

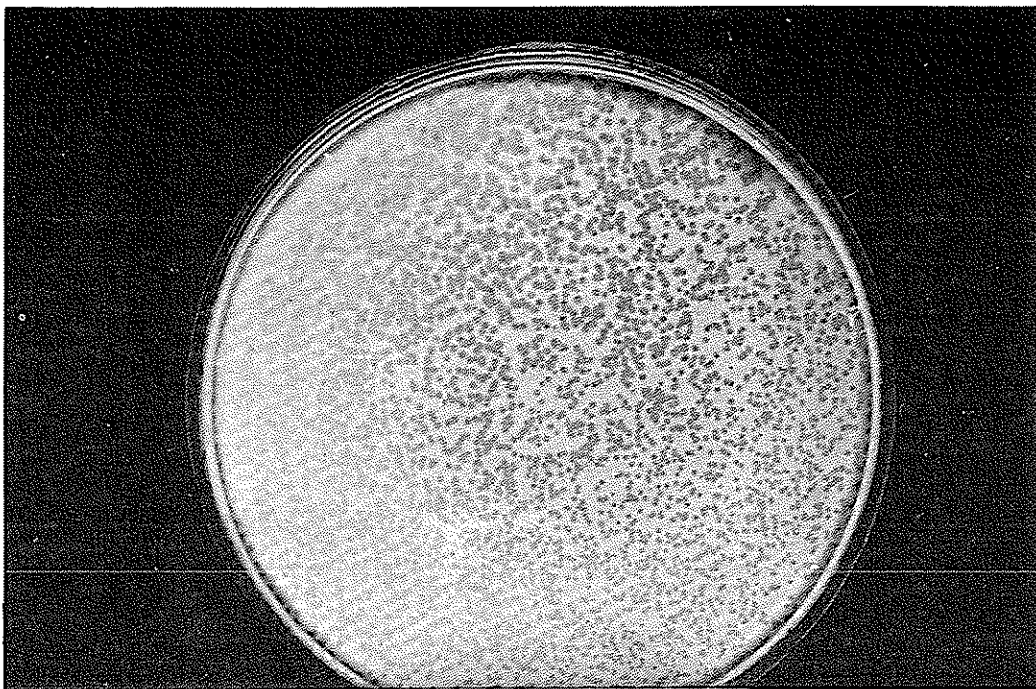
بررسی باکتریوفاژها و روش جدا کردن آنها

دکتر مسعود کیهانی*

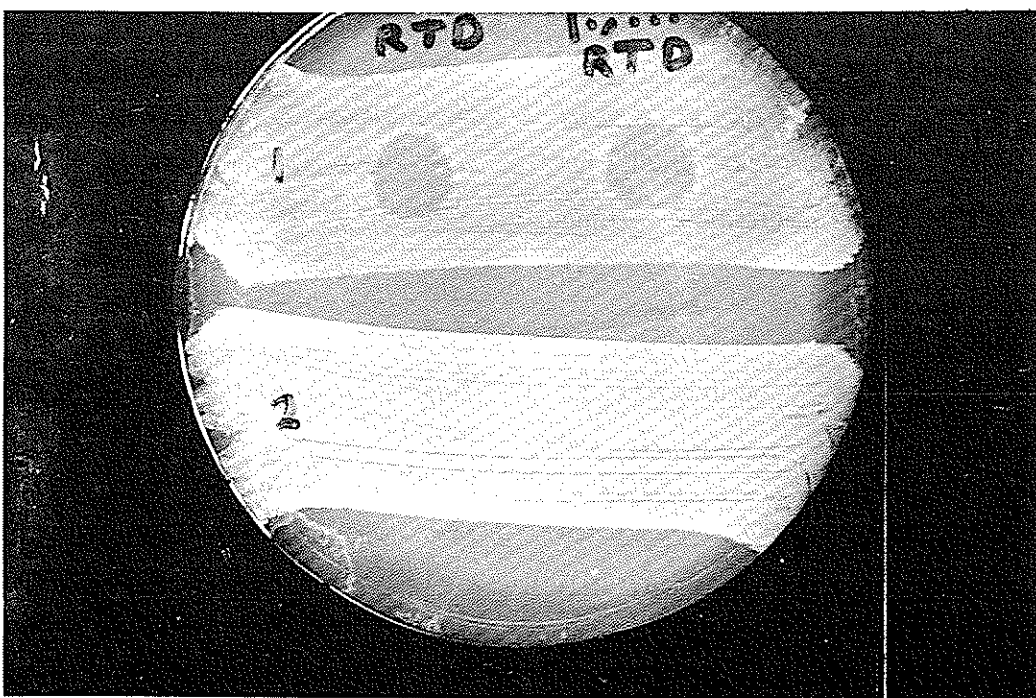
میکرب سل دارای باکتریوفاژی است بنام Mycobacterium riophage که برای تشخیص انواع میکرب سل بخصوص سل نوع مرعی M. tuberculosis, avian strain بکار میرود. همچنین میکرب دیفتری دارای باکتریوفاژ بنام Corynebacteriophage است که برای تشخیص این باکتری بکار میرود. میکرب‌های دیگر نیز دارای باکتریوفاژ هستند که از همه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

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 نه تنها 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 loco کانون آلودگی استافیلوکوکی را

باکتریوفاژها یا ویروس باکتری‌ها Bacterial viruses اجرامی هستند که در داخل باکتری زنده رشد و تولید مثل میکنند. هر باکتری دارای باکتریوفاژ اختصاصی میباشد که بوسیله 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 بیوشیمیایی و سرولوژیکی دقیق‌تر و مطمئن‌تر است و آنرا Bacteriophage typing مینامند (۱، ۲، ۹). باکتریوفاژ بروسلا آبورتوس بوسیله نگارنده در آزمایشگاه میکروشناسی تهیه گردید. مورفولوژی و اثر آن در روی انواع بروسلا در اشکال ۱، ۲ مشاهده میگردد.



شکل ۱ - مورفولوژی پلاکهای باکتریوفاز بروسلا آبورتوس



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

مشخص می نمایند (۲، ۶۰۵).

اثر باکتریوفاز در روی باکتری

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

۱ - عمل حلاله یا Lytic: در این حالت باکتریوفاز وارد باکتری شده و آنرا لیز و یا حل میکند این دسته از باکتریوفازها را باکتریوفاز حلاله یا Lytic bacteriophage می نامند (۱).

۲ - عمل لیزوژنیک یا Lysogenic: در این حالت باکتریوفاز وارد باکتری شده ولی آنرا لیز و یا حل نمیکند، این دسته از باکتریوفازها را پروفاژ Prophage می نامند. باکتریهای لیزوژنیک Lysogenic را میتوان سوسائل مکانیکی، شیمیایی و یا اشعه اولترا ویوله حل کرد و این روش تبدیل را اینداکشن Induction گویند (۱، ۲۰).

شکل و ساختمان باکتریوفاز

برای مطالعه شکل باکتریوفاز از میکروسکوپ الکترونی استفاده می کنند. شکل باکتریوفاز A2 استافیلوکوک طلائی را بعنوان نمونه شرح میدهیم. باکتریوفاز A3 استافیلوکوک طلائی دارای یک سر و یک دم است. سر این باکتریوفاز پهن عرض ۶۰۰ A و انگسترون و دمی عرض ۱۲۰ A و بطول ۲۹۰۰ A انگسترون میباشد. شکل و اندازه باکتریوفازهای مختلف یکسان نیست.

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

از نظر ساختمان شیمیایی باکتریوفاز A3 استافیلوکوک طلائی از پروتئین و DNA یا Desoxyribonucleic acid ساخته شده است و چنانکه آنرا بوسیله شوک اسمزی خرد کنیم بصورت دو قسمت 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 باکتریوفاز

آلودگی باکتریها بوسیله باکتریوفاز در سه مرحله انجام میشود که منجر به تولید باکتریوفازهای جدید میگردد. این مراحل به ترتیب زیر میباشد.

۱ - مرحله الصاق یا Adsorption: در این مرحله

باکتریوفازهایی که دارای دم هستند بوسیله انتهای دم خود به باکتری می چسبند. عامل مهم در الصاق باکتریوفاز به باکتری غلظت نمک محیط کشت است. چنانکه مقدار نمک محیط کشت مساعد Optimum نباشد باکتریوفاز به باکتری ملصق نمی گردد. همچنین سرم ضد باکتریوفاز و یا سرم آنتی باکتری میتواند از الصاق باکتریوفاز به باکتری جلوگیری نماید. الصاق باکتریوفاز به باکتری خیلی اختصاصی است بطوریکه کوچکترین موتاسیون Mutation در باکتری، باکتریوفاز به باکتری ملصق نمیشود. بعضی از باکتریوفازها برای الصاق به باکتری احتیاج به یک کوفاکتور Cofactor مانند تریپتوفان Tryptophan دارند (۲، ۷).

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

۳ - مرحله آزاد شدن یا Release of phage:

در انتهای دوره کمون باکتریوفازها آزاد میشوند. میتوان با سرد کردن محیط کشت از آزاد شدن باکتریوفازها جلوگیری کرد ولی مواد شیمیایی نمیتوانند از آزاد شدن باکتریوفازها جلوگیری نمایند. میتوان مدت دوره کمون را با وسائل مکانیکی

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 (۴۰،۳۰۲).

کشت باکتریوفاژ

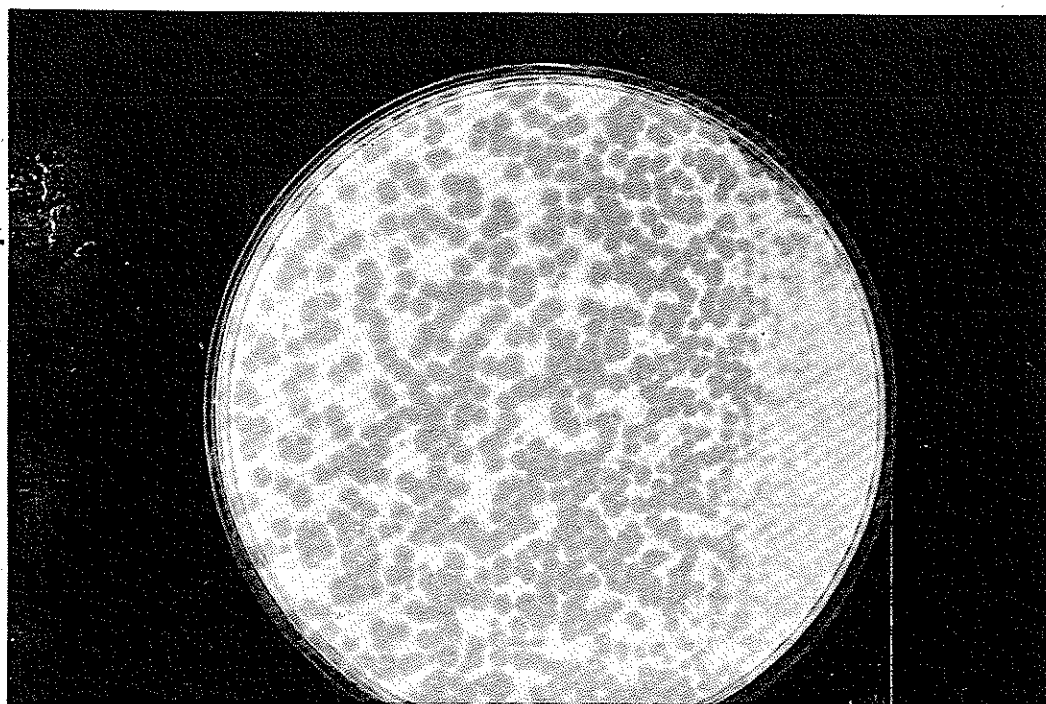
باکتریوفاژها را میتوان بدو روش کشت و مقدار آنها را افزایش داد.

۱- کشت باکتریوفاژ در محیط مایع: برای این منظور به محلول آبگوشت Tryptocase soy broth مقدار متناسب باکتریوفاژ و کشت ۲۴ ساعته باکتری مربوط

اضافه می‌نمایند. Propagating strain محیط کشت آبگوشت TSB که حاوی باکتریوفاژ و 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- 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 پلاک‌هایی ظاهر میگردد (۱). (۱۷، ۱۲) (شکل ۳).



شکل ۳- کشت باکتریوفاژ سالمونلا آبورنوس اوویس بروش آگار دولایه‌ای

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 نمونه‌هایی از محل‌های مختلف بیمارستان مانند زمین، لباس و تمام وسائل بیمارستان تهیه و کشت می‌دهند. در اکثر موارد از بینی و گلو کارکنان بیمارستان نمونه‌ای تهیه و برای جدا کردن استافیلوکوک پلائی کشت می‌دهند.

بدین ترتیب کانون آلودگی استافیلوکوک پلائی را با روش Phage typing مشخص می‌کنند. همچنین در مسمومیت‌های غذایی 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- از باکتریوفازها برای درمان بیماری‌های میکربی استفاده شده است. البته این روش درمان هنوز بصورت تجربی بکار میرود. برای مثال در مورد بیماری بروسلوز در اثر بروسلآ بورتوس بطور تجربی از باکتریوفاز بروسلآ استفاده شده است. همچنین در عفونت‌های استافیلوکوکی در اثر استافیلوکوک پلائی، باکتریوفاز استافیلوکوک بطور تجربی برای درمان بکار برده شده ولی نتایج بدست آمده بوسیله دانشمندان هنوز کاملاً روشن نیست. برای درمان عفونت استافیلوکوکی که نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف مقاوم هستند، ابتدا حساسیت استافیلوکوک پلائی را نسبت به باکتریوفازها مشخص نموده. سپس باکتریوفازی که سویه استافیلوکوک پلائی 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 باکتریوفاز E-Coli برای درمان استفاده شده است و این روش درمان در آمریکا در بعضی از موارد انجام می‌گردد. بطور کلی معالجه بوسیله باکتریوفازها هنوز در مرحله تحقیقی است و به مرحله استفاده روزمره بعنوان درمان در نیامده است.

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

جهت برداشت کشت باکتریوفاز 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 کاملاً در آبگوشت حل نشود میتوان از یک هاونگ استریل استفاده نمود و ژلز را در آبگوشت بخوبی مخلوط کرد. محلول باکتریوفاز 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 میلی پور ۰/۴۵ میکرون عبور می‌دهند. بدین ترتیب باکتریوفازی تهیه می‌گردد که آماده برای تیتراسیون میباشد (۱، ۲، ۱۰).

تیتراسیون باکتریوفاز

برای تعیین عباری تیترا باکتریوفاز، 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 باکتریوفاز 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. عبارتست از رقیق‌ترین محلول باکتریوفاز که باکتری استاندارد را کاملاً حل می‌نماید. رقت ده - هزار RTE عبارتست از رقتی برابر ده هزار برابر رقت RTD است. برای مثال اگر رقت RTD برابر 10^{-7} باشد. رقت ده - هزار RTD برابر 10^{-3} میباشد. دورقت RTD و ده هزار RTD را برای تعیین نوع باکتری بوسیله باکتریوفاز یا Phage typing بکار می‌برند (۱، ۲، ۱۶).

موارد استعمال باکتریوفاز در علم پزشکی

۱- از باکتریوفازها در مطالعات اپیدمیولوژیکی استفاده می‌کنند. برای مثال گاهی در بعضی از بیمارستان‌ها عفونت استافیلوکوکی در اثر استافیلوکوک پلائی مشاهده میشود که آنرا Hospital infection می‌نامند. این

بوسیله نگارنده انجام شده اثر سرم ضد باکتریوفاژ بخیبی نشان داده شده است (۱۱،۳،۱) (شکل ۴).

۵- 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 ۲-۳ روزه که فاقد پادتن نسبت به ویروس نیوکاسل یا Hemagglutination (HI) inhibition titer 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 آتی به تحقیقات بیشتری از باکتریوفاژها مانند بعضی از ویروسهای دیگر برای تولید انترفرون استفاده کرد (۱۶،۱۵).

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 فاضل آب 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 هر جا 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

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

الف- 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 ۳۷ درجه بمدت ۱۵ دقیقه میگذارند تا کشت باکتری خشک شود. سپس بوسیله پیپت پاستور استریل یک قطره از محلول باکتریوفاژ در رقت RTD ده هزار 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.

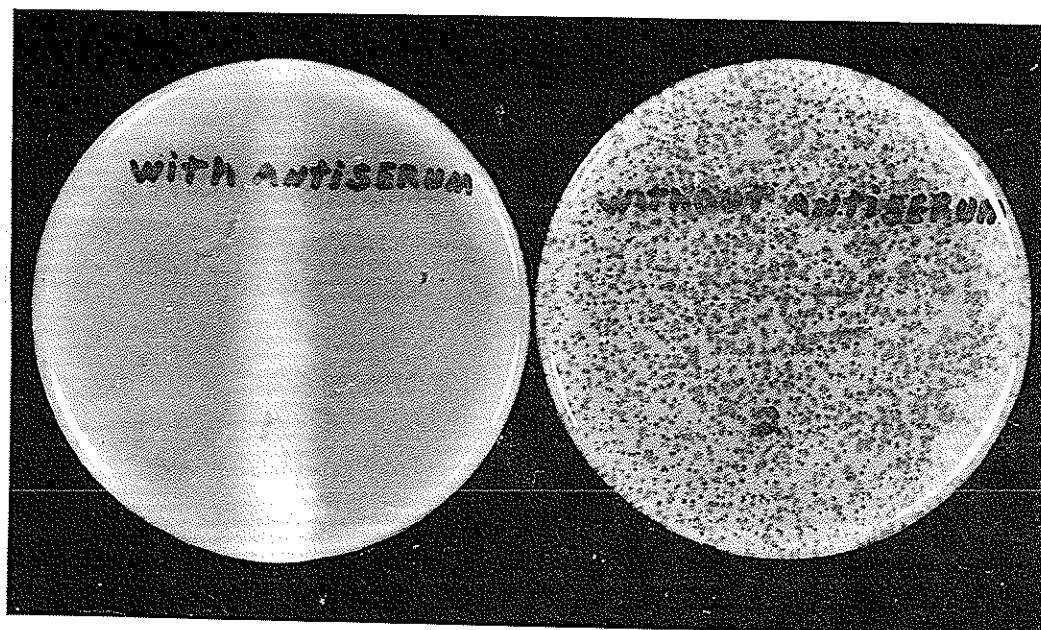
ب- روش دیگر برای تعیین نوع باکتری بوسیله باکتریوفاژ روش آگار دو لایه‌ای Double agar layer میباشد. در این روش مقدار متناسب باکتریوفاژ و کشت ۲۴ ساعته باکتری مورد آزمایش را به ۲/۵ سانتیمتر مکعب محلول نیمه جامد ژلر غذایی در حرارت ۴۵ درجه اضافه می‌نمایند. سپس این آگار نیمه جامد را در سطح آگار محیط TSA قوطیهای پتری می‌ریزند. پس از منجمد شدن ژلر، 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 (۱۶،۱۴،۲۰۱).

۴- سرم ضد باکتریوفاژ Anti bacteriophage serum

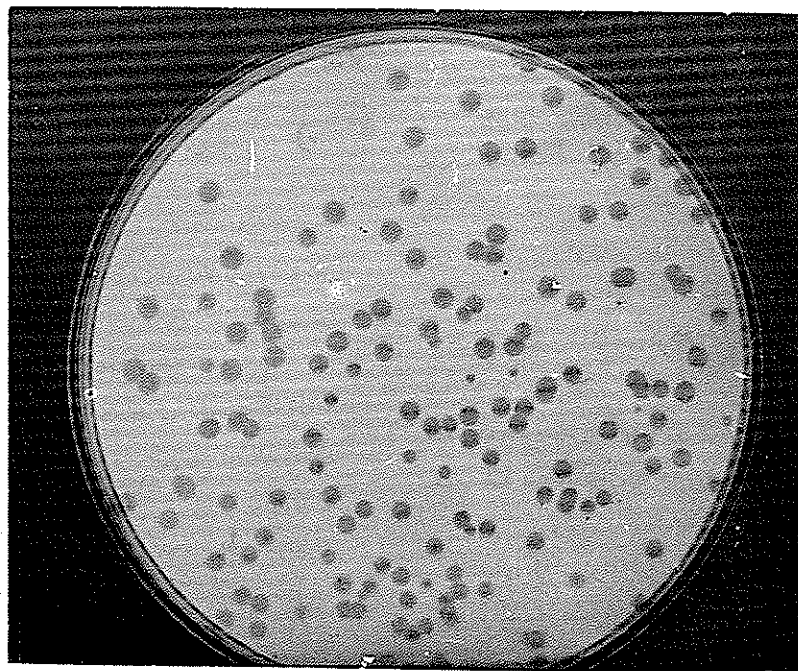
در جدا کردن برخی از باکتریها مانند میکرب بروسلا مفید است. تجربیات در روی اثر سرم ضد باکتریوفاژ نشان میدهد که اگر به محیط کشت سرم ضد باکتریوفاژ بروسلا اضافه نمایند در مواردیکه میکرب بروسلا حامل باکتریوفاژ باشد به جدا کردن میکرب بروسلا کمک می‌نماید.

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 با آسانی در محیط رشد می‌نماید. آزمایشاتی که

علاوه بر صرف وقت یک آزمایشگاه انتهائی نمیتواند
 باکتریوفاز تمام میکربها را جدا و نگهداری نماید. از این
 نظر برای نگهداری باکتریوفازها مراکزی هست که آزمایشگاهها
 برای تشخیص و تحقیق باکتریوفاز لازم خود را از آنها دریافت



شکل ۴ - تیتراسیون سرم ضد باکتریوفاز بروسلا، رقت ۱۰۱۰۰۰
 سرم ضد باکتریوفاز صد درصد باکتریوفاز بروسلا را در مدت
 ۱۰ دقیقه خنثی می نماید.



شکل ۵ - باکتریوفاز سالمونلا *S. abortus ovis* این
 باکتریوفاز از سویه این میکرب بروشی که شرح داده شد جدا
 گردید.

میکند، البته جدا کردن باکتریوفاز جدید که تاکنون شناخته نشده است خیلی اهمیت دارد. در اینجا طرز جدا کردن باکتریوفاز سالمونلا که آبورتوس اوویس *Salmonella abortus ovis* را که نگارنده در موسسه سرم و واکسن - سازی رازی جدا کرده است (۱۳) برای مثال شرح میدهیم. جدا کردن باکتریوفاز 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 اتاق 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 درجه گذاشته سپس با یک پیپت بروش استریل تمام محیط کشت و محلول آبگوشت را در ظرفی خالی و تکه‌های آگار را در محلول کاملاً 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 (۱۳، ۲۰۱، ۱۸).

تقویت باکتریوفاز جدا شده

باکتریوفازی که بروش ذکر شده 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 تیتراژ باکتریوفاز، عبورهای *Passages* متوالی در روی سویه مربوط *Propagating strain* سالمونلا آبورتوس انجام گردید. بدین ترتیب باکتریوفازی با عیار 10^{-9} بدست می‌آید. برای جدا کردن باکتریوفاز از باکتریهای روده‌ای مانند کلی باسیل *E-Coli*، مقدار ۳۰ سانتیمتر مکعب 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 سوارخهایی باندازه ۰/۴۵ میکرون است عبور میدهم. 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 و آنرا بمدت ۲۴ ساعت در حرارت ۳۷ درجه کشت میدهند. محلول کشت کلی باسیل را سانتریفوژ نموده و محلول روئی را جدا میکنند. این محلول را که ممکن است محتوی باکتریوفاز باشد از چند فیلتر مقدماتی عبور داده و بالاخره بوسیله فیلتر میلی‌پور استریل میکنند. باکتریوفاز را در محلول استریل بالا بروش‌های زیر جستجو می‌نمایند.

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

ب - روش روشن شدن کشت آبگوشت.

به ۱۵ سانتیمتر مکعب آبگوشت TSB مقدار یکدهم سانتیمتر مکعب محلول کشت کلی باسیل و دودهم سانتیمتر - مکعب محلول استریل مزنون به وجود باکتریوفاز اضافه میکنند. این محلول را خوب مخلوط کرده و در حرارت ۳۷ درجه قرار میدهند و تغییرات آنرا تا مدت ۲۴ ساعت در فواصل معین از نظر 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 باکتریوفاز در آن مسلم میگردد. برای مشاهده پلاک باکتریوفاز باید محیط آبگوشت را بروش *Plating* در قوطی پتری کشت بدهیم و پلاکهای باکتریوفاز را ملاحظه نمائیم. برای برداشت یک پلاک و تهیه یک نوع باکتریوفاز خالص، بوسیله یک آنس، یک پلاک مجزا را برداشت نموده و در یک سانتیمتر مکعب از

قویتی پتری افزایش و تقویت میکنند (۱۸۰۱۳۰۲۰۱)

محلول آبگوشت قرار داده سپس آنرا بوسیله کشت در محیط

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.