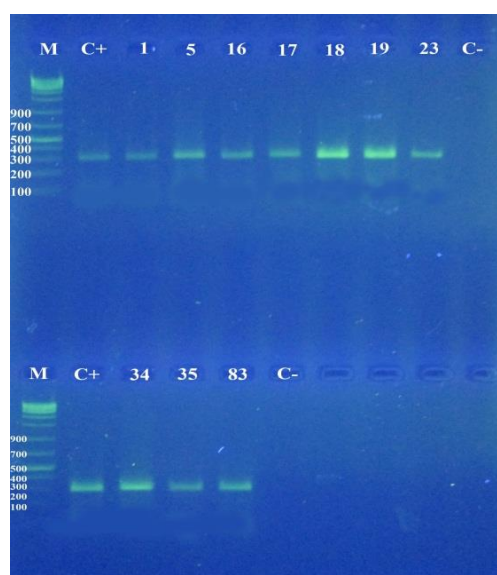
### نتایج

تست PCR بر روی DNA استخراج شده از سوش استاندارد N:Oc30، و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و برنامه حرارتی مناسب اجرا گردید. در الکتروفورز محصول PCR، باند اختصاصی حاصل از آمپلیکون مورد نظر که ۲۹۴ جفت باز طول داشت رویت گردید (شکل ۱).



شکل ۱: تست PCR بهینه شده هلیکوباکتر پیلوری  
M: سایزمارکر 1kb DNA Ladder (bioflux)  
C+: کنترل مثبت (DNA هلیکوباکتر استاندارد)  
C-: کنترل منفی

این مطالعه در گروه سنی ۲۱ تا ۶۰ سال قرار داشتند (شکل ۴).



شکل ۴: تست تشخیص PCR نمونه‌های مایع منی  
M: سایزمارکر 1kb DNA Ladder (bioflux)  
C+: کنترل مثبت  
C-: کنترل منفی  
نمونه‌های مثبت: ۱،۵،۱۶،۱۷،۱۸،۱۹،۲۳،۳۴،۳۵،۸۳

## بحث

۸ الی ۳۵ درصد موارد ناباروری مردان در سراسر جهان مربوط به عفونت‌های مجرای ادراری- تناسلی است (۱۹). عفونت‌های باکتریایی سیستم تناسلی هم از عوامل شایع هستند و طیف وسیعی از باکتری‌ها، با درجه‌های مختلف، در ایجاد ناباروری در مردان نقش دارند. عفونت‌های باکتریایی باعث به هم چسبیدن اسپرم می‌شوند، که این امر می‌تواند باعث بی‌تحریکی اسپرم‌ها گردد و این اثر، بستگی به تراکم باکتری‌ها در مایع منی دارد.

در مطالعه حاضر به بررسی حضور *هلیکوباکتری پیلوری* در مایع منی مردان نابارور پرداخته شد و این نتیجه حاصل شد که این باکتری روی باروری مردان تأثیر منفی می‌گذارد و با توجه به مطالعه‌های قبلی نیز می‌توان این موضوع را اثبات کرد. مانند مطالعه *Giullia Collodel* و همکارانش در سال ۲۰۰۸ که به منظور رسیدگی به این احتمال که عفونت *هلیکوباکتری پیلوری* ممکن است یک نقش مضر در کیفیت اسپرم مردان با ناباروری ایدیوپاتیک داشته باشد انجام گرفت، طی آن عفونت با *هلیکوباکتری پیلوری* و توسط سویه‌های بیان کننده ژن *Caga* در ۸۰ بیمار نابارور مرد توسط الایزا انجام شد و آنالیز مایع منی با میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی انتقالی

انجام گرفت و سطح سیستمیک IL-6 و TNF-a مورد ارزیابی قرار گرفت، و این نتیجه حاصل شد که بیماران نابارور مبتلا به عفونت *هلیکوباکتری پیلوری* نسبت به بیماران بدون عفونت از کیفیت اسپرم پایین‌تری برخوردار بودند (۲۰). البته در مطالعه ما از روش PCR استفاده شد، زیرا با وجود تفاوت در حساسیت و اختصاصیت تست‌های تشخیصی جهت شناسایی *هلیکوباکتری پیلوری*، نشان داده شده که حساسیت روش‌هایی از قبیل کشت میکروبی، تست سریع اوره‌آز (RUT)، بافت-شناسی و تست‌های آنتی‌ژن مدفوعی، زمانی که تعداد باکتری‌های موجود در نمونه اندک باشند، غیرقابل اعتماد هستند (۲۱). به علاوه سرولوژی نمی‌تواند *هلیکوباکترهای* دفع شده را شناسایی کند و تست اوره‌آز نیز می‌تواند نتایج غیر اختصاصی را به علت حضور سایر باکتری‌های اوره‌آز مثبت و یا نتایج منفی کاذب در بیمارانی که بازدارنده‌های پمپ پروتون را مصرف می‌کنند، ایجاد کند (۲۲، ۲۳). روش‌های مبتنی بر تشخیص آنتی‌بادی‌های خاص مانند الایزا در کشورهایی که این باکتری بومی آنجاست مانند تایلند، مناسب است (۲۴). در میان روش‌های غیرتهاجمی، تست تفسی اوره (UBT) به عنوان یک روش خوب به رسمیت شناخته شده اما با این حال، از دیدگاه نظری به دلیل حضور باکتری‌های اوره‌آز مثبت در حفره دهان، منجر به ایجاد جواب‌های مثبت کاذب می‌گردد و انجام آن نیز گران است (۲۵). روش کشت، روش استاندارد برای شناسایی باکتری *هلیکوباکتر* است، زیرا اجازه انتخاب کلنی توسط درمان ضد میکروبی در محیط کشت را می‌دهد (۲۵). ولی این روش زمان‌بر و گران و مشکل است. از آنجایی که *هلیکوباکتر* یک ارگانیزم سخت رشد است و در شرایط محیطی و محیط‌های آبی به فرم کوکوئیدی تبدیل می‌شود، بنابراین روش کشت نمی‌تواند روش مناسبی جهت شناسایی در برخی موارد باشد (۲۶)، اما طی مطالعه‌هایی ثابت شده که تکنیک PCR از حساسیت و اختصاصیت بالایی برخوردار است مانند مطالعه *Ottiwet* در سال ۲۰۱۰، که عملکرد PCR و Nested PCR را با هدف ژنی *Urea* مورد بررسی قرار داد و با روش‌های کشت، RUT و بافت‌شناسی برای شناسایی *هلیکوباکتری پیلوری* در نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به سوء هاضمه مورد مقایسه قرار داد. حساسیت و اختصاصیت PCR به ترتیب ۹۱٪ و ۱۰۰٪ و برای Nested PCR ۹۵٪ و ۹۷٪ ارزیابی گردید (۲۷). استفاده از روش PCR معمولی اگرچه دارای حساسیتی کم‌تر نسبت به Nested PCR است، اما از لحاظ اقتصادی در انجام نسبت به Nested PCR مقرون به

DNA باکتریایی موجود در نمونه، شرایط حمل و نقل مناسب و نیز وجود باکتری در نمونه بستگی دارد (۳۲). برای اثبات این موضوع می‌توان به مطالعه Lu و همکارانش در سال ۱۹۹۹ اشاره کرد که با انجام آزمون PCR بر روی ۵ ژن متفاوت از هلیکوباکتریپیلوری شامل ژن *16SrRNA*، توالی‌های تصادفی ژنی، ژن *SSA*، ژن *UreA* و ژن *UreC* و مقایسه آن‌ها با یک دیگر دریافتند که با آن که ژن *16SrRNA* بیشترین هدف مورد استفاده برای شناسایی هلیکوباکتریپیلوری توسط PCR است، اما دارای اختصاصیت بسیار پایینی است و از سوی دیگر با وجود این که توالی‌های تصادفی و ژن *UreA*، برای شناسایی هلیکوباکتریپیلوری دارای اختصاصیت بالایی است، اما حساسیت به دست آمده توسط PCR این ژن‌ها، رضایت‌بخش نیست. این حساسیت پایین به علت پلی‌مورفیسم در این جایگاه‌های ژنی است. ژن *SSA* نیز دارای اختصاصیت بسیار پایینی در مطالعه‌ها است. در نهایت ژن *glmM* با اختصاصیت ۹۶٪ و حساسیت ۱۰۰٪ در این مطالعه ارزیابی گردید و نتیجه اینکه ژن *glmM* مناسب‌ترین ژن مورد استفاده در شناسایی های ملکولی هلیکوباکتریپیلوری محسوب می‌گردد، در این پژوهش روش PCR با هدف ژنی *glmM* اختصاصیت بالایی برای هلیکوباکتریپیلوری داشت (۱۷). هم‌چنین اسمیت و همکاران در سال ۲۰۰۴ با مقایسه سه روش PCR نشان دادند که PCR ژن *ureC* به‌منظور تکثیر یک قطعه ۲۹۴ جفت بازی اختصاصی‌ترین و حساس‌ترین روش است (۳۳).

### نتیجه‌گیری

روش PCR از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار است. مزایای این تکنیک انکار ناپذیر بوده و بهره‌گیری از این تکنیک سبب تحولی در علوم مختلف زیستی شده است. در این مطالعه ابتلا مردان نابارور به هلیکوباکتریپیلوری با استفاده از روش مولکولی PCR، ۱۰٪ است که نشان می‌دهد هلیکوباکتریپیلوری یکی از عوامل باکتریایی است که می‌تواند برای ناباروری مردان در نظر گرفته شود، البته نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از پرسنل محترم موسسه دانش بنیان ایرانیان ژن فناوری، آزمایشگاه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس، بیمارستان و مرکز تحقیقات باروری و

صرفه است و در همه آزمایشگاه‌ها در دسترس و قابل اجراست. هم‌چنین در روش Nested PCR به دلیل آلودگی حین انتقال از مرحله اول به دوم پاسخ مثبت کاذب را به دنبال دارد. زیرا که نتایج مثبت کاذب ناشی از آلودگی در این روش، بین ۴ تا ۳۱٪ گزارش شده است.

مطالعه‌های دیگری هم وجود دارند که اثبات می‌کنند هلیکوباکتریپیلوری بر قدرت باروری مردان تأثیرگذار است مانند مطالعه Elena Moretti و همکارانش در سال ۲۰۱۲، که در ۷۸ مرد، عفونت هلیکوباکتریپیلوری و سیتوتوکسین مرتبط با پروتئین ژن *Caga* توسط وسترن بلات تشخیص داده شد. کیفیت مایع منی (۴۷ نفر) به دنبال دستورالعمل‌های سازمان بهداشت جهانی، و با روش Radioimmunoassay (RIA) سنجش شد. ۲۷ مرد (۳۴٫۶٪) هلیکوباکتریپیلوری مثبت و ۱۱ نفر از ۲۷ مرد (۴۰٫۷٪) *Caga* مثبت بودند. طی نتایجی که به دست آمد مشخص شد تحرک اسپرم در مردان *HP+/Caga+* در مقایسه با مردان *HP+/Caga-* به‌طور قابل توجهی کاهش پیدا می‌کند (۲۸). هم‌چنین طی یافته‌های دیگری از Elena Moretti و همکارانش در سال ۲۰۱۴ برای پاسخ به پرسش "آیا عفونت هلیکوباکتریپیلوری می‌تواند به دستگاه تولید مثل انسان نفوذ کند؟" به بررسی رابطه عفونت هلیکوباکتریپیلوری با بیماری‌های خارج دستگاه گوارش پرداختند. در این یافته‌ها شواهد مربوط به کاهش پتانسیل باروری در افراد آلوده به هلیکوباکتریپیلوری به‌خصوص توسط گونه‌هایی که *Caga* را بیان می‌کنند، گزارش شده است. این عفونت در افراد مبتلا به اختلال‌های باروری شایع‌تر است. مشاهده شد که در مردان دچار این عفونت، تحرک اسپرم، زنده بودن، و شکل طبیعی اسپرم کاهش می‌یابد (۲۹). البته در این مطالعه‌ها از ژن *Caga* استفاده شده، ولی در مطالعه ما از ژن *UreC* (*glmM*) استفاده شده است که از اختصاصیت بالایی برخوردار است، زیرا مطالعه‌هایی نشان می‌دهد که در روش‌های مولکولی شناسایی ژن *glmM* مطمئن‌ترین راه تشخیص هلیکوباکتریپیلوری است (۱۸،۳۰). چون در روش‌های مولکولی، بسته به ژن‌های هدف مورد استفاده از قبیل ژن‌های *UreA*، *UreC*، *16SrRNA*، *Vaca*، *Caga* و غیره، حساسیت و اختصاصیت‌های متفاوتی وجود دارد (۲۵،۳۱). هم‌چنین باید به این نکته توجه کرد که تفاوت در حساسیت و اختصاصیت به فاکتورهای دیگری نیز غیر از ژن هدف بستگی دارد که از آن جمله توزیع هلیکوباکتر در مخاط معده، میزان

ناباروری صارم و مرکز تحقیقات بیماری‌های کبد و گوارش  
دانشکده علوم پزشکی دانشگاه شهید بهشتی به‌دلیل همکاری  
صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

- 1- Nojoomi M, Ashrafi M, koochpaye zadeh J. Prevalence of infertility among couples in west of Tehran. *Iran J Med Sci.* 2001; 8,21:633-640[In Persian]
- 2- Mahboubi M, Ghahramani F. The effect of smoking on the sperm and male infertility. *J Kermanshah Univ Med Sci.* 2013; 17:294-99.[In Persian]
- 3- Barzin M, Aminzadeh P. Evaluation of Hysterosalpingography in Infertile Women Referred to a Private Radiology Clinic (1999-2007). *JBUMS.* 2009; 11:67-73.[In Persian]
- 4- Leke RJ, Oduma JA, Bassol-Mayagoitia S, Bacha AM, Grigor KM. Regional and geographical variation in infertility: effects of environmental, cultural and socioeconomic factors. *Environ Health Perspect.* Jul 1993; 101 (2):73-80.
- 5- Ali Mohammadzadeh Kh. Talks and discussions on populations, health management and population proportion. Women and Family's Socio-cultural Council. *iau-tmuj.* 2014; 2:82-88.[In Persian]
- 6- Cates W, Farley TM, Rowe PJ. Worldwide patterns of infertility: Is Africa different? *Lancet.* Sep 1985; 14:2(8455): 596-8.
- 7- Ahmadi M.H, AmirMozafari N, Kazemi B, Seddiqi-Gilani M.A, Masjedian-Jazi F. Identification of *Mycoplasma hominis* and *UreaplasmaUrealyticum* in the semen of infertile men referring to Royan Institute by PCR method. *Int J Mol Cell Med.* 2010; 12,3: 371-380[In Persian]
- 8- AmirMozafari N, Ahmadi M.H, Seddiqi-Gilani M.A, Kazemi B, Masjedian-Jazi F. Surveying our presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma Urealyticum* in the semen of the infertile men referring to Royan Institute. *Iran J Med Sci.* 2010; 7,75:14-25[In Persian]
- 9- Soleimani Rahbar A, Golshani M, Fayyaz F, Rafiei Tabatabaee P, Moradi A. Identification of *Mycoplasma* genome in infertile men's sperm by PCR. *Iran J Med Microbiol.* 2007; (13):32-42[In Persian]
- 10- Bukharin O.V, kuzmin M.D, Ivanov I.U.B. The role of the microbial factor in the pathogenesis of male infertility. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2000; 2:106-10.
- 11- Khalili M.B, Sharifi M.K. The effect of bacterial infection on the quality of human's spermatozoa. *Iranian J pub Health.* 2001; 35:62-7.
- 12- McGowan M.P, Burger H.G, Baker H.W.G, Kretser D.M, Kovacs G. The incidence of non-specific infection in the semen in fertile and sub-fertile males. *Int J Androl.* Dec 1981; 4(6):657-62.
- 13- Virecoulon F, Wallet F, Fruchart-Flamenbaum A, Rigot JM, Peers MC, Mitchell V, et al. Bacterial flora of the low male genital tract in patients consulting for infertility. *Andrologia.* Oct 2005; 37(5):160-5.
- 14- Atherton JC, Cover TL, Papini E, Telford JL. Vacuolating cytotoxin. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL, editors. *Helicobacter Pylori: Physiology and Genetics.* Washington, DC. *ASM Press.* 2001; Chapter 9
- 15- Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(1):28-37.
- 16- Bickley J, Owen RJ, Fraser AG, Pounder RE. Evaluation of the polymerase chain reaction for detecting the urease C gene of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy samples and dental plaque. *J Med Microbiol.* 1993; 39(5):338-44.
- 17- Lu JJ, Perng CL, Shyu RY, Chen CH, Lou Q, Chong SK, et al. Comparison of Five PCR Methods for Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Gastric Tissues. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(3):772-4.

- 18- Shahamat M, Alavi M, Watts JEM, Gonzalez M, Sowers KR, Maeder DW, et al. Development of two PCR-based techniques for detection helical and coccoid forms of *Helicobacter pylori*. *J.Clin. Microbiol.* 2004; 42(8):3613-3619.
- 19- Askienazy-Elbhar M. Male genital tract infection: the point of view of the bacteriologist. *Gynecol Obstet Fertil.* 2005; 33: 691-97
- 20- Collodel G, Moretti E, Campagna M.S, Capitani S, Lenzi C, Figura N. Infection by CagA-Positive *Helicobacter pylori* Strains may Contribute to Alter the Sperm Quality of Men with Fertility Disorders and Increase the Systemic Levels of TNF- $\alpha$ . *Dig Dis Sci.* 2010; 55:94-100
- 21- Holton, J. Clinical relevance of culture: why, how, and when. *Helicobacter.* 1997; 2 (1):S25-33.
- 22- Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M, et al. Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science.* 2003; 299(5612):1582-1585.
- 23- Mobley HL, Hu LT, Foxal PA. *Helicobacter pylori* urease: Properties and role in pathogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1991; 187:39-46.
- 24- Deankanob W, Chomvarin C, Hahnvajanawong C, Intapan PM, Wongwajana S, Mairiang P, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of *Helicobacter pylori* in dyspeptic patient and volunteer blood donors. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2006; 37(5):958-65.
- 25- Krogfelt KA, Lehours P, Megraud F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter.* 2005; 10 (1): 5-13.
- 26- Khanolkar-Gaitonde SS, Reubish GK Jr, Lee CK, Stadtlander CT. Isolation of bacteria other than *Helicobacter pylori* from stomachs of squirrel monkeys (*Saimiri* spp.) with gastritis. *Dig Dis Sci.* 2000; 45(2): 272-80.
- 27- Ottiwet O, Chomvarin C, Chaicumpar K, Namwat W, Mairiang P. Nested polymeras chain reaction for detection of *H. pylori* in gastric biopsy specimens. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2010; 41(6):1423-31.
- 28- Moretti E, Collodel G, Campagna M.S, Franci M.B, Lacoconi F, Mazzi L, et al. Influence of *Helicobacter pylori* Infection on Levels of Ghrelin and Obestatin in Human Semen. *J Andrology.* 2012; 33,5. 938-943
- 29- Moretti E, Figura N, Collodel G, Ponzetto A. Can *Helicobacter pylori* infection influence human reproduction. *World J Gastroenterol.* May2014; 21: 20(19): 5567-5574
- 30- Bunn JE, MacKay WG, Thomas JE, Reid DC, Weaver LT. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in drinking water biofilms implications for transmission in early life. *Letters Appl Microbiol.* 2002; 34: 450-454.
- 31- Singh V, Mishra S, Rao GR, Jain AK, Dixit VK, Gulati AK, et al. Evaluation of nested PCR in detection of *Helicobacter pylori* targeting a highly conserved gene: HSP60. *Helicobacter.* 2008; 13: 30-4.
- 32- Lu Y, Redlinger TE, Avitia R, Galindo A, Goodman K. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *Appl. Environ Microbiol.* 2002; 68, 1436-1439.
- 33- Smith SI, Oyedeji KS, Arigbabu AO, Cantet F, Megraud F, Ojo OO. Comparison of three PCR method for detection of *Helicobacter pylori* DNA and detection of *cagA* gene in gastric biopsy specimens. *World J Gastroenterol.* 2004; 10: 1958-1960.