جداسازی و تعیین اختصاصیت باکتریوفاژ سالمونلا انتریتیدیس از نمونه فاضلاب بیمارستانی

پریسا ترابی بناب: کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی میکروبیولوژی، واحد علوم دارویی دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. parisatorabi.mic19@yahoo.com

***محمدمهدی سلطان دلال:** استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی / بخش میکروب شناسی مواد غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران (*نویسنده مسئول). msoltandallal@gmail.com

سعید اکبرزاده: استادیار، بخش فارماکولوژی، گروه سم شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. saeidakbarzadeh4 @gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۶

چکیده

زمینه و هدف: امروزه با توجه به بوجود آمدن مقاومت دارویی به انواع آنتی بیوتیک‌ها باید جایگزین مناسبی برای داروها یافت. باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند که در انهدام باکتری‌ها نقش بسیار موثری دارند. باکتریوفاژها به دلیل داشتن خواص ویژه و مطلوب می‌توانند جایگزین مناسبی برای آنتی بیوتیک‌ها در درمان بیماری‌های عفونی در نظر گرفته شوند. هدف این تحقیق جداسازی باکتریوفاژ اختصاصی سالمونلا انتریتیدیس از فاضلاب بیمارستانی بوده است.

روش کار: ۱۰ نمونه از فاضلاب هر کدام شامل حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر فاضلاب خام بیمارستان امام خمینی تهران جمع‌آوری شد و سپس با محیط کشت *Brain-heart infusion medium(BHI)* به عنوان محیط کشت مایع جهت رشد میکروارگانیسم‌ها مخلوط شد. مراحل دیگر کار شامل خالص سازی، تلقیح باکتری و تعیین میزبان نیز برای جداسازی باکتریوفاژ انجام شدند. جهت انتخابی بودن تاثیر باکتریوفاژ بر روی میکروارگانیسم‌هایی مانند: *E. coli (ATCC25922)*،*Enterococcus faecalis* *Staphylococcus aureus (ATCC2392)* و Yersinia *enterocolitica (*ATCC9610)و *Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)* بررسی شد.

یافته‌ها: از هر ۱۰ نمونه فاضلاب باکتریوفاژ منتخب سالمونلا انتریتیدیس جدا شد. در طی آزمایش تعیین میزبان مشخص شد که این باکتریوفاژها، به خوبی قادر به لیز کردن و از بین بردن سالمونلا انتریتیدیس هستند، اما برروی سایر باکتری‌های مورد آزمایش هیچ اثری ندارند.

نتیجه‌گیری: نتیجه‌گیری‌های حاصل حاکی از آن است که باکتریوفاژ استخراج شده به صورت اختصاصی عمل می‌کند و با توجه به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی، فاژها می‌توانند جایگزین مناسبی برای درمان عفونت‌های سالمونلایی باشند.

کلیدواژه‌ها: باکتریوفاژ، سالمونلا، آنتی بیوتیک

مقدمه

سالمونلا انتریتیدیس باسیل گرم منفی از خانواده انتروباکتریاسه است. این باکتری عامل شایع گاستروانتریت در بین باکتری‌های جنس سالمونلا است (۱). ظهور و گسترش باکتری‌های مقاوم به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در سه دهه اخیر به نگرانی عمده‌ای تبدیل گشته است و این افزایش گونه‌های مقاوم همچنان ادامه دارد. بخش عمده این مقاومت‌ها در حوزه‌های درمانی و مراقبت بهداشتی به علت تجویز بی‌مورد، استفاده خودسرانه و نادرست افراد و سایر عوامل صورت می‌گیرد. *سالمونلا انتریکا* سروار *انتریتیدیس و تیفی موریوم* ازجمله دو سروتیپ شایع ایزوله شده از سالمونلا در ایران و کشورهای دیگر هستند (۱ و ۲). در طی دو دهه گذشته شیوع سالمونلاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک به‌صورت مشکل جدی جهانی درآمده است و نماد بارز این مقاومت گسترش بتالاکتامازها در بین گونه‌های مختلف سالمونلا است (۳). باکتریوفاژها دسته‌ای از ویروس‌هایی هستند که فقط باکتری را آلوده می‌کنند، اندازه آن‌ها تقریباً ۵۰ برابر کوچک‌تر از باکتری و در حدود (۲۰۰-۲۰ نانومتر) می‌باشد. این ویروس‌ها از منابع بسیار متعددی مانند خاک، آب‌های شیرین، آب دریا، فاضلاب‌ها و... قابل جداسازی هستند (۴). اولین بار استفاده از باکتریوفاژها برای درمان عفونت‌های باکتریایی قبل

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.2.1.6]

از جنگ جهانی دوم موردتوجه قرار گرفت. در سال‌های اخیر با تشدید پدیده مقاومت آنتی‌بیوتیکی و به وجود آمدن انواعی از استرین‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک، تحقیقات بسیار گسترده‌ای بر روی استفاده از فاژها برای پیشگیری، کنترل و حتی درمان بیماری‌ها قوت گرفته است و تلاش بیشتر محققان بر پایه فرضیه جایگزین کردن باکتریوفاژها به‌جای آنتی‌بیوتیک درحال‌توسعه می‌باشد. باکتریوفاژها به‌طور بالقوه برای جایگزین شدن به‌جای آنتی‌بیوتیک‌ها دارای چندین مزیت ساختاری و ژنتیکی بسیار مطلوب هستند، یکی از این مزایا انگل اجباری درون‌سلولی باکتری‌ها بودن و اختصاصی عمل کردن آن‌هاست، دیگری عدم توانایی آلوده کردن سلول‌های یوکاریوتی و آخرین مزیت تأثیر مستقیم بر سلول‌های هدف است، باکتریوفاژها کار خود را بدون صدمه رساندن و تغییر فلور طبیعی بدن (برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها) انجام می‌دهند و با ریشه کنی کامل، باکتری را از بدن حذف می‌کنند (۵ و ۶). در تحقیقات اخیر اثر باکتریوفاژدرمانی بر روی مرغ‌ها بررسی شده است. مرغ‌ها ابتدا توسط *سالمونلاگالیناروم* مبتلا شدند، باکتریوفاژها از راه دهان تجویز شدند و مشاهده شد که میزان مرگ‌ومیر این پرندگان در گروهی که فاژ داده شده به طور مشخصی کاهش پیدا کرده است. همچنین به طور مرتب باکتری‌های گرفته شده از کبد، طحال و سکوم شمارش شد و در تعداد آن‌ها کاهش قابل‌ملاحظه‌ای مشاهده گردید (۷). در مطالعه‌ی Niuو دیگران از تعداد ۸۵۵ نمونه‌ی گرفته شده ۲۳۹ نمونه حاوی باکتریوفاژ بوده و جدا شده است (۸). در مطالعه‌ی Ran wong و دیگران از ۵۰ نمونه‌ی جمع آوری شده از فاضلاب مرغداری توانستند باکتریوفاژ سالمونلاانتریتیدیس VB-sen M-PA13076 را جداسازی کنند (۹). در این مقاله به چگونگی روش جداسازی باکتریوفاژ سالمونلا انتریتیدیس از فاضلاب بیمارستانی و اثبات عملکرد اختصاصی آن پرداخته شده است.

روش کار

آماده سازی باکتری: پس از جداسازی اولیه سالمونلا انتریتیدیس با استفاده از تست های بیوشیمیایی، نمونه بر روی محیط هکتون انتریک آگار کشت داده شد. تعدادی از کلونی ایجاد شده در روز بعد به محیط TSB براث منتقل شده و در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد. برای تعیین گروه، از آنتی سرم های پلی والان O استفاده گردید. از کشت ۲۴ ساعته و خالص باکتری بر روی محیط TSIاستفاده شد و در نهایت سروتیپ باکتری با استفاده از تکنیک Multiplex-PCR تایید شد.

جداسازی باکتریوفاژ از فاضلاب: نمونه‌های فاضلاب بیمارستانی (تعداد ۱۰ نمونه) جمع آوری شد و به سرعت به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران ارسال گردید. نمونه ها به یخچال منتقل و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه روز قرارداده شد تا رسوبات معلق ته نشین شود. روز بعد مقدار ۱۰ میلی لیتر از هر نمونه فاضلاب در یک لوله آزمایش ریخته شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۵۰۰ g سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ از یک فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده شد. در ادامه کار ۵ میلی لیتر از مایع فیلتر شده به ۱۰ میلی لیتر محیط BHI حاوی باکتری سالمونلا انتریتیدیس با غلظت $1/5\times10^8$cfu/ml اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. پس از انکوباسیون کشت مایع باکتری به مدت ۸ دقیقه با دور ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شد. مجددا سوپرناتانت به دست آمده از فیلتر غشایی با اندازه ۰,۲۲ میکرومتر عبور داده شد. در مرحله بعد سانتریفوژ مجدد کشت مایع در دور ۴۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و دوباره سوپرناتنت از یک فیلتر غشایی با اندازه ۲۲. میکرومتر عبور داده شد. برای تایید حضور فاژ در مایع صاف شده از روش Double layer agar استفاده شد. بدین منظور ۵۰ میکرولیتر از مایع صاف شده با ۲۰۰ میکرولیتر از کشت باکتری به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و در مرحله بعد به ۴,۵ سی سی از محیط BHI آگار ذوب شده که تا دمای ۵۰ درجه خنک گردیده، اضافه شد. سپس پلیت ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق تا سفت شدن آگار،

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.2.1.6]

نگهداری شد در مرحله بعد انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه به مدت یک شبانه روز (تا تشکیل پلاک (اشکال دایره ای شکل شفاف که نشان دهنده عدم رشد باکتری هستند و نشانه وجود باکتریوفاژ می‌باشند) انجام شد.

خالص سازی فاژ: پلاک فاژ با استفاده از پیپت پاستور شیشه ای برداشته شد و بر روی کشت *سالمونلا انتریتیدیس* اضافه و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. سپس مخلوط باکتری و باکتریوفاژ در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و از فیلتر غشایی ۰,۲۲ میکرومتری عبور داده شد. مجددا روش Double layer بر روی مایع صاف شده انجام شد. پلیت به دست آمده با اضافه کردن ۸ سی سی SM بافر و انکوباسیون آن در دمای اتاق به مدت ۴ ساعت همراه با shaking شستشو داده شد. سپس ۵ میلی لیتر از مایع روی پلیت سانتریفیوژ و از فیلتر عبور داده شد.

اثر فاژ جداشده بر *سالمونلا انتریتیدیس* در محیط *in vitro*: به‌منظور سنجش میزان توانایی باکتریوفاژ جدا شده در لیز کردن میزبان (*سالمونلا انتریتیدیس*) در in vitro، منحنی رشد باکتری را در حضور باکتریوفاژ جدا شده با (MOI) Multiplicity of infection مختلف بررسی شدند. در گروه (کنترل) بجای باکتریوفاژ از محلول PBS استفاده شد. مقدار ۱۰۰ CCاز کشت ۲۴ ساعته *سالمونلا انتریتیدیس* به محیط LB broth تازه اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با Shaking در دور ۱۵۰rpm به مدت ۶ ساعت انکوبه شد. سپس باکتری در PBS به حدی اضافه شد تا در طول موج ۶۵۰ نانومتر OD ۰/۶ حاصل شود، یعنی غلظتی معادل (۲×۱۰^{۹}) غلظت های مختلفی از فاژ ۲×۱۰^{۷}، ۲×۱۰^{۸}، ۲×۱۰^{۹} و یک کنترل PBS به لوله های حاوی باکتری اضافه شد و به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه با Shaking انکوبه گردید و به طور متناوب هر ۳۰ دقیقه در طول موج ۶۰۰ نانومتر OD نمونه اندازه‌گیری شد.

تعیین اختصاصیت باکتریوفاژ با استفاده از روش Spot Test: برای تائید و تعیین اختصاصیت باکتریوفاژ از روش Spot test استفاده گردید؛ بدین نحو که تعدادی باکتری گرم مثبت و منفی به‌طور تصادفی انتخاب شده و برای انجام این تست مورد استفاده قرار گرفت. این باکتری‌ها عبارت بودند از : *سالمونلا انتریتیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس، یرسینیا انتروکلی تیکا، انتروکوکوس فکالیس، اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی موریوم*. باکتری‌ها ۲۴ ساعت در محیط BHI مایع رشد داده شدند تا در فاز لگاریتمی قرار بگیرند سپس ۱۰۰ میکرولیتر از کشت با ۴/۵ سی سی از BHI ۰٪/۷ براث خوب مخلوط شد و سپس سطح BHI آن با آگار ۱/۵٪ پوشانده شد، پس از بسته شدن آگار مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریوفاژ به بالای سطح آگار اضافه شد و ۲۰ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید. حساسیت به باکتریوفاژ بوسیله هاله شفاف (پلاک) تشخیص داده شد.

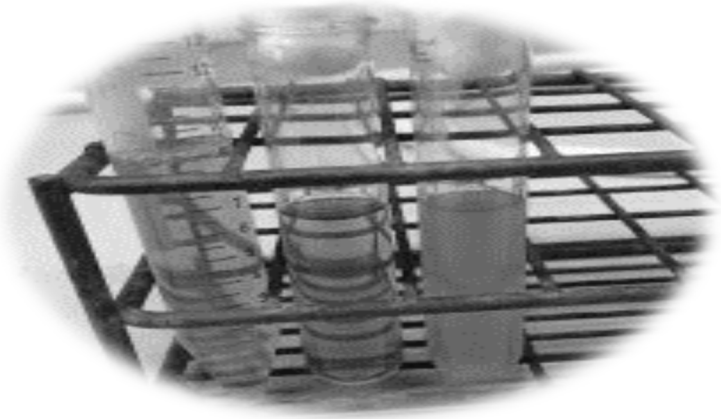
یافته‌ها

در طی مطالعات مشخص شد که کدورت لوله هایی که حاوی فاضلاب و محلول کشت باکتری بودند کمتر از حد انتظار می‌باشد و این مساله حاکی از آن بود که فاضلاب مورد نظر حاوی باکتریوفاژی است که رشد باکتری و در پی آن کدورت محیط کشت براث را کنترل کرده و مقدار رشد را کاهش داده است. در طی تکرار این روش این نتیجه به دست آمد که عملکرد باکتریوفاژهای موجود در فاضلاب مطلوب و مفید بوده است و به علاوه با تکرار پی در پی این روش مشاهده گردید که کدورت لوله در طی ۲۴ ساعت نسبت به روز قبل به حد قابل‌ملاحظه‌ای کاهش پیدا کرده است و در نهایت لوله حاوی باکتری و مایع فیلتر شده کاملاً شفاف و فاقد کدورت ناشی از رشد باکتری شد. نتیجه کلی نشان داد که در لوله باکتریوفاژ بسیار فعالی حضور دارد (شکل ۱).

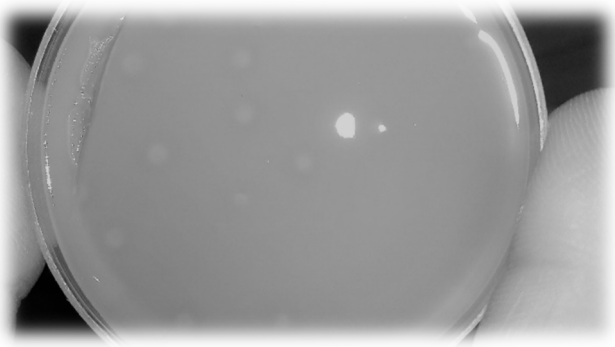
بر طبق مشاهدات، تایید حضور فاژ با به دست آوردن پلاک ویروسی صورت گرفت. مشاهده پلاک‌های حاصل از باکتریوفاژ به دست آمده پس از خالص شدن، هاله های شفاف عدم رشد با اندازه‌هایی حدود ۲ تا ۳ میلی متر را ایجاد نمودند (شکل ۲).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.2.1.6]



شکل ۱ – لوله سمت چپ حاوی محیط BHI. لوله وسط حاوی باکتری و مایع فیلتر شده حاوی فاژ که بخوبی اثر ممانعت از رشد را نشان می دهد. لوله سمت راست حاوی باکتری است که بخوبی رشد نموده و غلظتی برابر با حدود ۲ مک فارلند ایجاد کرده است.



شکل ۲– پلاک های ایجاد شده به صورت نقاط روشن در پلیت نشان دهنده وجود باکتریوفاژ در نمونه هستند.

آزمایشات و مشاهدات در راستای تائید اختصاصیت عملکرد باکتریوفاژها و به عبارت دیگر تعیین میزبان نشان داد که فقط سالمونلا به این فاژ حساسیت نشان داده است و سایر باکتری‌های دیگر که در این مطالعه به کار برده شدند به این باکتریوفاژ حساسیتی نشان ندادند. نتیجه این تست در جدول ۱ آورده شده است.

در شکل ۳، پلیت A دارای هاله عدم رشد می‌باشد که نشان داده است این باکتری دارای گیرنده برای این فاژ بوده و تنها بروی باکتری فوق موثر است این مساله اختصاصی بودن عملکرد باکتریوفاژ جداسازی شده بروی سالمونلا انتریتیدیس ر ا به اثبات می رساند.

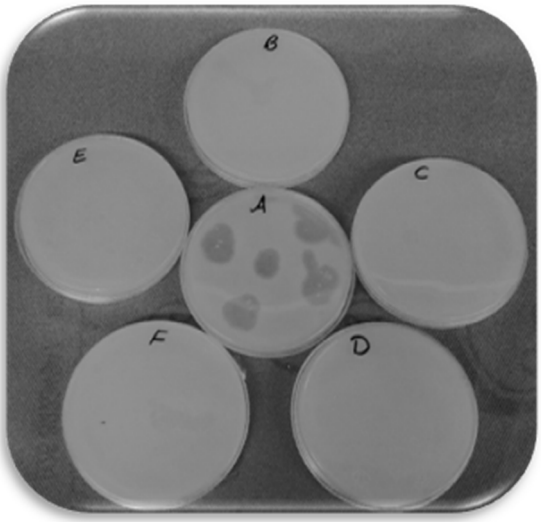
طبق نتایج به دست آمده در (MOI= ۰) Multiplicity of infection که PBS جایگزین استفاده از فاژ شده بود به علت عدم وجود عامل ممانعت کننده، رشد باکتری به‌صورت صعودی بود. در MOI= ۰/۱ رشد باکتری صورت گرفت، اما پس از گذشتن زمانی حدود ۱۰ ساعت رشد باکتری متوقف گردید. در MOI= ۱ رشد باکتری روند خود را طی نمود ولی در طی زمان ۹ ساعت رشد باکتری کنترل شد. در MOI= ۱۰ رشد باکتری صورت گرفت ولی در طی مدت‌زمان ۷ ساعت رشد باکتری کنترل شد. این بررسی نشان داد که هر

جدول ۱– جدول تعیین حساسیت باکتری های مختلف به فاژ جداسازی شده

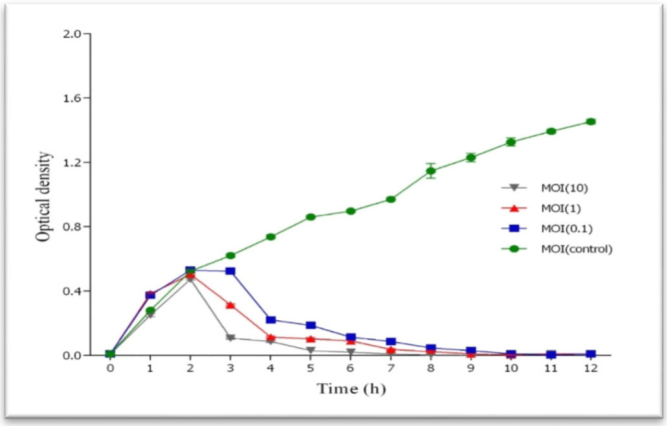
***	باکتری	لیز (انهدام)
A	*Salmonella enterica serovar enteritidis*	+
B	*Yersinia enterocolitica* (ATCC9610)	-
C	*E. coli (ATCC25922)*	-
D	*Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)*	-
E	*Staphylococcus aureus (ATCC2392)*	-
F	*Salmonella typhimurium*	-

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.2.1.6]



شکل ۳- نتیجه حاصل از تعیین اختصاصیت فاژ. A: سالمونلا انتریتیدیس (هاله عدم رشد شبیه به دیسک آنتی بیوتیک مشاهده شد) B: یرسینیا انتروکلی تیکا C: اشریشیا کلی D: سودوموناس آئروژینوزا E: استافیلوکوکوس اورئوس F: سالمونلا تیفی موریوم



شکل ۴- نتایج مواجهه سالمونلا انتریتیدیس و MOI های مختلف باکتریوفاژ

چه غلظت فاژ در زمان تجویز بیشتر باشد، زمان کنترل کردن رشد باکتری کاهش می‌یابد. در طی کمتر از یک ساعت اول بررسی، رشد باکتری در هر چهار غلظت فاژ روند صعودی از خود نشان داد و کدورتی نزدیک به ۰/۳ = OD به دست آمد. نتایج حاصل از شمارش باکتریوفاژها در MOI های مختلف (سه بار برای هر زمان ۱ ساعته)، میزان OD اندازه گیری شده و نتایج حاصل از آن در شکل ۴ آورده شده است.

تفسیر منحنی نتایج به دست آمده حاصل از مواجهه *سالمونلا انتریتیدیس* و MOI های مختلف باکتریوفاژ به شرح زیر می‌باشد:

a) در گروه کنترل که PBS جایگزین استفاده از فاژ شده بود، باکتری در مدت‌زمان ۱۲ ساعت رشد تصاعدی از خود نشان داده است.

b) در گروه ۱۰ =MOI با توجه به بالا بودن میزان تیتر باکتریوفاژ در سوسپانسیون اضافه شده به محیط رشد باکتری (۱۰ باکتریوفاژ به ازای هر یک باکتری) ومنحنی رشد باکتری بخوبی استنباط می‌شود که در ۲-۳ ساعت اولیه میزان رشد باکتری کاهش بیشتری نسبت به MOI های ۱ و ۰/۱ داشته است و از ساعت ۲ به بعد بخوبی رشد باکتری را کنترل کرده و در ساعات پایانی بررسی (ساعت ۶ به بعد)حتی رشد باکتری کاملاً متوقف شده است.

این نتیجه بخوبی بیانگر این مساله است که در محیط *in vitro* فعالیت باکتریوفاژ برای کنترل رشد باکتری کاملاً موفقیت آمیز و میزان

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-01]
[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.2.1.6]

تأثیرگـذاری آن وابسـته بـه غلظـت و دوز تجـویز می‌باشد، ولی در عین حال باید بـه ایـن نکتـه نیـز توجه نمود که علی رغم اثـر سـریع غلظـت بـالاتر باکتریوفاژ در ساعت اولیه تجویز، رشـد بـاکتری بـا گذشـت زمـان حتـی در گـروه هـایی کـه غلظـت باکتریوفاژ کم بوده بخوبی کنترل شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

سالمونلا انتریکا باکتری بیماری زایـی اسـت کـه اکثـرا انـدام‌های گوارشـی پسـتانداران، پرنـدگان و خزندگان را مورد تهاجم قرار می دهـد و پتانسـیل بالایی برای زنـدگی کـردن طـولانی مـدت در آب، خاک یا حتی مواد غذایی دارد. بیشتر بیماری‌هـای عفونی ناشی از ایـن بـاکتری در انسـان، بـه علـت مصرف غذای حیوانی کامـل طـبخ نشـده و گـاهی میوه جات و سبزیجات آلوده شده به مدفوع انسانی روی مـی دهـد. تظـاهرات بـالینی سـالمونلوزیس شامل گاسـتروانتریت، باکتریمی‌شـدید، مننزیـت و اشکال دیگر عفونت‌هـای خـارج روده ای می‌باشـد (۱۰). بـیش از ۲۳۰۰ سـرووار شـناخته شـده از سالمونلا انتریکا (۱۱) تا به حال شناخته شده است که تفاوت های زیادی در شدت بیماریزایی از خـود نشـان می‌دهنـد (۱۲). بـه علـت وجـود مقاومـت آنتی‌بیوتیکی وسیع در ایزوله های سالمونلا انتریکا، فلوروکینویون‌هـا و سفالوسـپوریهای نسـل سـوم، آنتی‌بیوتیک‌هـای کـاربردی بـرای درمـان اشـکال شدید بالینی عفونت‌های ناشی از سـالمونلا انتریکـا می‌باشند (۱۰). آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شـده گـاهی به‌عنوان آخرین خط درمان بکار گرفته مـی شـوند لذا از این نظر نیـاز بـه‌جایگزین کـردن مـواد ضـد میکروبـی بـه‌جای آنتی‌بیوتیک‌هـا بیشـتر از پـیش احساس می‌شود. فاژهای کشنده از منابعی همچون مدفوع خوک، آب فاضلاب و خاک جـدا شـده انـد (۱۳). در مطالعه‌ی حاضـر تعـداد ۱۰ عـدد نمونـه فاضلاب بیمارستانی گرفته شد که از هر ۱۰ نمونـه به‌طور جداگانه فاژ سالمونلا با موفقیـت جداسـازی گردید. درمجموع فاژها در طبیعت و محیط اطراف وجود دارند امـا بـا توجـه بـه اینکـه در مطالعـه از باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* استفاده شـد، لـذا بـا این فرض که در مراکز دامپـروری و مرغـداری‌ها از آنتی‌بیوتیک بـرای کنتـرل رشـد حیـوان اسـتفاده می‌شود لذا احتمال اینکه این باکتری در این مراکز وجود داشته باشد کمتر است و بالطبع فـاژ هـم در صـورت عـدم وجـود میزبـان خـود، جداسـازی نمی‌شـود. در محـیط بیمارسـتان بـه علـت وجـود بیماران با طیف مختلفی از باکتری‌ها و مـن جملـه سالمونلا انتریتیدیس که یکی از عوامل بیمـاریزای انسانی است لذا در فاضـلاب خـام و تصـفیه نشـده این مراکز به وفور این باکتری وجود دارد و بـالطبع فاژ مرتبط به آن در آنجا قابل جداسازی است.

طبق تعریف، طیف میزبان باکتریوفاژ بـه جـنس، گونه و سویه‌ای از باکتری گفته می‌شود که توسـط فاژ لیز شده و از محیط حـذف گـردد. ایـن حالـت یکـی از ویژگی‌هـای بیولوژیـک مهـم ویروس‌هـای باکتریال (فازها) می‌باشد که در پروسـه فاژدرمـانی بسـیار مـورد توجـه قـرار می‌گیـرد. در ایـن مقالـه باکتری‌هـای مختلفـی بـه‌منظور تعیـین میزبـان و حساسیت نسبت بـه باکتریوفـاژ جـدا شـده، مـورد ارزیابی قرار گرفتند که از خانواده *سالمونلا*، *تیفـی موریوم*، *انتریتیـدیس* و از خـانواده غیـر سـالمونلا، *یرسینیا انتروکلی تیکا*، *اشرشیا کلـی*، *سـودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مـورد بودنـد. *سـالمونلا تیفـی موریـوم* و *انتریتیـدیس* بـه ایـن باکتریوفـاژ حساسـیت نشـان دادنـد. البتـه میـزان شفافیت هالـه عـدم رشـد در روش Spot Test در مورد انتریتیدیس بسیار واضح‌تر و قوی‌تر بود، ولـی در مورد تیفی موریوم این هاله عدم رشد کوچک‌تر بـوده و عملکـرد ضـعیفی داشـت و در هالـه هنـوز کدورت ناشی از رشد باکتری مشاهده می‌شد. سایر باکتری‌هـا بـه ایـن باکتریوفـاژ حساسـیتی نشـان ندادند. در مطالعه‌ی دیگـری کـه انجـام شـده بـود (۱۴)، پس از بررسی و تعیین طیـف میزبـان بـرای باکتریوفاژ iEPS5 *سالمونلا*، در *سالمونلا*های تیفـی موریوم در برخی اسـترین‌ها کـاملاً هالـه‌ی شـفاف عدم رشد در اطراف کلنی‌های آن‌ها دیـده شـد. در این بررسی هالـه‌ی عـدم رشـد در مـورد *یرسـینیا انتروکلـی تیکـا*، *اشریشـیا کلـی*، *سـودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* دیده نشد. این نشان‌دهنده‌ی عملکرد اختصاصـی ایـن باکتریوفـاژ بروی برخـی از جنس‌هـای *سـالمونلا* می‌باشـد. در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.2.1.6]

مطالعه حاضر هم به این نتیجه رسیده شد که سالمونلا انتریتیدیس دارای یک گیرنده اختصاصی برای این فاژ می‌باشند و این گیرنده در سایر باکتری‌های ارزیابی شده وجود ندارد (این گیرنده در اکثر باکتری‌ها LPS (لیپوپلی ساکارید) می‌باشد). در مطالعه‌ی دیگری، تأثیر باکتریوفاژ سالمونلا بر *سالمونلای گالیناروم، پولوروم، تیفی موریوم، اشریشیاکلی، پاستورلامولتی سیدا، هموفیلوس آنفولانزا* ارزیابی شد. در این بررسی *سالمونلا گالیناروم، پولوروم* و *تیفی موریوم* به این باکتریوفاژ حساسیت نشان دادند (به‌صورت هاله‌ی عدم رشد) ولی سایر باکتری‌ها مقاوم بودند (۱۵). مجموع این اطلاعات و نتیجه این مطالعه حاکی از آن است که حساسیت باکتری‌ها به یک فاژ در سطح جنس می‌باشد. گزارش‌هایی هم از اختصاصیت منحصربه‌فرد یک فاژ به میزبان خود وجود دارد به‌عنوان نمونه در یکی از مطالعات انجام شده، باکتریوفاژ سالمونلایی جدا شد که فقط بر *سالمونلا تیفی* اثر خود را نشان داد و دیگر باکتری‌های گروه *سالمونلا* به این فاژ حساس نبودند (۱۶).

نتیجه‌گیری‌های حاصل حاکی از آن است که باکتریوفاژ استخراج شده برای باکتری سالمونلا انتریکا به‌صورت کاملاً اختصاصی عمل می‌کند. بنابراین با توجه به محدود شدن طیف استفاده از انواع آنتی‌بیوتیک‌ها به علت مقاومت دارویی به وجود آمده در طی چند دهه اخیر، فاژها با توجه به ویژگی‌های مطلوبی که دارند اعم از عملکرد اختصاصی، عدم آسیب‌رسانی به فلور طبیعی بدن و همچنین عدم تأثیرگذاری بر سلول‌های یوکاریوتی، می‌توانند به‌عنوان یکی از بهترین و مناسب‌ترین گزینه‌های موجود جهت جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها در نظر گرفته شده و برای کنترل و حتی درمان عفونت‌های باکتریایی مورد استفاده قرار گیرند.

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 ۳۴۵۰۳ 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. White PL, Naugle AL, Jackson CR, Fedorka-Cray PJ, Rose BE, Pritchard KM, et al. Salmonella Enteritidis in meat, poultry,and pasteurized egg products regulated by the U.S. Food; 2010:134-556.

2. Shahpouri RR, Eghbalzade M. The Prevalence of Salmonella serotypes from Chicken and egg samples and determination theirs antibiotical sensitive in Zanjan. Biol Sci J Zanjan Azad Uni; 2009.6(2):63-71.

3. Davies J, Davies D. Origin and evolution of Antibiotic Resistance, Microbiology and Molecular Biology reviews; 2010 Sep: 417-433.

4. Kutter E, Sulakvelidze A. Bacteriophages: biology and applications, in Bacteriophages: Biology and Applications, edsE. Kutter and A. Sulakvelidze (Boca Raton: CRCPress); 2005:1–5.

5. Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potentialnewthera-peutics toreplace or supplement antibiotics. TrendsBiotechnol; 2010;. 28:591–595.

6. Jenny F . Fighting bacterial infections-future treatment options. Drug Resist Updat; 2011. 14:125–139.

7. Hong SS, Jeong J, Lee J, Kim S, Min W, Myung H. Therapeutic effects of bacteriophages against Salmonella gallinarum infection in chickens. J Microbiol Biotechnol; 2013.23(10):1478-83.

8. Niu Y, McAllister T, Xu Y, Johnson R, Stephens T, Stanford K. Prevalence and impact of bacteriophages on the presence of Escherichia coli O157: H7 in feedlot cattle and their environment. Appl Environ Microb; 2009. 75:1271–8.

9. Bao H, Zhang P, Zhang H, Zhou Y, Zhang L, Wang R. Bio-Control of Salmonella Enteritidis in Foods Using Bacteriophages. Viruses; 2015. 247(8):4836-53.

10. 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, 2008. Euro Surveill; 2009. 14:10.

11. 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.

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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.2.1.6]

13. 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.

14. Choi Y, Shin H, Lee JH, Ryu S. Identification and characterization of a novel flagellum-dependent Salmonella-infecting bacteriophage, iEPS5. Environ Microbiol; 2013 Aug. 79(16):4829-37.

15. Rahaman MT, Rahman M, Rahman MB, Khan MFR, Hossen ML, Parvej MS, et al. Poultry Salmonella Specific Bacteriophage Isolation and Characterization. Bangl. J Veterin Med; 2014. 12(2): 107-114.

16. 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; 2006:159-172.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.2.1.6]

Isolation and specificity of *Salmonella enteritidis* bacteriophage from hospital sewage sample

Parisa Torabi Bonab, Division of Biology, Department of Microobiology, School of Medical Science, Azad University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
***Mohammad Mehdi Soltan Dallal**, Professor, Food Microbiology Research Center/Division of Food Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author). msoltandallal@gmail.com
Saeid Akbarzadeh, Division of Pharmacology, Department of Toxicology, School of Medical Science, Azad University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Background: Nowadays, due to the emergence of drug resistance to antibiotics, a good alternative to drugs should be found. Bacteriophages are viruses that play a very important role in the destruction of bacteria. Because of their specific properties, bacteriophages can be considered as suitable substitutes for antibiotics in the treatment of infectious diseases. The aim of this study was to isolate *Salmonella enteritidis* bacteriophage from hospital wastewater.

Methods: Ten samples of sewage, each containing about 100 ml of raw wastewater from Imam Khomeini Hospital of Tehran, were collected and then mixed with culture medium Brain-heart infusion medium (BHI) as a liquid medium for growth of microorganisms. Other stages of the work included purification, bacterial inoculation and determination of host for isolation of bacteriophages. To select the effect of bacteriophage on microorganisms such as: *E. coli (ATCC25922)*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus (ATCC2392), Yersinia enterocolitica (*ATCC9610), *Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) were used*.

Results: Out of 10 samples of bacteriophage sewage selected from *Salmonella enteritidis*. During the host testing, it became clear that these bacteriophages are well able to leach and destroy *Salmonella enteritidis*, but have no effect on other bacteria.

Conclusion: The results of this study indicate that the extracted bacteriophage is specifically acting, due to the increase in antibiotic resistance; phages can be used as a suitable substitute for the treatment of *Salmonella* infections.

Keywords: Bacteriophage, *Salmonella*, Antibiotics

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2024-12-01]

[DOR: 20.1001.1.22287043.1397.25.2.1.6]