

Bacteriolytic Activity of Novel Bacteriophage P ϕ Bw Ec01 from Cystoviridae Family against the Clinical Strain of Antibiotic Resistant Escherichia Coli in Burn Wounds

Ladan Rahimzadehtorabi¹, Monir Doudi^{1*}, Nafiseh Sadat Naghavi¹, Ramesh Monajemi²

¹ Dept of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

² Dept of Biology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: 19 May 2021

Revised: 07 June 2021

Accepted: 26 June 2021

* Correspondence to:

Monir Doudi

Dept of Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran

Email: monirdoudi@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: The emergence of Escherichia coli resistance to common antibiotics in burn wound patients has become a controversial problem in Iran trauma and burn hospitals. The emergence of more and more drug resistance by infectious pathogens paves the way for further study of the nature of phages, and phage therapy can significantly address this crisis. In the first phase, this study aimed to isolate and identify the biochemical and molecular nature of antibiotic-resistant E. coli, which causes burn wound infections. The second phase of this study isolated the specific phages of the bacteria in these wounds and then evaluated the morphological characteristics of the phage and the host area.

Material & Methods: In this study, 50 bacterial strains were isolated from specialized accident and burn hospitals in Isfahan, Yazd, Tehran, and Rasht. Accurate identification and study of antibiotic resistance profile was performed by disk diffusion method on agar. The 16S rRNA coding gene was amplified using the PCR technique. The PCR product was then sent to "Gene Azma" laboratory for sequencing. In order to isolate the possible phages, a sample was taken from the raw wastewater (entrance of the northern treatment plant) in Isfahan, Iran. Phage morphology was assessed and reported by transmission electron microscopy (TEM); moreover, phage plate count and host range were assessed for this bacteriophage.

Findings: Bacterial 16S rRNA sequence was located in NCBI with MW844043 Accession Number. The specific phage P ϕ Bw-Ec01 was significantly able to infect resistant E. coli bacteria. TEM demonstrated that the isolated phage was dsRNA and belonged to the family Cystoviridae with prototype ϕ 6. P ϕ Bw-Ec01 lytic phage was highly effective in inhibiting the growth of E. coli strain ADB_66-1 in this study.

Discussion & Conclusion: The results of this report showed that E. coli isolated from burn wounds of hospitalized patients had high resistance to common antibiotics. The studied phage in this study can be a good choice and a suitable option for controlling and inhibiting these resistant pathogens in the burn wounds of hospitalized patients. It is hoped that with more extensive research on the identity and study of the effectiveness of phages, the rate of bacterial lysis will be investigated. This issue will reduce the microbial load caused by resistant and infectious pathogens and can be used as an effective adjuvant against burn wound infections.

Keywords: Antibiotic resistance, Bacteriophage, Burn wound infection, Escherichia coli, Phage therapy, 16S rRNA

➤ How to cite this paper

Rahimzadehtorabi L, Doudi M, Naghavi N S, Monajemi R. Bacteriolytic Activity of Novel Bacteriophage P ϕ Bw Ec01 from Cystoviridae Family against the Clinical Strain of Antibiotic Resistant Escherichia Coli in Burn Wounds. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;29(5): 44-55.



© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

Journal of Ilam University of Medical Sciences: Volume 29, Issue 5, 2022

فعالیت باکتریولیتیک باکتریوفاز جدید PφBw-Ec01 از خانواده Cystoviridae علیه سویه بالینی Escherichia coli مقاوم به آنتی‌بیوتیک موجود در زخم سوختگی

لادن رحیم‌زاده ترابی^۱، منیر دودی^{۱*}، نفیسه‌السادات نقوی^۱، رامش منجمی^۲

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران

^۲ گروه بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۹

تاریخ داوری: ۱۴۰۰/۰۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵

نویسنده مسئول:

منیر دودی

گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان، فلاورجان، اصفهان، ایران

Email: monirdoudi@yahoo.com

مقدمه: پیدایش مقاومت Escherichia coli به آنتی‌بیوتیک‌های معمول در بیماران دارای زخم سوختگی، به یک چالش جدی و بحث‌برانگیز در بیمارستان‌های سوانح و سوختگی ایران تبدیل شده است. ظهور هرچه بیشتر مقاومت دارویی از سوی پاتوژن‌های عفونی، زمینه‌ساز مطالعه بیشتر ماهیت فاژهاست و مقوله فاژتراپی به‌طور چشمگیری می‌تواند با این بحران پیش رو مقابله کند؛ بنابراین، هدف از این تحقیق در فاز اول، جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی Escherichia coli مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ایجادکننده عفونت‌های زخم‌های سوختگی است و در فاز دوم، جداسازی فاژهای اختصاصی باکتری‌های این زخم‌ها و سپس ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیکی فاژ و بررسی محدوده میزبان بود.

مواد و روش‌ها: در این بررسی، جمعاً ۵۰ ایزوله باکتریایی از بیمارستان‌های تخصصی سوانح و سوختگی شهرهای اصفهان، یزد، تهران و رشت جداسازی شدند که در میان آن‌ها، شناسایی دقیق و بررسی پروفایل مقاومت آنتی‌بیوتیکی توسط روش انتشار دیسک در آگار صورت گرفت. تکثیر ژن کدکننده S rRNA^{۱۶} با استفاده از تکنیک PCR انجام گردید؛ سپس محصول PCR برای تعیین توالی به آزمایشگاه ژن‌آزما ارسال شد. به‌منظور جداسازی فاژهای احتمالی، برداشت نمونه از فاضلاب خام (ورودی تصفیه‌خانه شمال) اصفهان در ایران صورت گرفت. بررسی مورفولوژی فاژ توسط TEM، شمارش پلاک‌های فاژی و ارزیابی محدوده میزبان برای این باکتریوفاز انجام و گزارش شد.

یافته‌ها: توالی S rRNA^{۱۶} باکتری در NCBI با Accession Number [MW844043] قرار گرفت. فاژ اختصاصی PφBw-Ec01 به‌طور فراوانی قادر به عفونی کردن باکتری‌های Escherichia coli مقاوم بود. میکروسکوپ الکترونی TEM نشان داد که فاژ ایزوله شده ویروس بدون دم و dsRNA و متعلق به خانواده Cystoviridae با پروتوتایپ φ۶ است. فاژ لیتیک PφBw-Ec01 میزان اثربخشی بالایی را در جلوگیری از رشد باکتری Escherichia coli سویه ADB_66-1 در این مطالعه داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج این گزارش مبین آن بود که Escherichia coli جداشده از زخم سوختگی بیماران بستری، مقاومت نسبتاً بالایی به گروه عمده‌ای از آنتی‌بیوتیک‌های معمول داشته است. فاژ مطالعه‌شده در این تحقیق می‌تواند یک انتخاب خوب و گزینه مناسب برای کنترل و مهار این گونه پاتوژن‌های مقاوم در زخم سوختگی بیماران بستری باشد. امید است که با تحقیقات گسترده‌تر درباره هویت و مطالعه میزان اثربخشی سایر باکتریوفازها، لیز باکتریایی حاصل از تأثیر فاژها را بررسی کرد تا بار میکروبی ناشی از پاتوژن‌های مقاوم و عفونت‌زا را کاهش داد و بتوان به‌عنوان یک عامل کمک درمانی مؤثر در برابر عفونت‌های زخم سوختگی از آن‌ها استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: اشریشیا کلائی، باکتریوفاز، سوختگی، فاژتراپی، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عفونت زخم، S rRNA^{۱۶}

استناد: رحیم‌زاده ترابی، لادن؛ دودی، منیر؛ نقوی، نفیسه‌السادات؛ منجمی، رامش. فعالیت باکتریولیتیک باکتریوفاز جدید PφBw-Ec01 از خانواده Cystoviridae علیه سویه بالینی Escherichia coli مقاوم به آنتی‌بیوتیک موجود در زخم سوختگی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دی

۱۴۰۰؛ ۲۹(۵): ۴۴-۵۵.



مقدمه

مقاومت دارویی در باکتری‌ها به‌ویژه در *Escherichia coli* احتمالاً می‌تواند ناشی از سازوکارهای گوناگونی باشد؛ مثلاً دیده‌شده بعضی از باکتری‌ها ممکن است ژن‌های متعددی را جمع‌آوری کنند که هر کدام مقاومت در برابر یک داروی واحد را کد می‌کند و تنها یک سلول مسئول این واقعه است. این تجمع معمولاً روی پلاسمیدهای مقاوم رخ می‌دهد. از سوی دیگر، مشاهده‌شده است که طیف وسیعی از مقاومت چنددارویی نیز با گسترش بیان ژن‌هایی به‌وجود می‌آیند که پمپ‌های خروجی چنددارویی را کدگذاری می‌کنند (۳-۱). سوختگی‌ها مسئول بسیاری از تغییرات پاتوفیزیولوژیکی (۴) و نشان‌دهنده ترومای شدید (۵، ۶) هستند. میکروارگانیزم‌ها از جمله باکتری‌ها یا سایر عوامل عفونی فرصت‌طلب به لایه سطحی پوست آسیب وارد می‌کنند و به ایجاد زخم‌های عفونی دردناک منجر می‌شوند (۷) این عمل باعث تأخیر در روند بهبود زخم یا وخیم شدن آن می‌گردد، به‌طوری‌که عفونت‌های باکتریایی موجود در زخم‌ها، به‌تدریج به بخش‌های زیرین پوست نفوذ می‌کنند و خود را به بافت چربی زیر پوست می‌رسانند و در سطح پیشرفته‌تر ممکن است عفونت میکروبی پوستی (سلولیت) یا یک عفونت میکروبی حاد یا مزمن (استئومیلیت) ایجاد سازند (۸). زخم‌های عفونی هنگامی رخ می‌دهند که دستگاه ایمنی بدن پاسخ مؤثر و مثبتی نمی‌دهد و یا آنتی‌بیوتیک‌ها نمی‌توانند رشد طبیعی باکتری‌ها را مهار کنند. هرچند آنتی‌بیوتیک‌ها با درمان بیماری‌های عفونی، کیفیت زندگی را بهبود می‌بخشند، با این حال، با افزایش شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سطح جهانی، محدودیت‌های مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها همچنان ادامه دارد (۹). حال اگر این مقاومت آنتی‌بیوتیکی در انواع زخم‌ها به‌ویژه زخم‌های سوختگی مشاهده شود، روند بهبودی را در بیمار به تأخیر می‌اندازد و میزان وخامت و مرگ‌ومیر را افزایش می‌دهد (۱۰). کلونیزاسیون زخم توسط باکتری‌های بیماری‌زا تقریباً

بلافاصله پس از آسیب شروع می‌شود و شامل پاتوژن‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب اکتسابی از محیط اطراف و یا میکروبیوم خود بیمار است (۱۱، ۱۲). به‌طور معمول، طی هفته اول، باکتری‌های گرم مثبت اندوژن با منشأ داخلی، در انواع زخم‌های سوختگی مشاهده می‌گردند؛ اما پس از آن، به‌سرعت توسط باکتری‌های گرم منفی حساس به آنتی‌بیوتیک جایگزین می‌شوند. استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف برای درمان این عفونت‌ها باعث می‌گردد که کلونیزاسیون‌های بعدی با ارگانیزم‌های بیمارستانی اگزوژن با منشأ عوامل خارجی مشاهده شود که معمولاً باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک هستند؛ مانند *Staphylococcus aureus* مقاوم به متی‌سیلین، انتروکوکوس‌های مقاوم به وانکومایسین و باکتری‌های گرم منفی تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف (۱۰). باکتری‌های گرم منفی شایع در زخم‌های سوختگی عبارت‌اند از: *Pseudomonas aeruginosa* مقاوم به دارو *Actinetobacter baumannii*، باکتری‌های تولیدکننده بتالاکتام‌های وسیع‌الطیف و انتروباکتریاسه‌ها (۱۳). عفونت‌های زخم‌های سوختگی حاصل از باکتری *Escherichia coli* میزان مرگ‌ومیر را افزایش می‌دهند (۱۴). باکتریوفاژها و ویروس‌های باکتریایی هستند که توانایی آلوده کردن و از بین بردن سلول باکتری را دارند (۱۵)؛ بدین معنی که ژنوم ویروس را وارد ژنوم میزبان می‌کنند و همانندسازی را آغاز می‌نمایند (لیزوژنی) و یا در حالتی دیگر، پیش از انتشار ذرات فاژ در داخل سلول میزبان با لیز سلول باکتریایی (لیتیک)، باکتری هدف را از بین می‌برند (۱۶). به‌تازگی استفاده از فاژ تراپی سبب شده است که از فاژها به‌عنوان عوامل ضدباکتریایی در درمان باکتری‌های پاتوژن و عفونی استفاده گردد. با ظهور هر چه بیشتر مقاومت دارویی از سوی پاتوژن‌های عفونی، شناخت فاژها به‌طور چشمگیری می‌تواند این بحران را حل کند. میزان روبه‌افزایش بیماران دچار انواع زخم‌های سوختگی از یک‌سو و ظهور باکتری‌های مقاوم به چندین

زخم‌های سوختگی: با استفاده از تست‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی (شناسایی ماکروسکوپی و میکروسکوپی)، شناسایی اولیه باکتری‌های مدنظر صورت گرفت، بدین‌صورت که برای هر یک از سویه‌های بالینی جداسازی‌شده به تفکیک بررسی انجام شد. ابتدا از رنگ‌آمیزی گرم برای شناسایی میکروسکوپی نمونه‌ها استفاده گردید و سپس تست‌های بیوشیمیایی به‌منظور اثبات اولیه و ردیابی باکتری‌ها در زخم سوختگی صورت گرفت. کشت در محیط EMB و شامل IMVIC، MR-VP، TSI، Motility، OF، SIM، کاتالاز، اکسیداز، اوره آز، نیترات براث، سیمون سترات آگار و... بودند (۱۸).

شناسایی مولکولی باکتری‌های در زخم‌های سوختگی: استخراج ژنوم باکتری *Escherichia coli* توسط کیت استخراج اسید نوکلئیک تحت لیسانس شرکت PREP RIBO-کشور روسیه طبق پروتکل شرکت سازنده صورت گرفت. به‌منظور تکثیر ژن ۱۶ S rRNA، از جفت پرایمرهای یونیورسال استفاده گردید که از شرکت پیشگام تهران تحت لیسانس شرکت متابیون آلمان تهیه و خریداری‌شده و با عنوان ۲۷-5' F (AGAGTTTGGCTCAG-3') و ۱۴۹۲ R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') بودند؛ همچنین فرایند PCR توسط دستگاه Thermal Cycler (Bio-Rad) T100 کشور مالزی انجام گردید. اطلاعات و جزئیات این واکنش در جدول شماره ۱ نشان داده شده

آنتی‌بیوتیک از سوی دیگر سبب شد که در این بررسی، به‌منظور ارائه چشم‌انداز جدیدی از فازتراپی، باکتری *Escherichia coli* مقاوم به آنتی‌بیوتیک زخم‌های سوختگی هدف قرار گیرد. هدف از این تحقیق در فاز اول، جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی *Escherichia coli* مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ایجادکننده عفونت‌های زخم‌های سوختگی است و در فاز دوم، جداسازی فازهای اختصاصی باکتری‌های این زخم‌ها و سپس ارزیابی مشخصه‌های مورفولوژیکی فاز و بررسی محدوده میزبان است.

مواد و روش‌ها

جداسازی نمونه از بیماران سوختگی: نمونه‌های آزمایش‌شده در این تحقیق، از میان ۵۰ بیمار بستری دارای زخم‌های سوختگی و مبتلا به عفونت‌های باکتریایی مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک در مدت‌زمانی سه‌ماهه (فروردین تا خرداد سال ۱۳۹۹) جمع‌آوری‌شده بودند. ایزوله‌های باکتریایی ایجادکننده عفونت‌های ثانویه باکتریایی از انواع زخم‌های سوختگی بیماران از بیمارستان‌های تخصصی سوانح و سوختگی امام موسی کاظم اصفهان، شهدای محراب یزد، مطهری تهران و ولایت رشت جمع‌آوری گردیدند و در این پژوهش، از سویه استاندارد *Escherichia coli* ATCC 25922 به‌صورت آمپول لیوفلیزه استفاده شد که از انستیتو پاستور تهران تهیه گردید (۱۷).

آزمون‌های بیوشیمیایی باکتری *Escherichia coli* در

جدول شماره ۱. مراحل انجام واکنش PCR

زمان (ثانیه)	دما (درجه سانتی‌گراد °C)	مراحل واکنش
6 min	۹۵°C	دنا تورا سیون اولیه
45 s	۹۵°C	دنا تورا سیون
40 s	۵۵°C	اتصال
45 s	۷۲°C	باز آرای
5 min	۷۲°C	طویل شدن نهایی
تعداد نوکلئوتید		پرایمرهای یونیورسال
20	(5'-AGAGTTTGGCTCAG-3')	27F
21	(5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')	1492R

است و سپس همه محصولات PCR مطالعه شده، برای sequencing DNA به آزمایشگاه ژن آزما ارسال گردیدند و توسط دستگاه xl 3130 کمپانی Applied biosystems طبق دستورالعمل سازنده تعیین توالی شدند؛ سپس محصولات PCR برای sequencing DNA به آزمایشگاه ژن آزما ارسال گردیدند (۱۹).

ارزیابی الگوی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی Escherichia coli: برای بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی و انجام تست آنتی بیوگرام، به روش انتشار دیسک در آگار (روش استاندارد کربی-بائر) عمل شد و ایزوله های بالینی در مجاورت دیسک های آنتی بیوتیکی از قبیل آموکسی سیلین AM، سفنازیدیم CAZ، سفکسیم CFM، توبرامایسین TM، سیپروفلوکساسین CF، مروپنم MEN، کلوکساسیلین CX، اریترومایسین E، آمپی سیلین AP، ایمی پنم IPM، پنی سیلین PEN، سفالکسین CN، جنتامایسین GM، کلیندامایسین DA، کلیستین، کوآموکسی کلاو AMC، کانامایسین KM، آمیکاسین AN، سفوکسیتین FOX، کوتریماکسازول SXT، سفوتاکسیم CTX و تازوسین TPZ (خریداری شده از شرکت Rosco ایتالیا) روی محیط کشت مولر هینتون آگار MHA قرار داده شدند. برای بررسی پاتوژن های مقاوم به آنتی بیوتیک، سویه هایی که بالاترین مقاومت آنتی بیوتیک را به دیسک های مدنظر دارند و الگوی حساسیت کمتری در آنها مشاهده شود، به عنوان مقاومت بسیار گسترده مشخص می گردند؛ پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون، میزان قطر هاله عدم رشد ایزوله های مورد مطالعه، بررسی و اطلاعات به دست آمده به صورت نتایج حساس، نیمه حساس و مقاوم بر اساس استاندارد دی به نام CLSI تعیین شد (۲۰).

جداسازی باکتریوفاژ لیتیک و اختصاصی: برای جداسازی باکتریوفاژهای احتمالی، از آب ورودی فاضلاب شهری استفاده گردید. نمونه برداری از تصفیه خانه شمال اصفهان صورت گرفت؛ سپس نمونه های جداسازی شده در مجاورت یخ به آزمایشگاه

تحقیقاتی دانشگاه فلاورجان منتقل و با ۸۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید؛ پس از آن، محلول شناور روی سطح یا همان سوپرناتانت، با سرنگ استریل و فیلتر سرسرنگی سلولزی با قطر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد و محلول حاصل به محیط ۲ برابر غلظت برین هارت اینفیوژن براث (BHI B 2x) افزوده و از کشت شبانه و تازه باکتریایی به آن اضافه گردید و این مخلوط یک شب در ۳۷ درجه سانتی گراد با دور 140 RPM شیک شد تا نمونه ها کاملاً باهم مخلوط شوند. محیط BHI از شرکت ایبرسکو ایران تهیه شده بود (۲۱).

غنی سازی باکتریوفاژ ایزوله شده: برای غنی سازی باکتریوفاژ، کشت تازه سویه های باکتریایی به محیط برین هارت اینفیوژن براث BHI افزوده گردید؛ سپس از سوسپانسیون که ممکن است باکتریوفاژهای احتمالی را داشته باشد، به آن اضافه شد. این ترکیب در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت با دور 140 RPM شیک گردید و سپس با ۸۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت با سرنگ استریل و فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتری فیلتر گردید. این مرحله طی سه آزمون و این عمل نیز برای سویه های استاندارد هم انجام شد (۲۱). با استفاده از روش تشکیل پلاک یا آگار دولایه، از ترکیب محلول فیلتریت فاژی تهیه شده مرحله پیش (۱۰^۸ PFU/ml) با SM بافر تهیه گردید. مجموعه ای از رقت های مختلف تهیه شد و از هر کدام از رقت ها به تفکیک، به کشت تازه باکتریایی (۱۰^۸ CFU/ml) اضافه گردید. سرانجام مقداری از این ترکیب به محیط ذوب شده BHI دارای ۰/۷ درصد آگار، با دمای ۴۵ درجه سانتی گراد افزوده و روی سطح آگار که حاوی BHI با ۱/۵ درصد آگار بود، به حالت پورپلیت ریخته شد؛ سپس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از گذشت مدت انکوباسیون، پلاک های تشکیل شده مشاهده و شمارش شدند و پلیت های آزمایش از نظر ایجاد پلاک بررسی گردید (۲۲).

مرحله تغلیظ باکتریوفاژ: در مرحله تغلیظ فاژ، دوباره از مخلوط توأم باکتریوفاژ ایزوله شده و کشت باکتریایی

مرحله از آزمایش بدین صورت بود که کشت تازه باکتریایی (10^8 CFU/ml) با ۵ الی ۶ سی سی محیط کشت BHI حاوی ۰/۷ درصد آگار مخلوط شد و لوله حاوی این مخلوط پس از ورنکس شدن، به سطح محیط‌هایی اضافه گردید که حاوی BHI با ۱/۵ درصد آگار بود. هنگامی که سطح آگار در زیر هود کاملاً بسته و اصطلاحاً سفت شد، محلول فاژ فیلترشده به دست آمده به صورت نقطه‌ای یا حالت قطره‌چکانی روی سطح BHI آگار به سویه باکتری تلقیح گردید و پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت، وجود پلاک یا نقاط شفاف ایجاد شده نشان‌دهنده توانایی و پتانسیل فاژ در آلوده کردن و لیز کردن باکتری آزمایش شده بود (۲۴).

شناسایی ساختار باکتریوفازها توسط میکروسکوپ الکترونی TEM، برای مطالعه دقیق ساختار و مورفولوژی باکتریوفازهای احتمالی، حدود ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون فاژی تهیه شده یا همان محلول فیلتریت فاژی 10^8 PFU/ml به مدت ۳۰ ثانیه روی گرید مسی کربن کوتد پوشش داده شد و به مدت ۱ دقیقه با ۲ درصد (w/v) اورانیل استات رنگ آمیزی گردید و پس از خشک شدن گریدها، ذرات فاژ در نمونه با میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM مدل EM 208S مشاهده شد (۲۵).

تجزیه و تحلیل آماری: از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) بهره گرفته شد. همه داده‌ها به برنامه Excel، مایکروسافت) وارد شدند. برای آنالیز آمار تحلیلی از SPSS vol.20 استفاده گردید. خروجی داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ SD ارائه شدند.

یافته‌ها

شناسایی بیوشیمیایی و مشخصات مولکولی سویه‌های باکتریایی ایزوله شده: سویه‌های باکتریایی ایزوله شده از زخم سوختگی بیماران بستری در بیمارستان‌های گوناگون، با آزمایش‌های بیوشیمیایی و ژنتیکی بررسی، شناسایی و تأیید گردیدند. تست‌های تشخیصی استفاده شده در جدول شماره ۲ آورده شده است؛

استفاده می‌شود، به طوری که پس از مرحله سانتریفیوژ، برای تغلیظ به مخلوط به دست آمده از پلی اتیلن گلیکول PEG ۶۰۰۰ و برای شستشو و جداسازی سوپرناتانت‌ها از سدیم کلراید استفاده می‌گردد که میزان آن‌ها به ترتیب ۱۰ درصد و ۱ مولار است؛ سپس این مخلوط در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۸ ساعت همراه با شیک کردن قرار گرفتند؛ پس از آن، محلول به دست آمده با دور ۹۰۰۰g به مدت ۲۵ الی ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند و سوپرناتانت با سرنگ استریل و فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرومتری جدا گردید (محلول رویی حذف) و رسوب آن در بافر SM که حاوی سدیم کلراید، $MgSO_4$ ، Tris-HCl و گلیسرول بود، به صورت شناور درآورده شد. این نمونه‌ها دوباره سانتریفیوژ گردیدند و در نهایت، محلول به دست آمده در ۴ درجه سانتی گراد یخچال حفظ و نگهداری شدند (۲۳).

خالص سازی باکتریوفاز: پلاک‌های تک ایجاد شده روی محیط BHI آگار، با تیغ اسکالپل استریل یا حرارت دیده بریده شد و به میکروتیوب‌های استریل دارای ۱ میلی لیتر SM بافر منتقل گردید و به مدت ۳۰ ثانیه کاملاً مخلوط شد. این ترکیب با دور ۸۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید؛ سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت یا محلول رویی آن به ۹۰۰ میکرولیتر SM بافر افزوده شد. در این مرحله از سوپرناتانت، زنجیره‌های رقت گوناگون 10^{-1} تا 10^{-8} تهیه گردید و سپس از هر رقت، به طور جداگانه به ۵ میلی لیتر محیط ذوب شده BHI برآش حاوی ۰/۷ درصد آگار اضافه و ۱۰۰ میکرولیتر هم از کشت ۲۴ ساعته و تازه باکتری افزوده شد. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، پلاک‌های ایجاد شده شمارش و از نظر ظاهر پلاک بررسی گردیدند. این مرحله برای سویه‌های استاندارد نیز با سه تکرار انجام شده بود (۲۲).

بررسی محدوده میزبان باکتریوفاز لیتیک: محدوده میزبان باکتریوفازهای ایزوله شده با استفاده از تست‌های نقطه‌ای بر باکتری *Escherichia coli* بررسی می‌شود. این

جدول شماره ۲. نتایج آزمون بیوشیمیایی روی *Escherichia coli* ایزوله شده

رنگ آمیزی گرم	منفی
مورفولوژی	میل‌ای
TSI	A/A/G
اوره آز	-
O/F	O+/F+
حرکت	متحرک
وژ پروسکوئر VP	-
متیل رد MR	+
اکسیداز	-
کاتالاز	+
احیای سیتрат	-
اندول	+
نیترات ردوکتاز	+
محیط EMB	سبز متالیک
تست ONPG	+

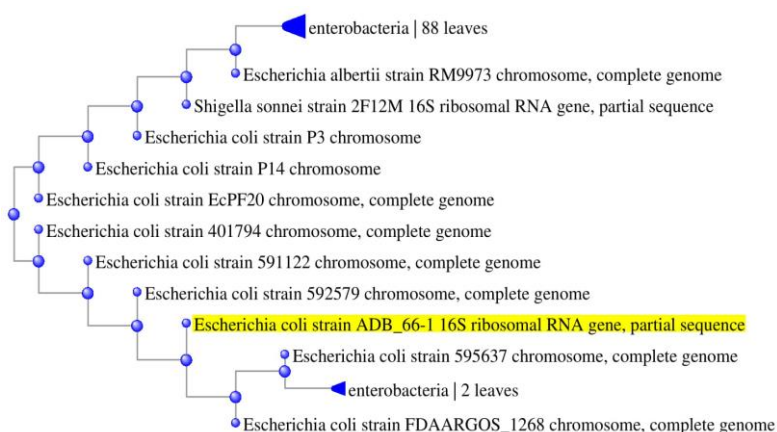
منفی. -؛ مثبت. +

همچنین برای تشخیص دقیق سویه‌های باکتریایی، همه نمونه‌های ایزوله‌های بالینی ارسالی از بیمارستان که از نظر بیوشیمیایی تأیید شده بودند، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی جنس و گونه *Escherichia coli* نیز مورد تأیید آزمایش‌های مولکولی و ژنتیکی قرار گرفتند. توالی ۱۶ rRNA S و تجزیه و تحلیل BLAST، سویه *Escherichia coli* دارای ۱۰۰٪ Query coverage بود. ایزوله مطالعه شده در تحقیق ما با عنوان *Escherichia coli* strain ADB_66-1 در سایت www.ncbi.nlm.nih.gov نام گذاری شد و توالی ۱۶ rRNA S آن در GenBank، NCBI با Accession Number [MW844043] قرار گرفت. در شکل شماره ۲ درخت فیلوژنی سویه مدنظر آورده شده است.

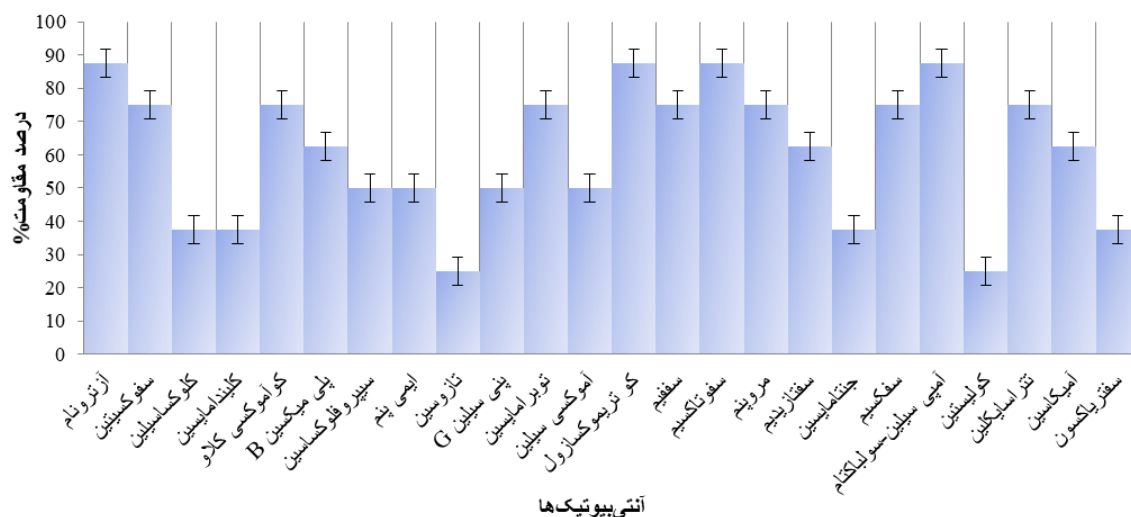
بررسی الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بیماران سوختگی: در این تحقیق، بررسی فراوانی باکتری‌های



شکل شماره ۱. نمونه‌ای از بیمار دارای زخم سوختگی با عفونت ناشی از *Escherichia coli* مقاوم به آنتی‌بیوتیک



شکل شماره ۲. نمونه‌ای از درخت فیلوژنیک سویه *Escherichia coli* strain ADB_66-1



شکل شماره ۳. نتایج الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی

نتیجه آزمایش پلاک و محدوده میزبان فازی: فاز لیتیک PφBw-Ec01 از ورودی تصفیه خانه شمال اصفهان در ایران جداسازی شده بود. فاز ایزوله شده قابلیت لیزکنندگی داشت که روی کشت باکتری پلاک‌های شفاف را ایجاد کرده بود. دامنه میزبان و فعالیت لیتیک باکتریوفاز PφBw-Ec01 روی سویه‌های بالینی مختلف با استفاده دو تکنیک آگار دولایه و تست نقطه‌ای بررسی شده و مناطق لیز مشاهده و به عنوان امتیاز (++) برای لیز کامل، امتیاز (+) برای لیز ضعیف و امتیاز (-) برای نبود لیز و تشکیل نشدن نقاط شفاف در نظر گرفته شده بودند (جدول شماره ۳). فاز لیتیک PφBw-Ec01 میزان اثربخشی بالایی در

عامل عفونت بیمارستانی در بیماران بستری دارای زخم سوختگی و تعیین الگوی مقاومت آن‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌هایی که علیه آن‌ها استفاده می‌شود، صورت گرفته بود. برای تفسیر دقیق نتایج از جدول موسسه CLSI استفاده گردید. الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی به دست آمده از روش انتشار در آگار (Bauer-Kirby) سویه‌های بالینی *Escherichia coli* نشان داده بود که همه ایزوله‌های مقاوم به آنتی بیوتیک شناسایی شده بودند و بالاترین مقاومت را به آزترونام، کو تریموکسازول، سفتوآکسیم و آمپی سیلین-سولباکتام حدود ۸۷/۵ درصد و کمترین مقاومت را به تازوسین و کولیسیتین حدود ۲۵ درصد داشتند (شکل شماره ۳).

جدول شماره ۳. نتایج تست نقطه‌ای و حساسیت باکتری‌ها نسبت به فاز لیتیک P یتیکی‌ها

شهرها	مراکز بیمارستانی	تست نقطه‌ای	سویه‌های مقاوم	کد سویه‌ها
یزد	بیمارستان سوختگی شهدای محراب	-	<i>Escherichia coli</i>	Shmy05
یزد	بیمارستان سوختگی شهدای محراب	-	<i>Escherichia coli</i>	Shmy07
اصفهان	بیمارستان امام موسی کاظم	++	<i>Escherichia coli</i>	ADB_66-1
اصفهان	بیمارستان امام موسی کاظم	-	<i>Escherichia coli</i>	IMK10
تهران	بیمارستان سوختگی مطهری	+	<i>Escherichia coli</i>	TM02
تهران	بیمارستان سوختگی مطهری	-	<i>Escherichia coli</i>	TM04
تهران	بیمارستان سوختگی مطهری	+	<i>Escherichia coli</i>	TM06
رشت	بیمارستان ولایت رشت	-	<i>Escherichia coli</i>	VRC06
انستیتو پاستور ایران	ATCC	-	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922



شکل شماره ۴. (a) نتیجه تست نقطه‌ای و بررسی حساسیت باکتری *Escherichia coli* به فاز PφBw-Ec01 (b) تصویر TEM از باکتریوفاز PφBw-Ec01 متعلق به خانواده Cystoviridae (با میزان تقریبی 80 ± 10 نانومتر)

باکتری *Escherichia coli* مقاوم به شکل کاملاً اختصاصی است و این مسئله بسیار قابل توجه است؛ بنابراین، با توجه به محدود شدن طیف بهره‌برداری از آنتی‌بیوتیک‌ها به علت مقاومت دارویی گسترده طی سال‌های اخیر، ویروس‌های باکتریایی (باکتریوفازها) با توجه به ماهیت طبیعی بودنشان و ویژگی‌های خاصی که دارند، می‌توانند به عنوان یکی از مطلوب‌ترین و مناسب‌ترین گزینه‌های موجود برای جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در نظر گرفته شوند؛ همچنین فازها می‌توانند با محصولات ارزان‌قیمت وارد جوامع گردند و پیشگیری و درمان عفونت‌های جدی بیمارستانی را دست بگیرند (۲۶). باکتری *Escherichia coli* طی ارزیابی مقاومت و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های منتخب، با استفاده از روش انتشار دیسک در آگار Kirby-Bauer مورد تشخیص قرار گرفت. فاز ایزوله شده از تصفیه‌خانه شمال اصفهان، به عنوان یکی از مؤثرترین فاز علیه این باکتری گزینش شد و مطالعات بیشتر مانند بررسی مورفولوژی فازها توسط TEM و بررسی محدودهٔ میزان روی این باکتریوفاز انجام گردید. فاز اختصاصی PφBw-Ec01 به طور چشمگیری قادر به عفونی کردن باکتری *Escherichia coli* مقاوم بود. TEM نشان داد که فاز ایزوله شده ویروس بدون دم و dsRNA و متعلق به خانواده Cystoviridae با پروتوتایپ $\phi 6$ است. فاز لیتیک

جلوگیری از رشد باکتری *Escherichia coli* سویه ADB_66-1 مطالعه شده داشت. در محیط BHI آگار، ۳۶ پلاک بر سطح آگار شمارش شد و تیتراژ کل فازهای لیتیک باکتری آزمایش شده تقریباً به صورت 36×10^8 PFU/mL تعیین گردید.

تعیین مورفولوژی فاز توسط TEM مشاهده مورفولوژی فازها با میکروسکوپ الکترونی TEM نشان داد که فاز PφBw-Ec01 با قطر تقریبی ۸۰ نانومتر، به عنوان خانواده Cystoviridae شناخته شد. این ویروس dsRNA شکل و بدون دم و دارای پوشش لیپیدی بود. مورفولوژی فاز ایزوله شده در شکل‌های شماره ۴a و ۴b به نمایش گذاشته شد. شکلها ادغام شدند.

بحث و نتیجه گیری

هدف مطالعه حاضر، جداسازی و شناسایی فنوتیپی و ژنوتیپی باکتری گرم منفی *Escherichia coli* جداسازی شده از عفونت زخم سوختگی در بیماران بستری بود. این مطالعه نشان داد که باکتری ایزوله شده از بیمارستان‌های سوختگی به آنتی‌بیوتیک‌های معمول مقاومت بالایی نشان داده بودند. کنترل و مهار عفونت‌های حاصل از این باکتری‌ها توسط فازها در این مراکز، به کاهش وخامت و مرگ‌ومیر این بیماران منتهی می‌شود. می‌توان عنوان کرد که عملکرد باکتریوفاز ایزوله شده بر

لیتیک و آلکالین فسفاتاز برای درمان عفونت سوختگی ناشی از *Escherichia coli* در موش آزمایشگاهی را بررسی کردند. اثربخشی باکتریوفاژهای ایزوله شده از ورودی و خروجی رودخانه‌ها، مدفوع گوسفندان، سگ و موش‌ها نشان داد که ۸۰ درصد موش‌های آزمایشگاهی دارای سوختگی آلوده به *Escherichia coli* قابل تیمار بودند و به‌طور چشمگیری میزان مرگ‌ومیر در آن‌ها کاهش یافته بود، در این پژوهش، بهره‌برداری از فاژها به‌عنوان استوک دارویی، نه تنها برای درمان زخم‌های سوختگی ایجاد شده در موش‌ها، بلکه برای درمان عفونت‌های باکتریایی ناشی از این زخم‌ها استفاده شده بود (۲۹). اخیراً پژوهشی با عنوان فاگویرن در تلاش برای استفاده از فاژتراپی در درمان عفونت باکتری‌هایی از قبیل *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* در قربانیان سوختگی، به‌صورت بالینی انجام گردیده است. هدف از این پروژه، مهار پاتوژن‌های عفونی در سوختگی‌های شدید بوده است. فاز I و II آزمایش‌های بالینی در فرانسه، بلژیک و سوئیس شروع شده است. اگرچه این پروژه پیشرفت بزرگی در مطالعه فاژ تراپی است؛ اما برای استفاده از آن‌ها در درمان افراد مبتلا به پاتوژن‌های عفونت‌زا و باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، آزمایش‌های بالینی و آزمایشگاهی بیشتری نیاز است (۳۰). فاگوبایودرم نیز نوعی زخم‌پوش یا پانسمان است که محققان گرجستانی و تحت حمایت یک شرکت آمریکایی (Intralix Inc) به همراهی دانشگاه مریلند آمریکا طراحی کرده‌اند. این محصول از پلیمر تجزیه‌پذیر فراهم شده که با آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر سیپروفلوکساسین (۲۰۶ mg cm⁻²) و ترکیبی از باکتریوفاژها (PyoPhage1×106 PFU/ml) آغشته گردیده است و علیه باکتری‌هایی نظیر *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus* و *Proteus spp* اثر دارند (۸).

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه دکتری با کد ۱۷۲۳۰۵۰۷۹۷۲۰۰۲

PφBw-Ec01 میزان اثربخشی بالایی را در لیز باکتری *Escherichia coli* سویه ADB_66-1 داشتند که از بیمارستان سوانح- سوختگی امام موسی کاظم اصفهان جداسازی شده بود. نتایج مطالعه زارع و همکاران (۲۰۰۷) بر باکتریوفاژ مؤثر بر سویه‌های پاتوژن *Escherichia coli* ایزوله شده از زخم بیماران دیابتی نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده مقاومت بالایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده دارند. بر اساس ویژگی مورفولوژیک، فاژ جداسازی شده متعلق به خانواده Siphoviridae بود (۲۷). رحمانی و همکاران در سال ۲۰۱۵، در پژوهشی «اثر فاژها به‌عنوان عوامل ضد میکروبی سبز در برابر *Escherichia coli* بیمارستانی مقاوم در برابر چند آنتی‌بیوتیک» را بررسی کردند. نمونه‌ها از زخم‌های مختلف تهیه گردید و سویه‌های *Escherichia coli* جدا و با روش‌های استاندارد شناسایی شدند. باکتریوفاژها از نمونه‌های آب محیطی جدا گردید و به‌وسیله روش آگار دولایه برای مشاهده پلاک‌ها ارزیابی شد. واکنش متقابل فاژها بر سویه‌های *Escherichia coli* برای تعیین فاژهای طیف گسترده‌تر صورت گرفت. ده نمونه *Escherichia coli* از نمونه‌های بیمارستان جدا گردید که همه آن‌ها مقاومت بالایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده نشان دادند. واکنش متقابل، فاژهایی را نشان می‌دهد که بیش از شش سویه *Escherichia coli* را تحت تأثیر قرار می‌دهند. آن‌ها می‌توانند انتخاب مناسبی برای استفاده درمانی بالینی باشند. آزمایش‌های حیوانی *in vivo* نتایج مشابهی را با گروهی نشان می‌دهد که با جنتامایسین درمان می‌شدند. در هر دو گروه، عفونت پس از ۴۸ ساعت برداشته شد. بر اساس نتایج، ۶ سویه مقاوم باکتریایی به شش یا هفت آنتی‌بیوتیک و همه سویه‌ها دست کم به دو آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. با این حال، برای هریک از این باکتری‌های مقاوم، یک باکتریوفاژ از نمونه‌های محیطی در نظر گرفته شد که نشان‌دهنده اثر مثبت باکتریوفاژ برای حذف گونه‌های کلینیکی *Escherichia coli* بود (۲۸). حسین‌زادگان و همکاران در سال ۱۳۸۷، استفاده توأم فاژ

نمودند، نیز کمال تشکر را داشته باشیم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که تضاد منافی در این مطالعه وجود ندارد.

کد اخلاق: IR.IAU.FALA.REC.1400.017

References

1. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem* 2009; 78:119-46. doi.10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923
2. Li XZ, Plesiat P, Nikaido H. The challenge of efflux mediated antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28:337-418. doi. 10.1128/CMR.00117-14
3. Richardson LA. Understanding and overcoming antibiotic resistance. *PLoS Biol* 2017; 15: 2003775. doi.10.1371/journal.pbio.2003775.
4. Summer GJ, Puntillo KA, Miaskowski C, Green PG, Levine JD. Burn injury pain the continuing challenge. *J Pain* 2007; 8:533-48. doi.10.1016/j.jpain.2007.02.426.
5. Rosenkranz KM, Sheridan R. Management of the burned trauma patient balancing conflicting priorities. *Burns* 2002; 28:665-9. doi.10.1016/s0305-4179(02)00109-2.
6. Hawkins A, MacLennan PA, McGwin JRG, Cross JM, Rue LW. The impact of combined trauma and burns on patient mortality. *J Trauma* 2005; 58:284-8. doi.10.1097/01.ta.0000130610.19361. bd.
7. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:244-69. doi.10.1128/CMR.14.2.244-269.2001.
8. Lloccarrillo C, Wu S, Beck JP. Phage therapy of wounds and related purulent infections. 1th ed. Cambridge USA CAB Int Publication. 2012; P.185-202.
9. Centers for disease control and prevention. Antibiotic antimicrobial resistance. 2th ed. CDC Gov Drug Publication. 2017; P.1-100.
10. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:403-34. doi.10.1128/CMR.19.2.403-434.2006.
11. Mayhall CG. The epidemiology of burn wound infections then and now. *Clin Infect Dis* 2003; 37:543-50. doi.10.1086/376993.
12. Rafla K, Tredget EE. Infection control in the burn unit. *Burns* 2011; 37:5-15. doi. 10.1016/j.burns.2009.06.198.
13. Azzopardi EA, Azzopardi E, Camilleri L, Villapalos J, Boyce DE, Dziewulski P, et al. Gram negative wound infection in hospitalised adult burn patients systematic review and metanalysis. *Plos One* 2014; 9:95042. doi.10.1371/journal.pone.0095042.
14. Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, Jeschke MG, Finnerty CC. Infection in Burns. *Surg Inf* 2016; 17:250-5. doi.10.1089/sur.2013.134.
15. Chan Benjamin K, Abedonstephen T, Lloccarrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy. *Future Microbiol* 2013; 8:769-83. doi.10.2217/fmb.13.47.
16. Doss J, Culbertson K, Hahn D, Camacho J, Barekzi N. A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses* 2017; 9:50. doi.10.3390/v9030050
17. Rahimzadehtorabi L, Doudi M, Noori A. [Antibacterial effects of gold nanoparticles on multi drug resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* and Its effect on the liver of balb/c Mice]. *JSSU* 2016; 23:1001-17. (Persian)
18. Goli HR, Nahaei MR, Ahangarzadehrezade M. Emergence of colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Tabriz hospitals Iran. *Iran J Microbiol* 2016; 8:62-9.
19. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991; 173:697-703. doi.10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
20. Naghavi NS, Golgoljam M, Akbari, M. Effect of three sewage isolated bacteriophages on the multi drug resistant pathogenic bacteria. *J Biol Sci* 2013. doi.10.3923/jbs.2013.422.426
21. Ghasemi SM, Bouzari M, Emtiazi G. Preliminary characterization of *Lactococcus garvieae* bacteriophage isolated from wastewater as a potential agent for biological control of lactococcosis in aquaculture. *Aquacult Int* 2014; 22:1469-80. doi.10.1007/s00705-014-2142-z.
22. Rahimzadehtorabi L, Doudi M, Naghavi N, Monajemi R. Isolation characterization, and effectiveness of bacteriophage against XDR *Acinetobacter baumannii* isolated from nosocomial burn wound infection. *Iranian J Bas Med Sci* 2021; 24: 1254-63. doi.10.22038/ijbms.2021.57772.12850.
23. Mendes JJ, Leandro C, Cortereal S. Wound healing potential of topical bacteriophage therapy on diabetic cutaneous wounds. *Wound Rep Reg* 2013; 21:595-603. doi.10.1111/wrr.12056.
24. Rahimzadeh Torabi L, Doudi M, Naghavi N, Monajemi R. Bacteriophages pen-cl and pen-ho can eliminate MDR *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter hormaechei* isolated from burn

- wound infections without toxicity for human skin cells. *FEMS Microbiol Let* 2021; 368: 143. doi.10.1093/femsle/fnab143.
25. Rahimzadehtorabi L, 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; 13:678-690. doi.10.18502/ijm.v13i5.7435.
 26. Shokri D, Soleimani DA, Moayednia R, Mobasherizadeh S, Shirsalimian M, Enayatollahi S, et al. 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. *Sci J Ilam Uni Med Scie* 2015; 23:164-1172.
 27. Zare L, Shenagari M, Khan Mirzaei MA, Mojtahedi A. Isolation of lytic phages against pathogenic *E. coli* isolated from diabetic ulcers. *Iran J Med Microbiol* 2017; 11:34-41.
 28. Rahmani R, Zarrini G, Sheikhzadeh F, Aghamohammadzadeh N. Effective phages as green antimicrobial agents against antibiotic resistant hospital *Escherichia coli* Jundishapur J Microbiol 2015; 8:59808. doi.10.5812/jjm.17744. doi.10.5812/jjm.17744.
 29. Hosainzadegan H, Mohammadi M, Pajohy N, Ebrahimzade F. Study of lytic phage and alkaline phosphatase on treatment of burn infections caused by *Escherichia coli* in MouseIran J Med Microbiol 2008; 2:37-43.
 30. Servick K. Beleaguerd phage therapy trial presses on. *Science* 2016; 352:1506. doi.10.1126/science.352.6293.1506.