Research article

New Cell Mol Biotech
j.9/36 , 2019

Scan online to view this article

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

Mostafa khoshbin[1*], Mohammad hassan shahhosseiny[1,2], Mansoureh Paknejadi.[1]

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.3.7]

Corresponding author:
Department of Microbiology, Basic Sciences, shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
Email: Mkhoshbin5134@yahoo.com

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی مولکولی
دوره ۹ - شماره -۳۶ پائیز ۱۳۹۸
مقاله تحقیقی

برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

تشخیص مولکولی *هلیکوباکترپیلوری* در مایع منی مردان نابارور

مصطفی خوش بین[1*]، محمدحسن شاه حسینی[1و2]، منصوره پاکنژادی[1]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. مؤسسه ایرانیان ژن فناور(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. *هلیکوباکترپیلوری* 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 *هلیکوباکترپیلوری* 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 *هلیکوباکترپیلوری* تکثیر شدند. در بررسی تست ویژگی، پرایمرها فقط با DNA *هلیکوباکترپیلوری* باند ایجاد کردند و با DNA سایر میکروارگانیسم‌ها باندی ایجاد نشد. میزان حد تشخیص تست ۱۰Copy/reaction اندازه‌گیری شد. از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی، ۱۰ نمونه (۱۰٪) مثبت گردید.

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

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

مقدمه

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 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. به‌عنوان مثال عفونت‌های دستگاه تناسلی به‌خصوص در جنس مؤنث و نیز بیماری‌های مقاربتی از مهم‌ترین عوامل ایجاد

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-01]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.3.7]

اختلال در باروری محسوب می‌شوند. به‌دلیل تفاوت‌های بسیاری که در شرایط مختلف محیطی مرتبط با رفتار باروری همانند سن ازدواج، تعدد شریک جنسی، آلودگی‌های محیطی، مصرف الکل و سیگار، شیوع بیماری های عفونی و ... بین جوامع وجود دارد، سبب‌شناسی بروز ناباروری و الگوی فراوانی علل مختلف ناباروری در مناطق مختلف، متفاوت است (۴).

تا چند سال پیش، از هر۵۰ زوج، سه مورد از ناباروری‌ها مربوط به مردان بودند، اما در حال حاضر از هر ۵۰ زوج، ۱۵ مورد ناباروری مربوط به مردان است. بر اساس جدیدترین داده‌های 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 بیش‌ترین میزان عفونت مایع منی که باعث ناباروری در مردان می‌شود در آفریقا و کم‌ترین میزان مربوط به کشورهای صنعتی بوده است (۶).

بسیاری از مردم باور نمی‌کنند که برخی از عفونت‌ها می‌توانند بر قابلیت باروری شخص آسیب برسانند. برخی عفونت‌ها هم در زن و هم در مرد باعث ناباروری می‌شوند، برخی کاشته شدن رویان در داخل رحم را مختل می‌کنند و برخی باعث سقط می‌شوند. در مردها عفونت در کیسه منی یا غده پروستات، از راه‌های خاصی می اند بر اسپرم‌ها اثر کند. سلول-های عفونی توانایی شناگری اسپرم‌ها را کاهش می‌دهند. بعضی عفونت‌ها باعث مسدود شدن مسیر اسپرم‌ها در دستگاه تناسلی مرد شده و منجر به توقف انتقال اسپرم می‌شوند (۷،۸).

یکی از مهم‌ترین علت‌های ناباروری مردان، عفونت‌های مایع منی و مجاری تناسلی است. بعضی از مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک در مردان نابارور با عفونت مایع منی (باکتریواسپرمی) ارتباط دارد. به‌طوری‌که ۸ الی ۳۵ درصد موارد ناباروری مردان در سراسر جهان مربوط به عفونت‌های مجرای ادراری- تناسلی است (۹). عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها اغلب بدون علامت بوده که این امر می تواند تأثیر منفی بر سلامت تناسلی مردان داشته باشد که شامل تأثیر منفی بر حجم، pH و به‌طور مستقیم موجب کاهش غیرطبیعی تعداد اسپرماتوزوئید مایع منی، کاهش تحرک و تغییر مورفولوژی در اسپرم می‌شود و در نتیجه قدرت باروری را کاهش می‌دهد. هم چنین به‌طور غیر مستقیم می‌تواند موجب عفونت، آسیب به بیضه، التهاب و در پی آن تحریک سیستم ایمنی بر علیه آنتی-ژن‌های خودی همراه با لکوسیتو اسپرمی شود که همه این عوامل می‌توانند مرد را دچار معضل ناباروری کنند (۱۰،۱۱،۱۲).

در این میان، طیف وسیعی از باکتری‌ها، با درجه‌های مختلف، در ایجاد ناباروری در مردان نقش دارند. از جمله *هلیکوباکترپیلوری* که به‌طور معنی‌داری بین مردان و زنان نابارور نسبت‌به گروه‌های کنترل سالم، شایع‌تر است و آنتی-بادی‌های ضد این باکتری در مایع تناسلی بیماران نابارور یافت شده است (۱۰۰درصد مایع فولیکولار، ۵۰ درصد نمونه-های اسپرم و میزان اندکی از ترشح‌های واژینال) آنتی‌بادی-های ضد *هلیکوباکتر* با دم و ناحیه دور سانتریولی اسپرماتوزوآ انسانی واکنش می‌دهند. این در نتیجه این واقعیت است که این نواحی غنی از توبولین بوده و توبولین انسانی، همولوژی واضحی با پروتئین‌های باکتریایی دارد (۱۳). عفونت با این باکتری در سطح جهان گسترده است و به‌طور تقریبی نیمی از جمعیت جهان با این باکتری آلوده‌اند به‌طوری‌که آلودگی در کشورهای در حال توسعه به بیش از ۸۰ درصد و در کشورهای توسعه یافته به کم‌تر از ۴۰ درصد می‌رسد (۱۴). در بیش‌تر افراد آلودگی با عفونت *هلیکوباکترپیلوری* علائم خاصی را نشان نمی‌دهد که این خود نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای *هلیکوباکترپیلوری* است (۱۵). پس تشخیص به موقع آن می-تواند در درمان و پیشگیری مؤثر باشد. ساده‌ترین آزمایش جهت بررسی ناباروری مردان، بررسی وضعیت اسپرم است. در این بررسی، بسیاری از ناهنجاری‌های مربوط‌به اسپرم آشکار می‌شود.

وجود یک برنامه مدون از نظر شناخت وضعیت این عامل بیماری‌زا، شناخت عوامل مستعد کننده به این عفونت و برنامه‌ریزی جهت انجام تست‌های غربالگری و به دنبال آن درمان افراد عفونی می‌تواند سبب کاهش آسیب‌های این بیماری در جامعه گردد. از این رو مطالعه حاضر برای تعیین میزان شیوع عفونت *هلیکوباکترپیلوری* در مردان نابارور مراجعه‌کننده به کلینیک ناباروری بیمارستان صارم صورت

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.3.7]

گرفت تا ضرورت انجام غربالگری مردان نابارور مورد بررسی قرارگیرد.

روش کار

نمونه گیری

پس از انجام هماهنگی‌های لازم در بیمارستان فوق تخصصی صارم، جمع‌آوری نمونه‌های مایع منی مردان نابارور مراجعه-کننده به کلینیک ناباروری بیمارستان صارم در مدت ۶ ماه (زمستان ۹۶ تا بهار ۹۷) انجام شد و تعداد ۱۰۰ نمونه از مایع منی مردان نابارور مراجعه‌کننده به کلینیک ناباروری مورد آزمایش قرار گرفت. این مردان در سنین باروری (۶۰-۲۱ سال) بوده و علت مشخصی (فیزیولوژیک، هورمونال و آناتومیکی) برای ناباروری نداشتند (لازم‌به 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 آنتی‌بیوتیک تا یک هفته قبل از نمونه گیری

۲) داشتن دوره پرهیز جنسی حداقل به‌مدت ۴۸ ساعت

نمونه‌ها به‌منظور 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 نمونه‌های فریز شده مایع منی به روش مخلوط Boiling/ DNG_PLUS انجام شد. به این معنی که نمونه‌ها ابتدا در دمای جوش به‌مدت 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 میلی‌لیتری انتقال داده شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد، سپس ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده DNG هم دما شده با محیط به نمونه اضافه گردید و سپس نمونه به‌مدت 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 به‌مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی تخلیه (دکانته) گردید و مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول شستشو (الکل ۷۰ درصد) به نمونه اضافه و بعد از مخلوط شدن نمونه با محلول شستشو، ۱۰ مرتبه لوله وارونه گردید و سپس به‌مدت ۵ دقیقه در rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد (مرحله ۳ اگر لازم باشد تکرار می گردد.). بعد از تخلیه محلول رویی، رسوب موجود در ته لوله به‌مدت ۱۰-۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد (دستگاه هیتر بلاک) به‌طور 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 به‌مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد 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 *هلیکوباکترپیلوری* که جهت تکثیر ناحیه bp ۲۹۴ ژن *فسفوگلوکزآمین موتاز* این باکتری مورد استفاده قرار گرفت در جدول ۱ آمده است (۱۶،۱۷،۱۸).

جدول۱- 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) به‌مقدار ۱۵ میکرولیتر، ۱۰X PCR-Buffer به‌مقدار ۲/۵ میکرولیتر، پرایمرها با غلظت ۰/۲ mM و به‌مقدار ۰/۵ میکرولیتر، ۰/۷۵ میکرولیتر ($MgCl_2$ (۵۰mM، ۰/۵ میکرولیتر از (۱۰mM) dNTP، ۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase به‌مقدار ۰/۳ میکرولیتر از غلظت ۵U/µl، ۵ میکرولیتر از DNA استخراج شده، و در آخر به مقدار ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی به آن‌ها اضافه گردید.

پروفایل حرارتی مورد استفاده در این مطالعه عبارت بود از:

۱) مرحله دناتوره: در دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت 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 به‌مدت 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.3.7]

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

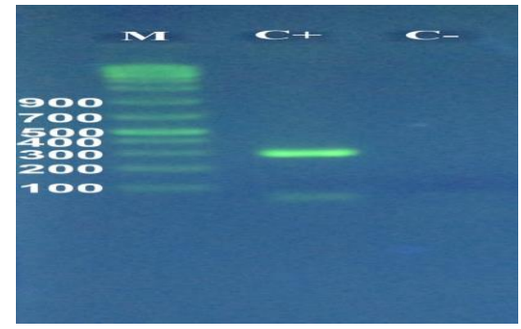
تعیین حد تشخیص (LOD) و ویژگی

به‌منظور تعیین حد تشخیص آزمون PCR بهینه شده، باید رقت‌هایی 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 *هلیکوباکترپیلوری* با تعداد مشخصی به روش سریال رقیق شد. سپس بر روی رقت‌های به‌دست آمده با تعداد مشخصی آزمون PCR همراه با کنترل مثبت و کنترل منفی گذاشته شد. تعداد DNA موجود در لوله اولیه از طریق اندازه‌گیری غلظت DNA در تیوب به وسیله دستگاه نانودراپ و استفاده از فرمول ژنوم کپی نامبر (GCN) و اندازه ژنوم *هلیکوباکترپیلوری* به‌دست آمد.

جهت تعیین اختصاصیت، از DNA انسان، *ساکارومیسس سرویزیه*، *اشرشیاکلی*، *مایکوپلاسما پنومونیه*، *هرپس سیمپلکس ویروس*، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و *سالمونلاتیفی‌موریوم* به‌همراه نمونه کنترل مثبت و منفی استفاده شد.

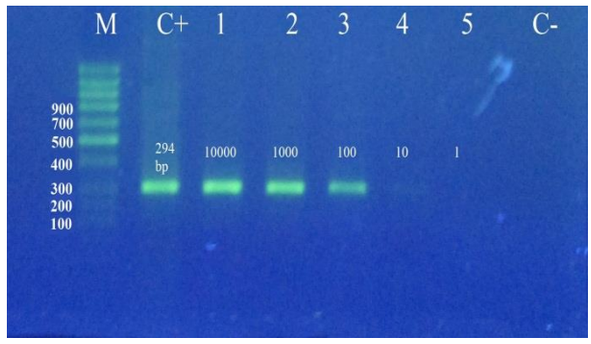
نتایج

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 موردنظر که ۲۹۴ جفت باز طول داشت رویت گردید (شکل ۱).



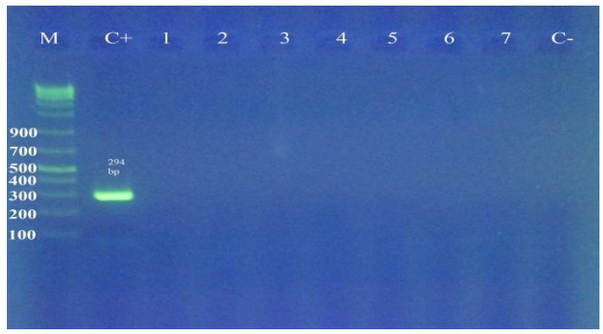
شکل ۱: تست PCR بهینه شده *هلیکوباکترپیلوری*
M: سایزمارکر 1kb DNA Ladder (bioflux)
C+: کنترل مثبت (DNA*هلیکوباکتر* استاندارد)
C-: کنترل منفی

حد تشخیص آزمون PCR برابر ۱۰ Copy/reaction در هر واکنش به‌دست 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 *هلیکوباکترپیلوری* مثبت گردید و هیچ‌کدام از نمونه‌های دیگر در این تست، موجب تکثیر نگردید (شکل ۳).

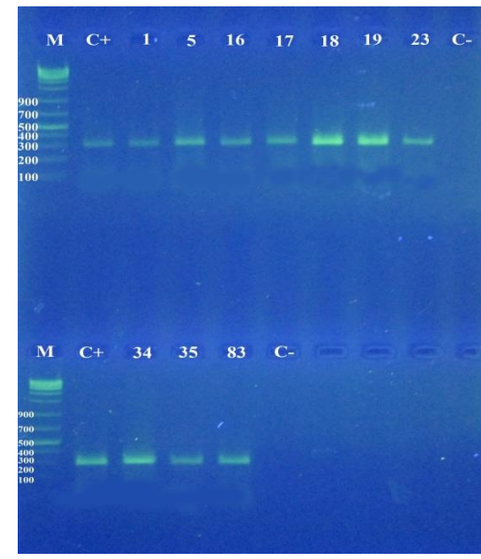


شکل ۳: تست ویژگی PCR *هلیکوباکترپیلوری*
M: سایزمارکر 1kb DNA Ladder (bioflux)
C+: کنترل مثبت
C-: کنترل منفی
۱: DNA/*اشرشیاکلی* ۲: DNA *مایکوپلاسما پنومونیه*
۳: DNA *هرپس سیمپلکس ویروس II*
۴: DNA *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*
۵: DNA *سالمونلا تیفی موریوم*
۶: DNA *ساکارومیسس سرویزیه*
۷: DNA انسان

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

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-01]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.3.7]

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



شکل۴: 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 به‌هم چسبیدن اسپرم می‌شوند، که این امر می‌تواند باعث بی‌تحرکی اسپرم‌ها گرددو این اثر، بستگی به تراکم باکتری‌ها در مایع منی دارد.

در مطالعه حاضر به بررسی حضور *هلیکوباکترپیلوری* در مایع منی مردان نابارور پرداخته شد و این نتیجه حاصل شد که این باکتری روی باروری مردان تأثیر منفی می‌گذارد و با توجه‌به 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 *هلیکوباکترپیلوری* ممکن است یک نقش مضر در کیفیت اسپرم مردان با ناباروری ایدیوپاتیک داشته باشد انجام گرفت، طی آن عفونت با *هلیکوباکترپیلوری* 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 *هلیکوباکترپیلوری* نسبت‌به 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 *هلیکوباکترپیلوری*، نشان داده شده که حساسیت روش‌هایی از قبیل کشت میکروبی، تست سریع اوره‌آز (RUT)، بافت-شناسی و تست‌های آنتی‌ژن مدفوعی، زمانی‌که تعداد باکتری-های موجود در نمونه اندک باشند، غیرقابل اعتماد هستند (۲۱). به‌علاوه سرولوژی نمی‌تواند *هلیکوباکترهای* دفع شده را شناسایی کند و تست اوره‌آز نیز می‌تواند نتایج غیر اختصاصی را به‌علت حضور سایر باکتری‌های اوره‌آز مثبت و یا نتایج منفی کاذب در بیمارانی که بازدارنده‌های پمپ پروتون را مصرف می‌کنند، ایجاد کند (۲۲،۲۳). روش‌های مبتنی‌بر 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) به‌عنوان یک روش خوب به رسمیت شناخته شده اما با این حال، از دیدگاه نظری به‌دلیل حضور باکتری‌های اوره‌آز مثبت در حفره دهان، منجر به ایجاد جواب‌های مثبت کاذب می‌گردد و انجام آن نیز گران است (۲۵). روش کشت، روش استانداردی برای شناسایی باکتری *هلیکوباکتر* است، زیرا اجازه انتخاب کلنی توسط درمان ضدمیکروبی در محیط کشت را می‌دهد (۲۵). ولی این روش زمان‌بر و گران و مشکل است. از آن‌جایی‌که *هلیکوباکتر* یک ارگانیسم 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 *هلیکوباکترپیلوری* در نمونه‌های بیوپسی بیماران مبتلا به سوء هاضمه مورد مقایسه قرار داد. حساسیت و اختصاصیت PCR به‌ترتیب ۹۱٪ و ۱۰۰٪ و برای Nested PCR ۹۵٪ و ۹۷٪ ارزیابی گردید (۲۷). استفاده از روش PCR معمولی اگرچه دارای حساسیتی کم‌تر نسبت‌به Nested PCR است، اما از لحاظ اقتصادی در انجام نسبت‌به Nested PCR مقرون‌به

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-01]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.3.7]

صرفه است و در همه آزمایشگاه‌ها در دسترس و قابل اجراست. هم‌چنین در روش Nested PCR به‌دلیل 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 *هلیکوباکترپیلوری* بر قدرت باروری مردان تأثیرگذار است مانند مطالعه Elena Moretti و همکارانش در سال ۲۰۱۲، که در ۷۸ مرد، عفونت *هلیکوباکترپیلوری* و *سیتوتوکسین* مرتبط با پروتئین ژن *CagA* توسط وسترن بلات تشخیص داده شد. کیفیت مایع منی (۴۷ نفر) به دنبال دستورالعمل-های سازمان بهداشت جهانی، و با روش Radioimmunoassay (RIA) سنجش شد. ۲۷ مرد (۳۴٫۶٪) *هلیکوباکترپیلوری* مثبت و ۱۱ نفر از ۲۷ مرد (۴۰٫۷٪) *CagA* مثبت بودند. طی نتایجی که به‌دست 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 *هلیکوباکترپیلوری* می‌تواند به دستگاه تولید مثل انسان نفوذ کند؟" به بررسی رابطه عفونت *هلیکوباکترپیلوری* با بیماری‌های خارج دستگاه گوارش پرداختند. در این یافته‌ها شواهد مربوط‌به کاهش پتانسیل باروری در افراد آلوده به *هلیکوباکترپیلوری* 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 *هلیکوباکترپیلوری* است (۱۸،۳۰). چون در روش‌های مولکولی، بسته‌به ژن های هدف مورد استفاده از قبیل ژن‌های *UreC*، *UreA*، *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 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 *هلیکوباکترپیلوری* شامل ژن *16SrRNA*، توالی‌های تصادفی ژنی، ژن *SSA*، ژن *UreA* و ژن *UreC* و مقایسه آن ها با یک دیگر دریافتند که با آن که ژن *16SrRNA* بیش-ترین هدف مورد استفاده برای شناسایی *هلیکوباکترپیلوری* توسط PCR است، اما دارای اختصاصیت بسیار پایینی است و از سوی دیگر با وجود این که توالی‌های تصادفی و ژن *UreA*، برای شناسایی *هلیکوباکترپیلوری* دارای اختصاصیت بالایی است، اما حساسیت به‌دست آمده توسط PCR این ژن‌ها، رضایت‌بخش نیست. این حساسیت پایین به‌علت 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*، مناسب ترین ژن مورد استفاده در شناسایی های ملکولی *هلیکوباکترپیلوری* محسوب می گردد، در این پژوهش روش PCR با هدف ژنی *glmM* اختصاصیت بالایی برای *هلیکوباکترپیلوری* داشت (۱۷). هم-چنین اسمیت و همکاران در سال ۲۰۰۴ با مقایسه سه روش PCR نشان دادند که PCR ژن *ureC* به‌منظور تکثیر یک قطعه ۲۹۴ جفت بازی اختصاصی ترین و حساس ترین 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 *هلیکوباکترپیلوری* با استفاده از روش مولکولی PCR، ۱۰٪ است که نشان می‌دهد *هلیکوباکترپیلوری* 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 فناور، آزمایشگاه علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرقدس، بیمارستان و مرکز تحقیقات باروری و

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.3.7]

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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.3.7]

منابع

1- Nojoomi M, Ashrafi M, koohpaye 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.3.7]

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-*a. 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, Lacoponi 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.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2025-07-01]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1398.9.36.3.7]