JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره یازدهم، شماره دوم، ۱۳۹۴، پیاپی ۳۱: ۹۹-۹۱

ارزیابی اثرات فاژ عزت نگر ۱ (Iz_1) در درمان موش BALB/C مبتلا به عفونت تجربی باکتری *بروسلا ملی‌تنسیس*

آمنه کربلای محمد میگونی[۱]، علی محمد بهروزیخواه[۲*]، محمدرضا محزونیه[۳]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد باکتری شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

۲- استادیار پژوهش بخش بروسلوز، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، کرج، ایران

۳- دانشیار دانشکده دامپزشکی، پژوهشکده بیماری‌های مشترک انسان و دام، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۶ اسفند ۱۳۹۳ *تاریخ پذیرش: ۱۵ تیر ۱۳۹۴*

چکیده

بیماری بروسلوز که در انسان تب مالت نامیده می‌شود، از جمله مهمترین بیماری‌های مشترک بین انسان و دام (زئونوز) با گسترش جهانی و طیف وسیع میزبانی است. اگرچه تجویز آنتی بیوتیک راه اصلی درمان بیماران است، لیکن به علت بروز مقاومت دارویی در باکتری‌ها، پزشکان به استفاده از درمان‌های جایگزین دارو علاقه مند شدند. یک راه درمان عفونت‌های باکتریایی، عود مجدد بیماری و مدت درمان استفاده از باکتریوفاژها به جای عوامل ضدباکتری است. در این مطالعه، اثر باکتریوفاژ عزت نگر شماره ۱ (Izat Negar 1) Iz_1 در درمان بروسلوز تجربی موش‌های BALB/C حاصل از سویه حاد بومی باکتری بروسلا ملی تنسیس بایوتایپ ۱ بررسی شده است. در این مطالعه، ۸ گروه ۶ تایی موش BALB/C، با 10^4 عدد باکتری در ۱۰۰ مایکرولیتر به صورت تزریق داخل صفاقی آلوده شدند. ۴ گروه از این موش‌ها به وسیله آنتی بیوتیک‌های ریفامپین و داکسی سایکلین بصورت خوراکی درمان شدند. ۴ گروه دیگر از این موش‌ها مورد تزریق داخل صفاقی فاژ Iz قرار گرفته و ۴ گروه ده تایی نیز به عنوان شاهد به ترتیب برای باکتری ، فاژ، آنتی بیوتیک و تامپون فسفات در نظر گرفته شدند. در نتایج حاصل از این مطالعه، گروه‌های گیرنده آنتی بیوتیک درمان شدند و طحال اکثر آنها از باکتری بروسلا عاری شد. گروه‌هایی که فاژ دریافت کرده بودند، درمان نشدند اما در مقایسه با گروه شاهد باکتری، گروه فاژ توانسته بود از تعداد کلنی باکتری بروسلا در طحال بکاهد.

کلمات کلیدی: *بروسلا ملیتنسیس بایو تایپ ۱، فاژ عزت نگر، آنتی بیوتیک، ریفامپین، داکسی سایکلین، موش BALB/C*

*نویسنده مسئول: علی محمد بهروزیخواه

آدرس: کرج، حصارک، مؤسسه تحقیقات واکسن وسرم سازی رازی کرج، کرج، ایران تلفن: ۰۲۶۳۴۵۷۰۰۳۸ ، فکس: ۰۲۶۳۴۵۵۲۱۹۴

پست الکترونیک: am.behroozikhah@rvsri.ac.ir

مقدمه

عفونت حاصل از باکتری *بروسلا* که پاتوژن داخل سلولی با قدرت همزیستی بالا است و قادر به عبور از تمام سدهای بیولوژیک و توان لانه گزینی درتمام دستگاه و اندام‌های بدن است، نیازمند تجویز رژیم درمانی طولانی و دست کم با دو آنتی بیوتیک وسیع الطیف است (۳ و ۲، ۱). این رژیم درمانی به ویژه اگر حاوی آمینوگلیکوزید باشد گاهی مشکلات و عوارض گوارشی، کبدی، کلیوی و شنوایی را تشدید و یا به همراه دارد. *بروسلا ملی‌تنسیس* که یکی از گونه‌های اندمیک و دارای قدرت بیماریزایی یا حدت بالا است، عامل اصلی بیماری بروسلوز انسانی کشور ما محسوب می شود (۲ و ۱). مشکلی که مبتلایان بروسلوز در کشورمان با آن روبرو هستند، رژیم درمانی دو یا سه آنتی بیوتیکی و دوره زمانی نسبتاً طولانی بروسلوز است (۳ و ۲، ۱). در مواردی نیز درمان مبتلایان با عود مجدد بیماری همراه است. نتایج مطالعات و بررسی‌های علمی محققین در خصوص درمان بیماریهای باکتریایی با فاژ، نشان می‌دهد تجویز فاژها در درمان بعضی از بیماری‌های باکتریایی، امیدوار کننده بوده است (۹ و ۵).

استفاده از باکتریوفاژ در درمان بیماری‌های باکتریایی، دانش نوین و نوپایی است که در چند سال اخیر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. در تحقیقات منتشر شده اخیر، از باکتریوفاژ بیشتر برای درمان بیماری‌های موضعی استفاده شده است و مطالعات زیادی در درمان بیماری‌های سیستمیک انجام نگرفته است. از این‌رو هدف این مطالعه، بررسی اثر باکتریوفاژ عزت نگر یا Iz بر درمان عفونت تجربی بروسلوز حاصل از باکتری *بروسلا ملی‌تنسیس* بایوتایپ ۱، سویه حاد بومی ایران، در موش‌های BALB/C است. باکتریوفاژ عزت نگر ۱ با طیف میزبانی موثر بر گونه‌های موجود *بروسلا* در ایران از جمله *بروسلا ملی‌تنسیس* بایوتایپ ۱، می باشد. فاژهای *بروسلا* در زمره ویروس‌های DNA هستند که فاژهای این گروه بسیار شبیه به یکدیگر متعلق به یک گروه مرفولوژیک به نام Pedoviridae با محتوای G+C، ۴۵–۴۷ مول درصد و اندازه ژنوم ۲۵×۱۰^{۳} کیلو دالتون هستند. این فاژها به دترجنت‌های آنیونی و غیرآنیونی و برخی معرف‌های آلی عادی به استثنای کلروفرم مقاوم هستند و به حرارت، دترجنت‌های کاتیونی و بسیاری از عوامل اکسیدکننده حساس هستند. پایداری این فاژها در برابر آنزیم‌های پروتئولیتیک برحسب سدیم متفاوت است. بررسی‌های سرولوژیک و الگوی اندونوکلئازهای محدودگر، نشان می دهد که تمامی این فاژها به اندازه ای شبیه به یکدیگر هستند که می توان آنها را واریانت‌های طیف میزبانی از یک تیپ فاژ دانست (۱). براساس طیف میزبان، فاژهای *بروسلا* عمدتا به ۶ گروه تقسیم می شوند:

فاژهای گروه ۱- سویه‌های Tb (Tbilisi)

فاژهای گروه ۲ - Fi75/B (Firenze)

فاژهای گروه ۳ - wb (weighbridge)

فاژهای گروه ۴- BK_2 (Berkeley)

فاژهای گروه ۵ - R (Rough)

فاژهای گروه ۶ - IZ_1 (Izatnagar)

و فاژهای گروه ۷ - NP (Nepean)

فاژهای گروه ۶ سویه‌های Iz_1 نامیده می شوند و برای تمامی کشت‌های صاف از تمامی گونه‌های *بروسلا* و تمامی کشت‌های خشن از *بروسلا ملی تنسیس*، *بروسلا سوئیس* و به میزان کمتر *بروسلا اوویس* و *بروسلا کنیس* لیز کننده (lytic) هست (۱۳ و ۱۲، ۱۱، ۷، ۶). فاژ Iz_1 یک فاژ هندی می‌باشد که اولین بار در کشور هندوستان کشف شد. این باکتریوفاژ روی سویه‌های *بروسلا ابورتوس*، *بروسلا ملی‌تنسیس*، *بروسلا نئوتومه* و

بروسلا میکروتی (B. microti) لیز کامل می‌دهد. این فاژ روی سویه *بروسلا سوئیس* بایووار ۲ اثر ندارد، اما روی سایر بایووارها مؤثر است. همچنین روی اکثر بایووارهای *B. ceti* و *B. pinnipdialis* اثر دارد. از نظر ژنتیکی، اسید نوکلئیک این فاژ DNA دو رشته‌ای به اندازه مولکولی Kbp ۳۸ است. فاژ IZ_1 سویه Rough *بروسلا* را لیز نمی‌کند (۱۰ و ۵).

مواد و روش کار

فاژ عزت نگر شماره ۱ و باکتری *بروسلا ملی‌تنسیس* بایوتایپ ۱سویه حاد بومی ایران از کلکسیون بخش بروسلوز مؤسسه تحقیقات، واکسن و سرم سازی رازی مربوط به جدایه گوسفندی تهیه شد. تعداد ۹۸ قطعه موش از نژاد BALBC/C ، ماده با سن بین ۵-۷ هفته و وزن بین ۲۰-۳۰ گرم انتخاب شد. از محیط کشت *بروسلا* آگار BD یا BBLO برای کشت *بروسلا* استفاده شد. آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین و داکسی سایکلین، آنتی بیوتیک‌های افزودنی به محیط کشت Supplement Brucella Oxoid، مورد استفاده قرار گرفت. در تحقیق حاضر تعداد ۹۸ سر موش به ۴ گروه ۶ تایی به عنوان گروه‌های اصلی گیرنده‌ی فاژ، ۴ گروه ۶ تایی به عنوان گروه‌های اصلی گیرنده‌ی آنتی بیوتیک و ۴ گروه ۱۰ تایی به عنوان شاهد شامل شاهد باکتری، شاهد آنتی بیوتیک، شاهد فاژ و شاهد تامپون فسفات انتخاب شد. در روز اول به موش‌های ۴ گروه گیرنده‌ی فاژ، ۴ گروه گیرنده آنتی بیوتیک و گروه شاهد باکتری تعداد 10^4 عدد باکتری *بروسلا ملی‌تنسیس* در حجم ۱۰۰ مایکرولیتر به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. به گروه شاهد آنتی بیوتیک ۱۰۰ مایکرولیتر معادل ۱ دوز روزانه داکسی سایکلین و ۱ دوز روزانه از ریفامپین بصورت خوراکی داده شد. به گروه شاهد تامپون فسفات ۱۰۰ مایکرولیتر تامپون فسفات بصورت داخل صفاقی تزریق شد. به گروه شاهد فاژ ۱۰۰ مایکرولیتر فاژ Iz_1 در غلظت یک RTD به صورت داخل صفاق تزریق شد. به ۴ گروه گیرنده‌ی فاژ به هر موش به میزان ۱۰۰ مایکرولیتر فاژ Iz_1 با رقت RTD به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

تهیه رقت RTD: ابتدا یک سوسپانسیون باکتریای از میزبان اختصاصی فاژ باکتری *بروسلا* را تهیه و سپس روی یک یا چند محیط *بروسلا* آگار به میزان ۰/۱ سی سی بسته به میزان غلظت اولیه فاژ باکتری را پخش مینماییم. یک رقت دهدهی از فاژ با *بروسلا* براس یا تامپون فسفات در لوله‌های معمولی تهیه می نماییم.

یک قطره از هر رقت دهدهی فاژ را با پی پت پاستور استریل یا پی پت یک به محیط کشت حاوی کشت بروسلا اضافه و ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه انکوباسیون می نماییم. بعد از ۴۸ ساعت بالاترین رقتی از فاژ که بتواند لیز کامل دهد (Routine test diolation) RTD نامیده میشود. بدیهی است رقت‌های پایین همگی لیز کامل خواهند داد و غلظت‌های بالا دچار لیز ناقص می‌شوند. آنتی بیوتیک‌تراپی در ۴ گروه گیرنده‌ی آنتی‌بیوتیک نیز از این روز آغاز شد که در آن به هرموش ۱۰۰ مایکرولیتر ریفامپین محلول که حاوی ۳۰۰ مایکروگرم ریفامپین (دوز لازم برای یک روز) (10mg/kg/day) و ۱۰۰ مایکرولیتر داکسی سایکلین که حاوی ۱۳۲ مایکروگرم داکسی سایکلین (دوز لازم برای یک روز) (4/4mg/kg/day) بود به صورت خوراکی، داده شد. دادن آنتی بیوتیک تا ۵ روز به همین منوال به همه ی موش‌های ۴ گروه ادامه پیدا کرد. گروه ۱ گیرنده‌ی آنتی بیوتیک ۵ روز ،گروه۲، ۱۰روز، گروه ۳ ، ۱۵ روز و گروه۴، ۲۰ روز آنتی بیوتیک به صورت متوالی به روش خوراکی دریافت کردند. گروه ۱ گیرنده‌ی فاژ،

۱ بار،گروه ۲ گیرنده‌ی فاژ، ۲ بار،گروه ۳ گیرنده‌ی فاژ، ۳ بار، گروه فاژ ۴ گیرنده فاژ، ۴ بار با فاصله ۵ روز به صورت تزریق داخل صفاقی فاژ دریافت کردند. در ۳ نوبت از هر گروه، در طی برنامه زمانی مشخص، تعدادی موش کشتار شد. هر بار ۲ قطعه موش کشتار گردید، اولین کشتار بعد از پایان درمان و کشتار دوم در نیمه دوره و کشتار آخر در پایان دوره و در روز ۴۵ انجام شد. موش‌ها را وزن کرده و با روش اخلاقی در محفظه شیشه‌ای با کلروفرم بیهوش شدند. سپس خونگیری از قلب با سرنگ انسولینی در شرایط استریل انجام گرفت و خون در میکروتیوب‌های ۱ میلی‌لیتری استریل جمع آوری شد. ،بعد ازخونگیری کالبدگشایی انجام شده و اعضای بدن اعم از کبد، کلیه، قلب، ریه، معده، تیروئید و دستگاه تناسلی برداشت شده و در پلیت‌های استریل قرار داد شد. طحال چون از اهمیت زیادی در میزان عفونت *بروسلا* برخوردار است، جداگانه برداشت شده و در ویال‌های استریل قرار گرفت.

کشت بافت‌ها و خون در محیط *بروسلا* آگار حاوی آنتی بیوتیک و زیر هود لامینار کلاس ۲، در شرایط استریل انجام شد. طحال‌ها قبل از کشت وزن شدند و سپس یک میلی‌لیتر آب مقطر به طحال اضافه شد. برای له کردن از لوله‌های گریندر تن بروک استفاده شد و مایع حاصل توسط پی‌پت ۱ بار مصرف با پی‌پتور، در روی ۳ محیط کشت *بروسلا* آگار آنتی بیوتیک دار کشت داده شد. کلیه‌ی کشت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. ۴۸ ساعت بعد نتایج کشت‌ها قرائت شد، اما کشت‌ها به مدت۲ هفته در انکوباتور نگهداری و تغییرات آن‌ها ثبت شد.

کشت‌ها در مقابل نور بررسی شدند و کشت‌هایی که کلنی *بروسلا* در آن‌ها مشهود بود، به عنوان مثبت گزارش شد. از کشت‌های مشکوک کشت مجدد تهیه شد و نتایج آن مجدداً بررسی گردید. بعضی موارد تا ۳ بار کشت مجدد تهیه شد. برای اطمینان از *بروسلا* بودن موارد مشکوک و تأیید گونه *بروسلا*، از نمونه مشکوک، روی محیط حاوی آنتی‌بیوتیک کشت تهیه شده و سپس به روش فاژ تایپینگ تأیید تشخیص گونه داده شد. زمان پاک شدن طحال در گروه‌های مختلف ثبت و با تحلیل آماری واریانس میانگین‌ها با هم مقایسه شدند.

نتایج

نتایج بدست آمده از این مطالعه از چند جهت مورد بررسی قرار گرفت.

۱- نسبت وزن طحال به وزن بدن: در بیماری بروسلوز، وزن طحال به وزن بدن یک شاخص برای مقدار عفونی شدن آن می‌باشد. هر چقدر این نسبت بالاتر باشد بیانگر بزرگ شدن طحال و عفونی شدن بیشتر و درگیری بدن با عامل این بیماری است. در مطالعه‌ای که صورت گرفت در گروه‌های مختلف درصد وزن طحال به وزن بدن برای هر موشی بعد از کشتار تعیین شد. در مقایسه گروه‌ها بر اساس تجزیه واریانس، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. نسبت وزن طحال به وزن بدن در گروه‌ها در نمودار شماره ۱ آمده است. نتایج مقایسه میانگین گروه‌های گیرنده‌ی فاژ و گروه شاهد تامپون نشان داد که وزن طحال نسبت به وزن بدن، در گروه‌های گیرنده‌ی فاژ افزایش یافته است. این افزایش در گرو ه‌هایی که ۱، ۲، ۳ و ۴ بار فاژ دریافت کرده بودند، روند صعودی داشت. این طور به نظر می‌رسد که دریافت فاژ باعث کاهش اندازه ی طحال نشده است. در مقایسه میانگین درصد وزن طحال به وزن بدن در گروه‌های شاهد باکتری، شاهد آنتی‌بیوتیک، شاهد تامپون، شاهد

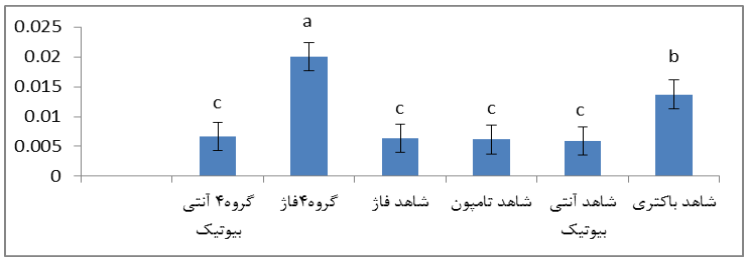
فاژ و گروه ۴ گیرنده‌ی آنتی‌بیوتیک این طور نشان داده می‌شود که: گروه شاهد باکتری که هیچگونه درمانی دریافت نکرد و فقط باکتری به آن‌ها تلقیح شده بود، از نظر درصد وزن طحال به وزن بدن دارای بالاترین نسبت بودند که نشان دهنده عفونت موجود در طحال و عفونت موش‌ها می‌باشد. گروه شاهد آنتی‌بیوتیک و شاهد تامپون و شاهد فاژ از نظر درصد وزن طحال به وزن بدن دارای تفاوت کمی می‌باشند. گروه شاهد آنتی‌بیوتیک به علت دریافت آنتی‌بیوتیک کمترین درصد را نشان داد و گروه شاهد تامپون بعد از آن و گروه شاهد فاژ دارای تفاوت کمی با این دو بود و میانگین وزن طحال نسبت به دو گروه شاهد دیگر، به مقدار جزئی بالاتر بود که احتمالاً به علت دریافت فاژ و درگیری طحال با آن است. اما گروه ۴ گیرنده‌ی فاژ، بالاترین درصد وزن طحال به وزن بدن را داشت که نشان دهنده‌ی افزایش درگیری طحال است. احتمالاً علاوه بر باکتری، مقدار بالای فاژ هم به تنهایی باعث بزرگ شدن طحال می‌شود. نتایج گروه ۴ آنتی‌بیوتیک هم مشابه گروه‌های شاهدی بود که هیچ باکتری دریافت نکرده بودند و درصد وزن طحال به وزن بدن در این گروه طبیعی بود که نشانه‌ی پاک شدن طحال از عفونت است.

۲- زمان پاک شدن طحال: درباره‌ی زمان پاک شدن طحال در گروه‌های مختلف مورد مطالعه نتایج متفاوتی بدست آمد که با توجه به زمان کشتار موش‌ها و گروه مورد نظر، این نتایج اهمیت به سزایی دارد. زمان پاک شدن گروه‌های گیرنده‌ی آنتی‌بیوتیک با توجه به رژیم دریافتی و تاریخ کشتار متفاوت بود. کشتار ۱۷روز بعد از دریافت باکتری، مربوط به گروه ۱ آنتی‌بیوتیک بوده که به مدت ۵ روز متوالی آنتی‌بیوتیک دریافت کرده بودند. طحال ۵۰٪ از این موش‌ها، از باکتری پاک شده بود. طحال ۵۰٪ ازموش‌های مربوط به گروه ۲ آنتی‌بیوتیک نیز که ۲۲ روز بعد از عفونت به مدت ۱۰ روز آنتی‌بیوتیک دریافت کرده بودند هم از باکتری پاک شده بود. طحال ۵۰٪ از موش‌هایی که ۲۹ روز بعد از عفونت به مدت ۱۵ روز آنتی بیوتیک دریافت کرده بودند هم از باکتری پاک شده بود. کشتار ۳۴ روز بعد از دریافت باکتری که مربوط به گروه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ آنتی‌بیوتیک بوده و از همه گروه‌ها که ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز آنتی‌بیوتیک دریافت کرده بودند به طور تصادفی برداشته شد و پس از کشت طحال ۳۳٪ از طحال‌ها پاک شده بودند. کشتار ۴۱ روز بعد از دریافت باکتری که مربوط به گروه ۴ آنتی‌بیوتیک بوده که ۲۰ روز آنتی‌بیوتیک دریافت کرده بودند نشان داد، ۷۵٪ طحال موش‌ها عاری از باکتری شده بود. کشتار ۴۵ روز بعد از دریافت باکتری که مربوط به موش‌های باقی مانده‌ی گروه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ آنتی‌بیوتیک نشان داد که ۵۰٪ طحال‌های آن‌ها، پاک شده بودند. علت این‌که فقط ۵۰٪ پاک شدند این بود که این میانگین مربوط به کل موش‌های باقی مانده‌ی کشتارشده، بود که در آن گروه‌هایی که رژیم‌های مختلف آنتی‌بیوتیک داشتند، روی هم دیده شده است. زمان پاک شدن طحال در موش‌های گروه‌های گیرنده‌ی فاژ در زمان‌های مختلف تغییر چندانی حاصل نکرد و موش‌هایی که از تمام گروه‌ها در ۱۷، ۲۲، ۲۹، ۳۴ و ۴۱ روز بعد از دریافت باکتری کشتار شده بودند طحالشان از باکتری پاک نشده و کشت آن‌ها دارای کلنی مثبت بروسلایی بودند اما در کشتار آخر که در ۴۵ روز بعد از دریافت باکتری انجام شد، طحال ۱۲/۵٪ از موش‌ها از باکتری پاک شده بود.

۳- مقایسه تعداد کلنی در گروه‌های مختلف: مقایسه‌ی تعداد کلنی‌های باکتری *بروسلا* در طحال در گروه‌های

مختلف نتایجی به دست آمد که ارتباط مستقیمی با میزان آلودگی و اندازه طحال گروه‌های مورد نظر داشت. مقایسه تعداد باکتری در طحال موش‌ها در گروه‌های گیرنده‌ی آنتی‌بیوتیک در مقابل گروه شاهد باکتری از نظر تعداد کلنی تفاوت بسیار محسوسی دارد و نشان دهنده‌ی مؤثر بودن درمان روی موش‌ها و کاهش بسیار محسوس تعداد باکتری در طحال نسبت به گروه شاهد باکتری می‌باشد.

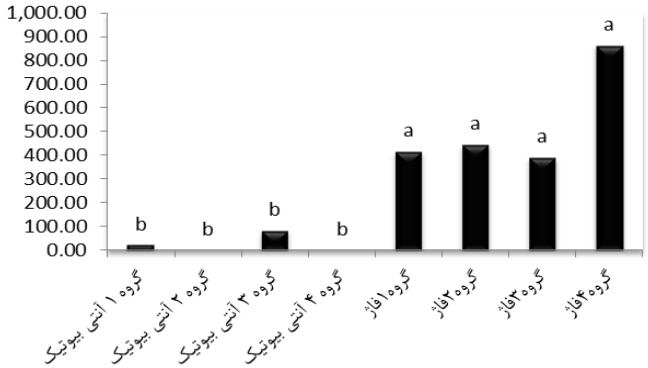
۴- درصد تعداد کشت‌های مثبت شده از بافت‌های برداشت شده از موش‌ها، شامل: خون، کبد، کلیه، معده، ریه، قلب، تناسلی، تیروئید و طحال در گروه‌های مختلف ارتباط مستقیمی با میزان عفونت در موش‌ها داشته و جایگزینی باکتری بروسلا را در بافت‌های مختلف نشان می‌دهد. در گروه‌های گیرنده آنتی‌بیوتیک، موارد کشت مثبت در روز ۴۱، کمترین درصد را دارد که نشان دهنده بیشترین میزان پاک شدن اندام‌ها در گروه ۴ آنتی بیوتیک که ۲۰ روز آنتی بیوتیک دریافت کرده اند را نشان می‌دهد. در روز ۳۴ و ۴۵ ، چون از تمام گروه‌ها کشتار انجام شده و ۸ موش در این روزها کشتار شدند، افزایش داشته اما در مجموع روند پاک شدن طحال افزایش داشته و موارد مثبت شدن کشت‌ها کاهش یافته است. در گروه‌های گیرنده فاژ پاک شدن اندام‌ها روند صعودی دارد و روند مثبت شدن کشت‌ها کاهش نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۱: نسبت وزن طحال به وزن بدن در گروه‌های موش بعد از عفونت تجربی

جدول ۱: زمان پاک شدن طحال از باکتری در بازه‌های زمانی پس از کشتار در گروه‌های درمان شده با آنتی‌بیوتیک

درصد پاک شدن طحال از باکتری	تعداد کل موش‌ها	زمان
٪۵۰	۲	۱۷ روز بعد
٪۵۰	۲	۲۲روز بعد
٪۵۰	۲	۲۹روز بعد
٪۳۳	۸	۳۴روز بعد
٪۷۵	۲	۴۱روز بعد
٪۵۰	۸	۴۵ روز بعد



نمودار ۲: مقایسه‌ی تعداد کلنی‌های باکتری بروسلا در طحال در گروه‌های مختلف

نمودار شماره ۳: مقایسه تعداد باکتری در طحال موش گروه‌های گیرنده آنتی بیوتیک در مقابل گروه شاهد باکتری

بحث

بروسلا ملی تنسیس یکی از گونه‌های اندمیک و عامل اصلی بیماری بروسلوز انسانی در ایران است. طبق توصیه پزشکان، دوره درمانی مبتلایان با *بروسلا ملی تنسیس*، شش ماه با دو یا سه آنتی بیوتیک به صورت دو تا سه وعده در روز است. دوره نسبتاً طولانی درمان و رژیم دو الی سه آنتی بیوتیکی و احتمال عود مجدد مشکلاتی هستند که مبتلایان بروسلوز در کشورما و سایر کشورهایی که آلودگی با *بروسلا ملی تنسیس* دارند با آن روبرو می باشند. استفاده از باکتریوفاژ در درمان دهه‌های اخیر مورد استقبال پژوهشگران واقع شده است. استفاده از باکتریوفاژ در تحقیقات و درمان به وسیله‌ی آنها روشی نوین می‌باشد که به چند مورد آن اشاره خواهد شد، اما مطالعات انجام گرفته به خصوص در بیماری‌های سیستمیک بسیار اندک است. بروسلوز هم جزء بیماری‌های سیستمیک محسوب می‌شود و مطالعات منتشر شده در مورد آن، بسیار نادر است.

Soothill (۱۹۹۲) باکتریوفاژها را برای درمان عفونت‌های داخل صفاقی تجربی با باکتری *اسینتوباکتر باومانی*، *پسودوموناس آئروجینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در موش‌های BALB/c به کار برد. مقدار 10^2 ذره از فاژ اختصاصی *اسینتوباکتر*، موش‌ها را در برابر ($10^8 \times 1$) از یک سویه بیماری‌زای *اسینتوباکتر باومانی* در موش‌ها محافظت کرد. مقدار $1/2 \times 10^7$ ذره‌ی ویروسی از یک فاژ *پسودوموناس*، موش‌ها را در برابر 5 LD_{50} از یک سویه بیماری‌زای *پسودوموناس آئروجینوزا* محافظت نمود. از این رو، از موش BALB/C و تزریق داخل صفاقی در مطالعه حاضر استفاده شد، زیرا باکتری *بروسلا* داخل سلولی و ایمنی سلولی در بقاء و ایمنی آن نقش اساسی دارد. با این حال، شاید اگر از راه تزریق زیر جلدی استفاده می‌شد، جواب بهتری به دست می‌آمد (۱۰).

Capparelli از فاژ Msa علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین استفاده کرد. این فاژ توانست ۹۷ درصد از موش‌هایی که به طور تجربی با سویه‌ی A170 آلوده شده بودند را نجات دهد. فاژ به طور کامل سبب حذف باکتری شد و از بروز آبسه جلوگیری کرد. لذا نامبرده اظهار کرد که فاژ را به شکل موضعی و سیستمیک می‌توان در درمان عفونت به کار برد (۴). استفاده از فاژ در درمان بروسلوز که از عفونت‌های اندمیک کشور است و عفونت حاصل از آن مشکلات زیادی را برای افراد مناطق آلوده ایجاد کرده ما را به بررسی بیشتر در درمان با فاژ مصمم می نماید (۳).

در نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر، مشخص شد که گروه‌های گیرنده‌ی آنتی‌بیوتیک، همگی درمان شده و اکثر آنها در طی دوره‌ی درمان از باکتری پاک شده بودند و افزایش اندازه طحال نسبت به وزن بدن هم محسوس نبود. اما موش‌های موجود در گروه‌های گیرنده‌ی فاژ درمان نشده بودند. شاید این مقدار فاژ که به موش‌ها داده شده بود، برای درمان کامل مؤثر نبود. با این حال، در مقایسه با گروه شاهد باکتری، فاژ عزت نگر ۱، تا حدی توانست تعداد کلنی باکتری *بروسلا ملی‌تنسیس* را در طحال موش‌های آلوده، کاهش دهد. برای توجیه این امر، می‌توان اذعان نمود، در بیماری‌هایی که جایگزینی باکتری داخل سلولی است، به علت عدم امکان نفوذ بیشتر داروها به سلول، درمان بسیار مشکل است از این رو باید از داروهای خاص و به مدت طولانی استفاده نمود که نتایج مثبت پاکسازی طحال و سایر اندام‌ها توسط آنتی‌بیوتیک در طی دوره‌ی درمان، مؤید این مطلب است. بهتر است در فاژ تراپی در ورود فاژ به باکتری برای لیز باکتری ، ورود باکتری به بدن و دریافت فاژ از نظر زمان فاصله کوتاهی باشد تا قبل از جایگزینی باکتری، فاژ بتواند باعث لیز باکتری گردد در این صورت شاید بتوان نتایج مطلوب‌تری انتظار داشت، لذا کاهش تعداد باکتری در گرو فاژ و پاک شدن درصدی از طحال‌ها در این گروه هم با این امر مطابقت دارد.

منابع

۱. بهروزیخواه، ع. (۱۳۸۳). تایپینگ مولکولی سویه‌های بومی *بروسلا آبورتوس* و *بروسلا ملی تنسیس* با استفاده از RAPD-PCR. پایان نامه دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، صفحات ۱۵-۳.

۲. تاج بخش، ح. (۱۳۸۸). *باکتری شناسی عمومی*. چاپ هشتم، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۶۹۸-۶۹۵، ۴۰۹، ۳۹۸.

۳- ذوقی، ا. (۱۳۶۹). *میکروبیولوژی بروسلاها*. چاپ اول. سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، صفحات: ۹۷-۸۵

4. Capparelli, R., Parlato, M., Borriello, G., Salvatore, P., Iannelli, D. (2007). Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice. *Atimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**: 2765-73.

5. Chanishvili, N., Sharp, R. (2009). *A literature review of the practical application of bacteriophage*
Research. Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology Department, Tbilisi, Georgia.

6. Corbel, M.J., Tolari, F., Yadava, V.K. (1988). Characterization of new phage lytic for both smooth and non-smooth *Brucella* species. *Research in Veterinary Science* **44**: 45-9.

7. Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Danoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckaert, A., Godfroid, J., Letesson, J.J. (1988). Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis 16M* and involvement of lipopolysacharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Journal of Infection and Immunology* **66**: 5485-93.

8. Hanlon, G.W. (2007). Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* **30**: 118-28.

9. Shasha, S.M., Sharon, N., Inbar, M. (2004). Bacteriophags as antibacterial agents. *Harefuah* **143**: 121-5, 166.

10. Soothill, J.S. (1992). Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *Journal of Medical Microbiology* **37**: 258-61.

11. Teane, M.A., Erica, A., Tatiane, A., Renée, M., Renato, L. (2011). Laboratory animal models for brucellosis research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology review* **2011**: 6-9.

12. Unver, A., Erdogan, H.M., Atabay, H.I., Sahin, M., Celebi, O. (2006). Isolation, identification, and molecular characterization of *Brucella melitensis* from aborted sheep fetuses in Kars turkey. *Revuede Medicine Veterinare* **1**: 42-6.

13. Wilson, G.S., Miles, A.A. (2006). *Brucella*. In: Topley and Wilsons Microbiology and Microbial Infections. 10th, Vol. 2, Chapter 66, London: 998-1003.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 11, Issue 2, 2015

Evaluation of Izat Negar 1 (Iz_1) Phage Effects in Treatment of Experimentally Infected BALB/C Mice with *Brucella melitensis*

Karbalaee Mohammad Meygoonee, A.[1], Behroozikhah, A.M.[2]*, Mhzoonieh, M.R.[3]

1. Graduated of Master Degree in Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, shahrekord University, Shahrekord, Iran
2. Department of Research and production of Brucellosis vaccines, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
3. Institute of Zoonotic Diseases, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

Received Date:7 March 2015 *Accepted Date: 6 July 2015*

Abstract: *Brucellosis is one of the most common diseases between man and animals (zoonosis) with global spread and broad spectrum of hosts. Although the main way of its medication is prescribing antibiotics to treat patients but due to the occurrence of antimicrobial resistance in bacteria, but medical practitioners are interested in alternative treatments. One way to treat bacterial infections, the use of bacteriophages is instead antibacterial agents in this study. Futurist number 1 (Izat Negar) Iz_1 was used in the treatment of experimental brucellosis BALB/C mouse strain Brucella melitensis bacteria of acute biotype1 native national 1. In this study, 4 Group 6BALB/C mice, injected with 104 bacteria intraperitoneal infected as in 100 microliter, consisting of the mice by Rifampin antibiotics and oral Doxycycline treatment. 4 other groups of mice were received intraperitoneal injection of phage Iz treatment. Four control groups (each consisting 10 mice) were included for bacteria, bacteriophage, and antibiotic and phosphate buffer. On the results of this study were treatment antibiotics recipient groups. Groups that were received phages were not treated but in comparison with a control group of bacteria, the bacterial colony count for Brucella was lower in the spleen.*

Keywords: *Bacteriophage, Brucella melitensis biotype 1, Rifampin, Antibiotic, Doxycycline, BALB/C mice*

**Corresponding authors: Behroozikhah, A.M.*
Adress: Department of Research and production of Brucellosis vaccines, Razi Vaccine and Serum. Tel: 02634570038-46,34552005-9 Fax: +02634552194
E-mail: am.behroozikhah@rvsri.ac.ir