BRIEF REPORT

Lytic Activity of Isolated Phage from Milk Against Extended-Spectrum Beta-Lactamase Escherichia coli

Golnar Rahimzadeh[1],
Mohammad Sadegh Rezai[2],
Elaheh Ahmadi[3]

[1] Assistant Professor, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Professor, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] PhD Candidate in Food Science and Technology Advanced Food Systems Research Unit, College of Health and Biomedicine, Victoria University, Melbourne, Victoria, 3030 Australia

(Received July 27, 2019 ; Accepted November 1, 2020)

Abstract

Background and purpose: *Escherichia coli (E.coli)* is the most common cause of urinary tract infection. The treatment strategy has been hampered by the emergence of broad-spectrum beta-lactamase-producing *E.coli* and its resistance to most antibiotics. Bacteriophages are suggested as an alternative treatment option. This study aimed at evaluating the lytic activity of isolated phage from unpasteurized milk against Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBLs) *E.coli.*

Materials and methods: In this experimental study, *E. coli* was isolated from nine urinary tract infection samples and was confirmed as broad-spectrum beta-lactamase-producing by the Kirby-Bauer method. Bacteriophage was isolated from unpasteurized milk samples**.** Lytic activity of phage was determined by the spot test. Phage titer was calculated using the DLA assay. The phage latent period was detected and phenotype of the phage was determined by electron microscopy.

Results: Lytic activity of phage against *E.coli* was confirmed by the formation of an inhibition zone. The phage titer was 15×10^{10} PFU/ml. The images of electron microscopy confirmed the phage *cocktail* belonged to *Myoviridae* and *Podoviridae* families. The latent period of bacteriophage was 20 min.

Conclusion: Isolated bacteriophage from unpasteurized milk is effective on broad-spectrum beta-lactamase *E. coli*.

Keywords: bacteriophage, *E. coli*, Broad-spectrum beta-lactamases

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 30 (192): 139-144 (Persian).

*** Corresponding Author: Mohammad Sadegh Rezai -** Pediatric Infectious Diseases Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: rezai@mazums.ac.ir)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-08]

گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی ام شماره 192 دی سال 1399 (144-139)

بررسی فعالیت لیتیک فاژ جداسازی شده از شیر علیه *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف

گلنار رحیم زاده[1]
محمدصادق رضائی[2]
الهه احمدی[3]

چکیده

سابقه و هدف: *اشریشیاکلی* شایع‌ترین عامل عفونت دستگاه ادراری می‌باشد. استراتژی درمان با ظهور *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف و مقاومت آن به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها با مشکل مواجه شده است. باکتریوفاژها به‌عنوان گزینه درمانی جایگزین پیشنهاد می‌شوند. به همین منظور این مطالعه با هدف بررسی فعالیت لیتیک فاژ جداسازی شده از شیر پاستوریز نشده علیه *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف، انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی جهت آماده سازی باکتری، *اشریشیاکلی* از 9 نمونه عفونی ادرار جداسازی شد. سپس *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف با روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) تایید شد. باکتریوفاژ نیز از نمونه شیر پاستوریزه نشده جداسازی شد. فعالیت لیتیک فاژ علیه *اشرشیاکلی* با Spot test تایید شد. تیتر فاژ با تکنیک DLA assay محاسبه شد. زمان نهفتگی فاژ تعیین و فنوتیپ فاژ با میکروسکوپ الکترونی مشخص شد.

یافته‌ها: فعالیت لیتیک فاژ علیه *اشریشیاکلی* تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در شرایط *In vitro* با تشکیل هاله عدم رشد تایید شد. تیتر فاژ 10^{10}PFU/ml × 15 محاسبه شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی کوکتل فاژ متعلق به خانواده‌های *میوویریده و پودوویریده* را تایید نمود. دوره نهفتگی فاژ 20 دقیقه بود.

استنتاج: براساس یافته‌های این مطالعه باکتریوفاژ جداسازی شده از شیر پاستوریزه نشده علیه *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف در شرایط *In vitro* موثر است.

واژه های کلیدی: باکتریوفاژ، *اشریشیاکلی*، بتالاکتامازوسیع الطیف

مقدمه

عفونت دستگاه ادراری شایع‌ترین علت عفونت‌های بیمارستانی و دومین عفونت رایج در انسان می‌باشد. هر ساله 150 میلیون نفر توسط *اشریشیاکلی* به عفونت دستگاه ادراری مبتلا می‌شوند. با گسترش سریع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در این باکتری درمان عفونت‌های ناشی از آن با شکست مواجه شده است. عمده‌ترین روش مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام، تولید آنزیم بتالاکتاماز می‌باشد. باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف قادر به هیدرولیز بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌های گروه بتالاکتام مانند پنی‌سیلین‌ها،

مولف مسئول: محمدصادق رضایی - ساری: مرکز آموزشی درمانی بوعلی سینا، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده بیماری های واگیر E-mail:rezai@mazums.ac.ir
1. استادیار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
2. استاد، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
3. دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی واحد تحقیقات پیشرفته سیستم های غذایی، دانشکده بهداشت و پزشکی، دانشگاه ویکتوریا، ملبورن، ویکتوریا، 3030 استرالیا
تاریخ دریافت : 1398/5/5 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات :1398/5/6 تاریخ تصویب : 1399/8/11

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-08]

سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم و آزترئونام می‌باشند(2-1). استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها در دام و فرآورده‌های دامی یکی دیگر از دلایل انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی از فرآورده‌های دامی به انسانی می‌باشد(3).

با توجه به گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی جامعه پزشکی علاقمند به جایگزین کردن گزینه مناسب جهت درمان عفونت‌های باکتریایی می‌باشد. رویکرد جدید برای حل این مشکل استفاده از باکتریوفاژها است. باکتریوفاژها ویروس‌های طبیعی هستند که به‌طور اختصاصی سبب لیز باکتری‌ها می‌شوند و تاثیر مخرب بر فلور نرمال ندارند. تولید آن‌ها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه می‌باشد و اثر سمی نیز ندارند(5-4). Chibeu تاثیر فاژ علیه بیوفیلم تشکیل شده توسط *اشریشیاکلی* ایجادکننده عفونت ادراری را بررسی و تایید نمود(6). Sybesma از فاژهای تجاری علیه عفونت ادراری ناشی از *اشریشیاکلی* استفاده نمود(7). در این مطالعه از شیر پاستوریزه نشده به‌عنوان منبع جداسازی *فاژ علیه اشریشیاکلی* استفاده شد. هدف از انجام این مطالعه جداسازی و بررسی فعالیت لیتیک فاژ جداسازی شده از نمونه شیر پاستوریز نشده علیه *اشریشیاکلی* تولیدکننده بتالاکتاماز وسیع‌الطیف در شرایط *In vitro* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده سازی باکتری

در این مطالعه تجربی *اشریشیاکلی* از 9 نمونه ادرار افراد مبتلا به عفونت ادراری جداسازی شد. این باکتری توسط تست‌های افتراقی میکروبی تایید شد. جهت تایید *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف از روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک: سفیکسیم (5 µg)، آمیکاسین (30 µg)، جنتامیسین (10µg)، سفتریاکسون (30µg)، آمپی‌سیلین (10µg)، سفتازیدیم (30µg)، سفوتاکسیم (30µg) و کوآموکسی کلاو (30 µg) (Rosco, United States) استفاده شد(8).

جداسازی باکتریوفاژ *از شیر پاستوریزه نشده*

100 میلی‌لیتر محیط نوترین براث (QUELAB, United States) به هم حجم شیر پاستوریزه نشده اضافه شد. سپس در شیکر انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از یک شبانه روز مخلوط با دور g× 10000 به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ و سوپرنتنت جداسازی شد(9).

تعیین فعالیت لیتیک و دامنه میزبانی باکتریوفاژ علیه اشریشیاکلی با روش Spot test

جهت بررسی فعالیت لیتیک فاژ علیه *اشریشیاکلی* از روش Spot test استفاده شد. 100میکرولیتر از فاژ به تاپ آگار اضافه شد. سپس تاپ آگار به پلیت (Bottom agar) اضافه شد. 50 میکرولیتر از 9 عدد *اشریشیاکلی* جداسازی شده از نمونه‌های ادرار به طور جداگانه به تاپ آگار اضافه شد. سپس پلیت در انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. تشکیل هاله عدم رشد، بررسی گردید(9).

محاسبه تیتر باکتریوفاژ جداسازی شده با روش Double layer Agar (DLA assay)

برای محاسبه تیتر فاژ از روشDLA assay استفاده شد. بدین منظور سریال رقت از فاژ در 10 لوله استریل تهیه شد. از هر رقت تهیه شده از فاژ به نسبت 1:1 سوسپانسیون باکتری با غلظت معادل 0/5 مک فارلند اضافه شد. مخلوط هر لوله به تاپ آگار اضافه شد. تاپ آگار به پلیت اضافه شد. پلیت‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد بمدت 24 ساعت انکوبه شدند(9).

منحنی رشد و تکثیر باکتریوفاژ جداسازی شده (The Single-Step Growth Curve)

طبق روش بالا سریال رقت از فاژ در چهار سری و هر سری شامل 4 لوله استریل تهیه شد. به هر رقت تهیه شده از فاژ به نسبت 1:1 سوسپانسیون باکتری با غلظت

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-08]

معادل 0/5مک فارلند اضافه شد. در مدت زمان 80 دقیقه با فاصله زمانی هر 20 دقیقه نمونه‌ها از انکوباتور خارج شدند. با استفاده از روش DLA assay، دوره نهفتگی فاژ محاسبه شد(9).

توصیف ویژگی فنوتیپی باکتریوفاژ جداسازی شده

فاژ با دور g×25000 به مدت 60 دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب فاژ بر روی گرید (carbon-coated copper grids) ریخته شد و با یورانیل استات با (pH 4-4/5) رنگ آمیزی انجام شد. از میکروسکوپ الکترونی مدل Philips 300 CM Electron Microscope با ولتاژ 150 kV استفاده شد(9).

یافته ها و بحث

توصیف اشریشیاکلی مولد بتالاکتامازم وسیع الطیف

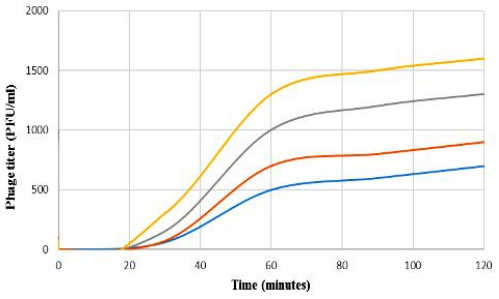
از 9 نمونه *اشریشیاکلی* جداسازی شده از نمونه ادرار افراد مبتلا به عفونت ادراری، 7 نمونه با مقاومت به سفتازیدیم، سفتریاکسون، سفوتاکسیم و کوآموکسی کلاو به عنوان باکتری‌های مولد بتالاکتامازم وسیع الطیف شناسایی شدند. 2 نمونه دیگر به نالیدیکسیک اسید، سفیکسیم، پیپراسیلین، سفتریاکسون، آمپیسیلین، تتراسیکلین مقاوم و به سفتازیدیم، سفتریاکسون و سفوتاکسیم حساس بودند.

توصیف باکتریوفاژ

در این مطالعه فاژ از شیر پاستوریزه نشده جداسازی شد. با تشکیل هاله عدم رشد در روش Spot test، فعالیت لیتیک فاژ علیه *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف و سویه‌های فاقد بتالاکتاماز نیز تایید گردید (تصویر شماره 1).

تیتر فاژ جداسازی شده با روش DLA assay، 15×10^{10} PFU/ml محاسبه شد. براساس منحنی رشد و تکثیر فاژ دوره نهفتگی آن 20 دقیقه محاسبه شد (تصویر شماره 2).

تصویر شماره 1: تایید فعالیت لیتیک فاژ علیه *اشریشیاکلی* با تشکیل هاله عدم رشد با استفاده از روش Spot test

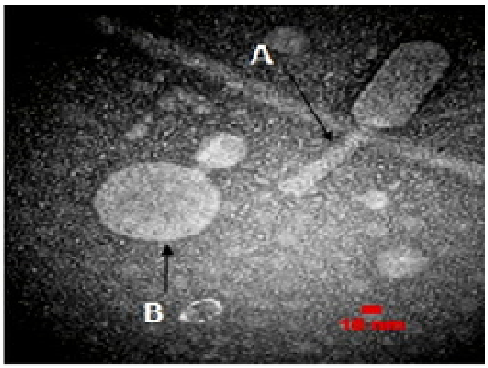


تصویر شماره 2: منحنی رشد و تکثیر فاژ لیتیک جداسازی شده از نمونه شیر خام پاستوریزه نشده علیه *اشریشیاکلی*

*Note: Sample 1: Phage concentration 1:10
Sample 2: Phage concentration 1:100
Sample 3: Phage concentration 1:1000
Sample 4: Phage concentration 1:10000

تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی جداسازی کوکتل فاژ را تایید نمود. فاژهای گروه اول با سر چند وجهی به طول (180nm) و دم *بلند غیر منقبض شونده به طول* (165nm)، متعلق به خانواده *میوویریده* (راسته *کادو ویرال ها*) بودند. فاژهای گروه دوم با ساختار هندسی به طول (45nm)، متعلق به خانواده *پودوویریده* (راسته *کادو ویرال‌ها*) بودند (تصویر شماره 3). در مطالعه Peng و همکاران در سال 2018، فاژ vB_EcoS_HSE2 متعلق به خانواده *سیفوویریده* از نمونه فاضلاب جداسازی شد و دوره نهفتگی فاژ 30 دقیقه گزارش شد، که در مقایسه با مطالعه حاضر دوره نهفتگی طولانی تر می‌باشد.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-08]



تصویر شماره 3: تصویر میکروسکوپ الکترونی: (A) فاژ متعلق به خانواده *میوویریده*، (B) خانواده *پودویریده*،رنگ آمیزی با اورانیل استات 2 درصد (pH=4-4.5) ولتاژ 150 Kv ، Scale bar 15 nm

همچنین آن‌ها در مطالعه خود تاثیر لیتیک فاژ علیه 11 سویه *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف را بررسی کردند که فعالیت لیتک فاژ علیه 6 سویه *اشریشیاکلی* تایید شد(10).

در مطالعه Nishikawa و همکاران، فاژهای *T4*، *T6* و *KEP10* علیه *اشریشیاکلی* از فاضلاب جداسازی شدند. *فاژ T4*، *T6* متعلق به خانواده *میوویریده* دامنه میزبانی محدودی داشتند(11).

در *مطالعه* Galtie و همکاران، فاژهای *AL505_P1*، *AL505_P2* و *AL505_P3* از فاضلاب جداسازی شدند. فاژها به ترتیب متعلق به خانواده‌های *پودوویریده*، *میوویریده* و *سیفوویریده بودند*. فعالیت لیتیک فاژها به‌صورت کوکتل بیوفیلم تشکیل شده توسط *اشریشیاکلی* سویه AL505 را کاهش داد. اما علیه *اشریشیاکلی* سویه 55989 فعالیت لیتیک کم‌تری نشان داد(12).

در مطالعه Skaradzinska و همکاران در سال 2017، کوکتل فاژ BF17 و BF15 از مدفوع، خوراک و بستر خوک را جداسازی کردند. فعالیت لیتیک کوکتل فاژ را علیه *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتامازهای وسیع الطیف گزارش کردند. 82/7 درصد باکتری‌های جداسازی شده به فاژ حساس بودند و17/3 درصد به فاژ مقاوم بودند(13).

Gundogdu و همکاران در سال 2016، تاثیر لیتیک فاژهای تجاری *Pyophage*، *Intestiphage*، *Enko* و *Ses* را علیه *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف که از بزرگسالان و کودکان جداسازی شده بودند، گزارش کردند. از نمونه‌های افراد مبتلا به عفونت ادراری از نظر حساسیت به فاژ *Enko* *Pyophage* و *Intestiphage* به ترتیب 124، 116 سویه *اشریشیاکلی* حساس بودند(14).

در این مطالعه تاثیر لیتیک فاژ جداسازی شده از شیر پاستوریزه نشده علیه *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع‌الطیف ایزوله شده از نمونه‌های ادراری افراد مبتلا به عفونت ادراری در شرایط *In vitro* تایید شد. فاژ جداسازی شده از شیر با فعالیت لیتیک اختصاصی علیه *اشریشیاکلی* مولد عفونت ادراری در انسان می‌تواند تایید کننده یکی از راه‌های انتقال مقاومت آنتی‌بیوتیکی به انسان از طریق فراورده‌های دامی و محصولات غذایی نیز باشد.

سپاسگزاری

این مطالعه با کد اخلاق IR.MAZUMS..REC.1397.2704 انجام شد. از آزمایشگاه تحقیقاتی مرکز عفونی اطفال بیمارستان بوعلی سینا ساری که این امکان را فراهم کردند تا از تجهیزات و امکانات مورد نیاز جهت انجام این طرح بهره‌مند شویم، قدردانی می‌شود.

References

1. Ena J, Arjona F, Martínez-Peinado C, del mar López-Perezagua M, Amador C. Epidemiology of urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli. Urology 2006; 68(6): 74-79.
2. Melzer M, Petersen I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing E. coli compared to non-ESBL producing E. coli. J Infect 2007; 55(3): 254-259.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-08]

3. Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, et al. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant Escherichia coli strains of human, animal, and food origins. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(10): 3996-4001.
4. Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, et al. Phage therapy in clinical practice :treatment of human infections. Curr Pharm Biotechnol 2010; 11(1): 69-86.
5. Rahimzadeh G, Saeedi M, Farshidi F, Rezai MS. Phage Therapy in Treatment of Gram-negative Bacterial Infections: A Systematic Review. J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28(165): 203-212.
6. Chibeu A, Lingohr EJ, Masson L, Manges A, Harel J, Ackermann H-W, et al. Bacteriophages with the ability to degrade uropathogenic Escherichia coli biofilms. Viruses 2012; 4(4): 471-487.
7. Sybesma W, Zbinden R, Chanishvili N, Kutateladze M, Chkhotua A, Ujmajuridze A, et al. Bacteriophages as potential treatment for urinary tract infections. Front Microbiol 2016; 7: 465.
8. Giriyapur RS, Nandihal NW, Krishna BV, Patil AB. Comparison of Disc Diffusion Methods for the Detection of Extended-Spectrum Beta Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. J Lab Physicians 2011; 3(1): 33-36.
9. Rahimzadeh G, Gill P, Rezai MS. Characterization and lytic activity of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) phages isolated from NICU. Australas Medical J 2016; 9(6): 169-175.
10. Peng Q, Yuan Y. Characterization of a newly isolated phage infecting pathogenic Escherichia coli and analysis of its mosaic structural genes. Sci Rep 2018; 8(1): 8086.
11. Nishikawa H, Yasuda M, Uchiyama J, Rashel M, Maeda Y, Takemura I, et al. T-even-related bacteriophages as candidates for treatment of Escherichia coli urinary tract infections. Arch Virol 2008; 153(3): 507-515.
12. Galtier M, De Sordi L, Maura D, Arachchi H, Volant S, Dillies MA, et al. Bacteriophages to reduce gut carriage of antibiotic resistant uropathogens with low impact on microbiota composition. Environ Microbiol 2016; 18(7): 2237-2245.
13. Skaradzińska A, Śliwka P, Kuźmińska-Bajor M, Skaradziński G, Rząsa A, Friese A, et al. The efficacy of isolated bacteriophages from pig farms against ESBL/AmpC-Producing Escherichia coli from pig and Turkey farms. Front Microbiol 2017; 8: 530.
14. Gundogdu A, Bolkvadze D, Kilic H. In vitro effectiveness of commercial bacteriophage cocktails on diverse extended-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli strains. Front Microbiol 2016; 7: 1761.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-05-08]