مقاله پژوهشي

بررسی خواص ضدویروسی لاکتوباسیلوس رامنوسوس روی هرپس سیمپلکس ویروس تیپ دو

مهدی معظمی گودرزی[۱]، محمدرضا فاضلی*[۲]، عباس اخوان سپهی[۳]، اکرم عیدی[٤]

تاریخ دریافت ۱٤۰۰/۰٤/۲٦ تاریخ پذیرش ۱٤۰۰/۰۷/۰۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: شیوع بالای عفونت‌های متنوع ژنیتال در میان بانوان و گسترش روزافزون مقاومت دارویی عامل انگیزش در کاربرد هدفمند پروبیوتیک‌ها در پیشگیری و درمان این ضایعات است. این پژوهش کوشیده است تا اثر باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* را روی مهار هرپس سیمپلکس ویروس تیپ دو ارزیابی نماید.

مواد و روش کار: در میان ۲۵ نمونه باکتری لاکتیک اهداشده به این پژوهش، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* با تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی تعیین هویت شده و سپس خواص ضدویروسی مایع رویی کشت آن در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ درصد روی ویروس هرپس سمپکس تیپ ۲ از طریق انجام آزمون شمارش تعداد پلاک روی رده سلولی هلا مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: با تأثیر مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ۶ ساعت قبل، هم‌زمان و ۶ ساعت پس از آلوده کردن رده سلولی به ویروس هرپس، تعداد پلاک ایجادشده در رده سلولی هلا کاهش یافت. بیشترین میزان کاهش پلاک‌ها در غلظت ۲۰ درصد مایع رویی و ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: متابولیت‌های پروبیوتیکی نقش مهمی را در برقراری مهار علیه پاتوژن‌های تناسلی ایفا می‌کنند. با توجه به بیشترین اثر مهاری مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی و با تعمیم احتمالی آن به شرایط درون تنی می‌توان نتیجه گرفت که فلورمیکروبی واژن احتمالاً قادر به مهار اتصال و استقرار ویروس در مراحل نخستین ایجاد عفونت می‌باشد. این در حالی است که پس از ورود پارتیکل‌های ویروسی به سلول‌های میزبان، اثر مهاری مایع رویی کشت باکتری به شکل معناداری کاهش میابد. مکانیسم‌های احتمالی مختلفی نظیر ایجاد اختلال در اتصال ویروس، خنثی‌سازی ویروس و همچنین اخلال در روی دادهای درون‌سلولی دخیل در تکثیر ویروس در این میان نقش‌آفرینند.

کلیدواژه‌ها: *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، هرپس سیمپکس ویروس تیپ دو

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره هفتم، ص ٤۸۹-٤۷۸، مهر ۱٤۰۰

آدرس مکاتبه: تهران، حصارک دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی تلفن: ۰۲۱۸۸۰۹۷۳۲۵

Email: trainpub@gmail.com

مقدمه

قسمت‌های گوناگون دستگاه تناسلی در بانوان شامل یک مجموعه متوازن از سیستم‌های حفاظتی طبیعی است. ازاین‌رو در بخش درونی و بیرونی دستگاه تناسلی بانوان به‌صورت طبیعی در مقابل عوامل عفونت‌زا و فرصت‌طلب میکروبی به‌خوبی مقابله به عمل می‌آید (۱).

بیماری‌های عفونی دستگاه تناسلی ادراری در بانوان در ۲ حالت می‌تواند بروز کند. اول زمانی است که محافظ‌های طبیعی دستگاه تناسلی از بین روند 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 میکروب‌های ساکن روده امکان مهاجرت بسیار آسان را به مجرای واژینال پیدا می‌کنند. ازاین‌جهت حفظ بهداشت ناحیه تناسلی ادراری برای بانوان و دوشیزگان بسیار حائز اهمیت می‌باشد. این دسته از مشکلات به‌خصوص در میان

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، تهران، ایران

[۲] استاد گروه کنترل غذا و دارو، مرکز تضمین کیفیت دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

[٤] استاد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/umj.32.7.478]

بانوان و دوشیزگانی که دارای پوست نازک، حساس و ضعیف در ناحیه بیرونی دستگاه تناسلی ادراری هستند با شدت بیشتر بروز خواهد کرد (۳ و ۲-۱).

مجرای تناسلی سالم در بانوان و دوشیزگان به‌طورکلی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیکی نظیر لاکتوباسیل‌ها کلنیزه شده‌اند. این دسته از باکتری‌ها با تولید اسیدلاکتیک محیط اسیدی با محدوده‌ی اسیدیته ای مابین ۳/۸ تا ۴/۴ را ایجاد می‌کنند. 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 میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و فرصت‌طلب را مهار می‌کند (۴-۵).

هرپس تناسلی جزو بیماری‌های آمیزشی است که عمدتاً توسط ویروس Herpes Simplex Virus Type II (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 (۶-۷). آمارهای متفاوتی از میزان آلودگی با ویروس HSV type II در آمریکا گزارش شده است. این آمارها حاکی است که تقریباً ۱ نفر از هر ۵ نفر با سن بالای ۱۲ سال دچار آلودگی با ویروس HSV type II می‌باشد (۸-۹). 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 (۱۰-۷). در ایران آمار دقیق در دسترس نیست اما چیزی که در مراجعات بیماران به‌ویژه جوانان قابل‌مشاهده است افزایش میزان ابتلا به این بیماری در سال‌های اخیر می‌باشد (۱۱-۱۲). باکتری‌های اسیدلاکتیک هنگام تخمیر، اسیدهای آلی مانند اسیدلاکتیک و اسیداستیک تولید می‌کنند. تجمع این اسیدهای آلی در کنار سایر متابولیت‌ها به‌صورت بالقوه در فرایند پاتوژنز بسیاری از پاتوژن‌ها نظیر پارتیکل‌های ویروسی ایجاد اختلال می‌کند (۱). اسیدهای لیپوفیلیک مانند اسیداستیک و اسیدلاکتیک در فرم تجزیه‌کننده می‌توانند در باکتری‌ها نفوذ کرده و در شرایط داخل سلولی، یون‌های هیدروژن تولید کنند (۱۳). اثرات ضدویروسی لاکتوباسیل‌ها در قیاس با دیگر انواع پاتوژن‌ها کمتر مورد ارزیابی قرار گرفته است. اما مطالعات اندک صورت گرفته حاکی از آن است که لاکتوباسیل‌ها به‌ویژه انواع واجد خواص پروبیوتیکی توانایی معناداری (دست‌کم در سطح آزمایشگاه)، چه در قالب بایومس وچه متابولیت‌ها لاکتیکی (نظیر انواع باکتریوسین‌ها، پراکسید هیدروژن و..) در مهار پاتوژنز ویرس‌ها دارند (۱۴). تاکنون مطالعات گسترده‌ای در خصوص بررسی خواص ضدویروسی لاکتوباسیل‌ها صورت نگرفته است، اما معدود پژوهش‌های انجام‌شده حکایت از تأثیر معنی‌دار باکتری‌های لاکتیک دارد. به‌عنوان‌مثال ذبیح الهی و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که مایع رویی کشت *Lactobacillus gasseri* و *Lactobacillus crispatus* به شکل معنی‌داری موجب مهار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک و ایدز می‌گردد (۱۴). همچنین پژوهش دیگری در سال ۲۰۰۵ نشان داد که لود ویروس HIV در واژن زنانی که دارای میکروبیوم واژینال نرمال و غالب‌تری برای لاکتوباسیل‌ها هستند به‌مراتب در قیاس با زنانی که دچار اختلال در تعادل فلورمیکروبی و کاهش غلبه لاکتوباسیل‌های واژینال هستند، کمتر می‌باشد (۱۵). همچنین پژوهش دیگری نشان داده است که *Lactobacillus acidophilus* زمانی که در دوز بالا به ویروس HIV عرضه شود، خواص viricidal قابل‌ملاحظه‌ای را نشان می‌دهد (۹). متابولیت‌های لاکتوباسیل‌ها ازجمله اسیدلاکتیک، پراکسید هیدروژن و باکتریوسین‌ها از طریق مهار کلونیزه شدن پاتوژن‌ها موجب تثبیت فلور طبیعی واژن می‌شوند (۶). تشخیص نوع لاکتوباسیل‌های موجود در واژن زنان سالم و استفاده مناسب از آن‌ها به‌صورت خوراکی و یا واژینال، احتمالاً می‌تواند راه مناسبی جهت جلوگیری از عفونت واژینال اعم از ویروسی و باکتریایی و حتی سرطان واژن و گردن رحم در بانوان باشد (۱۵-۱۶). این پژوهش کوشیده است تا اثر باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، که از اعضای میکروبیوم واژینال محسوب می‌گردد را روی پاتوژنز هرپس سیمپلکس ویروس تیپ دو ارزیابی نماید.

مواد و روش کار

سویه‌های باکتریایی و ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو:

در این پژوهش تعداد ۲۵ عدد ایزوله باکتریایی واژینال از سوی یک آزمایشگاه تشخیص طبی در تهران اهدا شد. این نمونه‌ها به جهت ارزیابی‌ها در مراحل بعدی به‌منظور جداسازی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* مورداستفاده قرار گرفتند. همچنین باکتری *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 55916 به‌عنوان سویه استاندارد و *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید. ویروس هرپس سیمپلکی تیپ دو توسط آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس اهدا شد.

کشت نمونه‌ها:

پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه به جهت شناسایی سویه‌های احتمالی جداشده، نمونه‌ها روی محیط Man, Rogosa and Sharpe (MRS) جامد شرکت مرک در شرایط استریل کشت داده شدند. سپس پلیت‌ها با شرایط هوادهی میکروآئروفیل (درون فلاسک‌های ANOXOMAT) که دست‌کم شامل جو پنج‌درصدی

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOI: 10.52547/umj.32.7.478]

دی‌اکسید کربن می‌باشد، به‌صورت واژگون قرارگرفته و در دمای ۳۷ °C برای مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت درون انکوباتور گرما گذاری شدند. کلنی‌های رشد یافته در پلیت، که به رنگ سفید مات، خامه‌ای وگنبدی شکل بودند، جهت مراحل بعدی مطالعات به‌عنوان سویه کاندید لاکتوباسیل انتخاب و جداسازی شدند. این کلنی‌ها ابتدا رنگ‌آمیزی گرم شده و سپس تست کاتالاز در مورد آن‌ها اجرا گردید. به این منظور یک قطره هیدروژن پروکساید ۳درصد بر روی لام ریخته شد و سپس یک کلنی از باکتری موردنظر در آن حل شد. در صورت عدم مشاهده حباب‌های گاز، کلنی انتخابی به‌عنوان سویه کاتالاز منفی انتخاب گردید. کلنی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی برای مراحل بعدی مورداستفاده قرار گرفتند. در این مرحله تعداد ۷ عدد از نمونه‌ها که معیارهای شرح داده‌شده فوق را به‌خوبی ارائه نمی‌دادند از مطالعه خارج شدند.

تست تخمیر کربوهیدرات (Carbohydrate Fermentation Test):

در این تست از محیط MRS agar (شرکت مرک) استفاده شد با این تفاوت که محیط فاقد Meat extractو گلوکز بوده و حاوی w/v درصد۵، ۰ کلروفنول قرمز به‌عنوان مارکر محیط می‌باشد (فنول در محیط اسیدی تغیر رنگ داده و محیط را زردرنگ می‌کند). این تست، بر اساس تفاوت در الگوی مصرف و تخمیر قند که برای گونه‌های مختلف لاکتوباسیل‌ها متفاوت می‌باشد، طراحی و مورداجرا قرار گرفت. پروفایل متفاوتی که هر یک از گونه‌های مختلف لاکتوباسیل‌ها در تخمیر گروهی از قندها نظیر: گلوکز، گالاکتوز، لاکتوز، مالتوز، رافینوز، ملیبیوز، رامنوز، مانیتول و آرابینوز ایجاد می‌نمایند به‌عنوان ابزاری در جهت شناسایی فنوتیپیک گونه‌ها در قالب یک تست افتراقی مورداستفاده می‌باشد. به این منظور محیط کشت MRS agar که حاوی ۱ درصد از هر یک از قندهای فوق (به‌صورت جداگانه) می‌باشد تهیه گردید. سپس در شرایط استریل یک لوپ کلنی میکروب به محیط تلقیح شد. نتایج پس از ۲۴ ساعت گرما گذاری در دمای ۳۷ °C درون فلاسک‌های ANOXOMAT ازنظر تخمیر قند و تغییر رنگ محیط کشت موردبررسی قرار گرفتند. *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* قادر به تخمیر گلوکز، لاکتوز، مالتوز، گالاکتوز، رامنوز و مانیتول بوده ولی قادر به تخمیر آرابینوز، رافینوز و ملیبیوز نمی‌باشد (۹-۱۷). در این مرحله تعداد ۱۰ عدد از نمونه‌ها که معیار پروفایل تخمیری شرح داده‌شده را ارائه نمی‌دادند از مطالعه خارج شدند.

شناسایی مولکولی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*:

در این مرحله به‌منظور شناسایی و جداسازی دقیق *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* از دیگر سویه‌ها از آزمون PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی جهت آن دسته از سویه‌هایی که پروفایل تخمیر قند *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* را ارائه دادند، استفاده شد. توالی پرایمر استفاده‌شده در این آزمون به‌قرار زیر است (۱۰).

Rhamno F: 5′- TGCTTGCATCTTGATTTAATTTTG – 3′

Rhamno R: 5′- GGTTCTTGGATTATGCGGTATTAG – 3

همچنین از باکتری *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 55916 به‌عنوان کنترل مثبت و *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پرایمر Rhamno برای توالی اختصاصی روی ژن 16srDNA گونه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* طراحی‌شده و در صورت ایجاد محصول 122 bp هویت سویه موردنظر تأیید نهایی خواهد شد. واکنش PCR برای تکثیر قطعه 122bp، شامل ناحیه اختصاصی روی توالی ژن 16srDNA طبق برنامه‌ای با نام Rhamno اجرا گردید. روش تهیه مخلوط موردنیاز جهت فرایند PCR و دمای اجرای هر یک از مراحل آن به این شرح است: ژنوم الگو به میزان ۱ میکرولیتر (با غلظت ۱۰ پیکومولار)، هر یک از پرایمرها (آغازگرها) به میزان ۱ میکرولیتر (با غلظت ۱۰ پیکومولار)، بافر مخصوص PCR به میزان ۲/۵ میکرولیتر، نوکلئوتید میکس به میزان ۲/۵ میکرولیتر، آنزیم Taq DNA Polymerase به میزان ۰/۲ میکرولیتر (با غلظت ۱۰ پیکومولار) و آب مخصوص PCR به میزان ۱۶/۸ میکرولیتر. به‌این‌ترتیب مخلوط واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تهیه گردید و طی برنامه به نام Rhamno در دستگاه ترموسایکلر (شرکت Eppendorf) اجرا گردید. جزئیات برنامهRhamno در جدول شماره یک آورده شده است. این برنامه توسط دستگاه، ۳۴ سیکل تکرار شد. تمامی مواد و کیت استخراج DNA ژنومیک مورداستفاده در واکنش PCR از شرکت metbaion آلمان تهیه شد. در این مرحله تعداد ۵ عدد از نمونه‌ها با توجه به نتایج آزمون از مطالعه خارج شدند.

جدول (۱): program rhamno برای یک سیکل

Step	Temperature	Time
Pre - Denaturation	94	3 min
Denaturation	94	75 sec
Annealing	62	70 sec
Extension	72	1min

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/umj.32.7.478]

Final Extension	72	1 min
Final hold	4	∞

شمارش میکروارگانیسم‌های زنده(Total Count) :

جهت شمارش *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* از روش Plate Count و فن پور پلیت Pour Plate استفاده شد (۱۸).

ابتدا مایه تلقیح تهیه شد، به‌این‌ترتیب که از میکروارگانیسم‌های رشد یافته در محیط MRS-Broth (شرکت مرک)، در حجم معین از سرم فیزیولوژی یا بافر فسفات و یا آب مقطر استریل، سوسپانسیونی با کدورت معلوم و تعیین‌شده (Transmittance=0.1, λ=625nm)، تهیه گردید. سپس ۱ سی‌سی از سوسپانسیون در مرحله اول رقیق‌سازی طبق روش ذیل، بکار گرفته شد.

در مرحله رقیق‌سازی سریالی،۶ لوله محتوی ۹ سی‌سی آب مقطر یا بافر فسفات سالین (با pH~7.4) استریل تهیه شد، ۱ سی‌سی 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. به‌این‌ترتیب، رقت هر لوله و لوله بعدی آن، ۱۰ مرتبه اختلاف داشت. سپس برای هرکدام از سه لوله آخر، دو پلیت مجزا در نظر گرفته و در داخل هر پلیت ۱ میلی‌لیتر از هرکدام از رقت‌های مربوطه ریخته شد و به آن ۲۰ میلی‌لیتر محیط MRS-Agar با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، اضافه شد. پلیت‌ها به‌صورت دورانی در جهت عقربه‌های ساعت و خلاف آن و یا به‌صورت عدد 8 لاتین حرکت داده شدند تا ۱ میلی‌لیتر نمونه با محیط کشت به‌خوبی مخلوط شود. بعد از جامد شدن محیط‌ها، پلیت‌ها به انکوباتور حاوی ۵ درصد CO_2 منتقل‌شده و بعد از گذشت ۲۴ ساعت گرما گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رشد کلنی‌ها بر روی محیط، پلیت‌هایی که تعداد کلنی رشد یافته روی آن به‌صورت تقریبی مابین ۳۰ الی ۳۰۰ عدد تخمین زده می‌شد، انتخاب و تعداد کلنی‌ها به‌وسیله دستگاه شمارش کلنی، شمارش شد. درنهایت با استفاده از فرمول زیر تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر از نمونه به دست آمد:

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

تهیه محلول رویی (Cell Free Supernatant):

جهت تهیه محلول رویی لاکتوباسیل از سه سویه‌ای که وارد آزمون شدند، میزان 10^9 واحد تشکیل‌دهنده‌ی کلنی (Colony Forming Unit) (که از شمارش کلی هر یک از لاکتوباسیل‌ها حاصل از کشت Over Night به‌دست‌آمده بودند) به ۱۰ سی‌سی محیط کشت DMEM) بدون آنتی‌بیوتیک و غنی از گلوکز) انتقال داده شد. محیط کشت پس از تلقیح برای ۲۰ ساعت در انکوباتور دارای جو CO_2درصد۵ گرماگذاری گردید. پس‌ازاین زمان محتوای محیط کشت ابتدا با دور 3000 rpm برای ده دقیقه سانتریفوژ شده و پس از جداسازی مایع روی از pellet، مایع رویی توسط صافی میلی پور ۲۲درصد میکرومتر فیلتر شده و محلول به‌دست‌آمده از صافی به‌عنوان محلول رویی کشت لاکتوباسیل مورداستفاده قرار گرفت (۱۸-۱۹). مایع رویی کشت لاکتوباسیل‌ها در شرایط دمای یخچال برای حداکثر ۲۴ ساعت نگهداری گردید. اسیدیته مایع رویی کشت لاکتوباسیل در تمام مراحل آزمون به جهت جلوگیری از تأثیر و مداخله یون H^+ در محدوده خنثی تنظیم شد.

بررسی اثر ضدویروسی مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* روی پاتوژنز ویروس هرپس سیمپلکس تیپ II:

برای بررسی خواص ضدویروسی ۳ سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* واردشده به مطالعه، از تأثیر محلول رویی کشت باکتری پس از سانتریفیوژ روی رده سلولی هلا (آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس) که در محیط کشت DMEM تشکیل شده بود استفاده شد. کشت سلولی با ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو، یک‌بار به‌تنهایی و هم‌چنین در حضور محلول رویی (غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰درصد در آب مقطر استریل) کشت لاکتوباسیل گرما گذاری و سپس تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده‌ی پلاک (PFU) بر مبنای تست PLAQUE ASSAY پس از رنگ‌آمیزی رده سلولی با کریستال ویوله مورد ارزیابی قرار گرفتند. مقایسه شمارش نهایی پلاک‌های تشکیل شده بر محیط کشت در حضور سوسپانسیون محلول رویی محیط کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و در غیاب آن مبنای بررسی و اظهارنظر در مورد تأثیر لاکتوباسیل بر پاتوزنز ویروس قرار گرفت. آزمون برای هر سه سویه جداشده و با سه نوبت تکرار اجرا گردید.

به این منظور سلول‌های هلا با دانسیته ی نهایی $4X10^5$ سلول در هر چاهک در حضور محیط DMEM و در میکروپلیت کشت داده شد. زمانی که حداقل ۹۸درصد از رده سلولی تشکیل شد با ۵۰ واحد تشکیل‌دهنده پلاک (Plaque Forming Unit) از ویروس،

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-20]

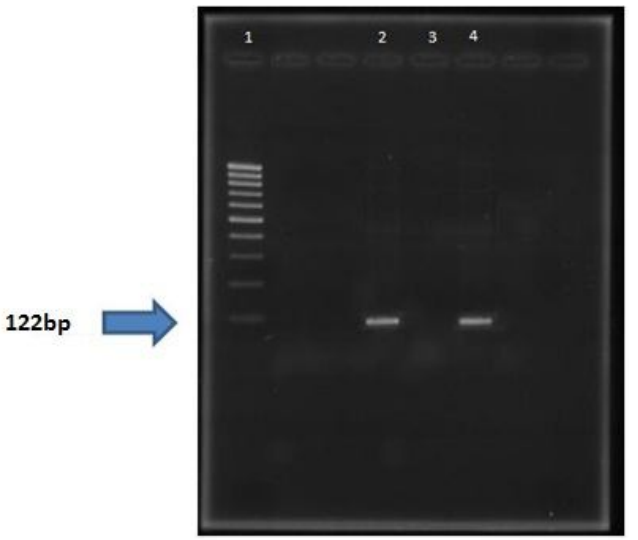
[DOI: 10.52547/umj.32.7.478]

آلوده و پس از یک ساعت گرما گذاری به‌منظور حذف ویروس‌هایی که به رده سلولی متصل نشده‌اند، 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 مجدداً در اختیار رده سلولی قرار گرفت. سپس گرماگذاری به مدت ۷۲ ساعت در حضور محیط DMEM برای رده سلولی که احتمالاً به ویروس آلوده گشته انجام گرفت. پس‌ازاین زمان، رده سلولی پس از تخلیه محیط DMEM ابتدا با متانول ۹۸درصد فیکس و سپس پلاک‌های 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 تهیه‌شده بودند، یک مرتبه ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی با ویروس، یک مرتبه هم‌زمان با آلوده‌کردن رده سلولی با ویروس و یک مرتبه ۶ ساعت پس از آلوده نمودن رده سلولی با ویروس، اضافه گردید. سپس سنجش پلاک‌های شکل‌گرفته مطابق روشی که از پیش گفته شد انجام گرفت. این ارزیابی در شرایط کاملاً یکسان با استفاده از مایع رویی کشت *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 55916 به‌عنوان سویه استاندارد نیز اجرا گردید. با توجه به مطالعات قبلی حداقل مدت‌زمان موردنیاز برای ایجاد اثرات سایتوپاتیک پارتیکل ویروسی هرپس حدود ۵ ساعت می‌باشد (۱۲). ازاین‌رو به جهت افزایش ضریب دقت در آزمون‌ها و حصول نتیجه بهتر فواصل تعریف‌شده برای تغییر در متغیر زمان حداقل ۶ ساعت در نظر گرفته شد.

در این پژوهش آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به‌دست‌آمده با استفاده از روش آنالیز واریانس (ANOVA) تجزیه‌وتحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ($P < 0/05$) انجام پذیرفت.

یافته‌ها

شناسایی مولکولی با پرایمرهای اختصاصی پس از تخلیص ژنوم از باکتری اجرا گردید. محصول اختصاصی PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شده و نتایج آزمون در صورت مشاهده باند 122 bp مطابق تصویر یک گزارش گردید.



تصویر (۱): تعیین هویت مولکولی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*: خط یک: مارکر 100 bp، خط ۲: نمونه مجهول، خط ۳: کنترل منفی، خط ۴ کنترل مثبت. باند ۱۲۲ جفت بازی روی ژل قابل‌مشاهده است.

آزمون مهار رشد ویروس هرپس سیمپلکس:

پس از پایان آزمون مطابق تصویر ۲ میزان تولید پلاک توسط ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو در رده سلولی هلا رو به کاهش گذاشت. میانگین تعداد پلاک شمارش‌شده طی سه مرحله تکرار و برای سه سویه وارد شده به آزمون با توجه به درصد غلظت مایع رویی به‌کاررفته در تیمار محیط کشت در جدول شماره ۲ و ۳ آورده شده است. تصویر شماره ۲ آزمون شمارش پلاک را نشان می‌دهد.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-20]
[DOI: 10.52547/umj.32.7.478]

جدول (۲): تأثیر مایع رویی کشت لاکتوباسیلوی رامنوسوس روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف.

غیاب مایع روی	۶ ساعت پس از آلودگی ویروسی	هم‌زمان با آلودگی ویروسی	۶ ساعت قبل از آلودگی ویروسی	زمان
PFU count	PFU count (Triplicate average)	PFU count (Triplicate average)	PFU count (Triplicate average)	مایع رویی
۱۲۰	۵،۶±۱۲۰	۵،۲±۱۰۹،۳۳	× ۱۴،۸±۸۰،۳۱	غلظت ۵٪
۱۱۹	۶،۱±۱۱۸	۵،۱±۱۰۱،۲۳	×±۷۲،۴۲ ۱۵،۶	غلظت ۱۰٪
۱۱۱	۵،۹±۱۱۰	۴،۳±۹۵،۳۳	×۱۸،۶±۶۵،۲۱	غلظت ۱۵٪
۱۰۴	۴،۸±۱۰۳	×۴،۲±۹۲،۳۳	× ۱۸،۹±۵۲،۳۷	غلظت ۲۰٪

میانگین تعداد واحد تشکیل‌دهنده پلاک در سه مرحله تکرار آزمون ± انحراف معیار

× مقادیر معنادار از دیدگاه آماری

جدول (۳): تأثیر مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (سویه استاندارد) روی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف

غیاب مایع روی	۶ ساعت پس از آلودگی ویروسی	هم‌زمان با آلودگی ویروسی	۶ ساعت قبل از آلودگی ویروسی	زمان
PFU count	PFU count (Triplicate average)	PFU count (Triplicate average)	PFU count (Triplicate average)	مایع رویی
۱۱۵	۵،۸±۱۱۵،۳۰	۶،۲±۱۱۰،۳۳	×۱۳،۶±۸۷،۲۳	غلظت ۵٪
۱۰۱	۵،۵±۱۰۰،۳۳	۵،۹±۹۳،۳۰	×۱۴،۱±۸۰،۶۵	غلظت ۱۰٪
۱۰۸	۷،۱±۱۰۸،۶۵	۵،۱±۹۸،۴۱	×۱۸،۱±۷۶،۸۷	غلظت ۱۵٪
۸۹	۶،۳±۹۱،۳۴	× ۵،۲±۸۸،۳۳	×۱۸،۳±۶۱،۳۰	غلظت ۲۰٪

میانگین تعداد واحد تشکیل‌دهنده پلاک در سه مرحله تکرار آزمون ± انحراف معیار

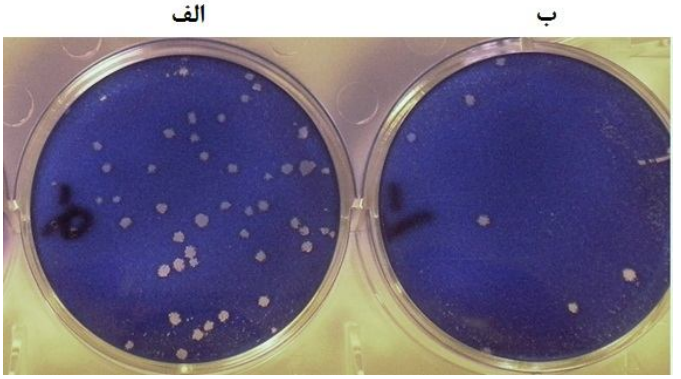
× مقادیر معنادار از دیدگاه آماری

تحلیل داده‌های آماری نشان می‌دهد که متغیر غلظت مایع رویی کشت لاکتوباسیل ارتباط معکوسی با تعداد پلاک ایجادشده توسط پارتیکل ویروسی روی رده سلولی دارد. به این معنا که هرچه قدر غلظت مایع رویی بیشتر باشد اثر مهاری روی اثرات سایتوپاتیک پارتیکل ویروسی بیشتر شده و تعداد پلاک‌های ایجادشده توسط پارتیکل ویروسی کمتر می‌شود. اما با در نظر گرفتن متغیر زمان، بیشترین تأثیر مهاری روی ایجاد اثرات سایتوپاتیک پارتیکل ویروسی بر رده سولی هلا زمانی رخ داد که تیمار رده سلولی هلا با مایع رویی کشت لاکتوباسیل ۶ ساعت پیش از آلوده کردن آن با پارتیکل ویروسی رخ دهد. داده‌های آماری و بررسی آن‌ها نشان داد که هرچند متغیر غلظت مایع رویی کشت لاکتوباسیل فاکتور تأثیرگذاری در کنترل اثرات سایتوپاتیک میباشد اما ارزش متغیر زمان اضافه کردن مایع رویی کشت لاکتوباسیل به رده سلولی هلا در کنترل اثر سایتوپاتیک پارتیکل ویروسی به‌مراتب معنادارتر و ارزشمندتر می‌باشد. این در حالی است که تقریباً اثر مهاری روی پاتوژنز پارتیکل ویروسی در متغیرهای زمانی ۶ ساعت بعد و هم‌چنین هم‌زمان با آلوده کردن رده سلولی تقریباً برابر و ازلحاظ آماری فاقد ارزش معناداری در قیاس یا متغیر زمانی ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی با پارتیکل ویروس مشاهده گردید.

علاوه بر این نتایج مقایسه دیتای به‌دست‌آمده میان مایع رویی سویه استاندارد و سویه‌های وحشی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نشان داد خاصیت مهار بر اثرات سایتوپاتیک پارتیکل ویروسی در سویه‌های وحشی به شکل معنی‌داری از سویه استاندارد بالاتر است.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/umj.32.7.478]



تصویر (۲): نتایج آزمون کاهش تولید پلاک توسط ویروس هرپس تیپ ۲ در حضور مایع رویی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*. الف: نتیجه تست در غیاب مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ب: نتیجه آزمون پس از تیمار رده سلولی با مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در غلظت ۲۰درصد و شش ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی با پارتیکل ویروسی.

بحث و نتیجه‌گیری

تخمین زده می‌شود که تعداد ۵۰ میلیون نفر در ایالات‌متحده آمریکا به هرپس تناسلی مبتلا هستند. هرپس تناسلی تنها با تماس مستقیم فردبه‌فرد گسترش می‌یابد. عقیده بر این است که ۶۰درصد بالغین فعال جنسی ویروس هرپس را حمل می‌کنند (۶). بخشی از علت میزان بالای عفونت ادامه‌دار این است که بیشتر زنان مبتلا با ویروس هرپس از بیماری خود ناآگاه‌اند. زیرا آن‌ها علائم کمی دارند یا فاقد علامت می‌باشند (۶-۲۰). در بسیاری زنان شیوع بدون علامت وجود دارد و یا تنها علامت ممکن، خارش خفیف یا حداقل میزان ناراحتی است. علاوه بر این، هرچه زنی زمان طولانی‌تری ویروس را حمل نماید، علائم کمتری را نشان می‌دهد (۱۱-۲۱). درنهایت 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 آمریکایی ۲۵ درصد، 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 درحال‌توسعه ۱۰-۳۰ درصد می‌باشد (۱-۲۲).

نتایج پژوهش ما حاکی از کاهش تکثیر ویروس هرپس تیپ دو در حضور مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بود. این خاصیت احتمالاً به‌واسطه ترشح مولکول‌های فعال در مایع رویی کشت این باکتری که دارای خاصیت مهاری روی تکثیر ویروس هستند می‌باشد. احتمالاً این باکتری با تولید باکتریوسین و یا دیگر مولکول‌های فعال خواص ضدویروسی خود را بروز می‌دهد. مایع رویی مورداستفاده در پژوهش ما دارای اسیدیته در محدوده‌ی خنثی بود. این بدان معنی است که *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* خاصیت ضدویروسی خود را از طریق تولید آب‌اکسیژنه و یا آزادسازی یون H^+ بروز نمی‌دهد. این در حالی است که تولید این دو فراورده قبلاً به‌عنوان مسیرهای شناخته‌شده در مهار تکثیر ویروس مطرح شده بودند (۲۳-۲۴).

هم‌زمان پژوهش ما نشان داد که بیشترین میزان کاهش در خواص سایتوپاتیک ویروس هرپس تیپ دو زمانی بروز خواهد نمود که مایع رویی ۶ ساعت قبل از آلوده شدن رده سلولی با ویروس به محیط کشت اضافه گردد. چنین نتایجی این فرضیه را تقویت می‌کند که احتمالاً مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به طریقی قادر به ایجاد اختلال در فرایند اتصال ویروس هرپس تیپ دو به رده سلولی است. این یافته‌ها با دیگر پژوهش‌ها همخوانی دارد (۱۴-۲۳). اما این ویژگی هیچ ارتباطی با تولید آب‌اکسیژنه و یا یون H^+ ندارد (۱۴). پژوهش ما نشان داد که لزوماً حضور جسم سلولی لاکتوباسیلوس 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 (۲۴). از جهت دیگر مقایسه نتایج میان سویه وحشی به‌دست‌آمده از نمونه‌های واژینال با سویه استاندارد *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 55916 نشان می‌دهد تقریباً در تمام غلظت‌های مایع‌رویی توان مهارکنندگی سویه وحشی از سویه استاندارد بالاتر می‌باشد.

با در نظر گرفتن متغیر زمان مداخله مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در رده سلولی و بیشترین تأثیر مهاری مایع رویی روی ویروس هرپس سمپلکس، ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی با ویروس می‌توان این‌گونه تحلیل کرد که زمانی

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/umj.32.7.478]

که پارتیکل‌های ویروسی درون سلول‌های رده سلولی نفوذ می‌کنند، احتمالاً تأثیر فاکتورهای موجود در پروفایل متابولیتی مایع رویی لاکتوباسیل روی پارتیکل ویروسی به حداقل میزان خود می‌رسد. این مشاهدات مؤید مداخله متابولیت‌های لاکتیکی در نخستین مراحل اتصالی پارتیکل ویروسی به رده سلولی است. لذا متغیر زمان در اثربخشی مایع رویی لاکتوباسیل بسیار نقش‌آفرین بوده و احتمالاً زمان طلایی اثربخشی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* مورد آزمون در پژوهش پیش رو و به‌احتمال، دیگر پروبیوتیک‌های لاکتیکی قبل از آلوده شدن سلول‌های میزبان با پارتیکل‌های ویروسی است. پدیده‌ای که با قوت نقش پروبیوتیک‌ها در پیشگیری از عفونت‌های ویروسی هرپس واژینال را دست‌کم در سطح آزمایشگاه تقویت می‌کند. این در حالی است که همین میزان اثربخشی پس از آلوده شدن رده سلولی کاهش معنی‌داری پیدا می‌کند (۲۵-۲۶).

همان‌طور که در نتایج مشاهده می‌شود مابین تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده پلاک در رده سلولی هلا و میزان اثربخشی مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در مهار هرپس سیملکس ویروس تیپ دو ارتباط معکوس وجود دارد. به این معنی که در غلظت‌های بالاتر مایع رویی و ۶ ساعت قبل از آلوده کردن رده سلولی با ویروس، کمترین تعداد واحد تشکیل‌دهنده پلاک که مؤید اثرات سایتوپاتیک پارتیکل ویروسی هستند، مشاهده می‌شود. این در حالی است که در غلظت‌های پایین‌تر مایع رویی کشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و یا تیمار رده سلولی با مایع رویی، هم‌زمان و یا ۶ ساعت پس از آلوده نمودن رده سلولی با ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو، تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده پلاک افزایش میابد. نتایجی که با یافته‌ای دیگر پژوهشگران همخوانی دارد (۹-۱۴-۱۵).

نخستین مرحله از ایجاد عفونت توسط ویروس‌ها ورود به سلول هدف می‌باشد و بدیهی است که نخستین گام در این فرآیند اتصال پارتیکل ویروسی به سطح سلول است (۲). این فرضیه وجود دارد که متابولیت‌های لاکتوباسیل و یا جسم سلولی لاکتوباسیل با پوشانیدن گیرنده‌های سطحی سلول نقش بسیار مهمی در جلوگیری از ورود پارتیکل ویروسی به سلول ایفا نمایند. این گیرنده‌ها هم شامل انواع اختصاصی و هم انواع غیراختصاصی هستند (۱۴). این اطلاعات با نتایج پژوهش ما همخوانی دارد. جایی که تیمار رده سلولی با مایع رویی کشت لاکتوباسیل سبب کاهش شمارش تأثیرات سایتوپاتیک بر پیکر رده سلولی می‌گردد. توانایی لاکتوباسیل‌ها در اتصال به سلول‌ها به عوامل مختلفی نظیر ترکیبات تشکیل‌دهنده دیواره سلولی باکتری‌ها، گیرنده‌های سلولی و پروتئین‌های محلولی که توسط سلول ترشح می‌گردد در ارتباط است (۲۷). هم‌چنین مطالعات قبلی پیشنهاد داده است که دست‌کم برخی از انواع لاکتوباسیل‌ها قادرند پروتئین‌هایی لایه s تولیدکننده که نقش مهمی در اتصال این باکتری‌ها به دیواره سلولی در رده سلولی HeLa دارند (۲۸-۲۹). بااین‌وجود مطالعات بسیاری چه در سطح آزمایشگاهی و چه در سطح بالینی باید جهت بررسی نقش فاکتورهای اتصالی تولیدشده توسط لاکتوباسیل‌ها در سلامت واژینال مورد انجام قرار گیرد.

درصورتی‌که تأثیر لاکتوباسبل را در کاهش اثرات سایتوپاتیک در رده سلولی مجزا از عوامل مؤثر متابولیتی بدانیم دو فرضیه در خصوص تأثیر فیزیکی لاکتوباسیل در ممانعت از آلوده شدن سلول رده سلولی با ویروس مطرح است:

الف: تشکیل میکروکلنی‌های لاکتوباسیلوس روی رده سلولی و پوشانیدن و یا متوقف کردن گیرنده‌های ویروس روی رده سلولی. با توجه به این‌که در پژوهش پیش رو از مایع رویی کشت ۲۴ ساعته *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* استفاده شده است، لذا امکان نقش‌آفرینی جسم سلولی لاکتوباسیل‌ها در ایجاد ممانعت فیزیکی برای اتصال پارتیکل‌های ویروسی به سطح رده سلولی منتفی می‌باشد (۳۰).

ب: به دام انداختن و متوقف کردن پارتیکل‌های ویروسی توسط تراکنش مابین پوشش انولوپ ویروسی و دیواره لاکتوباسیل. در موردپژوهش پیش رو کماکان نیز به علت فقدان حضور جسم سلولی لاکتوباسیل در رده سلولی این نقش‌آفرینی نیز منتفی است (۳۱-۳۲).

به‌این‌ترتیب به نظر می‌رسد با توجه به استفاده صرف از مایع رویی کشت لاکتوباسیل‌های منتخب در این مطالعه در صورت قوی دانستن فرضیه مداخلات اتصالی لاکتوباسیل و یا پوشانیدن گیرنده‌های سطحی رده سلولی و یا انولوپ پارتیکل ویروسی، لاکتوباسیل‌های منتخب قادر به تولید متابولیت‌های محلول در آبی هستند که می‌توانند یا با مداخله روی گیرنده‌های رده سلولی و یا اتصال و پوشانیدن مولکول‌های نظیر آن‌ها در سطح پارتیکل ویروسی فرایند اتصال پارتیکل به رده سلولی را مختل نموده و از این طریق فرایند ورود پارتیکل ویروسی و ایجاد عفونت را ممانعت کرده و یا به شکل معنی‌داری کاهش دهند. به‌این‌ترتیب احتمالاً فلورمیکروبی واژن قادر به مهار استقرار و اتصال ویروس در مراحل نخستین ایجاد عفونت هرپس ویروس در میزبان هستند. مکانیسم‌های مختلفی ممکن است در بروز این ویژگی مؤثر باشند نظیر ایجاد اختلال در مراحل نخستین ایجاد عفونت ویروس و یا خنثی‌سازی ویروس و یا از طریق خنثی‌سازی روی داده‌های درون‌سلولی مؤثر در فرایندهای تکثیری ویروس در سلول میزبان (۳۳).

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/umj.32.7.478]

از محدودیت‌های این پژوهش می‌توان به بررسی و تحلیل نتایج در شرایط آزمایشگاهی اشاره کرد. بدیهی است در شرایط درون تنی متغیرهای فیزیولوژیک دخیل در فرایند استقرار و بیماری‌زایی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو در واژن و همچنین ترکیب جمعیتی میکروبیوم واژینال از عوامل و متغیرهایی هستند که می‌توانند در نتایج بررسی تأثیرگذار باشند.

با توجه به رشد روزافزون مقاومت‌های دارویی و کاهش کارایی برخی از روش‌های درمانی تهاجم محور علیه عوامل بیماری‌زا، به نظر می‌رسد گشودن افق‌های جدید پیشگیری و درمان مبتنی بر اصول اکولوژی میکروبی و فارغ از روش‌های تهاجم محور دارویی می‌تواند به‌صورت بالقوه ابزاری کارآمد به‌ویژه برای کنترل و پیشگیری بیماری‌های عفونی واژینال و افزایش سطح سلامت جامعه باشد. *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* که از اعضای میکروبیوم واژینال به‌حساب می‌آید پتانسیل قابل‌ملاحظه‌ای در پیشگیری از اسقرار ویروس هرپس سیمپلکس تیپ دو دارد.

تقدیر و تشکر

محققین بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از کارکنان آزمایشگاه ویروس‌شناسی دانشگاه تربیت مدرس و همچنین آزمایشگاه کنترل غذا و دارو دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران که نهایت مساعدت و همراهی جهت تسهیل انجام این پژوهش را فراهم کردند، ابراز دارند

References:

1-Nam H, Whang K, Lee Y. Analysis of vaginal lactic acid producing bacteria in healthy women. J Microbiol 2007; 45(6): 515-20.

2-Abdolalipour E, Mahooti M, Salehzadeh A, Torabi A, Mohebbi SR, Gorji A, et al. Evaluation of the antitumor immune responses of probiotic Bifidobacterium bifidum in human papillomavirus-induced tumor model. Microb Pathog 2020;145: 104207.

3-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: 1054-8.

4-Li Y, Yu T, Yan H, Li D, Yu T, Yuan T, et al. Vaginal microbiota and HPV infection: Novel mechanistic insights and therapeutic strategies. Infect Drug Resist 2020; 13: 1213–20.

5-Palma E, Recine N, Domenici L, Giorgini M, Pierangeli A, Panici PB. Long-term Lactobacillus rhamnosus BMX 54 application to restore a balanced vaginal ecosystem: A promising solution against HPV-infection. BMC Infect Dis 2018; 18: 13.

6- Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNaim D, Wabwire-Mangen F. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. Lancet 1997; 350(9077): 546-50.

7- 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.

8-Oo KM, Ayelwin A, Kyaw YY, Tun WM, Fukada K, Goshima A, et al. Safety and long-term effect of the probiotic FK-23 in patients with hepatitis C virus infection. Biosci Microbiota Food Health.2016; 35: 2015–24.

9- Klebanoff SJ, Coombs RW. Viricidal effect of Lactobacillus acidophilus on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. J Exp Med 1991; 174:289–92.

10-Haghighat L, Crum-Cianflone NF. The potential risks of probiotics among HIV-infected persons: Bacteraemia due to Lactobacillus acidophilus and review of the literature. Int J STD AIDS 2016;27(13):1223-30.

11- D'Angelo C, Reale M, Costantini E. Microbiota and probiotics in health and HIV infection. Nutrients 2017; 6: 615.

12 -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-

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/umj.32.7.478]

seropositive men: a randomized, doubleblind, placebo-controlled crossover trial. J Infect Dis 2007; 196(10): 1500-8.

13- McGroarty JA. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. FEMS Immunol Med Microbiol 1993; 6(4): 251-64.

14- Zabihollahi R, Motevaseli E, Sadat SM, Azizi-Saraji AR, Asaadi Dalaie S, Modarressi MH. Inhibition of HIV and HSV infection by vaginal lactobacilli in vitro and in vivo. Daru 2012; 9:48-53.

15- Sha BE, Zariffard MR, Wang QJ, Chen HY, Bremer J, Cohen MH, et al. Female genital-tract HIV load correlates inversely with Lactobacillus species but positively with bacterial vaginosis and Mycoplasma hominis. J Infect Dis 2005; 191:25–32.

16- Bayané A, Roblain D, Dubois-Dauphin R, Destain J. Assessment of the physiological and biochemical characterization of a Lactic acid bacterium isolated from chicken faeces in sahelian region. Afr J Biotechnol 2006; 5: 629-34.

17-Ou YC, Fu HC, Tseng CW, Wu CH, Tsai CC, Lin H. The influence of probiotics on genital high-risk human papilloma virus clearance and quality of cervical smear: A randomized placebo-controlled trial. BMC Womens Health2019; 19: 103.

18- Ehrstrom S, Daroczy K, Rylander E, Samuelsson C, Johannesson U. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. Microbes Infect 2010;12: 691–9.

19-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): 365-8.

20- Reikvam DH, Meyer-Myklestad MH, Trøseid M, Stiksrud B. Probiotics to manage inflammation in HIV infection. Curr Opin Infect Dis 2020;33(1):34-43.

21- Conti C, Malacrino C, Mastromarino P. Inhibition of herpes simplex virus type 2 by vaginal lactobacilli. J Physiol Pharmacol 2009; 60: 19-26.

22-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: 405-10.

23-Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of benefical effects. Antonie Van Leeuwenhoek 2002;82(1-4):279-89.

24- Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. Cell 2006; 124:715-27.

25- Chen X, Xu J, Shuai J, Chen J, Zhang Z, Fang W. The S-layer proteins of Lactobacillus crispatus strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium. Int J Food Microbiol 2007; 115:307-12.

26- Khani S, Motamedifar M, Golmoghaddam H, Hosseini HM, Hashemizadeh Z. In vitro study of the effect of a probiotic bacterium Lactobacillus rhamnosus against herpes simplex virus type 1. Braz J Infect Dis 2012;16(2):129-35.

27- Antushevich H. Interplays between inflammasomes and viruses, bacteria (pathogenic and probiotic), yeasts and parasites. Immunol Lett 2020; 228: 1–14.

28- Majamaa, H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. J. Pediat. Gastroenterol Nutr 1995; 20: 333–83.

29- Verhoeven V, Renard N, Makar A, Royen PV, Bogers JP, Lardon F, et al. Probiotics enhance the clearance of human papillomavirus-related cervical lesions: A prospective controlled pilot study. Eur J Cancer Prev 2013; 22: 46–51.

30- Hummelen R, Changalucha J, Butamanya NL, Cook A, Habbema JDF, Reid G. Lactobacillus rhamnosus GR-1 and L.euteri RC-14 to prevent or cure bacterial vaginosis among women with HIV. Int J Gynecol Obstet 2010; 111: 245–8.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/umj.32.7.478]

31- Reikvam DH, Meyer-Myklestad MH, Trøseid M, Stiksrud B. Probiotics to manage inflammation in HIV infection. Curr Opin Infect Dis 2020;33(1):34-43.

32- Scheri GC, Fard SN, Schietroma I, Mastrangelo A, Pinacchio C, Giustini N, et al. Modulation of tryptophan/serotonin pathway by probiotic supplementation in human immunodeficiency virus-positive patients: Preliminary results of a new study approach. Int J Trytophan Res 2017; 10: 1178646917710668.

33- Freedman SB, Xie J, Nettel-Aguirre A, Pang XL, Chui L, Williamson-Urquhart S, et al. A randomized trial evaluating virus-specific effects of a combination probiotic in children with acute gastroenteritis. Nat Commun 2020;11(1):2533.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/umj.32.7.478]

Original Article

ASSESSMENT OF ANTIVIRAL ACTIVITY OF LACTOBACILLUS RHAMNOSUS AGAINST HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE II

*Mehdi Moazzami Goudarzi[1], Mohammad Reza Fazeli [*2], Abbas Akhavan Sepahi[3], Akram Eidi[4]*

Received: 17 July, 2021; Accepted: 27 September, 2021

Abstract

Background & Aims: High prevalence of urogenital infections among women and the increasing emergence of drug-resistant organisms are a challenging topic. Due to this background, it is reasonable to consider probiotics for combating the urogenital infections. This study is an attempt to evaluate the effect of Lactobacillus rhamnosus against Herpes Simplex Virus Type II.

Materials & Methods: Within donated lactobacilli, biochemical and molecular characterization was carried out to find Lactobacillus rhamnosus isolates. Then to evaluate how cell-free supernatant (CFS) of Lactobacillus rhamnosus may affect the pathogenesis of herpes simplex virus type II, a plaque formation counting test was done on HeLa Cells by plaque-forming assay.

Results: The supernatant of Lactobacillus rhamnosus culture significantly reduced plaque formation by herpes simplex virus II and almost the same results were obtained for standard strain. The inhibitory effects of the two supernatants were independent of H202 or H+ secretion by candidate lactobacilli, but the result was more reasonable for wild type in comparison to the standard strain of lactobacillus rhamnosus.

Conclusion: Considering the most effective inhibitory results (6h before virus contamination) and also by probable in vivo generalization of result, it is more possible to consider vaginal microbiome as an inhibitor for initial steps of viral attachment. Otherwise, when HeLa cells were successfully contaminated by HSV II, the inhibitory result of lactobacilli was reduced. A variety of mechanisms may be responsible for interruption in viral-host cell interaction, virus neutralization, and post-infected intracellular viral procedures.

Keywords: lactobacillus rhamnosus, Herpes simplex virus type II

Address: Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.
Tel: +982188097325
Email: trainpub@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(7): 489 ISSN: 2717-008X

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-20]

[DOI: 10.52547/umj.32.7.478]

[1] Department of Microbiology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2] Department of Drug and Food Control, Pharmaceutical Quality Assurance Center, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (Corresponding Author)
[3] Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, North of Tehran branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[4] Department of Biology, Faculty of Basic Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran