بررسی تاثیر کوکتل فاژی علیه *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به آنتی بیوتیک

بهزاد همتی[1*]، مریم صادقیانی[2]

۱. دانشیار مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران
۲. دانش آموخته گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران

چکیده

امروزه با افزایش مقاومت باکتریهای بیماری زا به انواع آنتی بیوتیک ها و گسترش سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک و بالارفتن درصد مرگ و میر حاصل از آنها یافتن راهکارهای نوین برای مقابله با سویه های مقاوم بسیار ضروری به نظر میرسد. یکی از این راهکارها استفاده از کوکتل های فاژی مجموعه ای متشکل از دو یا چند باکتریوفاژ می باشد که به طور اختصاصی و بدون آسیب به سلول های بدن میزبان انسانی یا حیوانی باعث از بین بردن باکتریهای عامل عفونت میگردند.

زمینه و اهداف: هدف این مطالعه جداسازی و بررسی تاثیر باکتریوفاژهای لیتیک علیه *سودوموناس آئروژینوزا* از فاضلاب بیمارستانی است.

مواد و روش ها: در این مطالعه نمونه فاضلاب از ورودی فاضلاب یکی از بیمارستانهای واقع در شهرستان کرج گرفته و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه منتقل شد پس از تهیه کوکتل فاژی از دو سویه *سودوموناس آئروژینوزای* ATCC ۲۷۸۵۳ و RTCC ۱۴۷۴ استفاده شد با روشهای کشت دولایه و Spot test و مشاهده پلاک و هاله های شفاف در محیط حضور باکتریوفاژ و حساسیت باکتری مورد نظر به باکتریوفاژ اثبات و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تصویر برداری انجام گردید.

یافته ها: مشاهده با میکروسکوپ الکترونی حضور دو فاژ با اندازه های حدود ۵۰ و ۸۰ نانومتر اثبات گردید که با خصوصیات دو خانواده از فاژها به نام تکتی ویریده و سیستوویریده مطابقت داشت.

نتیجه گیری: با توجه به مقاومت هر دو سویه باکتری به آنتی بیوتیک ها میتوان برای از بین بردن باکتری بیماری زا و مقاوم به آنتی بیوتیک *سودوموناس آئروژینوزا* از این فازها استفاده نمود.

واژگان کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا* باکتریوفاژ لیتیک کوکتل فاژی سویه های مقاوم

Investigating the effect of phage cocktail against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Behzad Hemati[1*], Maryam Sadeghiani[2]

1. Associate Professor of Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Karaj Branch, Alborz, Iran

2. Graduated from the Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Alborz

Abstract

Introduction: Today, with the increase in the resistance of pathogenic bacteria to all kinds of antibiotics and the spread of antibiotic-resistant strains and the increase in the percentage of deaths resulting from them, it seems very necessary to find new solutions to deal with resistant strains. One of these solutions is the use of phage cocktails (a collection of two or more bacteriophages) that specifically and without harming the cells of the human or animal host body cause the destruction of the bacteria causing the infection. The aim of this study is to isolate and investigate the effect of lytic bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater. **Methods:** In this study, the wastewater sample was taken from the wastewater inlet of one of the hospitals located in Karaj city and transferred to the research laboratory of the university. After preparing the phage cocktail, two strains of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 and RTCC1474 were used. The presence of bacteriophage and the sensitivity of the target bacteria to bacteriophage were confirmed by two-layer culture and spot test methods and the observation of plaques and clear halos in the environment, and imaging was done using an electron microscope. **Results:** The presence of two phages with the size of 50 and 80 nm was confirmed by observing with an electron microscope, which corresponded to the characteristics of two families of phages called tectoviride and cystoviride.
Conclusion: Considering the resistance of both bacterial strains to antibiotics, these phages can be used to eliminate the pathogenic and antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa bacteria.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, lytic bacteriophage, phage cocktail, resistant strains

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و پاتوژنی فرصت طلب است (۱). این باکتری اکسیداز مثبت متحرک و دارای یک تا سه فلاژله قطبی می باشد. به جز در مواقعی که در حضور نیترات رشد میکند و آن را به نیتریت احیا می کند در سایر موارد هوازی اجباری می باشد. این باکتری در محیط های کشت رنگدانه های متعددی از جمله پیوسیانین (رنگدانه آبی)، پیووردین (رنگدانه سبز)، پیوروبین (رنگدانه قرمز) و پیو ملانین (رنگدانه سیاه) را تولید می کند. کلنی های آن بوی خاص شبیه گل یاس یا انگور دارند (۲). قادر به سازگاری با شرایط محیطی نامطلوب در بدن میزبان بوده و با ترشح انواع فاکتورهای حدت باعث ایجاد عفونت و بیماری زایی می گردند (۳). در تمام محیط ها قدرت زیست داشته و عامل بسیاری از عفونت های شدید در انسان مانند اندوکاردیت مننژیت سپتی سمی و عفونت های مزمن ریه در بیماران سیستیک فیبروزیس هستند. اگزوتوکسینA از سمی ترین پروتیین هایی است که توسط *سودوموناس آئروژینوزا* تولید و از طریق ریبوزیله کردن فاکتور طویل کننده (EF-۲) پروتیین سازی در سلول های یوکاریوت باعث مهار پروتین سازی و مرگ سلول می شود. این باکتری به عنوان دومین باکتری بیماری زای رایج در جراحیها و سومین عامل شایع و متداول عفونتهای بیمارستانی بعد از *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوک اورئوس* شناخته میشود (۱). *سودوموناس آئروژینوزا* در۱۶٪ پنومونی بیمارستانی، ۱۲٪ عفونت های مجاری ادرار، ۸٪ عفونت زخم ها و ۱۰٪ عفونت های خونی دخالت دارد. این باکتری همچنین در بیماران دارای نقص‌ایمنی، مانند بیماران دریافت کننده ی داروهای سرکوب کننده ایمنی، بیماران سرطانی و پیوند مغز استخوان عامل ۳۰ ٪ از مرگهای ناشی از سپتی سمی و پنومونی است و در پنومونی ناشی از دستگاه تهویه مکانیکی(ونتیلاتور) در ۳۸ ٪ از موارد موجب مرگ و میر می شود. در بیماران سوانح سوختگی عامل ۶۸٪ مرگ های ناشی از عفونت زخم است(۴). در طی شیوع اخیر همه گیری بیماری کووید ۱۹ در جهان حدود ۳۰ ٪ از بیماران مبتلا به کووید-۱۹ از عفونت های باکتریایی زمینه ای رنج می برده اند که حداقل ۱۲٪ آنها عفونت های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* بوده است(۵). استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها و مکانیسم های متعدد مقاومت دارویی توسط این باکتری، درمان *سودوموناس آئروژینوزا* را با مشکل مواجه ساخته است. امروزه اصطلاح *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به چند دارو (MDR) *سودوموناسی*اطلاق میشود که حداقل به ۳ نوع آنتی بیوتیک شامل آمینوگلیکوزیدها،بتالاکتام ها و فلوروکینولون ها مقاوم باشند. *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به چند دارو یکی از معضلات مهم در درمان عفونت های بیمارستانی به خصوص در بخش های مراقبت های ویژه نوزادان است. از این رو استفاده از روش های جایگزین برای درمان ضروری به نظر می رسد(۴). باکتریوفاژها ویروس هایی هستند که میزبان های باکتریایی را آلوده می کنند، اندازه ی آنها بسیار کوچک و حدود ۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر می باشد و دارای تمام ویژگی های ویروس ها هستند لذا برای تکثیر به میزبان باکتریایی نیاز دارند(۶). ویروس های ضدباکتریایی(باکتریوفاژها) یکی از عوامل مهم کنترل جمعیت باکتریایی می باشند که به طور اختصاصی به باکتری های میزبان خود حمله کرده و باعث انهدام آنها می شوند، اما بر روی سلول های انسانی یا حیوانی تاثیری نمی گذارند. تخمین

نویسنده مسئول: دانشیار ، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

آدرس الکترونیک:hemati@kiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۲

زده می شود که فاژها گسترده ترین و متنوع ترین موجوداتی هستند که در کره ی زمین وجود دارند. فاژهای لیتیک درون باکتری تکثیر می یابند و تعداد زیادی فاژ تولید می شودکه در نهایی موجب مرگ باکتری می شوند(۷). اولین بار باکتریوفاژها در سال ۱۸۸۶ در گزارشی از سوی Hankin معرفی شدند. Felix d Herelle با همکاری George Eliava در سال ۱۹۳۱ از فاژها جهت درمان و پیشگیری بیماری وبا استفاده نمودند، براین اساس اولین محصول فاژی علیه باکتری *ویبروکلرا* در گرجستان به صورت تجاری تولید شد(۸). فاژدرمانی در عصر حاضر در مراکز،با تمرکز بر جداسازی و نگهداری فاژها و تولید داروهای فاژی شامل: مونوفاژها که علیه باکتری های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* می باشد انجام می گیرد. همچنین داروهای پلی فاژ، فاژهای علیه بیماری های قانقاریا، کزاز، مخملک، دیفتری، سیاه زخم نیز تولید می شوند. مرکز(HLLET) در هلند با تولید محصولات فاژی علیه عفونت های گوارشی، سپتی سمی و عفونت ریه و دستگاه ادراری پیشگیری یا درمان عفونت های پس از عمل و پس از زایمان و درمان باکتری های مقاوم به چند آنتی بیوتیک در حال فعالیت می باشد. مرکز (QAMHB) در بلژیک نیز بیشتر بر روی فاژهای موثر بر زخم های سوختگی و علیه باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *آسینتوباکتربومانی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *انتروباکتریاسه* مطالعه داشته است. دارویی که توسط این مرکز در سال ۲۰۰۷ تولید شد با نام ۱-BFC عرضه گردید. چندین مطالعه کارآزمایی بالینی در خصوص عفونت زخم و سپتی سمی در این مرکز انجام شده است. مرکز(DSMZ) در آلمان نیز مطالعات کارآزمایی بالینی جهت بررسی تاثیر فاژ بر بهبودی سیستیک فیبروزیس و تولید محصول فاژی برای اولین بار به صورت اسپری جهت دکلنیزاسیون باکتری سودوموناس آئروژینوزا در بیماران مبتلا به برونشیت انجام داده است(۹). باکتریوفاژهایی که به طور اختصاصی *سودوموناس آئروژینوزا* را در مورد هدف قرار می دهند. اولین بار در اواسط قرن بیستم کشف شدند که بر روی *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به آنتی بیوتیک عامل عفونت های بیمارستانی موثر واقع شد(۱۰). فاژها کاملا هوشمندانه و به طور کاملا اختصاصی بر روی باکتری میزبان خود موثر بوده و تاثیر مخربی بر فلور نرمال ندارند. در حالی که آنتی‌بیوتیک‌ها بر فلور نرمال اثر مخرب داشته و عوارضی .مانند عفونت ثانویه و مشکلات گوارشی را ایجاد می‌نمایند در محل عفونت خود تکثیر شونده هستند و نیاز به تنظیم دوز ندارند. از آنجایی که خود تکثیر شونده هستند تولید این عوامل ضد باکتریایی مقرون به صرفه بوده و از نظر اقتصادی بسیار سریع و ارزان می‌باشند. فاژها اثر توکسیک ندارند و خود محدود شونده هستند به نحوی که بعد از نابود کردن باکتری‌های مضر، خود نیز از بین می‌روند (۹). با این وجود استفاده از فاژها مانند هر داروی ضد باکتریایی دیگر اثرات سوئی نیز دارد. از فاژها علیه پاتوژن‌های داخل سلولی مانند گونه‌های سالمونلا استفاده نمی‌شود. به علت عدم توانایی ورود فاژ به سلول‌های یوکاریوتی، فاژ به سلول باکتری دسترسی نخواهد داشت. اگرچه فاژها پاتوژن‌های مستقیم سلول‌های یوکاریوتی نیستند، سیستم ایمنی بدن انسان می‌تواند فاژ را به عنوان آنتی‌ژن‌های خارجی تشخیص دهد و تولید آنتی‌بادی‌های ضد فاژی انجام شود. تجویز تیترهای بالای فاژ به بیمار ممکن است یک واکنش شدید مانند شوک آنافیلاکسی ایجاد کند، اگرچه این عوارض منفی مشاهده نشده است. توانایی فاژهای لیزوژنیک در انتقال مواد ژنتیکی بیماری‌زا و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و تولید سموم باکتریایی مانند انتروتوکسین از طریق ترانسداکشن از دیگر ویژگی‌های .فاژ است که ممکن است یک ضرر در فاژ درمانی قلمداد شود برای جلوگیری از این مشکل، فاژهایی که لیتیک هستند در فاژ درمانی ایده‌آل می‌باشند. برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها، فاژها در طیف گسترده‌ای از از درجه حرارت پایدار هستند و اگر

میزبان به طور مداوم در دسترس باشد، می‌توانند بدون محدودیت باقی بمانند و انتشار ناخواسته آن یک مشکل مهم ایجاد می‌کند (۹). مساله دیگری که با فاژ درمانی ایجاد می‌شود، اثرات احتمالی پس از لیز باکتری است. هنگامی که باکتری‌های گرم منفی لیز می‌شوند، اجزای سلولی مانند اندوتوکسین آزاد می‌شوند. این مشکل در حال حاضر در ارتباط با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های خاص نیز وجود دارد. چنانچه مقدار زیادی از اندوتوکسین در بدن آزاد شود، میتواند موجب تب یا شوک سپتیک‌شود، که ممکن است منجر به مرگ شود (۹).

مواد و روش‌ها

مقدار ۸۰ میلی لیتر نمونه از ورودی فاضلاب یکی از بیمارستان‌های کرج گرفته و در دو ظرف پلاستیکی درب‌دار استریل به آزمایشگاه دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انتقال یافت.

خالص‌سازی نمونه فاضلاب

نمونه فاضلاب داخل شش لوله فالکون (۱۵ میلی لیتری) ریخته شد و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی بعد از سانتریفوژ به داخل ظرف استریل سرریزشد. نمونه ی حاصل یک بار با فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتر و بار دوم با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر (زیر هود و نزدیک شلعه و شرایط استریل) فیلتر شده، سپس در داخل یخچال و دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. دو سویه ی *سودوموناس آئروژینوزای* استفاده شده و در این پژوهش ATCC۲۷۸۵۳ و RTCC۱۴۷۴ می باشند که با استفاده از روش کربی بائر مقاوم بودن این دو سویه به آنتی بیوتیک های انتخابی به اثبات رسیده و نتایج در جداول ۱و ۲ ارائه شده است.

جدول۱. نتیجه تست کربی بائر مربوط به سویه ATCC۲۷۸۵۳

	CP	CRO	CZ	AMC	AN	GM	SXT	CTX
قطر هاله	۲۹MM	۱۴MM	۱۱MM	۱۱MM	۱۹MM	۱۷MM	بدون هاله	۱۶MM
نتیجه	R	S	R	R	S	S	R	R

S:Sensitive R:Resistant

جدول۲. نتیجه تست کربی بائر مربوط به سویه RTCC۱۴۷۴

	CP	CRO	CZ	AMC	AN	GM	SXT	CTX
قطر هاله	۳۶MM	بدون هاله	بدون هاله	بدون هاله	۱۷MM	بدون هاله	بدون هاله	۱۵MM
نتیجه	S	R	R	R	S	R	R	R

S:Sensitive R:Resistant

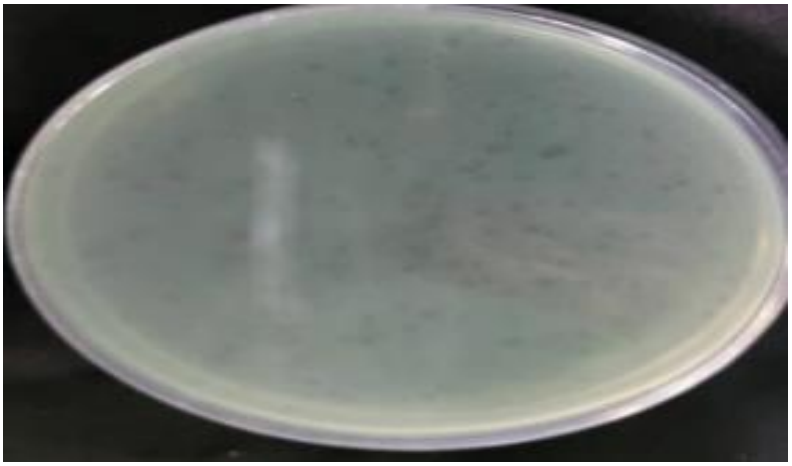
غنی‌سازی باکتریوفاژ

۵۰ میلی لیتر از محلول خالص سازی شده ی فاضلاب را با ۵۰ میلی لیتر محیط نوترینت براث 2X و ۱ لیتر از کشت سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری با غلظتی معادل نیم مک فارلند(کدروت نیم فارلند معادل تعداد $1/5 \times 10^8$ عدد باکتری در هر میلی لیتر می باشد) مخلوط شد، سپس چند قطره $MgSO_4$ اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد انکوبه شدند، بعد از خارج کردن ارلن حاوی محلول از انکوباتور، ۱۰ قطره کلروفرم به آن اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه محتویات آن را داخل لوله های فالکن ریخته و با دور ۱۸۰۰g به مدت نیم ساعت سانتریفوژ گردید، مایع رویی را داخل ظرف استریل ریخته و با سمپلر به داخل میکروتیوپ های دو میکرولیتری انتقال داده شد(تعداد ۲۴ میکروتیوپ)، پس از آن میکروتیوپ ها را با میکروسانتریفوژ یخچال دار با سرعت ۱۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کردیم و مایع رویی را داخل ظرف استریل ریخته و ابتدا با فیلتر سر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر و سپس با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر گردید(۷).

تایید حضور فاژ از طریق کشت دولایه

در یک لوله آزمایش استریل مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از مایع فیلتر شده و ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته *سودوموناس آئروژینوزای* مورد نظر که غلظت نیم مک فارلند دارد با ۲/۵ میلی لیتر نوترینت آگار (۰/۷ درصد) که در دمای ۴۵درجه ی سانتی گراد و به حالت مایع بود مخلوط کرده و سپس آن را بر روی پلیت حاوی محیط جامد نوترینت آگار (۱/۵ درصد) ریخته و با حرکت پلیت به صورت دورانی آن را کاملا پخش کرده، سپس ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کرده و بعد از ۲۴ ساعت از نظر وجود پلاک بررسی شد(۷). این مرحله در سه پلیت دیگر هم انجام شد با این تفاوت که از مایع فیلتر شده به مقدار ۳۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر در هرکدام اضافه شد. در بررسی پلیت ها بعد از ۲۴ ساعت، در پلیت هایی که در آنها از سویه ی RTCC۱۴۷۴ استفاده شده بود تعداد زیادی پلاک شفاف دیده شد. همچنین از بین آنها پلاک های مربوط به غلظت ۳۰۰ میکرولیتری از همه واضح

تر و به ترتیب میزان وضوح در پلیت های با غلظت مایع فیلترشده ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتری کمتر بود.

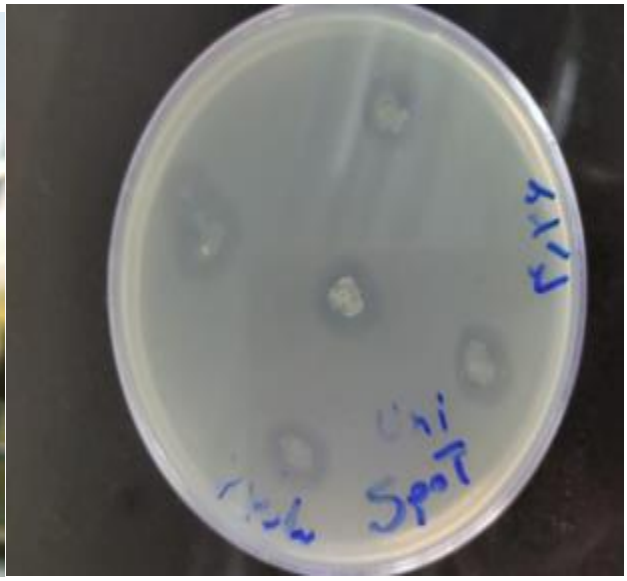


شکل۱. ظهور پلاک ها در کشت دو لایه

تعیین اختصاصیت باکتریوفاژ با روش Spot Test

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری با کدورت نیم مک فارلند به ۲.۵ میلی لیتر محیط نوترینت آگار(۰/۷ درصد آگار) با دمای ۴۵ درجه ی سانتی گراد اضافه کرده، خوب بهم زده و سپس آن را بر روی پلیت حاوی محیط جامد نوترینت آگار(۱/۵ درصد آگار) ریخته و پخش شد، پس از آن بسته شدن محیط رویی، از پلاک های ایجاد شده کشت آگار دولایه با آنس سوزنی برداشته و به آرامی روی محیط دو لایه ی اخیر قرار داده شد و سپس با دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. با بررسی پلیت بعد از ۲۴ ساعت هاله های شفاف عدم رشد مشاهده شد(۷)(شکل۳).

برای افزایش قطر هاله ها تمامی مراحل کشت دولایه و اسپات تست بار دیگر با محیط لوریا برتانی انجام شد و هاله های بزرگتری به دست آمد(شکل۴).

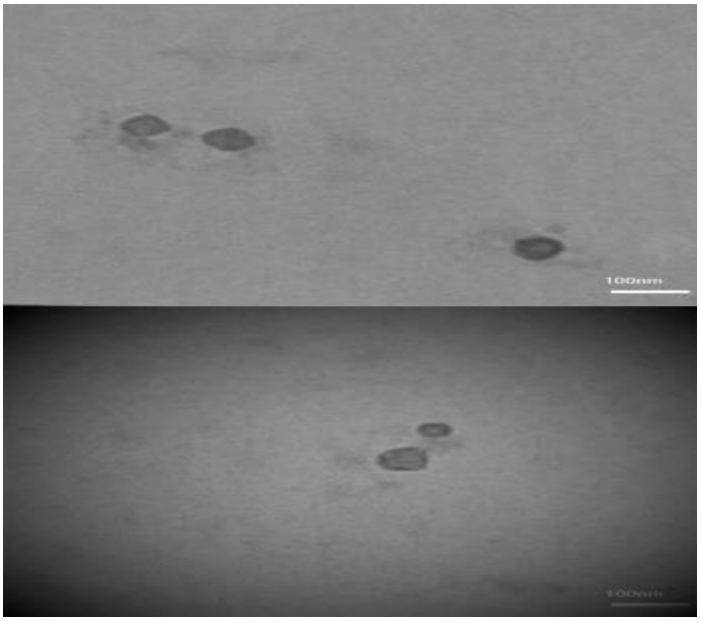


شکل۲.شکل هاله ها در روش اسپات تست

شکل۳. تشکیل هاله در محیط لوریا برتانی با روش اسپات تست

تهیه بافرSM

۵/۸ گرم بر لیتر NaCL ، ۲ گرم بر لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۵۰ میلی لیتر بر لیتر tris Hcl ۱مولار با pH ۷.۵ مخلوط و سپس در اتوکلاو استریل شد (۱۱). -۲ ۳ میلی لیتر از SM بافر حاصل را بر روی پلیت اسپات تست با محیط لوریا برتانی ریخته و۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور یخچال دار با دور۱۰۰ در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد، سپس بافر را با سمپلر جمع آوری کرده و با فیلتر سر سرنگی ۲۲/۰ میکرومتر فیلتر شد. محلول حاصل در ظرف استریل ریخته شد. تشخیص مورفولوژی فاز با میکروسکوپالکترونی گزاره نمونه بر روی گرید می فرموار ۳۰۰ مش قرار داده شد و با رنگ یورانیل استات رنگ آمیزی انجام و سپس با میکروسکوپ الکترونی گزاره مشاهده شد شکل (۵).



شکل۴. نمایی از مورفولوژی فاژ با میکروسکوپ الکترونی

یافته‌ها

وجود پلاک‌ها در کشت دولایه و همچنین هاله‌ها در روش اسپات تست نشانه وجود باکتریوفاژ لیتیک علیه دو سویه *سودوموناس* مورد نظر می‌باشند و طبق عکس‌های گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی گذاره (عبوری) دو نوع فاژ جداسازی شده است که هر دو از نوع بدون دم هستند و اندازه آنها حدود ۵۰ و ۸۰ نانومتر می‌باشد و با عنایت به شکل و اندازه آنها به نظر می‌رسد متعلق به خانواده‌های تکتی ویریده و سیستوویریده باشند. بنابراین کوکتل فازی شامل دو نوع فاژ لیتیک تهیه شده است که می‌توان از آن در صنایع داروسازی جهت از بین بردن سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک در زمینه‌های پزشکی و دامپزشکی استفاده نمود

.

بحث

امروزه گسترش باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک به نگرانی عمده ای تبدیل شده است (۱۲). سودوموناس اتروژینوزا یکی از عفونتهای بیمارستانی به ویژه در بخش سوختگی و گیوند محسوب می شود. این باکتری عامل اولیه عفونت های ریویدر افراد مبتلا به فیبروز سیستیک و بیماری مزمن انسداد ریوی می باشد (۱۳). همچنین میتواند باعث بروز اسهال اپیدمیک در کودکان عفونتهای چشمی استئومیلیت عفونتهای پوستی عفونت در گوش باکتریمی، اندوکاردیت و مننژیت شود. (۱۴) عدم درمان این عفونت ها با آنتی بیوتیک ها باعث گرایش محققان به روشهای جایگزین برای حذف و

کنترل این باکتری ها شده است. یکی از اینروشهای جایگزین یا مکمل استفاده از باکتریوفاژها است که به منظور درمان عفونت در در بسیاری از عفونتهای مقاوم به درمان به طور موفقیت آمیز مورد استفاده قرار گرفته است. این پدیده یا فاز درمانی به معنای استفاده از فازها برای درمانعفونت های ناشی از باکتریها و به خصوص استفاده از چند فاز هم زمان به صورت مخلوط که کوکتل فازی نامیده میشود برای افزایش طیف میزبان در مورد یک جنس خاص علیه عفونت های مختلف باکتریایی استفاده شده است. برخلاف بیشتر انتی بیوتیکها فاژها اسلحه های هوشمندی هستند که اختصاصی عمل می کنند (۱۲). عزیزیان و همکاران در سال ۱۳۸۸ در طی تحقیقاتی در مشهد با هدف غنی سازی و جداسازی باکتریوفاژهای لیتیک علیه ایزوله های *سودوموناس آئروژینوزا* مقاوم به آنتی بیوتیک تحقیقاتی را انجام دادند که نتایج حاصله نشان داد اثرات باکتریوسایدی باکتریوفاژها در غلظت های بالا بسیار اثر بخش است(۱۱). Vindokumar و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از باکتریوفاژهای لیتیک موشهای دچار سپتی سمی ناشی از *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به چند دارو (MDR) را درمان کرده و موفق شدند آنها را از مرگ نجات دهند (۱۵). FU و همکاران (۲۰۱۰) فاژهای اختصاصی *سودوموناس آئروژینوزا* را علیه بیوفیلم ناشی از این سویه ها درکنترهای مورد استفاده در بیمارستان مورد مطالعه قرار دادند(۱۲). Pires و همکاران (۲۰۱۱) به جداسازی و شناسایی دو فاژ به برای کنترل philBB-PAP۲۱ و philBB-PAA۲ نام های فرم های پلانکتونیک و بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* پرداختند که هر دو فاز لینیک کارایی لیز را روی فرم پلانکتونیک نشان دادند اما فاز philBB-PAA۲ در مورد تخریب بیوفیلم موثرتر واقع شد (۱۶). زانتی و همکارانش (۲۰۱۳) فاژهای سویه های بیماری زا *سودوموناس آئروژینوزا* را که به خانواده های Siphoviridae و Mauviridae تعلق داشتند، جدا کردند (۱۲). شکری و همکاران (۲۰۱۵) نیز در مطالعه ای از روش Spot Test برای جداسازی باکتریوفاژ از فاضلاب بیمارستانی و شهری استفاده کردند و موفق به جداسازی و شناسایی دو باکتریوفاژ شدند که به صورت مخلوط کوکتل فازی) اثر باکتری کشی قوی علیه اکثر سویه های مقاوم باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* داشتند و کاندیدای مناسبی برای فاژ درمانی بودند (۱۲). Peng Ong و همکاران (۲۰۲۰) با جدا کردن دوفاز ϕPAO۲ و ϕPAO۱ و ایجاد یک کوکتل فازی برای درمان عفونت های *سودوموناس آئروژینوزا* از این کوکتل به همراه آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و مروینم استفاده کردند و موفق به سرکوب باکتری تا ۹۶ ساعت شدند. Bing و همکاران (۲۰۲۳) توانستند فاز لیتیک H۲۲۲۰۱ علیه فاز philBB-PAA۲ *سودوموناس آئروژینوزای* PAO۱ را از آب رودخانه جداسازی کنند که فاز مذکور از خانواده کو دو ویرال میباشد (۱۷). Aliaa و همکاران (۲۰۲۳) فاز vB -PacM-PS را جداسازی کردند که بر روی بیوفیلم حاصل از *سودوموناس آئروژینوزا* در بدن موش ها موثر بود (۱۸). در سال ۲۰۱۷، سازمان بهداشت جهانی فهرستی از پاتوژن‌های اولویت‌دار جهانی را منتشر کرد که شامل ۱۲ گونه باکتری است که بر اساس سطح مقاومت و درمان‌های موجود در اولویت‌های بحرانی، بالا و متوسط طبقه‌بندی شده‌اند. نرخ فعلی توسعه مقاومت بسیار فراتر از سطح کشف و توسعه آنتیبیوتیک است و یک چالش بهداشت عمومی جهانی را نشان میدهد. برآوردها حاکی از آن است که تا سال ۲۰۵۰ ممکن است بیش از ۱۰ میلیون نفر در سال به دلیل مقاومت ضد میکروبی جان خود را از دست بدهند. (۱۹) و این هزینه‌ای معادل ۱۰۰ تریلیون دلار برای اقتصاد جهان خواهد داشت و یک تهدید بزرگ برای سلامت جهانی است که میتواند بر همه افراد، صرف نظر از سن، وضعیت اجتماعی-اقتصادی، یا کشور محل زندگی آنها تأثیر بگذارد(۲۰).

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضراز دو سویه *سودوموناس آئروژینوزا* (ATCC۲۷۸۵۳) و (RTCC۱۴۷۴) استفاده شد که هر دو مقاوم به آنتی‌بیوتیک بودند و با استفاده از روش‌های کشت دو لایه و اسپات تست و مشاهده پلاک‌ها و هاله‌های عدم رشد وجود باکتریوفاژ به اثبات رسید. همچنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مورفولوژی، سایز و خانواده باکتریوفاژها مشخص گردید. بنابراین تحقیق حاضر نیز با هدف جداسازی و غنی‌سازی و شناسایی باکتریوفاژ لیتیک علیه *سودوموناس آئروژینوزا* و تهیه کوکتل فاژی، موفق به جداسازی و شناسایی دو فاژ لیتیک با اندازه‌های ۵۰ و ۸۰ نانومتر از خانواده‌های تکتی‌ویریده و سیستوویریده گردید.

سپاسگزاری

بدینوسیله از راهنمایی و مساعدت سرکار خانم دکتر دزفولیان ریاست محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج که ما را در این پژوهش یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی می شود.

Reference

1. Amini B, Kamali M, zarei A, bayat E, Javadi h, Mansuri M, Farhadi N. Isolation and Rapid Identification of Peudomonas aeruginosa through PCR Bio Sci Qtr Azad Uni of Zanjan 2013 Winter, (3): 59-65
2. Taghinekhad J, Molaee Kohneh Shahri SH, Hosseinzadeh M, Javan Jasur V. Qtr J of Laboratory and Diagnosis 2015 Winter (34): 67-82
3. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal Transduct Target Ther. 2022;7(1):1–27.
4. Azizian R, Askari H . The Use of Phage as a Specialized Antibiotic Against Lethal Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Sci J Ilam Univ Med Sci. 2013;
5. Arumugam S, Manohar P, Sukumaran S, Sadagopan S, Loh B, Leptihn S, et al. Antibacterial efficacy of lytic phages against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections in bacteraemia mice models. BMC Microbiol [Internet]. 2022;22(1):1–7. Available from: https://doi.org/10.1186/s12866-022-02603-0
6. Hatfull G, Dedrick R, Schooley R. Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. Annu Rev Med. 2022;73:197–211.
7. Nasr-Esfahani B, Roshnaei M, Fazeli H, Havaei A, Moghim Sh, Ghasemian-Safaei H et al. The Effect of Isolated Bacteriophage on Multi-Drug Resistant (MDR) Pseudomonas

Aeruginosa. J Isfahan Med Sci 2014; 2014.

8. Rahimzadeh G , Farshidi F. Phage Therapy in Treatment of Gram-negative Bacterial Infections: A Systematic Review. J Mazandaran Univ Med Sci 2018;28; 2018. p. 203–12.
9. Rahimzadeh G, Saeedi M, Farshidi F, Rezai MS, Infectious P, Sciences M, et al. Phage Therapy in Tereatment of Gram-negative Bacterial Infection : A Systematic Review. J Maz Uni Med Sci. 2018;28(165):203–12.
10. Chegini Z, Khoshbayan A, Taati Moghadam M, Farahani I Bacteriophage therapy against Pseudomonas aeruginosa biofilm:A review. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials REVIEW; 2020.
11. Molla Ahmadian Kaseb A. Isolation of Bacteriophages Treatment of Infection Caused by Pseudomonas aeruginosa as an Aiternative for Antibiotics. Thsis submitted to receive the degree of Master of Sciences in Micribiology
12. Shokri D, Soleimanidelfan A, Moayednia R, Mobasherizadeh S, Shirsalimian M, Enayatollahi S EJ. Isolation Identification and Evaluation of Two Lytic Bacteriophages Against Clinical Antibiotic-Resistant Strains of Pseudomonas aeruginosa from Waste Water and Hospital Sewage of Isfahan City. Sci J Ilam Univ Med Sci [Internet]. 2015;23:164–72. Available from: www.SID.ir
13. Dorri K, 1, Farzan Modaresi2*, Mohammad Reza shakibaie3 EM. Frequency of Gene-Producing Strains (aprA, rhlI, rhlR, algD) in Clinical.pdf. Pars Journal of Medical Sciences,Vol.20,No.2,Summer 2022; 2022. p. 39–47.
14. Khajekaramodin M, fazlibazaz B, Ebrahimi M, Ghazvini K, Afzal Aghayee M, Naderinasab M, et al. Enrichment and Isolation of Lytic Bacteriophages againet Antibiotic-resistant Peseudomonas aeruginosa Isolates .Iranian Journal of Medical Microbiology ,No 2,3, Summer and Winter 2008, p. 66-72
15. Vinodkumar C, Kalsurmath S, Neelagund Y. Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa septicemia in mice. Indian J Pathol Microbiol. 2008 Jul 1;51(3):360–6.
16. Pires D, Sillankorva S, Faustino A, Azeredo J. Use of newly isolated phages for control of Pseudomonas aeruginosa PAO1 and ATCC 10145 biofilms. Res Microbiol [Internet]. 2011;162(8):798–806. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092325081100115X
17. Fei B, Li D, Liu X, You X, Guo M, Ren Y, et al. Characterization and genomic analysis of a broad-spectrum lytic phage HZ2201 and its antibiofilm efficacy against Pseudomonas aeruginosa. Virus Res [Internet]. 2023;335(April):199184. Available from:

https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199184

18. Abdelghafar A, , Ghada G, Momen S. A novel lytic phage exhibiting a remarkable in vivo therapeutic potential and higher antibiofilm activity against Pseudomonas aeruginosa. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2023;42(10):1207–34. Available from: https://doi.org/10.1007/s10096-023-04649-y
19. Furfaro L, Payne M, Chang B. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8(October):1–7.
20. Altamirano F, Barr J. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2019;32(2):e00066-18. Available from: https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/CMR.00066-18