Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 11, Number 2 (May - June)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

Isolation of lytic phages against pathogenic *E.coli* isolated from diabtic ulcers

Leyla Zare[1], Mohammad Shenagari[1,2], Mohammadali Khan Mirzaei[3], Ali Mojtahedi[1,2]

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
2. Cellular and Molecular Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
3. Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, Quebec, Canada

Downloaded from ijmm.ir at 9:51 +0430 on Sunday June 24th 2018

Article Information

Article history:
Received: 2017/05/08
Accepted: 2017/05/30
Available online: 2017/06/07

Article Subject:
Medical Virology

IJMM 2017; 11(2): 34-41

Corresponding author:

Dr. Mohammad Shenagari

Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

Tel: 0981333690921

Email:
Shenagari@gmail.com

Abstract

Background and Aims: In the present study, we have tried to isolate an effective lytic bacteriophages on drug-resistant *Escherichia coli* isolated from diabetic ulcer wounds.

Materials and Methods: Two *E.coli* strains were isolated by using standard methods from patients in Razi Hospital of Rasht. Waste water of the same hospital was used as a source for isolation of lytic bacteriophages. Agar layer method was used to isolate and plaque finding. Determination of host range of isolated phages was performed using five standard reference collection of *E. coli*. Finally, Transmission electron microscopy was used for morphological analysis of the isolated bacteriophages. Morphotype and family of isolated phages were determined based on Bradley recommendation and final version of International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) report, respectively.

Results: The results showed that the isolated bacteria were highly resistant to the antibiotics tested. Based on morphological characteristics, the separated virus belongs to siphoviridae family. Based on Bradley classification, isolated phage against strains of *E.coli* belongs to the morphotype B1.

Conclusions: The isolated bacteriophage from waste water efficiently lysed the multiresistant strains of *E. coli*. Therefore, bacteriophages could potentially be used as an alternative for antibiotics for treating infections by multiresistant *E. coli*.

KeyWords: Bacteriophage, Antibiotic Resistance, *Escherichia coli*, Diabetes, Wound infection

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

Final

How to cite this article:

Zare L, Shenagari M, Khan Mirzaei MA, Mojtahedi A. Isolation of lytic phages against pathogenic *E.coli* isolated from diabtic ulcers. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (2): 34-41

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۱ – شماره ۲ – خرداد و تیر ۱۳۹۶

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

جداسازی باکتریوفاژ لایتیک مؤثر بر سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیا کلی* جداشده از عفونت زخم بیماران دیابتی

لیلا زارع[۱]، محمد شناگری[۱و۲]، محمدعلی خان میرزایی[۳]، علی مجتهدی[۱و۲]

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
۲. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران
۳. گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشگاه مک گیل، مونترال، کبک، کانادا

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۸

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۰۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۳/۱۷

موضوع:

ویروس شناسی پزشکی

IJMM 1396; 11(2): 34-41

نویسنده مسئول:

دکتر محمد شناگری

گروه میکروبیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

تلفن: ۰۹۸۱۳۳۳۶۹۰۹۲۱

پست الکترونیک:

Shenagari@gmail.com

چکیده

زمینه و اهداف: در این مطالعه باکتریوفاژ لیتیک مؤثر بر *اشریشیا کلی* مقاوم به درمان جداشده از نمونه زخم بیماران مبتلابه دیابت نوع دو جداسازی گردید.

مواد و روش کار: دو نمونه مختلف از زخم بیماران بستری در بیمارستان رازی رشت گرفته شد و سویه‌های *اشریشیا کلی* جداسازی شده با روش‌های استاندارد شناسایی شدند. نمونه‌برداری از فاضلاب همان بیمارستان برای جداسازی فاژ لیتیک انجام شد. از روش آگار دولایه برای جداسازی و مشاهده پلاک استفاده گردید. برای تعیین واکنش کراسینگ فاژ روی سویه‌های باکتری جداسازی شده و ۵ سویه استاندارد *اشریشیا کلی* انجام گردید. درنهایت برای تأیید و بررسی مرفولوژیکی از میکروسکوپ الکترونی گذاره استفاده شد. مورفوتیپ و خانواده فاژ جداشده بر اساس طبقه‌بندی Bradley و نسخه نهایی گزارش International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)، به ترتیب مشخص گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که باکتری‌های جداشده مقاومت بالایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های استفاده‌شده دارند. بر مبنای خصوصیت مورفولوژیک، ویروس جداشده متعلق به خانواده *siphoviridae* بود. بر مبنای طبقه‌بندی *Bradley* فاژ جداشده برعلیه سویه‌های *اشریشیا کلی* متعلق به مورفوتایپ *B1* بود.

نتیجه‌گیری: فاژ جداشده در این مطالعه می‌تواند به‌طور مؤثر سویه‌های *اشریشیا کلی* بیماری‌زا جداشده از زخم بیماران دیابتی را لیز کنند. درنتیجه شاید بتوان به‌عنوان یک عامل درمانی مؤثر در برابر عفونت‌های مقاوم به درمان مربوط به این باکتری در داخل بدن در مطالعات آینده استفاده شود.

کلمات کلیدی: باکتریوفاژ، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، *اشریشیاکلی*، دیابت، عفونت زخم

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

اشریشیا کلی یک باسیل گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، تخمیرکننده و اکسیداز منفی از خانواده *انتروباکتریاسه* است (۱). در اغلب بیمارستان‌ها *اشریشیا کلی* شایع‌ترین عامل سپتی سمی در بین باکتری‌های گرم منفی بوده و درواقع شایع‌ترین ارگانیسمی است که از کشت خون به دست می‌آید (۲). به دلیل مصرف بیش‌ازحد و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت‌های دارویی چندگانه در این ارگانیسم‌ها افزایش‌یافته و مشکل اصلی در درمان عفونت‌های ناشی از *اشریشیا کلی*، مقاوم بودن این باکتری نسبت به تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌باشد (۳). *اشریشیاکلی* می‌تواند از عفونت‌های زخم به‌ویژه در ناحیه شکم جدا گردد. پریتونیت به‌خصوص پس از پارگی آپاندیس در معده، اندوکاردیت، آپاندیسیت، عفونت پس از زایمان، باکتریمی و سپتی سمی نیز مشاهده‌شده است. باکتریمی و سپتی سمی معمولاً ثانویه بوده و در مبتلایان سرطان یا بیماری‌های بدخیم و به دنبال عفونت‌های صفراوی یا روده‌ای، ادراری تناسلی یا پس از دست‌کاری ایجاد می‌شود. از عفونت‌های شایع *اشریشیاکلی*

Downloaded from ijmm.ir at 9:51 +0430 on Sunday June 24th 2018

Downloaded from ijmm.ir at 9:51 +0430 on Sunday June 24th 2018

مرتبط با بافت‌های سطحی می‌توان به عفونت پوست و بافت نرم (Skin and Soft Tissue Infection) عفونت زخم در جراحی‌های مستعد آلودگی (Contaminated Surgery) گانگرن فورنیر (Fournier gangrene) در بیماران مرد دیابتی عفونت استخوان مزمن در بیماران دیابتی اشاره کرد (۴،۵). زخم پای دیابتی یکی از عوارض شایع بیماران دیابتی نوع ۱ و ۲ می‌باشد. هم‌اکنون گزارش‌ها حاکی از ابتلا ۵-۴ میلیون ایرانی به دیابت می‌باشند و متأسفانه درصد افراد مبتلابه‌صورت فزاینده‌ای رو به افزایش است (۶). احتمال ابتلا به عفونت‌های بافت نرم و عفونت استخوان در بیماران مبتلابه دیابت ۱۰ برابر افراد دیگر می‌باشد. عفونت زخم پای دیابتی به‌وسیله *اشریشیا کلی* مقاوم به چند دارو مکرراً در مطالعات مختلف گزارش‌شده است (۷). در سال‌های اخیر افزایش نرخ حضور ژن‌های دخیل در اعطای مقاومت از قبیل bla_{CTX-M} و bla_{TEM} در سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیا کلی* در مطالعات متعددی در ایران گزارش‌شده است (۸).

فاژ درمانی، استفاده از فاژها با اهداف درمانی برای از بین بردن عفونت‌های باکتریایی است. باکتریوفاژها به‌عنوان عوامل درمانی در برابر برخی از باکتری‌ها قبل از کشف آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شدند. ظهور باکتری‌های پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین افزایش هم‌زمان بیماران دارای نقص سیستم ایمنی، پزشکی مدرن را در درمان عفونت‌های میکروبی با چالش جدی مواجه کرده است. این نگرانی که بشر در حال ورود دوباره به دوران قبل از آنتی‌بیوتیک‌هاست بسیار به حقیقت نزدیک شده است و توسعه روش‌های جایگزین علیه عفونت‌ها به یکی از اولویت‌های مهم پزشکی مدرن و بیوتکنولوژی مبدل گردیده است. تا قبل از کشف و استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، پیشگیری و یا درمان عفونت‌های باکتریایی توسط باکتریوفاژها محرز شده بود. اگرچه مطالعات بالینی اولیه با باکتریوفاژها در ایالات‌متحده آمریکا و اروپای غربی قویاً پیگیری نشدند، در اتحاد جماهیر شوروی سابق و اروپای شرقی استفاده از فاژها ادامه یافت. نتایج حاصل از این مطالعات به‌طور گسترده‌ای در مجلات غیر انگلیسی (به‌طور عمده روسیه، گرجستان، لهستان) منتشر شدند و بنابراین به‌راحتی در دسترس جامعه علمی غرب نبودند (۹).

طبقه‌بندی ویروس‌های باکتریایی بر اساس چندین فاکتور ازجمله میزبان مورد ترجیح، مورفولوژی ویروس، نوع ژنوم و ساختارهای محوری مانند دم یا پوشش صورت می‌گیرد (۱۰). ویژگی‌های نوکلئیک اسید و مورفولوژی فاژ کلیدی‌ترین فاکتورهای طبقه‌بندی هستند. ژنوم می‌تواند DNA یا RNA باشد. اکثر فاژها حاوی DNA دو رشته‌ای هستند، درحالی‌که گروه‌های کوچکی از فاژها با DNA تک رشته، RNA دو رشته و RNA تک رشته وجود دارند. بر اساس مورفولوژی گروه‌های کمی در فاژها وجود دارند: فاژهای رشته‌ای، فاژهای بیست‌وجهی بدون دم، فاژهای دم‌دار و حتی چندین فاژ با پوشش حاوی لیپید. این گروه‌ها، باکتریوفاژها را تبدیل به بزرگ‌ترین گروه ویروسی در طبیعت می‌کند. در حال حاضر ۵۵۰۰ ویروس باکتریایی با میکروسکوپ الکترونی بررسی‌شده‌اند (۱۱).

با توجه به آمار مبتلایان به دیابت در ایران از یک‌سو و پیدایش سویه‌های مقاوم به چند دارو ما را بر آن داشت تا در این مطالعه همگام با مطالعات جهانی جداسازی باکتریوفاژ لیتیک مؤثر بر *اشریشیاکلی* مقاوم به درمان جداشده از نمونه زخم بیماران مبتلابه دیابت در ایران را مدنظر قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۵ به انجام رسیده است.

جمع‌آوری و جداسازی باکتری‌ها

برای جداسازی نمونه‌های *اشریشیا کلی* از اگزودای زخم پای دیابتی دو بیمار مبتلابه دیابت نوع دو استفاده گردید. نمونه‌گیری در طول انجام طرح از بیمارستان رازی در رشت انجام گرفت. نمونه‌گیری از زخم توسط سوآب استریل صورت گرفت که با کشت مستقیم در محیط کشت غنی انجام شد. پلیت های تهیه‌شده در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. برای جداسازی باکتری از کلنی‌های رشد یافته، رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی استفاده گردید.

تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جداسازی شده

تست آنتی بیوگرام طبق دستورالعمل CLSI با استفاده از روش استاندارد انتشار دیسک برای مشخص کردن مقاومت دارویی انجام گرفت (۱۲). حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی سیلین (AMX)، آزیترومایسین (AZM)، سفالکسین (CN)، نالیدیکسیک اسید (NA)، داکسی سیکلین (D)، تتراسایکلین (TE)، سیپروفلوکساسین (CP)، جنتامایسین (GM) و کانامایسین (K) ارزیابی شد. در این

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 9:51 +0430 on Sunday June 24th 2018

مطالعه باکتری‌های مقاوم به حداقل چهار دارو به‌عنوان باکتری گرم منفی مقاوم به چند دارو (Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacterium) در نظر گرفته شد.

جداسازی باکتریوفاژ ها

برای جداسازی فاژ، از فاضلاب بیمارستانی نمونه‌برداری شد. برای غنی‌سازی تعداد فاژهای احتمالی موجود در فاضلاب، ۱۰۰ mL از نمونه فاضلاب با ۵۰ mL از محیط کشت مایع LB در یک ارلن استریل مخلوط و باکتری‌های میزبان موردنظر به داخل آن تلقیح شد. سپس ارلن در گرمخانه شیکر دار در دمای ۳۷ درجه و چرخش ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. برای جداسازی فاژ، ۵۰ mL از مخلوط داخل ارلن به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس‌ازاین مدت، مایع رویی را مستقیماً در سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری ریخته و بعد سوسپانسیون حاصل را با فیلتر ۰/۴۵ نانومتر در داخل یک لوله فالکون تازه، فیلتر گردید. روی این سوسپانسیون Serial dilution گردید. از هرکدام از رقت‌های شماره ۶، ۷ و ۸ به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته با ۲/۵ mL محیط سافت آگار ذوب‌شده (حدود ۵۰ درجه) و ۲۰۰ میکرولیتر باکتری اولیه در بن ماری مخلوط می‌کنیم و روی پلیت نرمال اگار ریخته و با چرخاندن پخش شد. سپس در ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید.

خالص‌سازی باکتریوفاژ

در اغلب موارد با توجه به استفاده از مخزن فاضلاب برای جداسازی امکان حضور بیش از یک نوع فاژ در پلیت جداسازی وجود دارد که این فاژها پلاک‌هایی با اشکال و اندازه‌های مختلف ایجاد می‌کنند. پلاک لیتیک با سر سمپلر استریل برداشته‌شده و در ۵۰۰ میکرولیتر محیط LB داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. این میکروتیوب در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه باقی ماند سپس رقت سریالی تهیه شد. به خاطر اطمینان از حضور یک نوع فاژ و یا چند نوع فاژ، این پلاک‌ها به‌طور جداگانه خالص‌سازی گردیدند. از هر میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر برداشته با ۲۰۰ میکرولیتر باکتری اولیه و ۲/۵ mL محیط سافت آگار مخلوط گردید و در پلیت LB آگار ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید تا پلاک‌های ایجادشده مشاهده گردند.

ذخیره‌سازی

به‌منظور ذخیره‌سازی فاژهای جداسازی شده از استوک فاژ که در براث بود، ۵۰۰ میکرولیتر برداشته شد و با ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول استریل در میکروتیوب مخلوط گردید و تکان داده شد تا از ایجاد دو فاز ممانعت گردد. ذخیره‌سازی فاژ ها در ۷۰- درجه انجام شد.

تعیین تیتر

به‌منظور تعیین تیتر فاژ های خاص سازی شده (purified Phages) از روش محاسبه PFU/mL استفاده شد. برای این منظور باکتری موردنظر به‌صورت چمنی کشت شد. از فاژ خالص‌سازی شده به تعداد ۱۰ رقت، از 10^{-1} تا 10^{-10} در محیط LB براث تهیه‌شده و به هر پلیت اضافه گردید. پس از انکوباسیون پلیت های هر رقت به مدت یک‌شب در ۳۷ درجه سلسیوس، پلاک‌های هر رقت به‌طور دقیق بررسی شد و پلاک‌ها تا حد امکان شمارش گردید. آخرین رقت که در آن تعداد ۳۰۰-۳۰ پلاک مشاهده شد. مبنای محاسبه واحد ایجادکننده پلاک در نظر گرفته شد و از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\frac{\text{Average \# Plaques}}{D \times V} = \text{PFU/ml}$$

D = Dilution factor
V = Volume of diluted virus added to the well

مشاهده ساختمان فاژ با میکروسکوپ الکترونی

به‌منظور بررسی مورفولوژیک، تصاویر میکروسکوپ الکترونی گذاره از فاژ تهیه شد. جهت مشاهده ساختمان فاژ، از رنگ‌آمیزی منفی استفاده شد. ابتدا گرید های مسی به‌وسیله محلول فرم وار در کلروفرم و یا دی اتیلن کلراید پوشش داده شد. سپس یک قطره از نمونه روی آن قرار داده شد. بعد از خشک شدن، با کاغذ صافی اضافه نمونه گرفته شد. سپس یک قطره از رنگ فسفوتنگستیک اسید (۰/۰۱ درصد،pH ۷/۲-۷/۴) اضافه گردید و پس از خشک شدن، با میکروسکوپ الکترونی TEM (Germany Leo 906E, Zeiss) مشاهده شد.

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 9:51 +0430 on Sunday June 24th 2018

تعیین هویت فاژهای جداسازی شده

از آخرین ویرایش انتشار گزارش کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها (Virus Taxonomy: 2015 Release) برای مشخص کردن خانواده احتمالی ویروس جداسازی شده استفاده شد (۱۳). همچنین از طبقه‌بندی رفرانس Bradley برای تعیین مورفوتایپ ویروسی استفاده گردید (۱۴).

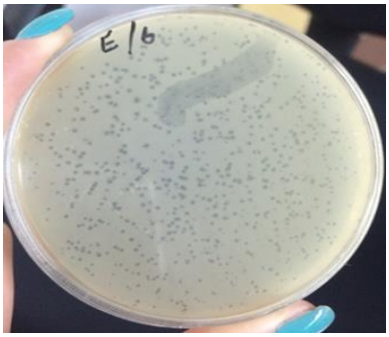
تعیین طیف میزبانی فاژ جداسازی شده

برای انتخاب فاژ مناسب برای فاژ تراپی، باید مشخص گردد که کدام فاژ محدوده میزبانی گسترده‌تری دارد. برای این منظور اثر فاژ اختصاصی جداسازی شده علیه ۵ سویه انسانی مرجع استاندارد شامل سویه‌های شماره ۱ (RM74A)، شماره ۱۰ (ANI)، شماره ۲۴ (FN33)، شماره ۵۳ (RM33B) و شماره ۷۲ (P68) نیز بررسی شد (۱۵). برای واکنش کراسینگ از روش کشت آگار دولایه استفاده شد.

یافته‌ها

مشاهده پلاک‌های فاژ خالص‌سازی شده

نمونه‌های فاضلاب گرفته‌شده حاوی چندین فاژ علیه باکتری‌ها بود که از میان آن‌ها فاژی که پلاک شفاف‌تری داشت به‌عنوان فاژ اختصاصی برای سویه باکتری خالص‌سازی انتخاب شد. نام‌گذاری این فاژ با عنوان PhEIR1 انجام شد. پلاک‌های ایجادشده توسط فاژ جداسازی شده علیه *اشریشیا کلی* ایزوله شده از بیماران دیابتی نوع دو در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود.



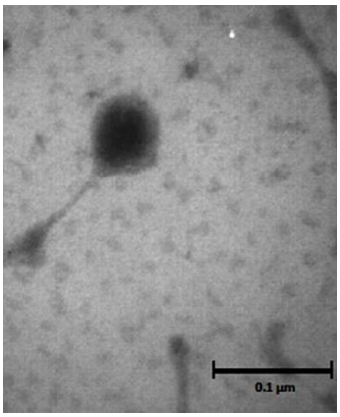
شکل ۱: پلاک‌های ایجادشده توسط فاژ PhEIR1

نتایج تعیین تیتر فاژ جداسازی شده

محاسبه تعیین تیتر فاژهای به‌دست‌آمده با استفاده از PFU/mL نشان داد که تیتر ویروس خالص‌سازی و غنی‌سازی شده بر مبنای فرمول محاسبه‌شده 36.1×10^8 بود.

مشاهده ذرات فاژی با میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و تعیین هویت فاژ

شکل ۲ تصویر تهیه‌شده از فاژ PhEIR1 توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره را نشان می‌دهد. همان‌طور که از تصویر برمی‌آید ویروس واجد سر بیست‌وجهی منظم به‌اندازه تقریبی ۶۰ نانومتر می‌باشد. این فاژ واجد دم طویل غیر انقباضی می‌باشد که این ویژگی از خصایص خانواده Siphoviridae از راسته Caudovirales می‌باشد. بر مبنای طبقه‌بندی Bradley فاژ جداشده برعلیه سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیا کلی* جداشده از نمونه‌های زخم متعلق به مورفوتایپ B1 می‌باشند. همان‌طور که در این تقسیم‌بندی قیدشده است مورفوتایپ B1 شامل باکتریوفاژهای با سر بیست‌وجهی منظم و دم غیر انقباضی طویل می‌باشند.



شکل ۲: فاژ PhEIR1 مشاهده‌شده با میکروسکوپ الکترونی

نتایج تعیین طیف میزبانی

در جدول ۱ نتایج طیف میزبانی فاژ PhEIR1 مشخص گردیده است. PhEIR1 درمجموع قادر به لیز ۶ باکتری از مجموع ۷ باکتری استفاده‌شده بود. اثرگذاری این فاژ بر روی هر دو ایزوله باکتری جداشده از بیماران با زخم پای دیابتی مشخص گردید. سویه *E.coli M2* که نسبت به هفت آنتی‌بیوتیک مقاوم بود، نسبت به ۶ فاژ حساس بود که ارتباط نداشتن مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیک و مقاومت به فاژها را نشان می‌دهد. در جدول زیر نتایج کراسینگ فاژ ها با پنج سویه‌های استاندارد مقایسه شده است.

Final Proof

جدول ۱: واکنش تعیین طیف میزبانی فاژ PhEIR1 علیه *E.coli* های جداسازی شده و سویه‌های مرجع استاندارد

	E.coli M1	*E.coli* M2	*E.coli* (RM74A)	*E.coli* (ANI)	*E.coli* (FN33)	*E.coli* (RM33B)	*E.coli* (P68)
PhEIR1	+	+	+	-	+	+	+

بحث

عصر آنتی‌بیوتیک‌ها با یک مقاله خلاصه، با عنوان "پنی‌سیلین به‌عنوان یک عامل شیمی‌درمانی" توسط Chain و همکارانش در ۱۹۴۰ آغاز شد. از آن زمان آنتی‌بیوتیک‌ها جان میلیون‌ها انسان را نجات دادند که بیشتر از هر داروی دیگری در تاریخ بشریت بوده است و به همین دلیل توسط بسیاری افراد آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان داروی جادویی اسم برده می‌شوند (۱۶). بااین‌حال شبکه ایمنی آنتی‌بیوتیک‌ها در مقابل عفونت‌های باکتریایی به دلیل ظهور مقاومت بسیار شکننده شده است. همچنین تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید به‌طورکلی کاهش‌یافته است و فقط دو آنتی‌بیوتیک از سال ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۳ توسط FDA تائید شده است که مکانیسم عمل جدیدی داشته‌اند. داشتن مکانیسم عمل جدید برای یک آنتی‌بیوتیک یک ملاحظه حیاتی در نبرد علیه مقاومت آنتی‌بیوتیکی است (۱۷). در قرن بیست و یکم مقاومت به باکتری‌ها نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس به‌عنوان مشکلی جدی در درمان عفونت‌های باکتریایی مبدل شده است. بازگشت به عصر قبل از آنتی‌بیوتیک‌ها و مرگ‌ومیر ناشی از باکتری‌های پاتوژن عامل نگرانی‌های جدی است.

فاژهای لیتیک از این نظر که فعالیت ضد باکتریایی قابل‌توجهی دارند مشابه آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. بااین‌حال، فاژهای درمانی حداقل ازنظر تئوری مزایایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. فاژها در درمان عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در انسان‌ها و حیوانات آزمایشگاهی خیلی کارآمدتر و مؤثرتر از آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش‌شده‌اند. علاوه بر استفاده برای از بین بردن باکتری‌ها، فاژها ویژگی میزبانی معینی دارند که می‌توانند برای شناسایی و تایپینگ عفونت‌های باکتریایی مورد بهره‌برداری قرار گیرد. به‌طور مثال، شرکت میکروفاژ اخیراً تأییدیه FDA را برای تست کشت خون که از عفونت فاژ برای تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی سیلین استفاده می‌کند را دریافت کرده است (۱۸). علاوه بر مفید بودن به‌عنوان تشخیص عمومی، این محصولات می‌توانند زمینه مؤثر برای فاژتراپی که نیاز به تشخیص سریع اهداف باکتریایی و تعیین حساسیت آن‌ها به فاژهای اختصاصی را دارند، آماده کنند (۱۹).

در سال ۱۹۸۷ گزارشی از نتایج فاژتراپی عفونت‌های باکتریایی چرک دار به چاپ رسید که ۵۵۰ بیمار را طی سال‌های ۱۹۸۱ تا ۱۹۸۶ با مصرف خوراکی فاژ بررسی کرده بود (۲۰). ۹۲ درصد بیماران این پژوهش که عفونت‌های آن‌ها شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری‌های گرم منفی نظیر گونه‌های *کلبسیلا*، *اشریشیا*، *پروتئوس* و *سودوموناس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک بودند، از فاژتراپی نتیجه مثبت گرفتند. در همان سال‌ها در ۱۹۸۲ فاژتراپی عفونت تجربی *E.coli* O18:K1:H7 موش‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک بررسی شد (۲۱). در موش‌هایی که دوزهای کشنده باکتری را به‌صورت داخل عضلانی یا داخل مغزی دریافت کرده بودند، یک دوز داخل عضلانی فاژ بسیار مؤثرتر از دوز های مکرر تتراسایکلین، آمپی سیلین، کلرامفنیکل یا تری متوپریم به‌اضافه سولفامتوکسازول بود. اثر فاژ حداقل به‌اندازه دوزهای مکرر داخل عضلانی استرپتومایسین مؤثر بود. در سال ۲۰۱۰ پژوهشی برای بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی *E.coli* های جداسازی شده از زخم‌های پوستی عفونی انجام شد (۲۲). اکثر ۱۱۳ سویه بررسی‌شده از زخم‌های پوستی چرک دار جداشده بودند که ۷۷ درصد آن‌ها به‌تنهایی عامل عفونت بودند، اما در ۲۳ درصد بقیه، همراه با باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، گونه‌های *پروتئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* حضور داشتند. اکثر سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین حساس بودند، ولی فقط ۷ درصد سویه‌ها به آمپی سیلین حساسیت نشان دادند. بیش از ۵۰ درصد سویه‌ها به ایمی پنم و ۳۵-۵۰ درصد به سفالوسپورین های نسل چهارم حساس بودند.

در سال ۲۰۱۳ درمان مرکبی با استفاده از فاژ لایتیک و آنتی‌بیوتیک صناعی لینزولید برای حذف عفونت‌های (MRSA) Methicillin-resistant Staphylococcus aureus پای دیابتی انجام یافت (۲۳). زخم‌ها در پای پشتی موش‌های سوری ایجاد شدند. یک فاژ از پنج فاژ جداسازی شده از فاضلاب که گستره میزبانی وسیع‌تری داشت در مدل موشی استفاده شد. اثر استفاده از فاژ (موضعی) مشابه اثر لینزولید (خوراکی) بود، اما درمان مرکب با هر دو عامل ضد میکروبی اثر بهتری در بهبود زخم‌ها داشت. نتایج این بررسی این روش را به‌عنوان استراتژی مؤثر برای درمان (MRSA) پای دیابتی تأیید کرد. عفونت‌های پای دیابتی

Downloaded from ijmm.ir at 9:51 +0430 on Sunday June 24th 2018

Final Proof

که ۲۰-۱۵ درصد آن‌ها معمولاً توسط (MRSA)ایجاد می‌شوند به آنتی‌بیوتیک‌های متداول مقاوم هستند و پاسخ مناسبی به درمانی نمی‌دهند. فاژ های جداسازی شده در این مطالعه نیز قادر به لیز سویه‌های *اشریشیا کلی* جداشده بودند، لذا به‌تنهایی یا به‌صورت درمان مرکب با آنتی‌بیوتیک امکان استفاده در مطالعات آتی عفونت‌های ناشی از باکتری *E.coli* به‌خصوص عفونت زخم و سطحی این باکتری را در اختیار ما خواهند گذاشت.

با توجه به نرخ بسیار بالای افراد مبتلابه دیابت در ایران که همواره تبعات عمده‌ای برای بیماران از قبیل زخم پای دیابتی را به همراه دارد این مطالعه درصدد جداسازی فاژهای لیتیک بومی ایران برای سویه‌های پاتوژن مقاوم به دارو *اشریشیا کلی* ایزوله شده از زخم بیماران دیابتی بود. همان‌گونه که اشاره شد از نمونه فاضلاب بیمارستانی به‌عنوان مخزن برای جداسازی و تعیین هویت فاژ لیتیک استفاده گردید. با توجه به امکان دسترسی آسان به فاضلاب بیمارستانی به‌عنوان یک مخزن غنی از فاژ، نتایج این مطالعه نیز امکان جداسازی آسان فاژ از منابع فاضلاب بیمارستانی را متذکر ساخت. سویه‌های بالینی باکتری جداسازی شده از بیماران دارای زخم، مقاومت بالا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس و معمول مورداستفاده را نشان دادند. فاژ جداسازی شده از فاضلاب در این مطالعه قادر به لیز سویه‌های اشریشیا کلی استفاده‌شده در این مطالعه بودند، لذا به‌تنهایی یا به‌صورت مخلوط فاژی امکان استفاده در مطالعات آتی به‌منظور کنترل و مهار عفونت‌های ناشی از باکتری *E.coli* به‌خصوص عفونت زخم و سطحی این باکتری علی‌الخصوص در مورد زخم ایجادشده توسط سویه‌های مقاوم به درمان در بیماران دیابتی را در اختیار ما خواهد گذاشت.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بر خود فرض می‌دانند از تمامی همکاران پارک علم و فناوری گیلان، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی گیلان بابت کمک‌های علمی و اجرایی در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را به عمل‌آورند. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان می‌باشد.

تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Bruttin A, Brussow H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. Antimicrob Agents Chemother 2005;49(7):2874–8.
2. Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, Ricard JD. Treatment of highly virulent extraintestinal pathogenic Escherichia coli pneumonia with bacteriophages. Crit Care Med 2015;43(6):190–8.
3. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. Bacteriophage 2011;1(2):66-85.
4. Renvall S, Niinikoski J, Aho AJ. Wound infections in abdominal surgery. A prospective study on 696 operations. Acta Chir Scand 1980; 146(1):25-30
5. Petkovšek Ž, Elersic K, Gubina M, Zgur-Bertok D, Starcic Erjavec M. Virulence potential of Escherichia coli isolates from skin and soft tissue infections. J Clin Microbiol 2009;47(6): 1811-7.
6. Aghili R, Malek M, Baradaran HR, Peyvandi AA, Ebrahim Valojerdi A, Khamseh ME. General Practitioners' Knowledge and Clinical Practice in Management of People with Type 2 Diabetes in Iran; The Impact of Continuous Medical Education Programs. Arch Iran Med 2015; 18(9):582-5 .
7. Boykoe EJ, Lipsky BA. In: Diabetes in America. Harris MI, editor. Washington DC: National Institutes of Health. Infection and diabetes mellitus; 1995 pp. 485–496.
8. Haghighatpanah M, Mozaffari Nejad AS, Mojtahedi A, Amirmozafari N, Zeighami H. Detection of extended-spectrum β-lactamase (ESBL) and plasmid-borne blaCTX-M and blaTEM genes among clinical strains of Escherichia coli isolated from patients in the north of Iran. J Glob Antimicrob Resist 2016; 7:110-3.
9. Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(3):649-659.

Downloaded from ijmm.ir at 9:51 +0430 on Sunday June 24th 2018

Final Proof

Downloaded from ijmm.ir at 9:51 +0430 on Sunday June 24th 2018

10. Ackermann HW. Phage Classification and Characterization. Methods Mol Biol 2009;501:127-40.

11. Ackermann, HW. 5500 Phages examined in the electron microscope. Arch Virol 2007; 152(2):227-243.

12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25. Wayne, Pennsylvania, USA—January 2015

13. Krupovic M, Dutilh BE, Adriaenssens EM, WittmannJ, Vogensen FK, Sullivan MB, et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. Arch Virol 2016;4:1095–9 .

14. Bradley D. Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. Bacteriological Reviews. 1967; 31(4): 230-314.

15. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations. J Bacteriol 1984;157(2):690-3.

16. Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG. Penicillin as a chemotherapeutic agent. Lancet 1940; 236(6104):226–8.

17. Sulakvelidze A. The challenges of bacteriophage therapy. Eur Ind Pharm 2010;10:14-18.

18. Hagens S, Loessner MJ. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. Appl Microbiol Biotechnol 2007; 76(3):513-9.

19. Mahony D, Clow J, Atkinson L, Vakharia N, Schlech W. Development and application of a multiple typing system for Clostridium difficile. Appl Environ Microbiol 1991; 57:1873–9.

20. Slopek S, Durlakowa I, Weber-Dabrowska B, Kucharewicz-Krukowska A, Dabrowski M, Bisikiewicz R. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results. Arch Immunol Ther Exp 1983; 31:267–291.

21. Smith HW, Huggins M. Successful treatment of experimental Escherichia coli infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. Microbiology 1982;128(2):307-318.

22. Moş I, Micle O, Zdranca M, Muresan M, Vicas L. Antibiotic sensitivity of the Escherichia coli strains isolated from infected skin wounds. Farmacia 2010;58(5):637-644.

23. Biswas B, Adhya S,Washart P, Paul B, Trostel AN, Powel B, et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant Enterococcus faecium. Infect Immun 2002;70(1):204-210.

Final Proof