جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۲ شماره ۱ بهار ۱۳۸۷، صفحات ۳۷-۴۳

استفاده توام فاژ لیتیک و آلکالین فسفاتاز برای درمان عفونت سوختگی ناشی از اشرشیاکلی در موش آزمایشگاهی

حسن حسین زادگان *[۱] ، محسن محمدی[۱] ، ناصر پژوهی [۲]، فرزاد ابراهیم زاده [۱]

۱) گروه میکروب شناسی ، دانشکده پزشکی ،دانشگاه علوم پزشکی لرستان
۲) آزمایشگاه مرکز تحقیقات معاونت پژوهشی ، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
نویسنده رابط: حسن حسین زادگان، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات معاونت پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان
تلفکس : ۳۲۲۰۷۷۱-۰۶۶۱ همراه : ۰۹۱۶۳۶۷۸۷۶۲ asadzade_2003@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۲/۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

چکیده:

زمینه و اهداف: باکتریوفاژها به اشکال مختلف از باکتری ها به عنوان میزبان برای تکثیر و بقای خود استفاده می کنند. گروهی از آنها لیتیک هستند، که پس از تکثیر در میزبان سبب لیز باکتری ها می شوند. از این نوع برای درمان عفونت های باکتریال و فاژتایپینگ استفاده می شود. که در مقایسه با آنتی بیوتیک ها دارای مزایای درمانی زیادی هستند. در این مطالعه نیز اثرات درمانی و ضد میکروبی فاژ لیتیک جداشده از منابع طبیعی بر علیه باکتری اشرشیاکلی در عفونت سوختگی ناشی از این باکتری مورد مطالعه قرار گرفته است.

روش بررسی: باکتریوفاژهای لیتیک با استفاده از محیط کشت لوریا براث و روش Overlay از منابع محیطی جستجو و جداسازی شدند. در مرحله بعد با استفاده از میزبان باکتریایی تکثیر و پس از فیلتراسیون و رسوب پلی ساکاریدهای موجود به عنوان استوک درمانی استفاده شدند. برای درمان از نوعی مدل سوختگی موش آزمایشگاهی و عفونت القاء شده در پشت حیوان استفاده شد.

یافته ها: فاژهای لیتیک به فراوانی از مدفوع گوسفند، انسان و فاضلاب شهری جداسازی شدند. در مجموع تیتر فاژ جداشده از مدفوع گوسفند بسیار بالاتر از بقیه نمونه ها بود. نتایج آزمون مقایسه نسبت های کای-دو نشان می دهد، بین درصد بروز مرگ در گروه های مختلف اختلاف معنی داری وجود دارد.

نتیجه گیری: با توجه به آنالیز های آماری، در این مطالعه تزریق فاژهای لیتیک مانع مرگ ۸۰ درصد موش های مبتلاء به عفونت ناشی از اشرشیاکلی شد. که می تواند به عنوان ابزاری قدرتمند بر علیه عفونت های ناشی از باکتری ها از آن استفاده شود.

کلید واژه ها: باکتریوفاژ لیتیک، اشرشیا کلی، موش آزمایشگاهی، آلکالین فسفاتاز

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه:

استفاده از فاژها برای درمان عفونت های باکتریال قبل از کشف و استفاده از آنتی بیوتیک ها پیشنهاد شده است. فاژدرمانی با کشفیات باکتریولوژیست بریتانیایی به نام Ernest Hankin بر روی اثرات درمانی آب رودخانه گنگ و جومنا بر روی بیماری وبا در هند در ۱۸۹۶ کشف شد (۱). یکی از اولین مطالعات درمانی فاژها در حیوانات و بر علیه اشرشیاکلی بوده است (۲). در این مطالعه اثر درمانی فاژلیتیک علیه اشرشیاکلی موفقیت آمیز گزارش شده است. به دنبال آن از فاژها بر علیه عفونت های مقاوم درمان ناشی از *پسودوموناس آئروژینوزا* و آسینتوباکتر در موش و خوکچه هندی طراحی و با موفقیت اجراء شدند (۳،۴،۵). که به دنبال آن پیشنهاد شده از آنها در عفونت های پیوند پوست و سوختگی نیز استفاده شود، که همانطور که می دانیم باکتری های گرم منفی از قبیل *پسودوموناس آئروژینوزا* و *اشرشیاکلی* از مهمترین علل عفونی مرگ در میان بیماران دچار سوختگی و بستری در بیمارستان ها هستند. فاژدرمانی یکی از روش های کم هزینه بر علیه انواع باکتری ها و به ویژه عفونت های مقاوم درمان است. فاژها در واقع موجوداتی زنده بوده و برخلاف آنتی بیوتیک ها بسیار ارزان قیمت بوده و فاقد عوارض شناخته شده هستند، بر علیه تمامی باکتری ها قابل تولید بوده و از همه روش های شناخته شده از جمله داخل عروقی، عضلانی، خوراکی، و حتی داخل مغزی ... می توان از آنها برای درمان استفاده نمود. علاوه بر این به آسانی با هزینه ای پائین از محیط زندگی انسان قابل جداسازی و تخلیص هستند. از طرفی باکتری ها توانایی مقاومت در برابر آنها را ندارند، و یا حداقل مقاومت دارویی در برابر آنها بسیار پائین است. فاژها از نظر تاثیر بر روی باکتری ها بسیار اختصاصی هستند. به این ترتیب که فقط باکتری های بیماریزا را هدف می گیرند، و حداقل برای هر باکتری بیماریزا یک و بیشتر باکتریوفاژ اختصاصی وجود دارد، که می توان از آن برای درمان استفاده نمود. در حالی که آنتی بیوتیک ها بدون استثناء تمام باکتری ها را از بین می برند. از جمله با مصرف آنتی بیوتیک ها باکتری های مفید روده ها که مزیت های زیادی برای انسان دارند، از بین رفته و باکتری های مضر شروع به تکثیر می نمایند. از دیگر مزیت های فاژها این است، که به علت تکثیر سریع در داخل باکتری ها با یک دز پائین عفونت ها را ریشه کن می کنند و به خوبی در عمق بافت ها نفوذ می کنند. در حالی که موفقیت درمان عفونت های عمقی با آنتی بیوتیک ها پائین است. در ضمن فاژها به علت این که فقط داخل میزبان های باکتریایی خود رشد و تکثیر می کنند، بنابر این با مرگ تمام باکتری های حساس، فاژها نیز به سرعت از بین می روند. استفاده از باکتریوفاژها به ویژه در درمان سریع عفونت های مقاوم درمان در گروه های خاص بیماران از جمله بیماران دیابتی، افراد درگیر با عفونت های زخم بستر و سایر گروه های پر خطر و تضعیف شده ارجحیت دارد(۶). یکی دیگر از مزایای فاژها این است، که برخی از آنها دارای دامنه میزبانی وسیعی هستند، که از آنها می توان به عنوان ابزار قدرتمند علیه عفونت های مختلف استفاده نمود (۷).

جداسازی فاژهای لیتیک علیه باکتری های مقاوم آنتی بیوتیک و مسئول عفونت های بیمارستانی از جمله باکتری هایی از قبیل استنوتروفوموناس مالتوفیلا و... توجه زیادی را به فاژدرمانی سوق داده است (۸). ظهور باکتری های مقاوم بیماریزا و از طرفی افزایش بیماران تضیف ایمنی شده موجب کاهش کارآیی آنتی بیوتیک های رایج در درمان بیماری های عفونی باکتریایی شده است (۶). ضمن اینکه انسان به دوره پیش از آنتی بیوتیک ها به طور واقعی وارد می شود، در همین راستا تولید و گسترش آنتی میکروبیال های جدید یکی از چالش های اساسی پزشکی مدرن و بیوتکنولوژی است.

از طرفی اثرات آنزیم آلکالین فسفاتاز از چندین سال پیش در دتوکسیفای نمودن لیپوپلی ساکارید رها شده از باکتری های گرم منفی معلوم شده است. که یکی از مهمترین عوامل موثر در بروز شوک عفونی ناشی از این گروه باکتری هاست (۹،۱۰). لذا هدف این تحقیق بررسی اثرات توام فاژ لیتیک و آنزیم آلکالن فسفاتاز بر روی عفونت سوختگی ناشی از اشرشیاکلی در روی موش آزمایشگاهی است.

مواد و روش ها:

در این مطالعهٔ پایه ای، آزمایش بر روی موش های نر ٤ هفته ای با وزن معادل ۲۵ گرم و سالم انجام شد.

برای تعیین حجم نمونه از فرمول زیر $\phi 2 = \frac{D^2 n}{2\alpha\delta^2}$ استفاده شد. که در آن D معادل حداقل تفاوت بین نسبت مرگ و میر هر گروه است که به ازای مشاهده آن مقدار تفاوت، اختلاف میزان مرگ دو گروه را معنی دار تلقی می کنیم. n مساوی تعداد تکرار، α معادل تعداد گروه های آزمایش (یعنی ۴)، δ^2 واریانس هر کدام از گروه های آزمایشی است، که در اینجا برابر گرفته شده اند. بر اساس رابطه ذکر شده حداقل ۹ تکرار لازم بود، که در این مطالعه از برای اطمینان بیشتر از ۱۰ موش در هر گروه استفاده شد.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جداسازی باکتریوفاژهای لیتیک :

ابتدا محیط کشت لوریا براث ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیوم و ۱ درصد مالتوز به عنوان محیط کشت Low Agar با ۱/۵ درصد آگار تهیه شد. برای جستجوی فاژ نمونه های مختلف از مدفوع انسان، مدفوع گوسفند، ورودی و خروجی رودخانه خرم رود، دریاچه کیو و فاضلاب داخل شهر برداشته شده پس از رسوب با سانتریفوژ دور ۳۰۰۰ در دقیقه مایع رویی با فیلتر ۰/۲۲ میکرون صاف شد. رقت های ۱/۱۰۰۰۰ تا $۱/۱۰^{۹}$ از آنها تهیه شده، و محیط Top Agar با مشخصات بالا (با آگار ۰/۷۵ درصد) تهیه شده و تا هنگام مصرف در ۴۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد. برای مشاهده پلاک های فاژی ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری (کشت ۴ ساعته) با ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های فیلتر شده بالا مخلوط و نیم ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. بعد با ۵ میلی لیتر از محیط Top Agar مخلوط شده و روی محیط Low Agar به آرامی ریخته شد. بعد ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شده و پلاک های لیز کننده باکتری مشاهده شدند. برای پرهیز از ایجاد حباب تهیه و مخلوط نمودن محیط بایستی با آرامش انجام بگیرد (۷).

تکثیر،تولید و استخراج فاژها:

پلاک های مشاهده شده با پیپت پاستور جداسازی شده و در داخل هاون با قیچی استریل خرد و پس از له نمودن با فیلتر ۰/۲۲ فیلتر شدند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از آن با ۱۰۰ میکرولیتر باکتری با کدورت نیم مک فارلند مخلوط و داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد (به دلیل نداشتن انکوباتور شیکر دار به صورت دستی و متناوب) شیک شدند. پس از ۲۴ ساعت مایع رویی با سانتریفوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه) جدا شده، و با فیلتر ۰/۲۲ استریل شدند. با مقدار ۱۰ درصد حجمی با اتانول در یخچال به مدت ۱۲ ساعت رسوب و پلی ساکاریدهای رها شده از باکتری با سانتریفوژ مجدد جدا شدند. در مایع استریل شده با روش ذکر شده در بالا تیتر فاژهای لیتیک محاسبه شده و تا مرحله بعدی در داخل محیط انفوزیون براث مغز یا نگهداری شد (۷).

مرگ و میر حیوانی:

برای مطالعات حیوانی بخش پشتی ۴۰ موش در ۴ گروه ۱۰ تایی پس از بیهوشی با کتامین (100mg/kg/I.m) و زایلوزین (20mg/kg/i.v) و تراشیده شدن، با استفاده از پنبه الکلی هر کدام به مدت ثابت ۱۰ ثانیه از فاصله ثابت سوزانده می شدند. موش ها به مدت ۵ روز در حیوان خانه تغذیه شده و به همه آنها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کدورت نیم مک فارلند باکتری ۴ ساعت کشت به صورت زیر جلدی در محل سوختگی تزریق شد. سپس به ۴ گروه تقسیم شدند. گروه اول به عنوان کنترل پس از دریافت سرم استریل نگهداری شدند. گروه دوم فقط ۵۰ میکرولیتر آلکالن فسفاتاز دریافت کردند. گروه سوم نیز نیم ساعت پس از تزریق باکتری مقدار ۳۰ میکرولیتر باکتریوفاژ با $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل پلاک دریافت نمودند. در گروه چهارم مشابه گروه دوم ابتدا مقدار ۳۰ میکرولیتر باکتریوفاژ با $۱۰^{۸}$ واحد تشکیل پلاک دریاقت و بعد ۵۰ میکرولیتر آلکالین فسفاتاز دریافت کردند. مرگ و میر موش ها تا ۲۰ روز بررسی شدند.

یافته ها:

نمونه های مختلف از جمله مدفوع انسان، گوسفند، موش، سگ و مرغ و بخش مختلف رودخانه های اطراف شهر از جمله ورودی و خروجی و دریاچه کیو، فاضلاب داخل شهری از نظر وجود باکتریوفاژ لیتیک علیه سویه بیماریزای *اشرشیاکلی* مورد بررسی قرار گرفتند. فاژهای لیتیک به فراوانی از مدفوع گوسفند، انسان و فاضلاب شهری جداسازی شدند. در مجموع تیتر فاژ جداشده از مدفوع گوسفند بسیار بالاتر از بقیه نمونه ها بود. در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباسیون در مدت تقریبی ۱۲ ساعت پلاک های لیز باکتری میزبان به روشنی قابل مشاهده بودند، که نشان دهنده لیتیک بودن آنها بر روی باکتری بود.

اثر باکتریوفاژ نسبی تخلیص شده در مرگ و میر موش ها:

موش های مورد مطالعه در طی دوره ۷-۵ روزه پس از سوختگی دچار تضعیف ایمنی شدید می شدند. به این دلیل تمام موش ها پس از این مدت دچار ضعف شدید بدنی از جمله کاهش وزن، عدم اشتیاق به خوردن و آشامیدن شدند. برخی از حیوانات علائم شوک عفونی از جمله پشت خمیده، پشم های ژولیده، رگ های دمی پرخون، خواب آلودگی، تجمع اگزودا در اطراف چشم بسته حیوانات را نشان داده، و برخی نیز با عفونت های فرصت طلب از بین رفتند. موش های مرده در این مرحله از مطالعه حذف شدند. البته در مرحله ای از این مطالعه بررسی اثر کشندگی باکتری جدا شده از عفونت ادراری بیمار بر روی موش های سالم و سوزانده شده نشان داد که تمام موش ها پس از ۳-۲روز از تزریق داخل صفاقی با $۱۰^{۸}$ CFU باکتری از بین رفتند.

نتایج آزمون مقایسه نسبت های کای-دو نشان می دهد، بین درصد بروز مرگ در گروه های مختلف بطور کلی اختلاف معنی داری وجود دارد. ($P<0.001$). لازم به ذکر است که سطح معنی داری

معادل ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است. (α= 0.05) در ضمن مقایسه دو به دوی گروه های درمانی با سطح معنی دار ۰/۵۰ به صورت زیر بوده است. نتایج آزمون دقیق فیشر نشان می دهد که از نظر درصد مرگ، تفاوتی بین گروه ۱ و ۲ وجود ندارد. (P=0.237) در حالی که بین گروه ۱ و ۳ (P<0.002) و گروه های ۱ و ۴ (P<0.001) از این نظر تفاوت معنی داری وجود دارد. بر اساس نتایج آزمون فیشر بین گروه های ۲و۳ (با ۹۶/۵ درصد اطمینان و (P=0.035) و گروه های۲ و ۴ (با ۹۸/۸ درصد اطمینان و (P=0.012) تفاوت معنی دار وجود دارد. نتیجه این آزمون برای مقایسه گروه های ۳ و ۴ معنی دار نبود .(P=0.500)

نتیجه نهایی اینکه از نظر تاثیر مرگ و میر موش ها ی مورد مطالعه گروه های ۱ و۲ در یک دسته و گروه های ۳ و۴ در دسته جداگانه ای قرار می گیرند.

جدول۱: جدول توزیع فراوانی موش های آزمایشگاهی به تفکیک گروه تیمار و وضعیت مرگ

	پاسخ		کل
	تعداد زنده	تعداد مرده	
گروه۱	۰ (٪ ۰)	۱۰(٪۱۰۰)	۱۰(٪۱۰۰)
گروه۲	۲(٪۲۰)	۸(٪۸۰)	۱۰(٪۱۰۰)
گروه۳	۷(٪۷۰)	۳(٪۳۰)	۱۰(٪۱۰۰)
گروه۴	۸(٪۸۰)	۲(٪۲۰)	۱۰(٪۱۰۰)
مجموع	۱۷(٪۴۲،۵)	۲۳(٪۵۷،۵)	۴۰(٪۱۰۰)

بحث:

اشرشیاکلی یکی از فلور نرمال گوارشی در انسان و حیوانات خون گرم است. که در اغلب موارد به عنوان یک میکروب فرصت طلب در عفونت های مختلف بیمارستانی، سوختگی ها، و مهمتر از آنها عفونت سیستم ادراری انسان نقش دارد. مطالعه نقش باکتریوفاژهای لیتیک در پیشگیری یا درمان عفونت های ناشی از این باکتری و سایر باکتری ها دارای ارزش زیادی برای متخصصین عفونی و جامعه درمانی است. این زمینه از علم درمان مخصوصا در دو دهه اخیر به دلیل عدم تولید کلاس های جدید آنتی بیوتیکی و ظهور سویه های مقاوم چند دارویی علاقمندان زیادی را به خود جذب کرده است. نکته جالب توجه تحقیق حاضر این بود، که علیرغم اغلب مطالعات در زمینه فاژ درمانی که باکتری میزبان و باکتریوفاژ مربوطه با فاصله کوتاهی از هم به مدل حیوانی یا انسان های داوطلب تجویز می شود، در این مطالعه باکتری و فاژهای لیتیک پس از حدود ۵ روز از ایجاد سوختگی که اغلب حیوانات بد حال و نمره بهداشتی پائین داشتند، تزریق شدند. نتیجه نهایی با توجه به آنالیز های آماری پیشگیری از مرگ ۸۰ درصد موش های تیمار شده بود. پلاک های فاژی علیرغم رسوب پلی ساکاریدهای موجود با الکل سرد دارای مقدار زیادی از لیپوپلی ساکارید باکتری میزبان بود، که یکی از عوامل موثر در کارآیی درمانی آن بود. همانطور که می دانیم اندوتوکسین رها شده از باکتری های گرم منفی یکی از عوامل مهم تحریک کننده شوک عفونی و مرگ در انسان و حیوانات است. لیپوپلی ساکارید باکتری های گرم منفی هنگام تخلیص فاژها بایستی به طور کامل حذف شود. مطابق فارماکوپه اروپا در ۱۹۹۷ مقدار لیپوپلی ساکارید برای مصارف درمانی باید ۵ واحد اندوتوکسین به ازای هر کیلو وزن در ساعت یا 5 EU Kg/h باشد(۱۱). در این تحقیق به دلیل عدم دسترسی و نیز هزینه بالا امکان استفاه از تست LAL وجود نداشت. عدم وجود مواد و وسایل آزمایشگاهی استاندارد و شرایط نامناسب حیوان خانه محل انجام تحقیق نیز از سایر محدودیت های این مطالعه بودند.

مطالعه Smith , Huggins نشان داده است که تزریق یک دوز فاژهای مرحله رشد نمایی از تزریق مکرر ترکیب آنتی بیوتیک های مختلف از قبیل تتراسیکلین، آمپی سیلین، کلرامفنیکل، یا کوتریموکسازول در درمان عفونت باکتریمی در موش آزمایشگاهی بهتر است (۲).

در موش آزمایشگاهی تزریق آلکالین فسفاتاز به تنهایی سبب بقای ۸۰ درصد آنها از مرگ توسط عفونت کشنده *اشرشیاکلی* شده است. در بچه خوک ها مقادیر ۱۰ میکروگرم در هرکیلوگرم وزن از آلکالین فسفاتاز استخراج شده از روده گاوها موجب تخفیف اثرات هماتولوژیک و پاسخ فاکتور نکروز تومور آلفا می شود. این آنزیم پس از برداشتن گروه فسفات از بخش لیپیدی ملکول لیپوپلی ساکارید، آن را به شکل غیر سمی و غیر تب زا تبدیل می کند (۱۲). یکی از دلایل تفاوت در عدم تاثیر آلکالین فسفاتاز و گروه توام آنزیم با فاژ در این تحقیق این است، که آنزیم بایستی همراه باکتری ها تزریق می شد. در واقع پس از رها شدن اندوتوکسین، آنزیم فاقد اثر خواهد بود.

باکتریوفاژهای لیتیک احتمالا به صورت هدفمند در عفونت های خاصی نیز قابل استفاده هستند. به دلیل اینکه در یک مطالعه از فاژهای ایزوله شده از فاضلاب برای جلوگیری و کنترل سپتی سمی و عفونت شبه مننژیت ناشی از *اشرشیاکلی* سویه K1 در جوجه ها و گوساله ها استفاده شده است. این باکتریوفاژ به صورت انتخابی به آنتی ژن کپسولی K1 باکتری می چسبند. یکی از مزایای فاژدرمانی در این مطالعه اثر درمانی فاژها پس از بروز علائم بیماری گزارش شده است (۱۳). باکتریوفاژهای لیتیک قدرت نفوذ بسیار بالایی نیر دارند، به طوری که در مطالعه دوبوس و همکاران نشان داده شده است، که عفونت داخل مغزی با شیگلا در موش با استفاده از فاژهای لیتیک تزریق شده از طریق داخل صفاقی قابل درمان هستند، که در واقع بیانگر ورود فاژ از سد خونی مغزی است(۱۴).

اثر درمانی فاژها و عدم سیتوتوکسیسیته آنها در عفونت های ناشی از کلبسیلا در موش آزمایشگاهی بررسی شده است. در این تحقیق فاژهای لیتیک به صورت داخل بینی و داخل صفاقی و بدون عارضه استفاده شده اند (۱۵).

اثر فاژهای لیتیک در برخی عفونت های انسانی بهتر از آنتی بیوتیک ها گزارش شده است (۱۶). به طوری که در یک مطالعه اثر درمانی آنتی بیوتیک ها و فاژها در درمان عفونت چرکی استافیلوکوکوسی مقایسه شده است، که میزان بهبودی در گروه دریافت کننده فاژ ها ۸۲ درصد و گروه دریافت کننده آنتی بیوتیک ۶۴ درصد گزارش شده است (۱۷). در این مطالعه اثر درمانی فاژ ها در هنگام تزریق داخل رگی در گروهی دیگر از بیماران بالاتر از ۹۵ درصد گزارش شده است.

مصرف کلینیکی فاژها در طول صد سال گذشته به اشکال مختلف، با دوز های بالا و روش های مختلف تجویز بدون عارضه گزارش شده است (۶).

در واقع فاژها به شدت در محیط زندگی پراکنده اند. به طوری که در آب غیر آلوده به تعداد ۲۰۰ میلیون در هر میلی لیتر وجود دارند. که به طور منظم در غذاها مصرف می شوند (۶). فاژها علیرغم تاثیر ضد میکروبی محدودیت هایی نیز دارند. عدم تاثیر احتمالی بر میکروب های داخل سلولی، عدم نفوذ مناسب در محل التهاب، و تحریک بیماری های خود ایمن از مشکلات ناشی از فاژ درمانی هستند (۱۳). از طرفی فاژها ممکن است دارای ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی، ژن سموم مختلف، و یا ژن های عوامل ویرولانس باکتری ها بوده، یا در ترانسداکشن عمومی نقش داشته باشند. که از عوارض احتمالی آنها محسوب می شود. علاوه بر این، احتمالا فاژها توسط سیستم رتیکولواندوتلیال به سرعت حذف شده و به سطح درمانی نرسند (۱۸). از طرفی تولید آنتی بادی علیه آنتی ژن های فاژی به اثبات رسیده است (۱۹)، که احتمالا در بروز ایمنی علیه آنها و خنثی سازی آنها و نیز بیماری های خود ایمنی ممکن است نقش داشته باشند. از سایر معایب مطرح شده در رابطه با فاژ درمانی، موفقیت پائین درمان عفونت های داخل سلولی (مانند تیفوئید و بروسلوزیز...) و مقاومت های باکتریایی علیه آنهاست. که همگی نیازمند مطالعات گسترده و دقیق علمی است.

در مطالعه ای مقاومت ایجاد شده در باکتری کامپیلوباکتر در برابر فاژها ۴ درصد گزارش شده است. باکتری ها پس از کسب مقاومت توان کلونیزاسیون در میزبان را از دست می دهند، از طرفی پس از ورود در بدن میزبان به شکل حساس به فاژ بر می گردند (۲۰).

در هر حال در صد موفقیت جداسازی فاژهای لیتیک بر علیه باکتری ها نسبتا کاری مشکل و زمان بر می باشد، به دلیل اینکه در این تحقیق پس از بررسی دهها نمونه محیطی و انسانی در نهایت فاژ لیتیک موثر بر *اشرشیاکلی* از نمونه مدفوع گوسفند جداسازی شد. این فاژ به دلیل محدودیت زمانی و محدودیت هزینه طرح فقط بر روی یک سویه ایزوله از عفونت ادراری انسانی آزمایش شد. در همین رابطه در مطالعه ای بر روی ۲۹ فاژ جدا شده از فاضلاب بیمارستان فقط یکی از آنها روی سودوموناس مقاوم ایمی پنم اثر لیتیک داشته است. در این تحقیق با تزریق ۳۰ میلیون باکتری همه موش ها پس از ۲۴ ساعت از بین رفتند، و با تزریق یک دوز از فاژ لیتیک ۱۰۰ درصد موش ها زنده ماندند. با این حال موقعی که فاژها در ۱۸۰ و ۳۶۰ دقیقه پس از تزریق باکتری به حیوانات تزریق شدند، به ترتیب ۵۰ درصد و ۲۰ درصد موش ها زنده ماندند. که نشان دهنده وابستگی اثر فاژها به زمان ورود باکتری به میزبان است(۶). در این مطالعه سطح آنتی بادی ضد فاژ در ابتدای تزریق و پس از تزریق تغییری نیافت.

به طور کلی مطالعات گسترده درمانی در اواسط دهه ۱۹۸۰ در لهستان میزان بهبودی فاژ درمانی را ۹۲ درصد گزارش نموده است(۲۱).

نتیجه گیری:

فاژ درمانی موضوعی بسیار جذاب در بحث درمان عفونت های باکتریایی است. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان می دهد که فاژهای لیتیک ابزارهای قدرتمند بیولوژیک علیه باکتری ها هستند، که می توانند به دلیل افزایش روز افزون مقاومت دارویی و هزینه های

سرسام آور آنتی بیوتیک ها، به عنوان یکی از جایگزین های آنتی بیوتیک ها و دارو درمانی علیه عفونت های باکتریال استفاده شوند. لیکن مطالعات زیاد انسانی و حیوانی لازم است. ضمن اینکه بایستی عوارض ناشی از مصرف گسترده آنها در انسان با روش های علمی بررسی شود.

تقدیر و تشکر:

این طرح با حمایت های بی دریغ مجموعه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی وخدمات بهداشتی درمانی استان لرستان انجام شده است. که بدینوسیله از تمامی همکاران بخش های پژوهشی و مالی و مخصوصا معاونت های محترم آموزشی و پژوهشی، و مدیر پژوهشی و سایر همکاران تشکر و قدردانی می شود.

فهرست مراجع:

1. Hankin, EH. L'action bactericide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibrion du cholera. *Ann. Inst. Pasteur* 1896; 10:511.
2. Smith H W, and Huggins MB. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phages: its general superiority over antibiotics. *J. Gen. Microbiol* 1982; **128**:307–318.
3. Soothill J S, Lawrence JC, and Ayliffe G A**.** The efficacy of phages in the prevention of the destruction of pig skin in vitro by *Pseudomonas aeruginosa*. *Med. Sci. Res* 1988; **16**:1287–1288.
4. Soothill J S. Treatment of experimental infections of mice by bacteriophage. *J. Med. Microbio.* 1992; **37:**258–261.
5. Soothill JS. Bacteriophage prevents destruction of skin grafts by *Pseudomonas aeruginosa*. *Burns* 1994; **20**:209–211.
6. 6-Alexander S, Zemphira A, and Glenn MJ. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents and Chemother*. 2001; **45**(3): 649-659.
7. Ellien C J, Schrader HS, Rieland B, Thopson T L, Lee K W, Nickerson K W, And Tyler A. Kokjohn.Prevalence of Broad-Host-Range Lytic Bacteriophages of *Sphaerotilus natans*, *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa. Appl. Environ. Microbiol* 1998; **64**(2): 575–580.
8. Chang H C, Chiy-Rong C, Gwan-Han Shen, Kai-Ming Chang,Yi-Hsiung Tseng, and Shu-Fen Weng.Isolation and Characterization of Novel Giant *Stenotrophomonas maltophilia* Phage _SMA5 . *Appl. Environ Microbiol*. 2005; **71**(3): 1387–1393. doi:10.1128/AEM.71.3.1387–1393.2005
9. Klaas P, Winston WB, Pieter AK, Jan A A, Machiel M K, and Dirk FM. Dephosphorylation of Endotoxin by alkaline phosphatase in vivo. *A J Pathol* 1997, **151**:1163-1169.
10. Poelstra K, Bakker W W, Hardonk MJ, and Meijer D K F. Endotoxin detoxification by alkaline phosphatase in cholestatic livers. *Cells of the Hepatic Sinusoids* 1997;6: 187-189.
11. Boratynski J, Syper D, Weber-Dabrowska B, Lusiak-Szelachowska M, Pozniak G, Gorski A. Preparation of endotoxin-free bacteriophages. *Cell Mol Biol Lett* 2004; **9**(2):253-9.
12. Chantal B, Marty W, Willem R, Dani E F, Ruud B, and Willem S.Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, a Novel Therapeutic Drug for Lipopolysaccharide (LPS)-Mediated Diseases, Attenuates LPS Toxicity in Mice and Piglets. *J Pharmacol Exp Ther*. 1998; **307**(2) 234-238
13. Paul B, Margaret L, and Angelo B J. Use of Lytic Bacteriophage for Control of Experimental *Escherichia coli* Septicemia and Meningitis in Chickens and Calves.*Clin Diagn Lab Immunol* 1998;**5**(3): 294-298.
14. Dubos R J, Straus J H, and Pierce C**.** The multiplication of bacteriophage *in vivo* and its protective effect against an experimental infection with *Shigella dysenteriae*. J. Exp. Med. 1943; **20:**161-168.
15. Bogovazova G G, Voroshilova N N, and Bondarenko V M. The efficacy of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in the therapy of experimental *Klebsiella* infection. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol* 1991; **4**:5–8.
16. Sakandelidze V M**.** The combined use of specific phages and antibiotics in different infectious allergoses. *Vrach. Delo* 1991; **3**:60–63.

17. Meladze G D, Mebuke M G, Chkhetia N S, Kiknadze N I, Koguashvili G G, Timoshuk II, etal. The efficacy of staphylococcal bacteriophage in treatment of purulent diseases of lungs and pleura. *Grudn. Khir* 1982; **1:**53–56.
18. Merril C R, Biswas B, Carlton R, Jensen N C, Creed G j, Zullo S, and Adhya S. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 1996; **8**:3188–3192.
19. Kucharewicz-K, A, and Slopek S. Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. *Arch. Immunol. Ther.Exp* 1987; **5:**553–561.
20. Carrillo C L, Atterbury R J, El-Shibiny A, Connerton P L, Dillon E, Scott A, and Connerton I f. Bacteriophage Therapy To Reduce *Campylobacter jejuni* Colonization of Broiler Chickens *Appl.Environ Microbiol*. 2005; **71**(11): 6554–6563. doi:10.1128/AEM.71.11.6554–6563.2005
21. Wang J, Hu B, Xu M, Yan Q, Liu S, Zhu X, etal. Use of bacteriophage in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa. *Int J Mol Med* 2006; **17**(2):309-17