



باکتری سودوموناس آئروژینوزا تایپ شده



مواد و روش‌ها:

نمونه گیری از منابع مختلف شامل فاضلاب بیمارستانی، رودخانه و خاک انجام گردید و نمونه ها با سویه های تلیپ شده توسط **PFGE(Pulse field gel electrophoresis)** سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم های سوختگی مجاور شدند و در نهایت جداسازی فازها پس از چندین مرحله نمونه گیری انجام گردید. تعیین خصوصیات فازها و انتخاب فازها با کارایی بالاتر با بررسی کراس هاست با بگاری متد **Efficiency of Plating(EOP)**، انجام شد و سپس برست سایز و کراس هاست فازهای منتخب بروی باکتری های بجز باکتری سودوموناس آئروژینوزا بر اساس متد **EOP** و بررسی ویژگی های مورفولوژیک فازهای منتخب توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی گذاره و پایداری فازهای منتخب ایزوله شده در دما و **PH** مختلف انجام گردید.

در مرحله بعد پایداری فازهایی که در مراحل قبل کارایی بهتری داشتند در پمادهای سوختگی مورد بررسی قرار گرفت و سپس بمنظور استخراج **DNA** در نهایت سکانسینگ توسط روش **Illumina Miseq PE250** فازهای منتخب به دانشگاه مک گیل کانادا ارسال گردید. در مرحله آخر اثر کشندگی هر فاز (۶ خاک، ۴۵ خاک، ۳۲ فاضلاب) بصورت تکی با **MOI(Multiplicity of infection)** مختلف و چندتایی و ترکیب فاز و آنتی بیوتیک بر سودوموناس آئروژینوزا بر اساس متد منحنی **Time-Kill** مورد ارزیابی قرار گرفت و تعداد باکتری ها شمارش و تعیین **CFU(Colony forming unite)** گردید.

مقدمه: سودوموناس بعنوان یک پاتوژن فرصت طلب از متنوع ترین جنس های شناخته شده است. بیماران با ضعف سیستم ایمنی و بیمارانی که تحت درمانهای سرکوب ایمنی هستند مانند بیماران مبتلا به فیبروز کیستیک، زخم های سوختگی، ایدز و سرطان فراوانترین گروههایی هستند که بوسیله این ارگانیسم آلوده می شوند. سودوموناس آئروژینوزا، خصوصا در کشورهای در حال توسعه، یکی از مهمترین و رایج ترین علل عفونت وخیم در بیماران سوختگی می باشد.

متاسفانه بدلیل مقاومت گسترده سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک های مختلف، درمان عفونت ناشی از این باکتری در بیماران سوختگی بسیار سخت است و منجر به افزایش میزان مرگ و میر در این بیماران می شود. فازترایی یا فازدرمانی بعنوان یک جایگزین مناسب جهت کنترل میکروبی توجه زیادی را به خود معطوف کرده است. در این روش درمانی از باکتریوفازها(فازها) که در واقع ویروس های باکتریایی غیربیماری زا هستند، برای درمان استفاده می شود.

هدف ما از این مطالعه جداسازی فازهای لیبتیک علیه سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از زخم سوختگی، بررسی کراس هاست، خصوصیات مورفولوژی فازها و بررسی اثر فازهای ایزوله شده بتنهایی، ترکیب دوفاز، ترکیب فازها- آنتی بیوتیک ها روی کاهش غلظت سویه هدف سودوموناس آئروژینوزا بوده است.

هجده فاز لیتیک پس از حداقل چهار بار نمونه گیری از هر منبع ایزوله گردید. پس از انجام کراس هاست و بررسی نتایج حاصل و مقایسه آنها ۶ فاز از ۱۸ فاز بعنوان فازهای با اثربخشی بیشتر انتخاب شدند که قابلیت آلوده کردن طیف گسترده ای از باکتری های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به چند دارو را داشتند. در مرحله بعدی تفاوت میان فازهای منتخب از نظر ویژگی های برست ساینز و دوره انکوباسیون مشخص گردید، و از مطالعه ی فازهای منتخب یافتیم که در طیف دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد و PH خنثی بیشترین پایداری را دارند، برای بررسی مورفولوژیک شش فاز منتخب تحت تصویربرداری با TEM در آزمایشگاه رستاک قرار گرفتند و نتایج حاصل نشان دادند که فازها متعلق به خانواده مایوپویریدائه هستند.

بررسی پایداری سه فاز از شش فاز منتخب در دو پماد سیلورسولفادیازین ۱٪ و نیتروفورازون پس از ۲ ساعت انکوباسیون نشان داد که غلظت فازها به مقدار چشمگیری کاهش می یابد و پس از استخراج DNA(Deoxyribonucleic acid) تحت آزمایش سکانسینگ DNA قرار گرفتند که نشان داد سه فاز متفاوتند و ژنوم سه فاز در NCBI(The National Center for Biotechnology Information) ثبت گردید.

یافته ها (ادامه...): با توجه به اینکه هدف نهایی ما یافتن یک ترکیب با اثربخشی بالا بود. طی انجام آزمایشات هر کدام از فازها به صورت تکی، چندتایی و در ترکیب با آنتی بیوتیک در الگوها و مدل های مختلف و با وقفه های زمانی مختلف بررسی شدند و در نهایت با بررسی ترکیبی فازها (فاز ۶خاک، ۴۵خاک و ۳۲ فاضلاب) با **MOI:1** و آنتی بیوتیک(جنتامایسین و سیپروفلوکساسین) با غلظت یک چهارم **MIC(Minimum Inhibitory Concentration)** طبق **Time-Kill** نتایج حاصل نشان داد ترکیب دو فاز و یک آنتی بیوتیک بهترین اثربخشی را داشته، و پس از بکارگیری و آزمایش ترکیب های مختلف به این نتیجه رسیدیم که درمان برحسب نوع فاز و نوع آنتی بیوتیک بکاررفته در ترکیبی که فاز ۶ بعنوان عضو اصلی آن محسوب می شود، متفاوت است. پس از حصول نتایج اولیه از اثربخشی ترکیب مورد نظر در محدوده های زمانی کوتاه، ما به بررسی اثرات سینرژیک بین دوفاز و یک آنتی بیوتیک علیه سودوموناس آئروژینوزا سویه ۱۴ طی زمان طولانی تر ۴۸ ساعته پرداختیم. در نهایت تمام نتایج درمانی نشان دادند که میتوانند بطور چشمگیری غلظت باکتری هدف را بیش از یک لگاریتم کاهش دهند. بیشترین اثر زمانی مشاهده شد که فاز ۶ و ۴۵ در ترکیب با جنتامایسین بکاربرده شد و در نهایت پس از ۱۲ ساعت منجر به کاهش ۳ لگاریتمی در غلظت باکتری سودوموناس آئروژینوزا گردید.

نتیجه گیری: نمونه فاضلاب نسبت به نمونه رودخانه و خاک حاوی فازهای کارآمد بیشتری است که می توانند در درمان عفونت های مقاوم به آنتی بیوتیک سودوموناس آئروژینوزا مورد استفاده قرار بگیرند. در مطالعه حاضر در بررسی ترکیب فاز و آنتی بیوتیک، بیشترین میزان کشندگی را زمانی داشتیم که ترکیب دو فاز و یک آنتی بیوتیک بطور همزمان علیه سودوموناس آئروژینوزا مورد استفاده قرار گرفتند. می توان با بکارگیری فازها در ترکیب با آنتی بیوتیک با دوز کمتر می توان جمعیت باکتریایی را کنترل نمود و در بسیاری موارد حتی آن را کاهش داد و این موضوع در عصر مقاومت آنتی بیوتیکی می تواند بسیار نوید دهنده باشد.



دانشگاه علوم پزشکی همدان مرکز تحقیقات بیماری های عفونی



**ایزولاسیون، تعیین مشخصات فنوتیپی و ژنوتیپی
فازهای لیتیک سویه های سودوموناس آئروژینوزا
مقاوم به چند دارو ایزوله شده از زخم سوختگی و
بررسی پایداری فازهای ایزوله شده در کرم
نیتروفورازون و سیلورسولفادیازین ۱٪**

مجریان طرح:

دکتر محمد یوسف علیخانی
استاد باکتری شناسی پزشکی

دکتر علی مجتهدی
استاد باکتری شناسی پزشکی