Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 1 (March-April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

A comparison between the effects of antibiotics and cell free supernatant of *Lactobacillus* spp. on growth of ESBL positive *K. pneumoniae*

Laya Heydari[1], Rouha Kasra Kermanshahi[1], Mohammad Mehdi Feizabadi[2]

1. Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biology, Alzahra university, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Medical Science, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2015/01/17
Accepted: 2015/05/03
Available online:2016/03/10

Article Subject:
Antibiotic Resistant

IJMM 1395; 10(1): 44-55

Corresponding author at:
Dr. Rouha Kasra Kermanshahi

Department of microbiology and biotechnology, faculty of biology, Alzahra university, Tehran, Iran

Tel:
+98 913 1150779

Email:
rkasra@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Within recent 15 years, extended spectrum beta lactamase (ESBL) positive agents have caused many infections which could be a serious threat to the antibiotic therapy. The aim of this study is to compare the effect of antibiotics and cell free supernatant (CFS) of *Lactobacillus* spp. culture on the survival of *K. pneumoniae* ESBL positive isolates that cause nosocomial infections.

Materials and Methods: The antibiograms were determined for 7 *K. pneumoniae* clinical isolates (expressing CTX-M, TEM and SHV beta-lactamases) according to Kirby-Bauer method. Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration for selected antibiotics were determined according to CLSI guidelines. In order to evaluate the effect of *Lactobacillus acidophilus, L. casei*, *L. fermentum*, *L. plantarum* and *L. rhamnosus'* CFS on *K. pneumoniae* isolates, well-diffusion method, MIC and MBC determination were used. To determine the probable effective agent of CFS on inhibition of *K. pneumoniae* growth, CFS were neutralized and evaluated again according to MODA method.

Results: All *K. pneumoniae* isolates were resistant to gentamicin, cephalothin, ceftazidime and ciproflpxacin. The CFS of *L. plantarum* and *L. rhamnosus* and their acidic metabolites had the most antimicrobial effect.

Conclusions: Functional disorder would occur through enzymes inactivation and increasing cell membrane permeability by the effect of acidic metabolites of CFS, while *K. pneumoniae* isolates became resistant to some antibiotics with specific site of action. Therefore, CFS of *Lactobacillus* spp. could be an appropriate alternative for selected antibiotics against these *K. pneumoniae* isolates.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae,* antibiotic resistance, cell free supernatant of *Lactobacillus* spp.

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Heydari L, Kasra kermanshahi R, Feiz abadi M M. A comparison between the effects of antibiotics and cell free supernatant of Lactobacillus spp. on growth of ESBL positive K.pneumoniae . Iran J Med Microbiol. 2016; 10 (1) :44-55

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۱۰، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۵
Journal homepage: www.ijmm.ir

مقایسه‌ی تاثیر آنتی بیوتیک‌ها و مایع شناور فاقد سلول کشت *لاکتوباسیلوس*‌ها بر رشد *کلبسیلا پنومونیه* دارای بتالاکتاماز وسیع الطیف

لعیا حیدری[۱]، روحا کسرای کرمانشاهی[۱]، محمدمهدی فیض آبادی[۲]

۱. دانشکده زیست شناسی، گروه میکروب شناسی و بیوتکنولوژی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۷
پذیرش: ۱۳۹۴/۰۱/۱۳
انتشار آنلاین: ۱۳۹۴/۱۲/۲۱
موضوع:
مقاومت پادزیستی
IJMM 1395; 10(1): 44-55

نویسنده مسئول:
دکتر روحی کسرای کرمانشاهی
دانشکده زیست شناسی، گروه میکروب شناسی و بیوتکنولوژی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
تلفن: ۰۹۱۳۱۱۵۰۷۷۹
پست الکترونیک:
rkasra@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: در ۱۵ سال اخیر عفونت‌های بسیاری با عوامل عفونی ESBL (Extended spectrum beta-lac-tamase) مثبت گزارش گردیده که تهدیدی جدی برای درمان است. هدف از این پژوهش مقایسه‌ی میان تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها با تاثیر مایع شناور فاقد سلول (CFS) *لاکتوباسیلوس‌ها* بر میزان رشد جدایه‌های ESBL مثبت *Klebsiella pneumoniae* عامل عفونت بیمارستانی می‌باشد.

مواد و روش ها: آنتی‌بیوگرام برای ۷ جدایه‌ی بالینی *K. pneumoniae* (فنوتیپ‌های CTX-M, SHV, TEM) به روش Kirby-Bauer و نیز تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی طبق استانداردهای CLSI انجام شد. سنجش میزان حساسیت جدایه‌ها به CFS ۵ سویه‌ی *Lactobacillus acidophilus* ، *L. casei* ، *L. fermen-tum* ، *L. plantarum* و *L. rhamnosus* با روش چاهک- پلیت و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی CFS انجام گردید. جهت شناسایی عامل احتمالی موثر بر مهار رشد جدایه‌های *K. pneumoniae* خنثی سازی CFS و سپس تأثیر مجدد آن به روش MODA انجام شد.

یافته‌ها: همه ی جدایه های *K. pneumoniae* به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفالوتین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. بیش‌ترین تأثیر ضدمیکربی CFS، مربوط به *L. plantarum* و *L. rhamnosus* و متابولیت‌های اسیدی CFS آن‌ها بود.

نتیجه‌گیری: CFS حاوی متابولیت‌های اسیدی، با غیرفعال سازی آنزیم‌ها و افزایش نفوذپذیری غشاء باعث اختلال عملکرد می‌باشد، در حالی که جدایه‌های *K. pneumoniae* نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها با جایگاه اثر اختصاصی مقاوم شده اند. بنابراین CFS *لاکتوباسیلوس‌ها* در مقایسه با آنتی بیوتیک‌های انتخابی در از بین بردن این جدایه‌های *K. pneu-moniae* می‌تواند انتخاب مناسب تری باشد.

کلمات کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مایع شناور فاقد سلول *لاکتوباسیلوس*‌ها

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یکی از عوامل شایع عفونت‌های بیمارستانی بعد از *اشریشیا کلی* و عامل عفونت‌های ادراری، تنفسی و زخم می‌باشد (۱). میزان مرگ و میر در عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به طور معنی داری (۱۰۰-۲۴٪) نسبت به انواع غیر مقاوم بیش‌تر است و طبق گزارش WHO فراوانی عفونت‌های بیمارستانی در میان عفونت‌ها ۸/۷٪ و عفونت مجاری ادراری (Urinary tract infection/UTI) دومین عفونت شایع در انسان است (۲). ظهور سویه‌های دارای مقاومت چندگانه دارویی بخصوص انواع (Extended spectrum beta-lactamase:ESBL) مثبت در میان گونه‌های *کلبسیلا* تبدیل به بحرانی برای درمان گشته است (۳). *کلبسیلا* بیشترین گونه‌ای است که ESBLs را تولید می‌کند و در بعضی کشورها شیوع جدایه‌های مولد ESBLs به ۵۰٪ نیز می‌رسد (۴).

عوامل ایجاد مقاومت، ترانسپوزون‌ها به تنهایی و یا در قالب ساختار بزرگ‌تر پلاسمید هستند و علاوه بر انتقال ژن‌های مقاومت، گاهی با دخول در توالی کد کننده‌ی ژن‌هایی مانند پورین‌های غشایی مانع بیان آن‌ها و انتقال آنتی‌بیوتیک و یا عامل ضد میکربی به درون سلول باکتری

www.SID.ir

می‌شوند (۶، ۵). گونه‌های *کلبسیلا* پلاسمیدهایی دارند که مقاومت آنتی‌بیوتیکی از جمله مقاومت به بتالاکتام‌ها و سفالوسپورین‌های وسیع الطیف مانند سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفتی‌زوکسیم را ایجاد می‌نمایند و باعث افزایش زمان و هزینه‌های درمان و عدم حصول نتیجه‌ی مناسب از درمان با آنتی‌بیوتیک‌های موجود می‌گردد (۷). شایع‌ترین ESBLs گزارش شده از کشورهای غربی و آسیایی، انواع وسیع الطیف مشتق شده از SHV و TEM بر روی پلاسمیدهای بزرگ می‌باشند. در سال ۱۹۸۴ جدایه‌های بیمارستانی مقاوم به تمامی بتالاکتام‌ها به جز ایمی‌پنم و سفومایسین مشاهده شد که دارای پلاسمید حامل بتالاکتاماز نوع CTX-1 بود. مطالعات نشان می‌دهند که ESBLs در *کلبسیلا پنومونیه* که در سال ۱۹۸۵ کم‌تر از ۱٪ بوده، به ۱۱٪ در سال ۱۹۸۸ و بیش از ۱۵٪ در سال ۱۹۹۰ رسیده‌اند. سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مولد ESBLs تا مدت‌ها به ایمی‌پنم حساس بوده و این آنتی‌بیوتیک به عنوان داروی انتخابی درمان عفونت‌های *کلبسیلا پنومونیه* استفاده می‌شد؛ اما در سال ۱۹۹۷ سویه‌های مقاوم به ایمی‌پنم نیز جدا شدند که دارای بتالاکتاماز پلاسمیدی تیپ AmpC بودند (۸). بنابراین با توجه به سیر فزاینده‌ی ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، جهت کنترل و یا ممانعت از عفونت‌های مقاوم به چندین دارو، ایده‌ی یافتن جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها، مانند استفاده از متابولیت‌های میکروارگانیسم‌های ایمن می‌تواند انجام پذیرد. سلول زنده و متابولیت‌های پروبیوتیک‌ها می‌توانند به عنوان جایگزین عامل ضد میکربی استفاده شوند. طبق تعریف FAO/WHO در سال ۲۰۰۲، پروبیوتیک‌ها موجودات زنده‌ای هستند که در صورت وجود در مقادیر کافی، اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان‌شان دارند. برخی از معیارهای انتخاب پروبیوتیک‌ها عبارتند از: داشتن منشأ انسانی، غیربیماری‌زا بودن، مقاومت به اسید و صفرا، توانایی چسبیدن به سلول‌های اپی‌تلیال و باقی ماندن در مجاری روده و معده، تولید ترکیبات ضد میکربی و حذف رقابتی باکتری‌های بیماری‌زا و یا کاهش آن‌ها در روده. اصلی‌ترین میکروارگانیسم‌های باکتریایی که به عنوان پروبیوتیک شناخته شده‌اند، جنس‌های *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* هستند. این دو جنس توانایی ایجاد هیچ گونه التهاب را ندارند و بعضی از آن‌ها از میکروفلورای انسان‌های سالم بدست آمده‌اند. تأثیر پروبیوتیک‌ها هم به صورت تأثیر در محل، مانند تجمع بر روی غشای سلول میزبان و هم به صورت دور از محل و با اثر متابولیت‌های ترشحی می‌باشد (۹). *لاکتوباسیلوس* عضو اصلی خانواده‌ی باکتری‌های اسید لاکتیک، با قابلیت تخمیر قندها به صورت جور و ناجور تخمیر به اسید لاکتیک، اسید استیک، اسید پروپیونیک، اسید بوتیریک و استالدهید، اتانول و CO_2 می‌باشد. دیگر متابولیت‌های آن‌ها شامل اسیدهای چرب زنجیره کوتاه، آب اکسیژنه و باکتریوسین‌ها است (۱۰،۱۱). گونه‌هایی از این جنس که به عنوان پروبیوتیک بسیار استفاده می‌شوند عبارتند از: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس روتری*، *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*. به عنوان مثال سویه‌ی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* LB تولید اسید لاکتیک، دی استیل استیک اسید، اسیدهای چرب زنجیره کوتاه، آلدهیدها و باکتریوسین لاکتیسین B را دارد (۱۲). *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC1608 از انواع جور تخمیر مولد اسید لاکتیک در شرایط بی‌هوازی می‌باشد که تأثیر CFS آن در مقایسه با آزیترومایسین و کلرآمفنیکل بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* گزارش شده است (۱۳). سویه‌ی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG (ATCC53103) علاوه بر متابولیت‌های اسیدی، پپتیدها و اسیدهای چرب زنجیره کوتاه، تولید نیتریک اکسید را نیز در روده با ویژگی کنترل رشد باکتری‌های بیماری‌زا دارا می‌باشد (۱۴). پپتیدهای ضدمیکربی استخراج شده از کشت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC8014 بر *کلبسیلا پنومونیه* بیش‌ترین اثر ضدمیکربی را نسبت به دیگر باکتری‌های بیماری‌زا داشته‌اند (۱۵). باکتریوسین‌ها با اتصال به لیپید II که انتقال دهنده‌ی اصلی زیرواحدهای پپتیدوگلیکان است، مانع ساخت صحیح دیواره سلولی و نیز ایجاد منفذ در غشاء شده که مرگ باکتری را در پی دارد (۱۶). تعدادی از مطالعات، تولید بیوسورفکتانت توسط *لاکتوباسیلوس* را با ساختار پیچیده و متشکل از پروتئین و پلی‌ساکاریدها گزارش نموده‌اند. بیوسورفکتانت‌ها با عملکردی مشابه شوینده‌ها، دیواره‌ی سلولی باکتری را تخریب کرده و به عنوان عامل ضد چسبندگی و ضدباکتریایی شناخته می‌شوند. تولید بیوسورفکتانت‌ها توسط پروبیوتیک‌ها و اختصاصاً *لاکتوباسیلوس لاکتیس* و نقش مهاری آن در جایگزینی باکتری بیماری‌زا با مقاومت چندگانه‌ی آنتی‌بیوتیکی در بیمارانی با عفونت‌های مجاری ادراری گزارش گردیده است (۱۷).

بنابراین، با توجه به خصوصیات مهاری پروبیوتیک‌ها علیه باکتری‌های بیماری‌زا و ایمن بودن آن‌ها برای میزبان، اعضای جنس *لاکتوباسیلوس* با ویژگی‌های پروبیوتیکی، می‌توانند انتخاب مناسبی جهت مطالعه باشند. در این پژوهش تاثیر CFS کشت ۵ گونه‌ی *لاکتوباسیلوس* بر بقای سویه‌های ESBL مثبت *کلبسیلا پنومونیه* در مقایسه با تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی گردیده است.

روش‌ها

این مطالعه آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۲، در آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشگاه الزهرا (س) انجام شد.

www.SID.ir

سویه‌های باکتریایی مورد استفاده

۷ جدایه‌ی *کلبسیلا پنومونیه* جمع آوری شده از نمونه‌های ادرار و سوند از بیماران بستری در بیمارستان‌های دانشگاه تهران و لبافی نژاد با توالی شناسایی و ثبت شده‌ی ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی پلاسمیدی در پایگاه GenBank استفاده گردیدند. کد و ژنوتیپ مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها به این ترتیب می‌باشد: 210 L (SHV-11)، 244 L (TEM-1, CTX-M-15)، 302 T (TEM-1)، 548 L (CTX-M-15)، 549 L (CTX-M-15)، 551 L (TEM-1, CTX-M-15)، 556 L (CTX-M-15, SHV-11). سویه‌ی *کلبسیلا پنومونیه* ATCC700603 به عنوان کنترل مثبت برای وجود ESBL و *اشریشیا کلی* ATCC25922 به عنوان کنترل منفی نیز استفاده شدند. سویه‌های *لاکتوباسیلوس* مورد استفاده، که به عنوان پروبیوتیک شناخته شده‌اند نیز به این ترتیب می‌باشد: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ATCC۴۳۵۶، *لاکتوباسیلوس کازئی* PTCC1608، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* PTCC1638، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC8014 و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* PTCC1637 و از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه گردیدند.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی

جهت انجام آنتی‌بیوگرام، از کشت ۲۴ ساعته‌ی *کلبسیلا پنومونیه* در محیط آبگوشت مولر هینتون Mueller-Hinton Broth (Merck; Germany) در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس استفاده گردیده است.

جهت سنجش کیفی حساسیت سویه‌ها با روش Kirby-Bauer از دیسک‌های تتراسایکلین (۳۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، کلرآمفنیکل (۳۰µg)، سفالوتین (۳۰µg)، سولفومتاکسازول، سیپروفلوکساسین (۵µg)، آمپی‌سیلین (۱۰µg)، استرپتومایسین (۱۰µg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰µg)، سفوتاکسیم (۳۰µg)، داکسی‌سایکلین (۳۰µg)، پنی‌سیلین (۱۰µg)، ایمی‌پنم (۱۰µg)، سفپیم (۵µg)، سفازولین (۳۰µg) و نیتروفورانتوئین (۳۰۰µg)، شرکت پادتن طب، استفاده و قطر هاله‌ی عدم رشد بر روی محیط مولر هینتون آگار (MHA) پس از گرمخانه گذاری ۲۴ ساعته در ۳۷ درجه سلسیوس ثبت گردید (جدول ۱). جهت سنجش کمّی حساسیت سویه‌ها، تعیین MIC و MBC با آنتی‌بیوتیک‌های سفالوتین (Sigma-Aldrich; USA)، جنتامایسین (اکسیر)، سفتازیدیم (Glaxo; France) و سیپروفلوکساسین (Flu-ka; Germany) طبق استاندارد CLSI انجام شد (جدول ۲).

تعیین حساسیت به CFS پروبیوتیک‌ها

بررسی کیفی تأثیر CFS پروبیوتیک‌ها با روش چاهک-پلیت و بر روی محیط MHA انجام شد و جهت بدست آوردن CFS، سویه‌های *لاکتوباسیلوس* به مدت ۴۸ ساعت در آبگوشت MRS در جار بی‌هوازی به همراه CO_2 گرمخانه گذاری شده، سپس با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و با فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ mµ استریل شدند. CFS کشت ۴۸ ساعته، CFS خنثی شده با سود ۱ نرمال تا pH معادل ۷ و آبگوشت MRS استریل به عنوان کنترل منفی برای پر نمودن چاهک‌هایی استفاده شد که سطح MHA آن قبلاً با سوسپانسیون *کلبسیلا پنومونیه* با استاندارد ۰/۵ مک فارلند به صورت کشت چمنی تلقیح شده بود. پلیت‌ها ابتدا ۲ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس برای نفوذ بهتر محتویات درون چاهک‌ها به آگار و مهار رشد میکربی پیش از نفوذ CFS درون آن، نگهداری و سپس ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند و نتایج به صورت هاله‌ی عدم رشد مشاهده گردید (جدول ۳).

سنجش کمّی تأثیر CFS بر کشت سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* نیز با روش تعیین MIC انجام شد. بدین ترتیب که از CFS کشت ۴۸ ساعته پروبیوتیک‌ها، سری رقت‌های ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲ تهیه گردید. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) به شکل میکرودیلوشن و در میکروتیتر پلیت انجام شد، به طوری که ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون *کلبسیلا پنومونیه* با غلظت ۰/۵ مک فارلند که ۱۰۰ برابر با آب مقطر رقیق شده (CLSI 2009)، ۵۰ میکرولیتر CFS و ۱۰۰ میکرولیتر MHB در چاهک اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید (۱۸). از چاهک‌هایی که فاقد کدورت بودند کشت مجدد داده شد و تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) نیز صورت گرفت. تعیین MIC مربوط به CFS خنثی شده با سود ۱ نرمال نیز به همین روش ذکر شده انجام شد.

تعیین متابولیت مؤثر در CFS

جهت تعیین متابولیت یا متابولیت‌های احتمالی عامل تأثیر مشاهده شده بر جدایه‌ها، ابتدا اثر هرکدام از عوامل اسیدی مانند اسید لاکتیک و دیگر اسیدهای آلی، عوامل پروتئینی و پپتیدی مانند باکتریوسین‌ها و تأثیر آب اکسیژنه به طور جداگانه خنثی شد. pH مربوط به ذخیره CFS و تمامی رقت‌های تهیه شده از آن اندازه گرفته شد و سپس با محلول ۱ نرمال سود تا pH معادل ۷ خنثی گردید. جهت حذف اثر باکتریوسین و پپتیدهای ضدمیکربی، CFS با آنزیم‌های پپسین (۱ mg/ml) و تریپسین (۱ mg/ml) تیمار و آب اکسیژنه موجود در آن نیز با اثر کاتالاز (۵ mg/ml) تجزیه شد. سپس مجدداً MIC برای CFS با تیمارهای عنوان شده تعیین می‌گردد. یک روش مورد استفاده جهت بررسی متابولیت‌های مؤثر روش

Archive of SID
www.SID.ir

MODA (Microscale Optical Density Assay) است (۱۹). سوسپانسیون میکربی با کدورت ۰/۵ مک فارلند به میزان ۱:۱۰۰۰۰ رقیق شده و ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسون به همراه CFS به چاهک افزوده شد. یک چاهک به عنوان شاهد بدون CFS یا محیط کشت، شامل سوسپانسیون میکربی و بدون CFS، شاهد مثبت است. شاهد مثبت دیگر آبگوشت MRS استریل تیمار شده مطابق CFS می‌باشد (جداول ۴ و ۵) . pH برای هر رقت از CFS اندازه گیری شد. لازم به ذکر می‌باشد که محاسبات آماری توسط نرم افزار Minitab16 و آزمون ANOVA انجام گردیده است.

یافته‌ها

نتایج تعیین حساسیت جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها، به گونه ای که سعی بر این بود که از تمامی خانواده‌های آنتی‌بیوتیکی حداقل یک نوع استفاده شود در جدول ۱ نشان داده شده است. طبق نتایج، مقاومت جدایه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سیپروفلوکساسین، استرپتومایسین، نالیدیکسیک اسید و سفوتاکسیم در مقایسه با سویه‌ی استاندارد بیش‌تر می‌باشد. میزان MIC و MBC برای آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی برطبق نتایج آنتی‌بیوگرام، شامل جنتامایسین، سفالوتین، سفتازیدیم (به عنوان جایگزین سفوتاکسیم) و سیپروفلوکساسین در جدول ۲ نشان داده شده است. بررسی اثر CFS کشت ۵ سویه‌ی پروبیوتیک بر روی کشت ۲۴ ساعته‌ی جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* در جدول ۳ بیانگر اثر مهاری قوی CFS دو سویه‌ی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC8014 و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* PTCC1637 نسبت به دیگر پروبیوتیک‌ها می‌باشد. اختلاف قطر هاله‌ی عدم رشد جدایه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* در مقایسه با نمونه استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC700603 در حضور CFS دو *لاکتوباسیلوس* ذکر شده با $P\text{value} \sim 0.7$ اختلاف معنی داری نمی‌باشد و با توجه به ESBL مثبت بودن نمونه‌ی استاندارد، اثر CFS پروبیوتیک‌ها بر روی نمونه‌های بالینی نیز منطقی و قابل قبول به نظر می‌رسد. بررسی اثر مهاری CFS علیه جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* با تعیین MIC و MBC آن‌ها بدین ترتیب بود: MIC و MBC مربوط به CFS کشت ۲۴ ساعته *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تعیین نگردید، به این معنی که هیچ یک از رقت‌های (ml/ml) ۱ تا ۱/۳۲ از CFS رقیق شده‌ی کشت ۲۴ ساعته مانع رشد *کلبسیلا پنومونیه* نشده بود، اما رقت ۱/۲ از CFS کشت ۴۸ ساعته ی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان MIC و MBC بدست آمد. در واقع این رقت دارای خاصیت کشندگی *کلبسیلا پنومونیه* نیز بود. MIC برای CFS کشت ۲۴ ساعته ۱/۲ *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بدست آمد، اما MBC تعیین نشد و خاصیت کشندگی وجود نداشت. CFS کشت ۴۸ ساعته *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نیز MIC معادل ۱/۸ و MBC معادل ۱/۲ نسبت حجمی (CFS به آبگوشت MRS استریل) را بدست داد. بنابراین نتایج MIC و MBC نشان دهنده‌ی تأثیر بیش‌تر CFS کشت ۴۸ ساعته نسبت به ۲۴ ساعته می‌باشد.

میزان قدرت مهاری CFS تیمار شده با سود، پپسین، تریپسین و

جدول ۱ : نتایج حساسیت جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌ها به روش انتشار از دیسک

آنتی‌بیوتیک (µg) / سویه‌ی کلبسیلا پنومونیه و اشریشیا کلی	210L	244L	302T	548L	549L	551L	556L	کلبسیلا پنومونیه ATCC700603	اشریشیا کلی ATCC25922
آمپی‌سیلین (۱۰)	R*	R	R	R	R	R	R	R	S
تتراسایکلین (۳۰)	S**	S	R	R	R	R	R	R	S
جنتامایسین (۱۰)	R	R	R	S	R	S	R	R	S
کلرآمفنیکل (۳۰)	S	S	S	S	S	S	R	S	S
سفالوتین (۳۰)	R	R	R	I	R	R	R	R	I
سیپروفلوکساسین (۵)	R	S	R	S	I	R	R	I	S
استرپتومایسین (۱۰)	I#	R	S	R	S	R	R	S	I
نالیدیکسیک اسید (۳۰)	R	R	R	S	S	R	R	S	S
سفوتاکسیم (۳۰)	R	R	R	S	R	R	R	I	S
اریترومایسین (۱۵)	R	R	R	R	R	R	R	R	R
داکسی سایکلین (۳۰)	S	S	R	R	I	R	R	R	S
پنی‌سیلین (۱۰)	R	R	R	R	R	R	R	R	R

*(R): مقاوم **(S): حساس #(I): نیمه حساس

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲ :میزان MIC و MBC آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی برای جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به روش Microdilution

آنتی‌بیوتیک / باکتری	جنتامایسین		سفالوتین		سفتازیدیم		سیپروفلوکساسین	
	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)
کلبسیلا پنومونیه 210L	-[1]	-[2]	-	-	-	-	-	۵۱۲ R
کلبسیلا پنومونیه 244L	-	-	-	-	-	-	۲۵۶	۲۵۶ R
کلبسیلا پنومونیه 302T	۲۵۶	۲۵۶ R[3]	-	-	-	-	۵۱۲	۲۵۶ R
کلبسیلا پنومونیه 548L	-	۱۶ R	-	-	-	-	-	۳۲ R
کلبسیلا پنومونیه 549L			-	-	-	-	۱۶	۱۶ R
کلبسیلا پنومونیه 551L	۸	۸ I[4]	-	-	-	-	۱۲۸	۶۴ R
کلبسیلا پنومونیه 556L	-	-	-	-	-	-	-	۵۱۲ R
کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 (شاهد مثبت)	-	R ۱۶	-	۳۲ R	-	-	-	۱ S
اشریشیا کلی ATCC25922 (شاهد منفی)	۶۴	۱S[5]	-	۱S	۱S	-	۸	۱ S

۱. بیانگر وجود کلنی و عدم تعیین MBC حتی در تمامی رقت‌های آنتی‌بیوتیک ۲. بیانگر وجود کدورت در تمامی رقت‌های آنتی‌بیوتیک و عدم تعیین MIC = مقاوم ۳. (R): مقاوم ۴. (I): نیمه حساس ۵. (S): حساس

جدول ۳ :میانگین و انحراف معیار اندازه‌ی قطر هاله‌های عدم رشد جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* تحت تأثیر ۱۰۰ میکرولیتر CFS (بر حسب میلی‌متر ± SD) به روش چاهک- پلیت (Pvalue~ 0.7)

جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه / پروبیوتیک‌ها	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC4356	لاکتوباسیلوس کازئی PTCC1608	لاکتوباسیلوس فرمنتوم PTCC1638	لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC8014	لاکتوباسیلوس رامنوسوس PTCC1637
210L	۶[*]	۶	۱۰±۱/۲	۱۰/۳±۰/۴۷	۱۲±۰/۶
244L	۶	۶	۶	۱۱/۶±۰/۴۷	۱۲/۶±۰/۴
302T	۶	۶	۶	۱۰/۳±۰/۴۷	۱۱±۰/۴
548L	۶	۶	۶	۹/۶±۱/۲	۹/۵±۰/۵
549L	۶	۱۳±۲/۱	۶	۶	۱۲±۱/۶
551L	۱۴/۶±۱/۶	۱۲±۰/۸	۶	۱۳±۱/۴	۱۱±۲/۱
556L	۶	۶	۶	۱۴/۶±۱/۲	۱۴/۶±۰/۴۷
کلبسیلا پنومونیه ATCC700603	۶	۶	۹/۵±۰/۵	۱۲/۵±۲/۵	۱۴/۵±۰/۵

(*) قطر چاهک = رشد نمونه

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۴ : تعیین حساسیت جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به CFS سویه‌ی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ATCC ۸۰۱۴ در شرایط تیمار با سود، پپسین، تریپسین و کاتالاز توسط اسپکتروفوتومتری در ۶۲۵ nm در مقایسه با شاهد مثبت (میانگین جذب نوری سوسپانسیون ± SD) به روش MODA

کلبسیلا پنومونیه / تیمارهای مختلف CFS	کلبسیلا پنومونیه 302T		کلبسیلا پنومونیه 556L		کلبسیلا پنومونیه ATCC700603(شاهد مثبت)	
	MRS بدون تیمار*	پس از تیمار	MRS بدون تیمار	پس از تیمار	MRS بدون تیمار	پس از تیمار
CFS بدون تیمار	۱/۶۱۲ ±۰/۰۵	۰/۰۱۵±۰/۰۱	۱/۷۴۲±۰/۰۲	۰/۰۳۶±۰/۰۵	۱/۴۰۹±۰/۰۱	۰/۲۱±۰/۰۲
CFS با تیمار سود	۱/۱۱۵±۰/۰۵	۱/۰۰۶±۰/۰۳	۲/۰۰۳±۰/۱۵	۱/۷۰۹±۰/۰۳	۱/۶۱۸±۰/۰۶	۱/۱۴±۰/۰۴
CFS با تیمار کاتالاز	۱/۴۳۶±۰/۰۲	۰/۱۵۶±۰/۱	۲/۰۱۲±۰/۰۲	۱/۶۳۲±۰/۰۱	۲/۰۳±۰/۱	۰/۹۸±۰/۰۹
CFS با تیمار پپسین	۱/۸۴۳±۰/۰۴	۰/۰۸۴±۰/۱	۱/۵۲۴±۰/۵	۱/۰۴۶±۰/۰۱	۱/۳۰۶±۰/۰۴	۰/۶۵±۰/۰۲
CFS با تیمار تریپسین	۲/۰۱۱±۰/۱	۰/۱۳۶±۰/۰۳	۱/۶۱۳±۰/۰۲	۰/۹۶±۰/۰۶	۱/۲۲۵±۰/۰۲	۰/۵۴±۰/۰۳
سوسپانسیون میکربی بدون CFS	۱/۹۱۵±۰/۱۵		۱/۸۱۰±۰/۲		۱/۸۷±۰/۵	

*شاهد منفی، شامل آبگوشت MRS که تیمار مشابه لوله‌ی حاوی سوسپانسیون میکربی و CFS تیمار شده را دارد

جدول ۵ : تعیین حساسیت جدایه‌های K. pneumoniae به CFS سویه‌ی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* PTCC ۱۶۳۷ در شرایط تیمار با سود، پپسین، تریپسین و کاتالاز توسط اسپکتروفوتومتری در ۶۲۵ nm (میانگین جذب ± SD) به روش MODA

کلبسیلا پنومونیه / تیمارهای مختلف CFS	کلبسیلا پنومونیه302T		556L کلبسیلا پنومونیه		کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 (شاهد مثبت)	
	MRS بدون تیمار*	پس از تیمار	MRS بدون تیمار	پس از تیمار	MRS بدون تیمار	پس از تیمار
CFS بدون تیمار	۱/۳۹۴±۰/۰۷	۰/۰۷۱±۰/۰۲	۱/۲۹۸±۰/۰۵	۰/۰۳۳±۰/۰۹	۱/۸۶±۰/۰۵	۰/۰۲±۰/۰۸
CFS با تیمار سود	۲/۰۴۳±۰/۰۳	۱/۷۱۵±۰/۰۹	۱/۴۶۹±۰/۰۳	۱/۰۰۷±۰/۲	۱/۳۷۵±۰/۰۲	۰/۸۱۷±۰/۰۳
CFS با تیمار کاتالاز	۱/۴۸۵±۰/۱	۰/۲۰۸±۰/۱۲	۱/۶۰۴±۰/۰۹	۰/۳۱۱±۰/۰۶	۱/۰۶±۰/۱	۰/۷۹۰±۰/۰۹
CFS با تیمار پپسین	۱/۹۳۲±۰/۱	۰/۱۸۴±۰/۰۶	۱/۳۹۰±۰/۱	۰/۳۱۰±۰/۰۲	۱/۹۲۵±۰/۰۲	۱/۱۱۴±۰/۰۱
CFS با تیمار تریپسین	۱/۸۸۱±۰/۰۲	۰/۰۱۵±۰/۰۲	۱/۶۱۹±۰/۰۱	۰/۷۰۴±۰/۵	۱/۶۲۰±۰/۱	۰/۸۵±۰/۰۱
سوسپانسیون میکربی بدون CFS	۱/۷۴۸±۰/۵		۱/۷۹۰±۰/۷		۱/۴۴±۰/۷	

*شاهد منفی، شامل آبگوشت MRS که تیمار مشابه لوله‌ی حاوی سوسپانسیون میکربی و CFS تیمار شده را دارد

کاتالاز با محاسبه‌ی جذب نوری مخلوط CFS تیمار شده و کشت جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* در جداول ۴ و ۵ مشخص شده اند. اختلاف میان جذب نوری در ۶۲۵ nm میان تیمارهای مختلف، برای تیمار با سود در مقایسه با تیمار پپسین، تریپسین و کاتالاز با $P\text{value} \sim 0$ به طور معنی داری بیش‌تر است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت بیش‌ترین اثر مهاری مربوط به خصوصیت اسیدی CFS پروبیوتیک می‌باشد. بدین منظور مقایسه‌ای از میزان pH مربوط به CFS کشت‌های ۲۴ و ۴۸ ساعته‌ی دو پروبیوتیک در آبگوشت MRS انجام شد که pH پایین‌تر متعلق به کشت ۴۸ ساعته‌ی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* با مقدار ۳/۶۹ بود و با نتایج MIC و MBC عنوان شده در بخش پیشین مطابقت داشت.

بحث

در سال‌های اخیر، به دلیل فشار انتخابی حاصله از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت ایجاد شده در پی آن، با افزایش طیف انواع آنتی‌بیوتیک‌ها به احتمال زیاد پتانسیل بروز مقاومت با سازوکارهای مختلف مقاومتی در باکتری‌ها وجود خواهد داشت. بخصوص در باکتری‌های گرم منفی از خانواده‌ی انتروباکتریاسه انتقال افقی ژن به سهولت رخ داده و خصوصیات مقاومت به مواد ضدمیکربی به سرعت در میان جنس‌ها شیوع پیدا می‌کند. انتقال این قبیل مقاومت‌ها در محیط بیمارستانی، که باکتری‌ها با تشکیل بیوفیلم نیز جایگاه خود را تثبیت نموده اند بسیار شایع می‌باشد. در بیماران بستری که براثر ضعف ایمنی و یا کهولت سن دچار عفونت گردیده اند، معمولاً پاسخ به درمان آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مقاوم با شکست مواجه شده و میزان مرگ

Archive of SID

www.SID.ir

و میر افزایش می‌یابد. یکی از ایده‌هایی که در این چند ساله جهت رفع این مشکلات پدید آمده اند، استفاده از دیگر میکروارگانیسم‌ها و متابولیت‌های آن‌ها با خصوصیات ضدمیکربی می‌باشد. پروبیوتیک‌ها در این میان بسیار پر کاربرد بوده و مطالعات بسیاری بر روی تأثیرات ضدمیکربی آن‌ها بر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، هم به صورت سلول‌های زنده و هم CFS انجام شده است. نکته‌ی جالب توجه مقاومت پروبیوتیک‌ها به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد.

در این پژوهش نتایج بررسی مقاومت جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به روش انتشار در آگار به این ترتیب بود: آمپی‌سیلین (۱۰۰٪)، تتراسایکلین (۷۱٪)، جنتامایسین (۷۱٪)، کلرآمفنیکل (۱۴٪)، سفالوتین (۷۱٪)، سیپروفلوکساسین (۵۷٪)، استرپتومایسین (۵۷٪)، نالیدیکسیک اسید (۷۱٪)، سفوتاکسیم (۸۵٪)، اریترومایسین (۱۰۰٪)، داکسی‌سایکلین (۵۷٪) و پنی‌سیلین (۱۰۰٪). Pirouzi و همکاران (۲۰۱۲) برای جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* دارای ژن‌های SHV-1 و TEM-1 درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را چنین بدست آوردند: آمپی‌سیلین (۲۰٪)، تتراسایکلین (۴۷٪)، جنتامایسین (۵۷٪)، سیپروفلوکساسین (۳۷٪) و نالیدیکسیک اسید (۲۷٪) (۲۰). در کار Soltan dalal و همکاران (۲۰۱۲)، نتایج برای تتراسایکلین (۲۸٪)، جنتامایسین (۳۳٪)، کلرآمفنیکل (۲۶٪)، سفالوتین (۳۹٪)، سیپروفلوکساسین (۱۸٪) و سفوتاکسیم (۳۳٪) بود. اما حساسیت خوبی در میان جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* به ایمی‌پنم، سفتازیدیم و نالیدیکسیک اسید دیده شد (۲۱). در حالی که جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* در این پژوهش اکثراً به سفوتاکسیم و نالیدیکسیک اسید مقاوم بودند. Nahaei و همکاران (۲۰۰۹) مقاومت به سفتازیدیم را در جدایه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* حدود ۹۲٪ گزارش کردند که مشابه نتیجه مقاومت به سفتازیدیم (۱۰۰٪) در این پژوهش می‌باشد (۲۲). MIC آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی بر جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* ، برای جنتامایسین (۵۱۲ µg/ml < تا ۸)، سفالوتین (۵۱۲ µg/ml <)، سفتازیدیم (۵۱۲ µg/ml <) و سیپروفلوکساسین (۵۱۲ µg/ml - ۱۶) و همه در محدوده‌ی مقاوم بدست آمد. در مطالعه‌ی Eslami و همکاران (۲۰۱۲)، مقاومت به سفتازیدیم در سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* وجود داشته و بیش‌تر در غلظت ۱۶ µg/ml مشاهده شده است، در حالی که نتایج این پژوهش مقاومت تمامی جدایه‌ها را به غلظتی بیش‌تر از ۵۱۲ µg/ml نشان می‌دهد (۲۳). Afifi (۲۰۱۳) مقاومت سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مولد ESBLs را چنین گزارش نموده است: جنتامایسین (۸ µg/ml < تا ۲ <)، سفالوتین (۱۶ µg/ml <)، سفتازیدیم (۱۶ µg/ml < تا ۸) و سیپروفلوکساسین (۲ µg/ml < تا ۰/۵ <)(۲۴). این سویه‌ها به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین حساس و به سفالوتین و سفتازیدیم مقاوم بودند، در حالی که جدایه‌های مورد مطالعه‌ی این پژوهش به هر چهار آنتی‌بیوتیک مقاومت را نشان داده‌اند. براساس نتایج و مقایسه با دیگر مطالعات و سویه *کلبسیلا پنومونیه* استاندارد، جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* بررسی شده، مقاومت به بتالاکتام‌های مورد آزمایش و آنتی‌بیوتیک‌های انتخاب اول درمان عفونت‌های مجاری ادراری *کلبسیلا پنومونیه* مانند سفالوتین، سفتازیدیم، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین را نشان می‌هند در حالی که در مطالعات دیگر همراهی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بدین شکل مشاهده نشد و این نتیجه بیانگر وجود مقاومت چندگانه دارویی در این جدایه‌ها به واسطه‌ی حضور پلاسمیدهای مقاومت متعدد و سهولت انتقال این مقاومت در فضای بیمارستان و بخصوص در جمعیت میکروارگانیسم‌های مستقر در بیوفیلم می‌باشد. بنابراین شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی به سرعت رخ می‌دهد و نتیجه ظهور سویه‌هایی است که به غلظت‌هایی از آنتی‌بیوتیک حتی چند برابر MIC نیز مقاومت نشان می‌دهند.

اثر مهاری مشاهده شده از CFS سویه‌های *لاکتوباسیلوس* جدا شده از ماست در پژوهش Kazemi و همکاران (۲۰۱۱) بر سویه *کلبسیلا پنومونیه* PTCC1053 به روش چاهک پلیت چنین می‌باشد: ۱۰/۶۶ میلی‌متر برای CFS سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*(۲۵). بر خلاف این نتیجه، اثر مهاری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* بر جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* در پژوهش حاضر ناچیز بود. سویه‌های *لاکتوباسیلوس* مورد استفاده‌ی پژوهش حاضر؛ سویه استاندارد و نه بومی بودند، در حالی که سویه‌های مطالعه‌ی ذکر شده جدا شده از محصول بومی بودند و احتمال تفاوت در نوع متابولیت‌ها وجود دارد، باتوجه به اینکه زمان گرمخانه گذاری کشت سویه‌های *لاکتوباسیلوس* ذکر نگردیده است و در تنوع متابولیت‌ها مؤثر می‌باشد. Soltan dalal و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر CFS سویه‌ی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ATCC4356 بر بیماری‌زاهای انتروباکتریاسه بررسی نمودند. اثر مهاری بر *اشریشیا کلی* ATCC25922 با قطر هاله عدم رشد ۱۱/۶۶ میلی‌متری بدست آمد که مشابه نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر نمی‌باشد (۲۶). Dorri و همکاران (۲۰۱۱) بیش‌ترین اثر ضدمیکربی CFS سویه‌های *لاکتوباسیلوس* را علیه *اشریشیا کلی* با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جدا شده از مدفوع کودکان گزارش نمودند و ترتیب اثرگذاری پس از آن متعلق به *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بوده است (۲۷). Fazeli و همکاران (۲۰۰۹) نیز بیش‌ترین اثر مهاری باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از میکروفلورای روده‌ی کودکان بر روی رشد *اشریشیا کلی* (EPEC) *را به ترتیب مربوط به لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (۱۴ mm) *و لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (۱۲ mm) *گزارش کردند* که بسیار مشابه نتیجه حاصل از این پژوهش می‌باشد (۲۸). البته قابل ذکر است که *کلبسیلا پنومونیه* دارای کپسول

Archive of SID
www.SID.ir

پلی ساکاریدی ضخیم بوده که می‌تواند اثر شرایط محیطی را بر روی سلول باکتری نسبت به دیگر اعضای انتروباکتریاسه تحت تأثیر قرار دهد.

Kaktcham و همکاران (۲۰۱۲) تأثیر باکتریوسین را به عنوان متابولیت مؤثر در CFS سویه‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بومی با روش تیمار پروتئیناز-K، تریپسین، لیپاز، لیزوزیم و آمیلاز بر مهار *کلبسیلا پنومونیه* را گزارش نمودند که متفاوت با نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر می‌باشد (۲۹). البته در مطالعه‌ی ذکر شده سویه‌های بومی جهت تولید باکتریوسین غربالگری و شرایط بخصوص گرمخانه گذاری برای تولید اعمال شده بود، اما پروبیوتیک‌های مورد استفاده در این کار سویه‌ی اختصاصی و غربالگری شده جهت تولید باکتریوسین نبودند. گرچه اثر متابولیت پپتیدی نیز تا حدی در مهار *کلبسیلا پنومونیه* مشاهده شد، اما در مقایسه با اثر متابولیت اسیدی بسیار کم‌تر می‌باشد.

Maldonado و همکاران (۲۰۰۷) عنوان کردند که *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* CRL 1085 با *کلبسیلا پنومونیه* مولد بیوفیلم جهت اتصال به سطوح رقابت نموده و با تولید بیوسورفکتانت، سطحی بسیار آب گریز را ایجاد می‌کند. همچنین CFS اسیدی آن به همراه آب اکسیژنه مانع رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و تشکیل بیوفیلم آن‌ها می‌گردد (۳۰).

طبق مقایسه‌ها و نتایج این پژوهش، متابولیت احتمالی مؤثر بر جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* سنجش شده با روش‌های چاهک پلیت و تعیین MIC، متابولیتی با خاصیت اسیدی مانند اسید لاکتیک و اسید استیک می‌باشد، زیرا اثر ضدمیکربی با خنثی سازی CFS تا pH معادل ۷، در مقایسه با خنثی نمودن اثر پپتیدها و آب اکسیژنه، بسیار کاهش یافت.

بررسی منحنی رشد پروبیوتیک‌های مورد استفاده (Vahedi shahandashti و همکاران، ۱۳۹۲)، زمان تولید متابولیت‌ها در کشت *لاکتوباسیلوس* را نشان می‌دهد. کشت‌های مورد استفاده جهت تهیه‌ی CFS در این پژوهش ۴۸ ساعته ودر شرایط بی‌هوازی بودند و تفاوت pH در کشت ۲۴ و ۴۸ ساعته کاملاً مشخص می‌باشد (۳۱). *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* PTCC1637 قادر به تولید اسید لاکتیک با بازده بالا به شکل جور تخمیر و در شرایط کاملاً بی‌هوازی می‌باشد (۳۲).

در پژوهش Lash و همکاران (۲۰۰۵) شرایط مناسب گرمخانه گذاری جهت تولید باکتریوسین ۲۴ ساعت و در دمای ۳۰- ۲۵ درجه‌ی سلسیوس می‌باشد، بنابراین ترکیباتی مانند پپتیدها و باکتریوسین‌ها پس از گذشت زمان و افزایش تولید ترکیبات اسیدی و کاهش pH محیط کشت تقریباً غیرفعال می‌گردند، زیرا محیط اسیدی جهت حفظ ساختار و فعالیت این پپتیدها مناسب نمی‌باشد (۱۹). در کار Saadatzadeh و همکاران (۲۰۱۳) و همکاران، زمان گرمخانه گذاری ۷۲ و ۴۸ ساعت، کاهش تولید اسید لاکتیک را در مقایسه با ۲۴ ساعت نشان می‌دهد. البته مقدار pH در کشت ۴۸ ساعته کمتر از ۲۴ ساعته می‌باشد که بیانگر تولید ترکیبات اسیدی دیگر و کاهش pH است (۳۳). در کار Emami و همکاران (۲۰۰۹) CFS خنثی شده‌ی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با سود و کاتالاز، اثر ضدمیکربی کمتری بر *کلبسیلا پنومونیه* نسبت به CFS خنثی نشده داشتند. به این ترتیب اثر ضدمیکربی می‌تواند مربوط به اسید لاکتیک ، دی استیل استیک اسید، اسیدهای چرب و آلدهیدها و کاهش pH باشد (۱۸). در مطالعه‌ی Tomas و همکاران (۲۰۰۳) از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جدا شده از فلور واژن، جهت تأثیر بر بیماری‌زاهای ادراری با کشت در دمای بهینه شده‌ی ۳۷ درجه‌ی سلسیوس و pH ۶/۵ با حداکثر تولید اسید لاکتیک استفاده نمودند (۳۴). Al-Mathkhuri و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند CFS خنثی شده‌ی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جدا شده از ماست و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جدا شده از واژن اثری بر سلول‌های پلانکتونیک *کلبسیلا پنومونیه* ندارد و نتایج مشابه آنچه در این پژوهش بدست آمد بیان می‌کند که CFS اسیدی عامل اثر مهاری می‌باشد (۳۵).

طبق بررسی Mercado و همکاران (۲۰۱۱)، مهار سویه‌های دارای مقاومت چندگانه دارویی توسط پروبیوتیک‌ها، می‌تواند به علت ترشح اسیدهای آلی و به طور شاخص اسید لاکتیک باشد زیرا تولید اسید pH محیط را کاهش داده، باعث تغییر ساختار پروتئین‌های سلول و توقف عملکرد آنزیم‌های حساس به شرایط اسیدی می‌شود و شرایط را برای رشد نامناسب می‌سازد. دیگر احتمالات مربوط به ترکیبات ضدمیکربی مانند باکتریوسین‌ها، پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین و آب اکسیژنه می‌باشد (۳۶). Fayol-Messaoudi و همکاران (۲۰۰۵) این نکته را عنوان کردند که ممکن است اسید لاکتیک ترشح شده از *لاکتوباسیلوس* و مولکول‌های غیر اسید لاکتیکی به طور هم افزایی بر گرم منفی‌ها مؤثر باشند. اسید لاکتیک باعث افزایش نفوذ پذیری غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی شده و آن‌ها را نسبت به عوامل ضدمیکربی حساس‌تر می‌نماید (۳۷). با توجه به نتایج آزمون MODA، مؤثرترین متابولیت‌ها خاصیت اسیدی دارند هرچند نمی‌توان دقیقاً تعیین نمود که مواد مؤثر چه مولکول‌هایی هستند. در برخی مطالعات نیز باکتریوسین‌ها به عنوان عامل اثر مهاری گزارش شده‌اند و صرفاً این اثر مربوط به خصوصیت اسیدی CFS نمی‌باشد، که نتایج مربوطه با توجه

Archive of SID

www.SID.ir

به گونه‌ی پروبیوتیک و شرایط کشت آن متفاوت است. به‌علاوه می‌توان اثر CFS را به صورت غلیظ شده یا لیوفیلیزه سنجید و یا باکتریوسین را پس از استخراج و لیوفیلیزه کردن، در غلظت بالا بکار برد. زیرا با توجه به این‌که با کاهش غلظت، اثر ضدمیکربی CFS نیز کاهش می‌یابد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت غلظت متابولیت مؤثر عامل تعیین کننده ای در اثر ضدمیکربی است. جهت تعیین و شناسایی متابولیت‌های CFS، روش‌های دقیق بررسی جرم مولکولی نیاز بوده و اطلاعات موجود در مورد محتوای دقیق CFS برای گونه‌های مختلف محدود می‌باشد و این موضوع مشکل احتمالی در انتخاب متابولیت مؤثر و طراحی دارو و یا ماده ضدمیکربی را در پی دارد. اما نقطه قوت در مصرف پروبیوتیک‌ها و متابولیت‌های آن‌ها نداشتن سمیت، تحریک سیستم ایمنی میزبان به صورت مناسب و عدم ایجاد التهاب است، به طوری‌که در حال حاضر سلول‌های پروبیوتیک به عنوان قرص، شیاف، شربت و پماد موضعی کاربرد درمانی دارند. با توجه به تجویز و مصرف نادرست و بی رویه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها و سرعت انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان باکتری‌ها بخصوص در محیط بیمارستان، علاوه بر وجود عوارض جانبی و اثرات نامطلوب آنتی‌بیوتیک‌ها برفلور میکربی بدن، سویه‌های مقاوم به سرعت شیوع پیدا می‌کنند. این موضوع به تهدیدی برای بهداشت جوامع تبدیل شده است، زیرا علاوه بر افزایش میزان مرگ و میر در بیماران بستری، باعث افزایش هزینه‌های درمان می‌گردد. بنابراین یافتن جایگزین مناسب برای درمان آنتی‌بیوتیکی عفونت‌ها در حالی که کم‌ترین عوارض جانبی و ایجاد مقاومت را در پی داشته باشد بسیار با اهمیت می‌باشد. تاکنون موردی از مقاومت به متابولیت‌های پروبیوتیک در سویه‌های حساس به آن‌ها گزارش نگردیده است. بنابراین پروبیوتیک‌ها بخصوص باکتری‌های جنس *لاکتوباسیلوس* و متابولیت‌های آن‌ها با داشتن منشأ انسانی انتخاب مناسبی برای درمان برخی عفونت‌ها مانند عفونت‌های ادراری ناشی از سویه‌های *کلبسیلا پنومونیه* می‌باشند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد در دانشگاه الزهرا (س) بوده است. بدین وسیله مراتب سپاسگزاری از گروه میکربیولوژی و بیوتکنولوژی دانشگاه الزهرا (س) که آزمایشگاه میکروبیولوژی را جهت انجام این پژوهش در اختیار قرار دادند به عمل آورده می‌شود.

تعارض منافع

بین نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

Reference

1. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev 1998;11(4):589-603.

2. Paterson DL, Ko W-C, Von Gottberg A, Casellas JM, Mulazimoglu L, Klugman KP, et al. Outcome of cephalosporin treatment for serious infections due to apparently susceptible organisms producing extended-spectrum β-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory. J Clin Microbiol 2001;39(6):2206-12.

3. Mohamed BJ, Jiyad JH. Determining the effect of various physicochemical factors on inhibition activity of Lactobacillus acidophilus against Klebsiella pneumonia isolated from hospital-acquired infections by using optical density assay. Diyala J Pure Sci 2012; 8(3):121-135.

4. Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Ertapenem resistance among extended-spectrum-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae isolates. J Clin Microbiol 2009;47(4):969-74.

5. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(1):177-83.

6. Sadeghifard N, Shakib P, Zolfaghari MR, Ghafoorian S, Maleki A, Mohebi R, et al. A study on frequency of Ompk35 and Ompk36 porins in beta lactamas positive and beta lactamase negative Klebsiella pneumoniae. J Ilam Uni Med Sci 2011; 3(19):8.[In Persian]

7. Schneiders T, Amyes S, Levy S. Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical Klebsiella pneumoniae isolates from Singapore. Antimicrob Agents Chemother 2003;47(9):2831-7.

8. Skippen I, Shemko M, Turton J, Kaufmann M, Palmer C, Shetty N. Epidemiology of infections caused by extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella spp.: a nested case–control study from a tertiary hospital in London. J Hosp Infect 2006;64(2):115-23.

Archive of SID

www.SID.ir

9. Kasra Kermanshahi R, Maleki S. Microbiology for everyone. Tehran: Dibagaran Institute; 2009.(Persian)

10. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. Clin Microbiol Rev 2003;16(4):658-72.

11. Luyer MD, Buurman WA, Hadfoune Mh, Speelmans G, Knol J, Jacobs JA, et al. Strain-specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock. Infect Immun 2005;73(6):3686-92.

12. Gillor O, Etzion A, Riley M. The dual role of bacteriocins as anti-and probiotics. Appl Microbiol Biotechnol 2008;81(4):591-606.

13. Amin nezhad S, Kasra Kermanshahi R. Antibiofilm activity of cell-free supernatant from Lactobacillus casei in Pseudomonas aeruginosa. Feyz 2014; 18(1): 30-7. [In Persian]

14. Sobko T, Huang L, Midtvedt T, Norin E, Gustafsson LE, Norman M, et al. Generation of NO by probiotic bacteria in the gastrointestinal tract. Free Radical Biol Med 2006;41(6):985-91.

15. Siezen RJ, Tzeneva VA, Castioni A, Wels M, Phan HT, Rademaker JL, et al. Phenotypic and genomic diversity of Lactobacillus plantarum strains isolated from various environmental niches. Environ Microbiol 2010;12(3):758-73.

16. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nat Rev Microbiol 2005;3(10):777-88.

17. Saravanakumari P, Mani K. Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from Lactococcus lactis and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. Bioresource Technol 2010;101(22):8851-4.

18. Emami A, Hashemizade Z, Noeiaghdam R. Study of antimicrobial properties of Lactobacillus casei and L. acidophillus against common microorganisms causing nosocomial infections. J Qazvin Uni Med Sci 2009; 56(3):6.[In Persian]

19. Lash BW, Mysliwiec TH, Gourama H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum (ATCC 8014). Food Microbiol 2005;22(2):199-204.

20. Pirouzi A, Jafari MR, Kargar M, Mohsenzade M, Feizabadi MM, Afkari R. Molecular detection of coincidence of resistance to antibiotic and heavy metals in K. pneumoniae isolated from UTI. Esfahan Med Sci 2012; 30(186): 11. [In Persian]

21. Soltan dalal MM, Mardane J, Taheri pour M. Isolation and determination of susceptibility pattern of K. pneumoniae strain from NICU. Azad Uni J Biotechnol 2012; 3(11): 41-46. [In Persian]

22. Nahaei MR, Mobasherkar Jedi AR .Molecular study of SHV genes in E. coli and K. pneumoniae isolated in Tabriz. J Med Microbiol 2009; 2(3, 4): 9-17. (Persian)

23. Eslami M, Najarpeerayeh S. Phenotypic and molecular detection of TEM, PER, and VEB beta-lactamases in clinical strains of Klebsiella pneumoniae. Arak Med Uni J 2012; 15(60): 1-9. [In Persian]

24. Afifi MM. Detection of extended spectrum beta-lactamase producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli of environmental surfaces at upper Egypt. Int J Biol Chem 2013;7:58-68.

25. Kazemi R, Ghaemi N, Mirpour M. Study of antimicrobial effect of Lactic acid bacteria isolated from probiotic products. Azad Uni J Biotechnol 2011; 2(7): 29-36. [In Persian]

26. Soltan dalal MM, Rahnama M, Shirazi L. Study of antimicrobial activity of L. reuteri and L. acidophilus on some pathogens of Enterobacteriaceae. Azad Uni J Biotechnol 2011; 3(9): 29-34. [In Persian]

27. Dorri K, Hemayatkhah Jahromi V, Namdar N, Karga Jahromi H. Study of inhibitory effect of Lactobacillus species isolated from stool on growth of some intestinal pathogens. J Microbiol 2011; 3(4): 229-237. [In Persian]

28. Fazeli H, Sameti A. Antimicrobial effect of probiotics isolated from gut microflora against common GI pathogens. J Infect Trop Dis 2009; 3(42): 25-29. [In Per-

Archive of SID

www.SID.ir

sian]29. Kaktcham PM, Zambou NF, Tchouanguep FM, El-Soda M, Choudhary MI. Antimicrobial and safety properties of lactobacilli isolated from two Cameroonian traditional fermented foods. Sci Pharm 2012;80(1):189.

30. Maldonado N, Silva de Ruiz C, Cecilia M, Nader-Macias M. A simple technique to detect Klebsiella biofilm-forming-strains. Inhibitory potential of Lactobacillus fermentum CRL 1058 whole cells and products. Communicating current research and educational topics and Trends in Applied Microbiology 2007:52-9.

31. Vahedi Shahandashti R. The study of some secondary metabolites of probiotics on biofilm formation and antibiotic resistance of Serratia marcescens.[master thesis]. 2014; Tehran: Alzahra University, Faculty of Science.(Persian)

32. Moslehishad M, Mirdamadi S, Ehsani MR, Ezzatpanah H, Moosavi-Movahedi AA. The proteolytic activity of selected lactic acid bacteria in fermenting cow's and camel's milk and the resultant sensory characteristics of the products. Int J Dairy Technol 2013;66(2):279-85.

33. Saadatzadeh A, Fazeli MR, Jamalifar H, Dinarvand R. Probiotic properties of Lyophilized cell free extract of Lactobacillus casei. Jundishapur J Nat Pharm Prod 2013;8(3):131.

34. Tomás MSJ, Ocaña VS, Wiese B, Nader-Macías ME. Growth and lactic acid production by vaginal Lactobacillus acidophilus CRL 1259, and inhibition of uropathogenic Escherichia coli. J Med Microbiol 2003;52(12):1117-24.

35. Al-Mathkhury H, et al. Inhibitory Effect of Lactobacilli Filtrate on Klebsiella pneumoniae Biofilm. Iraq Postgrad Med J 2012; 11(1): 168-179.

36. Mercado M, Cabrera E. Probiotics from Philippine dairy products are bactericidal for pathogens with transferable multiple drug resistance. Philipp Sci Lett 2011;4(2):91-7.

37. Fayol-Messaoudi D, Berger CN, Coconnier-Polter M-H, Lievin-Le Moal V, Servin AL. pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic Lactobacilli against Salmonella enterica Serovar Typhimurium. Appl Environ Microbiol 2005;71(10):6008-13.

Archive of SID

www.SID.ir