DOI: 10.48305/jims.v40.i680.0532

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهلم/شماره‌ی ۶۸۰/هفته‌ی چهارم شهریور ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۳ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۴/۲۲ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۱/۶/۲۸

شناسایی پروبیوتیک‌های با اثر آنتاگونیستی علیه *انتروکوک*های مقاوم به ونکومایسین

بهناز زنگنه کمالی[۱]، داریوش شکری[۲]، سید مهدی قاسمی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: باکتری *انتروکوک* مقاوم به ونکومایسین با درمان‌های انتخابی محدود به عنوان مشکل جدی مطرح است و نیاز به درمان‌های جایگزین آنتی‌بیوتیک محسوس است. هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی پروبیوتیک‌های مؤثر بر سویه‌های مقاوم به ونکومایسین و بیوفیلم آن‌ها بود.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، نمونه‌های *انتروکوک* از چند بیمارستان شهر اصفهان جداسازی و با تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی، سویه‌های مقاوم به ونکومایسین انتخاب شدند. اثر ضدمیکروبی باکتری‌های پروبیوتیک مختلفی علیه آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت و بعد از انتخاب مؤثرترین پروبیوتیک‌ها تست‌های مختلف شامل مدت زمان کشندگی و کم‌ترین غلظت مهاری (MIC) و کشندگی (MBC) بر روی آن‌ها به انجام رسید. مکانیسم مهاری این پروبیوتیک‌ها و میزان تولید اسیدلاکتیک به عنوان اصلی‌ترین مکانیسم مهاری به روش کروماتوگرافی با کارآیی بالا مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: تعداد ۳۵۰ نمونه‌ی *انتروکوک* جداسازی شد که ۴۶ سویه‌ی مقاوم به ونکومایسین بودند و لینوزولید جز معدود آنتی‌بیوتیک‌های حساس بود. دو باکتری پروبیوتیک به نام‌های *پدیوکوکوس اسید لاکتیکی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که علیه تمامی سویه‌های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین و بیوفیلم آن‌ها مؤثر بودند جداسازی شد. مدت زمان کشندگی این دو پروبیوتیک پس از ۱۲ ساعت و کم‌ترین غلظت مهاری (Minimum inhibitory concentration) MIC و کشندگی (Minimum bactericidal concentration) MBC به ترتیب برابر غلظت ۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. همچنین تست‌های بیماری‌زایی مختلف، نشان‌دهنده‌ی عدم بیماری‌زایی و عدم وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی بود. مقدار اسید لاکتیک موجود در پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به مقدار ۲/۵ و در *پدیوکوکوس اسید لاکتیکی* به میزان ۱/۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بود.

نتیجه‌گیری: خواص ضدمیکروبی و ضدبیوفیلمی بسیار مناسب این دو پروبیوتیک با تولید میزان بالای اسیدلاکتیک علیه تمامی سویه‌های مقاوم به ونکومایسین نشان دهنده‌ی خواص مطلوب و بالقوه آن‌ها می‌باشد.

واژگان کلیدی: باکتری؛ مقاومت آنتی‌بیوتیکی؛ *انتروکوک*؛ ونکومایسین؛ پروبیوتیک

ارجاع: زنگنه کمالی بهناز، شکری داریوش، قاسمی سید مهدی. **شناسایی پروبیوتیک‌های با اثر آنتاگونیستی علیه *انتروکوک*های مقاوم به ونکومایسین.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۸۰): ۵۳۸-۵۳۲

مقدمه

ایجاد تغییرات ژنتیکی، باعث مقاوم شدن باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌گردد که امروزه به یکی از چالش‌های اصلی در حوزه‌ی سلامت و بهداشت عمومی در کل جهان تبدیل گشته است (۱، ۲). از میان باکتری‌های مقاوم به دارو، *انتروکوک*های مقاوم به ونکومایسین VRE (Vancomycin-resistant Enterococcus) اولین بار در سال ۱۹۸۰ در آمریکا و پس از آن در سال ۱۹۸۶ در اروپا گزارش شدند (۲). *انتروکوکوس*ها قادر به ایجاد عفونت‌های ادراری- تناسلی، اندوکاردیت، مننژیت، التهاب مجاری صفراوی، عفونت خون، عفونت داخل شکمی و لگنی، عفونت جلدی و عفونت‌های نوزادان می‌باشند (۳). *انتروکوکوس*ها با تعداد زیادی از فاکتورهای بیماری‌زایی و وجود ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی مختلف از جمله ونکومایسین که در بسیاری از موارد به عنوان خط آخر درمان بر علیه آن‌ها مطرح است به معضل جدی تبدیل گشته است و درمان آن‌ها با چالش جدی مواجهه گردیده است (۴، ۵).

پروبیوتیک‌ها با خواص بسیار مفید امروز در درمان یا کمک به

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: داریوش شکری: استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران

Email: dariush.shokri61@yahoo.com

درمان در بیماری‌های مختلفی مورد توجه قرار گرفته‌اند. از جمله اثرات مهاری آن‌ها علیه بیماری‌های عفونی و از جمله باکتری‌های بیماری‌زای مختلف نشان داده شده است (٦، ٧).

از آن‌جایی که جداسازی پروبیوتیک‌های با فعالیت وسیع علیه سویه‌های VRE و استفاده از پروبیوتیک‌ها برای کمک به درمان و کنترل این باکتری‌ها کمتر مورد بررسی قرار گرفته، لذا این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و ملکولی پروبیوتیک‌های مؤثر بر مهار سویه‌های مقاوم به ونکومایسین و تعیین خصوصیات ضد بیوفیلمی و مکانیسم‌های مهاری آن‌ها انجام گرفت.

روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی بر روی ۳۵۰ ایزوله *انتروکوک* به دست آمده از نمونه‌های بالینی که شامل ادرار میانی، خون، زخم، سوانح سوختگی، ترشحات چرکی و مایع مغزی نخاعی در بیماران بستری و سرپایی از دی ماه ۱۳۹۸ تا دی ماه ۱۳۹۹ بود، انجام گرفت. شناسایی ایزوله‌ها به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی و روش‌های فنوتیپیک و انجام آنتی‌بیوگرام با روش دیسک دیفیوژن (کربی- بائر) با استفاده از دیسک‌های تجاری (Mast Co.UK) انجام و نتایج با استفاده از جدول استاندارد CLSI 2020 (Clinical & Laboratory Standards Institute) با اندازه‌گیری قطر هاله بر حسب میلی‌متر بررسی شدند. دیسک‌های مورد استفاده شامل: لینزولید (۳۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، تیکوپلانین (۳۰ میکروگرم)، مینوسیکلین (۳۰ میکروگرم) و سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم) بودند.

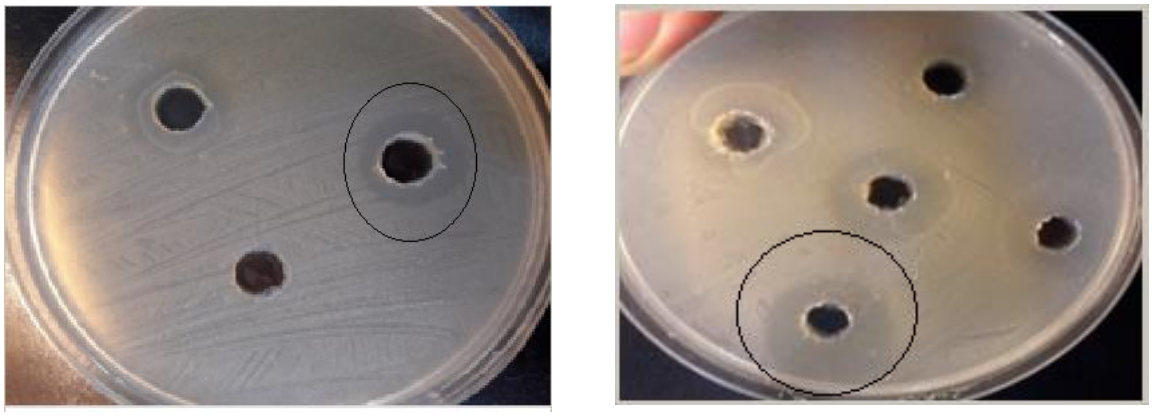
به منظور جداسازی پروبیوتیک‌های مؤثر بر باکتری‌های جداسازی شده در مرحله‌ی قبل، ۷۹ سویه‌ی پروبیوتیک از محصولات لبنی از مناطق مختلف استان اصفهان و همچنین نمونه‌های غیرلبنی از جمله واژینال جمع‌آوری شد. غنی‌سازی و جداسازی باکتری‌ها در محیط MRS (Man, Rogosa and Sharpe) براث طبق روش‌های قبلی به انجام رسید (٧).

بررسی اثر ضدمیکروبی سویه‌های پروبیوتیک با روش انتشار در چاهک پلیت انجام گرفت. در این روش، سوسپانسیونی با کدورت نیم مک‌فارلند از *انتروکوک*‌های مقاوم به ونکومایسین تهیه و به صورت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شدند، سپس چاهک‌هایی با قطر ٦ میلی‌متر بر روی محیط مذکور با استفاده از پی پیت پاستور استریل ایجاد گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری‌های پروبیوتیک رشد کرده در محیط MRS براث و مایع روی آن‌ها به هر چاهک اضافه و در جار CO_2 دار در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. برای کشت هم‌زمان در میکروتیتر پلیت در چاهک‌های ٢٤ خانه‌ای و تعیین MIC (Minimum inhibitory concentration) و MBC (Minimum bactericidal concentration)، ۲۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS براث تهیه و از کلنی‌های خالص باکتری‌های پروبیوتیک در آن تلقیح شد. سپس به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۵ درجه انکوبه گردید، پس از تهیه‌ی مایع رویی خالص از آن‌ها با باکتری‌های بیماری‌زای *انتروکوک* سوسپانسیونی با غلظت نیم مک‌فارلند در محیط BHI براث (Brain heart infusion) ساخته شد و به روش میکروتیتر پلیت در چاهک‌های ٢٤ خانه‌ای اثر مهاری مایع رویی دو پروبیوتیک علیه *انتروکوک*‌های مقاوم به ونکومایسین به روش Shokri و همکاران (٨) مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور بررسی تولید بیوفیلم توسط دو باکتری پروبیوتیک و همچنین اثر مهاری آن‌ها بر روی تشکیل بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زای *انتروکوک*، با استفاده از روش میکروتیتر پلیت در چاهک‌های ٢٤ خانه‌ای (مطابق قسمت قبلی) با روش Jamal و همکاران با روش رنگ‌آمیزی کریستال ویوله انجام گرفت (٩). به این صورت که چاهک‌های پلیت را به آرامی خالی کرده و هر چاهک را با ۲۵۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی شستشو داده و بعد از خالی کردن چاهک‌ها، سلول‌های چسبیده به آن‌ها (در اثر تشکیل بیوفیلم) را به کمک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه رنگ کردیم. این رنگ قابلیت اتصال به بیوفیلم باکتری را دارد. سپس مجدداً شستشو مانند مرحله‌ی قبل انجام و محتویات پلیت‌ها خالی گردید. برای حل کردن رنگ باقی‌مانده که نشان‌دهنده‌ی میزان بیوفیلم باکتری‌ها است به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر اتانول خالص داخل چاهک‌ها ریخته شد.

برای آزمایش مدت زمان کشندگی (Killing time)، بر روی محیط مولر هینتون آگار کشتی از سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا و مایع رویی (سوپرناتانت) پروبیوتیک مورد نظر تهیه و توسط انکوباسیون ۳۵ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت و زمان کشته شدن باکتری بیماری‌زا توسط پروبیوتیک‌های مورد نظر محاسبه شد.

برای شناسایی نوع و اطلاعات مورفولوژیکی دو باکتری پروبیوتیک مؤثر منتخب با روش بیوشیمیایی و ملکولی به روش تکثیر قطعه ژن 16S rRNA به انجام رسید. برای شناسایی ملکولی باکتری‌های مورد نظر، از یک جفت پرایمر یونیورسال رفت به نام با توالی 5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′ 27f و برگشت به نام 1492r با توالی 5′-GGYTACCTTGTTACGACTT-3′ استفاده گردید و شرایط آزمایش طبق مطالعه‌ی قبلی در نظر گرفته شد (٧). محصول نهایی به دست آمده پس از تکثیر قطعه‌ی مورد نظر بر روی ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی قطعات تکثیر شده با رنگ اتیدیوم بروماید و تأیید صحت انجام واکنش با توجه به دستورالعمل شرکت نیازن نور (تهران، ایران) جهت تعیین توالی ارسال گردید.



شکل ۱. ایجاد هاله‌ی عدم رشد توسط پروبیوتیک‌ها علیه سویه‌های بیماری‌زای مورد مطالعه بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار

برای تعیین وجود و مقدار غلظت اسید آلی اسید لاکتیک، پس از تهیه‌ی مایع رویی از دو نمونه‌ی پروبیوتیک مورد نظر، برای شرکت دانش معیار پارس ارسال شد و توسط روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا و با کمک ستون C18 (ابعاد ۲۵۰ در ٤٠/٦ میلی‌متر) میزان اسید آلی محاسبه گردید.

یافته‌ها

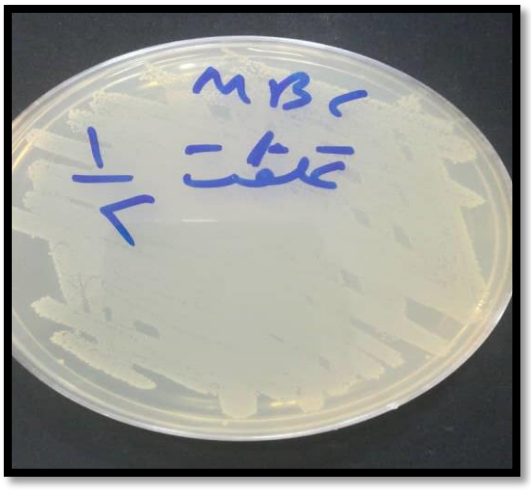
از بین سویه‌های جدا شده، ٤٦ (۱۳/۱ درصد) سویه‌ی غیرحساس به ونکومایسین بودند. نتایج الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی این *انتروکوک* های غیرحساس به ونکومایسین نشان داد که ۸۷ درصد نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک لینوزولید، ۱ درصد نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک تیکوپلانین، ٤۳ درصد نمونه‌ها به آنتی‌بیوتیک مینوسیکلین، ۱/۷۱ درصد به سیپروفلوکساسین و ٤ درصد نمونه‌ها به آمپی‌سیلین حساست نشان دادند. با استفاده از روش انتشار در چاهک پلیت به ارزیابی اثر مهاری پروبیوتیک علیه *انتروکوک*های مقاوم به ونکومایسین پرداخته شد که پس از انجام این آزمایشات فقط ۲ پروبیوتیک (٤/۳۵ درصد) دارای اثر مهاری کامل علیه VRE بودند که جهت شناسایی و سایر آزمایشات تکمیلی انتخاب شدند و مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). در بررسی کشت هم زمان در میکروتیتر پلیت در چاهک‌های ٢٤ خانه‌ای، در غلظت‌های ۱ و ۰/۵ کدورتی تشکیل نشد، بنابراین $\frac{1}{2}$ = MIC و ۱ = MBC گرم بر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (شکل ۲ الف و ب).

به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های پروبیوتیک و اثر مهاری آن‌ها بر روی تشکیل بیوفیلم *انتروکوک*ها، بعد از اضافه کردن اتانول، مشاهده شد در چاهک‌هایی که پروبیوتیک مورد نظر مانع از تشکیل بیوفیلم باکتری پاتوژن شده بود، در غلظت‌های ۱ و ۰/۵ رنگی ایجاد نگردید (شکل ۳).

الف

غلظت ۱

ب



غلظت ۰/۵

شکل ۲. آزمایش MBC پروبیوتیک شماره ۱۹ در غلظت یک (الف) و نصف (ب) (در غلظت ۱ باکتری انتروکوک به طور کامل مهار شد)

شکل ۳. بررسی اثر ضد بیوفیلم پروبیوتیک مورد نظر

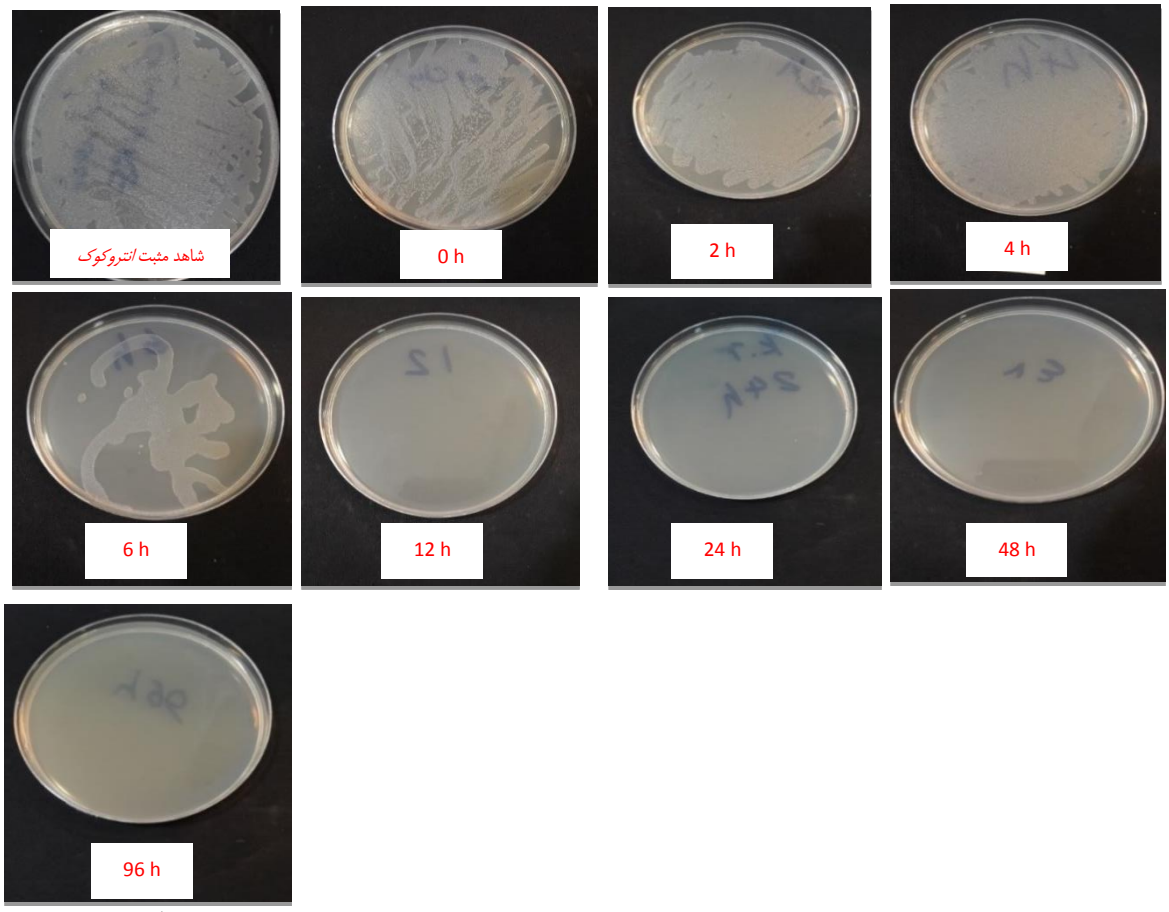
در بررسی آزمایش مدت زمان کشندگی، دریافتیم که حداقل زمان مورد نیاز برای مهار باکتری‌های پاتوژن توسط پروبیوتیک‌های مورد نظر ۱۲ ساعت بود (شکل ٤). در جدول ۱ شناسایی ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی دو باکتری پروبیوتیک آمده است.

در بررسی مولکولی دو پروبیوتیک مورد نظر با روش توالی ژن 16sRNA، مشخص شد که این دو پروبیوتیک *پدیوکوکوس اسید لاکتیکی* (*Pediococcus acidilactici*) و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (*Lactiplantibacillus plantarum*) هستند و در پایگاه NCBI با توجه به دستورالعمل‌های تاکسونومیک پروکاریوت‌ها ثبت گردید (۱۰، ۱۱).

بر اساس نتایج به دست آمده که در جدول ۲ نشان داده شده است، مقدار اسید لاکتیک موجود در پروبیوتیک شماره ۱۹ (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) به مقدار ۲/۵ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر و مقدار آن در پروبیوتیک شماره‌ی ۲۰ (*پدیوکوکوس اسید لاکتیکی*)، ۱/۱ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌باشد.

بحث

امروزه *انتروکوک*‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و از جمله ونکومایسین به طور تصاعدی از سراسر دنیا گزارش می‌شوند (۵). مطالعه‌ی حاضر نشان داد، بهترین آنتی‌بیوتیک علیه VRE لینوزولید می‌باشد. در این پژوهش از ۳۵۰ نمونه‌ی *انتروکوک*، ۱۳/۱ درصد به ونکومایسین مقاوم بودند. در پژوهش قزوینیان و همکاران ۱ (۱/۱۹ درصد) ایزوله *انتروکوکوس فکالیس* و ٤ (٦/٥٦ درصد) ایزوله *انتروکوکوس فاسیوم* به ونکومایسین مقاوم بودند (٤).



شکل ٤. بررسی مدت زمان کشندگی سوپر ناتانت پروبیوتیک در زمان‌های مختلف بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار

جدول ۱. شناسایی ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی دو باکتری پروبیوتیک

شماره‌ی پروبیوتیک مورد نظر	بررسی میکروسکپی	تست DNase	تست کاتالاز	همولیز	بایل اسکولین و تحمل نمک ۶/۵ درصد
۱۹	کوکسی شکل	منفی	منفی	گاما	منفی
۲۰	باسیلی شکل	منفی	منفی	آلفا	منفی

جدول ۲. مقدار اسید لاکتیک موجود در هر یک از پروبیوتیک‌ها

کد نمونه	نوع اسید آلی	مقدار	واحد	روش آزمون
۱۹	اسید لاکتیک	۲/۵	g/۱۰۰	HPLC
۲۰	اسید لاکتیک	۱/۱	g/۱۰۰	HPLC

در پژوهش دیگری از میان ۴۰۱۳ بیمار ثبت شده، در مجموع ۵۹ نفر (۳/۶ درصد) از نظر VRE مثبت بودند (۱۲).

در پژوهش گودرزی و همکاران، از میان ۶۹۰ ایزوله *انتروکوکسی* مورد بررسی، کم‌ترین مقاومت مربوط به لینزولید با صفر ایزوله (۰ درصد) بود (۱۳).

در پژوهش شکوهی‌زاده و همکاران، در میان ۸۶ ایزوله *انتروکوک*، ۴۲/۲ درصد از سویه‌ها به ونکومایسین مقاوم و همگی نسبت به آنتی‌بیوتیک لینزولید حساس بودند (۱۴).

در پژوهش مشابهی رزاز رحمتی و همکاران، از ۲۰۳ جدایه *انتروکوکوس*، به ترتیب ۴۷/۳، ۲۴/۶ و ۹/۴ درصد مقاوم به آمپی‌سیلین، ونکومایسین، تیکوپلانین بودند. تمام *انتروکوکوس‌ها* به لینزولید حساس بودند (۱۵). در اکثر مطالعات به کار بردن *لاکتوباسیل* (*Lactobacilli*)، باعث کاهش *انتروکوک‌های* مقاوم به ونکومایسین‌ها شده بود. با توجه به این‌که *لاکتوباسیلوس بارنسیلا* و *باکتروئیدس تتایوتامیکرون* (*Bacteroides thetaiotaomicron*) تعداد *انتروکوک‌های* مقاوم به ونکومایسین را در کولون موش کاهش دادند، این ایده مطرح می‌شود که باکتری‌های غیرهوازی موارد مناسبی برای استفاده به عنوان پروبیوتیک باشند. جالب است که بعد از درمان با آنتی‌بیوتیک، استفاده از *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (*Lactobacillus paracasei*) باعث بهبود بهتر انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین در موش‌ها شد (۶).

در یکی از بیمارستان‌های آلمان به درمان توسط *ساکارومایسز بولاردی* (*Saccharomyces bullardi*) و *اشریشیا کلی نیسل* پرداخته شد که منجر به کاهش عفونت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی ونکومایسین در باکتری *انتروکوکوس فاسیوم* گردید (۶).

در پژوهش رایانی و همکاران، میزان MIC دوغ پروبیوتیک برای *انتروکوکوس فکالیس* ۰/۸ ± ۲۵ درصد و MIC دوغ معمولی برای *انتروکوکوس فکالیس* ۱/۵۹ ± ۵۰ درصد بود که حاکی از اختلاف آماری معنی‌دار حداقل غلظت بازدارندگی دو نوع دوغ از رشد *انتروکوکوس فکالیس* بود (۱۶).

تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های پروبیوتیک برخلاف تشکیل آن توسط باکتری‌های بیماری‌زا دارای اثرات مفید بوده و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، به طور مثال Karimi Darsanaki و همکاران در سال ۲۰۱۲ اعلام کردند که لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی دارای اثر ضداتصالی هستند. بر اساس گزارش آن‌ها *لاکتوباسیلوس دلبروکی* قادر بود حدود ۸۰ درصد از اتصال *اشرشیاکلی* به سلول‌های Caco-2 جلوگیری کند (۱۷).

در پژوهش دیگری از بندری و همکاران، نشان دادند دو *لاکتوباسیلوس* پروبیوتیکی (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس کازئی*) قادرند با به دام انداختن و تجمع‌پذیری با باکتری *اشریشیا کلی*، سبب کاهش اتصال و مانع تشکیل بیوفیلم آن در شرایط آزمایشگاهی شوند (۱۸).

لاکتوباسیلوس پلانتاروم و *پدیوکوکوس اسید لاکتیکی* انتخاب شده در مطالعه‌ی حاضر از لحاظ خصوصیات دیگر مانند تست DNase، کاتالاز و همولیز نیز بررسی شدند که در هر صورت از لحاظ این موارد بی‌خطر محسوب می‌شوند، با توجه به نتایج آنالیز اسید آلی موجود در مایع رویی هر دو باکتری پروبیوتیک، اثرات مهاری قوی این باکتری‌ها به احتمال بسیار زیاد به حضور اسید لاکتیک برمی‌گردد؛ هرچند به آزمایشات بیش‌تری در این زمینه نیاز است. در پژوهش Jalilsood و همکاران نشان دادند که اسید لاکتیک تولید شده توسط باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، باعث مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا شده بود که مشابه با پژوهش حاضر بود (۱۹).

نتیجه‌گیری

دو ایزوله‌ی پروبیوتیک جدا شده، دارای خواص آنتی‌میکروبی و آنتی‌بیوفیلمی بسیار مناسب علیه تمامی سویه‌های VRE با کمک تولید میزان نسبتاً زیاد اسید لاکتیک بودند که خواص مطلوب آن‌ها را نشان می‌دهد و توانایی این باکتری‌ها را به عنوان یکی از راه‌های جایگزین احتمالی آنتی‌بیوتیک‌ها را با مکانیسم‌های مهاری امن مثل تولید اسیدهای آلی بی‌خطر نشان می‌دهد.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد با کد ۲۷۳۶۵۱۷ در رشته‌ی میکروبیولوژی گرایش صنعتی دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی می‌باشد. نویسندگان از زحمات معاونت پژوهشی این دانشگاه تقدیر و تشکر می‌نمایند.

References

1. Hosseini F, Kargar M. Antibiotic resistance pattern and identification of vancomycin resistance genes in enterococcus spp. isolated from environmental samples in Southern Fars province [in Persian]. J Ardabil Univ Med Sci 2017; 17(2): 164-73.
2. Dirbazian A, Rouhi S, Shakob P. Detection of VanA, VanB, and VanC genes in enterococcus species isolated from fecal sample of patients in Qom province, Iran [in Persian]. Applied Biology 2021; 11(43): 53-62.
3. Elahi Y, Javdani Shahedin G, Nejati A, Ashrafi I, Asadian M, Mazaheri Nezhad Fard R. Whole-genome sequencing of a clinically isolated antibiotic-resistant enterococcus faecium EntfacYE. Iran J Med Microbiol 2021; 15(6): 692-9.
4. Ghazvinian M, Mirzaei B, Asgharzadeh Marghmalek S, Amir Gholami S, Ahmadian L, Goli HR. Prevalence of vancomycin and teicoplanin resistant enterococcus faecalis and enterococcus faecium isolated from fecal samples of healthy individuals and hospital environmental samples [in Persian]. J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31(195): 103-11.
5. Guo Y, Tomich AD, McElheny CL, Cooper VS, Tait-Kamradt A, Wang M, et al. High-level fosfomycin resistance in vancomycin-resistant Enterococcus faecium. Emerging infectious diseases. Emerg Infect Dis 2017; 23(11): 1902-4.
6. Borgmann S, Rieß B, Siegmund R, Werner G, Klare I. Treatment with Saccharomyces boulardii and Escherichia coli Nissle is safe and associated with reduced nosocomial transmission of vanB vancomycin-resistant enterococcus faecium on an early rehabilitation ward in Germany: a retrospective analysis. Ther Clin Risk Manag 2019; 15: 343-54.
7. García MJ, Ruíz F, Asurmendi P, Pascual L, Barberis L. Searching potential candidates for development of protective cultures: Evaluation of two lactobacillus strains to reduce listeria monocytogenes in artificially contaminated milk. J Food Saf 2020; 40(1): e12723.
8. Shokri D, Zaghian S, Khodabakhsh F, Fazeli H, Mobasherizadeh S, Ataei B. Antimicrobial activity of a UV-stable bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) produced by Enterococcus faecium strain DSH20 against vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) strains. J Microbiol Immunol Infect 2014; 47(5): 371-6.
9. Jamal MT, Morris PC, Hansen R, Jamieson DJ, Burgess JG, Austin B. Recovery and characterization of a 30.7-kDa protein from Bacillus licheniformis associated with inhibitory activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus, vancomycin-resistant Enterococci, and Listeria monocytogenes. Mar Biotechnol (NY) 2006; 8(6): 587-92.
10. Lactiplantibacillus plantarum strain BZ2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [Online]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW672528.1
11. Pediococcus acidilactici strain BZ2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence. [Online]. Available from: URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MW692906
12. Altun HU, Hatipoğlu ÇA, Bulut C, Yağcı S, Ertem GT, Kınıklı S, et al. Surveillance of vancomycin-resistant enterococci colonization by (Cepheid) geneXpert vanA/vanB test and culture method. JMID 2014; 4(3): 97-101.
13. Goudarzi M, Mohabati Mobarez A, Najar-Peerayeh S, Mirzaee M. Prevalence of multidrug resistance in Enterococcus faecium isolated from patients and environment of hospitals in Lorestan province, (Iran) [in Persian]. Qom Univ Med Sci J 2018; 12(5): 71-8.
14. Shokoohizadeh L, Mohabati Mobarez A, Zali MR, Ranjbar R, Alebouyeh M. Frequency of vancomycin-resistant enterococcus faecium strains isolated from urinary tract infections (UTI) in 4 hospitals of Tehran [in Persian]. J Adv Med Biomed Res 2014; 22(91): 121-30.
15. Razaz Rahmati N, Mohabati Mobarez A, Khoram Abadi N, Shokoohizade L. Antibiotic Susceptibility of Staphylococcus aureus and Enterococcus Spp. Isolated from some Hospitals in Tehran [in Persian]. Med Lab J 2015; 9(2): 78-84.
16. Rayani A, Ahanjan M, Goli HR, Naderi fard N, Zamanzdeah M. Comparing the effect of probiotic and non-probiotic yogurt drinks on two common oral microorganisms: An in vitro study. J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30(185): 33-40.
17. Karimi Darsanaki R, Rokhi ML, Aliabadi MA, Issazadeh K. Antimicrobial activities of Lactobacillus strains isolated from fresh vegetables. Middle East J Sci Res 2012; 11(9): 1216-9.
18. Bandari S, Arbab Soleimani N, Tajbakhsh E. The effect of probiotic lactobacilli on the attachment power and biofilm formation of Escherichia coli isolated from urinary tract infections [in Persian]. J Microbial World 2018; 11(3): 278-87.
19. Jalilsood T, Baradaran A, Song AA, Foo HL, Mustafa S, Saad WZ, et al. Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria by a novel biofilm-forming lactobacillus isolate: a potential host for the expression of heterologous proteins. Microb Cell Fact 2015; 14(1).

DOI: *10.48305/jims.v40.i680.0532*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 40, No. 680, 4th Week, September 2022**

Received: 14.03.2022 Accepted: 13.07.2022 Published: 19.09.2022

Isolation and Identification of Probiotics with Antagonistic Effect on Vancomycin Resistant *Enterococci*

Behnaz Zanganeh-Kamali[1], Dariush Shokri[2], Seyed Mahdi Ghasemi[2]

Original Article

Abstract

Background: Vancomycin-resistant *Enterococci* are considered as a serious problem owing to limited selective therapies necessitating alternative antibiotic therapies. The aim of this study was to isolate and identify effective probiotics against vancomycin-resistant *Enterococci* strains and their biofilms.

Methods: In this experimental study, *Enterococci* samples were isolated from several hospitals in Isfahan and their vancomycin-resistant strains were selected by antibiotic susceptibility testing. The antimicrobial effect of various probiotic bacteria against them was investigated. After selecting the most effective probiotics, various tests including mortality time and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were performed. The inhibitory mechanism of these probiotics and the amount of lactic acid production as the main inhibitory mechanism were studied using high performance chromatography.

Findings: On total, 350 *Enterococci* samples were isolated, 46 of which were vancomycin resistant in which linezolid was among the few effective antibiotic. Two probiotic bacteria, *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum*, were isolated which were effective against all vancomycin-resistant *Enterococci* and their biofilms. The lethal time of these two probiotics was 12 hours and the MIC and MBC were at concentrations of 0.5 µg/ml and 1 µg/ml respectively. Various tests on these two probiotics also showed no pathogenicity and no antibiotic resistance. The amount of lactic acid in *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* were 2.5 and 1.1 g per 100 ml respectively.

Conclusion: The optimal antimicrobial and antibiofilm properties of these two probiotics alongside producing high levels of lactic acid against all vancomycin resistant strains demonstrate their desirable and potential properties.

Keywords: Antibiotic resistance; Bacteria; *Enterococcus*; Vancomycin; Probiotics

Citation: Zanganeh-Kamali B, Shokri D, Ghasemi SM. **Isolation and Identification of Probiotics with Antagonistic Effect on Vancomycin Resistant *Enterococci*.** J Isfahan Med Sch 2022; 40(679): 532-8.

1- MSc Student of Microbiology, Department of Microbiology, School of Biological Science and Technology, Shahid Ashrafi Esfahani University, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Biological Science and Technology, Shahid Ashrafi Esfahani University, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Dariush Shokri, Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Biological Science and Technology, Shahid Ashrafi Esfahani University, Isfahan, Iran; Email: dariush.shokri61@yahoo.com