

بررسی باکتریوفازها و روش جدا کردن آنها

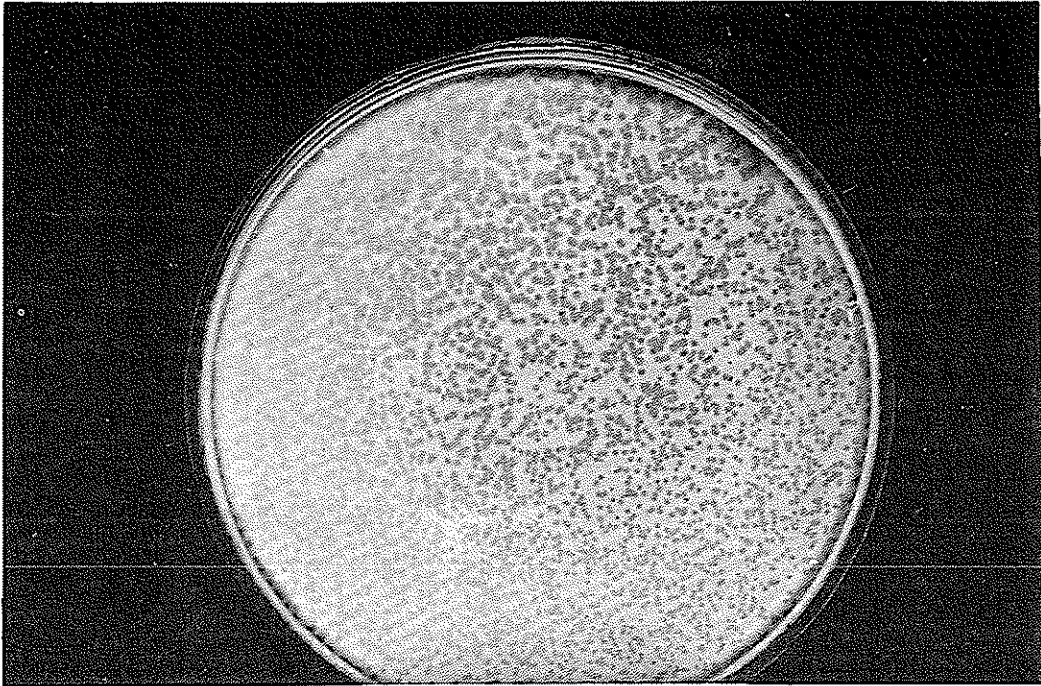
دکتر مسعود کیهانی\*

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

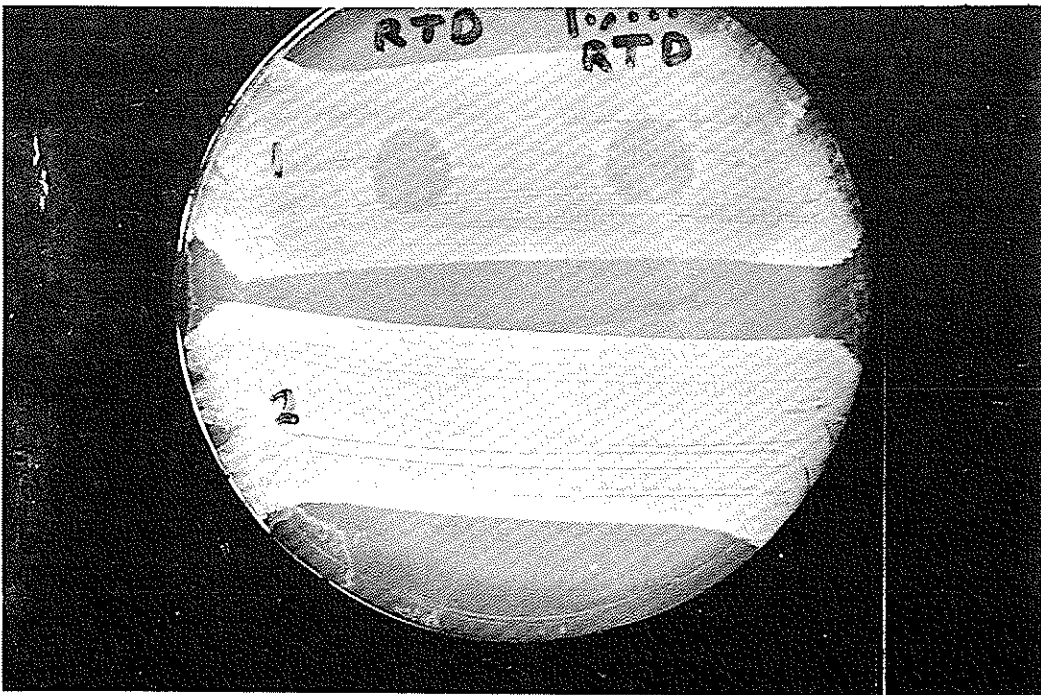
بعضی از باکتریها دارای تعداد زیادی باکتریوفاز میباشند. برای مثال میکرب استافیلوکوک طلائی *Staphylococcus aureus* دارای بیش از ۲۵ باکتریوفاز است. بدین ترتیب بوسیله این باکتریوفازها نه تنها میکرب استافیلوکوک را میتوان تشخیص داد بلکه تیپ‌های مختلف آنرا نیز میتوان مشخص نمود. از اختصاصی بودن باکتریوفازهای استافیلوکوک طلائی برای تعیین تیپ‌های این باکتری در مطالعات اپیدمیولوژیکی استفاده میکنند و با *Staphylococcal phage typing* کانون آلودگی استافیلوکوکی را

باکتریوفازها یا ویروس باکتریها *Bacterial viruses* اجزای هستند که در داخل باکتری زنده رشد و تولید مثل میکنند. هر باکتری دارای باکتریوفاز اختصاصی میباشد که بوسیله آن حل میشود. برای مثال میکرب بروسلا دارای یک باکتریوفاز 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 باکتریوفاز اختصاصی شناخته نشده است (۴ و ۱۴).

از این خاصیت اختصاصی بودن باکتریوفاز بروسلا استفاده کرده و برای تشخیص افتراقی انواع بروسلا بکار میبرند. چنانکه سویه بروسلا بوسیله باکتریوفاز 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). باکتریوفاز 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 می‌نماید (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 می‌نامند (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 می‌نامند. باکتریهای لیزوژنیک Lysogenic را میتوان سوسائل مکانیکی، شیمیایی و یا اشعه اولترا ویوله حل کرد و این روش تبدیل را اینداکشن Induction گویند (۲۰۱).

### شکل و ساختمان باکتریوفاز

برای مطالعه شکل باکتریوفاز از میکروسکوپ الکترونی استفاده می‌کنند. شکل باکتریوفاز A<sub>2</sub> استافیلوکوک طلائی را بعنوان نمونه شرح میدهیم. باکتریوفاز A<sub>3</sub> استافیلوکوک طلائی دارای یک سر و یک دم است. سر این باکتریوفاز پهن عرض ۶۰۰ A<sup>o</sup> انگسترون و دمی عرض ۱۲۰ A<sup>o</sup> و بطول ۲۹۰۰ A<sup>o</sup> انگسترون میباشد. شکل و اندازه باکتریوفاز باکتریهای مختلف یکسان نیست.

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

از نظر ساختمان شیمیایی باکتریوفاز A<sub>3</sub> استافیلوکوک طلائی از پروتئین و DNA یا Desoxyribonucleic acid ساخته شده است و چنانکه آنرا بوسیله شوک اسمزی خردکنیم 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، ۷۰۳).

### 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 می‌چسبند. عامل مهم در الصاق باکتریوفاز به باکتری غلظت نمک محیط کشت است. چنانکه مقدار نمک محیط کشت مساعد Optimum نباشد باکتریوفاز به باکتری ملصق نمی‌گردد. 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، ۷۰).

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 بطورکلی 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

کشت میگردد. وقتی باکتریوفاز بخوبی رشد کرد، محلول آبگوشت TSB صاف و روشن میشود که نشانه آنستکه باکتریها بخوبی حل شده اند. محلول باکتریوفاز را بمدت نیمساعت سانتریفوز نموده و اجساد میکربی را جدا میکنند. محلول روئی Supernatant را از چند صافی کاغذی و سپس از صافی میلی پور Millipore که اندازه سوراخهای آن ۰/۴۵ میکرون است عبور میدهند. محلول بدست آمده باکتریوفاز استریل و آماده تیتراسیون میباشد.

۲- کشت باکتریوفاز بروش آگار دو لایه ای Double agar layer : برای این منظور مقدار متناسب باکتریوفاز 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 قوطی های پتری اضافه می نمایند. پس از جامد شدن آگار روئی، قوطی های پتری را بمدت ۴۸ ساعت در حرارت ۳۷ درجه قرار میدهند. بدین ترتیب باکتریوفاز در آگار روئی رشد و بصورت پلاک هائی ظاهر میگردد (۱). (شکل ۳) (۱۷۰۱۲)

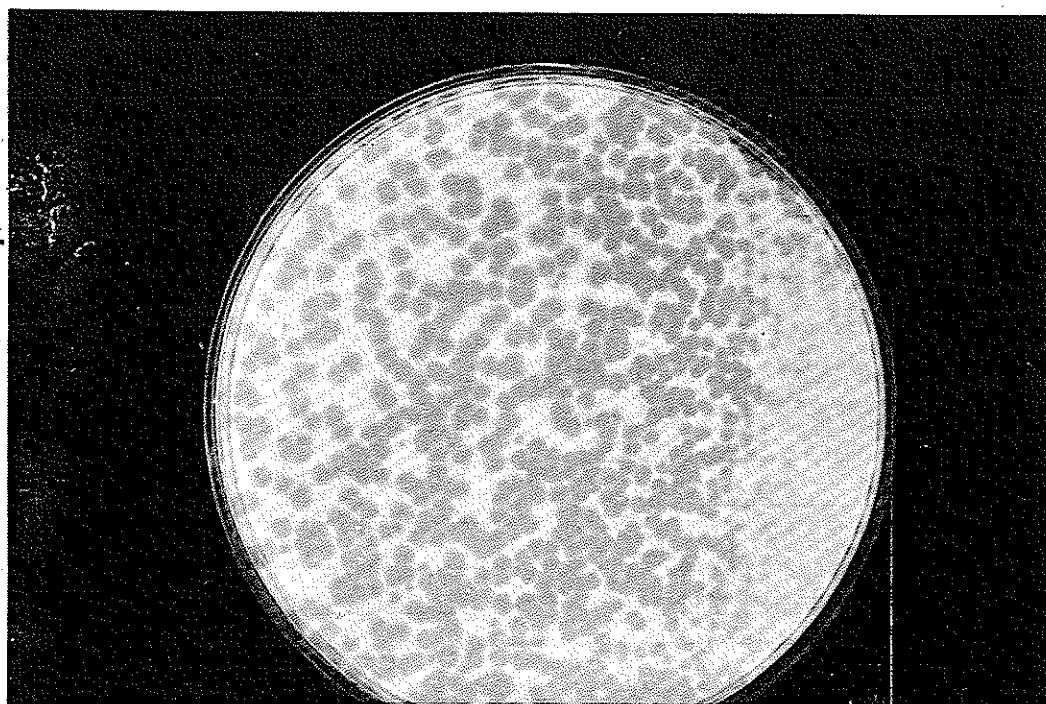
مانند Sonic vibration کوتاه نمود، در نتیجه باکتریها زودتر حل شده و باکتریوفازها آزاد میشوند. باکتریوفازهای آزاد شده دومرتبه به باکتریهای دیگر ملصق شده و عمل عفونت باکتری بوسیله باکتریوفاز از نو آغاز میگردد (۲، ۴۰۳۰۲).

### کشت باکتریوفاز

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

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

اضافه می نمایند. Propagating strain محیط کشت آبگوشت TSB که حاوی باکتریوفاز و باکتری استاندارد میباشد در روی دستگاه تکان دهنده Automatic shaker در حرارت ۳۷ درجه قرار میدهند. بدین ترتیب مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت باکتریوفاز را در حالت تکان



شکل ۳- کشت باکتریوفاز سالمونلا آبورتوس اوویس بروش آگار دولایه ای

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 طلائی کشت می‌دهند.

بدین ترتیب کانون آلودگی استافیلوکوک طلائی 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 بروسلایبورتوس بطور تجربی از باکتریوفاز بروسلایبورتوس استفاده شده است. همچنین در عفونت‌های استافیلوکوکی در اثر استافیلوکوک طلائی، باکتریوفاز 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 باکتریوفازها مشخص نموده. سپس باکتریوفازی که سوبیه استافیلوکوک طلائی را حل میکند بطور غلیظ به بیمار برای درمان می‌دهند (۱۶، ۴، ۳، ۱).

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 کاملا 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 (۱۰، ۲، ۱).

#### تیتراسیون باکتریوفاز

برای تعیین عبارتی تیتراژ 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. RTD عبارتست از رقیق‌ترین محلول باکتریوفاز که باکتری استاندارد را کاملا 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 (۱۶، ۲، ۱).

#### 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 طلائی مشاهده میشود که آنرا Hospital infection می‌نامند. این

بوسیله نگارنده انجام شده اثر سرم ضد باکتریوفاز بخیبی نشان داده شده است (۱۱،۳،۰۱) (شکل ۴).

۵- تولید انترفرون Interferon بوسیله باکتریوفاز: انترفرون عبارت است از یک پادتن غیر اختصاصی Non-specific antibody که با تزریق بعضی از ویروسها و حتی مواد شیمیایی 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 باکتریوفازها در مراحل ابتدایی تجربیات بوده و هنوز روشن نگردیده. تولید انترفرون بوسیله باکتریوفاز 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، باکتریوفاز 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 باکتریوفازها مانند بعضی از ویروسهای دیگر برای تولید انترفرون استفاده کرد (۱۶،۱۵).

#### روش جدا کردن باکتریوفازها

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

در جدا کردن باکتریوفازها باید بخاطر داشت که جدا کردن باکتریوفازهای شناخته شده اهمیت چندانی ندارد زیرا

برای تعیین نوع باکتری بوسیله باکتریوفاز 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 باکتریوفاز در رقت RTD و ده هزار RTD در سطح کشت باکتری قرار میدهند. بعد از ۲۴ ساعت کشت در حرارت ۳۷ درجه نتیجه آزمایش را مطالعه میکنند. چنانکه باکتری بوسیله باکتریوفاز حل شده باشد، نوع باکتری بوسیله باکتریوفاز مشخص میگردد.

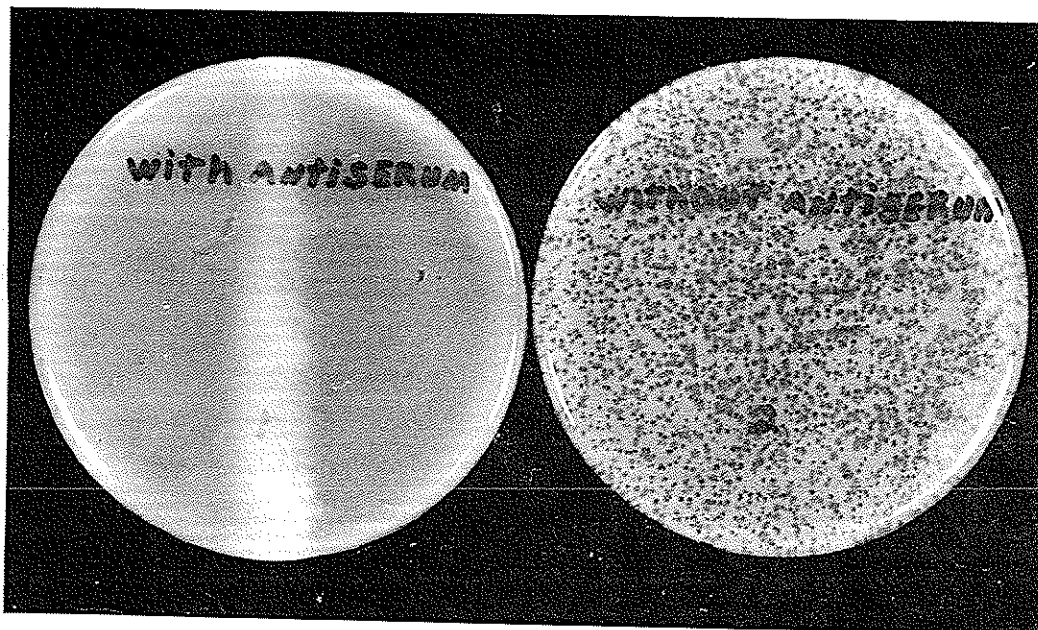
ب- روش دیگر برای تعیین نوع باکتری بوسیله باکتریوفاز روش آگار دو لایه‌ای Double agar layer میباشد. در این روش مقدار متناسب باکتریوفاز و کشت ۲۴ ساعته باکتری مورد آزمایش را به ۲/۵ سانتیمتر مکعب محلول نیمه جامد زلز غذایی در حرارت ۴۵ درجه اضافه می‌مایند. سپس این آگار نیمه جامد را در سطح آگار محیط TSA قوطیهای 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 باکتریوفاز حل شده باشد پلاکهای باکتریوفاز 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 باکتریوفاز Anti bacteriophage serum

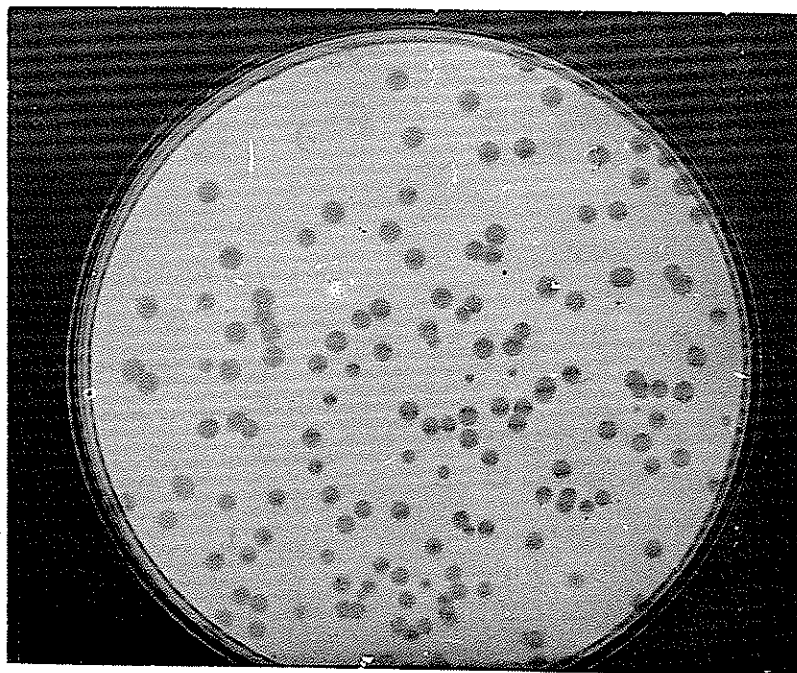
در جدا کردن برخی از باکتریها مانند میکرب بروسلا مفید است. تجربیات در روی اثر سرم ضد باکتریوفاز نشان میدهد که اگر به محیط کشت سرم ضد باکتریوفاز بروسلا اضافه نمایند در مواردیکه میکرب بروسلا حامل باکتریوفاز باشد به جدا کردن میکرب بروسلا کمک می‌نماید.

در این موارد میکرب بروسلا بوسیله باکتریوفاز خود حل میشود و از جدا شدن آن در محیط کشت جلوگیری میگردد. با اضافه کردن سرم ضد باکتریوفاز به محیط کشت، سرم ضد باکتریوفاز بروسلا، باکتریوفاز را خنثی نموده و در نتیجه میکرب بروسلا با آسانی در محیط رشد می‌نماید. آزمایشاتی که

علاوه بر صرف وقت یک آزمایشگاه انتهایی نمیتواند  
 باکتریوفاز تمام میکربها را جدا و نگاهداری نماید. از این  
 نظر برای نگاهداری 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.

میکنند. 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 میدهم. جدا کردن باکتریوفاز سالمونلا آبورتوس اوویس *S. abortus ovis*: سوپه 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 میکروبی 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 میدهم 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 عباری 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 سوپه 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 سوارخهائی با اندازه 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 میکروب 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

محلول آبگوشت قرار داده سپس آنرا بوسیله کشت در محیط قوطی پتری افزایش و تقویت میکنند (۱۸۰۱۳۰۲۰۱)

## 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.