

بررسی خصوصیات و کارایی فاژ لیتیک *Acinetobacter Baumannii* مقاوم به چند دارو جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه

بهنام سی‌سخت‌پور^۱، وجیهه کرباسی‌زاده^۲، سیده سعیده ابراهیمی^۱، نفیسه‌سادات حسینی^۲، آرزو میرزایی^۳، مهدی شعبانی^۴، ریحانه جعفری^۵، شراره مقیم^۶

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: هدف از انجام این مطالعه، جداسازی، تعیین خصوصیات و بررسی کارایی فاژهای اختصاصی *Acinetobacter baumannii* مقاوم به چند دارو (MDR یا Multidrug resistant) بود تا با استفاده از آن، بتوان روش مناسب و کارآمدی را جایگزین درمان آنتی‌بیوتیکی نمود و یا به عنوان یک ضد عفونی کننده‌ی سطوح بیمارستان از آن استفاده کرد.

روش‌ها: در یک مطالعه‌ی مقطعی طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۵، ۴۸ ایزوله‌ی مشکوک به *Acinetobacter baumannii* از بخش مراقبت‌های ویژه (Intensive care unit یا ICU) در بیمارستان الزهراء (س) اصفهان جداسازی شد. برای تعیین هویت، ابتدا آزمایش‌های فنوتیپی و سپس، تکثیر ژن bla_{OXA-51} انجام گرفت. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدا شده‌ها به روش دیسک دیفیوژن تعیین و پس از آن، فاژ اختصاصی *Acinetobacter baumannii* از منابع آب جدا شد. در نهایت، حساسیت *Acinetobacter baumannii* به فاژ، محدوده‌ی میزبانی فاژ و منحنی رشد آن بررسی گردید.

یافته‌ها: تمام ایزوله‌های *Acinetobacter baumannii* تشخیص داده شد و میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۹۹ درصد، ستفازیدیم ۹۶ درصد، سفیم ۹۷ درصد، آمیکاسین ۸۲ درصد و ایمی‌پنم ۱۰۰ درصد بود. فاژ از فاضلاب جداسازی شد و ۲۷ ایزوله‌ی *Acinetobacter baumannii* نسبت به آن حساس بودند و فاژ تأثیری بر سایر باکتری‌ها نداشت. در نهایت، با بررسی منحنی رشد، پس از مرحله‌ی نهفتگی ۳۰ دقیقه‌ای، در زمان ۴۰ دقیقه مرحله‌ی آزادسازی فاژ رخ داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از اثربخشی فاژ در مختل کردن رشد باکتری و با افزایش مقاومت *Acinetobacter baumannii* به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها و مشکل در درمان عفونت‌های آن، فاژ درمانی می‌تواند به عنوان روش درمانی برای مقابله با عفونت‌های این باکتری مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *Acinetobacter baumannii*، مقاومت به چند دارو، باکتریوفاژ، فاژ درمانی

ارجاع: سی‌سخت‌پور بهنام، کرباسی‌زاده وجیهه، ابراهیمی سیده سعیده، حسینی نفیسه‌سادات، میرزایی آرزو، شعبانی مهدی، جعفری ریحانه، مقیم شراره. **بررسی خصوصیات و کارایی فاژ لیتیک *Acinetobacter Baumannii* مقاوم به چند دارو جدا شده از بخش مراقبت‌های ویژه.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۲۸): ۵۶۴-۵۷۱

پاتوژن مهم بیمارستان به ویژه در بخش مراقبت‌های ویژه (Intensive care unit یا ICU) می‌باشد که به علت مقاومت به چند دارو، به عنوان یک عامل عمده در عفونت‌های بیمارستانی شناخته شده و با مرگ و میر قابل توجهی به ویژه در بیماران دچار نقص

مقدمه

Acinetobacter baumannii، باسیل گرم منفی هوازی، غیر تخمیری و بدون حرکت است. *Acinetobacter* به طور گسترده در خاک، آب، فاضلاب و محیط‌های بهداشتی یافت می‌شود. این باکتری، یک

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باکتری و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۲- استادیار، گروه باکتری و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۳- دانشجوی دکتری، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی فن‌آوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۴- دانشجوی دکتری، گروه باکتری و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
- ۵- گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
- ۶- دانشیار، گروه باکتری و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: moghim@med.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: شراره مقیم

فازهای لیتیک می‌باشد. این فازها در سلول باکتری تکثیر می‌یابند و باکتری را از بین می‌برند (۱۱). این روش درمانی، دارای مزایایی نسبت به آنتی‌بیوتیک درمانی می‌باشد که از این بین، می‌توان به ویژگی (Specificity) بالا برای میزبان باکتریایی، عدم عوارض جانبی برای بیمار و پایداری وابسته به حضور میزبان باکتریایی اشاره نمود (۱۲).

هدف از انجام این مطالعه، جداسازی، تعیین خصوصیات و بررسی کارایی فازهای اختصاصی *Acinetobacter baumannii* مقاوم به چند دارو بود تا با استفاده از آن، بتوان روش مناسب و کارآمدی را جایگزین درمان آنتی‌بیوتیکی نمود و یا آن را به عنوان یک ضد عفونی کننده‌ی سطوح بیمارستان مورد استفاده قرار داد.

روش‌ها

پژوهش حاضر یک مطالعه‌ی مقطعی بود که طی سال‌های ۹۷-۱۳۹۵ انجام گرفت. تعداد ۴۸ نمونه‌ی *Acinetobacter baumannii* از بخش ICU بیمارستان الزهراء (س) اصفهان جداسازی شد.

ابتدا، جهت تعیین هویت ایزوله‌های *Acinetobacter baumannii* نمونه‌ها به محیط کشت MacConkey agar تلقیح گردید و پس از رشد، بررسی‌های فنوتیپی شامل رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش‌های کاتالاز، اکسیداز و تخمیر هوازی گلوکز، سیترات و تست مالونات صورت گرفت.

سپس، جهت تأیید ژنوتیپی ایزوله‌ها، ژن مشخصه‌ی گونه‌ی *Acinetobacter baumannii* blaOXA-51، با روش Polymerase chain reaction (PCR) ردیابی شد (۱۳). بدین ترتیب که DNA باکتری، با روش جوشاندن استخراج و با استفاده از توالی‌های پرایمیری 5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3' OXA-F و 3'-TGGATTGCACTTCATCTTGG-5' OXA-R، واکنش PCR با استفاده از چرخه‌ی دمایی شامل دناتوراسیون اولیه‌ی DNA در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه برای دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

در نهایت، محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد حاوی DNA staining (Green Viewer) تفکیک و با DNA ladder ۵۰ جفت‌باز به عنوان نشانگر وزن مولکولی با استفاده از دستگاه Gel documentary ردیابی شد (۱۳).

آنتی‌بیوگرام: به منظور تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و جداسازی سویه‌های MDR، آزمایش آنتی‌بیوگرام به روش دیسک دیفیوژن انجام

ایمنی مرتبط است (۱). *Acinetobacter baumannii*، عفونت‌های متعددی همچون مننژیت، پنومونی، باکتری، عفونت‌های مجاری ادراری و همچنین، عفونت زخم‌های جراحی را ایجاد می‌کند (۲). عواملی مانند طول مدت بستری، جراحی، عفونت قبلی، کلونیزاسیون مدفوعی، درمان با آنتی‌بیوتیک‌های وسیع‌الطیف، تغذیه‌ی وریدی، کاتر ادراری، بستری بودن در بخش سوختگی و مراقبت‌های ویژه، از عوامل مستعد کننده به عفونت‌های این باکتری می‌باشند (۳). *Acinetobacter baumannii* به دلیل مکانیسم‌های ذاتی از زمانی که کشف شدند، به بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان دادند (۴).

امروزه، علاوه بر جداسازی سویه‌هایی با مقاومت چند دارویی (Multidrug resistance یا MDR)، از این باکتری ایزوله‌هایی مقاوم به کلیه‌ی داروها (Pan-drug) جداسازی شده است (۵). *Acinetobacter baumannii*، به دهیدراتاسیون، اشعه‌ی فرابنفش، ضد عفونی کننده‌های شیمیایی رایج و دترجنت‌ها مقاوم است و حذف و ریشه‌کنی آن از محیط‌های بیمارستانی به خصوص وسایل مرتبط با کاتر که در ICU استفاده می‌شود، بسیار مشکل است. به طور رایج، هیچ روش قابل دسترسی برای حذف *Acinetobacter baumannii* از محیط‌های بیمارستانی و بیماران بستری شده در بیمارستان با خطر خیلی بالا و به ویژه بیماران بخش ICU وجود ندارد (۶).

باکتریوفاژها یا به طور خلاصه فاژها، ویروس‌هایی هستند که به باکتری‌ها حمله می‌کنند و آن‌ها را از بین می‌برند. این ویروس‌ها برای باکتری‌ها اختصاصی هستند و بر روی سلول‌های یوکاریوت تأثیری ندارند (۷). باکتریوفاژها، فراوان ترین موجودات بر روی زمین هستند و به طور گسترده در فاضلاب، خاک، آب و آب‌های دریایی و غیره یافت می‌شوند. از لحاظ ساختاری، باکتریوفاژها از سه بخش سر، دم و فیبر دم تشکیل شده‌اند. ژنوم در ناحیه‌ی سر قرار دارد و دم شبیه یک لوله‌ی توخالی است که توسط آن ژنوم را وارد سلول میزبان می‌کند. فاژها مانند سایر ویروس‌ها، دارای یک اسید نوکلئیک درونی (DNA یا RNA) هستند، که این ژنوم توسط یک پوشش پروتئینی حفاظتی در خارج احاطه شده است (۸).

فاژدرمانی پس از کشف فاژ در سال‌های ۱۹۱۵ توسط Twort و ۱۹۱۷ توسط D'Herelle، برای درمان عفونت‌های باکتریایی مورد استفاده قرار گرفت و که با ظهور آنتی‌بیوتیک‌های متعدد، این روش درمانی به فراموشی سپرده شد (۹). با تحقیقات و توسعه‌ی فن‌آوری‌های جدید که بر روی فاژ صورت گرفته است، علاوه بر درمان و کنترل زیستی، از این ویروس‌ها برای تشخیص باکتری‌ها، آزادسازی دارو و طراحی واکسن استفاده می‌شود (۱۰). فاژ درمانی که در چند دهه‌ی گذشته مطرح گردیده است، بر اساس استفاده از

با روش آگار دولایه، روی پلیت برده شد و پس از ۸ ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، پلاک‌ها شمارش شدند و تیتراژ تعیین گردید (۱۷).

بررسی طیف میزبان: برای بررسی طیف میزبان، فاز جداسازی شده *Acinetobacter baumannii* Spot نسبت به ۴۸ ایزوله‌ی *Acinetobacter baumannii* (MDR) جدا شده از ICU مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۸).

بررسی طیف میزبان های مختلف: با استفاده از آزمایش Spot دامنه‌ی میزبانی فاز شناسایی شده، برای چند گونه‌ی گرم منفی دیگر مانند *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* بررسی شد (۱۹).

روش Spot ۱ میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری به ۲/۵ میلی‌لیتر محیط Nutrient agar ۰/۷ درصد تلقیح شد و مخلوط به پلیت حاوی Nutrient agar ۱/۵ درصد اضافه شد تا پلیت‌های دو لایه ایجاد شود. پس از بسته شدن لایه‌ی بالایی، ۱۰ میکرولیتر نمونه‌ی فاز فیلتر شده به صورت Spot وارد محیط گردید و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. هاله‌های ایجاد شده در پلیت نشان دهنده‌ی حساسیت باکتری به فاز می‌باشد (۲۰).

بررسی منحنی رشد فاز: رقت‌های مختلف از محلول باکتریوفاژ با ۱ میلی‌لیتر از باکتری با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند *Acinetobacter baumannii* مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا جذب فاز به باکتری صورت گیرد. سپس، به مدت ۳۰ ثانیه با شتاب ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب آن، به ۵ میلی‌لیتر Nutrient Broth اضافه گردید و در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در فواصل زمانی ۵ دقیقه نمونه گرفته شد و تیتراژ ویروس (PFU) Plaque-forming unit مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش سه بار تکرار شد (۲۱).

نتایج آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۴ (version 14, SPSS Inc., Chicago, IL)، آزمون χ^2 و ضریب Kappa (Kappa coefficient) تجزیه و تحلیل شد. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۴۸ نمونه‌ی *Acinetobacter baumannii* از نظر آزمایش‌های بیوشیمیایی دارای اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، سیتراز مثبت و تخمیر هوازی گلوکز مثبت بودند. سپس، ژنوم باکتری جداسازی شد و PCR بر روی ژن bla_{OXA-51} صورت گرفت و نتایج حاصل از PCR نشان داد که ژن bla_{OXA-51} در تمامی نمونه‌ها وجود دارد که خصوصیات فنوتیپی و گونه‌ی *Acinetobacter baumannii* را تأیید

شد (۱۴). به طور خلاصه، سوسپانسیون میکروبی از کشت ۲۴ ساعته‌ی ایزوله با غلظتی معادل ۰/۵ مک‌فارلند (Colony-forming unit) یا $10^4 \times 1/5$ تهیه و به محیط کشت Muller-Hinton (Merck, Germany) تلقیح شد. از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آمیکاسین، سفپیم، سفنازیدیم، سیپروفلوکساسین، ریفامپین و ایمی‌پنم استفاده گردید و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی جداییه‌ها بر اساس جدول Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم تعیین گردید (۱۵).

جداسازی فازهای لیتیک: ۵۰ میلی‌لیتر از منابع آب مختلف شامل فاضلاب بیمارستان، فاضلاب شهری و رودخانه، با شتاب ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی فیلتر شد و به ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط ۲x Nutrient Broth شامل ۱ میلی‌مولار سولفات منیزیم (MgSO₄) و کلرید کلسیم (CaCl₂) افزوده شد. در نهایت، ۱ میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته‌ی باکتری با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند به محیط تلقیح گردید و در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد با شتاب ۱۶۰ دور در دقیقه در انکوباتور دارای Shaker برای مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. سپس، بار دیگر مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه با شتاب ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی با فیلتر ۰/۴۵، فیلتر و در ارلن استریل ریخته شد (۱۶). برای تشخیص ایجاد پلاک توسط فاز، از روش آگار دو لایه (Double-layer agar) استفاده گردید.

روش آگار دولایه: ابتدا، محیط مایع Nutrient agar ۱/۵ درصد در ظرف پلیت ریخته شد. پس از جامد شدن محیط، ۱ میلی‌لیتر محلول فیلتر شده‌ی فاز به همراه ۱ میلی‌لیتر از کشت باکتری ۲۴ ساعته با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند در لوله‌ی حاوی محیط Nutrient Broth ۰/۷ درصد که دمای آن ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و مایع است، وارد گردید. مخلوط حاصل، بر روی پلیت حاوی Nutrient Broth جامد ریخته و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، پلاک‌ها توسط لوپ استریل جدا شد و به همراه ۵۰ میلی‌لیتر Nutrient Broth و ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری با رشد ۲۴ ساعته در ارلن استریل ریخته شد. این کار، چندین بار تکرار شد تا میزان فاز خالص افزایش یابد (۱۶).

تعیین تیتراژ فاز: از باکتریوفاژ رقت‌های سریال ۱۰ تایی تهیه شد. سپس، هر رقت با ۲۰۰ میکرولیتر باکتری با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور دارای Shaker در دمای ۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و با شتاب ۱۶۰ دور در دقیقه برای جذب، قرار گرفت. سپس، سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و بار دیگر، رسوب در محیط Nutrient Broth مخلوط شد. این مخلوط،

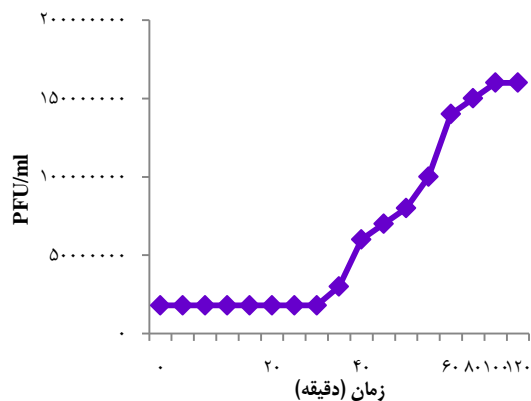
می‌کند (شکل ۱).

روی پلیت برده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، پلاک‌های ایجاد شده در رقت‌های 10^{-6} ، 10^{-7} و 10^{-8} شمارش و تیتراژ PFU $10^8 \times 13/3$ مشخص گردید.

بررسی طیف میزبان: با استفاده از آزمایش Spot، فاز بر روی ۴۸ ایزوله‌ی *Acinetobacter baumannii* قرار گرفت که ۲۷ ایزوله نسبت به فاز حساس بودند و پلاک ایجاد شده در پلیت، نشان دهنده‌ی لیز باکتری بود و در ۲۱ ایزوله، پلاکی مشاهده نشد.

بررسی طیف میزبان‌های مختلف: با استفاده از آزمایش Spot نمونه‌های باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* در برابر فاز قرار گرفتند که در هیچ یک از پلیت‌ها پلاک ایجاد نشد که بیانگر اختصاصی بودن فاز نسبت به *Acinetobacter baumannii* می‌باشد.

بررسی منحنی رشد فاز: بعد از یک مرحله‌ی نهفته‌ی ۳۰ دقیقه‌ای، در زمان ۴۰ دقیقه با ایجاد عفونت در باکتری، مرحله‌ی آزادسازی اولیه صورت گرفت. سپس، تا ۵۰ دقیقه رشد فاز ثابت ماند و در زمان ۶۰ دقیقه، آزادسازی ثانویه شکل گرفت. در نهایت، از مدت زمان ۶۰-۱۲۰ دقیقه، رشد ثابت ماند (شکل ۳).

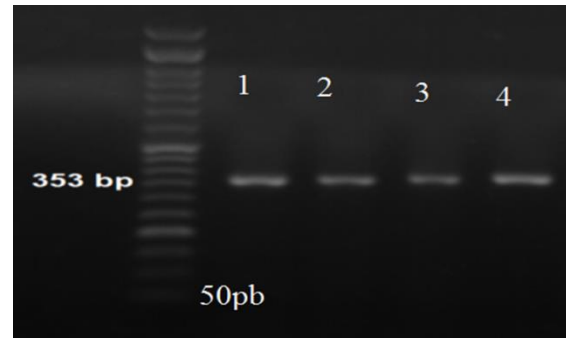


شکل ۳. منحنی رشد فاز

بحث

یکی از عوامل مهم مرگ و میر در بخش ICU، عفونت ناشی از باکتری‌های گرم منفی می‌باشد که *Acinetobacter baumannii* به عنوان یکی از این عوامل شناخته می‌شود (۲۲). افزایش روزافزون مقاومت این باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها، درمان عفونت‌های ناشی از آن را محدود کرده است (۲۳).

در این مطالعه، با توجه به الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی *Acinetobacter baumannii*، ۹۶ درصد مقاومت به سفتراییدیم و بیشترین مقاومت نسبت به ایمپنم، سیپروفلوکساسین و سفپیم دیده شد. در مطالعه‌ی اردبیلی و همکاران در تهران، بیشترین مقاومت



شکل ۱. نتایج Polymerase chain reaction (PCR) ژن

blaOXA-51 بر روی ژل آگار، ۱: شاهد مثبت،

Acinetobacter baumannii ATCC13302، ۳ و ۴: نمونه‌ی

بالینی، نشانگر ۵۰Ladder جفت‌باز

آنتی‌بیوگرام: بر اساس الگوی مقاومت، نمونه‌های *Acinetobacter baumannii*، ۸۲ درصد به آمیکاسین، ۹۷ درصد به سفپیم، ۹۶ درصد به سفتراییدیم، ۹۹ درصد به سیپروفلوکساسین، ۸۲ درصد به ریفامپین و ۱۰۰ درصد به ایمپنم مقاومت نشان دادند. تعداد کمی از نمونه‌ها، دارای الگوی مقاومت نیمه حساس و تمامی نمونه‌ها MDR بودند.

جداسازی فاز: از نمونه‌های آب تهیه شده از بیمارستان و فاضلاب شهری، باکتریوفاژ از نمونه‌ی فاضلاب جداسازی شد که با استفاده از روش آگار دو لایه و آزمایش Spot پلاک ایجاد شده، مرحله‌ی جداسازی تأیید گردید (شکل ۲).



شکل ۲. ایجاد پلاک توسط فاز اختصاصی *Acinetobacter baumannii* به روش Spot

تعیین تیتراژ فاز: ۱۰ سریال رقت از فاز تهیه شد و به هر رقت، ۲۰۰ میکرولیتر باکتری ۰/۵ مک فارلند افزوده و با روش آگار دو لایه

جدا شده از فاضلاب شهری بر روی ۴۸ گونه‌ی *Acinetobacter* مورد ارزیابی قرار گرفت و ۲۷ ایزوله نسبت به فاژ حساس بود.

همچنین، در مطالعه‌ی Jin و همکاران، فاژ zz1 از آب استخر پرورش ماهی جداسازی گردید و با قرار دادن آن بر روی سویه‌ی ABO9V، پلاک ایجاد شد و فاژ zz1 به عنوان فاژ اختصاصی *Acinetobacter baumannii* بیان گردید (۲۰).

در مطالعه‌ی Huang، فاژ Abp1 را بر روی ۸۰ سویه از *Acinetobacter baumannii* مورد ارزیابی قرار دادند و بیان داشتند که تنها ۲ سویه نسبت به فاژ حساسیت نشان دادند. همچنین، فاژ Abp1 نسبت به *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* مورد سنجش قرار گرفت و حساسیتی نسبت به فاژ یافت نشد. با بررسی منحنی رشد، گزارش شد که فاژ Abp1 پس از ۱۰ دقیقه مرحله‌ی نهفتگی، در زمان ۱۵ دقیقه بعد از عفونت باکتری، مرحله‌ی آزادسازی اتفاق افتاد (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر، فاژ نسبت به *Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli* مورد بررسی قرار گرفت و تأثیری بر باکتری‌ها نداشت که با یافته‌های مطالعه‌ی حاضر هم‌خوانی دارد. همچنین، در این مطالعه بررسی منحنی رشد نشان داد که مرحله‌ی نهفتگی ۳۰ دقیقه به طول انجامید و مرحله‌ی آزادسازی فاژ در زمان ۴۰ دقیقه صورت گرفت که با نتایج مطالعه‌ی Huang (۲۱) همسو می‌باشد. با توجه به نتایج این مطالعه، باکتری‌فاژ توانست از رشد *Acinetobacter baumannii* مقاوم به چند دارو جلوگیری کند. همچنین، با بررسی تأثیر فاژ بر میزبان‌های مختلف، مشخص شد که فاژ جداسازی شده، فاژ اختصاصی *Acinetobacter baumannii* می‌باشد. بر اساس یافته‌های این مطالعه و همچنین، مطالعات مشابهی که بر روی سایر باکتری‌ها مانند استفاده از فاژ برای مقابله با *Escherichia coli* (۲۷)، *Pseudomonas aeruginosa* (۲۸) و عفونت تنفسی *Burkholderia cepacia* (۲۹) صورت گرفت، فاژ درمانی به عنوان یک روش درمانی تأیید می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از منحنی رشد فاژ که کاهش غلظت چشم‌گیر باکتری‌ها را در حضور فاژ طی دو مرحله و مرحله‌ی نهفتگی کوتاه مدت نشان می‌دهد و همچنین، با مطالعات بیشتر در زمینه‌ی فاژ درمانی، می‌توان فاژها را به عنوان یک نامزد مناسب برای مقابله با باکتری‌های مقاوم به دارو در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از طرح تحقیقاتی با کد طرح ۳۹۶۱۸۸ می‌باشد که با حمایت دانشگاه علوم پزشکی اصفهان اجرا گردید.

Acinetobacter baumannii به سیپروفلوکساسین و سفپیم و مقاومت نسبت به سفنازیدیم ۹۸ درصد گزارش شد (۲۴) که این نتایج، مشابه یافته‌های مطالعه‌ی حاضر می‌باشد.

در مطالعه‌ی هاشمی زاده و همکاران در شیراز، الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ۱۴۷ ایزوله‌ی بالینی *Acinetobacter baumannii* مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان مقاومت باکتری به آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین ۸۷ درصد، آمیکاسین ۸۱ درصد، سفنازیدیم ۷۲ درصد و ایمپنم ۷۲ درصد گزارش شد (۲۵). در مطالعه‌ی حاضر، میزان مقاومت به ترتیب ۹۹، ۸۲، ۹۶ و ۱۰۰ درصد بود. تفاوت در میزان مقاومت، نشان می‌دهد که میزان مقاومت *Acinetobacter baumannii* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها به طور روزافزون در حال افزایش است. همچنین، میزان مقاومت باکتری‌ها در شهرهای مختلف متفاوت است که می‌تواند به دلیل تنوع در سویه‌ها، زمان انجام مطالعه و روش‌های درمانی متفاوت باشد.

در مطالعه‌ی صادقی فرد و همکاران در تهران، میزان مقاومت *Acinetobacter baumannii* به آنتی‌بیوتیک‌های سفنازیدیم ۱۰۰ درصد و آمیکاسین ۵۲ درصد بیان شده است (۲۶).

با توجه به مقاومت *Acinetobacter baumannii* به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها، امروزه روش قابل دسترسی برای حذف این باکتری در بیمارستان وجود ندارد و فاژ درمانی، به عنوان روش جایگزینی برای مقابله با عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مقاوم به چند دارو مورد توجه قرار گرفته است. فاژها ویژگی بالایی نسبت به میزبان هدف خود دارند و تا زمان حذف کامل آن، به رشد ادامه می‌دهند و پس از حذف باکتری، خود نیز از بین می‌روند.

در این مطالعه، فاژ جداسازی شده نسبت به میزبان‌های مختلف مانند *Pseudomonas aeruginosa*، *Klebsiella pneumoniae* و *Escherichia coli* ارزیابی شد و هیچ کدام از باکتری‌ها، نسبت به فاژ حساسیت نشان ندادند که بیانگر ویژگی بالای فاژ نسبت به میزبان باکتریایی می‌باشد.

در مطالعه‌ی Shen و همکاران بر روی فاژ ϕ Km18p، نمونه‌ی *Acinetobacter baumannii* XDR از پنج مرکز پزشکی جداسازی شدند و با میزبان قرار دادن این باکتری، جداسازی فاژ از فاضلاب بیمارستان صورت گرفت. آنان با روش Spot، فاژ را بر روی باکتری قرار دادند و بیان کردند که بیشتر باکتری‌ها به فاژ حساسیت نشان دادند و تجزیه شدند. با بررسی میکروسکوپ الکترونی فاژ دارای سر شش وجهی با قطر ۵۹ نانومتر و فاقد دم و از لحاظ ریخت‌شناسی و اندازه، مشابه فاژ PM2 بود. این فاژ، از خانواده‌ی Corticoviridae می‌باشد (۱۹). در مطالعه‌ی حاضر، فاژ



References

1. Rynga D, Shariff M, Deb M. Phenotypic and molecular characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* isolated from Delhi, India. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2015; 14: 40.
2. Dahdouh E, Gomez-Gil R, Pacho S, Mingorance J, Daoud Z, Suarez M. Clonality, virulence determinants, and profiles of resistance of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from a Spanish hospital. *PLoS One* 2017; 12(4): e0176824.
3. Huenges K, Reinecke A, Bewig B, Haneya A, Cremer J. Lung transplantation in a multidrug-resistant gram-negative *Acinetobacter baumannii*-colonized patient: A case report. *Thorac Cardiovasc Surg Rep* 2016; 5(1): 16-7.
4. Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TS, Almeida JN, Duarte AJ. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of Sao Paulo, Brazil, over five years. *Braz J Infect Dis* 2017; 21(1): 98-101.
5. Walkty A, Karlowsky JA, Adam HJ, Lagace-Wiens P, Baxter M, Mulvey MR, et al. Frequency of MCR-1-mediated colistin resistance among *Escherichia coli* clinical isolates obtained from patients in Canadian hospitals (CANWARD 2008-2015). *CMAJ Open* 2016; 4(4): E641-E645.
6. Gurjar M. Colistin for lung infection: an update. *J Intensive Care* 2015; 3(1): 3.
7. Balaji V, Jeremiah SS, Baliga PR. Polymyxins: Antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. *Indian J Med Microbiol* 2011; 29(3): 230-42.
8. O'Sullivan L, Buttimer C, McAuliffe O, Bolton D, Coffey A. Bacteriophage-based tools: recent advances and novel applications. *F1000Res* 2016; 5: 2782.
9. Koskella B, Meaden S. Understanding bacteriophage specificity in natural microbial communities. *Viruses* 2013; 5(3): 806-23.
10. Wittebole X, De RS, Opal SM. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence* 2014; 5(1): 226-35.
11. Zhang D, Coronel-Aguilera CP, Romero PL, Perry L, Minocha U, Rosenfield C, et al. The use of a novel NanoLuc -based reporter phage for the detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Sci Rep* 2016; 6: 33235.
12. Joerger RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult Sci* 2003; 82(4): 640-7.
13. Safari M, Saidijam M, Bahador A, Jafari R, Alikhani MY. High prevalence of multidrug resistance and metallo-beta-lactamase (MbetaL) producing *Acinetobacter baumannii* isolated from patients in ICU wards, Hamadan, Iran. *J Res Health Sci* 2013; 13(2): 162-7.
14. Prashanth K, Badrinath S. Simplified phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* spp. and their antimicrobial susceptibility status. *J Med Microbiol* 2000; 49(9): 773-8.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne, PA: CLSI; 2011.
16. Walker J, Clokie M, Kropinski A. Bacteriophages: Methods and protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. Totowa, NJ: Humana Press; 2009.
17. Kusradze I, Karumidze N, Rigvava S, Dvalidze T, Katsitadze M, Amiranashvili I, et al. Characterization and testing the efficiency of *acinetobacter baumannii* phage vB-GEC_Ab-M-G7 as an antibacterial agent. *Front Microbiol* 2016; 7: 1590.
18. 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).
19. Shen GH, Wang JL, Wen FS, Chang KM, Kuo CF, Lin CH, et al. Isolation and characterization of phikm18p, a novel lytic phage with therapeutic potential against extensively drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 2012; 7(10): e46537.
20. Jin J, Li ZJ, Wang SW, Wang SM, Huang DH, Li YH, et al. Isolation and characterization of ZZ1, a novel lytic phage that infects *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *BMC Microbiol* 2012; 12: 156.
21. Huang G, Le S, Peng Y, Zhao Y, Yin S, Zhang L, et al. Characterization and genome sequencing of phage Abp1, a new phiKMV-like virus infecting multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol* 2013; 66(6): 535-43.
22. Russo A, Giuliano S, Ceccarelli G, Alessandri F, Giordano A, Brunetti G, et al. Comparison of septic shock due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* or *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in intensive care unit patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; 62(6).
23. Fallah A, Rezaee MA, Hasani A, Barhaghi MHS, Kafil HS. Frequency of bap and cpaA virulence genes in drug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and their role in biofilm formation. *Iran J Basic Med Sci* 2017; 20(8): 849-55.
24. Ardebili A, Azimi L, Mohammadi Barzelighi H, Owlia P, Beheshti M, Talebi M, et al. Determination of resistance pattern of isolated *Acinetobacter baumannii* from hospitalized burned patients in Motahari Hospital, Tehran. *J Zanjan Univ Med Sci* 2013; 20(83): 112-9. [In Persian].
25. Hashemizadeh Z, zargani A, Emami A, Rahimi M. *Acinetobacter* antibiotic resistance and frequency of ESBL-producing strains in ICU patients of Namazi Hospital (2008-2009). *J Qazvin Univ Med Sci*. 2010; 14 (2) :47-53. [In Persian].
26. Sadeghifard NK, Ranjbar R, Ghasemi A, Pakzad I, Zaeimi Yazdi J, Zaheri A, et al. A study of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* and non-*Acinetobacter baumannii* strains isolated from three hospitals in Tehran. *J Ilam Univ Med Sci* 2006; 14(3): 29-34. [In Persian].
27. Dalmasso M, Strain R, Neve H, Franz CM, Cousin FJ, Ross RP, et al. Three new *Escherichia coli* phages from the human gut show promising potential for phage therapy. *PLoS One* 2016; 11(6): e0156773.

28. Rossitto M, Fiscarelli EV, Rosati P. Challenges and promises for planning future clinical research into bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. An argumentative review. *Front Microbiol* 2018; 9: 775.

29. Semler DD, Lynch KH, Dennis JJ. The promise of bacteriophage therapy for *Burkholderia cepacia* complex respiratory infections. *Front Cell Infect Microbiol* 2011; 1: 27.

Investigation of the Characteristics of Multidrug-Resistant (MDR) *Acinetobacter Baumannii* Lytic Phage Isolated from the Intensive Care Unit

Behnam Sisakhtpour¹ , Vajihe Karbasizadeh², Saeedeh Ebrahimi³, Nafiseh Sadat Hosseini⁴,
Arezo Mirzaee⁵, Mehdi Shabani⁴, Reyhaneh Jafari⁶, Sharareh Moghim⁷ 

Original Article

Abstract

Background: The aim of this study was to isolate, characterize, and investigate the efficacy of specific phages against multidrug resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* to use them as an appropriate and effective method to replace antibiotic treatment, or be used as an antiseptic for the hospital surfaces.

Methods: In a cross-sectional study in a period of two years (2017-2019), 48 suspected *Acinetobacter baumannii* strains were isolated from patients admitted to the intensive care unit (ICU) in Alzahra hospital, Isfahan, Iran. First, the isolates were identified by phenotypic method, and confirmed with bla_{OXA-51} gene amplification. Then, the antibiotic sensitivity of isolates was assessed using disk diffusion method, and the isolation of phage from water sources was carried out. Finally, the sensitivity of *Acinetobacter baumannii* isolates, and different hosts to phage were investigated, and One-Step Growth Curve was detected.

Findings: All *Acinetobacter baumannii* isolates were confirmed, and the pattern of antibiotic resistance percentage was 99% to ciprofloxacin, 96% to ceftazidime, 97% to cefipime, 82% to amikacin, and 100% to imipenem. The specific phage was isolated from the sewage, 27 isolates of *Acinetobacter baumannii* were sensitive to phage, and other different hosts were not affected by the phages. Finally, after 30 minutes in the latent phase, phage was exploded during a period of 40 minutes.

Conclusion: According to the results of the effectiveness of phage in disturbing *Acinetobacter baumannii*, and considering the increasing rate of the resistance of it to most of the antibiotics and the difficulty of treating its infections, phage therapy can be used as a therapeutic approach for this infection.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, Multidrug resistance, Bacteriophages, Phage therapy

Citation: Sisakhtpour B, Karbasizadeh V, Ebrahimi S, Hosseini NS, Mirzaee A, Shabani M, et al. Investigation of the Characteristics of Multidrug-Resistant (MDR) *Acinetobacter Baumannii* Lytic Phage Isolated from the Intensive Care Unit. J Isfahan Med Sch 2019; 37(528): 564-71.

1- MSc Student, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- PhD Candidate, Department of Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- PhD Candidate, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- Department of Microbiology, School of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

6- Associate Professor, Department of Microbiology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Sharareh Moghim, Email: moghim@med.mui.ac.ir