SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

Archive of SID

معیارهای ارزیابی ایمنی سویه های پروبیوتیک

دکتر سید سعید میردامادی

سازمان پژوهشهای علمی و صنعتی ایران ،

Email: Mirdamadi@irost.org

خلاصه:

تاکید بر ایمنی زیستی و ارزیابی ایمنی از مهمترین مباحث حفظ سلامت و بهداشت جامعه است. وسعت تحقیق و توسعه مصرف پروبیوتیک ها در ایران ما را بر آن می دارد که نظارت و تاکید بر اجرای ارزیابی ایمنی را الزامی نمائیم .

در این مقاله ضمن پرداختن به روشهای ارزیابی ایمنی در پروبیوتیک ها و بررسی آینده این تکنولوژی به نحوه عملکرد کشورهای پیشرو در این صنعت خواهیم پرداخت.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، ایمنی زیستی، ارزیابی خطر، قوانین مصرف

مقدمه:

غذاهای تخمیری طی هزاران سال به منظور حفظ سلامت غذا و افزایش زمان نگهداری و انبارداری توسط میکروارگانیسم های تخمیری تکامل یافته است.باکتری های لاکتیکی گروه بزرگ و ارزشمندی هستند که در جهت حفظ بهداشت غذا و safety نقش ویژه ای ایفا می کنند.مصرف این باکتری ها در اروپا سالانه به بیش از ۳۴۰۰ تن می رسد. استفاده از استارتر های صنایع لبنی در طی این سالها سالم و Safe بودن خود را اثبات نموده اند. امروزه مصرف سویه هایی نظیر L. acidophilus و L. casei و بسیاری دیگر از باکتری های لاکتیکی به عنوان پروبیوتیک توسعه یافته است. اما سابقه مصرف آنها به بیش از یکی دو دهه نمی رسد. از آنجا که سویه های لاکتیکی مورد مصرف در صنایع تخمیری از مواد لبنی ، سبزیجات تخمیری و فراورده های پروتئینی تخمیری جدا شده اند در مسیر گوارش تا روده حذف و یا به تعداد بسیار اندکی تقلیل می یابند و لذا از نظر سلامتی دارای ریسک خطر کمتری هستند اما سویه های پروبیوتیک منشا روده ای داشته و باید در مسیر سیستم گوارش زنده باقی بماند و در سیستم گوارش جایگزین میکروارگانیسم های دیگر گردد. بنابر این نمی توان اهمیت ارزیابی ایمنی این دو گروه باکتری را یکسان فرض کرد اگرچه برای مصرف هر سویه میکروبی ارزیابی ایمنی و سلامتی اجباری بوده و از اهمیت ویژه ای برخوردا است. با توجه به وجود گزارشات اندکی از ایجاد بیماری های گوارشی توسط برخی سویه های لاکتوباسیل و بیفیدوباکتر و حتی گزارش ایجاد عفونت در دستکاری های دندانپزشکی و وجود بسیاری از بیماری های زمینه ای مساعد کننده عفونت در جامعه بخصوص

www.SID.ir

Archive of SID

افراد دارای ضعف ایمنی ها از یک طرف و افزایش روز افزون تحقیق و توسعه مصرف پروبیوتیک ها ، لازم است توجه ویژه مسئولان کنترل کننده و محققین را به اهمیت اجرای ارزیابی ایمنی این گروه بزرگ از باکتری ها معطوف نمائیم. در این مقاله اهمیت و روش ارزیابی سویه های پروبیوتیک ارئه می گردد.

شناسایی مرفولوژیک ، فیزیولوژیک و سیستماتیک باکتری های پروبیوتیک:

جداسازی و شناسایی پروبیوتیک ها از مواد مختلف امروزه بطور گسترده ای در حال توسعه است. تکنیک های متعددی جهت شناسایی پروبیوتیک های جدا شده بکار می رود. روشهای فنوتیپی شناسایی دارای دقت تاکسونومیک بسیار کمی می باشد. تکیه بر تست های بیوشیمی بدلیل آسا نی و امکان اجرا در هر آزمایشگاه از وسعت بیشتری برخوردار است. این روش نیز تا حدودی کارساز است اما به دلیل تغییرات ژنتیکی باعث به اشتباه انداختن بسیاری از محقیقین می گردد. روشهای Chemotaxonomic نظیر SDS-Page پروتیین های سلولی ، روشهای دقیق تری برای شناسایی سویه های لاکتوباسیل و بیفیدوباکتر ها هستند اما گزارشات محدودیت این روشها را برای تشخیص L.acidophilus و L.plantarum از بیفیدوباکترها نشان می دهد. روشهای دیگر chemotaxonomic نظیر Gas liquid chromatographic analysis اسید های چرب متیل استر (GLC-FAME)در تشخیص پروبیوتیک ها از یکدیگر مفید واقع نشده است. امروزه مطالعات با روش DNA-DNA hybridization در حال افزایش می باشد.این روش به عنوان Gold Standard هنوز شناخته می شود. سکانس ژن 16S r DNA برای تععین جایگاه فیلوزنی سویه ها امروزه بطور وسیعی مورد استفاده قرار می گیرد. محققین نشان داده اند که ۵۰۰ جفت باز اول ژن 16 S rDNA برای شناسایی بیشتر لاکتوباسیل های پروبیوتیکی بجز L.gallinarum و L.amylovorus که دارای همولوژی بسیار بالایی در این ناحیه هستند، مناسب است. همچنین ثابت شده است که Partial 16S rDNA sequencing برای شناسایی بیفیدوباکتر ها کافی نیست. به نظر می رسد که تکنیک های انگشت نگاری (fingerprinting techniques) نظیر amplified fragment length polymorphism analysis و rep-PCR المنت های تکرار شونده ژنوم (repetitive genomic elements) نظیر (GTG)5 و BOX نتایج بهتری حاصل نماید.

بررسی سمیت حاد باکتری پروبیوتیک:

سمیت (toxicity) باکتری های لاکتیک روی بافت دستگاه گوارش با انجام تست acute toxicity test یکی از مهمترین فاکتورهای ارزیابی ایمنی زیستی است. در این تست برای بررسی سمیت باکتری از موش Balb-c و یا Lewis rat استفاده و $۱۰^{۱۰}$–$۱۰^{۷}$ CFU/ml از باکتری را به روشهای مختلف به حیوان خورانده و پس از طی زمان مناسب بر اساس پروتکل مورد استفاده حیوان را از جهت تغییر فعالیت ، رفتار ، سلامتی ، مصرف آب و غذای روزانه ، وزن بدن ، تب ، بررسی و سپس بافت های دستگاه گوارش نظیر ileum ؛

www.SID.ir

Archive of SID

سکوم، کلون را از نظرتغییرات بافت شناسی بررسی نموده و وجود باکتری در بافت های قلب ، غده های لنفاوی ، خون ، کبد ، طحال، کلیه و.... را با تکنیک های میکروبیولوژی و ملکولی بررسی می نمایند.

بررسی ایجاد Endocarditis توسط سویه پروبیوتیک:

از آنجا که محققین برخی از باکتری های پروبیوتیک نظیر L.casei و L.rhamnosus را در ایجاد اندوکاردیت موثر می دانند ، اتحادیه اروپا انجام آزمایش Infection Endocarditis را به عنوان یکی از تست های Safety assessment ضروری می داند. در این آزمایش نیز از مدل حیوانی خرگوش پاک (Phatogen Free) استفاده می شود و اثر باکتری در ایجاد اندوکاردیت مورد ارزیابی قرار می گیرد.

اثر بر سیستم ایمنی:

روشهای مختلفی جهت بررسی اثر میکروارگانیسم بر پروفایل Strain dependent cytokine وجود دارد که پروفایل سیتوکین های مربوط به T helper cell type 1 (Th1) که در بیماری های Auto immune موثر است و T helper cell type 2 (Th2) که در atopic allergy نقش دارد را ارزیابی می نماید.

برای این منظور تولید سیتوکین های التهابی نظیر TNF-α ، IL-1، IL-6، IL-8، IL-12 از سلول های اپیتلیوم روده در مدل موش ماده SJL/J mice و یا موش BALB/C بررسی می شود. در این روش با تزریق میکروارگانیسم مورد مطالعه، اثر گذاری آنها بر فاکتورهای ایمینولوژک ایجاد کننده بیماری Experimental Autoimmune Encephalomytitis (EAE) ارزیابی خواهد شد.

بررسی متابولیسم املاح صفراوی:

برخی باکتری های لاکتیکی نظیر لاکتوباسیل ها قادر به تغییر املاح صفراوی از نوع اولیه (Conjugated primary bile salts) به املاح آزاد و دهیدروکسی شده ثانویه (Dehydroxylated bile salts) در روده کوچک می باشند. املاح فوق علاوه بر ایجاد اسهال (diarrhea) و آسیب های روده ای (Intestinal lesions) در ایجاد سرطان روده نیز موثر هستند. لذا افزایش de-conjugation و de-hydroxylation املاح صفراوی توسط سویه کاندید پروبیوتیک با تولید آنزیم Bile Salt Hydrolase از ریسک های مهم بحساب می آید.

Hemolysis :

همولیز یکی از فاکتورهای عمومی ویرولانس میکروارگانیسم ها است که باکتری بیماریزا با آزاد سازی آهن هموگلوبین آنرا مورد استفاده قرار می دهد و باعث کم خونی و ادم در میزبان می گردد. این تست برای سویه های مورد نظر روی بلاد آگار حاوی ۵٪ خون انسان به همراه باکتری های Staphylococcus aureus و Bacillus cereus به عنوان کنترل مثبت α و β همولیز انجام می گیرد.

تست عدم فعال سازی سیستم کمپلمان (Resistance to human serum mediated killing) :

www.SID.ir

Archive of SID

سیستم کمپلمان در خون باعث مرگ میکروارگانیسم های پاتوژن و حذف آنها توسط فاگوسیت ها می گردد. توان گریز میکروارگانیسم مورد نظر از این سیستم باعث ماندگاری بیشتر آنها در خون و افزایش قدرت تهاجم آنها به بافت های دیگر بدن می شود. لذا این خاصیت باید به دقت مورد ارزیابی قرار گیرد.

بررسی کنترل القا انفجار تنفسی :

در طی فاگوسیتوز ، منونکلئوسیت ها (PMNs) با تولید رادیکالهای فعال اکسیزن ایجاد انفجار تنفسی نموده که باعث مرگ و هظم فاگوسیت می گردند. توانایی در جلوگیری از القاء انفجار تنفسی بشدت ریسک عفونت را افزایش می دهد.

بررسی Platelet aggregation :

اگریگاسیون پلاکت ها توسط میکروارگانیسم مورد نظر باعث ایجاد ترمبوز و اندوکاردیتیس عفونی می گردد.

بررسی توان اتصال به موکوس روده ای و ماتریکس خارج سلولی :

کلاژنها و دیگر پروتئین های خارج سلولی وسیله اتصال باکتری های پاتوژن به غشاء سلول و به عبارتی دروازه ورود عامل پاتوژن به بافت میزبان هستند. لذا بررسی توان اتصال به بافت موکوسی روده و ماتریکس خارج سلولی توسط میکروارگانیسم ما را به میزان Safety انها رهنمون می نماید.

بررسی Phosphatidyl inositol specific phospholipase C activity (PI-PLC):

فعالیت PI-PLC باعث آسیب به غشاء سلول های میزبان کشته و باعث انتقال آلودگی میکروبی به بافت هدف می گردد.

بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک:

مقاومت سویه ها به آنتی بیوتیک ها ، نوع مقاومت و نوع آنتی بیوتیک از مهمترین فاکتورهای بررسی ایمنی سویه ها می باشد. اکتسابی بودن یا ذاتی بودن مقاومت، پلاسمیدی یا کروموزومی بودن ژن مقاومت، قابل انتقال بودن و یا غیر قابل انتقال بودن از اهم مسائل قابل بررسی در این زمینه است.

پروبیوتیک های نسل بعدی

جداسازی سویه های جدید و معرفی آنها به عنوان پروبیوتیک با کاربردهای جدید نظیر معرفی Oxalobacter formigenes که باعث کاهش ریسک سنگ کلیه می گردد و سویه های پروبیوتیک دستورزی شده ژنتیکی (GMO) مثل سویه مولد anti-inflammatory cytokines (interleukin-10) در روده که ایجاد یک فرصت ارزشمند جهت مقابله با بیماری inflammatory bowel disease می نماید؛ بدلیل ایجاد خطرات مختلف نیاز به طراحی دستورالعمل های ایمنی زیستی جدیدی دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

لذا در این سخنرانی علاوه بر ارائه روشهای انجام این تکنیک ها به معرفی روشهای بررسی ریسک خطر در کشورهای مطرح خواهیم پرداخت.

منابع:

Ipek Goktepe, Vijay K. Juneja, Mohamed Ahmedna, Probiotics in Food Safety and bHuman Health, CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742, 2006,

G Mogensen et al. Food microorganisms — Health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. Bull. IDF, 377: 4–9, 2002.

DC Donohue, S Salminen. Safety of probiotic bacteria. Asian Pac. J. Clin. Nutr.,5: 25–28, 1996. 8. M Bernardeau, JP Vernoux, M Gueguen. Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. Int. J. Food Microbiol.,77: 19–27, 2002.

Donohue, M Deighton, JT Ahokas, S Salminen. Toxicity of lactic acid bacteria. In: S Salminen, A von Wright, Eds. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, New York, 1993, pp. 307–313.

JG Ruseler-van Embden, LM van Lieshout, MJ Gosselink, P Marteau. Inability of Lactobacillus casei strain GG, L. acidophilus, and Bifidobacterium bifidum to degrade intestinal mucus glycoproteins. Scand. J. Gastroenterol., 30: 675–680, 1995.

JS Zhou, Q Shu, KJ Rutherfurd, J Prasad, MJ Birtles, PK Gopal, HS Gill. Safety assessment of potential probiotic lactic acid bacterial strains Lactobacillus rhamnosus HN001, Lb. acidophilus HN017, and Bifidobacterium lactis HN019 in BALB/c mice. Int. J. Food Microbiol., 56: 87–96, 2000.

JS Zhou, Q Shu, KJ Rutherfurd, J Prasad, PK Gopal, HS Gill. Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria. Food Chem. Toxicol., 38: 153–161, 2000.

T Asahara, M Takahashi, K Nomoto, H Takayama, M Onoue, M Morotomi, R Tanaka, T Yokokura, N Yamashita. Assessment of safety of Lactobacillus strains based on resistance to host innate defence mechanisms. Clin. Diagn. Lab. Immunol., 10: 169–173, 2003.

www.SID.ir

SID

فیلم های آموزشی

سامانه ویراستاری STES

بلاگ مرکز اطلاعات علمی

کارگاه های آموزشی

سرویس ترجمه تخصصی

ابزارهای پژوهش

کارگاه‌های آموزشی مرکز اطلاعات علمی

آموزش نرم‌افزار Word برای پژوهشگران

روش تحقیق کمی

آموزش مهارت‌های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI