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[1], **Masoumeh Anvari**[1*], Meysam Hasannejad Bibalan [2]

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 *Invivo* 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@iau.ac.ir

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

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 phonotypical 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 16SrRNA 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 β-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

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

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 Invivo tests.

.

.

.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

جداسازی وشناسایی گونه های جنس لاکتوباسیلوس جدا شده از واژن زنان سالم وبررسی فنوتیپی وژنوتیپی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها

آزاده دخت افتخاری فومنی [۱] ، **معصومه انوری***[۱]، میثم حسن نژاد بی بالان [۲]

۱) گروه زیست‌شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

۲) گروه میکروب‌شناسی، 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 پروبیوتیک‌ها، جداسازی و شناسایی سویه‌های جدید بدون برخورداری از مقاومت های درویی با پتانسیل پروبیوتیکی می‌باشد لذا هدف تحقیق حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های متعلق به جنس لاکتو باسیلوس وارزیابی مقاومت دارویی آن ها از زنان سالم مراجعه کننده به کلینیک درمان ناباروری مهررشت بود. 50 نمونه تهیه و پس از کشت نمونه‌ها روی محیط کشت MRS آگار، شناسایی مورفولوژیک و بیوشمیایی جدایه ها انجام گردید. تست‌های تخمیر قند، همولیزوکاتالاز، تحمل اسید و مقاومت در برابر نمک‌های صفراوی انجام شد. مقاومت به آنتی بیوتیک‌های رایج از نظر فنوتیپی با روش دیسک دیفیوژن وتعیین MIC وحضور ژنهای مقاومت در لاکتوباسیل های جداسازی شده بررسی شد. در نهایت حساسترین سویه ها ی برخوردار از خواص پروبیوتیکی با استفاده از واکنش PCR ژن *16SrRNA*، شناسایی مولکولی شدند. ۱۲ ایزوله که رشد بهتری داشتند و در رنگ‌آمیزی گرم به صورت باسیل‌های گرم مثبت مشاهده شدند.شناسایی فنوتیپی جنس لاکتوباسیلوس را تایید نمود. تست تخمیر قندها برای همه ایزوله‌ها مثبت و تست همولیز برای همه آن‌ها منفی بود. ایزوله‌ها همچنین قادر به رشد در محیط اسیدی و محیط حاوی نمک‌های صفراوی بودند. نتایج نشان داد برترین جدایه در روشهای فنوتیپی فاقد مقاومت اکتسابی ودر ارزیابی ژنوتیپی فاقد ژنهای آن بود . حساسترین ایزوله‌ی جداسازی شده به انتی بیوتیکهای رایج *لاکتوباسیلوس کرایسپاتوس*بود. با انجام آزمایشات بیشتر در رابطه با خواص پروبیوتیکی این میکروارگانیسم و اثرات سلامتی‌بخش آن بصورت درون موجودی می‌توان 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@iau.ac.ir

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

مقدمه

واژن پستانداران میزبان تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌های مختلف است که به عنوان میکروبیوتا شناخته می‌شوند و در چندین عمل مفید در میزبان از جمله جلوگیری از کلونیزاسیون پاتوژن‌ها، بلوغ و تنظیم سیستم ایمنی و تعدیل انتشار هورمون‌هاشرکت می کنند(۱)

فلور غالب واژن شامل گونه های جنس لاکتوباسیلوس مانند *L.crispatus* ,*L.gasseri*,*L.jensenii*,*L.iners*می باشد.حذف اعضای این جنس از واژن منجر به واژینوز باکتریال(BV)و عفونت دستگاه ادراری(UTIs9) و بیماری های التهابی لگن می شود((۲)

غالبا 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 غالبا منجر به ایجاد سویه های مقاوم اکتسابی در فلور واژن می گردد که به نوبه خود می تواند تهدیدی برای سلامتی باشد.(۳, ۴)

گزارش‌های تحقیقاتی اخیر نشان می‌دهد که سویه‌های LAB با منشأ انسانی (شیر، نمونه‌های مدفوع نوزادیا واژن) ممکن است بقای بهتری در برابر عوامل استرس‌زای معده و روده داشته باشند؛در نتیجه، آنها را به کاندیداهای پروبیوتیک بهتری تبدیل می کنند (۳۹).

شواهد قابل توجهی فوائد پروبیوتیک‌ها را ثابت میکند که علاقه زیادی به کاربرد آنها در تغذیه و سلامت ایجاد کرده است . باکتریهای اسید لاکتیک ها اغلب برای فواید خاص سلامتی به مواد غذایی اضافه می‌شوند. افزایش مقاومت ضدمیکروبی (AMR) تهدیدی اساسی برای سلامت عمومی و اقتصاد است. امروزه آنتی‌بیوتیک‌ها به دلیل افزایش تعداد سویه‌های بیماری‌زای مقاوم به چند دارو (MDR) کمتر مؤثر واقع می‌شوند. در حالی که اکنون میزان مرگ و میر سالانه جهانی ناشی از عفونتهای مقاوم به دارو به بیش از ۷۰۰۰۰۰ تا ۱ میلیون نفررسیده است پیش‌بینی می‌شوداین میزان تا سال ۲۰۵۰ به ۱۰ میلیون نفر برسد [۲] لذا مقاومت دارویی توجه علمی و پزشکی قابل توجهی را به خود جلب کرده‌اند، شواهد نشان می‌دهد که تبادل ژن مداوم بین سویه‌های بیماری‌زا و گونه‌های به ظاهر بی‌ضرر یا حتی مفید هم‌زیست، در حال افزایش است. پیامد این است که موارد اخیر اکنون به عنوان "مخازن" ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی (ARG) در نظر گرفته می‌شوند که از طریق مسیرهای متعدد، ممکن است تکثیر شوند و در نهایت با عوامل بیماری‌زا یا پاتوژن‌ها به اشتراک گذاشته شوند (۴۰)

در سال‌های اخیر، گزارش‌هایی مبنی بر وجود سویه‌های LAB با فنوتیپ‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی تکی یا چندگانه منتشر شده است که نگرانی‌هایی را در مورد انتقال این ژن‌ها از طریق مکانیسم‌های ژنتیکی به پاتوژن‌های انسانی و حیوانی ایجاد کرده است. در حال حاضر، گزارش‌هایی مبنی بر انتقال ژن‌های کدکننده 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 سویه‌های باکتریایی حامل عناصر ژنتیکی متحرک با ARGها از خوراک، تخمیر مواد غذایی و استفاده از پروبیوتیک‌ها شده است در نتیجه، داشتن فنوتیپ‌های مقاومت توسط LAB، محل ژن‌های مقاوم و قابلیت انتقال این ویژگی‌ها به موضوعات داغی برای تحقیقات فشرده تبدیل شده است (۴۱).

بر اساس استانداردهای بین المللی مانند استاندارد EFSA FDA, تنها معیار ایمن بودن این باکتریها 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 لاکتوباسیل‌ها از منابع مختلف به منظور استفاده از آن‌ها به عنوان پروبیوتیک ادامه دارد

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

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 نمونه های 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 ودر تمام فصول سال 1403 جمع‌آوری شده و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش ذخیره گردید. تمامی نمونه ها بلافاصله پس از جمع آوری 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

تعدادخطا =d

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، رنگ‌آمیزی گرم تهیه شد و برای بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک زیر میکروسکوپ بررسی شد. همچنین تست‌های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اوره‌آز، سیترات، MR/VP و اندول به 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 CCAGTACCAAGGCATTCACC 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

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

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

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

تست تحمل نمک‌های صفراوی: 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 محیط‌های 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 سلولهای اپی تلیال

جدایه هایی که در کارآزمایی های قبلی بهترین عملکرد را داشتند برای آخرین مرحله کار، که شامل ارزیابی توانایی چسبندگی آنها به سلولهای اپیتلیال روده انسان بود، انتخاب شدند. ابتدا، رده های سلولی %سرم جنین گاو۱۰)، غنی شده با1640 (1 RPMI ـSigma, St. Louis, MO, USAدر محیط Caco_2)،Sigma (و 1%پنی سیلیناستریتومایسین در دمای 37درجه سانتیگراد در 5%اتمسفر CO2با رطوبت 95%کشت و رشد داده شدند. سلولهای Caco_ 2بصورت یک تک لایه روی صفحات کشت سلولی Sigma( )با 24ساعت انکوباسیون در دمای 37درجه سانتی گراد ثابت شدند و صفحات دو بار با فسفات بافر شسته شدند. سپس، تقریباً 108سلول در هر میلیلیتر از سوسپانسیون باکتریهای اسید لاکتیک (۱۰ میلیلیتر) بر روی هر پلیت اضافه و پس از 2ساعت انکوباسیون پلیتها در دمای 37درجه سانتی گراد، سلولها دو بار با فسفات بافر شسته شدند تا باکتریهای نچسبیده حذف شوند. سپس سلولهای Caco_2 با محلول تریپسین EDTA۰۵/۰)درصد) لیز شده و در 10میلیلیتر محلول فسفات بافر معلق شدند. در نهایت، محلول بدست آمده (حاوی باکتریهای چسبیده) بهصورت سریال رقیق شده و روی MRSآگار Merck, Darmstadt, Germanyکشت داده شدند و تعداد باکتریهای چسبیده با استفاده از معادله زیر گزارش شد.(۱۰)

(کل باکتری های اضافه شده / باکتری های چسبیده) × ۱۰۰ = 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 اشریشیا کلی (ATCC 25922)، سودوموناس ائروزینوزا (ATCC۲۷۸۵۳)، اسینتو باکتر بومانی (ATCC1605) واستافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) تهیه شده از مرکز کلکسیون میکروبی سازمان پژوهشهای علمی وصنعتی 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) برحسب میلی متر اندازه گیری شد .(۱۴)

بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت دارویی

مایع تلقیح به‌صورت مستقیم از کلنی‌های لاکتوباسیلوس شناسایی‌شده با استفاده از سرم فیزیولوژی تهیه شد. کلنی‌هایی که حدود ۱۸ تا ۲۴ ساعت از رشد آن‌ها روی محیط کشت نوترینت‌آگار در شرایط میکروائروفیلیک گذشته را به سرم فیزیولوژی استریل منتقل کرده و کدورت محلول تهیه‌شده به کمک استاندارد نیم‌مک‌فارلند که در دستگاه اسپکتروفوتومتر با جذب بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ در طول‌موج nm ۶۲۵ سنجیده شد.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

پس از ۱۵ دقیقه تنظیم کدورت با استاندارد نیم مک‌فارلند با استفاده از یک سواپ استریل سطح محیط کشت مولر-هینتون‌آگار تلقیح شد سپس دیسک‌های مربوط به آنتی-بیوتیک‌های ونکومایسین ۳۰µg، کانامایسین۳۰µg، اریترومایسین ۱۵µg، سیپروفلوکساسین۵µg، پنی-سیلین۱۰µg، نالیدیکسیک‌اسید ۳۰µg، تتراسایکلین ۳۰µg، کلرامفنیکل۳۰µg، جنتامایسین۱۰µg، استرپتومایسین ۳۰µg و آمپی‌سیلین ۱۰ µg، تری‌متوپریم ۲۵ µg روی هر پلیت قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله‌های تشکیل‌شده سه بار برای هر یک از دیسک‌ها توسط خط‌کش اندازه‌گیری شده و نتایج طبق جدول (۱) وبر اساس استاندارد CLSIمورد سنجش قرار گرفت.(۱۱)

جدول ۱ تفسیر داده های تست آنتی بیوگرام

Disk diffusion method	Zone diameter (mm)
Susceptible	>20
Intermediate	15-19
Resistant	≤14

تعیین MIC بر اساس روش ماکرودیلوشن 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 ۱۲۱ 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 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 ۳۷.۵ 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.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

جدول2 لیست پرایمرهای مربوط به ژن های مقاومت به آنتی بیوتیک

آنتی بیوتیک	نام ژن	پرایمر مربوط به ژن مقاومت به آنتی بیوتیک	اندازه امپلیکون bp	دمای annealing درجه سانتی گراد
تتراسایکلین	*tetM*	5'GTG GAC AAA GGT ACA ACG AG3' 5'CGG TAA AGT TCG TCA CAC AC3'	۴۰۶	۶۰
تتراسایکلین	*tetW*	5'GAG AGC CTG CTA TAT GCC AGC3' 5'GGG CGT ATC CAC AAT GTT AAC3'	۱۶۸	۶۰
تتراسایکلین	*tetL*	5'TGG TGG AAT GAT AGC CCA TT3' 5'CAG GAA TGA CAG CAC GCT AA3'	۲۲۹	۶۰
تتراسایکلین	*tetK*	5'GAT CAA TTG TAG CTT TAG GTG AAG G3' 5'TTT TGT TGA TTT ACC AGG TAC CAT T3'	۱۵۵	۶۰
تتراسایکلین	*tetO*	5'AAC TTA GGC ATT CTG GCT CAC3' 5'TCC CAC TGT TCC ATA TCG TCA3'	۵۱۵	۶۴
اریترومایسین	*ermA*	5'CCC GAA AAA TAC GCA AAA TTT CAT3' 5'CCC TGT TTA CCC ATT TAT AAA CG3'	۵۹۰	۶۰
اریترومایسین	*ermB*	5'TGG TAT TCC AAA TGC GTA ATG3' 5'CTG TGG TAT GGC GGG TAA GT3'	۷۴۵	۶۰
اریترومایسین	*mefA/E*	5'CAA TAT GGG CAG GGC AAG3' 5'AAG CTG TTC CAA TGC TAC GC3'	۳۱۷	۶۰
اریترومایسین	*ermC*	5'AAT CGT CAA TTC CTG CAT GT3' 5'TAATCGTGGAATACGGGTTTG3'	۲۹۹	۵۸
اریترومایسین	*lnuA*	5'GGT GGC TGG GGG GTA GAT GTA TTA ACT GG3' 5'GCT TCT TTT GAA ATA CAT GGT ATT TTT CGA TC3'	۳۲۳	۶۱
کلرامفنیکل	*Cat*	5'TAA GGT TAT TGG GAT AAG TTA3' 5'GCA TGR TAA CCA TCA CAW AC3'	۳۴۰	۵۴
کلرامفنیکل	*catA*	5'ATAACGTTACTCTCCTATTTC3' 5'GG ATAT GA A ATTTAT CCCTC3'	۴۸۶	۵۰
بتالاکتام ها(پنی سیلین	*blaZ*	5'ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC3' 5'TAG GTT CAG ATT GGC CCT TAG3'	۲۴۰	۶۰

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

آنتی بیوتیک	نام ژن	پرایمر مربوط به ژن مقاومت به آنتی بیوتیک	اندازه امپلیکون bp	دمای annealing درجه سانتی گراد
بتالاکتام ها(پنی سیلین)	*mecA*	5'AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C3' 5'AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C3'	۵۳۳	۵۵
آمینوگلیکوزید ها	*aac(6")-aph(2")*	5'CCAAGAGCAATAAGGGCATACC3' 5'ACCCTCAAAAACTGTTGTTGC3'	۲۲۰	۶۰
آمینوگلیکوزید ها	*aph(3")-III*	5'GCCTTTCCGCCACCTCACCG3' 5'GCCGATGTGGATTGCGAAAA3'	۲۹۲	۵۶
آمینوگلیکوزید ها	*aadA*	5'CCTCGTGTAATTCATGTTCTGGC3' 5'ATCCTTCGGCGCGATTTTG3'	۲۸۲	۵۶
آمینوگلیکوزید ها	*ant(4')-Ia*	5'CAA ACT GCT AAA TCG GTA GAA GCC3' 5'GGA AAG TTG ACC AGA CAT TAC GAA CT3'	۲۹۴	۵۶
آمینوگلیکوزید ها	*aph(2")-Ic*	5'CCA CAA TGA TAA TGA CTC AGT TCC C3' 5'CCA CAG CTT CCG ATA GCA AGA G3'	۴۴۴	۵۶
آمینوگلیکوزید ها	*aph(2")-Id*	5'GTG GTT TTT ACA GGA ATG CCA TC3' 5'CCC TCT TCA TAC CAA TCC ATA TAA CC3'	۶۴۱	۵۶
آمینوگلیکوزید ها	*ant(6)-Ia*	5'CGG GAG AAT GGG AGA CTT TG3' 5'CTG TGG CTC CAC AAT CTG AT3'	۵۶۳	۵۶
آمینوگلیکوزید ها	*aadE*	5'ATG GAA TTA TTC CCA CCT GA3' 5'TCA AAA CCC CTA TTA AAG CC3'	۱۰۶۰	۵۱
ونکومایسین	*vanA*	5'GGGAAAACGACAATTGC3' 5'GTACAATGCGGCGTTA3'	۷۳۲	۵۰
ونکومایسین	*Van*	5'TTGGCGTCGTGTTAGGGA3' 5'CTGATGCTGCGTGGGAATAGG3'	۵۰۳	۵۷/۲
ونکومایسین	*vanX*	5'TCGCGGTAGTCCCACCATTCGTT3' 5'AAATCATCGTTGACCTGCGTTAT3'	۴۵۴	۵۵
سیپروفلوکساسین	*gyrA*	5'GAYTATGCWATGTCAGTTATTGT3' 5'GGAATRTTRGAYGTCATACCAAC3'	۲۸۶	۴۵

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

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 µL مستر میکس زیست فناوری پیشگام ، ۱µL پرایمر Forward ،۱ µL پرایمر Reverse، ۱µL از DNA الگو و با افزودن آب مقطر به حجم ۵۰µL 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 طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و به مدت ۸ دقیقه انجام پذیرفت. در نهایت محصولات واکنش بر روی ژل 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 ولام رنگ امیزی گرم تایید شد. ایزوله ها پس از رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ نوری بررسی شدند و ویژگی‌های ظاهری آن‌ها نشان دهنده‌ی باسیل‌های گرم مثبت بود (شکل ۱). همچنین نتایج تست‌های بیوشیمیایی شامل تست‌های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، اوره-آز، سیترات، MR/VP و اندول برای همه آنها منفی بود که لاکتوباسیل بودن ایزوله ها را تایید کرد (جدول ۱).



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

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

تست / ایزوله	کاتالاز	اکسیداز	حرکت	اوره‌آز	سیترات	اندول	MR/VP
شماره ۱	–	–	–	–	–	–	–/–
شماره ۲	–	–	–	–	–	–	–/–
شماره ۳	–	–	–	–	–	–	–/–

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

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).

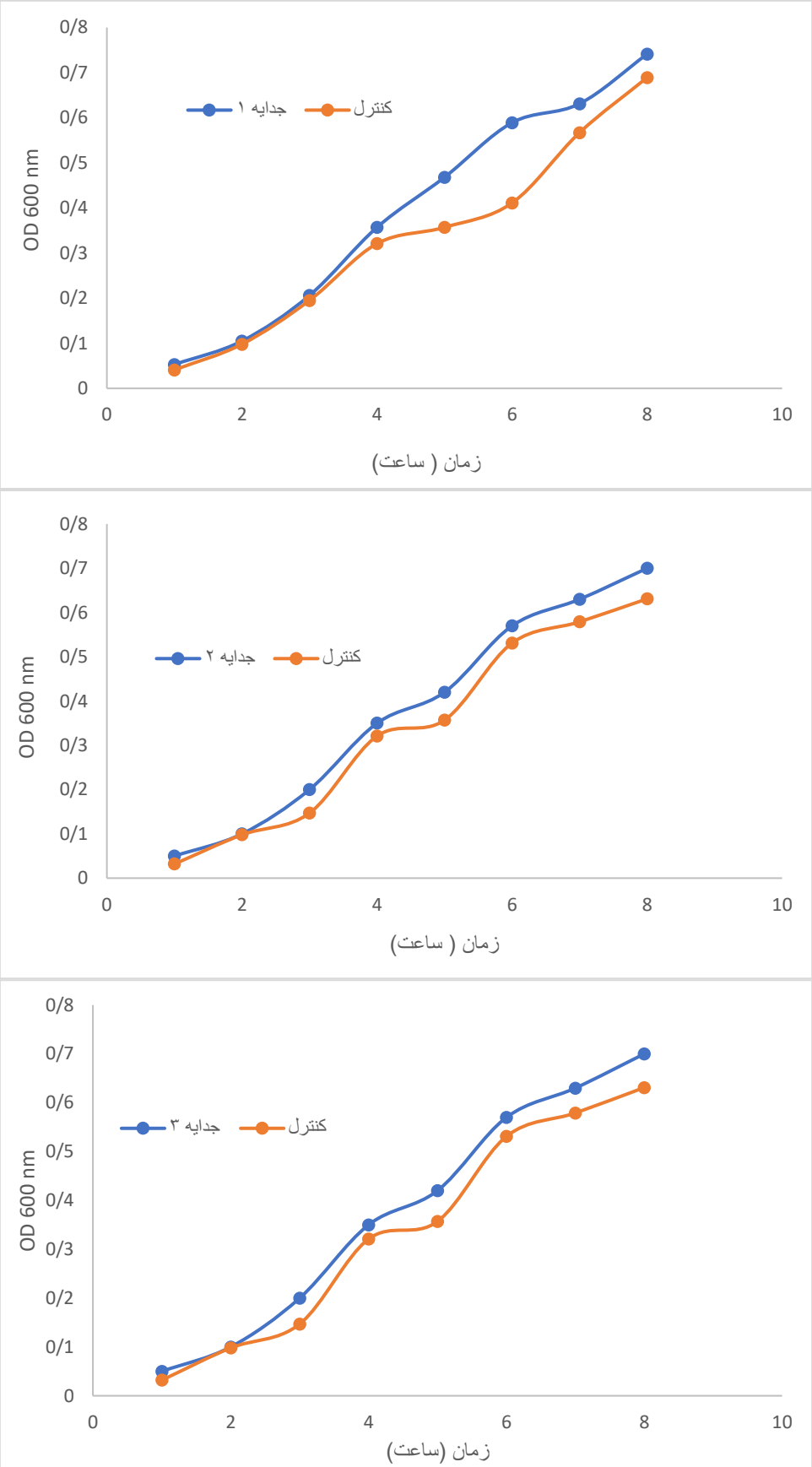


شکل ۲. بررسی فعالیت همولیتیک و عدم مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی‌ها ی باکتری *لاکتوباسیلوس کراپساتوس*

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 ایزوله ها قادر به تحمل شرایط اسیدی هستند.

تست مقاومت به نمک صفراوی: یکی از تست‌های مهم جهت ارزیابی توان پروبیوتیکی باکتری‌ها، بررسی مقاومت آن‌ها نسبت به نمک‌های صفراوی می‌باشد. جایه های مورد مطالعه قادر بودند در حضور نمک‌های صفراوی رشد کنند و منحنی رشد آن‌ها تفاوت چندانی با نمونه های کنترل (سوش استاندارد لاکتو باسیلوس کراپساتوس) نداشت. (شکل ۳).

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



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

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

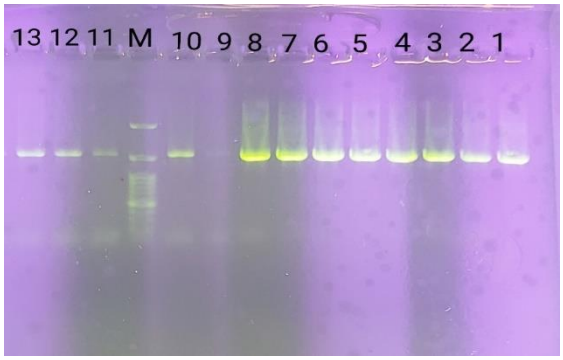
در مورد هر سه جدایه برترحضور نمکهای صفراوی تاثیر قابل ملاحظه ا ی بر رشد نشان نداد وتفاوت معنا داری در مقایسه با رشد کنترل بدون حضور نمک مشاهده نشد ($p < ۰/۰۵$)

تست اتصال: جدول ۴درصد اتصال جدایه ها ی برتر را نشان میدهد.

جدول۴ اتصال سه جدایه برتر به رده سلولی در دو pH با انالیز 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

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: محصول PCR روی ژل آگارز الکتروفورز گردید تا الگوی تشکیل باندها مورد ارزیابی قرار گیرد. در شکل ۴ تصویر ژل مذکور نشان داده شده است. وجود تک باندهای شارپ نشان دهنده‌ی صحت انجام واکنش برای ایزوله‌های مورد مطالعه بود.



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

بر روی ژل آگارز (ستون‌های ۱، ۲ و ۳: ایزوله‌های 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 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 مقامت دارویی در شکل ۵ نمایش داده شده است

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

جدول۵ الف – تفسیر آنتی بیوگرام در جدایه ها

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

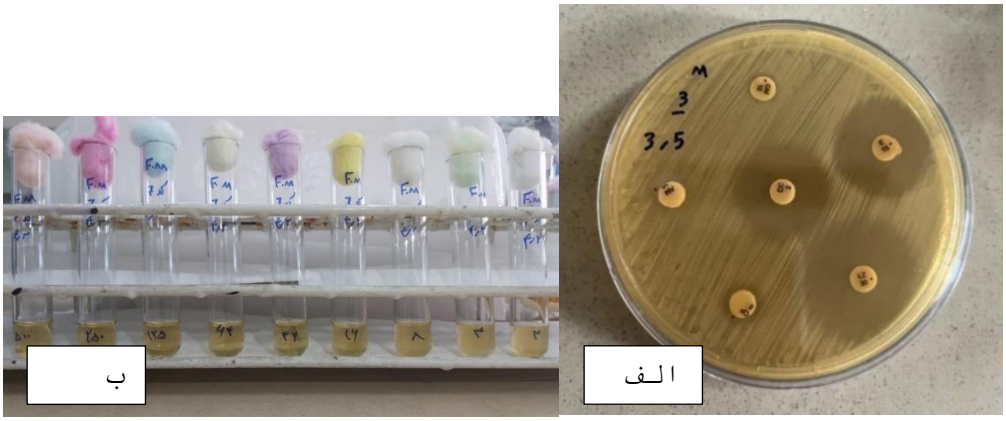
Sحساس Rمقاوم

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

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

توضیح: (S: استرپتومایسین، GM: جنتامایسین، AM: آمپی سیلین، CP: سیپروفلوکساسین، IPM; ایمیپنم ، LZ: لینزولید، E: اریترومایسین، CC: کلیندامایسین، K: کانامایسین، V: ونکومایسین، TE: تتراسایکلین، C: کلرامفنیکل

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



شکل۵-تصویری از نتایج آنتی بیوگرام جدایه ها الف -دیسک دیفیوژن ب -ماکرودایلوشن براث

غلظت آنتی بیوتیک از راست به چپ بترتیب ۲, ۴, ۸, 16, ۳۲, ۶۴, ۱۲۵, ۲۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر

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 ولوله چهارم شفاف است لذا MIC به میزان ۱۶ میکرو گرم بر میلی لیتر برای آنتی بیوتیک وانکو مایسین میباشد که حاکی از مقاومت است

MIC باکتری های اسیدلاکتیک

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

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

جدایه/نوع آنتی 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; ایمیپنم ، LZ: لینزولید، E: اریترومایسین، CC: کلیندامایسین، K: کانامایسین، V: ونکومایسین، TE: تتراسایکلین، C: کلرامفنیکل

مقاومت به ونکومایسین بیشترین فراوانی را داشت و در تمام12 ایزوله (۱۰۰درصد) 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 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 ماکرودایلوشن

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

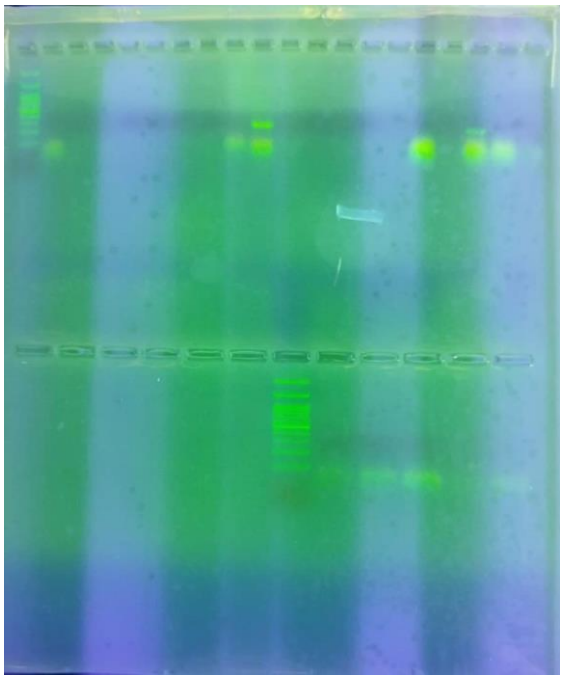
براث وغربالگری مولکولی نیزتنها مقاومت یک جدایه را تایید کرد.

مقاومت به سیپروفلوکساسین درمورد۱۱ جدایه تایید شد. مقاومت به جنتامایسین در ۲جدایه و مقامت به تتراسایکلین در ۳جدایه مشاهده شد..مقاومت به اریترومایسین در ۱ مورد مشاهده شد.مقاومت به استرپتومایسین در ۲ مورد مشاهده شد.در لاکتوباسیلوس های جداشده ۱مورد به ریفامپین مقاومت داشت.

جدایه E1به همه انتی بیوتیکها بجز وانکومایسین حساس بود ودوجدایه E2,E3 نیز به عنوان جدایه های برتربه جز دو آنتی بیوتیک وانکومایسین و سیپروفلوکساسین.به آنتی بیوتیک دیگری مقاومت نشان ندادند ولذا جدایه E1در 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.

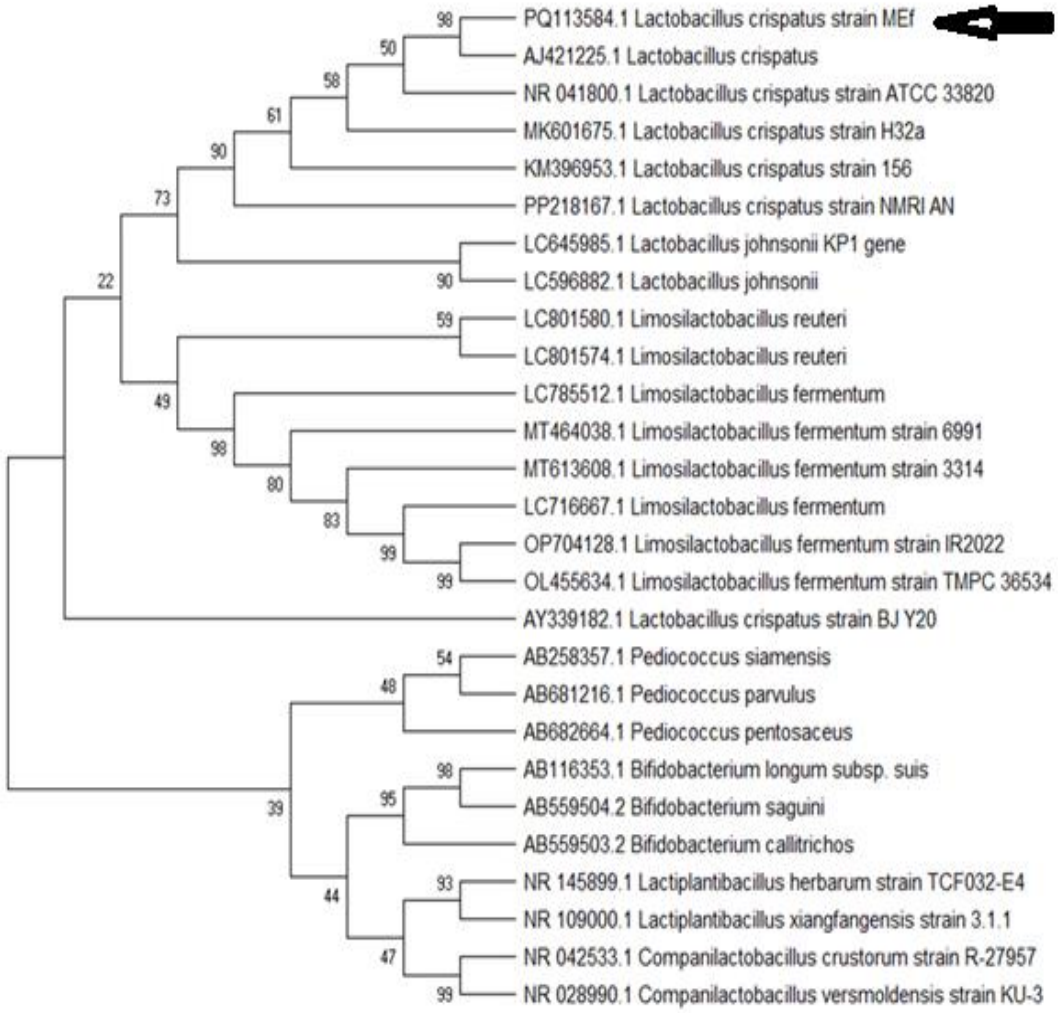


شکل ۶-نمونه ا ی از نتایج حضورژنهای مقاومت در جدایه ها

تصویر بالاچاهک ۱ کنترل منفی چاهک ۳ ژن مقاومت به سیپروفلوکساسین ژن *gyr A* با سایز BP ۲۸۶ 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 BP 533سایر چاهکها جدایه های فاقد ژنهای مقاومت

شناسایی مولکولی: جهت شناسایی مولکولی ایزوله‌ها، محصول PCR برای توالی‌یابی ارسال شد و از میان سه ایزوله، بهترین جدایه توالی‌یابی گردید. توالی حاصل در پایگاه داده NCBI بلاست شد که نتایج آن نشان دهنده‌ی تشابه ۹۳ درصدی توالی به *Lactobacillus cryspatus* بود. درخت فیلوژنی با متد Maximum Likelihood و بوت استرپ ۱۰۰۰ و با نرم‌افزار MEGA ترسیم شد (شکل ۷). از گونه *Pediococcus acidilactici* به عنوان اوت گروپ استفاده گردید.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]



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

بحث

گونه های جنس لاکتوباسیلوس درمیان میکروبیوتای طبیعی واژن جمعیت غالب محسوب می شوند که حضورانها دراین اکوسیستم از طریق همیاری با سایرمیکروارگانیسم های ساکن واژن اثرات مثبت ومفید 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 درمیان آنها رایج ترین گونه ها ,گونه های جنس لاکتوباسیلوس شامل کریسپاتوس ,اینریس,جانسونی و... هستند.این باکتری ها ازطریق تولیدانواع 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 بیماریهای 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 لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از واژن زنان سالم و ارزیابی مقاومت آنتی بیوتیکی آنها به منظور انتخاب بهترین جدایه جهت کاندیدپروبیوتیک بود.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

لاکتوباسیل‌ها گروهی متنوع از باکتری‌هاهستند که بسیاری از گونه‌های آنها از خواص پروبیوتیکی برخوردارند. مقاومت دارویی یکی از استراتژی‌های بقای میکروارگانیسم‌هاست. دو نوع مقاومت ذاتی و اکتسابی در میکروارگانیسم‌ها وجود دارد نوع ذاتی قابل انتقال نبوده و کاملاً مفید تلقی می گردد زیرا هنگام استفاده همزمان پروبیوتیک‌ها با آنتی بیوتیک‌ها آسیبی به باکتری پروبیوتیک(مثلاً هنگام درمان زخم‌های معده ناشی از اچ پایلوری) وارد نمی‌شود. اما مقاومت ثانویه اکتسابی بوده و در درون بدن موجود امکان انتقال ژن‌های مقاومت از باکتری پروبیوتیک به باکتری‌های پاتوژن وجود دارد(۱۸-۲۰)

بررسیهای فنوتیپی تعلق تمامی جدایهای مورد مطالعه را به اعضا جنس لاکتو باسیلوس تایید نمود.همچنین ازمونهای مقاومت به اسید ونمکهای صفراوی نشانه تحمل بالای باکتریهای مورد مطالعه در مقایسه با شاهد استاندارد بود.عدم ایجاد همولیز در محیط آکار خوندار ایمنی باکتریهای مورد مطالعه را تایید کرد .تمامی جدایه ها اثرات مهاری قوی علیه پاتوژنهای رایج از خود نشان دادند .بعلاوه آزمایشات اصال در کشت سلولی موید اتصال حدود ۷۰ درصد توسط جدایه برتر بود .تمامی این نتایج حاکی از توانایی پروبیوتیکی جدایهای این تحقیق بود.

بجز یک جدایه سایر جدایه ها به آنتی بیوتیک‌های دخیل درمهار سنتز اسید نوکلئیک (سیپروفلوکساسین) مقاومت فنوتیپی نشان دادند (91/66درصد).مقاومت بالای ۱۰۰ درصدی نسبت به نالیدیکسیک اسید و نورفلوکسازین در گزارشات محققان آمده است.شارما و همکاران نیز مقاومت بالا به کوانیولونها را گزارش کرده‌اند(۸۳٪ نسبت به نالیدیکسیک اسید) مقاومت بالا به این خانواده آنتی بیوتیکی جزو مکانیسم‌های مقاومت ذاتی محسوب می‌شود(۲۱, ۲۲)

اساساً پروفایل حساسیت دارویی بر اساس منبع ایزوله هم بسیار متفاوت است(۲۳)درتحقیقات مشابه, تمامی گونه‌های مشابه جدا شده‌از مواد غذایی تخمیری به کوانیولونها حساس اما جدایه‌های انسانی(جدا شده از شیرمادریا مدفوع)نسبت به این این آنتی بیوتیک‌ها حد واسط یا مقاوم گزارش شده‌اند(۲۳)

لذا منبع جدا سازی در بروز یا عدم بروز مقاومت تاثیرگذار است و اساساً جدایه‌های مواد غذایی به آنتی بیوتیک‌های خانواده کوانیولونها مانند سیپروفلوکساسین حساستر هستند. و دلیل اصلی این امر آن است که سویه‌هایی که از اکوسیستم های مختلف بدن مانند دهان یا واژن جدا می‌شوند به دلیل مواجهه با آنتی بیوتیک‌ها به تدریج مقاومت کسب می کنند(۲۴)

نتایج حاکی از مقاومت بالا وصد در صدی به آنتی بیوتیک وانکو مایسین بود.مقاومت به آنتی بیوتیک‌های گلیکو پپتیدی مانند وانکومایسین و تایکوپلانین توسط وانگ و همکاران نیز گزارش شده است (۱۲).اساساً لاکتوباسیل‌ها مقاومت طبیعی بسیار بالایی به آنتی بیوتیک‌های گلیکو پپتیدی از خود نشان می‌دهند که ناشی از دخالت ژن‌های کروموزومی سنتز و سازماندهی دیواره طی مسیرهای متفاوت آنزیمی است ,در دیواره طبیعی در مقایسه با باکتری‌های حساس است(۲۵)

مقاومت نسبت به آمپی سیلین نیز در سه باکتری از جدایه‌های مورد مطالعه دیده شد(۷۵٪). مطالعات مشابهی توسط سایر محققان برای گونه‌های برویس, پلانتاروم وپاراکازیی گزارش شده است.این مقاومت می‌تواند منشا غذایی داشته باشد .غالباً لاکتو باسیلوس‌های حساس به آنتی بیوتیک‌های بتالاکتام نسبت به سفالوسپورین‌ها مقاومت کمتری نشان می‌دهند(۲۶)

دلیل فیزیولوژیک مقاومت به سفالوسپورین‌ها هنوز ناشناخته است اما می‌تواند ناشی از نفوذ ناپذیری دیواره یا نقش یک اتولیزین متصل به دیواره مانندآنچه در *lacticaseibacillus casei* و *lactiplantibacillus plantarum*دیده میشود,باشد(۲۷, ۲۸)

تمامی باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق به ایمی پنم حساس بودند که این نسخه با نتایج برخی محققان دیگر مغایرت نشان می‌دهد(۲۹)و با برخی مطابقت دارد که

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

حساسیت به مروپنم را نشان می‌دهد .(۳۰)شارما و گویال نیز حساسیت بسیار بالای جدایه های 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 وتنها یک نمونه مقاوم دیده شد اما دلاگو و همکاران این مقاومت بالا را در جدایه‌های خود گزارش کرده‌اند.

به نظر windو Delgado این مقاومت‌ها می‌تواند مربوط به تفاوت های فردی میان جدایه ها باشد.اما نوع منبع نیز (منابع انسانی یا غذا) اثر قابل توجهی در بروز مقاومت دارد. درمطالعه حاضر اکثریت جدایه ها به آنتی بیوتیک های ماکرولیدی حساسیت نشان دادندکه این یافته ها با نتایج Daniashو wind همخوانی داشت.(۲۳)

Delgado و همکاران نتایج مشابهی درخصوص حساسیت جدایه های خود به اریترومایسین ارایه نمودند که بنظر میرسدکه نتایج حاصله تا حد زیادی مختص سویه می باشد.(۳۱)آنان دریافتند ارتباط معنا داری میان منبع جداسازی باکتری(منابع غذایی یا انسانی)با مقاومت یافت نگردید.

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

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

شارما و همکاران نیز اثراتی مهاری از جنتا مایسین علیه برخی جدایه‌ها گزارش کرده‌اند(۲۹)اساساً بسیاری از لاکتو باسیل‌ها به آمینو گلیکوزیدها مقاوم هستند(۳۲, ۳۳)که غالباً ذاتی بوده و به دلیل ویژگی‌های سطحی باکتریها و نفوذ ناچیز دارو و نیز فقدان وجود سیستم انتقال الکترون وابسته به سیتوکروم در آنهاست(۳۴)

از آنجا که تتراسایکلین یکی ازرایج‌ترین 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 درمدفوع بیشتر است که به نوبه خود اهمیت منبع جداسازی سویه را مطرح می کند(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 هیدروفولات ردوکتازو دی هیدرو پتروئید اسید سنتتاز را مهار می کنند و از آنجا که لاکتوباسیل‌ها فاقد مسیر سنتز اسید نوکلئیک هستند لذا به این آنتی بیوتیک‌ها مقاومت ذاتی نشان ی‌دهند(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 وشناسایی 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 شیافهای واژینال ترکیبی توصیه میگردد..

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

منابع

1. 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. 2. Mastromarino P, Hemalatha R, Barbonetti A, Cinque B, Cifone MG, Tammaro F, et al. Biological control of vaginosis to improve reproductive health. Indian Journal of Medical Research. 2014;140(Suppl 1):S91-S7.
3. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 10. Happel A-U, Kullin B, Gamieldien 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 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. 22. Anisimova EA, Yarullina DR. Antibiotic resistance of Lactobacillus strains. Current microbiology. 2019;76(12):1407-16.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]

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 probotic 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, Karpíšková 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.

.

[Downloaded from mail.amfi.ir on 2026-11-08]