



# Sıçan Modelinde Vankomisine Dirençli Enterokok Kolonizasyonunu Kontrol Etmek için *Lactobacillus Rhamnosus Gg*, *Saccharomyces boulardii* ve *Pediococcus acidilacticii C69*'un Kullanımı

The Use of *Lactobacillus Rhamnosus Gg*, *Saccharomyces Boulardii*, and *Pediococcus acidilacticii C69* to Control Vancomycin-resistant Enterococci Colonization in a Rat Model

Sevgi Topal<sup>1</sup> (iD), İlker Devrim<sup>2</sup> (iD), Osman Yılmaz<sup>3</sup> (iD), Uygur Saçık<sup>4</sup> (iD), Salih Gözmen<sup>5</sup> (iD), Şener Tulumoğlu<sup>6</sup> (iD), Gamze Gülfıdan<sup>6</sup> (iD), Güven Erbil<sup>4</sup> (iD)

<sup>1</sup> Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Yoğun Bakım Kliniği, İzmir, Türkiye

<sup>2</sup> Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği, İzmir, Türkiye

<sup>3</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>4</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

<sup>5</sup> Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Pediatrik Hematoloji ve Onkoloji Kliniği, İzmir, Türkiye

<sup>6</sup> Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, İzmir, Türkiye

**Makale atfı:** Topal S, Devrim İ, Yılmaz O, Saçık U, Gözmen S, Tulumoğlu Ş ve ark. Sıçan modelinde vankomisine dirençli enterokok kolonizasyonunu kontrol etmek için *Lactobacillus rhamnosus gg*, *Saccharomyces boulardii* ve *Pediococcus acidilacticii c69*'un kullanımı. J Pediatr Inf 2021;15(3):177-184.

## Öz

## Abstract

**Giriş:** Vankomisin rezistan enterokoklar (VRE) sağlık hizmeti ile ilişkili önemli enfeksiyonlardan sorumludur. Bu çalışmada, bir sıçan modelinde üç probiyotik organizmanın VRE kolonizasyonunu ortadan kaldırma veya gastrointestinal (GI) epitelyumdaki hasara karşı koruma yeteneğini araştırdık.

**Gereç ve Yöntemler:** Bu prospektif bir çalışmadır, 28 sıçanda gastrointestinal VRE kolonizasyonu için bir sıçan modeli oluşturulmuş ve 3 sıçan histolojik kontrol grubu için VRE kolonizasyonu olmadan ayrılmıştır. Üç probiyotik organizmanın (*Lactobacillus rhamnosus GG*, *Saccharomyces boulardii* ve *Pediococcus acidilacticii C69*) VRE kolonizasyonu üzerindeki yeteneklerini araştırmak amaçlandı. 3, 5, ve 9. günlerde dışkı örneklerindeki VRE ve probiyotik bakterilerin yoğunlukları ölçüldü. Tüm hayvanlar histolojik inceleme için çalışmanın 9. gününde kurban edildi.

**Objective:** Vancomycin-resistant enterococci (VRE) are responsible for a considerable amount of healthcare-associated infections. In this study, we investigated the ability of three probiotic organisms to eliminate VRE colonization or protect against gastrointestinal (GI) epithelium-induced injury in a rat model.

**Material and Methods:** This was a prospective study and a rat model of gastrointestinal VRE colonization which was created in 28 rats, and 3 rats were separated without VRE colonization for the histological control group. Three probiotic organisms (*Lactobacillus rhamnosus GG*, *Saccharomyces boulardii*, and *Pediococcus acidilacticii C69*) were studied to investigate their ability on VRE colonization. On the 3<sup>rd</sup>, 5<sup>th</sup>, and 9<sup>th</sup> day (d), the densities of VRE and probiotic bacteria in fecal samples were measured. All animals were sacrificed on the 9<sup>th</sup> d of the study for histological examination.

## Yazışma Adresi/Correspondence Address

### Sevgi Topal

Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları  
Eğitim ve Araştırma Hastanesi,  
Çocuk Yoğun Bakım Kliniği  
İzmir-Türkiye

E-mail: sevgi\_topal86@hotmail.com

Geliş Tarihi: 07.07.2020

Kabul Tarihi: 09.01.2021

Çevrimiçi Yayın Tarihi: 28.10.2021

©Telif Hakkı 2021 Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları ve Bağışıklama Derneği.  
Makale metnine www.cocukenfeksiyon.org web sayfasından ulaşılabilir.

**Bulgular:** Probiyotik gruplardaki gastrointestinal VRE yükü, 9. günde serum fizyolojik (SP) grubundan önemli ölçüde azdı ( $p=0.021$ ). Doku örneklerinin histolojik incelemesinde orta-şiddetli değişikliklerin oranı SP grubunda probiyotik gruplara göre anlamlı derecede yüksekti ( $p=0.000$ ). *S. boulardii* grubunun histolojisi diğer iki probiyotik gruptan daha iyi korunmuştur.

**Sonuç:** Hiçbir probiyotik suş VRE kolonizasyonunu azaltsa da ortadan kaldıramadı. Bununla birlikte, tüm probiyotikler gastrointestinal epitel hasarına karşı koruma sağladı ve VRE ile ilişkili hasarlanmayı önledi. *Saccharomyces boulardii*, gastrointestinal hasar için en koruyucu olan suştur. Probiyotiklerin kullanımı VRE ile ilişkili epitel hasarını veya koliti önlemekte araştırmacılar için alternatif bir tedavi yolu olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Bağırsak mikrobiyolojisi, direnç, enfeksiyon, enterobakteri, modelleme

## Giriş

Sindirim sisteminde bulunan enterokoklar, üriner sistem enfeksiyonları, batin içi ve pelvik reaksiyonlar, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, endokardit, bakteriyemi ve neonatal sepsis dahil sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyonlardan yüksek oranda sorumludur (1,2). Nozokomiyal vankomisin dirençli enterokokların (VDE) yaygın bulaş şekli insandan insana temas veya VDE ile kontamine objeler yoluyla. VDE bulaşı açısından en önemli rezervuar kolonize olmuş hastalardır. VDE kolonizasyonunun çoğunluğu sindirim sisteminde gerçekleşse de daha düşük oranlarda deri, genitoüriner sistem ve oral kavite gibi farklı bölgelerde de görülebilmektedir (2,3). Vankomisin dirençli enterokoklar immün yetmezliği olan hastalarda çeşitli enfeksiyonlara sebep olabilirler (3). Bu sebeple, VDE ile sindirim sisteminin kolonize edilmesinin önüne geçilmesi, yayılmayı ve enfeksiyonu sınırlamada önemli bir stratejidir. Ancak, günümüzde etkin VDE dekolonizasyon yöntemi bulunmamakla birlikte VDE'nin nüksetmesi de ilk enfeksiyonu takip eden günler hatta haftalar içerisinde görülebilir (1,2).

Probiyotikler, kolona canlı ulaşan, sindirime dirençli canlı mikroorganizmalar (bakteri ve maya) olarak tanımlanır. Normal kontrol mekanizmaları halen tamamen etkin olduğunda probiyotikler sıçanların normal kolon mukozasının proliferasyon hızını düşürebilir (4). Sağlığa çeşitli şekillerde fayda sağlamaktadırlar. *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) patojenik olmayan bir maya olup biyoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır. Bazı klinik çalışmalar *S. boulardii*'nin çeşitli intestinal hastalığın önlenmesi ve tedavisindeki etkisini göstermiştir. Antibiyotiklerin sebep olduğu diğer sindirim sistemi rahatsızlıkları ve ishalin tedavisi ve önlenmesinde dünyanın birçok ülkesinde *Saccharomyces boulardii* kullanılmaktadır. Enfeksiyona bağlı ishal üzerine yürütülen bir çalışmada, *S. boulardii*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Bifidobacterium bifidum* yüksek oranda etkili bulunmuştur (5). Çocuklarda enfeksiyona bağlı ishal durumlarında *S. boulardii*'nin hem ishal süresini hem de miktarını azalttığı bulunmuştur (6). *Lactobacillus rhamnosus* GG (*L. rhamnosus*) suşu özellikle çocuklarda rotavirüs sebepli ishal durumunda etkili bulunmuştur. Bir hay-

**Results:** Gastrointestinal VRE load in the probiotic groups was significantly decreased more than the serum physiologic (SP) group on the 9<sup>th</sup> d ( $p=0.021$ ). The ratio of moderate to severe changes in the histological examination of tissue samples was significantly higher in the SP group as compared with the probiotic groups ( $p=0.000$ ). The histology of the *S. boulardii* group was better preserved than that in the other two probiotic groups.

**Conclusion:** None of the probiotic strains, despite reducing the load, could not eliminate VRE colonization. However, all probiotics protected against gastrointestinal epithelium damage and prevented VRE-associated injury. *Saccharomyces boulardii* was the most protective in gastrointestinal damage. The use of probiotics might be an alternative treatment way to prevent epithelial damage or colitis associated with VRE for researches.

**Keywords:** Enterobacteria, infection, intestinal microbiology, modeling, resistance

vansal deneyde, çalışma sonuçları laktuloz ve *Pediococcus acidilacticii* (*P. acidilacticii*) ile formüle edilmiş simbiyotiklerin yavru domuzlardaki kolibasilozu önlemede ve iyileştirmede potansiyel yararı olduğunu ortaya koymuştur (7).

Eldeki mevcut kanıtlar, probiyotiklerin sindirim sistemi üzerinde yararlı etkilerinin olduğu fikrini destekler niteliktedir. *L. rhamnosus* ve *S. boulardii* dahil geniş bir probiyotik yelpazesi Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da şu anda mevcuttur (8). Biz, bu çalışmada, sıçan modelinde probiyotiklerin VDE kolonizasyonunu azaltacağını varsaydık. Bu konuya ışık tutmak adına sıçanlarda bir VDE kolonizasyonu modelinde üç probiyotik (*Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), *S. boulardii* (Hansen CBS 5926), and *Pediococcus acidilacticii* C69) mikrobiyolojik ve histolojik etkilerini karşılaştırdık.

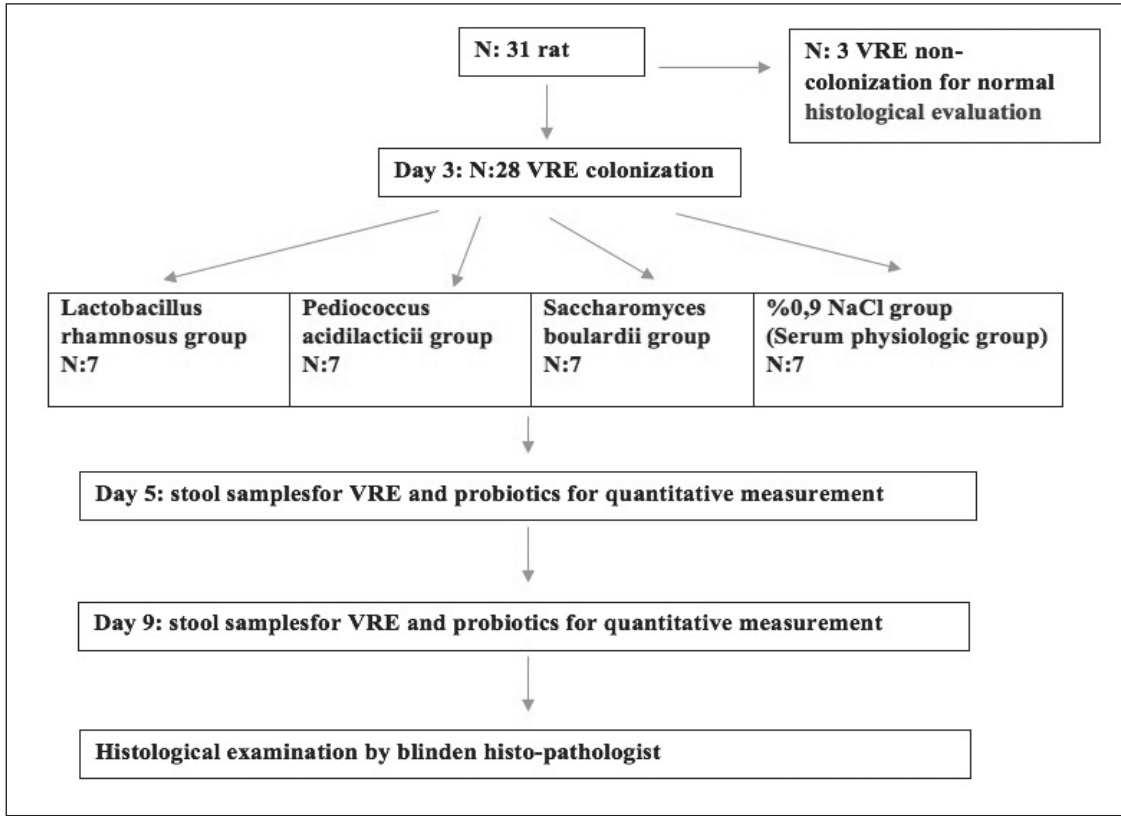
## Gereç ve Yöntemler

### Tasarım

Çalışmamız, bir Tıp Fakültesi Hastanesi Deney Hayvanı Yeterlik Kurulundan onay alındıktan sonra başladı (Protokol Numarası: 114/2013). Bu prospektif çalışmaya 200-250 g ağırlığında, dişi, 31 albino Wistar sıçan dahil edildi. Bölüm 2.2'de tarif edildiği şekilde gastrointestinal VDE kolonizasyonu sıçan modelinde yaratıldı. Sonrasında, kültür ile VDE kolonizasyonu doğrulanan 28 sıçan 4 gruba ayrıldı. Bu 28 sıçandan üçü, histolojik değerlendirme ve karşılaştırmada normal histolojik yapıyı incelemek için herhangi bir serum fizyolojik ve probiyotik solüsyonu verilmeden ayrıldı.

### Sıçan Modeli

Önceden kolonize olmamış üç rastgele seçilmiş dişi IOPS OF1A sıçanları ayrı ayrı kafeslere konuldu ve daha önceki VDE kolonizasyonu için taramadan geçirildi. VDE negatif oldukları tespit edildi. 1.5 mg/mL VDE ( $5 \times 10^9$  CFU (koloni oluşturan doz)/mL) standart solüsyonu ile gastrogavaj (toplam doz: 30 mg/20 mL/kg) uygulandı ve ilk üç sıçanda VDE kolonizasyonu görüldü (Şekil 1). Sonrasında, toplamda 28 sıçan VDE ile kolonize edildi.



Şekil 1. Çalışma planının ana hatları.

### Tedavi Grupları

Farklı mekanizmalar aracılığıyla sindirim sistemini etkilediği gösterilmiş farklı türlerin, probiyotik suçların alt gruplarından birini seçtik. Laboratuvar koşullarında üç farklı türden bir probiyotiği test ettik ve bunu standart solüsyon olarak uygulayıp VDE üzerindeki etkisine baktık. *Lactobacillus* türünden *L. rhamnosus*'u, *Saccharomyces* türünden *S. boulardii*'yi ve *Pediococcus* türünden *P. acidilacticii*'yi seçmemizin amacı bunların bağırsak ve enfeksiyöz ishal üzerindeki pozitif etkilerinin daha önceden gösterilmiş olmasıdır. Probiyotik solüsyon (*L. rhamnosus*, *P. acidilacticii* ve *S. boulardii*) (%0.9 NaCl içinde 4 mg/mL) hazırlandı ve toplamda 5 gün süreyle her bir probiyotik gruptaki sıçana toplam 1.5 mL'lik probiyotik solüsyon ( $2 \times 10^8$  CFU/d'ye eşit) oral gavaj yoluyla verildi. Ayrıca, probiyotik gruplarla karşılaştırma yapmak için SF grubundaki diğer 7 sıçana 5 gün süreyle aynı oranda serum fizyolojik (SF) verildi. Çalışmanın 3., 5. ve 9. günlerinde VDE yoğunlukları ve dışkı örneklerindeki probiyotik bakteriler ölçüldü. Tüm sıçanlar, 5 günlük probiyotik tedavisinin ardından çalışmanın dokuzuncu gününde kurban edildi.

Antibiyotikler VDE inokülasyonundan önce kullanıldığı için bu konu üzerinde yürütülen daha önceki çalışmalarda çalışma süresi daha uzun tutulmuştur (9-13). Biz çalışmamızda antibiyotik kullanmadık. Bu çalışmanın amacı, VDE ile kolonize olmuş sıçanların bağırsak yolunda probiyotiklerin akut histopa-

tojik etkilerini araştırmaktır. Süre uzadıkça karışıklığa neden olabilecek faktörlerin ortaya çıkma ihtimali arttığı için çalışma süresini uzun tutmadık. Bu konuda yürütülen hayvan deneylerinde gruplar yedilerli olarak ayarlandığı için (10,13) biz de gruplarda yedi sıçan olacak şekilde çalışmamızı yürüttük.

### Hayvanların Sakrifiye Edilmesi ve Doku Örnekleme

Genel anestezi ilk olarak eter ile uygulandı (Galenik, Türkiye). Dikey insizyon yapıldı ve örnekler distal ileumdan (2 örnek) (Di), çekumdan (1 örnek) (Ce) ve inen kolondan (Co) alınarak hayvanlar yüksek doz eter anestezisi ile kurban edildi. Örnekler, nötr formaldehid solüsyonunda saklandı ve rutin takip protokol blokları hazırlandı, 5 µm boyutundaki parafinlenmiş doku kesitleri Hematoksilin ve Eozin ile boyandı (Merck, Darmstadt, Almanya) ve ışık mikroskobu altında incelendi. Her bir gruptan 70 örnek alındı ve incelendi.

### Histolojik İnceleme

Histolojik değerlendirme, çalışma gruplarına kör bir histolojist tarafından yapıldı. Tablo 1'de histolojik skorum sistemi tarif edilmiştir.

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz, SPSS Versiyon 15.0 (IBM SPSS, Chicago, IL) kullanılarak yapıldı. Sayısal veriler ortalama  $\pm$  standard sapma (SS) veya ortanca olarak verildi. Nitel veriler ise mutlak ve göreceli sıklık olarak ifade edildi. Kategorik değişkenler  $\chi^2$  testi kul-

**Tablo 1.** Sıçanların gastrointestinal sistemlerinin histopatolojik incelemelerinde kullanılan skorlama sistemi

| Gastrointestinal sistem lümeni              | Skor |
|---|------|
| Debris ya da epitel hücre yok               | 1    |
| Biraz debris var                            | 2    |
| Yoğun glandüler epitel hücre ve debris doku | 3    |
| Bağırsak mukozası                           |      |
| <b>Normal histolojik yapı</b>               | 1    |
| Örneğin %25'inde epitel hasar               | 2    |
| Örneğin %25-%50'sinde epitel hasar          | 3    |
| Örneğin %50'sinden fazlasında epitel hasar  | 4    |
| <b>Lamina propria</b>                       |      |
| Normal                                      | 1    |
| Hafif enflamasyon ve glandüler hiperplazi   | 2    |
| Ciddi enflamasyon ve bezlerde ödem          | 3    |
| <b>Submukosa</b>                            |      |
| Normal histolojik yapı                      | 1    |
| Hafif enflamatuvar infiltrasyon             | 2    |
| Ciddi enflamatuvar infiltrasyon             | 3    |
| <b>Hasar derecesi</b>                       |      |
| Normal                                      |      |
| Grad I (hafif): < 5                         |      |
| Grad II (orta): 6-9                         |      |
| Grad III (ciddi): 10-13                     |      |

lanılarak karşılaştırılırken Student's t-testi veya Mann-Whitney U testi sürekli değişkenler için kullanıldı. Gruplar arası mikrobiyolojik karşılaştırma için üç probiyotik grubun probiyotik yükleri ve 3 zaman diliminde (3., 5. ve 9. günlerde) her bir grubun VDE yükleri kullanıldı. İstatiksel anlamlılık  $p < 0.05$  olarak kabul edildi.

**Tablo 2.** VDE düzeyi ve VDE yükü olarak mikrobiyolojik inceleme ve sakrifiye sonrası hayvanların gastroisntestinal sistem örneklerinin histolojik incelemesi (Min: minimum, Maks: maksimum)

|   | Serum fizyolojik grup   | Probiyotik alt grupları   |   |   |
|---|---|---|---|---|
|   |   | <i>L. rhamnosus</i> GG  | <i>P. acidilacticii</i> C69   | <i>S. boulardii</i>   |
| <b>Mikrobiyolojik inceleme Ortanca (Min-Maks)</b> |   |   |   |   |
| 3. gün  | $6.0 \times 10^{10}$<br>( $2.0 \times 10^{10}$ - $7.0 \times 10^{11}$ ) | $2.0 \times 10^{11}$<br>( $5.0 \times 10^{10}$ - $4.0 \times 10^{12}$ ) | $1.0 \times 10^{12}$<br>( $1.5 \times 10^{11}$ - $5.0 \times 10^{12}$ ) | $1.0 \times 10^{11}$<br>( $3.0 \times 10^{10}$ - $7.0 \times 10^{11}$ ) |
| 5. gün  | $6.0 \times 10^{10}$<br>( $2.0 \times 10^{10}$ - $7.0 \times 10^{11}$ ) | $7.0 \times 10^{10}$<br>( $3.0 \times 10^{10}$ - $7.0 \times 10^{11}$ ) | $7.0 \times 10^{10}$<br>( $8.0 \times 10^9$ - $7.0 \times 10^{11}$ )    | $1.0 \times 10^{10}$<br>( $7.0 \times 10^7$ - $1.0 \times 10^{11}$ )    |
| 9. gün  | $4.0 \times 10^7$<br>( $3.0 \times 10^7$ - $5.0 \times 10^7$ )          | $5.0 \times 10^5$<br>( $100$ - $7.0 \times 10^7$ )                      | $5.0 \times 10^5$<br>( $100$ - $7.0 \times 10^6$ )                      | 1000<br>( $100$ - $4.0 \times 10^5$ )                                   |
| <b>Histolojik inceleme sayı (%)</b>               |   |   |   |   |
| Histolojik olarak normal                          | 0   | 15 (21.4)   | 10 (14.3)   | 23 (32.9)   |
| Grad I (hafif)                                    | 0   | 32 (45.7)   | 45 (64.3)   | 47 (67.1)   |
| Grad II (orta)                                    | 19 (27.1)   | 23 (32.9)   | 0   | 0   |
| Grad III (ciddi)                                  | 51 (72.9)   | 0   | 15 (21.4)   | 0   |

## Bulgular

### Probiyotik Grupları ve SF Grubu Karşılaştırması

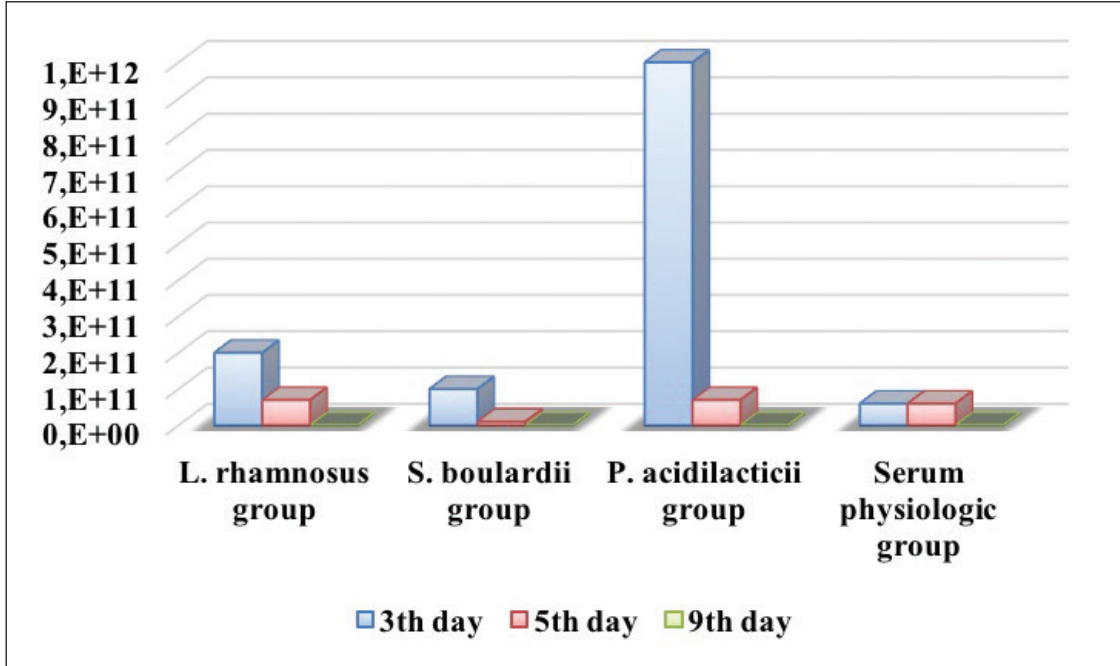
SF grubu ile kıyaslandığında probiyotik gruplarda ortalama gastrointestinal VDE yükü, tedavi öncesi dönemde (zaman çizelgesinin 3. gününde) anlamlı olarak daha yüksekti ( $p = 0.017$ ). SF grubu ile kıyaslandığında probiyotik gruplarda ortalama gastrointestinal VDE yükü, tedavinin 3. gününde (zaman çizelgesinin 5. gününde) anlamlı bir fark bulunmadı ( $p = 0.079$ ) (Tablo 2). SF grubu ile kıyaslandığında probiyotik gruplarda ortalama gastrointestinal VDE yükü, tedavinin 5. günü itibarıyla (zaman çizelgesinin 9. gününde) anlamlı olarak daha düşüktü ( $p = 0.021$ ) (Tablo 2).

*P. acidilacticii* grubundaki ortalama gastrointestinal VDE yükü, SF grubu ile kıyaslandığında, zaman çizelgesindeki 3. günde anlamlı olarak daha yüksekti ( $p = 0.012$ ). *S. boulardii* grubundaki ortalama fekal VDE düzeyleri, tedavinin 5. gününde (zaman çizelgesinin 9. gününde) SF grubuna kıyasla anlamlı olarak daha düşüktü ( $p = 0.002$ ). The median fecal VRE counts of the *L. rhamnosus* grubunun ortalama fekal VDE düzeyleri, değerlendirilen herhangi bir zaman aralığında SF grubuna kıyasla anlamlı derecede farklı bulunmadı ( $p > 0.05$ ) (Tablo 2).

### Probiyotik Grupları (*L. rhamnosus*, *P. acidilacticii*, *S. boulardii*) ve SF Grubundaki Fekal VDE Yüklerin Zaman Çizelgesi Değişimi

Zaman çizelgesinin 3., 5. ve 9. gününde probiyotik ve SF gruplarının fekal VDE yüklerinin karşılaştırması probiyotik gruplarının VDE yüklerinde bir düşüş ortaya koymuş olsa da bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi ( $p > 0.05$ ). Değerlendirilen her üç zaman aralığında probiyotik grupları ve SF grubu arasında fekal VDE yüklerinde anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 2).





Şekil 2. SF grubu ile kıyaslandığında *L. rhamnosus* GG, *S. boulardii* ve *P. acidilacticii* C69 ile tedavi edilmiş sıçanlarda fekal VDE yükü değişimi.

### Gastrointestinal Doku Örneklerinin Histolojik İncelemesi

Probiyotik gruplar ile kıyaslandığında sıçanların gastrointestinal sistemlerinin histolojik incelemesinde görülen orta ve ciddi dereceli değişimlerin oranı SF grubunda anlamlı olarak daha yüksekti ( $p = 0.000$ ) (Tablo 2). Normal görüntülenen histolojik yapılar *S. boulardii* grubunda korunmuşken *P. acidilacticii* ( $p = 0.016$ ) ve SF gruplarında ( $p = 0.000$ ) korunmamıştı. Ancak, *L. rhamnosus* ve *P. acidilacticii* grupları ( $p > 0.05$ ) arasında herhangi bir istatistiksel fark yoktu (Tablo 2). Ayrıca, SF grubunda 70 örneğin hepsi orta veya ciddi derecede etkilenmişti. Buna karşın, probiyotik gruplardaki 210 örneğin sadece 38'i (%18,1) orta-ciddi hasar gösterdi ve orta-ciddi hasar oranı SF grubunda anlamlı olarak daha yüksekti ( $p = 0.000$ ). Orta-ciddi hasar, SF, *P. acidilacticii* ve *L. rhamnosus* gruplarında gözlenenin aksine *S. boulardii* grubunda gözlenmedi ( $p = 0.000$ ) (Tablo 2, Şekil 3).

### Tartışma

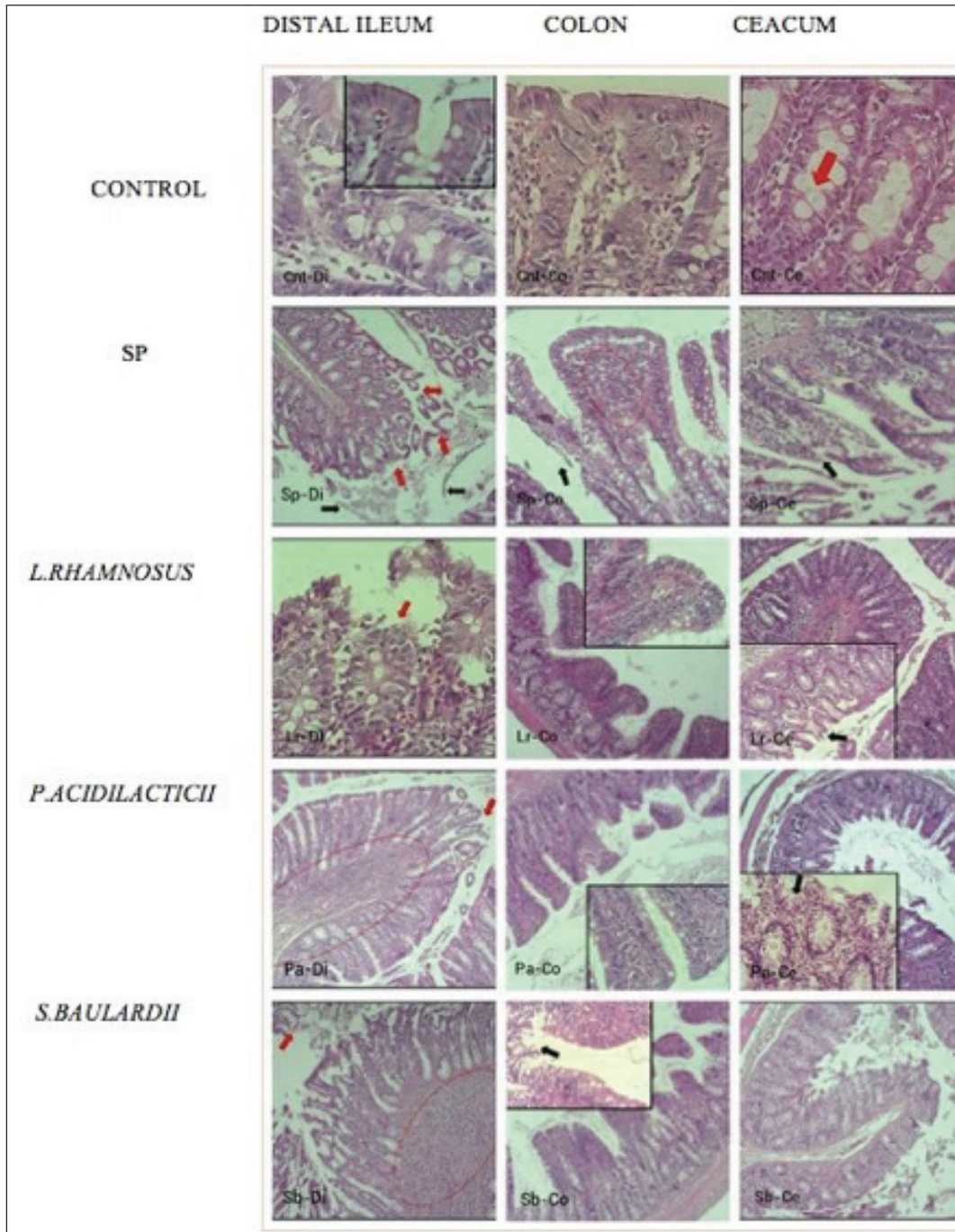
Çalışmamızda, çalışmanın 3. gününde (probiyotikler ve SF suspensiyonu uygulanmadan önce) VDE yükleri anlamlı derecede daha yüksek olsa da probiyotiklerin uygulanmasından sonraki 5. günde VDE düzeyi SF grubundan daha düşük bulundu. Probiyotik grupların hiçbirinde tamamen temiz bir kültüre ulaşılmaya da probiyotiklerin bazı klinik faydaları gözlemlendi. VDE kolonizasyonunu gidermedeki başarısızlığına rağmen, gastrointestinal epitel açısından probiyotiklerin koruyucu etkisi gösterildi. Probiyotik gruplarla karşılaştırıldığında epiteldeki ciddi değişim oranı SF grubunda anlamlı olarak daha yüksekti ( $p = 0.000$ ).

VDE üzerinde probiyotiklerin etkisini araştıran birçok çalışma VDE inokülasyonu öncesinde antibiyotik uygulaması yapılarak düzenlenmişti (9-13). Bizim çalışmamızda ise VDE kolonizasyonunda sadece probiyotik etkileri incelemek istediğimiz için VDE inokülasyonu öncesinde antibiyotik verilmedi. Önceki bir çalışmada antibiyotik kesilmesinden sonraki 7. günde VDE hâkim bakteri olarak bulunmuş ve tedavi sonrası 2. aya kadar da kültürlenmişti (14).

Önceki bir çalışmada, *Lactobacillus lactis* MM19 tespit edilebilir VanA tip VDE oranını azalttığı ve bu durumun probiyotiklerin hızlıca başlanmasına bağlı olduğu bulunmuştur (11). Başka bir çalışmada ise ısıyla ölen *E. faecalis* suşu EC-12 ve tanımlanmamış *Lactobacillus* spp. tavuklarda VDE düzeyinde dikkate değer bir düşüş elde etmiştir (12).

Bizim çalışmamızda, 3 zaman aralığında her bir probiyotik grubu için ortanca fekal VDE düzeyleri SF grubundakilere kıyasla anlamlı olarak daha düşüktü. Ancak, zaman çizelgesi süresince VDE oranlarındaki değişimin istatistiksel analizinin gösterdiği gibi, sıçan modelimizdeki SF grubuna kıyasla probiyotiklerin hiçbir VDE düzeylerini düşürmede üstünlük göstermedi ( $p > 0.05$ ).

Probiyotik uygulaması, murin modellerinde yararlı intestinal mikrobiyotayı artırarak ve immün fonksiyonlarını modüle ederek intestinal VDE kolonizasyonunu engellediği veya ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (13). VDE kolonizasyonu üzerinde probiyotiklerin etkisini araştıran birkaç çalışma vardır ve bu çalışmaların bulguları da uyumsuzdur (13-18). Bir murin modelinde, *L. rhamnosus* Lcr 35 uygulaması VDE kolonizasyonu



**Şekil 3.** Hematoksilin ve Eozin boyama sonrası distal ileum, kolon ve çekum görüntüleri.

**Cnt-Di:** Kontrol grubu, distal ileum normal görüntüsü (Di), **SP-Di:** Serum fizyolojik grup, distal ileum hasarlı görüntüsü (kırmızı oklar) ve salgı bezlerinin taşması ve lümeninde epitel hücreler. Siyah oklar glandüler ve epitel hücre sekresyonunu ve lümeninde dağılmayı belirtir, **L. rhamnosus-Di:** *L. rhamnosus* GG grubu, epitelde yüzeysel hasar (kırmızı ok: glandüler epitel hasar), **P. acidilacticii-Di:** *P. acidilacticii* C69 grubu, vilüste yüzeysel hasar, lamina propriada ve submukozal alanlarda mononükleer enflamatuvar infiltrasyon (noktalı dairesel bölge), **S. boulardii-Di:** *S. boulardii* grubu, enflamatuvar infiltrasyon (dairese bölge), epitel ve lümeninde debris yayılımı (kırmızı ok) ile mukozal ve glandüler hasar mevcut, **Cnt-Co:** Kontrol grubu, kolonun (Co) normal görüntüsü. **SP-Co:** Serum fizyolojik grup, lokal mukozal hasar (siyah ok) ve epitelin altında enflamatuvar hücre infiltrasyonu (dairese bölge), **L. rhamnosus-Co:** *L. rhamnosus* GG grubu, normal kolon ve küçük resimde minimal subepitel enflamatuvar infiltrasyon, **P. acidilacticii-Co:** *P. acidilacticii* C69 grubu, normal kolon ve küçük resimde minimal subepitel enflamatuvar infiltrasyon, **S. boulardii-Co:** *S. boulardii* grubu normal kolon ve küçük resimde minimal epitel hasar (siyah ok). **Cnt-Ce:** Kontrol grubu, çekumun (Ce) normal epitel ve salgı bez yapısı (kırmızı ok) **SP-Ce:** Serum fizyolojik grup, glandüler epitel ve bağ dokusu hücrelerinin lümenine kadar yayılması ile birlikte aşırı derecede hasarlı bölgeler (siyah ok), **L. rhamnosus-Ce:** *L. rhamnosus* GG grubu, normal çekum ve iki görüntünün daha küçükünde daha büyütülmüş boyutta görünümün lokal yüzeysel epitel hasarı (siyah ok) **P. acidilacticii-Ce:** *P. acidilacticii* C69 grubu, iki görüntünün daha küçükünde genel hasar ve glandüler hasar görüldüğü çekum (siyah ok). **S. boulardii-Ce:** *S. boulardii* grubu, yoğun epitel hasar.

oranında bir düşüşe sebep olmuştur. Ancak, aynı çalışmada *L. rhamnosus* Lcr 35 verilen 9 hastada aynı etki gözlemlenmiştir (19). Yarı *L. rhamnosus* içeren yoğurt ile tedavi edilen 27 VDE-pozitif hastanın dahil edildiği bir çalışmada VDE kolonizasyonunda probiyotiklerin faydalı etkisinden söz edilmiştir (15). Randomize, tek kör, plasebo-kontrol grubu olan bir çalışma ise *L. rhamnosus* ile tedavi edilen kolonize edilmiş çocuklarda VDE klerens oranı tedavi almayan gruba kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (15). Bizim çalışmamızda, çalışma süresi 5 gündü. Bunun aksine, birçok geçmiş çalışmada probiyotik ile tedavi süresi 3-4 hafta idi (10,15,17). Bu çalışmalardaki uzun süreler bulguları etkilemiş olabilir. Ayrıca, hayvan çalışmalarında bulgulardaki farklılık, mikrobiyota popülasyonlarındaki çeşitlilik, örneklem büyüklüğü ve muhtemelen kullanılan probiyotik suşlar ile ilişkilidir.

Çeşitli çalışmalar, VDE inhibasyonunda mikrobiyotanın anaerobik kabiliyetinin önemli bir rol oynayabileceğini göstermiştir (16,19,20). Bununla birlikte, VDE gastrointestinal kolonizasyonunun in vivo modellerinde çeşitli probiyotik yiyeceklerin bağırsağın işlevsel bariyerini destekleyebileceğini göstermiştir (21-23). Dahası, in vitro hücre kültür modellerinde gösterildiği gibi, probiyotik suşlar epitel bütünlük üzerinde patojenik mikroorganizmaların hasar verici etkilerini önlemiş ya da minimize etmiştir (24). Biz de bu çalışmamızda VDE-ilişkili epitel hasarında probiyotiklerin koruyuculuğunu ortaya koymakla birlikte üç probiyotik suş içerisinde en etkili olanın *S. boulardii* olduğunu da gösterdik. VDE-kaynaklı epitel hasarının önlenmesi, endojen VDE enfeksiyonlarının gelişmesini ve gastrointestinal kanaldan dolaşıma karışmasını engellemede bir rolü olabilir.

Bu üç mikroorganizmanın etkileri insanlarda da gösterilebilir fakat prospektif, randomize-kontrollü çalışmalara gerek duyulmaktadır. Üç probiyotik suş VDE kolonizasyonunu ortadan kaldırmadı. Histopatolojik olarak *S. boulardii*'nin bağırsak dokusunu iyileştirmede en iyi etkiye sahip olduğunu bulduk. İnsanlarda VDE kolonizasyonunda probiyotiklerin etkisini ve VDE ile kolonize edilmiş hastalarda klinik etkiyi görmek için prospektif, randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır.

## Sonuç

Çalışmamızdaki probiyotik suşların hiçbiri VDE kolonizasyonunu sıçan modelinde ortadan kaldıramadı fakat VDE-ilişkili epitel hasarından ise korudu. Bu üç probiyotik mikroorganizma içerisinde en iyi koruyuculuğu *Saccharomyces boulardii* sağladı. *Lactobacillus rhamnosus* GG ve *P. acidilacticii* epitel hasarı sınırlı derecede engelleyebildi. VDE kolonizasyonu sonrası enfeksiyonu engellemek için VDE-ilişkili epitel hasar veya koliti önlemede probiyotikler üzerine yeni stratejiler geliştirilmelidir.

**Etik Komite Onayı:** Çalışma için, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Deney Hayvanı Yerel Etik Kurulundan onay alındı (Protokol Numarası: 114/2013).

**Hakem Değerlendirmesi:** Dış bağımsız.

**Yazar Katkıları:** Fikir ve tasarım - ST, ID, OY, GE; Dizayn - ST, ID, OY, GE; Denetleme - ST, ID; Kaynaklar - ST, OY; Veri toplanması ve/veya işleme - ST, ID, OY, GE; Analiz ve/veya yorum - ST, ID, OY, GE; Literatür taraması - ST, ID, OY; Yazıyı yazan - ST, ID, GE; Eleştirel inceleme - ST, ID, OY, GE.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

**Finansal Destek:** Yazarlar bu çalışma için finansal destek almadıklarını beyan etmişlerdir.

## Kaynaklar

1. Baden LR, Critchley IA, Sahm DF. Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci repopulating the gastrointestinal tract following treatment with a novel glycolipopeptide, ramoplanin. *J Clin Microbiol* 2002;40:1160-3. [CrossRef]
2. Bonten MJ, Hayden MK, Nathan C, Rice TW, and Weinstein RA. Stability of vancomycin-resistant enterococcal genotypes isolated from long-term-colonized patients. *J Infect Dis* 1998;177:378-82. [CrossRef]
3. Linden PK. Optimizing therapy for vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Semin Respir Crit Care Med* 2007;28:632-45. [CrossRef]
4. Linsalata M, Russo F, Berloco P. Effects of probiotic bacteria (VSL#3) on the polyamine biosynthesis and cell proliferation of normal colonic mucosa of rats. *In vivo* 2005;19:989-95. [CrossRef]
5. McFarland L. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Med Infect Dis* 2007;5:97-105. [CrossRef]
6. Kurugol Z and Koturoglu G. Effects of *Saccharomyces boulardii* in children with acute diarrhea. *Acta Pediatr* 2005;94:44-7. [CrossRef]
7. Kim BR, Cho KJ, Kim D. Evaluation of synbiotics as gut health improvement agents against Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from the pig. *J Anim Sci Technol* 2019;61:55-60. [CrossRef]
8. Ringel Y, Quigley EMM, Lin HC. Using Probiotics in Gastrointestinal Disorders. *Am J Gastroenterol Suppl* 2012;1:34-40. [CrossRef]
9. Dever LL and Handwerker S. Persistence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* gastrointestinal tract colonization in antibiotic-treated mice. *Microb Drug Resist* 1996;2:415-21. [CrossRef]
10. Crouzet L, Rigottier-Gois L, Serron P. Potential use of probiotic and commensal bacteria as non-antibiotic strategies against vancomycin-resistant enterococci. *FEMS Microbiol Lett* 2015;362:4-12. [CrossRef]
11. Millette M, Cornut G, Dupont C, Shareck F, Archambault D, and Lacroix M. Capacity of human nisin and pediocin-producing lactic acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:1997-2003. [CrossRef]
12. Sakai Y, Tsukahara T, Bukawa W, Matsubara N, Ushida K. Cell preparation of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 prevents vancomycin-resistant enterococci colonization in the cecum of newly hatched chicks. *Poult Sci* 2006;85:273-7. [CrossRef]
13. Vidal M, Forestier C, Charbonnel N, Henard S, Rabaud C, Lesens O. Probiotics and intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in mice and humans. *J Clin Microbiol* 2010;48:2595-8. [CrossRef]
14. Cetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:686-707. [CrossRef]
15. Manley KJ, Fraenkel MB, Mayall BC, Power DA. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomized controlled trial. *Med J Aust* 2007;186:454-7. [CrossRef]
16. Ubeda C, Taur Y, Jenq RR. Vancomycin-resistant *Enterococcus* domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest* 2010;120:4332-41. [CrossRef]



17. O'Driscoll T, Crank CW. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology, clinical manifestations, and optimal management. *Infect Drug Resist* 2015;8:217-30. [\[CrossRef\]](#)
18. Donskey CJ, Huyen CK, Das SM, Farmer S, Dery M, Bonomo RA. Effect of oral *Bacillus coagulans* administration on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized mice. *Lett Appl Microbiol* 2001;33:84-8. [\[CrossRef\]](#)
19. Donskey CJ, Hanrahan JA, Hutton RA, Rice LB. Effect of parenteral antibiotic administration on persistence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in the mouse gastrointestinal tract. *J Infect Dis* 1999;180:384-90. [\[CrossRef\]](#)
20. Szachta P, Ignys I, Cichy W. An evaluation of the ability of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG to eliminate the gastrointestinal carrier state of vancomycin-resistant enterococci in colonized children. *J Clin Gastroenterol* 2011;45:872-7. [\[CrossRef\]](#)
21. Thomas CM, Versalovic J. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes* 2010;1:148-63. [\[CrossRef\]](#)
22. Donskey CJ, Chowdhry TK, Hecker MT. Effect of antibiotic therapy on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized patients. *N Engl J Med* 2000;343:1925-32. [\[CrossRef\]](#)
23. Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol* 2013;6:39-51. [\[CrossRef\]](#)
24. Yu Q, Yuan L, Deng J, Yang Q. *Lactobacillus* protects the integrity of intestinal epithelial barrier damaged by pathogenic bacteria. *Front in Cell Infect Microbiol* 2015;5:26. [\[CrossRef\]](#)