

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Scienze Ostetriche e Ginecologiche

Ciclo XXI

Ruolo degli anticorpi anti-*Helicobacter pylori*  
nell'infertilità di coppia

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Giovanni Battista Nardelli

Tutor:

Chiar.mo Prof. Alberto Bacchi Modena

Dottorando: Dott.ssa Alessandra Schiavo



## RIASSUNTO

**Presupposti dello studio.** I disordini riproduttivi riguardano approssimativamente il 15-20% delle coppie occidentali e nel 15-30% dei casi si tratta di sterilità idiopatica. Tra le cause di infertilità le infezioni stanno acquisendo un ruolo sempre più importante se si considera che il progetto di concepire un figlio viene spesso procrastinato nel tempo e che la fecondità migliora una volta risolta la causa infettiva. Inoltre, l'infertilità può essere dovuta ad un danneggiamento degli spermatozoi o ad una loro ridotta motilità, situazioni entrambi imputabili a processi infettivi in atto. Recentemente è stata avanzata l'ipotesi di una correlazione tra *Helicobacter pylori* e sterilità di coppia. Tale batterio è importante causa di patologie gastroduodenali (gastrite cronica, ulcera peptica, cancro gastrico, linfoma MALT) ma è stata ipotizzata una sua implicazione anche in malattie extradigestive, disordini autoimmunitari (per cross-reattività degli anticorpi anti-*Helicobacter pylori* con cellule epiteliali dell'ospite) e forme di sterilità di coppia, avendo l'infezione da *Helicobacter pylori* delle ripercussioni sistemiche.

Figura N et al. avevano riscontrato la presenza di IgG anti-*H. pylori* in campioni di liquido follicolare e nelle secrezioni vaginali di donne infertili, oltre che nel loro siero, ed avevano dimostrato l'esistenza di un'omologia strutturale tra la zona equatoriale dello spermatozoo e tre proteine del batterio. In pratica gli anticorpi anti-*H. pylori* cross-reagiscono con il flagello degli spermatozoi.

Il muco cervicale non è stato finora preso in considerazione dai suddetti studi ma è lecito supporre che anticorpi anti-*H. pylori*

contenuti al suo interno potrebbero alterare la penetrazione dei gameti maschili in cavità uterina.

**Scopo dello studio.** Considerato l'importante ruolo svolto dal muco cervicale nel processo riproduttivo per la sua interazione con gli spermatozoi, il nostro studio aveva come obiettivi: valutare la presenza di anticorpi anti-*Helicobacter pylori* nel siero e nel muco cervicale di donne con sterilità idiopatica, studiare l'eventuale corrispondenza tra i due parametri e verificare la possibile relazione tra infezione femminile e disordine riproduttivo. In particolare, sulla base della già nota cross-reattività tra i suddetti anticorpi ed i gameti maschili, abbiamo indagato l'ipotesi che i primi interferiscano negativamente su penetrazione, diffusione e motilità degli spermatozoi posti nel muco cervicale positivo per gli anticorpi anti-*H. pylori*.

**Materiali e metodi.** Sono state reclutate 73 pazienti con diagnosi di sterilità idiopatica di coppia, afferite al Centro di Procreazione Medicalmente Assistita del Dipartimento di Scienze Ginecologiche e della Riproduzione Umana dell'Università degli Studi di Padova. In un giorno scelto durante il periodo di picco ovulatorio (come da direttive WHO) a tutte le pazienti sono stati prelevati un campione di siero ed uno di muco cervicale. I sieri sono stati ottenuti mediante centrifugazione, i muchi mediante aspirazione con catetere da MK (catetere per il Test di Kurzrok e Miller). Tutti i campioni sono stati congelati a -20°C e successivamente analizzati, in un'unica sessione, mediante *Inova Quanta Lite Helicobacter pylori IgG kit* per determinare la concentrazione di IgG anti-*H. pylori* presenti. Per la prova di compatibilità muco cervicale - liquido seminale, 15 campioni di muco francamente positivi per i suddetti anticorpi (casi) e 15 di

muco negativo (controlli) sono stati incubati, su diversi vetrini, con un campione di liquido seminale normospermico. Le interazioni muco - liquido seminale sono state valutate a fresco mediante lo *Slide Test* o *Test di Kurzrok e Miller* per verificare penetrazione, diffusione e mobilità degli spermatozoi dopo 15, 60 e 120 minuti.

**Risultati.** Per quanto concerne la ricerca di anticorpi anti-*Helicobacter pylori*, lo studio ha rivelato una significativa correlazione positiva ( $r=0,8126$ ;  $p<0,0001$ ) tra il titolo anticorpale sierico (30% delle pazienti) e la concentrazione delle IgG nel muco cervicale (34%). La prova di compatibilità muco cervicale - liquido seminale ha mostrato una diminuita se non assente motilità degli spermatozoi, con ridotta penetrazione ed alterata diffusione degli stessi all'interno di tutti i 15 campioni di muco positivi per gli anticorpi anti-*H. pylori*.

**Conclusioni.** Anche se saranno necessari ulteriori studi, è plausibile pensare che l'infezione da *Helicobacter pylori*, ed in particolare la presenza di IgG anti-*H. pylori* nel muco cervicale, sia associata a disordini riproduttivi e considerata pertanto tra le cause di sterilità di coppia. Pertanto il dosaggio sierico delle IgG specifiche dovrebbe essere eseguito di *routine* in tutte le coppie infertili così da selezionare le pazienti a cui proporre il test sul muco cervicale.

## SCOPO DELLO STUDIO

Uno studio di Figura N et al.<sup>1</sup> nel 2002 aveva dimostrato che gli anticorpi anti-*Helicobacter pylori* presenti nel siero e nel liquido follicolare di pazienti infertili potevano cross-reagire con antigeni del flagello degli spermatozoi. Tuttavia effettuando una prova crociata incubando anticorpi anti-*H. pylori* sierici ed un liquido seminale negativo e normospermico non si verificava alcuna alterazione della motilità dei gameti maschili. Gli stessi Autori avevano inoltre dimostrato che i livelli sierici dei suddetti anticorpi erano significativamente più alti in pazienti affette da disordini riproduttivi rispetto a controlli sani e che la sieropositività era lievemente più alta nel gruppo di donne affette da sterilità idiopatica che in quelle con cause note d'infertilità. Il riscontro di IgG nei liquidi follicolari di una parte di queste pazienti sieropositive lasciava supporre un problema di fertilizzazione dovuto a quegli stessi anticorpi. A risultati analoghi erano arrivati anche Kurotsuchi S et al. in uno studio del 2007<sup>2</sup>.

Basandoci su questi riscontri e considerando che il muco cervicale è il luogo in cui avviene la capacitazione degli spermatozoi, la nostra ricerca aveva lo scopo principale di indagare la presenza di anticorpi anti-*Helicobacter pylori* nel muco cervicale di donne con diagnosi di infertilità idiopatica e l'eventuale correlazione tra IgG anti-*H. pylori* locali e titolo anticorpale sierico. Inoltre, lo studio si proponeva di valutare se la localizzazione nel muco cervicale delle IgG specifiche fosse associata ad alterazione della vitalità, motilità e capacità di penetrazione degli spermatozoi all'interno del muco stesso.

# **MATERIALI E METODI**

## **1. PAZIENTI**

La coorte considerata nello studio è stata estrapolata dalle coppie afferite al Centro di Procreazione Medicalmente Assistita del Dipartimento di Scienze Ginecologiche e della Riproduzione Umana dell'Università degli Studi di Padova. Per raggiungere la diagnosi della causa dell'infertilità, come da protocollo<sup>3-5</sup> le pazienti sono state sottoposte a dosaggi ormonali volti ad esaminare il ciclo ovulatorio, la funzione tiroidea, la prolattinemia ed i livelli androgenici. La riserva ovarica è stata valutata mediante la misurazione del livello sierico di FSH e la conta dei follicoli antrali, eseguiti entrambi il terzo giorno del ciclo mestruale. Le infezioni, incluse quelle da virus epatitici, HIV, TORCH, Chlamydia Trachomatis e Mycoplasma, sono state investigate tramite le sierologie e i tamponi vaginali. Inoltre le pazienti sono state sottoposte ad uno screening genetico completo comprendente l'analisi del cariotipo, lo screening per le mutazioni di CTFR e lo studio dei polimorfismi associati a trombofilia. Infine con l'isterosalpingografia è stata testata la pervietà delle tube di Falloppio.

Sono state prese in considerazione 73 donne con diagnosi di sterilità idiopatica, formulata in base ai criteri WHO<sup>6</sup>. Tutte le pazienti sono state valutate con dettagliata anamnesi ed esame obiettivo e sono state sottoposte al Test di Papanicolaou e ad un completo esame microbiologico vaginale con il fine di escludere possibili infezioni e stati infiammatori in atto. Tutte le pazienti risultavano negative al test sierico per gli anticorpi anti-spermatozoo. Nessuna di queste pazienti era stata sottoposta a terapia con inibitori di pompa protonica, amoxicillina o metronidazolo nel mese precedente allo studio. Solo 10

di esse erano state trattate con amoxicillina e inibitori di pompa oltre un mese prima.

Nessuno dei partners maschili presentava IgG anti-*Helicobacter pylori* sieriche né anticorpi antispermatozoo. Il liquido seminale risultava normale in termini di conta spermatica, motilità, vitalità e morfologia in accordo con le linee guida della WHO<sup>7</sup>.

Lo studio prevedeva due fasi:

- 1- La prima fase coinvolgeva 73 pazienti con diagnosi di sterilità idiopatica, alle quali sono stati prelevati campioni di siero e muco cervicale al fine di dosare gli anticorpi IgG anti-*H. pylori*.
- 2- Successivamente venivano considerate 15 tra le pazienti risultate francamente positive agli anticorpi anti-*H. pylori* sia nel siero che nel muco e per valutare l'interazione a fresco tra il muco cervicale ed il liquido seminale, confrontando il campione con un gruppo di controllo composto da 15 donne sane.

## **2. CAMPIONI DI SIERO E MUCO**

Sono stati prelevati 73 campioni di siero e muco cervicale da altrettante pazienti con sterilità idiopatica. I due prelievi di sangue e muco sono stati eseguiti nello stesso giorno, durante il periodo ovulatorio individuato mediante opportuni dosaggi ormonali ematici (LH, 17βestradiolo, progesterone) e monitoraggi ecografici.

Il siero è stato ottenuto mediante centrifugazione a 2200 g (corrispondenti a 4000 ripetizioni per minuto) per 4 minuti (centrifuga Beckman Model TJ-6) e successivamente congelato a -20°C.

Il muco cervicale è stato prelevato tramite aspirazione con il catetere solitamente usato per eseguire il *Test di Kurzrok e Miller* (MK): dopo detersione dell'orifizio esterno del canale cervicale, per impedire la



contaminazione del campione, lo strumento è stato inserito all'interno dell'endocervice ove è stato aspirato il materiale, secondo le direttive WHO. Il muco così ottenuto è stato lasciato nel catetere e congelato a -20°C. L'adequatezza del prelievo è stata valutata mediante lo *score di Insler*<sup>7</sup> che prende in considerazione la quantità del muco, la filanza, la dilatazione del collo uterino e il fern-test (cristallizzazione del muco osservata al microscopio). Ad ognuno di questi parametri viene assegnato un punteggio da 0 a 3, la cui somma determina lo score (Tabella I). Il muco è stato giudicato di buona qualità per score superiori o uguali a 10 (il massimo è 12), di qualità scadente per score inferiori a 6.

Il pH del muco non compare nel calcolo del punteggio ma è un importante fattore nell'interazione tra liquido seminale e muco cervicale. Infatti, gli spermatozoi sono molto sensibili alle variazioni di pH: un muco acido (pH < 6) li immobilizza mentre uno alcalino (pH 7 – 8,5) può esaltarne la mobilità.

**Tabella I. Score di Insler per la valutazione del muco cervicale.**

| PARAMETRO            | PUNTEGGIO |         |                     |                      |
|----------------------|-----------|---------|---------------------|----------------------|
|                      | 0         | 1       | 2                   | 3                    |
| <i>Quantità</i>      | Nulla     | Scarsa  | Discreta            | Abbondante           |
| <i>Filanza</i>       | Nulla     | Debole  | Moderata            | Pronunciata          |
| <i>Fern-test</i>     | Nulla     | Lineare | Parziale            | Completa             |
| <i>Collo uterino</i> | Chiuso    | /       | Parzialmente aperto | Completamente aperto |

Il congelamento a -20°C ha permesso di conservare il muco ed il siero fino al momento del dosaggio degli anticorpi anti-*H. pylori*, che è stato eseguito in un'unica sessione in una fase successiva.

### **3. DOSAGGIO DELLE IgG ANTI-HELICOBACTER PYLORI NEL SIERO E NEL MUCO**

Sia per il siero che per il muco è stato utilizzato *Inova Quanta Lite . Helicobacter pylori IgG kit*, un test ELISA sensibile e specifico che permette la ricerca semiquantitativa di anticorpi IgG anti-*H. pylori* nel siero umano. Il razionale di questa metodica consta nella reazione immunitaria sistemica scatenata dall'infezione da *Helicobacter pylori* e nella persistenza delle specifiche immunoglobuline IgG anche a distanza di anni.

La stessa tecnica è stata adattata, in via sperimentale, per il dosaggio degli anticorpi anti-*H. pylori* nel muco cervicale.

#### Modalità di funzionamento del test:

L'antigene purificato per l'*Helicobacter Pylori* IgG è stato fatto adsorbire sulle pareti dei pozzetti di una piastra microtiter in polistirene, in condizioni che hanno permesso la conservazione dell'antigene nel suo stato nativo. Il kit ha fornito i controlli ELISA debolmente e fortemente positivi per *Helicobacter pylori* IgG ed il controllo negativo; 100 µL di questi controlli pre-diluiti ed i sieri diluiti delle nostre pazienti (diluizione 1:100 ottenuta aggiungendo a 5 µL di siero 500 µL di diluente per campioni) sono stati distribuiti nei rispettivi pozzetti, consentendo agli anticorpi anti-*Helicobacter pylori* IgG eventualmente presenti di legarsi all'antigene adsorbito alle pareti. Dopo un'incubazione di trenta minuti l'eccesso di campione non legato è stato allontanato tramite tre lavaggi con soluzione HRP (contenente soluzione fisiologica tamponata). L'aggiunta a ciascun pozzetto di 100 µL di coniugato di anticorpi anti-IgG umane, marcati con un enzima, è stata seguita da un'ulteriore incubazione di trenta minuti che ha

consentito a questi ultimi anticorpi marcati di essere catturati da quelli della paziente, precedentemente legatisi alla parete dei pozzetti. Al fine di allontanare l'eccesso di anticorpi anti-IgG umane marcati con l'enzima, è stato fatto un ulteriore lavaggio. L'attività dell'enzima rimasto è stata misurata aggiungendo un substrato cromogeno TMB, lasciandolo in incubazione per trenta minuti al buio e, dopo aver utilizzato una soluzione di arresto costituita da acido solforico, misurando l'intensità di colore sviluppata. L'assorbanza è stata letta tramite uno spettrofotometro a 450 nm ed è stata interpretata confrontando l'intensità di colore nei pozzetti del campione con quella dei pozzetti di controllo. Il valore di reattività del campione, espresso in unità (collegato in modo non lineare alla quantità di anticorpi presenti) è stato calcolato dividendo il valore medio di assorbanza del campione per il valore medio di assorbanza del controllo ELISA debolmente positivo per *Helicobacter pylori* IgG e moltiplicando il risultato per il numero di unità assegnate al controllo stesso, fornito dal kit.

Lo stesso procedimento è stato applicato ai campioni di muco cervicale dopo averli resi pipettabili mediante l'aggiunta di diluente dato in dotazione con il kit ed usando il supernatante ottenuto mediante diluizione, omogeneizzazione e centrifugazione del muco stesso. Tuttavia, mentre in riferimento al siero abbiamo a disposizione delle curve R.O.C. per la stima dell'accuratezza diagnostica (e questo ci consente la validazione del valore soglia del metodo) non ci sono dati in letteratura su questa metodica applicata al muco. Pertanto i risultati ottenuti sono stati standardizzati rispetto alle proteine dosate nel muco.

### Interpretazione:

Il kit stesso forniva i valori per l'interpretazione del risultato del dosaggio degli anticorpi nel siero. Noi abbiamo quindi considerato il

test:           Positivo   per concentrazione di IgG  $\geq 25$  Unità/ml

                 Dubbio     $20,1 < \text{concentrazione IgG} < 24,9$  Unità/ml

                 Negativo per concentrazione di IgG  $< 20$  Unità/ml

Questi valori però non sono più validi quando si va ad applicare tale metodica al muco cervicale poiché l'utilizzo di *Quanta Lite* per la valutazione del muco è in forma sperimentale, non esistendo ancora una metodica valida e comprovata. Non ci sono dati in letteratura a riguardo.

Il problema nella valutazione del muco cervicale è che esso presenta densità e filanza diverse da campione a campione, impedendo il confronto tra i dosaggi anticorpali in diversi campioni. I risultati ottenuti sono stati standardizzati rispetto all'ammontare totale delle proteine presenti nel campione di muco al fine di renderli confrontabili. La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante la metodica descritta da Bradford<sup>8</sup> usando l'albumina sierica bovina come standard.

La curva di riferimento per riuscire a dosare il titolo delle IgG anti-*H. pylori* è stata ottenuta a partire da un campione di muco negativo.

## **4. ANALISI STATISTICA**

Mediante un'analisi lineare di regressione e il calcolo del coefficiente di correlazione di Pearson ( $r$ ) sono state confrontate le concentrazioni delle IgG anti-*H. pylori* relative al siero con quelle misurate nel muco. Lo scopo era di indagare la presenza di una correlazione tra i livelli di anticorpi nei due mezzi. La significatività statistica di  $r$  è stata

determinata tramite un t-test ed è stato considerato statisticamente significativo un valore di  $p < 0,05$ .

## **5. PROVA DI COMPATIBILITA' TRA MUCO CERVICALE E LIQUIDO SEMINALE**

Una volta indagata la presenza o meno degli anticorpi anti-*Helicobacter pylori* nel siero e nel muco cervicale delle pazienti, il passo successivo è stato di analizzare l'interazione tra un muco positivo ed un liquido seminale negativo. Il nostro scopo era di verificare se la presenza di IgG anti-*H. pylori* nel muco influenzasse in qualche modo la dispersione, la progressione o la motilità degli spermatozoi fatti penetrare in esso. Il metodo utilizzato è stato lo *Slide Test* o *Test di Kurzrok e Miller*.

Sono state arruolate 30 coppie costituite da 15 casi e 15 controlli. I casi furono scelti tra quelli che erano risultati francamente positivi per la presenza di IgG anti-*H. pylori* nel muco della donna; i 15 controlli furono reclutati perché in essi non erano stati rilevati anticorpi nel muco cervicale. Il seme del partner usato per l'esecuzione del test era risultato normale in termini di: volume, numero di spermatozoi, motilità, vitalità e morfologia dei gameti, in accordo con le linee guida della WHO<sup>7</sup>.

### Esecuzione dello *Slide Test*:

L'esame è stato effettuato a fresco, cioè con materiale non precedentemente congelato.

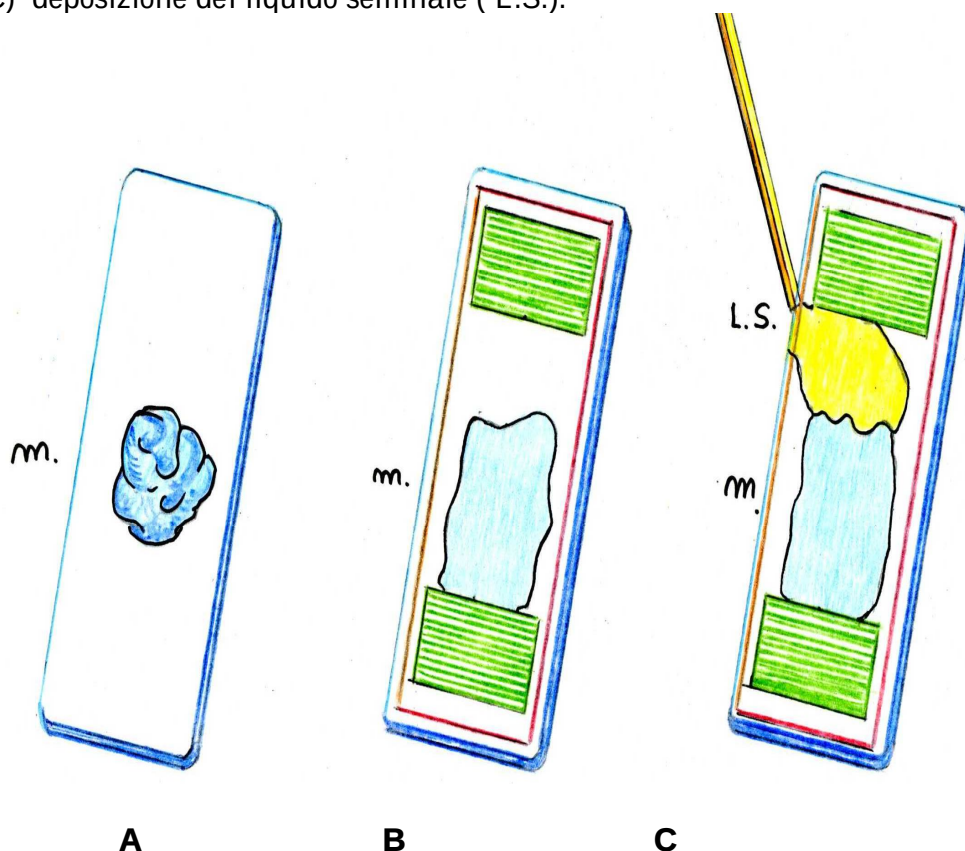
I campioni di muco cervicale sono stati prelevati mediante catetere da *MK* durante i giorni di picco ovulatorio. I campioni di liquido seminale sono stati prelevati dal partner di ogni paziente qualche minuto dopo il campione di muco, avendo rispettato l'intervallo di tre-cinque giorni di

astinenza da rapporti sessuali, e sono stati lasciati a liquefare per 20 minuti alla temperatura di 37°C.

*Allestimento del vetrino:* abbiamo depositato una goccia di muco cervicale al centro di un vetrino portaoggetti, ai due lati del quale erano stati montati due coprioggetto da 22x22 mm così da standardizzare lo spessore del campione di muco da esaminare; il tutto è stato coperto con un coprioggetto da 24x50 mm. Lateralmente, in un angolo del vetrino, è stata depositata una goccia di liquido seminale che, per capillarità, si è diffusa creando un'interfaccia con il muco (Figura 1). Dopo incubazione a 37°C in camera umida, si è effettuata la lettura con microscopio a contrasto di fase a 20X e a 40X dopo 15, 60 e 120 minuti.

**Fig 1. Allestimento del vetrino.**

- A) goccia di muco cervicale (m.) al centro del vetrino.
- B) applicazione degli spessori e del coprioggetto da 24x50 mm.
- C) deposizione del liquido seminale ( L.S.).



*Valutazione:* per definire la capacità di penetrazione degli spermatozoi nella secrezione cervicale sono stati identificati due campi microscopici:

- Campo 1 (F1): interfaccia muco cervicale - liquido seminale,
- Campo 2 (F2): adiacente a F1, all'interno del muco.

Altri campi potevano essere esaminati procedendo verso la parte interna del muco cervicale, per studiare la profondità di penetrazione.

*Giudizio dell'esame:* risultato (Tabella II)

- NORMALE: gli spermatozoi penetrano nel muco e più del 90% è mobile con progressione rapida;
- SCARSO: gli spermatozoi penetrano nel muco ma la maggior parte non progredisce oltre i 500 µm dall'interfaccia muco-liquido seminale;
- ANORMALE I: gli spermatozoi penetrano nel muco ma diventano rapidamente immobili o mostrano il tipico movimento rotatorio su se stessi.
- ANORMALE II: gli spermatozoi non penetrano nel muco e formano un agglomerato lungo l'interfaccia muco-liquido seminale.

**Tabella II Slide Test: giudizio**

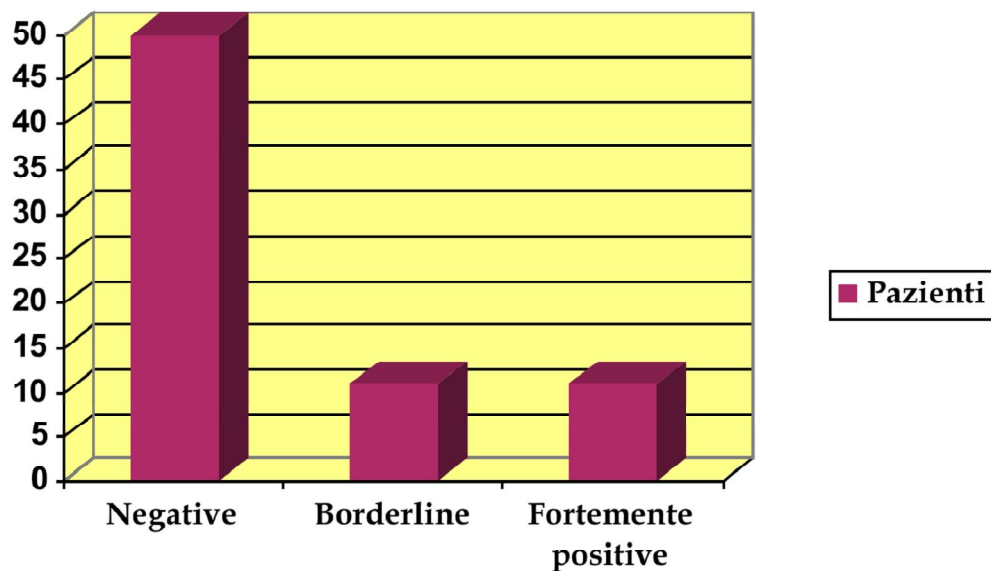
| <i>SLIDE TEST</i>    |                                                               |
|----------------------|---------------------------------------------------------------|
| <i>Eccellente</i>    | $\geq 25$ spermatozoi/campo 1 e $\geq 25$ spermatozoi/campo 2 |
| <i>Buono</i>         | 15 spermatozoi/campo 1 e 15 spermatozoi/campo 2               |
| <i>Insufficiente</i> | $< 5$ spermatozoi/campo 1 e 0-1 spermatozoi/campo 2           |
| <i>Negativo</i>      | nessuno spermatozoo/campo 1 e nessuno spermatozoo/campo 2     |

## RISULTATI

### 1. PRIMA FASE DELLA STUDIO: RICERCA DI ANTICORPI ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* NEL SIERO E NEL MUOCO CERVICALE

Dei 73 prelievi di siero determinati mediante l'utilizzo del *Quanta Lite Helicobacter pylori IgG kit*, secondo i range di riferimento forniti dal kit stesso, 51 campioni (il 70% dei casi) sono risultati negativi per la ricerca degli anticorpi anti-*H. pylori* ( $\text{IgG} < 20 \text{ U/ml}$ ), 11 (il 15%) borderline (ovvero ritenuti dubbi dalla metodica) e 11 (il 15% dei casi) positivi ( $\text{IgG} > 25 \text{ U/ml}$ ) come mostrato in Figura 2.

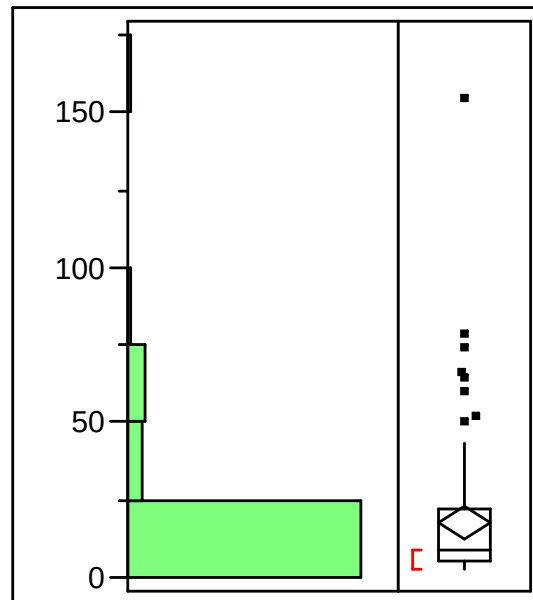
**Fig 2. Risultati della ricerca di anticorpi anti-*H. pylori* nel siero**



E' stata calcolata la media (17,58 U/ml) dei valori ottenuti e gli intervalli di confidenza (il 95% dei dosaggi era compreso tra 11,96 e 23,20 U/ml), ottenendo una distribuzione come in Figura 3.



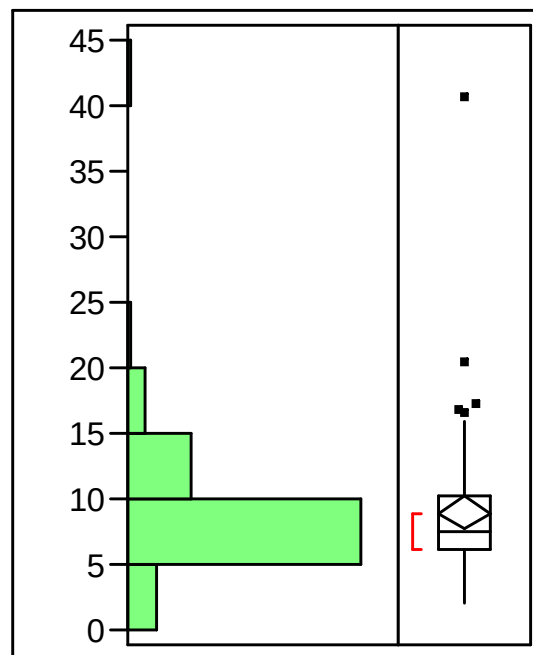
**Fig 3. Distribuzione dei valori di anticorpi anti-*H. pylori* nel siero. Asse x = numero di campioni; asse y = dosaggio di anticorpi in Unità.**



L'*Inova Quanta Lite Helicobacter pylori IgG kit* è stato finora utilizzato solo per la ricerca di anticorpi anti-*H. pylori* nel siero. Non esistendo ancora una metodica valida e comprovata per il muco cervicale, nel nostro studio si è fatto uso dello stesso *kit* anche per la valutazione dei campioni di muco. Pertanto, l'osservazione dei risultati relativi al muco non si è potuta basare sulle indicazioni di positività fornite dal *kit* perché facenti riferimento esclusivamente al siero. Se in quest'ultimo infatti, grazie alle sue favorevoli caratteristiche fisiche, il titolo anticorpale è facilmente dosabile, lo stesso non può purtroppo essere detto riguardo al muco cervicale: esso presenta densità e filanza diverse da campione a campione e ciò rende ingannevole il raffronto tra i vari dosaggi di anticorpi. Per questa ragione si è cercato di rendere confrontabili i risultati dosando le proteine totali presenti in ogni campione di muco cervicale. I valori grezzi ottenuti inizialmente con la metodica *Quanta Lite* sono poi stati normalizzati per la

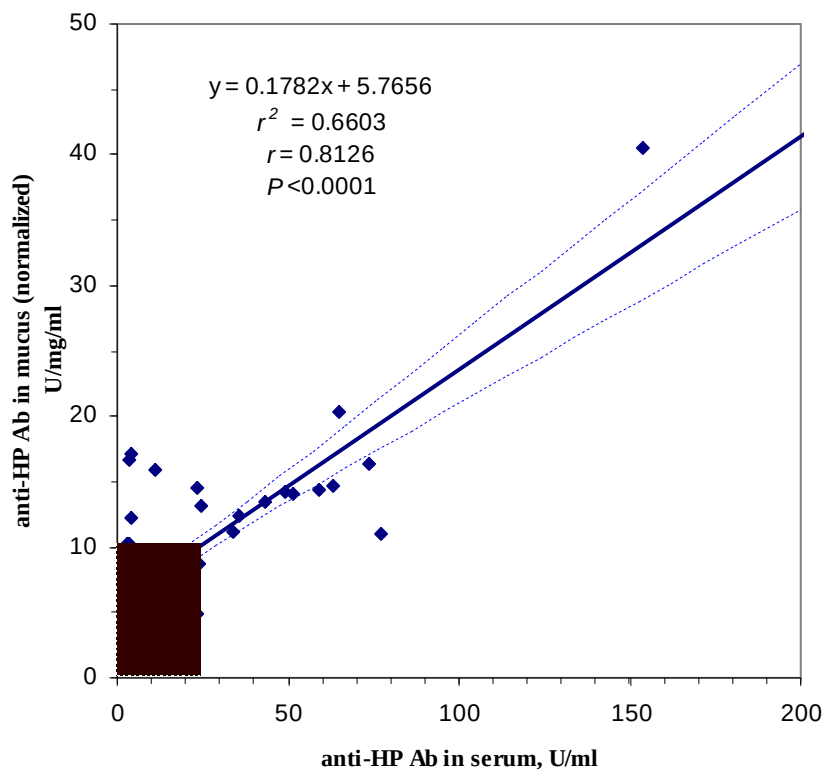
concentrazione proteica all'interno del muco ed espressi in Unità su milligrammo/ml. Di questi parametri è stato poi determinato il valore medio (IgG = 8,90 U su mg di proteine/ml). L'intervallo di confidenza al 95% va da 7,66 a 10,13 U su mg/ml, ottenendo la distribuzione mostrata in Figura 4.

**Fig 4. Distribuzione dei valori di anticorpi anti-*H. pylori* nel muco normalizzati per le proteine. Asse x = numero di campioni; asse y = anticorpi normalizzati nel muco, espressi in U su mg/ml.**



Una volta ottenuti tutti i dati è stato possibile confrontare i parametri relativi ai campioni di siero con quelli riguardanti il muco cervicale, utilizzando un'analisi statistica lineare di regressione e calcolando il coefficiente di correlazione di Pearson. Si evidenzia una significativa correlazione positiva ( $r=0,8126$ ;  $p<0,0001$ ) tra la concentrazione degli anticorpi anti-*H. pylori* nel siero e quella delle IgG nel muco cervicale (Figura 5).

**Fig 5. Correlazione tra i livelli di anticorpi anti-*H. pylori* nel siero e quelli nel muco cervicale normalizzati per le proteine.** Sono indicate la linea di regressione (linea centrale) e gli intervalli di confidenza al 95% (linee tratteggiate). L'area colorata nel grafico mostra il normale intervallo di anticorpi anti-*H. pylori* nel siero.



Vista la stretta corrispondenza tra i due tipi di campione, utilizzando il grafico di Figura 5 abbiamo anche determinato dei plausibili *range* di positività per i valori di anticorpi anti-*Helicobacter pylori* nel muco cervicale. Secondo la retta di regressione, infatti, al valore 20 U/ml di anticorpi nel siero corrisponde un dosaggio di 8,14 U su mg/ml nel muco, ed al valore di 25 U/ml sieriche corrispondono 10,28 U su mg/ml nel muco cervicale.

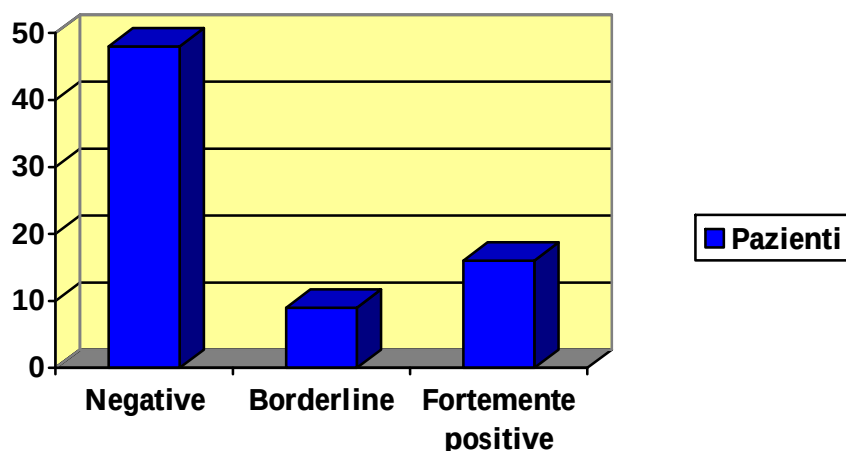
Riteniamo quindi che un valore normalizzato di anticorpi superiore a 8,14 U su mg/ml nel muco cervicale possa ritenersi indicativo di una positività, soprattutto se correlato ad una positività del siero. Pertanto,

gli intervalli di positività da noi considerati per il muco sono stati i seguenti:

|            |                        |
|------------|------------------------|
| Negativo   | 0,00 – 8,14 U su mg/ml |
| Borderline | 8,14-10,28 U su mg/ml  |
| Positivo   | ≥ 10,28 U su mg/ml     |

Di conseguenza, delle 73 pazienti prese in esame: 48 (il 66%) sono risultate negative, 9 pazienti (il 13%) si sono rivelate borderline per la ricerca di anticorpi anti-*Helicobacter pylori* nel muco cervicale, mentre 16 (il 21%) sono risultate fortemente positive (Figura 6).

**Fig 6. Risultati della ricerca di anticorpi anti-*Helicobacter pylori* nel muco cervicale.**



Se si confrontano le percentuali di positività nel siero e nel muco cervicale, includendo nella categoria dei dati positivi anche i risultati borderline, si nota ancora una volta come tra siero e muco ci sia una forte corrispondenza: si rilevava la presenza di anticorpi anti-*Helicobacter pylori* nel 30% dei sieri e nel 34% dei muchi.

Alcune pazienti sono risultate positive per gli anticorpi nel muco ma negative per gli stessi nel siero; riteniamo che la discordanza possa

essere attribuita a vari fattori, da chiarire e migliorare in futuro. Tra questi annoveriamo l'estrema variabilità qualitativa del muco cervicale da soggetto a soggetto, l'utilizzazione di una metodica finora mai testata né standardizzata per campioni di muco cervicale, la possibile contaminazione del muco con tracce di sangue proveniente dal canale cervicale (riccamente capillarizzato, soprattutto in fase ovulatoria) e, non ultimo, la scarsa numerosità del nostro campione.

## **2. SECONDA FASE DELLO STUDIO: PROVA DI COMPATIBILITA' MUCO CERVICALE - LIQUIDO SEMINALE**

*Slide Test o Test di Kurzrok e Miller:* l'osservazione al microscopio dell'interazione tra muco cervicale e liquido seminale nei 30 vetrini presi in considerazione ha fornito i seguenti esiti:

- Dopo 15 minuti: a livello dell'interfaccia tra muco e liquido seminale in tutti i casi si era verificata la migrazione della maggior parte degli spermatozoi nel muco ed erano visibili, a livello del campo 1, proiezioni digitiformi, dette falangi, costituite da colonne di gameti maschili mobili e orientati, penetranti il muco cervicale. Come normalmente accade anche in vivo, la maggior parte delle cellule gametiche maschili s'immetteva nel canale falangeo prima di entrare definitivamente nel muco cervicale. Osservando a 40X si notava che spesso era un singolo spermatozoo a condurre un'intera colonna di gameti all'interno del muco. La differenza tra le due situazioni era nel numero di queste formazioni: nei campioni positivi per gli anticorpi anti-*Helicobacter pylori* si era formata 1 sola falange (Figura 7) mentre nei controlli se ne erano formate 3 o più (Figura 8). Non c'è alcuna correlazione statisticamente significativa tra il numero di falangi e il titolo anticorpale nel muco.

- Dopo 60 minuti: una volta all'interno del muco cervicale, gli spermatozoi si disperdevano e si muovevano casualmente. Alcuni tornavano verso il liquido seminale mentre la maggior parte si approfondiva nel muco. Anche a quest'osservazione vi erano delle differenze quantitative. Nei controlli la maggior parte degli spermatozoi si trovava nel campo 2 e progrediva verso campi più interni (Figura 9). Invece nei campioni positivi per IgG la diffusione dei gameti maschili sembrava essere difficoltosa: questi penetravano più lentamente e meno profondamente nel muco; la maggior parte degli spermatozoi era localizzata in prossimità dell'interfaccia liquido seminale-muco e presentava un andamento circolare o casuale, non orientato (Figura 10).
- Dopo 120 minuti: al termine dell'osservazione la differenza tra le due situazioni è risultata ancora più evidente. Nel campione di controllo si è verificato ciò che dovrebbe accadere normalmente in vivo, ossia gli spermatozoi erano completamente diffusi in tutto il campione di muco cervicale, tanto da essere visibili anche al margine estremo opposto del vetrino, e presentavano una buona motilità (Figura 11). Nei casi positivi per gli anticorpi anti-*H. pylori* invece, il numero di spermatozoi presenti nel muco diminuiva progressivamente andando dall'interfaccia verso l'estremo opposto del vetrino, ove risultavano totalmente assenti. Inoltre gli spermatozoi che precedentemente erano penetrati nella secrezione cervicale (Campo 2) presentavano una motilità notevolmente ridotta se non assente (Figura 12).

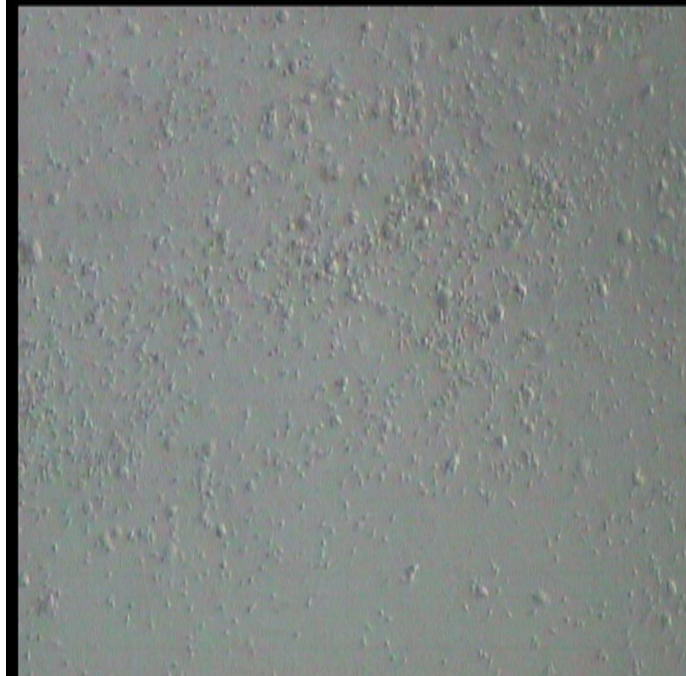
**Fig 7. Campione positivo: unica falange formatasi dopo 15'.**



**Fig 8. Campione negativo: una di tre falangi formatesi dopo 15'.**



**Fig 9. Campione negativo: controllo diffusione a 60'.**



**Fig 10. Campione positivo: controllo diffusione a 60'.**

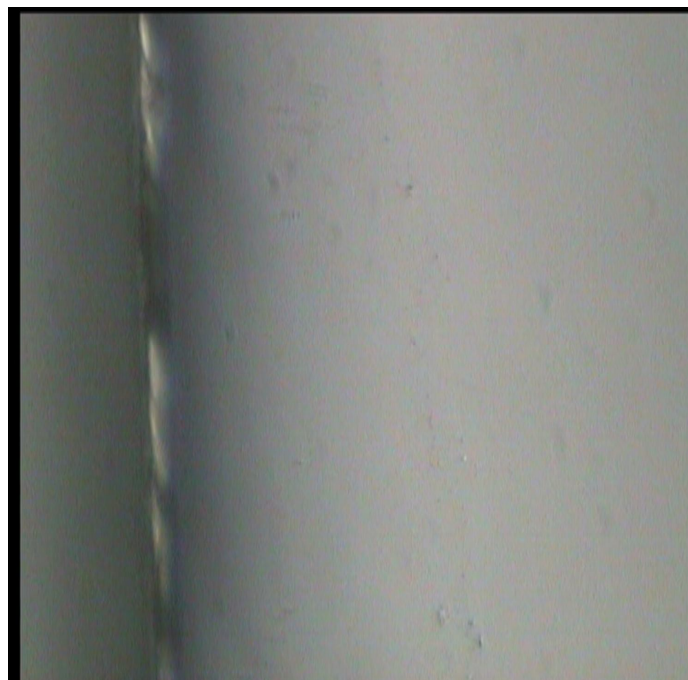




**Fig 11. Campione negativo: a 120' diffusione completa.**



**Fig 12. Campione positivo: a 120' diffusione incompleta.**



## DISCUSSIONE

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima la presenza di circa 80 milioni di coppie sterili nel mondo. Nei paesi industrializzati la prevalenza delle coppie sterili è passata dal 6-7% degli anni '60 al 15-20% attuale<sup>9</sup> e tale percentuale è destinata ad aumentare ulteriormente per motivazioni lavorative, ambientali, socio-economiche, culturali ed anche biologiche.

Nell'ambito dell'infertilità distinguiamo le forme maschili (attribuibili ad un terzo dei casi), quelle di origine femminile (altro terzo) e quelle dette combinate in quanto coinvolgono entrambi i partners della coppia (15% dei casi). Il rimanente 15% è rappresentato dalla sterilità idiopatica<sup>4</sup> ove, nonostante approfondite indagini, la causa rimane indeterminata. Nel tentativo di soddisfare il desiderio di conoscenza della coppia, molti Autori hanno avanzato nuove ipotesi e svolto numerosi studi, alla ricerca di valide spiegazioni scientifiche. Con questo spirito è nato anche il nostro lavoro.

Fra le cause d'infertilità femminile indeterminata, le infezioni dell'apparato genitale suscitano particolare interesse poiché sono un fattore causale spesso misconosciuto; inoltre, in molti casi l'eradicazione dell'agente patogeno può portare ad un significativo miglioramento della fecondità<sup>10-11</sup>. Negli ultimi decenni le infezioni hanno acquisito sempre più importanza in Occidente: lo sviluppo socio-economico, che porta a posticipare il concepimento del primo figlio, determina un incremento della prevalenza di sterilità di origine infettiva, dato che all'aumentare dell'età il rischio cumulativo di infezioni del tratto genitale aumenta. Infezioni batteriche da *Chlamydia Trachomatis* ed *Ureaplasma Urealyticum* possono causare

salpingiti, aderenze pelviche, fibrosi intraluminale tubarica o infiammazione cronica cervico-vaginale con leucocitosi asintomatica<sup>12</sup>. Risultati riportati in letteratura<sup>13-16</sup> attestano che il trattamento antibiotico della leucocitosi porterebbe ad un aumento della fertilità anche del 60%. Altre forme di sterilità derivano dal danno diretto degli spermatozoi con riduzione della loro motilità e capacità fecondante, come avviene in caso di Herpesvirus Hominis, Papillomavirus, Virus dell'epatite B, HIV-1, Candida Albicans e Chlamydia Trachomatis<sup>17-18</sup>. Inoltre anche infezioni sistemiche croniche possono incrementare il rischio di disordini della fertilità<sup>10-11</sup>.

La sterilità può anche essere ricondotta alla presenza di anticorpi anti-spermatozoo nell'uomo o nella donna (sterilità immunologica)<sup>19-20</sup>. Si è visto che le immunoglobuline, perlopiù IgG, possono causare l'immobilizzazione degli spermatozoi, impedire la penetrazione dei gameti nel muco cervicale od ostacolare l'interazione ovocita-spermatozoo<sup>21-23</sup>. A seconda dell'antigene coinvolto questi anticorpi possono non avere alcun effetto sul processo riproduttivo<sup>24</sup> oppure causare ipofertilità o sterilità: infatti, è stato dimostrato che gli antigeni contro cui possono essere diretti gli anticorpi sono molteplici<sup>25</sup>. Pertanto, la presenza di anticorpi anti-spermatozoo nel siero non è necessariamente indicativa di una forma immunologica di sterilità. Nella donna questo è anche legato al fatto che non c'è una stretta correlazione tra il titolo anticorpale ematico e il titolo presente nelle secrezioni cervicali o vaginali<sup>26</sup> e se tali IgG non sono presenti nel muco cervicale non possono interagire con gli spermatozoi. Per una corretta diagnosi sono importanti i tests di compatibilità muco cervicale - liquido seminale, come lo *Slide test* o il *Post Coital Test*.

Secondo le nostre migliori conoscenze la possibile associazione tra *Helicobacter pylori* e disordini riproduttivi è stata finora solo marginalmente investigata. Il batterio in questione è una delle principali cause di gastrite cronica e, attraverso meccanismi patogenetici ormai noti, può contribuire allo sviluppo di ulcera peptica, carcinoma gastrico e linfomi non-Hodgkin. È stato inoltre dimostrato il suo coinvolgimento in patologie extradigestive<sup>27</sup> (come la porpora trombotica trombocitopenica e l'orticaria cronica) e soprattutto in disordini autoimmunitari<sup>28-29</sup>: è infatti in grado di scatenare, mediante mimetismo molecolare, una reazione autoimmune contro le cellule epiteliali<sup>30</sup> presenti a livello intestinale, dei tubuli renali, dei dotti delle ghiandole salivari e dei follicoli tiroidei.

Anche le sue modalità di trasmissione sono tuttora in discussione: se da sempre è noto e comprovato il contagio per via oro-fecale, *Helicobacter pylori* è stato da poco ritrovato anche all'interno della cavità orale, nella saliva<sup>31</sup>, nella placca dentale<sup>32</sup> e nelle unghie<sup>33</sup>, lasciando supporre l'esistenza di altre possibili sedi di colonizzazione. Singh<sup>34</sup>, Schutze<sup>35</sup> e Perez-Perez<sup>36</sup> hanno dimostrato che all'interno delle coppie in cui uno dei due partners è infetto, l'individuo sano ha una maggiore probabilità di contrarre l'infezione da *Helicobacter pylori*, ma hanno escluso (o considerato valida solo in parte) la possibilità di una trasmissione sessuale del batterio. Eslick<sup>37</sup> ha invece ipotizzato la vagina come potenziale serbatoio d'infezione, mentre Yildirim et al.<sup>38</sup> in uno studio molto recente non sono riusciti ad individuare *Helicobacter pylori* nella cervice uterina di pazienti con cervicite.

Sulla base di queste osservazioni, il nostro studio ha voluto verificare l'esistenza di una possibile correlazione tra infezione da *Helicobacter pylori*

e sviluppo di infertilità. Recentemente, infatti, si è ipotizzato che il batterio possa avere delle ripercussioni sull'intero organismo: l'infezione permanente aumenta gli indici sistemici d'infiammazione e stimola la produzione di radicali liberi e mediatori cellulari (primi tra tutti IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ )<sup>39</sup> che vanno ad agire a distanza rispetto alla primitiva sede di infezione. Tutti questi agenti hanno la potenzialità di danneggiare gli spermatozoi e ridurre la capacità di fusione con l'ovocita ed esercitano un effetto luteolitico.

Figura et al.<sup>1</sup> nel 2002 hanno ottenuto in materia dei risultati interessanti, pienamente confermati cinque anni più tardi da Kurotsuchi<sup>2</sup>: il loro studio ha mostrato (1) che la prevalenza di infezione da *Helicobacter pylori* era significativamente maggiore nei pazienti sterili piuttosto che nei controlli; (2) che il liquido follicolare dei soggetti sieropositivi conteneva anticorpi anti-*Helicobacter pylori* in tutti i casi, i campioni di liquido seminale nel 50% dei casi e le secrezioni vaginali in una minoranza di casi; (3) che vi era una lineare omologia tra la  $\beta$ -tubulina degli spermatozoi (uniche cellule umane flagellate) e tre proteine del batterio (flagellina, VacA e CagA). Quest'ultimo punto ha indotto a ipotizzare lo sviluppo di anticorpi cross-reattivi che interferiscano con i gameti maschili, prevenendo la fecondazione dell'ovocita. In realtà il gruppo di ricercatori aveva effettuato anche una prova crociata tra anticorpi sierici ed un liquido seminale negativo e normospermico, senza però mostrare alcuna riduzione della motilità degli spermatozoi.

Utilizzando tutte queste considerazioni come presupposti abbiamo analizzato un campione di muco cervicale ed uno di siero per ciascuna delle 73 pazienti, con diagnosi di sterilità idiopatica, prese in esame.

Utilizzando un *kit* ELISA per il dosaggio degli anticorpi IgG anti-*Helicobacter pylori* ed analizzando statisticamente i risultati, abbiamo trovato una significativa correlazione positiva tra i valori nel siero e quelli nel muco ( $r=0,8126$ ;  $p<0,0001$ ). Trattandosi di IgG e non di IgA (tipiche delle secrezioni mucose), i nostri ritrovamenti sono compatibili con l'ipotesi che gli anticorpi in questione possano raggiungere il muco cervicale tramite passaggio dalla circolazione sanguigna. La cervice uterina, infatti, è una struttura riccamente vascolarizzata e durante il periodo ovulatorio i suoi capillari si dilatano tanto da andare facilmente incontro a piccole rotture.

Un altro considerevole risultato del nostro studio è stato il ritrovamento di un'azione diretta esercitata dagli anticorpi anti-*Helicobacter pylori* all'interno del muco cervicale e consistente nel bloccare la motilità e la penetrazione degli spermatozoi. Abbiamo infatti effettuato una prova di interazione muco – liquido seminale normospermico, comparando le due situazioni: muco positivo per anticorpi specifici / muco negativo. Osservando al microscopio dopo 15, 60 e 120 minuti, si è visto come dispersione, diffusione e motilità degli spermatozoi all'interno del muco cervicale positivo risultavano ampiamente ridotte. Attribuiamo l'accaduto all'esistenza di una cross-reattività degli anticorpi anti-*Helicobacter pylori* che, a causa delle già discusse analogie strutturali tra il batterio e gli spermatozoi, vanno ad agire anche contro le cellule gametiche maschili alterandone le proprietà.

Nello studio di Figura et al.<sup>1</sup> l'incubazione di un liquido seminale normale non inficiava la motilità degli spermatozoi attraverso il muco di una donna con positività sierica mentre nella nostra indagine gli spermatozoi

venivano bloccati dal muco patologico. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta alla presenza nel muco cervicale contenente anticorpi di qualche sostanza immunologica o infiammatoria correlata con l'infezione che rende gli spermatozoi più vulnerabili. Durante il passaggio di questi ultimi attraverso il canale cervicale, gli agenti flogistici potrebbero agire in maniera sinergica con gli anticorpi anti-*Helicobacter pylori*, determinando non solo il blocco fisico di alcune zone pericentriolari e della coda degli spermatozoi umani ma anche l'alterazione della loro motilità in vivo. Tutto ciò è compatibile con il quadro di normalità osservato invece sui campioni di muco negativo, dove i gameti maschili si diffondono in maniera completa.

## CONCLUSIONI

Il nostro studio ha evidenziato come la presenza di anticorpi anti-*Helicobacter pylori* all'interno del muco cervicale possa essere considerata una nuova causa di sterilità femminile, fino ad ora indeterminata. Il meccanismo ipotizzato consiste nel blocco della dispersione, progressione e motilità degli spermatozoi all'interno del canale cervicale ed è ritenuto quindi oltrepassabile mediante tecniche di inseminazione intrauterina dopo capacitazione in vitro. Considerando la stretta correlazione tra i livelli di anticorpi nel siero e nel muco cervicale, riteniamo che il dosaggio delle IgG anti-*Helicobacter pylori* nel siero dovrebbe essere un'indagine da introdurre nella routine di studio per tutte le pazienti infertili: in caso di riscontro positivo, si potrebbe poi eseguire un *Post-coital Test* o un *Test di Kurzrok e Miller*.

In presenza di questa causa di sterilità l'esecuzione di un'inseminazione intrauterina dopo capacitazione *in vitro* degli spermatozoi potrebbe rivelarsi la soluzione migliore per ottenere una gravidanza, come si è verificato in due delle pazienti che hanno partecipato allo studio.



## BIBLIOGRAFIA

1. Figura N, Piomboni P, Ponzetto A, Gambera L, Lenzi C, Vaira D, Peris C, Lotano MR, Gennari L, Bianciardi L, Renieri T, Valensis PE, Capitani S, Moretti E, Colapinto R, Baccetti B, Gennai C. *Helicobacter pylori* infection and infertility. Eur J Gastroenterol Hepatol 2002;14:663-669.
2. Kurotsuchi S, Ando H, Iwase A, Ishida Y, Hamajima N, Kikkawa F. The plausibility of *Helicobacter pylori*-related infertility in Japan. Fertil Steril 2007;78:1-3.
3. Quaas A, Dokras A. Diagnosis and treatment of unexplained infertility. Rev Obstet Gynecol 2008;1:69-76.
4. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Effectiveness and treatment for unexplained infertility. Fertil Steril 2006;86(5suppl):S111-S114.
5. Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couplet. Eur J Hum Genet 2002;10:303-312.
6. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, 4<sup>th</sup> Edition, Cambridge 1999; pp 54-59.
7. WHO: Workshop on the investigation of the sub fertile couple. 12th Cogress on Fertility and sterility. Singapore, 1986.
8. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram of protein utilizing the principle of protein-die binding. Anal Biochem 1976;72:248-254.

9. ACOG Committee Opinion n.413. Age-related fertility decline. Obstet Gynecol 2008;112:409-411.
10. McCormack W. Pelvic inflammatory disease. N Engl J Med 1994;330:115.
11. Mahadevan MM, Batres F, Miller MM, Moutos DM. Yeast infection of sperm, oocytes and embryos after intravaginal culture for embryo transfer. Fertil Steril 1996;66:481-483.
12. Kiviat NB, Paavonen JA, Brockway J, Critchlow CW, Brunham RC, Stevens CE et al: Cytologic manifestations of cervical and vaginal infections; epithelial and inflammatory cellular changes. J Am Med Assoc 1985;253:989-996.
13. Evers JLH. Female subfertility. Lancet 2002;360:151-159.
14. Wash RM, Anderson DJ, Hill JA. Asymptomatic cervicovaginal leukocytosis in infertile women. Fertil Steril 1990;54:445-45
15. Matilsky M, Ben-Ami M, Geslevich Y, Eyali V, Shalev E. Cervical leukocytosis and abnormal *post coital test*: a diagnostic and therapeutic approach. Hum Reprod 1993;8:244-246.
16. Ming CO, Chin SS. Implications of asymptomatic endocervical Leukocytosis in infertility. Gynecol Obstet Invest 2000;49:124-126.
17. Hadchouel M, Scotto J, Huret JL, Molinie C, Villa E, Degas F, Brechot C. Presence of HBV DNA in spermatozoa: a possible vertical transmission of HBV via germ line. J Med Virol 1985;16:61-66.
18. Baccetti B, Benedetto A, Burrini AG, Collodei G, Costantino-Ceccarini E, Crisa N et al. HIV-1 particles in spermatozoa of patients with AIDS and their transfer into the oocyte. J Cell Biol 1994;127:903-914.

19. Naz RK, Menge AC. Antisperm antibodies: origin, regulation, and sperm reactivity in human infertility. *Fertil Steril* 1994;61:1001-1013.
20. Naz RK, Butler A. Intrleukins-6 and -8 levels in sera and cervical mucous of fertile, idiopathic infertile, and immunoinfertile women: implication in infertility. *Am J Reprod Immunol* Jun 1996;35(6):534-540.
21. Shibahara H, Shigeta M, Inoue M, Hasegawa A, Koyama K, Alexander NJ, Isojima S. Diversity of the blocking effect of antisperm antibodies on fertilization in human and mouse. *Hum Reprod* 1996;11:2595-2599.
22. Kremer J, Jager S. The significance of antisperm antibodies for sperm-cervical mucus interaction. *Hum Reprod* 1992;7:781-784.
23. Francavilla F, Romano R, Santucci R, Marrone V, Properzi G, Ruvolo G. Interference of antisperm antibodies with the induction of the acrosome reaction by zona pellucida (ZP) and its relationship with the inhibition of ZP binding. *Fertil Steril* 1997;67:1128-1133.
24. Hall JL, Engel D, Naz RK. Significance of antibodies against human sperm FA-1 antigen in immunoinfertility. *Arch Androl* 1994;32:25-30.
25. Bronson R, Cooper G, Rosenfeld D. Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertil Steril* 1984;42:171-183.
26. Stern JE, Dixon PM, Mangianiello PD, Brinck-Johnsen T. Antisperm antibodies in women: variability in antibody levels in serum, mucus, and peritoneal fluid. *Fertil Steril* 1992;58:950-958.

27. Franceschi F, Gasbarrini A, Ponzetto A et al. *Helicobacter pylori* infection and extradigestive disease. Curr Opin Gastroenterol 1998;14 (suppl.1):S65-S69.
28. Siminovitch KA. Intrduction: Role of infection in autoimmune disease. Semin In Immunology 1998;10.
29. Negrini R, Lisato L, Zanella I, Cavazzini L, Giullini S, Villanacci V et al. *Helicobacter pylori* infection induces antibodies cross-reaction with human gastric mucosa. Gastroenterology 1991;101:437-445.
30. Nagashima R, Maeda K, Yuda F, Kudo K, Saitho M, Takahashi T. *Helicobacter pylori* antigen in the glomeruli of patients with membranous Nephropathy. Wirchows Arc 1997;431:235-239.
31. Mapstone NP, Lynch DA, Lewis FA et al. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomach of patients with gastritis using PCR. J Clin Pathol 1993;46:540-543.
32. Banatvala N, Lopez CR, Owen R et al. *Helicobacter pylori* in dental plaque. Lancet 1993;341:380.
33. Dowsett SA, Archila L, Segreto VA et al: *Helicobacter pylori* infection in indigenous families of Central America: serostatus and oral and fingernail carriage. J Clin Microbiol 1999;37:2456-2460.
34. Singh V, Trikha B, Vaiphel k et al. *Helicobacter pylori*: evidence for spouse-to-spouse transmission. J Gastroenterol Hepatol 1999;14:519-522.
35. Schutze K, Hentschhel E, Dragosies B et al. *Helicobacter pylori* re-infection with identical organism: transmission by the parent's spouses. Gut 1995; 36: 831-833.

36. Perez-Perez G, Witkin SS, Decker MD, Blaser MJ. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in couples. J Clinical Microb Mar 1991;29:642-644.
37. Eslick GD. *Helicobacter pylori* infection transmitted sexually via oral-genital contact: a hypothetical model. Sex Transm Infect 2000;76:489-492.
38. Yildirim B, Acikbas I, Sengül M, Akbulut M, Kaleli I, Bagci H. Is *Helicobacter pylori* a pathogenic agent of the cervix uteri? Ginecol Obstet Invest 2006;61:160-163.
39. Hamajima N, Matsuo K, Saito T et al: Interleukin 1 polymorphism, lifestyle factors and Helycobacter pylori infection. Jpn J Cancer Res 2001;92:383-389.