Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:48 IRST on Saturday September 26th 2020

مجله دانشکده پزشکی تهران

شماره سوم و چهارم ــ آذر، دی ــ ۲۵۳۶ ــ صفحه ۸۳

بررسی باکتریوفاژها و روش جداکردن آنها

دکتر مسعود کیهانی×

باکتریوفاژها یا ویروس باکتری‌ها Bacerial viruses اجرامی هستند که در داخل باکتری زنده رشد و تولید مثل میکنند. هر باکتری دارای باکتریوفاژ اختصاصی میباشد که بوسیلهٔ آن حل میشود. برای مثال میکرب بروسلا دارای یک باکتریوفاژ بنام Brucella phage, type abortus strain 3 است که فقط سویه‌های بروسلا آبورتوس را حل میکند و در روی سویه‌های بروسلا Br. suis و Br. melitensis اثری ندارد. تاکنون برای بروسلا ملی تنسیس و یا بروسلا سوئیس باکتریوفاژ اختصاصی شناخته نشده است (۴ و ۱۴).

از این خاصیت اختصاصی بودن باکتریوفاژ بروسلا استفاده کرده و برای تشخیص افتراقی انواع بروسلا بکار میبرند. چنانکه سویه بروسلا بوسیله باکتریوفاژ بروسلا حل شود بروسلا آبورتوس و اگر حل نشود بروسلا ملی تنسیس و یا بروسلا سوئیس میباشد. این روش تشخیص افتراقی بروسلاها از روشهای بیوشیمیائی و سرولوژیکی دقیق‌تر و مطمئن‌تر است و آنرا Bacteriophage typing مینامند (۱، ۲، ۹).

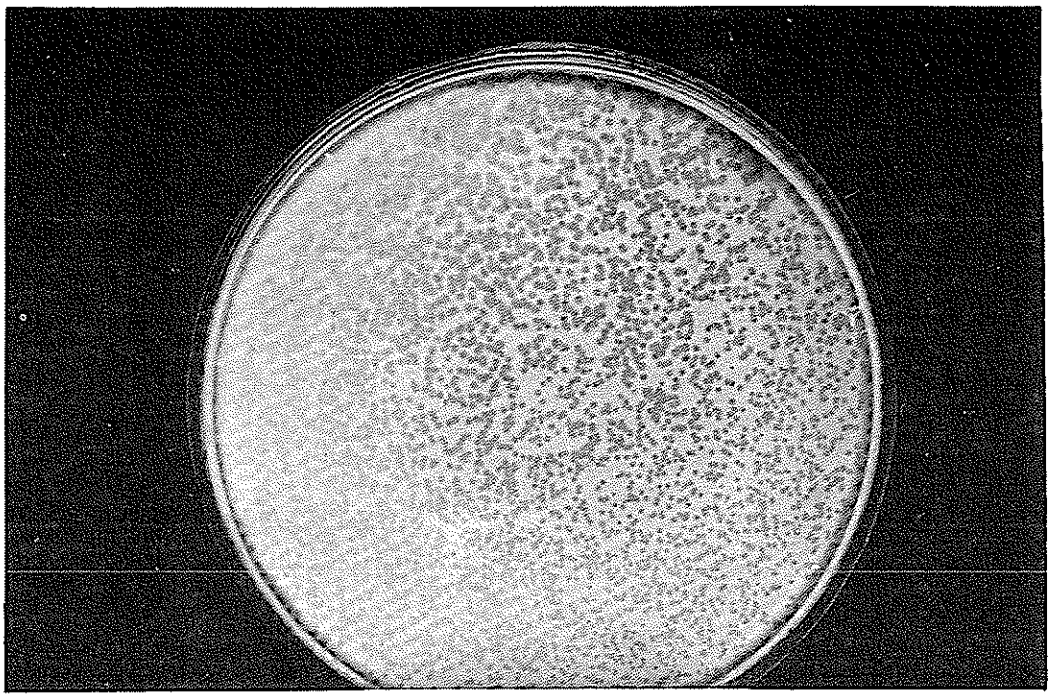
باکتریوفاژ بروسلا آبورتوس بوسیله نگارنده درآزمایشگاه میکروبشناسی تهیه گردید. مورفولوژی و اثر آن در روی انواع بروسلا در اشکال ۱، ۲ مشاهده میگردد.

میکرب سل دارای باکتریوفاژی است بنام Mycobacteriophage که برای تشخیص انواع میکرب سل بخصوص سل نوع مرغی M. tuberculosis, avian strain بکار میرود. همچنین میکرب دیفتری دارای باکتریوفاژ بنام Corynebacteriohage است که برای تشخیص این باکتری بکار میرود. میکرب‌های دیگر نیز دارای باکتریوفاژ هستند که از همه مهمتر سالمونلاها میباشند که برای تشخیص انواع سالمونلا بخصوص سالمونلا تیفی موریوم S. typhimurium و S. enteritidis از باکتریوفاژ استفاده می‌نمایند (۱، ۴، ۶).

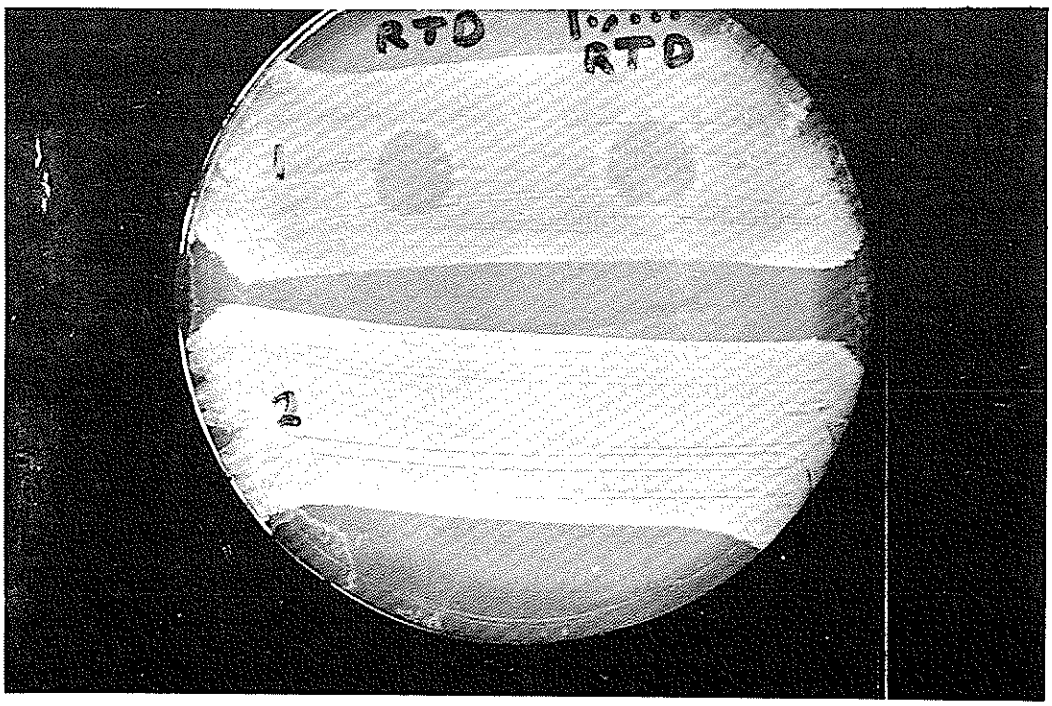
بعضی از باکتریها دارای تعداد زیادی باکتریوفاژ میباشند. برای مثال میکرب استافیلوکوک طلائی Staphylococcus aureus دارای بیش از ۲۰ باکتریوفاژ است. بدین ترتیب بوسیله این باکتریوفاژها نه‌تنها میکرب استافیلوکوک را میتوان تشخیص داد بلکه تیپ‌های مختلف آنرا نیز میتوان مشخص نمود. از اختصاصی بودن باکتریوفاژهای استافیلوکوک طلائی برای تعیین تیپ‌های این باکتری در مطالعات اپیدمیولوژیکی استفاده میکنند و با Staphylococcal phage typing کانون آلودگی استافیلوکوکی را

× دانشیار دانشکده دامپزشکی ــ دانشگاه تهران

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:48 IRST on Saturday September 26th 2020



شکل ۱ ــ مورفولوژی پلاکهای باکتریوفاژ بروسلا آبورتوس



شکل ۲ ــ اثر باکتریوفاژ بروسلا در رقتهای RTD 10,000 RTD, در روی بروسلا آبورتوس (حل شده) و بروسلا ملی تنسیس (حل نشده).

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:48 IRST on Saturday September 26th 2020

مشخص می‌نمایند (۲،۵،۶).

اثر باکتریوفاژ در روی باکتری

بطور کلی عمل باکتریوفاژ در روی باکتری ممکن است بدو صورت انجام گیرد.

۱ ــ عمل حلاله یا Lytic : در این حالت باکتریوفاژ وارد باکتری شده و آنرا لیز و یا حل میکند این دسته از باکتریوفاژها را باکتریوفاژ حلاله یا Lytic bacteriophage می‌نامند (۱).

۲ ــ عمل لیزوژنیک یا Lysogenic در این حالت باکتریوفاژ وارد باکتری شده ولی آنرا لیز و یا حل نمیکند، این دسته از باکتریوفاژها را پروفاژ Prophage می‌نامند. باکتریهای لیزوژنیک Lysogenic را میتوان بوسائل مکانیکی، شیمیائی و یا اشعه اولترا ویوله حل کرد و این روش تبدیل را ایندکشن Induction گویند (۲،۱).

شکل و ساختمان باکتریوفاژ

برای مطالعه شکل باکتریوفاژ از میکروسکوپ الکترونی استفاده می‌کنند. شکل باکتریوفاژ A_2 استافیلوکوک طلائی را بعنوان نمونه شرح میدهیم. باکتریوفاژ A_3 استافیلوکوک طلائی دارای یک سر و یک دم است. سر این باکتریوفاژ پهن بعرض ۶۰۰ A^o انگستروم و دمی بعرض ۱۲۰ A^o و بطول ۲۹۰۰ A^o انگستروم میباشد. شکل واندازه باکتریوفاژ باکتری‌های مختلف یکسان نیست.

بعضی باکتریوفاژها کوچک و برخی دیگر بزرگتر هستند. از این خاصیت میتوان برای جدا کردن باکتریوفاژها بوسیله فیلتر میلی‌پور Millipore با اندازه سوراخهای مختلف استفاده کرد (۳،۶).

از نظر ساختمان شیمیائی باکتریوفاژ A_3 استافیلوکوک طلائی از پروتئین و DNA یا Desoxyribonucleic acid ساخته شده است و چنانکه آنرا بوسیله شوک اسمزی خرد کنیم بصورت دوقسمت جدا از هم قابل مطالعه است. قسمت پوسته پروتئین ghosts و دیگری نوکلئیک اسید میباشد. بدین ترتیب میتوان DNA را از پوسته پروتئین جدا کرد (۱،۳،۷).

عفونت باکتری بوسیله باکتریوفاژ

آلودگی باکتری‌ها بوسیله باکتریوفاژ در سه مرحله انجام میشود که منجر به تولید باکتریوفاژهای جدید میگردد. این مراحل به ترتیب زیر میباشند.

۱ ــ مرحله الصاق یا Adsorption : در این مرحله باکتریوفاژهائی که دارای دم هستند بوسیله انتهای دم خود به باکتری می‌چسبند. عامل مهم در الصاق باکتریوفاژ به باکتری غلظت نمک محیط کشت است. چنانکه مقدار نمک محیط کشت مساعد Optimum نباشد باکتریوفاژ به باکتری ملصق نمی‌گردد. همچنین سرم ضد باکتریوفاژ و یا سرم آنتی باکتری میتواند از الصاق باکتریوفاژ به باکتری جلوگیری نماید. الصاق باکتریوفاژ به باکتری خیلی اختصاصی است بطوریکه کوچکترین موتاسیون Mutation در باکتری، باکتریوفاژ به باکتری ملصق نمیشود. بعضی از باکتریوفاژها برای الصاق به باکتری احتیاج به یک کوفاکتور Cofactor مانند تریپتوفان Tryptophan دارند (۷،۲).

۲ ــ مرحله کمون یا Latent period : پس از اینکه باکتریوفاژ بوسیله دم خود به باکتری ملصق شد بداخل باکتری راه پیدا میکند. در این حالت نمیتوان باکتریوفاژ را بوسائل شیمیائی و یا مکانیکی از باکتری‌ها جدا کرد. باکتریوفاژ پوسته پروتئینی را در خارج باکتری رها کرده قسمت نوکلئیک اسید DNA را بداخل باکتری تزریق میکند. باکتریوفاژ درداخل باکتری بصورت پروفاژ رشد میکند. چنانکه دوره کمون را بدقت بررسی نمائیم خواهیم دید که در ابتدای این مرحله نمیتوان باکتریوفاژ را در داخل باکتری تشخیص داد ولی در اواخر آن فازهای زیادی در مراحل ابتدائی رشد مشاهده میشوند. مدت دوره کمون برحسب نوع باکتریوفاژ و حرارت محیط کشت فرق میکند ولی بطورکلی حداقل این دوره ۵۵ دقیقه طول میکشد و بعد از ۹۹ دقیقه باکتریها حل شده و از هر باکتری بطور متوسط یکصد باکتریوفاژ آزاد میشود. میتوان مرحله کمون را با سرد کردن محیط کشت متوقف ساخت (۸،۲).

۳ ــ مرحله آزاد شدن یا Release of phage : در انتهای دوره کمون باکتریوفاژها آزاد میشوند. میتوان با سرد کردن محیط کشت از آزاد شدن باکتریوفاژها جلوگیری کرد ولی مواد شیمیائی نمی‌توانند از آزاد شدن باکتریوفاژها جلوگیری نمایند. میتوان مدت دوره کمون را با وسائل مکانیکی

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:48 IRST on Saturday September 26th 2020

مانند Sonic vibration کوتاه نمود، در نتیجه باکتری‌ها زودتر حل شده و باکتریوفاژها آزاد میشوند. باکتریوفاژهای آزاد شده دومرتبه به باکتریهای دیگر ملصق شده و عمل عفونت باکتری بوسیله باکتریوفاژ از نو آغاز میگردد (۴،۳،۲).

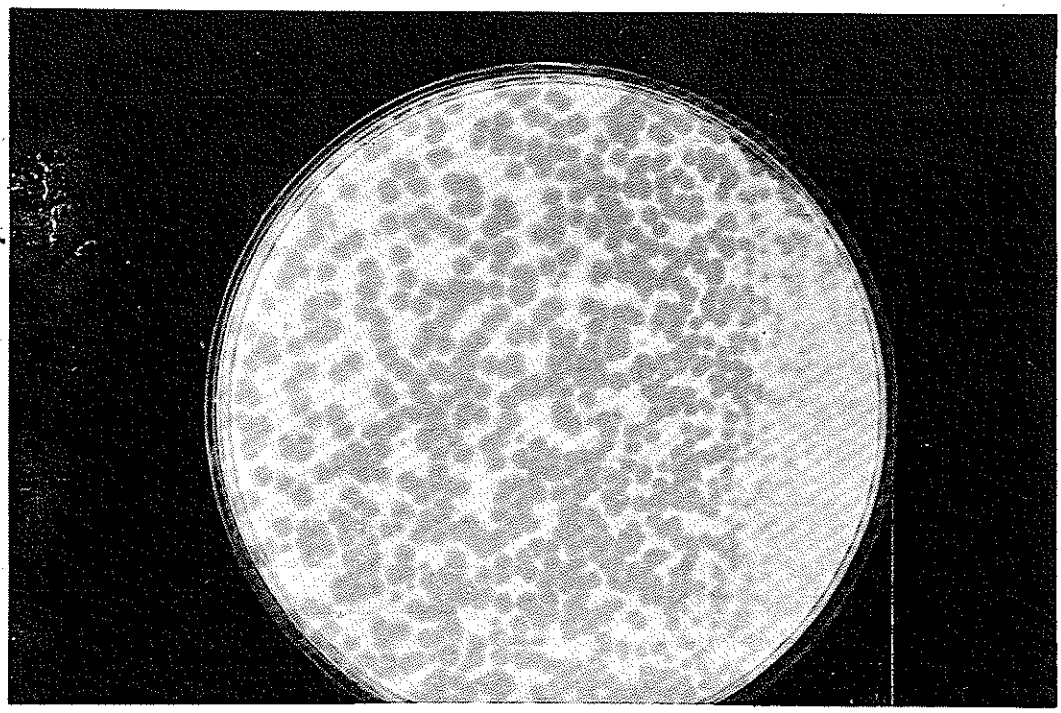
کشت باکتریوفاژ

باکتریوفاژها را میتوان بدو روش کشت و مقدار آنها را افزایش داد.

۱ ــ کشت باکتریوفاژ در محیط مایع: برای این منظور به محلول آبگوشت Tryptocase soy broth مقدار متناسب باکتریوفاژ و کشت ۲۴ ساعته باکتری مربوط Propagating strain اضافه می‌نمایند.

محیط کشت آبگوشت TSB که حاوی باکتریوفاژو باکتری استاندارد میباشد در روی دستگاه تکان دهنده Automatic shaker در حرارت ۳۷ درجه قرار میدهند. بدین ترتیب مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت باکتریوفاژ را در حالت تکان کشت میگردد. وقتی باکتریوفاژ بخوبی رشد کرد، محلول آبگوشت TSB صاف و روشن میشود که نشانه آنستکه باکتریها بخوبی حل شده‌اند. محلول باکتریوفاژ را بمدت نیمساعت سانتریفوژ نموده و اجساد میکربی را جدا میکنند. محلول روئی Supernatant را از چند صافی کاغذی و سپس از صافی میلی‌پور Millipore که اندازه سوراخهای آن ۰/۴۵ میکرون است عبور میدهند. محلول بدست آمده باکتریوفاژ استریل و آماده تیتراسیون میباشد.

۲ ــ کشت باکتریوفاژ بروش آگار دو لایه‌ای Double agar layer: برای این منظور مقدار متناسب باکتریوفاژ و باکتری مربوط Propagating strain را به ۲/۵ سانتیمترمکعب محلول آگار غذائی نیمه جامد در حرارت ۴۵ درجه اضافه و قبل از سرد شدن به سطح آگار Tryptocase soy agar قوطی‌های پتری اضافه می‌نمایند. پس از جامد شدن آگار روئی، قوطی‌های پتری را بمدت ۴۸ ساعت در حرارت ۳۷ درجه قرار میدهند. بدین ترتیب باکتریوفاژ در آگار روئی رشد و بصورت پلاک‌هائی ظاهر میگردد (۱، ۱۲، ۱۷) (شکل ۳).



شکل ۳ ــ کشت باکتریوفاژ سالمونلا آبورتوس اوویس بروش آگار دولایه‌ای

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:48 IRST on Saturday September 26th 2020

جهت برداشت کشت باکتریوفاژ در آگار روئی، به سطح محیط آبگوشت TSB اضافه نموده و بوسیله پیپت پاستور ژلز سطحی را در آبگوشت برداشت میکنند. در مواردی که ژلز روئی کاملا در آبگوشت حل نشود میتوان از یک هاونگ استریل استفاده نمود و ژلز را در آبگوشت بخوبی مخلوط کرد. محلول باکتریوفاژ را که بروش بالا تهیه میگردد مدت ۴۸ ساعت در حرارت ۴ درجه یخچال قرار داده، سپس از چند صافی کاغذی و بالاخره از فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرون عبورمیدهند. بدین‌ترتیب باکتریوفاژی تهیه میگردد که آماده برای تیتراسیون میباشد (۱،۲،۱۰).

تیتراسیون باکتریوفاژ

برای تعیین عیار یا تیتر باکتریوفاژ، رقتهای مختلف از 10^{-1} تا 10^{-9} در آبگوشت TSB تهیه می‌نمایند. باکتری استاندارد Propagating strain را در سطح آگار غذائی قوطیهای پتری TSA با یک سوآب استریل کشت میدهند. پس از ده دقیقه از رقتهای مختلف باکتریوفاژ بوسیله یک پیپت پاستور یک قطره از هر رقت در روی سطح کشت میکرب در محلهای مشخص قرار میدهند. قوطیهای پتری را در حرارت ۳۷ درجه بمدت ۴۸ ساعت قرار داده و سپس نتیجه آزمایش را مطالعه می‌نمایند. بدین ترتیب رقت RTD یا Routine test dilution مشخص میگردد. RTD عبارتست از رقیق‌ترین محلول باکتریوفاژ که باکتری استاندارد را کاملا حل Confluent lysis می‌نماید. رقت ده ــ هزار RTD عبارتست از رقتی برابر ده‌هزار برابر رقت RTD است. برای مثال اگر رقت RTD برابر 10^{-7} باشد. رقت ده ــ هزار RTD برابر 10^{-3} میباشد. دو رقت RTD و ده‌هزار RTD را برای تعیین نوع باکتری بوسیله باکتریوفاژ یا Phage typing بکار میبرند (۱،۲،۱۶).

موارد استعمال باکتریوفاژ در علم پزشکی

۱ ــ از باکتریوفاژها در مطالعات اپیدمیولوژیکی استفاده می‌کنند. برای مثال گاهی در بعضی از بیمارستان‌ها عفونت استافیلوکوکی در اثر استافیلوکوک طلائی مشاهده میشود که آنرا Hospital infection می‌نامند. این سویه‌های استافیلوکوک نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده خیلی مقاوم هستند و باعث مرگ و میر بیماران در بیمارستان میگردند. برای تعیین کانون میکرب استافیلوکوک که در بیمارستان شایع شده است از روش Staphylococcal phage typing استفاده میکنند. بدین ترتیب نمونه‌هائی از محل‌های مختلف بیمارستان مانند زمین، لباس و تمام وسائل بیمارستان تهیه و کشت میدهند. در اکثر موارد از بینی و گلوی کارکنان بیمارستان نمونه‌ای تهیه و برای جدا ــ کردن استافیلوکوک طلائی کشت میدهند.

بدین ترتیب کانون آلودگی استافیلوکوک طلائی را با روش Phage typing مشخص میکنند. همچنین در مسمومیت‌های غذائی در اثر استافیلوکوک از روش فوق استفاده کرده و کانون عفونت و انتشار میکرب استافیلوکوک را با phage typing مشخص و آنرا از بین می‌برند (۱، ۶، ۹).

۲ ــ از باکتریوفاژها برای درمان بیماری‌های میکربی استفاده شده است. البته این روش درمان هنوز بصورت تجربی بکار میرود. برای مثال در مورد بیماری بروسلوز در اثر بروسلا آبورتوس بطور تجربی از باکتریوفاژ بروسلا استفاده شده است. همچنین در عفونت‌های استافیلوکوکی در اثر استافیلوکوک طلائی، باکتریوفاژ استافیلوکوک بطور تجربی برای درمان بکار برده شده ولی نتایج بدست آمده بوسیله دانشمندان هنوز کاملا روشن نیست. برای درمان عفونت استافیلوکوکی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاوم هستند، ابتدا حساسیت استافیلوکوک طلائی را نسبت به باکتریوفاژها مشخص نموده. سپس باکتریوفاژی که سویه استافیلوکوک طلائی را حل میکند بطور غلیظ به بیمار برای درمان میدهند (۱،۳،۴،۱۶).

در بیماری تورم روده خوک Enteritis که در اثر عفونت کلی باسیل E-Coli ایجاد شده نیز از باکتریوفاژ E-Coli برای درمان استفاده شده است و این روش درمان در آمریکا در بعضی از موارد انجام میگردد. بطورکلی معالجه بوسیله باکتریوفاژها هنوز در مرحله تحقیقی است و به مرحله استفاده روزمره بعنوان درمان درنیامده است.

۳ ــ از باکتریوفاژها برای تعیین نوع باکتریها استفاده میکنند و این عمل را Phage typing می‌نامند.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:48 IRST on Saturday September 26th 2020

برای تعیین نوع باکتری بوسیله باکتریوفاژ از دو روش میتوان استفاده کرد.

الف ــ روش آگار یک لایه‌ای Single agar layer

: در این روش برای تشخیص نوع باکتری از کشت ۲۴ ساعته بوسیله یک سوآب استریل در سطح آگار قوطی پتری TSA کشت میدهند. قوطیهای پتری را در اتو ۳۷ درجه بمدت ۱۰ دقیقه میگذارند تا کشت باکتری خشک شود. سپس بوسیله پیپت پاستور استریل یک قطره از محلول باکتریوفاژ در رقت RTD و ده‌هزار RTD در سطح کشت باکتری قرار میدهند. بعد از ۲۴ ساعت کشت در حرارت ۳۷ درجه نتیجه آزمایش را مطالعه میکنند. چنانکه باکتری بوسیله باکتریوفاژ حل شده باشد، نوع باکتری بوسیله باکتریوفاژ مشخص میگردد.

ب ــ روش دیگر برای تعیین نوع باکتری بوسیله باکتریوفاژ روش آگار دو لایه‌ای Double agar layer میباشد. در این روش مقدار متناسب باکتریوفاژ و کشت ۲۴ ساعته باکتری مورد آزمایش را به ۲/۵ سانتیمتر مکعب محلول نیمه جامد ژلز غذائی در حرارت ۴۵ درجه اضافه می‌نمایند. سپس این آگار نیمه جامد را در سطح آگار محیط TSA قوطیهای پتری می‌ریزند. پس از منجمد شدن ژلز، آنرا بمدت ۴۸ ساعت در حرارت ۳۷ درجه قرار میدهند و نتیجه را بررسی میکنند. چنانکه باکتری مورد آزمایش بوسیله باکتریوفاژ حل شده باشد پلاکهای باکتریوفاژ مشاهده میگردد. در عمل روش آگار دو لایه‌ای خیلی دقیق‌تر از آگار یک لایه‌ای در تشخیص نوع باکتری میباشد ولی روش آگار یک لایه‌ای خیلی ساده‌تر میباشد (۱،۲،۱۴،۱۶).

۴ ــ سرم ضد باکتریوفاژ Anti bacteriophage serum

در جدا کردن برخی از باکتریها مانند میکرب بروسلا مفید است. تجربیات در روی اثر سرم ضد باکتریوفاژ نشان میدهد که اگر به محیط کشت سرم ضد باکتریوفاژ بروسلا اضافه نمایند در مواردیکه میکرب بروسلا حامل باکتریوفاژ باشد به جدا کردن میکرب بروسلا کمک می‌نماید.

در این موارد میکرب بروسلا بوسیله باکتریوفاژ خود حل میشود و از جدا شدن آن در محیط کشت جلوگیری میگردد. با اضافه کردن سرم ضد باکتریوفاژ به محیط کشت، سرم ضد باکتریوفاژ بروسلا، باکتریوفاژ را خنثی نموده و در نتیجه میکرب بروسلا بآسانی در محیط رشد می‌نماید. آزمایشاتیکه بوسیله نگارنده انجام شده اثر سرم ضد باکتریوفاژ بخوبی نشان داده شده است (۱،۳،۱۱) (شکل ۴).

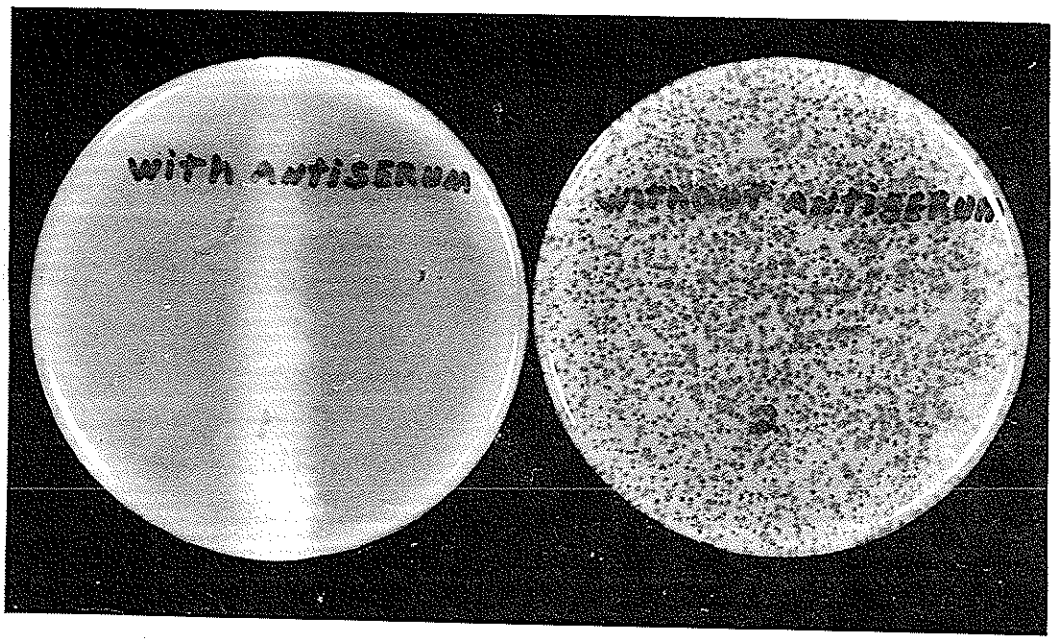
۵ ــ تولید انترفرون Interferon بوسیله باکتریوفاژ: انترفرون عبارت است از یک پادتن غیر اختصاصی Non-specific antibody که با تزریق بعضی از ویروسها و حتی مواد شیمیائی مانند Statolon در محیط کشت سلولی و یا در حیوان زنده ایجاد میگردد. تولید انترفرون با تزریق بعضی از ویروسها در کشت سلول In vitro و در حیوان زنده In vitro مطالعه و مشخص شده است. ولی تولید انترفرون با تزریق باکتریوفاژها در مراحل ابتدائی تجربیات بوده و هنوز روشن نگردیده. تولید انترفرون بوسیله باکتریوفاژ کلی باسیل گزارش شده است. در آزمایشاتی که بوسیله نگارنده انجام شده مشخص گردیده که چنانکه به جوجه‌های ۲ ــ ۳ روزه که فاقد پادتن نسبت به ویروس نیوکاسل یا Hemagglutination inhibition titer (HI) میباشند، باکتریوفاژ بروسلا خورانده و سپس تزریق گردند، این جوجه‌ها در مقابل سوش حاد نیوکاسل مقاوم میگردند. به نظر میرسد که این مقاومت نسبت به نیوکاسل حاد در اثر تولید انترفرون ایجاد میگردد. بدین ترتیب ممکن است در آتیه با تحقیقات بیشتری از باکتریوفاژها مانند بعضی از ویروسهای دیگر برای تولید انترفرون استفاده کرد (۱۵،۱۶).

روش جدا کردن باکتریوفاژها

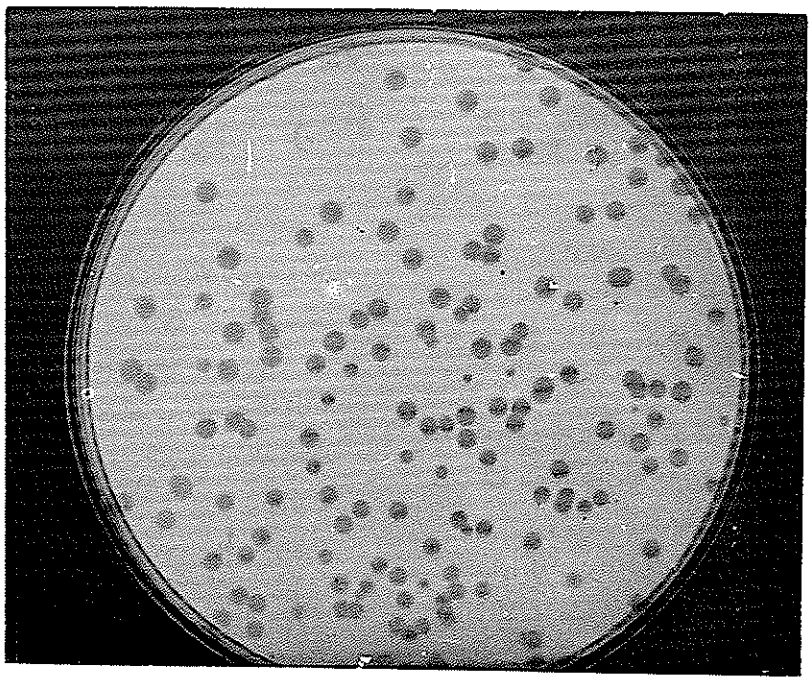
برای جدا کردن باکتریوفاژ هر باکتری باید محل طبیعی رشد آن باکتری را بررسی نمود. برای مثال برای جدا کردن باکتریوفاژ کلی باسیل E-Coli باید در فاضلاب و مدفوع به جستجوی آن پرداخت و یا برای جدا کردن باکتریوفاژهای باکتریهای روده‌ای Enteric bacteria باید در محتویات روده و مدفوع آنها را جستجو کرد. بدین ترتیب هرجا باکتری وجود ندارد باکتریوفاژ نیز وجود نخواهد داشت.

در جدا کردن باکتریوفاژها باید بخاطر داشت که جدا کردن باکتریوفاژهای شناخته شده اهمیت چندانی ندارد زیرا

علاوه بر صرف وقت یک آزمایشگاه بتنهائی نمیتواند باکتریوفاژ تمام میکربها را جدا و نگاهداری نماید. از این نظر برای نگاهداری باکتریوفاژها مراکزی هست که آزمایشگاهها برای تشخیص و تحقیق باکتریوفاژ لازم خود را از آنها دریافت



شکل ۴ ــ تیتراسیون سرم ضد باکتریوفاژ بروسلا، رقت ۱۰۱۰۰۰
سرم ضد باکتریوفاژ صددرصد باکتریوفاژ بروسلا را درمدت ۱۰ دقیقه خنثی می‌نماید.



شکل ۵ ــ باکتریوفاژ سالمونلا S. abortus ovis این باکتریوفاژ از سویه این میکرب بروشی که شرح داده شد جدا گردید.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:48 IRST on Saturday September 26th 2020

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:48 IRST on Saturday September 26th 2020

میکنند . البته جدا کردن باکتریوفاژ جدیدکه تاکنون شناخته نشده است خیلی اهمیت دارد . در اینجا طرز جدا کردن باکتریوفاژ سالمونلا که آبورتوس اوویس Salmonella abortus ovis را که نگارنده در موسسه سرم و واکسن‌سازی رازی جدا کرده است (۱۳) برای مثال شرح میدهیم .

جدا کردن باکتریوفاژ سالمونلا آبورتوس اوویس S. abortus ovis : سویه سالمونلا را در پنج لوله محیط Tryple sugar iron agar (TSI) بمدت ۴۸ ساعت در حرارت ۳۷ درجه کشت داده سپس لوله‌های کشت را در حرارت اطاق آزمایشگاه نگهداری و کشت میکربی روزانه مورد بررسی قرار گرفت . بعد از ۶ روز قرار گرفتن در حرارت آزمایشگاه تغییراتی در سطح کشت ملاحظه شد ، بطوریکه باکتریها در برخی قسمتهای کشت ناپدید شده بودند . در هر لوله کشت ۱۰ سانتیمتر مکعب محلول آبگوشت (TSB) Trypticase soy broth ریخته و بمدت ۵ روز در حرارت ۳۷°C درجه گذاشته سپس با یک پیپت بروش استریل تمام محیط کشت و محلول آبگوشت را در ظرفی خالی و تکه‌های آگار را در محلول کاملا له می‌نمائیم . محلول بدست آمده را بمدت ۴۸ ساعت در یخچال ۴ درجه قرار میدهیم و پس از گذراندن از چند فیلتر مقدماتی از فیلتر میلی‌پور Millipore با اندازه ۰/۴۵ میکرون عبور میدهند . بدین ترتیب یک محلول استریل بدست میآید (۱، ۲، ۱۳، ۱۸) .

تقویت باکتریوفاژ جدا شده

باکتریوفاژی که بروش ذکرشده تهیه میشود خیلی ضعیف و دارای عیاری برابر با 10^{-2} میباشد . بطوریکه با روش آگار یک لایه‌ای Single agar layer قابل مشاهده نیست ولی با روش آگار دولایه‌ای Double agar layer بصورت پلاکهای مجزا مشاهده میشود . برای تقویت و زیاد کردن قدرت حل Lysis و تعیین تیتر باکتریوفاژ ، عبورهای Passages متوالی در روی سویه مربوط Propagating strain سالمونلا آبورتوس انجام گردید . بدین ترتیب باکتریوفاژی با عیار 10^{-9} بدست میآید .

برای جدا کردن باکتریوفاژ از باکتریهای روده‌ای مانند کلی باسیل E-Coli ، مقدار ۳۰ سانتیمترمکعب از محلول فاضل‌آب را سانتریفوژ نموده و اجرام آنرا جدا میکنند . محلول روئی یا Supernatant را از چند صافی مقدماتی گذرانده و بالاخره از فیلتر Millipore که دارای سوارخهائی باندازه ۰/۴۵ میکرون است عبور میدهیم . بدین ترتیب محلول فاضل‌آب استریل بدست میآید . یک سانتیمتر مکعب از محلول استریل فاضل‌آب و یک سانتیمتر از کشت میکرب کلی باسیل را به ۳۰ سانتیمتر مکعب از محلول آبگوشت TSB اضافه نموده وآنرا بمدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷درجه کشت میدهند . محلول کشت کلی باسیل را سانتریفوژ نموده و محلول روئی را جدا میکنند . این محلول را که ممکن است محتوی باکتریوفاژ باشد از چند فیلتر مقدماتی عبور داده و بالاخره بوسیله فیلتر میلی‌پور استریل میکنند . باکتریوفاژ را در محلول استریل بالا بروش‌های زیر جستجو می‌نمایند .

الف ــ روش Plating یا روش کشت در قوطی پتری

محلول استریل بالا را که ممکن است محتوی باکتریوفاژ باشد در آبگوشت کشت کلی باسیل برقتهای 10^{-1} تا 10^{-9} رقیق می‌کنند . یکدهم سانتیمترمکعب از هر رقت را در سطح محیط قوطیهای پتری کشت میدهند . قوطیهای پتری را بمدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه قرار داده وپس از ۲۴ ساعت نتیجه را بررسی می‌کنند . اگر در سطح کشت پلاکهائی و یا کشت باکتری بصورت قسمتهای خورده و ناپدید شده مشاهده گردد وجود باکتریوفاژ محرز میگردد .

ب ــ روش روشن شدن کشت آبگوشت .

به ۱۵ سانتیمتر مکعب آبگوشت TSB مقدار یکدهم سانتیمترمکعب محلول کشت کلی باسیل ودودهم سانتیمتر ــ مکعب محلول استریل مظنون به‌وجود باکتریوفاژ اضافه میکنند . این محلول را خوب مخلوط کرده و در حرات ۳۷ درجه قرار میدهند و تغییرات آنرا تا مدت ۲۴ ساعت در فواصل معین ازنظر کدر شدن آزمایش کرده و با لوله شاهد مقایسه می‌نمایند . چنانکه محیط کشت آبگوشت روشن و شفاف بماند و یا اینکه ابتدا کدر و سپس صاف و روشن شود وجود باکتریوفاژ در آن مسلم میگردد . برای مشاهده پلاک باکتریوفاژ باید محیط آبگوشت را بروش Plating در قوطی پتری کشت بدهیم و پلاکهای باکتریوفاژ را ملاحظه نمائیم . برای برداشت یک پلاک و تهیه یک نوع باکتریوفاژ خالص، بوسیله یک آنس، یک پلاک مجزا را برداشت نموده و در یک سانتیمتر مکعب از

محلول آبگوشت قرار داده سپس آنرا بوسیله کشت در محیط قوطی پتری افزایش و تقویت میکنند (۱۸،۱۳،۲،۱)

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 14:48 IRST on Saturday September 26th 2020

References

1. Adams, M.H.: Methods of study of bacterial viruses. In methods in medical research. Vol. II. Yearbook publishers Inc., Chicago 1950.
2. Adams, M.H.: Bacteriophages. New York. Interscience Publishers Inc. 1959.
3. Adams, M.H., and Wade E.: Classification of bacterial viruses: The relationship of two Serratia phages to Coli-dysentery phages T3, T7 and D44. J. Bacteriology., 68, 320. 1954.
4. Adams, M.H., and Wade, E.: Classification of bacterial viruses. Characteristics of the T1, D20 species of Coli dysentery phages. J. Bacteriology. 70, 253. 1955.
5. Blair, J.E., and Carr, M.: The technique and interpretation of phage typing of staphylococci. Journal of laboratory and clinical medicine., 55, 560-662. 1960.
6. Fratta, I., and Mann, P.H.: Bacteriophage typing of staphylococci isolated from various species of domestic and laboratory animals. Canadian Journal of comparative medicine and veterinary science. 2-24, 270-272. 1960.
7. Groman, N.B.: The relation of bacteriophage to the change of Corynebacterium diphtheriae from avirulence to virulence. Science, 117, 297-299. 1953a
8. Joint FAO/WHO expert Committee on Brucellosis. Wld. Hlth. Org. Tech. Rep. Ser., 67. 1953.
9. Jones, L.M.: Comparison of phage typing with standard methods of species differentiation in Brucellae. Bull. Wld. Hlth. Org. 23, 130-133. 1960
10. Jones, L.M., Merz, C. S. and Wilson, J.B.: Phage typing reaction on Brucella species. Applied Microbiology. 16, 1179-1190. 1968.
11. Keyhani, M.: The limited value of antiphage serum for bacteriological diagnosis of Brucellosis. Arch. Inst. Razi, 21 103-105. 1969.
12. Keyhani, M. and Entessar, F.: Epidemiological studeis on human Brucellosis in Iran and Identification by bacteriophage. Arch. Inst. Razi, 21, 97-101. 1969.
13. Keyhani, M.: Isolation of Salmonella abortus ovis bacteriophage and the determination of its specificity. British Veterinary Journal, 125, 568-572. 1969.
14. Keyhani, M. and Entessar, F.: Studies on bacteriophage and Metabolic identification of Brucella strains. Arch. Inst. Razi. 20, 147-151. 1968.
15. Keyhani, M.: Protection against experimental Newcastle disease in chickens given Brucella bacteriophage. The Veterinary Record. 84. 657-658. 1969.
16. Kleinschmidt, W.J., Douthart, R.J. and Murphy, E.B.: Interferon production by T4 coliphage, Nature Vol. 228, 27-29. 1970
17. Morgan, W.J.B.: The examination of Brucella cultures for lysis by phage. J. gen. Microbiol. 30, 437-443. 1960.
18. Swanstrom, M. and Adams, M.H.: Agar layer method for production of high phage stocks, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 78, 372. 1951.