مطالعه ارتباط بین اندومتریوز، ناباروری و جمعیت باکتریایی رحم زنان مبتلا به اندومتریوز و ناباروری

مهدی دهدشتی[۱]، دکتر نیما بهادر[۲*]، دکتر طاهره پوردست[۳]، دکتر مریم ذوالقدر[۴]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
۲. دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
۳. دانشیار گروه زنان و مامایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.
۴. استادیار گروه زنان و مامایی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۵ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۳/۰۶/۰۸

خلاصه

مقدمه: اندومتریوز، یک بیماری مزمن ژنیکولوژی است که می‌تواند منجر به نازایی شود. با توجه به اینکه رحم استریل نیست، رفلاکس خون قاعدگی به لگن در این بیماران ممکن است آلوده به باکتری و اندوتوکسین باکتری‌ها باشد و به ایجاد و رشد ضایعات اندومتریوز کمک کند. مطالعه حاضر با هدف بررسی ارتباط بین اندومتریوز، ناباروری و باکتری‌های رحم زنان مبتلا به اندومتریوز و نازایی انجام شد.

روش‌کار: این مطالعه مورد- شاهدی از تابستان تا زمستان ۱۴۰۰ بر روی جدایه‌های باکتریایی آندومتر ۳۵ زن مبتلا به اندومتریوز و نازایی و ۱۵ زن سالم در بیمارستان زینبیه شیراز انجام گردید. جدایه‌ها توسط روش بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی و آنالیز شدند. جهت بررسی رابطه میکروبیوتای رحم با اندومتریوز و نازایی از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) و آزمون کای دو استفاده شد.

یافته‌ها: جدایه‌های حاصل از آندومتر رحم زنان بیمار شامل: *Enterococcus faecalis*(۳۱/۸٪)، *E. coli* (۱۸/۲٪)، *Streptococci pyogenes* (۶/۸٪)، *Klebsiella pneumonia* (۱۳/۶٪)، *Klebsiella aerogenes* (۱/۹٪)، *Staphylococci aureus* (۴/۵٪)، *Pseudomonas aeruginosa* (۹/۱٪)، *Staphylococci Epidermidis* (۶/۸٪) و در زنان سالم *Staphylococci epidermidis* (۳۰/۰٪)، *Lactiplantibacillus plantarum* (۴۵/۰٪)، *E. coli* (۱۵/۰٪) و *Acinetobacter baumannii* (۱۰/۰٪) بود. بر اساس آنالیز آزمون کای دو، بین باکتری‌های پاتوژن و فلور نرمال در گروه‌های مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۵$). همچنین جنس غالب در بین باکتری‌های جدا شده از زنان بیمار و سالم به‌ترتیب *E.faecalis* (۳۱/۸٪) و *L. plantarum* (۴۵٪) بود.

نتیجه‌گیری: کاهش گونه‌های لاکتوباسیلوس و افزایش تنوع گونه‌های باکتری‌های بیماری‌زا در رحم زنان مبتلا به اندومتریوز احتمالاً با افزایش استعداد ابتلاء به نازایی مرتبط است.

کلمات کلیدی: اندومتریوز، باکتری‌ها، ناباروری

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** دکتر نیما بهادر؛ دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران. **تلفن:** ۰۷۱-۳۶۴۱۰۰۴۱؛ **پست الکترونیک:** nima44bahador@gmail.com

مقدمه

اندومتریوز، یک بیماری مزمن ژنیکولوژی است که مشخصه آن حضور بافت شبه آندومتر در خارج از رحم می‌باشد. از آنجایی که اندومتریوز یک بیماری وابسته به استروژن می‌باشد، لذا ضایعات نابجا همزمان با سیکل قاعدگی تحت تأثیر سیکل‌های رشد و خونریزی قرار می‌گیرند. بیماری، طیف وسیعی از نشانه‌ها و علائم بالینی از جمله دردهای لنگی و نازایی را نشان می‌دهد. همچنین این بیماری تمایل به پیشرفت و عود دارد. اندومتریوز اثرات بدی بر روی زندگی بیماران از لحاظ کیفیت زندگی و بار اقتصادی دارد (۱، ۲). اندومتروزیس قویاً با ناباروری ارتباط دارد و ۵۰-۳۰٪ از افراد مبتلا به اندومتریوز، نازایی دارند. میزان بارداری در زنان جوان مبتلا به اندومتریوز درمان نشده ۱۰-۲٪ می‌باشد، در مقابل در زوجین سنین باروری که مبتلا به نازایی نمی‌باشند، حدود ۲۰٪ می‌باشد (۳). تحقیقات بیانگر آن است که در اندومتریوزیس، ترکیب میکروبیولوژیکی خاص آندومتر متمایز می‌شود و بر پذیرش آندومتر تأثیر منفی می‌گذارد و می‌تواند عامل فعال در ناباروری باشد (۴).

ارتباط بین اندومتریوز و التهاب نیز توسط یک مطالعه در دانمارک نشان داده شده است که زنان مبتلا به اندومتریوز در مقایسه با زنان سالم، به‌طور قابل‌توجهی در خطر ابتلاء به بیماری التهابی روده، کولیت اولسراتیو و بیماری کرون هستند. حتی ۲۰ سال پس از بستری شدن اولیه به‌دلیل اندومتریوز، این بیماران در معرض افزایش خطر ابتلاء به کولیت اولسراتیو و بیماری کرون هستند (۵).

از طرف دیگر ناباروری به یک سال مقاربت جنسی منظم و بدون جلوگیری اطلاق می‌شود که منجر به بارداری نگردد. در این میان علل اصلی ناباروری در زوجین شامل: اختلالات تخمک‌گذاری (۱۵٪)، بیماری‌های صفاقی و لوله‌ای (۳۵٪)، عوامل مربوط به مرد (۳۵٪)، بیماری‌های مربوط به رحم که نسبتاً ناشایع می‌باشند (۵٪) و در سایر موارد ناباروری به‌علت نامشخص (۱۰٪) است (۳). بنابراین محققین ناباروری توأم با اندومتریوز را با مکانیسم‌های مختلفی مرتبط دانسته که شامل: آناتومی به‌هم ریخته، التهاب و بیان غیرعادی ژن آندومتری می‌باشد. آناتومی به‌هم ریخته می‌تواند از رهاسازی تخمک و بازیابی پس از تخمک‌گذاری جلوگیری یا ممانعت کند و این امر، شاهد بالینی منطقی و خوب می‌باشد که اندومتریوز در مواردی که سبب در هم ریختن آناتومی می‌گردد، منجر به کاهش بارداری می‌شود. همچنین مطالعه‌ای (۲۰۰۴)، باروری در میمون‌هایی که تحت پیوند اتوگرافت صفاق از بافت آندومتر قرار گرفته بودند، یا میزان باروری در حیواناتی که اندومتریوز متوسط یا شدید در آنها ایجاد شده بود، به میزان قابل توجهی کمتر از آنهایی بود که بیماری بسیار خفیف داشته و یا در گروه شاهد بودند (۶).

از طرف دیگر میکروبیوتا جامعه‌ای از میکروب‌هاست که درون و روی بدن فرد زندگی می‌کنند و از نظر ماهیتی می‌توانند بین مکان‌های محیطی و زیستگاه‌های میزبان در فرد سالم و بیمار متفاوت باشد. میکروبیوتا روی سطح پوست، سوراخ‌های بینی، حفره دهانی، روده‌ها و مجاری ادراری تناسلی وجود دارند (۷). میکروبیوم انسان برای اولین بار به‌عنوان جامعه اکولوژیکی از میکروارگانیسم‌های کامنسال، همزیست و بیماری‌زا توصیف شد (۸). با ظهور نسل بعدی توالی‌یابی (NGS)[1]، تکنیک‌هایی مانند توالی‌یابی ژن 16SrRNA، مطالعات بسیاری را برای توصیف جوامع مختلف میکروبی در داخل رحم امکان‌پذیر کرد، اما مشخص نیست که منشأ آنها از کجاست. برای مثال، فرض بر این است که کلونیزاسیون رحم از روده، حفره دهان، جریان خون و یا واژن اتفاق می‌افتد (۹). به‌نظر می‌رسد میکروبیوتای رحم، زنجیره‌ای از میکروبیوتای واژن باشد، اما چندین مطالعه تفاوت‌های قابل توجهی را بین میکروبیوتای واژن و آندومتر گزارش کرده‌اند که اهمیت ارزیابی میکروبیوتای دستگاه تناسلی فوقانی را برای درک بهتر نقش بالقوه باکتری‌ها در آن نشان می‌دهد. اخیراً در مطالعات بیان شده است که میکروبیوتای رحم ممکن است با حضور باکتری‌های مهاجم تغییر

[1] Next-Generation Sequencing

کند که در سلامت باروری و بیماری نقش داشته باشد (۱۰).

واژینوز باکتریایی نوعی التهاب واژن است که چرخه قاعدگی، فعالیت جنسی و تغییرات در اکوسیستم روده (مانند یبوست و اسهال) از شایع‌ترین علل تغییرات در میکروبیوتای واژن و رحم است که به آسیب‌های واژینوز باکتریایی کمک می‌کند (۱۱). یکی از عوامل ایجاد اندومتریوز، التهاب آندومتر یا اندومتریت است که به‌دلیل شکست مکانیسم‌های سازگار با اثرات میکروبیوتا، زمینه‌ساز اختلالات عملکرد تولید مثل می‌باشد (۴).

اخیراً، میکروبیوم انسانی توالی‌یابی شده است که میکروبیوتای واژن حدود ۹٪ از کل میکروبیوتای انسان را تشکیل می‌دهد که به‌طور خاص، گونه‌های *لاکتوباسیلوس* به‌عنوان باکتری‌های موجود در این محل گزارش شده‌اند و جنس‌های دیگری مانند *Prevotella*، *Bifidobacterium*، *Gardnerella*، *Atopobium*، *Megasphaera*، *Sneathia* و *Anaerococcus* حضور دارند که در مراحل مختلف تولید مثل از تشکیل گامت، لقاح، لانه‌گزینی، نگهداری حاملگی و در کلونیزاسیون میکروبی جنین و یا نوزاد دخیل هستند (۱۲).

واژن، میزبان حاوی میلیاردها باکتری است و دهانه رحم باید مانع کاملی برای صعود آنها به حفره و لوله‌های رحم باشد. سد فیزیکی ایجاد شده توسط مخاط دهانه رحم، سطوح بالای پپتیدهای ضد میکروبی، سیتوکین‌های التهابی، ایمونوگلوبولین‌ها و آنزیم‌های تخریب کننده ماتریکس به‌عنوان محافظت در برابر باکتری‌های صعودی در نظر گرفته می‌شود (۱۳، ۱۴). در طول چرخه قاعدگی، ترکیب و pH مخاط دهانه رحم تغییر می‌کند که تحت شرایط خاصی می‌تواند منجر به غلبه بر آن به‌عنوان یک مانع شود. پمپ پریستالتیک رحم به انتقال اسپرم به لوله‌های فالوپ کمک می‌کند و ممکن است در گسترش باکتری‌ها در رحم نقش داشته باشد. در مرحله فولیکولی چرخه قاعدگی، انقباضات رحم در بالاترین فرکانس خود هستند که علاوه بر این، شرایط مختلف رحم می‌تواند منجر به ورود باکتری‌ها شود (۱۵). کلونیزاسیون حفره رحم عمدتاً به‌دلیل صعود فلور طبیعی واژن است. سایر راه‌های کلونیزاسیون توسط میکروارگانیسم‌های دستگاه تناسلی فوقانی ممکن است: انتشار هماتوژن میکروارگانیسم‌ها از نقاط دور بدن، عفونت رتروگراد رحم توسط میکروارگانیسم‌های صفاقی از طریق لوله‌های فالوپ، تلقیح مستقیم یا تروژنیک و میکروارگانیسم‌های متصل به آن، باشد (۱۶).

مشخصه اندومتریت مزمن، التهاب طولانی‌مدت مخاط آندومتر است که در اثر کلونیزاسیون رحم توسط باکتری‌های رایج مانند *انتروکوکوس فکالیس*، *اشریشیا کلی*، *گاردنرلا واژینالیس*، *کلبسیلا نومونیه*، *پروتئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* ایجاد می‌شود. تا همین اواخر، رحم استریل در نظر گرفته می‌شد و اکثر آزمایشات میکروبیولوژیکی بر اساس نمونه‌های واژینال انجام می‌شد. فلور غالب در سنین باروری در یک زن سالم از *لاکتوباسیل*‌ها تشکیل شده است که بسته به سن و محیط هورمونی، تغییراتی در آنها وجود دارد. این ویژگی جالب مربوط به انسان است، زیرا دستگاه تناسلی سایر پستانداران دارای یک میکروبیوم واژن است که *لاکتوباسیل* بر آن غالب نیست (۱۷).

باکتری *لاکتوباسیلوس* با تولید اسیدلاکتیک، pH اسیدی واژن را حفظ می‌کند و به‌عنوان یک مانع در برابر عوامل *بیماری‌زا* عمل می‌کند (۱۸). حضور گونه‌های *لاکتوباسیلوس* و تولید H_2O_2 با زایمان موفق و تولد نوزاد زنده رابطه مستقیم دارد، در حالی‌که باروری موفق با واژینوز باکتریایی رابطه معکوس دارد. بنابراین، تغییرات در میکروبیوتای دستگاه ادراری- تناسلی، به‌عنوان مثال واژینوز باکتریایی (که توسط *Gardnerella vaginalis* ایجاد می‌شود) باعث افزایش خطر سقط جنین می‌شود (۱۹، ۲۰). از طرف دیگر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا - مانند *کلامیدیا تراکوماتیس* و *نایسریا گونوره* می‌توانند باعث افزایش خطر ناباروری شوند (۲۱). جمعیت باکتریایی غیر*لاکتوباسیلوس* در آندومتر می‌تواند تأثیر منفی بر عملکرد تولید مثل داشته باشد. تحقیقات نشان داده است در زنانی که لانه‌گزینی ناموفق پس از انتقال

جنین داشتند، ارگانیسم‌هایی چون اعضای خانواده *انتروباکتریاسه*، گونه‌های *استرپتوکوکوس*، *استافیلوکوکوس*، *اشریشیا کلی* و باکتری‌های گرم منفی جمعیت غالب می‌باشند (۲۲). باکتری‌های مرتبط با واژینوز باکتریایی و کاهش *لاکتوباسیلوس* در میکروبیوم دهانه رحم با اندومتریوز و ناباروری ارتباط دارند؛ به‌طوری‌که مطالعات حیوانی، از رابطه دوطرفه بین میکروبیوتای روده و شروع و پیشرفت اندومتریوز و ناباروری حمایت می‌کند و نشان می‌دهد میکروبیوتای دستگاه تناسلی دیس‌بیوتیک با چندین بیماری ژنیکولوژیک مانند اندومتریوز و ناباروری مرتبط است. این میکروبیوم‌ها احتمالاً در محور روده- مغز نقش دارند و از ارتباط احتمالی با علائم مرتبط با اندومتریوز، از جمله ناباروری و درد لگن پشتیبانی می‌کنند (۲۳). *انتروکوکوس فکالیس*، یک پاتوژن فرصت‌طلب است که اغلب در آندومتر بیماران اندومتریت مزمن یافت می‌شود. به‌نظر می‌رسد ارگانیسم با تولید سوپر اکسید می‌تواند در ایجاد اندومتریت دخالت داشته باشد (۲۴).

در دوران کودکی، فلور واژن مخلوطی از جمعیت باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی از جمله *پرووتلا*، *انتروباکتر*، *استرپتوکوکوس* و گونه‌های *استافیلوکوکوس* است. با ایجاد یک محیط استروژنیک در دوران بلوغ، افزایش سطح گلیکوژن و کاهش pH، تسلط انواع *لاکتوباسیل*‌ها آغاز می‌شود. pH واژن از ۳/۵ تا ۴/۵ متغیر است و بعد از معده، دومین ناحیه اسیدی در بدن انسان است. این pH پایین ایجاد شده توسط درگیری *لاکتوباسیل*‌ها به‌طور قابل توجهی از رشد پاتوژن‌ها جلوگیری می‌کند (۲۵). از طرف دیگر مطالعات نشان داده‌اند که سیتوکین‌ها، سیستم ایمنی و میکروبیوتای واژن می‌توانند بر روی بارداری طبیعی و IVF تأثیر بگذارند (۲۶). بنابراین مطالعه حاضر با هدف ارزیابی میکروبیوتای زنان سالم و نابارور دارای اندومتریوز و اینکه آیا ارتباطی بین سویه‌های جدا شده و ناباروری وجود دارد و یا تغییر جمعیت میکروبی می‌تواند فرد را مستعد ابتلاء به اندومتریوز و نازایی کند، انجام گرفت. همچنین هدف مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی میکروبیوم آندومتر رحم زنان مبتلا به اندومتریوز و نازایی (کنترل مثبت) و زنان سالم (کنترل منفی) و همچنین مقایسه و ارزیابی ارتباط بین بیماری اندومتریوز و نازایی با پروفایل میکروبیوم رحم این دو گروه بود.

روش‌کار

نمونه‌گیری

مطالعه حاضر به صورت موردی- شاهدی در سال ۱۴۰۰ بر روی گروه زنان مبتلا به اندومتریوز و نازایی به‌عنوان گروه مثبت و زنان سالم به‌عنوان گروه شاهد در بیمارستان حضرت زینب (س) شیراز بر اساس کد اخلاق تصویب شده به شماره IR.IAU.SHIRAZ.REC.1400.018 انجام شد. برای این منظور از تابستان تا زمستان ۱۴۰۰، طی چندین مرحله با توجه به تمایل شرکت‌کنندگان در طرح مذکور، ۵۰ زن بیمار و سالم جامعه هدف مورد آزمون قرار گرفتند؛ به‌طوری‌که پس از ویزیت توسط متخصص زنان و زایمان، شرکت‌کنندگان به دو گروه تقسیم شدند: گروه اول زنانی که پس از حداقل یک‌سال مقاربت جنسی منظم و بدون جلوگیری، دارای ناباروری بودند و پس از انجام سونوگرافی و جراحی، اندومتریوز آنها تأیید شده بود و گروه دوم زنان سالم بارور بودند. نمونه‌گیری در هر دو گروه در وسط سیکل قاعدگی انجام شد و زنانی که سابقه بیماری زمینه‌ای، دیابت، مصرف دارو از جمله آنتی‌بیوتیک، خونریزی‌های نامنظم رحمی و همسرانی که دارای مشکل نازایی بودند، از مطالعه خارج شدند. در بین زنان مراجعه کننده ۳۵ نفر که اندومتریوز آنها تأیید و نابارور بودند و ۱۵ نفر از زنان سالم مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه‌برداری از آندومتر رحم تحت شرایط استریل انجام شد؛ بدین‌صورت که بیمار بر روی تخت لیتوتومی قرار گرفته، واژن توسط سرم شستشوی استریل شسته شد و توسط رینگ و گاز استریل خشک گردید. سپس در شرایط استریل، اسپکولوم جایگزین و نمونه‌برداری با پایپل جهت جلوگیری از هر گونه آلودگی احتمالی انجام شد (۲۷). نمونه‌ها طبق شماره درون لوله حاوی محیط ترانسپورت تیوگلیکولات براث (شرکت MIRMEDIA-ساخت ایران) ریخته و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۶/۵ درجه نگهداری گردید.

شناسایی باکتری‌ها به روش بیوشیمیایی

جهت شناسایی باکتری‌های آندومتر، نمونه‌ها بعد از ۲۴ ساعت بر روی محیط‌های ائوزین متیلن بلو آگار (شرکت MIRMEDIA- ساخت ایران)، بلاد آگار (شرکت MIRMEDIA- ساخت ایران) و آگار شکلاتی (شرکت MIRMEDIA- ساخت ایران) به‌صورت خطی کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت، گرمخانه‌گذاری گردید. همچنین جهت تشخیص احتمالی باکتری‌های بی‌هوازی یا بی‌هوازی اختیاری، پلیت‌های چاکلت آگار درون جار بی‌هوازی قرار گرفت. پس از گذشت زمان مذکور، پلیت‌ها جهت رشد و شناسایی باکتری‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند و پس از اطمینان از خالص بودن، تک‌کلنی‌ها رنگ‌آمیزی گرم و با توجه به نوع گرم تست‌های تشخیصی- افتراقی بر روی آنها صورت گرفت (۲۸، ۲۹). در بین جدایه‌ها، ارگانیسم‌های گرم منفی ابتدا توسط تست اکسیداز و سپس توسط کیت تشخیصی bioproducts Microgen, lot number:49591 مورد آنالیز قرار گرفت و متعاقباً به کمک نرم‌افزار مربوطه شناسایی شدند؛ بدین‌صورت‌که به تعداد باکتری‌های گرم منفی، لوله‌های تمیز و استریل حاوی ۵ میلی‌لیتر نرمال سایلین استریل تهیه شد و در زیر هود لامینار کلاس II، باکتری‌ها به نرمال سیلین تلقیح شد و به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌گذاری گردید و پس از مشاهده ایجاد کدورت در لوله‌ها، توسط سرسمپلر استریل، ۱۰۰ ماکرولیتر از باکتری‌ها به‌صورت مجزا به چاهک‌های کیت API اضافه و طبق بروشور به چاک‌های مشخص روغن اضافه گردید. نمونه‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و طبق دستورالعمل کیت، معرف‌های VP I/II- Indole-TDA-Nitrate اضافه و مجدد پس از یک ساعت انکوبه‌گذاری و با توجه به تغییر رنگ چاهک‌ها و کد به‌دست آمده، باکتری‌ها شناسایی شدند (۳۰).

علاوه بر این باکتری‌های گرم مثبت بر اساس همولایز و تست‌های تشخیصی اکسیداز (پادتن طب- ایران)، کاتالاز، کواگولاز، دیسک تشخیصی نووبیوسین (پادتن طب- ایران)، بایل اسکولین (شرکت MIRMEDIA- ساخت ایران) و مانیتول (شرکت MIRMEDIA- ساخت ایران) شناسایی شدند (۲۸، ۲۹).

شناسایی باکتری‌ها به روش مولکولار

جهت شناسایی مولکولی جدایه‌ها، استخراج DNA باکتری‌ها توسط کیت سینا کلون با کد شناسایی EX6021 به‌صورت زیر انجام شد: ۲۰۰ میکرولیتر باکتری خالص ۱۰ دقیقه در rpm۴۵۰۰ سانتریفیوژ گردید، سپس ۱۰۰ میکرولیتر Pre-lysis Buffer به همراه ۲۰ میکرولیتر Lysozyme اضافه شد. سپس آنها به‌طور کامل میکس شده و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. ۱۰ ماکرولیتر Ributinase اضافه و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر Lysis buffer اضافه و با سرعت زیاد به‌مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد و به آن ۳۰۰ میکرولیتر Precipitation Buffer اضافه گردید. مجدداً ۵ ثانیه با سرعت زیاد ورتکس شد. مایع رویی به ستون استخراج اضافه و تیوب برای ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. سپس ۴۰۰ میکرولیتر Wash Buffer 1 اضافه شد و مجدداً ۱ دقیقه ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و مایع سطحی دور ریخته شد و به آن Wash Buffer 2 به میزان ۴۰۰ میکرولیتر اضافه شد. مجدداً مانند مرحله قبل، سانتریفیوژ انجام و ستون استخراج در یک Collection Tube تمیز گذاشته و جهت خشک شدن مانند دو مرحله قبل سانتریفیوژ شد و به آن ۵۰ میکرولیتر Elution Buffer اضافه گردید. به‌مدت ۵ دقیقه تیوب‌ها در دمای ۶۵ درجه بن‌ماری‌گذاری شد و در دور rpm۴۰۰۰ به‌مدت ۱ دقیقه چرخید و مایعی که در تیوب باقی ماند، حاوی ژنوم باکتری‌ها بود. جهت شناسایی ارگانیسم‌ها، توالی پرایمرها توسط نرم‌افزار Allele ID v7.5 با فرمت زیر طراحی (جدول ۱) و جهت انجام واکنش PCR، مخلوط واکنش بر اساس حجم‌های ذکر شده در جدول ۲ تهیه شد. سپس واکنش PCR درون دستگاه ترموسایکلر (شرکت BIO RAD ساخت آمریکا) بر اساس پروتکل ذکر شده در جدول ۳ انجام و محصول PCR الکتروفورز شدند. محصولات تکثیر یافته از ژن 16S rRNA از تمامی باکتری‌ها ابتدا توسط ژل الکتروفورزیس مشاهده

و با توجه به الگوی باند لدر برند (SMOBIO #DM3100 1kbs) محصولات PCR جهت سکانس شدن و شناسایی مولکولی باکتری‌ها از روش توالی‌یابی sanger sequencing مورد آنالیز قرار گرفتند.

جدول ۱- توالی پرایمرهای یونیورسال مربوط به ژن 16S rRNA باکتری‌های گرم مثبت و منفی

پرایمر یونیورسال باکتری‌های گرم مثبت	رفت	CCTACGGGAGGCAGCAGT
	برگشت	ATGCTCCACCGCTTGTGC
پرایمر یونیورسال باکتری‌های گرم منفی	رفت	CTCCTACGGGAGGCAGCA
	برگشت	GTAGCACGTGTGTAGCCCTG

جدول ۲- اجزا مخلوط واکنش PCR

حجم (بر اساس ماکرولیتر)	اجزاء و غلظت مخلوط واکنش PCR
۱۲/۵	مستر میکس (غلظت ۲ برابری)*
۱	پرایمر رفت (۱۰ میکرولیتر)
۱	پرایمر برگشت (۱۰ میکرولیتر)
۴	نمونه (۱۰۰ نانوگرم)
۶/۵	آب دیونیزه
۲۵	حجم نهایی

*ترکیب مسترمیکس: Tris-HCl pH 8.5, (NH4)2S04, 3 mM MgCl2, 0.2% Tween® 20, 0.4 mM of each dNTPs, Ampliqon Taq DNA polymerase.

جدول ۳- پروتکل واکنش PCR

زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)		چرخه
۵ دقیقه	۹۵	واسرشت ابتدایی	۱
۳۰ ثانیه	۹۵	واسرشت شدن	۳۵
۲۰ ثانیه	۶۲	اتصال پرایمر	
۴۰ ثانیه	۷۲	پلیمریزاسیون محصول	
۱۰ دقیقه	۷۲	گسترش نهایی محصولات	۱
-----	۴	نگهداری	۱

بررسی ارتباط وجود باکتری‌های پاتوژن و فلور نرمال در زنان سالم و نابارور مبتلا به اندومتریوز با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (نسخه ۲۱) و آزمون کای دو انجام شد و اطلاعات توصیفی گروه‌های مورد مطالعه شامل تعداد و درصد باکتری‌ها به تفکیک جنس آنها بررسی گردید.

یافته‌ها

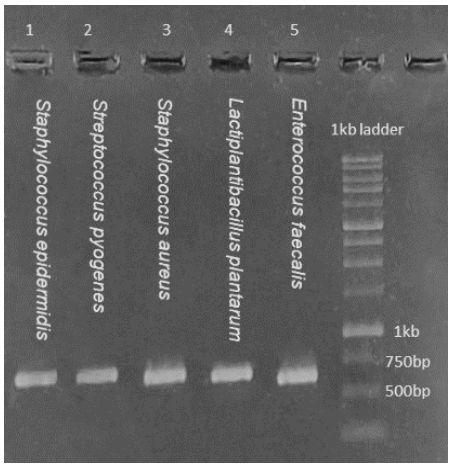
جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌ها

در این مطالعه ۵۰ نمونه از جامعه هدف (زنان مبتلا به اندومتریوز و نازایی و زنان سالم) گرفته شد. در مجموع ۶۴ باکتری جداسازی و شناسایی گردید. از ۳۵ زن مبتلا به اندومتریوز و نازایی که سن بین ۳۵-۲۶ سال داشتند، به تفکیک تعداد ۴۴ باکتری در ۸ جنس شناسایی شدند که شامل: *E. faecalis* (۱۴ مورد)، *E. coli* (۸ مورد)، *S. pyogenes* (۳ مورد)، *K. pneumonia* (۶ مورد)، *K. aerogenes* (۴ مورد)، *S.aureus* (۲ مورد)، *P. aeruginosa* (۴ مورد) و *S. epidermidis* (۳ مورد) بود و از ۱۵ زن سالم که سن بین ۳۶-۲۶ داشتند، به تفکیک تعداد ۲۰ باکتری در ۴ جنس شناسایی شدند که شامل: *L. plantarum* (۹ مورد)، *E. coli* (۳ مورد)، *A.baumannii* (۲ مورد) و *S. epidermidis* (۶ مورد) بود.

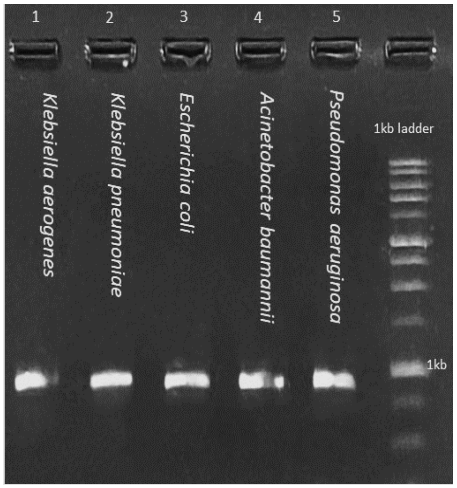
شناسایی و تأیید مولکولی باکتری‌ها

بر اساس طراحی پرایمر، در محدوده ۸۹۹ bp برای باکتری‌های گرم منفی و باند ۶۱۱ bp برای باکتری‌های

گرم مثبت باند مشاهده شد. نتایج حاصل از الکتروفورز باکتری‌های گرم مثبت و منفی به‌ترتیب در شکل‌های ۱ و ۲ آمده است.



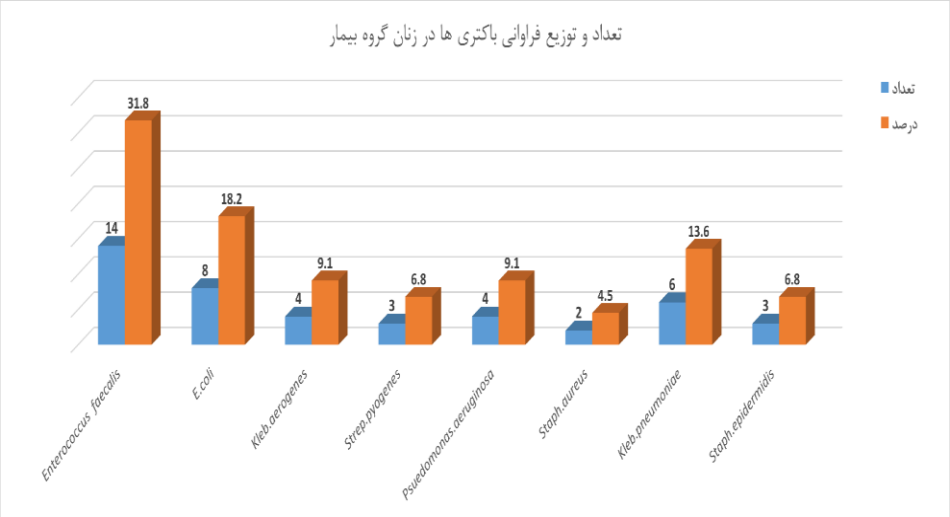
شکل ۱- الکتروفورز مربوط به باکتری‌های گرم مثبت (چاهک‌های ۵-۱)، مشاهده باند ۶۱۱ تأیید کننده عملکرد صحیح PCR و تکثیر ژن 16s rRNA می‌باشد.



شکل ۲- الکتروفورز مربوط باکتری‌های گرم منفی (چاهک‌های ۵-۱) مشاهده باند ۸۹۹ تأیید کننده عملکرد صحیح PCR و تکثیر ژن 16s rRNA می‌باشد.

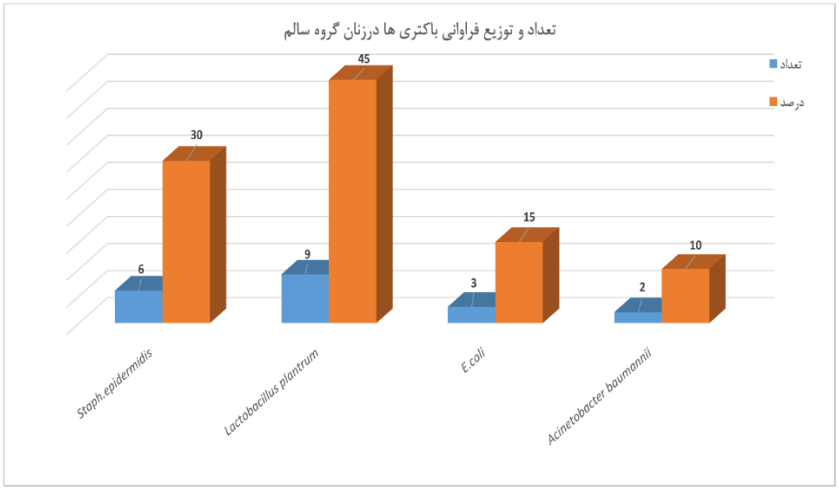
سکانس مولکولی باکتری‌ها توسط نرم‌افزار آنلاین NCBI blast مورد آنالیز قرار گرفت و نتایج به‌دست آمده، تأییدی بر آزمون‌های بیوشیمایی انجام شده برای شناسایی باکتری‌ها بود.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، بیشترین درصد فراوانی مربوط به *E. faecalis* (۳۱/۸٪) و *E.coli* (۱۸/۲٪)، و کمترین درصد فراوانی مربوط به *S. aureus* (۴/۵٪) بود. علاوه بر این، ۹۳/۲٪ از این باکتری‌ها پاتوژن و ۶/۸٪، فلور نرمال (از جنس*S.epidermidis*) بودند (نمودار ۱).



نمودار ۱- توزیع فراوانی باکتری‌ها در زنان نابارور مبتلا به اندومتریوز

اما در گروه زنان سالم، بیشترین درصد فراوانی مربوط به *L. plantarum* (۴۵٪) و *S. epidermidis* (۳۰٪) و کمترین درصد فراوانی مربوط به *A. baumannii* (۱۰٪) بود. علاوه بر این، ۲۵٪ از باکتری‌ها از گونه پاتوژن و ۷۵٪ از گونه فلور نرمال (از جنس *L. plantarum* و *S. epidermidis*) بودند (نمودار ۲).



نمودار ۲- درصد توزیع فراوانی باکتری‌ها در گروه زنان سالم

بنابراین بر اساس نتایج، از مجموع ۴۶ مورد باکتری پاتوژن، ۴۱ مورد (۸۹/۱٪) در زنان نابارور و ۵ مورد (۱۰/۹٪) در زنان سالم مشاهده شد که تأثیر باکتری‌های پاتوژن بر اندومتریوز و نازایی را ثابت می‌کند. همچنین، از مجموع ۱۸ مورد باکتری فلور نرمال، ۳ مورد (۱۶/۷٪) در زنان نابارور و ۱۵ مورد (۸۳/۳٪) در زنان سالم مشاهده شد که می‌توان احتمال تأثیر باکتری‌های فلور نرمال بر نرخ باروری را در نظر گرفت. بر اساس نتایج آزمون کای دو، بین نوع باکتری‌ها (فلور نرمال و پاتوژن) و گروه‌های مورد مطالعه (زنان سالم و نابارور مبتلا به اندومتریوز) ارتباط معنی‌داری وجود داشت ($p=۰/۰۰۰$). از طرف دیگر بر اساس نتایج جدول ۴، در مطالعه حاضر نسبت ریسک (خطر) وجود باکتری‌های پاتوژن در گروه زنان نابارور مبتلا به اندومتریوز به زنان سالم ۴۱ برابر بود و تفاوت معنی‌داری بین میکروبیوتای زنان سالم و زنان مبتلا به اندومتریوز و نازایی وجود داشت ($p<۰/۰۰۵$).

جدول ۴- برآورد ریسک وجود باکتری‌های پاتوژن در زنان نابارور مبتلا به اندومتریوز و زنان سالم

	مقدار	فاصله اطمینان ۹۵٪	
		حد پایین	حد بالا
ریسک برای زنان نابارور	۳/۷۳	۱/۷۴	۸/۰۰
ریسک برای زنان سالم	۰/۰۹	۰/۰۳	۰/۲۸
نسبت ریسک	۴۱	۸/۷۱	۱۹۲/۹۳

بحث

مطالعه میکروبیوتای آندومتر انسان در سال‌های اخیر که یک دانش رو به رشد است، نقش جمعیت میکروبی در پاتولوژی‌های مختلف رحم را فراهم کرده است و اهمیت یک میکروبیوتای یوبیوتیک در حفظ سلامت باروری را برجسته می‌کند. اندومتریت مزمن می‌تواند با انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها ایجاد شود که ممکن است علائم بالینی کمی داشته باشند و یا فاقد علائم بالینی قابل توجهی باشند. چندین جنس و گونه باکتریایی در بافت آندومتر زنان مبتلا به اندومتریت مزمن شناسایی شده که شامل: *E.coli*، *E.Faecalis*، *Streptococci*، *Gardenella vaginalis*، *Klebsiella pneumonia*، *Proteus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus* و برخی پاتوژن‌های رایج دستگاه تولید مثل مانند : *Mycoplasma* و *Urea lyticum*می‌باشد (۳۱).

طبق مطالعه‌ای (۲۰۱۵) با استفاده از توالی‌یابی ژن 16SrRNA، کشت‌های باکتریایی از نمونه‌های آندومتر در زنان سالم به میزان ۱۰۰٪ شناسایی شد که در این میان *لاکتوباسیل‌ها* و پس از آن *Gardnerella*، *Prevotella*، *Atopobium* و *Sneathia* در واژن به‌صورت غالب یافت شدند (۳۲).

نتایج برخی مطالعات اخیر نشان می‌دهد که آلودگی باکتریایی آندومتر به‌عنوان یک عامل جدید بالقوه در ایجاد اندومتریوز است. این نظریه از مطالعه‌ای ناشی می‌شود که نشان می‌دهد خون قاعدگی و مایع صفاقی در نتیجه ریفلاکس خون قاعدگی به لگن در زنان مبتلا به اندومتریوز به شدت با *E.coli* و سطوح بالاتری از اندوتوکسین‌ها آلوده است. نویسندگان مقاله جنس‌های بیماری‌زا مانند *گاردنرلا*، *انتروکوک*، *استرپتوکوک* و استافیلوکوک را اصلی‌ترین جنس‌های شناسایی شده در نمونه‌های آندومتر از زنانی معرفی نمودند که با اندومتریوز تشخیص داده شدند و پس از آن گونه‌های تاکسونومیک دیگر مانند *Actinomyces*، *Corynebacterium*، *Fusobacterium* و *Prevotellapion* قرار گرفتند. برای مقایسه، عمدتاً لاکتوباسیل‌ها در گروه کنترل یافت شدند (۳۳). همچنین باکتری‌های خانواده‌های *استرپتوکوکاسه* و *استافیلوکوکاسه* در مایع کیستیک به‌دست آمده از زنان مبتلا به اندومتریومای تخمدان در مقایسه با گروه‌های کنترل به‌طور قابل‌توجهی افزایش نشان داده است (۳۴). در این راستا یافته‌های مشابهی با تغییرات قابل توجه در ترکیب میکروبیوم در بیماران مبتلا به آدنومیوز یافت شده است (۳۵). از طرف دیگر، اندومتریوز با سطوح بالاتر سیتوکین پیش‌التهابی IL-6 در مایع فولیکولی (۳۶) وIL-1 مرتبط است که باعث التهاب در صفاق می‌شود (۳۷). در مطالعه‌ای (۲۰۱۴) که بیماران مبتلا به اندومتریوز که قبل از لانه‌گزینی با آنتی‌بیوتیک‌ها درمان شده بودند، نتیجه بارداری بهتری نسبت به بیمارانی داشتند که تحت درمان قرار نگرفته بودند، این امر نشان می‌دهد که تا حدی تأثیر منفی اندومتریوز بر باروری ممکن است با باکتری‌های موجود در رحم مرتبط باشد (۳۸). مطالعات به رابطه بین میکروبیوم و پاسخ ایمنی اشاره کرده‌اند. داده‌های جدید نشان می‌دهند که تغییرات در استروبولوم ناشی از دیس‌بیوز می‌تواند پاتولوژی‌های ناشی از استروژن، از جمله اندومتریوز و همچنین سرطان آندومتر را ایجاد کند (۳۹).

در یافته‌های به‌دست آمده از مطالعه حاضر، در بین زنان گروه کنترل مثبت، باکتری *Pseudomonas aeruginosa* با ۹/۱٪ جداسازی شد. از آنجایی که این باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک است و فاکتورهای تهاجمی

بسیاری دارد، حضورش در جامعه آماری بسیار مهم است. این در حالی است که مطالعه‌ای (۲۰۲۰) بیان کرد زنان دارای ضایعات اندومتریوز عمیق، دارای ترکیبات باکتریایی متفاوتی از جمله باکتری *Pseudomonas* هستند که داده‌های مطالعه حاضر را تأیید می‌نماید (۳۶).

از طرف دیگر در مطالعه حاضر نشان داده شد که میکروبیوتای آندومتر رحم زنان مبتلا به اندومتریوز و نازایی نسبت به گروه زنان سالم متنوع‌تر است. همچنین بیشترین درصد گونه‌های باکتریایی در میکروبیوتای آندومتر بیماران مبتلا به اندومتریوز و نازایی مربوط به باکتری پاتوژن گرم مثبت متعلق به جنس *E. faecalis*(۳۱/۸٪) بود، در حالی که در گروه کنترل منفی، بیشترین درصد به باکتری نرمال فلور گرم مثبت جنس *L. plantarum* (۴۵٪) تعلق داشت. همچنین کمترین درصد باکتری در بین گروه زنان مبتلا به اندومتریوز و نازایی متعلق به جنس *S. aureus* (۴/۵٪) و کمترین درصد باکتری در بین گروه کنترل منفی به باکتری گرم منفی پاتوژن جنس *A. baumannii* (۱۰٪) تعلق داشت. بنابراین درصد نرخ آلودگی آندومتر به باکتری‌های پاتوژن (اندومتریت) در زنان مبتلا به اندومتریوز و نازایی در مقایسه به آندومتر زنان سالم، بیشتر مشاهده شد. اطلاعات به‌دست آمده از میکروبیوتای آندومتر که در این مطالعه بیان شد، می‌تواند یکی از عوامل مستعد کننده ابتلاء به اندومتریوز و نازایی باشد. میکروبیوتای آندومتر که از طریق بیوپسی آندومتر به‌دست آمده بود، در گروه زنان مبتلا به اندومتریوز (تأیید شده توسط سونوگرافی و جراحی) و نازایی با گروه زنان سالم که بین ۳۵-۲۶ سال داشتند، مقایسه گردید و ثابت شد میکروبیوتای آندومتر زنان مبتلا به اندومتریوز و نازایی می‌تواند فاکتور مؤثری در باروری به‌شمار آید، زیرا کاهش گونه‌های *لاکتوباسیلوس* به‌عنوان فلور واژن و افزایش تنوع گونه‌های باکتری‌های بیماری‌زا، با اختلال در عملکرد تولیدمثل مرتبط است. با این‌حال، ایجاد تکنیک‌های روش‌شناختی و تحلیلی قابل تکرار برای به‌دست آوردن یک ترکیب باکتریایی و درک چگونگی ارتباط تغییرات آن با عوامل محیطی و میزبان خاص ضروری است.

نتیجه‌گیری

نتیجه حاصل از طرح مذکور بیانگر آن است کاهش گونه‌های *لاکتوباسیلوس* و افزایش تنوع گونه‌های باکتری‌های بیماری‌زا در رحم زنان مبتلا به اندومتریوز می باشد که احتمالاً این امر می تواند با افزایش استعداد ابتلاء به نازایی مرتبط باشد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمام نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، عدم تحریف داده‌ها، داده‌سازی و عدم انتشار دوگانه را در این مقاله رعایت کرده‌اند. همچنین طرح مذکور ابتدا توسط کمیته اخلاق تحقیق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز با کد IR.IAU.SHIRAZ.REC.1400.018 تأیید و سپس از تمامی شرکت‌کنندگان در طرح قبل از شرکت، ضمن تشریح پروژه رضایت کتبی آگاهانه اخذ گردید و سابقه اولیه مورد ارزیابی قرار گرفت.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از بخش مولکولی آزمایشگاه بیمارستان مسلمین و جناب آقای دکتر علمی بابت همکاری جهت شناسایی سویه‌ها، تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

همه نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافعی در مورد نتایج این مطالعه نداشتند.

حمایت مالی

این پژوهش هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است و برگرفته از رساله دکتری تخصصی دانشجوی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

همه نویسندگان در نگارش اولیه مقاله یا بازنگری آن سهیم بودند و با تأیید نهایی مقاله حاضر، مسئولیت دقت و صحت مطالب مندرج در آن را می‌پذیرند.

منابع

1. Nnoaham KE, Hummelshoj L, Webster P, d'Hooghe T, de Cicco Nardone F, de Cicco Nardone C, et al. Impact of endometriosis on quality of life and work productivity: a multicenter study across ten countries. Fertility and sterility 2011; 96(2):366-73.
2. Simoens S, Dunselman G, Dirksen C, Hummelshoj L, Bokor A, Brandes I, et al. The burden of endometriosis: costs and quality of life of women with endometriosis and treated in referral centres. Human reproduction 2012; 27(5):1292-9.
3. Taylor HS, Lubna Pal, Emre Sell. Speroff's Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 9nd ed. Tehran: Artin teb-andishe rafi; 2020. P.915.
4. Orazov MR, Radzinsky VE, Volkova SV, Khamoshina MB, Mikhaleva LM, Abitova MZ, et al. Chronic endometritis in women with endometriosis-associated infertility. Gynecology 2020; 22(3):15-20.
5. Jess T, Frisch M, Jørgensen KT, Pedersen BV, Nielsen NM. Increased risk of inflammatory bowel disease in women with endometriosis: a nationwide Danish cohort study. Gut 2012; 61(9):1279-83.
6. Missmer SA, Hankinson SE, Spiegelman D, Barbieri RL, Michels KB, Hunter DJ. In utero exposures and the incidence of endometriosis. Fertility and sterility 2004; 82(6):1501-8.
7. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 9nd ed. Tehran: andishe rafi; 2020. P.20-21.
8. Toson B, Simon C, Moreno I. The endometrial microbiome and its impact on human conception. International Journal of Molecular Sciences 2022; 23(1):485.
9. Simon C. Introduction: Do microbes in the female reproductive function matter?. Fertility and sterility 2018; 110(3):325-6.
10. Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine microbiota: residents, tourists, or invaders?. Frontiers in immunology 2018; 9:208.
11. Verstraelen H, Swidsinski A. The biofilm in bacterial vaginosis: implications for epidemiology, diagnosis and treatment. Current opinion in infectious diseases 2013; 26(1):86-9.
12. Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, D'Argenio V. Microbiota and human reproduction: the case of female infertility. High-throughput 2020; 9(2):12.
13. Ulcova-Gallova Z. Immunological and physicochemical properties of cervical ovulatory mucus. Journal of reproductive immunology 2010; 86(2):115-21.
14. Becher N, Hein M, Danielsen CC, Uldbjerg N. Matrix metalloproteinases in the cervical mucus plug in relation to gestational age, plug compartment, and preterm labor. Reproductive Biology and Endocrinology 2010; 8:1-9.
15. Hunt S, Low X, Dunn M, Costa FD, Vollenhoven B, Mol BW, et al. Assessing Peristalsis at the Endometrial–Myometrial Junctional Zone: A Reproducible Ultrasound Technique?. Fertility & Reproduction 2020; 2(03):96-101.
16. Pelzer ES, Willner D, Buttini M, Huygens F. A role for the endometrial microbiome in dysfunctional menstrual bleeding. Antonie Van Leeuwenhoek 2018; 111:933-43.
17. Tatyana B, Emiliana K, Svetlana P, Angel Y. Endometrial Microbiome in Health and Disease-A Brief Review. Ginekologia i Położnictwo medical project 2022; 17(1):1-5.
18. Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology 2007; 21(3):347-54.
19. Lambert JA, John S, Sobel JD, Akins RA. Longitudinal analysis of vaginal microbiome dynamics in women with recurrent bacterial vaginosis: recognition of the conversion process. PloS one 2013; 8(12):e82599.
20. Ralph SG, Rutherford AJ, Wilson J. Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study. Bmj 1999; 319(7204):220-3.
21. Sirota I, Zarek SM, Segars JH. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. InSeminars in reproductive medicine 2014; 32(01): 35-42.
22. Kyono K, Hashimoto T, Nagai Y, Sakuraba Y. Analysis of endometrial microbiota by 16S ribosomal RNA gene sequencing among infertile patients: a single-center pilot study. Reproductive medicine and biology 2018; 17(3):297-306.
23. Salliss ME, Farland LV, Mahnert ND, Herbst-Kralovetz MM. The role of gut and genital microbiota and the estrobolome in endometriosis, infertility and chronic pelvic pain. Human reproduction update 2022; 28(1):92-131.
24. Zhang Z, Li T, Xu L, Wang Q, Li H, Wang X. Extracellular superoxide produced by Enterococcus faecalis reduces endometrial receptivity via inflammatory injury. American Journal of Reproductive Immunology 2021; 86(4):e13453.
25. Huang B, Fettweis JM, Brooks JP, Jefferson KK, Buck GA. The changing landscape of the vaginal microbiome. Clinics in laboratory medicine 2014; 34(4):747-61.
26. Campisciano G, Florian F, D'eustacchio A, Stanković D, Ricci G, De Seta F, et al. Subclinical alteration of the cervical–vaginal microbiome in women with idiopathic infertility. Journal of cellular physiology 2017; 232(7):1681-8.

27. Wessels JM, Domínguez MA, Leyland NA, Agarwal SK, Foster WG. Endometrial microbiota is more diverse in people with endometriosis than symptomatic controls. Scientific Reports 2021; 11(1):18877.
28. Werner A, Suthar V, Plöntzke J, Heuwieser W. Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. Journal of Dairy Science 2012; 95(12):7105-14.
29. Ozgen EK, Cengiz S, Ulucan M, Okumus Z, Kortel A, Erdem H, et al. Isolation and identification of Dichelobacter nodosus and Fusobacterium necrophorum using the polymerase chain reaction method in sheep with footrot. Acta Veterinaria Brno 2015; 84(2):97-104.
30. Microgen TM GnA+B-ID System 2009; [1-17] Available at: URL:http://www.microgenbioproducts.com. Accessed January, 2020.
31. Cicinelli E, De Ziegler D, Nicoletti R, Tinelli R, Saliani N, Resta L, et al. Poor reliability of vaginal and endocervical cultures for evaluating microbiology of endometrial cavity in women with chronic endometritis. Gynecologic and obstetric investigation 2009; 68(2):108-15.
32. Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Lepera A, Alfonso R, Indraccolo U, et al. Prevalence of chronic endometritis in repeated unexplained implantation failure and the IVF success rate after antibiotic therapy. Human reproduction 2015; 30(2):323-30.
33. Khan KN, Fujishita A, Kitajima M, Hiraki K, Nakashima M, Masuzaki H. Intra-uterine microbial colonization and occurrence of endometritis in women with endometriosis. Human reproduction 2014; 29(11):2446-56.
34. Khan KN, Fujishita A, Masumoto H, Muto H, Kitajima M, Masuzaki H, et al. Molecular detection of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2016; 199:69-75.
35. Hernandes C, Silveira P, Rodrigues Sereia AF, Christoff AP, Mendes H, Valter de Oliveira LF, et al. Microbiome profile of deep endometriosis patients: comparison of vaginal fluid, endometrium and lesion. Diagnostics 2020; 10(3):163.
36. Tseng JF, Ryan IP, Milam TD, Murai JT, Schriock ED, Landers DV, et al. Interleukin-6 secretion in vitro is up-regulated in ectopic and eutopic endometrial stromal cells from women with endometriosis. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1996; 81(3):1118-22.
37. Sikora J, Mielczarek-Palacz A, Kondera-Anasz Z. Association of the precursor of interleukin-1β and peritoneal inflammation—role in pathogenesis of endometriosis. Journal of clinical laboratory analysis 2016; 30(6):831-7.
38. Marco Marinaccio MD, Ugo Indraccolo MD, Dominique De Ziegler MD. Chronic Endometritis Due to Common Bacteria is Prevalent in Women with Recurrent Miscarriage as Confirmed by Improved Pregnancy Outcome after Antibiotic Treatment. Reproductive sciences 2014; 21(5):640-7.
39. Ser HL, Au Yong SJ, Shafiee MN, Mokhtar NM, Ali RA. Current updates on the role of microbiome in endometriosis: a narrative review. Microorganisms 2023; 11(2):360.

Correlation between endometriosis, infertility and bacterial population of the uterus of women with endometriosis and infertility

Mehdi Dehdashti[1], Nima Bahador[2*], Tahereh Poordast[3], Maryam Zolghadr[4]

1. Ph.D. student, Department of Microbiology, School of Sciences, Agriculture and New Technologies, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
2. Associate Professor, Department of Microbiology, School of Sciences, Agriculture and New Technologies, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.
3. Associate Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.

Received: May 25, 2024 **Accepted:** Aug 29, 2024

Abstract

Introduction: Endometriosis is a chronic gynecological disease that can lead to infertility. Considering that the uterus is not sterile, the reflux of menstrual blood to the pelvis in these patients may be contaminated with bacteria and bacterial endotoxin, contributing to the development of endometriosis lesions. This study was conducted with aim to investigate the relationship between endometriosis, infertility, and uterine bacteria in women with endometriosis and infertility.

Methods: This case-control study was conducted during summer to autumn of 2021 on the endometrial bacteria of 35 women with endometriosis and infertility, as well as 15 healthy women in Zeinabieh Hospital, Shiraz. Bacterial isolates were identified and analyzed using biochemical and molecular methods. Then, the chi-square test and SPSS (version 21) were utilized to explore the relationship between uterine microbiota and endometriosis and infertility.

Results: The isolates obtained from the uterine endometrium of sick women included *Enterococcus faecalis* (31.8%), *E. coli* (18.2%), *Streptococci pyogenes* (6.8%), *Klebsiella pneumonia* (13.6%), *Klebsiella aerogenes* (9.1%), *Staphylococci aureus* (4.5%), *Pseudomonas aeruginosa* (9.1%), *Staphylococci Epidermidis (6.8%)* and in healthy women were *Lactiplantibacillus plantarum* (45%), *E. coli* (15%), *Acinetobacter baumannii* (10%), and *Staphylococci epidermidis* (30%). According to the results of chi-square test, there was a significant relationship between the type of bacteria (normal flora and pathogenic) and the studied groups ($p<0.05$). Among the bacteria isolated from sick and healthy women, *E. faecalis* (31.8%) and *L. plantarum* (45%) were found to be the dominant genera.

Conclusion: The reduction of *Lactobacillus* species and the increase in the diversity of pathogenic bacteria species in the uterus are associated with an increased susceptibility to endometriosis and infertility.

Keywords: Bacteria, Endometriosis, Infertility

► **Please cite this article as:**
Dehdashti M, Bahador N, Poordast T, Zolghadr M. Correlation between endometriosis, infertility and bacterial population of the uterus of women with endometriosis and infertility. **Iran J Obstet Gynecol Infertil** 2024; 27(6):18-30.
DOI: 10.22038/ijogi.2024.75347.5879