مقایسه اثرات آنتی‌باکتریالی کوکتل باکتریوفاژ لیتیک و سیپروفلوکساسین بر سویه‌های باکتری *سالمونلا انتریکا* - مطالعه درون آزمایشگاهی

محّمدرضا اسماعیل‌زاده: دانشجوی کارشناس ارشد میکروب شناسی مواد غذایی، گروه میکروب‌شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
زهرا رجبی: دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، کارمند مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
محّمد مهدی سلطان دلال: استاد میکروب شناسی، گروه میکروب‌شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران، و مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول). msoltandallal@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: سالمونلوزیس یک گاستروانتریت ناشی از آلودگی با سروتایپ‌های مختلف باکتری *سالمونلا* می‌باشد. *سالمونلا انتریکا* زیر گونه *انتریکا*، سویه‌های *انتریتیدیس*، *تیفی‌موریوم* و *اینفنتیس* بعنوان مهم‌ترین عوامل گاستروانتریت در انسان از اهمیت جهانی خاصی برخوردار شده‌اند که در سال‌های اخیر بطور روز افزون به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و مصرفی در درمان مقاوم شده‌اند. هدف اصلی از این مطالعه مقایسه اثرات آنتی‌باکتریالی کوکتل باکتریوفاژ لیتیک و سیپروفلوکساسین بر سویه‌های باکتری *سالمونلا انتریکا* در شرایط آزمایشگاهی است.

روش کار: سویه‌های استاندارد *سالمونلا* (*انتریتیدیس*، *تیفی موریوم* و *اینفنتیس*) از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه و باکتریوفاژ اختصاصی آن‌ها با روش Soft agar جداسازی گردید. اختصاصیت باکتریوفاژها نسبت به سه سویه *سالمونلا* و باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا دیسانتری* و *اشریشیا کلی انترو پاتوژنیک* با استفاده از روش لکه‌گذاری نقطه‌ای (Spot Test) مورد بررسی قرار گرفت. تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی با استفاده از روش E-Test انجام گرفت. به منظور دستیابی به تیتر مناسب جهت بررسی نتایج درمانی، غلظت‌های مختلف از باکتریوفاژ با باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت اثر پیشگیری کننده و درمانی در مقایسه با سیپروفلوکساسین مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: باکتریوفاژها با غلظت‌های متفاوت، توانایی مناسبی در کاهش شمار و حذف سویه‌های *سالمونلا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*) از خود نشان دادند. پلاک‌های اختصاصی باکتریوفاژها علیه سویه‌های دیگر *سالمونلا* و سایر باکتری‌های پاتوژن روده‌ای، فاقد عملکرد لیتیک بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده نشان داد که باکتریوفاژها بصورت اختصاصی عمل می‌کنند. با توجه به افزایش روز افزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی و نگرانی در خصوص درمان، باکتریوفاژها می‌توانند پیشنهاد مناسبی برای کاربرد آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی باشند.

کلیدواژه‌ها: گاستروانتریت، *سالمونلا انتریکا*، باکتریوفاژ، سیپروفلوکساسین

مقدمه

بیماری‌های منتقله از طریق مواد غذایی یکی از مهمترین مشکلات سلامت عمومی می‌باشند که هر سال موجب ابتلاء و مرگ و میر تعداد قابل توجهی از مردم می‌شوند (۱). طبق گزارش‌های مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها در ایالات متحده Centers for Disease Control and Prevention (CDC)، سالانه ۷۶ میلیون مورد بیماری در اثر مصرف مواد غذایی آلوده اتفاق می‌افتد که تقریباً ۵۰۰۰ مورد از آنها به مرگ می‌انجامد (۲). همواره بخشی از بیماری‌های منتقله از غذا، ناشی از مصرف تخم مرغ، گوشت طیور و فرآورده‌های آن می‌باشد (۳). باکتری *سالمونلا* یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه است که به صورت باسیل‌های گرم منفی هستند و اکثر سویه‌های (Serotype) آن توانایی حرکت را دارا می‌باشند. این جنس به صورت هوازی یا بی‌هوازی اختیاری است و بهترین شرایط رشد آن دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. گونه‌های *سالمونلا* به عنوان یکی از مهمترین آلوده کننده‌های مواد غذایی و از عوامل ایجاد کننده گاستروانتریت (التهاب معدی‌روده‌ای) در انسان به شمار می‌آیند. در جنس *سالمونلا* بیش از ۲۶۰۰ سویه وجود دارد که بسیاری از این سویه‌ها، پاتوژن‌های مهمی برای انسان‌ها و حیوانات محسوب می‌شوند (۴).

در ایران نیز گزارش‌های متعددی از اپیدمی‌های مربوط به سویه‌های *سالمونلا انتریکا* زیرگونه

انتریکا سویه‌های *انتریتیدیس*، *تیفی‌موریوم* و *اینفنتیس* انتشار یافته است (۵). آلودگی سالمونلایی در انسان موجب مسمومیت غذایی خفیف، التهاب معدی‌روده‌ای (Gastroenteritis)، حصبه (Typhoid fever) و گاهی اوقات مسمومیت خونی کشنده (Septicemia) می‌شود. ممکن است آلودگی به *سالمونلا* بدون هیچ گونه علائمی نیز رخ دهد (۶). پیدایش مقاومت در این پاتوژن عمدتاً به دلیل افزایش استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها در مراکز درمانی و صنایع پرورش طیور بوده که به مشکلی جهانی تبدیل گشته است (۷). سویه‌های باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک از طریق محصولات طیور به انسان منتقل می‌شوند. همین امر موجب می‌شود که آنتی‌بیوتیک‌های درمانی در مورد انسان، موثر واقع نشود. امروزه باقی ماندن آنتی‌بیوتیک در تولیدات طیور موجب ممنوعیت استفاده از آن در خیلی از کشورها شده است (۸).

استفاده از باکتریوفاژ به عنوان راهکاری نوین در کاهش آلودگی مزارع پرورش طیور به باکتری‌های مشترک بین انسان و پرندگان، رویکردی مناسب می‌باشد (۹). باکتریوفاژها (یا به اختصار فاژها)، ویروس‌هایی هستند که باکتری‌ها را آلوده می‌نمایند. آنها دارای دو چرخه زندگی لیتیک و لیزوژنیک می‌باشند. فاژهای لیتیک مناسب‌ترین گزینه برای فاژ درمانی هستند. در این چرخه فاژ به سرعت تکثیر شده و سلول میزبان در جریان تولید فاژهای جدید، کشته می‌شود (۱۰).

تقریباً از صد سال پیش باکتریوفاژها به منظور مقابله با عفونت‌های باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گرفتند. اما پس از کشف آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده از آنها، کاهش و تا حدی به فراموشی سپرده شدند. امروزه با پیدایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، محققین جهت درمان، به استفاده از فاژها تمایل پیدا کرده‌اند. باکتریوفاژها برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها، اختصاصی عمل می‌نمایند و تعادل طبیعی میکروفلور روده را بر هم نمی‌زنند. همچنین در قسمتی از دستگاه گوارش که میزبان آنها وجود دارد تکثیر می‌شوند. بنابراین در محل عفونت که وجودشان ضروری تر است، حضور می‌یابند و میزبان خود را که همان باکتری عامل عفونت است را بصورت کاملاً اختصاصی، از بین می‌برند (۱۱). مطالعات Sillankorva و همکارانش (۲۰۱۲) و Lubov Y. Brovko و همکارانش (۲۰۱۲) نشان داد که از باکتریوفاژ برای تشخیص و کنترل میکروبی پاتوژن‌ها در مواد غذایی می توان استفاده کرد. در این بررسی‌ها، فاژها مناسب‌تر و سودمندتر از آنتی‌بیوتیک ها شناخته شدند و از آنها بعنوان عوامل ضد میکروبی اختصاصی‌تر یاد شده است (۱۳،۱۲). هدف اصلی از این مطالعه مقایسه اثرات آنتی‌باکتریالی کوکتل باکتریوفاژ لیتیک و سیپروفلوکساسین بر سویه‌های باکتری *سالمونلا انتریکا* در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی-آزمایشگاهی است. مطالعات این پژوهش شامل نمونه‌گیری و جداسازی باکتریوفاژها در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۳۹۵ انجام شد. سویه‌های باکتری *سالمونلا انتریکا*، *سالمونلا تیفی موریوم* *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028)، *سالمونلا انتریتیدیس* *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076)، *سالمونلا اینفنتیس* *Salmonella infantis* (ATCC 51741) از گنجینه میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد.

جداسازی، خالص سازی، تکثیر و شمارش باکتریوفاژ: به منظور جداسازی باکتریوفاژ، ابتدا نمونه مدفوع طیور در مقدار معینی آب مقطر مخلوط شد. با استفاده از سانتریفیوژ (سیگما، آلمان) محلول مخلوط شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۱۵۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. سپس محلول سانتریفیوژ شده با استفاده از صافی ۰/۲۲ میکرومتر (جت بایوفیل، چین) صاف شد. به منظور جستجوی پلاک از یک کشت دولایه بر روی پلیت با پایه آگار به شرح زیر استفاده شد. مقداری از محلول سانتریفیوژ شده و چند میلی‌لیتر از کشت ۱۲ ساعته هر یک از

سویه‌های باکتری باکتری *سالمونلا انتریکا* (*تیفی-موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*)، به محیط مایع Brain heart infusion (BHI) (مرک، آلمان) با ۰/۷٪ آگار اضافه و بر روی پلیت حاوی محیط BHIمایع با پایه ۱/۵٪ آگار بصورت سطحی اضافه شد (۱۴).

پس از بسته شدن آگار در محیط و انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و مشاهده پلاک (نقاط شفافی که ناشی از لیز سلول‌های باکتری توسط باکتریوفاژ است)، با استفاده از پیپت پاستور استریل کمی از آن برداشته و به مدت ۲۴ ساعت در محیط BHI مایع جهت غنی سازی اضافه و سپس از فاژ غنی شده به منظور جستجوی مجدد پلاک استفاده شد. به منظور خالص سازی فاژ، تمامی مراحل پنج مرتبه تکرار گردید (۱۵). پس از خالص سازی باکتریوفاژ، تعداد ذرات سوسپانسیون فاژی تعیین شد. بدین منظور ابتدا رقت‌های سریال ده‌تایی از 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه شدند. پس از افزودن مقدار معینی از هر رقت فاژ و کشت ۱۲ ساعته باکتری به BHI مایع با ۰/۷٪ آگار اضافه شد. مجدداً هر کدام از رقت‌ها به طور جداگانه به پلیت با پایه BHI آگار (مرک، آلمان) اضافه شدند. پس از شمارش پلاک‌ها (توسط تقسیم بندی مناطق روی پلیت و بصورت چشمی شمارش گردید)، تعداد ذرات سوسپانسیون فاژی محاسبه گردید (۱۶).

$$\text{تعداد ذرات ویروسی}\left(\text{فاژها}\right)\text{در } 1ml = \frac{\text{تعداد پلاک}}{\text{حجم محلول فاژ} \times \text{فاکتور رقت}}$$

Salmonella enteritidis:

$$\frac{162}{0.0001 \times 0.1} = 1.62\times10^{7}$$

Salmonella typhimurium:

$$\frac{180}{0.0001 \times 0.1} = 1.8\times10^{7}$$

Salmonella infantis: $\frac{100}{0.0001 \times 0.1} = 1\times10^{7}$

ارزیابی کارایی باکتریوفاژ جداسازی شده در شرایط آزمایشگاهی: اثرات باکتریوسیدی باکتریوفاژهای جداسازی شده بر سویه‌های باکتری *سالمونلا انتریکا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*) با استفاده از میزان جذب نوری محیط کشت نوترینت مایع (مرک، آلمان) حاوی باکتری در صورت وجود فاژ و عدم وجود آن مورد بررسی قرار گرفت. به همین جهت ۴ محیط کشت، هر کدام حاوی ۶۰ میلی‌لیتر نوترینت مایع (مرک، آلمان) تهیه شد (۱۷).

به محیط کشت شماره ۱ به عنوان شاهد چیزی اضافه نشد. به سری محیط کشت شماره ۲ فقط ۲۰۰۰ ماکرولیتر (µl) باکتریوفاژ اختصاصی هر یک از سویه‌های باکتری *سالمونلا انتریکا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*) و به سری محیط کشت شماره ۳، ۵۰۰ ماکرولیتر از سویه‌های باکتری *سالمونلا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*) و ۲۰۰۰ ماکرولیتر از باکتریوفاژهای اختصاصی آنها افزوده شد. به سری محیط کشت شماره ۴ فقط ۵۰۰ ماکرولیتر از سویه‌های باکتری *سالمونلا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*) افزوده شد. سپس همه محیط‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. از زمان انکوباسیون تا ۲۰ ساعت بعد، هر یک ساعت یکبار، ۱ میلی‌لیتر از هر محیط کشت برداشته و با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر جذب نوری آن قرائت شد (۱۷).

غلظت‌های مختلفی از کوکتل باکتریوفاژها (باکتریوفاژهای جداسازی شده که به صورت مخلوط با هم ترکیب شدند) 2×10^{8}، 2×10^{9}، 2×10^{10} به لوله های حاوی باکتری اضافه شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور متحرک، گرماگذاری شد و به طور متناوب هر ۳۰ دقیقه در چگالی نوری OD=۶۰۰ (Optical density) نانومتر، نمونه اندازه گیری شد. نتایج حاصل از شمارش باکتریوفاژها در لوله‌های دارای تعدد عفونت یا (MOI) Multiplicity of infection مختلف و طی سه بار برای هر زمان ۱ ساعته کنترل، و میزان OD اندازه‌گیری شد.

تعیین میزبان و اختصاصیت باکتریوفاژ: تعیین اختصاصیت باکتریوفاژها برای سویه‌های باکتری *سالمونلا (تیفی‌موریوم، انتریتیدیس و اینفنتیس)* با استفاده از روش تست لکه گذاری نقطه‌ای (Spot test) انجام پذیرفت (۱۸). به منظور تعیین اختصاصیت کوکتل باکتریوفاژی حاصل از سویه‌های باکتری *سالمونلا (تیفی‌موریوم، انتریتیدیس و اینفنتیس)* مجدداً از روش تست لکه گذاری نقطه‌ای استفاده گردید. طی این فرایند، دو گروه برای انجام اختصاصیت باکتریوفاژ انتخاب گردید:

گروه اول: باکتری‌های غیر از جنس *سالمونلا (استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا دیسانتری و انترو پاتوژنیک اشریشیا کلی)*

گروه دوم: سویه‌های باکتری *سالمونلا (تیفی‌موریوم، انتریتیدیس و اینفنتیس)*

هر جنس باکتری یک شبانه روز در محیط BHI مایع رشد داده شد تا در فاز لگاریتمی قرار گرفت. ۱۰۰ ماکرولیتر از کشت را با ۴ میلی‌لیتر از BHI مایع با پایه ۰/۷٪ آگار خوب مخلوط کرده و سپس با آن سطحBHI مایع با پایه ۱/۵٪ آگار، پوشانده شد. پس از بسته شدن، ۱۰ ماکرولیتر از سوسپانسیون باکتریوفاژ به سطح رویی آگار بدون اینکه سر سمپلر با سطح تماس بر قرار کند، اضافه و یک شبانه روز در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، گرماگذاری و حساسیت به باکتریوفاژ، بررسی گردید. حساسیت به باکتریوفاژ توسط ایجاد هاله شفاف مشخص گردید.

روش **E.test** در تعیین حساسیت سویه‌های باکتری *سالمونلا انتریکا (تیفی‌موریوم، انتریتیدیس و اینفنتیس)* به روی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین: در این روش پس از تهیه سوسپانسیون باکتریایی به روش نیم مک‌فارلند، آن را روی پلیت مولر هینتون آگار (مرک،آلمان) توسط سواب استریل به روش کشت چمنی منتقل نموده و سپس نوارهای E.test را که معرف آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بود، بر روی پلیت آگار قرار داده و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، منطقه هاله عدم رشد بصورت مثلثی شکل ایجاد شد و سپس با مراجعه به جدول ارائه شده توسط شرکت سازنده نوارهای E.test (AB.BioDisk, Solna Sweden) حساسیت سویه‌های باکتری *سالمونلا (تیفی‌موریوم، انتریتیدیس و اینفنتیس)* به آنتی‌بیوتیک مذکور تعیین گردید.

یافته‌ها

بررسی تست کدورت در طول موج ۶۰۰ نانومتر: طی ۲۰ ساعت آزمایش جذب نوری محیط کشت‌های شماره ۱ و ۲ به عنوان گروه‌های شاهد، تغییری نشان نداد. با توجه به نتیجه به دست آمده، با وجود عدم تغییر چشمگیر در جذب نوری محیط کشت حاوی باکتریوفاژ و باکتری (گروه ۳)، جذب نوری کشت باکتریایی در غیاب فاژ (گروه ۴) بطور پیوسته رو به افزایش بود (جدول۱).

اختصاصیت باکتریوفاژهای جداسازی شده نسبت به سویه‌های باکتری *سالمونلا (تیفی‌موریوم، انتریتیدیس و اینفنتیس)*: در مطالعه حاضر باکتریوفاژهای جداسازی شده برای بررسی اختصاصیت باکتریوفاژهای جداسازی شده و حساسیت سویه‌های مورد مطالعه به آنها ، اثر هر باکتریوفاژ بر هر کدام از سویه‌های *سالمونلای* مورد مطالعه، ارزیابی شد. هر سه سویه باکتری *سالمونلا انتریکا (تیفی‌موریوم، انتریتیدیس و اینفنتیس)* بصورت اختصاصی نسبت به این باکتریوفاژها حساسیت نشان دادند. شفافیت هاله عدم رشد در روش تست لکه گذاری نقطه‌ای در مورد این سویه‌ها به خوبی مشاهده شد و تاثیر مثبت باکتریوفاژهای جداسازی در کنترل و حذف عامل بیماریزا، اثبات گردید (شکل۱).

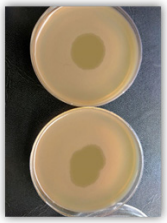
اختصاصیت کوکتل باکتریوفاژی: تمام سویه‌های مورد مطالعه باکتری *سالمونلا انتریکا (تیفی‌موریوم، انتریتیدیس و اینفنتیس)* به باکتریوفاژهای اختصاصی خود حساسیت کامل نشان دادند که در روش تست لکه گذاری نقطه‌ای نتایج به خوبی نشان داده شد و دیگر پاتوژن‌های روده‌ای مورد مطالعه، حساسیتی به این باکتریوفاژهای جداسازی شده نشان ندادند (شکل۲).

بررسی نتایج خاصیت آنتی‌باکتریال کوکتل باکتریوفاژ نسبت به سویه‌های باکتری *سالمونلا*

جدول ۱- مقادیر جذب نوری حاصل از لوله‌های حاوی کدورت ۱۰، ۱ و ۰/۱ و لوله کنترل (PBS)

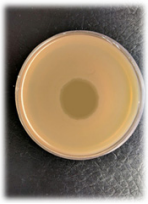
رقت / ساعت	کنترل۱ (PBS)	کنترل۲ (PBS)	کنترل۳ (PBS)	۱۰ *S.e*	۱۰ *S.t*	۱۰ *S.i*	۱ *S.e*	۱ *S.t*	۱ *S.i*	۰/۱ *S.e*	۰/۱ *S.t*	۰/۱ *S.i*
۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱
۱	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۲۸	۰/۲۳	۰/۲۵	۰/۲۴	۰/۳۸	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۶	۰/۳۷	۰/۳۶
۲	۰/۵۱	۰/۵۲	۰/۵۱	۰/۴۷	۰/۴۶	۰/۴۶	۰/۴	۰/۵	۰/۵	۰/۵۳	۰/۵۲	۰/۵۱
۳	۰/۶۱	۰/۶۲	۰/۶	۰/۱	۰/۱۱	۰/۱	۰/۳	۰/۳۱	۰/۳	۰/۵۱	۰/۵۲	۰/۵۱
۴	۰/۷۲	۰/۷۲	۰/۷۴	۰/۰۷	۰/۰۸	۰/۰۸	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۱۱	۰/۲۲	۰/۲۱	۰/۲
۵	۰/۸۳	۰/۸۴	۰/۸۶	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۱	۰/۱۱	۰/۱	۰/۱۸	۰/۱۷	۰/۱۸
۶	۰/۹	۰/۹	۰/۸۹	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۱
۷	۰/۹۶	۰/۹۵	۰/۹۷	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۰۹	۰/۰۹
۸	۱/۱	۱/۱۷	۱/۱۴	۰/۰۱	۰	۰	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۴	۰/۰۵	۰/۰۵
۹	۱/۲۴	۱/۲۲	۱/۲	۰	۰	۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۳	۰/۰۳
۱۰	۱/۳۲	۱/۳۵	۱/۳۳	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰	۰	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱
۱۱	۱/۴۱	۱/۴	۱/۳۸	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰	۰
۱۲	۱/۴۳	۱/۴۴	۱/۴۶	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۰۱

انتریکا (*انتریتیدیس*، *تیفی‌موریوم*، *اینفنتیس*) در مقایسه با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین: نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به سیپروفلوکساسین



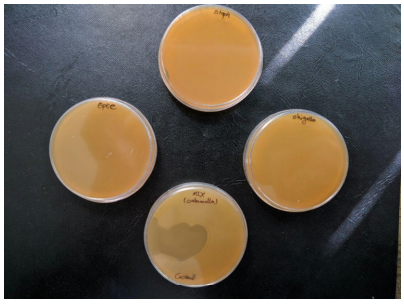
Salmonella enterica serovar *Enteritidis*

Salmonella enterica serovar Typhimurium



Salmonella enterica serovar Infantis

شکل ۱- اختصاصیت باکتریوفاژهای جداسازی شده در برابر سویه‌های باکتری *سالمونلا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*)



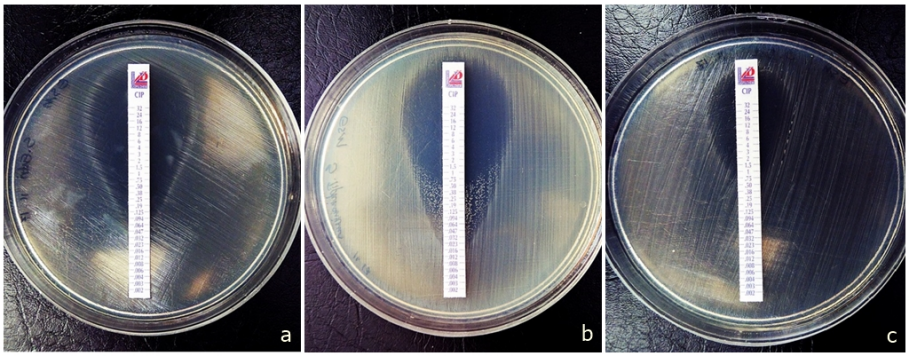
شکل ۲- تعیین اختصاصیت کوکتل باکتریوفاژی جداسازی شده بر روی مخلوط سویه‌های باکتری *سالمونلا انتریکا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*)

به وسیله نوار E.test برای سویه‌های باکتری *سالمونلا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*) به آنتی‌بیوتیک مذکور بررسی و نتایج به شرح زیر گزارش گردید (شکل ۳):

با توجه به تصاویر و نتایج حاصل شده از جدول ارائه شده توسط شرکت سازنده نوارهای E.test، سویه‌های *انتریتیدیس* و *تیفی‌موریوم* به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین حساسیت حد واسط نشان دادند و سویه *اینفنتیس* نسبت به این آنتی‌بیوتیک، مقاوم بود که عدم توانایی مناسب این آنتی‌بیوتیک انتخابی در حذف سروتایپ‌های مورد مطالعه را گزارش می‌کند.

بحث و نتیجه‌گیری

سالمونلا انتریکا در ناحیه گوارشی (روده و حفره ابتدای روده) پستانداران، پرندگان و خزندگان زندگی می‌کند و به مدت طولانی در آب یا خاک یا در مواد غذایی می‌تواند باقی بماند. بیشتر موارد انسانی سالمونلوزیس در نتیجه هضم غذا بویژه غذای حیوانی و گاهی میوه‌جات و سبزیجات آلوده شده با مدفوع انسانی و یا حیوانی اتفاق می‌افتد. تظاهرات بالینی سالمونلوزیس انسانی از التهاب معدی‌روده‌ای تحت بالینی تا باکتریمی (وجود باکتری در خون) شدید، مننژیت (التهاب غشاء اطراف مغز و نخاع) و اشکال دیگر عفونت‌های خارج روده‌ای می‌باشد (۱۹). بیش از ۲۳۰۰



شکل ۳- نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به سیپروفلوکساسین به وسیله نوار E.test برای سویه‌های باکتری *سالمونلا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*)

a: حساسیت باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* (تقاطع هاله با نوار: ۰/۱۲۵)

b: حساسیت باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* (تقاطع هاله با نوار: ۰/۵)

c: حساسیت باکتری *سالمونلا اینفنتیس* (تقاطع هاله با نوار: ۱)

جدول ۲- تفسیر و نقطه شکست MIC سیپروفلوکساسین برای *سالمونلا* بر اساس جدول CLSI

MIC breakpoints	Earlier CLSI (mg/L)			CLSI 2012 (mg/L)			EUCAST 2012 (mg/L)	
	S	I	R	S	I	R	S	R
	≤1	2	≥4	≤0.06	0.12-0.5	≥1.0	≤0.064	≥0.064

سروتایپ شناخته شده از *سالمونلا انتریکا* (۲۰) موجود می‌باشد که تفاوت‌های زیادی در شدت بیماریزایی از خود نشان می‌دهند (۲۱).

به علت وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی وسیع در جدایه‌های *سالمونلا انتریکا*، فلوروکینولون‌ها و سفالوسپورین‌های نسل سوم ،آنتی‌بیوتیک‌های مهیا و موثر برای درمان می‌باشند که مصرف مکرر آنها در درمان *سالمونلا انتریکا*، موجبات دیگر اختلالات بالینی را فراهم می‌سازند. از این نظر نیاز به جایگزین کردن مواد ضد میکروبی به جای آنتی‌بیوتیک‌ها، ضروری می‌باشد. باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند که به باکتری‌ها حمله می‌کنند و آنها را از بین می‌برند. این ویروس‌ها برای باکتری‌ها اختصاصی هستند. از این رو میتوان از آنها بعنوان یک استراتژی درمانی نیز استفاده نمود (۲۲).

در مطالعه حاضر باکتریوفاژهای جداسازی شده مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر سه سویه باکتری *سالمونلا انتریکا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*) بصورت اختصاصی نسبت به این باکتریوفاژها حساسیت نشان دادند. شفافیت هاله عدم رشد در روش تست لکه گذاری نقطه‌ای در مورد این سویه‌ها به خوبی مشاهده شد و تاثیر مثبت باکتریوفاژهای جداسازی در کنترل و حذف عامل بیماریزا، اثبات گردید که با مطالعه Timothy K Lu و Michael S Koeris در سال ۲۰۱۳ که بر روی مقاومت دارویی (آنتی‌بیوتیکی) و اثر مکانیسم باکتریوفاژ را بر روی عوامل بیماریزا بررسی کردند، همخوانی دارد. آنها توانستند اثرات مثبت باکتریوفاژها را بررسی و به اثبات برسانند. در نهایت برای انجام این فرایند در بخش های صنعتی، آزمایشات کنترل شده و استراتژی‌های مناسب را پیشنهاد دادند (۲۳).

باکتریوفاژهای جداسازی شده به منظور کنترل و حذف عامل آلوده کننده باکتریایی مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج در شرایط و تست‌های مختلف اعم از کاهش کدورت در لوله حاوی سویه‌های باکتری، ایجاد پلاک بر روی پلیت با پایه آگار حاوی سویه‌های باکتریایی و روش تست لکه گذاری نقطه‌ای این مهم را به اثبات رسانیدند که این عامل درمانی، توانایی لیز و در نهایت حذف عامل بیماریزای باکتریایی را دارا می‌باشند که با

مطالعات Josiane E Garneau و Sylvain Moineau، Todd R. Callaway و همکارانش و Sanna M. Sillankorva همخوانی دارد. آنها استفاده از باکتریوفاژ را بعنوان استراتژی درمانی برای کاهش جمعیت باکتریایی و کنترل آلودگی در مواد غذایی معرفی کردند و اثرات باکتریوسیدی آنها را مورد بررسی قرار دادند (۲۷-۲۵).

از جنس *سالمونلا* سویه‌های (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*) و از باکتری‌هایی غیر از جنس *سالمونلا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *انتروپاتوژنیک اشریشیا کلی* و *شیگلا دیسانتری* نسبت به این باکتریوفاژها مورد بررسی قرار گرفتند. تمام سویه‌های مورد مطالعه باکتری *سالمونلا* به باکتریوفاژهای اختصاصی خود حساسیت کامل نشان دادند که در روش تست لکه گذاری نقطه‌ای نتایج به خوبی نشان داده شد و دیگر پاتوژن‌های روده‌ای مورد مطالعه، حساسیتی به این باکتریوفاژهای جداسازی شده نشان ندادند. این نتایج بیانگر اختصاصیت کامل این عامل درمانی می‌باشد که با مطالعات Sillankorva و همکارانش و Lubov Y. Brovko و همکارانش همخوانی دارد. آنها از باکتریوفاژ برای تشخیص و کنترل میکروبی پاتوژن‌ها در مواد غذایی و محیط آماده‌سازی مواد غذایی استفاده کردند. در این بررسی‌ها، فاژها مناسب‌تر و سودمندتر از آنتی‌بیوتیک‌ها شناخته شدند و از آنها بعنوان عوامل ضد میکروبی اختصاصی‌تر یاد شده است (۱۳،۱۲).

باکتریوفاژ اختصاصی جداسازی شده *سالمونلا* بر علیه سویه *انتریتیدیس*، بر روی سویه *تیفی‌موریوم* هم تاثیر مثبت داشت. البته میزان شفافیت هاله عدم رشد در روش تست لکه گذاری نقطه‌ای در مورد سویه *انتریتیدیس*، بسیار بالا بود. ولی در مورد سویه *تیفی‌موریوم* این هاله عدم رشد، کمی کدرتر مشاهده شد که با مطالعه Paola Zinno و همکارانش همخوانی دارد که می‌تواند بعلت وجود گیرنده‌های مشترک باشد. آنها اثر باکتریوفاژ P22 را بر علیه باکتری *سالمونلا* بررسی کردند. نتایج حاصل از حساسیت *سالمونلا* نسبت به باکتریوفاژ P22 نشان داد که تمام ۱۲ ایزوله *سالمونلا* *تیفی‌موریوم* و همچنین *سالمونلا انتریتیدیس* و *سالمونلا دربی* با حضور فاژ P22 مهار شد (۲۹).

اختصاصیت کامل باکتریوفاژهای جداسازی شده نسبت به سویه‌های مورد مطالعه باکتری *سالمونلا* نشان داده شد. از این رو باکتریوفاژهای جداسازی شده می‌توانند بعنوان یک عامل شناساگر برای آلودگی‌های مرتبط با سویه‌های باکتری *سالمونلا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*) قرار گیرند که با مطالعات Amit Singh و همکارانش همخوانی کامل دارد. مطالعات اخیراین محققین در زمینه استفاده از باکتریوفاژ بعنوان یک حسگر زیستی برای کنترل پاتوژن‌های منتقله از غذا نشان داد که می‌توان از باکتریوفاژ بعنوان یک بیوسنسور در طبیعت و صنعت استفاده کرد (۲۸).

حساسیت باکتریوفاژهای جداسازی شده نسبت به باکتری‌های پاتوژن روده‌ای انتخاب شده، بررسی گردید. همچنین اثر کوکتل حاصل از باکتریوفاژهای جداسازی شده بر روی مخلوط سویه‌های مورد مطالعه باکتری *سالمونلا* نیز بررسی و خاصیت باکتریوسیدی کوکتل بدون هیچ گونه اثر افزاینده یا بازدارنده‌ای، مثبت ارزیابی گردید. در مطالعه Rattanachaikunsopon و دیگران، باکتروفاژ *سالمونلا*یی را جدا کردند که فقط برعلیه *سالمونلا تیفی* اثر خود را نشان داد و دیگر باکتری‌های جنس *سالمونلا* به این فاژ حساس نبودند که با نتایج این مطالعه، مطابقت کامل دارد (۲۹).

تاثیر مثبت باکتریوفاژهای جداسازی شده به منظور کنترل و حذف عامل باکتریایی سویه‌های باکتری *سالمونلا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*) به اثبات رسید. نتایج در شرایط و تست‌های مختلف اعم از کاهش کدورت در لوله حاوی سروتایپ‌های باکتری، ایجاد پلاک بر روی پلیت با پایه آگار حاوی سویه‌های باکتریایی و روش تست لکه گذاری نقطه‌ای این مهم را به اثبات رسانیدند که این عامل درمانی، توانایی لیز و در نهایت حذف عامل بیماریزای باکتریایی را دارا می‌باشند که با مطالعه نیکخواهی و همکاران که بر روی ارزیابی اثر بخشی باکتریوفاژ جداسازی شده در درمان سالمونلوز ناشی از *Salmonella*

enteritidis در موش انجام گرفت، مطابقت کامل دارد (۱۶).

جهت استخراج باکتریوفاژها در این مطالعه، از مدفوع طیور استفاده گردید. در مراح بعد، تعیین میزبان اختصاصی و حساسیت سویه‌های مورد مطالعه *سالمونلا انتریکا* نسبت به باکتریوفاژهای اختصاصی آنها، مورد ارزیابی قرار گرفت. سویه‌های باکتری *سالمونلا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*) به باکتریوفاژهای اختصاصی خود حساسیت کامل نشان دادند و دیگر پاتوژن‌های روده‌ای مورد مطالعه، حساسیتی به این باکتریوفاژهای جداسازی شده نشان ندادند که این نتایج بیانگر اختصاصیت کامل این عامل درمانی می‌باشد که با مطالعه ایمنی و همکاران که جداسازی باکتریوفاژ *E.coli* از فاضلاب خام و تعیین میزبان اختصاصی آن را مورد بررسی قرار داد، مطابقت دارد (۳۰).

مطالعه ما نشان داده است که باکتریوفاژها و یا یک ترکیب فاژ می‌تواند موجب کاهش و یا حذف کامل سویه‌های باکتری روده‌ای *سالمونلا انتریکا* (*تیفی‌موریوم*، *انتریتیدیس* و *اینفنتیس*) در شرایط آزمایشگاهی شود. این نتایج نشان دادند که درمان بوسیله باکتریوفاژها، این پتانسیل را دارند که بتواند به عنوان یک روش پیشنهادی جایگزین برای جلوگیری از مصرف آنتی‌بیوتیک به منظور کاهش یا حذف عفونت‌های *سالمونلایی* استفاده شود. بنابراین می‌توان از آنها به عنوان ابزارهای دارای توانمندی بیولوژیک علیه باکتری‌ها در شرایط کاربردی و عملی استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

این مقاله نتیجه بخشی از طرح مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۳۲۴۱۱ می‌باشد. بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که حامی مالی این طرح تحقیقاتی می‌باشند، کمال سپاس‌گزاری و تشکر را داریم.

منابع

1. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, et al. Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. Int J Food Microbiol; 2010. 139: 3-15.
2. Nyachuba DG. Foodborne illness: is it on the rise? Nutr Rev; 2010. 68(5):257-269.
3. Rahimi S, Shiraz ZM, Salehi TZ, Karimi Torshizi MA, Grimes JL. [Prevention of *Salmonella* infection in poultry by specific egg-derived antibody.] Int J Poult Sci; 2007.6(4):230-235. (Persian)
4. Su LH, Chiu CH. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. Chang Gung Med J; 2007. 30(3):209–10.
5. Soltan Dallal MM, Sharifi Yazdi M, Mirzaei N, Kalantar E. [Prevalence of *Salmonella* spp. in Packed and Unpacked Red Meat and Chicken in South of Tehran]. Jundishapur J Microbiol; 2014.7(4):562–8. (Persian)
6. Cardoso MO, Ribeiro AR, Santos LRd, Pilotto F, de Moraes HL, Salle CTP, et al. Antibiotic resistance in *Salmonella Enteritidis* isolated from broiler carcasses. Braz J Microbiol; 2006. 37(3):368-371.
7. Hungaro HM, Mendonça RCS, Gouvêa DM, Vanetti MCD, Pinto CLdO. Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. Food Res Int; 2013. 52(1):75-81.
8. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. Antimicrob Agents Chemother; 2001. 45(3): 459-649.
9. Sabour PM, Griffiths MW. Bacteriophages in the control of food-and waterborne pathogens: ASM Press; 2010.
10. Connerton P, Connerton I, Mead G. Microbial treatments to reduce pathogens in poultry meat, Food safety control in the poultry industry. Cambridge: Woodhead Ltd. 2005:414-427.
11. Adams MH. Bacteriophages. Bacteriophages. New York: Inter science Publishers, 1959. p. 121-132.
12. Sillankorva SM1, Oliveira H, Azeredo J. Bacteriophages and their role in food safety. Int J Microbiol; 2012. 2012:863945.
13. Brovko LY, Anany H, Griffiths MW. Bacteriophages for detection and control of bacterial pathogens in food and food-processing environment. Adv Food Nutr Res; 2012.67:241-88.
14. Wong CL, Sieo CC, Tan WS, Abdullah N, Hair-Bejo M, Abu J, et al. Evaluation of a lytic bacteriophage, Φ st1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in chickens. Int J Food Microbiol; 2014. 172:92-101.
15. Wagenaar JA, Van Bergen MA, Mueller

MA, Wassenaar TM, Carlton RM. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Vet Microbiol; 2005. 109(3):275-283.

16. Turki Y, Ouzari H ,Mehri I, Ammar AB, Hassen A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for the biocontrol of *Salmonella* of wastewater. Food Res Int; 2012. 45(2):1099-1105.

17. Bruun T, Sørensen G, Forshell L, Jensen T, Nygård K, Kapperud G, et al. An outbreak of *salmonella typhimurium* infections in Denmark, Norway and Sweden, Eurosurveillance; 2008. 14:10.

18. Nikkhahi F, Soltan Dallal MM, Alimohammadi M, Rahimi Foroushani A, Rajabi Z, Fardsanei F, et al. [Phage therapy: assessment of the efficacy of a bacteriophage isolated in the treatment of salmonellosis induced by *Salmonella enteritidis* in mice]. Gastroenterol Hepatol Bed Bench; 2017. 10(2): 131. (Persian)

19. Philips I, Casewell M, Cox T, de Groot B, Friis C, Jones R, et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. J Antimicrob Chemother; 2004. 53(1):28-52.

20. Turner JL, Pas S, Dritz SS, Minton JE. Review: Alternatives to conventional antimicrobials in swine diets. Prof Anim Sci; 2001. 25:217–26.

21. Jamalludeen N, Johnson RP, Friendship R, Kropinski AM, Lingohr EJ, Gyles CL. Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. Vet Microbiol; 2007. 124(1-2):47-57.

22. Labrie SJ, Samson JE, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. Nat Rev Microbiol; 2010. 8(5):317–27.

23. Lu TK, Bowers J, Koeris MS. Advancing bacteriophage-based microbial diagnostics with synthetic biology. Trends Biotechnol; 2013 Jun. 31(6):325-7.

24. Briggiler Marcó M, Garneau JE, Tremblay D, Quiberoni A, Moineau S. Characterization of two virulent phages of *Lactobacillus plantarum*. Appl Environ Microbiol; 2012 Dec. 78(24):8719-34.

25. Callaway TR, Sheridan TG. Smarter arrow now available in the food safety quiver. Proc Natl Acad Sci USA; 2015 Oct 6. 112(40):12230-1.

26. H V W. Before the vaccines: medical treatments of acute paralysis in the 1916 New York epidemic of poliomyelitis. Open Microbiol J; 2014 Dec 12. 8:144-7.

27. Zinno P, Devirgiliis C, Ercolini D, Ongeng D, Mauriello G. Bacteriophage P22 to challenge *Salmonella* in foods. Int J Food Microbiol; 2014 Nov 17. 191:69-74.

28. Singh A, Poshtiban S, Evoy S. Recent advances in bacteriophage based biosensors for food-borne pathogen detection. Sensors (Basel); 2013 Jan 30. 13(2):1763-86.

29. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Bacteriophage PPST1 Isolated from Hospital Wastewater, A Potential Therapeutic Agent against Drug Resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhi*. *Salmonella* – Distribution, Adaptation, Control Measures and Molecular Technologies; 2006.pp.159-172.

30. Imeni S, Akhavan Sepahi A, Soltan Dallal MM. [Isolating *E.coli* Bacteriophage from Raw Sewage and Determining its Selectivity to the Host Cell]. TB; 2016. 15(1):1-9. (Persian)

Comparison of Antibacterial Effects of Lytic Bacteriophage Cocktail and Ciprofloxacin on Strains of *Salmonella enterica: An in vitro* Study

Mohammad Reza Esmaeil Zadeh, MSc Student of Food Microbiology, Department of Food Microbiology, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Zahra Rajabi, PhD Student of Microbiology, Staff of Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
***Mohammad Mehdi Soltan Dallal**, Professor of Microbiology, Department of Food Microbiology, Faculty of Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran, & Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). msoltandallal@gmail.com

Abstract

Background: Salmonellosis is a gastroenteritis caused by the infection with different serotypes of *Salmonella*. *Salmonella enterica* is an *enterica* subtype, *enteritidis*, *typhimurium*, and *infantis* are the most important factors of gastroenteritis in humans. In recent years, increasingly commonly used antibiotics and treatments are resistant. The main purpose of this study was to compare the antibacterial effects of lytic bacteriophage Cocktail and ciprofloxacin on *Salmonella enterica* strains in laboratory conditions.

Methods: Standard strains of *salmonella* (*enteritidis*, *typhimurium*, and *infantis*) were collected from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, and their specific bacteriophages were isolated by soft agar method. Specificity of bacteriophages was investigated for strains of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* and *Enteropathogenic E. coli* (EPEC) bacteria using spot test. Antibiotic sensitivity was determined using E-Test method. In order to obtain an appropriate headline for evaluating the therapeutic results, different concentrations of bacteriophage with bacteria were evaluated. Finally, the preventive and therapeutic effect was evaluated in comparison with ciprofloxacin.

Results: Different concentrations of bacteriophages have the ability to reduce and eliminate strains of *salmonella* (*enteritidis*, *typhimurium*, and *infantis*). Bacteriophage specific plaque against other strains of *Salmonella* and other intestinal pathogenic bacteria did not have any lytic function.

Conclusion: The results showed that bacteriophages function as specified. Due to the increasing prevalence of antibiotic resistance and treatment concerns, bacteriophages can be a good alternative to the use of antibiotics in the treatment of bacterial infections.

Keywords: Gastroenteritis, *Salmonella enterica*, Bacteriophage, Ciprofloxacin