تحقیقی

ارزیابی فعالیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری علیه باکتری‌های انتروپاتوژن به دو روش آزمایشگاهی و مدل حیوانی

دکتر محمد مهدی سلطان دلال*[۱و۲]، مریم کشت ورز[۳]، ثمین زمانی[٤]، لیلا شیرازی[٥]

۱- استاد بخش میکروب‌شناسی غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۲- استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ۳- دانشجوی دکتری رشته باکتری‌شناسی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

٤- دانشجوی دکتری رشته باکتری‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران. ٥- کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف : *پروبیوتیک‌ها ارگانیسم‌های مفیدی هستند که اثرات درمانی خود را با جایگزین کردن فلور میکروبی ایفا می‌کنند. اشریشیاکلی، شیگلا و سالمونلا انتریکا شایع‌ترین ارگانیسم‌های عامل عفونت‌های روده‌ای هستند که در نوزادان و کودکان در سراسر دنیا منجر به مرگ و میر می‌شوند. این مطالعه به منظور ارزیابی فعالیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری علیه باکتری های انتروپاتوژن به دو روش آزمایشگاهی و مدل حیوانی انجام شد.*

روش بررسی : *در این مطالعه تجربی اثر درمانی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC 4356 و لاکتو باسیلوس روتری ATCC 23272 روی باکتری‌های شیگلا سونئی ATCC 9290، اشریشیا کلی ATCC 25922 و سالمونلا انتریکا BAA-708 به دو روش in vitro (چاهک آگار) و in vivo (موش BALB/c) انجام شد. همچنین اثر این باکتری‌ها روی بهبود وزن و طول عمر در موش‌ها تعیین گردید.*

یافته‌ها : *ارزیابی in vitro و in vivo نشان داد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری دارای اثر پیشگیری کننده بر باکتری‌های بیماری‌زای روده‌ای هستند. در مدل حیوانی نیز استفاده از پروبیوتیک‌ها باعث افزایش بقا و وزن و کاهش میزان کلونیزاسیون پاتوژن‌ها گردید (P<۰/۰۵).*

نتیجه‌گیری : *مصرف لاکتوباسیلوس روتری و اسیدوفیلوس دارای اثر ضدمیکروبی بوده و می‌توان از آنها در پیشگیری و درمان بیماری‌های گوارشی استفاده نمود.*

کلید واژه‌ها : *پاتوژن‌های روده‌ای ، پروبیوتیک ، خاصیت ضدمیکروبی ، موش*

* نویسنده مسؤول : دکتر محمد مهدی سلطان دلال ، پست الکترونیکی msoltandallal@gmail.com

نشانی : تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی، مرکز تحقیقات میکربیولوژی مواد غذایی/ بخش میکروب‌شناسی غذایی، تلفن و نمابر ۸۸۹۹۲۹۷۱-۰۲۱

وصول مقاله : ۹۳/۸/۱۸ ، اصلاح نهایی : ۹٤/۲/۲۰ ، پذیرش مقاله : ۹٤/۳/۳۱

مقدمه

بیماری اسهال یکی از علل شایع مرگ و میر در کودکان به‌خصوص در کشورهای در حال توسعه است. به‌طوری که در سال ۲۰۱۰ بیش از ۷ میلیون کودک در سن کمتر از ۵ سال جان خود را از دست دادند که ۱۵درصد از این مرگ و میرها ناشی از اسهال بوده است (۱). شایع‌ترین ارگانیسم‌های مرتبط با اسهال شامل اشریشیاکلی، گونه‌های شیگلا، گونه‌های سالمونلا انتریکا، یرسینیا انتروکلی تیکا و گونه‌های کمپیلوباکتر است (۲).

درمان اصلی اسهال (ORS (oral rehydration solution و Zinc است و در موارد شدید همراه با آنها داروهای آنتی‌بیوتیک تجویز می‌گردد (۳). آنچه در این میان مطرح است مقاومت‌های دارویی چندگانه‌ای است که در این باکتری‌ها توسط پلاسمیدها ایجاد شده و موجب انتشار عفونت‌های مقاوم می‌شوند. در نتیجه پرداختن به راه‌کارهای درمانی جدیدتر و یا استفاده از روش‌های پیشگیری مناسب‌تر امری مهم به نظر می‌رسد (۴).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای مانند باکتری‌ها هستند که اگر به تعداد کافی مصرف گردند؛ با حفظ تعادل جمعیت میکروبی فلور طبیعی روده اثرات مطلوبی را بر سلامت مصرف

کننده می‌گذارند. این میکروارگانیسم‌ها با دارا بودن مکانیسم‌های مختلفی همچون ترشح مواد ضدمیکروبی، اثرات آنتاگونیستی با پاتوژن‌ها در اتصال به اپیتلیوم روده و کلونیزاسیون در سطوح مخاطی روده، ایجاد مقاومت در برابر استرس و تولید برخی آنزیم‌ها؛ می‌توانند منجر به اثرات سودمندی در پیشگیری و درمان بیماری‌ها از جمله بیماری‌های اسهالی گردند (۵و۶).

لاکتوباسیل‌های جدا شده از دستگاه گوارش انسان و محصولات لبنی تخمیر شده به‌عنوان باکتری‌های مفید درنظر گرفته شده‌اند و عمدتاً به‌علت خاصیت پروبیوتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷و۸). پروبیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل‌های غذایی میکروبی تعریف شده‌اند که با بهبود تعادل میکروبی روده، اثرات مفیدی روی میزبان (انسان یا حیوان) می‌گذارند. متداول‌ترین گونه‌های مورد استفاده در محصولات پروبیوتیک مربوط به گونه‌های لاکتوباسیل، بیفیدوباکتریوم و ساکارومایسیز است (۹و۱۰). پروبیوتیک‌ها با تولید عوامل ضدمیکروبی متنوع می‌توانند در درمان و پیشگیری انواعی از عفونت‌های روده‌ای ایجاد شده توسط شیگلا، سالمونلا، اشریشیاکلی، کلستریدیوم دیفیسل و روتا ویروس نقش موثری ایفا کنند (۱۱). در بین لاکتوباسیل‌ها، لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند. لاکتوباسیلوس روتری جزء گسترده‌ترین گونه‌های لاکتوباسیل در حیوانات و محدودترین گونه‌ها در روده انسان محسوب می‌گردد (۱۲و۱۳). این باکتری باعث تولید ترکیب ضدمیکروبی همچون ruterin (یک ترکیب β-hydroxypropionaldehyde (3-HPA)) می‌شود که در اثر تخمیر گلیسرول در شرایط بی‌هوازی تولید می‌شود و اثراتی با طیف گسترده در برابر باکتری‌های گرم مثبت و منفی و همچنین قارچ‌ها و تک‌یاخته‌ها دارد (۱۴و۱۵).

برخی از استرین‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به‌طور گسترده در درمان عفونت‌های گوارشی مورد استفاده قرار می‌گیرند. آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی ممکن است باعث از بین بردن باکتری‌های مفید از جمله لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس گردند. گاهی اوقات درمان با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به بیمارانی که تحت درمان با آنتی‌بیوتیک‌ها بوده‌اند؛ تجویز می‌شود. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA-5 باعث تولید bacteriocin CH5 می‌شود که دارای اثر ضدمیکروبی و مهارکنندگی در برابر سالمونلا تیفی موریوم، کمپیلوباکتر ژژونی و اغلب مخمرها و کپک‌هاست (۱۶). همچنین تولید اسید و کاهش pH بیشترین عوامل موثر در خاصیت ضدمیکروبی گونه‌های لاکتوباسیلوس هستند (۱۷).

از آن جایی که Cano و Perdigón خاصیت ممانعت‌کنندگی پروبیوتیک‌ها را از رشد انتریک پاتوژن‌ها در مدل حیوانی فقط با اعمال روش تجویز پروبیوتیک بعد از ایجاد آلودگی با پاتوژن‌ها انجام دادند؛ بهترین میزان اثر را دوره ۷ روز بعد از تجویز گزارش نمودند (۱۸). de LeBlanc Ade و همکاران (۱۹) با بررسی همین خاصیت در مدل حیوانی با اعمال تجویز پروبیوتیک به صورت قبل و بعد از آلودگی با پاتوژن‌ها نتایج بهتری نسبت به گزارشات Cano و Perdigón (۱۸) به دست آوردند. لذا در این مطالعه از روش تجویز پروبیوتیک به صورت قبل و بعد از آلودگی استفاده شد و فعالیت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری علیه باکتری‌های انتروپاتوژن شامل شیگلا سونئی ATCC 9290، سالمونلا انتریکا BAA-708 و اشریشیاکلی ATCC 25922 به دو روش آزمایشگاهی و مدل حیوانی ارزیابی گردید.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی گونه‌های استاندارد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC 4356و لاکتوباسیلوس روتری ATCC 23272 از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و بیماری‌زای ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه گردید. هر دو سویه بر روی محیط (MRS) Man-Rogosa-Sharpe کشت داده شدند و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه گردیدند. سویه‌های استاندارد شیگلا سونئی ATCC 9290، سالمونلا انتریکا BAA-708 و اشریشیاکلی ATCC 25922 به صورت کشت شده بر روی محیط نوترینت براث از بخش میکروب‌شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شدند و بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط هوازی انکوبه گردیدند. سپس شیرابه میکروبی برای انجام تست حساسیت از آنها تهیه شد (۲۰و۲۱).

خواص مواد ضدمیکروبی تولید شده توسط لاکتوباسیلوس‌ها علیه سویه‌های پاتوژن: میزان ۲ میکرولیتر از لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس رشد یافته در محیط BHI براث که به غلظت نیم مک فارلند رسیده بود؛ برداشته شد و به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر از محیط MRS براث + ۲۰ میلی مولار گلوکز اضافه گردید. سپس ارلن‌ها در دستگاه انکوباسیون شیکردار (BRUNSWICK, NEW N.J.,USA) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت محتویات ارلن‌ها به لوله‌های فالکون استریل منتقل شد و برای تهیه سوپرناتانت باکتری‌ها در دستگاه سانتریفوژ Model 3-30k Sigma (GmbH) به مدت ۷ دقیقه در دور ۵۰۰۰ rpm قرار گرفتند. سپس محلول رویی جدا شد و برای ادامه آزمایش نگهداری شد. برای بررسی اثر ضدمیکروبی از سوسپانسیون باکتری‌های پاتوژن، با سواپ استریل به محیط کشت XLD به طور یکنواخت تلقیح شد.

در نتیجه پلیت‌های حاوی کشت XLD و پاتوژن‌های مورد نظر به ضخامت ۷ میلی‌متر و کاملاً استریل آماده گردید. سپس مکان چاهک‌ها در پشت پلیت‌ها مشخص گردید تا فاصله بین چاهک‌ها در تمام پلیت‌ها یکسان باشد. پس از علامت‌گذاری مکان چاهک‌ها بر پشت پلیت‌ها، با استفاده از پیپت پاستورهای استریل که برای هر پلیت به‌طور جداگانه استفاده شد؛ چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد شد. به منظور جلوگیری از انتشار سوپر ناتانت پروبیوتیک‌ها از ته چاهک، ته چاهک‌ها با محلول مولتن آگار مذاب کاملاً مسدود شد. سپس از عصاره تهیه شده از پروبیوتیک‌ها به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در داخل هر چاهک ریخته شد؛ به طوری که سطح محلول با سطح محیط کشت در یک خط قرار گرفت. پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت قطر هاله عدم رشد به وسیله کولیس ورنیه اندازه‌گیری و گزارش شد. برای افزایش دقت و حساسیت هر آزمون ۳ بار تکرار گردید و از میانگین سه آزمون برای ارزیابی نتایج استفاده شد (۲۰و۲۱).

تهیه موش در مدل حیوانی: تعداد ۴۵ سر موش از نژاد BALB/c ماده شش هفته‌ای با وزن ۱۸-۱۶ گرم از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و به حیوانخانه دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران انتقال یافتند. موش‌ها به منظور سازگاری با محیط جدید و حصول اطمینان از عدم آلودگی و بیماری به مدت یک هفته تحت شرایط کنترل شده و استاندارد (دما ۲±۲۲ درجه سانتی‌گراد، ۲±۵۵ درصد رطوبت، چرخه نور-تاریکی ۱۲ ساعته و تغذیه با پلت استاندارد) نگهداری شدند.

نحوه تقسیم‌بندی حیوانات در گروه‌ها: موش‌ها در ۹ دسته ۵ تایی به‌صورت انتخاب‌های تصادفی قرار گرفتند. گروه‌ها بر حسب پروبیوتیک‌های تجویز شده و انتروباکتریاسه‌های عفونی کننده نام‌گذاری شدند. گروه‌ها شامل شیگلا-روتری، شیگلا-اسیدوفیلوس، شیگلا- کنترل، سالمونلا-روتری، سالمونلا-اسیدوفیلوس، سالمونلا-کنترل، اشریشیاکلی-روتری، اشریشیاکلی-اسیدوفیلوس و اشریشیاکلی-کنترل بود.

پس از تقسیم‌بندی، موش‌های هر گروه با اسید پیکریک علامت‌گذاری شدند تا در ثبت وزن موش‌ها در توالی‌های مکرر مشکلی ایجاد نشود.

تهیه رقت از لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس: دو سویه لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر روی محیط Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (مرک) کشت داده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه شدند. سپس کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط با PBS جمع‌آوری شدند و رقت معادل نیم مک فارلند از سویه‌ها تهیه شد (۲۲).

نحوه تجویز پروبیوتیک در گروه‌ها: گروه‌های دریافت کننده پروبیوتیک به مدت هفت روز قبل و ده روز پس از عفونی شدن با پاتوژن‌های مورد نظر، پروبیوتیک‌ها را بر حسب نام گروه دریافت کردند. به این صورت که آب آشامیدنی موش‌ها از رقت باکتریایی (پروبیوتیک)، برابر نیم مک فارلند تهیه شد و در قفس‌ها قرار گرفت. در قفس‌های سه گروه کنترل، ظرف آبخوری حاوی آب فاقد پروبیوتیک بود (۲۲).

تهیه رقت از سالمونلا انتریکا، شیگلا سونئی و اشریشیاکلی: پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون باکتری‌های پاتوژن بر روی محیط مولر هینتون آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط هوازی، کلنی‌ها رشد کردند. سپس از روی محیط با PBS جمع‌آوری شدند و سوسپانسون میکروبی از سالمونلا انتریکا با رقت 1×10^{8} CFU/ml، اشریشیاکلی با رقت 1×10^{8} CFU/ml تا 1×10^{10} و شیگلا سونئی با رقت 1×10^{3}CFU/ml به صورت مجزا به عنوان دوزهای مناسب عفونی کنندگی برای گروه‌ها تهیه شد.

نحوه عفونی کردن موش‌ها: با گذشت هشت روز از شروع تجویز پروبیوتیک‌ها، هر موش در گروه‌های مشخص شده به میزان ۲۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های پاتوژن را به صورت گاواژ معده‌ای و با استفاده از سوزن مخصوص گاواژ دریافت کرده و عفونی شدند (۲۲).

میزان کلونیزاسیون پاتوژن‌ها در روده بزرگ : پس از پایان روز هجدهم مطالعه تعداد ۲ سر موش از هر گروه به طور تصادفی انتخاب شدند و در شرایط کاملاً استریل و در زیر هود لامیلار با روش نخاعی کردن کشته شدند. سپس با استفاده از الکل، تمام بدن موش‌ها برای جراحی استریل شد. روده بزرگ از بدن موش‌ها خارج گردید و داخل لوله فالکون‌های استریل ۵۰ میلی‌لیتری که حاوی ۱۵ میلی‌لیتر آب پپتونه ۰/۱درصد قرار گرفت (۲۲). پس از تهیه سوسپانسیون از این ارگان، توالی از رقت‌ها ساخته شد و در محیط‌های مک کانکی آگار (مرک)و گزیلوزلیزین دزوکسی کولات آگار (XLD) (مرک) با استفاده از لوپ‌های استریل به صورت پور پلیت کشت داده شدند. برای بررسی میزان کلونیزاسیون سالمونلا ابتدا یک لوپ از سوسپانسیون این باکتری به مدت ۸ ساعت داخل محیط کشت انتخابی غنی شده و مایع سلنیت F (مرک)کشت داده و انکوبه شد. سپس بر روی محیط‌های مک‌کانکی آگار و XLD کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون تعداد کلنی‌های رشد کرده بر روی محیط شمارش و نتایج ثبت گردید. برای حصول اطمینان از باکتری‌های شمارش شده، برای کلنی‌ها تست‌های بیوشیمیایی مربوطه انجام شد.

اندازه‌گیری وزن موش‌ها: وزن موش‌ها از روز صفر مطالعه تا پایان روز ۲۵ هر سه روز یک بار و با استفاده از ترازوی دیجیتالی با حساسیت سه رقم اعشار توزین شد.

طول عمر موش‌ها: تعداد ۳ سر موش باقیمانده در هر گروه، برای بررسی طول عمر تا روز ۲۵ نگهداری شدند. برای این منظور موش‌ها به قفس‌های مجزا انتقال داده شدند. هدف از این کار ممانعت از مرگ در اثر خورده شدن توسط موش‌های هم قفس بود.

آنالیز آماری: داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-18 و آزمون کای اسکوئر تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از هاله عدم رشد ایجاد شده توسط لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در سه سویه استاندارد باکتریایی سالمونلا انتریکا، شیگلا سونئی و اشریشیاکلی در جدول یک آمده است.

جدول ۱ : اندازه قطر هاله عدم رشد در سه سویه استاندارد باکتریایی توسط لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

سویه‌ها	قطر هاله عدم رشد (میلی متر)	
	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	لاکتوباسیلوس روتری
شیگلا سونئی	۱۳/۶۶	۱۲/۵
سالمونلا انتریکا	۱۳	۱۱/۶۶
اشریشیاکلی	۱۲/۵	۱۱/۴

جدول ۲ : تعداد کلونی‌های شمارش شده در نمونه روده بزرگ گروه‌های آلوده شده با سالمونلا انتریکا، شیگلا سونئی و اشریشیاکلی در رقت 10^{-2}

نام گروه‌ها	تعداد کلنی
شیگلا-روتری	۲۰۰
شیگلا-اسیدوفیلوس	۱۶۰
شیگلا- کنترل	۸۸۰
سالمونلا-روتری	۱۲۸
سالمونلا-اسیدوفیلوس	۹۷
سالمونلا-کنترل	۲۷۰
اشریشیاکلی- روتری	۱۶۵
اشریشیاکلی-اسیدوفیلوس	۱۴۰
اشریشیاکلی-کنترل	۲۸۸

نتایج حاصل از کشت روده بزرگ در جدول ۲ آمده است. برای شمارش صحیح کلونی‌ها رقت 10^{-2} از بین رقت‌ها انتخاب گردید. تعداد کلونی‌های شمارش شده نشان داد لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس باعث کاهش میزان کلونیزاسیون در روده بزرگ موش شده است.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری وزن موش‌ها نشان‌دهنده افزایش وزن در گروه‌های دریافت کننده پروبیوتیک نسبت به گروه کنترل بود. طبق نتایج آماری گزارش شده در گروه عفونی شده با شیگلا، متغیر اندازه افزایش وزن در داخل هر گروه در سنجش‌های مکرر با هم تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۰۵). همچنین تغییرات اندازه افزایش وزن از اندازه گیری ۱ تا ۵ در داخل هر سه گروه تفاوت آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۴).

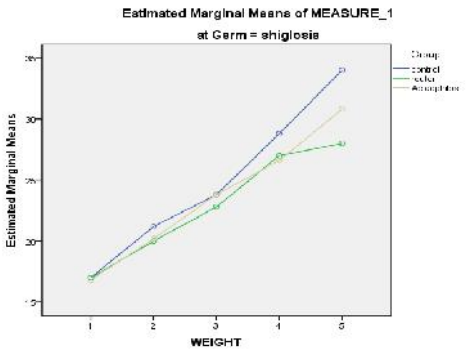
تغییرات افزایش وزن در بین سه گروه عفونی شده با شیگلا سونئی از نظر آماری معنی‌دار بود (نمودار یک) (P<۰/۰۰۱).

در گروه‌های عفونی شده با سالمونلا، متغیر افزایش وزن در داخل هر گروه در سنجش‌های مکرر با هم تفاوت آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱)؛ ولی تغییرات اندازه افزایش وزن از اندازه‌گیری ۱ تا ۵ در داخل هر سه گروه تفاوت آماری معنی‌داری نداشت.

در گروه عفونی شده با سالمونلا انتریکا تغییرات اندازه افزایش وزن در بین سه گروه مطالعه تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. تغییرات مربوط به افزایش وزن در دو گروه پروبیوتیک نزدیک به تغییرات به دست آمده در گروه کنترل بود (نمودار ۲).

در گروه عفونی شده با اشریشیاکلی، متغیر اندازه افزایش وزن در داخل هر گروه در سنجش‌های مکرر با هم تفاوت آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱). همچنین تغییرات اندازه افزایش وزن از اندازه‌گیری ۱ تا ۵ در داخل هر سه گروه تفاوت آماری معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۰۹).

نتایج نهایی از تغییرات اندازه افزایش وزن در بین سه گروه عفونی شده با اشریشیاکلی تفاوت آماری معنی‌داری داشت (P<۰/۰۹۵) و در آنها گروه دریافت کننده پروبیوتیک دارای افزایش وزن معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بود (نمودار ۳).

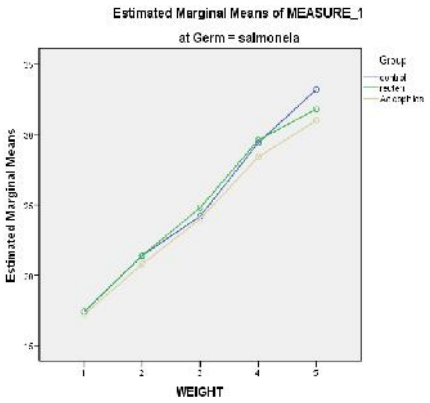


نمودار ۱ : مقایسه سه گروه (اسیدوفیلوس، روتری و کنترل) عفونی شده با شیگلا سونئی بر اساس تغییرات وزن در ۵ توالی اندازه‌گیری وزن

Estimated Marginal Means: روند افزایش وزن موش‌ها بر حسب گرم، Weight: توالی‌های اندازه‌گیری وزن موش‌ها

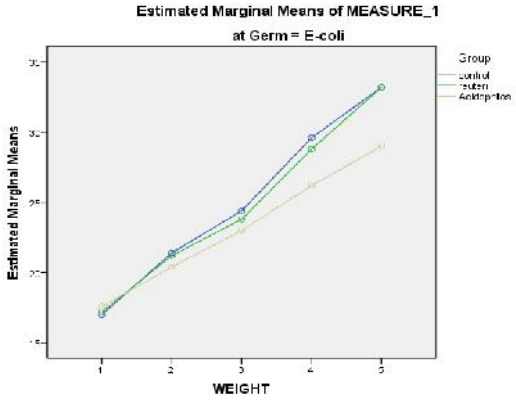
نگهداری موش‌ها تا روز ۲۵ مطالعه نشان داد که در این بازه زمانی هیچ‌گونه مرگ و میری در گروه‌های کنترل و دریافت کننده پروبیوتیک در گروه‌های عفونی شده با شیگلا و اشریشیاکلی اتفاق

نیفتاد و پس از این مدت، در گروه عفونی شده با سالمونلا انتریکا، یک مورد مرگ از ۳ مورد گزارش شد. این در حالی بود که هیچ‌یک از موش‌های گروه پروبیوتیک دچار مرگ نشده بودند. براساس آنالیز درصد بقا، مرگ در گروه کنترل ۳۰ درصد و در گروه پروبیوتیک صفر گزارش شد (P<۰/۰۵۲).



نمودار ۲ : مقایسه سه گروه (اسیدوفیلوس، روتری و کنترل) عفونی شده با سالمونلا انتریکا بر اساس تغییرات وزن در ۵ توالی اندازه‌گیری وزن

Estimated Marginal Means: روند افزایش وزن موش‌ها بر حسب گرم، Weight: توالی‌های اندازه‌گیری وزن موش‌ها



نمودار ۳ : مقایسه سه گروه (اسیدوفیلوس، روتری و کنترل) عفونی شده با اشریشیاکلی بر اساس تغییرات وزن در ۵ توالی اندازه‌گیری وزن

Estimated Marginal Means: روند افزایش وزن موش‌ها بر حسب گرم، Weight: توالی‌های اندازه‌گیری وزن موش‌ها

بحث

در این مطالعه اثر ضدمیکروبی سویه‌های استاندارد لاکتوباسیلوس روتری (ATCC 23272) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (ATCC 4356)در آزمایشگاه و روی مدل حیوانی بر روی سویه‌های استاندارد باکتری‌های شیگلا سونئی(ATCC 9290)، سالمونلا انتریکا (BAA-708) و اشریشیاکلی (ATCC 25922) آشکار شد. در مدل حیوانی نیز استفاده پروبیوتیک‌ها باعث افزایش بقا و وزن و کاهش میزان کلونیزاسیون پاتوژن‌ها گردید.

در مطالعه Spinler و همکاران اثر ضدمیکروبی چند سویه از لاکتوباسیلوس روتری جدا شده از لوله گوارشی انسان شامل سویه‌های (ATCC 55730, ATCC PTA 6475, ATCC PTA 4659, ATCC PTA 5289) بر روی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (ATCC 4356)، لاکتوباسیلوس کازئی (ATCC 334)، لاکتوباسیلوس گاسری (ATCC 33323)، لاکتوباسیلوس جانسونی (ATCC 33200)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (42/6) و سویه‌های انتریک پاتوژن جدا شده از نمونه‌های بیماران بیمارستان کودکان تگزاس شامل انتریک هموراژیک اشریشیاکلی، انتریک توکسی ژنیک اشریشیاکلی، سالمونلا انتریکا، شیگلا سونئی و ویبریو کلرا بررسی شد. نتایج گزارش شده بر روی انتریک پاتوژن‌ها نشان‌دهنده اثر ضدمیکروبی لاکتوباسیلوس‌ها و ایجاد هاله عدم رشد در اطراف چاهک‌ها بود (۲۳). نتایج مطالعه Spinler و همکاران (۲۳) تایید‌کننده مشاهدات ما در رابطه با اثر ضدمیکروبی پروبیوتیک‌ها بر باکتری‌های روده‌ای مورد استفاده بود.

در مطالعه Kolader و همکاران مصرف خوراکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به کودکان مبتلا به اسهال حاد توانست باعث کاهش مدت زمان و شدت بیماری گردد (۲۴). همچنین گزارشاتی در شرایط in vitro انجام شده که بیانگر خواص مفید لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس جانسونی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس روتری بر روی پاتوژن‌های روده‌ای است (۵و۲۷-۲۵). همچون این گزارشات، مطالعه حاضر در شرایط in vitro نیز حاکی از اثر ضدمیکروبی سودمند لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری بر سویه‌های استاندارد شیگلا سونئی، سالمونلا انتریکا و اشریشیا کلی بود. همچنین قابل ذکر است اثر مهاری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشتر از اثر مهاری لاکتوباسیلوس روتری بر هر سه پاتوژن روده‌ای بوده است. همچنین مقایسه اثر مهاری لاکتوباسیلوس روتری بر روی این سه پاتوژن نشان داد بیشترین هاله عدم رشد به ترتیب مربوط به شیگلا سونئی، سالمونلا انتریکا و اشریشیاکلی است.

مطالعات گسترده‌ای در ارتباط با خواص ضدمیکروبی پروبیوتیک‌ها بر روی پاتوژن‌های روده‌ای در مدل‌های حیوانی انجام شده است (۲۸و۲۹). در مطالعه Moorthy و همکاران اثر ممانعت کنندگی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس رامنوز روی موش‌های آلوده شده با شیگلا دیسانتری به طور واضح مشخص شد و ترکیب این دو پروبیوتیک دارای خواص درمانی و پیشگیری کننده بر روی عفونت‌های ایجاد شده با شیگلا دیسانتری در مدل حیوانی داشت (۳۰). در مطالعه دیگری لاکتوباسیلوس کازئی 431 CLR دارای اثر درمانی و ممانعت کنندگی در مقابل عفونت‌های ناشی از سالمونلا انتریتیدیس سروار تیفی موریوم بود.

تجویز لاکتوباسیلوس کازئی به موش‌های BALB/c عفونی شده با سالمونلا انتریتیدیس سروار تیفی موریوم در عدم کاهش وزن و افزایش طول عمر این موش‌ها بسیار موثر بود و مانع از کلونیزاسیون این باکتری در روده بزرگ، کبد و طحال گردید (۲۲).

در این مطالعه نیز با ایجاد آلودگی به صورت گاواژ داخل معده‌ای با پاتوژن‌هایی نظیر شیگلا سونئی، سالمونلا انتریکا و اشریشیاکلی و تجویز دو سویه از لاکتوباسیلوس‌ها شامل لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به صورت دوره‌های تجویز قبل و بعد از ایجاد عفونت مشاهده شد که این دو پروبیوتیک دارای اثر مهارکنندگی و درمانی بر روی طیف ذکر شده انتریک پاتوژن بودند و توانستند میزان کلونیزاسیون آنها را در بافت‌هایی مثل روده بزرگ، کیسه صفرا، کبد و طحال کاهش دهند. همچنین نتایج نشان داد در روز سوم تا چهارم پس از عفونت موش‌ها دچار کاهش وزن شدند که بر طبق نتایج به دست آمده این کاهش وزن در گروه کنترل بیشتر از گروه‌های پروبیوتیک بود. پس از گذشت چند روز موش‌ها بهبود وزن نشان دادند و بهبود وزن گروه‌های پروبیوتیک بیشتر از گروه کنترل بود. البته نتایج به دست آمده در گروه عفونی شده با سالمونلا انتریکا در رابطه با تفاوت وزن موش‌ها در گروه‌های پروبیوتیک و کنترل از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در صورتی که این تفاوت در گروه‌های عفونی شده با شیگلا سونئی و اشریشیاکلی در بین گروه‌های پروبیوتیک و کنترل معنی‌دار بود. از نظر میزان بقا، در گروه‌های عفونی شده با شیگلا سونئی و اشریشیاکلی تا روز ۲۵ مطالعه مرگ و میری در گروه‌های کنترل و پروبیوتیک مشاهده نشد؛ ولی در گروه آلوده شده با سالمونلا، پروبیوتیک‌ها دارای اثر بر روی طول عمر موش‌ها و افزایش میزان بقا بودند. آنچه که در این قسمت از بررسی نیز آشکارا به چشم می‌خورد این بود که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای قدرت اثر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به لاکتوباسیلوس روتری است. در واقع نتایج به دست آمده از مدل حیوانی بر یافته‌های ما در آزمایشگاه صحه می‌گذارد.

در مطالعات Callaway و همکاران (۲۸)، Jain و همکاران (۲۹) و Szabo و همکاران (۳۱) بر روی خواص مهارکنندگی میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بر روی باکتری‌های انتروپاتوژن، نتایج مطلوبی با عنوان خاصیت ضدمیکروبی پروبیوتیک‌ها گزارش شد (۲۸و۲۹و۳۱).

در مطالعه Jain و همکاران (۲۹) اثر ممانعت‌کنندگی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی بر روی موش‌های آلوده شده با سالمونلا انتریتیدیس به طور واضح نشان داده شد. این دو پروبیوتیک دارای خواص درمانی و پیشگیری کننده بر روی عفونت‌های ایجاد شده با سالمونلا انتریتیدیس در مدل حیوانی بودند (۲۹).

نتایج مطالعات مذکور، تایید کننده نتایج بررسی حاضر بوده و نشان می‌دهد که میکروارگانیسم‌های تحت عنوان پروبیوتیک در صورت تجویز روزانه دارای اثرات مفید و سودمند در میزبان خود بوده و می‌توانند از رشد و بیماری‌زایی انتروپاتوژن‌ها ممانعت کنند.

از آن جایی که Cano و Perdigón خاصیت ممانعت‌کنندگی پروبیوتیک‌ها را از رشد انتریک پاتوژن‌ها در مدل حیوانی فقط با اعمال روش تجویز پروبیوتیک بعد از ایجاد آلودگی با پاتوژن‌ها انجام دادند و بهترین میزان اثر را دوره ۷ روز بعد از تجویز گزارش نمودند (۱۸) و de LeBlanc Ade و همکاران نیز با بررسی همین خاصیت در مدل حیوانی با اعمال تجویز پروبیوتیک به صورت قبل و بعد از آلودگی با پاتوژن‌ها انجام دادند (۱۹) و نتایج بهتری نسبت به گزارش های Cano و Perdigón به دست آوردند؛ لذا در این مطالعه از روش تجویز پروبیوتیک به صورت قبل و بعد از آلودگی استفاده شد.

نتایج حاصله از این تحقیق نشان می‌دهد تجویز لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری به صورت دوره‌های تجویز قبل و بعد از ایجاد عفونت توسط پاتوژن‌هایی نظیر شیگلا سونئی، سالمونلا انتریکا و اشریشیاکلی می‌تواند اثر مهارکننده و درمانی بر روی این پاتوژن‌های روده ای داشته باشد و همچنین باعث کاهش میزان کلونیزاسیون این باکتری‌ها در روده بزرگ گردند.

لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای قدرت اثر ضدمیکروبی بیشتری نسبت به لاکتوباسیلوس روتری است. در واقع نتایج به‌دست آمده از مدل حیوانی بر یافته‌های ما در آزمایشگاه صحه می‌گذارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف لاکتوباسیلوس روتری و اسیدوفیلوس دارای اثر ضدمیکروبی بود و می‌توان از آنها در پیشگیری و درمان بیماری‌های گوارشی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از طرح تحقیقاتی (شماره ۱۰۵۴۹) مصوب دانشگاه علوم پزشکی تهران بود. بدین‌وسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه به‌دلیل حمایت‌های مادی و معنوی تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید.

References

1. You D, Jones G, Wardlaw T. Levels and Trends in Child Mortality Report 2011: Estimaes developed by the UN Inter-agency Group for Child Mortality Estimation. 35th. New York: UNCF. 2011; pp: 1-24.

2. Huilan S, Zhen LG, Mathan MM, Mathew MM, Olarte J, Espejo R, et al. Etiology of acute diarrhoea among children in developing countries: a multicentre study in five countries. Bull World Health Organ. 1991; 69(5):549-55.

3. World Health Organization, UNICEF/WHO, Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done, 2009. Available at: http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/cah_adh_flyer_2010_12_en.pdf

4. Meng CY, Smith BL, Bodhidatta L, Richard SA, Vansith K, Thy B, et al. Etiology of diarrhea in young children and patterns of antibiotic resistance in Cambodia. Pediatr Infect Dis J. 2011 Apr; 30(4):331-5. doi: 10.1097/INF.0b013e3181fb6f82

5. Das JK, Mishra D, Ray P, Tripathy P, Beuria TK, Singh N, Suar M. In vitro evaluation of anti-infective activity of a Lactobacillus plantarum strain against Salmonella enterica serovar Enteritidis. Gut Pathog. 2013 May; 5(1):11. doi: 10.1186/1757-4749-5-11

6. McFarland LV. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. Travel Med Infect Dis. 2007 Mar;5(2):97-105.

7. Cross ML, Mortensen RR, Kudsk J, Gill HS. Dietary intake of Lactobacillus rhamnosus HNOO1 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. Med Microbiol Immunol. 2002 May;191(1):49-53.

8. Puertollano E, Puertollano MA, Cruz-Chamorro L, Alvarez de Cienfuegos G, Ruiz-Bravo A, de Pablo MA. Orally administered Lactobacillus plantarum reduces pro-inflammatory interleukin secretion in sera from Listeria monocytogenes infected mice. Br J Nutr. 2008 Apr;99(4):819-25.

9. Jiang T, Savaiano DA. Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH in vitro. Impact on lactose metabolism, short-chain fatty acid, and lactate production. Dig Dis Sci. 1997 Nov; 42(11):2370-7.

10. Salminen S, Collado MC, Isolauri E, Gueimonde M. Microbial-host interactions: selecting the right probiotics and prebiotics for infants. Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program. 2009; 64:201-13. doi: 10.1159/000235792

11. Nomoto K. Prevention of infections by probiotics. J Biosci Bioeng. 2005 Dec;100(6):583-92.

12. Rolfe RD. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J Nutr. 2000 Feb; 130(2S Suppl): 396S-402S.

13. Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp. Immunol Cell Biol. 2000;78:80-8. doi:10.1046/j.1440-1711.2000.00886.x

14. Axelsson LT, Chung TC, Dobrogosz WJ, Lindgren SE. Production of a broad spectrum antimicrobial substance by Lactobacills reuteri. Microb Ecol Health Dis. 1989; 2(2):131-36.

15. Chung TC, Axelsson L, Lindgren E, Dobrogosz WJ. In vitro studies on reuterin synthesis by Lactobacillus reuteri. Microb Ecol Health Dis. 1989 ;(2): 137-44.

16. Tabasco R, García-Cayuela T, Peláez C, Requena T. Lactobacillus acidophilus La-5 increases lactacin B production when it senses live target bacteria. Int J Food Microbiol. 2009 Jun; 132(2-3):109-16. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.004

17. Erdogrul O, Erbilir F. Isolation and Characterization of Lactobacillus bulgaricusand Lactobacillus caseifrom Various Foods. Turk J Biol. 2006; 30:39-44.

18. Cano PG, Perdigón G. Probiotics induce resistance to enteropathogens in a re-nourished mouse model. J Dairy Res. 2003 Nov; 70(4):433-40.

19. de LeBlanc Ade M, Castillo NA, Perdigon G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic Lactobacillus strain against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. Int J Food Microbiol. 2010 Apr; 138(3):223-31. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.020

20. Onunbawo ST, Sanni AI, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F1 and Lactobacillus brevis. Afr J Biotechnol. 2003; 2(8); 219-27.

21. Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human Lactobacillus acidophilus strain LB. Appl Environ Microbiol. 1998 Nov;64(11):4573-80.

22. de LeBlanc Ade M, Castillo NA, Perdigon G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic Lactobacillus strain against Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. Int J Food Microbiol. 2010 Apr; 138(3):223-31. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.020

23. Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic Lactobacillus reuteri demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. Anaerobe. 2008 Jun;14(3):166-71. doi: 10.1016/j.anaerobe.2008.02.001

24. Kolader ME, Vinh H, Ngoc Tuyet PT, Thompson C, Wolbers M, Merson L, et al. An oral preparation of Lactobacillus acidophilus for the treatment of uncomplicated acute watery diarrhoea in Vietnamese children: study protocol for a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. Trials. 2013 Jan; 14:27. doi: 10.1186/1745-6215-14-27

25. Gaon D, Garmendia C, Murrielo NO, de Cucco Games A, Cerchio A, Quintas R, et al. Effect of Lactobacillus strains (L. casei and L. Acidophillus Strains cerela) on bacterial overgrowth-related chronic diarrhea. Medicina (B Aires). 2002;62(2):159-63.

26. Zhang YC, Zhang LW, Ma W, Yi HX, Yang X, Du M, et al. Screening of probiotic lactobacilli for inhibition of Shigella sonnei and the macromolecules involved in inhibition. Anaerobe. 2012 Oct; 18(5):498-503. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.08.007

27. Shornikova AV, Casas IA, Isolauri E, Mykkänen H, Vesikari T. Lactobacillus reuteri as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1997 Apr; 24(4):399-404.

28. Callaway TR, Edrington TS, Anderson RC, Harvey RB, Genovese KJ, Kennedy CN, et al. Probiotics, prebiotics and competitive exclusion for prophylaxis against bacterial disease. Anim Health Res Rev. 2008 Dec; 9(2): 217-25. doi: 10.1017/S1466252308001540

29. Jain S, Yadav H, Sinha PR, Naito Y, Marotta F. Dahi containing probiotic Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus casei has a protective effect against Salmonella enteritidis infection in mice. Int J Immunopathol Pharmacol. 2008 Oct-Dec; 21(4):1021-9.

30. Moorthy G, Murali MR, Devaraj SN. Protective role of lactobacilli in Shigella dysenteriae 1-induced diarrhea in rats. Nutrition. 2007 May;23(5):424-33.

31. Szabo I, Wieler LH, Tedin K, Scharek-Tedin L, Taras D, Hensel A, et al. Influence of a probiotic strain of Enterococcus faecium on Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 infection in a porcine animal infection model. Appl Environ Microbiol. 2009 May; 75(9):2621-8. doi: 10.1128/AEM.01515-08

Original Paper

Evaluation of anti-microbial activity of *Lactobacillus acidophillus* and *Lactobacillus ruteri* against entero-pathoges by in vitro and in vivo methods

Soltan Dallal MM (Ph.D)*[1,2], Keshtvarz M (M.Sc)[3], Zamani S (M.Sc)[4], Shirazi L (M.Sc)[5]

[1]Professor, Div. of Food Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [2]Professor, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [3]Ph.D Candidate in Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. [4]Ph.D Candidate in Microbiology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences. Tehran, Iran. [5]M.Sc in Microbiology, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objective: Probiotics are beneficial organisms therapeutic within microbial flora. *Shigella, Escherichia coli* and *Salmonella* are the most common cause of intestinal infectious diseases that lead to morbidity and mortality in infant and children worldwide. The aim of this study was to evaluate anti-microbial activity of *Lactobacillus acidophillus* and *Lactobacillus ruteri* against entero-pathoges by in vitro and in vivo methods.

Methods: In this experimental study, the therapeutic effect of the lactobacillus acidophilus ATCC 4356 and *ruteri* ATCC 23272 against *Shigella sonnei* ATCC 9290, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Salmonella enterica* BAA-708 were evaluated by in vitro (spot agar) and in vivo (BALB/c mice) methods. Weight improvment and survival rate in mice were recorded.

Results: *Lactobacillus acidophillus* and *ruteri* had protective and therapeutic effect against diarrhea caused by pathogenic bacteria. Probiotics reduced the weight, colonization of pathogens and increased the survival rate of animals ($P<0.05$).

Conclusion: *Lactobacillus acidophillus* and *ruteri* has anti-microbial activity and their consumption can be effective in the prevention and also the treatment of intestinal disease.

Keywords: Entero pathogens, Probiotics, Antibacterial activity, Mouse

*** Corresponding Author: Soltan Dallal MM (Ph.D), E-mail: msoltandallal@gmail.com**

Received 9 Nov 2014 **Revised** 10 May 2015 **Accepted** 21 Jun 2015

Cite this article as: Soltan Dallal MM, Keshtvarz M, Zamani S, Shirazi L. [Evaluation of anti-microbial activity of *Lactobacillus acidophillus* and *Lactobacillus ruteri* against entero-pathoges by in vitro and in vivo methods]. J Gorgan Uni Med Sci. Spring 2016; 18(1): 45-52. [Article in Persian]