مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شهید صدوقی یزد
سال یازدهم ، شماره سوم ، پاییز ۱۳۸۲ ، ص ۵۹
Archive of SID

بررسی کاهش کلونیزاسیون اشرشیاکلی آنتروتوکسینوژنیک توسط لاکتوباسیلوس کازئی در مدل آزمایشگاهی (In vivo)

دکتر علی فاضلی [۱] ، دکتر حاجیه قاسمیان‌صفائی [۲] ، رضا میرنژاد [۳]

چکیده

مقدمه: لاکتوباسیلوس کازئی نوعی باکتری است که همراه فرآورده‌های شیر مورد استفاده قرار می‌گیرد و برای انسان بیماری‌زا نمی‌باشد. اشرشیاکلی آنتروتوکسینوژنیک بعنوان یکی از باکتریهای عمدهٔ مولد اسهال مسافرین و اسهال کودکان محسوب می‌گردد. در این مطالعه کاربرد لاکتوباسیلوس کازئی به عنوان ارگانیسم پروبیوتیک و به منظور کاهش کلونیزه شدن اشرشیاکلی آنتروتوکسینوژنیک مورد بررسی قرار گرفته است. **روش بررسی :** موشهای Balb/c چهار هفته‌ای به دو گروه آزمون و یک گروه شاهد تقسیم شدند. درحالی که به گروه شاهد، باکتری پروبیوتیک خورانده نشد یکی از گروه‌های آزمون ۳ روز و دیگری ۶ روز باکتری پروبیوتیک را دریافت کردند. ۷۲ ساعت پس از دریافت آخرین تجویز خوراکی پروبیوتیک، به هر سه گروه اشرشیاکلی آنتروتوکسینوژنیک خورانده شد. اندازه‌گیری تعداد باکتریهای اشرشیاکلی دفع شده از موشها در زمانهای تعیین شده به عنوان معیار کلونیزاسیون باکتری پاتوژن تلقی گردید. **نتایج :** نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که هردو گروه موش آزمون، چه آنهائیکه باکتری پروبیوتیک را به مدت ۳ روز و چه آنهایی که ۶ روز دریافت کرده‌اند، در مقایسه با گروه شاهد، تعداد کمتری از باکتریهای اشرشیاکلی آنتروتوکسینوژنیک را در رودهٔ خود کلونیزه می‌کنند ($P=0.001$). مقایسهٔ دو گروه آزمون نشان داد که دریافت طولانی‌تر باکتری پروبیوتیک موجب کاهش بیشتر کلونیزاسیون باکتری پاتوژن می‌گردد.**نتیجه گیری :** با توجه به مطالعهٔ حاضر می‌توان لاکتوباسیلوس کازئی را به عنوان کاندیدای پروبیوتیک در جهت پیشگیری از ابتلا به اسهال ناشی از اشرشیاکلی آنتروتوکسینوژنیک پیشنهاد کرد.

واژه های کلیدی : پروبیوتیک ، لاکتوباسیلوس کازیی ، اشرشیاکلی انتروتوکسینوژن

مقدمه

اشرشیاکلی آنتروتوکسینوژنیک یکی از عوامل مهم مولد اسهال مسافرتی و اسهال کودکان محسوب می‌گردد که بویژه در کشورهای در حال توسعه بسیار شایع است. این باکتری با تولید آنتروتوکسین‌های حساس و مقاوم به حرارت موجب بهم خوردن شرایط اسموتیک روده و بروز اسهال می‌گردد. اولین گام در روند پاتوژنیسیته این باکتری استقرار آن در رودهٔ کوچک می‌باشد[۱]. استفاده از آنتی‌بیوتیک برای درمان اغلب اسهالها از جمله اسهال ناشی از این باکتری به دلیل مقاومت دارویی و

۱- دانشیار گروه میکروبیولوژی
۲-استادیار گروه میکروبیولوژی
۳-مربی گروه میکروبیولوژی بقیه‌ا...
۱و۲- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی اصفهان
۳- دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... تهران

www.SID.ir

Archive of SID

بهم خوردن فلور طبیعی روده و مزمن شدن اسهال توصیه نمی‌گردد. از سوی دیگر برای پیش‌گیری از این نوع اسهالها واکسن مناسبی نیز در دسترس نیست. بنابراین مهار کلونیزه شدن باکتری در روده، با استفاده از پدیدهٔ آنتاگونیسم می‌تواند به عنوان راه حل مناسبی در جهت پیش‌گیری از ابتلا به این نوع اسهالها مورد بررسی قرار گیرد[۲].

واژهٔ پروبیوتیک به میکروارگانیسم‌هایی اطلاق می‌شود که ظاهراً بی‌خطر می‌باشند و استقرار آنها در بافت زندهٔ انسان و حیوان بصورت آنتاگونیستیک در مقابله با پاتوژنها عمل کرده و از بیماری‌زایی آنها جلوگیری می‌کند. از جمله این نوع میکروارگانیسم‌ها می‌توان به لاکتوباسیلها، ساکارومیسس‌ها، بیفیدوباکتریها، آنتروکوکها و کلاستریدیومها اشاره کرد[۲،۳].

در مطالعهٔ Akalin و همکاران نشان داد که مصرف ماست حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در موش میزان LDL کلسترول را کاهش می‌دهد و میزان کلی‌فرم‌ها در موش‌هایی که ماست اسیدوفیلوس‌دار مصرف کردند خیلی کمتر از موش‌هایی بود که فقط ماست دریافت کرده بودند[۸].

در تحقیق دیگری Zhao و همکارانش به اثر کاهش حامل بودن اشرشیاکلی 0157:H7 در گاو توسط پروبیوتیک اشاره کردند. آنها در مطالعهٔ خود نتیجه گرفتند که مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها حامل بودن گاوها را نسبت به اشرشیاکلی کاهش داده و مانع از کلونیزاسیون آن در دستگاه گوارش گاو می‌گردد[۵].

همانند تحقیق حاضر تاکنون در ایران انجام نشده است ولی مطالعهٔ مشابه این تحقیق در سال ۱۹۹۷ توسط کبیر و همکارانش انجام شده که در روش کار و انتخاب حیوان آزمایشگاهی با مطالعه ما مشابه بود ولی مطالعهٔ اکثر آنها برروی اثر بازدارندگی لاکتوباسیلوس سالیواریوس از کلونیزاسیون هلیکوباکترپیلوری در موش نژاد Balb/c انجام گرفته است[۴].

هدف از این مطالعه بررسی توان لاکتوباسیلوس کازئی، بعنوان یک ارگانیسم پروبیوتیک، در کاهش کلونیزاسیون اشرشیاکلی آنتروتوکسینوژنیک در رودهٔ موش بعنوان مدل آزمایشگاهی می‌باشد.

روش بررسی

این پژوهش یک مطالعهٔ تجربی می‌باشد که ابتدا به موشها غذای استریل همراه با آنتی‌بیوتیک خورانده شد سپس لاکتوباسیلوس گازئی داده شد و بعد به همهٔ گروهها باکتری پاتوژن اشرشیاکلی توکسینوژن تلقیح گردید و میزان دفع اشرشیاکلی با کلنی‌کانت کردن مدفوع مشخص گردید.

تهیه و آماده‌سازی لاکتوباسیلوس: سویهٔ لاکتوباسیلوس کازیی که به صورت لیوفیلیزه بود از آزمایشگاه رفرانس سازمان پژوهشهای علمی ایران تهیه گردید. پودر این باکتری ابتدا در بافر PBS حل شده و پس از تلقیح به محیط MRS broth (خریداری شده از شرکت BBL) در شرایط بیهوازی (گاز پک) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ^{oc} ۳۷ انکوبه گردید. سپس با سانتریفیوژ کردن (۲۰ دقیقه، ۲۰۰۰ rpm) باکتریها بصورت رسوب از محیط جدا گردیده با بافر PBS ترکیب شده و جهت شستشوی باکتری‌ها سه بار این عمل تکرار شد و پس از آن باکتری‌ها ابتدا در ۰/۵ میلی‌لیتر PBS حل گردیده و سپس غلظت آن با استفاده از طول موج ۶۳۰ نانومتر اسپکتروفتومتر به OD-0.5 که معادل 1×10^{8} cfu/ml می باشد رسانده شد. سوسپانسیون باکتری در لوله‌های ۲ میلی‌لیتری تقسیم شده و برای خورانده شدن به موش نگهداری شد[۴۵].

تهیه و آماده‌سازی اشرشیاکلی: اشرشیاکلی آنتروتوکسینوژنیک سروتایپ O114 از آزمایشگاه رفرانس بوعلی تهران تهیه و ابتدا برروی محیط مکانیکی کشت داده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ^{oc} ۳۷ از کلنی های رشد یافته را از طریق تستهای بیوشیمیایی، تخمیر قندها و تستهای IMViC و استفاده از آنتی‌سرم‌های اختصاصی تأیید کرده و مجدداً برروی محیط TSB برده و به مدت ۱۲ ساعت در ^{oc} ۳۷ انکوبه گردید. به شیوه‌ای که قبلاً شرح داده شد غلظت این باکتری نیز به 1×10^{8} cfu/ml رسانده شده و برای خوراندن به موش نگهداری گردید[۴۵].

انتخاب موش و خوراندن باکتریها به آنها: موشهای Balb/c نر که سنی حدود ۴ هفته داشتند از انستیتوپاستور تهیه شده و هرکدام در قفسی جداگانه نگهداری می‌شدند. در دو هفتهٔ اول به آنها غذا و آب استریل به همراه آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین به

www.SID.ir

Archive of SID

غلظت ۰/۳ گرم در لیتر داده می‌شد [۴،۶]. مدفوع انها را در ظرفهای استریل جمع‌آوری کرده و در محیط‌های کشت مکانیکی و MRS کشت داده و بعد از ۲ هفته تعداد لاکتوباسیلوس‌ها و اشرشیاکلی در حد هزار در یک گرم مدفوع موش کاهش می‌یابد و برگشت به حالت فلور اولیه حدود ۲ هفته طول می‌کشد که در این مدت امکان تحقیق فراهم شد.

موشها به سه گروه تقسیم شدند، در دو گروه آزمون هرکدام ۴ موش و یک گروه شاهد ۸ تائی. به گروه آزمون اول، با استفاده از سرنگ استریل، ۶ روز پی‌درپی هر بار ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون لاکتوباسیلوس با غلظت 1×10^{8} cfu/ml خورانده شد. به گروه دوم همین مقدار باکتری و لی به مدت ۳ روز متوالی خورانده شد. در این مرحله به گروه شاهد باکتری داده نشد.

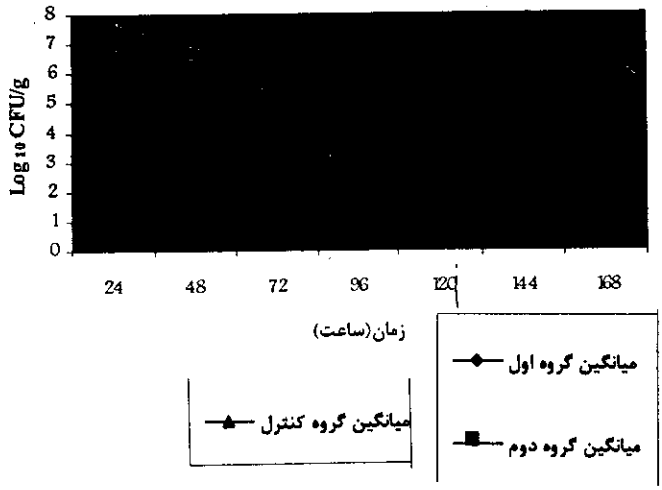
۷۲ ساعت پس از آخرین خوراک لاکتوباسیلوس کازئی، این بار به هر سه گروه موش هرکدام ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اشرشیاکلی آنتروتوکسینوژنیک با غلظت 1×10^{8} cfu/ml خورانده شد. برای تعیین کلونیزه شدن باکتری پاتوژن، از میزان دفع این باکتری از روده حیوان و با انجام کلنی کانت مدفوع در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ ساعت پس از خوراندن اشرشیاکلی در روی محیط مکانیکی، استفاده شد [۴،۵].

در مدت بررسی دفع اشرشیاکلی انتروتوکسینوژن از مدفوع موشها وجود لاکتوباسیلوس در زمانهای متفاوت به صورت کیفی با کشت مدفوع در محیط روگدزا (خریداری شده از شرکت دیفکو) بررسی شد. برای آنالیز نتایج، از روشهای آماری Non - parametric شامل Mann-Whitney, U Test (برای گروههای غیروابسته) و Wilcoxon (برای گروههای وابسته) و برای بررسی اختلاف میانگین در بین گروهها، از آزمون آماری Kruscal-wallis استفاده شد [۵].

نتایج

میزان دفع اشرشیاکلی آنتروتوکسینوژنیک در گروه شاهد که باکتری پروبیوتیک دریافت نکرده بودند در جدول (۱) نشان داده شده است. همانگونه که ملاحظه می‌شود باکتری در رودهٔ موش ساکن شده و پس از کاهش اولیه استقرار باکتری ادامه پیدا می‌کند و همینطور نشان دهندهٔ میزان دفع اشرشیاکلی از دو گروه موش آزمون می‌باشد. میزان دفع از گروه اول که به مدت ۶ روز باکتری پروبیوتیک را دریافت کرده‌اند به طور معنی‌داری از گروه دوم که ۳ روز از پروبیوتیک استفاده کرده‌اند کمتر می‌باشد (در ۲۴ ساعت اول p=0.043 و برای ساعات بعدی p=0.021).

نمودار (۱) نتایج حاصل از شمارش میانگین باکتریهای دفع شده از دو گروه آزمون و گروه شاهد را در زمانهای متفاوت نشان می‌دهد. میانگین میزان دفع باکتری از گروه آزمون یک در مقایسه با گروه شاهد به مراتب پائین‌تر و معنی‌دارتر می‌باشد(p=0.001).



نمودار ۱ : مقایسه شمارش کلنی کانت E..Coli آنتروتوکسیژنیک در مدفوع موشهای گروه آزمون و کنترل در فواصل زمانی مختلف برحسب $Log_{10}CFU/g$

جدول ۱: نتایج حاصل از مقایسهٔ بین میانگین‌های شمارش کلنی‌های اشرشیاکلی آنتروتوکسینوژنیک در مدفوع موشهای گروههای آزمون اول، دوم و کنترل برحسب CFU/gr

زمان(ساعت) / گروه	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶	۱۲۰	۱۴۴	۱۶۸
آزمون اول	6×10^{5}	5×10^{4}	5×10^{2}	6×10^{2}	4×10^{2}	1×10^{2}	5×10^{1}
آزمون‌دوم	6×10^{6}	1×10^{6}	2×10^{5}	2×10^{4}	1×10^{4}	2×10^{3}	1×10^{3}
کنترل	4×10^{7}	6×10^{6}	1×10^{6}	5×10^{5}	4×10^{5}	2×10^{5}	1×10^{5}

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

خاصیت آنتاگونیستی بین باکتریها اول بار توسط پاستور و جویرت در سال ۱۸۷۷ مطرح شد و بدنبال آن مچنیکوف در سال ۱۹۰۸ برای نخستین بار از باکتریهای مولد اسیدلاکتیک در درمان عفونتهای دستگاه گوارش استفاده کرد[۳]. اسهال مسافرتی و اسهال کودکان که اکثراً ناشی از اشرشیا آنتروتوکسی ژنیک می‌باشد در کشورهای در حال توسعه بسیار شایع است. استفاده از آنتی‌بیوتیک در درمان این نوع اسهالها به دلیل مقاومت دارویی از یک سو، و طولانی و مزمن شدن دوره اسهال که در رابطه با مصرف آنتی‌بیوتیک می‌باشد، از سوی دیگر، توصیه نمی‌گردد. بدین ترتیب اخیراً نظریهٔ درمان و پیشگیری با شیوه‌های طبیعی مانند استفاده از ارگانیسم‌های پروبیوتیک که هم به آسانی در دسترس بوده و هم ارزان قیمت است و درضمن فاقد عوارض جانبی همانند آنتی‌بیوتیکها هستند، قوت بیشتری گرفته است. اگر امکان استقرار ارگانیسم‌های بی‌ضرر ولی دارای قدرت مقابله با باکتریهای پاتوژن (پروبیوتیکها) در بافتهای انسان وجود داشته باشد، میتوان از این طریق از کلونیزه شدن و عفونت در این اندامها جلوگیری کرد[۱].

لاکتوباسیلها باکتری‌های بی‌آزار برای انسان و حیوان می‌باشند به مقدار فراوان در محصولات تخمیری و فرآورده‌های شیر وجود دارند و قدرت اتصال آنها به سلولهای اپی‌تلیال دستگاه گوارش انسان و حیوان نشان داده شده است و در چسبیدن به رسپتورهای سطوح اپی‌تلیوم با دیگر باکتریها رقابت می‌کنند(۴). اتصال و استقرار اشرشیاکلی آنتروتوکسی ژنیک در دستگاه گوارش موش نیز قبلاً نشان داده شده است و لاکتوباسیلوس کازئی نیز قدرت استقرار و پایداری در دستگاه گوارش موش را دارد و کاندید خوبی به عنوان عامل پروبیوتیکی علیه اشرشیاکلی انتروتوکسینوژن محسوب می‌شود[۷،۱۱].

در این مطالعه از لاکتوباسیلوس کازئی بعنوان باکتری پروبیوتیک در جهت مقابله از استقرار عامل اسهال، اشرشیاکلی آنتروتوکسی ژنیک، در رودهٔ موش استفاده شد. تعداد باکتری‌های دفع شده پس از خوراندن به موش به عنوان نشانهٔ حضور آنها در محل تلقی شده و با شمارش آن به میزان حجم باکتریهای مستقر در رودهٔ حیوان پی برده شد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که اشرشیاکلی عامل اسهال، پس از کاهش جزئی اولیه از نظر تعداد در رودهٔ حیوان (گروه شاهد) ساکن شده و میزان استقرار آن در ساعتهای بعد، تقریباً بطور ثابت ادامه پیدا می‌کند(جدول ۱). مقایسهٔ تعداد باکتریهای دفع شده از ۳ گروه موش، بیانگر این است که میزان کلونیزه شدن باکتریهای پاتوژن در رودهٔ گروههای آزمون بطور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد می‌باشد (نمودار ۱). هنگامیکه میزان کلونیزه شدن باکتری در گروه اول (مصرف ۶ روز لاکتوباسیلوس) با گروه دوم (مصرف ۳ روز لاکتوباسیلوس) آزمون مقایسه شود ملاحظه می‌گردد که استقرار باکتری پاتوژن در رودهٔ گروه اول ۱۰ الی ۵۰۰ برابر کمتر از گروه دوم می‌باشد(جدول ۱). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مصرف طولانی لاکتوباسیلوس احتمالاً اثر بیشتری در جهت جلوگیری از کلونیزه شدن اشرشیا در روده موش باقی می‌گذارد[۱۱].

در مطالعه‌ای نظیر بررسی حاضر، قدرت بازدارندگی لاکتوباسیلوس سالیواریوس برروی کلونیزه شدن هلیکوباکترپیلوری در رودهٔ موش نشان داده شده و اشغال گیرنده‌های هلیکوباکتر توسط لاکتوباسیلوس به عنوان عامل بازدارندگی قلمداد شده است[۴].

در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده است که میزان کلی‌فرمها در مدفوع موشهائی که ماست حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مصرف کرده‌اند کمتر از موشهائی است که ماست بدون لاکتوباسیلوس مصرف کرده‌اند[۸]. در مطالعه حاضر اگرچه مکانیسم عمل لاکتوباسیلوس بررسی نشده است ولی با الهام از گزارشهای دیگر و با توجه به تشابهات شیوهٔ مطالعه به نظر می‌رسد که اشغال گیرنده‌ها، تولید مواد ضدباکتری، پائین آوردن PH محیط به تنهائی و یا مجموعه‌ای از عملکردهای فوق می‌تواند به عنوان مکانیسم بازدارندگی لاکتوباسیلوس کازیی از کلونیزه شدن اشرشیا فرض گردد[۱۲].

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه که در آن لاکتوباسیلوس کازئی بعنوان یک ارگانیسم پروبیوتیک از کلونیزه

www.SID.ir

Archive of SID

شدن اشرشیاکلی مولد اسهال در رودهٔ موش جلوگیری کرده است می‌توان پیش‌بینی کرد که روزی این تجربه به انسانها نیز تسری داده شود و پایه‌ای برای بیوتراپی در این نوع بیماریها قرار بگیرد.

References

1- Collie . L , Balows . A & Sussman . M . In Topley & Willson's Microbiology and Microbial Infections. Oxford Univ. Inc , New York . 1998 : 514-699.

2- Elmer . G . W , Surawicz . C . M & Mcfarland L. V. ***Biothrapeutic agents*** , Jama . 1996 , 275(11): 870-76.

3- Gorbach S. L. ***Lactic acid bacteria and human health*** , Anals , Of Medicine , 1990 , 22 : 37-41.

4- Kabir . A . M , Takagi . A . Y et al . ***Prevention of Helicobacter pylori infection by Lactobacilli in a gnotobiotic murine model.*** Gut , 1997 , 41 : 49-55.

5- Zhao . T , Doyle . M . P & Harmon . B. G. ***Reduction of carriage of Enterohemorragic Escherichia coli O157: H7 in cattle by inoculation with probiotic bacteria.*** J. Clin. Microbiol. 1998, 36(3) : 641-7.

6- Dwayne . C . S , Dubos . R . ***Alteration in the mouse cecum and its flora produced by anlibacterial drug.*** J. Exp. Med. 1986, 127: 97-110.

7- Deneke C. F, McGowan K., Thoren G. M. & Gorbach S. L. ***Attachment of ETEC to human intestinal cell.*** Infection & Immunity, 1983, 39(3): 1102-6.

8- Akalin A. S, Gone S. & Duzel S. ***Influence of yogurt and acidophitus yogurt on serum cholesterol levels in mice.*** J. Dairy Sci. 1997, 80(1): 2721-5.

9- A. Handani, D. Ratner, O. Doron. ***Probactrix probiotic in the prevention of infectious*** diarrhea of piglets, j. 2002.Vol. 57(4)

10- B. Kos, S. Vukovi, M. Impraga. ***Adhesion and agg regation ability of probiotic strain lactobacillus acidophilus M92.*** Jou. App. Micro. 2003, 94(6) 981-987.

11- Aloysius LD, Souza, C. Rajkumar, J. Cooke. ***Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhea: Meta analysis.*** BMJ2002, 324: 1361.

12- Role RD. ***The role of probiotic cultures in the contro of gastrointestinal Health.*** Jnutr. 2000, Feb; 130: 396-402.

www.SID.ir