



## Isolation of lytic phages against pathogenic *E.coli* isolated from diabolic ulcers

Leyla Zare<sup>1</sup>, Mohammad Shenagari<sup>1,2</sup>, Mohammadali Khan Mirzaei<sup>3</sup>, Ali Mojtahedi<sup>1,2</sup>

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
2. Cellular and Molecular Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
3. Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, Quebec, Canada

### Article Information

#### Article history:

Received: 2017/05/08

Accepted: 2017/05/30

Available online: 2017/06/07

#### Article Subject:

Medical Virology

IJMM 2017; 11(2): 34-41

#### Corresponding author:

Dr. Mohammad Shenagari

Department of Microbiology,  
Faculty of Medicine, Guilan  
University of Medical Sciences,  
Rasht, Iran

Tel: 0981333690921

#### Email:

Shenagari@gmail.com

### Abstract

**Background and Aims:** In the present study, we have tried to isolate an effective lytic bacteriophages on drug-resistant *Escherichia coli* isolated from diabetic ulcer wounds.

**Materials and Methods:** Two *E.coli* strains were isolated by using standard methods from patients in Razi Hospital of Rasht. Waste water of the same hospital was used as a source for isolation of lytic bacteriophages. Agar layer method was used to isolate and plaque finding. Determination of host range of isolated phages was performed using five standard reference collection of *E. coli*. Finally, Transmission electron microscopy was used for morphological analysis of the isolated bacteriophages. Morphotype and family of isolated phages were determined based on Bradley recommendation and final version of International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) report, respectively.

**Results:** The results showed that the isolated bacteria were highly resistant to the antibiotics tested. Based on morphological characteristics, the separated virus belongs to siphoviridae family. Based on Bradley classification, isolated phage against strains of *E.coli* belongs to the morphotype B1.

**Conclusions:** The isolated bacteriophage from waste water efficiently lysed the multiresistant strains of *E. coli*. Therefore, bacteriophages could potentially be used as an alternative for antibiotics for treating infections by multiresistant *E. coli*.

**KeyWords:** Bacteriophage, Antibiotic Resistance, *Escherichia coli*, Diabetes, Wound infection

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Zare L, Shenagari M, Khan Mirzaei MA, Mojtahedi A. Isolation of lytic phages against pathogenic *E.coli* isolated from diabolic ulcers. Iran J Med Microbiol. 2017; 11 (2): 34-41



Farname Inc.

## جداسازی باکتریوفاژ لایتیک مؤثر بر سویه‌های بیماری‌زای *اشریشیا کلی* جدا شده از عفونت

### زخم بیماران دیابتی

لیلا زارع<sup>۱</sup>، محمد شناگری<sup>۲</sup>، محمدعلی خان میرزایی<sup>۳</sup>، علی مجتهدی<sup>۱</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۲. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۳. گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشگاه مک گیل، مونترال، کبک، کانادا

#### چکیده

#### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** در این مطالعه باکتریوفاژ لیتیک مؤثر بر *اشریشیا کلی* مقاوم به درمان جدا شده از نمونه زخم بیماران مبتلا به دیابت نوع دو جداسازی گردید.

**مواد و روش کار:** دو نمونه مختلف از زخم بیماران بستری در بیمارستان رازی رشت گرفته شد و سویه‌های *اشریشیا کلی* جداسازی شده با روش‌های استاندارد شناسایی شدند. نمونه برداری از فاضلاب همان بیمارستان برای جداسازی فاژ لیتیک انجام شد. از روش آگار دولایه برای جداسازی و مشاهده پلاک استفاده گردید. برای تعیین واکنش کراسینگ فاژ روی سویه‌های باکتری جداسازی شده و ۵ سویه استاندارد *اشریشیا کلی* انجام گردید. در نهایت برای تأیید و بررسی مرفولوژیکی از میکروسکوپ الکترونی گذاره استفاده شد. مورفوتیپ و خانواده فاژ جدا شده بر اساس طبقه‌بندی Bradley و نسخه نهایی گزارش ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) به ترتیب مشخص گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که باکتری‌های جدا شده مقاومت بالایی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده دارند. بر مبنای خصوصیت مورفولوژیک، ویروس جدا شده متعلق به خانواده *siphoviridae* بود. بر مبنای طبقه‌بندی Bradley فاژ جدا شده بر علیه سویه‌های *اشریشیا کلی* متعلق به مورفوتایپ *BI* بود.

**نتیجه‌گیری:** فاژ جدا شده در این مطالعه می‌تواند به‌طور مؤثر سویه‌های *اشریشیا کلی* بیماری‌زا جدا شده از زخم بیماران دیابتی را لیز کند. در نتیجه شاید بتوان به‌عنوان یک عامل درمانی مؤثر در برابر عفونت‌های مقاوم به درمان مربوط به این باکتری در داخل بدن در مطالعات آینده استفاده شود.

**کلمات کلیدی:** باکتریوفاژ، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، *اشریشیا کلی*، دیابت، عفونت زخم

#### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۸

پذیرش: ۱۳۹۶/۰۳/۰۹

انتشار آنلاین: ۱۳۹۶/۰۳/۱۷

#### موضوع:

ویروس شناسی پزشکی

IJMM 1396; 11(2): 34-41

#### نویسنده مسئول:

دکتر محمد شناگری

گروه میکروبیولوژی پزشکی،

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی گیلان، رشت، ایران

تلفن: ۰۹۸۱۳۳۳۶۹۰۹۲۱

پست الکترونیک:

[Shenagari@gmail.com](mailto:Shenagari@gmail.com)

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

#### مقدمه

به تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌باشد (۳). *اشریشیا کلی* می‌تواند از عفونت‌های زخم به‌ویژه در ناحیه شکم جدا گردد. پربتونیت به‌خصوص پس از پارگی آپاندیس در معده، اندوکاردیت، آپاندیسیت، عفونت پس از زایمان، باکتری می و سپتی سمی نیز مشاهده شده است. باکتری می و سپتی سمی معمولاً ثانویه بوده و در مبتلایان سرطان یا بیماری‌های بدخیم و به دنبال عفونت‌های صفراوی یا روده‌ای، ادراری تناسلی یا پس از دست‌کاری ایجاد می‌شود. از عفونت‌های شایع *اشریشیا کلی*

*اشریشیا کلی* یک باسیل گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، تخمیرکننده و اکسیداز منفی از خانواده *انتروباکتریاسه* است (۱). در اغلب بیمارستان‌ها *اشریشیا کلی* شایع‌ترین عامل سپتی سمی در بین باکتری‌های گرم منفی بوده و در واقع شایع‌ترین ارگانوسمی است که از کشت خون به دست می‌آید (۲). به دلیل مصرف بیش‌ازحد و خودسرانه آنتی‌بیوتیک‌ها، مقاومت‌های دارویی چندگانه در این ارگانوسم‌ها افزایش یافته و مشکل اصلی در درمان عفونت‌های ناشی از *اشریشیا کلی*، مقاوم بودن این باکتری نسبت

ویژگی‌های نوکلئیک اسید و مورفولوژی فاژ کلیدی‌ترین فاکتورهای طبقه‌بندی هستند. ژنوم می‌تواند DNA یا RNA باشد. اکثر فاژها حاوی DNA دو رشته‌ای هستند، درحالی‌که گروه‌های کوچکی از فاژها با DNA تک رشته، RNA دو رشته و RNA تک رشته وجود دارند. بر اساس مورفولوژی گروه‌های کمی در فاژها وجود دارند: فاژهای رشته‌ای، فاژهای بیست‌وجهی بدون دم، فاژهای دم‌دار و حتی چندین فاژ با پوشش حاوی لیپید. این گروه‌ها، باکتریوفاژها را تبدیل به بزرگ‌ترین گروه ویروسی در طبیعت می‌کند. در حال حاضر ۵۵۰۰ ویروس باکتریایی با میکروسکوپ الکترونی بررسی شده‌اند (۱۱).

با توجه به آمار مبتلایان به دیابت در ایران از یک سو و پیدایش سویه‌های مقاوم به چند دارو ما را بر آن داشت تا در این مطالعه همگام با مطالعات جهانی جداسازی باکتریوفاژ لبتیک مؤثر بر اشریشیا کلی مقاوم به درمان جداسازی از نمونه زخم بیماران مبتلا به دیابت در ایران را مدنظر قرار دهیم.

#### مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۵ به انجام رسیده است.

#### جمع‌آوری و جداسازی باکتری‌ها

برای جداسازی نمونه‌های اشریشیا کلی از اگزودای زخم پای دیابتی دو بیمار مبتلا به دیابت نوع دو استفاده گردید. نمونه‌گیری در طول انجام طرح از بیمارستان رازی در رشت انجام گرفت. نمونه‌گیری از زخم توسط سوآب استریل صورت گرفت که با کشت مستقیم در محیط کشت غنی انجام شد. پلیت‌های تهیه‌شده در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. برای جداسازی باکتری از کلنی‌های رشد یافته، رنگ‌آمیزی گرم و تست‌های بیوشیمیایی استفاده گردید.

#### تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های جداسازی

شده

تست آنتی بیوگرام طبق دستورالعمل CLSI با استفاده از روش استاندارد انتشار دیسک برای مشخص کردن مقاومت دارویی انجام گرفت (۱۲). حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی سیلین (AMX)، آزیترومایسین (AZM)، سفالکسین (CN)، نالیدیکسیک اسید (NA)، داکسی سیکلین (D)، تتراسایکلین (TE)، سیپروفلوکساسین (CP)، جنتامایسین (GM) و کانامایسین (K) ارزیابی شد. در این

مرتبط با بافت‌های سطحی می‌توان به عفونت پوست و بافت نرم (Skin and Soft Tissue Infection) عفونت زخم در جراحی‌های مستعد آلودگی (Contaminated Surgery) گانگرن فورنیر (Fournier gangrene) در بیماران مرد دیابتی عفونت استخوان مزمن در بیماران دیابتی اشاره کرد (۴،۵). زخم پای دیابتی یکی از عوارض شایع بیماران دیابتی نوع ۱ و ۲ می‌باشد. هم‌اکنون گزارش‌ها حاکی از ابتلا ۴-۵ میلیون ایرانی به دیابت می‌باشند و متأسفانه درصد افراد مبتلا به صورت فزاینده‌ای رو به افزایش است (۶). احتمال ابتلا به عفونت‌های بافت نرم و عفونت استخوان در بیماران مبتلا به دیابت ۱۰ برابر افراد دیگر می‌باشد. عفونت زخم پای دیابتی به وسیله اشریشیا کلی مقاوم به چند دارو مکرراً در مطالعات مختلف گزارش شده است (۷). در سال‌های اخیر افزایش نرخ حضور ژن‌های دخیل در اعطای مقاومت از قبیل *bla<sub>CTX-M</sub>* و *bla<sub>TEM</sub>* در سویه‌های بیماری‌زای اشریشیا کلی در مطالعات متعددی در ایران گزارش شده است (۸).

فاژ درمانی، استفاده از فاژها با اهداف درمانی برای از بین بردن عفونت‌های باکتریایی است. باکتریوفاژها به‌عنوان عوامل درمانی در برابر برخی از باکتری‌ها قبل از کشف آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شدند. ظهور باکتری‌های پاتوژن مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین افزایش هم‌زمان بیماران دارای نقص سیستم ایمنی، پزشکی مدرن را در درمان عفونت‌های میکروبی با چالش جدی مواجه کرده است. این نگرانی که بشر در حال ورود دوباره به دوران قبل از آنتی‌بیوتیک‌هاست بسیار به حقیقت نزدیک شده است و توسعه روش‌های جایگزین علیه عفونت‌ها به یکی از اولویت‌های مهم پزشکی مدرن و بیوتکنولوژی مبدل گردیده است. تا قبل از کشف و استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، پیشگیری و یا درمان عفونت‌های باکتریایی توسط باکتریوفاژها محرز شده بود. اگرچه مطالعات بالینی اولیه با باکتریوفاژها در ایالات متحده آمریکا و اروپای غربی قویاً پیگیری نشدند، در اتحاد جماهیر شوروی سابق و اروپای شرقی استفاده از فاژها ادامه یافت. نتایج حاصل از این مطالعات به‌طور گسترده‌ای در مجلات غیر انگلیسی (به‌طور عمده روسیه، گرجستان، لهستان) منتشر شدند و بنابراین به‌راحتی در دسترس جامعه علمی غرب نبودند (۹).

طبقه‌بندی ویروس‌های باکتریایی بر اساس چندین فاکتور از جمله میزان مورد ترجیح، مورفولوژی ویروس، نوع ژنوم و ساختارهای محوری مانند دم یا پوشش صورت می‌گیرد (۱۰).

### ذخیره‌سازی

به‌منظور ذخیره‌سازی فازهای جداسازی شده از استوک فاز که در برات بود، ۵۰۰ میکرولیتر برداشته شد و با ۵۰۰ میکرولیتر گلیسرول استریل در میکروتیوب مخلوط گردید و تکان داده شد تا از ایجاد دو فاز ممانعت گردد. ذخیره‌سازی فازها در -۷۰ درجه انجام شد.

### تعیین تیتراژ

به‌منظور تعیین تیتراژ فازهای خاص سازی شده (purified Phages) از روش محاسبه PFU/mL استفاده شد. برای این منظور باکتری موردنظر به‌صورت چمنی کشت شد. از فاز خالص‌سازی شده به تعداد ۱۰ رقت، از  $10^{-1}$  تا  $10^{-10}$  در محیط LB برات تهیه‌شده و به هر پلیت اضافه گردید. پس از انکوباسیون پلیت‌های هر رقت به مدت یک‌شب در ۳۷ درجه سلسیوس، پلاک‌های هر رقت به‌طور دقیق بررسی شد و پلاک‌ها تا حد امکان شمارش گردید. آخرین رقت که در آن تعداد ۳۰-۳۰۰ پلاک مشاهده شد. مبنای محاسبه واحد ایجادکننده پلاک در نظر گرفته شد و از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$\text{Average \# Plaques} = \text{PFU/ml} \\ D \times V$$

D = Dilution factor

V = Volume of diluted virus added to the well

### مشاهده ساختمان فاز با میکروسکوپ الکترونی

به‌منظور بررسی مورفولوژیک، تصاویر میکروسکوپ الکترونی گزاره از فاز تهیه شد. جهت مشاهده ساختمان فاز، از رنگ‌آمیزی منفی استفاده شد. ابتدا گرید های مسی به‌وسیله محلول فرم وار در کلروفورم و یا دی اتیلن کلراید پوشش داده شد. سپس یک قطره از نمونه روی آن قرار داده شد. بعد از خشک شدن، با کاغذ صافی اضافه نمونه گرفته شد. سپس یک قطره از رنگ فسفوتنگستیک اسید (۰/۰۱ درصد، ۷/۲-۷/۴ pH) اضافه گردید و پس از خشک شدن، با میکروسکوپ الکترونی TEM (Germany Leo 906E, Zeiss) مشاهده شد.

مطالعه باکتری‌های مقاوم به حداقل چهار دارو به‌عنوان باکتری گرم منفی مقاوم به چند دارو (Multi-Drug Resistant Gram-Negative Bacterium) در نظر گرفته شد.

### جداسازی باکتریوفازها

برای جداسازی فاز، از فاضلاب بیمارستانی نمونه‌برداری شد. برای غنی‌سازی تعداد فازهای احتمالی موجود در فاضلاب، ۱۰۰ mL از نمونه فاضلاب با ۵۰ mL از محیط کشت مایع LB در یک ارلن استریل مخلوط و باکتری‌های میزبان موردنظر به داخل آن تلقیح شد. سپس ارلن در گرمخانه شیکر دار در دمای ۳۷ درجه و چرخش ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. برای جداسازی فاز، ۵۰ mL از مخلوط داخل ارلن به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس‌ازاین مدت، مایع رویی را مستقیماً در سرنگ ۱۰ میلی‌لیتری ریخته و بعد سوسپانسیون حاصل را با فیلتر ۰/۴۵ نانومتر در داخل یک لوله فالكون تازه، فیلتر گردید. روی این سوسپانسیون Serial dilution گردید. از هرکدام از رقت‌های شماره ۶، ۷ و ۸ به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته با ۲/۵ mL محیط سافت آگار ذوب‌شده (حدود ۵۰ درجه) و ۲۰۰ میکرولیتر باکتری اولیه در بن ماری مخلوط می‌کنیم و روی پلیت نرمال آگار ریخته و با چرخاندن پخش شد. سپس در ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید.

### خالص‌سازی باکتریوفاز

در اغلب موارد با توجه به استفاده از مخزن فاضلاب برای جداسازی امکان حضور بیش از یک نوع فاز در پلیت جداسازی وجود دارد که این فازها پلاک‌هایی با اشکال و اندازه‌های مختلف ایجاد می‌کنند. پلاک لیتیک با سر سمپلر استریل برداشته‌شده و در ۵۰۰ میکرولیتر محیط LB داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. این میکروتیوب در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه باقی ماند سپس رقت سریالی تهیه شد. به خاطر اطمینان از حضور یک نوع فاز و یا چند نوع فاز، این پلاک‌ها به‌طور جداگانه خالص‌سازی گردیدند. از هر میکروتیوب ۱۰۰ میکرولیتر برداشته با ۲۰۰ میکرولیتر باکتری اولیه و ۲/۵ mL محیط سافت آگار مخلوط گردید و در پلیت LB آگار ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه گردید تا پلاک‌های ایجادشده مشاهده گردند.

## تعیین هویت فاژهای جداسازی شده

از آخرین ویرایش انتشار گزارش کمیته بین‌المللی طبقه‌بندی ویروس‌ها (Virus Taxonomy: 2015 Release) برای مشخص کردن خانواده احتمالی ویروس جداسازی شده استفاده شد (۱۳). همچنین از طبقه‌بندی رفرانس Bradley برای تعیین مورفوتایپ ویروسی استفاده گردید (۱۴).

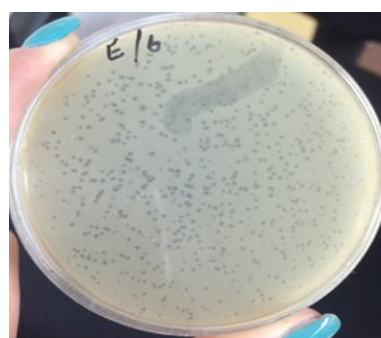
## تعیین طیف میزبانی فاژ جداسازی شده

برای انتخاب فاژ مناسب برای فاژ تراپی، باید مشخص گردد که کدام فاژ محدوده میزبانی گسترده‌تری دارد. برای این منظور اثر فاژ اختصاصی جداسازی شده علیه ۵ سویه انسانی مرجع استاندارد شامل سویه‌های شماره ۱ (RM74A)، شماره ۱۰ (ANI)، شماره ۲۴ (FN33)، شماره ۵۳ (RM33B) و شماره ۷۲ (P68) نیز بررسی شد (۱۵). برای واکنش کراس‌ینگ از روش کشت آگار دولایه استفاده شد.

## یافته‌ها

## مشاهده پلاک‌های فاژ خالص‌سازی شده

نمونه‌های فاضلاب گرفته‌شده حاوی چندین فاژ علیه باکتری‌ها بود که از میان آن‌ها فاژی که پلاک شفاف‌تری داشت به‌عنوان فاژ اختصاصی برای سویه باکتری خالص‌سازی انتخاب شد. نام‌گذاری این فاژ با عنوان PhEIR1 انجام شد. پلاک‌های ایجادشده توسط فاژ جداسازی شده علیه اشریشیا کلی ایزوله شده از بیماران دیابتی نوع دو در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود.



شکل ۱: پلاک‌های ایجادشده توسط فاژ PhEIR1

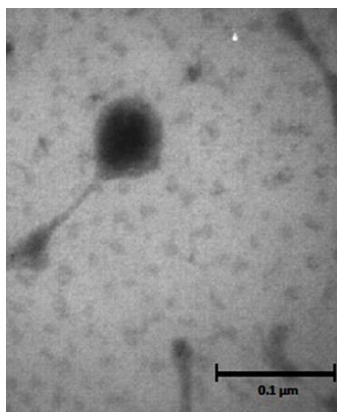
## نتایج تعیین تیتراژ جداسازی شده

محاسبه تعیین تیتراژهای به‌دست‌آمده با استفاده از PFU/mL نشان داد که تیتراژ ویروس خالص‌سازی و غنی‌سازی شده بر مبنای فرمول محاسبه‌شده  $36.1 \times 10^8$  بود.

## مشاهده ذرات فاژی با میکروسکوپ الکترونی گذاره

## (TEM) و تعیین هویت فاژ

شکل ۲ تصویر تهیه‌شده از فاژ PhEIR1 توسط میکروسکوپ الکترونی گذاره را نشان می‌دهد. همان‌طور که از تصویر برمی‌آید ویروس واجد سر بیست‌وجهی منظم به‌اندازه تقریبی ۶۰ نانومتر می‌باشد. این فاژ واجد دم طویل غیر انقباضی می‌باشد که این ویژگی از خصایص خانواده Siphoviridae از راسته Caudovirales می‌باشد. بر مبنای طبقه‌بندی Bradley فاژ جداشده بر علیه سویه‌های بیماری‌زای اشریشیا کلی جداشده از نمونه‌های زخم متعلق به مورفوتایپ B1 می‌باشند. همان‌طور که در این تقسیم‌بندی قیدشده است مورفوتایپ B1 شامل باکتریوفاژهای با سر بیست‌وجهی منظم و دم غیر انقباضی طویل می‌باشند.



شکل ۲: فاژ PhEIR1 مشاهده‌شده با میکروسکوپ الکترونی

## نتایج تعیین طیف میزبانی

در جدول ۱ نتایج طیف میزبانی فاژ PhEIR1 مشخص گردیده است. PhEIR1 در مجموع قادر به لیز ۶ باکتری از مجموع ۷ باکتری استفاده‌شده بود. اثرگذاری این فاژ بر روی هر دو ایزوله باکتری جداشده از بیماران با زخم پای دیابتی مشخص گردید. سویه *E. coli* M2 که نسبت به هفت آنتی‌بیوتیک مقاوم بود، نسبت به ۶ فاژ حساس بود که ارتباط نداشتن مکانیسم مقاومت به آنتی‌بیوتیک و مقاومت به فاژها را نشان می‌دهد. در جدول زیر نتایج کراس‌ینگ فاژها با پنج سویه‌های استاندارد مقایسه شده است.

جدول ۱: واکنش تعیین تیپ میزبانی فاژ PhEIR1 علیه *E. coli* های جداسازی شده و سویه‌های مرجع استاندارد

<i>E. coli</i> M1	<i>E. coli</i> M2	<i>E. coli</i> (RM74A)	<i>E. coli</i> (ANI)	<i>E. coli</i> (FN33)	<i>E. coli</i> (RM33B)	<i>E. coli</i> (P68)
PhEIR1	+	+	+	-	+	+

## بحث

عصر آنتی‌بیوتیک‌ها با یک مقاله خلاصه، با عنوان "پنی‌سیلین به‌عنوان یک عامل شیمی‌درمانی" توسط Chain و همکارانش در ۱۹۴۰ آغاز شد. از آن زمان آنتی‌بیوتیک‌ها جان میلیون‌ها انسان را نجات دادند که بیشتر از هر داروی دیگری در تاریخ بشریت بوده است و به همین دلیل توسط بسیاری افراد آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان داروی جادویی اسم برده می‌شوند (۱۶).

باین‌حال شبکه ایمنی آنتی‌بیوتیک‌ها در مقابل عفونت‌های باکتریایی به دلیل ظهور مقاومت بسیار شکننده شده است. همچنین تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید به‌طور کلی کاهش یافته است و فقط دو آنتی‌بیوتیک از سال ۱۹۹۸ تا ۲۰۰۳ توسط FDA تأیید شده است که مکانیسم عمل جدیدی داشته‌اند. داشتن مکانیسم عمل جدید برای یک آنتی‌بیوتیک یک ملاحظه حیاتی در نبرد علیه مقاومت آنتی‌بیوتیکی است (۱۷). در قرن بیست و یکم مقاومت به باکتری‌ها نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس به‌عنوان مشکلی جدی در درمان عفونت‌های باکتریایی مبدل شده است. بازگشت به عصر قبل از آنتی‌بیوتیک‌ها و مرگ‌ومیر ناشی از باکتری‌های پاتوژن عامل نگرانی‌های جدی است.

فاژهای لیتیک از این نظر که فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی دارند مشابه آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. باین‌حال، فاژهای درمانی حداقل از نظر تئوری مزایایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. فاژها در درمان عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در انسان‌ها و حیوانات آزمایشگاهی خیلی کارآمدتر و مؤثرتر از آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شده‌اند. علاوه بر استفاده برای از بین بردن باکتری‌ها، فاژها ویژگی میزبانی معینی دارند که می‌توانند برای شناسایی و تایپینگ عفونت‌های باکتریایی مورد بهره‌برداری قرار گیرد. به‌طور مثال، شرکت میکروفاژ اخیراً تأییدیه FDA را برای تست کشت خون که از عفونت فاژ برای تشخیص *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین استفاده می‌کند را دریافت کرده است (۱۸). علاوه بر مفید بودن به‌عنوان تشخیص عمومی، این محصولات می‌توانند زمینه مؤثر برای فاژتراپی که نیاز به تشخیص سریع اهداف باکتریایی و تعیین حساسیت آن‌ها به فاژهای اختصاصی را دارند، آماده کنند (۱۹).

در سال ۱۹۸۷ گزارشی از نتایج فاژتراپی عفونت‌های باکتریایی چرک دار به چاپ رسید که ۵۵۰ بیمار را طی سال‌های ۱۹۸۱ تا ۱۹۸۶ با مصرف خوراکی فاژ بررسی کرده بود (۲۰). ۹۲ درصد بیماران این پژوهش که عفونت‌های آن‌ها شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* و باکتری‌های گرم منفی نظیر گونه‌های *کلبسیلا*، *اشریشیا*، *پروتئوس* و *سودوموناس* مقاوم به آنتی‌بیوتیک بودند، از فاژتراپی نتیجه مثبت گرفتند. در همان سال‌ها در ۱۹۸۲ فاژتراپی عفونت تجربی *E. coli* O18:K1:H7 موش‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک بررسی شد (۲۱). در موش‌هایی که دوزهای کشنده باکتری را به‌صورت داخل عضلانی یا داخل مغزی دریافت کرده بودند، یک دوز داخل عضلانی فاژ بسیار مؤثرتر از دوز های مکرر تتراسایکلین، آمپی سیلین، کلرامفنیکل یا تری متوپریم به‌اضافه سولفامتوکسازول بود. اثر فاژ حداقل به‌اندازه دوزهای مکرر داخل عضلانی استرپتومایسین مؤثر بود. در سال ۲۰۱۰ پژوهشی برای بررسی حساسیت آنتی‌بیوتیکی *E. coli* های جداسازی شده از زخم‌های پوستی عفونی انجام شد (۲۲). اکثر ۱۱۳ سویه بررسی شده از زخم‌های پوستی چرک دار جدا شده بودند که ۷۷ درصد آن‌ها به‌تنهایی عامل عفونت بودند، اما در ۲۳ درصد بقیه، همراه با باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، گونه‌های *پروتئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* حضور داشتند. اکثر سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک آمیکاسین حساس بودند، ولی فقط ۷ درصد سویه‌ها به آمپی سیلین حساسیت نشان دادند. بیش از ۵۰ درصد سویه‌ها به ایمپنم و ۳۵-۵۰ درصد به سفالوسپورین‌های نسل چهارم حساس بودند.

در سال ۲۰۱۳ درمان مرکبی با استفاده از فاژ لایتیک و آنتی‌بیوتیک صنایع لینزولید برای حذف عفونت‌های (MRSA) *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* پای دیابتی انجام یافت (۲۳). زخم‌ها در پای پستی موش‌های سوری ایجاد شدند. یک فاژ از پنج فاژ جداسازی شده از فاضلاب که گستره میزبانی وسیع‌تری داشت در مدل موشی استفاده شد. اثر استفاده از فاژ (موضعی) مشابه اثر لینزولید (خوراکی) بود، اما درمان مرکب با هر دو عامل ضد میکروبی اثر بهتری در بهبود زخم‌ها داشت. نتایج این بررسی این روش را به‌عنوان استراتژی مؤثر برای درمان (MRSA) پای دیابتی تأیید کرد. عفونت‌های پای دیابتی

سویه‌های اشریشیا کلی استفاده شده در این مطالعه بودند، لذا به‌تنهایی یا به‌صورت مخلوط فاژی امکان استفاده در مطالعات آتی به‌منظور کنترل و مهار عفونت‌های ناشی از باکتری *E. coli* به‌خصوص عفونت زخم و سطحی این باکتری علی‌الخصوص در مورد زخم ایجاد شده توسط سویه‌های مقاوم به درمان در بیماران دیابتی را در اختیار ما خواهد گذاشت.

#### تقدیر و تشکر

نویسندگان بر خود فرض می‌دانند از تمامی همکاران پارک علم و فناوری گیلان، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و گروه میکروبیولوژی دانشگاه علوم پزشکی گیلان بابت کمک‌های علمی و اجرایی در انجام این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را به عمل آورند. این مقاله برگرفته از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان می‌باشد.

#### تعارض منافع

بین نویسندگان و مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

که ۲۰-۱۵ درصد آن‌ها معمولاً توسط (MRSA) ایجاد می‌شوند به آنتی‌بیوتیک‌های متداول مقاوم هستند و پاسخ مناسبی به درمانی نمی‌دهند. فاژهای جداسازی شده در این مطالعه نیز قادر به لیز سویه‌های اشریشیا کلی جدا شده بودند، لذا به‌تنهایی یا به‌صورت درمان مرکب با آنتی‌بیوتیک امکان استفاده در مطالعات آتی عفونت‌های ناشی از باکتری *E. coli* به‌خصوص عفونت زخم و سطحی این باکتری را در اختیار ما خواهند گذاشت.

با توجه به نرخ بسیار بالای افراد مبتلابه دیابت در ایران که همواره تبعات عمده‌ای برای بیماران از قبیل زخم پای دیابتی را به همراه دارد این مطالعه درصدد جداسازی فاژهای لیتیک بومی ایران برای سویه‌های پاتوژن مقاوم به دارو اشریشیا کلی ایزوله شده از زخم بیماران دیابتی بود. همان‌گونه که اشاره شد از نمونه فاضلاب بیمارستانی به‌عنوان مخزن برای جداسازی و تعیین هویت فاژ لیتیک استفاده گردید. با توجه به امکان دسترسی آسان به فاضلاب بیمارستانی به‌عنوان یک مخزن غنی از فاژ، نتایج این مطالعه نیز امکان جداسازی آسان فاژ از منابع فاضلاب بیمارستانی را متذکر ساخت. سویه‌های بالینی باکتری جداسازی شده از بیماران دارای زخم، مقاومت بالا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های در دسترس و معمول مورد استفاده را نشان دادند. فاژ جداسازی شده از فاضلاب در این مطالعه قادر به لیز

#### References

1. Bruttin A, Brussow H. Human volunteers receiving Escherichia coli phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(7):2874-8.
2. Dufour N, Debarbieux L, Fromentin M, Ricard JD. Treatment of highly virulent extraintestinal pathogenic Escherichia coli pneumonia with bacteriophages. *Crit Care Med* 2015;43(6):190-8.
3. Abedon ST, Kuhl SJ, Blasdel BG, Kutter EM. Phage treatment of human infections. *Bacteriophage* 2011;1(2):66-85.
4. Renvall S, Niinikoski J, Aho AJ. Wound infections in abdominal surgery. A prospective study on 696 operations. *Acta Chir Scand* 1980; 146(1):25-30
5. Petkovšek Ž, Elersic K, Gubina M, Zgur-Bertok D, Starcic Erjavec M. Virulence potential of Escherichia coli isolates from skin and soft tissue infections. *J Clin Microbiol* 2009;47(6): 1811-7.
6. Aghili R, Malek M, Baradaran HR, Peyvandi AA, Ebrahim Valojerdi A, Khamseh ME. General Practitioners' Knowledge and Clinical Practice in Management of People with Type 2 Diabetes in Iran; The Impact of Continuous Medical Education Programs. *Arch Iran Med* 2015; 18(9):582-5 .
7. Boykoe EJ, Lipsky BA. In: Diabetes in America. Harris MI, editor. Washington DC: National Institutes of Health. Infection and diabetes mellitus; 1995 pp. 485-496.
8. Haghghatpanah M, Mozaffari Nejad AS, Mojtahedi A, Amirmozafari N, Zeighami H. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and plasmid-borne blaCTX-M and blaTEM genes among clinical strains of Escherichia coli isolated from patients in the north of Iran. *J Glob Antimicrob Resist* 2016; 7:110-3.
9. Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(3):649-659.

10. Ackermann HW. Phage Classification and Characterization. *Methods Mol Biol* 2009;501:127-40.
11. Ackermann, HW. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch Virol* 2007; 152(2):227-243.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25. Wayne, Pennsylvania, USA—January 2015
13. Krupovic M, Dutilh BE, Adriaenssens EM, Wittmann J, Vogensen FK, Sullivan MB, et al. Taxonomy of prokaryotic viruses: update from the ICTV bacterial and archaeal viruses subcommittee. *Arch Virol* 2016;4:1095–9 .
14. Bradley D. Ultrastructure of Bacteriophages and Bacteriocins. *Bacteriological Reviews*. 1967; 31(4): 230-314.
15. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* 1984;157(2):690-3.
16. Chain E, Florey HW, Gardner AD, Heatley NG. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* 1940; 236(6104):226–8.
17. Sulakvelidze A. The challenges of bacteriophage therapy. *Eur Ind Pharm* 2010;10:14-18.
18. Hagens S, Loessner MJ. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 76(3):513-9.
19. Mahony D, Clow J, Atkinson L, Vakharia N, Schlech W. Development and application of a multiple typing system for *Clostridium difficile*. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57:1873–9.
20. Slopek S, Durlakowa I, Weber-Dabrowska B, Kucharewicz-Krukowska A, Dabrowski M, Bisikiewicz R. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections. I. General evaluation of the results. *Arch Immunol Ther Exp* 1983; 31:267–291.
21. Smith HW, Huggins M. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *Microbiology* 1982;128(2):307-318.
22. Moş I, Micle O, Zdranca M, Muresan M, Vicas L. Antibiotic sensitivity of the *Escherichia coli* strains isolated from infected skin wounds. *Farmacia* 2010;58(5):637-644.
23. Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powel B, et al. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 2002;70(1):204-210.