

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

Golnar Rahimzadeh¹,
Mohammad Sadegh Rezai²,
Elaheh Ahmadi³

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)

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

گلنار رحیم زاده¹محمدصادق رضائی²الهه احمدی³

چکیده

سابقه و هدف: *اشریشیاکلی* شایع ترین عامل عفونت دستگاه ادراری می باشد. استراتژی درمان با ظهور *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف و مقاومت آن به اکثر آنتی بیوتیک ها با مشکل مواجه شده است. باکتریوفاژها به عنوان گزینه درمانی جایگزین پیشنهاد می شوند. به همین منظور این مطالعه با هدف بررسی فعالیت لیتیک فاژ جداسازی شده از شیر پاستوریزه نشده علیه *اشریشیاکلی* مولد بتالاکتاماز وسیع الطیف، انجام شد.

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

یافته ها: فعالیت لیتیک فاژ علیه *اشریشیاکلی* تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف در شرایط *In vitro* با تشکیل هاله عدم رشد تایید شد. تیتراژ 15×10^{10} PFU/ml محاسبه شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی کوکتل فاژ متعلق به خانواده های میوویریده و پودوویریده را تایید نمود. دوره نهفتگی فاژ 20 دقیقه بود.

استنتاج: براساس یافته های 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*، بتالاکتاماز وسیع الطیف

مقدمه

ناشی از آن با شکست مواجه شده است. عمده ترین روش مقاومت در برابر آنتی بیوتیک های بتالاکتام، تولید آنزیم بتالاکتاماز می باشد. باکتری های تولید کننده بتالاکتاماز وسیع الطیف قادر به هیدرولیز بسیاری از آنتی بیوتیک های گروه بتالاکتام مانند پنی سیلین ها،

عفونت دستگاه ادراری شایع ترین علت عفونت های بیمارستانی و دومین عفونت رایج در انسان می باشد. هر ساله 150 میلیون نفر توسط *اشریشیاکلی* به عفونت دستگاه ادراری مبتلا می شوند. با گسترش سریع مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری درمان عفونت های

مؤلف 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 دکتری 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

سفالوسپورین‌های نسل سوم و چهارم و آزترئونام می‌باشند (1-2). 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 (4-5). Chibeu تاثیر فاژ علیه بیوفیلیم 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 پاستوریزه 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 وسیع‌الطیف از روش دیسک دیفیوژن (Kirby-Bauer) با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک: سفیکسیم (5 µg)، آمیکاسین (30 µg)، جنتامیسین (10 µg)، سفتریاکسون (30 µg)، آمپی‌سیلین (10 µg)، سفوتامیدیم (30 µg)، سفوتاگسیم (30 µg) و کوآموکسی کلاو (30 µg) (Rosco, United States) استفاده شد (8).

جداسازی باکتریوفاژ از شیر پاستوریزه نشده

100 میلی‌لیتر محیط‌نوترین برات (QUELAB, United States) به هم حجم شیر پاستوریزه نشده اضافه شد. سپس در شیکر انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از یک شبانه روز مخلوط با دور $10000 \times g$ به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ و سوپرناتنت 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. 100 میکرولیتر 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 به‌طور 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 تیتراژ باکتریوفاژ جداسازی شده با روش *Double layer Agar (DLA assay)*

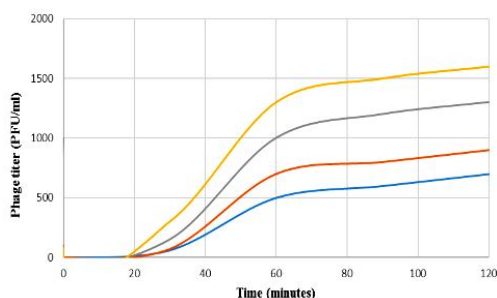
برای محاسبه تیتراژ از روش *DLA assay* استفاده شد. بدین منظور سریال رقت از فاژ در 10 لوله استریل تهیه شد. از هر رقت تهیه شده از فاژ به نسبت 1:1 سوسپانسیون باکتری با غلظت معادل $0/5$ مک فارلند اضافه شد. مخلوط هر لوله به تاپ آگار اضافه شد. تاپ آگار به پلیت اضافه شد. پلیت‌ها در دمای 37 درجه سانتی‌گراد بمدت 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



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 ویرال ها) بودند (تصویر
شماره 3). در مطالعه Peng و همکاران در سال 2018، فاژ
vB_EcoS_HSE2 متعلق به خانواده سیفویریده از نمونه
فاضلاب جداسازی شد و دوره نهفتگی فاژ 30 دقیقه
گزارش شد، که در مقایسه با مطالعه حاضر دوره
نهفتگی طولانی تر می باشد.

معادل 0/5 مک فارلند اضافه شد. در مدت زمان 80
دقیقه با فاصله زمانی هر 20 دقیقه نمونه ها 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 $25000 \times g$ 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 باکتری های مولد بتالاکتامازم وسیع الطیف
شناسایی شدند. 2 نمونه دیگر به نالیدیکسیک اسید،
سفیکسیم، پیراسیلین، 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 سویه های فاقد بتالاکتاماز نیز تایید گردید
(تصویر شماره 1).

تیتراژ 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).

و بستر خوک را جداسازی کردند. فعالیت لیتیک کوکتل فاژ را علیه *اشریشیاکلی* مولد بتالاکنمازهای وسیع الطیف گزارش کردند. 82/7 درصد باکتری‌های جداسازی شده به فاژ حساس بودند و 17/3 درصد به فاژ مقاوم بودند (13).

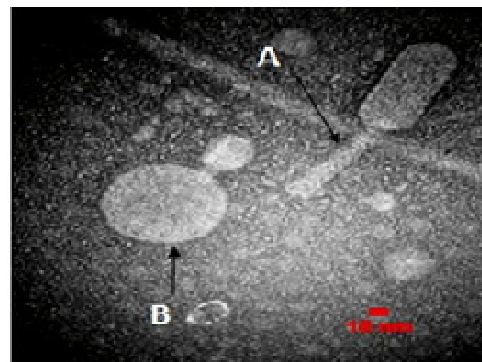
Gundogdu و همکاران در سال 2016، تاثیر لیتیک فاژهای تجاری *Pyophage*، *Enko*، *Intestiphage* و *Ses* را علیه *اشریشیاکلی* مولد بتالاکنماز وسیع الطیف که از بزرگسالان و کودکان جداسازی شده بودند، گزارش کردند. از نمونه‌های افراد مبتلا به عفونت ادراری از نظر حساسیت به فاژ *Enko Pyophage* و *Intestiphage* به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

- 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.



تصویر شماره 3: تصویر میکروسکوپ الکترونی: فاژ متعلق به خانواده میویریده، (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 بتالاکنماز وسیع الطیف را بررسی کردند که فعالیت لیتیک 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 میویریده 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 پودویریده، میویریده و سیفویریده بودند. فعالیت لیتیک فاژها به صورت 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

- 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.

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. Giriyaapur 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.