



مجله دنیای میکروب‌ها
سال پنجم، شماره سوم و چهارم (پیاپی ۱۳) زمستان ۱۳۹۱
صفحات ۹۳-۱۰۴

Original
Article

ارزیابی تاثیر مهاري سويه‌هاي بي‌فيدوباکتریوم در کاهش اثرات سيتوتوکسیک جدایه‌هاي اشریشیا کلی تولید کننده وروتوکسین

نجمه نامدار^۱، محمد کارگر^۲، یحیی تهمتن^{۳*}، محمد حسین حسینی^۳

^۱ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان، ^۲ دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی،
^۳ استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، گروه باکتری شناسی

چکیده

سابقه و هدف: اغلب سويه‌هاي اشریشیا کلی O157:H7 توانایی اتصال محکم به سلول‌های ورو و تولید شیکا توکسین را دارند. این مطالعه با هدف توسعه یک مدل آزمایشگاهی پروبیوتیکی برای محافظت در برابر اشریشیا کلی O157:H7 انجام شد. مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر به صورت تجربی بر روی سويه‌هاي پروبیوتیک بی‌فیدوباکتریوم و سويه‌هاي شیکا توکسینوژن اشریشیا کلی O157:H7 در سلول‌هاي تک لایه ورو انجام شد. برای این منظور سويه‌هاي پروبیوتیک در محیط MRS کشت و سپس به چاهک‌هاي رده سلولی ورو اضافه گردیدند. پس از گرماگذاری، سلول‌هاي خالص شناسایی شده واجد ژن‌هاي *stx1* و *stx2* مخلوط هر دو و نیز سوسپانسیون کشت اشریشیا کلی O157:H7 به هر چاهک اضافه و نتایج CPE پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در انکوباتور CO2 به وسیله میکروسکوپ معکوس بررسی شد.

یافته‌ها: بر اساس مقدار شیکا توکسین و اشریشیا کلی O157:H7 استفاده شده، سلول‌هاي ورو پیش تیمار شده با پروبیوتیک‌ها اثر متفاوتی نشان دادند. شیکا توکسین و اشریشیا کلی O157:H7 به تنهایی سبب تخریب زیاد سلول شدند. اما پیش تیمار پروبیوتیکی موجب کاهش قابل ملاحظه تخریب سلول‌هاي آلوده به اشریشیا کلی O157:H7 گردید. در مقایسه با سلول‌هاي کنترل با توجه به میزان پروبیوتیک مورد استفاده، ۸۰ تا ۱۰۰ درصد سلول‌ها سالم باقی ماندند.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که بی‌فیدوباکتریوم‌ها و محلول روماند حاصل از رشد آن‌ها موجب کاهش تخریب سلول‌هاي ورو در حضور شیکا توکسین و اشریشیا کلی O157:H7 می‌شوند. بنابراین امکان استفاده از آنها در صنایع غذایی به عنوان یک مدل واکسن زنده در پیشگیری و درمان عفونت‌ها می‌تواند وجود داشته باشد.

واژگان کلیدی: اشریشیا کلی O157:H7، شیکا توکسین، پروبیوتیک، بی‌فیدوباکتریوم.

پذیرش برای چاپ: شهریور ۱۳۹۱

دریافت مقاله: تیر ۱۳۹۱

مقدمه

بیماری اسهال می‌گردد (۱ و ۲). سويه‌هایی از این باکتری که در انسان موجب ایجاد گاستروانتریت می‌شوند را در ۶ گروه انتروپاتوژنیک/اشریشیا کلی (EPEC)، انتروتوکسیژنیک/اشریشیا کلی (ETEC)، انتروهموراژیک/اشریشیا کلی (EHEC)، انترو اینوسیو/اشریشیا کلی (EIEC)، انترو آگریگتیو/اشریشیا کلی (EaggEC) و اشریشیا کلی با انتشار پراکنده (DAEC) طبقه

زیستگاه طبیعی باکتری اشریشیا کلی (*E.coli*) روده انسان و حیوانات می‌باشد. با وجود بی‌خطر بودن این باکتری برخی از سويه‌هاي آن توکسین‌هایی تولید می‌کنند که موجب بروز

(* آدرس برای مکاتبه: شیراز، میدان صنایع، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، گروه باکتری شناسی

دنیای میکروب‌ها، سال پنجم، شماره سوم و چهارم، زمستان ۱۳۹۱. تاثیر مهاری سویه‌های بیفیدوباکتریوم در کاهش اثرات سیتوتوکسیک/اشریشیا کلی تولید کننده وروتوکسین. نجمه نامدار و همکاران

پروبیوتیک شناسایی شده‌اند (۸). اغلب پروبیوتیک‌ها با مهار چسبندگی اشریشیا کلی O157:H7 به رده سلولی و نیز تولید مواد باکتریوسینی علیه باکتری پاتوژن، موجب کاهش تخریب رده سلولی می‌گردند (۸).

بیفیدوباکتریوم‌ها به دلیل داشتن خصوصیات ویژه‌ای می‌توانند به عنوان پروبیوتیک نقش مهمی در ایجاد سلامت در میزبان داشته باشند. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های بیفیدوباکتریوم‌ها توانایی اتصال آن‌ها به سلول‌های مخاطی می‌باشد. این امر مانع از اتصال باکتری‌های پاتوژن به سلول و عدم استقرار آن‌ها می‌گردد. از دیگر خصوصیات بیفیدوباکتریوم‌ها به عنوان پروبیوتیک می‌توان به ایجاد تعادل در میکروفلور طبیعی بدن، مقاومت در برابر استقرار باکتری‌های بیماری‌زا، کاهش میزان کلسترول سرمی، جلوگیری از جهش‌زایی عوامل موجود در روده و کاهش تومورهای روده، جلوگیری از عفونت مجاری ادراری به ویژه التهاب حاد معده‌ای و روده‌ای، کاهش عدم تحمل به لاکتوز و کمک به جذب کلسیم در روده اشاره نمود (۹).

به طور کلی پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که با مکانیسم‌های متعددی مانند کاهش pH، ترشح مواد و پپتیدهای ضد میکروبی، مهار چسبندگی باکتری‌های پاتوژن به سلول‌های اپی تلیال، افزایش عملکرد دفاعی، تنظیم ایمنی و اثر بر روی سلول‌های ایمنی می‌توانند به میزبان در مقابل باکتری‌های پاتوژن کمک نمایند (۷ و ۱۰).

این مطالعه با هدف ارزیابی اثر بیفیدوباکتریوم‌ها به عنوان پروبیوتیک در کاهش تخریب رده سلولی ورو توسط باکتری اشریشیا کلی O157:H7 انجام شد.

مواد و روش‌ها

الف) سویه میکروبی و شرایط رشد: سویه‌های پروبیوتیکی بیفیدوباکتریوم انیمالیس (*B. animalis*)، بیفیدوباکتریوم لانگوم (*B. longum*) و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (*B. bifidum*) به صورت تجاری (لیوفیلیزه) از کارخانه شیر پگاه شیراز تهیه شدند.

بندی کرده‌اند (۳). اشریشیا کلی O157:H7 یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا در انسان به شمار می‌آید که مهم‌ترین سروتیپ بیماری‌زای EHEC می‌باشد. این سویه سالانه عامل ۷۳۰۰۰ بیماری منتقل شونده از طریق غذا (Food born illness) در ایالات متحده می‌باشد (۳). بیماری‌هایی که توسط اشریشیا کلی O157:H7 ایجاد می‌شوند شامل اسهال، اسهال خونی، کولیت هموراژیک (HC) و سندرم اورمی همولیتیک (HUS) می‌باشد که می‌تواند به آسیب‌های کلیوی و یا مرگ نیز منتهی گردند (۴). اشریشیا کلی O157:H7 با تولید توکسینی به نام شینگاتوکسین (Stx)، منجر به تخریب سلول‌های ورو می‌شود. از این رو آن‌ها را ورو توکسیژنیک/اشریشیا کلی یا VTEC می‌نامند (۳ و ۵). گیرنده‌های این توکسین علاوه بر سلول‌های روده بر روی سلول‌های اپیتلیوم کلیه نیز وجود دارند. بنابراین پس از استقرار باکتری در مخاط روده و سپس کلیه می‌تواند باعث نارسایی حاد کلیوی و خونریزی کلیه (حالت کشنده عفونت‌های ناشی از EHEC) گردد. از آنجایی که ژن کد کننده Stx بر روی یک باکتیوفاژ قرار دارد، بنابراین درمان آنتی‌بیوتیکی با برهم زدن فلور طبیعی روده موجب آزاد شدن هر چه بیشتر این سموم توسط باکتری و سخت‌تر شدن بیماری می‌گردد (۳).

امروزه از پروبیوتیک‌ها به عنوان باکتری‌های زنده‌ای که فرد را در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند در پیشگیری و درمان عفونت‌ها استفاده می‌گردد. پروبیوتیک‌ها با مکانیسم‌های متعددی از جمله تولید مواد ضد میکروبی، تولید مواد اسیدهای آلی، فعال نمودن سیستم ایمنی بدن، رقابت با عامل بیماری‌زا بر سر مواد غذایی و اشغال گیرنده‌های سلول میزبان، سبب مهار رشد و تکثیر عوامل بیماری‌زا در آن محل از بدن می‌گردند. مزیت استفاده از این عوامل در مقایسه با واکسن‌ها قیمت مناسب، فراوانی، خطر کم و در برخی موارد تحریک سیستم ایمنی میزبان می‌باشد (۶ و ۷). امروزه سویه‌هایی از لاکتوباسیلوس‌ها، بیفیدوباکتریوم‌ها، ساکارومایسس‌ها، انتروکوکوس و کلستریدیوم‌ها به عنوان

دنیای میکروب‌ها، سال پنجم، شماره سوم و چهارم، زمستان ۱۳۹۱. تاثیر مهاری سویه‌های بیفیدوباکتریوم در کاهش اثرات سیتوتوکسیک اشریشیا کلی تولید کننده وروتوکسین. نجمه نامدار و همکاران

استخراج DNA با روش جوشاندن انجام شد و برای انجام PCR، مخلوط ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۳ میلی مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی مول dNTPs، ۱ میکرولیتر پرایمر (جدول ۱) (۱۳)، ۱ میکرولیتر DNA و ۱ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز *Taq* تهیه و با آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندرف (ساخت آلمان) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برآمد با دستگاه Kodack gel scan عکسبرداری شد (۱۴).

د) آماده سازی محلول روماند حاصل از کشت باکتری‌ها: بیفیدوباکتریوم‌ها با کشت ۲۰ ساعته را در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و محلول روماند نیز دو بار با پالایه ۰/۲ میکرومتری فیلتر شد. لوله‌های حاوی محلول رویی حاصل از رشد باکتری‌ها با پارافیلیم پوشیده و برای استفاده در مطالعه نگهداری گردیدند (۱۷-۱۵).

ه) اندازه گیری *pH* و خنثی سازی سوسپانسیون باکتریایی

باکتری اشریشیا کلی O157:H7 از دانشگاه ادینبرگ اسکاتلند به عنوان سویه کنترل تهیه شد. چندین سویه باکتری اشریشیا کلی O157:H7 از حیوانات اهلی جداسازی گردید که برای شناسایی تمامی آن‌ها از تست‌های بیوشیمیایی، آنتی سرم اختصاصی اشریشیا کلی O157:H7 و PCR استفاده شد. باکتری‌ها و سویه اشریشیا کلی O157:H7 در محیط‌های BHI (Heart Infusion Brain) و TSB (Trypton Soya Broth)، در شرایط هوایی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری گردیدند. بیفیدوباکتریوم‌ها به صورت سوسپانسیون مخلوط با هم در محیط De Man-Rogosa-Sharp (MRS broth)، در شرایط بی‌هوایی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت گرماگذاری شدند. با استفاده از تکنیک PCR سویه‌های اشریشیا کلی O157:H7 واجد ژن‌های *stx1*، *stx2*، *eae* و *hly* انتخاب گردید (۱۱ و ۱۲).

ب) تعیین گروه سرولوژی: پس از جداسازی و شناسایی باکتری‌ها توسط تست‌های بیوشیمیایی با استفاده از آنتی سرم‌های تجاری به روش آگلوتیناسیون بر روی لام، گروه سرولوژی باکتری‌ها تعیین شد. برای انجام آگلوتیناسیون یک قطره از کشت باکتری در پیتون واتر با یک قطره از آنتی سرم اختصاصی بر روی لام در دایره ای به قطر ۱۰ میلی متر مخلوط گردید و برای ۲ دقیقه حرکت دورانی داده شد. (۷).

ج) شناسایی مولکولی سویه‌های اشریشیا کلی O157:H7:

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

اندازه (bp)	توالی (۵' → ۳')	پرایمر	ژن
۵۵۵	TTCGCTCTGCAATAGGTA	Stx ₁ -F	<i>stx₁</i>
	TTCCCAGTTCAATGTAAGAT	Stx ₁ -R	
۳۱۵	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT	Eae-F	<i>eae</i>
	AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA	Eae-R	
۱۱۸	GTGCCTGTACTGGGTTTTCTTC	Stx ₂ -F	<i>stx₂</i>
	AGGGGTCGATATCTCTGTCC	Stx ₂ -R	
۲۱۰	CGCAACAACTGAAGCAAAGG	Hly-F	<i>hly</i>
	TTGGCGGCACATTTGTAC	Hly-R	

میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. پس از آن حدود ۲۵ تا ۳۰ سی سی محیط کامل (۱۰ درصد)، (۶۰ سی سی محیط DMEM تهیه شده به همراه آنتی بیوتیک‌های جنتامایسن و پنی سیلین هر کدام به مقدار ۶۰ میکرولیتر و ۶ سی سی سرم جنین گوساله) روی فلاسک ریخته و مجدداً سلول‌ها زیر میکروسکوپ مشاهده شدند. پس از چند بار پیپتینگ کردن آن، سلول‌ها درون پلیت‌ها تقسیم شدند. با استفاده از لام نئوبار برای شمارش، مقدار 10^5 سلول درون هر چاهک کشت سلولی ریخته شد. سپس آن را درون انکوباتور مخصوص کشت سلول قرار داده تا پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها تک لایه گردند. پس از آن محیط رویی خارج و با محیط فاقد آنتی بیوتیک جایگزین گردید. برای اطمینان در کار، چندین بار به آهستگی سلول‌ها توسط محیط فاقد آنتی بیوتیک شستشو داده شدند. از محیط فاقد آنتی بیوتیک به دلیل جلوگیری از اثر آنتی بیوتیک بر باکتری‌ها استفاده شد (۱۵ و ۱۶).

ح) آلوده سازی رده سلولی ورو با اشیریشیا کلی O157:H7: برای این منظور یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاوی اشیریشیا کلی O157:H7 (10^8 cfu/ml) با یک میلی لیتر از محیط کشت سلولی (DMEM) مخلوط گردید و به آرامی به رده سلولی اضافه شد. سپس رقت‌های مختلفی از سوسپانسیون باکتریایی اشیریشیا کلی O157:H7 به چاهک‌ها اضافه شد تا کمترین رقت تخریب کننده سلول توسط باکتری اشیریشیا کلی O157:H7 مشخص گردد. در این مطالعه از رقت‌های 10^2 تا 10^8 استفاده و اثر تخریبی هر کدام از رقت‌ها با یکدیگر مقایسه شدند. سپس پلیت کشت سلولی ۲ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد با ۱۰ درصد CO_2 و ۹۰ درصد هوا قرار داده شد. پس از مدت زمان یاد شده برای مشاهده اثر اشیریشیا کلی O157:H7 روی رده سلولی ورو، سلول‌ها با PBS استریل شستشو داده شدند.

ط) اثر محلول رومانند کشت اشیریشیا کلی O157:H7 بر رده سلولی ورو: ابتدا باکتری اشیریشیا کلی O157:H7 سویه استاندارد (حاوی ژن‌های stx_1 و stx_2) در محیط TSB کشت داده شد و با دور rpm ۳۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

پروبیوتیک: برای این منظور ابتدا pH سوسپانسیون باکتری‌های پروبیوتیک (سویه‌های بیفیدوباکتریوم) گرما گذاری شده به مدت ۲۰ ساعت در MRS broth اندازه‌گیری گردید. سپس با اضافه کردن NaOH یک درصد، pH محلول خنثی شد. برای جلوگیری از آلودگی، ۲ لوله از باکتری‌های کشت داده شده با شرایط یکسان انتخاب گردید و پس از ریختن NaOH در یک لوله و خنثی شدن pH محلول، همان مقدار NaOH استریل به لوله دوم افزوده شد و در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت (۱۶).

و) تهیه رقت‌های متفاوت: به منظور تهیه مقدار غلیظ شده محلول رویی، ۳ لوله استریل تهیه و مقدار ۸ سی سی از محلول رویی به هر لوله اضافه گردید و در یخچال قرار داده شد. پس از آن که مقدار آن‌ها به ۴، ۲ و ۱ سی سی رسید، به عنوان مقادیر متفاوت از محلول رویی غلیظ شده مورد استفاده قرار گرفت. رقت‌های ۱/۸، ۱/۴، ۱/۲ و ۱ با استفاده از PBS استریل تهیه شد. برای جلوگیری از آلودگی، پس از تهیه هر رقت نمونه‌ها فیلتر شدند. به منظور تهیه رقت سوسپانسیون باکتریایی از لوله مک فارلند برای بررسی تعداد باکتری‌ها استفاده شد و در صورت لزوم تهیه رقت انجام گرفت. سپس تعداد آن‌ها با کشت بر روی محیط‌های جامد (MRS Agar و TSA) شمارش گردید (۱۵).

ز) رده سلولی ورو (Vero): سلول ورو از موسسه سرم سازی رازی شیراز تهیه شد. سلول‌ها در فلاسک‌های 25 cm^2 مخصوص کشت سلولی ریخته و محیط DMEM (Dulbecco modified Eagles mineral essential medium)

ساخت شرکت سیگما به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و جنتامایسن روی سلول‌ها ریخته شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ CO_2 گرما گذاری گردیدند. پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، سلول‌ها تک لایه شدند و از آن برای پاساژ سلول‌ها در پلیت‌های ۶، ۱۲ یا ۹۶ خانه استفاده شد. برای این منظور ابتدا مایع رویی فلاسک خارج و به آن تریپسین ورسین (۵۰ درصد) به منظور جدا شدن سلول‌ها از کف پلیت اضافه شد. پس از یک دقیقه سلول‌ها زیر

شد و اثر آن‌ها در جلوگیری از تخریب رده سلولی توسط مقادیر مختلف اشریشیا کلی O157:H7 بررسی گردید (۱۵).

ل) تیمار سلول‌های ورو با پروبیوتیک‌ها و محلول روماندهم زمان با تلقیح اشریشیا کلی O157:H7: در چاهک‌های پلیت کشت سلولی به طور هم زمان یک سی سی از سوسپانسیون باکتریایی اشریشیا کلی O157:H7 و یک سی سی از سوسپانسیون پروبیوتیکی ریخته شد. این مقادیر در دفعات متعدد تغییر داده شد. این پلیت‌ها در مدت‌های متفاوتی (۱، ۲، ۳، ۶، ۱۰، ۱۲ و ۲۴ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ درصد CO₂ انکوبه شدند و نتایج زیر میکروسکوپ بررسی گردید (۱۵).

یافته‌ها

در این بررسی مشخص گردید که پروبیوتیک‌ها و محلول رویی حاصل از رشد آن‌ها در مقادیر مختلف سبب تخریب سلول نمی‌شوند. اما سوسپانسیون باکتریایی اشریشیا کلی O157:H7 و محلول رویی حاصل از رشد آن با توجه به مقدار مورد استفاده توانایی تخریب سلول‌های ورو را دارند (شکل ۱). نتایج حاصل از شناسایی مولکولی سویه‌های بالینی نشان داد که برخی از سویه‌های اشریشیا کلی O157:H7 تمامی ژن‌های بیماری‌زایی (*stx₁*، *stx₂*، *hly* و *eae*) را دارند. اما برخی از آن‌ها دارای دو یا سه ژن و برخی نیز تنها یکی از ژن‌ها را داشتند. در بررسی اثر اشریشیا کلی O157:H7 و محلول رویی آن بسته به مقدار مورد استفاده اثر تخریبی ایجاد شده بر روی سلول‌ها متفاوت بود. به طوری که افزایش غلظت موجب افزایش تخریب سلول‌های ورو گردید. مقدار 10^4 ، 10^5 ، 10^6 ، 10^7 و بالاتر اثر تخریبی شدیدی را روی سلول نشان دادند. به طوری که با گذشت زمان گرماگذاری، اثرات تخریبی بیشتری مشاهده شد. اما در چاهک کنترل هیچ گونه اثر تخریبی مشاهده نگردید.

اثر تخریبی باکتری‌هایی که حاوی هر سه ژن *stx₁*، *stx₂* و *eae* بودند بیش از باکتری‌هایی بود که تنها یکی از ژن‌های *stx₁* و *stx₂* را دارا بودند. زمان گرماگذاری سلول‌ها نیز در

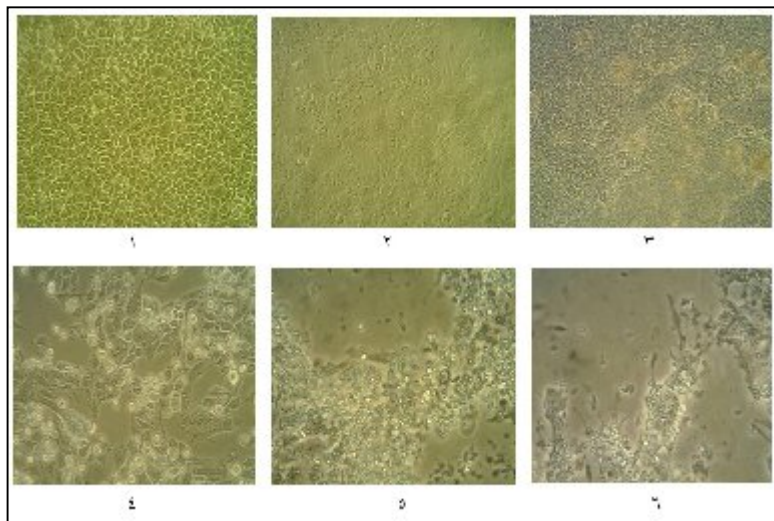
مایع رویی با پالایه ۰/۲ میکرومتر دو بار فیلتر گردید و پس از تهیه رقت‌های مختلف، اثر آن روی رده سلولی بررسی شد. اثر محلول رویی غلیظ شده نیز در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت. به ترتیب رقت‌های ۲ برابر غلیظ شده، ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۶ روی سلول‌ها تلقیح گردیدند. سپس به مدت ۲ تا ۳ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۱۰ درصد CO₂ قرار داده شدند و نتایج زیر میکروسکوپ بررسی گردید (۱۵).

ی) پیش تیمار پروبیوتیکی سلول‌های ورو: برای این منظور تلقیح پروبیوتیک‌ها به رده سلولی تک لایه شده ورو و ۲ تا ۳ ساعت گرماگذاری قبل از افزودن اشریشیا کلی O157:H7 به سلول انجام شد. برای نشان دادن اثر پروبیوتیک‌ها در کاهش یا عدم تخریب سلول‌های تک لایه شده ورو توسط اشریشیا کلی O157:H7 ابتدا سلول‌ها در پلیت‌های کشت سلولی کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت مراحل زیر به ترتیب انجام گرفت. پس از ریختن پروبیوتیک‌ها روی سلول‌های تک لایه، در انکوباتور ۱۰ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری گردید. پس از ۱ تا ۲ ساعت، سوسپانسیون باکتریایی اشریشیا کلی O157:H7 به سلول‌ها اضافه شد. با توجه به مقادیر ثابت پروبیوتیک، مقادیر مختلفی از سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری پاتوژن افزوده شد. پس از ثبت نتایج اولیه، مقدار پروبیوتیک افزوده شده در مرحله پیش تیمار اولیه افزایش یافت. این بار مقدار بیشتری از سوسپانسیون پروبیوتیکی بر روی سلول‌ها ریخته شد. این مقادیر به ترتیب در آزمایشات افزایش یافت به طوری که تمامی مقادیر 10^2 تا 10^8 سوسپانسیون پروبیوتیکی روی سلول‌ها ریخته شد (۱۵).

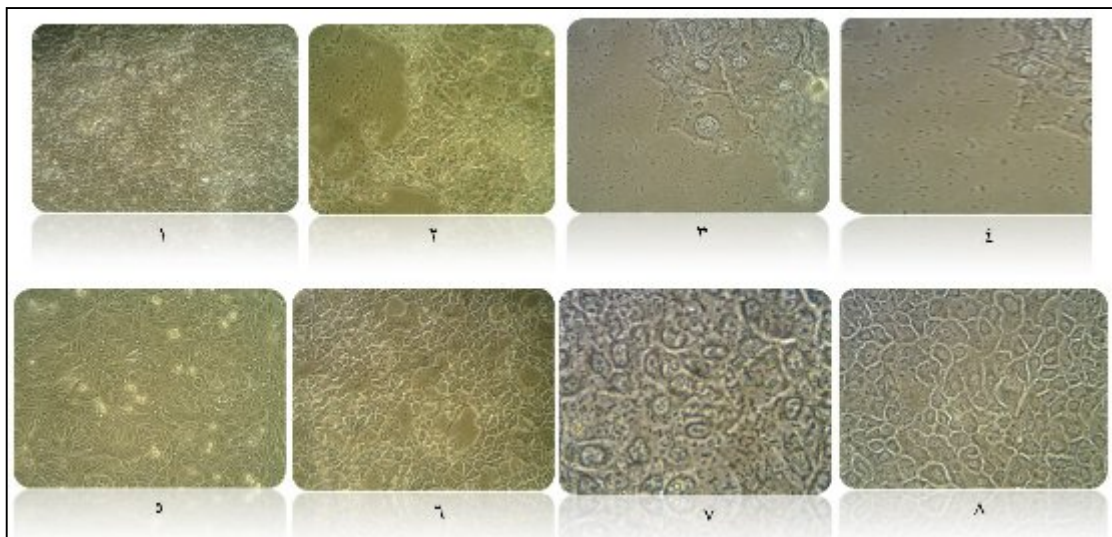
ک) پیش تیمار سلول‌های ورو با محلول رویی حاصل از کشت پروبیوتیک‌ها: مقدار یک سی سی از محلول رومانده تهیه شده در چاهک‌های کشت سلولی ریخته شد. پس از ۲ تا ۳ ساعت گرما گذاری مقادیر متفاوتی از سوسپانسیون باکتریایی اشریشیا کلی O157:H7 بر روی آن ریخته شد. چاهک‌ها یک ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ درصد CO₂ نگه‌داری و سپس توسط میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. محلول رویی حاصل از کشت پروبیوتیک‌ها نیز در مقادیر متفاوت تهیه

پروبیوتیک با باکتری پاتوژن، اثر تخریبی بسیار کمی نسبت به چاهک حاوی اشریشیا کلی O157:H7 مشاهده شد. اما این سلول‌ها نسبت به چاهک کنترل یا چاهک حاوی پروبیوتیک تخریب سلولی کمی را نشان دادند. در چاهک‌هایی که مقدار پروبیوتیک افزوده شده به رده سلولی حدود یک لگاریتم (۱۰۰۰ cfu) بیشتر از مقدار اشریشیا کلی O157:H7 بود،

تخریب بیشتر سلول‌ها موثر بود. به طوری که با گذشت زمان اثر تخریبی بیشتری بر روی سلول‌ها مشاهده گردید (شکل ۲). در زمان تیمار رده سلولی ورو یک تا دو ساعت قبل از آلودگی با اشریشیا کلی O157:H7 توسط پروبیوتیک یا محلول روماند آن‌ها، نتایج متفاوتی حاصل شد. اثر تخریبی سلول‌ها با توجه به تعداد باکتری‌های پروبیوتیک و اشریشیا کلی O157:H7 افزوده شده متفاوت بود (شکل ۲). در شرایط مساوی بودن میزان



شکل ۱: اثر اشریشیا کلی O157:H7 بر روی سلول ورو. (۱) سلول‌های سالم تیمار شده با پروبیوتیک. (۲) 10^2 CFU (۳) 10^4 CFU (۴) 10^5 CFU (۵) 10^6 CFU (۶) 10^7 CFU.



شکل ۲: ارزیابی اثر سویه اشریشیا کلی O157:H7 و پروبیوتیک‌ها بر روی رده سلولی ورو. (۱) سلول‌های ورو (کنترل). (۲-۴) اثر تخریبی اشریشیا کلی O157:H7 روی سلول‌های ورو به ترتیب پس از ۳، ۹ و ۲۴ ساعت. (۵) اثر پروبیوتیک‌ها روی سلول‌های ورو (عدم تخریب سلول‌ها). (۶-۸) اثر پیش تیمار پروبیوتیک‌ها روی سلول‌های ورو به ترتیب پس از ۳، ۹ و ۲۴ ساعت قبل از افزودن اشریشیا کلی O157:H7.

پروبیوتیک‌ها پس از مصرف خوراکی با اتصال به گیرنده‌ها، با باکتری‌های بیماری‌زایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس، سالمونلا، شیگلا، اشریشیا کلی، انتروباکتر، ویبرو کلرا و هلیکوباکتر پیلوری رقابت می‌کنند و مانع از استقرار این باکتری‌ها می‌شوند (۷). اشریشیا کلی O157:H7 پس از اتصال به سلول‌ها قادر به ایجاد اثرات تخریبی روی سلول‌های ورو می‌باشد. در مطالعه حاضر بیشترین تخریب توسط مقدار 10^8 ۲ باکتری ایجاد شد، که تفاوت بارزی با کمترین میزان تخریب (10^2) داشت. افزایش مقدار باکتری‌ها موجب اتصال تعداد باکتری بیشتری به گیرنده‌های سطحی سلول‌های اپی تلیال شد. به دنبال آن با افزایش تولید توکسین، اثر تخریبی بیشتری بر روی سلول‌های ورو ایجاد گردید. بررسی زمان گرما گذاری سلول‌های ورو با اشریشیا کلی O157:H7 نشان داد که افزایش زمان، موجب افزایش اثرات CPE در سلول‌ها می‌شود. بیشترین CPE در مدت زمان ۲۴ ساعت گرما گذاری و پس از آن ایجاد گردید. با افزایش زمان گرما گذاری سلول با اشریشیا کلی O157:H7، باکتری‌ها مدت زمان بیشتری را برای رشد و تولید متابولیت‌های سمی مانند stx_1 و stx_2 داشتند.

کونوالچوک (Konwalchuk) و همکاران اثر تخریبی سویه‌های مختلف اشریشیا کلی را بر روی رده‌های سلولی مختلف مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که با افزایش مقدار مورد استفاده باکتری بیماری‌زا و زمان انکوباسیون، اثر تخریبی بیشتری در سلول‌ها ایجاد می‌شود. این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت. به طوری که هر چه زمان به ۲۴ ساعت نزدیک‌تر می‌گردید تخریب بیشتری مشاهده می‌شد. همچنین محققین یاد شده دریافتند که حساسیت سلول‌های ورو در مقایسه با سایر رده‌های سلولی مانند Y-1 و CHO، نسبت به اشریشیا کلی بیشتر می‌باشد (۱۷).

اثرات سلولی ایجاد شده توسط محلول روماندا نشان داد که وجود باکتری اشریشیا کلی O157:H7 و اتصال آن به سلول تنها عامل موثر در تخریب سلولی نمی‌باشد و تولید متابولیت‌های سمی مانند توکسین‌ها نیز نقش مهمی در ایجاد CPE می‌تواند داشته باشد.

حداقل میزان تخریب سلولی به وسیله اشریشیا کلی O157:H7 در زیر میکروسکوپ مشاهده شد. در غلظت‌های بیشتر پروبیوتیک، اثر بازدارندگی قوی‌تری در تخریب سلول توسط اشریشیا کلی O157:H7 وجود داشت. هر چه زمان و مقدار پیش انکوباسیون بیشتر بود اثر تخریب سلولی کمتر مشاهده گردید (شکل ۲). به عنوان نمونه تعداد 10^5 باکتری اشریشیا کلی O157:H7 در پیش تیمار پروبیوتیکی با مقادیر 10^5 یا 10^6 ، 10^7 و بیشتر از آن قادر به تخریب رده سلولی نبود، اما همین تعداد از سوسپانسیون باکتریایی اشریشیا کلی O157:H7 به راحتی سلول‌های ورو را تخریب کرد. مهم‌ترین عامل در جلوگیری از CPE توسط باکتری پاتوژن مدت زمان پیش انکوباسیون و مقدار مورد استفاده پروبیوتیک‌ها بود. پیش تیمار رده سلولی ورو با محلول روماندا حاصل از رشد پروبیوتیک‌ها نیز نتایج مشابهی با اثر پروبیوتیک‌ها داشت. اثر ضدتخریبی محلول روماندا با غلظت بیشتر آن و مدت زمان پیش تیمار رابطه مستقیم داشت. با افزایش محلول روماندا و مدت زمان پیش انکوباسیون، اثر پروبیوتیک‌ها در مهار تخریب سلولی نیز بیشتر مشاهده شد. همچنین در شرایط کشت هم‌زمان پروبیوتیک و اشریشیا کلی O157:H7 اثر مهاری کمتر از زمانی بود که سلول‌ها با پروبیوتیک و محلول رویی آن پیش تیمار می‌شدند. به طور کلی پیش تیمار سلول‌های ورو با پروبیوتیک‌ها و محلول رویی آن‌ها اثر بهتری در کاهش تخریب رده سلولی توسط باکتری اشریشیا کلی O157:H7 داشت.

بحث

اشریشیا کلی تولید کننده وروتوکسین یا انتروهموراژیک اشریشیا کلی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زای انسانی به شمار می‌آید. اشریشیا کلی O157:H7 مهم‌ترین سروتیپ بیماری‌زای این پاتوتایپ در انسان محسوب می‌شود (۱۶). در مطالعات مختلف اثر پروبیوتیک‌ها در ممانعت و درمان طیف وسیعی از بیماری‌های روده‌ای مانند اسهال مسافرتی، اسهال ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک و عفونت‌های حاد روده‌ای به اثبات رسیده است (۱۶). هم‌چنین نشان داده شده که

باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بیماری‌زا می‌باشد (۹). از بین رفتن باکتری‌های بیماری‌زا توسط پروبیوتیک‌ها موجب مهار اتصال باکتری‌های بیماری‌زا به سطح سلول و ایجاد CPE می‌گردد (۲۰).

سو (Su) و برنت (Berent) گزارش کردند که پروبیوتیک‌هایی مانند لاکتوباسیلوس‌ها با اتصال به سلول‌ها در شرایط آزمایشگاه، چسبندگی و تهاجم باکتری‌های پاتوژن روده‌ای را به سلول‌ها مهار می‌کنند (۲۱). مطالعه حاضر نیز اثر ممانعتی پروبیوتیک‌های بیفیدوباکتریوم و محلول رویی حاصل از رشد آن‌ها را علیه ایجاد CPE توسط *شریشیا کلی* O157:H7 روی رده سلولی ورو در شرایط آزمایشگاهی را نشان داد.

در بررسی پیش تیمار پروبیوتیکی سلول‌ها، پروبیوتیک‌ها به طور قدرتمندی توانایی‌شان را در ممانعت از تخریب سلول‌ها توسط *شریشیا کلی* O157:H7 نشان دادند. قبل از افزودن *شریشیا کلی* O157:H7 به سلول‌ها، افزایش میزان مورد استفاده پروبیوتیک و مدت زمان انکوباسیون، اثر مهاری و ممانعتی قوی‌تر پروبیوتیک‌ها علیه *شریشیا کلی* O157:H7 را به دنبال داشت. زمانی که پروبیوتیک‌ها دو تا سه ساعت زودتر از *شریشیا کلی* O157:H7 روی سلول‌ها ریخته شدند (Pre incubation)، به دلیل افزایش چسبندگی به گیرنده‌های سطحی سلول‌های اپی تلیال و مهار شدن جایگاه‌های اتصال باکتری بیماری‌زا، اثر ممانعت‌کنندگی شدیدتری در چسبندگی *شریشیا کلی* O157:H7 می‌تواند ایجاد شود. افزایش مدت زمان پیش تیمار سلول‌های ورو با پروبیوتیک‌ها می‌تواند موجب افزایش تولید باکتريوسین و اسیدهای آلی و در نتیجه اثر ضدتخریبی قوی‌تری بر روی سلول‌های ورو گردد (۱۹).

کاهش تخریب سلولی ایجاد شده توسط *شریشیا کلی* O157:H7 به کمک محلول رومانند پروبیوتیک، اثبات می‌کند که وجود یا اتصال باکتری‌های پروبیوتیک به سلول تنها عامل اثر مهاری پروبیوتیک‌ها نمی‌باشد. بلکه محلول رویی پروبیوتیک‌ها به دلیل داشتن باکتريوسین، اسیدهای آلی، مواد متوقف کننده رشد باکتری‌های بیماری‌زا می‌تواند از اثرات تخریبی *شریشیا کلی* O157:H7 بر سلول‌های ورو جلوگیری کند (۱۲).

اثر تخریبی محلول رویی وروتوکسین‌های تولید شده توسط *شریشیا کلی* O157:H7 روی سلول‌های ورو توسط بسیاری از محققان مانند اسپیرس (Spiras) و همکاران در سال ۱۹۷۷ بررسی شده است (۱۸). نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر با یافته‌های این پژوهشگران مشابه بود. نتایج پژوهش جاری نشان داد که محلول رومانند و یا توکسین باکتریایی قادر به تخریب رده سلولی ورو می‌باشند. با توجه به تعداد مورد استفاده و زمان گرما گذاری اثر تخریب متفاوت بود. پروبیوتیک‌ها و محلول رومانند حاصل از رشد آن‌ها با توانایی تغییر در گیرنده‌های ویژه پاتوژن در سطح سلول‌های میزبان، موجب مهار اتصال باکتری‌های پاتوژن به سلول‌ها می‌شوند. تخریب گیرنده به معنای عدم اتصال باکتری پاتوژن و یا متابولیت‌های سمی آن بر روی سلول هدف است. گاگنون (Gagnon) و همکاران نیز اتصال قوی‌تر پروبیوتیک‌های بیفیدوباکتریوم را نسبت به *شریشیا کلی* O157:H7 روی رده سلولی Caco-2 بررسی کردند. نتایج آن‌ها اتصال قوی‌تر پروبیوتیک‌ها به سلول‌ها را نشان داد (۱۱). در مطالعه جاری نیز بیفیدوباکتریوم‌ها در مقایسه با *شریشیا کلی* اتصال قوی‌تری به سلول‌های ورو داشتند. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پروبیوتیک‌ها و محلول رومانند حاصل از رشدشان نه تنها باعث تخریب سلول ورو نمی‌شوند، بلکه از تخریب سلولی ایجاد شده توسط *شریشیا کلی* O157:H7 نیز جلوگیری می‌نمایند. پروبیوتیک‌هایی مانند بیفیدوباکتریوم‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها قادر به اتصال قوی به رده سلولی هستند و از طریق مکانیسم‌های متفاوت اثر رقابتی و ممانعتی علیه رشد و استقرار باکتری‌های بیماری‌زا ایفا می‌کنند. پژوهشگران بسیاری، تولید فاکتورهای دیگری از جمله اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک و اسید بوتیریک توسط پروبیوتیک‌ها را از مهم‌ترین عوامل ممانعت کننده رشد و بیماری‌زایی باکتری‌های پاتوژن و اثر تخریبی آن‌ها روی سلول‌ها می‌دانند (۱۹). نتایج حاصل از بررسی بوید (Boyd) و لینگود (Lingwood) نشان داد که مصرف محلول رومانند حاصل از کشت لاکتوباسیلوس کازئی و بسیاری دیگر از لاکتوباسیلوس‌ها دارای اثر کشندگی علیه گستره وسیعی از

نداشتن درمان قطعی، یافتن راهی که بتواند در پیشگیری یا بهبود بیماری موثر باشد حائز اهمیت است. اثرات مفید پروبیوتیک‌ها در سلامت میزبان و داشتن مکانیسم‌های متعدد دفاعی در مقابل میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا سبب شده است که امروزه پروبیوتیک‌ها به عنوان ابزار مفیدی در مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد زمانی که پروبیوتیک‌ها به صورت پیش تیمار بر روی سلول‌ها ریخته شوند، اثر تخریبی ایجاد شده توسط اشریشیا کلی O157:H7 به طور چشمگیری کاهش خواهد یافت. با توجه به این نتایج پیشنهاد می‌گردد که ابتدا از پروبیوتیک‌ها در پیشگیری و درمان عفونت‌های ناشی از اشریشیا کلی O157:H7 در حیوانات آزمایشگاهی استفاده شود تا بتواند در آینده به عنوان راهی در پیشگیری و کنترل عفونت‌های ناشی از اشریشیا کلی O157:H7 در انسان مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدرانی

نویسندگان این مقاله از موسسه واکسن سازی رازی شیراز و دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت‌های اجرایی کمال امتنان را دارند.

از آن جایی که افزایش تعداد پروبیوتیک‌ها می‌تواند موجب اشغال بیشتر گیرنده‌های سطحی، تولید متابولیت‌های مفیدی مانند باکتریوسین‌ها و اسیدهای آلی گردد، بنابراین اثر ضدتخریبی آن‌ها در رقابت با اشریشیا کلی O157:H7 بیشتر آشکار می‌گردد (۱۹). به طور کلی اثر پیش تیمار پروبیوتیکی در مهار تخریب سلولی، بسیار بهتر از زمانی بود که به صورت هم‌زمان پروبیوتیک و باکتری بیماری‌زا (تیمار) روی سلول ریخته شدند. دلایل متعددی این نتایج را تفسیر می‌کند. از جمله این‌که در پیش تیمار، پروبیوتیک‌ها زودتر به گیرنده‌های سطح سلول متصل می‌شوند و مکان اتصال اشریشیا کلی O157:H7 به سلول را اشغال می‌کنند. همچنین با داشتن زمان کافی برای تولید باکتریوسین می‌توانند موجب کاهش بهتر تخریب سلول گردند. زمان کافی برای اتصال پروبیوتیک‌ها و تعداد مناسب آن‌ها برای اشغال گیرنده‌های سطحی سلول‌ها از عوامل کلیدی در ممانعت از تخریب سلول توسط باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد (۱۶ و ۲۲).

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت اشریشیا کلی O157:H7 در ایجاد عفونت‌های گوارشی و HUS، تنوع در مسیرهای انتقال و نیز

References

1. Ochoa TJ and Cleary TG. XVI Infectious disease- *Escherichia coli*. Chapter 83. 2005; 9: 921-924.
2. Wang L, Li Y, Mustaphai A. Rapid and simultaneous quantization of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. J Food Prot. 2007; 70(6): 1366-1372.
3. Natara JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(1): 142-201.
4. Boyce T, Swerdlow DL, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and the Hemolytic- Uremic Syndrome. N Engl J Med. 1995; 333(6): 364-368.
5. Osek J. Development of a multiplex PCR approach for the identification of shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. J Appl Microbiol. 2003; 95(6): 1217-1225.

6. Obrig TG. Shiga toxin mode of action in *E. coli* O157:H7 disease. *Front Biosci.* 1997; 2: 635-642.
7. Mckp S, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Kinght SC. Mechanism action of probiotics: Recent advances. *Inflamm Bowel Dis.* 2008; 21: 756-781.
8. Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neat F, Matuchansky C. *Bifidobacteria* as agents-physiological effect and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005; 22(6): 495-512.
9. Kiaei E, Amir Mozafari N, Samiol Adab H, Jandaghi N, Ghaemi E. Antagonistic effect of lactic bacteria present in yoghurt against pathogenic bacteria. *J Gorgan Uni Med Sci.* 2006; 8(17): 33-28. [In Persian]
10. Shin IS, Nishikawa K, Maruyama H, Ishii S. Histidine-tagged shiga toxin B subunit binding assay: simple and specific determination of gb3 content in mammalian cells. *Chem Pharm Bull.* 2006; 54: 522-527.
11. Gagnon M, Kheadr EE, Blay GL, Fliss I. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by *Bifidobacterial* strains of human origin. *Food Microbiol.* 2004, 92: 69-78.
12. Trejo FM, Minnaard J, Perez FP, De Antoni GL. Inhibition of *Clostridium difficile* growth and adhesion by *Bifidobacterium* supernatants. *Anaerobe.* 2006, 12(4): 186-193.
13. Namdar N, Tahamtan Y, Kargar M, Hoseini MH. Evaluation of antagonistic effect of probiotics *Bifidobacteria* spp. on *E. coli* O157:H7 in vitro. *J Microb World.* 2009, 2(3): 161-168. [In Persian]
14. Pamela HR, Davis KC, Garstka WR, Bhunia AK. Lactat dehydrogenase realase assay from vero cells to distinguish vero toxin producing *Eschrichia coli* from non vero toxin producing strains. *J Microbiol Methods.* 2000; 43(3): 171-178.
15. Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Asaki T, Kamiya S. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O15: H7 infection in mice. *FEMS Immun Med Microbiol.* 2004; 41: 219-266.
16. Johnson-Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, Gordanpour, MandSherman P M. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. *Infect Immun.* 2008; 76(4): 1340-1348.
17. Konwalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1977; 18: 775-779.
18. Sprirs JI, Stavric S, Konowalchuk J. Assay of *Escherichia coli* Heat -Labile Enterotoxin with Vero cells. *Infect Immun.* 1997; 16(2): 617-622.
19. Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PC, Goulet J. Probiotics reduce enterohemorrhag *Escherichia coli* O157: H7 and enter pathogenic *E. coli* O157: H6 induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and scytoskeletal rearrangements. *Infect Immun.* 2005; 73(8): 5183-5188.
20. Boyd B, Lingwood C. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron.* 1989; 51

(2): 207-210.

21. Su C, Berent JL. *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Humans. *Ann Intern Med.* 1995; 123(9): 698-707.
22. Johnson-Henry KC, Hagen KE, Gordanpour M, Tompkins TA, Sherman PM. Surface-Layer Protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2007; 9(2): 356-36.



Antagonistic effects of bifidobacterium spp. in decrease of cytopathic effects of Verotoxin-producing *Escherichia coli*

Najmeh Namdar¹, Mohammad Kargar², Yahya Tahamtan³, Mohammad Hossein Hosseini³

¹M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Young Researchers club, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

²Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

³Assistant Professor, Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Most Enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 strains are able to adhere to Vero cell line tightly and produce shiga toxin. The aim of this study was to develop a probiotic in vitro model for protection against *E. coli* O157:H7.

Materials and Methods: This study was performed experimentally on probiotic *Bifidobacterium* and shigatoxinogen *E. coli* O157:H7 in Vero cell line monolayers. The probiotic bacterium first was grown in MRS media and then was transferred into the Vero cell line-containing wells. After incubation, the cells were first exposed to three different treatments (pure stx₁, stx₂, a mix of stx₁ and stx₂) and then were treated with *E. coli* O157:H7 bacterial culture. After 24 h incubation at 37° C in CO₂ incubator, the cell changes were observed by invert microscope.

Results: The Vero cell lines pre-treated with probiotic bacterium responded differently to the doses of used Shiga-toxin and *E. coli* O157:H7. When the cells were treated with only toxin or *E. coli* O157:H7, there was a intensive amounts of cell cytotoxicity. However, pre-treatment with prebiotic bacterium decrease significantly the toxicity caused by *E. coli* O157:H7. The survival rates of the Vero cells treated with probiotic ranged between 80% and 100% compared with controls.

Conclusion: Based on the results of this study, the probiotic bacteria and the supernatant prepared from their culture decrease the cell toxicity effects of shiga-toxin and *E. coli* O157:H7. Therefore, the probiotic bacteria can be used as an alive vaccine in food industry in order to prevent and treatment of infections.

Keywords: *E. coli* O157:H7, Shiga toxin, Probiotic, *Bifidobacterium* spp.

Correspondance to: Yahya Tahamtan

Tel: +989177117940

E-mail: yahyatahamtan@yahoo.com

Journal of Microbial World 2013, 5(3&4): 93-104.