● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ شانزدهم، شمارهٔ ۴، ص۳۱۷-۳۰۷، ۱۳۸۸

مقالهٔ پژوهشی

تأثیر لاکتوباسیلوس رامنوسوسGG در مهار کلونیزاسیون انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین در موش

دکتر حسین فاضلی[۱]، مریم میرلوحی[۲]، پرویز محمدی‌قلایی*[۳]

خلاصه

مقدمه: انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین (VRE) یکی از پاتوژن‌های شایع بیمارستانی در سراسر دنیا هستند. کلونیزاسیون این باکتری‌ها در روده یکی از منابع مهم در انتقال این باکتری‌ها می‌باشد. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی در مقادیر متعادل مورد استفاده قرار بگیرند، اثر مهاری روی کلونیزاسیون پاتوژن‌های دستگاه گوارش اعمال می‌کنند. این مطالعه به منظور بررسی اثر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG (LGG) در کاهش کلونیزاسیون انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین (VRE) در دستگاه گوارش موش انجام شد.

روش: تعداد ۲۴ موش به‌مدت یک هفته کنترل شده و سپس با دادن یک میلی لیتر وانکومایسین خوراکی (۲۵۰µg/ml) و یک میلی لیتر سوسپانسیون VRE در مولر – هینتون براث (۵×۱۰^{۸}CFU/ml) روزی یک بار و به مدت ۷ روز متوالی به VRE آلوده شدند. موش‌ها به صورت تصادفی به دو گروه تحت درمان و شاهد تقسیم شده و اثر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG در گروه تحت درمان بررسی و با گروه شاهد مقایسه شد. قبل و بعد ازکلونیزه شدن، تعداد VRE، کل انتروکوک‌ها و باسیل‌های گرم منفی روده‌ای در مدفوع دو گروه تعیین شد.

یافته‌ها: در ابتدا همهٔ موش‌ها با انتروکوک‌های غیرمقاوم به ونکومایسین کلونیزه شدند (متوسط ۷ روز ۵×۱۰^{۵} CFU/g) و مقاومت به ونکومایسین قابل تشخیص نبود. متعاقب تلقیح VRE در معدهٔ موش‌ها و دریافت روزانهٔ ونکومایسین خوراکی، سوش VRE در دستگاه گوارش همهٔ آنها کلونیزه شد (متوسط ۷ روز $۱/۶\times۱۰^{۶}$ CFU/g). کاربرد خوراکی LGG رشد همهٔ انتروکوک‌ها از جمله سوش‌های مقاوم به ونکومایسین را در مدفوع گروه تحت درمان سرکوب کرد (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: با توجه به کاهش قابل توجه میزان VRE در نمونه‌های مدفوع موش‌های دریافت کنندهٔ پروبیوتیک نتیجه می‌گیریم که پروبیوتیک می‌تواند کلونیزاسیون VRE را کاهش دهد. مطالعات بیشتری در زمینه تأثیر پروبیوتیک‌ها در پیشگیری و درمان عفونت VRE و پاتوژن‌های شایع دیگر پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: انتروکوکوس فکالیس، لاکتوباسیلوس رامنوسوسGG، پروبیوتیک

۱-استادیار میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ۲- دانشجوی دکترای تغذیه، گروه تغذیه، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان ۳- دانشجوی دوره دکترای داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ● **آدرس پست الکترونیک:** parvizm_parviz@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۸٦/۱۲/۲۱ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۷/۱۰/٤ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۷/۱۱/۹

مقدمه

انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین (VRE) یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های بیمارستانی در سراسر دنیا هستند (۱). مقاومت انتروکوک‌ها به ونکومایسین مهم بوده و می‌تواند منجر به عفونت‌های بالینی شدیدی شود، چرا که ونکومایسین معمولاً به عنوان یک داروی جایگزین در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم مثبت مقاوم به آنتی‌بیوتیک استفاده می‌شود (۲). این باکتری‌ها برای اولین بار در سال ۱۹۸۶ در اروپا (۳،۴) و سپس در سال ۱۹۸۷ در ایالات متحده جداسازی شدند (۵). از این زمان به بعد شیوع آنها در همهٔ دنیا افزایش یافت. طبق گزارش‌های مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها (CDC) شیوع VRE در ایالات متحده بین سال‌های ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۳ بیست برابر افزایش یافت. VRE دومین عامل عفونت‌های بیمارستانی در ایالات متحده بوده و علت حدود ۸٪ کل عفونت‌های خونی بیمارستانی است (۸-۶). کلونیزاسیون با VRE می‌تواند موجب بیماری‌های شدیدی همچون عفونت‌های مجاری ادراری، باکتریمی و اندوکاردیت شود که بسیاری از آنها می‌توانند کشنده باشند (۹).

کاهش کلونیزاسیون با VRE عامل مهمی در کنترل بیماری و مرگ و میر ناشی از آن می‌باشد، چرا که هیچ درمان ضد میکروبی مؤثری برای عفونت‌های VRE وجود ندارد (۱۰). یکی از مطالعات نشان داده که درمان با آنتی‌بیوتیک‌های ضدبی‌هوازی‌ها در بیمارانی که VRE در مدفوع آنها کلونیزه شده است، می‌تواند باعث افزایش این کلونیزاسیون شود (۱۱). برخی مطالعات انتروکوک‌هایی را گزارش کرده‌اند که برای رشد خود به ونکومایسین وابسته بوده‌اند (۱۲،۱۳). به‌نظر می‌رسد که میزان بالای جمعیت بیمارانی که VRE در آنها کلونیزه شده، مشکل مهمی در کنترل عفونت است (۱۴). مطالعات گذشته حاکی از آن است که کلونیزاسیون روده‌ای VRE به فاکتورهای جغرافیایی وابسته است (۱۵). از آنجایی که این باکتری‌ها در موش می‌توانند کلونیزه گردند، استفاده از موش راه مناسبی برای مطالعه بر روی آنهاست (۱۶).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی در مقادیر متعادل مورد استفاده قرار بگیرند، اثر مهاری روی کلونیزاسیون پاتوژن‌های دستگاه گوارش اعمال می‌کنند (۱۷،۱۸). یکی از مهم‌ترین پروبیوتیک‌ها لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG (PTCC 1637) می‌باشد که در مطالعات متعدد اثرات پروبیوتیکی آن از جمله مقاومت به اسید و صفرا، قدرت چسبیدن زیاد به سلول‌های مخاط روده انسان و موش، مهار فعالیت آنزیم‌های باکتری‌ها و تولید مواد ضد میکروبی به اثبات رسیده است (۱۹). طبق یکی از پژوهش‌های انجام شده استفاده از ماست تجاری حاوی LGG می‌تواند درمان ارزشمندی برای کلونیزاسیون VRE باشد و پیشنهاد شده است که مطالعات بیشتری در این زمینه انجام شود (۱۸). این مطالعه به منظور تعیین اثر لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG (Lactobacillus rhamnosus GG) بر کلونیزاسیون انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین در رودهٔ موش انجام شده است.

روش بررسی

این مطالعه تجربی بر روی ۲۴ موش نر Balb/c انجام شد که باکتری انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین در دستگاه گوارش آنها کلونیزه شده بود. به منظور جلوگیری از سوگرایی، مطالعه به‌صورت دو سویه کور انجام شد. به این صورت که موش‌ها و محلول‌های آنتی‌بیوتیک کدگذاری شده و فقط فرد تحلیل کننده اطلاعات از آنها آگاهی داشت و

آزمایش‌گر و جمع‌آوری کننده اطلاعات از مفهوم کدها اطلاع نداشتند.

باکتری‌های مورد مطالعه

انتروکوک مورد مطالعه از یک ایزوله کلنیکی انتروکوکوس فکالیس مقاوم به ونکومایسین از یک بیمار بستری در بیمارستان به‌دست آمد و مشخصات کلی آن با انتروکوکوس فکالیس (PTCC 1399) مطابقت داشت. باکتری از کشت مدفوع بیمار فوق بر روی محیط کشت مولر-هینتون آگار حاوی ونکومایسین (۵۰µg/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml)، پلی‌میکسین(۱۰۰ µg/ml) و نیستاتین (۲ µg/ml) جداسازی گردید (۱۴) و بر اساس مورفولوژی کلنی و تست‌های تولید کاتالاز، هیدرولیز اسکولین، رشد در ۶/۵٪ NaCl و هیدرولیزL- پیرونیدونیل – آلفا نفتیل آمید (PYR) تأیید گردید (۲۰). همچنین MIC باکتری طبق پروتکل‌های NCCLS ، برای ونکومایسین تعیین و حضور ژن Van A در DNA آن توسط روش PCR تأیید شد (۲۱). پروبیوتیک مورد استفاده شامل لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG (PTCC 1637) بود.

آلوده‌نمودن موش‌ها به VRE

با انکوبه کردن VRE در محیط کشت مولرهینتون براث (MHB) به‌مدت یک شب در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد غلظتی از باکتری معادل 5×10^{8}CFU/ g برای تلقیح به موش‌ها تهیه گردید (۲۲). تیتر دقیق باکتری توسط سریال دیلوشن و روش پلیت تعیین شد. ۲۴ موش نر Balb/C با وزن بین ۲۵ تا ۳۰ گرم در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت. هر کدام از موش‌ها در قفس جداگانه نگهداری شدند و قفس‌ها به‌طور روزانه تمیز می‌شد. تعداد کل انتروکوک‌ها در مدفوع موش‌ها بر حسب CFU/g برای همهٔ موش‌ها تعیین شد. سپس به منظور کلنیزه نمودن VRE در موش‌ها، از طریق گاواژ به آنها یک میلی لیتر ونکومایسین خوراکی (۲۵۰µg/ml) و یک میلی لیتر سوسپانسیون VRE در MHB با غلظت (5×10^{8}CFU/ ml) روزانه و به مدت ۷ روز داده شد.

مدفوع تازهٔ هر حیوان در فواصل زمانی معین جمع‌آوری و توزین شد. شناسایی انتروکوک‌ها با کشت مدفوع در محیط بایل-اسکولین آگار و تأیید با رنگ‌آمیزی گرم، هیدرولیز اسکولین، هیدرولیز L-پیرونیدونیل – آلفا نفتیل آمید و مقاومت به نمک (۲۳) و شناسایی باسیل‌های گرم منفی روده‌ای با کشت مدفوع در محیط مک کانکی آگار و انجام رنگ‌آمیزی گرم، و نیز انجام تست‌های بیوشیمیایی اعم از تخمیر گلوکز، تخمیر لاکتوز، تولید اسید و گاز و احیای نیترات، تست حرکت وتست متیل رد-وگس پروسکوئر بر روی محیط‌های TSI،SIM، MR-VP انجام گردید (۲۴). VRE هم با کشت مدفوع در محیط مولر-هینتون آگار حاوی ونکومایسین (۵۰µg/ml)، استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml)، پلی‌میکسین (۱۰۰ µg/ml) و نیستاتین (۲ µg/ml) شناسایی شد (۱۴) و مورفولوژی کلنی و تست‌های تولید کاتالاز، رشد در ۶/۵٪ NaCl و هیدرولیز L-پیرونیدونیل – آلفا نفتیل‌آمید تأیید گردید (۲۰). تعداد کل انتروکوک‌ها، باسیل‌های گرم منفی روده‌ای و انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین توسط سریال دیلوشن و روش پلیت تعیین شد.

آماده‌سازی پروبیوتیک و بررسی اثر آن

پروبیوتیک LGG با کشت لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG در محیط کشت MRS و انکوبه نمودن آن به‌مدت یک شب در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، شرایط بی‌هوازی و دی‌اکسیدکربن ۵٪ تا رسیدن به غلظت 1×10^{8}CFU/ ml تهیه شد (۲۵). تیتر دقیق

باکتری توسط روش پلیت و سریال دیلوشن تعیین شد. موش‌ها به دو گروه تصادفی ۱۲ تایی تحت درمان و شاهد تقسیم شدند. گروه تحت درمان به‌مدت یک هفته از طریق گاواژ ، روزانه 1×10^{8}CFU/ ml سوسپانسیون پروبیوتیک در MRS وگروه شاهد روزانه ۱ml سوسپانسیون MRS دریافت کردند. در طول زمان مطالعه، در فواصل زمانی معین تعداد VRE و تعداد کل انتروکوک‌ها در مدفوع دو گروه تعیین گردید.

آنالیز آماری

با استفاده از آنالیز واریانس و مقایسه تعداد VRE و شمارش کلی انتروکوک‌ها ($\log_{10} CFU/g$) در دو گروه شاهد و تحت درمان، چنانچه $P<0/05$ بود اختلاف معنی‌دار محسوب می‌گردید.

نتایج

نتایج شمارش انتروکوک‌ها قبل از تلقیح VRE یا پروبیوتیک

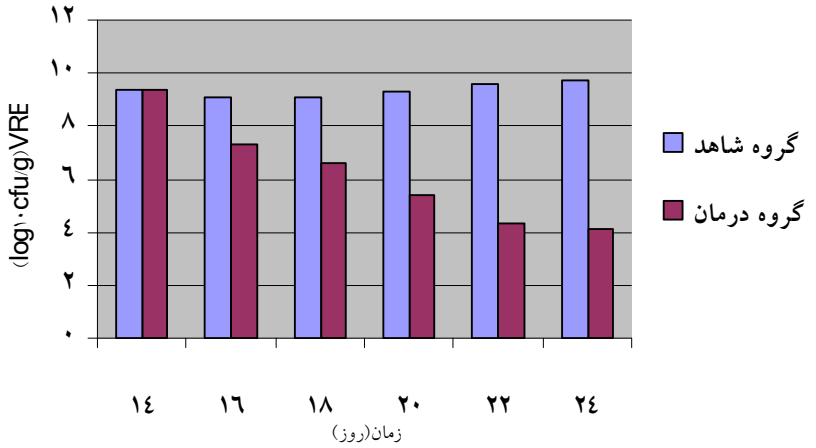
در ابتدا قبل از الوده نمودن موش‌ها با انتروکوک مقاوم به وانکومایسین یا درمان با پروبیوتیک، تعداد متوسط انتروکوک‌های فلور طبیعی روده موش‌ها در هر گرم از مدفوع در محدوده $3/2\times10^{5}$ تا 1×10^{6}CFU/g بود. تعداد کل انتروکوک‌ها در طول یک هفته آزمایش که به موش‌ها غذای معمول آزمایشگاه داده می‌شد، تغییر معنی‌داری نکرد و متوسط تعداد آنها در مدفوع 5×10^{5}CFU/g بود. علاوه بر این، در طول این دورهٔ زمانی، VRE در هیچکدام از موش‌ها شناسایی نشد. در هفته اول متوسط تعداد باسیل‌های گرم منفی روده‌ای در مدفوع آنها 8×10^{5}CFU/g بود (جدول ۱).

جدول ۱. *تعداد متوسط انتروکوک‌های فلور طبیعی، انتروکوک مقاوم به وانکومایسین (VRE) و باسیل‌های گرم منفی روده‌ای در موش‌ها قبل از تجویز VRE (روزهای ۰، ۲، ۴ و ۶) و بعد از تجویز VRE (روزهای ۸، ۱۰، ۱۲ و ۱۴).*

روز	رویداد	انتروکوک کل (log 10 CFU/g)	VRE (log10 CFU/g)	باسیل‌های گرم منفی روده‌ای (log10CFU/g)
۰		۵/٦	۰	۵/۵
۲		۵/۵	۰	۵/۹
٤	قبل از به‌کاربردن سوش مقاوم، انتروکوک‌ها یا پرو بیوتیک	٦	۰	۵/۷
٦		۵/۸	۰	٦/۳
متوسط		۵/۷	۰	۵/۹
۸		٤/۱	۵/۱	۹
۱۰		٦/۱	۵/۱	۸/۹
۱۲	بعد از به‌کاربردن VRE و ونکومایسین خوراکی	۷/۸	۸/٦	۹/۲
۱٤		۹/۷	۹/٤	۹/۱
متوسط		٦/۹	٦/۲	۹

جدول ۲. *تعداد متوسط VRE در مدفوع موش‌هایی که پروبیوتیک دریافت کرده‌اند (n=۱۲) و موش‌های گروه شاهد (n=۱۲)*

روز	رویداد	تعداد متوسط VRE (CFU/g log10)	
		گروه تحت درمان	گروه شاهد
۱۴	شروع پروبیوتیک درمانی	۹/٤	۹/٤
۱۵	یک روز بعد از شروع پروبیوتیک درمانی	۷/۳	۹/۱
۱۶	دو روز بعد از شروع پروبیوتیک درمانی	٦/٦	۹/۱
۱۸	چهار روز بعد از شروع پروبیوتیک درمانی	٥/٤	۹/۳
۲۰	شش روز بعد از شروع پروبیوتیک درمانی	٤/۳	۹/٦
۲۲	هشت روز بعد از شروع پروبیوتیک درمانی	٤/۱	۹/۷
	متوسط	٦/۲	۹/٤



شکل ۱. *مقایسه تعداد متوسط VRE در مدفوع گروه شاهد و گروه درمان پس از تجویز پروبیوتیک*

بعد از یک‌بار تلقیح سوسپانسیون VRE درMHB (۵×۱۰^{۸}CFU/ ml) و دریافت روزانهٔ ونکومایسین خوراکی (۲۵۰µg/ml) همهٔ موش‌ها با VRE کلونیزه شدند. در ابتدا میزان کلونیزاسیون پایین بود اما در روز ۱۰ به حد قابل‌توجهی رسید و تا روز ۱۴ همچنان افزایش یافت. همچنین در این مدت تعداد متوسط باسیل‌های گرم منفی روده‌ای و تعداد کل انتروکوک‌ها در مدفوع افزایش یافت (جدول ۱).

نتایج شمارش انتروکوک‌های مقاوم به وانکومایسین بعد از درمان با پروبیوتیک

با تجویز پروبیوتیک LGG به موش‌ها، کلونیزاسیون انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین در گروه تحت درمان کاهش یافت اما میزان کلونیزاسیون در گروه شاهد همچنان بالا باقی ماند (جدول ۲ و شکل ۱) ($P<۰/۰۵$). همچنین پروبیوتیکLGG تعداد متوسط انتروکوک‌های روده‌ای و باسیل‌های گرم منفی

روده‌ای را در مدفوع کاهش داد، اما این کاهش معنی‌دار نبود (داده‌ها نشان داده نشده است).

بحث

امروزه باکتری‌های متعلق به جنس لاکتوباسیلوس، به علت خاصیت پروبیوتیکی در پیشگیری و درمان بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند و تأثیر خود را به روش‌های مختلف از جمله اثر بر میکروفلور روده‌ها اعمال می‌کنند (۲۷-۲۶). یکی از اعضای این جنس لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG می‌باشد که در بسیاری کشورها در فرآورده‌های غذایی تخمیری به‌عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شود(۲۶). دستگاه گوارش محل مهمی برای انتشار سوش‌های انتروکوک است. بروز عفونت‌های بیمارستانی با کلونیزاسیون انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین در دستگاه گوارش ارتباط دارد (۲۸). کمیتهٔ مشورتی کنترل عفونت‌های بیمارستانی در هر بیمارستان باید اقداماتی را برای جلوگیری از گسترش مقاومت به ونکومایسین، به ویژه سوش‌های انتروکوک مقاوم به ونکومایسین در بین بیماران بستری و کارکنان بیمارستان ترتیب دهد (۲۹). یکی از این کارها درمان بیماران کلونیزه شده با انتروکوک مقاوم به ونکومایسین می‌باشد تا از انتشار این باکتری جلوگیری شود. امروزه داروهایی مثل نوبیوسین وریفامپین برای این کار مورد استفاده قرار می‌گیرند اما استفاده گسترده آنها موجب مقاومت به این آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (۳۱،۳۰). اقدامات دیگر شامل استفاده از پروبیوتیک‌ها برای کاهش کلونیزاسیون VRE در روده است. اما مطالعات در این زمینه محدود بوده و لازم است در این زمینه پژوهش‌های بیشتری صورت گیرد (۱۸). مطالعه حاضر کاهش معنی‌داری را در کلونیزاسیون VRE در دستگاه گوارش موش‌های تحت درمان با پروبیوتیک لاکتوباسیل LGG در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. در یکی از مطالعات انجام شده بر روی بیماران بستری در بخش کلیه پس از چهار هفته مصرف پروبیوتیک LGG، از نوزده نفر گروه تحت درمان شانزده نفر از لحاظ VRE منفی شدند، در حالی که گروه شاهد همچنان VRE مثبت بودند (۱۸). همچنین در مطالعه دیگری مشخص شده است که پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی می‌تواند از کلونیزاسیون اشرشیاکلی در پریتوئن موش جلوگیری کند (۳۲). در مطالعه‌ای که در هفده بخش ICU در بیمارستان‌های Clermont-Ferrand فرانسه انجام شده ۱۰۲ بیمار به‌عنوان گروه تحت درمان و ۱۰۶ بیمار به‌عنوان گروه شاهد شرکت داشته‌اند که پس از دریافت 10^9CFU سیلوس رامنوسوس به‌صورت دو بار در روز، بروز عفونت تنفسی با سودوموناس آئروژینوزا در گروه تحت درمان بسیار کمتر از گروه شاهد بود (۳۳). در مطالعه دیگری به بررسی اثر پروبیوتیک در کاهش و پیشگیری بیماری‌های تنفسی و گوارشی(به‌عنوان عامل کاهنده کارایی) در کارگران پرداخته شده است. بدین صورت که کارگران شرکت Tetra Park سوئد که هر روز و به‌صورت سه نوبت کاری کار می‌کردند به دو گروه تحت درمان و شاهد تقسیم شده و به گروه تحت درمان روزانه 10^8CFU پروبیوتیک لاکتوباسیلوس روتری و به گروه شاهد پلاسبو داده شد. میزان بروز بیماری‌های تنفسی و گوارشی در گروه تحت درمان به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود. (۳۴). تمام این مطالعات حاکی از

اثر بخشی و کارائی پروبیوتیک در این زمینه هستند و نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعات ذکر شده و دیگر مطالعات مشابه همخوانی کامل دارد. مکانیسم احتمالی اثر پروبیوتیک LGG در از بین بردن عفونت‌های روده‌ای شامل کلونیزاسیون رقابتی است که در آن LGG به اپی‌تلیوم روده متصل شده و چسبیدن پاتوژن‌هایی مثل اشرشیاکلی را مهار می‌کند (۳۵). همچنین LGG ممکن است مشابه L. ruminus دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه VRE باشد (۳۶) اگر چه این امر اثبات نشده است. LGG ممکن است در مصرف مونو ساکاریدها با VRE رقابت کرده و رشد آن را کند نماید. نشان داده شده است که این مکانیسم سوم تا حدودی علت اثربخشی LGG در مقابل کلستریدیوم دیفیسیل است(۳۷ و ۳۶). علاوه بر اینها، لاکتوباسیل ها اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه تولید می‌کنند که pH کولون را پایین آورده و برای رشد باکتری‌های پاتوژن کمتری مناسب است (۱۸). همچنین ممکن است اثر آن به دلیل تجمع لاکتیک اسید باشد(۳۸). در یک مقاله مروری که به بحث پیرامون معایب و خطرات مصرف پروبیوتیک‌ها در بالین پرداخته شده است، مهم‌ترین معایبی که برای آنها ذکر شده است خطر عفونت با خود پروبیوتیک و گزارشاتی از بروز عفونت به‌دنبال مصرف پروبیوتیک می‌باشد(۳۹). البته این موارد و گزارشات معدود- علی‌رغم اهمیت داشتن- محدود به مواردی است که بیمار دارای عوامل خطری همچون دیابت، سندروم روده کوتاه، جراحی برداشت معده، جراحی قلب، تغذیه غیروریدی، اسهال ویروسی و اسهال آنتی‌بیوتیکی بوده و در نوزادان نارس، کودکان کمتر از یک سال و افراد مسن رخ داده است؛ که می‌توان برای پیشگیری از بروز مشکل در افراد دارای این عوامل خطر از تجویز پروبیوتیک خودداری کرد. علاوه بر این در مورد اختصاصی بودن اثر پروبیوتیک‌ها، برنامه درمانی پروبیوتیکی، مکانیسم اثر پروبیوتیک ها و مکانیسم‌های بیولوژیکی و ایمنی‌زایی آنها قطعیت وجود ندارد. (۳۹). با توجه به نتایج این مطالعه لاکتوباسیلوس رامنوزوس GG می‌تواند کلونیزاسیون انتروکوک‌های مقاوم به ونکومایسین را در دستگاه گوارش کاهش دهد، بنابراین پیشنهاد می‌شود که در پیشگیری از کلونیزاسیون VRE در روده‌ها به جای آنتی بیوتیک از پروبیوتیک استفاده شود. البته با توجه به ناکافی بودن مطالعات، استفاده از پروبیوتیک در درمان عفونت‌های خطرناک و کشنده باید بسیار محتاطانه صورت گیرد و مطالعات بیشتری در این زمینه بایستی صورت گیرد تا به‌طور قطعی بتوان در درمان این عفونت‌ها از پروبیوتیک بهره گرفت.

The Inhibitory Effect of Lactobacillus rhamnosus GG on Vancomycin Resistant *Enterococcus faecalis* Colonization in Mouse

Fazeli H., Ph.D.[1], Mirlohi M., M.Sc.[2], Mohammadi Ghalaei P.[3*]

1. Assistant Professor of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. Ph.D. Student, Nutrition Department, School of Agricultural Sciences, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran
3. Student of pharmacology, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

* Corresponding author, e-mail: parvizm_parviz@yahoo.com

(Received 12 March 2008 Accepted 29 Jan. 2009)

Abstract

Background&Aims: Vancomycin Resistant *Enterococci* (VRE) are among the most common nosocomial pathogens worldwide. The intestinal tract provides a major source for transmission of these bacteria. Probiotics are living microorganisms that moderate use of them has inhibitory effect on intestinal colonization by enteric pathogens. We examined the effect of Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) on inhibition of VRE colonization in mouse model.

Methods: Twenty four mice (Balb/C) were controlled for a week and then were infected to VRE by daily receiving of 1ml oral vancomycin (250µg/ml) and 1ml VRE suspension in MHB ($5\times10^8\ CFU/ml$) for one week. Mice were randomly divided into two groups of treatment and control, and the effect of LGG probiotic was compared in the tow groups. VRE, total *Enterococci*, and enteric gram-negative bacilli counts in feces were determined before and after colonization by VRE.

Results: At first, all mice were colonized by non –Vancomycin Resistant *Enterococci* (mean 5×10^5CFU/g for 7 days), and Vancomycin resistance was not detectable. Following gastric inoculation of VRE and receiving oral vancomycin, VRE was colonized in gastrointestinal tract of all mice (mean 1.6×10^6CFU/g for 7 days). Oral administration of LGG suppressed growth of all *Enterococci*, including the vancomycin-resistant strain in treatment group feces ($P<0.05$).

Conclusion: It is concluded that probiotic can reduce colonization of VRE. More studies on the effect of probiotics in prevention and treatment of VRE and other common pathogens are suggested.

Key words: *Enterococcus faecalis*, Lactobacillus rhamnosus GG, Probiotic

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2009; 16(4): 307-317

References

1. Khudaier BY, Tewari R, Shafiani S, Sharma M, Emmanuel R, Sharma M, *et al.* Epidemiology and molecular characterization of vancomycin resistant Enterococci isolates in India. *Scand J Infect Dis* 2007; 39(8):662-70.
2. Willems RJ, Top J, van Santen M, Robinson DA, Coque TM, Baquero F, Grundmann H, Bonten MJ. Global spread of vancomycin-resistant Enterococcus faecium from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(6):821-8.
3. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in

Enterococcus faecium. *N Engl J Med* 1988; 319(3):157-61.
4. van Horn KG, Gedris CA, Rodney KM. Selective isolation of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1996; 34(4):924-7.
5. Uttley AH, Collins CH, Naidoo J, George RC. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* 1988; 1(8575-6): 57-8.
6. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 1991; 91(3B):72S-75S.
7. Banerjee SN, Emori TG, Culver DH, Gaynes RP, Jarvis WR, Horan T, et al. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980-1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Am J Med* 1991; 91(3B): 86S-9S.
8. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7(4):462-78.
9. Noskin GA, Cooper I, Peterson LR. Vancomycin-resistant Enterococcus faecium sepsis following persistent colonization. *Arch Intern Med* 1995; 155(13):1445-7.
10. Barbara E, Murray H. Vancomycin Resistant Enterococcal Infections. *NEJM* 2000; 9; 342: 710-21.
11. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT, Hoyen CK, Hanrahan JA, Hujer AM, et al. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin - resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med* 2000; 343(26):1925-32.
12. Tambyah PA, Marx JA, Maki DG. Nosocomial infection with vancomycin-dependent enterococci. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(7):1277-81.
13. Yowler CJ, Blinkhorn RJ, Fratianne RB. Vancomycin-dependent enterococcal strains: case report and review. *J Trauma* 2000; 48(4):783-5.
14. Bonten MJ, Slaughter S, Ambergen AW, Hayden MK, van Voorhis J, Nathan C, *et al.* The role of "colonization pressure" in the spread of vancomycin-resistant enterococci: an important infection control variable. *Arch Intern Med* 1998; 158(10):1127-32.
15. Kalocheretis P, Baimakou E, Zerbala S, Papaparaskevas J, Makriniotou I, Tassios PT, *et al.* Dissemination of vancomycin-resistant enterococci among haemodialysis patients in Athens, Greece. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(6):1031-4.
16. Whitman MS, Pitsakis PG, DeJesus E, Osborne AJ, Levison ME, Johnson CC. Gastrointestinal tract colonization with vancomycin-resistant Enterococcus faecium in an animal model. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(6):1526-30.
17. Gorbach SL, Chang TW, Goldin B. Successful treatment of relapsing Clostridium difficile colitis with Lactobacillus GG. *Lancet* 1987; 2(8574):1519.
18. Manley KJ, Fraenkel MB, Mayall BC, Power DA. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. *Med J Aust* 2007; 186 (9): 454-7.
19. Mirlohi M,. Soleimanian-Zad S , Sheikh-Zeiondin M , Fazeli H. Enumeration of lactobacilli in the fecal flora of infant using two different modified de-Man rogosa sharpe media under aerobic and anaerobic incubation. *Pak J Biol Sci* 2008; 11(6): 876-81.
20. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH. Manual of

clinical microbiology. 8th ed., Washington, ASM Press, 2003.
21. Satake S, Clark N, Rimland D, Nolte FS, Tenover FC. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 35(9):2325-30.
22. Anukam K, Osazuwa E, Ahonkhai I, Ngwu M, Osemene G, Bruce AW, Reid G. Augmentation of antimicrobial metronidazole therapy of bacterial vaginosis with oral probiotic Lactobacillus rhamnosus GR-1 and Lactobacillus reuteri RC-14: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Microbes Infect* 2006; 8(6):1450-4.
23. Karmarkar MG, Gershom ES, Mehta PR. Enterococcal infections with special reference to phenotypic characterization & drug resistance. *Indian J Med Res* 2004; 119 Suppl: 22-5.
24. Neguţ M, Szegli L, Georgescu C, Popovici M, Soare L, Călin C, Florescu E. [Simplified diagnostic scheme for Enterobacteriaceae]. *Rev Ig Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol Pneumoftiziol Bacteriol Virusol Parazitol Epidemiol* 1977; 22(3):171-8.
25. Fazeli SA, Ghasemian Safaei H, Mirnejad R. Evolution of effect of Probiotic lactobacillus casei colonization of Enterotoxogenic Escherichia coli in mouse. *J Shahrekord Univ Med Sci* 2004; 6(1): 26-33(In Persian)
26. Fuentes S, Egert M, Jiménez-Valera M, Ramos-Cormenzana A, Ruiz-Bravo A, Smidt H, Monteoliva-Sanchez M. Administration of Lactobacillus casei and Lactobacillus plantarum affects the diversity of murine intestinal lactobacilli, but not the overall bacterial community structure. *Res Microbiol* 2008; 159(4):237-43.
27. Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16(2):204-11.
28. Rice LB. Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *Am J Infect Control* 2006; 34(5 Suppl 1):S11-9; discussion S64-73.
29. Sohn AH, Ostrowsky BE, Sinkowitz-Cochran RL, Quirk SB, Jarvis WR. Evaluation of a successful vancomycin-resistant Enterococcus prevention intervention in a community of health care facilities. *Am J Infect Control* 2001; 29(1):53-7.
30. Montecalvo MA, Horowitz H, Wormser GP, Seiter K, Carbonaro CA. Effect of novobiocin-containing antimicrobial regimens on infection and colonization with vancomycin-resistant Enterococcus faecium. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(3):794.
31. Whitman MS, Pitsakis PG, Zausner A, Livornese LL, Osborne AJ, Johnson CC, *et al.* Antibiotic treatment of experimental endocarditis due to vancomycin- and ampicillin-resistant Enterococcus faecium. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37(10): 2069-73.
32. Ishida-Fujii K, Sato R, Goto S, Yang XP, Kuboki H, Hirano S, *et al.* Prevention of pathogenic Escherichia coli infection in mice and stimulation of macrophage activation in rats by an oral administration of probiotic Lactobacillus casei I-5. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(4):866-73.
33. Forestier C, Guelon D, Cluytens V, Gillart T, Sirot J, De Champs C. Oral

probiotic and prevention of Pseudomonas aeruginosa infections: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study in intensive care unit patients. *Crit Care* 2008; 12(3): R69.

34. Tubelius P, Stan V, Zachrisson A. Increasing work-place healthiness with the probiotic Lactobacillus reuteri: a randomised, double-blind placebo-controlled study. *Environ Health* 2005; 7; 4:25.
35. Mack DR, Michail S, Wei S, McDougall L, Hollingsworth MA. Probiotics inhibit enteropathogenic E. coli adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 1999; 276(4 Pt 1):G941-50.
36. Yun JH, Yim DS, Kang JY, Kang BY, Shin EA, Chung MJ, *et al.* Identification of Lactobacillus ruminus SPM0211 isolated from healthy Koreans and its antimicrobial activity against some pathogens. *Arch Pharm Res* 2005; 28(6): 660-6.
37. Wilson KH, Perini F. Role of competition for nutrients in suppression of Clostridium difficile by the colonic microflora. *Infect Immun* 1988; 56(10): 2610-4.
38. De Keersmaecker SC, Verhoeven TL, Desair J, Marchal K, Vanderleyden J, Nagy I. Strong antimicrobial activity of Lactobacillus rhamnosus GG against Salmonella typhimurium is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 259(1): 89-96.
39. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 2006; 83(6):1256-64; quiz 1446-7.