

Isolation of Bacteriophage Effective against *Shigella sonnei* in Hospital and Municipal Wastewaters

Serveh Molai¹, Mazaher Khodabandehloo^{2,3,4} and Himen Salimizand⁵

1.MSc student of Medical Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Student of Research Committee, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. ORCID ID: 0000-0003-3219-7189

2.Associate professor of Medical Virology, Zoonoses Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. Tel: +98-78-33664645 -8266, Email: mazaher-kh@muk.ac.ir, ORCID ID: 0000-0002-8800-0501

3.Associate professor of Medical Virology, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. Tel: +98-78-33664645 -8266, Email: mazaher-kh@muk.ac.ir, ORCID ID: 0000-0002-8800-0501

4. Associate professor of Medical Virology, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. Tel: +98-78-33664645 -8266, Email: mazaher-kh@muk.ac.ir, ORCID ID: 0000-0002-8800-0501

5.Assistant professor of Medical Bacteriology, Liver & Digestive Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, ORCID ID: 0000- 0002-2013-8694

ABSTRACT

Background and Aim: Infections of antibiotic-resistant bacteria make their treatment difficult and sometimes impossible. So, scientists are looking for new solutions to fight these bacteria. Phage therapy can replace antibiotic therapy, especially in multidrug-resistant bacteria. Therefore, we aimed to isolate bacteriophage that is effective against common gram-negative bacteria.

Materials and Methods: In this experimental study, 250 ml of hospital and municipal wastewater samples were gathered. The samples were centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes, the supernatants were filtered through a 0.22 µm filter. To phage enrichment, 50 ml of filtered water twice the volume of nutrient broth and host bacteria were incubated at 37 C for 24 hours in a shaker incubator. The double-layer agar method was used to see bacteriophage plaque. Transmission electron microscopy was used to investigate the characteristics of the isolated bacteriophage.

Results: Lytic bacteriophage effective to *Shigella sonnei* was found by testing on municipal wastewater. Electron microscopy showed that the bacteriophage belonged to the family *Microviridae*. However, bacteriophage against other Gram-negative bacteria was not found in the test on hospital wastewater samples.

Conclusion: The found bacteriophage had a specific lytic effect against *Shigella sonnei*, this bacteriophage could be used for the study of phage therapy for *Shigella* infection with antibiotic resistance.

Keywords: Bacteriophage, Antibacterial Effect, Multidrug Resistant Bacteria, *Shigella*, Phage Therapy

Received: May 10, 2021

Accepted: Oct 31, 2021

How to cite the article: Serveh Molai, Mazaher Khodabandehloo, Himen Salimizand. Isolation of a bacteriophage Effective against *Shigella sonnei* in Hospital and Municipal Wastewaters. *SJKU* 2023;27(1):126-134.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

جداسازی باکتریوفاژ موثر بر شیگلا سونئی در فاضلاب‌های بیمارستانی و شهری

سروه ملائی^۱، مظاهر خدابنده‌لو^۲ و هیمن سلیمی‌زند^۵

۱. کارشناسی ارشد میکروبیولوژی پزشکی، گروه آموزشی میکروبیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. کد ارکید: ۷۱۸۹-۳۲۱۹-۰۰۰۰-۰۰۰۳
۲. دانشیار ویروس‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات زئونوز، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. پست الکترونیک: mazaher-kh@muk.ac.ir. تلفن: ۰۷۸-۳۳۶۶۶۴۵-۸۲۶۶. کد ارکید: ۰۷۸-۳۳۶۶۶۴۵-۸۲۶۶-۰۰۰۰-۰۰۰۲-۸۸۰۰-۰۵۰۱
۳. دانشیار ویروس‌شناسی پزشکی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. پست الکترونیک: mazaher-kh@muk.ac.ir. تلفن: ۰۷۸-۳۳۶۶۶۴۵-۸۲۶۶. کد ارکید: ۰۷۸-۳۳۶۶۶۴۵-۸۲۶۶-۰۰۰۰-۰۰۰۲-۸۸۰۰-۰۵۰۱
۴. دانشیار ویروس‌شناسی پزشکی، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. پست الکترونیک: mazaher-kh@muk.ac.ir. تلفن: ۰۷۸-۳۳۶۶۶۴۵-۸۲۶۶. کد ارکید: ۰۷۸-۳۳۶۶۶۴۵-۸۲۶۶-۰۰۰۰-۰۰۰۲-۸۸۰۰-۰۵۰۱
۵. استادیار باکتری‌شناسی پزشکی، گروه آموزشی میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. hsalimizand@gmail.com. کد ارکید: ۰۷۸-۳۳۶۶۶۴۵-۸۲۶۶-۰۰۰۰-۰۰۰۲-۲۰۱۳-۸۶۹۴

چکیده

زمینه و هدف: عفونت‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، درمان آن‌ها را دشوار و گاهی غیرممکن می‌سازد. دانشمندان به دنبال یافتن روش‌های تازه برای مبارزه با این باکتری‌ها هستند. فاژ درمانی می‌تواند جایگزین آنتی‌بیوتیک به ویژه در درمان باکتری‌های مقاوم به چند دارو باشد. بنابراین هدف ما جداسازی و شناسایی باکتریوفاژ موثر بر باکتری‌های گرم منفی شایع بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی ۲۵۰ میلی لیتر از فاضلاب بیمارستانی و فاضلاب شهری نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌های فاضلاب با دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی آن‌ها با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتره شدند. سپس برای تقویت باکتریوفاژ ۵۰ میلی لیتر آب فیلتر شده را با حجم دو برابر نوترینت برات و باکتری میزبان در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار گذاشته شد. برای دیدن پلاک باکتریوفاژ از آگار دو لایه استفاده شد. برای بررسی ویژگی باکتریوفاژ جدا شده از میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد.

یافته‌ها: با انجام آزمایش روی فاضلاب شهری باکتریوفاژ لیتیک علیه باکتری شیگلا سونئی پیدا شد. میکروسکوپ الکترونی نشان داد که این باکتریوفاژ از خانواده میکروویریده است. ولی در آزمایش روی نمونه‌های فاضلاب بیمارستانی باکتریوفاژ علیه باکتری‌های گرم منفی دیگر پیدا نشد.

نتیجه‌گیری: باکتریوفاژ یافت شده اثر لیتیک اختصاصی علیه شیگلا سونئی دارد، این باکتریوفاژ می‌تواند در مطالعه فاژ درمانی علیه عفونت باکتری شیگلا مقاوم به آنتی‌بیوتیک به کار آید.

واژه‌های کلیدی: باکتریوفاژ، اثر ضد باکتریایی، باکتری‌های مقاوم به چند دارو، شیگلا، فاژ درمانی

وصول مقاله: ۱۴۰۰/۲/۲۰ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۰/۷/۲۵ پذیرش: ۱۴۰۰/۸/۹

مقدمه

شیگلا (*Shigella*) یکی از مهمترین علل عفونت های حاد دستگاه گوارش انسان است. شیگلایا بیشتر به عنوان عوامل بیماریزای ناشی از آب و غذا شناخته می شوند. شیگلایا با دوز کم با وسایل آلوده از فردی به فرد دیگر منتقل می شوند. این امر به عنوان علت اصلی موارد شیگلوز در کودکان زیر ۵ سال در کشورهای جهان سوم گزارش شده است. با این حال، بسیاری از موارد گزارش شده سالانه شیگلوز در مسافران و کارکنان نظامی در کشورهای صنعتی نیز دیده می شود (۱، ۲).

برآورد جهانی این است که سالانه دست کم ۸۰ میلیون بیماری اسهال خونی و ۷۰۰۰۰۰ مرگ و میر رخ می دهد. به دلیل دو فاکتور خطر، انتقال مدفوع دهانی (تماس مستقیم با بیماران یا مصرف غذاهای آلوده و آب) و دوز عفونی کم (کمتر از ۲۰۰ باکتری)، چندین شیوع در سراسر جهان گزارش شده است (۳).

گونه های شیگلا (*Shigella spp.*) باکتری های گرم منفی، غیرمتحرک و میله ای شکل هستند و از چهار گونه *S. sonnei*، *S. flexneri*، *S. boydii* و *S. dysenteriae* تشکیل شده اند. شیگلا فلکسنری در مقایسه با سایر گونه های شیگلا، عفونی ترین اسهال خونی باسیلی را ایجاد می کند، تقریباً دو میلیون عفونت در سراسر جهان در سال را تشکیل می دهد، زیرا در بسیاری از کشورهای در حال توسعه بومی است. از طرف دیگر، شیگلا سونئی به عنوان عامل اصلی شیگلوز در کشورهای توسعه یافته و یک نگرانی نوظهور در کشورهای در حال توسعه گزارش شده است. در چند سال گذشته، گونه های شیگلا به طور فزاینده ای در برابر داروهای ضد میکروبی شایع مقاوم شده اند. بنابراین، برای کاهش بروز اسهال خونی و میزان مرگ و میر ناشی از آن، یافتن روش های کنترل جدید و موثر ضروری است (۱، ۲). استفاده گسترده از آنتی بیوتیک در

پزشکی و صنعت دام به شیوع جهانی باکتری های مقاوم در برابر چند دارو (MDR) کمک کرده است (۴). در سال ۲۰۱۳، مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری ها (CDC) اعلام کرد که انسان در دوران پس آنتی بیوتیک ایستاده است. در سال ۲۰۱۷، سازمان بهداشت جهانی (WHO) لیستی از عوامل بیماریزا که نیاز فوری به آنتی بیوتیک جدید یا به رویکردهای کنترل درمان جایگزین دارند اعلام کرد (۳).

باکتری های آنتریباکتریاسه تولید کننده بتا لاکتاماز با طیف گسترده (ESBL) مسئول دست کم ۲۶۰۰۰ عفونت های وابسته به مراقبت های بهداشتی و ۱۷۰۰ مرگ در سال، در گروه بحران قرار گرفته اند. در مورد گونه های شیگلا، میزان مقاومت آن ها در برابر داروهای ضد میکروبی موجود طی ۲۰ سال گذشته (۲۰۰۹ تا ۲۰۱۹) به طور چشمگیری افزایش یافته است. سیستم پایش مقاومت ضد میکروبی ملی (NARMS) در مرکز پیشگیری و کنترل بیماری ها ۲۵ نوامبر ۲۰۱۹ گزارش داد که در ایالات متحده، در سال ۱۹۹۹، از شیگلایا جدا شده دارای فنوتیپ مقاومت، به ترتیب ۱٪ به سفتریاکسون، ۳٪ به سیپروفلوکساسین، ۱/۶٪ به نالیدیکسیک اسید، ۴/۵۶٪ به استرپتومايسين و ۵۷٪ به تتراسایکلین مقاوم بودند. در سال های اخیر این میزان مقاومت به ۱/۸٪ (سفتریاکسون)، ۲۳/۱٪ (سیپروفلوکساسین)، ۳/۹۸٪ (نالیدیکسیک اسید)، ۵۷٪ (استرپتومايسين) و ۸۷٪ (تتراسایکلین) افزایش یافته است (۳).

علاوه بر این، عفونت های مقاوم به آنتی بیوتیک فشار اقتصادی و مسئله مهم بهداشتی است که دوره بستری شدن در بیمارستان را افزایش و احتمال موفقیت درمان را کاهش می دهد. بنابراین، کشف روش های درمانی جایگزین برای کاهش مصرف آنتی بیوتیک ها و کاهش میزان ظهور جدایه های مقاوم ضروری است تا طول درمان کاهش یابد و میزان موفقیت درمان افزایش یابد. یک گزینه امیدوار کننده

سوختگی و دیابت بیمارستان‌های آموزشی شهر سنندج جمع‌آوری و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز شده بودند.

جداسازی باکتریوفاژ: نمونه‌های فاضلاب با دور ۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی را با فیلتر غشایی دارای منافذ ۰/۲۲ میکرومتر (MCE Gridded Membrane Filter) با پمپ خلاء فیلتر شد. آب فیلتر شده را در لوله فالكون‌های استریل در یخچال نگهداری و هر هفته روی یک نمونه کار انجام شد. برای تقویت فاژ (Phage Enrichment) ۵۰ میلی‌لیتر از آب فیلتر شده را با حجم دو برابر از محیط کشت نوترینت برات دارای ۵ میلی‌مولار $MgSO_4$ در ارلن‌مایر استریل مخلوط شد. سپس ۱ میلی‌لیتر باکتری با غلظت نیم مکفارلند (0.5) McFarland افزوده شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلیسوس شیکردار با دور ۱۶۰ انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به مخلوط یادشده افزوده و در انکوباتور شیکردار به مدت ۱۰ دقیقه برای از بین بردن باکتری‌ها گذاشته شد. سپس مخلوط در دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی آن با فیلتر دارای منافذ ۰/۴۵ میکرومتر فیلتراسیون انجام شد (۸).

تکنیک آگار دولایه: ویژگی باکتریوفاژ جدا شده روی باکتری گرم منفی استاندارد با روش آگار دولایه (double-layer agar) تعیین شد. نخست از فاضلاب فیلتر شده رقت سریال درست کردیم. در ده لوله آزمایش ۹۰۰ میکرولیتر نوترینت برات ریخته و ۱۰۰ میکرولیتر نمونه فیلتر شده به لوله اول افزوده شد. سپس از لوله اول ۱۰۰ میکرولیتر به لوله دوم، از لوله دوم ۱۰۰ میکرولیتر به لوله سوم اضافه و تا آخرین لوله این کار انجام شد و در پایان از لوله شماره ۱۰، ۱۰۰ میکرولیتر دور ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر باکتری با غلظت استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند در مرحله رشد نمایی و ۳۰ میکرولیتر $CaCl_2$ ۱ میلی‌مولار در لیت (برای کمک به چسبیدن باکتریوفاژ به باکتری) به هر کدام از لوله‌ها اضافه شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر نوترینت آگار (۰/۷ درصد آگار، در بن ماری) به هر لوله افزوده شد.

برای چنین وظیفه حیاتی، باکتریوفاژها (فاژ درمانی) هستند (۳). باکتریوفاژها ویروس‌های باکتریایی هستند که تمایل طبیعی به باکتری میزبان ویژه خود دارند، با وجود مقاومت یا حساسیت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها. ویژگی میانکنش باکتریوفاژ-باکتری باعث می‌شود که باکتریوفاژها بدون هیچگونه نگرانی از عوارض جانبی بر باکتری‌های دیگر، به ویژه میکروبیوتای طبیعی میزبان، ایمن و مناسب باشند (۲، ۳، ۵).

فاژ درمانی به کارگیری باکتریوفاژهای طبیعی است تا باکتری‌ها را در محل عفونت آلوده کرده و آن‌ها را لیز کند. پیشرفت‌های بیوتکنولوژی بکارگیری باکتریوفاژهای بالقوه را گسترش داده است. کاربرد باکتریوفاژهای مهندسی شده و پروتئین‌های لیتیک ویژه باکتریوفاژ استراتژی‌های تازه هستند. پژوهش‌های امروزی در مورد استفاده از باکتریوفاژها و پروتئین‌های لیتیک آن‌ها، به ویژه در برابر عفونت‌های باکتریایی مقاوم به چند دارو، نشان می‌دهد که فاژ درمانی می‌تواند جایگزین یا مکمل درمان آنتی‌بیوتیک باشد (۶). فاضلاب و زباله‌های بیمارستانی منابع آماده باکتریوفاژها هستند. علاوه بر این، هزینه‌های تصفیه و تولید باکتریوفاژ بسیار ارزان تر از آنتی‌بیوتیک‌ها است (۷).

با توجه به افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی و وجود باکتریوفاژها در بیوسفر و تاثیر لیتیک آن‌ها بر باکتری‌ها، هدف ما جداسازی و شناسایی باکتریوفاژ لیتیک ویژه شیگلا و دیگر باکتری‌های گرم منفی در فاضلاب بیمارستانی و شهری بود.

مواد و روش‌ها

نمونه آب: ۲۵۰ میلی‌لیتر فاضلاب از چهار بیمارستان آموزشی شهر سنندج (بعثت، کوثر، قدس و توحید) همچنین فاضلاب شهری جمع‌آوری کردیم.

نمونه‌های باکتریایی: باکتری شیگلا سونئی استاندارد (ATTC: 25931) و باکتری‌های (سالمونلا تیفی موربوم، اسینتوباکتر بومانی، سودوموناس اثرورنوزا، اشرشیا کلی، شیگلا فلکسنری و شیگلا سونئی) که از بخش‌های ICU،

میکروسکوپ الکترونی: ۱ میلی لیتر از باکتریوفاز خالص شده با ۳۰ میکرو لیتر پلی اتیلن گلیکول (۳ درصد) به مدت ۳۰ ثانیه رسوب داده شد. سپس نمونه با یک قطره یورانیل استات ۲٪ با pH 4.3 به مدت ۳۰ ثانیه رنگ آمیزی منفی شد. سپس با میکروسکوپ الکترونی عبوری (EM208S, PHILIPS, 100KV, NETHPLAND) بررسی و عکس برداری شد (آزمایشگاه نانو ساختار آریا رستاک، تهران).

یافته‌ها

در آزمایش جستجوی باکتریوفاز روی نمونه‌های فاضلاب شهری پلاک باکتریوفاز لیتیک مربوط به باکتری شیگلا سوئی دیده شد. باکتریوفاز جدا شده با روش آزمایش پلاک خالص شد. پلاک‌های دیده شده در پلیت (رقت^۵ ۱۰) شمارش و شمارش باکتریوفاز جدا شده محاسبه شد (PFU/mL^۲ ۲۹×۱۰^۵) (تصویر شماره ۱). ولی انجام آزمایش‌ها روی فاضلاب بیمارستانی نتیجه‌ای مثبت در پی نداشت.

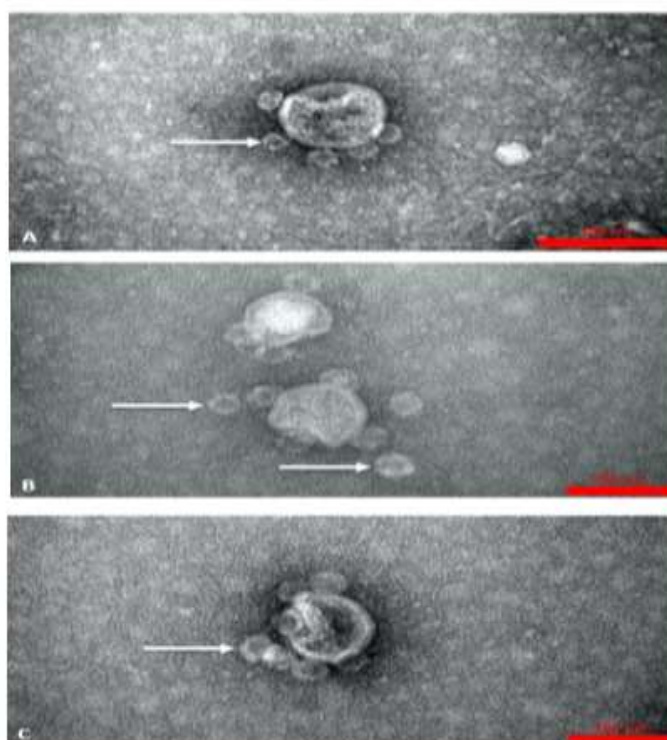
پس از مخلوط کردن به پتری دیش‌های دارای محیط کشت جامد نوترینت آگار (۱/۵ درصد در پتری دیش‌های ۱۵ سانتی متری) منتقل و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از پیدایش پلاک تک‌تکی (Single plaque) با کمک سواب استریل از پلاک برداشت شد. آزمایش پلاک و شمارش فاز: شمارش باکتریوفاز به روش آزمایش پلاک (plaque assay) و با فرمول شماره (۱) انجام شد (۸). فاز خالص شده به ۵۰ میلی لیتر (10⁶ CFU/mL) کشت باکتریایی نوترینت برات افزوده شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه شیکردار با دور ۱۶۰ مخلوط شد. سپس مخلوط در دور ۶۰۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر با کمک پمپ خلاء فیلتر شد. آزمایش پلاک به منظور تولید فاز خالص سه بار تکرار شد. فرمول ۱: تعداد باکتریوفاز (PFU/mL): رقتی که در آن باکتریوفاز جدا شده است × ۱۰ × تعداد پلاک



تصویر ۱: پلاک‌های باکتریوفاز ویژه شیگلا سوئی. پلاک‌های در پلیت شماره ۵ (با رقت^۵ ۱۰) باکتریوفاز ویژه باکتری شیگلا سوئی

است. این ویژگی‌ها نشان می‌دهد که این باکتریوفاز از خانواده میکروویریده (*Microviridae*) است (تصویر ۲).

از باکتریوفاز خالص شده با میکروسکوپ الکترونی عبوری تصویربرداری شد. با توجه به تصاویر به دست آمده این باکتریوفاز که دارای شکل متقارن، بدون انولوپ و بدون دم



تصویر ۲: Error! No text of specified style in document. در تصاویری که با میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) به دست آمد تنها یک نوع باکتریوفاژ دیده می‌شود. در تصاویر A، B، و C باکتریوفاژها دارای شکل متقارن، بدون انولوپ و دم دیده می‌شوند که نشان دهنده باکتریوفاژ از خانواده میکروویریده (*Microviridae*) است. در تصویرها باکتریوفاژها در کنار لاشه باکتری دیده می‌شوند.

بحث

در این مطالعه با انجام آزمایش روی فاضلاب شهری باکتریوفاژ لیتیک مربوط به شیگلا سونئی پیدا شد. میکروسکوپ الکترونی نشان داد که این باکتریوفاژ از خانواده میکروویریده (*Microviridae*) است. آزمایش جستجوی باکتریوفاژ روی نمونه‌های فاضلاب بیمارستانی نتیجه‌ای مثبت نداشت. شاید به دلیل متفاوت بودن باکتری‌های میزبان در فاضلاب و باکتری آزمایشگاهی بکار رفته در این پژوهش باشد.

در خانواده میکروویریده باکتریوفاژها متقارن، بدون انولوپ و دارای DNA تک رشته‌ای حلقوی، با قطر ۲۵ تا ۲۷ نانومتر هستند. ویریون ۶۰ نسخه از پروتئین‌های F، G، J و ۱۲ نسخه از پروتئین H دارد. دارای ۱۲ پنتامر شیپوری (طول ۷/۱ نانومتر و عرض ۳/۸ نانومتر) است که هر کدام از آنها

از ۵ پروتئین G و یک پروتئین H تشکیل شده‌اند. امروزه ۲۱ گونه در این خانواده وجود دارند که در دو زیرخانواده و شش جنس قرار گرفته‌اند. اگرچه بیشتر گونه‌های این خانواده چرخه زندگی لیتیک دارند، ولی شمار اندکی از آنها چرخه زندگی معتدل (temperate) دارند (۹-۱۱). عفونت‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، درمان آنها رادشوار و گاهی غیرممکن می‌سازد. عفونت‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باعث اقامت طولانی در بیمارستان، مراجعه زیاد به پزشک و درمان پرهزینه و عوارض سمی برای بیمار دارد. مقاومت آنتی‌بیوتیکی یکی از مشکلات بهداشت عمومی در جهان است. یکی از راه‌هایی که پژوهشگران برای مبارزه با باکتری‌های مقاوم به دارو پیشنهاد داده‌اند فاژدرمانی است (۱۰). استفاده از باکتریوفاژها به عنوان آنتی‌باکتریال‌های هدف دار، می‌تواند

طول عمر آنتی بیوتیک های فعلی را افزایش دهد و به طور بالقوه بروز عفونت های مقاوم به آنتی بیوتیک را کاهش دهد (۱۲).

در یک مطالعه، باکتریوفاژ مایوویریده (*Myoviridae*)، با نام pSs-1 از آب محیطی در کره جنوبی جدا شد که برای شیکلا فلکسنری و سویه های شیکلا سونئی موثر بود. آنالیز رشد یک مرحله ای نشان داد که pSs-1 دوره نهفتگی کوتاه (۲۵ دقیقه) و اندازه انفجار (Burst size) بزرگی (97 PFU/cell) دارد. آنالیز ژنومی نشان داد که pSs-1 ۱۶۴۹۹۹ جفت باز و $G+C$ ۳۵/۵۴٪ دارد و عضوی از باکتریوفازهای T4 بود (۲).

شاهین و همکاران در سال ۲۰۱۸ برای جداسازی باکتریوفازهای ویژه گونه های شیکلا از نمونه های تصفیه خانه فاضلاب استفاده کردند. ویژگی های رشدی باکتریوفازها و آنالیز ژنومی آنها انجام شد. باکتریوفاز سفیوویریده (*Siphoviridae*)، با نام vB_SsoS-IF002، از فاضلاب شهری در ایران جدا شد و عفونت زایی به شیکلا سونئی و شیکلا فلکسنری نشان داد. vB_SsoS-IF002 در pH های مختلف و دمای بالا پایدار بود. دوره نهفته کوتاه (۱۵ دقیقه)، اندازه انفجار بزرگ (9 ± 76 PFU/cell) و فعالیت لیتیک با MOI (Multiplicity of Infection) بالایی داشت. ژنوم آن (dsDNA) ۵۰۵۶۴ جفت باز با GC ۴۵/۵۳٪ با توجه به آنالیز ژنوم و درخت فیلوژنتیک، فاژ جدا شده عضوی از جنس T1 در نظر گرفته شد (۱).

قجاوند و همکاران در سال ۲۰۱۷ با هدف جداسازی باکتریوفازهای ضد آسیتوباکتر بومانی مقاوم به چند دارو (MDR) در اصفهان مطالعه ای انجام دادند. آنها نمونه های فاضلاب بیمارستانی، رودخانه کارون، دریای خزر، خلیج فارس و آب پرورش ماهی را سانتریفیوژ کردند. سپس مایع رویی آن را با استفاده از فیلتر غشایی ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر کردند و شناسایی فاژ با روش آگار دو لایه انجام شد. دو فاژ لیتیک برای آسیتوباکتر بومانی از فاضلاب بیمارستانی جدا و نامگذاری شد. میکروسکوپ الکترونی

نشان داد که فاژ IsfAB78 به خانواده مایوویریده و فاژ IsfAB39 به خانواده پودوویریده (*Podoviridae*) مربوط بودند. فاژها طیف میزبانی محدود داشتند (۱۳).

در سال ۲۰۱۷ با هدف جداسازی باکتریوفاز از فاضلاب در نپال که توانایی آلوده کردن چند میکروارگانیسم خانواده آنتروباکتریاسه را داشته باشد مطالعه ای انجام شد. باکتری های پاتوژن اشرشیا کلی، سالمونلا تیفی، انتروکوک فکالیس، استافیلوکوک اورئوس، سیتروباکتر، انتروباکتر ائروژنز، پروتئوس میرابلیس و سودوموناس ائروژینوزا بودند. باکتریوفازهای جدا شده تنها توانایی آلوده کردن اشرشیا کلی، انتروکوک فکالیس و سالمونلا تیفی موریوم را داشتند. ولی نتوانستند استافیلوکوک اورئوس، سیتروباکتر، انتروباکتر ائروژنز، پروتئوس میرابلیس و سودوموناس ائروژینوزا را آلوده کنند (۱۴).

در سال ۲۰۱۷ پژوهشی با هدف جداسازی باکتریوفاز برای باکتری های MDR جدا شده از زخم های سپتیک در هند انجام شد. نمونه های باکتریایی را از ۴۹ زخم دیابتی، ۶۹ زخم بعد از عمل و ۱۲ زخم سوختگی جمع آوری کردند. تست حساسیت آنتی بیوتیکی برای باکتری ها با ۱۱ آنتی بیوتیک انجام دادند. باکتریوفازهای لیتیک از نمونه های فاضلاب شهری با روش آگار دولایه به دست آوردند. روی اشرشیا کلی، کلبسیلا پنمونیه و سودوموناس ائروژینوزا پلاک های باکتریوفاز تشکیل شد ولی اشکال میکروسکوپی آنها متفاوت بود (۷).

بهشتی و همکاران در سال ۲۰۱۵ با هدف جداسازی و شناسایی دو باکتریوفاز در تصفیه فاضلاب برای اشرشیا کلی و کاربرد آن در فاژ درمانی پژوهشی انجام دادند. یک گونه اشرشیا کلی بومی اصفهان (*E. coli* SBSWF27) از تصفیه خانه فاضلاب شهری شناسایی شد. همچنین دو باکتریوفاز از زاینده رود با روش آگار دو لایه جداسازی کردند. فاژها از خانواده های میوویریده و پودوویریده بودند و اثر لیتیک بر روی گونه های *E. coli* PTCC1399 و *E. coli* SBSWF27 و همچنین کلیفرم های فاضلابی داشتند (۱۵).

در پژوهش‌های یادشده نتیجه‌گیری شده است که فاژها را می‌توان برای فازدرمانی بکار گرفت. ما جستجوی باکتریوفاز را همانند مطالعات گذشته روی نمونه‌های فاضلاب بیمارستانی و شهری انجام دادیم. ولی ما ویژگی‌های مانند دامنه میزبان، پایداری به دما و pH، سرعت رشد، آنالیز ژنومی و اثر درمانی باکتریوفاز جدا شده را بررسی نکردیم. پیشنهاد می‌شود جداسازی باکتریوفازها با هدف درمان جایگزین برای درمان عفونت با باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک ادامه یابد. همچنین ویژگی‌های رشد، آنالیز ژنومی و اثر درمانی باکتریوفازهای جدا شده بررسی شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه ما توانستیم باکتریوفازی پیدا کنیم که از خانواده میکروویریده بود. این باکتریوفاز قادر به لیز اختصاصی شیگلا سوئی بود. بنابراین این باکتریوفاز می‌تواند برای مطالعه فاز درمانی عفونت باکتری شیگلا دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کردستان بخاطر بودجه پژوهشی و همچنین از آزمایشگاه تحقیقاتی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت بخاطر استفاده از سیستم فیلتراسیون تشکر و قدردانی می‌کنند. این مقاله حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی سرویه ملایی بوده که در کمیته اخلاق دانشگاه به شماره پرونده: IR.MUK.REC.1397/260 به تصویب رسیده است. بودجه پژوهشی از دانشگاه علوم پزشکی کردستان دریافت شده است. نویسندگان مقاله در باره مواد و روش‌های به کار رفته در این پژوهش تعارض منافع ندارند.

شاهین و همکاران در سال ۲۰۲۰ با هدف بررسی اثر دو باکتریوفاز vB_SsoS-ISF001 و vB_SflS-ISF002 روی دو گونه شیگلا سوئی و شیگلا فلکسنری تولید کننده بتالاکتاماز با طیف گسترده (ESBL) و دارای مقاومت چند دارویی پژوهشی انجام دادند. نمونه‌های باکتریایی را از چندین مرکز بیمارستانی و آزمایشگاهی از استان‌های مختلف (اصفهان، فارس، هرمزگان، کهگیلویه و بویراحمد) جمع آوری کردند. آن‌ها از باکتریوفاز آماده استفاده کردند و تیر باکتریوفاز را با روش آگار دو لایه تعیین نمودند. ظرفیت عفونت‌زایی و لیز این دو باکتریوفاز بر شیگلا سوئی و شیگلا فلکسنری دارای مقاومت چند دارویی با روش تست نقطه‌ای (Spot test) ارزیابی شد. نتیجه نشان داد که ۳۶/۶٪ و ۷۲/۷٪ از سویه‌های شیگلا سوئی به ترتیب به وسیله vB_SflS-ISF001 و vB_SsoS-ISF002 لیز شد (۳).

در سال ۲۰۱۹ پژوهشی با هدف بررسی اثر دو باکتریوفاز روی موش آلوده به آسیتوباکتر بومانی مقام به دارو انجام شد. در این پژوهش سویه‌های OXA-23 و AmpC و ۸۲ سویه آسیتوباکتر بومانی از بیمارستان دانشگاه لوزان جمع آوری شد. برای جداسازی باکتریوفاز از فاضلاب شهر لوزان استفاده شد. پس از سانتریفیوژ فاضلاب مایع رویی آن را با فیلترهای سرنگی ۰/۲۲ نانومتر فیلتراسیون کردند. سپس برای شناسایی باکتریوفاز از روش آگار دو لایه و میکروسکوپ الکترونی استفاده کردند. دو باکتریوفاز vB_AbaM_3090 و vB_AbaM_3054 شناسایی شدند که از خانواده میویریده بودند. آزمایش فاز درمانی روی دو گروه موشی انجام شد. در گروه کنترل در روز نخست عفونت باکتری منجر به مرگ موش‌ها شد. ولی در گروه آزمایش دو ساعت پس از تزریق باکتری با باکتریوفاز درمان شدند که موش‌ها تا هفت روز زنده ماندند (۱۶).

منابع

1. Shahin K, Bouzari M, Wang R. Isolation, characterization and genomic analysis of a novel lytic bacteriophage vB_SsoS-ISF002 infecting *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. J Med Microbiol. 2018;67(3):376-86.

2. Jun JW, Giri SS, Kim HJ, Yun SK, Chi C, Chai JY, et al. Bacteriophage application to control the contaminated water with *Shigella*. *Sci Rep*. 2016;6:22636.
3. Shahin K, Bouzari M, Komijani M, Wang R. A New Phage Cocktail Against Multidrug, ESBL-Producer Isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* with Highly Efficient Bacteriolytic Activity. *Microb Drug Resist*. 2020;26(7):831-41.
4. Schooley RT, Biswas B, Gill JJ, Hernandez-Morales A, Lancaster J, Lessor L, et al. Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(10).
5. Shende RK, Hirpurkar SD, Sannat C, Rawat N, Pandey V. Isolation and characterization of bacteriophages with lytic activity against common bacterial pathogens. *Vet World*. 2017;10(8):973-8.
6. Lin DM, Koskella B, Lin HC. Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017;8(3):162-73.
7. Pallavali RR, Degati VL, Lomada D, Reddy MC, Durbaka VRP. Isolation and in vitro evaluation of bacteriophages against MDR-bacterial isolates from septic wound infections. *PLoS One*. 2017;12(7):e0179245.
8. Clokie MR, Kropinski AM, Lavigne R. Bacteriophages, Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions: Springer; 2009.
9. Krupovic M, Forterre P. Microviridae goes temperate: microvirus-related proviruses reside in the genomes of Bacteroidetes. *PLoS One*. 2011;6(5):e19893.
10. Ghosh S, Persad E, Shiue TY, Lam C, Islam A, Mascibroda LG, et al. Explorative Study on Isolation and Characterization of a Microviridae G4 Bacteriophage, EMCL318, against Multi-Drug-resistant *Escherichia coli* 15-318. *Antibiotics (Basel)*. 2018;7(4).
11. Wang H, Ling Y, Shan T, Yang S, Xu H, Deng X, et al. Gut virome of mammals and birds reveals high genetic diversity of the family Microviridae. *Virus Evol*. 2019;5(1):vez013.
12. Chan BK, Sstrom M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. 2016;6:26717.
13. Ghajavand H, Esfahani BN, Havaei A, Fazeli H, Jafari R, Moghim S. Isolation of bacteriophages against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Res Pharm Sci*. 2017;12(5):373-80.
14. Gautam B, Aryal L, Adhikari S, Rana M, Rajbhanshi A, Ghale S, et al. Isolation of bacteriophage from Guheswori sewage treatment plant capable of infecting pathogens. *Research in pharmacy and health sciences*. 2018;4(2):465-70.
15. Beheshti Maal K, Soleimani Delfan A, Salmanizadeh S. Isolation and Identification of Two Novel *Escherichia coli* Bacteriophages and Their Application in Wastewater Treatment and Coliform's Phage Therapy. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(3):e14945.
16. Leshkasheli L, Kutateladze M, Balarjishvili N, Bolkvadze D, Save J, Oechslin F, et al. Efficacy of newly isolated and highly potent bacteriophages in a mouse model of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteraemia. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;19:255-61.