

بررسی شیوع لاکتوباسیل‌های واژینال در زنان ایرانی به روش تشخیص ژنتیکی

دکتر الهه متوسلی،* مهدیه شیرزاد،* دکتر سید محمد هاشمی نسب،* دکتر محمد حسین مدرسی*

چکیده :

زمینه و هدف: فلور طبیعی واژن و گردن رحم به طور غالب از باکتری‌هایی به نام لاکتوباسیل‌ها تشکیل شده است. لاکتوباسیل‌ها جزء میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک محسوب می‌شوند و دریافت میزان مناسب آن‌ها برای بدن انسان سودمند می‌باشد. 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 می‌تواند راه مناسبی جهت جلوگیری از عفونت واژینال و حتی سرطان واژن و گردن رحم در بانوان باشد. با توجه به این‌که نوع لاکتوباسیل‌های واژینال در کشورهای مختلف متفاوت است و روش‌های مرسوم و متداول در تشخیص لاکتوباسیل‌ها در کشور ما دارای محدودیت‌های فراوانی است، در این مطالعه لاکتوباسیل‌های فلور طبیعی واژینال بانوان ایرانی برای اولین بار به روش تشخیص مولکولی و ژنتیکی مورد بررسی قرار گرفته است.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیل‌های واژینال، پروبیوتیک، Multiplex PCR.

زمینه و هدف

ریسک خطر ابتلا به بیماری در افراد متفاوت و در نهایت پیشگیری و درمان بیماری‌ها می‌شود.^۱ فلور واژن انسان شامل مجموعه میکروبی پویا و پیچیده‌ای است که در آن همزیستی میکروارگانیسم‌های مختلف موجب حفظ سلامت فرد می‌شود. در مطالعات متعدد مشخص شده که لاکتوباسیل‌ها باکتری غالب در محیط واژن زنان سالم هستند. لاکتوباسیل‌ها عضو اصلی گروه پروبیوتیک‌ها هستند. پروبیوتیک‌ها باکتری‌هایی هستند که مصرف میزان مناسب آن‌ها موجب حفظ سلامتی انسان می‌شود. در واژن زنان سالم، لاکتوباسیل‌ها گلیکوژن تولید شده توسط سلول‌های مخاط واژن را به گلوکز و سپس به اسید لاکتیک تبدیل می‌کنند و اسید لاکتیک تولید شده با اسیدی کردن محیط واژن سد دفاعی قابل توجهی جهت جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن ایجاد می‌کند. برخی از لاکتوباسیل‌ها نیز علاوه بر اسید لاکتیک، ماده ضد عفونی کننده طبیعی دیگری به نام پراکسید هیدروژن تولید می‌کنند که سبب تقویت مضاعف دفاع واژن می‌شود. هر گونه اختلال در میزان لاکتوباسیل‌های واژینال و یا ترکیب آن‌ها می‌تواند منجر به

هر منطقه از بدن انسان دارای مجموعه‌ای منحصر به فرد از میکروارگانیسم‌ها است. اگرچه در گذشته بیش‌تر تمایل داشتند که با مشخص کردن عامل اتیولوژیک بیماری‌های عفونی سلامتی انسان را حفظ کنند و موجب جلوگیری از ابتلا به بیماری شوند، اخیراً مشخص شده است که میکروارگانیسم‌های بومی و در واقع، رابطه دو طرفه بین آن‌ها و میزبان انسانی نقش مهم‌تری در حفظ سلامتی و بهداشت انسان دارد. در این رابطه همزیستی، انسان به عنوان یک میزبان فشار انتخابی قوی بر تعیین نوع میکروارگانیسم‌ها در مناطق مختلف بدن اعمال می‌کند و در مقابل، میکروارگانیسم‌های انتخاب شده موجب حفظ فیزیولوژی طبیعی انسان می‌شوند. عملکردهای این میکروارگانیسم‌ها بسیار متنوع می‌باشد که از جمله آن‌ها: حفظ تعادل سیستم ایمنی بدن و فعالیت‌های متابولیک، کاهش خطر ابتلا به سرطان و کمک به فعالیت‌های گوارشی و جلوگیری از دیابت و چاقی می‌باشد. از این رو، مشخص کردن طیف و نوع میکروارگانیسم‌های بومی انسانی و درک عملکرد اکولوژیک آن‌ها، موجب درک بهتر علت تفاوت

* گروه ژنتیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

فرد آزمایش کننده و زمان طولانی لازم برای انجام برخی آزمایشات تشخیصی و در نهایت ابهام آمیز بودن پاسخ برخی آزمایش‌ها می‌باشند. به طور مثال آزمایشات قندی که برای تشخیص گونه لاکتوباسیل‌ها انجام می‌شود نیاز به چندین نوع قند دارد که گران قیمت و وارداتی هستند و حداقل یک هفته وقت لازم است تا آزمایش تکمیل شود و البته بعد از اتمام مراحل بیوشیمیایی باز هم تشخیص قطعی نخواهد بود. از این رو، امروزه با توجه به محدودیت‌ها و مشکلات روش‌های بیوشیمیایی، در اغلب کشورها روش‌های مولکولی مناسب‌تر و دقیق‌تر جایگزین روش‌های قبلی شده‌اند. روش‌های مولکولار ژنتیکی که برای تشخیص لاکتوباسیل‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند متعدد هستند اما در کشور ما هنوز این روش‌ها به صورت محدود مورد استفاده قرار می‌گیرند و نمی‌توانند به سرعت و در یک مخلوط باکتریایی انواع لاکتوباسیل‌ها را مشخص کنند. در این راستا، در این مطالعه تلاش شد که با بررسی دقیق‌تر ژنوم باکتری‌ها، روش مولکولی دقیق‌تر و ارزان‌تری جهت تشخیص لاکتوباسیل‌های واژینال طراحی شده و باکتری‌های واژینال زنان ایرانی مشخص شود.

روش بررسی

تشخیص ژنتیکی: DNA نمونه مخلوط توسط کیت DNG plus شرکت سیناژن خالص سازی شده و سپس به روش Multiplex PCR و بدون نیاز به جداسازی گونه‌ها و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، گونه لاکتوباسیل‌های واژینال مشخص شد.

نمونه‌گیری: نمونه‌گیری توسط سواب استریل از ناحیه اگزوسرویکس و واژن زنان سالم مراجعه‌کننده به درمانگاه بیمارستان سرپایی زنان بیمارستان امام خمینی و چند مطب خصوصی جمع‌آوری شد. زنان سالم افرادی در نظر گرفته می‌شدند که هیچ شکایتی از عفونت نداشتند و در معاینه نیز علائم عفونت واژینال نداشتند ضمناً برای تمام نمونه‌ها رنگ‌آمیزی گرم انجام شد و بر اساس درجه‌بندی Nugent سالم بودن نمونه‌ها تایید و موارد غیر سالم از مطالعه حذف شد.

بررسی آماری: پس از مشخص شدن نوع لاکتوباسیل‌ها توسط نرم‌افزار SPSS بررسی آماری انجام شد.

یافته‌ها

ترکیب اصلی لاکتوباسیلوس‌های نمونه‌های سواب ۱۰۰ زن سالم در سنین باروری مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج در جدول ۱ ارایه شده است:

عفونت‌های مختلف ادراری تناسلی از جمله واژینوز باکتریال، بیماری‌های مقاربتی و یا ابتلا به ایدز شود. واژینوز باکتریال نوعی عفونت واژینال است که در آن فلور طبیعی واژن مختل شده و تعداد لاکتوباسیل‌های طبیعی در اثر افزایش بیش از حد باکتری‌های بی‌هوازی مختلف کاهش می‌یابد. این بیماری در زنان در سن باروری شایع بوده و ممکن است با ترشحات واژینال بدبو همراه باشد، اگرچه در بسیاری از زنان نیز بدون علامت است. اگرچه این بیماری موجب نازایی زنان می‌شود، در افراد باردار نیز می‌تواند موجب اختلالات پری‌ناتال از جمله تولد زودرس نوزاد و کوریوآمیونیوت شود که این بیماری‌ها ارتباط نزدیکی با مرگ و میر و معلولیت‌های نوزادان در سراسر جهان دارند. امروزه درمان‌های دارویی واژینوز باکتریال در بازگرداندن فلور طبیعی واژن موفق نبوده‌اند و علاوه بر ایجاد عوارض جانبی موجب ظهور سویه‌های مقاوم در برابر دارو و یا عود بیماری شده‌اند. با توجه به این مطلب، راهکار پیشنهادی بعدی استفاده از محصولات پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیل‌ها به عنوان جایگزینی مناسب جهت پیشگیری و درمان عفونت‌های ادراری تناسلی است چرا که این روش درمانی همراه با حفظ تعادل فلور طبیعی ادراری تناسلی و حفظ توانایی باروری زنان می‌باشد. به تازگی، مطالعات متعدد طیف میکروبی فلور واژن را در کشورهای مختلف با استفاده از روش‌های متفاوت بررسی کرده‌اند. در اغلب این مطالعات یک فرضیه اصلی مورد بررسی قرار گرفته است و این فرضیه این است که آیا تفاوت در ترکیب گونه‌های باکتریایی واژن جوامع مختلف می‌تواند موجب مستعد شدن برخی افراد به واژینوز باکتریال و یا بیماری‌های عفونی و یا غیر عفونی از جمله سرطان شود. پیش از این، انواع مختلفی از میکروب‌های واژینال در زنان سالم جوامع مختلف گزارش شده‌اند و مشخص شده که طیف و نوع آن‌ها در مناطق مختلف تفاوت قابل توجهی دارند. با توجه به این‌که تاکنون چنین بررسی در کشور ما انجام نشده بود، ما در این مطالعه لاکتوباسیل‌های واژینال زنان سالم ایرانی را مشخص کرده و انواع آن‌ها را با فلور طبیعی زنان سالمی که از نژادها و کشورهای دیگر مورد مطالعه قرار گرفته بودند مقایسه قرار دادیم تا تعیین کنیم که آیا طیف باکتری‌های واژینال زنان ایرانی با دیگر نژادها متفاوت هستند یا خیر. در کشور ما روش‌های متعارف تشخیص باکتری‌ها بر پایه تشخیص بیوشیمیایی هستند که محدودیت‌های فراوانی دارند. این محدودیت‌ها شامل ضرورت انجام چندین مرحله آزمایش، نیاز به وسایل خاص و مواد گران‌قیمت، نیاز به مهارت و دقت بالای

جدول-۱: پرایمرهای اختصاصی لاکتوباسیل‌ها

Lactobacillus	Forward primer	Reverse primer
<i>L. acidophilus</i>	TGCAAAGT GGTAGCGTAAGC	CCTTTCCCTCACGGTACTG
<i>L. jensenii</i>	AAGAAGGCACCTGAGTACGGA	CCTTTCCCTCACGGTACTG
<i>L. crispatus</i>	AGGATATGGAGAGCAGGAAT	CAACTATCTCTTACACTGCC
<i>L. gasseri</i>	AGCGACCGAGAAGAGAGAGA	TGCTATCGTTCAAGTGCTT
<i>L. paracasei</i>	CTAGCGGGTGGCGACTTTGTT	GGCCAGCTATGTATCACTGA
<i>L. rhamnosus</i>	CTAGCGGGTGGCGACTTTGTT	GCGATGCGAATTCTATTATT
<i>L. salivarius</i>	AATCGCTAAACTCATAACCT	CACTCTCTTTGGCTAATCTT
<i>L. reuteri</i>	CAGACAATCTTTGATTGTTTAA	GCTTGTGGTTTGGGCTCTTC
<i>L. plantarum</i>	ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT	CCTGAAGTGAAGAAATTGA
<i>L. fermentum</i>	ACTAAGTGGACTGATCTACGA	TTCAGTCTCAAGTAATCATC
<i>L.iners</i>	ACAGGGGTAGTAAGTACCTTTG	ATCTAATCTCTTAGACTGGCTATG

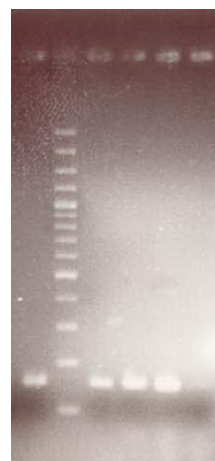
L. jensenii را به عنوان انواع شایع معرفی کرده‌اند^۲ و نتایج ما با نتایج سال‌های اخیر شباهت مشخصی دارد. در سال ۲۰۰۷ مطالعاتی در کشور بلژیک انجام شده که انواع لاکتوباسیل‌های شایع را *L. vaginalis*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, *L. iners* ذکر کرده‌اند.^۳

در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۰۹ در کشور هند *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. plantarum* شایع‌تر گزارش شده‌اند که با نتایج دیگران تفاوت واضحی دارد.^۴ در مطالعه‌ای دیگر در سال ۲۰۱۰ در کشور ژاپن لاکتوباسیل‌های شایع *L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri* ذکر شده‌اند^۱ و این گونه‌ها مشابه نتایج به دست آمده از بررسی زنان سفید پوست و سیاه‌پوست امریکای شمالی است.^۵ البته در مطالعاتی که این چهار گونه ذکر شده‌اند هم درصد آن‌ها متفاوت ذکر شده است، به طور مثال در کشور چین این درصدها به این ترتیب هستند: (*L. iners* ۶۸٪) (*L. jensenii* ۴۳٪) (*L. gasseri* ۸۵٪) (*L. crispatus* ۹۴٪) و در زنان سالم باردار کشور ژاپن بدین ترتیب: (*L. iners* ۳۹/۸٪) (*L. gasseri* ۳۳/۷٪) (*L. crispatus* ۲۹/۶٪) (*L. jensenii* ۶۱/۲٪).

تمام این شواهد نشان‌دهنده این است که تفاوت‌ها و شباهت‌های جالب توجهی میان گونه‌های لاکتوباسیلی شایع در جوامع مختلف وجود دارد و در هر نژاد با توجه به داشتن شرایط ژنتیکی و محیطی خاص، میکروارگانیسم‌های مشخصی توانایی رقابت و کلونیزاسیون در محیط واژن را دارند. با توجه به این که شواهد متعددی مبنی بر نقش حیاتی لاکتوباسیل‌ها در ارتقا سلامت و بهداشت فردی از طریق جلوگیری از ابتلا به بیماری‌های عفونی و غیر عفونی از جمله سرطان وجود دارد، مشخص شدن نوع لاکتوباسیل‌های بومی در کشور ما می‌تواند در انتخاب نوع مناسب لاکتوباسیل جهت مصرف پروبیوتیکی نقش موثری داشته باشد.

جدول-۲: درصد لاکتوباسیل‌های شایع در زنان سالم ایرانی

lactobacillus	percents
Acidophilus	۳۰
jensenni	۳۰
gasseri	۳۰
crispatus	۶۷
rhamnosus	۳۰
paracasei	۲۰
iners	۵۰



شکل-۱: تصویر نتیجه یک PCR اختصاصی

بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی‌های انجام شده در کشورهای مختلف، انواع لاکتوباسیل‌های موجود در فلور طبیعی واژن زنان تفاوت‌های مشخصی دارند. نتایج مطالعه ما نیز با نتایج به دست آمده از زنان دیگر کشورها و نژادها تفاوت‌ها و شباهت‌های جالب توجهی دارد. در حدود ۱۵ سال پیش طیف میکروبی شایع شامل *L. acidophilus* and *L. fermentum*, followed by *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. iners*, and *L.* مولکولی در سال‌های اخیر،

Abstract:

Vaginal lactobacilli determination in Iranian population by molecular analysis

**Motevaseli E. M.D., Ph.D.^{*}, Shirzad M. M.Sc.^{*}, Hasheminasb S. M. M.D.^{*}, Modarressi
M. H. M.D., Ph.D.^{*}**

Introduction & Objective: The healthy human vaginal and cervical ecosystem is dominated by *Lactobacillus* species. Lactobacilli represent sources of beneficial organisms termed probiotics. Probiotics are defined as live micro-organisms which confer a health benefit on the host when administered in adequate amounts. Lactobacilli metabolic products, such as hydrogen peroxide (H₂O₂), lactic acid, and bacteriocins are believed to play an important role in maintenance of the normal vaginal flora by inhibiting colonization of other pathogens. In this study we examined the prevalence of vaginal lactobacilli in healthy women by molecular analysis. The determination of the most common lactobacilli in healthy women would be important to specify the appropriate one to be used as a probiotic.

Key Words: Vaginal lactobacilli, probiotics, Multiplex PCR.

^{*} *Medical Genetics Department .Tehran University of Medical Sciences .Tehran, Iran.*

References:

1. Zhou, X., M.A. Hansmann, C.C. Davis, et al., The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010. 58(19912342): p. 169-181.
2. Nam, H., K. Whang and Y. Lee, Analysis of vaginal lactic acid producing bacteria in healthy women. *J Microbiol*, 2007. 45(18176534): p. 515-520.
3. Vitali, B., C. Pugliese, E. Biagi, et al., 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(17644631): p. 5731-5741.
4. Garg, K.B., I. Ganguli, R. Das, et al., Spectrum of *Lactobacillus* species present in healthy vagina of Indian women. *Indian J Med Res*, 2009. 129(19692744): p. 652-657.
5. Zhou, X., C.J. Brown, Z. Abdo, et al., Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J*, 2007. 1(18043622): p. 121-133.
6. Yan, D.-h., Z. Lu and J.-r. Su, Comparison of main *Lactobacillus* species between healthy women and women with bacterial vaginosis. *Chin Med J (Engl)*, 2009. 122(19951608): p. 2748-2751.
7. Tamrakar, R., T. Yamada, I. Furuta, et al., Association between *Lactobacillus* species and bacterial vaginosis-related bacteria, and bacterial vaginosis scores in pregnant Japanese women. *BMC Infect Dis*, 2007. 7(17986357): p. 128-128.