

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

Raheleh Majdani¹

Mansour Zamanifar²

Hamideh Lamakan³

¹ Assistant of Professor, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran

² MSc Student in Microbial Biotechnology, Faculty of Basic Sciences, University of Maragheh, Maragheh, Iran

³ 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 به‌عنوان 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 به‌عنوان کاندیداهایی برای فاژ درمانی، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی-مقطعی، جدایه‌های بالینی به‌دست آمده از بیمارستان شهید مدنی شهر تبریز با استفاده از تست‌های استاندارد بیوشیمیایی به‌عنوان *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 کلروفورم مخلوط شده و ارزیابی تولید پلاک با استفاده از روش آگار دو لایه انجام شد. ژنوم باکتریوفاژ با استفاده از آنزیم‌های *EcoRV* و *HindIII* 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 ماندن 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 به‌عنوان *کلبسیلا پنومونیه* تایید تشخیص شدند. در آزمایش سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به سفازولین (۸۰ درصد) و توبراماسین (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 به‌عنوان 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

لیتیک علیه جدایه‌های بیمارستانی کلبسیلا پنومونیه دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه خصوصیات زیستی و شکلی فاز دارای بیش‌ترین طیف میزبانی، به عنوان کاندیدای فاز 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 آنتی‌بیوگرام

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، توپرامایسن، 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 به‌عنوان مقاوم، نیمه‌حساس یا حساس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مطابق

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 به‌طور فزاینده‌ای نیاز به تجویز طولانی مدت دوزهای بالای آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف دارد (۴). استفاده از باکتریوفازها (فاژها) برای درمان عفونت‌های باکتریایی به‌عنوان 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 فاز درمانی اختصاصی از یک یا چند فاز حاصل از یک بانک فازی بر اساس فعالیت لیتیک آن‌ها در برابر سویه‌های باکتریایی جدا شده از عفونت بیمار استفاده می‌کنند (۷). مزیت‌های فاز درمانی را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی می‌توان در خصوصیت‌های ذاتی فازها از جمله فعالیت به‌عنوان 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 به‌کارگیری متنوع و استفاده در پاکسازی بیوفیلم جستجو کرد (۴). در مطالعه حاضر پس از جداسازی باکتریوفازهای

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 سرسمپلر 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 لیزکنندگی فاژهای جداسازی شده بر روی سایر جدایه‌های باکتریایی

گذاری شد. برای حذف باکتریوفازهای جذب نشده، سوسپانسیون فاز 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 فاز سه بار تکرار گردید.

سنجش پایداری باکتریوفازهای جدا شده در دماهای مختلف

پایداری باکتریوفازهای 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 باکتریوفازها با استفاده از تکنیک آگار دو لایه تعیین شد. سپس سوسپانسیون‌های باکتریایی در دماهای مورد نظر 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 باکتریوفازهای 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 فاز 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 فاز در آن pH در نظر گرفته شد (۱۴). مراحل آزمایش در هر قسمت سه بار تکرار گردید.

میکروسکوپ الکترونی

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

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 سوی‌براث تلقیح شد و بعد بر روی محیط تریپتون سوی آگار کشت داده شد. سپس یک قطره از سوسپانسیون فاز 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 فازها مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد سه تا از فازهای دارای بیش‌ترین طیف میزبانی برای بررسی بیش‌تر خصوصیات زیستی و میزان ماندگاری آن‌ها انتخاب شدند که از بین آن‌ها نیز فازهای 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 باکتریوفاز 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 فاز 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 فاز حاصل شمارش گردید (۱۳).

آزمایش رشد یک مرحله‌ای (One step growth)

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

تعیین سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک بر اساس داده‌های به دست آمده میزان مقاومت سویه‌های کلبسیلا پنومونیه بیمارستانی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های سفازولین (۸۰ درصد)، آمپی‌سیلین (۷۳ درصد)، کوتریموکسازول (۷۳ درصد)، جنتامایسین (۶۰ درصد)، ایمی‌پنم (۶۰ درصد)، سیفکسیم (۵۳ درصد)، نالیدیکسیک اسید (۵۳ درصد)، سپروفلوکسین (۴۶ درصد)، سفپیم (۳۳ درصد) و تویرامایسین (۲۶ درصد) بود. ۱۶ جدایه که دارای بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی براساس نتایج حاصل از سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه حاضر بودند، جهت جداسازی فازهای لیتیک علیه آن‌ها انتخاب شدند.

جداسازی باکتریوفازهای لیتیک علیه کلبسیلا پنومونیه در این مطالعه پس از شش بار نمونه‌گیری از تصفیه‌خانه فاضلاب شهر مراغه و انجام مراحل جداسازی به‌طور جداگانه برای یافتن حداقل یک فاز علیه هر یک از ۱۶ جدایه مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه (که شامل جدایه‌های دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیش‌تر بود)، ۱۶ فاز لیتیک به‌طور موفقیت‌آمیز جداسازی گردید.

نتایج استخراج ژنومی و هضم آنزیمی

از هر ۱۶ باکتریوفاز جدا سازی شده، استخراج ژنوم با موفقیت انجام شد که نتایج آن در تصویر شماره ۱ (الف) نشان داده شده است. اندازه تمامی ۱۶ ژنوم استخراج شده بزرگتر از ۱۰ کیلو جفت باز بود. در نتایج آزمایش هضم آنزیمی که در تصویر شماره ۱ (ب) نشان داده شده است. از ۱۶ جدایه باکتریوفاز، ۱۲ جدایه توسط آنزیم HindIII و ۹ جدایه نیز توسط آنزیم EcoRV برش خوردند.

گردید. در ابتدا نمونه فاژی با تیترا بالا (10^8 تا 10^9 PFU در هر میلی‌لیتر) تهیه گردید و از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر عبور داده شد. در ادامه نمونه فاژی در دور ۲۵۰۰g به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید تا باکتریوفاز رسوب کند. سپس رسوب باکتریوفاز دو مرتبه با محلول استات آمونیوم ۰/۱ 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 نمونه‌ها برای مشاهده مورفولوژی باکتریوفاز به وسیله میکروسکوپ TEM (Leo 906, Germany) با ولتاژ ۱۰۰ کیلوولت مورد بررسی قرار گرفت و تصاویر گرفته شده با فازهای استاندارد شناسایی شده قبلی موجود در منابع معتبر جهت شناسایی باکتریوفاز 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.

یافته‌ها

شناسایی و خالص سازی باکتری

در این مطالعه در مجموع ۳۶ نمونه باکتریایی به عنوان سویه‌های باکتری کلبسیلا پنومونیه جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان امام رضای شهر تبریز مورد تایید قرار گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده بعد از ۲۴ ساعت کشت روی محیط تریپتون‌سوی آگار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، کلنی‌های درشت و موکوئیدی ایجاد کردند که حالتی چسبناک داشتند. نمونه‌ها در رنگ آمیزی گرم، باکتری میله‌ای گرم منفی تشخیص داده شدند و کلنی‌ها در محیط کشت مک کانکی آگار به رنگ صورتی و لاکتوز مثبت بودند.

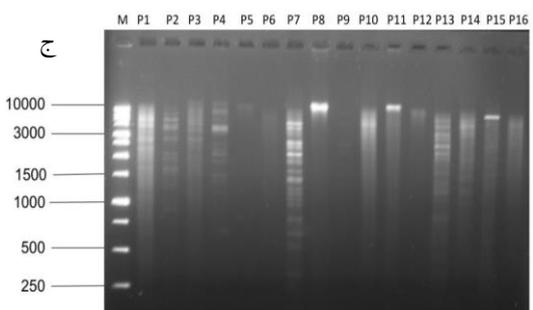
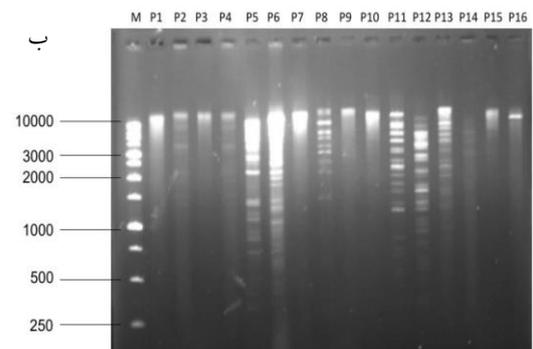
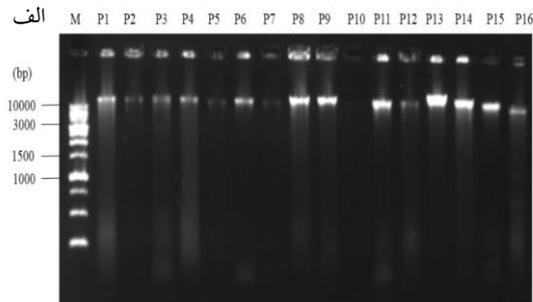
طیف میزبانی بودند که برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند (جدول شماره ۱). بر اساس نتایج جدول شماره ۱، فائز PKpMa2/20 با قدرت لیز ۱۱ نمونه باکتری کلبسیلا پنومونیه دارای بیش‌ترین طیف میزبانی بود و دو فائز P8 و P10 هر کدام دارای قدرت لیز ۹ نمونه باکتریایی از ۱۶ جدایه بودند.

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

| فائز | جدایه‌های باکتریایی کلبسیلا پنومونیه لیز شده در اثر فائزهای 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 تعداد بهینه عفونت (MOI)

در این مطالعه MOI بهینه فائزهای جداسازی شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه که دارای بیش‌ترین طیف میزبانی بودند. MOI بهینه فائز جداسازی شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه (Kp8) برابر ۰/۰۱ بود که بالاترین تیتراژ به دست آمده توسط لیزات فائز P8 (۲/۹۷ × ۱۰^۸ pfu/ml) بود. MOI بهینه فائز 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 فائز جداسازی شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه (Kp12) برابر ۰/۰۱ بود و بالاترین لیزات فائز 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 فائزهای جداسازی شده می‌باشد P1 تا P16.

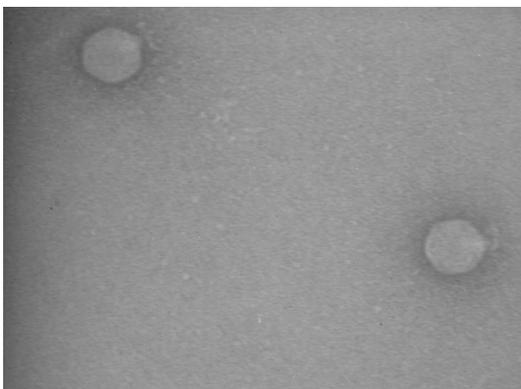
تعیین طیف میزبانی باکتریوفازها

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 P10، P8 و PKpMa2/20 دارای بیش‌ترین

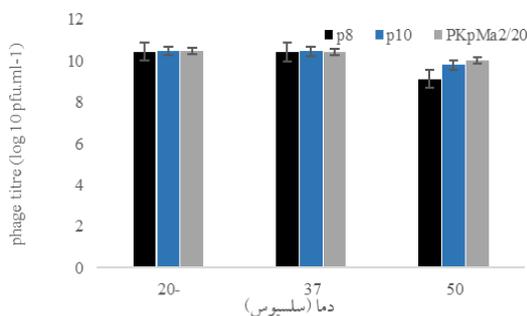
جدول شماره ۲: MOI بهینه فازهای P8، P10 و PKpMa2/20 (*Kp: K. pneumoniae*)

| 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 |
|---------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------|--------------|------------------------|
| $2/63 \times 10^9$ | $1/22 \times 10^7$ | $1/16 \times 10^8$ | ۱۰۰ | $۱۰^۸$ | $۱۰^۶$ |
| $1/09 \times 10^9$ | $1/97 \times 10^7$ | $1/93 \times 10^8$ | ۱۰ | $۱۰^۸$ | $۱۰^۷$ |
| $2/02 \times 10^9$ | $2/19 \times 10^7$ | $1/89 \times 10^8$ | ۱ | $۱۰^۸$ | $۱۰^۸$ |
| $3/02 \times 10^9$ | $3/82 \times 10^7$ | $2/49 \times 10^8$ | ۰/۸ | $۱۰^۷$ | $۱۰^۸$ |
| $3/39 \times 10^9$ | $3/02 \times 10^7$ | $2/34 \times 10^8$ | ۰/۰۱ | $۱۰^۶$ | $۱۰^۸$ |
| $3/00 \times 10^9$ | $1/90 \times 10^7$ | $2/97 \times 10^8$ | ۰/۰۰۱ | $۱۰^۵$ | $۱۰^۸$ |
| $2/29 \times 10^9$ | $2/36 \times 10^7$ | $2/36 \times 10^8$ | ۰/۰۰۱ | $۱۰^۴$ | $۱۰^۸$ |

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



تصویر شماره ۲: باکتریوفاز لیتیک PKpMa2/20، دارای بیشترین طیف میزبانی برای جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه مورد استفاده، بر اساس مشخصات ذکر شده فاز PKpMa2/20 متعلق به خانواده *Podoviridae* می‌باشد، فلش‌ها منطقه سر و دم باکتریوفاز را نشان می‌دهند.



نمودار شماره ۱: نمودار پایداری حرارتی فازهای PKpMa2/20 و p10، p8 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 و زمان وجود دارد ($P < 0.05$) نتایج بر اساس سه تکرار است.

سینتیک رشد یک مرحله‌ای

نتایج رشد یک مرحله‌ای فاز PKpMa2/20 جدا شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه نشان‌دهنده دوره نهفتگی ۱۰ دقیقه‌ای فاز و سبب انفجاری 350 pfu/ml در دقیقه ۳۵ بود که به عنوان نسبت تعداد نهایی ذرات فاز آزاد شده به تعداد اولیه سلول‌های باکتریایی در طول دوره نهایی محاسبه می‌شود. نتایج منحنی رشد یک مرحله‌ای فاز P8 جدا شده علیه باکتری کلبسیلا پنومونیه نشان‌دهنده یک دوره نهفتگی ۱۰ دقیقه‌ای با سبب انفجاری 210 pfu/ml بود. نتایج رشد یک مرحله‌ای فاز P10 نیز نشان داد که این فاز دارای دوره نهفتگی بلندتر نسبت به دو فاز دیگر و در حدود ۱۵ دقیقه بود و سبب انفجاری این فاز در حدود دقیقه ۳۵ و 180 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 ($60 \text{ nm} \times 60 \text{ nm}$) و یک دم کوتاه با طول حدود 10 nm بود که به نظر می‌رسد متعلق به خانواده *Podoviridae* باشد (تصویر شماره ۲).

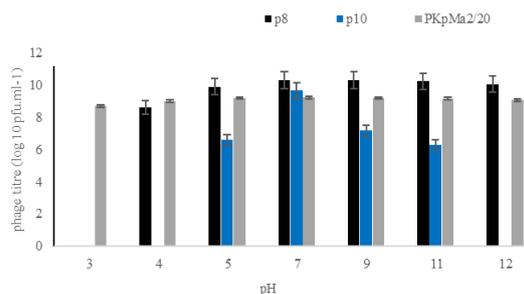
تاثیر دما و pH بر سه باکتریوفاز منتخب

نتایج نشان‌دهنده پایداری سه باکتریوفاز در دماهای ۲۰ و ۳۷- 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 هر سه فاز کاهش یافت. با این حال کاهش اندکی در میزان ماندگاری هر سه فاز مشاهده گردید. در بین فازهای مورد

جادویی به عنوان عوامل درمانی موثر بالقوه برای کنترل عفونت‌های غیر قابل درمان بسیار بالا رفته است (۱۹،۱۸). در پژوهشی توسط اسدپور و همکاران بر روی فراوانی کلبسیلا پنومونیه تولیدکننده بتا لاکتاماز وسیع الطیف و مقاوم به چند دارو، بیشترین میزان مقاومت این جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۹۲ درصد)، آموکسی‌سیلین (۸۷/۶ درصد) و اریترومیسین (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).



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 و pH وجود دارد ($P < 0.05$). نتایج بر اساس سه تکرار است.

با توجه به داده‌های به‌دست آمده 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=۷ داشت و در pHهای قلیایی و اسیدی فعالیت آن کاهش یافت به طوری که در pHهای کم‌تر از ۵ و بیش‌تر از ۱۱ فعالیت آن به صفر رسید، اما فاز P8 تا pH=۴ را تحمل کرده و فعالیت آن در pH های ۷ تا ۱۲ 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 مقام چندگانه آنتی‌بیوتیکی می‌باشد (۱۷). با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد باکتریوفازها، در سال‌های اخیر، انتظارات از این ذرات

۱۱ قادر بود توانایی زنده‌مانی خود را حفظ کند (۲۵). در مطالعه حاضر نیز مطابق با تحقیق Sundaramoorthy و همکاران دو باکتریوفاژ P8 و P10 توانایی تحمل pH‌های پایین را نداشتند در حالی که بر خلاف مطالعه Sundaramoorthy و همکاران فاژ منتخب PKpMa2/20 قادر بود در pH‌های 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 pH‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیقات نشان داد که فاژ BUCT556A در pH‌های 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 مطالعه‌ی حاضر نیز هر سه فاژ توانایی لیتیک خود را در دماهای بالا حفظ کردند و کاهش بسیار کمی در میزان زنده‌مانی 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 مطالعه‌ی 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 سویه‌های 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 تاثیر بر ۷۳ درصد از سویه‌های کلبسیلا پنومونیه مقاوم به آنتی‌بیوتیک، دارای وسیع‌ترین طیف میزبانی بود که با نتایج بررسی شده در مطالعه‌ی سوفی و همکاران مطابقت داشت. با

Wang و همکاران نیز تحقیقی در سال ۲۰۲۱ بر روی درمان ترکیبی فاژ vB_KpnM_P-KP2 و آنتی‌بیوتیک جتتامایسین روی پنومونی حاد ناشی از سروتپ 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 رشته‌ای 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 آنزیم‌های *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 آنزیم‌های محدودکننده نشان داد که فاژ PφBw-Kp1 توسط آنزیم‌های *Bam HI*، *Hind III* و *KpnI* برش خورده و هضم شد. فاژ PφBw-Kp2 به آنزیم‌های محدودکننده مورد استفاده در این آزمایش حساس بود و فاژ PφBw-Kp3 به آنزیم‌های *HindIII* و *EcoRI* حساس بود (۲۲).

بررسی پایداری فاژها تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند pH، یونها و دما به منظور کاربرد موفقیت آمیز این ذرات در زمینه‌های 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 pH‌های مختلف انجام دادند. مطالعات پایداری pH در این تحقیق نشان داد که فاژ KpG در pH‌های پایین ناپایدار بود و فاژ تنها در pH‌های بین ۷ تا

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 به‌عنوان کاندیداهای مناسبی جهت

References

- Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016; 80(3): 629-661.
- Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouveleki LS, Daikos GL. *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. *Pediatr Infect Dis J* 2017; 36(10): 1002-1005.
- Verma I, Semalty R, Gabrani R. Antibiotic-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and Targeted Therapy. *Antimicrobial Resistance* 2022; 2022: 233-252.
- 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.
- 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.
- Clokie MR, Millard AD, Letarov AV, Heaphy S. Phages in nature. *Bacteriophage* 2011; 1(1): 31-45.
- 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.
- 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.
- Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American Society for Microbiology* 2009; 121-144.
- CLSI C. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Lab Standards Institute* 2021.
- 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.
- 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.
- 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. *Fronti Microbiol* 2016; 7: 934.
- 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, Vogele K, Kühn J, Friese 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, Thothathri 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.