Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 37, No. 4, Oct. – Nov. 2015, Pages: 54-59

Isolation of Lactobacillus Acidophilus and Assessment for Its Antiviral Activity against Herpes Simplex Virus Type II

Mehdi Moazzami Goudarzi[1*], Mohammad Vali Nejhad[2]

[1]Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Microbiology, College of basic science, Jahroum Branch, Islamic Azad University, Jahroum, Iran

Received: 3 Feb , 2014 Accepted: 17 Apr, 2014

Abstract

Background and Objectives: High prevalence of urogenital infections among women and increasing emergence of antibiotic resistance organisms are a challenging element. It is reasonable to consider the probiotics for combating the urogenital infections.

Materials and Methods: In this study, 100 vaginal samples were collected from normal individuals and the presence of *lactobacillus acidophilus* was verified using biochemical and molecular characterization. the antiviral effect of *lactobacillus acidophilus* supernatant as a wild type and lactobacillus acidophilus La-5 supernatant, as a standard strain against herpes simplex virus type II were investigated.

Results: The supernatant *of Lactibacillus acidophilus* culture significantly reduced plaque formation by herpes simplex virus II. The same results were obtained for standard strain. The inhibitory effects of each two supernatants were independent of H_20_2 or H^+ secretion by candidate lactobacilli.

Conclusion: *lactobacillus acidophilus* is able to inhibit plaque formation by herpes simplex type II, independent from H_2O_2 and H^+ production and it is related to another active bi-products that should be investigate in future studies.

Keywords: *lactobacillus acidophilus*, Herpes simplex virus type II

*Corresponding author:
E-mail: Moma1675@gmail.com

مقاله پژوهشی

جداسازی و ارزیابی خواص ضد ویروسی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو

مهدی معظمی گودرزی[1*]، محمد ولی نژاد[2]

[1]دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران
[2]گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، جهرم، ایران

دریافت: ۹۲/۱۱/۱۴ پذیرش: ۹۳/۱/۲۸

چکیده

زمینه و اهداف: شیوع بالای عفونت‌های متنوع ژنیتال در میان بانوان و گسترش روز افزون مقاومت به آنتی‌بیوتیک های گوناگون عامل انگیزش در کاربرد هدفمند پروبیوتیک‌ها در پیشگیری و درمان این ضایعات است.

مواد و روش‌ها: پس از نمونه‌برداری از ترشحات واژن زنان سالم، لاکتوباسیل‌ها با تست های بیوشیمیایی و مولکولی تعیین هویت شده و سپس خواص ضد ویروسی مایع رویی کشت آنها به عنوان سوش های وحشی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس سویه La-5 به عنوان سوش استاندارد روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۲ مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: با تاثیر مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو به شکل معناداری تعداد پلاک ایجاد شده توسط ویروس روی رده سلولی کاهش پیدا کرد. نتایج مشابهی نیز برای سوش استاندارد به دست آمد. خاصیت مهارکنندگی لاکتوباسیل‌های وحشی و سوش استاندارد فارغ از تولید آب اکسیژنه و یا یون هیدروژن و اسیدی کردن محیط ایجاد شده بود.

نتیجه‌گیری: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بدون تولید آب اکسیژنه و یا اسیدی‌کردن محیط قادر به مهار رشد هرپس سیمپکلس تیپ دو است. خاصیت مهار ویروس به احتمال فراوان مربوط به تولید متابولیت‌های فعال می‌باشد.

کلید واژه‌ها: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، هرپس سیمپلکلس ویروس تیپ دو

*ایمیل نویسنده رابط: moma1675@gmail.com

مقدمه

قسمت‌های گوناگون دستگاه تناسلی در بانوان شامل یک مجموعه متوازن از سیستم‌های حفاظتی طبیعی است. از این رو در بخش درونی و بیرونی دستگاه تناسلی بانوان به صورت طبیعی در مقابل عوامل عفونت‌زا و فرصت طلب میکروبی به خوبی مقابله به عمل می‌آید. بیماری‌های عفونی دستگاه تناسلی ادراری در بانوان در دو حالت می‌تواند بروز کند. اول زمانی است که محافظ‌های طبیعی دستگاه تناسلی از بین بروند و دوم زمانی که یک آسیب جدی به دستگاه تناسلی وارد گردد. و از این طریق ممکن است زمینه یک عفونت تناسلی فراهم گردد. در این میان پوشش‌های حفاظتی طبیعی مهمترین هستند. در ناحیه تناسلی ادراری، عضو تناسلی و مقعد بسیار نزدیک هستند و از این طریق باکتری‌های ساکن روده به خصوص انتروباکتریاسه امکان مهاجرت بسیار آسان را به مجرای واژینال پیدا می‌کنند. از این جهت حفظ بهداشت ناحیه تناسلی ادراری برای بانوان و دوشیزگان بسیار حائز اهمیت می‌باشد این دسته از مشکلات به خصوص در میان بانوان و دوشیزگانی که دارای پوست نازک و حساس و ضعیف در ناحیه بیرونی دستگاه تناسلی ادراری هستند با شدت بیشتر بروز خواهد کرد (۱۰-۹و۱). مجرای تناسلی سالم در بانوان و دوشیزگان به طور کلی توسط باکتری‌های اسید لاکتیکی نظیر لاکتوباسیل‌ها کلونیزه شده‌اند. این دسته از باکتری‌ها با تولید اسید لاکتیک محیط اسیدی با محدوده‌ی اسیدیته‌ای ما بین ۳/۸ تا ۴/۴ را ایجاد می‌کند. این محیط اسیدی رشد و تکثیر این دسته از باکتریها را در محیط واژن تحریک و پشتیبانی کرده و در شرایط یکسان تکثیر و بقای میکرورگانیسم‌های بیماری‌زا و فرصت‌طلب را مهار می‌کند

(۱۲و۲). هرپس تناسلی جزو بیماری‌های آمیزشی است که اغلب توسط ویروس HSV type II ایجاد می‌شود. البته عفونت تناسلی با ویروس HSV type I نیز در ۱۵ درصد موارد دیده می‌شود که بیشتر در نوجوانان و جوانان شیوع دارد. آمارهای متفاوتی از میزان آلودگی با ویروس HSV type II در آمریکا گزارش شده است (تقریباً ۱ نفر از هر ۵ نفر بالای ۱۲ سال) ولی اهمیت موضوع در این‌جاست که اگر مراقبت‌های بهداشتی و اطلاع‌رسانی درست صورت نگیرد، تا سال ۲۰۲۵ شیوع عفونت به ۵۰ درصد افزایش خواهد یافت. در ایران آمار دقیق در دسترس نیست اما چیزی که در مراجعات بیماران به‌ویژه جوانان قابل مشاهده است افزایش میزان ابتلا به این بیماری در سال‌های اخیر می‌باشد (۹و۳). محصولات لاکتوباسیل‌ها از جمله اسید لاکتیک، پراکسید هیدروژن و باکتریوسینها از طریق مهار کلونیزاسیون پاتوژن‌ها موجب تثبیت فلور طبیعی واژن می‌شوند. تشخیص نوع لاکتوباسیل‌های موجود در واژن زنان سالم و استفاده مناسب از آن‌ها به صورت خوراکی و یا واژینال، احتمالا می‌تواند راه مناسبی جهت جلوگیری از عفونت واژینال و حتی سرطان واژن و گردن رحم در بانوان باشد (۱۱و۴).

مواد و روش‌ها

در این پژوهش به مدت سه ماه و به منظور تهیه نمونه‌های لاکتوباسیل از نمونه‌گیری با سوآپ استریل از ۱۰۰ زن متاهل سالم در محدوده سنی ۲۱ تا ۳۱ سال (که برمبنای معاینه پزشک وگزارش آزمایشگاه فاقد علائم ظاهری عفونت واژینال و همچنین تبخال و زگیل تناسلی بودند)، در چندین مرکز بهداشتی درمانی و مطب خصوصی شهر تهران استفاده شد. هر یک ار سوآپ‌ها پس از نمونه‌گیری فورا در کنار شعله روی محیط MRS به صورت کشت چهارمنطقه‌ای، کشت داده شده و برای گرماگذاری به آزمایشگاه منتقل شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه به جهت شناسایی و تعیین خلوص سوش جدا شده نمونه‌ها که روی محیط MRS جامد کشت داده شدند، با شرایط هوا دهی میکروائروفیل (درون فلاسک های ANOXOMAT) بصورت واژگون و در دمای ۳۶^{c} درون انکوباتور قرار گرفتند. کلنی‌های رشد یافته در پلیت، که سفید مات، خامه‌ای و گنبدی شکل بودند، جهت مراحل بعدی مطالعات جداسازی شدند. **جهت تست تخمیر کربوهیدرات** در این تست از محیط MRS agar استفاده شد با این تفاوت که محیط فاقد meat extract و گلوکز بوده و حاوی w/v ۰/۰۵٪ کلروفنول قرمز به عنوان مارکر محیط می‌باشد (فنول در محیط اسیدی تغییر رنگ داده و محیط را زرد رنگ می‌کند) این تست، بر اساس تفاوت در مصرف قند اختصاصی لازم برای رشد باکتری، تمایز زیر گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس را امکان‌پذیر می‌سازد. جهت تست هر قند در حضور میکروب، مقداری (یک گرم در هر ۱۰۰ میلی لیتر محیط) از آن به محیط افزوده و سپس با لوپ استریل کلنی میکروب به محیط تلقیح شد. نتایج پس از ۲۴ ساعت از گرماگذاری لوله‌ها، بررسی شد. قندهای مورد استفاده شامل آرابینوز، سلوبیوز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، مانیتول، مانوز، ملبیوز، رافینوز، رامنوز، ساکارز، تره هالوز و زایلوز بودند. تنها نمونه‌هایی که الگوی تخمیری استاندارد برای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را نمایش دهند برای آزمون مولکولی تعیین هویت کاندید شدند. این الگوی تخمیری شامل: تخمیر قندهای سلوبیوز، لاکتوز، مانوز، رافینوز، رامنوز، ساکارز و زایلوز و عدم تخمیر آرابینوز، ملبیوز و تره هالوز می‌شود (۶).

در این مرحله به منظور شناسایی و جداسازی دقیق لاکوباسیلوس اسیدوفیلوس از دیگر سوش‌ها، از آزمون PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس استفاده شد توالی آغازگر استفاده شده در این آزمون به قرار زیر است.

Forward: 5' TGCAAAGT GGTAGCGTAAGC 3',
Reverse: 5' CCTTTCCCTCACGGTACTG 3'

این پرایمرها از نوع یونیورسال بوده و برای ناحیه اختصاصی گونه اسیدوفیلوس در توالی ژن srDNA۱۶ طراحی شده است. محصول این PCR با طول bp۱۷۰ پس از توالی یابی، هویت میکرو ارگانیسم را تایید می‌نماید. روش تهیه مخلوط مورد نیاز جهت فرایند PCR و دمای اجرای هر یک از مراحل آن به این شرح است: ژنوم الگو به میزان ۱ میکرولیتر، هر یک از آغازگرها به میزان ۱ میکرولیتر، بافر مخصوص PCR ۲/۵ میکرولیتر، نوکلئوتید به میزان ۲/۵ میکرولیتر، آنزیم taq به میزان ۰/۲ میکرولیتر و آب مخصوص PCR ۱۶/۸ میکرولیتر. به این ترتیب مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه و طی مراحل زیر واکنش PCR انجام گردید: پیش واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸۰ ثانیه، واسرشت شدن در همین دما به مدت ۷۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۴۷ درجه و برای ۷۰ ثانیه، طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و برای ۶۰ ثانیه، تکرار چرخه های PCR برای ۲۴ مرتبه، طویل شدن نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه و نگه داشتن در ۴ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان بی نهایت انجام گرفت. جهت شمارش باکتریهای پروبیوتیک ازPlate Count و تکنیک پور پلیت Pour plate استفاده شد.

برای انجام روش فوق به این صورت عمل شد:

ابتدا مایه تلقیح تهیه شد به این ترتیب که از میکرو ارگانیسمهای رشد یافته در محیط MRS-Broth، در حجم معلوم از سرم فیزیولوژی یا بافر فسفات و یا آب مقطر استریل، سوسپانسیونی با کدورت معلوم و تعیین شده (Transmittance=0.1 , λ=625nm)، تهیه گردید. سپس ۱ سی‌سی از سوسپانسیون در مرحله اول رقیق سازی طبق روش ذیل بکار رفت. البته رقیق‌سازی را با استفاده از کلونی‌های رشد یافته درMRS-Agar هم می‌توان انجام داد.

در مرحله رقیق‌سازی سریالی، ۶ لوله محتوی ۹ سی‌سی آب مقطر یا بافر فسفات (باpH=7.4) استریل تهیه کرده، ۱سی‌سی از سوسپانسیون میکروبی یا ۱ کلونی رشد یافته در MRS-Agar، به لوله اول منتقل شد. از لوله اول ۱ میلی‌لیتر به لوله دوم اضافه گردید و این عمل تا لوله ششم ادامه پیدا کرد. به این ترتیب، رقت هر لوله و لوله بعدی آن، ۰/۱ اختلاف داشت. سپس برای هر کدام از سه لوله آخر، دو پلیت مجزا در نظر گرفته و در داخل هر پلیت ۱ میلی‌لیتر از هر کدام از رقتهای مربوطه ریخته شد و به آن ۲۰ میلی-

لیتر محیط MRS-Agar با دمای ۴۵ درجه سانتیگراد، اضافه شد. پلیت‌ها به صورت دورانی در جهت عقربه‌های ساعت و خلاف آن تکان یا بصورت ۸ لاتین حرکت داده شدند تا ۱میلی‌لیتر نمونه با محیط کشت مخلوط شود. بعد از بستن محیط‌ها، پلیت‌ها به انکوباتور حاوی ۵ درصد CO2 منتقل شده و بعد از گذشت ۲۴ ساعت و رشد کلنی‌ها بر روی محیط، پلیتی که بین ۳۰۰-۳۰ کلنی داشت را انتخاب و تعداد کلنی‌ها بوسیله دستگاه شمارش کلنی، شمارش شد و با استفاده از رابطه زیر تعداد باکتریها در هر میلی‌لیتر از نمونه بدست آمد:

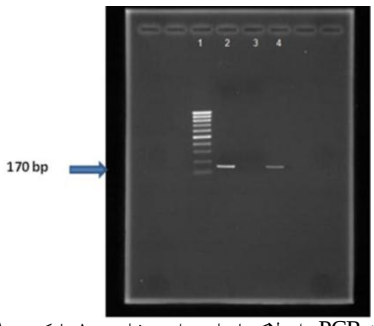
تعداد باکتریها در هر میلی‌لیتر نمونه= عکس ضریب رقت× میانگین تعداد کلنی‌های شمارش شده دو پلیت

در پژوهش پیش رو از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس La-5 به عنوان کنترل مثبت بهره‌گیری شد.

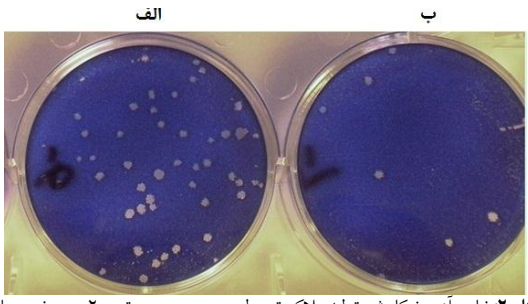
جهت بدست آوردن محلول رویی، از کشتهای رشد یافته در محیط MRS-Broth استفاده شد. جهت تهیه محلول رویی از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، ابتدا میزان $۱۰^{۹}$ واحد تشکیل دهنده‌ی کلنی (cfu) که از شمارش کلی لاکتوباسیل‌ها حاصل شده بود به پلیت‌های ۴ خانه حاوی ۶ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM، بدون حضور آنتی‌بیوتیک و غنی از گلوکز انتقال داده شد. پلیت‌ها برای ۲۰ ساعت در انکوباتور واجد جو CO2 ۵٪ گرماگذاری گردید. پس از این زمان محتوی پلیت‌ها ابتدا توسط سانتریفوژ با دور rpm ۳۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون سانتریفوژ یخچال دار سانتریفوژ شده و سپس توسط صافی میلی پور ۲۲٪ میکرومتر فیلتر شده و محلول به دست آمده از صافی به عنوان محلول رویی کشت لاکتوباسیل جهت تیمار رده سلولی هلا قبل از توزیع ویروس مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی خواص ضد ویروسی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، از تاثیر محلول روی کشت باکتری پس از سانتریفیوژ روی رده سلولی‌هلا که در محیط کشت DMEM تشکیل شده بود استفاده شد. رده سلولی با ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو یک بار در غیاب و یک بار در حضور محلول رویی کشت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس گرماگذاری شد. سپس تاثیر احتمالی مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس روی تکثیر و ایجاد اثرات سایتوپاتیک ویروس در رده سلولی هلا از طریق شمارش واحدهای تشکیل‌دهنده پلاک (PFU) بر مبنای تست شمارش پلاک (PLAQUE ASSAY) مورد ارزیابی قرار گرفتند. مقایسه تعداد نهایی پلاک‌های تشکیل‌شده بر رده سلولی هلا در حضور سوسپانسیون محلول رویی محیط کشت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و در غیاب آن، مبنای بررسی و اظهار نظر در مورد تاثیر لاکتوباسیل بر پاتوژنز ویروس قرار گرفت. برای این هدف در ابتدا سلول‌های هلا با دانسیته‌ی نهایی $X10^{۵۴}$ سلول در هر چاهک درون ظرف میکروپلیت حاوی محیط DMEM در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور جو ۵٪ دی اکسید کربن کشت داده شد. میکروپلیت‌ها در شرایط استریل هر ۱۲ ساعت با میکروسکوپ از نظر تشکیل رده سلولی که در جداره میکروپلیت تشکیل می‌گردد، مورد بررسی شهودی قرار گرفت. زمانی که دست کم ۹۸٪ از رده سلولی تشکیل شد، با ۵۰ واحد تشکیل‌دهنده پلاک (PFU) آلوده‌سازی شد و پس از یک ساعت گرماگذاری به جهت حذف آن دسته از ویروس‌هایی که به رده سلولی متصل نشده باشند، رده سلولی پس از خارج کردن محیط DMEM با بافر فسفات سالین به آهستگی شستشو داده شد. سپس با اضافه نمودن محیط DMEM تازه و استریل به میکروپلیت‌ها محیط مغذی در اختیار رده سلولی قرار گرفت. در این مرحله گرماگذاری به مدت ۷۲ ساعت در حضور محیط DMEM برای رده سلولی که احتمالا به ویروس آلوده گشته انجام گرفت. پس از این زمان، رده سلولی پس از تخلیه محیط DMEM ابتدا با متانول فیکس و سپس پلاک-های احتمالی تشکیل شده پس از رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله شمارش گردید. جهت ارزیابی کاهش احتمالی تعداد پلاک‌ها در حضور محلول رویی کشت لاکتوباسیل به میزان یک میلی‌لیتر از محلولهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد مایع رویی کشت لاکتوباسیل، که در آب مقطر استریل تهیه شده بودند، یک مرتبه ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی با ویروس، یک مرتبه هم زمان با آلوده-کردن رده سلولی با ویروس و یک مرتبه ۶ ساعت پس از آلوده نمودن رده سلولی با ویروس، اضافه گردید. سنجش پلاک‌های شکل گرفته مطابق روشی که از پیش گفته شد انجام گرفت. این ارزیابی در شرایط کاملا یکسان با استفاده از مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5 به عنوان سوش استاندارد نیز اجرا گردید.

یافته‌ها

شناسایی مولکولی با پرایمرهای اختصاصی پس از تخلیص ژنوم از باکتری اجرا گردید. محصول اختصاصی PCR پس از انجام روی ژل الکتروفورز یک درصد ران شده و نتایج آزمون در صورت مشاهده باند ۱۷۰ bp مطابق تصویر یک مثبت گزارش گردید. چنین جدایه‌هایی کاندید تهیه مایع‌رویی کشت و بررسی اثر مهاری روی هرپس تیپ دو شدند. پس از پایان آزمون مطابق تصویر دو به شکل معنی‌داری میزان تولید پلاک توسط ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو در رده سلولی هلا رو به کاهش گذاشت. بررسی تاثیر خاصیت مهاری مایع رویی روی ویروس هرپس در شرایط کاملا مشابه برای سوش استاندارد نیز مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲و۱).



شکل۱: آزمون PCR برای لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس. ۱: مارکر bp۱۰۰ ۲: کنترل مثبت ۳: کنترل منفی و ۴: نمونه مورد آزمون



شکل ۲: نتایج آزمون کاهش تولید پلاک توسط ویروس هرپس تیپ ۲ در حضور مایع رویی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس. الف: نتیجه تست در غیاب حضور مایع رویی کشت و ب: نتیجه آزمون شمارش پلاک پس از تیمار رده سلولی با مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس.

جدول ۱: بررسی تاثیر خاصیت مهاری مایع رویی کشت سوش استاندارد

زمان	۶-	صفر	۶+
غلظت مایع رویی	واحد تشکیل دهنده پلاک	واحد تشکیل دهنده پلاک	واحد تشکیل دهنده پلاک
غلظت ۵٪	۸۷	۱۱۰	۱۱۵
غلظت ۱۰٪	۸۰	۹۳	۱۰۰
غلظت ۱۵٪	۷۶	۹۸	۱۰۸
غلظت ۲۰٪	۵۹	۸۸	۹۱

جدول شماره ۲ : بررسی تاثیر خاصیت مهاری مایع رویی کشت سوش وحشی

زمان	۶-	صفر	۶+
غلظت مایع رویی	واحد تشکیل دهنده پلاک	واحد تشکیل دهنده پلاک	واحد تشکیل دهنده پلاک
غلظت ۵٪	۸۳	۱۰۹	۱۱۰
غلظت ۱۰٪	۷۸	۹۰	۹۸
غلظت ۱۵٪	۷۰	۹۵	۱۰۱
غلظت ۲۰٪	۵۳	۸۷	۹۱

بحث

در بررسی‌های انجام شده در کشورهای مختلف، انواع لاکتوباسیل‌های موجود در فلور طبیعی واژن زنان تفاوت‌های مشخصی را نشان می‌دهد. از حدود ۱۵ سال پیش تا کنون طیف غالب لاکتوباسیل‌های شایع به عنوان فلور میکروبی نرمال در میان زنان به شکل قابل توجهی تغییر نموده است (۵). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۹ در کشور هند *L.fermentum, L.salvaricus, L.plantarum* به عنوان فلور میکروبی غالب گزارش شده است (۱۲و۶). در این پژوهش *lactobacillus acidophilus* به عنوان گونه‌ی شایع شناسایی گردید و از این جهت این گونه کاندید بررسی خواص ضد میکروبی پروبیوتیک واژینال شایع در این پژوهش گردید. تخمین زده می‌شود که تعداد ۵۰ میلیون نفر در ایالات متحده به هرپس تناسلی مبتلا هستند. هرپس تناسلی تنها با تماس مستقیم فرد به فرد گسترش می‌یابد. عقیده بر این است که ۶۰٪ بالغین فعال جنسی ویروس هرپس را حمل می‌کنند. بخشی از دلیل میزان بالای عفونت ادامه دار این است که بیشتر زنان مبتلا با ویروس هرپس نمی‌دانند که عفونی هستند زیرا آنها علایم کمی دارند یا هیچ علامتی ندارند (۳). در بسیاری زنان شیوع بدون علامت وجود دارد که تنها علامت ممکن است خارش خفیف یا حداقل ناراحتی باشد. علاوه بر این، هرچه زنی زمان طولانی تری ویروس را حمل نماید، علایم کمتری را نشان می‌دهد (۱۳). در نهایت ویروس می‌تواند از سرویکس به واژن زنی که هیچ علامتی را تجربه نمی‌کند انتقال پیدا کند. شیوع این عفونت در کشورهای مختلف و جمعیت‌های مختلف متفاوت می‌باشد. شیوع این عفونت در افراد بزرگسال امریکایی ۲۵درصد، در بزرگسالان اروپایی و استرالیایی ۴-۱۴ درصد، در افریقا در زنان ۳۰-۸۰ درصد و در مردان ۱۰-۵۰ درصد و در کشورهای آسیایی در حال توسعه ۱۰-۳۰ درصد می‌باشد (۳و۱). نتایج پژوهش ما حاکی از کاهش معنی‌دار تکثیر ویروس هرپس تیپ دو در حضور مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود. این خاصیت احتمالا به واسطه ترشح مولکول‌های فعال در مایع رویی کشت این باکتری که دارای خاصیت مهاری روی تکثیر ویروس هستند می‌باشد. احتمالا این باکتری با تولید باکتریوسین و یا دیگر مولکول‌های فعال خواص ضد ویروسی خود را بروز می‌دهد. مایع رویی مورد استفاده در پژوهش ما دارای اسیدیته در محدوده‌ی خنثی بود. این بدان معنی است که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس خاصیت ضد ویروسی خود را از طریق تولید آب اکسیژنه و یا آزادسازی یون H^+ بروز نمیدهد. این درحالی است که تولید این دو فراورده قبلا به عنوان مسیرهای شناخته شده در مهار تکثیر ویروس مطرح شده بودند (۱۴و۷). همزمان پژوهش ما نشان داد که بیشترین میزان کاهش در خواص سایتوپاتیک ویروس هرپس تیپ دو زمانی بروز خواهد نمود که مایع‌رویی ۶ ساعت قبل از آلودن رده سلولی با ویروس به محیط کشت اضافه گردد. چنین نتایجی این فرضیه را تقویت می‌کند که احتمالا مایع رویی کشت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به طریقی قادر به ایجاد اختلال در فرایند اتصال ویروس هرپس تیپ دو به رده سلولی است. اما قطعا این ویژگی هیچ ارتباطی با تولید آب اکسیژنه و یا یون H^+ ندارد. پژوهش ما نشان داد که لزوما حضور جسم سلولی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نیز برای مهار تکثیر ویروس هرپس ضروری نیست. بلکه مایع رویی کشت این باکتری در محدوده اسیدیته خنثی نیز قادر به مهار نمودن تکثیر ویروس هرپس تیپ دو در کشت سلولی است. به این ترتیب احتمالا فلور میکروبی واژن قادر به مهار استقرار و اتصال ویروس هرپس تیپ دو در مراحل نخستین ایجاد عفونت هرپس ویروس در میزبان هستند. مکانیسم‌های مختلفی ممکن است در بروز این ویژگی موثر باشند نظیر ایجاد اختلال در مراحل نخستین ایجاد عفونت ویروس و یا خنثی‌سازی ویروس و یا از طریق خنثی‌سازی رویدادهای درون سلولی موثر در فرایندهای تکثیری ویروس در سلول میزبان. از جهت دیگر مقایسه نتایج میان سوش وحشی به دست آمده از نمونه‌های واژینال با سوش استاندارد LA-5 لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نشان می‌دهد تقریبا در تمام غلظت-های مایع‌رویی توان مهارکنندگی سوش وحشی از سوش استاندارد بالاتر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در خلال آغاز یک عفونت، در هریک از مکان‌های اکولوژیک میزبانی یک جمعیت هتروژن باکتریایی حضور دارد. این عدم تجانس باعث خواهد شد که عفونت با جمعیت‌های غالب

باکتریایی گسترش یابد. چنین عدم تجانسی امکان غلبه کردن بر شرایط غیر قابل پیش‌بینی میزبان‌ها و نیچ‌های متفاوت را فراهم می‌کند (۸). متابولیت های ثانویه تولید شده توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس احتمالا صرف نظر از رقابت‌های اکولوژیک تعریف شده در مهار معنی‌دار تکثیر ویروس ایفاگر نقش اصلی هستند. تولید اسیدلاکتیک به عنوان شاخص متابولیت‌های پروبیوتیکی نقش مهمتری را در برقراری مهار علیه پاتوژنهای تناسلی ایفا می‌کند. نتایج پژوهش ما نشان داد که برخلاف تصور رایج لاکتوباسیل‌های واژینال نه تنها در جلوگیری از بروز عفونت‌های باکتریایی و قارچی موثر هستند بلکه در کنترل و پیشگیری از عفونت‌های ویروسی نیز موثر هستند. بدیهی است تکیه بر تقویت و حفظ فلور میکروبی لاکتوباسیلی واژن از مهمترین و کم هزینه‌ترین روش‌های پیشگیری از کلونیزه شدن ویروس عامل تبخال تناسلی در واژن است.

References

1. Nam H, Whang K, Lee Y. Analysis of vaginal lactic acid producing bacteria in healthy women. *J Microbiol* 2007; **45**(6): 515-520.
2. Tamrakar R, Yamada T, Furuta I, Cho K, Morikawa M, Yamada H, et.al. Association between Lactobacillus species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. *BMC Infect Dis* 2007; **7**: 128.
3. Zuckerman RA, Lucchetti A, Whittington WL, Sanchez J, Coombs RW, Zuniga R, et.al. Herpes simplex virus (HSV) suppression with Val acyclovir reduces rectal and blood plasmaHIV-1 levels in HIV-1/HSV-2-seropositive men: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *J Infect Dis* 2007; **196**(10): 1500-1508.
4. McGroarty JA. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993; **6**(4): 251-264.
5. Zhou X, Hansmann MA, Davis CC, Suzuki H, Brown CJ, Schütte U, et.al. The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2010; **58**(2): 169-181.
6. Garg KB, Ganguli I, Das R, Talwar GP. Spectrum of Lactobacillus species present in healthy vagina of Indian women. *Indian J Med Res* 2009; **129**(6): 652-657.
7. Conti C, Malacrino C, Mastromarino P. Inhibition of herpes simplex virus type 2 by vaginal lactobacilli. *J Physiol Pharmacol* 2009; **60**: 19-26.
8. Vitali B, Pugliese C, Biagi E. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 5731-5741.
9. Pabich WL, Fihn SD, Stamm WE, Scholes D, Boyko EJ, Gupta K. Prevalence and determinants of vaginal flora alterations in postmenopausal women. *J Infect Dis* 2003; **188**: 1054-1058.
10. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNaim D, Wabwire-Mangen F, et.al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. Lancet 1997; **350**(9077): 546-550.
11. Reid G, Burton J. Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect* 2002; **4**(3): 319-324.
12. Song J, Abraham SN. Innate and adaptive immune responses in the urinary tract. *Eur J Clin Invest* 2008; **38** Suppl 2: 21-28.
13. Nagot N, Ouedraogo A, Defer MC, Vallo R, Mayaud P, Van de Perre P. Association between bacterial vaginosis and Herpes simplex virus type-2 infection: implications for HIV acquisition studies. *Sex Transm Infect* 2007; **83**(5): 365-368.
14. Cherpes TL, Meyn LA, Krohn MA, Hillier SL. Risk factors for infection with herpes simplex virus type 2: role of smoking, douching, uncircumcised males, and vaginal flora. *Sex Transm Dis* 2003; **30**: 405-410.