

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

Laya Heydari¹, Rouha Kasra Kermanshahi¹, Mohammad Mehdi Feizabadi²

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 ciprofloxacin. 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

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

لعیا حیدری^۱، روحا کسرای کرمانشاهی^۱، محمدمهدی فیض آبادی^۲

۱. دانشکده زیست شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: در ۱۵ سال اخیر عفونت‌های بسیاری با عوامل عفونی ESBL (Extended spectrum beta-lactamase) 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 روش‌ها: 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. fermentum*، *L. rhamnosus* و *L. plantarum* 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: همه‌ی جدایه‌های *K. pneumoniae* به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، سفالوتین، سفنازیدیم و سیپروفلوکساسین مقاوم بودند. بیش‌ترین تأثیر ضد میکروبی CFS، مربوط به *L. rhamnosus* و *L. plantarum* 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 شده‌اند. بنابراین CFS لاکتوباسیلوس‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی در از بین بردن این جدایه‌های *K. pneumoniae* می‌تواند انتخاب مناسب‌تری باشد.

کلمات کلیدی: کلبسیلا پنومونیه، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، مایع شناور فاقد سلول لاکتوباسیلوس‌ها

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

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 میکروبیولوژی، دانشگاه الزهراء، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۱۳۱۱۵۰۷۷۹

پست الکترونیک:

rkasra@yahoo.com

مقدمه

(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 میکروبی به درون سلول باکتری

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

به عنوان پروبیوتیک بسیار استفاده می‌شوند عبارتند از: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پاراکازئی، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس پلاتناروم، لاکتوباسیلوس روتری، لاکتوباسیلوس سالیواریس و لاکتوباسیلوس رامنوسوس. به عنوان مثال سویه‌ی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LB تولید اسید لاکتیک، دی استیل استیک اسید، اسیدهای چرب زنجیره کوتاه، آلدئیدها 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 آزیترامیسین و کلرامفنیکل 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 ضد میکربی استخراج شده از کشت لاکتوباسیلوس پلاتناروم 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 مهمی آن در جایگزینی باکتری بیماری‌زا با مقاومت چندگانه‌ی آنتی‌بیوتیکی در بیمارانی با عفونت‌های مجاری ادراری گزارش گردیده است (۱۷).

بنابراین، با توجه به خصوصیات مهمی 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 تأثیر CFS کشت ۵ گونه‌ی لاکتوباسیلوس بر بقای سویه‌های ESBL مثبت کلبسیلا پنومونیه در مقایسه با تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها بررسی گردیده است.

روش‌ها

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

می‌شوند (۶، ۵). گونه‌های کلبسیلا پلاسמידهایی دارند که مقاومت آنتی‌بیوتیکی از جمله مقاومت به بتالاکتام‌ها و سفالوسپورین‌های وسیع الطیف مانند سفتریاکسون، سفنازیدیم و سفتری‌زوکسیم 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 پلاسמידهای بزرگ می‌باشند. در سال ۱۹۸۴ جدایه‌های بیمارستانی مقاوم به تمامی بتالاکتام‌ها به جز ایمپنم و سفوماپسین مشاهده شد که دارای پلاسמיד 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 ایمپنم حساس بوده و این آنتی‌بیوتیک به عنوان داروی انتخابی درمان عفونت‌های کلبسیلا پنومونیه استفاده می‌شد؛ اما در سال ۱۹۹۷ سویه‌های مقاوم به ایمپنم نیز جدا شدند که دارای بتالاکتاماز پلاسמידی 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 CO₂ می‌باشد. دیگر متابولیت‌های آن‌ها شامل اسیدهای چرب زنجیره کوتاه، آب اکسیژنه و باکتریوسین‌ها است (۱۰، ۱۱). گونه‌هایی از این جنس که

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 پلاسמידی 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 ATCC4356، لاکتوباسیلوس کازئی PTCC1608، لاکتوباسیلوس فرمنتوم PTCC1638، لاکتوباسیلوس پلاتتاروم 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 (۳۰ μg)، جنتامایسین (۱۰ μg)، کلرامفنیکل (۳۰ μg)، سفالوتین (۳۰ μg)، سولفومتاکسازول، سیپروفلوکساسین (۵ μg)، آمپی‌سیلین (۱۰ μg)، استرپتومایسین (۱۰ μg)، نالیدیکسیک اسید (۳۰ μg)، سفوتاکسیم (۳۰ μg)، داکسی‌سایکلین (۳۰ μg)، پنی‌سیلین (۱۰ μg)، ایمی‌پنم (۱۰ μg)، سفپیم (۵ μg)، سفازولین (۳۰ μg) و نیتروفوراتوئین (۳۰۰ μg)، شرکت پادتن طب، استفاده و قطر هاله‌ی عدم رشد بر روی محیط مولر هینتون آگار (MHA) پس از گرمخانه‌گذاری ۲۴ ساعته در ۳۷ درجه سلسیوس ثبت گردید (جدول ۱). جهت سنجش کمی حساسیت سویه‌ها، تعیین MIC و MBC با آنتی‌بیوتیک‌های سفالوتین (Sigma-Aldrich; USA)، جنتامایسین (اکسیر)، سفنازیدیم (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 جاربیه‌های به همراه CO₂ گرمخانه‌گذاری شده، سپس با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و با فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ μm 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 میکروبی پیش از نفوذ CFS درون آن، نگهداری و سپس ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند و نتایج به صورت هاله‌ی عدم رشد مشاهده گردید (جدول ۳).

سنجش کمی 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 ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴ تهیه گردید. تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) به شکل میکرودیولوشن 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 گرمخانه‌گذاری 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 ضد میکروبی، 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

لاکتوباسیلوس پلاتناروم 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 $Pvalue \sim 0.7$ 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 پلاتناروم 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 ساعته‌ی لاکتوباسیلوس پلاتناروم 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

(Microscale Optical Density Assay) MODA است (۱۹). سوسپانسیون میکربی با کدورت ۰/۵ مک فارلند به میزان ۱:۱۰۰۰۰ رقیق شده و ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون 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 گونه‌ای 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 بر طبق نتایج آنتی‌بیوگرام، شامل جنتامایسین، سفالوتین، سفنازیدیم (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

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

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

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

جدول ۲: میزان MIC و MBC آنتی بیوتیک‌های انتخابی برای جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به روش Microdilution

سیپروفلوکساسین		سفتازیدیم		سفالوتین		جتامایسین		آنتی بیوتیک باکتری
MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	MIC (µg/ml)	MBC (µg/ml)	
۵۱۲ R	-	-	-	-	-	- ^۲	- ^۱	کلبسیلا پنومونیه 210L
۲۵۶ R	۲۵۶	-	-	-	-	-	-	کلبسیلا پنومونیه 244L
۲۵۶ R	۵۱۲	-	-	-	-	۲۵۶ R ^۲	۲۵۶	کلبسیلا پنومونیه 302T
۳۲ R	-	-	-	-	-	۱۶ R	-	کلبسیلا پنومونیه 548L
۱۶ R	۱۶	-	-	-	-	-	-	کلبسیلا پنومونیه 549L
۶۴ R	۱۲۸	-	-	-	-	۸ I ^۴	۸	کلبسیلا پنومونیه 551L
۵۱۲ R	-	-	-	-	-	-	-	کلبسیلا پنومونیه 556L
۱ S	-	-	-	۳۲ R	-	R ۱۶	-	کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 (شاهد مثبت)
۱ S	۸	۱ S	-	۱ S	-	۱ S ^۵	۶۴	اشریشیا کلی ATCC25922 (شاهد منفی)

۱. بیانگر وجود کلنی و عدم تعیین MBC حتی در تمامی رقت‌های آنتی بیوتیک ۲. بیانگر وجود کدورت در تمامی رقت‌های آنتی بیوتیک 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)

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

(*) قطر چاهک = رشد نمونه

جدول ۴: تعیین حساسیت جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به CFS سویه‌ی لاکتوباسیلوس پلانتروم ATCC ۸۰۱۴ در شرایط تیمار با سود، پیسین، تریپسین و کاتالاز توسط اسپکتروفتومتری در ۶۲۵ nm در مقایسه با شاهد مثبت (میانگین جذب نوری سوسپانسیون \pm SD) به روش MODA

کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 (شاهد مثبت)		کلبسیلا پنومونیه 556L		کلبسیلا پنومونیه 302T		کلبسیلا پنومونیه
پس از تیمار	MRS بدون تیمار	پس از تیمار	MRS بدون تیمار	پس از تیمار	MRS بدون تیمار*	تیمارهای مختلف CFS
۰/۲۱±۰/۰۲	۱/۴۰۹±۰/۰۱	۰/۰۳۶±۰/۰۰۵	۱/۷۴۲±۰/۰۰۲	۰/۰۱۵±۰/۰۰۱	۱/۶۱۲±۰/۰۰۵	CFS بدون تیمار
۱/۱۴±۰/۰۰۴	۱/۶۱۸±۰/۰۰۶	۱/۷۰۹±۰/۰۰۳	۲/۰۰۳±۰/۰۱۵	۱/۰۰۶±۰/۰۰۳	۱/۱۱۵±۰/۰۰۵	CFS با تیمار سود
۰/۹۸±۰/۰۰۹	۲/۰۳±۰/۰۰۱	۱/۶۳۲±۰/۰۰۱	۲/۰۱۲±۰/۰۰۲	۰/۱۵۶±۰/۰۰۱	۱/۴۳۶±۰/۰۰۲	CFS با تیمار کاتالاز
۰/۶۵±۰/۰۰۲	۱/۳۰۶±۰/۰۰۴	۱/۰۴۶±۰/۰۰۱	۱/۵۲۴±۰/۰۰۵	۰/۰۸۴±۰/۰۰۱	۱/۸۴۳±۰/۰۰۴	CFS با تیمار پیسین
۰/۵۴±۰/۰۰۳	۱/۲۲۵±۰/۰۰۲	۰/۹۶±۰/۰۰۶	۱/۶۱۳±۰/۰۰۲	۰/۱۳۶±۰/۰۰۳	۲/۰۱۱±۰/۰۰۱	CFS با تیمار تریپسین
۱/۸۷±۰/۰۰۵		۱/۸۱±۰/۰۰۲		۱/۹۱۵±۰/۰۱۵		سوسپانسیون میکربی بدون CFS

*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، پیسین، تریپسین و کاتالاز توسط اسپکتروفتومتری در ۶۲۵ nm (میانگین جذب \pm SD) به روش MODA

کلبسیلا پنومونیه ATCC700603 (شاهد مثبت)		کلبسیلا پنومونیه 556L		کلبسیلا پنومونیه 302T		کلبسیلا پنومونیه
پس از تیمار	MRS بدون تیمار	پس از تیمار	MRS بدون تیمار	پس از تیمار	MRS بدون تیمار*	تیمارهای مختلف CFS
۰/۰۲±۰/۰۰۸	۱/۸۶±۰/۰۰۵	۰/۰۳۳±۰/۰۰۹	۱/۲۹۸±۰/۰۰۵	۰/۰۷۱±۰/۰۰۲	۱/۳۹۴±۰/۰۰۷	CFS بدون تیمار
۰/۸۱۷±۰/۰۰۳	۱/۳۷۵±۰/۰۰۲	۱/۰۰۷±۰/۰۰۲	۱/۴۶۹±۰/۰۰۳	۱/۷۱۵±۰/۰۰۹	۲/۰۴۳±۰/۰۰۳	CFS با تیمار سود
۰/۷۹±۰/۰۰۹	۱/۰۶±۰/۰۰۱	۰/۳۱۱±۰/۰۰۶	۱/۶۰۴±۰/۰۰۹	۰/۲۰۸±۰/۰۱۲	۱/۴۸۵±۰/۰۰۱	CFS با تیمار کاتالاز
۱/۱۱۴±۰/۰۰۱	۱/۹۲۵±۰/۰۰۲	۰/۳۱۰±۰/۰۰۲	۱/۳۹۰±۰/۰۰۱	۰/۱۸۴±۰/۰۰۶	۱/۹۳۲±۰/۰۰۱	CFS با تیمار پیسین
۰/۸۵±۰/۰۰۱	۱/۶۲۰±۰/۰۰۱	۰/۷۰۴±۰/۰۰۵	۱/۶۱۹±۰/۰۰۱	۰/۰۱۵±۰/۰۰۲	۱/۸۸۱±۰/۰۰۲	CFS با تیمار تریپسین
۱/۴۴±۰/۰۰۷		۱/۷۹±۰/۰۰۷		۱/۷۴۸±۰/۰۰۵		سوسپانسیون میکربی بدون CFS

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

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 ضد میکربی 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 بر اثر ضعف ایمنی و یا کهولت سن دچار عفونت گردیده اند، معمولاً پاسخ به درمان آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مقاوم با شکست مواجه شده و میزان مرگ

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 پیسین، تریپسین و کاتالاز با $Pvalue \sim 0$ به طور معنی داری بیش تر است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت بیشترین اثر مزاری 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.

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، سفنازیدیم، جنتامایسین و سیپروفلوکساسین را نشان می‌دهند 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 میکروارگانیزم‌های 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 مهاري 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 پلاتناروم، لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (۲۵). بر خلاف این نتیجه، اثر مهاري 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 مهاري 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 ضد میکروبی 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 پلاتناروم بوده است (۲۷). Fazeli و همکاران (۲۰۰۹) نیز بیش‌ترین اثر مهاري باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از میکروفلورای رودی کودکان بر روی رشد اشریشیا کلی (EPEC) را به ترتیب مربوط به لاکتوباسیلوس پلاتناروم (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

و میر افزایش می‌یابد. یکی از ایده‌هایی که در این چند ساله جهت رفع این مشکلات پدید آمده‌اند، استفاده از دیگر میکروارگانیزم‌ها و متابولیت‌های آن‌ها با خصوصیات ضد میکروبی می‌باشد. پروبیوتیک‌ها در این میان بسیار پر کاربرد بوده و مطالعات بسیاری بر روی تأثیرات ضد میکروبی آن‌ها بر میکروارگانیزم‌های 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٪)، تراسایکلین (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٪)، تراسایکلین (۴۷٪)، جنتامایسین (۵۷٪)، سیپروفلوکساسین (۳۷٪) و نالیدیکسیک اسید (۲۷٪) (۲۰). در کار Soltan dalal و همکاران (۲۰۱۲)، نتایج برای تراسایکلین (۲۸٪)، جنتامایسین (۳۳٪)، کلرآمفنیکل (۲۶٪)، سفالوتین (۳۹٪)، سیپروفلوکساسین (۱۸٪) و سفوتاکسیم (۳۳٪) بود. اما حساسیت خوبی در میان جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه به ایمی‌پنم، سفنازیدیم 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 سفنازیدیم را در جدایه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه حدود ۹۲٪ گزارش کردند که مشابه نتیجه مقاومت به سفنازیدیم (۱۰۰٪) در این پژوهش می‌باشد (۲۲). MIC آنتی‌بیوتیک‌های انتخابی بر جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه، برای جنتامایسین ($512 \mu\text{g/ml}$) تا ۸، سفالوتین ($512 \mu\text{g/ml}$)، سفنازیدیم ($512 \mu\text{g/ml}$) و سیپروفلوکساسین ($512 - 16$) و همه در محدوده‌ی مقاوم بدست آمد. در مطالعه‌ی Eslami و همکاران (۲۰۱۲)، مقاومت به سفنازیدیم در سویه‌های کلبسیلا پنومونیه وجود داشته و بیش‌تر در غلظت $16 \mu\text{g/ml}$ مشاهده شده است، در حالی که نتایج این پژوهش مقاومت تمامی جدایه‌ها را به غلظتی بیش‌تر از $512 \mu\text{g/ml}$ نشان می‌دهد (۲۳). Afifi (۲۰۱۳) مقاومت سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مولد ESBLs را چنین گزارش نموده است: جنتامایسین ($8 \mu\text{g/ml}$ تا $2 <$ ، سفالوتین ($16 \mu\text{g/ml}$)، سفنازیدیم ($16 \mu\text{g/ml}$ تا $8 >$) و سیپروفلوکساسین ($2 \mu\text{g/ml}$ تا $0.5 <$) (۲۴). این سویه‌ها به جنتامایسین و سیپروفلوکساسین حساس و به سفالوتین و سفنازیدیم مقاوم بودند، در حالی که جدایه‌های مورد مطالعه‌ی این

سلسیوس می‌باشد، بنابراین ترکیباتی مانند پیتیدها 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 پیتیدها 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 ضد میکروبی کمتری بر کلیسیلا پنومونیه نسبت به CFS خنثی نشده داشتند. به این ترتیب اثر ضد میکروبی می‌تواند مربوط به اسید لاکتیک، دی استیل استیک اسید، اسیدهای چرب و آلدیدها 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 ۶/۵ pH 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 کلیسیلا 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 ضد میکروبی مانند باکتریوسین‌ها، پیتیدهایی 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 ضد میکروبی 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

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

Kaktcham و همکاران (۲۰۱۲) تأثیر باکتریوسین را به عنوان متابولیت مؤثر در CFS سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلاتناروم، لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس بومی با روش تیمار پروتئیناز-K، تریپسین، لیپاز، لیزوزیم و آمیلاز بر مهار کلیسیلا 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 پیتیدی نیز تا حدی در مهار کلیسیلا 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 کلیسیلا 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 جدایی‌های کلیسیلا پنومونیه سنجش شده با روش‌های چاهک پلیت و تعیین MIC، متابولیتی با خاصیت اسیدی مانند اسید لاکتیک و اسید استیک می‌باشد، زیرا اثر ضد میکروبی با خنثی سازی CFS تا pH معادل ۷، در مقایسه با خنثی نمودن اثر پیتیدها 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 و در 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

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 *کلبرسیلا 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 میکروبیولوژی 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 هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

Reference

- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(4):589-603.
- 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.
- Mohamed BJ, Jiyad JH. Determining the effect of various physicochemical factors on inhibition activity of *Lactobacillus acidophilus* against *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospital-acquired infections by using optical density assay. *Diyala J Pure Sci* 2012; 8(3):121-135.
- 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.

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 این که با کاهش غلظت، اثر ضد میکربی CFS نیز کاهش می‌یابد، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت غلظت متابولیت مؤثر عامل تعیین کننده‌ی ای در اثر ضد میکربی 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 ضد میکربی 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 طوری که 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 رویه آنتی‌بیوتیک‌ها و سرعت انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میان باکتری‌ها بخصوص در محیط بیمارستان، علاوه بر وجود عوارض جانبی و اثرات نامطلوب آنتی‌بیوتیک‌ها بر فلور میکربی بدن، سویه‌های مقاوم به سرعت شیوع پیدا می‌کنند. این موضوع به تهدیدی برای بهداشت جوامع تبدیل

- 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.
- 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]
- 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.
- 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.

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. acidophilus* 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, Najarpour 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-

- sian]29. Kaktcham PM, Zambou NF, Tchouanguép 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. Moslehisad 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. Saadatzaheh 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-Macias 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.