

DOI:10.13350/j.cjpb.241013

• 论著 •

耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌裂解性噬菌体 PA103 的生物学特性及全基因组分析^{*}

张改¹,靳静^{1**},陈松建¹,王书伟¹,李振江¹,刘肖¹,李亚辉¹,张欢欢¹,王山梅²

(1. 河南医学高等专科学校病原生物学与免疫学教研室,河南郑州 451191;2. 河南省人民医院检验科)

【摘要】目的 探讨耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*,CRAB)噬菌体PA103的生物学特性及全基因组信息。方法 以CRAB临床菌株A103为宿主菌,采用双层平板法在市政污水中分离得到1株裂解性噬菌体PA103;通过双层平板法观察噬菌斑形态;通过透射电镜观察噬菌体形态特征;调查PA103的噬菌谱、一步生长曲线及对温度和酸碱的稳定性;应用蛋白酶K/SDS法提取噬菌体基因组DNA;对PA103进行基因组测序、拼装;用RAST在线预测软件对基因组中可能存在的开放读码框进行预测;用MEGA 11.0软件以末端酶大亚基构建进化树,用Mauve软件进行比较基因组学分析。**结果** 试验分离得到1株可以裂解CRAB的裂解性噬菌体,命名为PA103;它可以在宿主菌A103的菌苔上形成直径约2 mm完全透明的噬菌斑,周围环绕宽为3~4 mm的半透明晕环;透射电镜显示PA103属于有尾噬菌体,头部和尾部直径长度约64 nm和120 nm;一步生长曲线显示PA103的潜伏期约为40 min,爆发期约为15 min,爆发量约为17 PFU/cell;噬菌体PA103在50、60 °C,pH 5.0~9.0的环境下,均能保持相对稳定的活性;PA103的基因组全长45 225 bp,G+C含量为37.82%,全基因组预测含86个开放阅读框,其中29个为功能蛋白,其余57个被注释为假定蛋白;共线性分析结果显示噬菌体PA103与噬菌体LZ35的局部共线性区域的数目、方向、排列顺序和长度非常相似;进化树构建结果显示噬菌体PA103应属于*Obolenskviru*属成员。**结论** 新型噬菌体PA103具有较强的鲍曼不动杆菌裂解能力,可为噬菌体防治耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌的感染提供参考。

【关键词】 耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌;噬菌体;生物学特性;基因组分析**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2024)10-1182-07[*Journal of Pathogen Biology*. 2024 Oct.;19(10):1182-1188,1193.]

Biological characteristics and whole genome analysis of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lytic phage PA103

ZHANG Gai¹, JIN Jing¹, CHEN Songjian¹, WANG Shuwei¹, LI Zhenjiang¹, LIU Xiao¹, LI Yahui¹, ZHANG Huanhuan¹, WANG Shanmei² (1. *Pathogenic Biology and Immunology Teaching and Research Office of Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China*; 2. *Laboratory of Henan Provincial People's Hospital*) ***

【Abstract】 **Objective** To investigate the biological characteristics and whole genome information of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) phage PA103. **Methods** Using CRAB clinical strain A103 as the host bacterium, a lytic phage PA103 was isolated from municipal wastewater using a double-layer plate assay technique; Observe the morphology of plaques using the double-layer plate assay technique; Observe the morphological characteristics of phages through transmission electron microscopy; Investigate the phage spectrum, one-step growth curve, and stability to temperature and acidity/alkalinity of PA103; Extract phage genomic DNA using proteinase K/SDS method; Perform genome sequencing and assembly on PA103; Use RAST online prediction software to predict potential open reading frames in the genome; Construct an evolutionary tree using MEGA 11.0 software with terminal enzyme subunits, and perform comparative genomics analysis using Mauve software. **Results** A lytic phage capable of cleaving CRAB was isolated from the experiment and named PA103; It can form a wholly transparent plaque with a diameter of about 2 mm on the bacterial coat of host bacterium A103, surrounded by a translucent halo with a width of 3-4 mm; Transmission electron microscopy showed that PA103 belongs to a tail bacteriophage, with a head and tail diameter length of approximately 64 nm and 120 nm, respectively; The one-step growth curve shows that the latent period of PA103 is about 40 minutes, the burst period is about 15 minutes, and the burst size is about 17 PFU/cell; Phage PA103 can maintain relatively stable

* 【基金项目】 河南省高等学校重点科研项目(No. 23B310012);河南省科技厅科技发展计划项目(No. 222102310449)。

** 【通讯作者】 靳 静,E-mail:Jing77772006@126.com

【作者简介】 张 改(1980-),女,河南许昌人,硕士,讲师,主要从事噬菌体方面的研究。E-mail:39435236@qq.com

activity in environments of 50 °C, 60 °C, and pH 5.0–9.0; The genome of PA103 has a total length of 45 225 bp and a G+C content of 37.82%. The whole genome prediction contains 86 open reading frames, of which 29 are functional proteins and the remaining 57 are annotated as hypothetical proteins; The results of collinearity analysis showed that the number, direction, arrangement order, and length of local collinear regions between phage PA103 and phage LZ35 were very similar; The results of constructing the evolutionary tree indicate that bacteriophage PA103 belongs to the *Obolenskviru* genus. **Conclusion** The novel phage PA103 has strong ability to lyse *Acinetobacter baumannii*, which can provide reference for phage prevention and treatment of CRAB infections.

【Keywords】 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB); phage; biological characteristics; genome analysis

鲍曼不动杆菌为动力试验阴性的非发酵革兰阴性菌,广泛存在于自然界、医院环境、人体体表及与外界相通的呼吸道、消化道和泌尿生殖道粘膜表面,属于条件致病菌。鲍曼不动杆菌是医院感染的常见病原体^[1],主要引起危重患者和免疫力低下的患者出现集体感染,致死率高达40%~66%^[2-3]。鲍曼不动杆菌具有天然耐药和容易获得耐药的特性,因而感染用药受限^[4]。被人类视为治疗革兰阴性菌感染最后一道防线的碳青霉烯类药物,曾是控制鲍曼不动杆菌感染最有效的药物之一。但随着临床应用增多,耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌增多,其发病率和流行率在全球范围内呈逐年增长趋势^[5]。我国细菌耐药监测网提供的数据显示,鲍曼不动杆菌在临幊上革兰阴性菌的分离率中常年位居第4^[6];2022年耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌在临幊上的分离率全国平均为53.4%,其中河南省高达71.6%^[6]。在美国,鲍曼不动杆菌对碳青霉烯耐药率由1995年的4%增长至2016年的44.8%,且还在逐年增长^[7]。2017年耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌共造成美国8 500多例感染,700例死亡,2.81亿美元的医疗费用^[8]。

在世界卫生组织的“耐药菌清单”(2017年)中,耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌位于极高危险级别首位^[9],目前几乎无药可用,给临幊治疗带来极大的挑战,亟需开发新的抗菌药物。噬菌体是一类能感染细菌等微生物的病毒,通过分离筛选针对相应病菌的特定噬菌体,有望获得替代抗生素的新型抗菌剂。然而,由于噬菌体种类繁多,获得具有高溶菌能力的裂解性噬菌体,需要进行大量的筛查实验和研究。为此,本课题组成功分离了1株新型可高效裂解耐碳青霉烯类抗菌药物的鲍曼不动杆菌噬菌体,并对其生物学特性和全基因组进行了初步研究。研究验证了从自然界中分离获得抗耐药菌噬菌体的可行性,丰富了耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌噬菌体库,可为后续应用于临幊治疗提供理论参考。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株来源及保存 实验菌株均来自河南省人民医院及河南省某市级医院。所有菌株加50%甘油后进行−80 °C保存。

1.2 主要试剂和仪器 营养琼脂粉、营养肉汤粉和琼脂粉均购自杭州天和微生物试剂有限公司;噬菌体保存液、上层培养基、下层培养基由本实验室制备;JEM-1400型透射电镜显微镜购于日本电子株式会社;PCR扩增仪购于德国Eppendorf公司;蛋白酶K、DNase和RNase、SDS购于Beyotime公司、EDTA购于天津市风船化学试剂科技有限公司。

2 方法

2.1 宿主菌的表型鉴定及药敏试验 使用BD Phoenix-100(Becton Dickinson Diagnostic Systems, System, MD, USA)全自动细菌鉴定/药敏系统进行细菌表型的鉴定及药敏试验。

2.2 噬菌体的分离、纯化、增殖与噬菌斑形态观察 参考文献[10]的方法,以鲍曼不动杆菌A103为宿主菌,采集郑州市市政污水,离心过滤后与A103共培养8 h(37 °C, 220 r/min),离心过滤除菌后,用点滴法获得1株裂解型噬菌体,命名为PA103。挑取单个噬菌斑经6次分离得到纯化噬菌体。采用双层平板法增殖噬菌体,得到高浓度的噬菌体悬液(10^{11} PFU/mL),用0.22 μm的无菌滤器过滤后4 °C保存备用。稀释噬菌体PA103,以鲍曼不动杆菌A103为宿主菌,用双层平板法铺板培养过夜观察噬菌斑形态。

2.3 噬菌体的形态观察 用戊二醛溶液(3%)固定(0 °C, 30 min)浓缩后的噬菌体PA103,取20 μL固定液滴在铜网(300目)上,再用2%(w/v)的磷钨酸(pH7.2)负染,干燥后用透射电镜观察噬菌体形态。

2.4 噬菌体稳定性、一步生长曲线的测定 将浓度为 2.5×10^9 PFU/mL的噬菌体悬液分别置于50、60、70、80 °C的水浴中,每隔20 min取定量溶液检测活性噬菌体的数量。将100 μL噬菌体悬液(2.5×10^9 PFU/mL)加入10 mL不同pH值(pH 1~12)的SM溶液中,37 °C孵育1 h后检测活性噬菌体的数量。取等体积的噬菌体悬液(10^8 PFU/mL)和处于对数生长期的细菌悬液(10^7 PFU/mL)混合(MOI约为10:

1),置于摇床中震荡培养1 min后快速离心(12 000 g离心2 min),取沉淀重悬于20 mL新鲜营养肉汤中震荡培养(37 °C,240 r/min),每隔5 min取样离心,测定噬菌体活性。以上试验重复3次。

2.5 噬菌体基因组提取和测序 将噬菌体裂解液离心(8 000 g,10 min)去除细菌碎片,加RNaseA、DNase进行酶消化,37 °C温育1 h,加入PEG 8000、NaCl溶解后冰浴1 h后离心(4 °C,10 000 g离心,20 min),弃上清;加SM液充分洗涤管壁及沉淀,转移到新EP管,加入裂解缓冲液(终浓度:SDS为0.5%、EDTA为20 mmol/L、蛋白酶K为50 mg/mL),置于56 °C水浴1 h;加入等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),混匀后离心(12 000 g,10 min),将上清液转移到新EP管,加等体积异丙醇充分混匀后离心(4 °C,12 000 g,10 min),弃上清液收获噬菌体DNA。噬菌体DNA送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

2.6 噬菌体全基因组分析 测序完成后,使用软件Velvet sequence assembler(1.2.10)对原始测序数据进行组装和拼接,得到全长45 225 bp的无重叠基因组序列。采用DNAstar软件分析基因组的碱基组成及G+C含量。使用RAST在线数据库(<http://www.rast.nmpdr.org>)对PA103的开放阅读框(open reading frame, ORF)进行预测,并使用NCBI的BLASTp(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)对结果进行验证。使用VFDB数据库(<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)进行毒力因子基因的预测,使用CARD数据库(<https://card.mcmaster.ca/>)进行抗生素抗性基因预测。使用tRNAscan-SE Search Server(<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)进行tRNA预测。使用CGview(<https://cgview.ca/>)进行基因组图谱的绘制。使用DeepTMHMM(<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)筛选具有跨膜结构域的蛋白质。使用Mauve软件对噬菌体PA103及与之相似噬菌体的全基因组进行共线性分析。在NCBI网站对噬菌体的末端酶大亚基的蛋白序列进行BLASTp比对,选择同源蛋白及近缘蛋白,使用MEGA11.0软件构建系统进化树。

结 果

1 宿主菌信息

以鲍曼不动杆菌A103为宿主菌,从郑州市市政污水中分离得到噬菌体PA103后,随机挑选实验室储藏的鲍曼不动杆菌380株,对PA103的噬菌谱进行了筛查。结果显示PA103可以感染来自不同医院或不

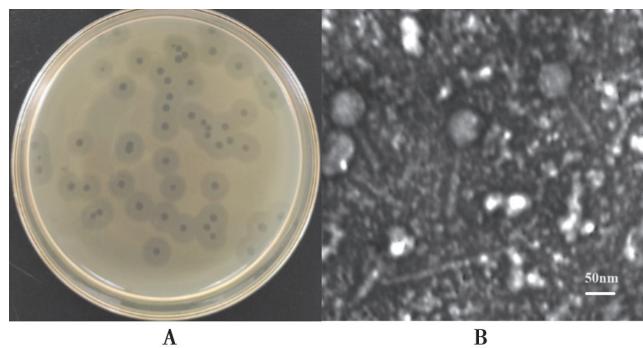
同科室、不同病人的58株鲍曼不动杆菌(以保留同一患者相同细菌第1株的原则剔除重复菌株)。所有能被噬菌体PA103感染的菌株均仅对多粘菌素敏感,对替加环素敏感或中介,对包括美罗培南、头孢哌酮舒巴坦在内的碳青霉烯类、喹诺酮类、β-内酰胺酶抑制剂、头孢菌素类、氨基糖苷类抗生素均耐药(表1)。标本类型多样,多数属于肺泡灌洗液、痰液(抽出痰/咳出痰),少量有咽拭子、气管插管、脑脊液、引流液、分泌物、粪便、中心导管、血液、尿液。标本大多来自重症监护室,少部分来自普通病房。

表1 PA103宿主菌信息
Table 1 Host bacteria information of phage PA103

项目	临床特征 Clinical features	例数 Sample size	占比(%) Proportion
年份	2019	16	27.59
	2020	15	25.86
	2021	27	46.55
	敏感	58	100.00
多粘菌素药敏	中介	0	0.00
	耐药	0	0.00
	敏感	53	91.38
替加环素药敏	中介	5	8.62
	耐药	0	0.00
	敏感	0	0.00
美罗培南药敏	中介	0	0.00
	耐药	58	100.00
	≤30	2	3.45
	31~40	6	10.34
患者年龄	41~50	8	13.79
	51~60	6	10.34
	61~70	16	27.59
	71~80	18	31.04
标本类型	81~90	2	3.45
	肺泡灌洗液	24	41.39
	痰(抽出痰/咳出痰)	17(15/2)	29.32(25.86/3.44)
	咽拭子	3	5.17
来源科室	气管插管	3	5.17
	脑脊液	3	5.17
	引流液	2	3.45
	分泌物	2	3.45
来源科室	粪便	1	1.72
	中心导管	1	1.72
	血液	1	1.72
	尿液	1	1.72
来源科室	ICU	42	72.41
	非ICU	16	27.59

2 PA103噬菌斑形态特征

如图1A所示,PA103在以鲍曼不动杆菌A103为宿主菌的双层平板上培养过夜后,形成1个直径约2 mm且完全透明的噬菌斑,周围环绕宽为3~4 mm的晕圈。通过电镜观测,如图1B所示,PA103具有1个直径约64 nm的头部和长度约120 nm的尾部。



A 噬菌斑 B 电镜照片(100 000×)

图1 噬菌体PA103的形态

A Plaque morphology of phage B Electron micrograph of phage(100 000×)

Fig. 1 The characteristics of Phage PA103

3 PA103 的一步生长曲线及对热、pH 的稳定性

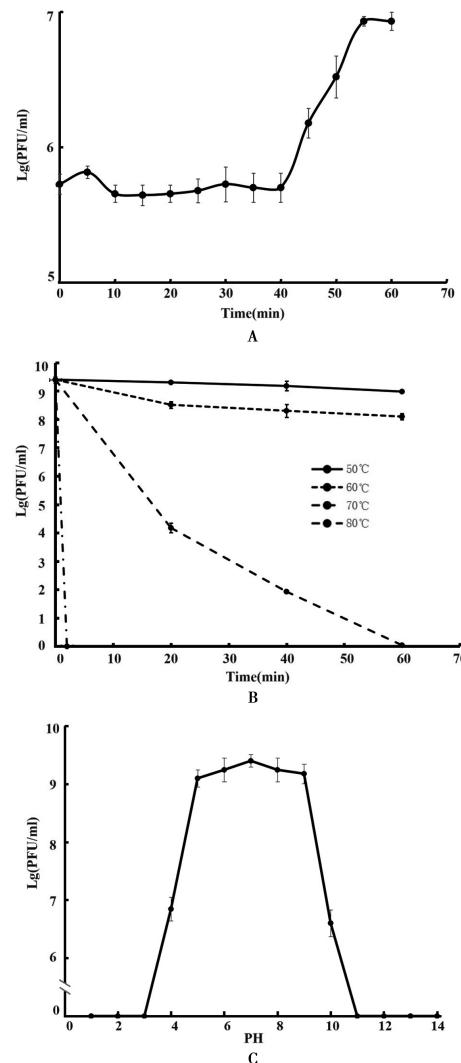
一步生长曲线(图 2A)显示噬菌体 PA103 感染鲍曼不动杆菌 A103 的潜伏期约为 40 min, 爆发期约为 15 min, 爆发量约为 17 PFU/cell。热稳定性结果(图 2B)显示噬菌体 PA103 在 50 °C 放置 60 min 时活性下降了一个数量级;在 60 °C 放置 20 min 时, 噬菌体活性即降低了 1 个数量级;在 70 °C 放置 20 min 时, 噬菌体活性下降了 5 个数量级, 60 min 时, 噬菌体活性变为 0;在 80 °C 放置 2 min 时噬菌体已完全被灭活。pH 稳定性结果(图 2C)显示在 pH 5~9 时, 噬菌体活性没有明显变化,但在 pH4 和 pH10 时,噬菌体活性下降 3 个数量级,在 pH 3~11 时,噬菌体已完全丧失活性。

4 噬菌体 PA103 的全基因组分析

4.1 基因组的基本特征 噬菌体 PA103 的基因组属于双链线性 DNA, 基因组长度为 45 225 bp, 其核酸序列已提交至 NCBI(登录号为 PP826938)。全基因组中 A、T、C、G 碱基含量分别为 31.64%, 30.54%, 16.67%, 21.15%, G+C 含量为 37.82%, 低于鲍曼不动杆菌基因组的平均(G+C)%含量 39%~47%^[4]。RAST 在线预测结果显示, PA103 含有 86 个 ORFs, 其中 75 个 ORFs 的编码方向为正向, 11 个 ORFs 的编码方向为负向。tRNAscan-SE 在线预测软件未发现 PA103 有 tRNA。VFDB 和 CARD 在线预测软件未发现噬菌体 PA103 含有已知的毒力因子基因及抗生素抗性基因。在线软件 DeepTMHMM 预测结果显示, 噬菌体 PA103 的 ORF 编码的蛋白中, 56 个属于细胞外蛋白, 19 个属于细胞内蛋白, 有 11 个属于跨膜蛋白。

4.2 基因组注释 噬菌体 PA103 共有 86 个开放阅读框(表 2), 其中 57 个 ORFs 注释为假定蛋白, 其余 29 个 ORFs 为功能编码序列(coding sequence, CDS)。根据注释结果, 该功能可以被分为 5 个模块: 调节蛋

白、复制蛋白、结构蛋白和包装蛋白。基因组注释图谱如图 3 所示。



A 一步生长曲线 B 热稳定性 C pH 稳定性

A One-step growth curve B Thermal stability C pH stability

Fig. 2 Biological properties of phage PA103

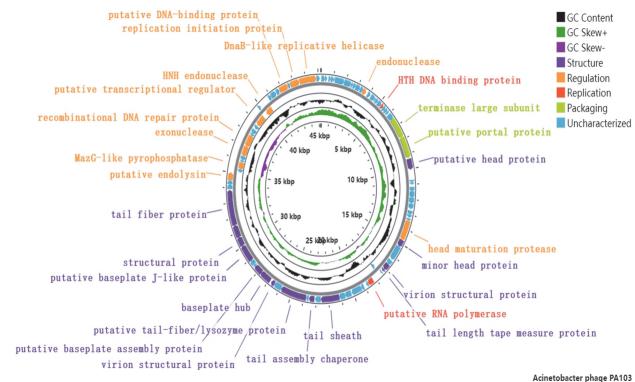


图3 噬菌体PA103基因组注释图谱
Fig. 3 Genomic map of phage PA103 with annotation

表 2 噬菌体 ORF 预测
Table 2 ORF analysis of the phage PA103

开放阅读框 ORF	最相似蛋白所属微生物物种的基因和名称 Top BLAST hit	BLASTP 比对百分比 Amino acid identity (%)	E 值 E value	最相似蛋白 序列编号 Accession No.
1	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	97/97(100%)	1.00E-64	YP_009055441.1
2	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	58/58(100%)	3.00E-34	YP_009055440.1
3	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	61/61(100%)	1.00E-35	YP_009055439.1
4	hypothetical protein[Acinetobacter phage Bphi-R2919]	70/70(100%)	9.00E-41	QGH74081.1
5	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC11/12/R2315]	37/37(100%)	1.00E-15	YP_009203574.1
6	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	251/251(100%)	0	YP_009055438.1
7	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	190/190(100%)	2.00E-138	YP_009055437.1
8	hypothetical protein[Acinetobacter phage Scipio]	52/54(96%)	1.00E-27	UQS93302.1
9	hypothetical protein[Acinetobacter phage AB1]	75/75(100%)	5.00E-48	YP_009613809.1
10	hypothetical protein[Acinetobacter phage vB_AbM_WUPSU]	121/126(96%)	2.00E-83	UJQ43490.1
11	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	86/86(100%)	2.00E-55	YP_009055433.1
12	endonuclease[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	93/93(100%)	8.00E-61	YP_009055432.1
13	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	79/79(100%)	8.00E-45	YP_009055431.1
14	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	115/115(100%)	8.00E-79	YP_009055430.1
15	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	40/40(100%)	7.00E-20	YP_009055429.1
16	hypothetical protein[Acinetobacter phage vB_AbaM-IME-AB2]	71/71(100%)	3.00E-44	YP_009592186.1
17	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC11/12/R1215]	108/108(100%)	2.00E-73	AJT61457.1
18	HTH DNA binding protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	65/65(100%)	4.00E-37	YP_009055426.1
19	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	80/80(100%)	3.00E-50	YP_009055425.1
20	hypothetical protein[Acinetobacter phage BUCT629]	67/67(100%)	4.00E-42	QZI85361.1
21	hypothetical protein[Acinetobacter phage AbP2]	56/56(100%)	4.00E-33	YP_009609911.1
22	hypothetical protein[Acinetobacter phage vB_AbM_WUPSU]	144/146(99%)	1.00E-103	UJQ43479.1
23	terminase large subunit[Acinetobacter phage vB_AbM_WUPSU]	468/472(99%)	0	UJQ43478.1
24	portal protein[Acinetobacter phage LZ35]	471/476(99%)	0	YP_009291949.1
25	putative head protein[Acinetobacter phage LZ35]	234/235(99%)	2.00E-172	AMD43231.2
26	hypothetical protein[Acinetobacter phage vB_AbaM_fThrA]	52/54(96%)	6.00E-30	WVH13533.1
27	hypothetical protein[Acinetobacter phage Bphi-R1888]	36/36(100%)	1.00E-17	QGH74181.1
28	hypothetical protein[Acinetobacter phage HZY2308]	98/98(100%)	1.00E-65	WPH63917.1
29	hypothetical protein[Acinetobacter phage P1068]	139/140(99%)	5.00E-100	WHB31307.1
30	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC11/12/R1215]	130/130(100%)	5.00E-89	AJT61472.1
31	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	120/120(100%)	1.00E-83	YP_009055495.1
32	hypothetical protein[Acinetobacter phage Bphi-R2919]	90/91(99%)	1.00E-59	QGH74107.1
33	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	68/68(100%)	5.00E-43	YP_009055493.1
34	hypothetical protein[Acinetobacter phage vB_AbaM_fThrA]	44/54(81%)	3.00E-24	WVH13542.1
35	head maturation protease[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	444/444(100%)	0	YP_009055491.1
36	minor head protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	159/159(100%)	9.00E-110	YP_009055490.1
37	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	339/339(100%)	0	YP_009055489.1
38	hypothetical protein[Acinetobacter phage YMC-13-01-C62]	112/112(100%)	2.00E-75	YP_009055488.1
39	virion structural protein[Acinetobacter phage LZ35]	150/150(100%)	1.00E-107	YP_009291882.1
40	tail length tape measure protein[Acinetobacter phage AB1]	43/48(90%)	4.00E-22	YP_009613776.1
41	hypothetical protein[Acinetobacter phage HZY2308]	42/42(100%)	2.00E-22	WPH63991.1
42	hypothetical protein[Acinetobacter phage vB_AbaM-IME-AB2]	74/74(100%)	2.00E-46	YP_009592160.1
43	putative RNA polymerase[Acinetobacter phage Ab31]	141/145(97%)	1.00E-100	WMC00244.1
44	hypothetical protein[Acinetobacter phage vB_AbM_WUPSU]	61/61(100%)	6.00E-34	UJQ43459.1
45	hypothetical protein[Acinetobacter phage Bphi-R2919]	83/83(100%)	1.00E-46	QGH74038.1
46	hypothetical protein[Acinetobacter phage Bphi-R2919]	265/267(99%)	0	QGH74039.1
47	hypothetical protein[Acinetobacter phage Bphi-R2919]	165/167(99%)	2.00E-120	QGH74040.1
48	hypothetical protein[Acinetobacter phage vB_AbaM_IME284]	162/164(99%)	2.00E-116	AYP68997.1
49	tail sheath[Acinetobacter phage vB_AbaM-IME-AB2]	487/487(100%)	0	YP_009592154.1
50	hypothetical protein[Acinetobacter phage Abp9]	149/149(100%)	3.00E-105	QEA11037.1
51	tail assembly chaperone[Acinetobacter phage Scipio]	140/141(99%)	3.00E-98	UQS93256.1
52	hypothetical protein[Acinetobacter phage vB_AbaM_IME512]	70/70(100%)	6.00E-44	AYP69095.1
53	putative tail-fiber/lysozyme protein[Acinetobacter phage LZ35]	682/682(100%)	0	YP_009291893.1
54	hypothetical protein[Acinetobacter phage LZ35]	205/205(100%)	2.00E-143	YP_009291894.1

续表

55	virion structural protein[<i>Acinetobacter</i> phage LZ35]	91/91(100%)	1.00E-58	YP_009291895.1
56	baseplate hub[<i>Acinetobacter</i> phage LZ35]	292/296(99%)	0	YP_009291896.1
57	putative baseplate assembly protein[<i>Acinetobacter</i> phage AbP2]	210/214(98%)	6.00E-154	YP_009609876.1
58	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage P1068]	48/48(100%)	4.00E-23	WHB31248.1
59	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage AB1]	116/117(99%)	1.00E-80	YP_009613845.1
60	baseplate J-like protein[<i>Acinetobacter</i> phage XC1]	388/394(98%)	0	WFD61209.1
61	structural protein[<i>Acinetobacter</i> phage vB_AbaM-IME-AB2]	208/208(100%)	7.00E-150	YP_009592224.1
62	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage Bphi-R2919]	272/279(97%)	0	QGH74054.1
63	tail fiber protein[<i>Acinetobacter</i> phage AbP2]	703/776(91%)	0	YP_009609870.1
64	hypothetical protein Arbor_46[<i>Acinetobacter</i> phage Arbor]	108/111(97%)	3.00E-70	URY98760.1
65	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage Scipio]	89/90(99%)	1.00E-57	UQS93270.1
66	secretion activator protein[<i>Acinetobacter</i> phage vB_AbaM_IME284]	170/170(100%)	6.00E-120	AYP68979.1
67	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage vB_AbaM_BP10]	73/76(96%)	1.00E-46	UYL86105.1
68	MazG-like pyrophosphatase[<i>Acinetobacter</i> phage vB_AbaM_AB3P2]	175/177(99%)	9.00E-125	WOZ14999.1
69	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage vB_AbaM-IME-AB2]	54/54(100%)	5.00E-30	YP_009592216.1
70	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage vB_AbaM_AB3P2]	95/97(98%)	6.00E-62	WOZ15002.1
71	exonuclease[<i>Acinetobacter</i> phage HZY2308]	251/251(100%)	0	WPH63962.1
72	recombinational DNA repair protein[<i>Acinetobacter</i> phage vB_AbaM_IME284]	299/299(100%)	0	AYP68972.1
73	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage AP22]	59/60(98%)	5.00E-35	YP_006383815.1
74	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage Brutus]	110/110(100%)	4.00E-72	UQS93201.1
75	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage vB_AbaM-IME-AB2]	85/85(100%)	1.00E-53	YP_009592210.1
76	putative transcriptional regulator[<i>Acinetobacter</i> phage LZ35]	270/270(100%)	0	YP_009291917.1
77	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage YMC11/12/R1215]	64/64(100%)	6.00E-38	AJT61433.1
78	HNH endonuclease[<i>Acinetobacter</i> phage LZ35]	195/195(100%)	8.00E-139	YP_009291919.1
79	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage LZ35]	80/80(100%)	9.00E-53	YP_009291920.1
80	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage NJ02]	147/147(100%)	1.00E-103	WJZ47787.1
81	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage NJ02]	96/96(100%)	2.00E-61	WJZ47786.1
82	putative DNA-binding protein[<i>Acinetobacter</i> phage AP22]	237/237(100%)	2.00E-176	YP_006383824.1
83	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage LZ35]	70/70(100%)	1.00E-42	YP_009291924.1
84	replication initiation protein[<i>Acinetobacter</i> phage LZ35]	244/246(99%)	5.00E-179	YP_009291925.1
85	DnaB-like replicative helicase[<i>Acinetobacter</i> phage YMC-13-01-C62]	447/447(100%)	0	YP_009055443.1
86	hypothetical protein[<i>Acinetobacter</i> phage YMC-13-01-C62]	88/88(100%)	1.00E-55	YP_009055442.1

4.3 噬菌体 PA103 进化树 为明确噬菌体 PA103 的进化关系,选择 PA103 中具有进化意义的末端酶大亚基(ORF23)的蛋白序列,在 NCBI 数据库中用 Blastp 进行蛋白比对,选择与之相似或相关的蛋白序列构建系统进化树(图 4)。根据 ICTV(International committee on taxonomy of viruses,ICTV)的分类,噬菌体 PA103 是 *Caudoviricetes* 纲下 *Obolenskviru* 属成员。

4.4 噬菌体 PA103 的比较基因组分析 使用 NCBI 的 Blastn 对噬菌体 PA103 的全基因组序列进行比对,在结果中选择与 PA103 比对得分最高的 *Acinetobacter* phage BUCT629(MZ712044.1, 覆盖度 66%, 一致性 95.67%, E=0), *Acinetobacter* phage vB_AbaM_IME285(MH853786.1, 覆盖度 73%, 一致性 96.18%, E = 0), *Acinetobacter* phage LZ35(KU510289.1, 覆盖度 81%, 一致性 93.92%, E=0) 和 *Acinetobacter* phage HZY2308(OR730450.1, 覆盖度 72%, 一致性 93.17%, E = 0) 四株噬菌体,用 Mauve 软件的 Progressive Mauve 算法对其全基因组

序列进行了共线性分析。噬菌体 PA103 与噬菌体 LZ35 的局部共线性区域的数目、方向、排列顺序和长度非常相似,但噬菌体 PA103 与噬菌体 BUCT629、vB_AbaM_IME285 和 HZY2308 的两个基因区域的排列顺序存在差异(图 5)。

讨 论

近年来,由于细菌耐药性日趋严重,研究新型的抗菌药物更具紧迫性。裂解性噬菌体因其天然的抗菌特性以及相对较低的研发成本,日益受到关注。有关鲍曼不动杆菌局部或全身感染的动物实验和临床应用也取得了良好的效果^[11-14]。本研究分离得到 1 株耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌噬菌体 PA103。针对随机挑选的 380 株鲍曼不动杆菌,仅能裂解 58 株,显示其噬菌谱相对较窄,表明该噬菌体具有较高的特异性。噬菌体的特异性使得噬菌体仅能杀死特定的细菌,与广谱的抗生素相比,噬菌体杀菌较少出现耐药问题,也不会造成微生态失衡。由于临床标本中分离的鲍曼不动杆菌往往同时存在多个亚种,噬菌体的特异性可能会限

制单一噬菌体的抗菌作用范围。采用多种噬菌体混合的“鸡尾酒”型噬菌体制剂,增大其作用范围,目前已成为治疗耐药性鲍曼不动杆菌感染的主要发展方向之一。有案例表明,通过口服包括鲍曼不动杆菌噬菌体在内的混合噬菌体治疗后,可大幅降低患者的感染水平^[15]。2006年,美国FDA批准了一个噬菌体鸡尾酒复配剂用于食品中李斯特菌的控制^[16]。2007年,比利时正式批准医务工作者用噬菌体混合制剂治疗由绿脓杆菌和金黄色葡萄球菌引起的烧伤后感染^[17]。

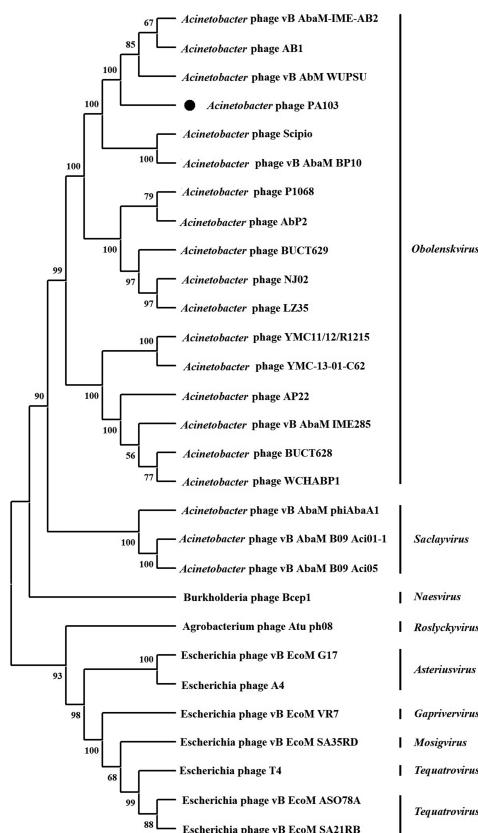


图4 使用噬菌体PA103末端酶大亚基(ORF23)构建系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic trees were formed by terminase large subunit (ORF23)

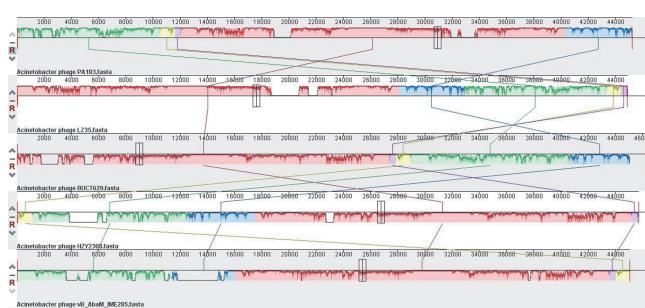


图5 噬菌体PA103共线性分析图谱
Fig. 5 Collinearity analysis of phage PA103

噬菌体PA103在宿主菌A103菌苔上可以形成透明的噬菌斑,表明PA103是一种裂解型噬菌体;噬

菌斑周围环绕晕圈,说明该噬菌体可以产生解聚酶。解聚酶是一种特异性较强的蛋白质,分为结构蛋白和可溶性蛋白,可以降解细菌的荚膜多糖、脂多糖以及细胞外基质,更容易杀死细菌,也可清除其宿主菌形成的生物膜,理论上裂解能力更强。一步生长曲线试验结果进一步证实了PA103具有较强的鲍曼不动杆菌株裂解能力,但与其他鲍曼不动杆菌噬菌体31~240 PFU/cell^[18]的裂解量相比,PA103的裂解量相对较小。

稳定性试验显示噬菌体PA103在不超过温度60℃,pH5~9的环境下表现出较强的稳定性,表明PA103在正常环境中易于保存,有利于相应新型抗菌药物的制备和储存。在线预测软件检测未发现PA103有tRNA,说明PA103在翻译过程中利用的是宿主菌的tRNA;也未发现已知的抗生素抗性基因及毒力因子基因,说明PA103具有较佳的抗耐药性和生物安全性,有利于临床应用。

在NCBI上对PA103的全基因组进行比对后发现,没有与之完全相同的噬菌体,证明PA103是一株新型噬菌体。关于噬菌体的分类,基因组比对结果显示,PA103与Caudoviricetes纲下Obolenskviru属噬菌体相似性高。用PA103的末端酶大亚基(ORF23)构建进化树发现,其与Obolenskviru属噬菌体亲缘关系较近。比较基因组学结果显示PA103与Obolenskviru属鲍曼不动杆菌噬菌体LZ35的局部共线性区域非常相似,说明这两种噬菌体的基因组在进化上可能经历过相似的途径;PA103与同为Obolenskviru属鲍曼不动杆菌噬菌体噬菌体BUCKT629,vB_AbaM lME285和HZY2308的部分基因区域的排列顺序仅存在少许差异,说明在长期的选择压力下,某些基因通过在局部共线性区域的改变来更好的适应生存空间,所以PA103应该为此属成员。

综上所述,本研究分离了1株新型耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌裂解性噬菌体PA103,研究了其生物学特性及全基因组特点。有关PA103的解聚酶等蛋白功能及动物实验尚需更深入的研究,以为未来的临床应用奠定理论基础。

【参考文献】

- [1] Kanaan MH, Khashan HT. Molecular typing, virulence traits and risk factors of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* spread in intensive care unit centers of baghdad city, iraq[J]. Rev Res Med Microbiol, 2022, 33(1):51-55.
- [2] Kanafani ZA, Zahreddine N, Tayyar R, et al. Multi-drug resistant *Acinetobacter* species:a seven-year experience from a tertiary care center in Lebanon[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2018, 7: 9-16.

(下转1193页)

- 会组织修复与再生分会. 中国糖尿病足防治指南(2019 版)(Ⅰ) [J]. 中华糖尿病杂志, 2019, 11(2):92-108.

[6] 陈向红, 何红梅, 赵娜, 等. 糖尿病足感染病原菌分布及多重耐药菌感染相关因素分析[J]. 中国消毒学杂志, 2023, 40(10):757-759,763.

[7] 詹师, 杨召伍, 陈山, 等. 糖尿病足感染病原微生物分布及风险预测模型的建立[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(10):95-100.

[8] 郑海龙, 那涵, 陈小盼, 等. 老年糖尿病足混合细菌感染病原菌分布及与免疫功能的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(17):4195-4200.

[9] 王家鑫, 司海娇, 于士龙, 等. 糖尿病足患者多重耐药菌感染分布特征及危险因素分析[J]. 临床军医杂志, 2022, 50(2):176-179.

[10] 薛刚霞, 孙衍, 任国梁, 等. 老年糖尿病足 MDROs 感染病原菌及危险因素[J]. 中华医院感染学杂志, 2023, 33(23):3582-3585.

[11] 杨雨平, 林东源, 叶健波, 等. 糖尿病足感染患者病原学及其与 Toll 样受体信号通路的关系[J]. 中华医院感染学杂志, 2023, 33(12):1823-1827.

[12] 朱伟雄, 方杭. 糖尿病足溃疡多重耐药菌感染的分布特点、耐药性及其危险因素分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2023, 33(2):240-244.

[13] 张加其, 姜晓锐, 王凯, 等. 糖尿病足感染患者的病原菌类型与病例特点及预后的相关性[J]. 医药导报, 2022, 41(9):1360-1365.

[14] 胡慧萍, 杨庆宇, 刘君. 糖尿病足患者合并感染的病原菌特点与血清瘦素的表达及其临床意义[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(2):216-219.

[15] Qi X, Cai E, Xiang Y, et al. An immunomodulatory hydrogel by hyperthermia-assisted self-cascade glucose depletion and ROS scavenging for diabetic foot ulcer wound therapeutics[J]. Adv Mater, 2023, 35(48):2306632.

[16] 温丰平, 刘行, 田世坤. 362 例糖尿病足感染患者的临床特点调查分析[J]. 实用骨科杂志, 2022, 28(1):25-29.

[17] 陈玉凤, 李江雁, 毛小芳, 等. 糖尿病足感染病原菌分布及临床特征分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(8):942-946.

[18] 陆露, 朱春雷, 金铄. 应用负压封闭引流技术联合药物冲洗治疗中老年糖尿病足合并感染的效果[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(4):853-855.

[19] Popovic DS, Papanas N. Contrast-associated acute kidney injury: More frequent among patients with diabetic foot ulcers [J]. Angiology, 2023, 74(7):609-610.

【收稿日期】 2024-05-13 【修回日期】 2024-07-30

(上接 1188 页)

- [3] Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen[J]. *Antibiotics (Basel)*, 2020, 9(3): 119-147.

[4] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21(3): 538-582.

[5] 马晨, 韩丹, 张祎, 等. 鲍曼不动杆菌临床分布及耐药性变迁分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(9): 1079-1082, 1087.

[6] 全国细菌耐药监测网. 2022 年全国细菌耐药监测报告(简要版) [EB/OL]. (2023-11-20)[2024-3-7]. <https://www.carsss.cn/>

[7] Munoz-Price LS, Weinstein RA. *Acinetobacter* infection[J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(12): 1271-1281.

[8] Colquhoun JM, Rather PN. Insights into mechanisms of biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* and implications for uropathogenesis[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 253-270.

[9] Willyard C. The drug-resistant bacteria that pose the greatest health threats[J]. *Nature*, 2017, 543: 15-15.

[10] 张改, 黄德海, 靳静, 等. 肺炎克雷伯菌噬菌体 LH-02 的生物学特性及基因组初步研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(1): 9-12.

[11] Strathdee SA, Hatfull GF, Mutualik VK, et al. Phage therapy: From biological mechanisms to future directions[J]. *Cell*, 2023, 186(1): 17-31.

[12] Aleshkin AV, Ershova ON, Volozhantsev NV, et al. Phagebiotics

- in treatment and prophylaxis of healthcare-associated infections [J]. Bacteriophage, 2016, 6(4):e1251379.

[13] Tan X, Chen H, Zhang M, et al. Clinical experience of personalized phage therapy against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* lung infection in a patient with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11:631585-631585.

[14] LaVergne S, Hamilton T, Biswas B, Kumaraswamy M, et al. Phage therapy for a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* craniectomy site Infection [J]. Open Forum Infect Dis, 2018, 5(4):ofy064.

[15] Schooley TR, Biswas B, Gill JJ, et al. Development and use of personalized bacteriophage-based therapeutic cocktails to treat a patient with a disseminated resistant *Acinetobacter baumannii* infection [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2017, 61(10):e00954-17.

[16] Damien M, Laurent D. Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine [J]. App Micro Biotechnol, 2011, 90(3):851-859.

[17] Gilbert V, Daniel V D, Mario V, et al. European regulatory conundrum of phage therapy [J]. Future Microbiol, 2007, 2(5):485-491.

[18] Yanqi L, Shune X, Guangtao H. *Acinetobacter baumannii* bacteriophage: progress in isolation, genome sequencing, preclinical research, and clinical application [J]. Current Microbiol, 2023, 80(6):199.

【收稿日期】 2024-06-04 【修回日期】 2024-08-30