Archive of SID

جداسازی، شناسایی و ارزیابی ۲ باکتریوفاژ لیتیک علیه سویه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا مقاوم به آنتی بیوتیک از فاضلاب شهری- بیمارستانی شهرستان اصفهان

داریوش شکری*[۱]، عباس سلیمانی دلفان[۲]، رضا مویدنیا[۳]، سینا مباشری زاده[٤]، محمدصادق شیرسلیمیان[٥]، سعید عنایت اللهی[٦]، جلیل انتشاری[۲]

۱) مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری ، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳) گروه پاتولوژی، بیمارستان الزهرا(س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴) مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵) گروه زیست‌شناسی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران

۶) گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یزد، یزد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۲/۲۹

چکیده

مقدمه: فاژدرمانی یا استفاده از باکتریوفاژها برای درمان عفونت باکتری های بیماری زا، به عنوان یکی از روش های جایگزین آنتی بیوتیک ها در باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک مطرح است. هدف این تحقیق جداسازی باکتریوفاژهای موثر علیه سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک سودوموناس آئروجینوزا(Pseudomonas aeruginosa) و تعیین هویت آن ها می باشد.

مواد و روش ها: سویه های مختلف باکتری سودوموناس آئروجینوزا از نمونه های مختلف بالینی در طی ۹ ماه(تیر ۹۱ تا فروردین ۹۲) از سه بیمارستان الزهرا(س)، امید و شهید بهشتی شهر اصفهان جداسازی و شناسایی شدند و میزان مقاومت به آنتی بیوتیک در سویه های جداسازی شده نسبت به آنتی بیوتیک های رایج این باکتری(شامل ایمی پنم، مروپنم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفپیم، پیپراسیلین/تازوباکتام، سفوتاکسیم و سفتازیدیم) به روش انتشار از دیسک(کربی-بائر) تعیین گردید. سویه های با مقاومت همه دارویی به این آنتی بیوتیک ها برای جداسازی باکتریوفاژهای اختصاصی انتخاب شدند. در مرحله بعد به منظور جداسازی باکتریوفاژها، نمونه برداری از فاضلاب بیمارستانی و فاضلاب شهری به عمل آمد. به کمک ایجاد پلاک حضور باکتریوفاژها بررسی گردیده و پس از غنی سازی و تغلیظ باکتریوفاژهای جداسازی شده و رنگ آمیزی نمونه ها، به منظور مشاهده موروفولوژی باکتریوفاژها و هم چنین اندازه گیری طول آن ها از میکروسکوپ الکترونی گذاره(TEM) استفاده گردید.

یافته های پژوهش: از میان ۸۱ سویه سودوموناس آئروجینوزا، ۳۸ (۴۷ درصد) سویه از این باکتری ها دارای مقاومت کامل به همه آنتی بیوتیک های تست شده بودند که پلاک های باکتریوفاژها بر علیه ۳۲ عدد(۸۴ درصد) از آن ها دیده شد. در تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ TEM دو باکتریوفاژ اصلی در مورد همه پلاک ها مورد شناسایی قرار گرفت که به خانواده های سیستوویریده(Cystoviridae) و لویویریده(Leviviridae) متعلق بودند.

بحث و نتیجه گیری: دو باکتریوفاژها جداسازی شده که به صورت مخلوط(یا کوکتل فاژی) اثر باکتری کشی قوی علیه اکثر سویه های بسیار مقاوم باکتری سودوموناس آئروجینوزا داشتند می توانند کاندیداهای مناسبی برای استفاده در فاژدرمانی بر علیه این عفونت ها باشند.

واژه های کلیدی: باکتریوفاژ، فاژدرمانی، سودوموناس آئروجینوزا، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، سیستوویریده، لویویریده

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیماری های گرمسیری و عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: Dariush.shokri61@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گسترش باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک به نگرانی عمده ای تبدیل گشته است به طوری که درصد فراوانی از مرگ و میر سالانه بیمارستانی را به خود اختصاص می دهند(۱). از این میان باکتری سودوموناس آئروجینوزا به عنوان یکی از باکتری های اصلی عامل عفونت در بیماران بستری(اکتسابی از بیمارستان) درصد فراوانی از این مرگ و میرها را به خود اختصاص می دهد به طوری که برخی از سویه های جدا شده آن ها به تمامی آنتی بیوتیک های رایج از خود مقاومت نشان می دهند و هیچ آنتی بیوتیک رایج شناخته شده ای برای درمان آن ها وجود ندارد(۲). عدم درمان این عفونت ها با آنتی بیوتیک ها باعث گرایش محققان و دانشمندان به روش های کاراتر و جایگزین برای حذف و کنترل این باکتری ها شده است. یکی از این روش های جایگزین و یا مکمل، استفاده از باکتریوفاژها(فاژها) است که به منظور درمان عفونت در بسیاری از عفونت های مقاوم به درمان، به طور موفقیت آمیز مورد استفاده قرار گرفته است(۶-۳). این پدیده یا فاژدرمانی به معنای استفاده از باکتریوفاژها برای درمان عفونت های ناشی از باکتری ها و به خصوص استفاده از چند فاژ هم زمان به صورت مخلوط که کوکتل فاژی نامیده می شود برای افزایش طیف میزبان در مورد یک جنس خاص، بر علیه عفونت های مختلف باکتریایی استفاده شده است(۳،۴). برخلاف بیشتر آنتی بیوتیک ها، فاژها اسلحه های هوشمندی هستند که اختصاصی عمل می کنند و بنا بر این به باکتری های مفید بدن مانند باکتری های روده آسیب کمی وارد می کنند در حالی که آنتی بیوتیک ها آن ها را از بین می برند(۴،۵). از طرف دیگر فاژها به صورت محدود عمل می کنند و بعد از نابود کردن باکتری های مضر به چرخه غیر فعال زندگی خود وارد می شوند و عملاً در برابر باکتری های غیر میزبان فعالیتی از خود نشان نمی دهند. به علاوه، تولید فاژها آسان و ارزان است، آلرژی را تحریک نمی کنند و اثرات جانبی کمی دارند(۷،۸). فاژدرمانی در کشورهای اروپای شرقی از قبیل گرجستان و لهستان برای درمان عفونت های مختلف استفاده می شود اما در حال حاضر محققان در بسیاری از کشورهای اروپایی و امریکایی، به فاژدرمانی روی آورده اند(۷). از فاژدرمانی برای درمان عفونت های ناشی از سودوموناس، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی سیلین، استرپتوکوکوس ها و همین طور باکتری های خانواده انتروباکتریاسه از جمله اشرشیاکلی استفاده شده است(۸،۹).

هدف این تحقیق جستجوی باکتریوفاژهای موثر بر علیه سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک سودوموناس آئروجینوزا جداسازی شده از عفونت های بیمارستانی و تعیین هویت و ارزیابی فعالیت آن ها بود به گونه ای که بتوان آن ها را برای فاژدرمانی معرفی کرد.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی سویه های سودوموناس آئروجینوزا و انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی بر روی آن ها: در ابتدا سویه های مختلف باکتری سودوموناس آئروجینوزا از نمونه های مختلف بالینی جداسازی و شناسایی شدند. شناسایی ایزوله ها به کمک آزمون های بیوشیمیایی(روش های فنوتیپیک) شامل تست های کاتالاز، اکسیداز، DNase، حساسیت به دیسک کولیستین، TSI، MR، VP، سیمون سیترات، SIM، لیزین دکربوکسیلاز، اورنیتین دکربوکسیلاز، فنیل آلانین دآمیناز، تست OF با قند گلوکز و ONPG انجام شد(۱۰). الگوی مقاومت به آنتی بیوتیک در سویه های جداسازی شده نسبت به آنتی بیوتیک های ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم(۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین(۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین(۵ میکروگرم)، سفپیم(۳۰ میکروگرم)، پیپراسیلین/تازوباکتام(تازوسین) (۱۰۰/۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم(۳۰ میکروگرم) و سفتازیدیم(۳۰ میکروگرم)(خریداری شده از شرکت مست انگلیس) به روش انتشار از دیسک و با روش استاندارد کربی-بائر براساس راهنمای موسسه استاندارد آزمایشگاهی و کلینیکی تعیین گردید(۱۱). سویه های با مقاومت همه دارویی به آنتی بیوتیک های فوق برای جداسازی فاژهای اختصاصی انتخاب شدند.

ب) جداسازی باکتریوفاژها: به منظور جداسازی باکتریوفاژهای موثر بر باکتری های جداسازی شده در مرحله قبل، نمونه برداری از فاضلاب بیمارستانی و فاضلاب شهری به عمل آمد. آب این مناطق در بطری

www.SID.ir

Archive of SID

های درب دار استریل به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. نمونه های جداسازی شده پس از انکوباسیون در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیده و سپس محلول روئی به وسیله فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر از جنس استات سلولز فیلتر شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد(۱۲).

ج) مشاهده اثر پلاک ایجاد شده به وسیله باکتریوفاژ بر روی باکتری میزبان: کشت تازه ای از باکتری های سودوموناس آئروژینوزای جداسازی شده در مرحله قبل و نیز سودوموناس آئروژینوزای استاندارد (Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853) تهیه شده و بر روی محیط BHI کشت داده شد، نمونه ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و پس از این مرحله ۱۵ میکرولیتر از محلول تهیه شده در مرحله قبل بر روی پلیت حاوی باکتری قرار داده شد. به منظور مشاهده اثر پلاک و بدست نیامدن واکنش مثبت کاذب ۲۰ میکرولیتر از محلول جداسازی باکتریوفاژ به صورت نمونه شاهد در شرایط برابر با پلیت های فاژ مورد آزمایش قرار داده شد. ایجاد پلاک بر روی کشت باکتری به عنوان مثبت بودن تست از نظر حضور فاژ در نظر گرفته شد.

د) غنی سازی باکتریوفاژهای جداسازی شده: جهت غنی‌سازی باکتریوفاژهای مورد مطالعه، کشت تازه سویه های مختلف باکتری سودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت نوترینت براث تهیه شد و به میزان یک درصد از محلول جداسازی شده در مرحله اول(احتمالاً حاوی باکتریوفاژ) به این کشت ها اضافه گردید و مخلوط کشت باکتری و باکتریوفاژ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در ۶۰ دور در دقیقه نگهداری شد. هم چنین به منظور تهیه یک استاندارد منفی، نمونه کشت مشابه نمونه اصلی اما بدون محلول باکتریوفاژ کشت گردید. بعد از مدت ۴۸ ساعت نمونه ها ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول روئی(حاوی ذرات باکتریوفاژ) پس از فیلترگذاری با فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر از جنس استات در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. جهت غنی سازی مناسب باکتریوفاژها این مراحل چندین مرتبه تکرار گردید(۱۲،۱۳).

ه) تغلیظ باکتریوفاژها: محلول حاوی باکتریوفاژ و باکتری میزبان که از ۲۴ ساعت قبل با یکدیگر انکوبه شده بودند به مدت یک ساعت روی یخ نگه داشته شد و سپس حذف باکتری ها و مواد اضافی آن ها توسط سانتریفوژ در دور ۱۱۰۰۰g به مدت ده دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد به انجام رسید. پس از این مرحله مایع روئی جدا شده و برای رسوب ذرات فاژی معلق در آن از پلی اتیلن گلایکول ۶۰۰۰ واحد تا غلظت ۱۰ درصد وزنی/حجمی استفاده شد و رسوب به دست آمده به لوله های سانتریفوژ منتقل شده و برای بازیافت ذرات فاژی یک سانتریفوژ دیگر در دور ۱۱۰۰۰g به مدت ده دقیقه در ۴ درجه انجام گردید و مایع روئی دور ریخته شده و رسوب خشک پلی اتیلن گلایکول ۶۰۰۰ به همراه ذرات فاژ حاصل در محلول بافر SM معلق گردید(برای تهیه بافر SM ۵/۸ گرم NaCl، ۲ گرم MgSo4، ۵۰ میلی لیتر Tris-HCl ۱ مولار، ۵ میلی لیتر محلول ۲ درصد وزنی–حجمی ژلاتین را به کمک آب به حجم ۱ لیتر رسانده شد). در نهایت برای جداسازی پلی اتیلن گلایکول و باقی مانده باکتری ها از سوسپانسیون فاژی، به مقدار هم حجم محلول باقی مانده کلروفرم اضافه گردید(میزان و زمان استفاده از کلرفرم به اندازه ای بود که باعث حذف غشاء ویروس در صورت وجود نشد). یک ورتکس آرام به مدت سی ثانیه انجام شد و سپس برای جدا کردن فاز آلی و فاز آبی، سانتریفوژ ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت. فاز آلی دور ریخته و فاز آبی که دارای ذرات فاژی بود به منظور مطالعه به وسیله میکروسکوپ الکترونی در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد(۱۲،۱۳).

و) شناسایی خانواده باکتریوفاژها به کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری(TEM): نمونه های باکتریوفاژ غلیظ شده در مرحله قبل به وسیله رنگ یورانیل استات(نمک اورانیوم) ۲ درصد وزنی/حجمی با pH برابر ۴ تا ۴/۵ به صورت رنگ آمیزی منفی رنگ آمیزی شده و بر روی گرید مسی ۴۰۰ مش ثابت گردید. سپس اضافه رنگ به وسیله کاغذ فیلتر خشک شده و جهت مشاهده آماده گردید. پس از رنگ آمیزی

www.SID.ir

Archive of SID

باکتریوفاژهای تغلیظ شده، نمونه ها به منظور مشاهده موروفولوژی باکتریوفاژ و هم چنین اندازه گیری طول آن ها به وسیله میکروسکوپ TEM(مدل فلیپس CM10) مورد بررسی قرار گرفتند و تصاویر گرفته شده با فاژهای استاندارد شناسایی شده قبلی موجود در منابع معتبر به منظور تشخیص خانواده آن ها مطابقت داده شد(۱۶-۱۳).

یافته های پژوهش

تعداد ۸۱ سویه سودوموناس آئروجینوزا از نمونه های بالینی مختلف در طی ۹ ماه(تیر ۹۱ تا فروردین ۹۲) از سه بیمارستان الزهرا(س)، امید و شهید بهشتی شهر اصفهان جداسازی و شناسایی گردیدند. تست های بیوشیمیایی باکتری سودوموناس آئروجینوزا به صورت زیر بود: تست های مثبت شامل: کاتالاز و اکسیداز، سیمون سیترات، حرکت، O قند گلوکز مثبت و تست های منفی نیز شامل: DNase ،MR، VP، لیزین دکربوکسیلاز، اورنیتین دکربوکسیلاز، فنیل آلانین دآمیناز، اندول، تولید SH2 و ONPG بودند. هم چنین حساس به دیسک کولیستین و دارای الگوی alk/alk در محیط TSI بودند. نمونه های بالینی که سویه ها از آن ها جداسازی گردید شامل ادرار میانی(۴۵ عدد)، نمونه های تنفسی(۱۵ عدد)، نمونه خون(۸ عدد)، مایعات استریل بدن(۶ عدد)، زخم و آبسه(۴ عدد) و سایر نمونه ها(۳ عدد) بودند. میزان مقاومت این باکتری ها به آنتی بیوتیک های مختلف در جدول شماره ۱ آمده است. ۳۸ سویه از این باکتری ها دارای مقاومت کامل به همه آنتی بیوتیک های تست شده علیه آن ها بودند و این سویه ها برای جداسازی فاژ بر علیه آن ها انتخاب شدند.

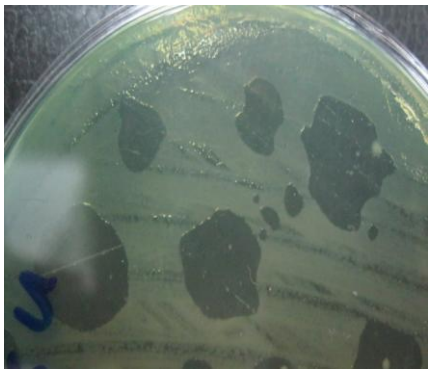
جدول شماره ۱. میزان مقاومت سویه های مختلف جداسازی شده سودوموناس به آنتی بیوتیک های مختلف

آنتی بیوتیک	حساس تعداد(درصد)	نیمه حساس تعداد(درصد)	مقاوم تعداد(درصد)
سیپروفلوکساسین	۳۰ (۳۷)	۲ (۲/۵)	۴۹ (۶۰/۵)
پیپراسیلین/تازوباکتام	۳۰ (۳۷)	۴ (۵)	۴۷ (۵۸)
ایمی‌پنم	۱۴ (۱۷/۳)	۹ (۱۱/۱)	۵۸ (۷۱/۶)
مروپنم	۱۱ (۱۳/۶)	۵ (۶/۲)	۶۵ (۸۰/۲)
آمیکاسین	۲۲ (۲۷/۲)	۴ (۴/۹)	۵۵ (۶۷/۹)
سفتازیدیم	۲۰ (۲۴/۷)	۲ (۲/۵)	۵۹ (۷۲/۸)
سفوتاکسیم	۸ (۹/۹)	۱ (۱/۲)	۷۲ (۸۸/۹)
سفپیم	۱۴ (۱۷/۳)	۰ (۰)	۶۷ (۸۲/۷)

در مورد مناطقی که باکتریوفاژ از آب آن مناطق جدا شده بود، نمونه فاضلاب بیمارستانی دارای فاژهای مناسب برای باکتری سودوموناس آئروجینوزا بود و باکتریوفاژهای جداسازی شده به خوبی در محل تزریق بر روی محیط کشت حاوی باکتری های مورد نظر (شامل سویه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا و سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزا ATCC27853) پلاک های موثری را ایجاد نمودند (شکل شماره ۱ الف و ۱ ب). از مجموع ۳۸ (۴۷ درصد) باکتری دارای مقاومت به همه آنتی بیوتیک های استفاده شده، پلاک ها بر علیه ۳۲ باکتری(۸۴ درصد) دیده شد.

www.SID.ir

Archive of SID



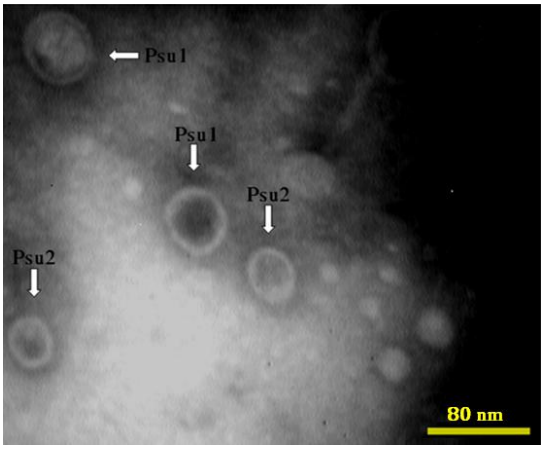
شکل شماره ۱ الف. ایجاد پلاک های با اندازه متفاوت توسط فاژهای اختصاصی سودوموناس آئروجینوزا در یکی از سویه های بالینی جداسازی شده

شکل شماره ۱ ب. ایجاد پلاک های با اندازه متفاوت توسط فاژهای اختصاصی سودوموناس آئروجینوزا در سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزا ATCC 27853

در تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ TEM دو فاژ اصلی در مورد همه پلاک ها مورد شناسایی قرار گرفت که در شکل شماره ۲ نشان داده شده‌اند(Psu1 و Psu2). نمونه Psu1 با ریخت شناسی شش وجهی، بدون دم و ابعاد تقریبی ۷۵ نانومتر و حساس بودن به کلرفرم در آزمایشات به نظر می رسد به خانواده سیستوویریده متعلق باشد و نمونه مورد مطالعه Psu2 همانند نمونه Psu1 دارای مورفولوژی شش وجهی و بدون دم می باشد و از نظر مقیاس مشاهده شده دارای ابعاد تقریبی ۳۰ نانومتر است که با مقاومت به کلرفرم به نظر می رسد به خانواده لویویریده متعلق باشد(شکل شماره ۲).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل شماره ۲. ساختار باکتریوفاژهای اختصاصی جداسازی شده برای سویه های سودوموناس آئروجینوزا گرفته شده توسط میکروسکوپ TEM. Psu1 فاژ متعلق به خانواده سیستوویریده (با اندازه تقریبی ۷۵ نانومتر) و Psu2 فاژ متعلق به خانواده لویویریده (با اندازه تقریبی ۳۰ نانومتر).

بحث و نتیجه گیری

ظهور و گسترش باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک باعث گرایش محققین به روش های کاراتر برای حذف آن ها شده است و در حال حاضر استفاده از فاژها به منظور درمان عفونت در بسیاری از عفونت های مقاوم به درمان، به طور موفقیت‌آمیز مورد استفاده قرار گرفته است(۱۶،۱۷). در مطالعه حاضر هدف جداسازی فاژهای فعال علیه سویه های مقاوم باکتری سودوموناس آئروجینوزا بود. در مورد فاژهای موثر بر سویه های سودوموناس آئروجینوزا مطالعات متعددی به انجام رسیده است. Zanetti و همکاران در سال ۲۰۱۳ فاژهای سویه های بیماری زای سودوموناس آئروجینوزا را جداسازی کردند که از خانواده های سیفوویریده و مایووریده بودند(۱۸). هم چنین Kumari و همکاران در سال ۲۰۰۹ پنج فاژ مختلف اختصاصی از سویه های سودوموناس آئروجینوزا جداسازی شده از عفونت های زخم را برای فاژدرمانی آن ها مورد استفاده قرار دادند(۱۹). این محققین موش های آزمایشگاهی را با سویه های سودوموناس آئروجینوزا آلوده کردند و سپس فاژها را بر علیه آن ها مورد استفاده قرار دادند و توانستند به طور کامل عفونت ها را درمان کنند. در مطالعه دیگر Fu و همکاران در سال ۲۰۱۰ فاژهای اختصاصی سودوموناس آئروجینوزا را بر علیه بیوفیلم ناشی از این سویه ها در کتترهای مورد استفاده در بیمارستان مورد استفاده قرار دادند(۲۰).

نتایج مطالعه حاضر همانند سایر مطالعات، نشان دهنده تاثیر باکتری کشی باکتریوفاژهای جداسازی شده بر علیه سویه های باکتری سودوموناس آئروجینوزا بود. مخلوط فاژهای استفاده شده دارای اثر لیتیک علیه اکثر سویه های باکتری فوق با مقاومت همه دارویی بود که نشان دهنده وسیع الطیف بودن این فاژها می باشد و آن ها را به عنوان کاندیدای مناسبی برای فاژدرمانی به صورت مخلوط مطرح می سازد. از طرفی با تعیین هویت این فاژها به کمک میکروسکوپ TEM که تشخیص خانواده ویروس ها را فراهم می کند این فاژها به خانواده های سیستوویریده و لویویریده تعلق گرفتند که اولی جزو فاژهای دارای ژنوم RNA دو رشته ای و فاژ دومی جزو فاژهای RNA دار تک رشته ای می باشند هر چند برای تایید نهایی هویت آن ها نیازمند استفاده از روش های دقیق تری مثل PCR می باشیم. هر دوی این فاژها قبلاً به عنوان فاژهای جنس سودوموناس شناخته شده بودند و جزو فاژهای معدود بدون دم در این باکتری هستند(۱۴). فاژهای سیستوویریده به علت دارا بودن غشاء به کلروفرم حساس هستند اما فاژهای خانواده لویویریده به خاطر عدم دارا بودن غشاء دارای مقاومت به کلروفرم

www.SID.ir

Archive of SID

هستند(۱۴،۱۵). حضور هم زمان این دو فاژ باعث اثر وسیع الطیفی آن ها شده بود به گونه ای که بر علیه غالب سویه های کاملاً مقاوم سودوموناس دارای اثر مهاری بودند. به طور کلی فاژهای جداسازی شده که دارای اثرات بسیار کارایی بودند قبلاً به طور هم زمان بر علیه سویه های مقاوم همه دارویی سودوموناس مورد استفاده قرار نگرفته اند و به نظر می رسد این دو فاژ که به صورت مخلوط اثر باکتری کشی قوی و وسیع الطیف علیه اکثر سویه های بسیار مقاوم باکتری فوق داشتند می توانند کاندیداهای مناسبی برای استفاده در فاژدرمانی بر علیه این عفونت ها باشند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان(کد تصویبی طرح: ۲۹۰۳۰۲) به انجام رسید. بدین وسیله از مسئولین زحمت کش این مرکز تشکر و قدردانی می گردد.

References

1.Kollef MH, Fraser VJ. Antibiotic resistance in the intensive care unit. Ann Intern Med 2001;134:298-314.

2.Bradley D. The structure and infective process of a Pseudomonas aeruginosa bacteriophage containing ribonucleic acid. J Gener Microbiol 1966; 45:83-96.

3.Miller R. Environmental bacteriophage-host interactions: Factors contribution to natural transduction. Ant Lee2001;79:141-7.

4.Inal JM. Phage therapy a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. Arch Immunol Therapy Exp 2003; 51:237-44.

5.Merabishvili M, Pirnay JP, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. Plos one 2009; 4:44-9.

6.Ryan EM, Gorman SP, Donnelly RF, Gilmore BF. Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. J Pharm Pharmacol2011; 63:1253-64.

7.Slopek S, Weberdabrowska B, Dabrowski M, Kucharewiczkrukowska A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. Arch Immunol Therapy Exp 1987; 35:569-83.

8. Harper DR Enright MC. Bacteriophages for the treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. J Appl Microbiol 2011; 111:1-7.

9. Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. Curr Opin Microbiol 2008; 11:393-400.

10. Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. Curr Opin Microbiol 2008;11:393-400

11. Fischetti VA. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. Trends Microbiol 2005;13:491-6

12. Delfan AS, Etemadifar Z, Bouzari M, Emtiazi G. Screening of novel bacteriophage infection in Pseudomonas putida isolated from potato disease. Jundi J Microbiol 2012; 5:550-4.

13. Borysowski J, Weberdabrowska B, Gorski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. Exp Biol Med 2006;231:366-77.

14. Hermoso JA, Garcia JL, Garcia P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. Curr Opin Microbiol2007;10:461-72.

15.Ackermann HW. Phage classification and characterization. Meth Molecul Biolo2009;501:127-40.

16.Hajihashemi B, Farzanehkhah M, Hajia M, Rahbar M. Evaluation of sensitivity and specificity of Hodge Test in diagnosis of carbapenem resistance in Klebsiella pneumoniae isolates. Biol J Microb2013; 2:59-64.

17.Webb JS, Lau M, Kjelleberg S. Bacteriophage and phenotypic variation in Pseudomonas aeruginosa biofilm development. J Bacteriol2004;186:8066-73.

18.Zanetti CCS, Mingrone RCC, Kisielius JJ, Ueda IM, Pignatari ACC. Characterization of bacteriophages infecting clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa stored in a culture collection. Brazil J Med Biol Res 2013;46:689-95.

19.Kumari S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage treatment of burn wound

www.SID.ir

Archive of SID

infection caused by Pseudomonas aeruginosa PAO in BALB/c mice. American J Biomed Sci 2009; 1:385-94.
20. Loessner MJ. Bacteriophage endolysins-current state of research and applications. Curr Opin Microbiol2005;8:480-7.

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation Identification and Evaluation of Two Lytic Bacteriophages Against Clinical Antibiotic-Resistant Strains of Pseudomonas aeruginosa from Waste Water and Hospital Sewage of Isfahan City

Shokri D[1], Soleimanidelfan A[2], Moayednia R[3], Mobasherizadeh S[4], Shirsalimian M[5], Enayatollahi S[6], Enteshari J[7]*

(Received: March 9, 2015 Accepted: May 19, 2015)

Abstract

Introduction: Phagetherapy is the therapeutic use of bacteriophages to treat pathogenic bacterial infections as alternative to antibiotics for treatment of resistant bacteria. The aims of this study were to isolate, identify and evaluate effective bacteriophages active against antibiotic resistant strains of Pseudomonas aeruginosa.

Materials & methods: Different Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical specimens during 9 months (July 2013 to March 2014) in three Isfahan hospitals (AlZahra, Omid and Shahid Beheshti hospitals) and Kirby Bauer's disc diffusion method was used for determination of resistance profiles of these isolates using different antibiotics including Amikacin, Imipenem, Meropenem, Ciprofloxacin, Ceftazidime, Cefepime, Cefotaxime, Piperacillin-tazobactam. The resistant strains to all tested antibiotics were selected for finding their specific bacteriophages from waste water and hospital sewage. Presence of phage investigated by plaque formation and after enrichment and stained of samples, TEM microscope was used for determination of phage morphology and size.

Findings: Among 81 Pseudomonas aeruginosa isolates, 38 isolates (47%) were resistant to all tested antibiotics and plaque due to phages was detected against 32 (84%) among these 38 isolates. Two phages belong to Cystoviridae and Leviviridae identified using TEM microscope.

Discussion & Conclusions: It seems that the mixture of two phages (cocktails phages) that has high bactericidal effect against resistant strains of Pseudomonas aeruginosa can be good candidates for use in phagetherapy.

Keywords: Bacteriophage, Phagetherapy, Pseudomonas aeruginosa, Antibiotic resistance, Cystoviridae, Leviviridae

1. Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2. Dept of Biology, Isfahan University, Isfahan, Iran
3. Dept of Pathology, Alzahra Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4. Nosocomial Infection Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5. Dept of Microbiology, Islamic Azad University, Ashkezar Branch,Yazd, Iran
6. Dept of Microbiology, Islamic Azad University, Yazd Branch, Yazd, Iran
** Correspondin author Email:Dariush.Shokri61@yahoo.com*

www.SID.ir