اولین کنفرانس ملی فناوری های نوین دامپزشکی
1st National Conference on Modern Veterinary Technologies
8th September 2021

جداسازی و بررسی کارایی باکتریوفاژهای جدا شده از فاضلاب علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* های دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی (MDR) و مولّد بیوفیلم مسبب ورم پستان گاوی

فاطمه محمدیان[1] ، حمیده کلاته رحمانی[1]، بهنام بیداریان[1] ، بابک خرمیان[1*]

[1]دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی، مشهد، خراسان رضوی، ایران

[*]خراسان رضوی، مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم درمانگاهی، کدپستی: ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۴

Khoramian@um.ac.ir

چکیده

ورم پستان یکی از رایج‌ترین بیماری‌ها در گله‌های شیری است که ضررهای اقتصادی بسیاری را از طریق کاهش تولید شیر و کاهش کیفیت آن برای دامداران به بار می آورد. پیشگیری و درمان ورم پستان به مقدار زیادی وابسته به مصرف آنتی بیوتیک هاست؛ اما، تاثیر آن‌ها به دلیل مقاومت دارویی باکتری‌ها روز به روز در حال کاهش می‌باشد. یکی از راه حل‌های این مشکلات استفاده از روش‌های جایگزین در درمان ورم پستان از جمله استفاده از باکتریوفاژها است. هدف این مطالعه یافتن باکتریوفاژهایی است که علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* های جداشده از ورم پستان با توانایی تولید بیوفیلم و دارای مقاومت چندگانه به آنتی‌بیوتیک‌ها (MDR) موثر باشند. نمونه‌های فاضلاب شیردوشی از گاوداری‌های استان خراسان رضوی جمع آوری شد. سپس، با استفاده از روش آگار دولایه جداسازی فاژ و خالص سازی آن انجام گردید. حاصل کار، جداسازی دو فاژ دارای اثر لیز کنندگی علیه باکتری‌های MDR و مولّد بیوفیلم بود. در نهایت، طیف میزبانی فاژها بر روی ۳۱ عدد سویه باکتری سنجیده شد که از بین آن‌ها مجموع پنج باکتری به فاژهای مورد نظر حساس بودند. نتایج نشان می‌دهد باکتریوفاژهای جدا شده از فاضلاب فعالیت لیزکنندگی مناسبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* های جداشده از ورم پستان دارند که می‌توان از آن‌ها در درمان ورم پستان بهره برد.

کلید واژگان: باکتریوفاژ، *استافیلوکوکوس اورئوس*، مقاومت دارویی، ورم پستان، گاو شیری

۱. مقدمه

ورم پستان یکی از رایج ترین بیماری‌ها در گله‌های شیری است که ضررهای اقتصادی بسیاری را از طریق کاهش تولید شیر و کاهش کیفیت آن برای دامداران به بار می‌آورد. میکروارگانیسم‌های رایج مسبب ورم پستان شامل باکتری‌هایی از قبیل: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس یوبریس*، *استرپتوکوکوس آگالاکتیه*، *استرپتوکوکوس دیس گالاکتیه*، *اشرشیا کلی*، گونه‌های مختلف *انتروکوکوس* و گونه‌های مختلف *سودوموناس*؛ قارچ ها از جمله گونه‌های مختلف *کاندیدیا* و گونه های مختلف *کریپتوسپوریدیا* و جلبک‌هایی مانند *پروتتکا* می‌باشند.

ورم پستان در گله های شیری سبب افزایش تعداد سلول های سوماتیک شیر (SCC) می‌شود که این امر باعث ضرر به دامداران و صنایع لبنی می‌گردد. افزایش سلول‌های سوماتیک (ورم پستان تحت بالینی) سبب کاهش تولید شیر در گاوهای مبتلا می‌شود. علاوه بر آن، ورم پستان یکی از عوامل اصلی حذف در گله‌ها می‌باشد.

پیشگیری و درمان ورم پستان به مقدار زیادی وابسته به مصرف آنتی بیوتیک هاست؛ اما، تاثیر آن‌ها به دلیل پدید آمدن و گسترش مقاومت دارویی در باکتری‌ها رو به کاهش است. این مشکل به دلیل استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها در درمان دام‌ها می‌باشد. بسیاری از محققین به افزایش مقاومت باکتری‌های اصلی مسبب ورم پستان به آنتی بیوتیک‌ها تاکید داشته‌اند. اخیراً مطالعات زیادی در مورد بررسی روش‌های جایگزین برای درمان بیماری‌ها در حیوانات با هدف کاهش استفاده از آنتی بیوتیک‌ها و جلوگیری از افزایش مقاومت پاتوژن‌ها در برابر آن‌ها انجام شده است [۱].

استافیلوکوکوس اورئوس اصلی ترین پاتوژن ایجاد کننده ورم پستان‌های واگیر دار است که انتقال دام به دام نقش مهمی در گسترش آن دارد. عواملی سبب دشوار شدن درمان ورم پستان‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شوند که به برخی از آن‌ها اشاره می‌کنیم: ریسک بالای انتقال ورم پستان‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* بین گاوها خصوصاً در فرایند شیردوشی؛ کاهش میزان پاسخ به درمان این نوع ورم پستان به دلیل افزایش مقاومت پاتوژن‌ها به آنتی بیوتیک‌های مصرفی؛ لزوم درمان طولانی مدت با آنتی بیوتیک‌ها جهت رسیدن به بهبود باکتریایی Bacteriological cure (BC) مناسب. در سال‌های اخیر،گزارشات متعدّدی از درگیری گله‌های شیری به فرم تحت بالینی این عفونت ثبت شده است. بنابراین، درمان مناسب ورم پستان‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* نیازمند اتخاذ تدابیر شدید مدیریتی، بهداشتی و درمانی است [۲].

باکتریوفاژها (فاژ) گروهی از ویروس‌ها هستند که به طور گسترده در طبیعت پخش شده اند و میزبان آن‌ها باکتری‌ها می‌باشند. باکتریوفاژها از ماده ژنتیک (DNA یا RNA) با پوششی از جنس پروتئین (ساختاری به نام کپسید) تشکیل شده اند. آن‌ها را می‌توان از

منابع مختلفی از جمله آب شور، آب تازه، فاضلاب و خاک جداسازی نمود. برخی از فاژها با استفاده از چرخه لیزکنندگی سلول (Lytic cycle)، میزبان خود را آلوده کرده و در نهایت منجر به از بین رفتن باکتری میزبان و متعاقب آن، آزاد سازی تعداد زیادی فاژ در محیط می-گردند. لیز شدن سلول میزبان در اثر عملکرد آنزیم‌های لیزکننده کد شده توسط فاژ می باشد. پس از آن، فاژهای رها شده از سلول میزبان قبلی می توانند به سایر سلول‌های باکتریایی حمله کنند. در یک چرخه لیزکنندگی که وابسته به باکتریوفاژ و سلول میزبان است، ۵۰ تا ۱۰۰۰ فاژ جدید تولید و به محیط آزاد می شود؛ که به صورت مجدّد، هر فاژ می‌تواند باکتری‌های دیگر را آلوده کند. بر اساس گزارش کارلتون (۱۹۹۹)، بعد از تخریب سلول باکتری به طور میانگین ۲۰۰ باکتریوفاژ آزاد می‌شود که هر کدام از آن‌ها می‌تواند باکتری‌های دیگر را مورد هجوم قرار دهد. این اتفاق به لیز کردن بیشتر باکتری‌ها و تولید ۴۰۰۰۰ باکتریوفاژ پس از دومین و هشت میلیون باکتریوفاژ پس از سومین چرخه لیزکنندگی منتهی می‌شود. بر اساس مطالعات Guling و Duckworth در سال ۲۰۰۲، باکتریوفاژها می‌توانند چهار چرخه لیزکنندگی را در هر ساعت انجام دهند. برخی از باکتریوفاژها می‌توانند از چرخه لیزوژنیک (Lysogenic cycle) نیز استفاده نمایند که تهاجم بسیار کمتری دارد و به تخریب سلول باکتری منجر نمی شود. در این چرخه، ماده ژنتیکی باکتریوفاژ به سلول باکتری نفوذ کرده و در کروموزوم باکتری قرار می‌گیرد تا همراه DNA سلول میزبان همانند سازی کند و پروفاژ را به وجود آورد. با قرار گیری باکتری در شرایط استرس، پروفاژها فعال شده و با استفاده از چرخه لیزکنندگی سلول باکتری را از بین می‌برند [1].

در سال‌های اخیر علاقه زیادی به استفاده از باکتریوفاژها در درمان ورم پستان ایجاد شده است. نتایج حاصل از مطالعات آزمایشگاهی بسیاری نشان می‌دهد که این روش‌ها به علّت مؤثّر بودن فاژها یا اندولیزین‌های آن‌ها روی باکتری‌های مسبب ورم پستان، کارا می‌باشند. به علت حضور عوامل چالش‌زا در درمان و مقابله با ورم پستان‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس*، حجم زیادی از مطالعات صورت گرفته بر کاربرد درمانی فاژها در ورم پستان، به درمان اورام *استافیلوکوکوس اورئوس* اختصاص دارد؛ که حاکی از امکان کاربرد باکتریوفاژها درکنار سایر روش‌ها برای درمان ورم پستان می‌باشد.

۲. مواد و روش کار :

سویه‌های باکتری

مجموع ۳۱ جدایه‌ی باکتری مورد بررسی قرار گرفتند که شامل: ۲۰ جدایه‌ی MDR (*استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به چند دارو)، ۱۰جدایه‌ی *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده‌ی بیوفیلم و یک سویه‌ی *اشرشیا کلی* می‌باشد. جدایه‌های MDR بر اساس مقاومت به سه

کلاس آنتی‌بیوتیک و یا بیش‌تر که توسط Magiorakos و همکاران (۲۰۱۱) ارائه شده است، انتخاب شدند. توانایی تولید بیوفیلم نیز با روش فنوتیپی مورد بررسی قرار گرفت [۳].

جمع آوری فاضلاب جهت جداسازی باکتریوفاژ

ابتدا فاضلاب شیردوشی از دو مزرعه اطراف شهر مشهد جمع آوری شد. سپس در آزمایشگاه مایع رویی از رسوبات با استفاده از سانتریفیوژ جدا شد و پس از عبور از فیلتری با قطر منافذ ۰/۲۲ µm، برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی باکتریوفاژ

جهت جداسازی باکتریوفاژ، ml ۴ از کشت واقع در مرحله‌ی رشد لگاریتمی باکتری به همراه ml ۱۰ محیط آبگوشت LB (۲X) و ml ۱۰ فاضلاب فیلتر شده از مرحله‌ی قبل با یکدیگر مخلوط شده و در دمای °C ۳۷ به مدت یک شب گرمخانه گذاری شد. سپس، باکتری‌ها و بقایای آن‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در g× ۷۵۰۰به مدت ۲۰ دقیقه جدا شد. پس از آن، مایع رویی از فیلتری با قطر منافذ ۰/۲۲ µm عبور داده شد (برای تکثیر فاژ، این مراحل کشت سه بار تکرار شد). در آخر، مایع عبور داده شده از فیلتر برای یافتن فاژ لیتیک در روش آگار دو لایه (Double-layer Agar (DLA)) مورد استفاده قرار گرفت.

روش آگار دو لایه

در این روش، µl ۲۵۰ از مایع عبوری از فیلتر با µl ۱۵۰ از کشت لگاریتمی باکتری مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در °C ۳۷ گرمخانه گذاری شد. سپس، مخلوط یاد شده داخل محیط Luria-Bertani (LB) مذاب (°C ۴۵) ریخته شد و بر روی لایه‌ی زیری LB جامد قرار گرفت. حضور فاژ لیتیک بر اساس وجود مناطق شفاف حاصل از لیز سلول‌های باکتری تعیین شد.

خالص سازی باکتریوفاژ

یک پلاک از پلیت به همراه ml ۱ از کشت لگاریتمی *استاف اورئوس* به مدت h ۲۴ در °C ۳۷ گرمخانه گذاری شد. روز بعد، حضور فاژ لیتیک با استفاده از روش آگار دو لایه مورد بررسی قرار گرفت. جهت خالص سازی فاژ، این فرایند سه بار تکرار شد.

تعیین تیتر باکتریوفاژ

رقت‌های متوالی بر پایه‌ی ۱۰ از مایع فیلتر شده‌ی حاوی فاژ در LB broth تهیه شد. سپس، µl ۱۰۰ از کشت لگاریتمی باکتری با همین میزان از هر رقت فاژ مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه گرمخانه گذاری شد. پس از آن، هر کدام از لوله‌های حاوی فاژ و باکتری با LB مذاب (°C ۴۵) مخلوط شده و بر روی محیط LB جامد، لایه گذاری شد. پس از یک شب گرمخانه گذاری، تعداد پلاک‌ها شمارش شد.

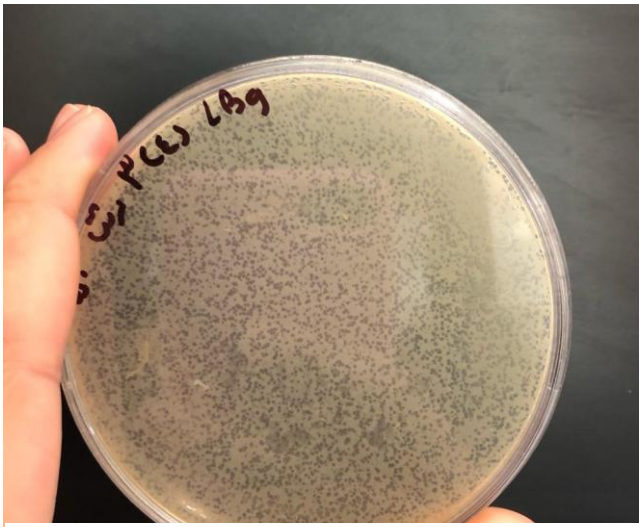
تعیین طیف میزبانی

اثر گذاری باکتریوفاژهای جدا شده بر روی جدایه‌های مختلف باکتری با استفاده از روش تست لکه‌ای (spot test) صورت گرفت. مقدار ۱۰۰ µl از کشت ۴ ساعته از هر یک از باکتری های مورد نظر (۲۰ جدایه‌ی MDR و ۱۰جدایه‌ی تولید کننده‌ی بیوفیلم از باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*) آماده شده و با LB حاوی ۰/۴٪ آگار مذاب (۴۵ °C) بر روی LB جامد لایه گذاری شد. پس از بستن لایه‌ی رویی، ۱۰ µl از مایع حاوی فاژ به صورت لکه روی محیط قرار داده شد. پس از گرمخانه گذاری در ۳۷ °C به مدت یک شب، اثر فاژ با توجه به حضور ناحیه‌ی شفاف حاصل از لیز باکتری مورد قضاوت قرار گرفت. اثر فاژها همچنین بر روی باکتری *اشرشیا کلی* مورد بررسی قرار گرفت.

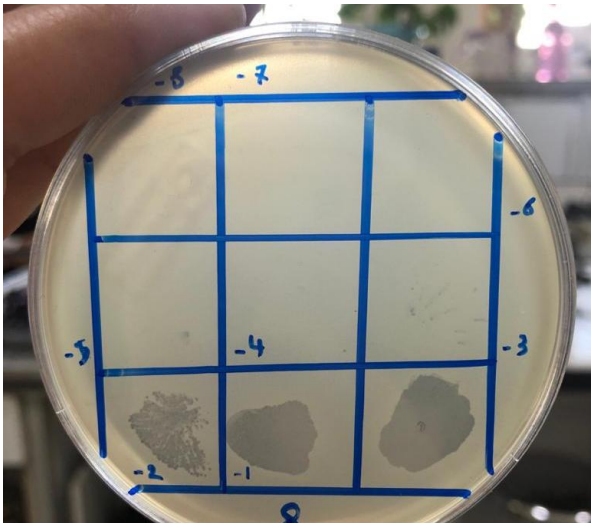
۳. نتایج

طی این پژوهش، دو باکتریوفاژ با نام‌های M8 □ (تصویر شماره ۱) و B4 □ (تصویر شماره 2) از فاضلاب گاوداری‌ها جداسازی شد و خالص گردید. در تعیین تیتر، غلظت‌های ۲×۱۰^{۶} PFU/ml و ۳×۱۰^{۵} PFU/ml به ترتیب برای دو فاژ M8 □ و B4 □ محاسبه شد.

سپس، با استفاده از تست لکه ای طیف میزبانی برای هر باکتریوفاژ مشخص شد. چهار سویه باکتری، به فاژ M8 □ حساس بودند که ویژگی‌های آن‌ها مطابق روبرو است: سویه‌ی شماره ۲۵ (استافیلوکوکوس اورئوس با توانایی تولید بیوفیلم)، سویه‌ی شماره 40 (MDR با الگوی مقاومت به: تتراسایکلین، اریترواماسین، سیپروفلوکساسین، کلرامفنیکل)، سویه‌ی شماره ۱۰۰ (MDR با الگوی مقاومت به: انروفلوکساسین، تتراسایکلین، اگزاسیلین، جنتامایسین، سفازولین، تری متوپریم)، سویه‌ی شماره ۸ (MDR با الگوی مقاومت به: انروفلوکساسین، تتراسایکلین، اگزاسیلین، لینکومایسین، اریترومایسین، سفازولین، سفتری اکسون). همچنین، تنها یک سویه (سویه شماره ۴ که قادر به تولید بیوفیلم می‌باشد) به فاژ B4 □ حساس بود.



شکل شماره ۱ : لیز سلول‌های باکتری مولد بیوفیلم



شکل شماره ۱: لیز سلول‌های باکتری MDR

۴. نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد باکتریوفاژهای جدا شده از فاضلاب فعالیت لیز کنندگی مناسبی علیه سویه های *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای مقاومت چندگانه آنتی بیوتیکی و مولّد بیوفیلم جدا شده از اورام پستان را دارند. بنابراین، می‌توانند در کنار سایر روش‌های درمانی، جهت درمان ورم پستان مورد استفاده قرار گیرند. اگرچه تحقیقات بیشتری جهت ارزیابی کاربردهای بالینی آن‌ها مورد نیاز است.

مراجع

1. Radzikowski, D., et al., *Alternative solutions to antibiotics in mastitis treatment for dairy cows-a review.* Animal Science Papers and Reports, 2020. **38**(2): p. 117-133.
2. Titze, I., et al., *Efficacy of bacteriophages against Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitis.* Pharmaceuticals, 2020. **13**(3): p. 35.
3. Magiorakos, A.-P., et al., *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.* 2012. **18**(3): p. 268-281.