

جداسازی، شناسایی و ارزیابی ۲ باکتریوفاژ لیتیک علیه سویه های بالینی سودوموناس آئروجینوزا مقاوم به آنتی بیوتیک از فاضلاب شهری - بیمارستانی شهرستان اصفهان

داریوش شکری^{۱*}، عباس سلیمانی دلفان^۲، رضا مویدنیا^۳، سینا مباشری زاده^۴، محمدصادق شیرسلیمیان^۵،
سعید عنایت اللهی^۶، جلیل انتشاری^۶

- (۱) مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
(۲) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
(۳) گروه پاتولوژی، بیمارستان الزهرا(س)، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
(۴) مرکز تحقیقات عفونت های بیمارستانی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
(۵) گروه زیست شناسی، واحد اشکذر، دانشگاه آزاد اسلامی، یزد، ایران
(۶) گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یزد، یزد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۲/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۸

چکیده

مقدمه: فائدرمانی یا استفاده از باکتریوفاژها برای درمان عفونت باکتری های بیماری زا، به عنوان یکی از روش های جایگزین آنتی بیوتیک ها در باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک مطرح است. هدف این تحقیق جداسازی باکتریوفاژهای موثر علیه سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک سودوموناس آئروجینوزا (*Pseudomonas aeruginosa*) و تعیین هویت آن ها می باشد.

مواد و روش ها: سویه های مختلف باکتری سودوموناس آئروجینوزا از نمونه های مختلف بالینی در طی ۹ ماه (تیر ۹۱ تا فروردین ۹۲) از سه بیمارستان الزهرا(س)، امید و شهید بهشتی شهر اصفهان جداسازی و شناسایی شدند و میزان مقاومت به آنتی بیوتیک در سویه های جداسازی شده نسبت به آنتی بیوتیک های رایج این باکتری (شامل ایمی پنم، مروپنم، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین، سفپییم، پپراسیلین/تازوباکتام، سفوتاکسیم و سفنازیدیم) به روش انتشار از دیسک (کربی-بائر) تعیین گردید. سویه های با مقاومت همه دارویی به این آنتی بیوتیک ها برای جداسازی باکتریوفاژهای اختصاصی انتخاب شدند. در مرحله بعد به منظور جداسازی باکتریوفاژها، نمونه برداری از فاضلاب بیمارستانی و فاضلاب شهری به عمل آمد. به کمک ایجاد پلاک حضور باکتریوفاژها بررسی گردیده و پس از غنی سازی و تغلیظ باکتریوفاژهای جداسازی شده و رنگ آمیزی نمونه ها، به منظور مشاهده مورفولوژی باکتریوفاژها و هم چنین اندازه گیری طول آن ها از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) استفاده گردید.

یافته های پژوهش: از میان ۸۱ سویه سودوموناس آئروجینوزا، ۳۸ (۴۷ درصد) سویه از این باکتری ها دارای مقاومت کامل به همه آنتی بیوتیک های تست شده بودند که پلاک های باکتریوفاژها بر علیه ۳۲ عدد (۸۴ درصد) از آن ها دیده شد. در تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ TEM دو باکتریوفاژ اصلی در مورد همه پلاک ها مورد شناسایی قرار گرفت که به خانواده های سیستوویریده (*Cystoviridae*) و لویویریده (*Leviviridae*) متعلق بودند.

بحث و نتیجه گیری: دو باکتریوفاژها جداسازی شده که به صورت مخلوط (یا کوکتل فازی) اثر باکتری کشی قوی علیه اکثر سویه های بسیار مقاوم باکتری سودوموناس آئروجینوزا داشتند می توانند کاندیداهای مناسبی برای استفاده در فائدرمانی بر علیه این عفونت ها باشند.

واژه های کلیدی: باکتریوفاژ، فائدرمانی، سودوموناس آئروجینوزا، مقاومت آنتی بیوتیکی، سیستوویریده، لویویریده

* نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات بیماری های گرمسیری و عفونی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: Dariush.shokri61@yahoo.com

مقدمه

گسترش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به نگرانی عمده‌ای تبدیل گشته است به طوری که درصد فراوانی از مرگ و میر سالانه بیمارستانی را به خود اختصاص می‌دهند (۱). از این میان باکتری سودوموناس آئروجینوزا به عنوان یکی از باکتری‌های اصلی عامل عفونت در بیماران بستری (اکتسابی از بیمارستان) درصد فراوانی از این مرگ و میرها را به خود اختصاص می‌دهد به طوری که برخی از سویه‌های جدا شده آن‌ها به تمامی آنتی‌بیوتیک‌های رایج از خود مقاومت نشان می‌دهند و هیچ آنتی‌بیوتیک رایج شناخته شده‌ای برای درمان آن‌ها وجود ندارد (۲). عدم درمان این عفونت‌ها با آنتی‌بیوتیک‌ها باعث گرایش محققان و دانشمندان به روش‌های کارا تر و جایگزین برای حذف و کنترل این باکتری‌ها شده است. یکی از این روش‌های جایگزین و یا مکمل، استفاده از باکتریوفاژها (فاژها) است که به منظور درمان عفونت در بسیاری از عفونت‌های مقاوم به درمان، به طور موفقیت آمیز مورد استفاده قرار گرفته است (۳-۶). این پدیده یا فاژدرمانی به معنای استفاده از باکتریوفاژها برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌ها و به خصوص استفاده از چند فاژ هم زمان به صورت مخلوط که کوکتل فاژی نامیده می‌شود برای افزایش طیف میزبان در مورد یک جنس خاص، بر علیه عفونت‌های مختلف باکتریایی استفاده شده است (۳،۴). برخلاف بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها، فاژها اسلحه‌های هوشمندی هستند که اختصاصی عمل می‌کنند و بنا بر این به باکتری‌های مفید بدن مانند باکتری‌های روده آسیب کمی وارد می‌کنند در حالی که آنتی‌بیوتیک‌ها آن‌ها را از بین می‌برند (۴،۵). از طرف دیگر فاژها به صورت محدود عمل می‌کنند و بعد از نابود کردن باکتری‌های مضر به چرخه غیر فعال زندگی خود وارد می‌شوند و عملاً در برابر باکتری‌های غیر میزبان فعالیتی از خود نشان نمی‌دهند. به علاوه، تولید فاژها آسان و ارزان است، آلرژی را تحریک نمی‌کنند و اثرات جانبی کمی دارند (۷،۸). فاژدرمانی در کشورهای اروپای شرقی از قبیل گرجستان و لهستان برای درمان عفونت‌های مختلف استفاده می‌شود اما در حال حاضر محققان در

بسیاری از کشورهای اروپایی و امریکایی، به فاژدرمانی روی آورده‌اند (۷). از فاژدرمانی برای درمان عفونت‌های ناشی از سودوموناس، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، استرپتوکوکوس‌ها و همین‌طور باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه از جمله اشرشیاکلی استفاده شده است (۸،۹).

هدف این تحقیق جستجوی باکتریوفاژهای موثر بر علیه سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک سودوموناس آئروجینوزا جداسازی شده از عفونت‌های بیمارستانی و تعیین هویت و ارزیابی فعالیت آن‌ها بود به گونه‌ای که بتوان آن‌ها را برای فاژدرمانی معرفی کرد.

مواد و روش‌ها

الف) جداسازی سویه‌های سودوموناس آئروجینوزا و انجام تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی بر روی آن‌ها: در ابتدا سویه‌های مختلف باکتری سودوموناس آئروجینوزا از نمونه‌های مختلف بالینی جداسازی و شناسایی شدند. شناسایی ایزوله‌ها به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی (روش‌های فنوتیپیک) شامل تست‌های کاتالاز، اکسیداز، DNase، حساسیت به دیسک کولیسیتین، TSI، MR، VP، سیمون سیترات، SIM، لیزین دکربوکسیلاز، اورنیتین دکربوکسیلاز، فنیل آلانین دامیناز، تست OF با قند گلوکز و ONPG انجام شد (۱۰). الگوی مقاومت به آنتی‌بیوتیک در سویه‌های جداسازی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، مروپنم (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، سفپیم (۳۰ میکروگرم)، پپراسیلین/تازوباکتام (تازوسین) (۱۰/۱۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم) و سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم) (خریداری شده از شرکت مست انگلیس) به روش انتشار از دیسک و با روش استاندارد کربی-بائر براساس راهنمای موسسه استاندارد آزمایشگاهی و کلینیکی تعیین گردید (۱۱). سویه‌های با مقاومت همه دارویی به آنتی‌بیوتیک‌های فوق برای جداسازی فاژهای اختصاصی انتخاب شدند.

ب) جداسازی باکتریوفاژها: به منظور جداسازی باکتریوفاژهای موثر بر باکتری‌های جداسازی شده در مرحله قبل، نمونه برداری از فاضلاب بیمارستانی و فاضلاب شهری به عمل آمد. آب این مناطق در بطری

های درب دار استریل به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. نمونه های جداسازی شده پس از انکوباسیون در دمای آزمایشگاه به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردیده و سپس محلول روئی به وسیله فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر از جنس استات سلولز فیلتر شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۲).

ج) مشاهده اثر پلاک ایجاد شده به وسیله باکتریوفاژ بر روی باکتری میزبان: کشت تازه ای از باکتری های سودوموناس آئروژینوزای جداسازی شده در مرحله قبل و نیز سودوموناس آئروژینوزای استاندارد (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) تهیه شده و بر روی محیط BHI کشت داده شد، نمونه ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و پس از این مرحله ۱۵ میکرولیتر از محلول تهیه شده در مرحله قبل بر روی پلیت حاوی باکتری قرار داده شد. به منظور مشاهده اثر پلاک و بدست نیامدن واکنش مثبت کاذب ۲۰ میکرولیتر از محلول جداسازی باکتریوفاژ به صورت نمونه شاهد در شرایط برابر با پلیت های فاژ مورد آزمایش قرار داده شد. ایجاد پلاک بر روی کشت باکتری به عنوان مثبت بودن تست از نظر حضور فاژ در نظر گرفته شد.

د) غنی سازی باکتریوفاژهای جداسازی شده: جهت غنی سازی باکتریوفاژهای مورد مطالعه، کشت تازه سویه های مختلف باکتری سودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت نوترینت برات تهیه شد و به میزان یک درصد از محلول جداسازی شده در مرحله اول (احتمالاً حاوی باکتریوفاژ) به این کشت ها اضافه گردید و مخلوط کشت باکتری و باکتریوفاژ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در ۶۰ دور در دقیقه نگهداری شد. هم چنین به منظور تهیه یک استاندارد منفی، نمونه کشت مشابه نمونه اصلی اما بدون محلول باکتریوفاژ کشت گردید. بعد از مدت ۴۸ ساعت نمونه ها ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و محلول روئی (حاوی ذرات باکتریوفاژ) پس از فیلترگذاری با فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر از جنس استات در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. جهت غنی سازی مناسب باکتریوفاژها این مراحل

چندین مرتبه تکرار گردید (۱۲،۱۳).

ه) تغلیظ باکتریوفاژها: محلول حاوی باکتریوفاژ و باکتری میزبان که از ۲۴ ساعت قبل با یکدیگر انکوبه شده بودند به مدت یک ساعت روی یخ نگه داشته شد و سپس حذف باکتری ها و مواد اضافی آن ها توسط سانتریفوژ در دور ۱۱۰۰۰g به مدت ده دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد به انجام رسید. پس از این مرحله مایع روئی جدا شده و برای رسوب ذرات فازی معلق در آن از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ واحد تا غلظت ۱۰ درصد وزنی/حجمی استفاده شد و رسوب به دست آمده به لوله های سانتریفوژ منتقل شده و برای بازیافت ذرات فازی یک سانتریفوژ دیگر در دور ۱۱۰۰۰g به مدت ده دقیقه در ۴ درجه انجام گردید و مایع روئی دور ریخته شده و رسوب خشک پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ به همراه ذرات فاژ حاصل در محلول بافر SM معلق گردید (برای تهیه بافر SM ۵/۸ گرم NaCl، ۲ گرم $MgSO_4$ ، ۵۰ میلی لیتر Tris-HCl ۱ مولار، ۵ میلی لیتر محلول ۲ درصد وزنی-حجمی ژلاتین را به کمک آب به حجم ۱ لیتر رسانده شد). در نهایت برای جداسازی پلی اتیلن گلیکول و باقی مانده باکتری ها از سوسپانسیون فازی، به مقدار هم حجم محلول باقی مانده کلروفرم اضافه گردید (میزان و زمان استفاده از کلروفرم به اندازه ای بود که باعث حذف غشاء ویروس در صورت وجود نشد). یک ورتکس آرام به مدت سی ثانیه انجام شد و سپس برای جدا کردن فاز آلی و فاز آبی، سانتریفوژ ۳۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت. فاز آلی دور ریخته و فاز آبی که دارای ذرات فازی بود به منظور مطالعه به وسیله میکروسکوپ الکترونی در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۲،۱۳).

و) شناسایی خانواده باکتریوفاژها به کمک میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM): نمونه های باکتریوفاژ غلیظ شده در مرحله قبل به وسیله رنگ یورانیل استات (نمک اورانیوم) ۲ درصد وزنی/حجمی با pH برابر ۴ تا ۴/۵ به صورت رنگ آمیزی منفی رنگ آمیزی شده و بر روی گرید مسی ۴۰۰ مش ثابت گردید. سپس اضافه رنگ به وسیله کاغذ فیلتر خشک شده و جهت مشاهده آماده گردید. پس از رنگ آمیزی

باکتریوفاژهای تغلیظ شده، نمونه‌ها به منظور مشاهده مورفولوژی باکتریوفاژ و هم چنین اندازه گیری طول آن‌ها به وسیله میکروسکوپ TEM (مدل فلیپس CM10) مورد بررسی قرار گرفتند و تصاویر گرفته شده با فاژهای استاندارد شناسایی شده قبلی موجود در منابع معتبر به منظور تشخیص خانواده آن‌ها مطابقت داده شد (۱۶-۱۳).

یافته‌های پژوهش

تعداد ۸۱ سویه سودوموناس آئروجینوزا از نمونه‌های بالینی مختلف در طی ۹ ماه (تیر ۹۱ تا فروردین ۹۲) از سه بیمارستان الزهرا(س)، امید و شهید بهشتی شهر اصفهان جداسازی و شناسایی گردیدند. تست‌های بیوشیمیایی باکتری سودوموناس آئروجینوزا به صورت زیر بود: تست‌های مثبت شامل: کاتالاز و اکسیداز، سیمون سیترات، حرکت، O قند گلوکز مثبت و تست

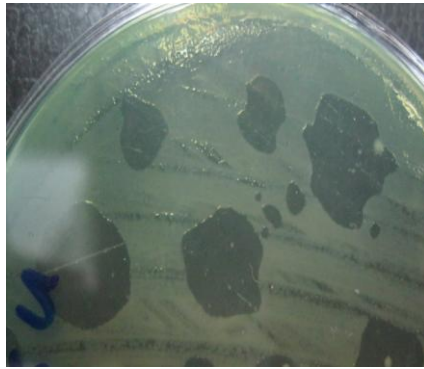
های منفی نیز شامل: VP، MR، DNase، لیزین دکربوکسیلاز، اورنیتین دکربوکسیلاز، فنیل آلانین دامیناز، اندول، تولید SH2 و ONPG بودند. هم چنین حساس به دیسک کولیستین و دارای الگوی alk/alk در محیط TSI بودند. نمونه‌های بالینی که سویه‌ها از آن‌ها جداسازی گردید شامل ادرار میانی (۴۵ عدد)، نمونه‌های تنفسی (۱۵ عدد)، نمونه خون (۸ عدد)، مایعات استریل بدن (۶ عدد)، زخم و آبسه (۴ عدد) و سایر نمونه‌ها (۳ عدد) بودند. میزان مقاومت این باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در جدول شماره ۱ آمده است. ۳۸ سویه از این باکتری‌ها دارای مقاومت کامل به همه آنتی‌بیوتیک‌های تست شده علیه آن‌ها بودند و این سویه‌ها برای جداسازی فاژ بر علیه آن‌ها انتخاب شدند.

جدول شماره ۱. میزان مقاومت سویه‌های مختلف جداسازی شده سودوموناس به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف

آنتی‌بیوتیک	حساس تعداد(درصد)	نیمه حساس تعداد(درصد)	مقاوم تعداد(درصد)
سیروفلوکساسین	۳۰ (۳۷)	۲ (۲/۵)	۴۹ (۶۰/۵)
پپراسیلین/تازوباکتام	۳۰ (۳۷)	۴ (۵)	۴۷ (۵۸)
ایمی‌پنم	۱۴ (۱۷/۳)	۹ (۱۱/۱)	۵۸ (۷۱/۶)
مروپنم	۱۱ (۱۳/۶)	۵ (۶/۲)	۶۵ (۸۰/۲)
آمیکاسین	۲۲ (۲۷/۲)	۴ (۴/۹)	۵۵ (۶۷/۹)
سفتازیدیم	۲۰ (۲۴/۷)	۲ (۲/۵)	۵۹ (۷۲/۸)
سفتوتاکسیم	۸ (۹/۹)	۱ (۱/۲)	۷۲ (۸۸/۹)
سفیپیم	۱۴ (۱۷/۳)	۰ (۰)	۶۷ (۸۲/۷)

سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزا ATCC27853) پلاک‌های موثری را ایجاد نمودند (شکل شماره ۱ الف و ۱ ب). از مجموع ۳۸ (۴۷ درصد) باکتری دارای مقاومت به همه آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده، پلاک‌ها بر علیه ۳۲ باکتری (۸۴ درصد) دیده شد.

در مورد مناطقی که باکتریوفاژ از آب آن مناطق جدا شده بود، نمونه فاضلاب بیمارستانی دارای فاژهای مناسب برای باکتری سودوموناس آئروجینوزا بود و باکتریوفاژهای جداسازی شده به خوبی در محل تزریق بر روی محیط کشت حاوی باکتری‌های مورد نظر (شامل سویه‌های بالینی سودوموناس آئروجینوزا و



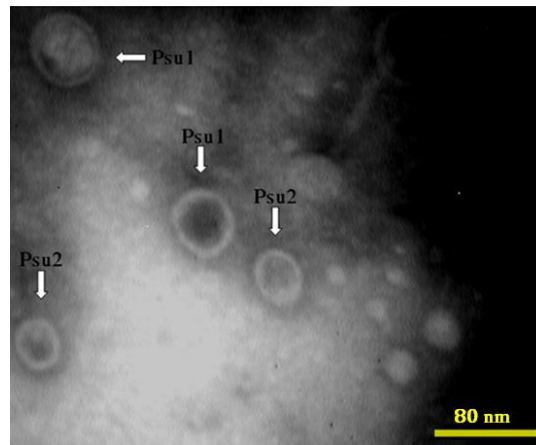
شکل شماره ۱ الف. ایجاد پلاک های با اندازه متفاوت توسط فازهای اختصاصی سودوموناس آئروجینوزا در یکی از سویه های بالینی جداسازی شده



شکل شماره ۱ ب. ایجاد پلاک های با اندازه متفاوت توسط فازهای اختصاصی سودوموناس آئروجینوزا در سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزا ATCC 27853

سیستوویریده متعلق باشد و نمونه مورد مطالعه Psu2 همانند نمونه Psu1 دارای مورفولوژی شش وجهی و بدون دم می باشد و از نظر مقیاس مشاهده شده دارای ابعاد تقریبی ۳۰ نانومتر است که با مقاومت به کلرفرم به نظر می رسد به خانواده لویویریده متعلق باشد(شکل شماره ۲).

در تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ TEM دو فاز اصلی در مورد همه پلاک ها مورد شناسایی قرار گرفت که در شکل شماره ۲ نشان داده شده اند(Psu1 و Psu2). نمونه Psu1 با ریخت شناسی شش وجهی، بدون دم و ابعاد تقریبی ۷۵ نانومتر و حساس بودن به کلرفرم در آزمایشات به نظر می رسد به خانواده



شکل شماره ۲. ساختار باکتریوفازهای اختصاصی جداسازی شده برای سویه های سودوموناس آئروجینوزا گرفته شده توسط میکروسکوپ TEM. Psu1 فاز متعلق به خانواده سیستوویریده (با اندازه تقریبی ۷۵ نانومتر) و Psu2 فاز متعلق به خانواده لویوپریده (با اندازه تقریبی ۳۰ نانومتر).

بحث و نتیجه گیری

ظهور و گسترش باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک باعث گرایش محققین به روش های کارا تر برای حذف آن ها شده است و در حال حاضر استفاده از فازها به منظور درمان عفونت در بسیاری از عفونت های مقاوم به درمان، به طور موفقیت آمیز مورد استفاده قرار گرفته است (۱۶،۱۷). در مطالعه حاضر هدف جداسازی فازهای فعال علیه سویه های مقاوم باکتری سودوموناس آئروجینوزا بود. در مورد فازهای موثر بر سویه های سودوموناس آئروجینوزا مطالعات متعددی به انجام رسیده است. Zanetti و همکاران در سال ۲۰۱۳ فازهای سویه های بیماری زای سودوموناس آئروجینوزا را جداسازی کردند که از خانواده های سیفوویریده و مایوویریده بودند (۱۸). هم چنین Kumari و همکاران در سال ۲۰۰۹ پنج فاز مختلف اختصاصی از سویه های سودوموناس آئروجینوزا جداسازی شده از عفونت های زخم را برای فازدرمانی آن ها مورد استفاده قرار دادند (۱۹). این محققین موش های آزمایشگاهی را با سویه های سودوموناس آئروجینوزا آلوده کردند و سپس فازها را بر علیه آن ها مورد استفاده قرار دادند و توانستند به طور کامل عفونت ها را درمان کنند. در مطالعه دیگر Fu و همکاران در سال ۲۰۱۰ فازهای اختصاصی سودوموناس آئروجینوزا را بر علیه بیوفیلم

ناشی از این سویه ها در کتترهای مورد استفاده در بیمارستان مورد استفاده قرار دادند (۲۰). نتایج مطالعه حاضر همانند سایر مطالعات، نشان دهنده تاثیر باکتری کشی باکتریوفازهای جداسازی شده بر علیه سویه های باکتری سودوموناس آئروجینوزا بود. مخلوط فازهای استفاده شده دارای اثر لیتیک علیه اکثر سویه های باکتری فوق با مقاومت همه دارویی بود که نشان دهنده وسیع الطیف بودن این فازها می باشد و آن ها را به عنوان کاندیدای مناسبی برای فازدرمانی به صورت مخلوط مطرح می سازد. از طرفی با تعیین هویت این فازها به کمک میکروسکوپ TEM که تشخیص خانواده ویروس ها را فراهم می کند این فازها به خانواده های سیستوویریده و لویوپریده تعلق گرفتند که اولی جزو فازهای دارای ژنوم RNA دو رشته ای و فاز دومی جزو فازهای RNA دار تک رشته ای می باشند هر چند برای تایید نهایی هویت آن ها نیازمند استفاده از روش های دقیق تری مثل PCR می باشیم. هر دوی این فازها قبلاً به عنوان فازهای جنس سودوموناس شناخته شده بودند و جزو فازهای محدود بدون دم در این باکتری هستند (۱۴). فازهای سیستوویریده به علت دارا بودن غشاء به کلروفرم حساس هستند اما فازهای خانواده لویوپریده به خاطر عدم دارا بودن غشاء دارای مقاومت به کلروفرم

فوق داشتند می توانند کاندیداهای مناسبی برای استفاده در فازدرمانی بر علیه این عفونت ها باشند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (کد تصویبی طرح: ۲۹۰۳۰۲) به انجام رسید. بدین وسیله از مسئولین زحمت کش این مرکز تشکر و قدردانی می گردد.

هستند (۱۴،۱۵). حضور هم زمان این دو فاز باعث اثر وسیع الطیفی آن ها شده بود به گونه ای که بر علیه غالب سویه های کاملاً مقاوم سودوموناس دارای اثر مهاری بودند. به طور کلی فازهای جداسازی شده که دارای اثرات بسیار کارایی بودند قبلاً به طور هم زمان بر علیه سویه های مقاوم همه دارویی سودوموناس مورد استفاده قرار نگرفته اند و به نظر می رسد این دو فاز که به صورت مخلوط اثر باکتری کشی قوی و وسیع الطیف علیه اکثر سویه های بسیار مقاوم باکتری

References

1. Kollef MH, Fraser VJ. Antibiotic resistance in the intensive care unit. *Ann Intern Med* 2001;134:298-314.
2. Bradley D. The structure and infective process of a *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage containing ribonucleic acid. *J Gener Microbiol* 1966; 45:83-96.
3. Miller R. Environmental bacteriophage-host interactions: Factors contribution to natural transduction. *Ant Lee* 2001;79:141-7.
4. Inal JM. Phage therapy a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Arch Immunol Therapy Exp* 2003; 51:237-44.
5. Merabishvili M, Pirnay JP, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials. *Plos one* 2009; 4:44-9.
6. Ryan EM, Gorman SP, Donnelly RF, Gilmore BF. Recent advances in bacteriophage therapy: how delivery routes, formulation, concentration and timing influence the success of phage therapy. *J Pharm Pharmacol* 2011; 63:1253-64.
7. Slopek S, Weberdabrowska B, Dabrowski M, Kucharewiczukowska A. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Arch Immunol Therapy Exp* 1987; 35:569-83.
8. Harper DR, Enright MC. Bacteriophages for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Appl Microbiol* 2011; 111:1-7.
9. Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11:393-400.
10. Fischetti VA. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr Opin Microbiol* 2008;11:393-400.
11. Fischetti VA. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol* 2005;13:491-6.
12. Delfan AS, Etemadifar Z, Bouzari M, Emtiazi G. Screening of novel bacteriophage infection in *Pseudomonas putida* isolated from potato disease. *Jundi J Microbiol* 2012; 5:550-4.
13. Borysowski J, Weberdabrowska B, Gorski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med* 2006;231:366-77.
14. Hermoso JA, Garcia JL, Garcia P. Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics. *Curr Opin Microbiol* 2007;10:461-72.
15. Ackermann HW. Phage classification and characterization. *Meth Molecul Biol* 2009;501:127-40.
16. Hajhashemi B, Farzanehkhah M, Hajia M, Rahbar M. Evaluation of sensitivity and specificity of Hodge Test in diagnosis of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Biol J Microb* 2013; 2:59-64.
17. Webb JS, Lau M, Kjelleberg S. Bacteriophage and phenotypic variation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *J Bacteriol* 2004;186:8066-73.
18. Zanetti CCS, Mingrone RCC, Kisielius JJ, Ueda IM, Pignatari ACC. Characterization of bacteriophages infecting clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* stored in a culture collection. *Brazil J Med Biol Res* 2013;46:689-95.
19. Kumari S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage treatment of burn wound

infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO in BALB/c mice. American J Biomed Sci 2009; 1:385-94.
20. Loessner MJ. Bacteriophage endolysins-current state of research and

applications. Curr Microbiol 2005;8:480-7.

Opin



Isolation Identification and Evaluation of Two Lytic Bacteriophages Against Clinical Antibiotic-Resistant Strains of *Pseudomonas aeruginosa* from Waste Water and Hospital Sewage of Isfahan City

Shokri D^{1*}, Soleimanidelfan A², Moayednia R³, Mobasherizadeh S⁴, Shirsalimian M⁵, Enayatollahi S⁶, Enteshari J⁷

(Received: March 9, 2015

Accepted: May 19, 2015)

Abstract

Introduction: Phagotherapy is the therapeutic use of bacteriophages to treat pathogenic bacterial infections as alternative to antibiotics for treatment of resistant bacteria. The aims of this study were to isolate, identify and evaluate effective bacteriophages active against antibiotic resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials & methods: Different *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimens during 9 months (July 2013 to March 2014) in three Isfahan hospitals (AlZahra, Omid and Shahid Beheshti hospitals) and Kirby Bauer's disc diffusion method was used for determination of resistance profiles of these isolates using different antibiotics including Amikacin, Imipenem, Meropenem, Ciprofloxacin, Ceftazidime, Cefepime, Cefotaxime, Piperacillin-tazobactam. The resistant strains to all tested antibiotics were selected for finding their specific bacteriophages from waste water and

hospital sewage. Presence of phage investigated by plaque formation and after enrichment and stained of samples, TEM microscope was used for determination of phage morphology and size.

Findings: Among 81 *Pseudomonas aeruginosa* isolates, 38 isolates (47%) were resistant to all tested antibiotics and plaque due to phages was detected against 32 (84%) among these 38 isolates. Two phages belong to Cystoviridae and Leviviridae identified using TEM microscope.

Discussion & Conclusions: It seems that the mixture of two phages (cocktails phages) that has high bactericidal effect against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* can be good candidates for use in phagotherapy.

Keywords: Bacteriophage, Phagotherapy, *Pseudomonas aeruginosa*, Antibiotic resistance, Cystoviridae, Leviviridae

1. Infectious Diseases and Tropical Medicine Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2. Dept of Biology, Isfahan University, Isfahan, Iran

3. Dept of Pathology, Alzahra Hospital, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4. Nosocomial Infection Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5. Dept of Microbiology, Islamic Azad University, Ashkezar Branch, Yazd, Iran

6. Dept of Microbiology, Islamic Azad University, Yazd Branch, Yazd, Iran

* Correspondin author Email: Dariush.Shokri61@yahoo.com