Isolation, morphological characterization and host range determination of Iranian bacteriophages against Salmonella reference collection

Panahi P., BS[1], Mojtahedi A., PhD[2], Khan Mirzaei M.A., PhD[3], Shenagari M., PhD[4], Atrkar Roushan Z., PhD[5]

1. MSc. Student, Microbiology Department, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
2. Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran (Corresponding Author),Tel:+98-13-3360884, alimojtahedi@yahoo.com
3. Microbiology and Immunology Department, Duff Medical Building McGill University, Montreal, Canada.
4. Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran.
5. Assistant Professor, Biostatistics Department, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht- Iran

ABSTRACT

Background and Aim: *Salmonella spp*. is important in medicine. Most related infections are self-limited. Antibiotics are used for high risk patients such as children, old individuals and immune-compromised patients. Overuse of antibiotics has led to increased emergence of multi-drug resistant bacteria which are life-threatening. Phage therapy is an alternative method to reduce antibiotic use.

Materials and Methods: Waste water samples were collected from sewage system of Rasht City twice a month. Prepared suspensions of *Salmonella* reference collection A (SARA) number 1, 6 (*S. typhimurium*) and 46, 48, 51 (*S. paratyphi B*) and double LB broth were mixed with filtrated waste water. After centrifugation and filtration, serial dilutions were prepared and phages were isolated. Morphologic characteristics were determined using TEM (Transmission electron microscopy). Finally, to assess the spectrum effect of the bacteriophages, we determined host range against 19 SARA strains.

Results: Clear plaque formation on double layer LB agar indicated lysis of the test strains by isolated phages. The results of host range showed that some of the phages were able to lyse a number of other bacteria of SARA collection. Imaging with TEM indicated that the isolated phages against SARA collection belonged to *Siphoviridae* and *Podoviridae* families.

Conclusion: This is the first report of phage isolation against *Salmonella* reference collection in Iran. SARA no. 51 (*S. paratyphi B*) was lysed by *S. typhimurium* phage. It means that the isolated phage may lyse *S. typhi*, which is an important human pathogen.

Keywords: *Salmonella* reference collection, Bacteriophage, TEM, Morphology.

Received: Oct 31, 2016 **Accepted:** Jan 10, 2017

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

[DOI: 10.22102/22.2.120]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / خرداد و تیر ۱۳۹۶/ ۱۲۸-۱۲۰

جداسازی و تعیین خصوصیات مورفولوژیکی و دامنه میزبانی باکتریوفاژهای ایرانی علیه جدایه‌های کلکسیون رفرانس سالمونلا

پگاه پناهی[۱]، علی مجتهدی [۲]، محمد علی خان میرزایی[۳]، محمد شناگری[۴]، زهرا عطرکار روشن[۵]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت - ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت - ایران (مؤلف مسئول)،تلفن ثابت:۳۳۶۰۸۸۴-۰۱۳، alimojtahedi@yahoo.com

۳. دانشجوی فوق دکترا، دپارتمان میکروبیولوژی و ایمنولوژی، ساختمان پزشکی Duff، دانشگاه مک گیل، مونترال، کانادا

۴. استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت - ایران

۵. استادیار، گروه آمار حیاتی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت - ایران

چکیده

زمینه و هدف: باکتری سالمونلا در پزشکی حائز اهمیت می‌باشد. اغلب عفونت‌های مرتبط با این باکتری‌ها خود محدود شونده می‌باشند. آنتی بیوتیک‌ها برای بیماران در معرض خطر مانند کودکان، افراد مسن و بیماران دارای ضعف ایمنی تجویز می‌شود. مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها منجر به افزایش باکتری‌های دارای مقاومت چند دارویی شده است که تهدید کننده حیات می - باشند. فاژ تراپی یکی از راه‌های جایگزین در جهت کاهش آنتی بیوتیک است.

روش بررسی: از فاضلاب رشت دوبار در ماه نمونه‌گیری شد. سوسپانسیون باکتری‌های شماره ۱، ۶، ۴۶، ۴۸ و ۵۱ کلکسیون SARA Aو دبل LB براث (Double LB) با فاضلاب فیلتر شده مخلوط شدند. پس از سانتریفیوژ و فیلتراسیون، رقت‌های سریالی تهیه و باکتریوفاژ جداسازی شد. ویژگی‌های مورفولوژیکی آنها توسط میکروسکوپ الکترونی TEM تعیین گردید. در نهایت دامنه میزبانی علیه ۱۹ سویه انسانی کلکسیون انجام شد تا طیف اثر باکتریوفاژها تعیین شود.

یافته‌ها: تشکیل پلاک شفاف روی محیط LB آگار دو لایه نشان دهنده لیز سویه‌های تست شده توسط باکتریوفاژهای جداسازی شده بود. نتایج دامنه میزبانی نشان داد که بعضی از این فاژها قادر به لیز تعدادی از سایر باکتری‌های کلکسیون SARA A بودند. عکس‌برداری توسط TEM نشان داد که فاژهای ایزوله شده علیه کلکسیونSARA A ، متعلق به خانواده *Siphoviridae* و *Podoviridae* بودند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه اولین گزارش جداسازی باکتریوفاژ علیه سویه‌های رفرنس سالمونلا در ایران است. سویه شماره ۵۱ (سالمونلا پاراتایفی B) توسط باکتریوفاژ سالمونلا تایفی موریوم لیز شد که بدین معنا می‌باشد که ممکن است سالمونلا تایفی که یک پاتوژن حائز اهمیت انسانی است را بتواند لیز کند.

کلید واژه‌ها: TEM، سویه استاندارد سالمونلا، باکتریوفاژ، مورفولوژی

وصول مقاله: ۹۵/۸/۹ اصلاحیه نهایی:۹۵/۱۰/۱۴ پذیرش:۹۵/۱۰/۲۰

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

[DOI: 10.22102/22.2.120]

مقدمه

سالمونلا از شایع‌ترین باکتری‌های منتقل شونده از حیوانات به انسان‌ها بوده و از مهمترین عوامل مرتبط با مسمومیت غذایی و مشکلات بهداشتی در سراسر جهان است. بر اساس اعلام CDC 2009، سالیانه ۴۰ هزار مورد سالمونلوزیس در آمریکا گزارش می‌شود. به علاوه سالمونلوزیس غیر تیفوئیدی دومین عامل شایع مسمومیت‌های زئونوز در اروپا شناسایی شده است (۴-۱). سرووار تایفی موریوم دومین سرووار مهم عامل سالمونلوزیس بوده است و مقاومت به آنتی بیوتیک‌های مهم مثل سیپروفلوکساسین در این سرووار بالا است (۵ و ۳). در کشورهای در حال توسعه از جمله ایران، عفونت‌های سالمونلایی همچنان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، به طوری که سالیانه درصد قابل توجهی از عفونت‌های انسانی به خصوص اطفال و افراد مسن را به خود اختصاص می‌دهد. لذا ارزیابی الگوی اثرات آنتی بیوتیکی رایج و مقایسه آن با دیگر داروهای مناسب به عنوان جایگزین در درمان و کنترل این عفونت دارای اهمیت می-باشد (۶).

اکثر عفونت‌های سالمونلا خود محدود شونده هستند و از آنتی بیوتیک فقط در درمان بیماران پرخطر از قبیل بیماران زیر سه ماه، بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی، سوء تغذیه و بدخیمی و نیز افراد مبتلا به عفونت‌های خارج روده‌ای استفاده می‌شود (۷). سالمونلا تایفی موریوم به عنوان یکی از سرووارهای غیر تیفوئیدی نسبتاً شایع و عامل ایجاد کننده عفونت‌های روده‌ای یا خارج روده‌ای در انسان، دام و پرندگان است. در افراد سالم عفونت‌های ناشی از این باکتری اغلب به شکل عفونت‌های روده‌ای با علائمی از قبیل اسهال یا اسهال هموراژیک روی می‌دهد. سالمونلا پارا تایفی نیز باعث ایجاد تب روده‌ای در انسان می‌شود. مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک‌ها در انسان و حیوانات منجر به افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در جهان شده است. بدین ترتیب حیوانات تولید کننده مواد غذایی، یک منبع مقاومت آنتی بیوتیکی شده و طی ذبح حیوانات یا فرآوری، گوشت می تواند با مدفوع آلوده شود. ۹۵- ۹۰ درصد عفونت های سالمونلا ناشی از مصرف غذای آلوده مثل گوشت، مرغ، تخم مرغ، گوشت خوک، شیر و غذای دریایی می باشد (۸).

برای درمان عفونت‌های باکتریایی مقاوم به آنتی بیوتیک باید به دنبال روش‌های جایگزین بود. یکی از روش‌های جایگزین، استفاده از باکتریوفاژها است. از این مقوله تحت عنوان فاژ درمانی یاد می‌شود. فاژ درمانی روشی است که در آن از ویروس‌های باکتریایی که فاقد بیماریزایی برای انسان می‌باشد می‌توان استفاده نمود. فاژ درمانی روشی ارزان‌تر و سریع‌تر نسبت به تولید نسل جدید آنتی بیوتیک است. باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند که قادر به لیز باکتری‌ها می‌باشند. آنها در طبیعت بسیار فراوان هستند و اغلب در انواعی از محیط‌ها که در ارتباط با میزبانشان باشند همانند خاک، فاضلاب، آب، کود و تولیدات کشاورزی و حیوانی یافت می‌شوند (۲). این میکروارگانیسم‌ها پر تعدادترین موجودات بر روی زمین هستند و تعداد آنها به 10^{31} می رسد و از لحاظ ساختار فیزیکی، محتوای ژنتیکی و نوع زندگی دارای تنوع زیادی هستند (۹). میزان تخمینی آنها ده برابر تعداد باکتری میزبان خود می‌باشد.

باکتریوفاژهای *Caudovirales* معمولاً به دو شکل لایتیک (Lytic) و موقت (Temperate) وجود دارند. فاژهایی که برای اهداف درمانی استفاده می‌شوند معمولاً لایتیک مطلق هستند و از ۳ خانواده در راسته *Caudovirales* شامل *Myoviridae*، *Siphoviridae* و *podoviridae* می‌باشند (۷).

جداسازی و توصیف فاژهای ویرولانت و اختصاصی سالمونلا از منابع طبیعی با هدف نهایی ایجاد یک کلکسیون از فاژها جهت کنترل سالمونلا انجام می‌شود. در این پژوهش جداسازی فاژهای لایتیک ۵ سویه استاندارد سالمونلا تایفی موریوم و سالمونلا پاراتایفی B که از منابع انسانی جدا شده‌اند انجام شده و خصوصیات مورفولوژیکی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

[DOI: 10.22102/22.2.120]

و دامنه میزبانی این باکتریوفاژها مورد ارزیابی قرار گرفته است.

روش بررسی

در یک مطالعه توصیفی جهت جداسازی باکتریوفاژها، نمونه های مورد نیاز از فاضلاب شهری و تصفیه خانه فاضلاب شهر رشت تهیه شد. نمونه‌گیری از فاضلاب به صورت مداوم و هر دو هفته یک بار انجام گرفت و نمونه‌ها بلافاصله پس از تهیه به یخچال آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل و در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

سوش‌های باکتری:

سویه‌های استاندارد باکتری سالمونلا مورد استفاده در این پژوهش سویه‌های تایپ بندی شده بودند که تمام خصوصیات ژنومی و پروفایل پروتئینی و آنزیمی آنها مشخص گردیده است و هر یک مربوط به یک کلن باکتریایی خاص می‌باشند. این سویه‌های سالمونلا بر اساس پروفایل‌های آللی برای ۲۰ جایگاه پلئومورفیک آنزیم در ۴۸ تایپ الکتروفورتیک (Mu، Pb، He، Sp،Tm) طبقه بندی شده‌اند (Salmonella reference collections SARA) (۱۰). سویه‌های منتخب شامل باکتری‌های استاندارد سالمونلا و شماره‌های ۱، ۶، ۴۶، ۴۸ و ۵۱ بود، که سویه شماره ۱ و ۶ از گروه سالمونلا تایفی موریوم و سویه - های شماره ۴۶، ۴۸ و ۵۱ متعلق به گروه پاراتایفی B بودند.

باکتری‌های مذکوردر محیط نوترینت آگار کشت داده شدند و از باکتری‌ها سوسپانسیونی در محیط LB براث تهیه و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد.

ایزولاسیون باکتریوفاژ:

۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری به همراه ۵۰ میلی لیتر از نمونه فاضلاب و ۵۰ میلی لیتر از محیط Double LB براث در یک ارلن با هم مخلوط و ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷°C درجه انکوبه شد.

روز بعد، از سوسپانسیون نمونه برداری نموده و توسط سانتریفیوژ یخچال دار در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، سانتریفیوژ و محلول رویی توسط فیلتر ۰/۴، فیلتر گردید.

سوسپانسیون حاصل از $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۸}$ رقیق سازی شد. فاژ رقیق شده و باکتری هدف کشت داده شده با ۲/۵ میلی لیتر محیط سافت آگار (SA) که همان LB Broth حاوی ۰/۷ درصد آگار بود در دمای ۵۰ درجه مخلوط و سپس روی پلیت های LB آگار پخش شد و در ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. اگر نمونه فاضلاب حاوی باکتریوفاژ بر علیه سویه باکتری باشد با ورود به باکتری و تکثیر، باعث انهدام و لیز باکتری می‌شود که این پدیده به شکل پلاک-های شفاف مشاهده می‌شودکه نشان دهنده کشته شدن باکتری توسط باکتریوفاژ است.

خالص سازی پلاک:

علت انجام این مرحله جداسازی فاژهایی است که یک باکتری مشترک را آلوده کرده‌اند، زیرا به طور همزمان ممکن است دو فاژ برای یک باکتری جداسازی شود که با انجام این مرحله می‌توان فاژها را جدا نمود.

پلاک لایتیک را با پی پت پاستور استریل برداشته و در یک میکروتیوب ۱/۵ سی سی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محیط LB براث ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده و پس از انکوباسیون مرحله Serial dilution انجام گردید.

۱۰۰ میکرولیتر از رقت تهیه شده و ۲۰۰ میکرولیتر از باکتری با ۲/۵ میلی لیتر محیط سافت آگار (SA) در دمای ۵۰ درجه مخلوط و سپس روی پلیت های LB آگار پخش شد و در ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید.

غنی سازی:

۱۰۰ میکرولیتر از استوک فاژ با ۲/۵ میلی لیتر SA و ۲۰۰ میکرولیتر باکتری در دمای ۵۰ درجه مخلوط و روی پلیت LB آگار پخش شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه گردید. سپس ۲ میلی لیتر از محیط LB براث روی پلیت ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. پس از آن با سر سمپلر آبی استریل LB براث رویی

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

[DOI: 10.22102/22.2.120]

کشیده و در لوله فالکون استریل ریخته شد و باقی SA روی سطح پلیت با پی پت پاستور استریل تراشیده و به همان لوله فالکون اضافه شد.این لوله فالکون به مدت ۱۵ دقیقه دردور ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی آن توسط فیلتر ۰/۴ فیلتر شد. این محلول حاضر به عنوان استوک می‌باشد و در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود.

تعیین دامنه میزبانی:

این مرحله نشان می دهد که یک فاژ جداسازی شده قادر است چند باکتری از یک گونه را لیز کند.

۱۰۰ میکرولیتر از ۱۹ سویه از کلکسیون باکتری سالمونلا کشت داده شده روی محیط LB آگار پخش گردید و به مدت ۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا سطح پلیت خشک شود. سپس به تعداد فاژهایی که داریم (تا ۴ فاژ در هر پلیت) ۱۰ میکرولیتر از استوک رقیق شده فاژ را روی پلیت ریخته و بدون پخش کردن صبر نمودیم تا در دمای اتاق جذب محیط شود و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از طی این مدت انکوباسیون مواردی که پلاک تشکیل دادند به عنوان مثبت گزارش گردید.

بررسی مورفولوژی فاژ با میکروسکوپ الکترونی:

مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریوفاژ را بر روی گرید پوشیده شده با کربن قرار داده و اجازه داده شد تا در دمای اتاق خشک شود. سپس با محلول اورانیل استات رنگ‌آمیزی انجام گردید. گریدهای رنگ آمیزی شده توسط میکروسکوپ الکترونی Transmission (LEO906;zeiss,Germany) مشاهده و از نواحی مورد نظر عکس تهیه شد.

ذخیره سازی فاژ:

۵۰۰ میکرولیتر از استوک فاژ با ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول استریل درون میکروتیوب مخلوط گردید به طوری که دو فاز نشود و در فریزر ۷۰?C- نگهداری گردید.

نتایج

جمع آوری و جداسازی باکتریوفاژها:

طی ۶ ماه نمونه‌گیری از فاضلاب تصفیه خانه رشت به صورت دو هفته یک بار و انجام مراحل جداسازی و خالص سازی باکتریوفاژ، ۲ باکتریوفاژ لایتیک سویه‌های استاندارد ۱ و ۶ سالمونلا تایفی موریوم و ۳ باکتریوفاژ لایتیک برای سویه‌های ۴۶، ۴۸ و ۵۱ سالمونلا پاراتایفی B از کلکسیون استاندارد، ایزوله گردید (شکل شماره ۱).

میزان غلظت باکتریوفاژها:

با استفاده از تکنیک Plaque assay میزان غلظت باکتریوفاژها مشخص شد. تعداد فاژهای جداسازی شده به صورتplaque forming unit گزارش گردید (جدول ۱).

پلاک‌های دیده شده در هر ۵ باکتری آلوده شده با باکتریوفاژ، شفاف و فرم لایتیک بودند.

جدول ۱: واحد تشکیل دهنده پلاک در هر میلی لیتر باکتریوفازهای جدا شده بر ضد سویه‌های استاندارد کلکسیون سالمونلا

تعداد (pfu/ml)	باکتریوفاژ جدا شده
$۳×۱۰^{۸}$	باکتریوفاژ جداسازی شده باکتری سالمونلا تایفی موریوم سویه استاندارد ۱
$۴۸×۱۰^{۸}$	باکتریوفاژ جداسازی شده باکتری سالمونلا تایفی موریوم سویه استاندارد ۶
$۲۴×۱۰^{۸}$	باکتریوفاژ جداسازی شده باکتری سالمونلا پاراتایفی B سویه استاندارد ۴۶
$۲۳×۱۰^{۸}$	باکتریوفاژ جداسازی شده باکتری سالمونلا پاراتایفی B سویه استاندارد ۴۸
$۱۲×۱۰^{۸}$	باکتریوفاژ جداسازی شده باکتری سالمونلا پاراتایفی B سویه استاندارد۵۱

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

[DOI: 10.22102/22.2.120]

بررسی دامنه میزبانی باکتریوفاژها:

دامنه میزبانی ۵ باکتریوفاژ جداسازی شده با ۱۹ سویه دیگر از کلکسیون باکتری سالمونلا که همگی سویه های جداسازی شده از انسان بودند ارزیابی گردید که در جدول ۲ آمده است. هر ۵ سویه قادر به لیز سویه‌های میزبان خود در کل فرآیند بودند.

مورفولوژی و دسته بندی باکتریوفاژها:

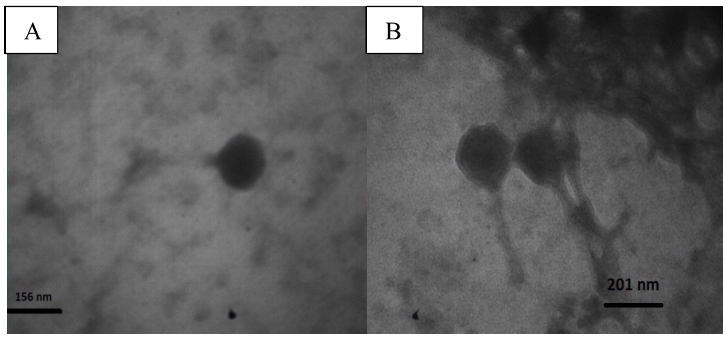
۵ باکتریوفاژ جداسازی شده پس از رنگ آمیزی منفی و بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی توسط میکروسکوپ الکترونی دسته بندی شدند.

باکتریوفاژهایی که علیه سویه‌های استاندارد سالمونلا تایفی موریوم شماره ۶ و سالمونلا پاراتایفی شماره ۴۶، ۴۸ و ۵۱ جداسازی شدند متعلق به خانواده *Siphoviridae* بودند. باکتریوفاژ سالمونلا تایفی موریوم شماره ۱ نیز متعلق به خانواده *Podoviridae* بود.

جدول ۲: دامنه میزبانی باکتریوفاژهای جدا شده

سویه استاندارد سالمونلا / باکتریوفاژ	۵۳	۵۴	۵۵	۵۸	۵۹	۱۶	۱۹	۴۳	۴۴	۵۶	۶۲	۴۲	۲۷	۱	۶	۴۶	۴۸	۵۱	۷۰
۱								+			+	+		+	+		+	+	
۶	+	+	+		+					+	+	+		+	+	+			
۴۶	+		+							+		+			+	+	+		
۴۸	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+				+	+		
۵۱						+				+		+		+				+	

علامت مثبت (+) نشان دهنده لیز سوش باکتری توسط باکتریوفاژ می‌باشد.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ TEM از باکتریوفاژهای جدا شده: A خانواده *Podoviridae*، و B خانواده *Siphoviridae*

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

[DOI: 10.22102/22.2.120]

بحث

تجویز آنتی بیوتیک‌ها در انسان و دام جهت پیشگیری و درمان بیماری‌های باکتریایی شرایطی را جهت زنده ماندن سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک ایجاد می‌کنند (۱۱). فلوروکینولون‌ها و سفالوسپورین‌های وسیع الطیف داروهای مناسب جهت درمان عفونت‌های مهاجم سالمونلا در کودکان و بزرگسالان می‌باشند (۱۲ و ۳). سویه‌های MDR سالمونلا انتریکا در آسیا شایع هستند. به دلیل تفاوت الگوی مقاومتی در سروتایپ‌ها و مکان‌های مختلف، نمی‌توان یک الگوی مقاومتی ویژه در مورد سالمونلا ارائه نمود ولی در کل بیشترین مقاومت‌ها در سروتایپ تایفی موریوم گزارش شده است (۱۳). در مطالعه‌ای در ایران از سال ۷۸ تا ۷۹ از میان ۴۰۰ نمونه مدفوع کودکان مبتلا به اسهال، ۶ مورد سالمونلا پاراتایفی B و یک مورد سالمونلا تایفی شناسایی شد. برخی سالمونلاهای جدا شده نسبت به سفوتاکسیم و سفالوتین مقاومت کامل و نسبت به جنتامایسین و کانامایسین مقاومت نسبی از خود نشان دادند (۱۴). بنابراین می‌توان پیش بینی نمود چنانچه نظارتی در مصرف آنتی بیوتیک‌ها انجام نگیرد علاوه بر آمینوگلیکوزیدها، سفالوسپورین‌ها نیز دیر یا زود بی‌اثر شوند (۱۵). موانع زیادی بر سر راه شرکت های دارویی در تولید آنتی بیوتیک ها وجود دارد، از جمله آنتی بیوتیک‌ها از بسیاری از داروها سودآوری کمتری داشته و دوره رژیم درمانی آنتی بیوتیک‌ها محدود است. همچنین رشد سریع مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها مدت زمان کارآمدی و مفید بودن آنها را کم می کند (۱۶).

یکی از روش‌های جایگزین، استفاده از باکتریوفاژها است. درمان باکتری های مقاوم به درمان توسط باکتریوفاژ می - تواند بسیار مؤثر باشد. فاضلاب اغلب حاوی تعداد زیادی میکروب به دلیل آلودگی مدفوع و منابع آب بیمارستان می باشد. فاژ بعد از واکنش با گیرنده باکتری وارد آن شده و باعث آلودگی میزبان می شود. اکثر فاژهای یافت شده، ویژگی زیادی برای گیرنده‌های میزبانشان داشته اند و با گیرنده‌های متفاوت وارد واکنش نمی شوند.

در سال ۱۹۷۰ واکسن‌ها با فاژ آلوده شدند ولی در پی آن هیچ مشکل بالینی برای افراد آلوده شده پیش نیامد که این می‌تواند نشان دهنده بی خطر بودن استفاده بالینی از باکتریوفاژها باشد (۱۷).

باکتریوفاژ اختصاصی *Alicyclobacillus acidoterrestris* که عامل فساد آب میوه است از خاک اطراف درخت کنار جداسازی گردید که برای حذف باکتری از آب میوه و عدم صدمه به کیفیت آن در نظر گرفته شده که این از موارد دیگر کاربرد باکتریوفاژ می‌باشد (۱۸).

علاوه بر مطالعه حاضر که باکتریوفاژهای اختصاصی سالمونلا تایفی موریوم و پاراتایفی B جداسازی و مورد ارزیابی قرار گرفته، مطالعات دیگری بر روی باکتری‌های دیگر صورت گرفته است.

در مطالعه‌ای در تهران، باکتریوفاژ اختصاصی سالمونلا انتریتیدیس از مدفوع طیور جداسازی و کارایی آن در کاهش و حذف میزان سالمونلا در روده باریک حیوانات مبتلا به این باکتری و بهبود سیستم ایمنی آنها، مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹). همچنین در سال ۸۸ در مشهد جداسازی باکتریوفاژهای لایتیک علیه ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به آنتی بیوتیک انجام گرفت که نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که در غلظت بالا، فاژها اثرات باکتریسیدی بالایی دارند و با افزایش غلظت فاژ اثرات باکتریسیدی هم افزایش می‌یابد (۲۰) که البته با توجه به وجود پدیده Lysis from without شاید بتوان این فرضیه را رد کرد. زیرا با افزایش غلظت فاژها و اتصال آنها به گیرنده‌شان در سطح باکتری‌ها، انسجام غشا بهم ریخته و بدون ورود و تکثیر فاژ درون باکتری، دیواره آن لیز و باکتری از بین می‌رود.

در مطالعه مشابه دیگری در سال ۹۲ در اصفهان، نصر اصفهانی و همکاران، باکتریوفاژهای اختصاصی علیه سویه - های سودوموناس آئروژینوزاهای دارای مقاومت چند دارویی به آمیکاسین، سفپیم، سفتازیدیم، جنتامایسین،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

[DOI: 10.22102/22.2.120]

سیپروفلوکساسین، ایمی پنم و مروپنم را جداسازی نمودند که پس از مواجهه با سودوموناس‌های غیر مقاوم به دارو و سه باکتری گرم منفی اسینتوباکتر بومانی، کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر کلوآکه، بی‌تأثیر بود (۱۷). البته نوع باکتریوفاژ جداسازی شده مشخص نشده بود، ولی در پژوهش حاضر نوع باکتریوفاژها مشخص گردیده است که در مطالعات مشابه می تواند مفید باشد.

در آمریکا در سال ۲۰۱۴ در مطالعه ای با هدف تولید کلکسیونی از باکتریوفاژهای لایتیک که قادر به آلوده سازی سروارهای متفاوت و پاتوژن سالمونلا انتریکا، انجام شد ۶ باکتریوفاژ لایتیک علیه سروارهای سالمونلا انتریکا از نمونه فاضلاب و مدفوع حیوانات جداسازی و از نظر مورفولوژیکی و دامنه میزبانی بررسی گردید که دو فاژ SEA1 و SEA2 در میان فاژهای جداسازی شده دامنه میزبانی وسیعی علیه سالمونلا داشتند و SEA2 درآلوده سازی سالمونلا تایفی موریوم DT104 بسیار کارآمد بود که با بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی TEM متعلق به خانواده *Myoviridae* شناسایی شدند و ۴ باکتریوفاژ دیگر نیز متعلق به خانواده *Siphoviridae* بودند (۲). در مطالعه حاضر که قسمتی از آن مربوط به جداسازی باکتریوفاژهای لایتیک سویه‌های استاندارد سالمونلا تایفی موریوم و سالمونلا پاراتایفی B جداسازی شده از انسان بود دو باکتریوفاژ ایزوله شده با بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی TEM متعلق به خانواده *Siphoviridae* و *Podoviridae* شناسایی گردیدند.

Pereira و همکاران در سال ۲۰۱۶ در پرتغال، ۳ باکتریوفاژ phSE-1،phSE-2 وphSE-5 را علیه سالمونلا تایفی موریوم جداسازی کردند که پس از بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی متعلق به خانواده *Siphoviridae* بودند و آنها را به صورت جداگانه و با ترکیب ۲ یا ۳ فاژ برای کنترل سالمونلا تایفی موریوم مقایسه کردند که هر ۳ فاژ علیه سالمونلا تایفی موریوم مؤثر بودند، اما استفاده از cocktail در مقایسه با فاژها به صورت جداگانه خیلی مؤثر نبوده است (۲۱).

در چین نیز Bao و همکاران در سال ۲۰۱۵، ۲ باکتریوفاژ لایتیک PA13076 وPA2184 توسط ۲ باکتری سالمونلا انتریتیدیس به عنوان میزبان باکتریوفاژ، از فاضلاب مرغ جداسازی شد و با کمک میکروسکوپ الکترونی جز خانواده *Myoviridae* دسته بندی گردیدکه دامنه میزبانی وسیعی در جنس سالمونلا داشتند و میزان اثر بخشی آنها به صورت مستقل و cocktail در دمای ۴ درجه سانتیگراد بهتر از ۲۵ درجه سانتیگراد بود (۲۲).

Wong و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مالزی، باکتریوفاژ لایتیک st1 را از مدفوع مرغ جداسازی و شناسایی کردند و به عنوان کاندید برای کنترل سالمونلا در مرغ ارزیابی نمودند. این فاژ متعلق به خانواده *Siphoviridae* بود که توانایی آلوده کردن سالمونلا تایفی موریوم و *S.hadar* را نیز داشت (۲۳).

نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی در سراسر جهان و مشکلات تولید آنتی بیوتیک‌های جدید، نتایج این مطالعه و مطالعات مشابه نشان می‌دهد استفاده از باکتریوفاژها به عنوان گزینه درمانی و جایگزین مناسب برای آنتی بیوتیک‌ها به ویژه در باکتری‌های دارای مقاومت چند دارویی مورد بررسی بیشتری قرار بگیرد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات سرکار خانم دکتر زبردست و پرسنل مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی که صمیمانه در انجام این طرح همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

[DOI: 10.22102/22.2.120]

References

1. Hungaro H, Mendonca R,Gouvea D,Vanetti M,Pinto C. Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. Food Research International 2013; 52: 75-81

2.Akhtar M, Viazis S, Gonzalez F. Isolation, identification and characterization of lytic, wide host range bacteriophages from waste effluents against Salmonella enterica serovars. Food Control.2014;38:67-74.

3. Van Boxstael S, Dierick K, Van Huffel X, Uyttendaele M, Berkvense D, Herman L and et al. Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of Salmonella typhimurium isolated from pigs, pork and humans in Belgium between 2001 and 2006. Food Research International 2012; 45: 913-918.

4. Gantzhorn M, Olsen J, ThomsenL. Importance of sigma factor mutations in increased triclosan resistance in Salmonella typhimurium. BMC Microbiology 2015; 15: 105.

5. Grant A, Hashem F, Parveen S. Salmonella and Campylobacter: Antimicrobial resistance and bacteriophage control in poultry. Food Microbiology 2016; 53:104-109.

6. Eshraghi S, Soltan Dalall M, Fardsanei F, Zahraii Salehi T, Ranjbar R, Nikmanesh B, et al. Salmonella enteritidis and antibiotic resistance patterns: a study on 1950 children with diarrhea. Tehran University Medical Journal 2010; 67: 876-882.

7. Ranjbar R, Naghoni A,Izadi M, Jafari N, Panahi Y. Isolation and identification of antibiotic resistance Salmonella typhimurium. Journal of Military Medicine 2009; 11:115-118.

8. World health organization. WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health. Geneva: world Health Report ,2014.

9. Szeloch A, Kawa Z, Dabrowska B, Kassner J, Skrobek G, Augustyniak D, and et al. Characterizing the biology of novel lytic bacteriophages infecting multidrug resistant Klebsiella pneumonia. Virology Journal 2013; 10:100.

10. Beltran P, Plock S, Smith N, Whittam T, Old D, Selander R. Reference collection of strains of the Salmonella typhimurium complex from populations. Journal of General Microbiology 1991; 137:601-606.

11. Mahfozi L, Taremian S. Antibiotic resistance of Salmonella typhi isolated from typhoid fever patients.Journal of Guilan University of Medical Science 2002; 44:49-53.

12. Bearson B, Brunelle B. Fluoroquinolone induction of phage mediated gene transfer in multidrug resistant Salmonella. International Journal of Antimicrobial Agents 2015; 46:201-204.

13. Abdollahi A, Mohammadi A, Fasihi M, Shayan R, Radmanesh R. Emergence of Bla-ctx-m-type Gene in Salmonella Enterica Serotypes Isolated from Patients Stool. Journal of Isfahan Medical School 2011; 28: 1-10.

14. Yousefi S, Mojtahedi A, Shenagari M and Atrkar - Roushan Z. The relation of qnr genes in induction of resistance to ciprofloxacin in Escherichia coli. Kurdistan University of Medical Sciences 2015; 20: 52- 60.

15. Sharifzade A, Hematzade F, Namjo A, Danesh A. Antibiotic susceptibility of antibiotic-resistant Salmonella isolated from children 0 to 2 years in Shahrekord and bacterial resistance factor transmissibility to E.coli k12. Journal of Shahrekurd Medical Science 2004;1:1-6.

16. Ryan E, Gorman S, Donnely R, Gilmore B. Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. Journal of Pharmacy And Pharmacology 2011; 63:1253-1264.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

[DOI: 10.22102/22.2.120]

17. Nasr-Esfahani B, Roshnaei M, Fazeli H, Havaei A, Moghim S, Ghasemian-Safaei H, et al. The effect of isolated bacteriophage on multi-drug resistant (MDR) Pseudomonas Aeruginosa. Journal of Isfahan Medical School 2014; 32:1805-1815.
18. Tajbakhsh A, Tofighi E, Motamedi H, Rafie S. Isolation Alicyclobacillus acidoterrestris specific bacteriophage, the causative agent of fruit juice spoilage from soil. Journal of Food Microbiology 2014; 1:15-19.
19. Mosab Ahmadi, Mohammad Amir Karimi Torshizi, Shaban Rahimi. Isolation of lytic bacteriophage from poultry's feces and evaluation of its efficiency to reduce salmonella enteritidis in vitro and in vivo. Iranian Journal of Medical Microbiology 2015; 9: 37-47.
20. Khajekaramodin M,Bazaz S,Ebrahimi M,Ghazvini K,Aghaie M,Naderinasab M,et al. Enrichment and isolation lytic bacteriophage against pseudomonas aeruginosa isolates resistant to antibiotics. Journal of Medical Microbiology 2009; 2, 3:67-72.
21. Pereira C, Moreirinha C, Lewicka M, Almeida P, Clemente C, Cunha A, et al. Bacteriophages with potential to inactive Salmonella typhimurium: use of single phage suspensions and phage cocktails. Virus Research 2016; 220:179-192.
22. Bao H ,Zhang P,Zhang H,Zhou Y,Zhang L,Wang R. Bio-Control of salmonella enteritidis in foods using bacteriophages. Viruses 2015; 7: 4836-4853.
23. Wong C, Sieo C, Tan W, Abdullah N, Bejo M, Abu J, Ho Y. Evaluation of a lytic bacteriophage,□st1,for biocontrol of Salmonella enterica serovar typhimurium in chickens. International Journal of Food Microbiology 2014; 172:92-101.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-11-05]

[DOI: 10.22102/22.2.120]