ORIGINAL ARTICLE

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

Raheleh Majdani[1]
Mansour Zamanifar[2]
Hamideh Lamakan[3]

[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 pneumonia* 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 *EcoR*V 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℃), 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 ℃. In the temperature of 50℃, 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 theses 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)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-12-09]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و چهارم شماره ۲۳۲ اردیبهشت سال ۱۴۰۳ (۴۹-۳۸)

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

راحله مجدانی[1]
منصور زمانی فر[2]
حمیده لامکان[3]

چکیده

سابقه و هدف: با ظهور باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، یافتن مواد ضدمیکروبی جایگزین موثر برای مبارزه با این باکتری‌ها اجتناب‌ناپذیر می‌باشد. باکتریوفاژدرمانی به‌عنوان یک رهیافت بیولوژیک دارای پتانسیل درمانی بالا اخیرا 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 *Hind*III و *Eco*RV 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 سایز 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، ۱۱و۱۲) 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 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 جداشده به‌ترتیب ۱۰، ۱۰ و ۱۵ دقیقه و سایز 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 کاملا 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 احتمالا متعلق به خانواده *پودوویریده* بود.

استنتاج: با توجه به اثرات لیتیک مناسب و نیز زمان نهفته و سایز 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.

واژه های کلیدی: *کلبسیلا پنومونیه*، مقاومت آنتی بیوتیکی، باکتریوفاژ، فاژدرمانی، پودوویریده

مولف مسئول: راحله مجدانی- مراغه: دانشگاه مراغه، دانشکده علوم پایه
E-mail: rahelehmajdani@yahoo.com
۱. استادیار، گروه زیست شناسی، 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-12-09]

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(۲،۱). این باکتری یکی از عوامل بیماری‌زایی است که مقاومت چند دارویی بالایی از خود نشان می‌دهد و توسعه مقاومت‌های ضدمیکروبی در *کلبسیلاپنومونیه* منجر به کاهش اثر بخشی درمان‌های مرسوم در برابر این باکتری شده است. افزایش مداوم در میزان مرگ‌ومیر به‌دلیل مقاومت ضدمیکروبی، 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 باکتریوفاژها (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 باکتریوفاژها 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 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 باکتریوفاژهای 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 روش ها

جمع‌آوری نمونه‌های باکتریایی کلبسیلاپنومونیه

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

تست آنتی بیوگرام

بعد از تایید تشخیص، جدایه‌های باکتریایی به دست‌آمده 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، نالیدیکسیک‌اسید، جنتامایستین، سیپروفلوکساسین، ایمیپنم، توبرامایسن، سفپیم و کوتریموکسازول، استفاده گردید. جهت انجام آزمایش در ابتدا باکتری‌ها در ۵ میلی‌لیتر محیط تریپتون‌سوی‌براث (TSB) تلقیح شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۶ ساعت گرماگذاری شدند. پس از ایجاد کدورت نیم مک فارلند، با سواپ در سطح محیط مولرهینتون‌آگار کشت داده شد. مناطق مهار رشد در پلیت‌ها اندازه‌گیری و جدایه‌ها به‌عنوان مقاوم، نیمه‌حساس یا حساس نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مطابق

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-12-09]

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 درچند مرحله از آب ورودی تصفیه‌خانه فاضلاب مراغه نمونه‌گیری شد و مراحل جداسازی باکتریوفاژ به‌صورت جداگانه برای هر یک از جدایه‌های باکتریایی (به‌عنوان 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 منیزیوم یک درصد اضافه و گرماگذاری گردید. به محلول مورد نظر کلروفرم افزوده و به‌مدت 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 آگارنرم 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 تیتر باکتریوفاژ خالص‌سازی شده

نمونه‌های فاژی در لوله‌های حاوی TSB، به‌صورت 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، به‌صورت PFU/ml بیان گردید(۱۲). نتایج حاصل از سه بار تکرار می‌باشد.

تجزیه و تحلیل مولکولی باکتریوفاژهای جداشده

پس از تعیین تیتر فاژهای جداسازی‌شده، 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 *EcoR*V و *Hind*III و در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به‌طور 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 *EcoR*V دو ساعت و برای آنزیم *Hind*III 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-12-09]

کلبسیلاپنومونیه 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 تریپتون‌سوی‌براث تلقیح شد و بعد بر روی محیط تریپتون سوی‌آگار کشت داده شد. سپس یک قطره از سوسپانسیون فاژی بر روی محیط کشت باکتری ریخته و به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرما گذاری شد. پس از طی این مدت ایجاد پلاک توسط هر یک از فاژها مورد بررسی قرارگرفت. در مرحله بعد سه تا از فاژهای دارای بیش‌ترین طیف میزبانی برای بررسی بیش‌تر 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 جذب‌نوری به $OD_{۶۰۰}$=۰/۴ 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 $OD_{۶۰۰}$=۰/۴-۰/۵ 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 ۱۰۰۰۰ rpm 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 باکمی تغییرات در سه دمای ۲۰ -، ۳۷ و ۵۰ درجه سلسیوس مورد بررسی قرارگرفت. برای این منظور ابتدا تیتر باکتریوفاژها با استفاده از تکنیک آگار دو لایه تعیین شد. سپس سوسپانسیون‌های باکتریایی در دماهای موردنظر به‌مدت دو ساعت گرماگذاری گردید. در مرحله آخر یک بار دیگر تیتر فاژی با استفاده از تکنیک آگار دو لایه تعیین شد و اعداد به‌دست آمده با هم مقایسه گردیدند(۱۴). آزمون براساس سه بار تکرار انجام شد.

سنجش پایداری باکتریوفاژهای جداشده 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 تیتر 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 تیتر فاژی با استفاده از تکنیک آگار دو لایه تعیین شد. مقایسه اندازه تیتر فاژی 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-12-09]

گردید. در ابتدا نمونه فاژی با تیتر 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 باکتریوفاژ رسوب کند. سپس رسوب باکتریوفاژ دو مرتبه با محلول استات آمونیوم ۰/۱ مولار شستشو گردید. برای رنگ‌آمیزی، ابتدا نمونه فاژی بر روی گریدهای مسی ثابت شد و سپس با اورانیل استات دو درصد رنگ‌آمیزی شده و رنگ اضافی توسط کاغذ فیلتر حذف گردید. در آخر نمونه‌ها برای مشاهده مورفولوژی باکتریوفاژ به وسیله میکروسکوپ TEM (Leo 906, Germany) با ولتاژ ۱۰۰ 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.

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 تریپتون‌سوی‌آگار 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.

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)، سیپروفلوکسین (۴۶ درصد)، سفپیم (۳۳ درصد) و توبرامایسین (۲۶ درصد) بود. ۱۶ جدایه که دارای بیش‌ترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی براساس نتایج حاصل از سنجش حساسیت آنتی‌بیوتیکی در مطالعه حاضر بودند، جهت جداسازی فاژهای لیتیک علیه آن‌ها انتخاب شدند.

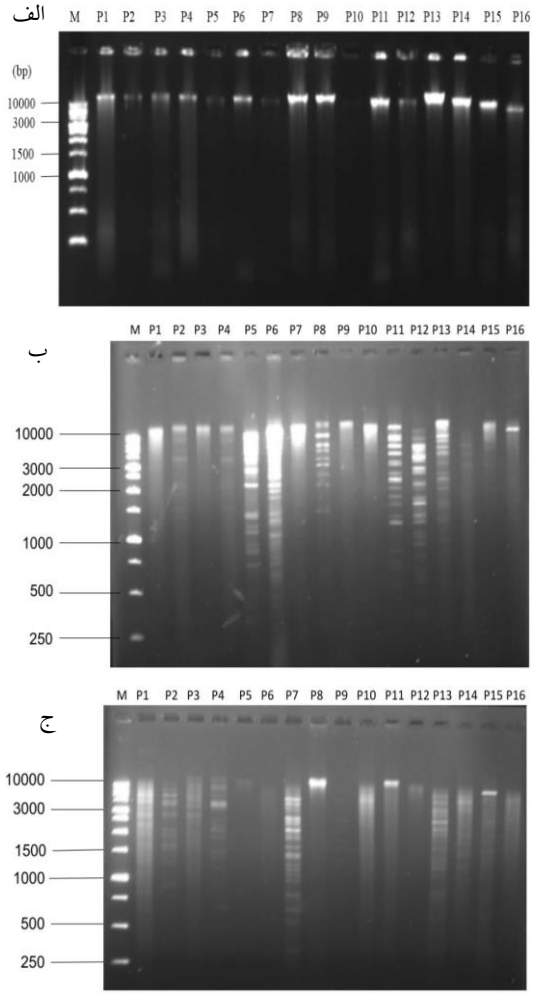
جداسازی باکتریوفاژهای لیتیک علیه کلبسیلا پنومونیه

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

نتایج استخراج ژنومی و هضم آنزیمی

از هر ۱۶ باکتریوفاژ 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 باکتریوفاژ، ۱۲ جدایه توسط آنزیم *Hind*III و ۹ جدایه نیز توسط آنزیم *EcoR*V برش خوردند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-12-09]



تصویر شماره ۱: DNA ژنومی ۱۶ باکتریوفاژ جداسازی شده علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه*، الف: نتایج استخراج ژنومی باکتریوفاژها، ب: نتایج هضم آنزیمی DNA ژنومی باکتریوفاژهای جداسازی شده از تصفیه خانه فاضلاب مراغه با آندونوکلئاز *Hind*III.ج: نتایج هضم آنزیمی DNA ژنومی باکتریوفاژهای جداسازی شده از تصفیه خانه فاضلاب مراغه با آندونوکلئاز *Eco*RV 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 فاژهای جداسازی شده می‌باشد P1 تا P16.

تعیین طیف میزبانی باکتریوفاژها

پس از جداسازی باکتریوفاژها، قدرت لیز هر باکتریوفاژ به‌صورت جداگانه علیه همه ۱۵ جدایه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* دیگر با روش تست نقطه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت که حاکی از آن بود که سه باکتریوفاژ P10، P8 و PKpMa2/20 دارای بیش‌ترین طیف میزبانی بودند که برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند(جدول شماره ۱). بر اساس نتایج جدول شماره ۱، فاژ PKpMa2/20 با قدرت لیز ۱۱ نمونه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* دارای بیش‌ترین طیف میزبانی بود و دو فاژ P8 و P10 هرکدام دارای قدرت لیز ۹ نمونه باکتریایی از ۱۶ جدایه بودند.

جدول شماره ۱: طیف میزبانی و اثر لیزکنندگی باکتریوفاژهای جداسازی شده علیه جدایه‌های بالینی *کلبسیلا پنومونیه*، (جدایه‌های کلبسیلا پنومونیه: Kp، جفت باز:bp، فاژهای جداشده:P، فاژ منتخب با بیش ترین طیف میزبانی: PKPMa2/20)

فاژ	جدایه های باکتریایی کلبسیلا پنومونیه لیزشده در اثر فاژهای 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 فاژهای جداسازی شده علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* که دارای بیش‌ترین طیف میزبانی بودند. MOI بهینه فاژ جداسازی شده علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* (Kp8) برابر ۰/۰۰۱ بود که بالاترین تیتر به‌دست آمده توسط لیزات فاژ P8 ($۲/۹۷\times۱۰^{۸}$ pfu/ml) بود. MOI بهینه فاژ جداسازی شده علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* (Kp10) برابر ۰/۱ بود و بالاترین میزان لیزات آن برابر با $۳/۸۲\times۱۰^{۷}$ pfu/ml بود. MOI بهینه فاژ جداسازی شده علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* (Kp12) برابر ۰/۰۱ بود و بالاترین لیزات فاژ به دست آمده برای PKpMa2/20 برابر با $۳/۳۹\times۱۰^{۹}$ pfu/ml برآورد گردید (جدول شماره ۲).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-12-09]

جدول شماره ۲: MOI بهینه فاژهای P10، P8 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
$2/63\times10^{9}$	$1/22\times10^{7}$	$1/16\times10^{8}$	۱۰۰	۱۰^۸	۱۰^۶
$1/09\times10^{9}$	$1/97\times10^{7}$	$1/93\times10^{8}$	۱۰	۱۰^۸	۱۰^۷
$2/02\times10^{9}$	$2/19\times10^{7}$	$1/89\times10^{8}$	۱	۱۰^۸	۱۰^۸
$3/02\times10^{9}$	$3/82\times10^{7}$	$2/49\times10^{8}$	۰/۱	۱۰^۷	۱۰^۸
$3/39\times10^{9}$	$3/02\times10^{7}$	$2/34\times10^{8}$	۰/۰۱	۱۰^۶	۱۰^۸
$3/00\times10^{9}$	$1/90\times10^{7}$	$2/97\times10^{8}$	۰/۰۰۱	۱۰^۵	۱۰^۸
$2/29\times10^{9}$	$2/36\times10^{7}$	$2/36\times10^{8}$	۰/۰۰۰۱	۱۰^۴	۱۰^۸

سینتیک رشد یک مرحله ای

نتایج رشد یک مرحله‌ای فاژ PKpMa2/20 جدا شده علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* نشان‌دهنده دوره نهفتگی ۱۰ دقیقه‌ای فاژ و سایز انفجاری ۳۵۰pfu/ml در دقیق ۳۵ بود که به‌عنوان نسبت تعداد نهایی ذرات فاژ آزاد شده به تعداد اولیه سلول‌های باکتریایی در طول دوره نهایی محاسبه می‌شود. نتایج منحنی رشد یک مرحله‌ای فاژ P8 جدا شده علیه باکتری *کلبسیلا پنومونیه* نشان دهنده یک دوره نهفتگی ۱۰ دقیقه‌ای با سایز انفجاری ۲۱۰ pfu/ml بود. نتایج رشد یک مرحله‌ای فاژ P10 نیز نشان داد که این فاژ دارای دوره نهفتگی بلندتر نسبت به دو فاژ دیگر و در حدود ۱۵ دقیقه بود و سایز انفجاری این فاژ در حدود دقیقه ۳۵ و ۱۸۰ pfu/ml بود.

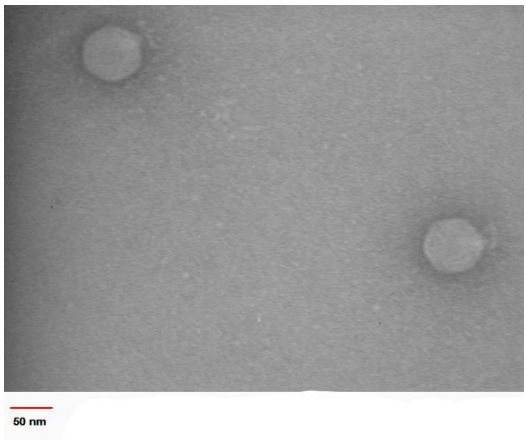
بررسی خصوصیات مورفولوژیک باکتریوفاژ منتخب PKpMa2/20 با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری

باکتریوفاژ 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).

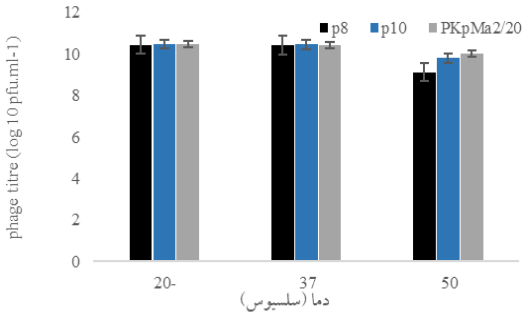
تاثیر دما و pH بر سه باکتریوفاژ منتخب

نتایج نشان‌دهنده پایداری سه باکتریوفاژ در دماهای ۳۷ و ۲۰- درجه سلسیوس به مدت دو ساعت بود به‌طوری که در این طیف دمایی، کاهش تیتر فاژی مشاهده نگردید، اما با افزایش دما و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس تیتر هر سه فاژ کاهش یافت. با این حال کاهش اندکی در میزان ماندگاری هر سه فاژ مشاهده گردید. در بین فاژهای مورد بررسی، بیش‌ترین کاهش در میزان زنده‌مانی در فاژ P8 با ۲۰ درصد کاهش مشاهده گردید (نمودار شماره ۱).

نتایج تاثیر pH روی باکتری‌ها در نمودار شماره ۲ آمده است.

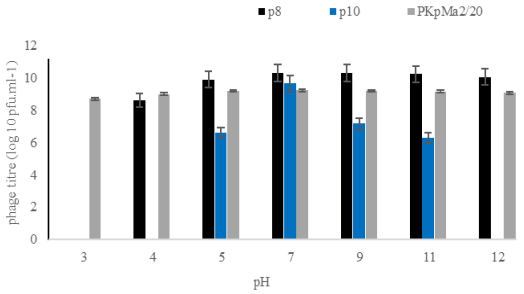


تصویر شماره ۲: باکتریوفاژ لیتیک PKpMa2/20، دارای بیش‌ترین طیف میزبانی برای جدایه‌های *کلبسیلا پنومونیه* مورد استفاده، براساس مشخصات ذکر شده فاژ PKpMa2/20 متعلق به خانواده *Podoviridae* می‌باشد، فلش‌ها منطقه سر و دم باکتریوفاژ را نشان می‌دهند.



نمودار شماره ۱: نمودار پایداری حرارتی فاژهای PKpMa2/20 و p8, p10، میله‌های خطا نشان‌دهنده انحراف استاندارد از سه آزمایش مستقل است که به‌صورت تکراری انجام شده‌اند. با توجه به آنالیزهای انجام شده ارتباط معناداری از نظر آماری میان لگاریتم تیتر فاژی و زمان وجود دارد (P<۰/۰۵) نتایج بر اساس سه تکرار است.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-12-09]



نمودار شماره ۲: پایداری فاژهای منتخب فاژهای 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 تیتر فاژی و pH وجود دارد (P<۰/۰۵). نتایج بر اساس سه تکرار است.

با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده در این آزمایش، پایداری سه فاژ P8، P10 و PKpMa2/20 در pH های مختلف متفاوت از هم بود. در این میان فاژ P10 دارای محدوده فعالیت کم‌تری نسبت به دو فاژ 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 فاژ P8 تا pH= ۴ را تحمل کرده و فعالیت آن در pH های ۷ تا ۱۲ تقریبا ثابت باقی ماند. فاژ PKpMa2/20 دامنه فعالیت بیش‌تری نسبت به دو فاژ دیگر داشت به‌طوری‌که 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 مقامت چندگانه آنتی‌بیوتیکی می باشد(۱۷). با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد باکتریوفاژها، در سال‌های اخیر، انتظارات از این ذرات جادویی به‌عنوان 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 وسیع‌الطیف و مقاوم به چند دارو، بیش‌ترین میزان مقاومت این جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین (۹۲ درصد)، آموکسی‌سیلین (۸۷/۶ درصد) و اریترومایسین (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 باکتریوفاژ 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 باکتریوفاژ 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 ویژگی های فاژهای جدا شده در مطالعه‌ی کنونی رشد بسیار سریع آن‌ها در سلول‌های باکتری *کلبسیلا پنومونیه* بود. در شرایط استاندارد آزمایشگاهی، دوره نهفتگی سه فاژ منتخب جداسازی شده در حدود ۱۵ تا ۱۰ دقیقه بود که یک دوره نسبتاً کوتاه بوده و سایز انفجاری برای لیز سلول میزبان که سبب آزادسازی فاژهای 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 باکتریوفاژ 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 باکتریوفاژ در حدود دقیقه‌ی ۸۰ بود(۲۲).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-12-09]

Wang و همکاران نیز تحقیقی در سال ۲۰۲۱ بر روی درمان ترکیبی فاژvB_KpnM_P-KP2 و آنتی‌بیوتیک جنتامایسین روی پنومونی حاد ناشی از سروتیپ K47 *کلبسیلاپنومونیه* 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 حدودا 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 *Hind*III و *Eco*RV صورت گرفت که آنزیم *Eco*RV قادر به هضم نه ژنوم فاژی بود و آنزیم *Hind*III 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 *Hind* III، *Bam H*I و *Kpn*I برش خورده و هضم شد. فاژ PϕBw-Kp2 به آنزیم‌های محدود کننده مورد استفاده در این آزمایش حساس بود و فاژ PϕBw-Kp3 به آنزیم‌های *Hind*III و *Eco*RI حساس بود(۲۲).

بررسی پایداری فاژها تحت تأثیر عوامل مختلفی مانند pH، یون‌ها و دما به منظور کاربرد موفقیت‌آمیز 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 *کلبسیلاپنومونیه* 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 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 *کلبسیلاپنومونیه* 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 به‌مدت 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 *کلبسیلاپنومونیه* 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 مطالعه‌ای که Sofy و همکاران در سال ۲۰۲۱ در رابطه با طیف میزبانی فاژ لیتیک KPP-5 جداسازی شده علیه باکتری *کلبسیلاپنومونیه* 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 *کلبسیلاپنومونیه* 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 *کلبسیلاپنومونیه* مقاوم به آنتی‌بیوتیک، دارای وسیع‌ترین طیف میزبانی بود که با نتایج بررسی شده در مطالعه‌ی سوفی و همکاران مطابقت داشت. با

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-12-09]

توجه به طیف میزبانی گسترده سه باکتریوفاژ 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 فاژهای مناسب جهت فاژ درمانی می‌باشد، می‌توان این فاژها را به‌عنوان کاندیداهای مناسبی جهت کنترل عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باکتری‌های *کلبسیلا پنومونیه* معرفی نمود. البته قبل از استفاده کاربردی درمانی از این فاژها، آنالیز مولکولی کامل‌تر این فاژها و تعیین توالی ژنومی آن‌ها جهت اطمینان از عدم وجود هر گونه ژن آسیب‌زا و نیز بررسی پایداری فاژها در برابر عوامل محیطی دیگر ضروری می‌باشد.

References

1. Paczosa MK, Mecsas 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, Tzouvelekis 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. Fronti Microbiol 2016; 7: 934.
14. Ahmadi M, Karimi Torshizi MA, Rahimi S, Dennehy JJ. Prophylactic Bacteriophage Administration More Effective than Post-

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-12-09]

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 φKMV-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 *Klebsiells pnemoniae* 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-12-09]