

## بررسی ارتباط فلور میکروبی سرویکس در هنگام انتقال رویان با پیامد IVF

دکتر عزیزه قاسمی نژاد\* - دکتر نرگس ایزدی مود\* - دکتر پیمان پورقاسم\*\*

\*استادیار گروه زنان، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\*متخصص زنان و زایمان

تاریخ دریافت مقاله: ۸۲/۱۰/۱۷

تاریخ پذیرش: ۸۳/۳/۱۹

### چکیده

مقدمه: قرار دادن رویان در رحم، مهم ترین رویدادی است که میزان موفقیت IVF را محدود می نماید. وجود میکروارگانیسم های پاتوژن در سرویکس می تواند منجر به آلودگی امبریو در هنگام انتقال رویان گردد. هدف: به منظور تعیین رابطه فلور میکروبی سرویکس در هنگام انتقال رویان با پیامد IVF، مطالعه ای طولی بر روی خانم های نازای مراجعه کننده به بخش IVF بیمارستان میرزا کوچک خان طی سالهای ۸۰-۱۳۷۹ صورت گرفت. مواد و روش ها: تعداد ۱۰۰ خانم واجد شرایط به طور متوالی وارد مطالعه شدند. پس از انجام مراحل IVF و بعد از انتقال رویان، ۲ سانی متری انتهای کاترهای که برای انجام انتقال بکار رفته بود، بریده شد و داخل لوله های حاوی محلول فیزیولوژیک قرار داده شد و در دو نوع محیط (آگار شکلاتی و آگار خونی ۵٪) کشت داده شد و در شرایط هوازی-بی هوازی بمدت ۲۲-۴۸ ساعت انکوبه گردید. نتایج: نتیجه کشت در ۵۳ بیمار مثبت بود که E Coli شایع ترین جرم بود. مجموعاً میزان حاملگی کلینیکی ۱۰٪ (۱۰ مورد) بود. این میزان در بیماران با کشت منفی بطور معنی دار بیشتر از بیماران با کشت مثبت بود (۱۴/۹٪ در برابر ۵/۷٪ و  $p=۰/۰۳$ ). میزان حاملگی در حال پیشرفت در دو گروه به ترتیب ۱۰/۶٪ و ۳/۸٪ بود ( $p=۰/۰۱۵$ ). بیماران کشت مثبت و کشت منفی از نظر میانگین سن، مقدار HMG مصرفی، سطح استرادیول و FSH و مقدار امبریوهای منتقل شده با یکدیگر اختلاف معنی دار نداشتند. میانگین مدت نازایی در دو گروه بطور معنی دار متفاوت بود،  $۸/۹ \pm ۳/۸$  در گروه کشت منفی و  $۷/۱ \pm ۴/۴$  سال در گروه کشت مثبت ( $p=۰/۰۳$ ). نتیجه گیری: آلودگی سرویکس به میکروارگانیسم های پاتوژن در هنگام انتقال رویان با کاهش میزان موفقیت IVF همراه است.

**کلید واژه ها:** انتقال جنین اولیه به مادر/ بارورسازی آزمایشگاهی/ فلور میکروبی/ گردن رحم

### مقدمه

انجمن IVF آمریکا، میزان حاملگی بالینی در IVF را ۱۹/۱۱٪ و میزان زایمان را ۱۵/۳٪ گزارش کرده است (۲). اخیراً مشاهده شده که وجود کلامیدیا در اندوسرویکس زنانی که تحت IVF قرار گرفته اند شانس حاملگی را کاهش داده شده است (۳). علاوه بر این، میکروارگانیسم های پاتوژنیک دیگر در سرویکس، می توانند در هنگام انتقال رویان آن را آلوده کرده و باعث ناباروری شوند. براساس گزارش های موجود درصد موفقیت IVF در بیماران دارای کشت مثبت سرویکس، در هنگام انتقال رویان ناچیز است (۴ و ۷).

باروری آزمایشگاهی (IVF) نقش مهمی در درمان نازایی دارد. قرار دادن رویان در داخل رحم مهم ترین رویدادی است که میزان موفقیت IVF را محدود می کند، به نحوی که حتی در صورت مناسب بودن مورفولوژی رویان از نظر بافت شناسی، هیستوشیمی و مشخصات خوب اندومتر، باز هم شانس حاملگی در IVF ناچیز است (حدود ۱۹٪). این امر نشانگر آن است که باید عوامل دیگری در میزان جایگزینی جنین در رحم موثر باشد. یکی از این عوامل انتقال صحیح جنین به داخل رحم و آلوده نشدن جنین به فلور میکروبی سرویکس است (۱).

Egbase و همکاران، در مطالعه خود میزان حاملگی بالینی را در بیماران دارای کشت مثبت سرویکس در هنگام انتقال رویان ۲۹/۶٪ و در گروه کشت منفی ۵۷/۱٪ گزارش کردند (۵).  
در یک مطالعه آینده‌نگر در فرانسه، ارتباط بین فلور میکروبی سرویکس در هنگام انتقال رویان و پیامد IVF بررسی شد. ۵۱٪ موارد دارای کشت مثبت بودند و در ۶۴٪ آنها E.Coli ارگانسیم شایع بود. حاملگی در حال پیشرفت به ترتیب در ۱۷٪ و ۲۸٪ ( $p < 0.04$ ) موارد مشاهده شد (۶).  
با توجه به اهمیت روند IVF در درمان نازایی، شناخت عوامل مربوط به میزان موفقیت آن ضروری می‌نماید. یکی از عوامل مرتبط با پیامد IVF، فلور میکروبی سرویکس در هنگام انتقال رویان است. بنابراین در یک مطالعه آینده‌نگر، فلور میکروبی سرویکس در هنگام انتقال رویان در بیماران داوطلب انجام IVF در بیمارستان میرزا کوچک‌خان بررسی شدند و ارتباط آن با میزان موفقیت IVF سنجیده شد.

### مواد و روش‌ها

نوع مطالعه طولی (longitudinal) و با ماهیت آینده‌نگر بود. جامعه مورد مطالعه خانم‌های نازای مراجعه کننده به بخش IVF بیمارستان میرزا کوچک‌خان طی سال‌های ۸۰-۱۳۷۹ بودند.

معیارهای ورود به مطالعه شامل: لزوم انجام IVF، طبیعی بودن شکل رحم (تایید شده بوسیله اولتراسون یا هیستروسکوپی و یا هیستروسالپینگوگرافی) و ایجاد حداقل ۲ امبریو با کیفیت خوب (دارای شکل و اندازه‌های یکسان بلاستومر و اووپلاسم بدون گرانولاریتی) بود.

معیارهای خروج از مطالعه شامل وجود شواهدی دال بر سرویسیت، واژینیت و آلودگی میکروبی در کشت منی در مدت حداقل دو ماه قبل از IVF بود.

بر اساس بررسی‌های گذشته، شیوع کشت مثبت سرویکس در هنگام انتقال رویان ۵۰٪ در نظر گرفته شد. حجم نمونه با احتساب  $a=0.05$  و دقت ۱۰٪ حدود ۱۰۰ نفر برآورد شد. نمونه‌گیری از جمعیت در دسترس به طور متوالی

تا تکمیل حجم نمونه انجام شد. بیماران پس از معاینه واژینال و رد شدن سرویسیت، واژینیت و عفونت‌های لگنی، وارد پروتکل (controlled COH hyperstimulation) شده و پس از گذراندن مرحله‌های مختلف آن، فولیکولهای  $\leq 12$  میلی‌متر با راهنمایی سونوگرافی واژینال، مکیده (Aspiration) می‌شد. اسپرم‌ها با روش‌های مخصوص آزمایشگاهی، آماده شده و آمیزش تخمک و اسپرم در محیط آزمایشگاه انجام می‌شد. دو روز بعد، رویان با کاتتر مخصوص ترانس سرویکال انتقال داده می‌شد. برای آماده کردن سرویکس محلول‌های آنتی‌سپتیک استفاده نمی‌شد و ترشحات واژینال با سواب‌های مخصوص برداشته می‌شد. نمونه‌گیری از سرویکس با همان کاترهایی انجام می‌شد که برای انتقال رویان بکار می‌رفت و از هر گونه تماس کاتتر با دیواره واژن و آگرو سرویکس اجتناب می‌شد. ۲ سانتی‌متر انتهائی این کاترها بعد از انتقال رویان بریده شده، داخل لوله‌های محتوی سرم فیزیولوژیک انداخته می‌شد. سپس در دو محیط (آگار شکلاتی و آگار خون ۵٪) کشت داده و در  $CO_2$  ۵٪ و دمای  $37^{\circ}C$  در شرایط هوایی و بی‌هوایی به مدت ۷۲-۴۸ ساعت نگهداری می‌شد (incubation).

بر اساس نتیجه کشت، بیماران به دو گروه کشت مثبت و کشت منفی تقسیم شدند. پیامد مورد نظر در این مطالعه ایجاد حاملگی بالینی و حاملگی در حال پیشرفت (ongoing pregnancy) بود. منظور از حاملگی بالینی مشاهده ساک حاملگی همراه با ضربان قلب جنین در سونوگرافی و منظور از حاملگی در حال پیشرفت آمنوره به مدت ۱۲ هفته بود.

داده‌ها با آزمون‌های آماری  $t$ -test,  $\chi^2$  در سطح معنی‌داری  $a=0.05$  تجزیه و تحلیل شد.

### نتایج

میانگین سن ۱۰۰ بیمار مورد مطالعه  $29.5 \pm 4.4$  و میانگین مدت نازایی آنها  $1 \pm 8$  سال بود. شایع‌ترین علت نازایی، عامل (Factor) مردانه (۵۱٪)، سپس

میکروبی بودند. میانگین سن در گروه کشت مثبت و کشت منفی به ترتیب  $29 \pm 4/5$  و  $29/9 \pm 4/3$  سال و بدون اختلاف معنی دار آماری بود.

میانگین مدت نازایی در گروه کشت مثبت به طور معنی دار کمتر از گروه کشت منفی بود ( $7/1 \pm 4/4$  در برابر  $8/9 \pm 3/8$  سال و  $p=0/03$ ).

دو گروه از نظر میانگین HMG مصرفی، سطح استرادیول، FSH و تعداد امبریوهای منتقل شده با یکدیگر اختلاف معنی دار آماری نداشتند (جدول ۱).

فاکتور لوله (۲۵٪) و فاکتور تخمک گذاری (۸٪) بود. علت ۱۲٪ موارد نامشخص (unexplained) و در ۴٪، ترکیبی از این عوامل دخالت داشت.

در ۱۰٪ (مورد ۱۰) حاملگی بالینی اتفاق افتاد. نتیجه کشت سرویکس در ۵۳ مورد مثبت و در ۴۷ مورد منفی بود.

فلور میکروبی به ترتیب شیوع عبارت بود از E.Coli (۵۸/۸٪)، انتروباکتر (۹/۵٪) و استرپتوکوک (۳/۹٪). ۵/۹٪ میکروب های بی هوایی و ۲۱/۹٪ نیز سایر جرم های

جدول ۱: مقایسه موارد کشت مثبت و کشت منفی سرویکس هنگام انتقال رویان در بیماران کانید IVF در بیمارستان میرزا کوچک خان طی

سالهای ۸۰-۱۳۷۹

سطح معنی داری	نتیجه کشت		متغیرها
	کشت منفی n=47	کشت مثبت n=53	
N.S**	$29/9 \pm 4/3$	$29 \pm 4/5$	سن (سال)
P.V.=0/03	$8/9 \pm 3/8$	$7/1 \pm 4/4$	طول مدت نازایی (سال)
N.S	$36/3 \pm 17/8$	$34 \pm 17/9$	سطح استرادیول
N.S	$8/8 \pm 4/7$	$7/3 \pm 3/7$	سطح FSH
N.S	$32/6 \pm 12/8$	$29/3 \pm 9/3$	تعداد آمپول HMG مصرفی
N.S	$2/9 \pm 1/1$	$2/9 \pm 1/1$	تعداد امبریو منتقل شده
p=0/03	7 (14/9)	3 (5/7)	حاملگی کلینیکی
p=0/015	5 (10/6)	2 (3/8)	حاملگی در حال پیشرفت

ارقام بصورت انحراف معیار  $\pm$  میانگین و یا (%) فراوانی آورده شده است. \* براساس آزمون t-test و یا  $X^2$  non significant \*\*

در گروه کشت منفی ۱ از ۷ مورد بود. فراوانی دوقلویی در دو گروه به ترتیب ۱ و ۲ مورد بود.

### بحث و نتیجه گیری

۱۰۰ زن نازای داوطلب IVF از نظر ارتباط بین فلور میکروبی سرویکس در هنگام انتقال رویان و پیامد حاملگی بررسی شدند.

۵۳٪ بیماران از نظر کشت سرویکس مثبت بودند. موارد کشت مثبت و کشت منفی از نظر میانگین سنی، HMG مصرفی، میزان استرادیول، FSH، تعداد امبریوهای منتقل شده و علت نازایی تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. از نظر میانگین مدت نازایی، بین دو گروه اختلاف معنی دار

شایع ترین علت نازایی در هر دو گروه فاکتور مردانه (۵۸/۵٪) در گروه کشت مثبت و ۴۲/۶٪ در گروه کشت منفی) و سپس فاکتور لوله ای (به ترتیب ۲۴/۵٪ و ۲۵/۵٪) بود. دو گروه از نظر علت نازایی با یکدیگر تفاوت معنی دار آماری نداشتند.

حاملگی بالینی در ۵/۷٪ (۳ مورد) گروه کشت مثبت و ۱۴/۹٪ (۷ مورد) گروه کشت منفی به وجود آمد. این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود ( $p=0/03$ ).

میزان حاملگی در حال پیشرفت در دو گروه به ترتیب ۳/۸٪ (۲ مورد) و ۱۰/۶٪ (۵ مورد) بود ( $p=0/015$ ).

فراوانی سقط جنین در گروه کشت مثبت ۱ از ۳ مورد و

گروه کشت منفی ۵۷/۱٪ گزارش کرده‌اند (۵).  
Fanchin و همکاران، میزان حاملگی بالینی را در موارد کشت مثبت ۲۴٪ و در موارد کشت منفی ۳۷٪ و میزان حاملگی در حال پیشرفت را به ترتیب ۱۷٪ و ۲۸٪ ذکر کرده‌اند (۶) ( $p < 0.05$ ).

در مطالعه ما شایع‌ترین جرم مسئول در موارد کشت مثبت، E.Coli (۵۸/۸٪) بود. در مطالعه Fanchin و همکاران نیز، E.Coli در ۶۴٪ موارد شایع‌ترین جرمی بود که یافت شده (۶).

در مطالعه ما از ۳ حاملگی ایجاد شده در گروه کشت مثبت، یک مورد (۳۳/۳٪) حاملگی دوقلو بود و یک مورد (۳۳/۳٪) هم به سقط انجامید. از ۷ مورد حاملگی در گروه کشت منفی، دو مورد (۲۸/۶٪) دوقلو بود و یک مورد (۳/۱۴٪) سقط شد. البته به دلیل تعداد کم این موارد، انجام آزمون آماری جایگاهی نداشت.

جمع‌بندی: در این مطالعه نشان داده شد که نتایج درمانی IVF می‌تواند مرتبط با آلودگی سرویکس به جرم‌های بیماری‌زا، در هنگام انتقال رویان، باشد و در صورت مثبت بودن کشت سرویکس، میزان موفقیت حاملگی بالینی و حاملگی در حال پیشرفت کاهش می‌یابد.

بود و این مدت در گروه کشت مثبت کوتاه‌تر بوده است. فراوانی موارد کشت مثبت در مطالعه ما، مشابه دیگر بررسی‌ها بدست آمد. این رقم در مطالعه Egbase و همکاران ۴۹/۱٪ و در مطالعه Fanchin و همکاران، ۵۱٪ گزارش شد (۵-۶).

میزان حاملگی بالینی در مطالعه ما ۱۰٪ و میزان حاملگی در حال پیشرفت ۷٪ حاصل شد که نسبت به دیگر بررسی‌ها پایین‌تر است. به طوری که میزان موفقیت IVF را ۱۹/۱٪ (حاملگی بالینی) و میزان زایمان را ۱۵/۳٪ ذکر کرده‌اند (۲).

ما در مطالعه خود ارتباط معنی‌داری بین فلور میکروبی سرویکس و میزان موفقیت IVF پیدا کردیم: میزان موفقیت در گروه کشت مثبت نسبت به گروه کشت منفی پایین‌تر بود.

میزان حاملگی بالینی و در حال پیشرفت به ترتیب در ۵/۷٪ و ۳/۸٪ گروه کشت مثبت و در ۱۴/۹٪ و ۱۰/۶٪ گروه کشت منفی دیده شد.

این یافته‌ها مشابه نتایج بررسی‌های دیگران است. از جمله Egbase و همکاران که در مطالعه بر ۱۱۰ مورد IVF، میزان حاملگی بالینی را در گروه کشت مثبت ۲۹/۶٪ و در

## منابع

1. Egbase PE, Udo EE, Al-Shrham M. Prophylactic Antibiotics and Endocervical Microbial Inoculation of the Endometrium at ET. *Lancet* 1999; 354(917): 651-2.
2. Machel M, Seibel. *Infertility a Comprehensive Text*. Second Edition.
3. Witkin SS, Sut KM, Nal GS et al. Unsuspected Chlamydia Trachomatis Infection and IVF Result. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171; 1208-14.
4. Awonuga A, Nalam A, Govindbhae, et al. Contamination of Embryonic Transfer Catheter and Treatment Outcome in IVF. *J Assist Reprod Genet* 1998; 15(4): 198-201.
5. Egbase PE, Al-Sharham M, Al-Othmans, et al. Incidents of Microbial Growth from the Tip of the Embryo Transfer Catheter after Embryonic Transfer in Relation to Clinical Pregnancy Rate Following IVF-ET. *Human Reproduction* 1996; 11; 1687-9.
6. Renato Fanchin, Amar Harms, Farida Benaoudia, MD, et al. Microbial Flora of the Cervix Assessed at the Time of Embryo Transfer Aversely Affects In Vitro Fertilization Outcome. *Fertilization* 1998; 70; 5.
7. Watt B, Geldacne MJ, Laudon N, et al. Prevalence of Bacteria in the Vagina of Normal Young Women. *BRJ Obs and Gynecol* 1981; 88; 588-95.

## Survey of Relationship Between The Microbial Flora of Cervix at Time of Embryo Transfer and Invitro Fertilization (IVF) Outcomes

Ghasemi nezhad A.(MD), Izadi Mood N.(MD), Pour Ghasem P.(MD)

### Abstract

**Introduction:** The embryo transfer to uterus is the most important process with can limit the success rate in IVF. The existence of pathogenic microorganisms in cervix may lead to infection of embryo at the time of transfer.

**Objective:** In order to determine the relationship between microbial flora of cervix at time of embryo transfer and IVF outcome a longitudinal study was conducted on infertile women in IVF center of Mirza Koochak-Khan hospital in the years of 1379-80.

**Materials and Methods:** Thereby 100 eligible women were entered study consecutively. They underwent IVF treatment. After transferring the embryo, 2 cm of the end of using catheters were cut and put in the tubes of physiology solution, then either cultured in chocolate agar or blood agar 5% containers. And were incubated for 48-72 hours in aerobic-anaerobic conditions.

**Results:** The culture results were positive in 53 patients. The most frequent pathogen was E.Coli.

The overall clinical pregnancy rate was 10% (10 cases). This rate was significantly more in patients with negative culture than positive cultures (14.9% versus 5.7%  $P=0.03$ ) and the ongoing pregnancy rate was 10.6% and 3.8% respectively ( $p=0.015$ ).

The patients with positive and negative culture were not significantly different about the mean of: age, HMG consumption, serum estradiol, FSH measures and the number of embryo transferred. The mean of infertility period was different significantly,  $8.9\pm 3.8$  in negative and  $7.1\pm 4.4$  year in positive culture patients ( $p=0.03$ ).

**Conclusion:** The contamination of cervix with pathogenic microorganisms at time of embryo transfer is associated with decrease success rate of IVF treatment.

**Key words:** Cervix/ Embryo Transfer/ Fertilization in Vitro/ Microbial Flora