



## Isolation and identification of *Lactobacillus* species isolated from the vagina of healthy women and phenotypic and genotypic study of their antibiotic resistance

Azadehdokht Eftekhari Fumani<sup>1</sup>, **Masoumeh Anvari**<sup>1\*</sup>, Meysam Hasannejad Bibalan<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Ra.C., Islamic Azad University, Rasht, Iran

2. Department of Microbiology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Received Date:2025.07.27 Accepted Date:2025.8.22

### Abstract

One of the important factors in the use of probiotics is the isolation and identification of new strains without drug resistance with probiotic potential. The aim of this study was to isolate and identify bacteria belonging to the genus *Lactobacillus* and evaluate their drug resistance from healthy women referred to the Mehr infertility treatment clinic of Rasht. 50 samples were prepared and after that they were cultured on MRS agar. Also, morphological and biochemical identification of the isolates was performed. Sugar fermentation, hemolysis, acid tolerance and resistance to bile salts tests were performed. Resistance to common antibiotics was examined phenotypically by the disk diffusion method and MIC determination and the presence of resistance genes in the isolated lactobacilli were genetically assayed. Finally, the most sensitive strains with probiotic properties were molecularly identified using the 16SrRNA gene PCR reaction. 12 isolates had grown better and were observed as gram-positive bacilli in Gram stain. Phenotypic identification confirmed the genus *Lactobacillus*. Sugar fermentation test was positive and hemolysis and catalase test was negative for all of isolates. The bacteria were also able to grow in acidic pH and bile salts. The best isolate in phenotypic methods and molecular analysis lacked acquired drug resistance genes was identified as *Lactobacillus crispatus*. By conducting further complementary *In vivo* tests on the probiotic properties of this microorganism and its health-promoting effects, it can be used as a therapeutic supplement for medicinal purposes such as vaginal suppositories.

**Keywords:** Drug resistance; *Lactobacillus*; Probiotic properties; Vagina

\* Anvari@iaue.ac.ir

## EXTENDED ABSTRACT

**Introduction:** The dominant vaginal flora includes species of the genus *Lactobacillus*. Recent research reports indicate that LAB strains of Human milk, infant stool, or vaginal fluids may have better survival against gastrointestinal stressors, making them better candidates for probiotics. The rise of antimicrobial resistance (AMR) is a major threat to public health and the economy. In recent years, reports of LAB strains with single or multiple antibiotic resistance phenotypes have been published, raising concerns about the transfer of these genes to human and animal pathogens through genetic mechanisms. According to international standards such as EFSA and FDA standards, the only criterion for the safety of these bacteria is the absence of resistance genes.

This study aimed to identification of the new *Lactobacillus* isolates with potential of probiotic properties from human vaginal source, to clarify the possibility of the spread of antibiotic resistance genes and their suitability for probiotic application, and introduce them as candidates for probiotics and food and drug production.

**Material and method:** 50 vaginal swab samples were cultured to MRS broth and morphological characteristics and biochemical tests were used to phenotypical identification of the isolates. Also, acid and bile tolerance test and the epithelial cell attachment ability performed based on standard protocols.

Determination of antibacterial activity of the isolated *Lactobacillus* species was performed by a disk diffusion and macro dilution broth assay based on 2020 standard CLSI protocols. Molecular identification of resistance genes and the most sensitive isolate were identified by specific PCR amplification of all resistance and 16S rRNA genes respectively.

**Results:** 12 isolates were confirmed as lactic acid bacteria based on above-mentioned tests. Resistance to vancomycin was the most common and was observed in all 12 isolates (100%). Ampicillin resistance was observed in isolate 5. All isolates were sensitive to kanamycin. Trimethoprim resistance was observed in isolate 7. Penicillin resistance was found in isolate 9. Chloramphenicol resistance was observed in isolate 6. Erythromycin resistance was positive in the disk diffusion test in all isolates except isolate 11, and broth macrodilution test and molecular screening also confirmed resistance in only one isolate. Ciprofloxacin resistance was confirmed in 11 isolates. Resistance to gentamicin was observed in 2 isolates and resistance to tetracycline in 3 isolates. Resistance to erythromycin was observed in 1 case. Resistance to streptomycin was observed in 2 cases. Among the isolated lactobacilli, 1 case was resistant to rifampin. Isolate E1 was the best strain and sensitive to all antibiotics except vancomycin and isolates E2 and E3 were the superior ones and only showed resistance to vancomycin and ciprofloxacin.

**Discussion:** Probiotic ability of the all isolates in this study was confirmed based on probiotic property determination tests. Except for 1 isolate, all others showed phenotypic resistance to antibiotics involved in the inhibition of nucleic acid synthesis (ciprofloxacin) (91/66%). High resistance to this antibiotic family is considered to be one of the mechanisms of intrinsic resistance. Basically, the drug susceptibility profile is also very different based on the source of the isolate. In similar studies, all similar species isolated from fermented foods were sensitive to quinolones, but human isolates (isolated from breast milk and feces) were reported to be intermediate or resistant to these antibiotics.

High and 100% resistance to the antibiotic vancomycin. Basically, lactobacilli show a very high natural resistance to glycopeptide antibiotics, which is due to the involvement of chromosomal genes for wall synthesis and organization through different enzymatic pathways, in the natural wall compared to sensitive bacteria.

Resistance to ampicillin was also seen in three of the studied isolates (75%). This resistance may be of dietary origin. Lactobacilli susceptible to  $\beta$ -lactam antibiotics are often less resistant to cephalosporins. The physiological reason for cephalosporin resistance could be due to wall impermeability or the role of a wall-bound autolysins.

All of isolates were susceptible to imipenem, which is in contrast to the results of some other researchers and is consistent with some that show susceptibility to meropenem. It seems that resistance to this group of antibiotics is species-specific.

Although no significant resistance to macrolides was observed in this study and only one resistant sample was observed. According to Wind and Delgado, these resistances could be related to individual differences between

isolates. However, the type of source (human or food sources) also has a significant effect on the occurrence of resistance. In the present study, the majority of isolates showed sensitivity to macrolide antibiotics.

More than fifty percent of the studied isolates were resistant to kanamycin (58.33%). In confirmation of the report of many other researchers, no significant inhibitory effect was observed by aminoglycosides, especially kanamycin and tobramycin. Gentamicin usually shows a greater inhibitory effect than other aminoglycosides. However, two isolates also showed resistance to gentamicin. Basically, many lactobacilli are resistant to aminoglycosides which is often intrinsic and is due to the surface characteristics of the bacteria and the low penetration of the drug, as well as the lack of a cytochrome-dependent electron transport system in them.

Since tetracycline is one of the most commonly used antibiotics in livestock farming, the expectation of resistance to it is also high. However, the bacteria studied in this study, like other similar studies showed high sensitivity to tetracycline (75%). It seems that the incidence of this resistance is lower in isolates from food sources and milk and higher in feces, which in turn raises the importance of the source of strain isolation. It seems that resistance to nucleic acid synthesis inhibitors such as trimethoprim and Sulfonamides such as co-trimoxazole are also intrinsic to lactobacilli. Because these antibiotics inhibit the enzyme dihydrofolate reductase dihydropteroide acid synthetase, and changing the permeability of the wall to the above antibiotics. Among the three isolates studied, isolate E1 was the best isolate with probiotic properties without any acquired resistance. Molecular analysis indicated the best strain is *Lactobacillus crispatus*. Considering its valuable probiotic properties, it is recommended as a candidate for use as a supplement to probiotic treatment such as combined vaginal suppositories after complementary *In vivo* tests.

.  
. .



## جداسازی و شناسایی گونه های جنس لاکتوباسیلوس جدا شده از واژن زنان سالم و بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها

آزاده دخت افتخاری فومنی<sup>۱</sup>، معصومه انوری\*<sup>۱</sup>، میثم حسن نژاد بی بالان<sup>۲</sup>

(۱) گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

(۲) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۳۱

### چکیده

یکی از عوامل مهم در استفاده از پروبیوتیک ها، جداسازی و شناسایی سویه های جدید بدون برخورداری از مقاومت های درویی با پتانسیل پروبیوتیکی می باشد لذا هدف تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی باکتری های متعلق به جنس لاکتوباسیلوس و ارزیابی مقاومت دارویی آن ها از زنان سالم مراجعه کننده به کلینیک درمان ناباروری مهر رشت بود. 50 نمونه تهیه و پس از کشت نمونه ها روی محیط کشت MRS آگار، شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی جدایه ها انجام گردید. تست های تخمیر قند، همولیز و کاتالاز، تحمل اسید و مقاومت در برابر نمک های صفراوی انجام شد. مقاومت به آنتی بیوتیک های رایج از نظر فنوتیپی با روش دیسک دیفیوژن و تعیین MIC و حضور ژنهای مقاومت در لاکتوباسیل های جداسازی شده بررسی شد. در نهایت حساسترین سویه های برخوردار از خواص پروبیوتیکی با استفاده از واکنش PCR ژن *16SrRNA*، شناسایی مولکولی شدند. ۱۲ ایزوله که رشد بهتری داشتند و در رنگ آمیزی گرم به صورت باسیل های گرم مثبت مشاهده شدند. شناسایی فنوتیپی جنس لاکتوباسیلوس را تایید نمود. تست تخمیر قندها برای همه ایزوله ها مثبت و تست همولیز برای همه آن ها منفی بود. ایزوله ها همچنین قادر به رشد در محیط اسیدی و محیط حاوی نمک های صفراوی بودند. نتایج نشان داد برترین جدایه در روشهای فنوتیپی فاقد مقاومت اکتسابی و در ارزیابی ژنوتیپی فاقد ژنهای آن بود. حساسترین ایزوله ی جداسازی شده به آنتی بیوتیک های رایج لاکتوباسیلوس *کرایسپاتوس* بود. با انجام آزمایشات بیشتر در رابطه با خواص پروبیوتیکی این میکروارگانیسم و اثرات سلامتی بخش آن بصورت درون موجودی می توان از آن به عنوان یک مکمل درمانی جهت مصارف دارویی مانند شیافهای واژینال استفاده نمود.

**کلید واژه ها:** خواص پروبیوتیکی، لاکتوباسیلوس، مقاومت دارویی، واژن

\* Anvari@iaui.ac.ir

واقع می شوند. در حالی که اکنون میزان مرگ و میر سالانه جهانی ناشی از عفونت های مقاوم به دارو به بیش از ۷۰۰۰۰۰ تا ۱ میلیون نفر رسیده است پیش بینی می شود این میزان تا سال ۲۰۵۰ به ۱۰ میلیون نفر برسد [۲] لذا مقاومت دارویی توجه علمی و پزشکی قابل توجهی را به خود جلب کرده اند، شواهد نشان می دهد که تبادل ژن مداوم بین سویه های بیماری زا و گونه های به ظاهر بی ضرر یا حتی مفید هم زیست، در حال افزایش است. پیامد این است که موارد اخیر اکنون به عنوان "مخازن" ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی (ARG) در نظر گرفته می شوند که از طریق مسیر های متعدد، ممکن است تکثیر شوند و در نهایت با عوامل بیماری زا یا پاتوژن ها به اشتراک گذاشته شوند (۴۰)

در سال های اخیر، گزارش هایی مبنی بر وجود سویه های LAB با فنوتیپ های مقاومت آنتی بیوتیکی تکی یا چند گانه منتشر شده است که نگرانی هایی را در مورد انتقال این ژن ها از طریق مکانیسم های ژنتیکی به پاتوژن های انسانی و حیوانی ایجاد کرده است. در حال حاضر، گزارش هایی مبنی بر انتقال ژن های کد کننده مقاومت از LAB به پاتوژن ارائه شده است که منجر به توصیه سازمان ایمنی مواد غذایی اروپا (EFSA) و سازمان بهداشت جهانی (WHO) مبنی بر حذف سویه های باکتریایی حامل عناصر ژنتیکی متحرک با ARG ها از خوراک، تخمیر مواد غذایی و استفاده از پروبیوتیک ها شده است در نتیجه، داشتن فنوتیپ های مقاومت توسط LAB، محل ژن های مقاوم و قابلیت انتقال این ویژگی ها به موضوعات داغی برای تحقیقات فشرده تبدیل شده است (۴۱).

بر اساس استانداردهای بین المللی مانند استاندارد EFSA، FDA، تنها معیار ایمن بودن این باکتری ها عدم برخورداری از ژن های مقاومت است (۵). لذا به منظور پیشگیری از انتشار ژن های مقاومت هر پروبیوتیکی، در اکوسیستم واژن باید فاقد این ژن ها باشد (۶). به همین دلیل تلاش برای جداسازی و شناسایی لاکتوباسیل ها از منابع مختلف به منظور استفاده از آن ها به عنوان پروبیوتیک ادامه دارد

## مقدمه

واژن پستانداران میزان تعداد زیادی از میکروارگانیسم های مختلف است که به عنوان میکروبیوتا شناخته می شوند و در چندین عمل مفید در میزان از جمله جلوگیری از کلونیزاسیون پاتوژن ها، بلوغ و تنظیم سیستم ایمنی و تعدیل انتشار هورمون ها شرکت می کنند (۱)

فلور غالب واژن شامل گونه های جنس لاکتوباسیلوس مانند *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. iners* باشد. حذف اعضای این جنس از واژن منجر به واژینوز باکتریال (BV) و عفونت دستگاه ادراری (UTIs) و بیماری های التهابی لگن می شود (۲)

غالباً با درمان های آنتی بیوتیکی ناشی از عفونت در سایر نقاط بدن، این جمعیت طبیعی دچار خدشه شده و توازن فلور واژن برهم می خورد. بعلاوه تداوم استفاده از آنتی بیوتیک غالباً منجر به ایجاد سویه های مقاوم اکتسابی در فلور واژن می گردد که به نوبه خود می تواند تهدیدی برای سلامتی باشد (۳، ۴)

گزارش های تحقیقاتی اخیر نشان می دهد که سویه های LAB با منشأ انسانی (شیر، نمونه های مدفوع نوزاد یا واژن) ممکن است بقای بهتری در برابر عوامل استرس زای معده و روده داشته باشند؛ در نتیجه، آنها را به کاندیداهای پروبیوتیک بهتری تبدیل می کنند (۳۹).

شواهد قابل توجهی فواید پروبیوتیک ها را ثابت میکند که علاقه زیادی به کاربرد آنها در تغذیه و سلامت ایجاد کرده است. باکتری های اسید لاکتیک ها اغلب برای فواید خاص سلامتی به مواد غذایی اضافه می شوند. افزایش مقاومت ضد میکروبی (AMR) تهدیدی اساسی برای سلامت عمومی و اقتصاد است. امروزه آنتی بیوتیک ها به دلیل افزایش تعداد سویه های بیماری زا مقاوم به چند دارو (MDR) کمتر مؤثر

منظور شناسایی بیوشیمیایی ایزوله‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. (۸)

**تست تخمیر قند:** جهت انجام تست تخمیر قندها، ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط نوترینت براث حاوی ۱ میلی‌لیتر فنول قرمز تهیه و اتوکلاو شد. پس از اتوکلاو به هر لوله حاوی محیط کشت، ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱٪ از قندهای گلوکز، لاکتوز و سوکروز با فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرونی به محیط کشت اضافه شد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر کشت تازه باکتری با کدورت معادل نیم مک فارلند به هر لوله اضافه گردید. لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند و سپس تغییر رنگ محیط از قرمز به زرد به عنوان نشانه‌ی تخمیر قند، ارزیابی گردید.

**شناسایی مولکولی ایزوله‌ها:** برای این منظور ابتدا DNA ایزوله‌ها با استفاده از کیت جداسازی شده و واکنش PCR با استفاده از پرایمر ژن *16SrRNA* انجام شد. از کیت سیناکلون استفاده شد و مراحل انجام واکنش مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. همچنین از پرایمرهای اختصاصی رفت و برگشت با توالی GGAGTTTGATCCTGGCTCAG و CCAGTACCAAGGCATTACAC استفاده گردید. پس از ارزیابی کمی و کیفی محصول PCR به ترتیب با روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز، محصول PCR جهت توالی‌یابی به شرکت کدون ژنتیک ارسال شد. توالی‌های به دست آمده در پایگاه داده NCBI بلاست شده و از طریق تطابق توالی با توالی‌های موجود در این پایگاه داده، گونه‌های جداسازی شده شناسایی شدند. به منظور رسم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار MEGA7 استفاده و هم‌ردیفی انجام شد. سپس درخت فیلوژنی با روش اتصال همسایگی (NJ) و بوت استرپ ۱۰۰۰ رسم گردید.

**تست همولیز:** بررسی لیز گلبول‌های قرمز خون گوسفندی با کشت جدایه‌ها بر روی محیط کشت آگار خون‌دار (محیط پایه حاوی ۵٪ خون گوسفندی دفیبرینه) انجام شد. پس از

این مطالعه با هدف تجزیه و تحلیل فنوتیپ‌ها و ژنوتیپ‌های باکتری‌های پروبیوتیک بالقوه از منابع انسانی، برای روشن شدن احتمال انتشار ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین مناسب بودن آنها برای کاربرد پروبیوتیک و شناسایی لاکتوباسیل‌های برخوردار از خواص پروبیوتیکی از نمونه‌های واژینال به عنوان کاندید پروبیوتیک و تولید مواد غذایی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

**نمونه‌برداری:** تعداد ۲۰۰ نمونه سواپ واژینال به تعداد بر اساس فرمول کوکران از زنان سالم تهیه شد و در تمام فصول سال ۱۴۰۳ جمع‌آوری شده و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش ذخیره گردید. تمامی نمونه‌ها بلافاصله پس از جمع‌آوری تحت تکنیک‌های آسپتیک در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا از آلودگی احتمالی جلوگیری شود.

$$n = \frac{z^2 pq}{d^2}$$

$$Z=1.96$$

$$P=q=0.5$$

$$d = \text{تعداد خطا}$$

**جداسازی باکتری‌ها:** سواپ‌ها به محیط کشت MRS براث اضافه شد. پس از انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، محیط‌هایی که کدر شده بودند انتخاب شدند. از هر لوله آزمایش، یک لوپ برداشته شده و روی محیط کشت MRS آگار کشت منطقه‌ای انجام شد. کلنی‌های به دست آمده در پلیت‌های جدید تخلیص شدند تا در ادامه‌ی آزمایش مورد استفاده قرار گیرند (۷).

**شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی:** از کلنی‌های خالص به دست آمده در مرحله‌ی قبل، رنگ آمیزی گرم تهیه شد و برای بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک زیر میکروسکوپ بررسی شد. همچنین تست‌های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اوره‌آز، سترات، MR/VP و اندول به

انکوباسیون، وجود هاله شفاف در اطراف کلنی ها بررسی گردید (۹)

**تست تحمل اسید:** مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی در لوله های حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت اسیدی با pH حدود ۴-۲/۵ تلقیح شد و پس از ۴ ساعت انکوباسیون یک میلی لیتر از آن برداشته شده و روی محیط کشت جامد کشت داده شد. سپس شمارش کلنی انجام شد که مقدار آن در سویه های مقاوم به اسید نباید کمتر از  $10^6$  باشد. (۹)

**تست تحمل نمک های صغری:** مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی به محیط کشت مایع حاوی بایل ۰/۳ درصد اضافه شد. از محیط کشت فاقد بایل به عنوان کنترل استفاده گردید. جذب نوری محیط های کشت قبل و بعد از انکوباسیون (هر ۸ ساعت یک بار) در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانش شد. منحنی رشد باکتری در حضور و عدم حضور صفرا رسم گردید. (۹)

### بررسی تست اتصال به سلول های اپی تلایل

جدایه هایی که در کار آزمایی های قبلی بهترین عملکرد را داشتند برای آخرین مرحله کار، که شامل ارزیابی توانایی چسبندگی آنها به سلول های اپیتلیال روده انسان بود، انتخاب شدند. ابتدا، رده های سلولی (% سرم جنین گاو ۱۰)، غنی شده با RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA) در محیط Caco-2، (Sigma) و 1% پنی سیلین استرپتومایسین در دمای 37 درجه سانتیگراد در 5% اتمسفر CO<sub>2</sub> با رطوبت 95% کشت و رشد داده شدند. سلول های Caco-2 بصورت یک تک لایه روی صفحات کشت سلولی Sigma (با 24 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی گراد ثابت شدند و صفحات دو بار با فسفات بافر شسته شدند. سپس، تقریباً 108 سلول در هر میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری های اسید لاکتیک (۱۰ میلی لیتر) بر روی هر پلیت اضافه و پس از 2 ساعت انکوباسیون پلیت ها در دمای 37 درجه سانتی گراد، سلول ها دو بار با فسفات بافر شسته شدند تا باکتری های نچسبیده حذف شوند. سپس سلول های Caco-2 با محلول تریپسین

EDTA 0.5% (درصد) لیز شده و در 10 میلی لیتر محلول فسفات بافر معلق شدند. در نهایت، محلول بدست آمده (حاوی باکتری های چسبیده) به صورت سریال رقیق شده و روی MRS آگار (Merck, Darmstadt, Germany) کشت داده شدند و تعداد باکتری های چسبیده با استفاده از معادله زیر گزارش شد. (۱۰)

(کل باکتری های اضافه شده / باکتری های چسبیده)  $\times 100$  = درصد چسبندگی

**تعیین فعالیت ضد باکتریایی:** فعالیت ضد باکتریایی گونه های لاکتوباسیلوس جدا شده با اصلاح روش انتشار دیسک تعیین شد. دیسک های کاغذی استریل در کشت ۴۸ ساعته سویه های جدا شده غوطه ور شدند. سپس دیسک های فوق روی محیط آگار مغذی اغشته با کشت ۳ ساعته پاتوژن های آزمایشی شامل اشیریشیا کلی (ATCC 25922)، سودوموناس اتروژینوزا (ATCC ۲۷۸۵۳)، اسیتو باکتر بومانی (ATCC 1605) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) تهیه شده از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران قرار داده شدند. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و مناطق بازدارندگی رشد (zones of growth inhibition) بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. (۱۴)

### بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت دارویی

مایع تلقیح به صورت مستقیم از کلنی های لاکتوباسیلوس شناسایی شده با استفاده از سرم فیزیولوژی تهیه شد. کلنی هایی که حدود ۱۸ تا ۲۴ ساعت از رشد آن ها روی محیط کشت نوترینت آگار در شرایط میکرواثر و فلیک گذشته را به سرم فیزیولوژی استریل منتقل کرده و کدورت محلول تهیه شده به کمک استاندارد نیم مک فارلند که در دستگاه اسپکتروفتومتر با جذب بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ در طول موج nm ۶۲۵ سنجیده شد.



کلرامفنیکل  $30 \mu\text{g}$ ، جنتامایسین  $10 \mu\text{g}$ ، استرپتومایسین  $30 \mu\text{g}$  و آمپی سیلین  $10 \mu\text{g}$ ، تری متوپریم  $25 \mu\text{g}$  روی هر پلیت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌های تشکیل شده سه بار برای هر یک از دیسک‌ها توسط خط کش اندازه گیری شده و نتایج طبق جدول (۱) و بر اساس استاندارد CLSI مورد سنجش قرار گرفت. (۱۱)

پس از ۱۵ دقیقه تنظیم کدورت با استاندارد نیم مک فارلند با استفاده از یک سوپ استریل سطح محیط کشت مولر- هیتون آگار تلقیح شد سپس دیسک‌های مربوط به آنتی- بیوتیک‌های ونکومایسین  $30 \mu\text{g}$ ، کانامایسین  $30 \mu\text{g}$ ، اریترومایسین  $15 \mu\text{g}$ ، سیپروفلوکساسین  $5 \mu\text{g}$ ، پنی- سیلین  $10 \mu\text{g}$ ، نالیدیکسیک اسید  $30 \mu\text{g}$ ، تتراسایکلین  $30 \mu\text{g}$

جدول ۱ تفسیر داده های تست آنتی بیوگرام

| Disk diffusion method | Zone diameter (mm) |
|-----------------------|--------------------|
| Susceptible           | >20                |
| Intermediate          | 15-19              |
| Resistant             | $\leq 14$          |

لوله شماره ۲ ریخته شد. بعد از تکانش لوله، مجدد با سمپلر استریل یک میلی لیتر از لوله دوم به لوله سوم ریخته شد و پس از تکانش کامل لوله یک میلی لیتر از آن به لوله بعدی انتقال داده شد و به همین صورت تا لوله شماره ۹ ادامه داده و از لوله شماره ۹، یک میلی لیتر برداشته و دور ریخته شد.

سپس به همه لوله ها یک میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی اضافه شد. دهانه همه لوله ها با پنبه بسته و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور  $37.5^\circ\text{C}$  درجه انکوبه شدند. در روش MIC، اولین لوله شفاف ما قبل لوله دارای کدورت (نشان دهنده رشد باکتری)، به عنوان MIC گزارش شد. (۱۲)

### شناسایی مولکولی ژنهای مقاومت

بدین منظور پرایمرهای ذکر شده در جدول ۲ با مرور منابع تهیه شدند.

### تعیین MIC بر اساس روش ماکرودیولوشن براث انجام شد

۹ لوله آزمایش برای هر آنتی بیوتیک در نظر گرفته شد و به ترتیب شماره گذاری شدند. در تمام لوله ها به جز لوله اول، یک میلی لیتر آب مقطر با استفاده از سمپلر ریخته و سپس لوله ها در دمای  $121^\circ\text{C}$  درجه سانتی گراد و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو و استریل شدند. سوسپانسیون میکروبی معادل ۰.۵ مک فارلند در طی ۴ ساعت از تک کلنی خالص باکتری به دست آمد. استوک های آنتی بیوتیک در حجم ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل تهیه شد.

سپس در لوله شماره یک، ۲ میلی لیتر از استوک آنتی بیوتیک با استفاده از سمپلر استریل ریخته شد، سپس یک میلی لیتر از استوک لوله شماره یک با سمپلر برداشته و در



جدول 2 لیست پرایمرهای مربوط به ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک

| نام ژن                    | پرایمر مربوط به ژن مقاومت به آنتی بیوتیک                                                                          | اندازه<br>امپلیکون<br>bp | دمای<br>annealing<br>درجه سانتی<br>گراد |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|
| تتراسایکلین               | <i>tetM</i><br>5'GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG3'<br>5'CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC3'                                   | ۴۰۶                      | ۶۰                                      |
| تتراسایکلین               | <i>tetW</i><br>5'GAG AGC CTG CTA TAT GCC AGC3'<br>5'GGG CGT ATC CAC AAT GTT AAC3'                                 | ۱۶۸                      | ۶۰                                      |
| تتراسایکلین               | <i>tetL</i><br>5'TGG TGG AAT GAT AGC CCA TT3'<br>5'CAG GAA TGA CAG CAC GCT AA3'                                   | ۲۲۹                      | ۶۰                                      |
| تتراسایکلین               | <i>tetK</i><br>5'GAT CAA TTG TAG CTT TAG GTG AAG<br>G3'<br>5'TTT TGT TGA TTT ACC AGG TAC CAT<br>T3'               | ۱۵۵                      | ۶۰                                      |
| تتراسایکلین               | <i>tetO</i><br>5'AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC3'<br>5'TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA3'                                 | ۵۱۵                      | ۶۴                                      |
| اریترومایسین              | <i>ermA</i><br>5'CCC GAA AAA TAC GCA AAA TTT<br>CAT3'<br>5'CCC TGT TTA CCC ATT TAT AAA CG3'                       | ۵۹۰                      | ۶۰                                      |
| اریترومایسین              | <i>ermB</i><br>5'TGG TAT TCC AAA TGC GTA ATG3'<br>5'CTG TGG TAT GGC GGG TAA GT3'                                  | ۷۴۵                      | ۶۰                                      |
| اریترومایسین              | <i>mefA/E</i><br>5'CAA TAT GGG CAG GGC AAG3'<br>5'AAG CTG TTC CAA TGC TAC GC3'                                    | ۳۱۷                      | ۶۰                                      |
| اریترومایسین              | <i>ermC</i><br>5'AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT3'<br>5'TAATCGTGAATACGGGTTTG3'                                         | ۲۹۹                      | ۵۸                                      |
| اریترومایسین              | <i>lnuA</i><br>5'GGT GGC TGG GGG GTA GAT GTA<br>TTA ACT GG3'<br>5'GCT TCT TTT GAA ATA CAT GGT ATT<br>TTT CGA TC3' | ۳۲۳                      | ۶۱                                      |
| کلرامفنیکل                | <i>Cat</i><br>5'TAA GGT TAT TGG GAT AAG TTA3'<br>5'GCA TGR TAA CCA TCA CAW AC3'                                   | ۳۴۰                      | ۵۴                                      |
| کلرامفنیکل                | <i>catA</i><br>5'ATAACGTTACTCTCCTATTTTC3'<br>5'GG ATAT GA A ATTTAT CCCTC3'                                        | ۴۸۶                      | ۵۰                                      |
| بتالاکتام ها(پنی<br>سیلین | <i>blaZ</i><br>5'ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC3'<br>5'TAG GTT CAG ATT GGC CCT TAG3'                                 | ۲۴۰                      | ۶۰                                      |

| نام ژن                   | پرایمر مربوط به ژن مقاومت به آنتی بیوتیک                                            | اندازه<br>امپلیکون<br>bp | دمای<br>annealing<br>درجه سانتی<br>گراد | آنتی بیوتیک                 |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------|
| <i>mecA</i>              | 5'AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C3'<br>5'AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C3'              | ۵۳۳                      | ۵۵                                      | بتالاکتام ها (پنی<br>سیلین) |
| <i>aac(6'')-aph(2'')</i> | 5'CCAAGAGCAATAAGGGCATACCG3'<br>5'ACCCTCAAAAACCTGTTGTTGCG3'                          | ۲۲۰                      | ۶۰                                      | آمینو گلیکوزید ها           |
| <i>aph(3'')-III</i>      | 5'GCCTTTCCGCCACCTCACCG3'<br>5'GCCGATGTGGATTGCGAAAA3'                                | ۲۹۲                      | ۵۶                                      | آمینو گلیکوزید ها           |
| <i>aadA</i>              | 5'CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC3'<br>5'ATCCTTCGGCGCGATTTTG3'                              | ۲۸۲                      | ۵۶                                      | آمینو گلیکوزید ها           |
| <i>ant(4')-Ia</i>        | 5'CAA ACT GCT AAA TCG GTA GAA<br>GCC3'<br>5'GGA AAG TTG ACC AGA CAT TAC<br>GAA CT3' | ۲۹۴                      | ۵۶                                      | آمینو گلیکوزید ها           |
| <i>aph(2'')-Ic</i>       | 5'CCA CAA TGA TAA TGA CTC AGT TCC<br>C3'<br>5'CCA CAG CTT CCG ATA GCA AGA G3'       | ۴۴۴                      | ۵۶                                      | آمینو گلیکوزید ها           |
| <i>aph(2'')-Id</i>       | 5'GTG GTT TTT ACA GGA ATG CCA TC3'<br>5'CCC TCT TCA TAC CAA TCC ATA TAA<br>CC3'     | ۶۴۱                      | ۵۶                                      | آمینو گلیکوزید ها           |
| <i>ant(6)-Ia</i>         | 5'CGG GAG AAT GGG AGA CTT TG3'<br>5'CTG TGG CTC CAC AAT CTG AT3'                    | ۵۶۳                      | ۵۶                                      | آمینو گلیکوزید ها           |
| <i>aadE</i>              | 5'ATG GAA TTA TTC CCA CCT GA3'<br>5'TCA AAA CCC CTA TTA AAG CC3'                    | ۱۰۶۰                     | ۵۱                                      | آمینو گلیکوزید ها           |
| <i>vanA</i>              | 5'GGGAAAACGACAATTGCG3'<br>5'GTACAATGCGGCGTTA3'                                      | ۷۳۲                      | ۵۰                                      | ونکومايسين                  |
| <i>Van</i>               | 5'TTGGCGTCGTGTTAGGGA3'<br>5'CTGATGCTGCGTGGAATAGG3'                                  | ۵۰۳                      | ۵۷/۲                                    | ونکومايسين                  |
| <i>vanX</i>              | 5'TCGCGGTAGTCCCACCATTCGTT3'<br>5'AAATCATCGTTGACCTGCGTTAT3'                          | ۴۵۴                      | ۵۵                                      | ونکومايسين                  |
| <i>gyrA</i>              | 5'GAYTATGCWATGTCAGTTATTGT3'<br>5'GGAATRTTRGAYGTCATACCAAC3'                          | ۲۸۶                      | ۴۵                                      | سپروفلوکساسین               |

آگارز ۱٪ ریخته شد و باند ها در زیر آشکارساز UV مشاهده شدند.

## نتایج

**شناسایی مورفولوژیک و بیوشیمیایی:** تعداد ۱۲ جدایه از ۵۰ نمونه واژینال به عنوان باکتریهای خانواده اسید لاکتیک براساس خصوصیات کلنی و لام رنگ آمیزی گرم تایید شد. ایزوله ها پس از رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند و ویژگی های ظاهری آنها نشان دهنده ی باسیل های گرم مثبت بود (شکل ۱). همچنین نتایج تست های بیوشیمیایی شامل تست های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اوره-آز، سترات، MR/VP و اندول برای همه آنها منفی بود که لاکتوباسیل بودن ایزوله ها را تایید کرد (جدول ۱).

بعد از استخراج DNA به وسیله کیت ذکر شده (GTP)، واکنش PCR با محصولات واکنش با مقدار مشخص از مواد زیر برای هر نمونه انجام شد: ۲۵  $\mu$ L، مستر میکس زیست فناوری پیشگام، ۱  $\mu$ L، پرایمر Forward، ۱  $\mu$ L، پرایمر Reverse، ۱  $\mu$ L از DNA الگو و با افزودن آب مقطر به حجم ۵۰  $\mu$ L رسانده شد. واکنش PCR برای ژن های مقاومت با برنامه دمایی زیر انجام شد. دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۵ دقیقه انجام شد، دناتوراسیون ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و به مدت ۴۵ ثانیه انجام شد. دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و ۱۵ ثانیه انجام شد. این مراحل در ۳۵ چرخه تکرار شد و طولی شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۸ دقیقه انجام پذیرفت. در نهایت محصولات واکنش بر روی ژل



شکل ۱. باسیل های گرم مثبت در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰۰x

جدول ۳. نتایج تست های بیوشیمیایی جهت شناسایی سه ایزوله برتر جنس لاکتوباسیلوس

| تست<br>ایزوله | کاتالاز | اکسیداز | حرکت | اوره آز | سیترات | اندول | MR/V<br>P |
|---------------|---------|---------|------|---------|--------|-------|-----------|
| شماره ۱       | -       | -       | -    | -       | -      | -     | -/-       |
| شماره ۲       | -       | -       | -    | -       | -      | -     | -/-       |
| شماره ۳       | -       | -       | -    | -       | -      | -     | -/-       |

**تست تخمیر قند:** یکی از ویژگی‌های باکتری‌های اسید لاکتیک با توان پروبیوتیکی، تنوع تخمیر قندها می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی تخمیر قندها نشان داد که ایزوله‌های مورد مطالعه قادر به تخمیر گلوکز، لاکتوز و سوکروز بودند. با تخمیر قند و تولید اسید توسط ایزوله‌ها، محیط کشت از قرمز به زرد تغییر رنگ داده بود.

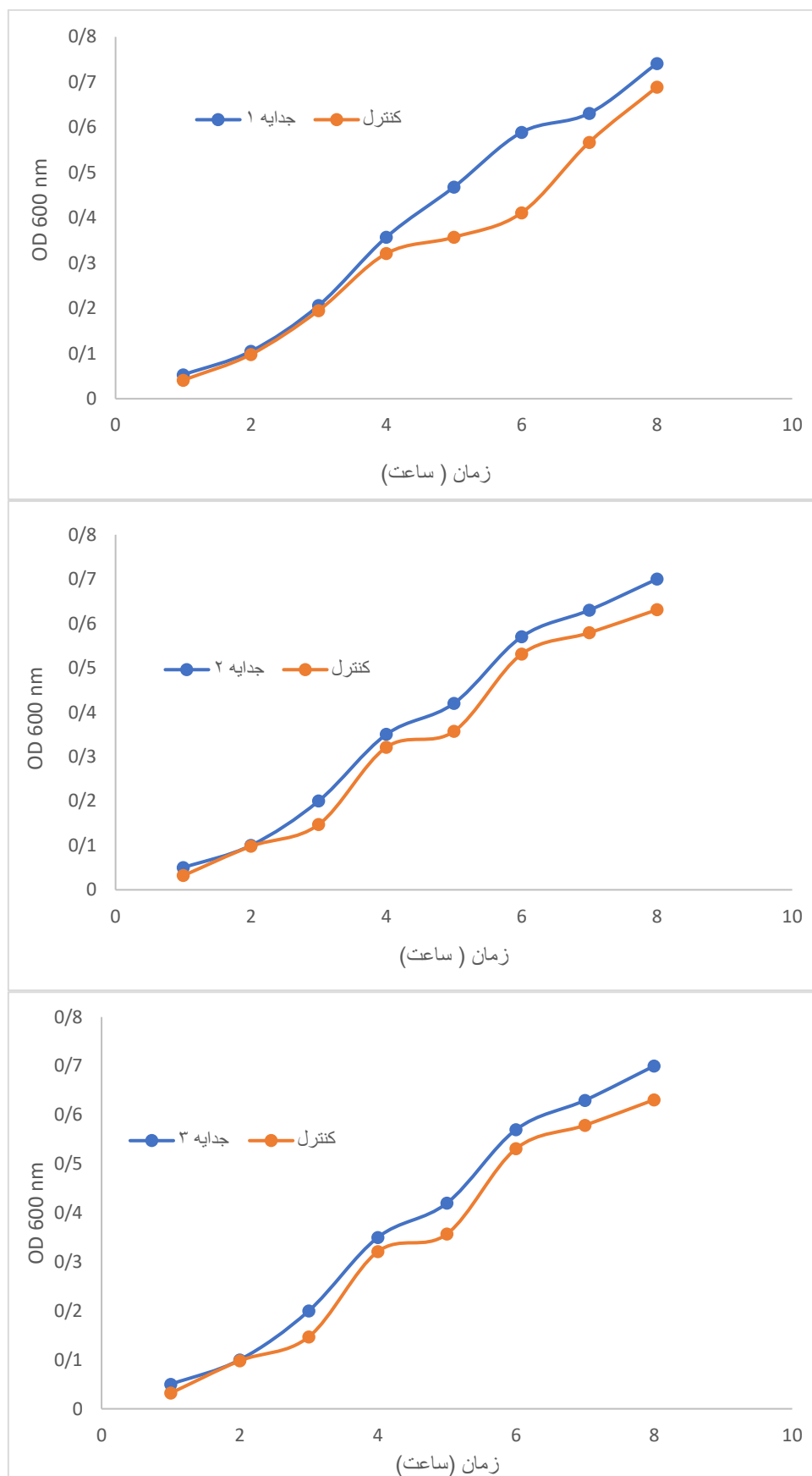
**عدم فعالیت همولیتیک:** پس از کشت باکتری‌ها بر روی محیط کشت آگار خون‌دار، وجود هاله در اطراف کلنی‌ها بررسی گردید و مشخص شد که هیچ هاله‌ی شفاف‌ی در اطراف کلنی‌ها تشکیل نشده و در نتیجه ایزوله‌های مورد مطالعه فعالیت همولیتیک نداشتند (شکل ۲).



شکل ۲. بررسی فعالیت همولیتیک و عدم مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی‌های باکتری لاکتوباسیلوس کراپساتوس

**تست مقاومت به اسید:** پس از تلقیح سوسپانسیون میکروبی در لوله‌های دارای محیط کشت اسیدی و سپس کشت آن روی پلیت حاوی محیط کشت جامد، کدورت لوله‌ها و همچنین تعداد کلنی‌ها روی پلیت ارزیابی گردید. کدورت لوله‌ها نشان دهنده‌ی رشد باکتری‌ها در محیط اسیدی بود. همچنین شمارش کلنی‌ها نشان داد که تعداد کلنی‌های هر پلیت بیشتر از  $10^6$  بوده و در نتیجه ایزوله‌ها قادر به تحمل شرایط اسیدی هستند.

**تست مقاومت به نمک صفاوی:** یکی از تست‌های مهم جهت ارزیابی توان پروبیوتیکی باکتری‌ها، بررسی مقاومت آن‌ها نسبت به نمک‌های صفاوی می‌باشد. جایه‌های مورد مطالعه قادر بودند در حضور نمک‌های صفاوی رشد کنند و منحنی رشد آن‌ها تفاوت چندانی با نمونه‌های کنترل (سوش استاندارد لاکتوباسیلوس کراپساتوس) نداشت. (شکل ۳).



شکل ۳. منحنی رشد ایزوله های برتر مورد مطالعه در حضور و عدم حضور نمک های صفراوی

**تست اتصال:** جدول ۴ درصد اتصال جدایه های برتر را نشان میدهد.

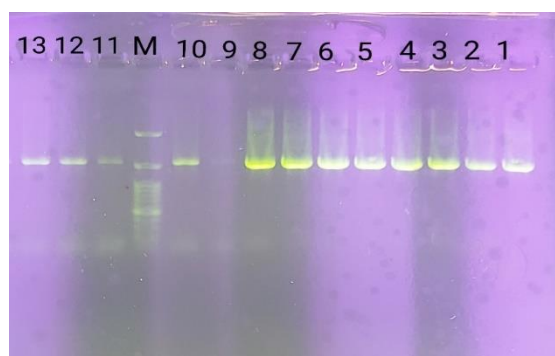
در مورد هر سه جدایه برتر حضور نمکهای صفراوی تاثیر قابل ملاحظه ای بر رشد نشان نداد و تفاوت معناداری در مقایسه با رشد کنترل بدون حضور نمک مشاهده نشد ( $p < 0.05$ )

جدول ۴ اتصال سه جدایه برتر به رده سلولی در دو pH با آنالیز رگرسیون

| نام سویه | pH | درصد اتصال |
|----------|----|------------|
| E1       | 4  | 39.23      |
|          | 7  | 41.17      |
| E2       | 4  | 41.12      |
|          | 7  | 37.03      |
| E3       | 4  | 69.56      |
|          | 7  | 69.09      |

شده است. وجود تک باندهای شارپ نشان دهندهی صحت انجام واکنش برای ایزوله های مورد مطالعه بود.

**واکنش زنجیره ای پلی مراز:** محصول PCR روی ژل آگارز الکتروفورز گردید تا الگوی تشکیل باندها مورد ارزیابی قرار گیرد. در شکل ۴ تصویر ژل مذکور نشان داده



شکل ۴. الکتروفورز محصول PCR جهت شناسایی ژن *16SrRNA*

نیز فراوانی نسبی مقاومت جدایه های آنتی بیوتیک های رایج به ترتیب در جداول شماره ۵ الف و ب ارائه شده است. همچنین تصویر بررسی فنوتیپی مقاومت دارویی در شکل ۵ نمایش داده شده است

بر روی ژل آگارز (ستون های ۱، ۲ و ۳: ایزوله های مورد مطالعه در محدوده 1500bp، M: مارکر مولکولی 100-bp (2000

### بررسی فنوتیپی مقاومت دارویی جدایه ها

نتایج مربوط به حساسیت به هر آنتی بیوتیک پس از سه با راندازه گیری در مورد لاکتوباسیلوس های جداسازی شده و

جدول ۵ الف - تفسیر آنتی بیوگرام در جدایه ها

| CP | GM | AM | CF | IPM | LZ | E | CC | K | V | TE | C | کد باکتری |
|----|----|----|----|-----|----|---|----|---|---|----|---|-----------|
| S  | S  | S  | S  | S   | S  | S | S  | S | R | S  | S | ۱         |
| R  | S  | S  | S  | S   | S  | S | S  | S | R | S  | S | ۲         |
| R  | S  | S  | S  | S   | S  | S | S  | S | R | S  | S | ۳         |
| R  | R  | R  | S  | S   | S  | R | S  | R | R | S  | S | ۴         |
| R  | S  | S  | S  | S   | S  | S | S  | R | R | R  | R | ۵         |
| R  | S  | R  | S  | S   | S  | S | S  | R | R | S  | S | ۶         |
| R  | S  | R  | S  | S   | S  | S | S  | R | R | S  | S | ۷         |
| R  | S  | S  | S  | S   | S  | S | S  | S | R | S  | R | ۸         |
| R  | S  | S  | S  | S   | S  | S | S  | S | R | R  | S | ۹         |
| R  | R  | S  | S  | S   | S  | S | S  | R | R | S  | S | ۱۰        |
| R  | S  | S  | S  | S   | S  | R | S  | R | R | S  | S | ۱۱        |
| R  | S  | S  | S  | S   | S  | S | S  | R | R | S  | S | ۱۲        |

S حساس R مقاوم

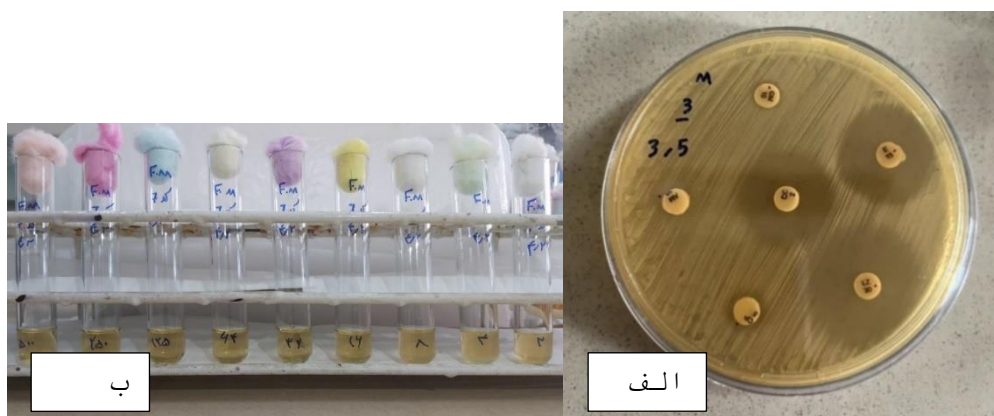
جدول ۵ ب - فراوانی نسبی مقاومت جدایه های آنتی بیوتیک های رایج

| CP    | GM    | AM | CF  | IPM | LZ  | E     | CC  | K     | V    | TE    | C     |                      |
|-------|-------|----|-----|-----|-----|-------|-----|-------|------|-------|-------|----------------------|
| 91/66 | ۱۶/۶۷ | ۲۵ | ۰/۰ | ۰/۰ | ۰/۰ | ۱۶/۶۷ | ۰/۰ | ۵۸/۳۳ | ۱۰۰  | ۱۶/۶۷ | ۱۶/۶۷ | درصد جدایه های مقاوم |
| 8/34  | ۸۳/۳۳ | ۷۵ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۱۰۰ | ۸۳/۳۳ | ۱۰۰ | ۴۱/۶۷ | ۰/۰۰ | ۸۳/۳۳ | ۸۳/۳۳ | درصد جدایه های حساس  |

توضیح: (S): استرپتومایسین، GM: جنتامایسین، AM: آمپی سیلین، CP: سیپروفلوکساسین، IPM: ایمینیم، LZ: لینزولید، E:

اریترومایسین، CC: کلیندامایسین، K: کانامایسین، V: ونکومایسین، TE: تتراسایکلین، C: کلرامفنیکل





شکل ۵- تصویری از نتایج آنتی بیوگرام جدایه ها الف - دیسک دیفیوژن ب - ماکرودایلوژن براث

غلظت آنتی بیوتیک از راست به چپ بترتیب ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۵، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر

### MIC باکتری های اسیدلاکتیک

نتایج MIC سه باکتری اسیدلاکتیک حساس منتخب جدا شده از واژن بر اساس استاندارد CLSI در جدول ۶ آورده شده است.

همانطور که در تصویر الف مشاهده میشود تشکیل هاله با قطر بیش از ۱۴ میلی متر حاکی از حساسیت باکتری به آنتی بیوتیک مورد نظر میباشد. در تصویر ب سه لوله از سمت راست کدر و لوله چهارم شفاف است لذا MIC به میزان ۱۶ میکرو گرم بر میلی لیتر برای آنتی بیوتیک وانکو مایسین میباشد که حاکی از مقاومت است

جدول ۶ - MIC سه باکتری اسیدلاکتیک حساس منتخب جدا شده از واژن بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر

| جدایه/نوع<br>آنتی<br>بیوتیک | C | TE | V  | K | CC   | E    | LZ | IPM  | CP | AM | GM | S |
|-----------------------------|---|----|----|---|------|------|----|------|----|----|----|---|
| E1                          | 4 | 4  | ۳۲ | 2 | 0.25 | 0.25 | 2  | 0.25 | ۱۶ | 2  | 4  | 4 |
| E2                          | 8 | 4  | ۶۴ | 8 | 0.5  | 0.5  | 4  | 0.5  | ۳۲ | ۴  | 8  | 8 |
| E3                          | 8 | 4  | ۳۲ | 4 | 0.5  | 0.5  | 4  | 0.5  | ۳۲ | 4  | 8  | 4 |

توضیح: (S): استرپتومایسین، GM: جنتامایسین، AM: آمپی سیلین، CP: سیپروفلوکساسین، IPM: ایمنیم، LZ: لینزولید، E:

اریترومایسین، CC: کلیندامایسین، K: کانامایسین، V: ونکومایسین، TE: تتراسایکلین، C: کلرامفنیکل

شد. مقاومت به پنی سیلین در جدایه ۹ یافت شد. مقاومت به کلرامفنیکل در جدایه ۶ مشاهده شد.

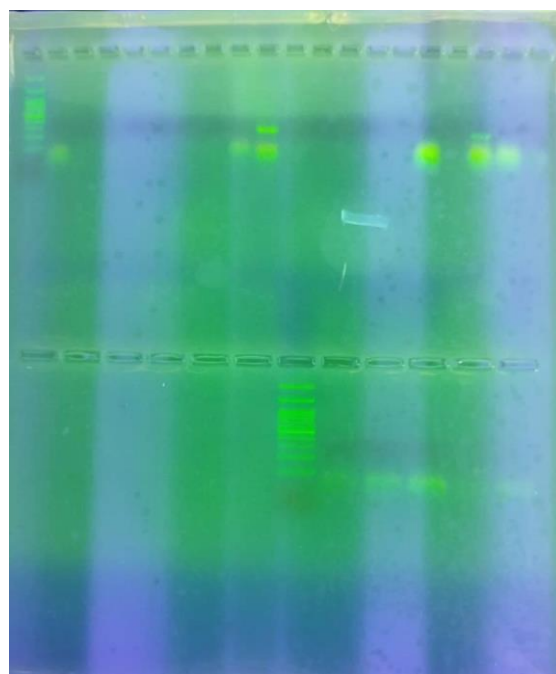
مقاومت به اریترومایسین در تست دیسک دیفیوژن در تمام جدایه ها بجز جدایه ۱۱ مثبت بود و آزمون ماکرودایلوژن

مقاومت به ونکومایسین بیشترین فراوانی را داشت و در تمام ۱۲ ایزوله (۱۰۰ درصد) مشاهده شد. مقاومت به آمپی-سیلین جدایه ۵ مشاهده شد. تمامی جدایه ها به کانامایسین حساس بودند. مقاومت به تری متوپریم در جدایه ۷ مشاهده

بیوتیک وانکومایسین و سیپروفلوکساسین. به آنتی بیوتیک دیگری مقاومت نشان ندادند و لذا جدایه E1 در کنار نتایج سایر آزمایشات به عنوان کاندید پروبیوتیک جهت شناسایی مولکولی انتخاب شد.

### بررسی ژنوتیپی مقاومت دارویی جدایه ها

شکل ۶ نمونه ای از نتایج غربالگری مولکولی مقاومت را نشان میدهد.



شکل ۶- نمونه ای از نتایج حضور ژنهای مقاومت در جدایه ها

تصویر بالا چاهک ۱ کنترل منفی چاهک ۳ ژن مقاومت به سیپروفلوکساسین ژن *gyr A* با سایز ۲۸۶ BP سایر چاهکها جدایه های فاقد ژنهای مقاومت، تصویر پایین چاهک ۱ کنترل منفی چاهک ۳ ژن مقاومت به آمپی سیلین ژن *mec A* با سایز ۵۳۳ BP سایر چاهکها جدایه های فاقد ژنهای مقاومت

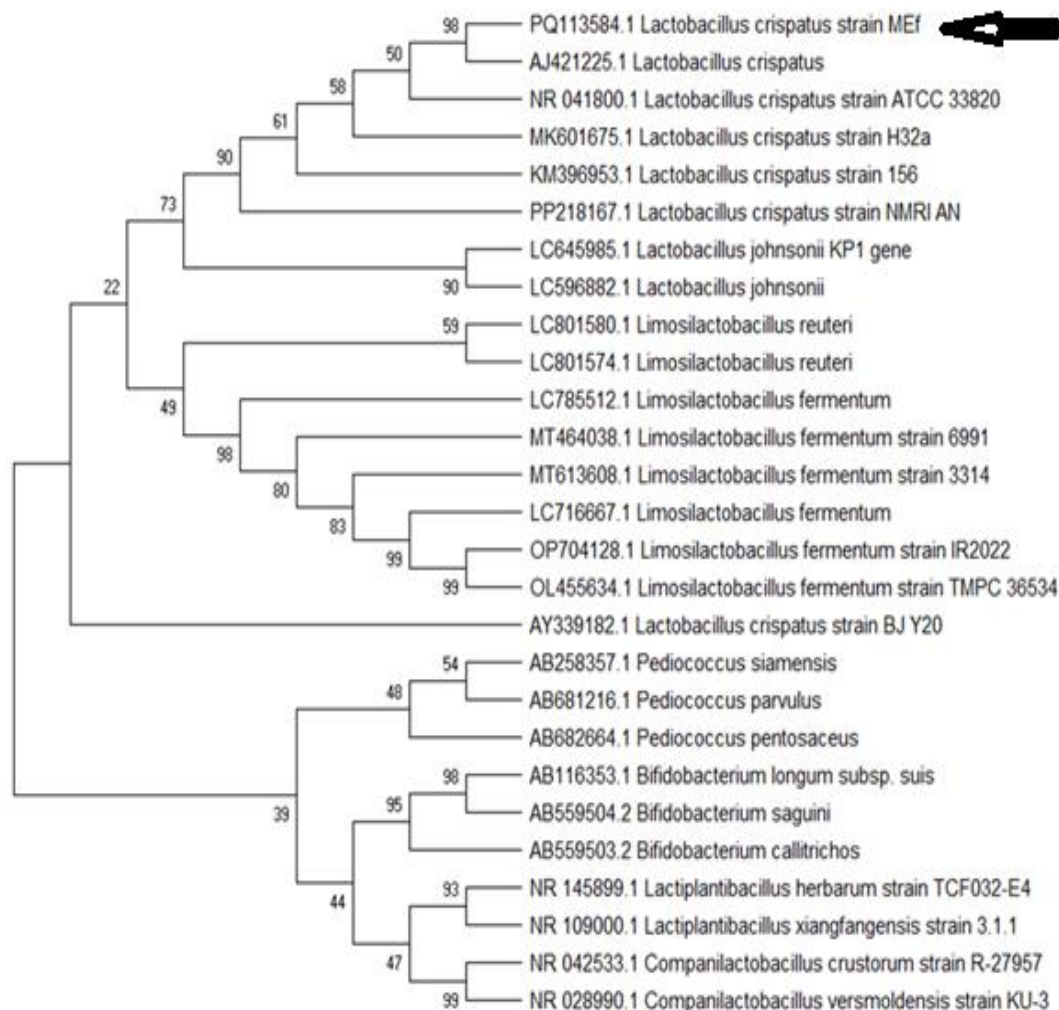
فیلورنی با متد Maximum Likelihood و بوت استرپ ۱۰۰۰ و با نرم افزار MEGA ترسیم شد (شکل ۷). از گونه *Pediococcus acidilactici* به عنوان اوت گروپ استفاده گردید.

براث و غربالگری مولکولی نیز تنها مقاومت یک جدایه را تایید کرد.

مقاومت به سیپروفلوکساسین در مورد ۱۱ جدایه تایید شد. مقاومت به جنتامایسین در ۲ جدایه و مقاومت به تتراسایکلین در ۳ جدایه مشاهده شد. مقاومت به اریترومایسین در ۱ مورد مشاهده شد. مقاومت به استرپتومایسین در ۲ مورد مشاهده شد. در لاکتوباسیلوس های جدا شده ۱ مورد به ریفامپین مقاومت داشت.

جدایه E1 به همه آنتی بیوتیکها بجز وانکومایسین حساس بود و دو جدایه E2, E3 نیز به عنوان جدایه های برتر به جز دو آنتی

شناسایی مولکولی: جهت شناسایی مولکولی ایزوله ها، محصول PCR برای توالی یابی ارسال شد و از میان سه ایزوله، بهترین جدایه توالی یابی گردید. توالی حاصل در پایگاه داده NCBI بلاست شد که نتایج آن نشان دهنده ی تشابه ۹۳ درصدی توالی به *Lactobacillus cryspatus* بود. درخت



شکل ۷ درخت فیلولونی با متد Maximum Likelihood و بوت استرپ ۱۰۰۰ (ایزوله مورد مطالعه با رنگ سبز و با نام Se.3 نشان داده شده است).

هستند. این باکتری ها از طریق تولید انواع ترکیبات ضد میکروبی (مانند پراکسید هیدروژن و اسید لاکتیک و ...) و رقابت برای اتصال پاتوژن ها به محل های اتصال روی بافت پوششی واژن از بروز بیماری های عفونی جلوگیری میکنند و مانع از ایجاد عفونت دستگاه ادراری، واژینوز باکتریایی و کاندیدیاز واژن میشوند (۱۴-۱۷).

هدف اصلی این تحقیق بررسی خواص پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس های جدا شده از واژن زنان سالم و ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها به منظور انتخاب بهترین جدایه جهت کاندید پروبیوتیک بود.

## بحث

گونه های جنس لاکتوباسیلوس در میان میکروبیوتای طبیعی واژن جمعیت غالب محسوب می شوند که حضور آنها در این اکوسیستم از طریق همیاری با سایر میکروارگانیسم های ساکن واژن اثرات مثبت و مفید بر سلامتی میزبان دارد (۱۳) با تعیین ترادف ژنومی مشخص شده است که بیش از ۲۵۰ گونه باکتری در واژن زنان سالم در سنین باروری وجود دارد که در میان آنها رایج ترین گونه ها، گونه های جنس لاکتوباسیلوس شامل کریسپاتوس، اینریس، جانسونی و ...

مدفوع) نسبت به این آنتی بیوتیک ها حد واسط یا مقاوم گزارش شده اند (۲۳)

لذا منبع جدا سازی در بروز یا عدم بروز مقاومت تاثیر گذار است و اساساً جدایه های مواد غذایی به آنتی بیوتیک های خانواده کواینولون ها مانند سیپروفلوکساسین حساس تر هستند. و دلیل اصلی این امر آن است که سویه هایی که از اکوسیستم های مختلف بدن مانند دهان یا واژن جدا می شوند به دلیل مواجهه با آنتی بیوتیک ها به تدریج مقاومت کسب می کنند (۲۴)

نتایج حاکی از مقاومت بالا و صد در صدی به آنتی بیوتیک وانکو مایسین بود. مقاومت به آنتی بیوتیک های گلیکو پپتیدی مانند وانکو مایسین و تایکوپلانتین توسط وانگ و همکاران نیز گزارش شده است (۱۲). اساساً لاکتوباسیل ها مقاومت طبیعی بسیار بالایی به آنتی بیوتیک های گلیکو پپتیدی از خود نشان می دهند که ناشی از دخالت ژن های کروموزومی سنتز و سازماندهی دیواره طی مسیرهای متفاوت آنزیمی است و در دیواره طبیعی در مقایسه با باکتری های حساس است (۲۵)

مقاومت نسبت به آمپی سیلین نیز در سه باکتری از جدایه های مورد مطالعه دیده شد (۷۵٪). مطالعات مشابهی توسط سایر محققان برای گونه های برویس، پلانتاروم و پاراکازی گزارش شده است. این مقاومت می تواند منشأ غذایی داشته باشد. غالباً لاکتوباسیلوس های حساس به آنتی بیوتیک های بتالاکتام نسبت به سفالوسپورین ها مقاومت کمتری نشان می دهند (۲۶)

دلیل فیزیولوژیک مقاومت به سفالوسپورین ها هنوز ناشناخته است اما می تواند ناشی از نفوذ ناپذیری دیواره یا نقش یک اتولیزین متصل به دیواره مانند آنچه در *lactocaseibacillus plantarum* و *casei* و *lactiplantibacillus* دیده میشود باشد (۲۷، ۲۸)

تمامی باکتری های مورد مطالعه در این تحقیق به ایمنی پنم حساس بودند که این نسخه با نتایج برخی محققان دیگر مغایرت نشان می دهد (۲۹) و با برخی مطابقت دارد که

لاکتوباسیل ها گروهی متنوع از باکتری ها هستند که بسیاری از گونه های آنها از خواص پروبیوتیکی برخوردارند. مقاومت دارویی یکی از استراتژی های بقای میکروارگانیسم ها است. دو نوع مقاومت ذاتی و اکتسابی در میکروارگانیسم ها وجود دارد نوع ذاتی قابل انتقال نبوده و کاملاً مفید تلقی می گردد زیرا هنگام استفاده همزمان پروبیوتیک ها با آنتی بیوتیک ها آسیبی به باکتری پروبیوتیک (مثلاً هنگام درمان زخم های معده ناشی از اچ پیلوری) وارد نمی شود. اما مقاومت ثانویه اکتسابی بوده و در درون بدن موجود امکان انتقال ژن های مقاومت از باکتری پروبیوتیک به باکتری های پاتوژن وجود دارد (۱۸-۲۰)

بررسی های فنوتیپی تعلق تمامی جدایه های مورد مطالعه را به اعضا جنس لاکتوباسیلوس تایید نمود. همچنین از مونهای مقاومت به اسید و نمکهای صفراوی نشانه تحمل بالای باکتری های مورد مطالعه در مقایسه با شاهد استاندارد بود. عدم ایجاد همولیز در محیط آگار خوندار ایمنی باکتری های مورد مطالعه را تایید کرد. تمامی جدایه ها اثرات مهاری قوی علیه پاتوژنهای رایج از خود نشان دادند. بعلاوه آزمایشات اصل در کشت سلولی موید اتصال حدود ۷۰ درصد توسط جدایه برتر بود. تمامی این نتایج حاکی از توانایی پروبیوتیکی جدایه های این تحقیق بود.

بجز یک جدایه سایر جدایه ها به آنتی بیوتیک های دخیل در مهار سنتز اسید نوکلئیک (سیپروفلوکساسین) مقاومت فنوتیپی نشان دادند (۹۱/۶۶ درصد). مقاومت بالای ۱۰۰ درصدی نسبت به نالیدیکسیک اسید و نورفلوکسازین در گزارشات محققان آمده است. شارما و همکاران نیز مقاومت بالا به کواینولون ها را گزارش کرده اند (۸۳٪ نسبت به نالیدیکسیک اسید) مقاومت بالا به این خانواده آنتی بیوتیکی جزو مکانیسم های مقاومت ذاتی محسوب می شود (۲۱، ۲۲)

اساساً پروفایل حساسیت دارویی بر اساس منبع ایزوله هم بسیار متفاوت است (۲۳) در تحقیقات مشابه، تمامی گونه های مشابه جدا شده از مواد غذایی تخمیری به کواینولون ها حساس اما جدایه های انسانی (جدا شده از شیر مادر یا

فقدان وجود سیستم انتقال الکترون وابسته به سیتوکروم در آنهاست (۳۴)

از آنجا که تتراسایکلین یکی از رایج‌ترین آنتی بیوتیک‌های کاربردی در پرورش دام است لذا انتظار بروز مقاومت نسبت به آن نیز بالاست (۳۵) اما باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق مانند تحقیقات مشابه دیگر (۲۳, ۲۹) به تتراسایکلین حساسیت بالا نشان دادند. (۷۵٪). به نظر می‌رسد که میزان بروز این مقاومت در جدایه‌های منابع غذایی و شیر کمتر و در مدفوع بیشتر است که به نوبه خود اهمیت منبع جداسازی سویه را مطرح می‌کند (۳۵)

به نظر می‌رسد که مقاومت به مهار کننده‌های سنتز اسید نوکلئیک مانند تری متوپریم و سولفونامیدها مانند کوتریموکسازول نیز در بین لاکتوباسیل‌ها ذاتی باشد (۳۶) زیرا این آنتی بیوتیک‌ها آنزیم دی هیدرو فولات ردوکتازو دی هیدرو پتروئید اسید سنتتاز را مهار می‌کنند و از آنجا که لاکتوباسیل‌ها فاقد مسیر سنتز اسید نوکلئیک هستند لذا به این آنتی بیوتیک‌ها مقاومت ذاتی نشان می‌دهند (۳۷, ۳۸)

و به نظر می‌رسد باکتری‌ها از طریق دستیابی به راه‌های فرعی و جایگزین سنتز اسید فولیک یا تولید بیش از اندازه آنزیم دی هیدرو فولات ردوکتاز مقاوم به آنتی بیوتیک یا ایجاد تغییر در نفوذ پذیری دیواره نسبت به آنتی بیوتیک‌های فوق باشد.

در بین سه جدایه مورد مطالعه جدایه E1 به عنوان بهترین جدایه برخوردار از خواص پروبیوتیکی بدون هیچگونه مقاومت اکتسابی انتخاب و شناسایی مولکولی حاکی از تعلق آن به گونه کرایسپاتوس بود. با توجه به خواص ارزشمند پروبیوتیکی آن آن پس از انجام آزمایشات تاییدی درون موجودی به عنوان از کاندیدی جهت کاربرد مکمل درمان پروبیوتیکی مانند شیفاهای واژینال ترکیبی توصیه می‌گردد..

حساسیت به مروپنم را نشان می‌دهد. (۳۰) شارما و گوپال نیز حساسیت بسیار بالای جدایه‌های خود را به مروپنم گزارش نمودند (۳۰) و به نظر می‌رسد که مقاومت به این گروه آنتی بیوتیک‌ها مختص گونه است.

گرچه در این تحقیق مقاومت قابل توجهی به ماکرولیدها مشاهده نشد و تنها یک نمونه مقاوم دیده شد اما دلاگو و همکاران این مقاومت بالا را در جدایه‌های خود گزارش کرده‌اند.

به نظر Delgado و wind این مقاومت‌ها می‌تواند مربوط به تفاوت‌های فردی میان جدایه‌ها باشد. اما نوع منبع نیز (منابع انسانی یا غذا) اثر قابل توجهی در بروز مقاومت دارد. در مطالعه حاضر اکثریت جدایه‌ها به آنتی بیوتیک‌های ماکرولیدی حساسیت نشان دادند که این یافته‌ها با نتایج Daniash و wind همخوانی داشت. (۲۳)

Delgado و همکاران نتایج مشابهی در خصوص حساسیت جدایه‌های خود به اریترومايسين ارایه نمودند که بنظر میرسد که نتایج حاصله تا حد زیادی مختص سویه می‌باشد. (۳۱) آنان دریافتند ارتباط معناداری میان منبع جداسازی باکتری (منابع غذایی یا انسانی) با مقاومت یافت نگردید.

جدایه‌های مورد مطالعه بیش از پنجاه درصد نسبت به کانا مایسین (۵۸.۳۳٪). مقاومت نشان دادند.

در تایید گزارش بسیاری از محققان دیگر اثر مهاري قابل توجهی توسط آمینو گلیکوزیدها خصوصاً کانامایسین و توبرامایسین مشاهده نگردید. معمولاً جنتامایسین اثر مهاري بیشتری نسبت به سایر آمینو گلیکوزیدها از خود نشان می‌دهد با اینحال دو جدایه هم به جنتامایسین مقاومت نشان دادند.

شارما و همکاران نیز اثراتی مهاري از جنتامایسین علیه برخی جدایه‌ها گزارش کرده‌اند (۲۹) اساساً بسیاری از لاکتوباسیل‌ها به آمینو گلیکوزیدها مقاوم هستند (۳۲, ۳۳) که غالباً ذاتی بوده و به دلیل ویژگی‌های سطحی باکتریها و نفوذ ناچیز دارو و نیز



## منابع

1. Das Purkayastha S, Bhattacharya MK, Prasad HK, Upadhyaya H, Lala SD, Pal K, et al. Contrasting diversity of vaginal lactobacilli among the females of Northeast India. *BMC Microbiology*. 2019;19(1):198.
2. Mastromarino P, Hemalatha R, Barbonetti A, Cinque B, Cifone MG, Tammara F, et al. Biological control of vaginosis to improve reproductive health. *Indian Journal of Medical Research*. 2014;140(Suppl 1):S91-S7.
3. Husni RN, Gordon SM, Washington JA, Longworth DL. Lactobacillus Bacteremia and Endocarditis: Review of 45 Cases. *Clinical Infectious Diseases*. 1997;25(5):1048-55.
4. Antony SJ, Stratton CW, Dummer JS. Lactobacillus bacteremia: description of the clinical course in adult patients without endocarditis. *Clinical infectious diseases*. 1996;23(4):773-8.
5. on Additives EP, Rychen G, Aquilina G, Azimonti G, Bampidis V, de Lourdes Bastos M, et al. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *Efsa Journal*. 2018;16(3):e05206.
6. Flórez AB, Campedelli I, Delgado S, Alegria A, Salvetti E, Felis GE, et al. Antibiotic susceptibility profiles of dairy *Leuconostoc*, analysis of the genetic basis of atypical resistances and transfer of genes in vitro and in a food matrix. *PLoS One*. 2016;11(1):e0145203.
7. Hütt P, Lapp E, Štšepetova J, Smidt I, Taelma H, Borovkova N, et al. Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. *Microbial ecology in health and disease*. 2016;27(1):30484.
8. Smidt I, Kiiker R, Oopkaup H, Lapp E, Rööp T, Truusalu K, et al. Comparison of detection methods for vaginal lactobacilli. *Beneficial microbes*. 2015;6(5):747-52.
9. Pino A, Bartolo E, Caggia C, Cianci A, Randazzo CL. Detection of vaginal lactobacilli as probiotic candidates. *Scientific Reports*. 2019;9(1):3355.
10. Happel A-U, Kullin B, Gamielien H, Wentzel N, Zauchenberger CZ, Jaspan HB, et al. Exploring potential of vaginal *Lactobacillus* isolates from South African women for enhancing treatment for bacterial vaginosis. *PLoS Pathogens*. 2020;16(6):e1008559.
11. Cai H, Rodriguez BT, Zhang W, Broadbent JR, Steele JL. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology*. 2007;153(8):2655-65.
12. Wang Y, Dong J, Wang J, Chi W, Zhou W, Tian Q, et al. Assessing the drug resistance profiles of oral probiotic lozenges. *Journal of Oral Microbiology*. 2022;14(1):2019992.
13. Di Cerbo A, Palmieri B, Aponte M, Morales-Medina JC, Iannitti T. Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. *Journal of clinical pathology*. 2016;69(3):187-203.
14. Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *The American journal of the medical sciences*. 2012;343(1):2-9.
15. Gootenberg DB, Mitchell CM, Kwon DS. Cervicovaginal microbiota and reproductive health: the virtue of simplicity. *Cell host & microbe*. 2018;23(2):159-68.
16. Caruso S, Cianci S, Malandrino C, Cicero C, Lo Presti L, Cianci A. Quality of sexual life of women using the contraceptive vaginal ring in extended cycles: preliminary report. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care*. 2014;19(4):307-14.
17. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(supplement\_1):4680-7.
18. Eslami M, Yousefi B, Kokhaei P, Moghadas AJ, Moghadam BS, Arabkari V, et al. Are probiotics useful for therapy of *Helicobacter pylori* diseases? Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 2019;64:99-108.
19. Rokon-Uz-Zaman M, Bushra A, Pospo TA, Runa MA, Tasnuva S, Parvin MS, et al. Detection of antimicrobial resistance genes in *Lactobacillus* spp. from poultry probiotic products and their horizontal transfer among *Escherichia coli*. *Veterinary and Animal Science*. 2023;20:100292.
20. van Reenen CA, Dicks LM. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Archives of microbiology*. 2011;193(3):157-68.
21. Li S, Li Z, Wei W, Ma C, Song X, Li S, et al. Association of mutation patterns in *GyrA* and *ParC* genes with quinolone resistance levels in lactic acid bacteria. *The Journal of Antibiotics*. 2015;68(2):81-7.
22. Anisimova EA, Yarullina DR. Antibiotic resistance of *Lactobacillus* strains. *Current microbiology*. 2019;76(12):1407-16.

23. 23. Danielsen M, Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International journal of food microbiology*. 2003;82(1):1-11.
24. 24. Duche RT, Singh A, Wandhare AG, Sangwan V, Sihag MK, Nwagu TNT, et al. Antibiotic resistance in potential probiotic lactic acid bacteria of fermented foods and human origin from Nigeria. *BMC Microbiology*. 2023;23(1):142.
25. 25. Zhang S, Oh J-H, Alexander LM, Özçam M, van Pijkeren J-P. d-Alanyl-d-alanine ligase as a broad-host-range counterselection marker in vancomycin-resistant lactic acid bacteria. *Journal of bacteriology*. 2018;200(13):10.1128/jb. 00607-17.
26. 26. Selvin J, Maity D, Sajayan A, Kiran GS. Revealing antibiotic resistance in therapeutic and dietary probiotic supplements. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2020;22:202-5.
27. 27. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *Journal of food protection*. 1998;61(12):1636-43.
28. 28. Kim KS, Morrison J, Bayer A. Deficient autolytic enzyme activity in antibiotic-tolerant lactobacilli. *Infection and immunity*. 1982;36(2):582-5.
29. 29. Sharma C, Gulati S, Thakur N, Singh BP, Gupta S, Kaur S, et al. Antibiotic sensitivity pattern of indigenous lactobacilli isolated from curd and human milk samples. *3 Biotech*. 2017;7:1-14.
30. 30. Sharma J, Goyal A. A study on the drug resistance of probiotic strains isolated from commercial probiotic products available in the local market of Agra. *Eur J Exp Biol*. 2015;5:33-6.
31. 31. Drago L, Rodighiero V, Mattina R, Toscano M, De Vecchi E. In vitro selection of antibiotic resistance in the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103. *Journal of Chemotherapy*. 2011;23(4):211-5.
32. 32. Zhou J, Pillidge C, Gopal P, Gill H. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International journal of food microbiology*. 2005;98(2):211-7.
33. 33. Dec M, Nowaczek A, Stępień-Pyśniak D, Wawrzykowski J, Urban-Chmiel R. Identification and antibiotic susceptibility of lactobacilli isolated from turkeys. *BMC microbiology*. 2018;18:1-14.
34. 34. Dušková M, Morávková M, Mrázek J, Florianová M, Vorlová L, Karpišková R. Assessment of antibiotic resistance in starter and non-starter lactobacilli of food origin. *Acta Veterinaria Brno*. 2021;89(4):401-11.
35. 35. Fontana C, Patrone V, Lopez CM, Morelli L, Rebecchi A. Incidence of tetracycline and erythromycin resistance in meat-associated bacteria: Impact of different livestock management strategies. *Microorganisms*. 2021;9(10):2111.
36. 36. Nawaz M, Wang J, Zhou A, Ma C, Wu X, Moore JE, et al. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products. *Current microbiology*. 2011;62:1081-9.
37. 37. Ammor MS, Flórez AB, Mayo B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food microbiology*. 2007;24(6):559-70.
38. 38. Katla A-K, Kruse H, Johnsen G, Herikstad H. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *International journal of food microbiology*. 2001;67(1-2):147-52.
39. 39. Jafari-Nasab T, Khaleghi M, Farsinejad A, Khorrami S. Probiotic potential and anticancer properties of *Pediococcus* sp. isolated from traditional dairy products. *Biotechnol Rep*. 2021;29:e00593.
40. 40 Wong A, Matijasic BB, Ibana JA, Lim RLH. Editorial: Antimicrobial Resistance along the Food Chain: are we what we eat. *Front Microbiol*. 2022;13:881882.
41. 41 EFSA. Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA J*. 2018;16:e05206.