

Isolation and Characterization of a *Helicobacter pylori* Bacteriophage from a Sewage Sample at a Tertiary Hospital in Northern Iran

Golnar Rahimzadeh¹,
 Mohammad Sadegh Rezai²,
 Nasrin Samadi^{3,6},
 Hossein Jamalifar^{4,6},
 Mohammad Reza Fazeli^{5,6}

¹ Assistant Professor, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Pediatric Infectious Diseases Research Center, Communicable Diseases Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Associate Professor, Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ PhD in Medical Bacteriology, Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ Professor, Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁶ Pharmaceutical Quality Assurance Research Center, The Institute of Pharmaceutical Sciences (TIPS), Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

(Received February 4, 2025; Accepted August 7, 2025)

Abstract

Background and purpose: *Helicobacter pylori* is a Gram-negative, microaerophilic, and spiral-shaped bacterium recognized as a major causative agent of gastrointestinal diseases such as chronic gastritis, peptic ulcers, and gastric cancer. The high prevalence of this infection, particularly in developing countries, combined with the increasing antibiotic resistance of the bacterium, has significantly reduced the effectiveness of current treatment protocols. In this regard, bacteriophages, viruses that specifically target bacteria, have emerged as a promising, targeted, and safe alternative for the treatment of resistant infections. Accordingly, this study was designed to isolate and characterize a lytic bacteriophage with efficacy against *H. pylori*.

Materials and methods: In this experimental study, a wastewater sample was collected from Bou Ali Sina Hospital (Mazandaran Province, Iran). Following phage isolation, the bacteriophage was identified, and its lytic activity was evaluated using the spot test method. Phage titer was determined by the double-layer agar (DLA) assay. The morphology of the phage was observed and classified using transmission electron microscopy (TEM). In addition, phage stability was assessed under various temperature conditions (4 C, 25 C, 37°C, and 55 C) and pH ranges (3–9).

Results: A phage belonging to the *Podoviridae* family was isolated, with a titer of 10⁶ PFU/mL. The phage structure included an icosahedral head and a short, non-contractile tail. The spot test confirmed strong lytic activity. The phage exhibited the highest stability and lytic activity at 37 C and pH 5.

Conclusion: Given its effective lytic activity and favorable stability under physiological conditions, the isolated phage demonstrates significant potential for development as a phage therapy agent targeting *H. pylori* infections. This approach could serve as a promising strategy for combating antibiotic resistance in the future.

Keywords: antibiotic, bacteriophage, *Helicobacter pylori*, Sewage sample

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (247): 40-48 (Persian).

Corresponding Author: Mohammad Reza Fazeli - Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. (E-mail: fazelimo@sina.tums.ac.ir)

جداسازی و توصیف باکتریوفاژ *هلیکوباکتر پیلوری* از نمونه فاضلاب در بیمارستان سطح سه در شمال ایران

گلنار رحیم زاده^۱محمدصادق رضایی^۲نسرین صمدی^۳حسین جمالی فر^۴محمد رضا فاضلی^۵

چکیده

سابقه و هدف: *هلیکوباکتر پیلوری* یک باکتری گرم منفی، میکروآئروفیل و مارپیچی شکل است که به عنوان یکی از عوامل اصلی در بروز بیماری های گوارشی مانند گاستریت مزمن، زخم معده و دوازدهه و حتی سرطان معده شناخته می شود. شیوع بالای این عفونت در بسیاری از کشورها، به ویژه در کشورهای در حال توسعه، و افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری نسبت به درمان های رایج، موجب کاهش اثربخشی پروتکل های درمانی موجود شده است. در این راستا، استفاده از باکتریوفاژها به عنوان ویروس های اختصاصی علیه باکتری ها، می تواند رویکردی نوین، هدفمند و ایمن در درمان عفونت های مقاوم باشد. این مطالعه با هدف جداسازی و بررسی ویژگی های باکتریوفاژ مؤثر علیه *هلیکوباکتر پیلوری* طراحی و انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در یک مطالعه تجربی، نمونه فاضلاب از بیمارستان بوعلی سینا (مازندران) جمع آوری شد. پس از جداسازی، باکتریوفاژ با استفاده از روش spot test شناسایی و فعالیت لیتیک آن بررسی گردید. تیتراژ با روش (DLA Assay) تعیین شد. مرفولوژی فاژ با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مشاهده و طبقه بندی گردید. هم چنین پایداری فاژ در شرایط مختلف دما (۴، ۲۵، ۳۷ و ۵۵ درجه سانتی گراد) و (pH 3-9) مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: فاژ از خانواده پودوویریده با تیتراژ ۱۰ PFU/mL جداسازی شد. ساختار فاژ شامل سر ایکوزاهدال و دم کوتاه غیر منقبض شونده بود. تست spot وجود فعالیت لیتیک را تأیید کرد. فاژ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و pH برابر ۵ بیش ترین پایداری و فعالیت را از خود نشان داد.

استنتاج: با توجه به فعالیت لیتیک مؤثر و پایداری مناسب در شرایط فیزیولوژیک، باکتریوفاژ جداسازی شده پتانسیل بالایی برای توسعه فاژتراپی علیه عفونت های ناشی از *هلیکوباکتر پیلوری* دارد. استفاده از این رویکرد می تواند راهکاری نوید بخش برای مقابله با مقاومت آنتی بیوتیکی در آینده باشد.

واژه های کلیدی: آنتی بیوتیک، باکتریوفاژ، *هلیکوباکتر پیلوری*، نمونه فاضلاب

E-mail: fazelimo@sina.tums.ac.ir

مؤلف مسئول: محمد رضا فاضلی - تهران: دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۱. استادیار، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، مرکز تحقیقات عفونی اطفال، پژوهشکده بیماری های واگیر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشیار، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴. دکترای تخصصی باکتری شناسی پزشکی، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۵. استاد، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۶. مرکز تحقیقات تضمین کیفیت دارویی، پژوهشکده علوم دارویی (TIPS)، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۱۱/۲۷ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۴/۱۶

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری، باسیل خمیده میکرو آئرو فیل است و ممکن است این باکتری به صورت درون سلولی فعال باشد و مانند سایر باکتری های داخل سلولی مشکلات جدی ایجاد نماید. ۵۰ درصد از جمعیت جهان به ویژه در کشورهای در حال توسعه به دلیل پایین بودن سطح اجتماعی - اقتصادی و بهداشت فردی به هلیکوباکتر پیلوری مبتلا می باشند. این باسیل از طریق مسیرهای دهانی - مدفوعی و دهانی - دهانی به ویژه در افرادی که با هم زندگی می کنند منتقل می شود (۱). از آنجایی که هلیکوباکتر پیلوری می تواند به شکل کوکسیدی (coccid) در آید، مقاومت خود را در برابر شرایط محیطی و قرار گرفتن در معرض آنتی بیوتیک ها افزایش می دهد و به راحتی می تواند از طریق آب آشامیدنی آلوده منتقل شود (۱). در ایران، میزان شیوع آلودگی با هلیکوباکتر پیلوری در افراد ۳۵ تا ۵۵ سال ۸۸/۴ تا ۹۳ درصد، در افراد ۶ تا ۲۰ سال به ترتیب ۴۷/۵ و ۳۰/۶ درصد گزارش شده است (۲). هلیکوباکتر پیلوری به طور منحصر به فردی در شرایط سخت معده باقی می ماند و در لایه اپیتلیال معده کلونیزه می شود و می تواند منجر به بدخیمی های معده به ویژه سرطان معده، لنفوم MALT (Mucosa associated lymphoid tissue)، زخم معده و اثنی عشر، گاستریت، سوء هاضمه و آدنوکارسینوم شود. هلیکوباکتر پیلوری اکنون به عنوان رایج ترین عامل سرطان مرتبط با عفونت محسوب می شود، به طوری که بیش از ۶۰ درصد از موارد سرطان معده، آلودگی با این باکتری گزارش شده است. به این ترتیب، هلیکوباکتر پیلوری توسط آژانس بین المللی تحقیقات سرطان به عنوان یک باکتری سرطان زا کلاس I شناخته شده است. هم چنین، این باکتری با بسیاری از بیماری های غیر گوارشی مانند ترومبوسیتوپنی ایدیوپاتیک، کمبود ویتامین B12، میگرن، فقر آهن، برخی بیماری های قلبی عروقی و خودایمنی مرتبط است (۳، ۴). در سال ۲۰۱۷، سازمان بهداشت جهانی (WHO) هلیکوباکتر

پیلوری را به عنوان یک باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک با اولویت بالا گزارش کرده است. عفونت هلیکوباکتر پیلوری، عفونت بسیار شایع در سراسر جهان با واریانت های جغرافیایی قوی می باشد که شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری، به سرعت در حال افزایش است. گسترش مقاومت آنتی بیوتیکی در این باکتری می تواند مربوط به عوامل مختلفی همانند انتخاب نامناسب آنتی بیوتیک، مصرف بی رویه آنتی بیوتیک ها، عدم دقت در مدت زمان لازم برای درمان و عدم توانایی هر آزمایشگاه در کشت این باکتری می باشد. در ایران، در تحقیقات صورت گرفته مقاومت هلیکوباکتر پیلوری به مترونیدازول (۴/۵۷ درصد)، کلاریترومایسین (۱۷ درصد)، تراسیکلین (۱۱/۵ درصد)، سیپروفلو کساسین (۱۸/۵ درصد)، آموکسی سیلین (۱۲/۹ درصد) و ریفامایسین (۲۸/۶ درصد) گزارش شده است. طبق مطالعات انجام گرفته در ایران مقاومت این باکتری به آنتی بیوتیک های مورد استفاده ۷۰-۶۰ درصد گزارش شده است که در مقایسه با میزان مقاومت این باکتری در دنیا بین ۵۰-۳ درصد، میزان نسبتاً بالایی به حساب می آید (۵، ۶). این امر جایگزینی گزینه های درمانی جدید را طلب می نماید. با توجه به شیوع بالای هلیکوباکتر پیلوری در جمعیت، اهمیت بیماری های مرتبط و همچنین مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری، یافتن درمانی که بتواند جایگزین آنتی بیوتیک ها شود، حیاتی است. باکتریوفاژها، ویروس هایی هستند که باکتری ها را آلوده می کنند. در محل عفونت خود تکثیر شونده می باشند و بر خلاف آنتی بیوتیک ها نیاز به تنظیم دوز ندارند. تولید آن ها از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه می باشد. فاژها رسپتور در سطح سلول های یوکاریوتی ندارند و برای انسان توکسیک نمی باشند. فاژها می توانند سویه خاصی از باکتری را لیز کنند و در صورت استفاده به عنوان گزینه درمانی، عوارض جانبی و تاثیری بر میکروبیوتای طبیعی ندارند. بنابراین فاژ درمان بی خطر است و سمیت آن بسیار کم است. مکانیسم عمل فاژ با

آنتی‌بیوتیک‌ها کاملاً متفاوت است بنابراین می‌تواند باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک را نیز لیز کند و از این نظر حائز اهمیت می‌باشند (۷، ۸). با توجه به مشکلاتی که در درمان هلیکوباکتر پیلوری با آن مواجه بوده و این که فازهای لیتیک فعال برای ریشه‌کنی این باکتری به ندرت گزارش شده است، این مطالعه برای جداسازی باکتریوفاژ لیتیک علیه هلیکوباکتر پیلوری طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتریوفاژ

مطالعه تجربی حاضر با کد اخلاق IR.TUMS.BLC.1402.135، در آزمایشگاه مرکز تحقیقات عفونی اطفال در بیمارستان بوعلی سینا، استان مازندران شهرستان ساری انجام شد. ۱۰۰۰ سی سی نمونه فاضلاب مایع یک بار و به صورت تصادفی از خروجی سیستم تصفیه فاضلاب بیمارستان بوعلی سینا در ظرف شیشه‌ای استریل جمع‌آوری شد. نمونه فاضلاب پس از جمع‌آوری، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هیچ گونه تیمار شیمیایی یا فیزیکی (مانند فیلتراسیون، سانتریفوژ یا استفاده از کلروفرم) پیش از کشت همزمان انجام نشد. سپس نمونه فاضلاب با محیط کشت BHI Broth (QUELAB, USA) مخلوط و ۱۰ سی سی از سوسپانسیون سویه باکتری که قبلاً از نمونه بیمار مبتلا به گاستریت جداسازی شده با غلظتی معادل ۰/۵ مک فارلند اضافه شد. این مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در شرایط میکروآئروفیلیک انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت مخلوط در شرایط استریل در فاکون ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور 5000×g سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، سوپرناتانت با فیلتر 0.45µm (Millipore, USA) فیلتر شد (۹، ۱۰).

تایید جداسازی فاژ با روش Spot Test

از سوسپانسیون سویه باکتری مقدار ۱۰ سی سی به محیط نیمه جامد Top Agar آگار، حاوی محیط مغذی

(BHI Agar (QUELAB, USA) با ۰/۸ درصد آگار و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه شد. سپس Top Agar بر روی پلیت حاوی Bottom Agar اضافه شد. Bottom Agar با استفاده از BHI Agar غنی شده با ۵ درصد خون گوسفند و غلظت ۱/۵ درصد آگار تهیه شد. سپس ۵۰ µl از سوپرناتانت فاژی به صورت قطره در مرکز پلیت ریخته شد و پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط میکروآئروفیلیک انکوبه شد. همزمان یک نمونه کنترل مثبت و نمونه کنترل منفی نیز تهیه شد. در نمونه کنترل مثبت ۱۰ سی سی از سوسپانسیون باکتری به Top Agar اضافه شد. در نمونه کنترل منفی جهت کنترل آلودگی Top Agar بر روی پلیت حاوی Bottom Agar اضافه شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت تشکیل هاله شفاف که تایید کننده حضور فاژ لیتیک می‌باشد بررسی شد (۹، ۱۰).

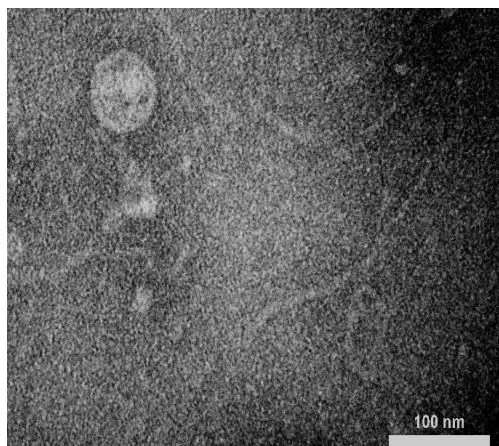
تعیین تیتراژ فاژ با روش (Double-layer agar DLA assay method)

در ابتدا سریال رقت از سوپرناتانت فاژ با تیتراژ 10⁶ PFU/mL در ۱۰ عدد لوله استریل تهیه شد. در تمامی لوله‌ها BHI Broth 900µl اضافه شد و 100 µl از فاژ به لوله اول اضافه شد. لوله شماره یازده به عنوان کنترل مثبت با اضافه نمودن 100µl سوسپانسیون باکتری و لوله شماره ۱۲ به عنوان کنترل منفی تنها شامل محیط BHI Broth در نظر گرفته شد. سپس به ۱۰ رقت تهیه شده از فاژ، سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. مخلوط هر لوله به Top Agar اضافه شد و سپس این مخلوط به Bottom Agar اضافه گردید. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط میکروآئروفیلیک انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت با شمارش پلاک‌ها تیتراژ محاسبه شد (۹، ۱۰).

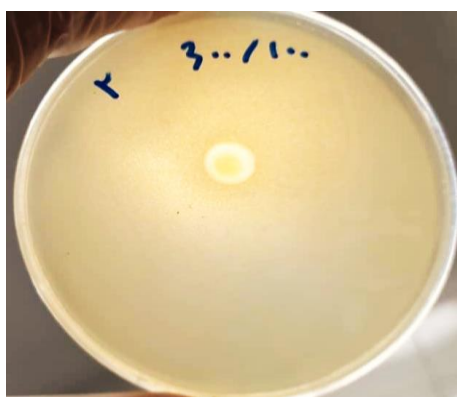
توصیف فنوتیپ باکتریوفاژ

جهت توصیف ویژگی‌های فنوتیپی فاژ جداسازی

DLA assay، تیتراژ جداسازی شده 10^6 PFU/mL محاسبه شد. فاژ لیتیک جداسازی شده با تشکیل هاله عدم رشد فعالیت لیتیک علیه هلیکوباکتریپیلوری را نشان داد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی از فاژ پودوویریده با رنگ آمیزی منفی، ۲ درصد اورانیل استات (pH 4-4.5)، ولتاژ 150Kv، با مقیاس 100nm



تصویر شماره ۲: روش Spot test، تشکیل هاله عدم رشد و تایید فعالیت لیتیک فاژ ایزوله شده علیه هلیکوباکتریپیلوری

پایداری فاژ در دماهای مختلف بررسی شد و مطابق تصویر شماره ۳، اپتیم فعالیت لیتیک فاژ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد مشاهده گردید. در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد کاهش شدیدی در تیتراژ مشاهده شد. در بررسی پایداری فاژ در pHهای مختلف، اپتیم فعالیت لیتیک فاژ در ۷، ۵ pH مشاهده گردید. اما در ۳، ۱ pH کاهش شدیدی در تیتراژ مشاهده شد (تصویر شماره ۴).

شده از میکروسکوپ الکترونی گذاره استفاده شد. بدین منظور فاژ لیتیک در میکروتیوپ استریل ریخته شده و با دور $10000\times$ g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب فاژ بر روی گرید (carbon-coated copper grids, USA) به میزان 20 μ l ریخته و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. یورانیل استات با (pH ۴/۵) بر سطح گرید ریخته شد و به مدت ده دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. رنگ اضافی با کاغذ صافی حذف و نمونه کاملاً خشک شد. پس از فیکساسیون فاژ، جهت گرفتن تصاویر از میکروسکوپ الکترونی مدل Microscope Philips 300 CM Electron با ولتاژ 150kV استفاده شد (۹، ۱۰).

بررسی پایداری فاژ در دماهای مختلف

سوپرنتنت فاژی با تیتراژ 10^6 PFU/mL در دماهای ۴، ۲۲، ۳۷، ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه می شود. سپس نسبت ۱:۱ از فاژ و باکتری با غلظت ۰/۵ مک فارلند اضافه شد و ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. تیتراژ فاژ با روش DLA assay اندازه گیری شد (۹، ۱۰).

بررسی پایداری فاژ در pHهای مختلف

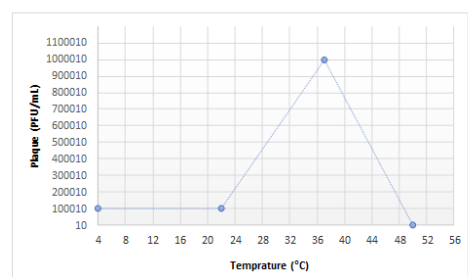
سوپرنتنت فاژی با تیتراژ 10^6 PFU/mL در pHهای ۱، ۳، ۵، ۷، ۹، ۱۱ به مدت ۱ ساعت در دمای محیط انکوبه شد. سپس نسبت ۱:۱ از فاژ و باکتری با غلظت ۰/۵ مک فارلند اضافه شد و ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت انکوبه شد. تیتراژ فاژ با روش DLA assay اندازه گیری شد (۹، ۱۰).

یافته ها

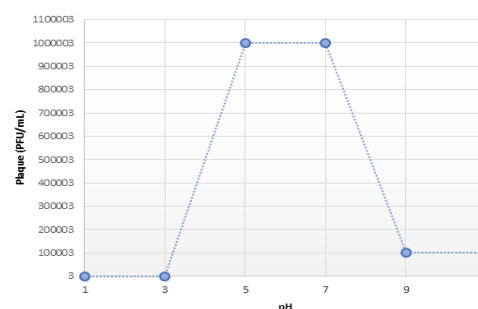
مطابق تصویر شماره ۱، فاژ پودوویریده با سر ایکوزوهدرال با ابعاد 90nm و دم کوتاه غیر منقبض شونده با طول 35nm جداسازی شد. فاژ جداسازی شده متعلق به خانواده پودوویریده و راسته کادوویرال ها دارای DNA دو رشته ای می باشد. در روش

گزارش کردند و فاژ ایزوله شده ویژگی‌های سازگار با خانواده پودوویریده را نشان دادند (۱۲، ۱۳). در همان سال، دو باکتریوفاژ لیزوژنیک هلیکوباکتر پیلوری (KHP30, KHP40) متعلق به خانواده کورتیکوویریده از بیماران در ژاپن جداسازی شدند. این پروفاژها با ساختار کروی و پوشش چربی پس از آزادسازی خود به خودی ذرات ویروسی توسط سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری به دست آمدند (۱۴). مطالعات اخیر نشان دادند، حضور باکتریوفاژهای لیزوژنیک باعث ایجاد تغییرات ژنتیکی در ژنوم میزبان می‌شوند. هم‌چنین تنوع در مورفولوژی، تحرک، زنده ماندن و بیماری‌زایی باکتری میزبان را ایجاد می‌نمایند (۱۵). رابطه بین حضور پروفاژها و تنوع ژنتیکی باکتریایی به‌طور گسترده مورد بحث قرار گرفته است. هلیکوباکتر پیلوری یک گونه ژنتیکی متنوع است. این تنوع با منشاء جغرافیایی جمعیت‌ها مرتبط می‌باشد. هم‌چنین عناصر ژنتیکی متحرک مانند پروفاژها در این تنوع ژنتیکی سهم می‌باشند (۱۶). به این دلیل در فاژتراپی استفاده از فاژهای لیتیک، محصولات فاژهای لیتیک مانند اندولیزین و هالین بسیار حائز اهمیت می‌باشد. مطالعات کارایی این آنزیم‌ها را برای درمان عفونت‌های باکتریایی که عمدتاً توسط باکتری‌های گرم منفی ایجاد می‌شوند و در کاهش حدت باکتریایی موثر هستند، گزارش کرده‌اند (۱۷).

با افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی گرایش به باکتریوفاژها افزایش یافته است. در واقع فاژ درمانی مزایای بالقوه متفاوتی نسبت به مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. زیرا فاژها و لیزین آن‌ها بسیار اختصاصی هستند و بر باکتری هدف تأثیر می‌گذارند و تأثیری بر میکروبیوم ندارند (۱۸). علاوه بر این، فاژها فقط در محل عفونت تکثیر می‌شوند و هیچ اثر ثانویه و جانبی برای آن‌ها توصیف نشده است (۱۹). اگرچه یافته‌ها نشان می‌دهند که پتانسیل استفاده از فاژهای لیتیک برای از بین بردن هلیکوباکتر پیلوری کمیاب هستند. Vale و همکاران در سال ۲۰۰۸، اولین بار فاژ لیتیک علیه هلیکوباکتر پیلوری را از مدفوع بیماری ایزوله کردند و فاژ



تصویر شماره ۳: تعیین اپتیمم فعالیت لیتیک فاژ در دماهای مختلف



تصویر شماره ۴: تعیین اپتیمم فعالیت لیتیک فاژ در pH های مختلف

بحث

در مطالعه حاضر، فاژ علیه هلیکوباکتر پیلوری از نمونه فاضلاب بیمارستان بوعلی سینا در استان مازندران جداسازی شد و فعالیت لیتیک فاژ با Spot test تایید شد. هم‌چنین تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی جداسازی یک نوع فاژ با ویژگی فوتویی متعلق به خانواده پودوویریده با سر ایکوزاهدراول و دم کوتاه غیر منقبض شونده با طول 35nm را نشان داد. ۱۳۰ گونه در این خانواده وجود دارد که به ۳ زیرخانواده و ۵۲ جنس اختصاصی طبقه‌بندی می‌شود. ویژگی این خانواده داشتن دم‌های بسیار کوتاه و غیرقابل انقباض، بدون پوشش، ژنوم DNA دو رشته‌ای خطی با طول ۴۰-۴۲ کیلو بایت که این ژنوم ۹ پروتئین ساختاری، یک DNA پلیمراز نوع B ترانسفراز آدنیل و یک RNA پلیمراز را کد می‌نماید (۱۱). همراستا با نتایج مطالعه حاضر در مطالعات Luo, Ferreira و همکاران به ترتیب در سال‌های ۲۰۲۲ و ۲۰۱۲، جداسازی فاژهای 1961P, HPy1R از سویه‌های هلیکوباکتر پیلوری،

ایزوله شده بدون دم و با قطر 100nm گزارش شد (۲۰). AbdelHalim و همکاران در سال ۲۰۱۸، دو فاژ لیتیک ($\phi HPE1$, $\phi HPE2$) را از فاضلاب جدا و با میکروسکوپ الکترونیکی مشخص کردند این فاژهای لیتیک به ترتیب متعلق به خانواده‌های *Podoviridae* و *Siphoviridae* می‌باشند (۲۱).

طبق نتایج مطالعه حاضر، فاژ لیتیک پودوویریده با تیتراژ 10^6 PFU/mL در محدوده pH ۱۱-۱۰ بقا و فعالیت لیتیک را نشان داد، اما در pH ۱۱-۱۰ کاهش تیتراژ و اپتیمم فعالیت لیتیک فاژ در pH ۵، ۷ مشاهده شد. هم‌چنین طبق نتایج مطالعه حاضر، کاهش تیتراژ ایزوله شده و حداکثر فعالیت لیتیک فاژ به ترتیب در دماهای ۵۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. هم‌راستا با مطالعه حاضر، Ferreira و همکاران در سال ۲۰۲۲، پایداری فاژ پودوویریده را در pH 3, 5 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان دادند و کاهش تیتراژ پودوویریده را در pH ۱/۱۳ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند (۱۲). هم‌چنین در مطالعه Uchiyama و همکاران در سال ۲۰۱۲، بقا و فعالیت فاژ ایزوله شده در رنج‌های ۱۰، ۲/۵ pH گزارش کردند (۱۴). باکتری هلیکوباکتر پیلوری ذاتا با تولید اوره آز می‌تواند در شرایط اسیدی معده زنده بماند. اما فاژ هلیکوباکتر پیلوری توانایی تولید آنزیم جهت محافظت و حفظ بقا در شرایط اسیدی معده را ندارد. وجود املاح و آنزیم‌ها در شیر معده می‌تواند تکثیر و غلظت فاژها را کاهش داده و اجزای بیولوژیکی و ساختاری آن‌ها را تغییر دهد (۲۲). از دست دادن تیتراژ فاژ در شرایط *In vitro* که مطابق شرایط اسیدی معده مدل‌سازی شده است ممکن است به این واقعیت مرتبط باشد. با این حال، کپسوله کردن فاژ می‌تواند راه حل مناسبی برای غلبه بر شرایط نامطلوب محیط معده

باشد (۲۳، ۲۴). دما و pH به عنوان عوامل فیزیکی خارجی شناخته شده بر جذب فاژ در سلول میزبان و خروج مواد ژنتیکی همراه با تکثیر فاژ، پایداری و زنده ماندن لیزات فاژی تأثیر می‌گذارند (۲۲). نتایج نشان می‌دهد که فاژها ممکن است یک جایگزین واقعی برای مبارزه با عفونت گوارشی ناشی از هلیکوباکتر پیلوری باشند. با این حال، مطالعات بیش‌تری در زمینه ایمنی فاژها، سمیت و عدم وجود یا انتقال ژن‌های حدت‌مورد نیاز است. حذف ژن‌های حدت، تغییر فاژ لیزوژنیک به فاژ لیتیک و استفاده از کوکتل فاژ جهت گسترش طیف اثر فاژ درمانی در درمان عفونت هلیکوباکتر پیلوری مناسب می‌باشند.

در این مطالعه، فاژ لیتیک پودوویریده با مشخصات فتوتیپی سرایکوزاهدراول و دم کوتاه غیر منقبض شونده از نمونه فاضلاب در بیمارستان بوعلی سینا جداسازی شد. فاژ ایزوله شده علیه هلیکوباکتری پیلوری در محدوده وسیعی از pH و دما پایدار بود، اما اپتیمم فعالیت لیتیک فاژ ایزوله شده در pH 5 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. به نظر می‌رسد این نتایج در مورد پیش‌بینی پایداری فاژ در شرایط اسیدی معده و بهره‌گیری از فاژ درمانی جهت درمان گاستریت ناشی از هلیکوباکتری پیلوری می‌تواند امیدوار کننده باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مطالعه لازم می‌دانند از مرکز تحقیقات تضمین کیفیت دارو، پژوهشکده علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات عفونی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی مازندران که در اجرای این طرح همکاری لازم را داشته‌اند تشکر و قدردانی نمایند. این مطالعه با شماره طرح 1402-3-263-68779 به تصویب رسیده است.

References

- Denic M, Touati E, De Reuse H. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*. 2020; 24: e12638. PMID: 32918351.
- Mezmaile L, Coelho LG, Bordin D, Leja M. Epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. 2020; 25: e12734. PMID: 32918344.

3. Sousa C, Ferreira R, Azevedo NF, Oleastro M, et al. *Helicobacter pylori* infection: From standard to alternative treatment strategies. Crit Rev Microbiol. 2021; 48(3): 376-396. PMID: 34569892.
4. Miftahussurur M, Yamaoka Y, Graham DY. *Helicobacter pylori* as an oncogenic pathogen, revisited. Expert Rev Mol Med. 2017; 19: e4. PMID: 28322182.
5. Evariste Tshibangu-Kabamba E, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance - from biology to clinical implications. Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2021; 18(9): 613-629. PMID: 34002081.
6. Boyanova L, Hadzhiyski P, Gergova R, Markovska R. Evolution of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: A topic of increasing concern. Antibiotics (Basel). 2023; 12(2): 332-352. PMID: 36830243.
7. Monteiro R, Pires DP, Costa AR, Azeredo J. Phage Therapy: Going Temperate? Trends Microbiol. 2019; 27(4): 368-378. PMID: 30466900.
8. Muñoz AB, Trespalacios-Rangel AA, Vale FF. An American lineage of *Helicobacter pylori* prophages found in Colombia. Helicobacter. 2021; 26(2): e12779. PMID: 33400833.
9. Samaee HR, Eslami G, Rahimzadeh G, Saeedi M, Davoudi Badabi A, Asare-Addo K, et al. Inhalation phage therapy as a new approach to preventing secondary bacterial pneumonia in patients with moderate to severe COVID-19: A double-blind clinical trial study. J Drug Deliv Sci Technol 2023; 84: 104486. PMID: 37123173.
10. Khosravi S, Amini R, Arabestani MR, Talebi S, Azizi Jalilian F. Isolation of a lytic bacteriophage for *Helicobacter pylori*. Gene Rep. 2021; 23: 101107.
11. Cui L, Watanabe S, Miyanaga K, et al. A Comprehensive Review on Phage Therapy and Phage-Based Drug Development. Antibiotics (Basel). 2024; 13(9): 870. PMID: 39335043.
12. Ferreira R, Sousa C, Gonçalves RFS, et al. Characterization and Genomic Analysis of a New Phage Infecting *Helicobacter pylori*. Int J Mol Sci. 2022; 23(14): 7885. PMID: 35887231.
13. Luo CH, Chiou PY, Yang CY, et al. Genome, integration, and transduction of a novel temperate phage of *Helicobacter pylori*. J Virol. 2012; 86(16): 8781-8792. PMID: 22696647.
14. Uchiyama J, Takeuchi H, Kato S, et al. Complete genome sequences of two *Helicobacter pylori* bacteriophages isolated from Japanese patients. J Virol. 2012; 86(20): 11400-11401. PMID: 22997420.
15. Takeuchi H, Kira M, Konishi S, et al. Polymorphisms in the *Helicobacter pylori* NY43 strain and its prophage-cured derivatives. Microbiology (Reading). 2018; 164(7): 877-882. PMID: 29738305.
16. Yahara K, Lehours P, Vale FF. Analysis of genetic recombination and the pan-genome of a highly recombinogenic bacteriophage species. Microb Genom. 2019; 5(5): e000282. PMID: 31310202.
17. Khan FM, Rasheed F, Yang Y, et al. Endolysins: a new antimicrobial agent against antimicrobial resistance. Strategies and opportunities in overcoming the challenges of endolysins against Gram-negative bacteria. Front Pharmacol. 2024; 15: 1385261. PMID: 38831886.
18. Brüssow H. Infection therapy: the problem of drug resistance- and possible solutions. Microb Biotechnol. 2017; 10(5): 1041-1046. PMID: 28737021.
19. Matsuzaki S, Rashel M, Uchiyama J, et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy

- against bacterial infectious diseases. J Infect Chemother. 2005; 11(5): 211-219. PMID: 16258815.
20. Vale FF, Lehours P. Relating phage genomes to *Helicobacter pylori* population structure: general steps using whole-genome sequencing data. Int J Mol Sci. 2018; 19(6): 1831. PMID: 29933614.
 21. Abdel-Haliem MEF, Askora A. Isolation and characterization of bacteriophages of *Helicobacter pylori* isolated from Egypt. Future Virol. 2018; 8(9): 821-826. PMID: 30245707.
 22. Nobrega FL, Costa AR, Santos JF, Siliakus MF, van Lent JW, Kengen SW, et al. Genetically manipulated phages with improved pH resistance for oral administration in veterinary medicine. Sci Rep. 2016; 6: 39235. PMID: 27976713.
 23. Loh B, Gondil VS, Manohar P, Khan FM, Yang H, Leptihn S. Encapsulation and Delivery of Therapeutic Phages. Appl Environ Microbiol. 2020; 87(4): e01979-20. PMID: 33310718.
 24. Cuomo P, Papaiani M, Fulgione A, Guerra F, Capparelli R, Medaglia C. An innovative approach to control *H. pylori*-induced persistent inflammation and colonization. Microorganisms. 2020; 8(8): 1214. PMID: 32785064.