

Isolation and Characterization of Effective Lytic Bacteriophages to Control the Antibiotic Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Infections in Noth-West of Iran

Raheleh Majdani¹Mansour Zamanifar²Hamideh Lamakan³¹ Assistant of Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran² MSc Student in Microbial Biotechnology, Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran³ MSc in Microbial Biotechnology, Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran

(Received August 29, 2023 ; Accepted March 16, 2024)

Abstract

Background and purpose: Due to emerging antibiotic-resistant bacteria, finding effective alternative antimicrobials to combat the bacteria is unavoidable. Bacteriophage therapy as a biologic and highly potentiated therapeutic approach was considered recently. This study aimed to isolate lytic bacteriophage(s) against multi-drug resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and evaluate the morphological and biological characteristics as candidates for phage therapy.

Materials and methods: Obtained clinical isolates from Shahid Madani Hospital in Tabriz, were confirmed as *K. pneumoniae*, and an antibiotic sensitivity test was performed using the standard disk diffusion method. Then, the isolation of lytic bacteriophages against 16 selected antibiotic-resistant bacterial isolates was carried out. Briefly, samples for phage isolating were gained from sewage water and centrifuged. The supernatant was filtered using a 0.45 µm Filter, mixed with fresh tripton soy broth medium and magnesium sulfate and incubated at room temperature. Then, the solution was mixed with chloroform and evaluation of plaque formation was performed using the agar bilayer technique. Genomes of the bacteriophages were subjected to molecular analysis using *Hind* III and *EcoRV* enzymes. Host range determination of the isolated bacteriophages was evaluated using spot test and agar bilayer techniques. Three bacteriophages with a broader host range than others were selected for more characterization. One step growth curve of the phages was drawn and their latent period and burst size were investigated. Then, the stability and survivability of the isolated lytic bacteriophages to different temperatures (-20, 37, 50°C), different rates of pH value (3,4,5,7,9,11,12), and also UV radiation were evaluated. Finally, morphological characteristics of bacteriophage with the broadest host range (PKpMa2/20) were investigated using electron microscopy.

Results: 36 clinical bacterial isolates were confirmed as *K. pneumoniae* based on standard biochemical tests. In the antibiotic susceptibility assay, it was revealed that the highest and lowest rates of antibiotic resistance belonged to cefazoline (80%) and tobramycin (26%) respectively. Isolation of bacteriophages against all 16 selected isolates was successfully performed. After the extraction of the genomes of the phages, a high variety of genome sequences was detected according to molecular analysis. In host range determination, PKpMa2/20 had lytic activity against 11 of 15 isolates. In a study of the one-step growth curve of the phages, with a broader host range than other isolated bacteriophages, latent periods were shown 10, 10, and 15 min and their burst size were 350, 210, and 180 pfu/ml respectively. All of the phages showed appropriate stability in temperatures of -20 and 37 °C. In the temperature of 50°C, the survivability of PKpMa2/20 was higher than two other phages. Also, PKpMa2/20 was stable in the pH range of 3-12; in the pH value of 3, two other phages stability was ceased but PKpMa2/20 showed appropriate lytic activity. In electron microscopy, PKpMa2/20 had a short tail length of 10 nm and a head with a diameter of about 60 nm that possibly belonged to the family *Podoviridae*.

Conclusion: Based on appropriate lytic effects, latent period, and burst size of the three isolated bacteriophages in the current study, especially PKpMa2/20, and also, their high stability to different temperatures, pH, and UV radiation, they could be considered as candidates for phage therapy to control resistant strains of *K. pneumoniae* infections but for the therapeutic use of these phages, more molecular analysis is needed.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic resistance, bacteriophage, phage therapy, *Podoviridae*

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34(232): 38-49 (Persian).

Corresponding Author: Raheleh Majdani - Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran.
(E-mail: rahelehmajdani@yahoo.com)

جداسازی و بررسی خصوصیات باکتریوفاژهای لیتیک موثر جهت کنترل عفونت‌های حاصل از باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه* مقاوم به آنتی‌بیوتیک در شمال غرب ایران

راحله مجدانی^۱

منصور زمانی فر^۲

حمیده لامکان^۳

چکیده

سابقه و هدف: با ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، یافتن مواد ضد میکروبی جایگزین موثر برای مبارزه با این باکتری‌ها اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. باکتریوفاژ درمانی به عنوان یک رهیافت بیولوژیک دارای پتانسیل درمانی بالا اخیراً در این زمینه مورد توجه قرار گرفته است. این مطالعه با هدف جداسازی باکتریوفاژهای لیتیک علیه جدایه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه* دارای مقاومت‌های چندگانه آنتی‌بیوتیکی و ارزیابی خصوصیات زیستی و شکلی آن‌ها به عنوان کاندیداهایی برای فاژ درمانی، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، جدایه‌های بالینی به دست آمده از بیمارستان شهید مدنی شهر تبریز با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی به عنوان *کلبسیلا پنومونیه* تایید شدند و سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها با استفاده از روش استاندارد انتشار از دیسک انجام شد. سپس جداسازی باکتریوفاژهای لیتیک علیه ۱۶ جدایه باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک صورت گرفت. به‌طور خلاصه نمونه‌های آب اخذ شده جهت جداسازی فاژ از فاضلاب سانتریفیوژ گردید. مایع رویی با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد و با محیط کشت تریپتون سوی براث تازه و سولفات منیزیم مخلوط شد و در دمای اتاق انکوبه گردید. سپس محلول موردنظر با کلروفرم مخلوط شده و ارزیابی تولید پلاک با استفاده از روش آگار دو لایه انجام شد. ژنوم باکتریوفاژ با استفاده از آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRV* تحت روند آنالیز مولکولی قرار گرفت. تعیین طیف میزبانی فاژهای جداسازی شده با استفاده از روش نقطه‌ای و آگار دو لایه انجام گرفت. سه باکتریوفاژ دارای طیف میزبانی وسیع‌تر برای بررسی بیش‌تر خصوصیات آن‌ها انتخاب شدند. منحنی رشد یک مرحله‌ای فاژها ترسیم گردید و زمان نهفته و ساینز انفجاری آن‌ها مشخص شد سپس پایداری و زنده مانی باکتریوفاژهای لیتیک در برابر دماهای مختلف (۲۰، ۳۷، ۵۰ درجه سلسیوس)، محدوده‌های مختلف pH (۳، ۴، ۵، ۷، ۹، ۱۱ و ۱۲) و هم‌چنین تشعشع UV بررسی گردید. در نهایت خصوصیات شکلی باکتریوفاژ دارای بیش‌ترین طیف میزبانی (*PKpMa2/20*) با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشخص شد.

یافته‌ها: ۳۶ جدایه بالینی باکتریایی براساس تست‌های استاندارد بیوشیمیایی به عنوان *کلبسیلا پنومونیه* تایید تشخیص شدند. در آزمایش سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به سفازولین (۸۰ درصد) و توبرامایسین (۲۶ درصد) مشاهده گردید. سپس جداسازی باکتریوفاژها علیه همه ۱۶ جدایه منتخب با موفقیت انجام شد. بعد از استخراج ژنوم فاژهای جدا شده تنوع توالی بالایی مشخص گردید. در مورد تعیین طیف میزبانی، *PKpMa2/20* دارای اثر کشندگی روی ۱۱ جدایه از ۱۶ جدایه مذکور بود. در مطالعه منحنی رشد یک مرحله‌ای سه فاژ دارای طیف میزبانی بیش‌تر، زمان نهفته سه فاژ جدا شده به ترتیب ۱، ۱۰ و ۱۵ دقیقه و ساینز انفجاری آن‌ها به ترتیب ۳۵۰، ۲۱۰ و ۱۸۰ برای *PKpMa2/20*، *P8* و *P10* ارزیابی گردید. هر سه فاژ پایداری خوبی در دمای بین ۲۰- و ۳۷ درجه سلسیوس نشان دادند. در دمای ۵۰ درجه سلسیوس اثر لیتیک فاژ *PKpMa2/20* بیش‌تر از دو فاژ دیگر بود. فاژ *PKpMa2/20* در بازه pH بین ۳ تا ۱۲ فعال بود در حالی که دو فاژ دیگر در میزان pH برابر با ۳ کاملاً از بین رفتند. در بررسی میکروسکوپ الکترونی، باکتریوفاژ *PKpMa2/20* یک دم کوتاه با طول ۱۰ نانومتر و یک سر با قطر ۶۰ نانومتر داشت که احتمالاً متعلق به خانواده پودوویریده بود.

استنتاج: با توجه به اثرات لیتیک مناسب و نیز زمان نهفته و ساینز انفجاری خوب سه فاژ منتخب جدا شده در این مطالعه به خصوص (*PKpMa2/20*) و هم‌چنین پایداری مناسب آن‌ها در برابر دماهای مختلف و محدوده pH مختلف و نیز تشعشع UV، این فاژها می‌توانند به عنوان کاندیدا جهت استفاده در فاژ درمانی برای کنترل سویه‌های مقاوم *کلبسیلا پنومونیه* عفونی مورد توجه قرار گیرند، اما جهت استفاده درمانی نیاز به تجزیه و تحلیل مولکولی بیش‌تری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، باکتریوفاژ، فاژ درمانی، پودوویریده

E-mail: rahelehmajdani@yahoo.com

مؤلف مسئول: راحله مجدانی-مراغه: دانشگاه مراغه، دانشکده علوم پایه

۱. استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۳. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۷ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۸/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۲/۲۶

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یک باکتری گرم منفی و غیرمتحرک است که معمولاً در محیط وجود داشته و عمدتاً در بیماران مبتلا به دیابت، اختلال مصرف الکل یا پنومونی اکتسابی دیده می‌شود (۱، ۲). این باکتری یکی از عوامل بیماری‌زایی است که مقاومت چند دارویی بالایی از خود نشان می‌دهد و توسعه مقاومت‌های ضد میکروبی در کلبسیلا پنومونیه منجر به کاهش اثر بخشی درمان‌های مرسوم در برابر این باکتری شده است. افزایش مداوم در میزان مرگ و میر به دلیل مقاومت ضد میکروبی، ضرورت توجه به رویکردهای جایگزین در امر درمان را مشخص می‌سازد (۳). درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به دارو بسیار چالش برانگیز است، زیرا به طور فزاینده‌ای نیاز به تجویز طولانی مدت دوزهای بالای آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف دارد (۴). استفاده از باکتریوفازها (فاژها) برای درمان عفونت‌های باکتریایی به عنوان یک روش درمانی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها در مبارزه با باکتری‌های مقاوم در برابر چند دارو در حال ظهور مجدد می‌باشد (۵). انتشار باکتریوفازها در روی کره زمین بسیار فراگیر بوده و آن‌ها را می‌توان در خاک، پساب‌های شهری، اقیانوس‌ها، مکان‌هایی با شرایط محیطی سخت، محیط بیمارستانی و ... یافت (۶). در رویکردهای فاژ درمانی اختصاصی از یک یا چند فاژ حاصل از یک بانک فاژی بر اساس فعالیت لیتیک آن‌ها در برابر سویه‌های باکتریایی جدا شده از عفونت بیمار استفاده می‌کنند (۷). مزیت‌های فاژ درمانی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی می‌توان در خصوصیت‌های ذاتی فاژها از جمله فعالیت به عنوان باکتریوساید، خود تنظیمی دارویی، سمیت ذاتی پایین، اختلالات در فلور طبیعی بدن، پتانسیل ضعیف ایجاد مقاومت باکتریایی، عدم تداخل با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، جداسازی سریع، امکان فرمولاسیون و به کارگیری متنوع و استفاده در پاکسازی بیوفیلم جستجو کرد (۴). در مطالعه حاضر پس از جداسازی باکتریوفازهای

لیتیک علیه جدایه‌های بیمارستانی کلبسیلا پنومونیه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه خصوصیات زیستی و شکلی فاژ دارای بیش‌ترین طیف میزبانی، به عنوان کاندیدای فاژ درمانی، ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های باکتریایی کلبسیلا پنومونیه

در این مطالعه توصیفی - مقطعی، تعداد ۵۰ نمونه باکتریایی کلبسیلا پنومونیه طی خرداد ماه تا شهریور ماه سال ۱۴۰۰ از بیمارستان شهید مدنی تبریز از بیماران بستری شده در این بیمارستان به دست آمد. جهت تایید تشخیص باکتری، در مرحله اول از نمونه‌های دریافتی، کشت شبانه بر روی محیط تریپتون‌سوی آگار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس تهیه گردید و پس از بررسی خواص مورفولوژیکی تست‌های بیوشیمیایی استاندارد جهت تایید تشخیص کلبسیلا پنومونیه انجام شد (۸).

تست آنتی بیوگرام

بعد از تایید تشخیص، جدایه‌های باکتریایی به دست آمده تحت آزمایش سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار از دیسک و براساس دستورالعمل ارائه شده توسط سازمان استانداردهای بالینی و آزمایشگاه (CLSI) قرار گرفتند (۹، ۱۰). در این آزمایش از ده آنتی‌بیوتیک (پاتن طب-ایران)، سفازولین، آمپی‌سیلین، سفکسیم، نالیدیکسیک اسید، جنتامایستین، سیپروفلوکساسین، ایمپینم، توبرامایسن، سفپیم و کوتریموکسازول، استفاده گردید. جهت انجام آزمایش در ابتدا باکتری‌ها در ۵ میلی‌لیتر محیط تریپتون‌سوی براث (TSB) تلقیح شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۶ ساعت گرماگذاری شدند. پس از ایجاد کدورت نیم مک فارلند، با سواب در سطح محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. مناطق مهار رشد در پلیت‌ها اندازه‌گیری و جدایه‌ها به عنوان مقاوم، نیمه‌حساس یا حساس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مطابق

با دستورالعمل‌های کمیته ملی استاندارد آزمایشگاه‌های بالینی گروه‌بندی شدند. سپس تعداد ۱۶ جدایه دارای بیش‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی جهت جداسازی باکتریوفاژ علیه آن‌ها (به عنوان میزبان) انتخاب شدند.

جداسازی باکتریوفاژها

ابتدا در چند مرحله از آب ورودی تصفیه‌خانه فاضلاب مراغه نمونه‌گیری شد و مراحل جداسازی باکتریوفاژ به صورت جداگانه برای هر یک از جدایه‌های باکتریایی (به عنوان میزبان) انجام شد. مایع رویی از فیلتر با اندازه منافذ ۰/۴۵ میکرومتری عبور داده شد. سپس به آن، محیط تریپتون‌سوی‌براث، محیط کشت تازه باکتریایی (در اوایل مرحله رشد لگاریتمی با میزان جذب نوری ۰/۷-۰/۴) و هم‌چنین سولفات منیزیم یک درصد اضافه و گرماگذاری گردید. به محلول مورد نظر کلروفرم افزوده و به مدت دو ساعت در دمای محیط قرار داده شد. محلول فوق سانتریفیوژ شده و در آخر محلول رویی حاوی فاژ از فیلتر عبور داده شد. در نهایت ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی فاژها در برابر باکتری با استفاده از روش کشت آگار دو لایه صورت گرفت (۸). در این روش مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی برداشته با سه میلی‌لیتر محیط آگار نرم ذوب شده ۰/۷ درصد (با دمای حدود ۵۰ درجه سلسیوس) و ۲۰۰ میکرولیتر از باکتری میزبان مخلوط گردید و روی پلیت نرمال آگار (با درصد آگار ۱/۵ درصد) ریخته و در ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید و حضور پلاک‌های فاژی و اندازه آن‌ها بررسی شد.

خالص‌سازی باکتریوفاژها

به منظور خالص‌سازی پلاک‌های فاژی، پلاک لیتیک با استفاده از سرمپلر استریل برداشته، در محیط TSB تلقیح شد. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری، سانتریفیوژ شده و مایع رویی از فیلتر عبور داده شد. در نهایت ایجاد پلاک‌ها با روش آگار دو لایه مورد بررسی گرفت (۱۱).

تعیین تیتراژ باکتریوفاژ خالص‌سازی شده

نمونه‌های فاژی در لوله‌های حاوی TSB، به صورت رقت سریالی ده برابر رقیق شده و با تکنیک آگار دو لایه کشت و گرماگذاری گردید. تعداد فاژهای موجود در محیط اولیه از روی شمارش پلاک‌های تشکیل شده روی محیط کشت تعیین و عیار فاژهای مربوط، به صورت PFU/ml بیان گردید (۱۲). نتایج حاصل از سه بار تکرار می‌باشد.

تجزیه و تحلیل مولکولی باکتریوفاژهای جدا شده

پس از تعیین تیتراژ فاژهای جداسازی شده، جهت آنالیز مولکولی فاژها، استخراج ژنوم باکتریوفاژها با استفاده از کیت استخراج DNA ویروسی (QIAamp DNA Mini Kit) ساخت شرکت کیاژن آلمان انجام شد. هضم آنزیمی ژنوم‌های استخراج شده از باکتریوفاژها با دو آنزیم *EcoRV* و *HindIII* و در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به طور خلاصه، مقدار دو میکرولیتر آنزیم، دو میکرولیتر Universal Buffer، شش میکرولیتر آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر از DNA استخراجی فاژ مورد استفاده قرار گرفت. برای هردو آنزیم دمای انکوباسیون ۳۷ درجه سلسیوس در نظر گرفته شد زمان گرماگذاری برای آنزیم *EcoRV* دو ساعت و برای آنزیم *HindIII* پنج ساعت بود. پس از انجام هضم آنزیمی برای غیر فعال کردن آنزیم‌ها، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند. مشاهده نتایج استخراج DNA و هضم آنزیمی نمونه‌ها در ژل آگارز ۰/۸ درصد در دستگاه الکتروفورز افقی صورت گرفت و ولتاژ دستگاه در محدوده ۹۰-۱۰۰ mV تنظیم گردید و نتایج با استفاده از دستگاه UV مشاهده شده و عکس برداری از نمونه‌ها انجام شد.

تعیین طیف میزبانی باکتریوفاژها

برای تعیین طیف میزبانی، قدرت لیز کنندگی فاژهای جداسازی شده بر روی سایر جدایه‌های باکتریایی

کلیسیلا پنومونیه مورد استفاده در این مطالعه علاوه بر میزبان اصلی خود نیز سنجیده شد. برای این منظور از تست نقطه‌ای استفاده گردید. ابتدا باکتری در محیط کشت تریپتون سوسوی برات تلقیح شد و بعد بر روی محیط تریپتون سوسوی آگار کشت داده شد. سپس یک قطره از سوسپانسیون فاژی بر روی محیط کشت باکتری ریخته و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرما گذاری شد. پس از طی این مدت ایجاد پلاک توسط هر یک از فاژها مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد سه تا از فاژهای دارای بیشترین طیف میزبانی برای بررسی بیش تر خصوصیات زیستی و میزان ماندگاری آن‌ها انتخاب شدند که از بین آن‌ها نیز فاژی که بیشترین طیف میزبانی را داشت برای بررسی شکلی توسط میکروسکوپ الکترونی انتخاب گردید. نتایج حاصل از سه بار تکرار آزمایش می‌باشد.

سنجش تعدد بهینه عفونت (MOI)

برای تعیین میزان MOI سه باکتریوفاژ منتخب (P8, P10, P12)، ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت تازه تلقیح شد. پس از گرماگذاری کشت باکتری، میزان جذب نوری به $OD_{600} = 0.4$ رسانده شد. سپس سوسپانسیون فاژی با MOI های مختلف به باکتری اضافه گردید و به مدت ۳/۵ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرما گذاری گردید. پس از گذشت زمان مورد نظر، نمونه سانتریفیوژ شد و در رقت‌های مختلف با افزودن کشت شبانه باکتری، آزمایش آگار دو لایه انجام گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت گرما گذاری در ۳۷ درجه سلسیوس، پلاک‌های فاژی حاصل شمارش گردید (۱۳).

آزمایش رشد یک مرحله‌ای (One step growth)

کشت باکتریایی با $OD_{600} = 0.4-0.5$ با نمونه فاژی مورد نظر با MOI بهینه ۰/۰۱ با یکدیگر مخلوط گردیدند و سوسپانسیون حاصل به منظور جذب باکتریوفاژ، پنج دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرما

گذاری شد. برای حذف باکتریوفاژهای جذب نشده، سوسپانسیون فاژ و باکتری به مدت ۱ دقیقه در انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۰۰۰۰ و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد و محلول رویی حذف گردید. رسوب حاصل با ۵ میلی لیتر محیط TSB مخلوط گردید (۱۳). این مرحله برای هر فاژ سه بار تکرار گردید.

سنجش پایداری باکتریوفاژهای جدا شده در دماهای مختلف

پایداری باکتریوفاژهای منتخب به روش احمدی و همکاران با کمی تغییرات در سه دمای ۲۰-، ۳۷ و ۵۰ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا تیتراژ باکتریوفاژها با استفاده از تکنیک آگار دو لایه تعیین شد. سپس سوسپانسیون‌های باکتریایی در دماهای موردنظر به مدت دو ساعت گرماگذاری گردید. در مرحله آخر یک بار دیگر تیتراژ با استفاده از تکنیک آگار دو لایه تعیین شد و اعداد به دست آمده با هم مقایسه گردیدند (۱۴). آزمون براساس سه بار تکرار انجام شد.

سنجش پایداری باکتریوفاژهای جدا شده در pH های مختلف

سنجش میزان حساسیت به pH، با استفاده از روش احمدی و همکاران با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا سوسپانسیون‌های فاژی با تیتراژ مشخص در pH های ۳، ۴، ۵، ۷، ۹، ۱۱ و ۱۲ به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری گردید. بعد از این مدت تیتراژ با استفاده از تکنیک آگار دو لایه تعیین شد. مقایسه اندازه تیتراژ قبل و بعد از گرماگذاری در pH مورد نظر، معیار پایداری فاژ در آن pH در نظر گرفته شد (۱۴). مراحل آزمایش در هر قسمت سه بار تکرار گردید.

میکروسکوپ الکترونی

فاژ دارای وسیع‌ترین طیف میزبانی جهت بررسی خصوصیات شکلی با میکروسکوپ الکترونی تعیین

گردید. در ابتدا نمونه فاژی با تیترا بالا (10^8 تا 10^9 PFU در هر میلی لیتر) تهیه گردید و از فیلتر 0.45 میکرومتر عبور داده شد. در ادامه نمونه فاژی در دور $2500g$ به مدت 60 دقیقه سانتریفیوژ گردید تا باکتریوفاژ رسوب کند. سپس رسوب باکتریوفاژ دو مرتبه با محلول استات آمونیوم 0.1 مولار شستشو گردید. برای رنگ آمیزی، ابتدا نمونه فاژی بر روی گریدهای مسی ثابت شد و سپس با اورانیل استات دو درصد رنگ آمیزی شده و رنگ اضافی توسط کاغذ فیلتر حذف گردید. در آخر نمونه ها برای مشاهده مورفولوژی باکتریوفاژ به وسیله میکروسکوپ TEM (Leo 906, Germany) با ولتاژ 100 کیلوولت مورد بررسی قرار گرفت و تصاویر گرفته شده با فاژهای استاندارد شناسایی شده قبلی موجود در منابع معتبر جهت شناسایی باکتریوفاژ مقایسه گردید (۱۵).

ملاحظات اخلاقی پژوهش

کد اخلاق مطالعه حاضر IR.MARAGHEHPHC.1402.025 بوده و این پژوهش در کار گروه/کمیته اخلاق در پژوهش دانشکده علوم پزشکی مراغه به تصویب رسیده است.

یافته ها

شناسایی و خالص سازی باکتری

در این مطالعه در مجموع 36 نمونه باکتریایی به عنوان سویه های باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان امام رضای شهر تبریز مورد تایید قرار گرفت. نمونه های جمع آوری شده بعد از 24 ساعت کشت روی محیط تریپتون سوس آگار در دمای 37 درجه سلسیوس، کلنی های درشت و موکوئیدی ایجاد کردند که حالتی چسبناک داشتند. نمونه ها در رنگ آمیزی گرم، باکتری میله ای گرم منفی تشخیص داده شدند و کلنی ها در محیط کشت مک کانکی آگار به رنگ صورتی و لاکتوز مثبت بودند.

تعیین سویه های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی بیوتیک بر اساس داده های به دست آمده میزان مقاومت سویه های کلبسیلا پنومونیه بیمارستانی نسبت به آنتی بیوتیک های سفازولین (80 درصد)، آمپی سیلین (73 درصد)، کو تریمو کسازول (73 درصد)، جنتامایسین (60 درصد)، ایمپنم (60 درصد)، سیفکسیم (53 درصد)، نالیدیکسیک اسید (53 درصد)، سپروفلوکسین (46 درصد)، سفپیم (33 درصد) و توپرامایسین (26 درصد) بود. 16 جدایه که دارای بیش ترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی براساس نتایج حاصل از سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی در مطالعه حاضر بودند، جهت جداسازی فاژهای لیتیک علیه آن ها انتخاب شدند.

جداسازی باکتریوفاژهای لیتیک علیه کلبسیلا پنومونیه در این مطالعه پس از شش بار نمونه گیری از تصفیه خانه فاضلاب شهر مراغه و انجام مراحل جداسازی به طور جداگانه برای یافتن حداقل یک فاژ علیه هر یک از 16 جدایه مقاوم به آنتی بیوتیک کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه (که شامل جدایه های دارای مقاومت آنتی بیوتیکی بیش تر بود)، 16 فاژ لیتیک به طور موفقیت آمیز جداسازی گردید.

نتایج استخراج ژنومی و هضم آنزیمی

از هر 16 باکتریوفاژ جدا سازی شده، استخراج ژنوم با موفقیت انجام شد که نتایج آن در تصویر شماره ۱ (الف) نشان داده شده است. اندازه تمامی 16 ژنوم استخراج شده بزرگتر از 10 کیلو جفت باز بود. در نتایج آزمایش هضم آنزیمی که در تصویر شماره ۱ (ب) نشان داده شده است. از 16 جدایه باکتریوفاژ، 12 جدایه توسط آنزیم HindIII و 9 جدایه نیز توسط آنزیم EcoRV برش خوردند.

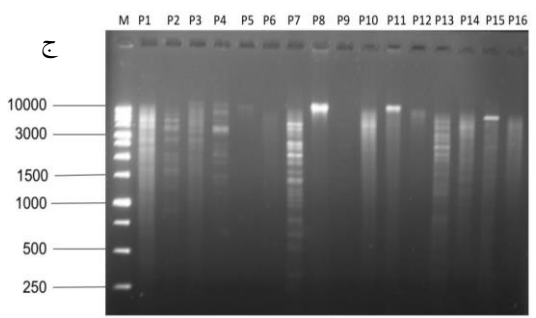
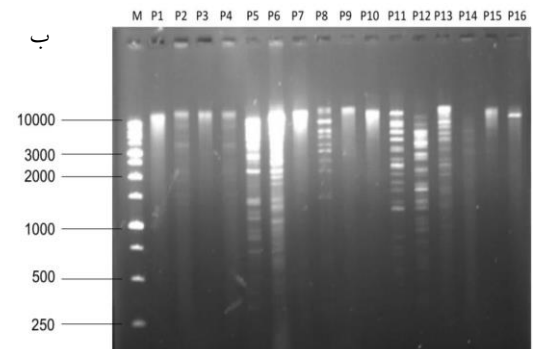
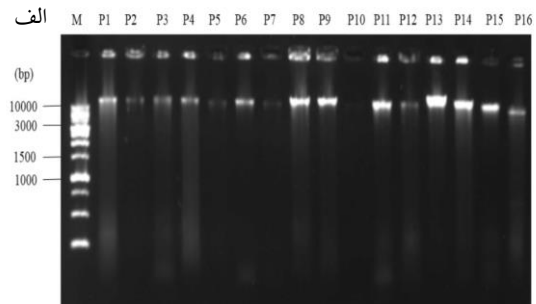
طیف میزبانی بودند که برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند (جدول شماره ۱). بر اساس نتایج جدول شماره ۱، فاش PKpMa2/20 با قدرت لیز ۱۱ نمونه باکتری کلبسیلا پنومونیه دارای بیش‌ترین طیف میزبانی بود و دو فاش P8 و P10 هر کدام دارای قدرت لیز ۹ نمونه باکتریایی از ۱۶ جدایه بودند.

جدول شماره ۱: طیف میزبانی و اثر لیزکنندگی باکتریوفازهای جداسازی شده علیه جدایه‌های بالینی کلبسیلا پنومونیه، (جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه: Kp، جفت باز: bp، فاش‌های جداسازی شده: P، فاش منتخب با بیش‌ترین طیف میزبانی: PKpMa2/20)

فاز	جدایه‌های باکتریایی کلبسیلا پنومونیه لیز شده در اثر فاش‌های جداسازی شده در این مطالعه
P1	Kp1
P2	Kp2, Kp11
P3	Kp3, Kp11
P4	Kp4, Kp11
P5	Kp5, Kp11
P6	Kp6, Kp11
P7	Kp7, Kp11
P8	Kp1, Kp2, Kp3, Kp5, Kp6, Kp7, Kp8, Kp11, Kp12
P9	Kp9
P10	Kp2, Kp3, Kp4, Kp7, Kp8, Kp9, Kp10, Kp11, Kp13
P11	Kp11
PKpMa2/20	Kp1, Kp2, Kp3, Kp4, Kp7, Kp8, Kp10, Kp12, Kp13, Kp14, Kp15
P13	Kp5, Kp6, Kp13
P14	Kp14, Kp11
P15	Kp5, Kp6, Kp15

تعیین تعدد بهینه عفونت (MOI)

در این مطالعه MOI بهینه فاش‌های جداسازی شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه که دارای بیش‌ترین طیف میزبانی بودند. MOI بهینه فاش جداسازی شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه (Kp8) برابر ۰/۰۱ بود که بالاترین تیترا به دست آمده توسط لیزات فاش P8 (۲/۹۷×۱۰^۸ pfu/ml) بود. MOI بهینه فاش جداسازی شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه (Kp10) برابر ۰/۱ بود و بالاترین میزان لیزات آن برابر با ۳/۸۲×۱۰^۷ pfu/ml بود. MOI بهینه فاش جداسازی شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه (Kp12) برابر ۰/۰۱ بود و بالاترین لیزات فاش به دست آمده برای PKpMa2/20 برابر با ۳/۳۹×۱۰^۹ pfu/ml برآورد گردید (جدول شماره ۲).



تصویر شماره ۱: DNA ژنومی ۱۶ باکتریوفاز جداسازی شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه، الف: نتایج استخراج ژنومی باکتریوفازها، ب: نتایج هضم آنزیمی DNA ژنومی باکتریوفازهای جداسازی شده از تصفیه خانه فاضلاب مراغه با آندونوکلئاز HindIII ج: نتایج هضم آنزیمی DNA ژنومی باکتریوفازهای جداسازی شده از تصفیه خانه فاضلاب مراغه با آندونوکلئاز EcoRV چاهک شماره ۱: نشانگر مولکولی ۱۰۰۰۰bp (سیناژن، ایران)، چاهک ۲: P1، چاهک ۳: P2، چاهک ۴: P3، چاهک ۵: P4، چاهک‌های ۲ تا ۱۶ مربوط به ژنومهای فاش‌های جداسازی شده می‌باشد P1 تا P16.

تعیین طیف میزبانی باکتریوفازها

پس از جداسازی باکتریوفازها، قدرت لیز هر باکتریوفاز به صورت جداگانه علیه همه ۱۵ جدایه باکتری کلبسیلا پنومونیه دیگر با روش تست نقطه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت که حاکی از آن بود که سه باکتریوفاز P8، P10 و PKpMa2/20 دارای بیش‌ترین

جدول شماره ۲: MOI بهینه فازهای P8، P10 و PKpMa2/20 (*Kp: K.pneumoniae*)

Phage titers PKpMa2/20 (pfu/mL)	Phage titers p10 (pfu/mL)	Phage titers p8 (pfu/mL)	MOI	pfu of phage	CFU of Kp8, Kp10, Kp12
2/63×10 ⁹	1/22×10 ⁷	1/16×10 ⁸	۱۰۰	۱۰ ^۸	۱۰ ^۶
1/09×10 ⁹	1/97×10 ⁷	1/93×10 ⁸	۱۰	۱۰ ^۸	۱۰ ^۷
2/02×10 ⁹	2/19×10 ⁷	1/89×10 ⁸	۱	۱۰ ^۸	۱۰ ^۸
3/02×10 ⁹	3/82×10 ⁷	2/49×10 ⁸	۰/۱	۱۰ ^۷	۱۰ ^۸
3/39×10 ⁹	3/02×10 ⁷	2/34×10 ⁸	۰/۰۱	۱۰ ^۶	۱۰ ^۸
3/00×10 ⁹	1/90×10 ⁷	2/97×10 ⁸	۰/۰۰۱	۱۰ ^۵	۱۰ ^۸
2/29×10 ⁹	2/36×10 ⁷	2/36×10 ⁸	۰/۰۰۰۱	۱۰ ^۴	۱۰ ^۸

سیتینیک رشد یک مرحله ای

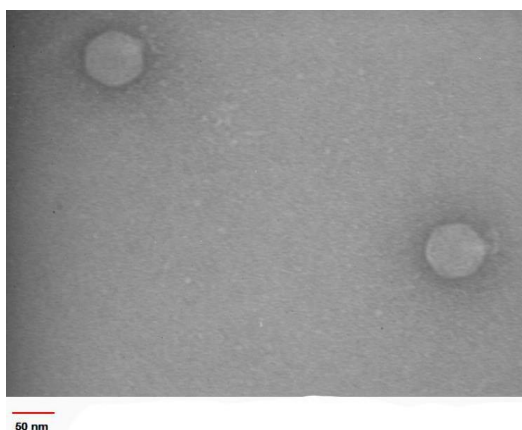
نتایج رشد یک مرحله ای فاز PKpMa2/20 جدا شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه نشان دهنده دوره نهفتگی ۱۰ دقیقه ای فاز و ساینز انفجاری ۳۵۰ pfu/ml در دقیق ۳۵ بود که به عنوان نسبت تعداد نهایی ذرات فاز آزاد شده به تعداد اولیه سلول های باکتریایی در طول دوره نهایی محاسبه می شود. نتایج منحنی رشد یک مرحله ای فاز P8 جدا شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه نشان دهنده یک دوره نهفتگی ۱۰ دقیقه ای با ساینز انفجاری ۲۱۰ pfu/ml بود. نتایج رشد یک مرحله ای فاز P10 نیز نشان داد که این فاز دارای دوره نهفتگی بلندتر نسبت به دو فاز دیگر و در حدود ۱۵ دقیقه بود و ساینز انفجاری این فاز در حدود دقیقه ۳۵ و ۱۸۰ pfu/ml بود.

بررسی خصوصیات مورفولوژیک باکتریوفاز منتخب PKpMa2/20 با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری باکتریوفاز PKpMa2/20 دارای یک سر بزرگ و چند وجهی (۶۰ nm × ۶۰ nm) و یک دم کوتاه با طول حدود ۱۰ nm بود که به نظر می رسد متعلق به خانواده Podoviridae باشد (تصویر شماره ۲).

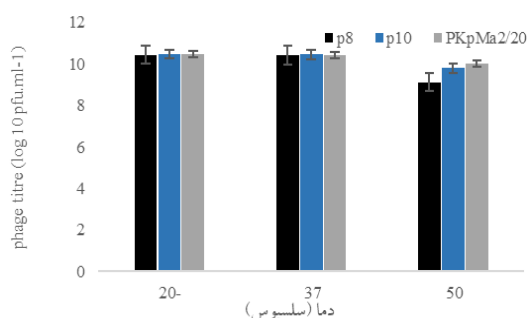
تاثیر دما و pH بر سه باکتریوفاز منتخب

نتایج نشان دهنده پایداری سه باکتریوفاز در دماهای ۳۷ و ۲۰- درجه سلسیوس به مدت دو ساعت بود به طوری که در این طیف دمایی، کاهش تیتراژی مشاهده نگردید، اما با افزایش دما و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس تیتراژ سه فاز کاهش یافت. با این حال کاهش اندکی در میزان ماندگاری هر سه فاز مشاهده گردید. در بین فازهای مورد

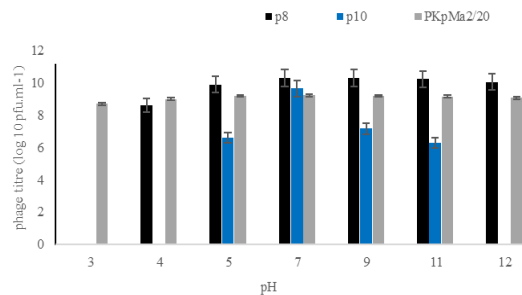
بررسی، بیشترین کاهش در میزان زندهمانی در فاز P8 با ۲۰ درصد کاهش مشاهده گردید (نمودار شماره ۱). نتایج تاثیر pH روی باکتری ها در نمودار شماره ۲ آمده است.



تصویر شماره ۲: باکتریوفاز لیتیک PKpMa2/20، دارای بیشترین طیف میزبانی برای جدایه های کلبسیلا پنومونیه مورد استفاده، براساس مشخصات ذکر شده فاز PKpMa2/20 متعلق به خانواده Podoviridae می باشد، فلش ها منطقه سر و دم باکتریوفاز را نشان می دهند.



نمودار شماره ۱: نمودار پایداری حرارتی فازهای PKpMa2/20 و p8، p10 میله های خطا نشان دهنده انحراف استاندارد از سه آزمایش مستقل است که به صورت تکراری انجام شده اند. با توجه به آنالیزهای انجام شده ارتباط معناداری از نظر آماری میان لگاریتم تیتراژی و زمان وجود دارد ($P < 0.05$) نتایج بر اساس سه تکرار است.



نمودار شماره ۲: پایداری فازهای منتخب فازهای PKpMa2/20 و p8, p10 در شرایط اسیدی و قلیایی مختلف، میله‌های خطا نشان‌دهنده انحراف استاندارد از سه آزمایش مستقل است که به صورت تکراری انجام شده‌اند. با توجه به آنالیزهای انجام شده ارتباط معناداری از نظر آماری میان لگاریتم تیتراژ فازی و pH وجود دارد ($P < 0.05$). نتایج بر اساس سه تکرار است.

با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده در این آزمایش، پایداری سه فاز P8, P10 و PKpMa2/20 در pH های مختلف متفاوت از هم بود. در این میان فاز P10 دارای محدوده فعالیت کم‌تری نسبت به دو فاز دیگر بود به این صورت که بیش‌ترین ماندگاری را در pH=7 داشت و در pH های قلیایی و اسیدی فعالیت آن کاهش یافت به طوری که در pH های کم‌تر از 5 و بیش‌تر از 11 فعالیت آن به صفر رسید، اما فاز P8 تا pH=4 را تحمل کرده و فعالیت آن در pH های 7 تا 12 تقریباً ثابت باقی ماند. فاز PKpMa2/20 دامنه فعالیت بیش‌تری نسبت به دو فاز دیگر داشت به طوری که هم در pH قلیایی و هم اسیدی فعالیت خود را حفظ کرد. با این وجود در شرایط قلیایی عملکرد بهتری داشت.

بحث

کلبسیلا پنومونیه یکی از عوامل بیماری‌زای مهم انسانی است که باعث عفونت‌های بیمارستانی فرصت‌طلب به‌ویژه در میان بیماران دچار نقص ایمنی می‌شود (۱۶). استفاده گسترده از درمان آنتی‌بیوتیکی مسئول بروز سویه‌های کلبسیلا دارای مقامات چندگانه آنتی‌بیوتیکی می‌باشد (۱۷). با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد باکتریوفازها، در سال‌های اخیر، انتظارات از این ذرات

جادویی به‌عنوان عوامل درمانی موثر بالقوه برای کنترل عفونت‌های غیر قابل درمان بسیار بالا رفته است (۱۸، ۱۹). در پژوهشی توسط اسدپور و همکاران بر روی فراوانی کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتا لاکتاماز وسیع‌الطیف و مقاوم به چند دارو، بیش‌ترین میزان مقاومت این جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۹۲ درصد)، آموکسی‌سیلین (۸۷/۶ درصد) و اریترومايسين (۸۴/۶ درصد) بوده و آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و آمیکاسین موثرترین آنتی‌بیوتیک‌ها در این مطالعه بودند (۲۰).

در مطالعه‌ای که سوفی و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام دادند یک باکتریوفاز اختصاصی KPP-5 که دارای یک سر چند وجهی و یک دم کوتاه بود و متعلق به خانواده *Podoviridae* بود، علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا سازی گردید (۲۰). یک باکتریوفاز اختصاصی دیگر نیز علیه کلبسیلا پنومونیه نیز شناسایی شده است که دارای یک سر چند وجهی و یک دم کوتاه بود و در خانواده *Podoviridae* قرار گرفت (۲۱). نتایج هر دوی این مطالعات با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت. یکی از جالب‌ترین ویژگی‌های فازهای جدا شده در مطالعه‌ی کنونی رشد بسیار سریع آن‌ها در سلول‌های باکتری کلبسیلا پنومونیه بود. در شرایط استاندارد آزمایشگاهی، دوره نهفتگی سه فاز منتخب جداسازی شده در حدود ۱۵ تا ۱۰ دقیقه بود که یک دوره نسبتاً کوتاه بوده و ساینز انفجاری برای لیز سلول میزبان که سبب آزادسازی فازهای جدید از سلول‌های میزبان شد، در حدود دقایق ۳۰ تا ۴۰ و به میزان ۱۸۰ pfu/ml تا ۳۵۰ تخمین زده شد.

در مطالعه رحیم‌زاده ترابی و همکاران، نتایج منحنی رشد یک مرحله‌ای که بر اساس الگوی رشد و فعالیت لیتیک سه باکتریوفاز جدید PΦBw-Kp1، PΦBw-Kp2 و PΦBw-Kp3 جدا شده علیه باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه حاصل از زخم سوختگی ترسیم شد، بیانگر این بود که زمان انفجار در هر سه باکتریوفاز در حدود دقیقه‌ی ۸۰ بود (۲۲).

Wang و همکاران نیز تحقیقی در سال ۲۰۲۱ بر روی درمان ترکیبی فاژ vB_KpnM_P-KP2 و آنتی بیوتیک جنتامایسین روی پنومونی حاد ناشی از سرو تیپ K47 کلبسیلا پنومونیه انجام دادند که زمان ترکیدگی باکتریوفاژ vB_KpnM_P-KP2 جدا شده را در حدود دقیقه ۳۰ تخمین زدند (۲۳).

در مطالعه حاضر آنالیز مولکولی باکتریوفاژهای لیتیک جداسازی شده نشان داد که ژنوم این فاژها از نوع DNA دو رشته ای بود. ژنوم این فاژها همگی حدوداً دارای وزن مولکولی مشابهی بودند و اندازه ژنومی آنها نیز بزرگ تر از ۱۰ کیلو جفت باز تخمین زده شد. در رابطه با هضم آنزیمی نیز این فرآیند توسط آنزیم های *HindIII* و *EcoRV* صورت گرفت که آنزیم *EcoRV* قادر به هضم نه ژنوم فاژی بود و آنزیم *HindIII* توانست ۱۲ ژنوم فاژ را هضم کند.

در مطالعه جدید دیگر پس از استخراج ژنوم سه باکتریوفاژ لیتیک PΦBw-Kp1، PΦBw-Kp2 و PΦBw-Kp3 جداسازی شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه و هضم آنزیمی این باکتریوفاژها، تجزیه و تحلیل الگوی هضم آنزیم های محدود کننده نشان داد که فاژ PΦBw-Kp1 توسط آنزیم های *Bam HI*، *Hind III* و *KpnI* برش خورده و هضم شد. فاژ PΦBw-Kp2 به آنزیم های محدود کننده مورد استفاده در این آزمایش حساس بود و فاژ PΦBw-Kp3 به آنزیم های *HindIII* و *EcoRI* حساس بود (۲۲).

بررسی پایداری فاژها تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند pH، یونها و دما به منظور کاربرد موفقیت آمیز این ذرات در زمینه های دارویی و پزشکی ضروری است و از اهمیت بسیاری برخوردار است (۲۴).

Sundaramoorthy و همکاران در سال ۲۰۲۱ تحقیقی در رابطه با پایداری فاژ KpG جدا شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه در pH های مختلف انجام دادند. مطالعات پایداری pH در این تحقیق نشان داد که فاژ KpG در pH های پایین ناپایدار بود و فاژ تنها در pH های بین ۷ تا

۱۱ قادر بود توانایی زنده مانگی خود را حفظ کند (۲۵). در مطالعه حاضر نیز مطابق با تحقیق Sundaramoorthy و همکاران دو باکتریوفاژ P8 و P10 توانایی تحمل pH های پایین را نداشتند در حالی که بر خلاف مطالعه Sundaramoorthy و همکاران فاژ منتخب PKpMa2/20 قادر بود در pH های پایین نیز فعالیت لیتیک خود را به خوبی حفظ کند. Feng و همکاران نیز در سال ۲۰۲۱ میزان پایداری فاژ لیتیک BUCT556A جداسازی شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه را در دماها و pH های مختلف مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیقات نشان داد که فاژ BUCT556A در pH های بین ۴ تا ۱۳ پایدار بود (۲۶). میزان بقای فاژ لیتیک BUCT556A که در دمای ۴۰ تا ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه گرماگذاری شده بود به آرامی کاهش یافت اما با این وجود، فاژ در این دماها هنوز فعالیت لیتیک خود را حفظ کرده بود. با این حال، با رسیدن دما به ۸۰ درجه سلسیوس تقریباً هیچ فاژی زنده نمانده بود. در مطالعه ای حاضر نیز هر سه فاژ توانایی لیتیک خود را در دماهای بالا حفظ کردند و کاهش بسیار کمی در میزان زنده مانگی هر سه فاژ جداسازی شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه رخ داد که بیانگر این بود که هر سه فاژ جداسازی شده در این مطالعه P8، P10 و فاژ منتخب PKpMa2/20 قابلیت تحمل حرارتی بالایی داشتند. در مطالعه ای که Sofy و همکاران در سال ۲۰۲۱ در رابطه با طیف میزبانی فاژ لیتیک KPP-5 جداسازی شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه انجام دادند، نتایج این تحقیق گویای این بود که فاژ لیتیک KPP-5 دارای فعالیت لیتیک قوی بود و قادر بود ۷۳ درصد از سویه های کلبسیلا پنومونیه جدا شده از منابع مختلف را با کارایی بالا لیز کند (۲۱). بررسی طیف فعالیت لیتیک باکتریوفاژهای جدا شده در مطالعه حاضر نیز نشان داد فاژ منتخب PKpMa2/20 با تأثیر بر ۷۳ درصد از سویه های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی بیوتیک، دارای وسیع ترین طیف میزبانی بود که با نتایج بررسی شده در مطالعه ای سوفی و همکاران مطابقت داشت. با

کنترل عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه معرفی نمود. البته قبل از استفاده کاربردی درمانی از این فازها، آنالیز مولکولی کامل‌تر این فازها و تعیین توالی ژنومی آن‌ها جهت اطمینان از عدم وجود هر گونه ژن آسیب‌زا و نیز بررسی پایداری فازها در برابر عوامل محیطی دیگر ضروری می‌باشد.

توجه به طیف میزبانی گسترده سه باکتریوفاز جداسازی شده در این مطالعه علیه جدایه‌های بالینی مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلبسیلا پنومونیه و همچنین ماندگاری مناسب آن‌ها در دماها و pH های مختلف که از عوامل مهم در انتخاب فازهای مناسب جهت فاز درمانی می‌باشد، می‌توان این فازها را به عنوان کاندیداهای مناسبی جهت

References

1. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. Microbiol Mol Biol Rev 2016; 80(3): 629-661.
2. Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouveleki LS, Daikos GL. *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. Pediatr Infect Dis J 2017; 36(10): 1002-1005.
3. Verma I, Semalty R, Gabrani R. Antibiotic-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and Targeted Therapy. Antimicrobial Resistance 2022; 2022: 233-252.
4. Kortright KE, Chan BK, Koff JL, Turner PE. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. Cell Host Microbe 2019; 25(2): 219-232.
5. Eskenazi A, Lood C, Wubbolts J, Hites M, Balarjishvili N, Leshkasheli L, et al. Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Nature Communications 2022; 13(1): 1-14.
6. Clokie MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. Bacteriophage 2011; 1(1): 31-45.
7. Friman VP, Soanes-Brown D, Sierocinski P, Molin S, Johansen HK, Merabishvili M, et al. Pre- adapting parasitic phages to a pathogen leads to increased pathogen clearance and lowered resistance evolution with *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis bacterial isolates. J Evol Biol 2016; 29(1): 188-198.
8. Pallavali RR, Degati VL, Lomada D, Reddy MC, Durbaka VRP. Isolation and in vitro evaluation of bacteriophages against MDR-bacterial isolates from septic wound infections. PLoS One 2017; 12(7): e0179245.
9. Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. American Society for Microbiology 2009; 121-144.
10. CLSI C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical Lab Standards Institute 2021.
11. Jun JW, Kim JH, Shin SP, Han JE, Chai JY, Park SC. Characterization and complete genome sequence of the Shigella bacteriophage pSf-1. Res Microbiol 2013; 164(10): 979-986.
12. Majdani R. Isolation of lytic bacteriophages against pathogenic *Escherichia coli* strains in poultry in the northwest of Iran. Archives of Razi Institute 2016; 71(4): 235-244.
13. Wang Z, Zheng P, Ji W, Fu Q, Wang H, Yan Y, et al. SLPW: a virulent bacteriophage targeting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro and in vivo. Front Microbiol 2016; 7: 934.
14. Ahmadi M, Karimi Torshizi MA, Rahimi S, Dennehy JJ. Prophylactic Bacteriophage Administration More Effective than Post-

- infection Administration in Reducing *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Shedding in Quail. *Front Microbiol* 2016; 7(1): 1253.
15. Knezevic P, Kostanjsek R, Obreht D, Petrovic O. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* specific phages with broad activity spectra. *Curr Microbiol* 2009; 59(2): 173-180.
16. Pan YJ, Lin TL, Chen YY, Lai PH, Tsai YT, Hsu CR, et al. Identification of three podoviruses infecting *Klebsiella* encoding capsule depolymerases that digest specific capsular types. *Microb Biotechnol* 2019; 12(3): 472-486.
17. Drulis-Kawa Z, Mackiewicz P, Kęsik-Szeloch A, Maciaszczyk-Dziubinska E, Weber-Dąbrowska B, Dorotkiewicz-Jach A, et al. Isolation and characterisation of KP34—a novel ϕ KMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 90(4): 1333-1345.
18. Qin J, Wu N, Bao J, Shi X, Ou H, Ye S, et al. Heterogeneous *Klebsiella pneumoniae* co-infections complicate personalized bacteriophage therapy. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 10: 608402.
19. Asadpour L, Nahavandinejhad M. Frequency of extended spectrum beta lactamase producing multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* in urinary tract infections in Rasht. *J Ilam Univ Med Sci* 2017; 25(2): 82-90.
20. Sofy AR, El-DougDoug NK, Refaey EE, Dawoud RA, Hmed AA. Characterization and full genome sequence of novel KPP-5 lytic phage against *Klebsiella pneumoniae* responsible for recalcitrant infection. *Biomedicines* 2021; 4(9): 342.
21. Eckstein S, Stender J, Mzoughi S, Voge K, Kühn J, Frieze D, et al. Isolation and characterization of lytic phage TUN1 specific for *Klebsiella pneumoniae* K64 clinical isolates from Tunisia. *BMC Microbiol* 2021; 21(1): 186.
22. Torabi LR, Naghavi NS, Doudi M, Monajemi R. Efficacious antibacterial potency of novel bacteriophages against ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn wound infections. *Iran J Microbiol* 2021; 13(5): 678.
23. Wang Z, Cai R, Wang G, Guo Z, Liu X, Guan Y, et al. Combination therapy of phage vB_KpnM_P-KP2 and gentamicin combats acute pneumonia caused by K47 serotype *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol* 2021; 12: 674068.
24. Abdallah K, Tharwat A, Gharieb R. High efficacy of a characterized lytic bacteriophagen combination with thyme essential oil against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in chicken products. *Iran J Vet Res* 2021; 22(1): 24-32.
25. Sundaramoorthy NS, Thoathathi S, Bhaskaran M, GaneshPrasad A, Nagarajan S. Phages from Ganges River curtail in vitro biofilms and planktonic growth of drug resistant *Klebsiella pneumoniae* in a zebrafish infection model. *AMB Express* 2021; 11(1): 27.
26. Feng J, Gao L, Li L, Zhang Z, Wu C, Li L, Zhang Z, Wu C, Li F, et al. Characterization and genome analysis of novel *Klebsiella* phage BUCT556A with lytic activity against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Virus Res* 2021; 303: 198506.