تولیدات دامی
دوره ۱۷ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۴
صفحه‌های ۲۰۹-۱۹۹

مطالعهٔ کارایی باکتریوفاژ در مهار زیستی کلونیزاسیون انتروکوکوس در بلدرچین

جلیل نوری رایگانی[۱]، محمدامیر کریمی ترشیزی[۲]*، شعبان رحیمی[۳]، امید مددگار[۴]

۱. دانشجوی دکتری تغذیهٔ طیور، گروه پرورش و مدیریت طیور، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه پرورش و مدیریت طیور، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳. استاد، گروه پرورش و مدیریت طیور، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴. دانشیار، گروه ویروس‌شناسی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۳/۰۸/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۴/۰۲/۰۶

چکیده

تحقیق حاضر با هدف جداسازی باکتریوفاژ برای مهار زیستی باکتری انتروکوکوس مقاوم به پادزیست و کاهندهٔ رشد جداشده از مدفوع بلدرچین ژاپنی در سه آزمایش انجام شد. ۶۰ نمونه از محتویات دستگاه گوارش بلدرچین‌های بالغ برای جداسازی انتروکوکوس‌های بالقوهٔ کاهندهٔ رشد، جدا و یک نمونهٔ منتخب به‌همراه باکتری *انتروکوکوس فکالیس* سوش ۵۱۲۹۹ براساس زنده‌مانی و کاهندگی رشد در بلدرچین، انتخاب و در سطح گونه شناسایی شد. سپس باکتریوفاژ لیتیک با استفاده از نمونه‌های فضولات طیور و فاضلاب مرغداری به‌عنوان منابع باکتریوفاژ علیه باکتری منتخب، جداسازی شد. کارایی فاژدرمانی علیه باکتری منتخب در کاهش استقرار باکتری‌های انتروکوکوس در محتویات ایلئوم بلدرچین‌ها متعاقب دریافت دهانی انتروکوکوس بررسی شد. باکتری منتخب به‌عنوان *انتروکوکوس فکالیس* شناسایی شد. تجویز باکتریوفاژ لیتیک توانست شمار انتروکوکوس‌ها در محتویات ایلئوم را در مقایسه با گروه دریافت‌کنندهٔ باکتری و بدون درمان با باکتریوفاژ کاهش دهد و به سطح قابل مقایسه با گروه شاهد منفی (گروه بدون دریافت باکتری انتروکوکوس) برساند ($P<۰/۰۵$). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که باکتریوفاژ جداشده می‌تواند به‌طور مؤثر کلونیزاسیون باکتری انتروکوکوس را به‌شکل زیستی مهار کند.

کلیدواژه‌ها: *انتروکوکوس فکالیس*، باکتریوفاژ لیتیک، بلدرچین ژاپنی، فاژدرمانی، کاهندهٔ رشد.

* نویسنده مسئول Email: karimitm@modares.ac.ir

مقدمه

باکتری‌های جنس *انتروکوکوس* بی‌هوازی اختیاری، گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند. اعضای این جنس انتشار وسیعی دارند و بخشی از فلور میکروبی دستگاه گوارش پرندگان و پستانداران را تشکیل می‌دهند. گونه‌های *انتروکوکوس* در به‌وجودآوردن بیماری‌های درمانگاهی گوناگون همچون سپتی‌سمی، تورم‌روده، بیماری‌های تنفسی، و عفونت‌های دستگاه ادراری نقش دارند (۱۸). شیوع بیماری ایجادشده توسط *انتروکوکوس‌ها* زمانی رخ می‌دهد که عوامل مستعدکننده مانند کمبودها، عفونت‌های دیگر، سرکوبگرهای ایمنی، درمان پادزیستی، و مایه‌کوبی وجود داشته باشند (۱۵). در بسیاری از موارد، گونه‌های چندگانهٔ باکتری می‌تواند جدا شود و تخم‌مرغ‌های آلوده می‌توانند منبع مهمی از آلودگی باشند.

در طول دهه‌های اخیر، انتروکوکوس‌ها به‌عنوان عوامل بیماری‌زای بیمارستانی ظهور پیدا کرده‌اند. نقش آن‌ها در چنین عفونت‌هایی به‌دلیل قابلیت آنها برای اکتساب مقاومت به عوامل ضدمیکروبی متنوع، افزایش یافته است و درمان آن‌ها را با مشکل مواجه می‌سازد (۱۵). پرورش طیور چرخهٔ متراکم تولیدی است و بنابراین به‌شدت می‌تواند با انتشار عوامل ضدمیکروبی در ارتباط باشد. این امر به افزایش مقاومت ضدمیکروبی جمعیت باکتریایی هم‌زیست و بیماریزا می‌انجامد. مشکلات مرتبط با باکتری‌های مقاوم به پادزیست، تمایل به درمان‌های جایگزین در درمان عفونت‌های باکتریایی را افزایش داده است (۹). در این خصوص، توجه زیادی به فاژدرمانی یعنی استفاده از باکتریوفاژها برای ازبین‌بردن یا مهار جمعیت‌های باکتریایی در میزبان‌های آلوده شده است (۱۶ و ۱۷).

باکتریوفاژها (فاژها) ویروس‌های باکتری هستند و تقریباً در هر محیطی روی کره زمین یافت می‌شوند (۱). باکتریوفاژها انحصار و ویژگی میزبانی دارند و در داخل سلول‌های باکتریایی تکثیر می‌شوند. به‌طورکلی، فاژها توسط ساختارهای تخصصی به نام فیبرهای دمی به سطح سلول میزبان می‌چسبند و اسیدنوکلئیک خود را به‌داخل باکتری تزریق می‌کند. با استفاده از ماشین تکثیر، ترجمه، و نسخه‌برداری سلول‌های میزبان، اسیدنوکلئیک ویروسی زیاد می‌شود و در داخل کپسیدهای پروتئینی قرار می‌گیرد. فرار ویروس‌های بالغ از سلول میزبان به غشای پلاسمایی باکتری آسیب می‌رساند و باعث مرگ آن می‌شود (۵).

مطالعات اولیه روی *اشریشیاکلی* ثابت کرد که فاژدرمانی می‌تواند به‌اندازهٔ پادزیست مؤثر باشد (۱۱). اثربخشی استفاده از باکتریوفاژها برای درمان التهاب کیسه‌های هوایی ناشی از *ای. کلی* در جوجه‌ها مشاهده شده است (۱۹). بعضی از باکتریوفاژهای جداشده از منابع گوناگون می‌توانند در کاهش تجمع *سالمونلا انتریتیدیس* در دستگاه گوارش طیور مؤثر باشند (۲). اطلاعات اندکی درخصوص جداسازی باکتریوفاژ لیتیک علیه باکتری‌های *انتروکوکوس* کاهندهٔ رشد طیور وجود دارد. از این رو هدف از انجام پژوهش حاضر، جداسازی جدایهٔ بومی کاهندهٔ رشد و مقاوم باکتری *انتروکوکوس* و همچنین جداسازی و ارزیابی کارایی باکتریوفاژ لیتیک بومی در کاهش استقرار *انتروکوکوس‌ها* است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، مصوبات "کمیتهٔ اخلاق پزشکی در مورد استفاده و مراقبت از حیوانات آزمایشگاهی در تحقیقات" دانشگاه تربیت مدرس مورد توجه و اجرا قرار گرفت. ۶۰ نمونه مدفوع تازهٔ بلدرچین‌های ژاپنی (بلدرچین‌های ماده و بالغ در حال تخم‌گذاری) با استفاده از سواب پنبه‌ای سترون گرفته شد و سواب‌ها بلافاصله در محیط کشت براث انفوزیون مغز و قلب (مرک، آلمان) قرار گرفتند. نمونه‌ها

به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ازدیاد باکتری‌ها در محیط براث انفوزیون مغز و قلب، از محیط کشت *استرپتوکوکوس* کی‌اف آگار (مرک، آلمان) مکمل‌شده با یک درصد تترازولیوم هیدروکلراید (مرک، آلمان) برای خالص‌سازی آنها استفاده شد. اطمینان از *انتروکوکوس*بودن نمونه‌ها براساس رشد و ویژگی‌های ریخت‌شناسی *انتروکوکوس*ها، رنگ‌آمیزی گرم، تولید کاتالاز، تحمل نسبت به نمک طعام ۶/۵ درصد، و رشد در دمای ۴۵ درجهٔ سلسیوس و هیدرولیز اسکولین در حضور صفرا (صفرا مانع رشد باکتری‌های دیگر به‌جز *انتروکوکوس*ها می‌شود) به عمل آمد. در تمامی مراحل از باکتری سوش *انتروکوکوس فکالیس* ۵۱۲۹۹ به‌عنوان استاندارد استفاده شد. نمونه‌های خالص در محیط کشت انفوزیون مغز و قلب تازه به همراه ۲۰ درصد گلیسرول سترون‌شده در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس ذخیره شدند.

میزان کاهندگی رشد بلدرچین (براساس معیار افزایش وزن و تلفات) توسط هفت نمونه *انتروکوکوس* به‌دست‌آمده از مرحلهٔ اول بررسی شد. ۲۸۸ قطعه بلدرچین ژاپنی یک‌روزه (مخلوط هر دو جنس) که هیچ نوع درمان دارویی (به‌جز ایمنی کسب‌شده ازطریق تخم) دریافت نکرده بودند، انتخاب شدند. این پرندگان به‌طور تصادفی در نه تیمار، چهار تکرار، و هشت پرنده در هر تکرار توزیع شدند. تمامی پرندگان در قفس پرورش یافتند و به جیرهٔ مشابه برای تأمین احتیاجات غذایی بلدرچین ژاپنی دسترسی آزاد داشتند. گروه‌های آزمایشی عبارت بودند از: شاهد منفی (هیچ نوع باکتری دریافت نمی‌کرد)، گروه آزمایشی شاهد مثبت (مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری *انتروکوکوس فکالیس سوش ۵۱۲۹۹* با شمارش 10^7 واحد تشکیل‌دهندهٔ کلنی در هر میلی‌لیتر ازطریق آب آشامیدنی در روزهای اول و دوم بعد از تفریخ دریافت کرد)، گروه‌های آزمایشی یک تا هفت که هر یک از هفت نمونه باکتری *انتروکوکوس* (حجم و غلظت مشابه با گروه شاهد مثبت) را ازطریق آب آشامیدنی در روزهای اول و دوم بعد از تفریخ دریافت کردند، به‌مدت ۲۸ روز پرورش داده شدند (برای مشاهدهٔ تأثیرات زیان‌آور باکتری یک دورهٔ ۲۸روزهٔ پرورش کافی بود). شمارش تعداد باکتری در هر میلی‌لیتر ازطریق مقایسه با تعلیق استاندارد مک‌فارلند (McFarland) انجام شد. برای اطمینان از استقرار باکتری در دستگاه گوارش و همچنین تأثیرگذاری بیشتر و سهولت انجام کار، چالش ازطریق آب آشامیدنی و از روز اول و دوم بعد از تفریخ انجام شد. برای پیش‌گیری از انتشار باکتری همهٔ مراحل تحقیق با رعایت اصول قرنطینه انجام شد.

میزان مرگ‌ومیر پرندگان به‌شکل روزانه و درصد زنده‌مانی برای هر واحد آزمایشی به‌طور جداگانه تا روز ۲۸ دورهٔ پرورش ثبت شد. پرندگان موجود در هر قفس در هفته‌های اول، دوم و چهارم وزن شدند و مصرف خوراک آنها نیز در هفته‌های مذکور ثبت و ضریب تبدیل خوراک محاسبه شد.

در روز ۲۸ دورهٔ پرورش از هر یک از تکرارهای گروه‌های آزمایشی یک پرنده انتخاب و قبل از کشتار مقدار ۱ میلی‌لیتر خون کامل از قلب آنها گرفته شد. غلظت‌های مربوط به آلبومین، پروتئین، تری‌گلیسرید، گلوکز، کلسترول، اسیداوریک، و فسفر در نمونه‌های سرم با کیت‌های تشخیصی (پارس‌آزمون، تهران) در آزمایشگاه علوم طیور دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس اندازه‌گیری شد.

باتوجه به نتایج حاصل از مرحلهٔ قبل، نمونه‌ای از باکتری *انتروکوکوس* که ضمن کاهش رشد پرندگان آزمایشی، کمترین تلفات را نیز ایجاد کرده بود، انتخاب شد. الگوی نتیجهٔ آزمون‌های بیوشیمی بیست‌گانه در نمونهٔ

منتخب با کیت API Strep 20 E (بیومریو، فرانسه) تعیین و شناسایی نهایی براساس نتایج آزمون بیوشیمی با نرم‌افزار API web انجام شد (بیومریو، فرانسه).

جدایهٔ باکتری انتخاب‌شده (به‌دلیل کاهندگی رشد پرندگان آزمایشی) روی محیط کشت پایهٔ بلاد آگار (دیفکو، آمریکا) حاوی ۵ درصد خون دفیبرینهٔ گوسفند به‌روش کشت خطی کشت داده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس فعالیت همولیتیک احتمالی آن بررسی شد.

برای جدایهٔ باکتری انتخاب‌شده از آزمون آنتی‌بیوگرام و کاربرد ۱۳ داروی پادزیست استفاده شد. این آزمون مطابق روش استاندارد و با تکنیک صفحهٔ منتشرشدهٔ کیربای‌بایر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) انجام گرفت. صفحه‌های پادزیست (پادتن طب، ایران) انتخاب‌شده عبارت بودند از: نئوبیوسین (۵ میکروگرم)، لینکواسپکتین (۱۵ میکروگرم)، دانوفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، انروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، نئومایسین (۳۰ میکروگرم)، دیفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، داکسی‌سایکلین (۳۰ میکروگرم)، فلورفنیکول (۳۰ میکروگرم)، کلیستین (۱۰ میکروگرم)، تیامولین (۳۰ میکروگرم)، اکسی‌تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، تتراسیکلین (۳۰ میکروگرم)، و فلومیکوئین (۳۰ میکروگرم).

در این آزمایش، برای جداسازی فاژ از فاضلاب مرغداری مزرعهٔ تحقیقات پرورش طیور دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس نمونه‌گیری شد. مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر فاضلاب به آزمایشگاه منتقل شد و به‌مدت یک ساعت روی تکان‌دهنده قرار گرفت. سپس ظرف حاوی نمونهٔ فاضلاب به‌مدت یک ساعت به‌صورت ساکن قرار گرفت و بعد از ته‌نشین‌شدن مواد جامد مایع رویی، سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه) شد. سپس مایع رویی در شرایط سترون با پالایهٔ غشایی ۰/۲۲ میکرومتر صاف شد تا سلول‌های باکتریایی (به استثنای *مایکوپلاسماها*) و ذرات سلولی خارج شوند (۶). ۲۰۰ میکرولیتر از نمونهٔ فاژ و ۵۰ میکرولیتر از کشت مایع جدایهٔ باکتری منتخب (*انتروکوکوس فکالیس*) که یک شب از کشت آن گذشته بود با ۷ میلی‌لیتر آگار نرم انفوزیون مغز و قلب با غلظت ۰/۷درصد مخلوط گردید و روی بشقابک حاوی آگار (۱/۵درصد) ریخته شد. بشقابک‌ها به‌مدت یک شب در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس برای آزمون وجود پلاک در گرمخانه نگهداری شدند (۱). یک بشقابک نیز که فقط حاوی باکتریوفاژ بود به‌عنوان گروه شاهد منفی درنظر گرفته شد. ارزیابی پلاک برای جدایهٔ باکتری منتخب در سه تکرار انجام شد.

برای خالص‌سازی فاژ پلاک‌هایی که به‌خوبی جدا شده بودند، از روش استاندارد با اندکی اصلاحات استفاده شد تا یک نوع فاژ به‌دست آید (۲۰). به‌طور خلاصه، خالص‌سازی به این شکل انجام شد که پلاک‌های دارای ظاهر مشابه و اندازهٔ یکسان از سطح بشقابک برداشته شد و در لولهٔ حاوی ۵ میلی‌لیتر براث انفوزیون مغز و قلب قرار گرفت. این مخلوط به‌خوبی تکان داده شد و سانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه) گردید و مایع رویی نمونه با پالایهٔ ۰/۲۲ میکرومتر صاف شد. حجمی معادل ۲۰۰ میکرولیتر از نمونهٔ فاژ و ۵۰ میکرولیتر از کشت جدایهٔ باکتری منتخب در ۷ میلی‌لیتر محیط کشت آگار انفوزیون قلب و مغز (۰/۷درصد) مخلوط و روی بشقابک حاوی آگار (۱/۵درصد) ریخته شد و پس از سفت‌شدن آگار، بشقابک‌ها در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس در گرمخانه قرار داده شدند. این مراحل تا پنج مرتبه تکرار شد تا فقط یک نوع فاژ براساس اندازه و ریخت‌شناسی پلاک به‌دست آمد (۲۴).

پس از خالص‌سازی باکتریوفاژ، عیار (تعداد ذرات) تعلیق فاژی تعیین شد. به‌این منظور، ابتدا رقت‌های متوالی ده‌تایی با عامل رقت ۰/۱ از تعلیق باکتریوفاژ تهیه شد. پس

از افزودن ۲۵۰ میکرولیتر از هر رقت فـاژ و ۵۰ میکرولیتـر کشـت ۱۲ سـاعتهٔ بـاکتری منتخـب بـه ۷ میلـیلیتـر آگـار انفوزیـون مغـز و قلـب ذوبشـده، هـر کـدام از رقـتهـا جداگانه به بشقابک حاوی پایهٔ آگار (مرک، آلمـان) اضـافه شدند. پس از شمارش پلاکها، عیار تعلیق فاژی براسـاس لگاریتم واحد تشکیلدهندهٔ پلاک (Plaque forming unit) در هر میلیلیتر محاسبه شد (۲۰).

بـرای تکثیـر باکتریوفـاژ از روش اسـتاندارد بـا انـدکی اصلاحات استفاده شد (۲۰). بهطـور خلاصـه، مقـدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونهٔ فاژ و ۵۰ میکرولیتر باکتری میزبـان در ۵ میلیلیتر محیط کشت براث انفوزیون مغز و قلـب مخلـوط شد. این مخلوط در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس بهمدت یک شب در گرمخانه نگهداری شد. نمونهٔ سـانتریفیوژ (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه بهمدت ۱۵ دقیقـه) و از پالایـهٔ غشـایی ۰/۲۲ میکرومتر گذرانده شد. فاژهای تکثیرشده در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس ذخیره شدند.

درمجموع ۷۲ قطعه بلدرچین ژاپنی نر ۲۸روزه بـهطـور تصادفی در سه گروه آزمایشی با سه تکرار و هشت پرنـده در هر تکرار قرار گرفتند. تمامی پرندگان در قفس پرورش یافتند و جیرهٔ پایهٔ مشابه بـرای تـأمین احتیاجـات معمـول بلدرچین ژاپنی دریافت کردند. تمام گـروههـای آزمایشـی بهجز گروه شاهد (گروههای دوم و سوم) در روزهای ۲۸ و ۲۹ با 10^7 واحد تشـکیلدهنـدهٔ کلنـی در هـر میلـیلیتـر از جدایهٔ باکتری منتخب به شکل دهـانی چـالش داده شـدند. ۲۴ ساعت پس از آخرین چالش به گـروه آزمایشـی سـوم مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از باکتریوفـاژ اختصاصـی بـا غلظـت 10^4 واحد تشکیلدهنـدهٔ پـلاک در هـر میلـیلیتـر ازطریـق دهانی و یک بار در روز بهمدت دو روز خورانـده شـد. در روز ۳۱ دورهٔ پرورش (پس از دو روز دریافت باکتریوفـاژ) از هر تکـرار تعـداد دو پرنـده انتخـاب و پـس از کشـتار، باکتریهای *انتروکوکوس* در محتویات ایلئوم رودهٔ کوچـک آنها شمارش شد.

در پایان آزمایش (۳۱روزگی) شش قطعه پرنـده از هـر گروه آزمایشی بهطور تصادفی انتخاب شد. بهمنظور رعایت رفاه پرندگان، در ابتدا پرندهها با گاز دیاکسیدکربن بیجان گشتند (۲) و پس از کالبدگشایی، اندامهای داخلیشان جدا شد و توزین شدند. بهمنظور جداسازی *انتروکوکوس*ها یک گرم از محتویات بخش ایلئـوم رودهٔ کوچـک پرنـدههـا در شرایط بدون آلودگی (کنار شعله و روی صفحات آلومینیوم سترونشده) برداشته شد و به لولـههـای سـترون حـاوی ۹ میلیلیتر محلول سالین نرمـال سـترون منتقـل و تـا هشـت مرتبه به شکل متوالی با عامـل رقـت ۰/۱ رقیـق شـد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به روش ریختن در بشقابک کشت به همراه ۱۵ میلیلیتر محیط کشـت کـی. اف. *استرپتوکوکس* آگار (مـرک، آلمـان) مـذاب مکمـلشـده بـا یـک درصـد تترازولیوم هیدروکلرایـد (مـرک، آلمـان) در هـر بشـقابک کشت سترون ریخته شد و پس از خنکشدن بـهمـدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس در گرمخانه قـرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، پرگنههـای بـنفش رنـگ بـهعنـوان بـاکتری *انتروکوکـوس* درنظـر گرفتـه شـدند. بـرای تأییـد باکتریهای *انتروکوکوس* از هـر بشـقابک کشـت تعـدادی پرگنه مورد آزمـایشهـای تکمیلـی (بررسـی ویژگـیهـای ریختشناسی *انتروکوکوس*هـا، رنـگآمیـزی گـرم، تولیـد کاتالاز، تحمل نسبت به نمـک طعـام ۶/۵درصـد، رشـد در دمای ۴۵ درجهٔ سلسیوس، و هیدرولیز اسکولین در حضور صفرا) قرار گرفت. تعداد پرگنههـای *انتروکوکـوس* در هـر گـروه آزمایشـی برحسـب لگـاریتم تعـداد در هـر گـرم محتویات ایلئوم گزارش شد (۲۳).

دادههای حاصل با نرمافزار آمـاری SAS، رویـهٔ GLM برای طرح کاملاً تصـادفی تجزیـه و میـانگینهـا بـهکمـک آزمون چنددامنهای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

چالش تجربی با هفت نمونه باکتری انتخاب‌شده از میان ۶۰ باکتری *انتروکوکوس* جداشده، بر مصرف خوراک و افزایش وزن پرندگان بی‌تأثیر بود. باکتری *انتروکوکوس* اثر معنی‌داری بر قابلیت زنده‌مانی و ضریب تبدیل غذایی بلدرچین ژاپنی داشت (P<۰/۰۵). بالاترین قابلیت زنده‌مانی (۹۶/۲۵درصد) و کمترین ضریب تبدیل خوراک مربوط به گروه شاهد و نمونهٔ شمارهٔ سه بود (جدول ۱).

بالاترین ضریب تبدیل غذایی (۲/۶۲) در پرندگان دریافت‌کنندهٔ باکتری شمارهٔ هفت مشاهده شد که با گروه‌های دریافت‌کنندهٔ باکتری *انتروکوکوس فکالیس* سوش ۵۱۲۹۹ (۲/۴۷) و نمونهٔ شمارهٔ چهار (۲/۵۱) تفاوت معنی‌داری نداشت و کمترین زنده‌مانی (۵۳/۱۲درصد) در گروه دریافت‌کنندهٔ باکتری *انتروکوکوس فکالیس* سوش ۵۱۲۹۹ مشاهده شد که با نمونه‌های شمارهٔ سه، چهار، و شش اختلاف نداشت، اما با نمونه‌های شمارهٔ یک، دو، پنج، و هفت تفاوت داشت. بهبود عملکرد در برخی گروه‌های آزمایشی در مقایسه با گروه تیمار شاهد نیز طبیعی است، زیرا برخی از سوش‌های انتروکوک مانند *انتروکوکوس فاشیوم* به‌عنوان پروبیوتیک (۲۱) استفاده می‌شوند.

هر هفت نمونهٔ *انتروکوکوس* به‌همراه سوش باکتری دریافت‌شده از کلکسیون در مقایسه با شاهد منفی تلفات را در دامنهٔ حدود ۲۵ الی ۴۳درصد افزایش دادند. در این تحقیق، باکتری *انتروکوکوس* که حدت بالا داشته باشد، مدنظر نبوده است و فقط به کاهندگی رشد با کمترین میزان تلفات توجه شده است.

جدول ۱. اثر نمونه‌های باکتری *انتروکوکوس* بر عملکرد بلدرچین ژاپنی تا ۲۸روزگی

گروه	مصرف خوراک (گرم)	افزایش وزن بدن (گرم)	ضریب تبدیل خوراک	قابلیت زنده‌مانی (درصد)
شاهد	۲۹۵/۸۸	۱۳۹/۰۳	۲/۱۳^{c}	۹۶/۲۵^{a}
انتروکوکوس فکالیس سوش ۵۱۲۹۹	۳۱۳/۸۰	۱۲۹/۴۷	۲/۴۷^{ab}	۵۳/۱۲^{c}
نمونهٔ ۱	۳۲۵/۹۹	۱۴۴/۸۸	۲/۴۲^{b}	۷۱/۸۷^{b}
نمونهٔ ۲	۳۱۴/۹۵	۱۳۳/۳۳	۲/۳۶^{b}	۶۶/۶۲^{b}
نمونهٔ ۳	۲۹۹/۴۵	۱۳۹/۶۴	۲/۱۴^{c}	۵۳/۱۲^{c}
نمونهٔ ۴	۳۳۶/۶۰	۱۳۳/۹۸	۲/۵۱^{ab}	۵۹/۳۷^{bc}
نمونهٔ ۵	۳۲۲/۳۰	۱۳۲/۹۶	۲/۴۲^{b}	۶۸/۷۵^{b}
نمونهٔ ۶	۳۴۸/۱۵	۱۳۹/۴۹	۲/۵۰^{b}	۵۶/۲۵^{bc}
نمونهٔ ۷	۳۳۴/۴۹	۱۲۷/۴۸	۲/۶۲ ^{a}	۶۸/۷۵^{b}
SEM	۳۳/۵۹	۱۲/۳۵	۰/۱۴۹	۱۱/۲۳
P-value	۰/۵۹	۰/۷۹	۰/۰۵	۰/۰۰۰۳

a-c: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: خطای معیار میانگین‌ها

بنابراین باکتری شمارهٔ هفت انتخاب شد. باتوجه به اینکه کلیه‌ها در تنظیم ترکیبات نیتروژنه و فسفر خون نقش فعالی دارند و پرندگان چالش‌داده‌شده با جدایهٔ شمارهٔ هفت در مقایسه با تیمار شاهد منفی بالاترین سطوح این متابولیت‌ها را در خون نشان دادند، می‌توان آسیب احتمالی در کنش طبیعی کلیه را به‌عنوان علت کاهش عملکرد پیشنهاد داد. نقش مهم کبد در سوخت‌وساز و تنظیم ترکیبات آلی نیتروژنهٔ خون نیز می‌تواند آسیب احتمالی در کنش طبیعی کبد را یادآور شود. باتوجه به کم‌بودن افزایش وزن، بالابودن ضریب تبدیل غذایی، و درصد زنده‌مانی نمونهٔ شمارهٔ هفت به‌عنوان نمونهٔ کاهندهٔ رشد که تلفات بالا نیز ایجاد نمی‌کرد، برای بررسی بیشتر شامل فعالیت همولیز، حساسیت پادزیستی، شناسایی و جداسازی باکتریوفاژ اختصاصی آن، و همچنین فاژدرمانی انتخاب شد.

کاربرد باکتریوفاژها به‌عنوان یک فناوری ضدباکتریایی امیدبخش می‌تواند در مهار دامنهٔ وسیعی از باکتری‌های بیماریزا و کاهندهٔ رشد مفید واقع شوند. استفاده از فاژها برای مهار باکتری‌ها به‌ویژه پاتوژن‌های موجود در خوراک در زنجیرهٔ غذایی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. پژوهش‌های انجام‌شده روی فاژها کارایی مؤثر آنها را در زنجیرهٔ فراوری مواد خوراکی با منشاء دامی نشان داده است. از این دست پژوهش‌ها می‌توان به کاهش *کمپیلوباکتر ژژونی* (۱۶) و *سالمونلا* در طیور (۳) اشاره کرد. در این پژوهش، براساس این فرضیه که فاژهای جداسازی‌شده از مدفوع در مقایسه با فاژهای موجود در سایر محیط‌ها مقاومت و پایداری بیشتری در برابر شرایط دستگاه گوارش دارند، مدفوع طیور به‌عنوان منبع جداسازی باکتریوفاژ انتخاب شد. اگر نمونه‌ای از محلول فاژی روی کشت انبوه سلول‌های باکتریایی به پتری‌دیش محتوی آگار مغذی اضافه شود، به دور هر نقطه‌ای که ذرهٔ فاژی قرار بگیرد، یک ناحیهٔ شفاف (پلاک) یا اصطلاحاً حفره پدید می‌آید. این حفره‌ها محتوی میلیون‌ها ذره فاژ جدید هستند که درنتیجهٔ متلاشی‌شدن سلول‌های باکتریایی آزاد شده‌اند.

اثر نمونه‌های باکتری *انتروکوکوس* بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد غلظت آلبومین و کلسترول سرم بلدرچین ژاپنی تحت تأثیر چالش با نمونه‌های باکتری قرار نگرفت، اما غلظت پروتئین کل سرم در پرندگان چالش‌یافته با سوش ۵۱۲۹۹ و نمونهٔ سه از سایر تیمارها (به استثنای نمونهٔ هفت) بیشتر بود ($P<0/05$). سطح گلوکز خون در پرندگان چالش‌داده‌شده با سوش ۵۱۲۹۹، نمونهٔ یک، نمونهٔ سه، و نمونهٔ شش بیشتر از پرندگان گروه شاهد بود ($P<0/05$). سطوح اسیداوریک و فسفر خون در پرندگان دریافت‌کنندهٔ نمونهٔ باکتری شمارهٔ هفت در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<0/05$). باتوجه به نقش کلیدی کبد و کلیه در تنظیم متابولیت‌هایی چون پروتئین، اسیداوریک، و فسفر، هر گونه عفونت یا مسمومیت در این اندام‌های حیاتی می‌تواند به‌صورت افزایش بیش از مقدار طبیعی این متابولیت‌ها بروز کند. دربارهٔ آزمایش حاضر تحت تأثیر قرارگرفتن کنش طبیعی کبد و کلیه در اثر استقرار *انتروکوکوس* براساس مشاهدهٔ افزایش سطوح پروتئین، اسیداوریک، و فسفر در سرم برخی گروه‌های آزمایشی تأیید می‌شود.

جدایهٔ باکتری منتخب فعالیت بتا-همولیتیک دارد و در محیط آگار خون‌دار همولیز کامل ایجاد می‌کرد. این جدایه در مقایسه با پادزیست‌های دانوفلوکساسین، انروفلوکساسین، دیفلوکساسین، و فلورفنیکول حساس و به بقیهٔ پادزیست‌های استفاده‌شده در این تحقیق مقاوم بود. براساس نتیجهٔ آزمون بیوشیمی الگوی تخمیر قندها، جدایهٔ منتخب واجد کد API # ۵۱۴۳۷۱۱ بود و با درصد شناسایی ۹۹/۷، به‌عنوان *انتروکوکوس فکالیس* توسط پایگاه API web شناسایی شد.

جدول ۲. اثر نمونه‌های باکتری *انتروکوکوس* روی بعضی از فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم بلدرچین ژاپنی

گروه	پروتئین کل (گرم در دسی‌لیتر)	آلبومین (گرم در دسی‌لیتر)	گلوکز (میلی‌گرم در دسی لیتر)	کلسترول (میلی‌گرم در دسی لیتر)	اسیداوریک (میلی‌گرم در دسی لیتر)	فسفر (میلی‌گرم در دسی لیتر)
شاهد	۴/۱۹^{c}	۳/۰۳	۱۱۹/۵۴^{c}	۲۰۱/۷۹	۳/۹۹^{d}	۳/۷۸^{b}
انتروکوکوس فکالیس سوش ۵۱۲۹۹	۴/۹۲^{a}	۳/۱۱	۱۴۰/۰۸^{ab}	۲۰۴/۳۴	۴/۵۱^{bc}	۴/۲۱^{ab}
نمونهٔ ۱	۴/۳۰^{c}	۳/۰۱	۱۳۹/۰۴^{ab}	۱۹۴/۰۰	۴/۰۲^{d}	۳/۷۹^{b}
نمونهٔ ۲	۴/۲۰^{c}	۲/۹۷	۱۳۳/۷۱^{bc}	۱۸۲/۰۲	۴/۳۷^{bcd}	۳/۹۹^{b}
نمونهٔ ۳	۴/۸۲^{a}	۳/۲۳	۱۵۳/۲۰^{a}	۱۸۲/۱۷	۴/۶۴^{ab}	۴/۲۳^{ab}
نمونهٔ ۴	۴/۲۶^{c}	۲/۹۵	۱۲۸/۷۱^{bc}	۱۹۲/۳۶	۴/۲۱^{bcd}	۳/۹۵^{b}
نمونهٔ ۵	۴/۳۶^{bc}	۲/۸۹	۱۳۵/۳۰^{abc}	۲۰۱/۱۹	۴/۱۲^{cd}	۳/۹۹^{b}
نمونهٔ ۶	۴/۱۵^{c}	۳/۰۱	۱۴۴/۹۷^{ab}	۱۹۲/۲۱	۴/۲۱^{bcd}	۳/۸۴^{b}
نمونهٔ ۷	۴/۶۷^{ab}	۳/۱۰	۱۳۵/۵۸^{abc}	۱۸۶/۳۶	۴/۹۶^{a}	۴/۵۷^{a}
SEM	۰/۱۲	۰/۱۲	۱۰/۱۰	۹/۷۶	۰/۲۲	۰/۲۸
P-value	۰/۰۰۰۳	۰/۱۱	۰/۰۳۷	۰/۰۷	۰/۰۰۱	۰/۰۵

a-d: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: خطای معیار میانگین‌ها

جدول ۳. تعداد باکتری‌های *انتروکوکوس* بازیافت‌شده از محتویات رودهٔ کوچک بلدرچین ژاپنی با و بدون درمان باکتریوفاژ

گروه	*انتروکوکوس فکالیس* (10^{7} واحد تشکیل‌دهندهٔ کلنی در هر میلی‌لیتر)	باکتریوفاژ (10^{4} واحد تشکیل‌دهندهٔ پلاک در هر میلی‌لیتر)	تعداد باکتری‌های در محتویات ایلئوم (لگاریتم واحد تشکیل‌دهندهٔ کلنی در هر گرم)
شاهد منفی	–	–	۶/۰۱^{b}
شاهد مثبت	۱۰۰ میکرولیتر	–	۷/۳۳^{a}
درمان فاژی	۱۰۰ میکرولیتر	۱۰۰ میکرولیتر	۵/۹۴^{b}
SEM			۰/۰۹۱
P-value			۰/۰۰۰۱

a-b: تفاوت ارقام در هر ستون با حروف نامشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: خطای معیار میانگین‌ها

شاهد مثبت: پرندگان این گروه فقط باکتری دریافت کردند

شاهد منفی: پرندگان این گروه نه باکتری دریافت کردند و نه فاژ

در مرحلهٔ سوم از غلظت 10^{7} واحد تشکیل‌دهندهٔ کلنی در هر میلی‌لیتر باکتری *انتروکوکوس فکالیس* منتخب و غلظت 10^{4} واحد تشکیل‌دهندهٔ پلاک در هر میلی‌لیتر باکتریوفاژ اختصاصی استفاده شد. چالش دهانی پرندگان با باکتری‌های *انتروکوکوس*، تعداد این باکتری‌ها را در محتویات ایلئومی افزایش داد ($P<0/05$). دریافت دهانی باکتریوفاژ توسط پرندگان چالش‌داده‌شده با *انتروکوکوس فکالیس* سبب کاهش تعداد *انتروکوکوس*‌ها در محتویات ایلئوم شد ($P<0/05$)، به‌طوری‌که از این نظر با گروه شاهد منفی تفاوتی نداشتند.

کاهش کلینزاسیون *انتروکوکوس* مقاوم به وانکومایسین با استفاده از فاژ جداشده از فاضلاب قبلاً در موش مشاهده شده است (۷). پذیرش باکتریوفاژ درمانی در بسیاری از کشورهای صنعتی با سختی مواجه است (۱). پژوهش‌های زیادی در ارتباط با استفاده از فاژ علیه آلودگی باکتریایی مواد خوراکی انجام گرفته است (۸). فاژهای انتروکوکال از بسیاری از منابع جدا شده‌اند. این فاژها از بزاق انسان (۴) و منابع آب (۱۲) به‌دست آمده‌اند. چندین مطالعه قابلیت فاژها را در مهار *انتروکوکوس*‌های مقاوم به وانکومایسین در موش و انسان (۱۳) بررسی کرده‌اند و نتایج نشان داد که باکتریوفاژی که در شرایط آزمایشگاهی فعال و لیتیک است می‌تواند در دستگاه گوارش بلدرچین ژاپنی نیز باعث کاهش تعداد باکتری‌های *انتروکوکوس* شود. نتایج ما مبنی بر توان ضدباکتریایی فاژ علیه *انتروکوکوس فکالیس* با نتایج سایر محققان موافقت دارد (۱۴، ۱۹). باکتریوفاژها قابلیت پیش‌گیری یا درمان بعضی از عفونت‌های باکتریایی در حیوان را ازطریق کاهش استقرار باکتری *انتروکوکوس* در پرنده دارند. به‌هر حال، مشکلاتی نیز در ارتباط با استفاده از فاژها وجود دارد همچون امکان ایجاد مقاومت در برابر فاژ که ممکن است فاژدرمانی را در مورد تعدادی از عفونت‌های باکتریایی محدود کند (۴).

در این آزمایش، باکتریوفاژ لیزکنندهٔ باکتری منتخب جداشده از فاضلاب مرغداری برای کاهش جدایهٔ این باکتری در شرایط آزمایشگاهی و در بلدرچین‌های ژاپنی استفاده شد. این مطالعه نشان داد که باکتریوفاژ به‌دست‌آمده می‌تواند جمعیت باکتری‌های انتروکوکوس را کاهش دهد. به‌هرحال، تاکنون در ارتباط با جداسازی فاژهای لیتیک علیه *انتروکوکوس فکالیس* در ایران گزارشی منتشر نشده است و پژوهش حاضر اولین گزارش در زمینهٔ جداسازی باکتریوفاژهای لیتیک علیه *انتروکوکوس فکالیس* در ایران است. باوجود شک و شبهات در این زمینهٔ تحقیقی، کار آزمایشگاهی دقیق نشان می‌دهد که استفاده از باکتریوفاژها می‌تواند بسیار مؤثر باشد.

باتوجه به مشکلات روزافزون بیماری‌های باکتریایی و مقاومت پادزیستی باکتری‌ها در سراسر دنیا نگرشی دوباره به این رهیافت منطقی خواهد بود. باتوجه به اینکه آزمایش حاضر جزء اولین آزمایش‌ها در زمینهٔ ارزیابی کارایی استفاده از فاژ لیتیک علیه *انتروکوکوس*‌های روده‌ای کاهندهٔ رشد در پرندگان است و نتایج امیدبخشی دربارهٔ کاهش جمعیت *انتروکوکوس*‌های روده‌ای به‌دست آمده است، لازم است در آزمایش‌های تکمیلی بعدی در طول زمان بیشتر نتایج عملکردی و همچنین هیستوپاتولوژی اندام‌های کلیه و کبد بررسی شود. نتایج حاصل از تحقیق حاضر، در رابطه با ایمن‌بودن باکتریوفاژ در توافق با سایر مطالعات انجام‌شده است. ایمن‌بودن فاژهای جداسازی‌شده قبل از استفاده از فاژ در درمان افراد مبتلا به عفونت‌های باکتریایی تأیید شد (۱).

لازم است حساسیت باکتری‌های بیماری‌زا (۲۲) و فرصت‌طلب طیور به باکتریوفاژها بررسی شود تا در صورت لزوم از این فاژها به‌عنوان جایگزین پادزیست‌های درمانی استفاده شوند. باتوجه به اینکه روش‌های گوناگون تجویز باکتریوفاژ ازنظر زمان و تناوب استفاده و همچنین

راه دریافت آن بر کارایی باکتریوفاژ مؤثر است، پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده این موارد بررسی شوند (۱۰).

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مسئولان محترم گنجینهٔ مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی استاد البرزی شیراز بابت اهدای باکتری قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Adams MH (1959) Bacteriophages. New York: International Science Publishers. Pp. 121- 132.

2. Andreatti Filho RL, Higgins JP, Higgins SE, Gaona G, Wolfenden AD, Tellez G and Hargis BM (2007) Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis *in vitro* and *in vivo*. Poultry Science. 86(9): 1904-1909.

3. Atterbury RJ, Van Bergen MA, Ortiz F, Lovell MA, Harris JA, De BA, Wagenaar JA and Allen VM (2007) Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. Applied Environmental Microbiology. 73: 4543-4549.

4. Bachrach G, Zigmond ML, Zlotkin A, Naor R and Steinberg D (2003) Bacteriophage isolation from human saliva. Letters in Applied Microbiology. 36(1): 50-53.

5. Barrow PA and Soothill JS (1997) Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. Trends in Microbiology. 5: 268-271.

6. Beaudoin RN, DeCesaro DR, Durkee DL and Barbaro SE (2007) Isolation of a bacteriophage from sewage sludge and characterization of its bacterial host cell. Rivier Academic. 3(1): 1-8.

7. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN and Powell B (2002) Bacteriophage therapy rescues mice bacteraemia from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Infection and Immunity. 70(1): 204-210.

8. Greer GG (2005) Bacteriophage control of foodborne bacteria. Food Protocol. 68: 1102-1111.

9. Hudson JA, Billington C, Carey-Smith G and Greening G (2005) Bacteriophages as biocontrol agents in food. Food Protocol. 68: 426-437.

10. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM and Donoghue AM (2002) Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. Poultry Science. 81: 1486-1491.

11. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM and Donoghue AM (2003) Bacteriophage treatment of a severe *Escherichia coli* respiratory infection in broiler chickens. Avian Disease. 47: 1399-1405.

12. Huff WE, Huff GR, Rath NC, Balog JM and Donoghue AM (2005) Alternatives to antibiotics: Utilization of bacteriophage to treat colibacillosis and prevent foodborne pathogens. Poultry Science. 84: 655-659.

13. Joerger RD (2003) Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. Poultry Science. 82: 640-647.

14. Letkiewicz S, Miedzybrodzki R, Fortuna W, Weber-Dabrowska B and Górskib A (2009) Eradication of *Enterococcus faecalis* by phage therapy in chronic bacterial prostatitis - Case report. Folia Microbiologica. 54(5): 457-461.

15. Linden PK and Mille CB (1999) Vancomycin-resistant enterococci: the clinical effect of a common nosocomial pathogen. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 33:113-120.

16. Loc Carrillo C, Atterbury RJ, el-Shibiny A, Connerton PL, Dillon E, Scott A and Connerton IF (2005) Bacteriophage therapy to reduce *Campylobacter jejuni* colonization of broiler chickens. Applied Environmental Microbiology. 71: 6554-6563.

17. Lorch A (1999) Bacteriophages: an alternative to antibiotics? Biotechnology and Development Monitor. 39: 14-17.

18. Margaret JS, Marina LB, Alexandru W, Rachel M and Durda S (2010) Arthritis and osteomyelitis associated with *Enterococcus cecorum* infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario, Canada. Veterinary Diagnostic Investigation. 22: 643-645.

19. Ramin MNF, Mary DB and Michael WH (2010) Novel bacteriophages in *Enterococcus* spp. Current Microbiology. 60: 400-406.

20. Sambrook J and Russell DW (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

21. Samli HE, Dezcan S, Koc F, Ozduven M, Okur AA and Senkoylu N (2010) Effects of *Enterococcus faecium* supplementation and floor type on performance, morphology of erythrocytes and intestinal microbiota in broiler chickens. British Poultry Science. 51(4): 564-568.

22. Thomas D and Martin W (2014) Environmental responses and phage susceptibility in foodborne pathogens: implications for improving applications in food safety. Current Opinion in Biotechnology. 26: 45-49.

23. Uchiyama J, Rashel M, Maeda Y, Takemura I, Sugihara S and Akechi K (2008) Isolation and characterization of a novel *Enterococcus faecalis* bacteriophage phi EF24C as a therapeutic candidate. FEMS Microbiology Letters. 278(2): 200-206.

24. Wagenaar JA, Van Bergen MA, Mueller MA, Wassenaar TM and Carlton RM (2010) Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Veterinary Microbiology. 109(3): 275-283.