

## 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  
 \*محمد مهدی 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*، *Enterococcus faecalis* (ATCC25922)، *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 بر روی 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

از سالمونلا در ایران و کشورهای دیگر هستند (۱) و (۲). در طی دو دهه گذشته شیوع سالمونلاهای مقاوم به آنتی‌بیوتیک به صورت 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

سالمونلا/انتریتیدیس باسپیل 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/انتریک سرووار/انتریتیدیس و تیفی موریوم از جمله دو سروتیپ شایع ایزوله شده

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 TSI استفاده شد و در نهایت سروتیپ باکتری با استفاده از تکنیک Multiplex-PCR تایید شد.

**جداسازی باکتریوفاژ از فاضلاب:** نمونه های 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 درمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت یک شبانه روز قرار داده 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  $10^8 \times 1/5$  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 ۸۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. مجددا سوپرناتانت به دست آمده از فیلتر غشایی با اندازه ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. در مرحله بعد سانتریفیوژ مجدد کشت مایع در دور ۴۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و دوباره سوپرناتانت از یک فیلتر غشایی با اندازه ۰/۲۲ 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،

از جنگ جهانی دوم مورد توجه قرار گرفت. در سال های اخیر با تشدید پدیده مقاومت آنتی بیوتیکی و به وجود آمدن انواعی از استرین های مقاوم به چند آنتی بیوتیک، تحقیقات بسیار گسترده ای بر روی استفاده از فاژها برای پیشگیری، کنترل و حتی درمان بیماری ها قوت گرفته است و تلاش بیشتر محققان بر پایه فرضیه جایگزین کردن باکتریوفاژها به جای آنتی بیوتیک در حال توسعه می باشد. باکتریوفاژها به طور بالقوه برای جایگزین شدن به جای آنتی بیوتیک ها دارای چندین مزیت ساختاری و ژنتیکی بسیار مطلوب هستند، یکی از این مزایا انگل اجباری درون سلولی باکتری ها بودن و اختصاصی عمل کردن آنهاست، دیگری عدم توانایی آلوده کردن سلول های یوکاریوتی و آخرین مزیت تأثیر مستقیم بر سلول های هدف است، باکتریوفاژها کار خود را بدون صدمه رساندن و تغییر فلور طبیعی بدن (برخلاف آنتی بیوتیک ها) انجام می دهند و با ریشه کنی کامل، باکتری را از بدن حذف می کنند (۵) و (۶). در تحقیقات اخیر اثر باکتریوفاژ درمانی بر روی مرغ ها بررسی شده است. مرغ ها ابتدا توسط سالمونلا گالیناروم 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 باکتری های گرفته شده از کبد، طحال و سکوم شمارش شد و در تعداد آنها کاهش قابل ملاحظه ای مشاهده گردید (۷). در مطالعه ی Niu و دیگران از تعداد ۸۵۵ نمونه ی گرفته شده ۲۳۹ نمونه حاوی باکتریوفاژ بوده و جدا شده است (۸). در مطالعه ی Ran wong و دیگران از ۵۰ نمونه ی جمع آوری شده از فاضلاب مرغداری توانستند باکتریوفاژ سالمونلا انتریتیدیس 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

باکتریوفاژ از روش Spot test استفاده گردید؛ بدین نحو که تعدادی باکتری گرم مثبت و منفی به طور 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، اشیریشیا 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٪ برات 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 لوله‌هایی 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 برات 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 قابل ملاحظه‌ای 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).

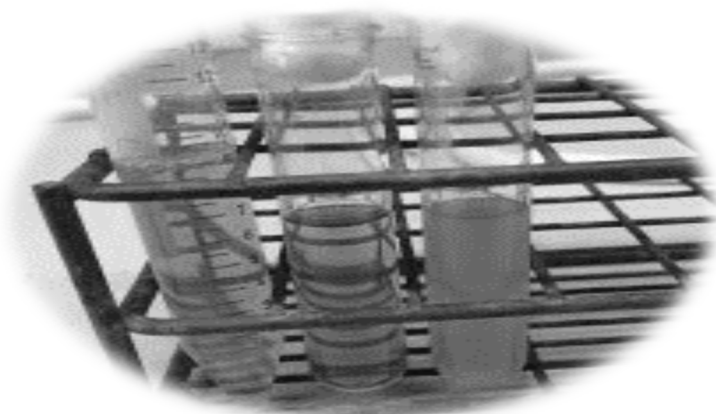
بر طبق مشاهدات، تایید حضور فاژ با به دست آوردن پلاک و ویروسی صورت گرفت. مشاهده پلاک‌های حاصل از باکتریوفاژ به دست آمده پس از خالص شدن، هاله‌های شفاف عدم رشد با اندازه‌هایی حدود ۲ تا ۳ میلی متر را ایجاد نمودند (شکل ۲).

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

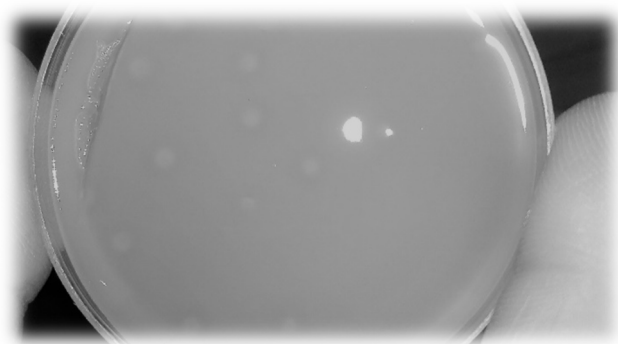
**خالص سازی فاژ:** پلاک فاژ با استفاده از پیپت پاستور شیشه‌ای برداشته شد و بر روی کشت سالمونلا انتریتیدیس اضافه و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. سپس مخلوط باکتری و باکتریوفاژ در دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و از فیلتر غشایی ۰٫۲۲ میکرومتری عبور داده شد. مجدداً روش Double 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 جدا شده بر سالمونلا انتریتیدیس در محیط *in vitro*** به منظور 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 CC از کشت ۲۴ ساعته سالمونلا انتریتیدیس به محیط LB broth تازه اضافه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با Shaking در دور ۱۵۰ rpm 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 ( $2 \times 10^9$ ) غلظت‌های مختلفی از فاژ  $2 \times 10^7$ ،  $2 \times 10^8$ ،  $2 \times 10^9$  و یک کنترل PBS به لوله‌های 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 تأیید و تعیین اختصاصیت



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.

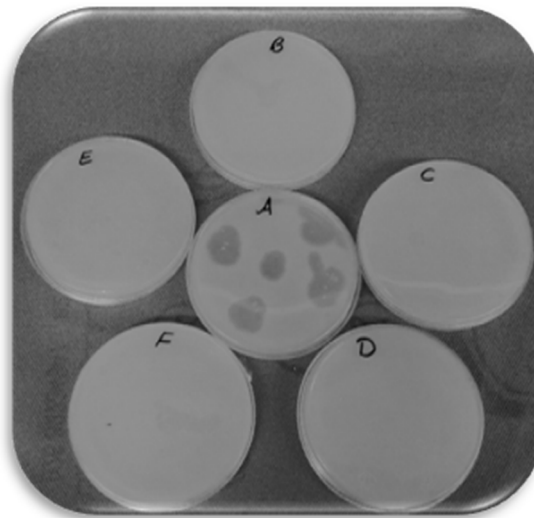
انتریتیدیس را با اثبات می رساند. طبق نتایج به دست آمده در ( $MOI=0$ ) Multiplicity of infection که PBS جایگزین استفاده از فاژ شده بود به علت عدم وجود عامل ممانعت کننده، رشد باکتری به صورت صعودی بود. در  $MOI=0/1$  رشد باکتری صورت گرفت، اما پس از گذشتن زمانی حدود ۱۰ ساعت رشد باکتری متوقف گردید. در  $MOI=1$  رشد باکتری روند خود را طی نمود ولی در طی زمان ۹ ساعت رشد باکتری کنترل شد. در  $MOI=10$  رشد باکتری صورت گرفت ولی در طی مدت زمان ۷ ساعت رشد باکتری کنترل شد. این بررسی نشان داد که هر

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 باکتری های دیگر که در این مطالعه به کار برده شدند به این باکتریوفاژ حساسیتی نشان ندادند. نتیجه این تست در جدول ۱ آورده شده است.

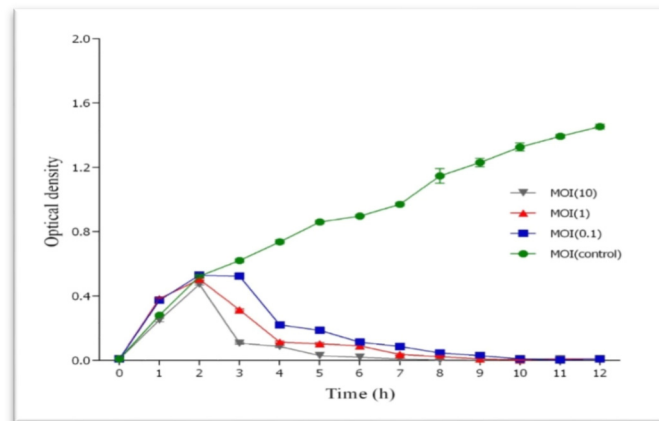
در شکل ۳، پلیت A دارای هاله عدم رشد می باشد که نشان داده است این باکتری دارای گیرنده برای این فاژ بوده و تنها بروی باکتری فوق موثر است این مساله اختصاصی بودن عملکرد باکتریوفاژ جداسازی شده بروی سالمونلا

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

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



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



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

رشد تصاعدی از خود نشان داده است. در گروه  $MOI=10$  با توجه به بالا بودن میزان تیتراژ باکتریوفاژ در سوسپانسیون اضافه شده به محیط رشد باکتری ( $10^8$  باکتریوفاژ به ازای هر یک باکتری) و منحنی رشد باکتری بخوبی استنباط می شود که در ۲-۳ ساعت اولیه میزان رشد باکتری کاهش بیشتری نسبت به MOI های ۱ و  $0.1$  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

چه غلظت فاژ در زمان تجویز بیشتر باشد، زمان کنترل کردن رشد باکتری کاهش می یابد. 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  $OD = 0.3$  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 می باشد:

(a) در گروه کنترل که PBS جایگزین استفاده از فاژ شده بود، باکتری در مدت زمان ۱۲ ساعت

آنتی‌بیوتیک برای کنترل رشد حیوان استفاده می‌شود لذا احتمال اینکه این باکتری در این مراکز وجود داشته باشد کمتر است و بالطبع فاژ هم در صورت عدم وجود میزبان خود، جداسازی نمی‌شود. در محیط بیمارستان به علت وجود بیماران با طیف مختلفی از باکتری‌ها و من جمله سالمونلا انتریتیدیس که یکی از عوامل بیماریزای انسانی است لذا در فاضلاب خام و تصفیه نشده این مراکز به وفور این باکتری وجود دارد و بالطبع فاژ مرتبط به آن در آنجا قابل جداسازی است.

طبق تعریف، طیف میزبان باکتریوفاژ به جنس، گونه و سویه‌ای از باکتری گفته می‌شود که توسط فاژ لیز شده و از محیط حذف گردد. این حالت یکی از ویژگی‌های بیولوژیک مهم ویروس‌های باکتریال (فاژها) می‌باشد که در پروسه فاژدرمانی بسیار مورد توجه قرار می‌گیرد. در این مقاله باکتری‌های مختلفی به‌منظور تعیین میزبان و حساسیت نسبت به باکتریوفاژ جدا شده، مورد ارزیابی قرار گرفتند که از خانواده سالمونلا، تیفی موریوم، انتریتیدیس و از خانواده غیر سالمونلا، *یرسینیا انترولیکیا*، *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* مورد بودند. سالمونلا تیفی موریوم و انتریتیدیس به این باکتریوفاژ حساسیت نشان دادند. البته میزان شفافیت هاله عدم رشد در روش Spot Test در مورد انتریتیدیس بسیار واضح‌تر و قوی‌تر بود، ولی در مورد تیفی موریوم این هاله عدم رشد کوچک‌تر بوده و عملکرد ضعیفی داشت و در هاله هنوز کدورت ناشی از رشد باکتری مشاهده می‌شد. سایر باکتری‌ها به این باکتریوفاژ حساسیتی نشان ندادند. در مطالعه‌ی دیگری که انجام شده بود (۱۴)، پس از بررسی و تعیین طیف میزبان برای باکتریوفاژ iEPS5 سالمونلا، در سالمونلاهای تیفی موریوم در برخی استرین‌ها کاملاً هاله‌ی شفاف عدم رشد در اطراف کلنی‌های آن‌ها دیده شد. در این بررسی هاله‌ی عدم رشد در مورد *یرسینیا انترولیکیا*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس* دیده نشد. این نشان‌دهنده‌ی عملکرد اختصاصی این باکتریوفاژ بروی برخی از جنس‌های سالمونلا می‌باشد. در

تأثیرگذاری آن وابسته به غلظت و دوز تجویز می‌باشد، ولی در عین حال باید به این نکته نیز توجه نمود که علی‌رغم اثر سریع غلظت بالاتر باکتریوفاژ در ساعت اولیه تجویز، رشد باکتری با گذشت زمان حتی در گروه‌هایی که غلظت باکتریوفاژ کم بوده بخوبی کنترل شده است.

### بحث و نتیجه‌گیری

*سالمونلا/انتریکا* باکتری بیماری‌زایی است که اکثراً اندام‌های گوارشی پستانداران، پرندگان و خزندگان را مورد تهاجم قرار می‌دهد و پتانسیل بالایی برای زندگی کردن طولانی مدت در آب، خاک یا حتی مواد غذایی دارد. بیشتر بیماری‌های عفونی ناشی از این باکتری در انسان، به علت مصرف غذای حیوانی کامل طبخ نشده و گاهی میوه جات و سبزیجات آلوده شده به مدفوع انسانی روی می‌دهد. تظاهرات بالینی سالمونلوزیس شامل گاستروانتریت، باکتریمی‌شدید، مننژیت و اشکال دیگر عفونت‌های خارج روده ای می‌باشد (۱۰). بیش از ۲۳۰۰ سرروار شناخته شده از سالمونلا انتریکا (۱۱) تا به حال شناخته شده است که تفاوت‌های زیادی در شدت بیماریزایی از خود نشان می‌دهند (۱۲). به علت وجود مقاومت آنتی‌بیوتیکی وسیع در ایزوله‌های سالمونلا انتریکا، فلوروکینولون‌ها و سفالوسپورین‌های نسل سوم، آنتی‌بیوتیک‌های کاربردی برای درمان اشکال شدید بالینی عفونت‌های ناشی از سالمونلا انتریکا می‌باشند (۱۰). آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده گاهی به‌عنوان آخرین خط درمان بکار گرفته می‌شوند لذا از این نظر نیاز به جایگزین کردن مواد ضد میکروبی به‌جای آنتی‌بیوتیک‌ها بیشتر از پیش احساس می‌شود. فاژهای کشنده از منابعی همچون مدفوع خوک، آب فاضلاب و خاک جدا شده اند (۱۳). در مطالعه‌ی حاضر تعداد ۱۰ عدد نمونه فاضلاب بیمارستانی گرفته شد که از هر ۱۰ نمونه به‌طور جداگانه فاژ سالمونلا با موفقیت جداسازی گردید. در مجموع فاژها در طبیعت و محیط اطراف وجود دارند اما با توجه به اینکه در مطالعه از باکتری *سالمونلا/انتریتیدیس* استفاده شد، لذا با این فرض که در مراکز دامپرووری و مرغداری‌ها 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 their antibiogram 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, eds E. Kutter and A. Sulakvelidze (Boca Raton: CRC Press); 2005:1-5.
5. Kutateladze M, Adamia R. Bacteriophages as potential new therapeutic to replace or supplement antibiotics. Trends Biotechnol; 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.

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 سیدئا، هموفیلوس آنفولانزا ارزیابی شد. در این بررسی سالمونلا گالیناروم، پولوروم و تیفی موریوم به این باکتریوفاژ حساسیت نشان دادند (به صورت 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 به عنوان 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 به صورت 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 به عنوان 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. بدین وسیله از

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. Rattanachaiakunsopon 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.

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

**Parisa Torabi Bonab**, Division of Biology, Department of Microbiology, 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