

# Isolation of Lytic Bacteriophages against MDR-*Klebsiella pneumoniae* and MDR-*Enterobacter aerogenes* from Sewage Samples: A Potential Tool for Medical Purposes

Fatemeh Habibinava<sup>1</sup>, Mohammad Reza Zolfaghari<sup>1\*</sup>, Saleh Sabouri<sup>2</sup>, Mohsen Zargar<sup>1</sup>,  
Mohammad Soleimani<sup>3</sup>

1. Department of Biology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
2. Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, Kerman, University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, AJA University of Medical Sciences, Tehran, Iran

doi [10.30699/ijmm.15.1.46](https://doi.org/10.30699/ijmm.15.1.46)



## ABSTRACT

**Background and Aim:** This study aimed to isolate phages able to lyse some strains of multiple drug-resistant (MDR)-*Klebsiella pneumoniae* (named vB\_Kp1 and vB\_Kp2) and *Enterobacter aerogenes* (named vB\_Ea1) from swage.

**Materials and Methods:** Different *K. pneumoniae* and *E. aerogenes* strains were isolated from clinical specimens during January-September 2018 in three hospitals of Amol, Mazandaran, Iran. Kirby-Bauer disc diffusion method was used to determine the resistance profiles of these isolates using different antibiotics. The MDR strains were selected for investigating the effect of isolated phages from wastewater and hospital sewage. The presence of phage was confirmed by plaque formation. The isolated bacteriophages were enriched, concentrated, and stained. Afterwards, a transmitting electron microscope (TEM) was applied to observe the morphology of the bacteriophages. Phage identification tests, including host range and one-step growth, were performed.

**Results:** The TEM analysis revealed that three phages had an icosahedral capsid and long contractile tail being classified as a member of the Myoviridae family. Phages were able to lyse 14 (56%) of the 25 MDR isolated bacterial strains. The one-step growth curve showed large bursts and short latent times.

**Conclusion:** The formation of clear plaques demonstrates the high lyse power of phages. Therefore, they have good potential for further analysis for clinical use as a therapeutic agent in the future.

**Keywords:** *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, Multiple drug-resistant infections, Phage therapy

Received: 2020/09/16;

Accepted: 2020/11/02;

Published Online: 2021/01/10

Corresponding Information: **Mohammad Reza Zolfaghari**, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.  
Email: [mreza.zolfaghary@gmail.com](mailto:mreza.zolfaghary@gmail.com)



Copyright © 2021, This is an original open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribution of the material just in noncommercial usages with proper citation.

Use your device to scan and read the article online



Habibinava F, Zolfaghari M R, Sabouri Shahrababak S, Zargar M, Soleimani M. Isolation of Lytic Bacteriophages from Sewage Samples against MDR-*Klebsiella pneumoniae* and MDR-*Enterobacter aerogenes*: A potential tool for medical purposes. Iran J Med Microbiol. 2021; 15 (1) 46-66

Download citation: [BibTeX](#) | [RIS](#) | [EndNote](#) | [Medlars](#) | [ProCite](#) | [Reference Manager](#) | [RefWorks](#)

Send citation to:  [Mendeley](#)  [Zotero](#)  [RefWorks](#)

## Introduction

One of the most significant problems in global health in the last decade has been the increasing prevalence of antibiotic-resistant infections, including gram-positive and gram-negative bacteria, specifically the "ESKAPE" bacteria (i.e., *Enterococcus faecium*,

*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp.) (1, 2). Excessive usage of antibacterial drugs might result in elevated

multidrug resistance (MDR) infections and changes in the bacterial population in patients (3).

Gram-negative bacteria, such as *E. aerogenes* and *K. pneumoniae* are resistant to cephalosporin, penicillin, and carbapenem family leading to MDR infection formation. *E. aerogenes* and *K. pneumoniae* can express carbapenemase (KPC), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), and metal beta-lactamase that have not been defined as a class of antibiotics capable of controlling the infection (4-7).

Gram-negative MDR contamination in individuals with poor immune systems, such as infants, elderly, immunosuppressed cases, and cancer patients, is a real danger that results in extreme neutropenia symptoms and even death in some cases (3, 8). The rising prevalence of MDR infections, treatment difficulties, and extended therapy has led to the production of high-efficiency new antibacterial medications with lower side effects and low cost for the management of MDR infections.

An alternative that has gained a lot of interest in the last two decades is bacterial viruses or bacteriophages discovered almost a century ago (9, 10). One type is lytic phages that enter into bacterial cells and change bacterial metabolism causing bacteriolysis and destruction (9, 11). Since the early 20th century, phage therapy has been used as an agent for the treatment of infections caused by both gram-positive and gram-negative bacteria (9-11).

Considering the benefit of phage therapy, several European countries and the United States have started to discover new bacteriophages for the antibacterial management of drug-resistant infections and seriously infected patients (12-14). Some preferences of phage therapy entail efficacy in treating MDR infections, not destroying the natural microbial flora of the patient, lower costs of phage therapy relative to broad-spectrum antibiotics, fewer side effects, stability in unfavorable temperature and drought conditions, specificity for the target bacteria, lacking toxin genes, and easy isolation from diverse environmental samples, such as sewage, sea, and dirt (15-18).

The objective of the present study was to screen and isolate lytic bacteriophages from sewage, which can be useful for the antibiotic-resistant strains of *K. pneumoniae* and *E. aerogenes* isolated from clinical specimens.

## Materials and Methods

### Bacterial Strains

*K. pneumoniae* and *E. aerogenes* were isolated from the clinical specimens of three hospitals and medical centers in Amol, Mazandaran, Iran during January-

September 2018. Isolated bacteria were analyzed using biochemical tests according to the American Society for Microbiology standard methods to confirm the bacterial strain. Moreover, *P. aeruginosa* ATCC 1074, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 35218, *Salmonella typhi* PTCC 1639, *E. aerogenes* PTCC 1221, and *K. pneumoniae* PTCC 1290 were obtained from the microbial collection of Pasteur Institute of Iran and were used as the standard strains.

### Antimicrobial Susceptibility Testing

Antibiotic susceptibility patterns were assessed by the Kirby-Bauer disk diffusion method on Mueller-Hinton agar. The susceptibility of bacteria was classified based on the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (19). Twelve different kinds of antibiotics were utilized, including amikacin (30 µg), cefotaxime (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg), gentamycin (10 µg), cefalotin (10 µg), imipenem (10 µg), nitrofurantoin (300 µg), cotrimoxazole (5 µg), tetracycline (30 µg), norfloxacin (10 µg), and nalidixic acid (30 µg) (Merck, Germany).

The strains resistant to at least three classes of antimicrobial agents were considered as MDR bacteria (19). Finally, 15 MDR-*K. pneumoniae* and 10 MDR-*E. aerogenes* were obtained from clinical isolates (Table 1). Approximately 2-3 colonies were suspended with 100 ml sterile physiological serum and were incubated at 37°C to adjust the bacterial density equal to that of 0.5 McFarland turbidity reference.

### Phage Isolation and Propagation

Hospital, industrial, and urban wastewater samples were collected from a different place in Mazandaran, north of Iran during January-September 2018 (Table 2). Samples were collected in a sterile falcon and then centrifuged at 5000 g for 10 min (RS/20IV, TPMYSELKO, Japan) to remove large particulates. The supernatant was filtered using 0.22 µm syringe filters (Startech, Taiwan) and stored at 4°C. To enrich the bacteriophage (21), we added 10 ml of each sample supernatant into 100 ml exponential growth cultures (in early log phase, OD of 0.4-0.6) supplemented with 0.1 M calcium chloride (Merck, Germany). The cultures were incubated in a shaker incubator (JAL company, Iran) at 37°C and 40 rpm for 48 h. Next, the samples were centrifuged at 5000 rpm for 15 min and the supernatant was filtered through a 0.22 µm syringe filter (22).

**Table 1.** MDR-*K. pneumoniae* and MDR-*E. aerogenes* obtained from clinical isolates

Microorganism	Source	Sample origin	Number of samples	Abbreviation
<i>K. pneumoniae</i>	Imam Reza Hospital	Urine	10	Kr1
		Urine		Kr2
		Blood		Kr3
		Urine		Kr4
		Urine		Kr5
		Chip		Kr6
		Urine		Kr7
		Blood		Kr8
		Urine		Kr9
		Wounds		Kr10
<i>K. pneumoniae</i>	Imam Ali Hospital	Urine	5	Ka1
		Wounds		Ka2
		Blood		Ka3
		Urine		Ka4
		Wounds		Ka5
<i>E. aerogenes</i>	Imam Reza Hospital	Urine	5	Er1
		Urine		Er2
		Wounds		Er3
		Urine		Er4
		Chip		Er5
<i>E. aerogenes</i>	Imam Mosabn Jafar Hospital	Urine	5	Em1
		Urine		Em2
		Wounds		Em3
		Urine		Em4
		Blood		Em5

**Table 2.** Place of collection of wastewater samples

Sample number	Sampling location
1	Sewage outlet of Amirkola Children's Hospital
2	Sepidan poultry slaughterhouse wastewater outlet
3	Oil Company effluent (Mahmoud Abad)
4	Sewage of Cheshmeh Saran fish breeding pool
5	Sewage of North Pardis Recreation Complex
6	Wastewater outlet of Ghaem Hospital (Kelardasht)
7	North Hospital (Amol)
8	Imam Hossein Hospital (Neka)
9	Omidi Hospital (Behshahr)
10	Imam Hospital (Behshahr)
11	Babol Poultry Slaughterhouse

#### Double-Layer Agar Technique (Plaque Assay)

We used the double-layer agar (DLA) method to examine the antibacterial ability of the isolated phages. To this end, 200  $\mu$ L of bacterial culture early log phase (OD=0.2-0.4) and 200  $\mu$ L of filtrates supernatant were mixed and incubated for 15 min at 37°C for proper absorption. The medium was mixed with 3 ml of LB soft agar containing 0.7% half agar (Merck, Germany) and was poured onto the bottom agar followed by swirling to produce a uniform top layer. The plates were incubated overnight at 37°C.

The lysis zones or plaque formation after incubation suggested the presence of lytic phages (23).

#### Phage Purification

Each plaque formed on the plate surface contains approximately  $10^5$ - $10^6$  phages. The established plaque was solved in 1.5 mL of LB solution. Afterwards, 200  $\mu$ L of chloroform was added to eliminate bacterial contaminations according to the method mentioned in the phage isolation section. For better purification, plaque assay was performed in triplicate. The titers of each phage, isolated against MDR-bacteria from clinical samples, were represented in plaque-forming

units (PFU) per mL (PFU/mL) as described by Carlson and Miller (24).

#### Determination of Host Range

Spot assay was applied for determining the host range of purified bacteriophage (25). Different bacteria isolated from clinical specimens and indicator bacteria strains were grown in LB broth until the early log phase (OD=0.4). Next, 300 µL of bacteria were mixed with 0.5% LB agar infused onto the underneath 1% LB agar to solidify. Afterwards, 10 µL of several dilutions of purified phage ( $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$ , and  $10^1$  PFU/mL) was dropped on the LB agar. The plates were incubated overnight at 37°C. The lysis zones or plaque formation were analyzed after incubation.

#### Phage Adsorption Assays

Diverse bacteria isolated from clinical samples were cultured overnight in LB at 37°C. Approximately  $10^7$  PFU/mL of isolated and purified phage in 500 µL was mixed with 500 µL of bacterial samples, about  $10^8$  CFU/mL. The suspension was incubated at 37°C and the medium was centrifuged at  $8000 \times g$  for 3 min after 0, 2, 4, 6, 8, 10, and 12 min. The phage titer that remained in the supernatant was examined by the DLA method. The isolated bacteria cultured in LB was exclusively utilized as a non-absorbing control.

#### Determine the Optimal Multiplicity of Infection

To determine the optimal multiplicity of infection (MOI) required for attaining maximum adsorption

without affecting bacterial viability (26),  $10^4$  bacteria (in early log phase, OD=0.3) were cultured in a 96 well plate and mixed with several dilutions of phage ( $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ , and  $10^2$  PFU/mL). MOIs were assessed at 2 hr, 4 hr and 8 hr after infection. The experiments were performed in triplicate. The wells containing exclusively bacteria or phage were considered as controls. The turbidity of each well was measured with a microplate enzyme-linked immunosorbent assay reader (ELX800, BioTek Instruments, USA) at 630 nm (OD=630). The best results were adopted for our phage further analysis.

#### One-step Growth Curve Analysis

Host bacteria were cultured in 10 ml LB broth until reaching the early log phase (OD=0.3). Afterwards, the cultured bacteria were centrifuged at  $5000 \times g$  for 10 min, the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended (contain bacteria) in 1 mL LB broth. The phage suspension was mixed with bacteria culture medium according to MOI (Table 3) and the suspension was incubated at room temperature for 10 min for phage adsorption.

Following incubation, the non-adsorbed phage was deleted by centrifugation at  $11000 \times g$  for 30 sec and the pellet containing adsorbed phage was suspended in 10 ml of LB broth. The phage titer in the culture was determined every 10 min. The phage was purified using chloroform according to the method described in the phage isolation section (27).

Table3. General characteristics of 3 bacteriophages isolated from wastewater samples

Characteristics	vB-Kp1*	vB-Kp2	vB-Ea1**
Host bacteria	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. aerogenes</i>
PFU/ml	$15 \times 10^{10}$	$3 \times 10^{11}$	$3 \times 10^{12}$
Plaque appearance	Clear	Clear	Clear
MOI	$10^3$	$10^1$	$10^3$
Latent period (min)	20	10	10
Burst size	500	833	333
Family	Myoviridae	Myoviridae	Myoviridae
Head diameter (nm)	40	45	70
Tail length (nm)	70	80	110
Sampling location	Sewage outlet of Amirkola Children's Hospital	Sepidan poultry slaughterhouse wastewater outlet	Sewage outlet of Amirkola Children's Hospital

#### Phage Morphology Observation by Electron Microscopic

For transmission electron microscopy (TEM) observation, the sample was prepared based on Brenner and Horne protocol (27). Briefly, the purified phage suspension ( $10^9$  PFU/mL) was centrifuged at  $15000 \times g$  for 150 min and the supernatant was discarded. The pellet was washed with distilled water

two times. The bacteriophage was deposited on a cuprum grid with carbon-coated formvar film and was stained with 2% potassium phosphotungstate (pH: 7.2) or 1% uranyl acetate (pH: 4.5). Following air drying, the sample was observed by TEM (ZEISS EM 900, Germany) at an acceleration voltage of 50 kV.

### SDS-PAGE Analysis of Phage Structural Proteins

The purified phage suspension ( $10^9$  PFU/mL) was centrifuged at  $8000 \times g$  for 60 min at  $4^\circ\text{C}$  (Centrifuge 5424 R, Eppendorf, Germany) and the supernatant was discarded. The phage pellet was suspended in 1 mL of loading buffer containing 2.5%  $\beta$ -mercaptoethanol, 2% SDS, 10% glycerol, and 0.0025% bromophenol blue in 6.25 mm Tris-HCL (pH: 6.8).

The suspension was heated at  $100^\circ\text{C}$  for 10 min to denature the phage proteins. Next, 14  $\mu\text{L}$  of denatured sample and 2  $\mu\text{L}$  of protein molecular weight marker (Thermo Fisher, Germany) were loaded in 12% polyacrylamide gel (PAGE) and were electrophoresed in 100-120 MV for 5 hr. Finally, after separation, dimension gels were stained with silver nitrate (28, 29).

## Results

### Plaques Formed by Isolated and Cultivated Phages

Clinical isolates of MDR-*K. pneumoniae* and MDR-*E. aerogenes* were coded (Table 1) and used as host

strains for isolating phages from the hospital, industrial, and urban wastewater of north of Iran. Three bacteriophages were isolated from the wastewater samples and a host bacterial strain for each bacteriophage was selected using the DLA technique. The bacteriophage produced clear plaques on the culture of the host bacterial strain (Figure 1).

Two lytic bacteriophages active against *K. pneumoniae* were isolated using the abovementioned strategy and were named as vB\_Kp1, vB\_Kp2. In addition, one lytic bacteriophage active against *E. aerogenes* was named as vB\_Ea1 (Table 2). Afterwards, the clearest plaque of the three lytic bacteriophages was isolated, purified, and amplified. The titers of each phage lysate reached  $10^9$  PFU/mL or higher (Table 3).

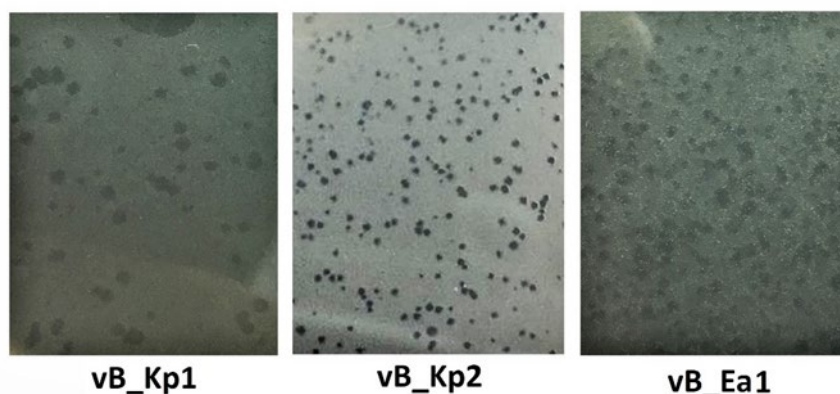


Figure 1. Primary plaques of three isolated phages

### Susceptibility of Isolated Strains to the Three Purified Phages

The host range of the isolated phages (vB\_Kp1, vB\_Kp2, and vB\_Ea1) was tested against 15 MDR-*K. pneumoniae* and 10 MDR-*E. aerogenes* clinically isolated strains and standard strains, including *P. aeruginosa* ATCC 1074, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 35218, *S. typhi* PTCC 1639, *E. aerogenes* PTCC 1221, and *K. pneumoniae* PTCC 1290. The spot assay method was employed to characterize host specificity in three different phages. Their infectivity was categorized based on plaque formation and in case the plaques were formed the strain was selected as a host of phage (Table 4).

As shown in Table 4, phages vB\_Kp1 and vB\_Kp2 lysed 5 (33.3%) and 7 (46.6%) samples out of 15 clinically isolated *K. pneumoniae* cases, respectively. Furthermore, vB\_Ea1 was able to lyse 6 of 10 (60%) clinical *E. aerogenes* samples. The phages could not infect 11 isolated MDR-strains, including Kr1, Kr2, Kr5, Kr8, Kr9, Ka1, Ka4, Em2, Em5, Er2, and Er4. The other isolated MDR-strains were sensitive to at least one of the isolated phages. The antibiotic resistance analysis of the susceptible strains revealed that all the strains were resistant to more than three of the tested antibiotics.

**Table 4.** Susceptibilities of clinically isolated strains to infection with bacteriophages isolated from wastewater samples

Strain	vB-Kp1	vB-Kp2	vB-Ea1
Kr1	-	-	-
Kr2	-	-	-
Kr3	+	+	-
Kr4	-	+	-
Kr5	-	-	-
Kr6	+	+	-
Kr7	-	+	-
Kr8	-	-	-
Kr9	-	-	-
Kr10	+	+	-
Ka1	-	-	-
Ka2	+	+	-
Ka3	-	+	-
Ka4	-	-	-
Ka5	+	-	-
Em1	-	-	+
Em2	-	-	-
Em3	-	-	+
Em4	-	-	+
Em5	-	-	-
Er1	-	-	+
Er2	-	-	-
Er3	-	-	+
Er4	-	-	-
Er5	-	-	+
<i>E. aerogenes</i> PTCC1221	-	-	+
<i>K. pneumoniae</i> PTCC 1290	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 1074	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218	+	+	-
<i>S. typhi</i> PTCC 1639	-	-	-

+: Sensitivity of the isolated clinical strain to infection with isolated bacteriophages

\_: Insensitivity of the isolated clinical strain to infection with isolated bacteriophages

### Morphology of Lytic Bacteriophages

The morphology of isolated and purified phages was analyzed using TEM ([Figure 2](#)). Phages had long tails of approximately 70, 80, and 110 nm in a non-compressed state. In various images prepared for each phage, the contracted and compressed tails could be observed. Moreover, phages vB\_Kp1, vB\_Kp2, and vB\_Ea1 had icosahedral capsids measuring approximately 40, 45, and 70 nm, respectively. The morphological characteristics of isolated phages as long contracted tail and icosahedral capsid are similar to those of the Mayoviridae family ([Table 3](#)).

[Figure 2](#). TEM images of isolated phages (vB\_Kp1, vB\_Kp2, and vB\_Ea1); scale bars for each picture have been mentioned.

### Optimal Multiplicity of Infection

Cultures of  $10^4$  CFU/ml host bacteria in the early log phase (OD=0.3) were infected with different amounts of designed phages and were evaluated to determine the phage titers after 2, 4, and 8 h of incubation. The optimal MOI was selected for subsequent experiments. The optimal MOIs of vB\_Kp1, vB\_Kp2, and vB\_Ea1 were  $10^3$ ,  $10^1$ , and  $10^3$ , respectively ([Table 3](#)).



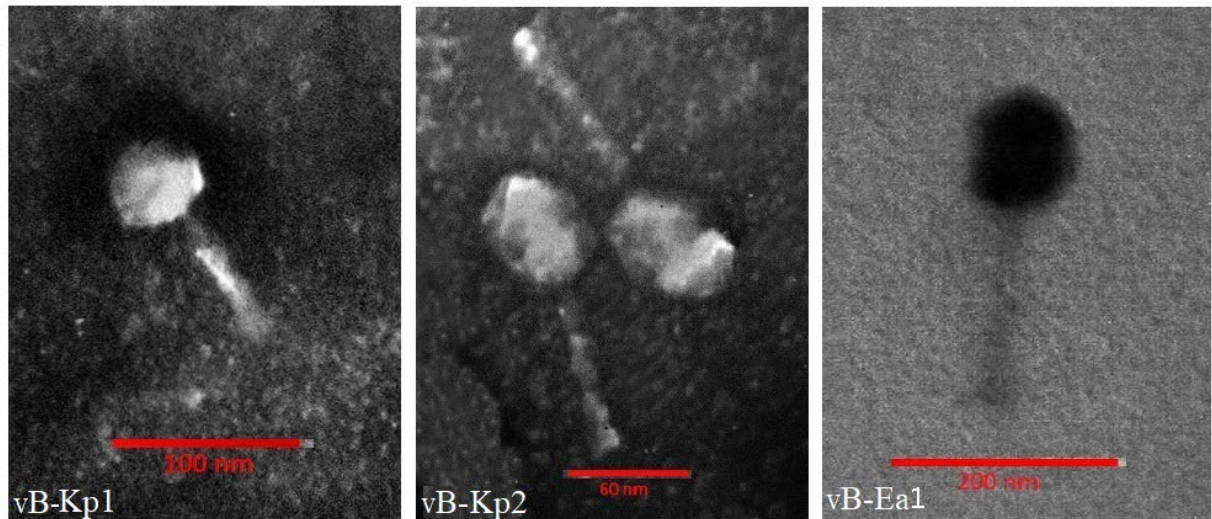


Figure 2. TEM images of isolated phages (vB\_Kp1, vB\_Kp2 and vB\_Ea1). Scale bars for each picture have been mentioned.

### Latent Time and Isolated Phages Burst Size

The one-step growth curve was represented to determine the latent time and burst size of each isolated and purified phage (Figure 3). Supported by the curves, the latent times of vB\_Kp1, vB\_Kp2, and

vB\_Ea1, were found to be about 20, 10, and 10 min, respectively. In addition, the burst sizes were 500, 833, and 333 PFU/infected cells, respectively (Table 3).

Figure 3. One-step growth curve of isolated bacteriophages vB\_Kp1, vB\_Kp2, and vB\_Ea1.

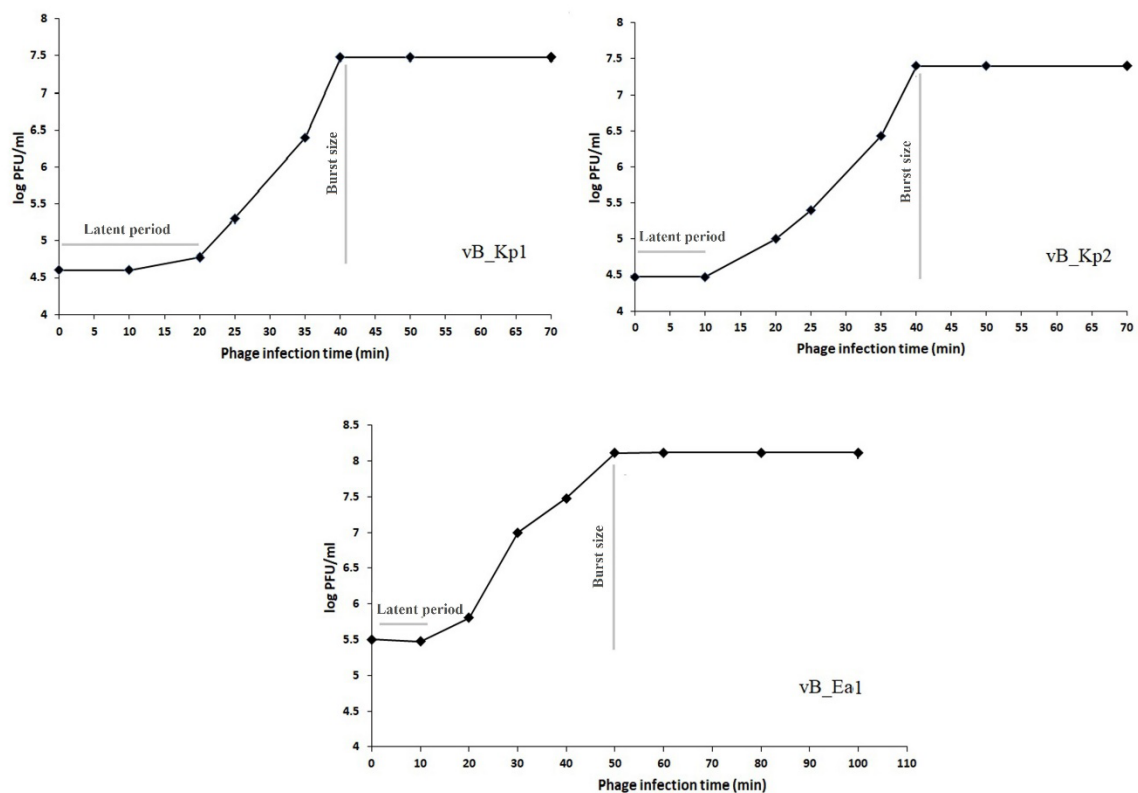


Figure 3. One-step growth curve of isolated bacteriophages vB\_Kp1, vB\_Kp2, and vB\_Ea1.

### SDS-PAGE Patterns of Structural Proteins of Isolated Phages

Three isolated phages, namely vB\_Kp1, vB\_Kp2, and vB\_Ea1 were analyzed in terms of their structural protein composition by SDS-PAGE. Many protein bands were observed in a silver-stained SDS polyacrylamide gel. All the three phages assigned to the Myoviridae family presented a different protein pattern in SDS polyacrylamide gel. Nevertheless, protein bands were observed with a size range of 18-70 kDa (Figure 4). Several bands were observed to be very strong and some were weak in SDS polyacrylamide gel.

Figure 4. SDS-PAGE patterns of structural proteins of the isolated bacteriophages vB\_Kp1, vB\_Kp2, and vB\_Ea1

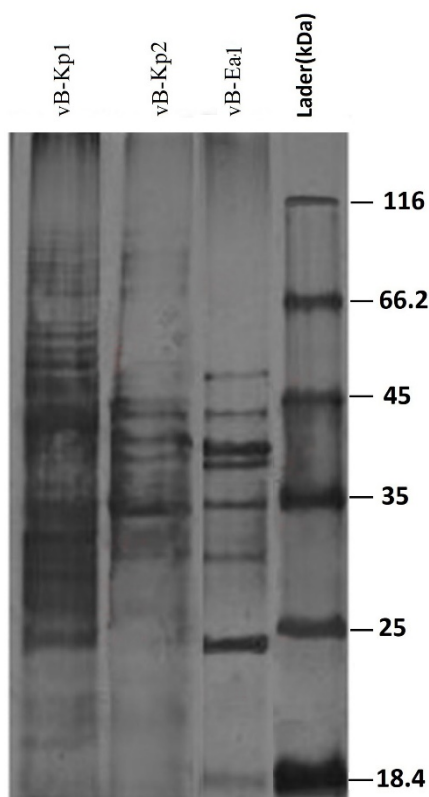


Figure 4. SDS-PAGE patterns of structural proteins of isolated bacteriophages vB\_Kp1, vB\_Kp2, and vB\_Ea1.

### Discussion

The rising incidence of gram-negative antibiotic-resistant bacterial infections, such as *E. aerogenes* and *K. pneumoniae* is one of the most remarkable problems in public health elevating the associated mortality rate and financial and psychological burden on patients and the healthcare system (30-34). *K. pneumoniae* and *E. aerogenes* have been identified as potentially pathogenic organisms in various infections, which show an extraordinary ability to express ESBL,

KPC, and Metallo beta-lactamase making problems for successful treatment (4-7).

Therefore, for the treatment of MDR infections, efficient and affordable therapeutic approaches with fewer side effects are required. Lytic phages are similar to antibiotics in terms of significant antibacterial activity. However, therapeutic phages, at least in theory, have advantages over antibiotics. Phages have been reported to be much more effective and efficient than antibiotics in treating antibiotic-resistant infections in humans and laboratory animals.

In addition to being used to kill bacteria, phages have certain hosting properties that can be used to detect and type bacterial infections. Moreover, these products can provide an influential basis for phage therapy that requires rapid detection of bacterial targets and their sensitivity to specific phages.

Phage therapy is one of the significant, inexpensive, and specific methods that has attracted increasing attention for the treatment of MDR bacterial infections today (35, 36). However, new isolated MDR bacterial strains may be resistant to these phages. Bacteria can resist phage attack through diverse mechanisms, such as spontaneous mutations, restriction-modification systems, and adaptive immunity via the CRISPR-Cas system. Consequently, the identification of new phages and the creation of bacteriophage cocktails can be useful for improving therapeutic phages (37-39).

Up to now, many bacteriophages have been characterized as an antibacterial agent for *K. pneumoniae* (40, 41) and *E. aerogenes* (42, 43). In the present study, first, MDR-*K. pneumoniae* and MDR-*E. aerogenes* were isolated from clinical specimens and used as the main host to screen for bacteriophages extracted from hospital wastewater. Two phages, namely vB\_Kp1 and vB\_Kp2 against MDR-*K. pneumoniae* and vB\_Ea1 phage against MDR-*E. aerogenes* were isolated from hospital effluent.

Clear plaques are characteristic of lytic phages and all three isolated phages formed clear plaques showing their lysing potential. Electron microscopy showed that all the three phages isolated from the Myoviridae family are tail phages (44). The burst sizes of vB\_Kp1, vB\_Kp2, and vB\_Ea1 are about 500, 833, and 333 PFU/infected cells, and the latent times are about 20, 10, and 10 min, respectively.

All three isolated bacteriophages showed several characteristics suitable for phage use, including forming clear plaques and having a short latent time and large burst size indicated by a one-step growth curve. Moreover, the SDS-PAGE patterns of structural proteins showed that all three isolated phages were similar to the protein patterns of other members of



the Myoviridae family, such as Phaxl (45),  $\phi$ TMA (46), AP22 (25), and LP65 (47).

Karumidze *et al.* isolated bacteriophages VB-KLP-5 and VB-KLOX-2 from Georgia River wastewater. Clinical samples of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* were used to isolate and amplify phages. Both phages had large burst sizes and were stable under different adverse conditions. The phages reported in the current study are double-stranded DNA bacterial viruses belonging to families Podoviridae and Siphoviridae. The phages were able to lyse about 63% of the *Klebsiella* strains, including a set of 123 clinical isolates from Georgia and the United Kingdom. The properties of these phages indicated their potential to be applied in phage therapy cocktails (40).

In 2019, Zhao *et al.* identified a specific lytic bacteriophage for *E. aerogenes* isolates called vB\_EaeM\_φEap-3. Based on TEM analysis, phage vB\_EaeM\_φEap-3 was classified as a member of the Myoviridae family. Determination of host range demonstrated that vB\_EaeM\_φEap-3 was able to lyse 18 of the 28 strains of *E. aerogenes* while showing a one-step growth curve, short latent times, and a medium burst size. Considering host range, genome, and phage parameters, vB\_EaeM\_φEap-3 became a suitable candidate for phage therapy programs (42).

In the present study, phages vB\_Kp1 and vB\_Kp2 lysed about 33.3% and 46.6% of the clinical isolates of *K. pneumoniae*. In addition, vB\_Ea1 lysed approximately 60% of *E. aerogenes* isolates. These percentages indicate their applicability in phage therapy. Some studies have reported a wider host range for some phages.

For example, in the study performed by Komijani *et al.* over two years, *K. pneumoniae* was isolated from 193 infected wounds in three hospitals of Isfahan that were ESBL positive. The lytic phage was isolated against *K. pneumoniae* and the host range, morphology, thermal stability, pH, salinity stress, and genome size were estimated. The phage was classified in the Myoviridae family due to the morphological characteristics. Out of 41 clinical specimens, 38 cases were phage sensitive (41). On the other hand, some other studies reported a very limited host range for isolated phages.

In a study by Li *et al.* in 2016, the phiEap-2 phage against *E. aerogenes* was isolated from wastewater and lysed *E. aerogenes* 3-sp strain. Following phage isolation, diverse properties, such as host range, phage structural proteins, genome structure and sequence, pH tolerance range, and resistance to different temperatures were investigated showing that this phage can be used for treatment (43).

Phages vB\_Kp1, vB\_Kp2, and vB\_Ea1 could be suitable candidates for phage therapy research due to different characteristics, including short latent time, large burst size, and lysis. However, further studies concerning resistance at different pH and temperatures, genomic sequencing, and bioinformatics studies are required.

## Conclusion

Despite the findings of the present study, our data may not be sufficient for determining host specificity and phage type for successful therapeutic use. Therefore, further experiments, molecular analysis, complete genome sequencing, proteomics analysis, and clinical studies are necessary for selecting acceptable phage types against MDR-*K. pneumoniae* and MDR-*E. aerogenes*.

## Acknowledgment

We would like to express our gratitude and thanks to all who helped during the implementation of this research. It is worth mentioning that this article is the result of a part of the dissertation of Ms. Fatemeh Habibi Nava from the Islamic Azad University, Qom Branch.

## Funding

The financial resources of this research were provided by Ms. Habibi Nava

## Conflict of Interest

The authors of the current study declared no conflict of interest.



## جداسازی باکتریوفازهای لیتیک علیه کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر آئروژنز دارای مقاومت دارویی چندگانه از نمونه‌های فاضلاب: ابزاری بالقوه برای اهداف پزشکی

فاطمه حبیبی نوا<sup>۱</sup>، محمدرضا ذوالفقاری<sup>۱\*</sup>، صالحه صبوری<sup>۲</sup>، محسن زرگر<sup>۱</sup>، محمد سلیمانی<sup>۳</sup>

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران
۲. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران، بیوتکنولوژی دارویی، کرمان، ایران
۳. گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی آجا، تهران، ایران.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و اهداف:** هدف از مطالعه حاضر، غربالگری و جداسازی باکتریوفازهای لیتیک، علیه نمونه‌های بالینی جداسازی شده از سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلبسیلا پنومونیه (vB\_Kp2.vB\_Kp1) و انتروباکتر آئروژنز (vB\_Ea1) از فاضلاب است.

**مواد و روش کار:** کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر آئروژنز از نمونه‌های بالینی از دی ماه ۱۳۹۶ تا شهریور ۱۳۹۷ در سه بیمارستان امل (مازندران، ایران) جداسازی و شناسایی شدند. روش انتشار از دیسک (کربی-باثر) برای تعیین الگوی مقاومت ایزوله‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف استفاده شد. سویه‌های با مقاومت چند دارویی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تست‌شده، برای بررسی اثر فازه‌های ایزوله، انتخاب شدند. برای جداسازی باکتریوفازها، نمونه‌برداری از فاضلاب‌های شهری و بیمارستانی انجام شد. پلاک‌ها حضور باکتریوفازها را تأیید کرد. پس از غنی‌سازی باکتریوفازهای ایزوله و رنگ‌آمیزی، مورفولوژی باکتریوفازها با میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) مشخص گردید. تست‌های شناسایی فازه‌ها شامل محدوده میزبانی و مراحل رشد انجام شد.

**یافته‌ها:** بررسی تصاویر TEM نشان داد که فازه‌ها دارای کپسید بیست وجهی و دم بلند منقبض‌شونده بوده و از خانواده مایوپوریده هستند. فازه‌ها ۱۴ سویه (۵۶ درصد) از ۲۵ سویه باکتری را لیز کردند. منحنی رشد یک مرحله‌ای، اندازه انفجاری بزرگ و زمان تاخیری کوتاه را برای فازه‌ها نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** تشکیل پلاک‌های شفاف، قدرت لیزکنندگی بالای فازه‌ها را نشان می‌دهد؛ بنابراین پتانسیل خوبی برای آنالیز بیشتر، برای استفاده بالینی به‌عنوان عامل درمانی در آینده دارند.

**کلید واژه‌ها:** کلبسیلا پنومونیه، انتروباکتر آئروژنز، فازه درمانی، عفونت مقاوم به چند دارو

کپی‌رایت © مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران؛ دسترسی آزاد؛ کپی برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

**تاریخچه مقاله**  
دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۶  
پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۲  
انتشار آنلاین: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱  
**موضوع:** ویروس شناسی پزشکی

### نویسنده مسئول:

محمدرضا ذوالفقاری، گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران  
ایمیل: [omreza.zolfaghary@gmail.com](mailto:omreza.zolfaghary@gmail.com)

### مقدمه

پنومونیه با بیان کارباینماز (KPC)، بتا-لاکتاماز وسیع‌الطیف (ESBL) و متالو بتا-لاکتاماز به این آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شده و نمی‌توان از این آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل عفونت استفاده کرد (۷-۴).

آلودگی با باکتری‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو در افراد دارای سیستم ایمنی ضعیف، مانند نوزادان، افراد مسن، بیماران دارای نقص سیستم ایمنی و بیماران سرطانی، یک خطر جدی است که منجر به علائم شدید نوتروپنی و حتی در بعضی موارد باعث مرگ می‌شود (۳).  
۸. شیوع فزاینده عفونت‌های مقاوم به چند دارو، مشکلات درمانی و درمان طولانی مدت منجر به تولید داروهای ضد باکتری جدید با بازده بالا با عوارض جانبی پایین و هزینه پایین برای درمان عفونت‌های مقاوم به چند دارو شده است.

یکی از مهمترین مشکلات بهداشت جهانی در دهه اخیر، شیوع روزافزون عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، از جمله باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، به‌ویژه باکتری‌های "ESKAPE" شامل انتروکوکوس فاسیوم، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه، اسینتویاکتر بومانی، سودوموناس آئروژینوزا و گونه انتروباکتر است (۱، ۲). استفاده بیش از حد داروهای آنتی‌باکتریال، منجر به افزایش مقاومت به چند دارو و تغییر در جمعیت باکتری در بیماران می‌شود (۳).

باکتری‌های گرم منفی مانند انتروباکتر آئروژنز و کلبسیلا پنومونیه، مقاوم در برابر سفالوسپورین، پنی‌سیلین و خانواده کارباینماز منجر به تشکیل عفونت مقاوم به چند دارو می‌شوند. انتروباکتر آئروژنز و کلبسیلا

MERCK شامل آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کلرآمفینیکل (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، سفالوتین (۱۰ میکروگرم)، ایمی‌پنم (۱۰ میکروگرم)، نیتروفورانثونین (۳۰۰ میکروگرم)، کوتریموکسازول (۵ میکروگرم)، تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)، نورفلوکساسین (۱۰ میکروگرم)، و اسیدنالیدیکسیک (۳۰ میکروگرم) مشخص شد.

سویه‌هایی که حداقل به سه کلاس داروی ضد میکروبی مقاوم هستند به‌عنوان باکتری‌های مقاوم به چند دارو در نظر گرفته می‌شوند (۲۰). سرانجام، ۱۵ نمونه کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو و ۱۰ نمونه انتروباکتر آئروژنز مقاوم به چند دارو از سویه‌های بالینی جداسازی شد (جدول ۱). برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی، دو الی سه کلنی در ۱۰۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل، تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شده تا کدورت سوسپانسیون باکتری، برابر با نیم مک‌فارلند شود.

### جداسازی و تغلیظ فاز

نمونه فاضلاب بیمارستانی، صنعتی و شهری از مکان‌های مختلف در شمال ایران (مازندران، ایران) بین ژانویه تا سپتامبر ۲۰۱۸ جمع‌آوری شده است (جدول ۲). نمونه‌ها در یک فالكون استریل جمع‌آوری شده و سپس در ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه، در سانتریفیوژ (RS/20IV, TPMYSELKO, Japan) قرار گرفت تا ذرات بزرگتر جدا شوند. سوپرناتانت به‌وسیله فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر (Star ech, Taiwan) فیلتر شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس ذخیره شد. به‌منظور غنی‌سازی و تکثیر باکتریوفاز، ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه سوپرناتانت، به ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکربی باکتری مورد نظر در ۰/۴-۰/۶ OD اضافه گردید (۲۱). همچنین ۲۴۰ میکرولیتر محلول ۱ مولار کلسیم کلرید (Merck, Germany) اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکردار (JAL company, Iran) با دور ۴۰ rpm، انکوبه شد. سپس نمونه‌ها با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی، به‌وسیله فیلتر سرنگ ۰/۲۲ میکرومتر شد (۲۲).

یکی از گزینه‌های مورد علاقه در دو دهه اخیر، ویروس‌های باکتریایی یا باکتریوفازهای کشف شده تقریباً از قرن پیش است (۹). فازهای لیتیک، وارد سلول‌های باکتری می‌شوند و متابولیسم باکتری‌ها را تغییر داده و باعث لیز و تخریب باکتری می‌شوند (۹، ۱۱). از اوایل قرن بیستم، فاز درمانی به‌عنوان راهکاری برای درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی استفاده می‌شود (۹-۱۱).

با توجه به مزایای فاز درمانی، چندین کشور اروپایی و ایالات متحده، به دنبال کشف باکتریوفاز جدید و بهبود این ابزار برای کنترل عفونت مقاوم در برابر داروهای ضد باکتری و مراقبت از بیماران عفونی هستند (۱۴-۱۲).

فاز درمانی علاوه بر اینکه در درمان عفونت‌های مقاوم به چند دارو موثر است مزایای دیگری هم دارد، مانند حفظ فلور میکروبی بیمار، هزینه کم فاز درمانی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های وسیع الطیف، عوارض جانبی کمتر، پایداری در شرایط نامساعد (دما و خشکی)، اختصاصی بودن برای باکتری‌های هدف، فاقد ژن سموم و جداسازی آسان فاز از محیط‌های مختلف مانند فاضلاب، دریا، خاک و غیره است (۱۸-۱۵).

هدف از مطالعه حاضر، غربالگری و جداسازی باکتریوفازهای لیتیک، علیه نمونه‌های بالینی جدا شده از سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر آئروژنز از فاضلاب است.

## مواد و روش‌ها

### سویه‌های باکتریایی

کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر آئروژنز از دی ماه ۱۳۹۶ تا شهریور ۱۳۹۷ از ۳ بیمارستان و مرکز پزشکی در شمال ایران (آمل، مازندران، ایران) از نمونه‌های بالینی جدا شدند. با توجه به روش‌های استاندارد انجمن میکروبی‌شناسی آمریکا (ASM) باکتری‌های جدا شده با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی تجزیه و تحلیل شدند. همچنین از سویه‌های شامل سودوموناس آئروژینوزا ATCC 1074، استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 6538، اشریشیا کلی ATCC 35218، سالمونلا تیفی PTCC 1639، انتروباکتر آئروژنز PTCC 1221 و کلبسیلا پنومونیه PTCC 1290 استاندارد استفاده شد.

### تست حساسیت ضد میکروبی

الگوهای حساسیت به آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش انتشار دیسک کربی-بائر روی محیط کشت مولر-هینتون آگار انجام شده است. حساسیت باکتری‌ها طبق دستورالعمل‌های استاندارد بالینی و آزمایشگاهی CLSI (۱۹)، نسبت به دیسک آنتی‌بیوتیکی کمپانی

جدول ۱. ایزوله‌های کلینیکی کلبسیلا پنومونیه و انتروباکتر آئروژنز مقاوم به چند دارو

نشانه اختصاری	تعداد نمونه	منشا نمونه	منبع	میکروارگانیزم
Kr1	۱۰	ادرار	ایزوله بالینی بیمارستان امام رضا آمل	کلبسیلا پنومونیه
Kr2		ادرار		
Kr3		خون		
Kr4		ادرار		
Kr5		ادرار		
Kr6		تراشه		
Kr7		ادرار		
Kr8		ادرار		
Kr9		خون		
Kr10		ادرار		
Ka1	۵	ادرار	ایزوله بالینی بیمارستان امام علی آمل	کلبسیلا پنومونیه
Ka2		زخم		
Ka3		خون		
Ka4		ادرار		
Ka5		زخم		
Em1	۵	ادرار	ایزوله بالینی درمانگاه موسی بن جعفر آمل	انتروباکتر آئروژنز
Em2		ادرار		
Em3		زخم		
Em4		ادرار		
Em5		تراشه		
Er1	۵	ادرار	ایزوله بالینی بیمارستان امام رضا آمل	انتروباکتر آئروژنز
Er2		ادرار		
Er3		زخم		
Er4		ادرار		
Er5		خون		

جدول ۲. محل جمع‌آوری نمونه‌های فاضلاب

مکان نمونه‌گیری	شماره نمونه
خروجی فاضلاب بیمارستان کودکان امیرکلا	۱
خروجی فاضلاب کشتارگاه طیور سپیدان	۲
پساب شرکت نفت (محمود آباد)	۳
فاضلاب استخر پرورش ماهی چشمه ساران	۴
فاضلاب مجتمع تفریحی پردیس شمال	۵
خروجی فاضلاب بیمارستان قائم (کلاردشت)	۶
بیمارستان شمال (آمل)	۷
بیمارستان امام حسین (نکا)	۸
بیمارستان امید (بهشهر)	۹
بیمارستان امام (بهشهر)	۱۰
کشتارگاه بابل طیور	۱۱

شدند. سپس از مایع رویی (فاژهای آزاد) رقت تهیه شده و با روش top agar overlay کشت داده شد.

### تعیین MOI بهینه

به منظور بررسی اثر کشندگی فاژ بر روی باکتری، لازم است تا بهینه نسبت فاژ به باکتری (Multiplicity of infection) محاسبه شود (۲۶). لذا داخل میکروپلیت ۹۶ خانه، داخل هر چاهک، ۱۰ میکرولیتر باکتری میزبان  $10^4$  cfu/mL ریخته شده و با ۱۰ میکرولیتر فاژ با رقت‌های مختلف (PFU/mL)  $10^2$  و  $10^4$ ،  $10^6$ ،  $10^7$  مخلوط شد. برای هر رقت از فاژ سه خانه در نظر گرفته شد. در ضمن، سه خانه دارای باکتری فاقد فاژ، برای کنترل رشد باکتری و سه خانه دارای فاژ فاقد باکتری، برای اطمینان از عدم آلودگی استوک فاژ نیز قرار گرفت. میکروپلیت در  $37^\circ\text{C}$  انکوبه شده و در فاصله زمانی ۲، ۴ و ۸ ساعت در دستگاه الیزا ریدر (ELX800, BioTek Instruments, USA) در  $OD_{630}$  خوانده شد.

### تعیین منحنی رشد یک مرحله‌ای فاژ

باکتری میزبان فاژ مورد نظر، در ۱۰ mL محیط کشت، تلقیح و تا رسیدن به  $OD=0.3$  انکوبه شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در  $5000 \times g$  سانتریفیوژ شده و توده سلولی به دست آمده در ۱ mL محیط کشت ریخته شد سپس طبق MOI بهینه فاژ (جدول ۳)، با فاژ آلوده شد. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، ۳۰ ثانیه در  $11000 \times g$  سانتریفیوژ شد. مایع رویی حاوی فاژهای جذب نشده، دور ریخته شده و سلول‌های آلوده شده موجود در رسوب، دو بار با محیط کشت، شستشو و بلافاصله در ۱۰ mL محیط کشت گرم، سوسپانسیون شده و در  $37^\circ\text{C}$  انکوبه گردید و در فاصله زمانی هر ده دقیقه، نمونه برداری برای تعیین PFU انجام شد. نمونه‌ها با ۲٪ کلروفرم مخلوط شده و قسمت مایه (رویی) که فاژهای آزاد شده و داخل سلولی را نشان می‌دهد، تیترا شد (۲۷).

### تهیه عکس با میکروسکوب الکترونی گذاره یا عبوری

برای تهیه عکس فاژ با TEM (transmission electron microscope)، سوسپانسیونی با تیترا بالای فاژ ( $10^9$  PFU/mL) به مدت ۱۵۰ دقیقه در  $15000 \times g$  رسوب داده شد سپس دو بار با آب مقطر استریل شستشو شد. مقداری از آن روی گریدهای مسی قرار گرفته و با فسفوتنگستات سدیم ۲٪ یا اورانیل استات ۱٪ رنگ آمیزی شد پس از خشک شدن، نمونه با میکروسکوب TEM (آلمان، ZEISS EM 900) با ولتاژ (۵۰ کیلوولت) مشاهده شد (۲۷).

### روش آگار دو لایه (Plaque Assay)

برای بررسی توانایی ضد باکتری فاژهای جدا شده، از روش آگار دو لایه استفاده کردیم. ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه خالص شده حاوی فاژ احتمالی با ۲۰۰ میکرولیتر کشت مایع باکتری مورد نظر با  $OD = 0.2-0.4$  مخلوط شده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس به منظور جذب فاژ به باکتری، گرمخانه‌گذاری شد. مخلوط حاصل همراه با ۳ میلی‌لیتر LB agar مذاب که حاوی ۰.۷۵٪ جرمی حجمی آگار است (Half agar)، ترکیب شده و پس از اختلاط کامل به صورت Top agar overlay کشت داده شد. پس از جامد شدن لایه دوم، پلیت حاصل در  $37^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد پس از انکوباسیون، لیز یا تشکیل پلاک وجود فاژهای لیتیک را گواهی می‌دهد (۲۳).

### خالص‌سازی فاژ

پس از تشکیل پلاک با روش plaque assay، یک پلاک روی سطح پلیت انتخاب شد. هر پلاک تقریباً شامل  $10^5$  تا  $10^6$  فاژ است. پلاک ایجاد شده در ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول LB حل شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد تا آلودگی‌های باکتریایی طبق روش بخش جداسازی فاژ از بین برود. برای خالص‌سازی بهتر، آزمایش پلاک در سه نسخه انجام شد. تیترا فاژهای جدا شده در برابر باکتری‌های مقاوم به چند دارو از نمونه‌های بالینی، به صورت واحدهای تشکیل‌دهنده پلاک (PFU) در هر میلی‌لیتر (PFU/mL) نشان داده شد که توسط کارلسون و میلر توصیف شده است (۲۴).

### تعیین محدوده میزبانی

۳۰۰ میکرولیتر باکتری با  $OD=0.4$ ، در محیط LB حاوی ۰.۷۵٪ آگار با دمای  $45^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس سوسپانسیون شده سپس روی یک پلیت حاوی LB آگار ۱٪، قرار داده شد و قبل از بستن آگار، ده میکرولیتر از چندین رقت فاژ خالص شده (PFU/mL)  $10^2$ ،  $10^5$ ،  $10^7$  و  $10^1$  روی محیط LB ریخته شد (تست قطره). پلیت‌ها پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در  $37^\circ\text{C}$  درجه، بررسی و منطقه شفاف در ناحیه قطره، به عنوان پاسخ مثبت و حساسیت به فاژ در نظر گرفته شد (۲۵).

### تعیین زمان جذب

از سوسپانسیون میکروبی  $10^8$  cfu/mL و تیترا فاژی  $10^7$  pfu/mL، حجم‌های مساوی برداشته و در حمام آب گرم  $37^\circ\text{C}$  درجه قرار داده و در زمان‌های مشخص (۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ دقیقه) مقداری از نمونه برداشته و بلافاصله روی یخ قرار داده و سرانجام همه نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه در  $8000 \times g$  سانتریفیوژ



لیتیک، جداسازی، خالص سازی و غنی سازی شد و تیتراژ هر فاز به  $10^9$  PFU/mL یا بالاتر رسید (جدول ۳).

### تعیین حساسیت سویه های جدا شده کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو و انتروباکترئوزن مقاوم به چند دارو به ۳ فاز خالص شده

دامنه میزبانی فازهای جدا شده (vB\_Kp2 ، vB\_Kp1) vB\_Ea1 علیه ۱۵ کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو و ۱۰ نمونه انتروباکترئوزن مقاوم به چند دارو و سویه های استاندارد شامل سودوموناس آئروژینوزا / ATCC 1074 ، استاف اورئوس ATCC 6538، اشیشیا کلی ATCC 35218، سالمونلا تیفی PTCC 1639، انتروباکترئوزن PTCC 1221 و کلبسیلا پنومونیه PTCC 1290 بررسی شد. روش تست قطره برای بررسی ویژگی میزبانی در فازها استفاده شد. در مواردی که پلاکها تشکیل شدند (+) سویه باکتری به عنوان میزبان فاز انتخاب شد (جدول ۴).

همانطور که در جدول ۴ نشان داده شده است فاز vB\_Kp1، ۵ نمونه از ۱۵ نمونه کلبسیلا پنومونیه کلینیکی جدا شده (۳۳.۳٪) و vB\_Kp2، ۷ نمونه از ۱۵ نمونه کلبسیلا پنومونیه (۴۶.۶٪) را لیز کرد همچنین vB\_Ea1 توانست ۶ نمونه از ۱۰ نمونه (۶۰٪) ایزوله کلینیکی انتروباکترئوزن را لیز کند، فازها نتوانستند ۱۱ سویه باکتری جدا شده مقاوم به چند دارو (از مجموع هر دو باکتری) شامل Er2، Em5، Em2، Ka4، Ka1، Kr9، Kr8، Kr5، Kr2، Kr1 و Er4 را آلوده کنند. بقیه سویه های جدا شده مقاوم به چند دارو حداقل نسبت به یکی از فازهای جدا شده، حساس بودند. تجزیه و تحلیل مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های باکتریایی حساس نشان داد که همه سویه ها به بیش از سه آنتی بیوتیک آزمایش شده، مقاوم هستند.

### استخراج پروتئین و انجام SDS-PAGE

تیتراژ بالای فاز ( $10^9$  PFU/mL)، در  $8000 \times g$  به مدت یک ساعت در دمای  $4^\circ C$  (centrifug5424 R, Eppendorf, Germany) سانتریفوژ شد. رسوب حاصل در یک سی سی بافر لودینگ  $\beta$  [مرکاپتواتانول ۲/۵٪، SDS ۲٪، گلیسرول ۱۰٪، آبی بروموفنول ۰/۰۲۵٪ در ۶.۲۵ میلی لیتر] (pH=۶/۸) Tris-HCL سوسپانسیون شده و پس از ۱۰ دقیقه جوشاندن پروتئینها دناتوره شد. سپس ۱۴ میکرولیتر از نمونه دناتوره ۲ میکرولیتر سایز مارکر (Thermo Fisher, Germany) در ژل پلی اکریلامید ۱۲٪ لود شده و به مدت ۵ ساعت با ولتاژ ۱۲۰-۱۰۰ ولت، الکتروفورز شد. سپس با استفاده از نیتراز قره رنگ آمیزی انجام شد (۲۸ و ۲۹).

### یافته ها

#### تشکیل پلاک ها توسط فازهای جداسازی شده

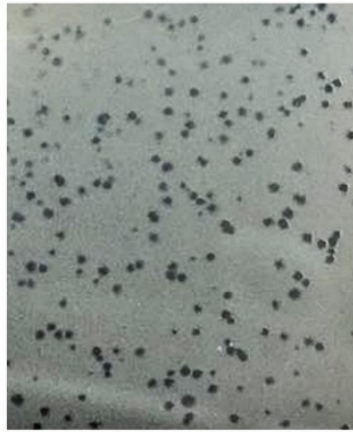
سویه های بالینی کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو و انتروباکترئوزن مقاوم به چند دارو که کدگذاری شده بود (جدول ۱) به عنوان سویه میزبان فازهای احتمالی موجود در فاضلاب های بیمارستان، صنعتی و شهری شمال ایران استفاده شد. سه باکتریوفاژ جدا شده از نمونه فاضلاب بیمارستانی، با استفاده از روش آگار دو لایه جدا شد. برای هر باکتریوفاژ، یک سویه باکتری میزبان، انتخاب شده بود. باکتریوفاژ پلاک های شفاف بر روی محیط کشت سویه باکتری میزبان تولید کرد (شکل ۱). دو باکتریوفاژ لیتیک علیه کلبسیلا پنومونیه با استفاده از استراتژی فوق جدا شده و vB\_Kp1، vB\_Kp2 نامگذاری شدند. همچنین، یک باکتریوفاژ لیتیک علیه انتروباکترئوزن به نام vB\_Ea1 نامگذاری شد (جدول ۳). سپس شفاف ترین پلاک سه باکتریوفاژ جدول ۳. مشخصات عمومی سه باکتریوفاژ جدا شده از نمونه های فاضلاب

مشخصات باکتری میزبان	vB-Kp1 کلبسیلا پنومونیه	vB-Kp2 کلبسیلا پنومونیه	vB-Ea1 انتروباکترئوزن
PFU/ml	$15 \times 10^{10}$	$3 \times 10^{11}$	$3 \times 10^{12}$
شکل پلاک	شفاف	شفاف	شفاف
MOI	۱۰۳	۱۰۱	۱۰۲
زمان تاخیری (دقیقه)	۲۰	۱۰	۱۰
اندازه انفجاری (ذره به ازای هر سلول)	۵۰۰	۸۳۳	۳۳۳
خانواده	مایویریده	مایویریده	مایویریده
قطر سر (نانومتر)	۴۰	۴۵	۷۰
طول دم (نانومتر)	۷۰	۸۰	۱۱۰
محل نمونه برداری	خروجی فاضلاب بیمارستان کودکان امیرکلا	خروجی فاضلاب کشتارگاه طیور سپیدان	خروجی فاضلاب بیمارستان کودکان امیرکلا

\* vB (bacterial virus), KP (K. pneumoniae), \*\* vB (bacterial virus), Ea (E. aerogenes)



vB\_Kp1



vB\_Kp2



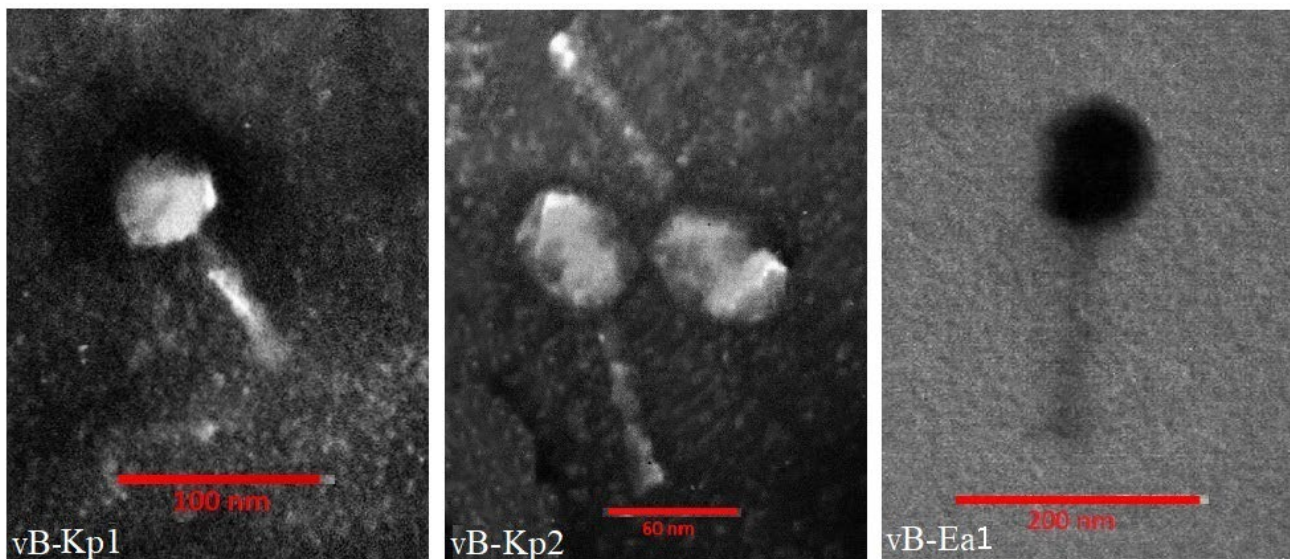
vB\_Ea1

شکل ۱. پلاک‌های اولیه ۳ فاز جدا شده

جدول ۴. حساسیت سویه‌های بالینی ایزوله نسبت به عفونت با باکتریوفازهای جدا شده از فاضلاب

Strain	vB-Kp1	vB-Kp2	vB-Ea1
Kr1	-	-	-
Kr2	-	-	-
Kr3	+	+	-
Kr4	-	+	-
Kr5	-	-	-
Kr6	+	+	-
Kr7	-	+	-
Kr8	-	-	-
Kr9	-	-	-
Kr10	+	+	-
Ka1	-	-	-
Ka2	+	+	-
Ka3	-	+	-
Ka4	-	-	-
Ka5	+	-	-
Em1	-	-	+
Em2	-	-	-
Em3	-	-	+
Em4	-	-	+
Em5	-	-	-
Er1	-	-	+
Er2	-	-	-
Er3	-	-	+
Er4	-	-	-
Er5	-	-	+
<i>انتروباکتر آئروژنز ATCC 1221</i>	-	-	+
<i>کلبسیلا پنومونیه PTCC 1290</i>	-	+	-
<i>سودوموناس آئروژینوزا ATCC 1074</i>	-	-	-
<i>استاف اورئوس ATCC 6538</i>	-	-	-
<i>اشریشیا کلی ATCC 35218</i>	+	+	-
<i>سالمونلا تیفی PTCC 1639</i>	-	-	-

+ : وجود حساسیت سویه بالینی ایزوله نسبت به عفونت با باکتریوفازهای جدا شده  
 - : عدم حساسیت سویه بالینی ایزوله نسبت به عفونت با باکتریوفازهای جدا شده



شکل ۲. تصاویر بدست آمده از TEM برای فازهای جدا شده (vB\_Ea1 و vB\_Kp2، vB\_Kp1)

ساعت انکوباسیون،  $OD_{630}$  قرائت شد. MOI بهینه vB\_Kp1، vB\_Kp2 و vB\_Ea1 به ترتیب  $10^3$ ،  $10^1$  و  $10^3$  بود. MOI بهینه هر فاز، برای آزمایش‌های بعدی، لازم بود و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۳).

#### زمان تاخیری و اندازه انفجاری فازها

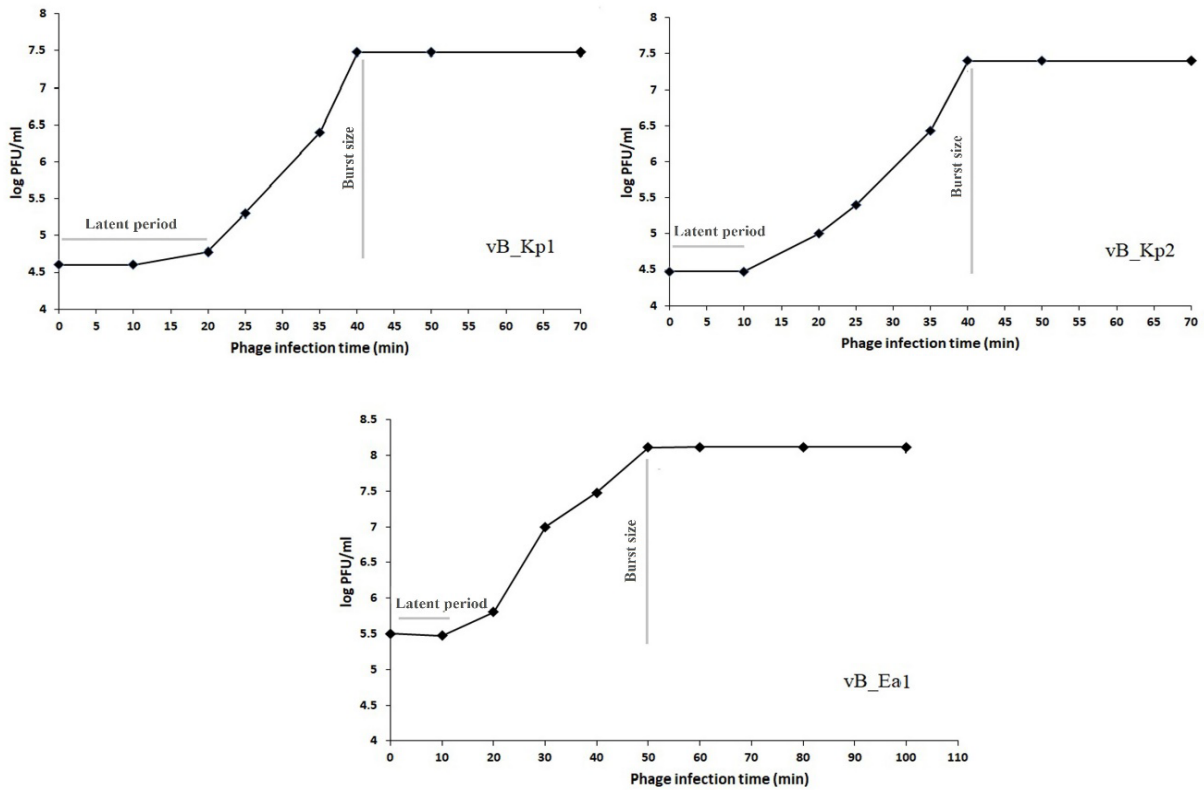
منحنی رشد یک مرحله‌ای برای تعیین زمان تاخیری و اندازه انفجاری هر فاز جدا شده، نشان داده شده است (شکل ۳). بر اساس منحنی‌ها، زمان نهفته vB\_Kp1، vB\_Kp2 و vB\_Ea1، به ترتیب حدود ۲۰، ۱۰ و ۱۰ دقیقه ارزیابی شد، در حالی که اندازه انفجاری به ترتیب ۵۰۰، ۸۳۳ و ۳۳۳ ذره به ازای هر سلول، مشخص شد (جدول ۳).

#### مورفولوژی باکتریوفاژهای لیتیک

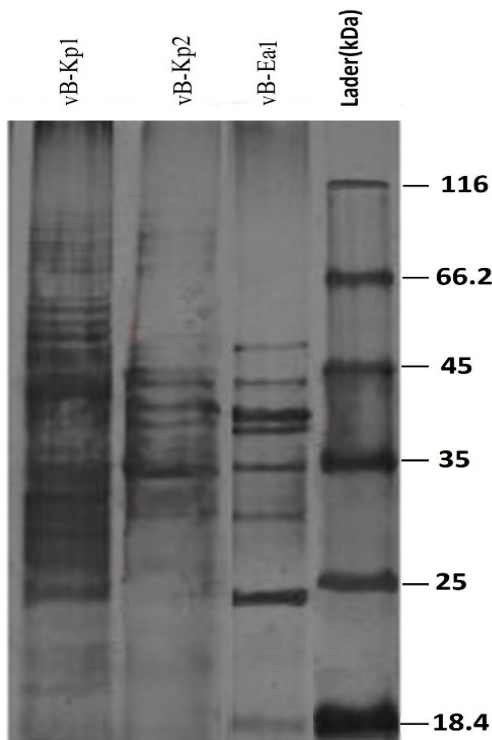
مورفولوژی فازهای جدا شده، با استفاده از TEM تجزیه و تحلیل شد (شکل ۲). فازهای vB\_Kp1، vB\_Kp2 و vB\_Ea1 دارای دم‌های بلند به طول تقریباً ۷۰، ۸۰ و ۱۱۰ نانومتر در حالت غیر فشرده بودند در تصاویر متعدد که برای هر فاز تهیه شد دم‌های منقبض شده و فشرده هم دیده شد، همچنین فازها دارای کپسید بیست وجهی (ایکوزاهیدرال) با اندازه تقریباً ۴۰، ۴۵ و ۷۰ نانومتر بودند. خصوصیات مورفولوژیکی فازهای جدا شده (دم بلند منقبض شونده و کپسید بیست وجهی)، مشابه اعضای خانواده مایوویریده است (جدول ۳).

#### تعیین MOI بهینه

۱۰ میکرولیتر باکتری میزبان  $10^4$  CFU/mL ( $OD=0.3$ ) با ۱۰ میکرولیتر فاز با رقت‌های مختلف آلوده شد و پس از ۲، ۴ و ۸



شکل ۳. منحنی رشد یک مرحله ای باکتریوفازهای جدا شده vB\_Ea1 و vB\_Kp2 ، vB\_Kp1 .



شکل ۴. الگوهای SDS-PAGE پروتئین‌های ساختاری باکتریوفازهای جدا شده vB\_Ea1 و vB\_Kp2 ، vB\_Kp1 .

#### الگوهای SDS-PAGE از پروتئین‌های ساختاری فازهای جدا شده

سه فاز جدا شده ( vB\_Ea1 و vB\_Kp2 ، vB\_Kp1 ) با استفاده از SDS-PAGE برای ترکیب پروتئین ساختاری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نوارهای پروتئینی زیادی در ژل پلی آکریل آمید SDS رنگ آمیزی شده با نقره، مشاهده شد. هر سه فاز در خانواده مایوویریده قرار دارند ولی هر کدام الگوی پروتئینی متفاوت در ژل پلی آکریل آمید SDS داشتند. با این وجود، نوارهای پروتئینی در محدوده اندازه ۱۸ تا ۷۰ کیلو دالتون مشاهده شد (شکل ۴). چندین باند بسیار قوی بودند که احتمالاً مربوط به پروتئین‌های اصلی کپسید هستند و برخی از آنها در ژل پلی آکریل آمید SDS ضعیف بودند.

## بحث

افزایش شیوع عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باکتری‌های گرم‌منفی مانند کلبسیلا پنومونیه و *انتروباکتر آئروژنز* از مهمترین مشکلات در بهداشت عمومی است و افزایش میزان مرگ و میر ناشی از آن، بار مالی و روانی برای بیماران و سیستم مراقبت‌های بهداشتی ایجاد می‌کند (۳۴-۳۰). کلبسیلا پنومونیه و *انتروباکتر آئروژنز* به‌عنوان میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا در عفونت‌های مختلف شناسایی شده‌اند زیرا توانایی فوق‌العاده‌ای در بیان ژن بتا-لاکتاماز وسیع الطیف (ESBL)، کارباپنماز (KPC) و متالو بتا-لاکتاماز نشان می‌دهد، که درمان موفقیت آمیز را مشکل می‌کند (۷-۴).

بنابراین، برای درمان عفونت مقاوم به چند دارو، رویکردهای درمانی کارآمد و مقرون به صرفه با عوارض جانبی کمتر مورد نیاز است. فازهای لیتیک از این نظر که فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی دارند مشابه آنتی‌بیوتیک‌ها هستند. با این حال فازهای درمانی حداقل از نظر تئوری مزایایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. فازها در درمان عفونت‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در انسان‌ها و حیوانات آزمایشگاهی خیلی کارآمدتر و موثرتر از آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شده‌اند. علاوه بر استفاده برای از بین بردن باکتری‌ها، فازها ویژگی میزبانی معینی دارند که می‌توانند برای شناسایی و تایپینگ عفونت‌های باکتریایی، مورد بهره‌برداری قرار گیرند. علاوه بر مفید بودن به‌عنوان تشخیص عمومی، این محصولات می‌توانند زمینه موثر برای فازتراپی که نیاز به تشخیص سریع اهداف باکتریایی و تعیین حساسیت آنها به فازهای اختصاصی را دارند آماده کنند. فازدرمانی یکی از روش‌های قابل توجه، ارزان و خاص است که امروزه توجه روزافزونی را در درمان عفونت‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو به خود جلب کرده است (۳۵ و ۳۶). همچنین سوبه‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو جدید، ممکن است در برابر این فازها مقاوم شوند. باکتری‌ها می‌توانند در مقابل حمله فاز از طریق مکانیسم‌های مختلف، از جمله جهش خود به خودی، سیستم‌های restriction modification و ایمنی تطبیقی از طریق سیستم CRISPR-Cas مقاومت کنند. بنابراین، شناسایی فازهای جدید و ایجاد کوکتل باکتریوفازها می‌تواند برای بهبود فازهای درمانی مفید باشد (۳۷-۳۹). تاکنون، بسیاری از باکتریوفازها به‌عنوان یک عامل ضد باکتری برای کلبسیلا پنومونیه (۴۰ و ۴۱) و *انتروباکتر آئروژنز* (۴۲ و ۴۳) مشخص شدند.

در مطالعه حاضر در ابتدا کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو و *انتروباکتر آئروژنز* مقاوم به چند دارو از نمونه‌های بالینی جدا

شده و به‌عنوان میزبان اصلی در مطالعه حاضر برای غربالگری باکتریوفازهای استخراج‌شده از فاضلاب‌های بیمارستانی استفاده شد. دو فاز (vB\_Kp1، vB\_Kp2) علیه کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو و یک فاز علیه *انتروباکتر آئروژنز* مقاوم به چند دارو (vB\_Ea1) از فاضلاب بیمارستان جدا شدند. از آنجا که پلاک شفاف مشخصه فازهای لیتیک است، هر سه فاز جدا شده، پلاک‌های شفافی را تشکیل می‌دهند که قدرت لیزکنندگی آنها را نشان می‌دهد. میکروسکوپ الکترونی نشان داد که هر سه فاز جدا شده از خانواده مایوویریده از فازهای دم دار هستند (۴۴). اندازه انفجاری vB\_Kp1، vB\_Kp2 و vB\_Ea1 حدود ۵۰۰، ۸۳۳، ۳۳۳ ذره در سلول است و زمان تاخیری به ترتیب حدود ۲۰، ۱۰ و ۱۰ دقیقه است. هر سه باکتریوفاز جدا شده، چندین ویژگی مناسب برای استفاده از فاز را نشان دادند همه آنها پلاک‌های شفافی تشکیل داده‌اند و زمان تاخیری کوتاه و اندازه انفجاری بزرگ دارند، که توسط منحنی رشد یک مرحله‌ای نشان داده شده است. همچنین الگوهای SDS-PAGE پروتئین‌های ساختاری نشان داد که هر سه فاز جدا شده شباهت به الگوهای پروتئینی سایر اعضای خانواده مایوویریده مانند PhaxI (۴۵)، TMAφ (۴۶)، (۲۵) AP22 و LP65 (۴۷) دارد.

در تحقیقاتی Karumidze و همکاران توانستند باکتریوفاز لیتیک Vb-KLP-5 و Vb-KLOX-2 از فاضلاب رودخانه جورجیا جداسازی کنند. برای جداسازی و تکثیر فاز از نمونه کلینیکی باکتری‌های کلبسیلا پنومونیه و کلبسیلا اکسی توکا استفاده شد. هر دو فاز دارای اندازه انفجاری بزرگ بودند، در شرایط نامساعد مختلف پایدار بودند. فازهای گزارش شده در این مطالعه ویروس‌های باکتریایی DNA دار دو رشته‌ای هستند که متعلق به خانواده‌های پودوویریده و سیفوویریده بودند فازها قادر به لیزر حدود ۶۳ درصد از سوبه‌های کلبسیلا بود که شامل مجموعه‌ای از ۱۲۳ ایزوله بالینی از جورجیا و انگلستان بود. خواص این فازها، پتانسیل کاربردی آنها را در کوکتل‌های فازتراپی نشان می‌دهند (۴۰). همچنین در سال ۲۰۱۹ Zhao و همکاران باکتریوفاز لیتیک اختصاصی برای ایزوله‌های *انتروباکتر آئروژنز* با نام vB\_EaeM\_φEap-3 شناسایی شد. بر اساس تجزیه و تحلیل میکروسکوپ الکترونی عبوری، فاز vB\_EaeM\_φEap-3 به‌عنوان یکی از اعضای خانواده مایوویریده طبقه‌بندی شد. تعیین دامنه میزبانی نشان داد که vB\_EaeM\_φEap-3 توانست ۱۸ مورد از ۲۸ سوبه *انتروباکتر آئروژنز* مورد آزمایش را لیز کند، در حالی که منحنی رشد یک مرحله‌ای، یک زمان تاخیری کوتاه و اندازه انفجاری



بررسی مقاومت در pH و دماهای مختلف، بررسی توالی ژنومی و بررسی‌های بیوانفورماتیک است.

### نتیجه‌گیری

با وجود یافته‌های این مطالعه، ممکن است داده‌های ما برای پی بردن به ویژگی میزبان و نوع فاژها برای کاربرد درمانی موفق، کافی نباشد. بنابراین، آزمایش‌های بیشتر و تجزیه و تحلیل مولکولی، تعیین توالی کامل ژنوم، تجزیه و تحلیل پروتئومیکس و مطالعات بالینی برای انتخاب یک نوع فاژ قابل قبول برای فاژدرمانی، ضروری به نظر می‌رسد. در نتیجه، مطالعه ما نشان داد که، دو فاژ لیتیک جداسازی شده علیه کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو و یک فاژ لیتیک علیه/انتروباکتر آئروژنز مقاوم به چند دارو با وجود ویژگی‌های مناسب، کاندیدای خوبی برای استفاده به‌عنوان عوامل درمانی در عفونت مقاوم به چند دارو پس از انجام تجزیه و تحلیل‌های بیشتر هستند.

### سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب قدرانی و تشکر خود را از تمام کسانی که در طول اجرای این پژوهش مرا یاری کردند اعلام می‌نمایم. شایان ذکر است که این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دکتری خانم فاطمه حبیبی نوا از دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم است.

### تعارض در منافع

درانجام مطالعه حاضر، نویسندگان هیچ‌گونه تضاد منافع‌ی نداشته‌اند.

### منابع مالی

منابع مالی این تحقیق توسط، خانم حبیبی نوا تامین شده است.

متوسط را نشان می‌دهد. با توجه به محدوده میزبان، ژنومی و پارامترهای فاژ vB\_EaeM\_φEap-3 کاندیدای مناسبی برای برنامه‌های فاژدرمانی شد (۴۲). در تحقیق حاضر فاژ vB\_Kp1 قادر به لیز حدودا ۳۳.۳٪، vB\_Kp2 حدودا ۴۶/۶٪ از ایزوله‌های کلینیکی کلبسیلا پنومونیه و همچنین vB\_Ea1 حدودا ۶۰٪ انتروباکتر آئروژنز را لیز کنند. که این درصدها نشان‌دهنده قابلیت استفاده از آنها در فاژتراپی است. در برخی از مطالعات دامنه تاثیر گسترده‌تری برای فاژها گزارش شده است به‌عنوان مثال در مطالعه‌ای Komijani در یک دوره دو ساله، سویه کلبسیلا پنومونیه از ۱۹۳ دسته زخم آلوده در سه بیمارستان اصفهان جدا شد که ESB� مثبت بودند. فاژ لیتیک علیه کلبسیلا پنومونیه جداسازی شد و دامنه میزبانی، مورفولوژی، ثبات حرارتی و pH، استرس شور و اندازه ژنوم تخمین زده شد. ویژگی‌های مورفولوژی فاژ آن را در خانواده مایوپویریده قرار داد. از ۴۱ نمونه بالینی، ۳۸ مورد حساس به فاژ بودند (۴۱). از سوی دیگر برخی مطالعات دیگر دامنه میزبانی بسیار محدودی را برای فاژهای جداسازی شده گزارش کردند. در مطالعه‌ای Li و همکارانش (۲۰۱۶) فاژ phiEap-2 علیه/انتروباکتر آئروژنز از فاضلاب جداسازی شد که سویه/انتروباکتر آئروژنز 3-sp را لیز کرد. پس از جداسازی فاژ خصوصیات آن از جمله محدوده میزبانی، پروتئین‌های ساختاری فاژ و ساختار ژنوم و توالی آن، دامنه تحمل pH و مقاومت به دماهای مختلف بررسی شد و نشان داد که این فاژ می‌تواند برای درمان استفاده شود (۴۳).

با توجه به سایر خصوصیات فاژهای vB\_Kp2، vB\_Kp1 و vB\_Ea1 مانند زمان تاخیری کوتاه و اندازه انفجاری بزرگ و همچنین لیتیک بودن آنها می‌تواند کاندیدای خوبی برای تحقیقات فاژدرمانی باشند اما نیاز به مطالعات دیگری همچون

### Referance

1. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013;11(3):297-308. [DOI:10.1586/eri.13.12] [PMID]
2. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacol Therapeut.* 2015;40(4):277.
3. Van Duin D, Paterson DL. Multidrug-resistant bacteria in the community: trends and lessons learned. *Infect Dis Clin.* 2016;30(2):377-90. [DOI:10.1016/j.idc.2016.02.004] [PMID] [PMCID]
4. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram Negative Bacteria. *J Glob Infect Dis.* 2010;2(3):263. [DOI:10.4103/0974-777X.68531] [PMID] [PMCID]
5. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3(1):15-21. [DOI:10.1177/2049936115621709] [PMID] [PMCID]
6. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg*

- Infect Dis. 2011;17(1):103. [DOI:10.3201/eid1701.101358] [PMID] [PMCID]
7. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro Surveill.* 2008;13(47):19044.
  8. Goltsman G, Baumohl Y, Gal G, Buckman Z, Proshkin V, Lubart E. To check or not to check. Rectal ESBL colonization in hospitalized elderly patients. *Am J Infect Control.* 2018;46(11):1236-9. [DOI:10.1016/j.ajic.2018.05.010] [PMID]
  9. Summers WC. Bacteriophage research: early history. *Bacteriophages: Biology and applications.* 2005:5-27. [DOI:10.1201/9780203491751.ch2]
  10. Carlton RM. Phage therapy: past history and future prospects. *Arch Immunol Ther Exp.* 1999; 47:267-74.
  11. Summers WC. The strange history of phage therapy. *Bacteriophage.* 2012;2(2):130-3. [DOI:10.4161/bact.20757] [PMID] [PMCID]
  12. Squires RA. Bacteriophage therapy for management of bacterial infections in veterinary practice: what was once old is new again. *N Z Vet J.* 2018;66(5):229-35. [DOI:10.1080/00480169.2018.1491348] [PMID]
  13. Furfaro LL, Chang BJ, Payne MS. Applications for bacteriophage therapy during pregnancy and the perinatal period. *Front Microbiol.* 2018; 8:2660. [DOI:10.3389/fmicb.2017.02660] [PMID] [PMCID]
  14. LaVergne S, Hamilton T, Biswas B, Kumaraswamy M, Schooley RT, Wooten D. Phage therapy for a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* craniectomy site infection. *Open Forum Infect Dis.* 2018;5(4). US: Oxford University Press. [DOI:10.1093/ofid/ofy064] [PMID] [PMCID]
  15. Clark JR. Bacteriophage therapy: history and future prospects. *Future Virol.* 2015;10(4):449-61. [DOI:10.2217/fvl.15.3]
  16. Kutter E, De Vos D, Gvasalia G, Alavidze Z, Gogokhia L, Kuhl S, Abedon ST. Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections. *Curr Pharm Biotechnol.* 2010;11(1):69-86. [DOI:10.2174/138920110790725401] [PMID]
  17. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage.* 2011;1(2):111-4. [DOI:10.4161/bact.1.2.14590] [PMID] [PMCID]
  18. Ajideh R, Faramarzi MA, Yazdi MH, Pourmand MR. Phage Therapy as a New Approach in Treating Emerging Antibiotic Resistant Infections. *Trends Pept Protein Sci.* 2018;2(1):15-23.
  19. Wayne, P., Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) performance standards for antimicrobial disk diffusion susceptibility tests 19th ed. approved standard. CLSI document M100-S19, 2009. 29(2011); p. M100-S21.
  20. Hudzicki J. Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. 2009.
  21. Bourdin G, Schmitt B, Guy LM, Germond JE, Zuber S, Michot L, Reuteler G, Brüssow H. Amplification and purification of T4-like *Escherichia coli* phages for phage therapy: from laboratory to pilot scale. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(4):1469-76. [DOI:10.1128/AEM.03357-13] [PMID] [PMCID]
  22. Yele AB, Thawal ND, Sahu PK, Chopade BA. Novel lytic bacteriophage AB7-IBB1 of *Acinetobacter baumannii*: isolation, characterization and its effect on biofilm. *Arch Virol.* 2012;157(8):1441-50. [DOI:10.1007/s00705-012-1320-0] [PMID]
  23. Santos SB, Carvalho CM, Sillankorva S, Nicolau A, Ferreira EC, Azeredo J. The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique. *BMC Microbiol.* 2009;9(1):148. [DOI:10.1186/1471-2180-9-148] [PMID] [PMCID]
  24. Carlson K, Miller E. Single-step growth. *Molecular biology of bacteriophage.* 1994. 4:434-7.
  25. Popova AV, Zhilenkov EL, Myakinina VP, Krasilnikova VM, Volozhantsev NV. Isolation and characterization of wide host range lytic bacteriophage AP22 infecting *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett.* 2012;332(1):40-6. [DOI:10.1111/j.1574-6968.2012.02573.x] [PMID]
  26. Birge EA. T4 bacteriophage as a model genetic system. In *Bacterial and Bacteriophage Genetics* 2000:171-214. [DOI:10.1007/978-1-4757-3258-0\_6]
  27. Brenner S, Horne RW. A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta.* 1959; 34:103-10. [DOI:10.1016/0006-3002(59)90237-9]
  28. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature.* 1970;227(5259):680-5. [DOI:10.1038/227680a0] [PMID]
  29. Sen A, Ghosh AN. Physicochemical characterization of vibriophage N5. *Virol J.* 2005;2(1):1-4. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-1> <https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-27> [DOI:10.1186/1743-422X-2-28] [PMID] [PMCID]
  30. Grazziotin AL, Vidal NM, Palmeiro JK, Dalla-Costa LM, Venancio TM. Genome sequencing of four multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* isolates from hospitalized patients in Brazil. *Front Microbiol.* 2016; 7:1649. [DOI:10.3389/fmicb.2016.01649] [PMID] [PMCID]

31. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(3):629-61. [[DOI:10.1128/MMBR.00078-15](https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
32. Vasilev K, Reshedko G, Orasan R, Sanchez M, Teras J, Babinchak T, Dukart G, Cooper A, Dartois N, Gandjini H, Orrico R. A Phase 3, open-label, non-comparative study of tigecycline in the treatment of patients with selected serious infections due to resistant Gram-negative organisms including *Enterobacter* species, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(suppl\_1): i29-40. [[DOI:10.1093/jac/dkn249](https://doi.org/10.1093/jac/dkn249)] [[PMID](#)]
33. Cosgrove SE, Kaye KS, Eliopoulos GM, Carmeli Y. Health and economic outcomes of the emergence of third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacter* species. *Arch Intern Med.* 2002;162(2):185-90. [[DOI:10.1001/archinte.162.2.185](https://doi.org/10.1001/archinte.162.2.185)] [[PMID](#)]
34. Podschun R. Phenotypic properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. *Int J Hyg Envir Heal.* 1990;189(6):527-35.
35. Kropinski AM. Bacteriophage research-What we have learnt and what still needs to be addressed. *Res Microbiol.* 2018;169(9):481-7. [[DOI:10.1016/j.resmic.2018.05.002](https://doi.org/10.1016/j.resmic.2018.05.002)] [[PMID](#)]
36. Krut O, Bekeredjian-Ding I. Contribution of the immune response to phage therapy. *J Immunol.* 2018;200(9):3037-44. [[DOI:10.4049/jimmunol.1701745](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701745)] [[PMID](#)]
37. Kutateladze Á, Adamia R. Phage therapy experience at the Eliava Institute. *Med Mal Infect.* 2008;38(8):426-30. [[DOI:10.1016/j.medmal.2008.06.023](https://doi.org/10.1016/j.medmal.2008.06.023)] [[PMID](#)]
38. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastroentero.* 2017;8(3):162. [[DOI:10.4292/wjgpt.v8.i3.162](https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
39. Schmelcher M, Shen Y, Nelson DC, Eugster MR, Eichenseher F, Hanke DC, Loessner MJ, Dong S, Pritchard DG, Lee JC, Becker SC. Evolutionarily distinct bacteriophage endolysins featuring conserved peptidoglycan cleavage sites protect mice from MRSA infection. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(5):1453-65. [[DOI:10.1093/jac/dku552](https://doi.org/10.1093/jac/dku552)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
40. Karumidze N, Kusradze I, Rigvava S, Goderdzishvili M, Rajakumar K, Alavidze Z. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *Curr Microbiol.* 2013;66(3):251-8. [[DOI:10.1007/s00284-012-0264-7](https://doi.org/10.1007/s00284-012-0264-7)] [[PMID](#)]
41. Komijani M, Bouzari M, Rahimi F. Detection and characterization of a novel lytic bacteriophage (vB-KpneM-Isf48) against *Klebsiella pneumoniae* isolates from infected wounds carrying antibiotic-resistance genes (TEM, SHV, and CTX-M). *Iran Red Crescent Med J.* 2017. 19(2). [[DOI:10.5812/ircmj.34475](https://doi.org/10.5812/ircmj.34475)]
42. Zhao J, Zhang Z, Tian C, Chen X, Hu L, Wei X, Li H, Lin W, Jiang A, Feng R, Yuan J. Characterizing the Biology of Lytic Bacteriophage vB\_EaeM\_φEap-3 Infecting Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes*. *Front Microbiol.* 2019; 10:420. [[DOI:10.3389/fmicb.2019.00420](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00420)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
43. Li E, Wei X, Ma Y, Yin Z, Li H, Lin W, Wang X, Li C, Shen Z, Zhao R, Yang H. Isolation and characterization of a bacteriophage phiEap-2 infecting multidrug resistant *Enterobacter aerogenes*. *Sci Rep.* 2017;7(6). [[DOI:10.1038/srep46805](https://doi.org/10.1038/srep46805)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
44. Ackermann HW. Phage classification and characterization in *Bacteriophages 2009*. Springer. 2009:127-140. [[DOI:10.1007/978-1-60327-164-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_13)] [[PMID](#)]
45. Shahrabak SS, Khodabandehlou Z, Shahverdi AR, Skurnik M, Ackermann HW, Varjosalo M, Yazdi MT, Sephrizadeh Z. Isolation, characterization and complete genome sequence of PhaxI: a phage of *Escherichia coli* O157: H7. *Microbiology.* 2013;159(8):1629-38. [[DOI:10.1099/mic.0.063776-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.063776-0)] [[PMID](#)]
46. Tamakoshi, M., et al., Genomic and proteomic characterization of the large Myoviridae bacteriophage φTMA of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Bacteriophage.* 2011;1(3):152-164. [[DOI:10.4161/bact.1.3.16712](https://doi.org/10.4161/bact.1.3.16712)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]
47. Chibani-Chennoufi S, Dillmann ML, Marvin-Guy L, Rami-Shojaei S, Brüßow H. *Lactobacillus plantarum* bacteriophage LP65: a new member of the SPO1-like genus of the family Myoviridae. *J Bacteriol.* 2004;186(21):7069-83. [[DOI:10.1128/JB.186.21.7069-7083.2004](https://doi.org/10.1128/JB.186.21.7069-7083.2004)] [[PMID](#)] [[PMCID](#)]