باکتریوفاژ کاندیدای جدید برای جلوگیری و حذف بیوفیلم

رضا عزیزیان[1,2]، فرید عزیزی جلیلیان[3*]، حسن عسکری[1,2]، احمد ناصر[1,2]، ساجده کریمی[2]، نورخدا صادقی فرد[2]
سید داود موسوی نسب[4]، نایبعلی احمدی [5]

1)کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
2)مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
3)مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
4)گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
5)مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

تاریخ پذیرش: **تاریخ دریافت:**

چکیده

مقدمه: سودوموناس آئروژینوزا، میکروارگانیسمی است که در شرایط مرطوب زنده می ماند و عامل خطرناکی بویژه در فضای بیمارستانی می باشد. مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک ها باعث بروز سویه های مقاوم به درمان چند دارویی سودوموناس آئروژینوزا گردیده است. سودوموناس آئروژینوزا می تواند به سطوح متنوعی متصل شده و تشکیل بیوفیلم بدهد. بیوفیلم به عنوان شکلی از جمعیت باکتریایی نسبت به بسیاری داروها و مواد شمیایی مقاوم بوده و قادر به ایجاد بیماریهای خطرناک و مقاوم به درمان می شود. در چندین دهه گذشته باکتریوفاژها (فاژها) به عنوان راه حل جدیدی برای درمان بیوفیلم مطرح گردیده اند. در این مطالعه فاژهای سودوموناس آئروژینوزا جهت جلوگیری و حذف بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفته اند.

مواد و روش ها: پس از جداسازی فاژها و تهیه رقت های سریالی تشکیل بیوفیلم به روش میکروپلیت مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر فاژهای جداشده بر روی بیوفیلم باکتری های Pseudomonas putida، E.coli و Acinetobacter baumanii نیز بررسی شد.

یافته های پژوهش : غلظت نوری برای بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا در طول موج 492nm برابر 1/688 بود. سوسپانسیون فاژ خالص و رقت های 2-10 و 3-10 از سوسپانسیون فاژی، OD را به ترتیب به 1/587، 1/341 و 1/461 کاهش دادند. نتایج نشان می دهد که فاژها قادر به حذف و مهار بیوفیلم هستند. همچنین فاژها در رقت های خاصی بیشترین تاثیر را دارند.

بحث و نتیجه گیری: فاژها برای اتصال به رسپتور هدف باهم رقابت می کنند و در غلظت معینی بیشترین اثر دارند. نتایج این تحقیق نشان داد که فازها قادر به از بین بردن باکتریای مختلف هستند و م توان آنها را به این منظور مورد استفاده قرار داد.

واژه های کلیدی: باکتریوفاژ، سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلم

***نویسنده مسئول:** مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

Email: azizifarid@gmail.com

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا میکروارگانیسمی است که توانایی زنده ماندن در محیط های مرطوب را دارا بوده و قادر به ایجاد مشکلات شدیدی در بیمارستان می باشد. این باکتری بعنوان فراوان ترین باکتری گرم منفی جدا شده از خون، عفونت زخم، پنومونی، سپسیس، عفونت دستگاه ادراری- تناسلی و عفونت داخل شکمی مطرح می باشد [1]. این باکتری همچنین قادر به ایجاد مشکلات جدی در افراد متبلا به سیستیک فیبروزیس با ایمنی سرکوب شده، افراد با سوختگی شدید، سرطانی ها و ایدزی ها می باشد [2]. یکی از دغدغه های درمان این باکتری، حساسیت پائین آن به آنتی بیوتیک ها می یاشد، که این فرآیند را به پمپ های افلاکس (کد شونده توسط کروموزومی) و نفوذپذیری دیواره سلولی باکتری و مکانیسم های دیگر نسبت می دهند[3]. استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک ها به پیدایش باکتری ها مقاوم چند دارویی منجر گردیده است که باعث مشکلات درمانی عفونت های حاصله از سودوموناس آئروژینوزا شده است [3, 4]. به علاوه سودوموناس آئروژینوزا قادر به اتصال به سطوح و تشکیل بیوفیلم می باشد[5]. بیوفیلم بعنوان یک استراتژی برای زنده ماندن باکتری مسئول ایجاد عفونت های مقاوم به آنتی بیوتیک از طریق وسائل پزشکی مطرح می باشد[6, 7]. باکتریوفاژها بعنوان روشی نوین برای مقابله با بیوفیلم مورد استفاده قرار گرفت [6, 8].

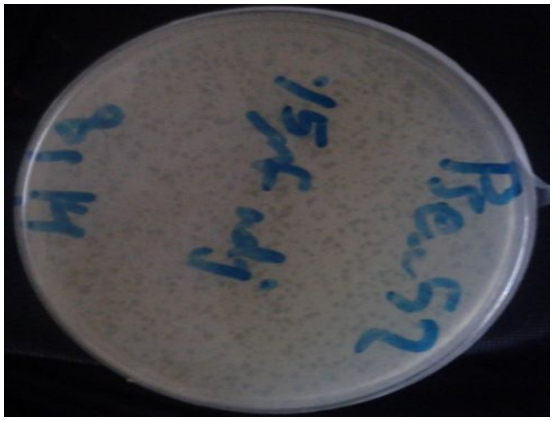
فاژ تراپی که در چندین دهه ساله گذشته مطرح گردیده است[9] برپایه استفاده از فاژهای لیتیک و مقابله با عفونت باکتریایی استوار می باشد. این روش درمانی دارای مزایای نسبت به آنتی بیوتیک درمانی می باشد که می توان اختصاصیت بالا برای میزبان باکتریایی، عدم عوارض جانبی برای بیمار و پایداری وابسته به حضور میزبان باکتریایی اشاره نمود [6]. هدف از این مطالعه بررسی اثر فاژ بر روی دو فاز از مراحل تشکیل بیوفیلم می باشد: مرحله ی پلانکتونیک و مرحله ی بیوفیلمی.

مواد و روش ها

در این مطالعه نمونه های فاضلاب از حوضچه بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی ایلام تهیه شد. در ابتدا به 40 سی سی از فاضلاب تازه 2-3 قطره کلروفرم اضافه شد و سپس با دور 4000 rpm در 4 درجه سانتی گراد برای 15 دقیقه عمل سانتریفیوژ انجام شد و در انتها محلول بالایی با فیلتر 0.45µ فیلتر گردید.

20 سی سی سوسپانسیون حاصل به طور هم حجم با LB براث، به همراه 1-2 سی سی سولفات منیزیم 10 درصد و 5 سی سی از سوسپانسیون باکتریایی برای 24ساعت در 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از 24 ساعت، سانتریفیوژ و فیلتراسیون با همان شرایط انجام گردید. سپس با روش overlay (کشت دو لایه) باکتری با سوسپانسیون فاژی کشت گردید. در ادامه پلاک فاژی که حاوی تقریبا 106 p.f.u بود را با پیپت پاستور استریل برداشته در 5 سی سی LB براث حاوی یک سی سی باکتری با غلظت 0.5µf برای 4-6 ساعت در 37 درجه سانتیگراد با دور 100 rpm انکوبه گردید.

به سوسپانسیون حاصل چند قطره کلروفروم اضافه گردید و برای 5 دقیقه با دور 5000 rpm در 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و سپس با فیلتر 0.45µ فیلترگردید. سوسپانسیون حاصله شامل فاژ سودوموناس بوده که در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت[10].



عکس شماره 1-1: پلاک های فاژی

مهار تشکیل بیوفیلم:

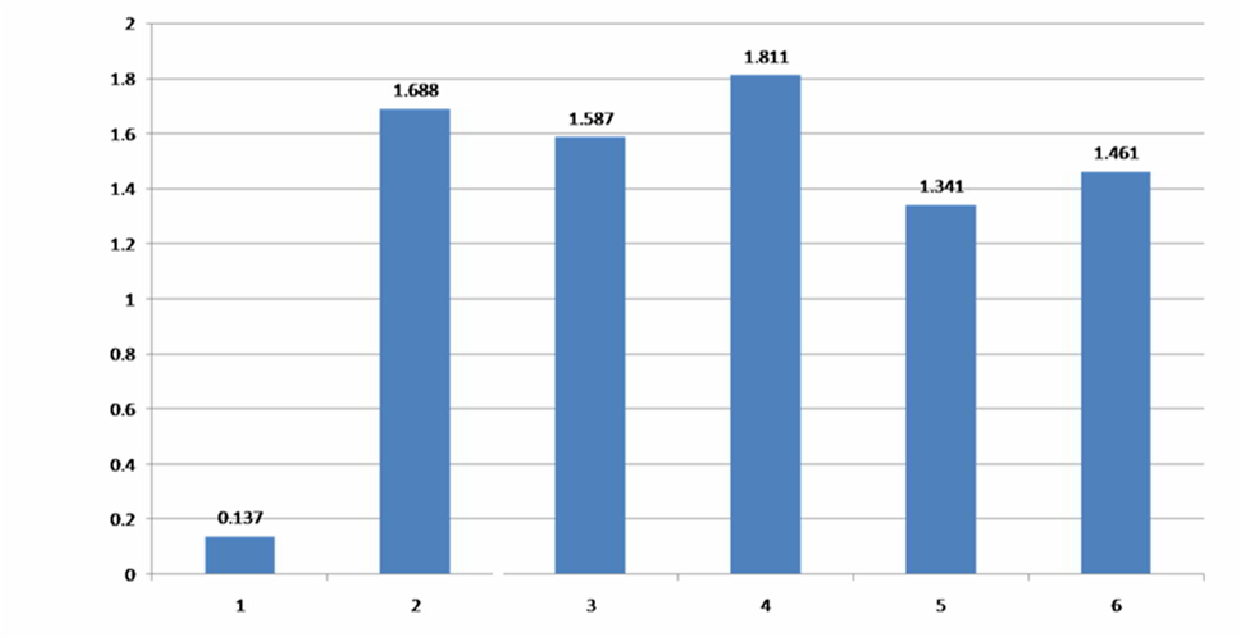
برای این مرحله رقت های سریالی از سوسپانسیون فاژی (1-10 تا 3-10) تهیه شد. حجم یکسانی از باکتری با سوسپانسیون خالص و رقت های تهیه شده فاژی، برای 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد به روش میکرو پلیت در پلیت 96 خانه ی الایزا انکوبه شد. بعد از 24 ساعت شستشو و فیکساسیون با اسید استیک و متانول انجام گرفت و رنگ آمیزی با کریستال ویوله صورت گرفت. غلظت نوری (OD) در طول موج 420nm با دستگاه خوانش الیزا (ELISA reader) ثبت گردید.

حذف بیوفیلم:

در این مرحله فاژهای سودوموناس آئروژینوزا به منظور حذف بیوفیلم مورد استفاده قرار گرفت. بیوفیلم مطابق مطالعه در گذشته [11] با استفاده از گونه های Pseudomonas putida, E.coli, Acinetobacter baumanii تهیه شد. بعد از تهیه بیوفیلم در روز دوم، سوسپانسیون فاژی خالص و رقت های 1-10 تا 3-10 به چاهک های حاوی بیوفیلم اضافه شدند. در روز سوم، OD با دستگاه ELISA reader خوانده شد.

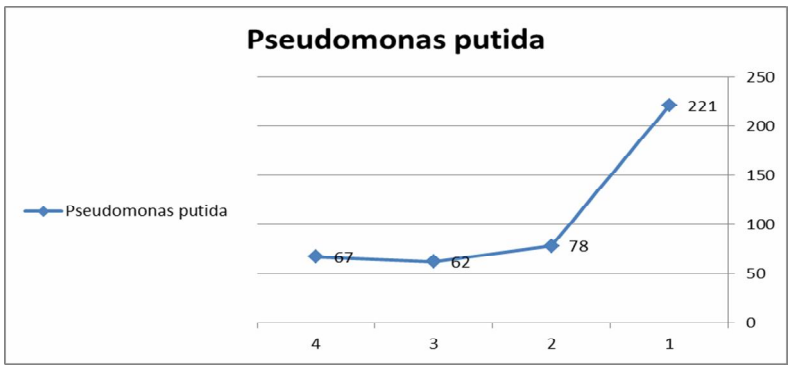
نتایج:

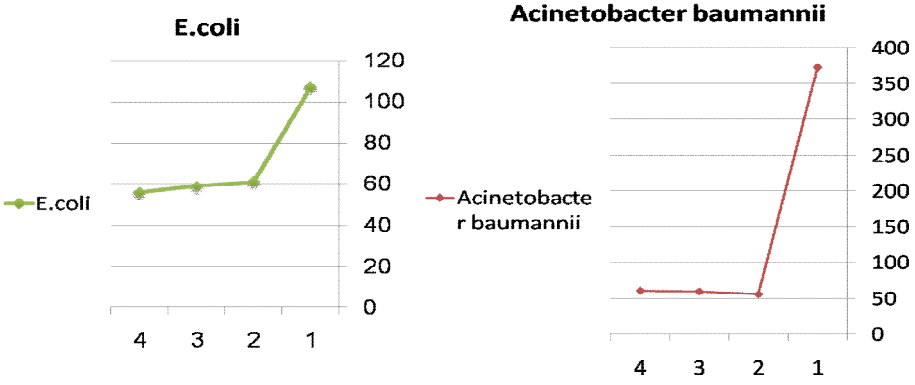
مهار تشکیل بیوفیلم: غلظت نوری (OD) بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا در طول موج 492nm برابر 1/688 بود. فاژ خالص، OD را تا به 1/587 کاهش داد، در حالیکه در رقت 1-10 نه تنها کاهشی رویت نشد، بلکه افزایش اندکی نیز رخ داد. (شکل 1-1) رقت های 2-10 و 3-10 به ترتیب OD را به 1/341 و 1/461 کاهش دادند. که بیشترین اثر مهاری متعلق به رقت 2-10 بود.



شکل 1-1:غلظت نوری (OD) 1. محیط Blank 2. بیوفیلم 3. فاژ خالص 4. رقت 10^{-1} 5. 10^{-2} 6. 10^{-3}

حذف بیوفیلم: فاژهای جدا شده از باکتری سودوموناس آئروژینوزا جهت حذف بیوفیلم استفاده شدند. بیوفیلم سودوموناس پوتیدا دارای غلظت نوری 0/221 در طول موج nm 492 بود. رقت های استفاده شده فاژی 1-10، 2-10 و 3-10 به ترتیب باعث کاهش OD به 0/078، 0/062 و 0/067 شدند (شکل 2-1). تاثیر رقت های فاژی بر روی E.coli و آسینتوباکتر بومانی بصورت شکل آورده شده است (شکل 2-1).





شکل 2-1: غلظت نوری (OD) ; 1. بیوفیلم 2. رقت 10^{-1} 3. رقت 10^{-2} 4. رقت 10^{-3}

بحث و نتیجه گیری

فاژها مشخصا قادر به کاهش جمعیت باکتریایی در فرم پلانکتونیک و بیوفیلم هستند بنابراین از آن ها می توان به عنوان ابزاری برای جلوگیری و حذف بیوفیلم استفاده کرد[12]. نتایج این مطالعه بیانگر آن است که فاژهای سودوموناس آئروژینوزا قادر به کاهش OD بیوفیلم باکتری های E.coli ، سودوموناس آئروژینوزا و آسینتوباکتر بومانی می باشند.

این پدیده را می توان به عملکرد پروتئولیتیک پروتئین های فاژی نسبت داد که قادر به حذف اگزوپلی ساکارید (EPS) بیوفیلم هستند و بر خلاف خود فاژها اختصاصی عمل نمی کنند. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که فاژها در رقت های خاصی دارای بهترین عملکرد هستند که دلیل این امر می تواند تمایل اتصالی متفاوت فاژها در رقت های مختلف برای رسپتور خود می باشد. در رقت های پائین سرعت رشد باکتری باعث می شود نسبت تعداد باکتری به فاژ در واحد زمان بیشتر گردد و فاژها قادر به حذف تمامی باکتری ها نخواهند بود. اما در خصوص غلظت های بالای فاژی به نوعی می توان گفت که رقابت فاژها برای اتصال به باکتری باعث ناکارآمدی فاژها می گردد[13, 14].

سپاسگزاری

نویسندگان بدین وسیله از پروفسور Andrew M. Kropinski در آزمایشگاه بیماریهای مشترک انسان و حیوان منتقله از راه غذا کانادا و دکتر Marine Henry از بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور فرانسه تشکر و قدردانی به عمل می آید.

References

1-Mah TF, PittsB, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'TooleGA. A genetic basis for Pseudomonas aeruginosa biofilm antibiotic resistance. Nature 2003;426:306-10.

2-Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, patho- genesis and treatment of Pseudomonas aeruginosa infections. . Drugs 2007;67: 351-68.

3-Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa. J R Soc Med 2002;95: 22-6.

4-Cunha BA. Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapy. Semin Respir Infect 2002; 17.

5-Stewart PS, William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 2001;358:135-8.

6-Azeredo J, Sutherland IW. The use of phages for the Removal of infectious biofilms. Curr Pharm Biotechnol 2008;9:261-6.

7-Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis 2002;8:881-90.

8-[8] O'Toole G, Kaplan H, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu Rev Microbiol 2000;54:49-79.

9-Joerger RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. Poult Sci 2003;82:640-7.

10-Martha RJ, Clokie AMK. Bacteriophages methods and protocols. Isol Charact Inter 2009;1:11-14.

11-Christensen WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 1985;22:996-1006.

12-Matsuzaki S, Rashel M, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. J Infect Chemother 2005;11:211-9.

13-Petar Knezevic ea. A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on Pseudomonas aeruginosa biofilm. J Microbiol Meth 2008;74:114-8.

14-Bradley DE. Basic characterization of a Pseudomonas aeruginosa pilus-dependent bacteriophage with a long noncontractile tail. J Virol 1973:1139-48.

Bacteriophage as a Novel Approach to Inhibite and Remove Biofilms

Azizian R[1,2], Azizi Jalilian F[3], Askari H[1,2], Naser A[1,2], Karimi S[2], Sadeghi FardN[2], Mousavi NasabS.D[4]; Ahmadi N.A[5]

(Received: Accepted:)

Abstract

Introduction: Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) is a ubiquitous organism which has emerged as a major threat in the hospital setting. Overuse of antibiotics has also significantly increased the emergence of multi-drug resistant bacteria. P. aeruginosa has an innate ability to adhere to the surfaces and form virulent biofilms. Bacteriophages may be as potential agents for resolving of the problem. In this study, P.aeruginosaphage was explored to prevent and remove the biofilms.

Material and Method: After isolation of the phages and preparation of serial dilution, the biofilm formation by using of the microplate method was examined. Furthermore, the effects of isolated phages on the biofilms of Pseudomonas putida, Acinetobacter baumanii and Escherichia coli were also assessed.

Findings: P.aeruginosa biofilm had OD=1.688 at wave length 492 nanometer. Pure phage suspension and the serial diluted 10-2 and 10-3 of the suspension had ODs 1.587, 1.341 and 1.461, respectively. Isolated phage dramatically declined the ODs of the biofilms of all bacteria strains.

Discussion & Conclusion: Phages have various affinities to attach to hosts; thereby it is supposed that the phages compete for their receptors. Also, it is assumed that phages have most efficiency in optimum concentration to remove biofilm or inhibit the growth of bacteria. Our findings demonstrated phages have significant effect on various bacteria and they could be used to remove different bacterial strains.

Key word: Bacteriophage; Pseudomonas aeruginosa; Biofilm

1. Student Research Committee, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
2. Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
3. Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran
4. Dept of Virology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
5. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
**(corresponding author)*