

研究报告

一株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌噬菌体的分离鉴定和临床应用

刘自强^{1,2}, 潘勇军³, 谭新², 杨永清², 熊敏³, 周宁³, 侯洁薇³, 丁训梅³, 马迎飞^{*2}, 余加林^{*1,3}

- 1 重庆医科大学附属儿童医院新生儿科 国家儿童健康与疾病临床医学研究中心 儿童发育疾病研究教育部重点实验室 儿童感染免疫重庆市重点实验室, 重庆 404100
- 2 中国科学院深圳先进技术研究院 深圳合成生物学创新研究院 中国科学院定量工程生物学重点实验室, 广东 深圳 518055
- 3 南方科技大学医院, 广东 深圳 518055

刘自强, 潘勇军, 谭新, 杨永清, 熊敏, 周宁, 侯洁薇, 丁训梅, 马迎飞, 余加林. 一株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌噬菌体的分离鉴定和临床应用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 3035-3048.

LIU Ziqiang, PAN Yongjun, TAN Xin, YANG Yongqing, XIONG Min, ZHOU Ning, HOU Jiewei, DING Xunmei, MA Yingfei, YU Jialin. Isolation, identification, and clinical application of a novel phage targeting carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 3035-3048.

摘要:【背景】耐药菌感染是人类生命健康的重要威胁, 寻找抗生素替代或辅助疗法迫在眉睫, 噬菌体是细菌的天敌, 有很大的开发潜力。【目的】分离针对耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB)的烈性噬菌体, 治疗患者 CRAB 肺部感染, 为噬菌体疗法的推广积累经验。【方法】用 CRAB 临床菌株 NAB11B 做宿主菌, 从医院污水中分离新噬菌体, 进行生物学特征和基因组特点的表征、分析后制备成高纯度的噬菌体制剂, 通过雾化吸入的方式治疗肺部 CRAB 感染, 评估噬菌体疗法的有效性和安全性。【结果】分离到一株新噬菌体, 命名为 AB_SZL4, 其潜伏期短、增殖速度快、抑菌能力强、生物学稳定性高且不携带有害基因。在临床应用中, 噬菌体鸡尾酒联合抗生素疗法能快速清除肺部病原菌, 且未见明显噬菌体相关不良反应。【结论】AB_SZL4 是一株有极大临床应用潜力的烈性噬菌体。

关键词: 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌; 噬菌体; 生物学特性; 基因组学分析; 噬菌体疗法

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0903100); 国家自然科学基金面上项目(81971431); 深圳市科创委基础研究面上项目(JCYJ20220530112602005)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0903100), the National Natural Science Foundation of China (81971431), and the Basic Research Project of Shenzhen Science and Technology Innovation Commission (JCYJ20220530112602005).

*Corresponding authors. E-mail: MA Yingfei, yingfei.ma@siat.ac.cn; YU Jialin, yujialin486@163.com

Received: 2023-04-25; Accepted: 2023-06-05; Published online: 2023-06-15

Isolation, identification, and clinical application of a novel phage targeting carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

LIU Ziqiang^{1,2}, PAN Yongjun³, TAN Xin², YANG Yongqing², XIONG Min³, ZHOU Ning³, HOU Jiewei³, DING Xunmei³, MA Yingfei^{*2}, YU Jialin^{*1,3}

1 Department of Neonatology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Ministry of Education, Key Laboratory of Child Development and Disorders, Chongqing Key Laboratory of Child Infection and Immunity, Chongqing 404100, China

2 Chinese Academy of Sciences Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, Guangdong, China

3 Southern University of Science and Technology Hospital, Shenzhen 518055, Guangdong, China

Abstract: [Background] Infections by antibiotic-resistant pathogens pose tremendous threats to human health, and there is an urgent need to develop alternative or adjuvant therapies for classic antibiotics. Phages as the natural predators of bacteria demonstrate promising prospects in treating bacterial infections. **[Objective]** To isolate virulent phages against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) and then treat CRAB-caused pulmonary infection with the isolated phages. **[Methods]** We isolated new phages from hospital sewage by using the CRAB clinical strain NAB11B as the host bacteria and then studied the biological and genomic characteristics of the isolated phages. Subsequently, we employed aerosol inhalation of a phage cocktail to treat a patient with CRAB pulmonary infection. Finally, we evaluated the efficacy and safety of phage therapy. **[Results]** We isolated a novel phage AB_SZL4, which could produce a transparent plaque with a halo in NAB11B lawn and inhibit the growth of NAB11B at low multiplicity of infection (MOI). AB_SZL4 showed the latent period of about 15 min and the burst size of 75 PFU/cell. AB_SZL4 remained stable at pH 3.0–11.0 and 70 °C and below. There was no detrimental gene in the genome of AB_SZL4. NAB11B was eliminated following phage therapy combined with antibiotics within a week, and no phage-related side effect was observed. **[Conclusion]** AB_SZL4 is a potent lytic phage with great potential for clinical application.

Keywords: carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB); phage; biological characteristics; genomic analysis; phage therapy

噬菌体是一类能特异性感染并裂解其宿主菌的病毒，在抗生素耐药危机下，噬菌体不同于小分子抗生素的杀菌机制和天然抗生物膜能力让它有望成为抗生素疗法的辅助甚至替代疗法^[1]。

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)是一种非发酵革兰氏阴性杆菌，是常见的机会致病菌(opportunistic pathogen)，常引起住院患者的呼吸机相关性肺炎、中心静脉导管相关性血流感染和导管相关尿路感染等^[1]。鲍曼不动杆菌普遍

且复杂的耐药性和形成生物膜的能力极大地增加了其治疗难度,截至 2014 年在全球范围内约 63%的鲍曼不动杆菌分离株具有多重耐药性(multi-drug resistant, MDR),远远高于其他常见的革兰氏阴性病原菌,铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)中的 MDR 分离株仅占 8%^[3]。在中国,鲍曼不动杆菌是对碳青霉烯类抗生素产生耐药性最普遍的病原菌,耐药率在 2019–2020 年甚至达到 70%^[4],严重限制了临床抗菌药物的应用,大大增加了患者的死亡风险。因此,WHO 在 2017 年将耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, CRAB)列为迫切需要新型抗生素的 12 大超级细菌中最高优先级的病原菌(<https://www.who.int/zh/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>)。

2017 年美国食品及药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准了第一例噬菌体疗法紧急新药研究(emergency investigational new drug, eIND),研究者使用 4 种鲍曼不动杆菌噬菌体组成的噬菌体鸡尾酒制剂成功治疗了患者体内的多重耐药鲍曼不动杆菌感染^[5]。此后噬菌体疗法迎来了快速发展,成功治疗了各种难治性感染,如外科手术继发感染^[6-8]、主动脉弓假体感染^[9]、关节假体感染^[10-11]、泌尿系统感染^[12]、肺部感染^[13-14]和骨感染^[15-16]等。

为了治疗一例新冠患者并发的肺部 CRAB(仅对多粘菌素中介敏感)感染,本研究从环境中分离了一株烈性噬菌体,并对其进行生物学特性和基因组特征研究,确定了其抑菌能力强、增殖速度快、环境稳定性高和不携带有害基因等特点后,将它制备成高纯度的噬菌体制剂用于治疗该患者肺部的 CRAB 感染,以期噬菌体疗法的推广积累了经验。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

临床菌株 NAB11B 是由南方科技大学医院 ICU 潘勇军提供的一株 CRAB。全国范围内多家医院混合污水和噬菌体 AB_SZ6 由中国科学院深圳先进技术研究院微生物组学中心马迎飞课题组提供。

1.1.2 主要试剂和仪器

噬菌体保存缓冲液(SM Buffer)和氯化铯,生工生物工程(上海)股份有限公司;显色基质法鲎试剂盒, Bioendo 公司;病毒基因组提取试剂盒, TaKaRa 公司。超速离心机, Eppendorf 公司;铜网, 中科镜仪公司; Qubit 荧光仪和透射电子显微镜, Thermo Fisher Scientific 公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基参照文献^[17]配制, 固体培养基加 15 g/L 的琼脂, 半固体培养基加 0.7 g/L 的琼脂, 用于培养病原菌及噬菌体成斑。3×LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 30.0, 酵母提取物 15.0, 氯化钠 30.0, 用于新噬菌体分离。

1.2 噬菌体的分离与纯化

将医院污水在 4 °C、8 000×g 的条件下离心 8 min, 将上清通过 0.22 μm 滤膜过滤以去除杂质。取 200 μL 生长至 OD₆₀₀ 约为 0.5 的 NAB11B 菌液和 2 mL 的污水样品加入 1 mL 的 3×LB 培养基, 在 37 °C、220 r/min 条件下振荡培养 8 h。污水噬菌体富集液在 4 °C、8 000×g 的条件下离心 8 min 后, 经 0.22 μm 滤膜过滤以去除宿主菌等杂质, 并取 10 μL 污水噬菌体富集液在含 NAB11B 菌液的 LB 琼脂板上划线, 37 °C 恒温培养箱中培养过夜。挑取 NAB11B 菌板上的单个噬菌斑, 加入含 NAB11B 菌液的 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min 条件下振荡培养 8 h。重复上述噬菌体划线, 挑单个噬菌斑纯化 3 次至噬菌

体在 NAB11B 的菌板上形成形态均一的噬菌斑,纯化后的噬菌体铺板在 NAB11B 的双层平板上表征其噬菌斑形态,并保存于 4 °C。

1.3 噬菌体形态学观察

将氯化铯(cesium chloride, CsCl)密度梯度离心法纯化后的噬菌体固定在 200 目的进口铜网碳膜上,并用磷酸钨负染法将噬菌体染色后使用透射电子显微镜观察噬菌体形态^[18]。

1.4 噬菌体一步生长曲线测定

将宿主菌 NAB11B 培养至对数期,即细菌浓度为 1×10^8 CFU/mL,向 1 mL 的对数期宿主菌中加入 1 mL 的 1×10^6 PFU/mL 噬菌体,即感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.01,混匀后置于 37 °C、220 r/min 条件下振荡培养,并在第 0、5、10、20 和 30 分钟取样进行噬菌体计数,每个时间点重复 4 组。计算各时间点噬菌体滴度后绘制新噬菌体的一步生长曲线^[19]。

1.5 噬菌体温度敏感性测定

将 200 μ L 滴度为 2×10^8 PFU/mL 的新噬菌体分别置于 4、37、50、60、70 和 80 °C 中孵育 60 min,分别在第 0、10、20、30、40 和 60 分钟取样进行噬菌体计数,每个温度重复 4 组。得到新噬菌体在不同温度下孵育不同时间后的滴度^[18]。

1.6 噬菌体 pH 稳定性测定

使用 1 mol/mL 的 HCl 和 NaOH 溶液调整 SM 缓冲液(NaCl 100 mmol/L, MgSO₄ 8 mmol/L, Tris-HCl 5 mmol/L, gelatin 0.01%, pH 7.5)至 pH 值分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 和 13.0。向 180 μ L 各 pH 的 SM buffer 中分别加入 20 μ L 滴度为 2×10^9 PFU/mL 的新噬菌体,在 37 °C 孵育 60 min,分别在第 0 min 和第 60 分钟取样进行噬菌体计数,每个 pH 做 4 组重复。得到新噬菌体在不同 pH 条件下孵育 60 min 后的滴度^[18]。

1.7 噬菌体基因组提取

分别按质量分数 10%和终浓度 1 mol/L 向 50 mL 的新噬菌体裂解液中加入聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG) 8000 和 NaCl,置于 4 °C 过夜孵育以沉淀新噬菌体。4 °C、10 000 r/min 离心经 PEG 8000 孵育后的新噬菌体共 20 min,完全去除上清后用 1 mL 的 SM buffer 重悬噬菌体,并加入 10 U 的 DNase、6 U 的 RNase,在 37 °C 孵育 30 min 以去除宿主 DNA、RNA。使用病毒基因组提取试剂盒提取处理后噬菌体样品的基因组,经 Qubit 测定浓度后送华大研究院进行噬菌体全基因组二代测序,序列上传至 GenBank。

1.8 噬菌体基因组注释与分析

使用 SPAdes 软件^[20]拼接新噬菌体的基因组后,在 RAST 网站上(<https://rast.nmpdr.org/>)^[21]对新噬菌体基因组进行开放阅读框(open reading frame, ORF)预测和注释,将注释后的新噬菌体基因组分别上传至在线网站全面抗生素耐药性数据库(the comprehensive antibiotic resistance database, CARD) (<https://card.mcmaster.ca/>)^[22]和毒力因子数据库(virulence factor database, VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)^[23]进行耐药基因和毒力因子的预测,将上述预测结果通过在线网站(<https://proksee.ca/>)进行可视化。基于包括新噬菌体在内的 15 株鲍曼不动杆菌噬菌体的保守蛋白(末端酶大亚基和主要衣壳蛋白)的氨基酸序列使用 MEGA X 构建系统发育树,氨基酸序列对齐方式选择 ClustalW 多重比对,建树方法采用邻接法并进行 1 000 次 bootstrap 检验^[18]。

1.9 噬菌体的筛选及抑菌能力表征

针对 NAB11B 分离新噬菌体的同时,本实验室鲍曼不动杆菌噬菌体库中的 AB_SZ6^[24]也对 NAB11B 敏感。为了进一步确定新噬菌体和

AB_SZ6 对患者体内 CRAB 的抑菌效果, 将 NAB11B 作为宿主菌, 分别测定了新噬菌体、AB_SZ6 及二者联用在 MOI 为 0.001 条件下的抑菌曲线。将 NAB11B 培养至 OD_{600} 约为 0.5 后, 调整菌液浓度至 1×10^8 CFU/mL, 向 96 孔板中分别加入 100 μ L 即 1×10^7 CFU 的宿主菌, 再分别加入 1×10^4 PFU 的新噬菌体、AB_SZ6 及鲍曼不动杆菌噬菌体鸡尾酒, 37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养, 每 15 min 测量一次 OD_{600} , 共测量 24 h。

1.10 噬菌体制剂的制备

采用 CsCl 密度梯度离心法去除噬菌体裂解液中内毒素、宿主蛋白等杂质^[25], 向 8 mL 滴度在 1×10^{11} PFU/mL 的噬菌体裂解液中分别加入 1 mL 密度为 1.3、1.5 和 1.7 g/mL 的 CsCl 溶液, 4 $^{\circ}$ C、24 000 r/min 离心 2.5 h 后得到噬菌体, 经 SM buffer 透析去除 CsCl 后进行滴度检测并使用显色基质法鲎试剂盒进行内毒素检测。

1.11 噬菌体临床治疗

在患者及家属知情同意且取得南方科技大学医院伦理委员会批准(审批号为医学伦理委员会 2023 年伦审第 01 号)后开始对患者肺部感染进行噬菌体治疗, 将 1 mL 滴度为 6×10^9 PFU/mL 的噬菌体鸡尾酒制剂稀释至 4 mL 后给予患者雾化吸入, 每日 2 次, 共治疗 14 d, 并先后联合盐酸左氧氟沙星(0.5 g iv. q.d, 2023 年 2 月 20 日–2023 年 3 月 5 日)、异帕米星(0.2 g iv. b.i.d, 2023 年 3 月 5 日–2023 年 3 月 9 日)和米诺环素(0.1 g po. b.i.d, 2023 年 3 月 7 日–2023 年 3 月 9 日)等抗生素治疗。在患者开始噬菌体治疗前及噬菌体治疗开始后第 1、3、5、7 和 11 天抽血检测白细胞计数(white blood count, WBC)、C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、降钙素原(procalcitonin, PCT)和白介素 6 (interleukin-6,

IL-6)等炎症指标, 并记录患者噬菌体治疗前后平均血压(mean blood pressure, MBP)和体温(temperature, T)等生命体征以及谷氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)、肌酐(creatinine, Cr)等肝肾功能指标, 以评估噬菌体是否引起不良反应。

2 结果与分析

2.1 噬菌体形态

从污水中分离到的噬菌体可在含宿主菌 NAB11B 的双层琼脂平板上形成形状大小均一、直径约为 1.5 mm 的透亮噬菌斑, 且边缘伴有直径约为 3 mm 的半透明抑菌环, 命名为 AB_SZL4 (GenBank 登录号为 OQ828462) (图 1A)。透射电镜结果显示噬菌体 AB_SZL4 有一多边形的头部, 直径约为 59 nm, 尾巴长度约为 90 nm、宽度约为 13 nm, 可见清晰的底盘, 底盘宽度约为 32 nm (图 1B), 噬菌体 AB_SZ6 的电镜照片提示其形态学属于短尾噬菌体^[24]。

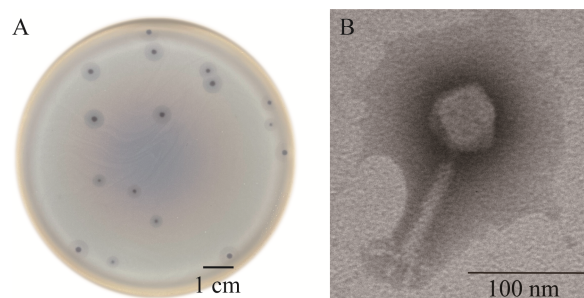


图 1 噬菌体 AB_SZL4 的形态 A: AB_SZL4 在 NAB11B 菌板上的噬菌斑形态. B: AB_SZL4 的电镜形态

Figure 1 Morphology of phage AB_SZL4. A: The plaque formed by AB_SZL4 on the bacterial lawn of NAB11B. B: The morphology of AB_SZL4 revealed by transmission electron microscope.

2.2 噬菌体生物学特性

在 MOI 为 0.01 条件下测定噬菌体 AB_SZL4 的一步生长曲线,在噬菌体和宿主菌共孵育最初的 10 min 内噬菌体滴度会下降约 98%,第 10–20 分钟噬菌体滴度快速上升,第 20–30 分钟滴度缓慢上升,如图 2A 所示,噬菌体的潜伏期约为 10 min,暴发量约为 75 PFU/cell。

噬菌体 AB_SZL4 显示出很好的热稳定性,在 4、37、50 和 60 °C 条件下均能在 60 min 内保持滴度不下降;在 70 °C 条件下 AB_SZL4 在 10 min 内滴度降低 90%、60 min 后滴度降低 99.5%,但仍能保持 1×10^6 PFU/mL 的滴度;而在 80 °C 条件下 AB_SZL4 会迅速死亡,仅 10 min 后便再无噬菌体检出,见图 2B。

噬菌体 AB_SZL4 在不同 pH 条件下孵育 60 min 后的滴度表明噬菌体 AB_SZL4 在 pH 值为 3.0–11.0 的环境下仍有生物学活性,pH 值为 6.0–9.0 是最适合噬菌体 AB_SZL4 生长的环境,pH 值大于 9.0 和小于 6.0 时噬菌体 AB_SZL4 的滴度会快速下降,当 pH 值达到 12.0 及以上或 2.0 以下时 AB_SZL4 将完全丧失生物学活性,见图 2C。

2.3 噬菌体全基因组分析

噬菌体 AB_SZL4 的全基因组测序和拼接结果显示,其基因组为环形双链 DNA,长度为 44 398 bp,GC 含量为 38%。AB_SZL4 的基因组核酸序列经过 BLASTn 比对,与噬菌体 *Acinetobacter* phage Arbor (GenBank 登录号为 ON237674.1)最为相似,在 90% 的覆盖度情况下有 98.24% 的序列一致性。RAST 网站预测出噬菌体 AB_SZL4 一共有 86 个开放阅读框(open reading forum, ORF),其中 73 个 ORF 在正义链、13 个 ORF 在反义链上,它们编码 8 个噬菌体结构相关蛋白,包括头部蛋白(ORF52、ORF53)、衣壳蛋白(ORF64)、底盘蛋白(ORF76、ORF83)和

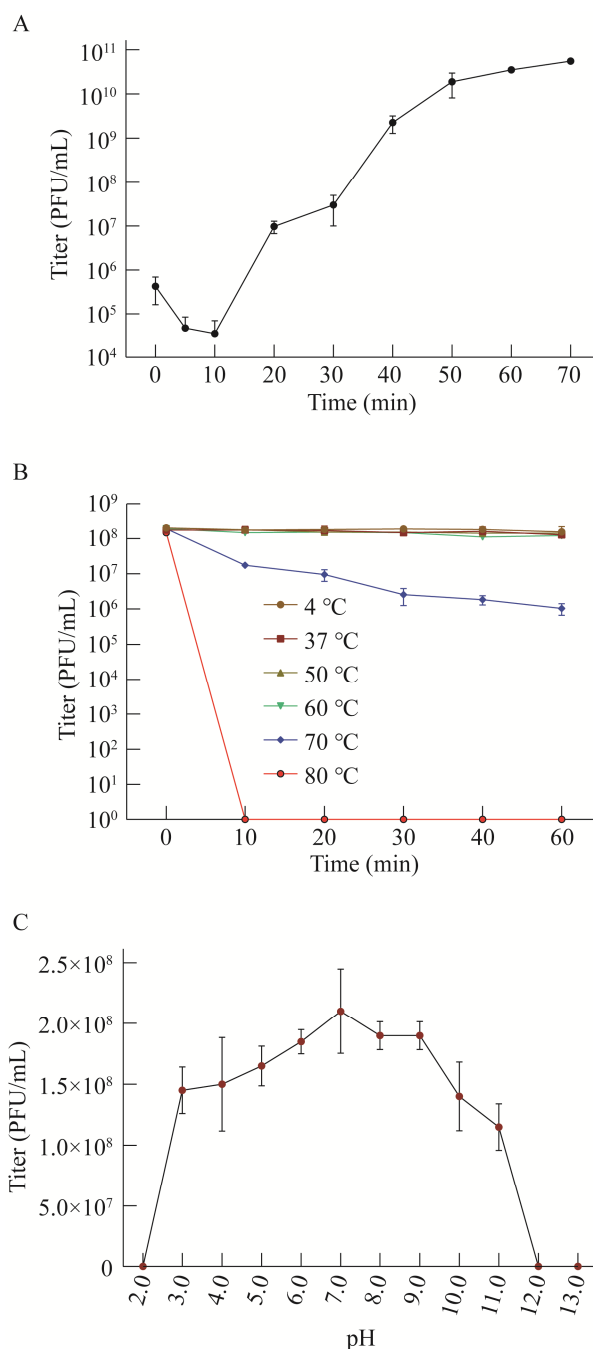


图2 噬菌体 AB_SZL4 的生物学特性 A: AB_SZL4 的一步生长曲线. B: AB_SZL4 的热稳定性. C: AB_SZL4 的 pH 稳定性

Figure 2 Biological characteristic of phage AB_SZL4. A: One-step growth curve of phage AB_SZL4. B: Temperature stability of phage AB_SZL4. C: pH stability of phage AB_SZL4.

尾丝蛋白(ORF1、ORF85 和 ORF86); 6 个和 DNA 复制、修复和代谢相关蛋白, 包括 DNA 结合蛋白(ORF85)、DNA 解旋酶(ORF27)、DNA 重组修复蛋白(ORF12)、DNA 内切酶(ORF4、ORF35 和 ORF39); 4 个噬菌体包装相关蛋白, 包括末端酶(ORF49、ORF50)、门户蛋白(ORF51)和 RHS 重复核心蛋白(ORF48); 3 个宿主裂解相关蛋白, 包括溶菌酶(ORF76)、裂解酶(ORF5)和防多病毒感染蛋白(ORF30); 2 个噬菌体转录、翻译相关蛋白, 包括 RNA 聚合酶(ORF68)和转录调节因子(ORF16); 1 个其他蛋白即 NTP 水解酶(ORF7)和 62 个未知功能蛋白。通过 CARD 和 VFDB 网站预测出噬菌体

AB_SZL4 基因组中不携带抗生素耐药基因和毒力因子基因, 所有拼接和预测结果通过 Proksee 软件进行可视化处理, 见图 3。噬菌体 AB_SZ6 基因组长度为 40 565 bp, 属于 Friunavirus (GenBank 登录号为 ON513429)^[24]。

基于末端酶大亚基构建的系统发育树和基于主要衣壳蛋白构建的系统发育树均显示噬菌体 AB_SZL4 与不动杆菌噬菌体 Cato 亲缘关系最近, 属于 Caudoviricetes 的 Obolenskivirus (图 4)。

2.4 噬菌体对 NAB11B 的抑菌能力

单独使用噬菌体 AB_SZL4、AB_SZ6 及二者联用都能对病原菌 NAB11B 展现出较强的抑菌效果, 在 MOI=0.001 的条件下, 单用噬菌体

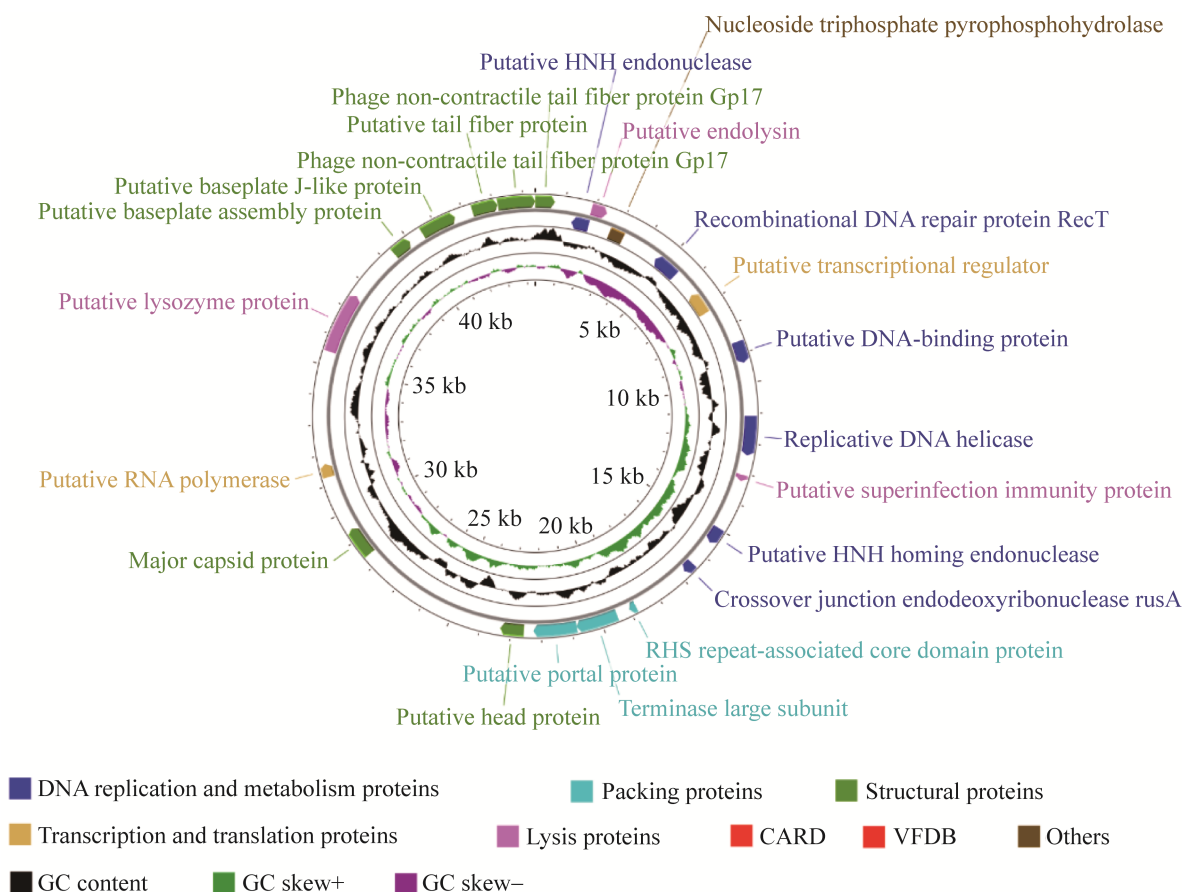


图 3 噬菌体 AB_SZL4 的全基因组图谱

Figure 3 Genome map of phage AB_SZL4.

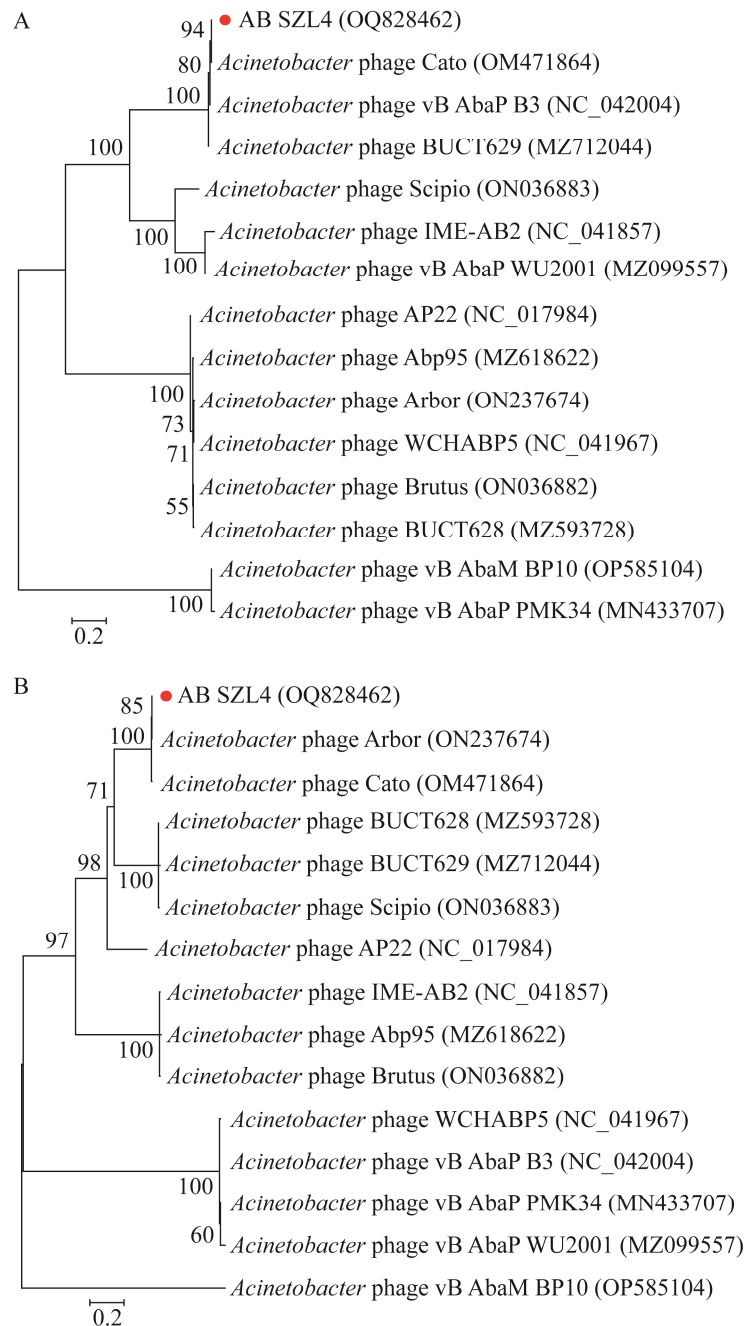


图 4 噬菌体 AB_SZL4 系统发育关系分析 A: 基于末端大亚基构建的系统发育树. B: 基于主要衣壳蛋白构建的系统发育树. 括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表可信度, 数值越接近 100, 可信度越强; 标尺: 代表遗传距离, 标尺越短代表亲缘关系越近

Figure 4 Phylogenetic relationships of phage AB_SZL4. A: Phylogenetic tree based on terminase large subunit. B: Phylogenetic tree based on capsid protein. The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the phage; The number on the branch point represents the credibility, the closer the value is to 100, the stronger the credibility is; Scale: The genetic distance, the shorter the ruler is, the closer the relationship is.

AB_SZL4或AB_SZ6能完全抑制NAB11B的生长约8 h,而二者组成的鸡尾酒可以在24 h内完全抑制NAB11B的生长,见图5。因此,应用该鸡尾酒组合可以更好地控制由NAB11B引发的感染。

2.5 噬菌体的临床应用

接受噬菌体AB_SZL4治疗的患者情况:91岁男性,既往高血压3级很高危组、冠心病、慢性心力衰竭、心功能4 IV级、慢性肺栓塞、2型糖尿病等;2023年1月4日无明显诱因出现气喘、伴呼吸困难,因“气喘伴呼吸困难2 h”入院,胸部CT提示双侧肺炎,以“重症肺炎”收入南方科技大学医院呼吸科;入院后患者新冠筛查阳性,且先后从痰液中培养出纹带棒状杆菌、CRAB、耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)和伊丽莎白菌等;患者先后经过了哌拉西林他唑巴坦(4.5 g iv. t.i.d, 2023年1月5日–2023年1月20日和2023年2月7日–2023年2月19日)、米诺环素(0.1 g po. b.i.d, 2023年1月16日–2023年1月23日)、美罗培南(1.0 g iv. Qid, 2023年1月21日–2023年1月23日)、万古霉素(1.0 g iv.

b.i.d, 2023年1月21日–2023年2月6日)、头孢哌酮钠舒巴坦钠(3.0 g iv. t.i.d, 2023年1月24日–2023年2月6日)、多粘菌素(50 mg iv. b.i.d, 2023年1月24日–2023年2月6日)、多粘菌素(25 mg inh. b.i.d, 2023年1月25日–2023年2月6日)等抗生素的治疗,但均无法彻底清除肺部病原菌,2023年1月20日痰培养仍提示大量CRAB(+++),药敏提示仅对多粘菌素中介敏感,见图6。

纯化后的噬菌体AB_SZL4和AB_SZ6各取 3×10^9 PFU组成噬菌体鸡尾酒制剂,其中内毒素含量仅6.9 EU/剂,在2023年1月23日–2023年2月9日(图6, D1–D13)被用于治疗患者肺部CRAB的感染,治疗过程见图6。开始噬菌体治疗后患者再未出现发热,血流动力学也保持稳定,WBC、CRP、IL-6和PCT等炎症指标从噬菌体治疗第3天起快速下降至正常范围,痰培养也从第3天开始连续两天阴性,虽然在第6天再次培养出少量CRAB(+),但很快被再次清除并再未检出。在噬菌体治疗第10天,患者家属要求将患者转入普通病房进行关怀治疗,患者在噬菌体治疗第14天出现血氧饱和度及心率、血压下降,家属拒绝心肺复苏、电除颤、气管插管和使用升压药物等抢救措施,最终死于重症肺炎、急性呼吸窘迫综合征、心力衰竭、肾功能衰竭。在整个噬菌体治疗过程中,患者的肝功能保持稳定,AST始终在50 U/L以下,ALT始终在50 U/L左右,Cr也从第6天开始快速下降,见图7,未见其他明显噬菌体相关不良反应。

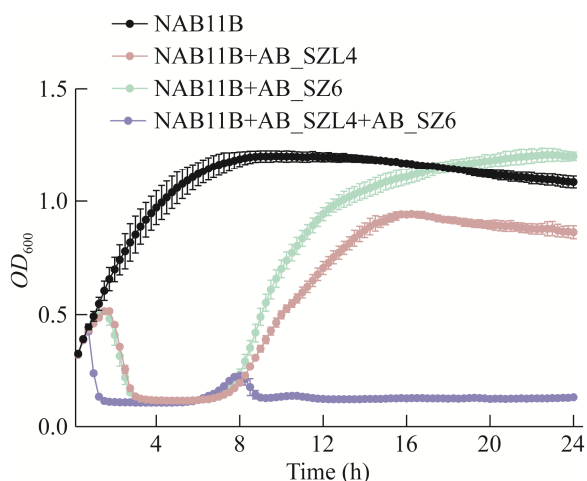


图5 噬菌体对NAB11B的抑菌曲线

Figure 5 Bacteriocidal curve of phages on NAB11B.

3 讨论与结论

抗生素是一项伟大的发现,其广泛应用拯救了无数人的生命,但随着抗生素的广泛应用甚至滥用,抗生素耐药的问题日益严重,耐药菌感染相关的死亡人数在2019年就达到了

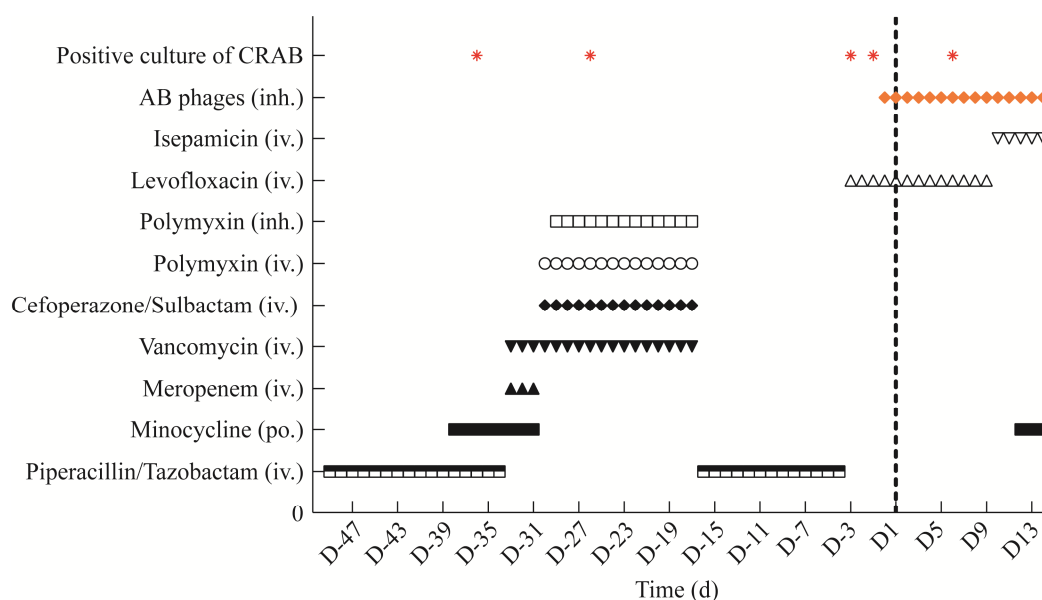


图6 临床时间线 D1: 开始噬菌体疗法的第1天; D-47: 噬菌体疗法开始前的第47天; iv.: 静脉给药; po.: 口服给药; inh.: 雾化给药

Figure 6 Clinical timeline. D1: The first day of phage therapy; D-47: The 47th day before phage therapy; iv.: Intravenous administration; po.: Oral administration; inh.: Inhalation.

495万人^[26]。鲍曼不动杆菌是重要的耐药菌之一, 2019年中国的鲍曼不动杆菌分离株中CRAB占比在70%左右, 而在俄罗斯、印度和一些非洲及南美国家CRAB的占比甚至大于80%^[27]。鲍曼不动杆菌是重要的院内病原菌, 常引起呼吸机相关性肺炎、血流导管相关感染和导尿管相关感染等院内感染, 这些导管给鲍曼不动杆菌创造了形成生物膜的有利条件, 生物膜对抗生素和宿主免疫系统有很强的抗性^[28], 给鲍曼不动杆菌感染的治疗带来了极大的困难。然而噬菌体具有独特的宿主菌裂解机制和非常丰富的生物多样性, 理论上针对所有的细菌感染性疾病都能找到对应的噬菌体用作治疗, 因此噬菌体疗法有望成为抗生素的替代或辅助疗法, 鲍曼不动杆菌噬菌体也已经有多次治疗多重耐药鲍曼不动杆菌感染的成功经验^[5-7,14]。

本研究针对患者肺部的一株CRAB

(NAB11B)从污水中分离到一株产裂解酶的烈性噬菌体(AB_SZL4)。通过一步生长曲线发现噬菌体AB_SZL4的潜伏期仅10 min左右, 快于其他鲍曼不动杆菌噬菌体^[19], 可以很快发挥出对宿主菌的杀灭作用。75 PFU/cell的暴发量使AB_SZL4的滴度可以快速达到 10^{10} PFU/mL以上, 这可以缩短噬菌体临床应用前的制备时间。AB_SZL4噬菌体的稳定性较强, 在pH值为3.0-11.0的环境下仍能保持较高的生物学活性, 60℃及以下的温度也能稳定存在, 这使其能在人体内的绝大多数部位稳定存在, 有望在未来应用在多部位鲍曼不动杆菌感染的治疗上。AB_SZL4抑菌能力较强, 即使在很少噬菌体存在的情况下(MOI=0.001)也能完全抑制宿主菌NAB11B的生长约8 h以上, 甚至在联合噬菌体AB_SZ6使用时可以完全抑制宿主菌NAB11B的生长24 h以上, 且基因组中不携带耐药基因和毒力因子, 具有较大的临床应用潜力。

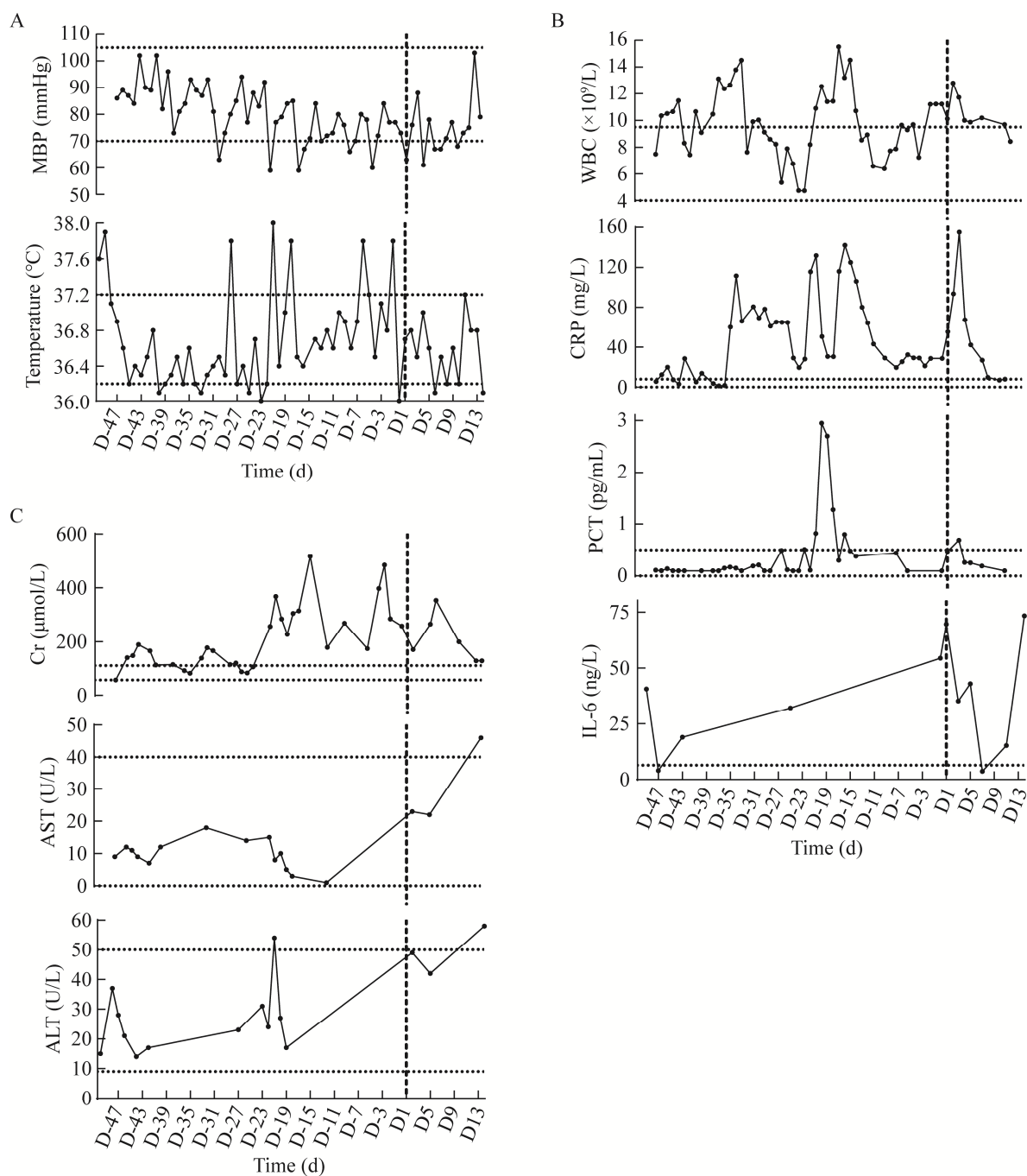


图 7 患者临床指标 A: 平均血压及体温. B: 白细胞计数、C 反应蛋白、降钙素原和白介素 6. C: 肌酐、门冬氨酸氨基转移酶和谷丙转氨酶. D1: 开始噬菌体疗法的第 1 天; D-47: 噬菌体疗法开始前的第 47 天

Figure 7 Clinical indicators of the patient. A: Blood pressure and temperature. B: White blood cells, C-reactive protein, procalcitonin and interleukin-6. C: Creatinine, aspartate transaminase and alanine aminotransferase. D1: The first day of phage therapy; D-47: The 47th day before phage therapy.

含噬菌体 AB_SZL4 的噬菌体鸡尾酒制剂在患者体内同样展现出很强的抑菌能力, 患者肺部 CRAB 菌量在噬菌体治疗开始后快速下降, 从痰培养大量 CRAB 至 3 d 后痰培养转阴, WBC、CRP、IL-6 和 PCT 等炎症指标也开始下降。虽然噬菌体治疗第 8 天再次培养出少量的 CRAB, 中性粒细胞计数也小幅上升, 但 CRP 仍稳步下降, 并从噬菌体治疗第 10 天后再未从痰液中检出 CRAB。遗憾的是, 患者最终因家属放弃治疗而死于重症肺炎、急性呼吸窘迫综合征、心力衰竭、肾功能衰竭, 但噬菌体在很短时间内清除了患者体内大量的 CRAB (3 次痰培养阴性) 仍证明噬菌体疗法的有效性, 而且在整个噬菌体治疗过程中, 患者的 ALT 和 AST 始终保持稳定, Cr 也呈下降趋势, 未观察到明显的噬菌体相关副反应。

本研究从环境中分离到一株裂解能力强、生物稳定性强、增殖速度快的烈性噬菌体, 且不携带耐药基因和毒力因子等有害基因, 并成功清除了一名患者肺部的 CRAB, 为多重耐药鲍曼不动杆菌引起难治性感染性疾病的治疗提供了新的治疗手段。

REFERENCES

- [1] CHEN X, LIU M, ZHANG PF, XU M, YUAN WH, BIAN LM, LIU YN, XIA J, LEUNG SSY. Phage-derived depolymerase as an antibiotic adjuvant against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 845500.
- [2] WEINER LM, WEBB AK, LIMBAGO B, DUDECK MA, PATEL J, KALLEN AJ, EDWARDS JR, SIEVERT DM. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2011–2014[J]. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2016, 37(11): 1288-1301.
- [3] GIAMMANCO A, CALÀ C, FASCIANA T, DOWZICKY MJ. Global assessment of the activity of tigeicycline against multidrug-resistant Gram-negative pathogens between 2004 and 2014 as part of the tigeicycline evaluation and surveillance trial[J]. *mSphere*, 2017, 2(1): e00310-e00316.
- [4] 李耘, 郑波, 吕媛, 薛峰, 张秀珍, 胡云建, 金玉芬, 胡志东, 赵建宏, 潘世扬, 李华茵, 俞云松, 李艳, 刘文恩, 刘德华, 费樱, 刘智勇, 徐修礼, 裴凤艳, 孟灵, 等. 中国细菌耐药监测(CARST)研究 2019–2020 革兰氏阴性菌监测报告[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(5): 432-452.
LI Y, ZHENG B, LÜ Y, XUE F, ZHANG XZ, HU YJ, JIN YF, HU ZD, ZHAO JH, PAN SY, LI HY, YU YS, LI Y, LIU WE, LIU DH, FEI Y, LIU ZY, XU XL, PEI FY, MENG L, et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms: results from China antimicrobial resistance surveillance trial (CARST) program, 2019–2020[J]. *The Chinese Journal of Clinical Pharmacology*, 2022, 38(5): 432-452 (in Chinese).
- [5] SCHOOLEY RT, BISWAS B, GILL JJ, HERNANDEZ-MORALES A, LANCASTER J, LESSOR L, BARR JJ, REED SL, ROHWER F, BENLER S, SEGALL AM, TAPLITZ R, SMITH DM, KERR K, KUMARASWAMY M, NIZET V, LIN L, MCCAULEY MD, STRATHDEE SA, BENSON CA, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(10): e00954-e00917.
- [6] LAVERGNE S, HAMILTON T, BISWAS B, KUMARASWAMY M, SCHOOLEY RT, WOOTEN D. Phage therapy for a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* craniectomy site infection[J]. *Open Forum Infectious Diseases*, 2018, 5(4): ofy064.
- [7] van NIEUWENHUYSE B, van der LINDEN D, CHATZIS O, LOOD C, WAGEMANS J, LAVIGNE R, SCHROVEN K, PAESHUYSE J, de MAGNÉE C, SOKAL E, STÉPHENNE X, SCHEERS I, RODRIGUEZ-VILLALOBOS H, DJEBARA S, MERABISHVILI M, SOENTJENS P, PIRNAY JP. Bacteriophage-antibiotic combination therapy against extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection to allow liver transplantation in a toddler[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 5725.
- [8] RUBALSKII E, RUEMKE S, SALMOUKAS C, BOYLE EC, WARNECKE G, TUDORACHE I, SHRESTHA M, SCHMITTO JD, MARTENS A,

- ROJAS SV, ZIESING S, BOCHKAREVA S, KUEHN C, HAVERICH A. Bacteriophage therapy for critical infections related to cardiothoracic surgery[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(5): 232.
- [9] CHAN BK, TURNER PE, KIM S, MOJIBIAN HR, ELEFTERIADES JA, NARAYAN D. Phage treatment of an aortic graft infected with *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2018, 2018(1): 60-66.
- [10] DOUB JB, JOHNSON AJ, NANDI S, NG V, MANSON T, LEE M, CHAN B. Experience using adjuvant bacteriophage therapy for the treatment of 10 recalcitrant periprosthetic joint infections: a case series[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2023, 76(3): e1463-e1466.
- [11] TKHILAISHVILI T, WINKLER T, MÜLLER M, PERKA C, TRAMPUZ A. Bacteriophages as adjuvant to antibiotics for the treatment of periprosthetic joint infection caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019, 64(1): e00924-19.
- [12] BAO J, WU NN, ZENG YG, CHEN LG, LI LL, YANG L, ZHANG YY, GUO MQ, LI LS, LI J, TAN DM, CHENG MJ, GU JM, QIN JH, LIU JZ, LI SR, PAN GQ, JIN X, YAO BX, GUO XK, et al. Non-active antibiotic and bacteriophage synergism to successfully treat recurrent urinary tract infection caused by extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 771-774.
- [13] CHEN PF, LIU ZQ, TAN X, WANG HJ, LIANG YY, KONG YJ, SUN WX, SUN LQ, MA YF, LU HZ. Bacteriophage therapy for empyema caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *BioScience Trends*, 2022, 16(2): 158-162.
- [14] TAN X, CHEN HS, ZHANG M, ZHAO Y, JIANG YC, LIU XY, HUANG W, MA YF. Clinical experience of personalized phage therapy against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lung infection in a patient with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 631585.
- [15] FERRY T, KOLENDA C, LAURENT F, LÉBOUCHER G, MERABISCHVILLI M, DJEBARA S, GUSTAVE CA, PERPOINT T, BARREY C, PIRNAY JP, RESCH G. Personalized bacteriophage therapy to treat pandrug-resistant spinal *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 4239.
- [16] NIR-PAZ R, GELMAN D, KHOURI A, SISSON BM, FACKLER J, ALKALAY-OREN S, KHALIFA L, RIMON A, YERUSHALMY O, BADER R, AMIT S, COPPENHAGEN-GLAZER S, HENRY M, QUINONES J, MALAGON F, BISWAS B, MOSES AE, MERRIL G, SCHOOLEY RT, BROWNSTEIN MJ, et al. Successful treatment of antibiotic-resistant, poly-microbial bone infection with bacteriophages and antibiotics combination[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2019, 69(11): 2015-2018.
- [17] 刘梅, 张新建, 周方园. 葱地种蝇幼虫伴生细菌多样性及两种培养基分离效果比较[J]. *福建农业学报*, 2022, 37(1): 84-95.
- LIU M, ZHANG XJ, ZHOU FY. Diversity and isolation of symbiotic bacteria on *Delia antiqua* larvae[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37(1): 84-95 (in Chinese).
- [18] CHEN L, LIU Q, FAN JQ, YAN TW, ZHANG HR, YANG JF, DENG D, LIU CL, WEI T, MA YF. Characterization and genomic analysis of ValSw3-3, a new *Siphoviridae* bacteriophage infecting *Vibrio alginolyticus*[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(10): e00066-20.
- [19] JIANG LL, TAN JJ, HAO Y, WANG Q, YAN XR, WANG DL, TUO L, WEI ZR, HUANG GT. Isolation and characterization of a novel myophage Abp9 against pandrug resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 506068.
- [20] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, GUREVICH AA, DVORKIN M, KULIKOV AS, LESIN VM, NIKOLENKO SI, PHAM S, PRJIBELSKI AD, PYSHKIN AV, SIROTKIN AV, VYAHNI N, TESLER G, ALEKSEYEV MA, PEVZNER PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. *Journal of Computational Biology: a Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 2012, 19(5): 455-477.
- [21] AZIZ RK, BARTELS D, BEST AA, DEJONGH M, DISZ T, EDWARDS RA, FORMSMA K, GERDES S, GLASS EM, KUBAL M, MEYER F, OLSEN GJ, OLSON R, OSTERMAN AL, OVERBEEK RA, MCNEIL LK, PAARMANN D, PACZIAN T, PARRELLO B, PUSCH GD, et al. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9: 75.
- [22] JIA BF, RAPHENYA AR, ALCOCK B, WAGLECHNER N, GUO PY, TSANG KK, LAGO BA, DAVE BM, PEREIRA S, SHARMA AN, DOSHI S, COURTOT M, LO R, WILLIAMS LE, FRYE JG, ELSAYEGH T,

- SARDAR D, WESTMAN EL, PAWLOWSKI AC, JOHNSON TA, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D566-D573.
- [23] CHEN LH, YANG J, YU J, YAO ZJ, SUN LL, SHEN Y, JIN Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(suppl_1): D325-D328.
- [24] TAN X, CHEN K, JIANG ZH, LIU ZQ, WANG SY, YING Y, ZHANG JQ, YUAN SJ, HUANG ZP, GAO RY, ZHAO M, WENG AT, YANG YQ, LUO HL, ZHANG DZ, MA YF. Phage administration with repeated intravenous doses leads to faster phage clearance in mammalian hosts[J]. bioRxiv, 2023. DOI: 10.1101/2023.03.10.532150.
- [25] LUONG T, SALABARRIA AC, EDWARDS RA, ROACH DR. Standardized bacteriophage purification for personalized phage therapy[J]. Nature Protocols, 2020, 15(9): 2867-2890.
- [26] WAGENLEHNER FME, DITTMAR F. Re: global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. European Urology, 2022, 82(6): 658.
- [27] COLLABORATORS AR. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. Lancet (London, England), 2022, 399(10325): 629-655.
- [28] HARDING CM, HENNON SW, FELDMAN MF. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(2): 91-102.