

研究报告

噬菌体 A149 的生物学特性及其在小鼠肠道耐万古霉素粪肠球菌感染模型中的治疗评价

王武华², 曾慧然¹, 王媛¹, 李欣悦¹, 刘龙南¹, 王娟¹, 张兴林¹, 马俊飞^{*1}

1 临沂大学 医学院 农林科学学院, 山东 临沂 276000

2 临沂东山医院, 山东 临沂 276000

王武华, 曾慧然, 王媛, 李欣悦, 刘龙南, 王娟, 张兴林, 马俊飞. 噬菌体 A149 的生物学特性及其在小鼠肠道耐万古霉素粪肠球菌感染模型中的治疗评价[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2816-2827.

WANG Wuhua, ZENG Huiran, WANG Yuan, LI Xinyue, LIU Longnan, WANG Juan, ZHANG Xinglin, MA Junfei. Biological characterization of phage A149 and evaluation of its therapeutic effect in a mouse model intestinal infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2816-2827.

摘要:【背景】粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)是一种革兰氏阳性兼性厌氧细菌, 可以引起菌血症、心内膜炎、牙髓感染和尿路感染等疾病。由于抗生素耐药性日趋严重, 噬菌体治疗已成为一种有效针对粪肠球菌感染的替代策略。【目的】分离针对粪肠球菌的烈性噬菌体, 为开发粪肠球菌噬菌体疗法奠定基础。【方法】分离出针对耐万古霉素粪肠球菌 V583 的噬菌体 A149, 通过透射电镜观察噬菌体的形态, 测定其最佳感染复数、一步生长曲线及温度和 pH 稳定性, 并进行全基因组测序分析, 以阐释该噬菌体的基本生物学特性; 测定其裂解谱和体外抑菌曲线, 并进一步通过治疗耐万古霉素粪肠球菌肠道感染小鼠模型评价其抗菌性能。【结果】噬菌体 A149 的最佳感染复数为 0.001, 具有短尾噬菌体科(Podoviridae)的典型形态特征。噬菌体 A149 在较宽的温度范围(20–50 °C)稳定存活, 60 °C 滴度略有下降, 70 °C 及以上完全失活; 在 pH 4.0–10.0 范围内稳定存活, 在 pH 11.0 时滴度略有下降, pH 低于 3.0 或高于 12.0 时完全失活。噬菌体 A149 潜伏期短(≤5 min), 暴发量高(约 912 PFU/cell), 基因组不含抗生素抗性基因和毒力基因, 在体外可有效抑制粪肠球菌生长达 11 h, 对所测试的粪肠球菌具有 86.4% 的裂解能力(51/59), 在小鼠肠道感染模型中可降低粪肠球菌约 1.3 个数量级。【结论】本研究表明噬菌体 A149 对于治疗粪肠球菌感染具有一定的应用潜力, 为开发粪肠球菌噬菌体防控技术奠定了基础。

关键词: 粪肠球菌; 噬菌体; 生物学特性; 体外和体内抗菌评价

资助项目: 山东省科技型中小企业项目(2023TSGC0419)

This work was supported by the Project of Small and Medium-sized Sci-tech Enterprises in Shandong Province (2023TSGC0419).

*Corresponding author. E-mail: majunfei@lyu.edu.cn

Received: 2024-09-19; Accepted: 2024-11-11; Published online: 2025-01-07

Biological characterization of phage A149 and evaluation of its therapeutic effect in a mouse model intestinal infection with vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*

WANG Wuhua², ZENG Huiran¹, WANG Yuan¹, LI Xinyue¹, LIU Longnan¹, WANG Juan¹, ZHANG Xinglin¹, MA Junfei^{*1}

1 College of Medicine, College of Agriculture and Forestry, Linyi University, Linyi 276000, Shandong, China

2 Linyi Dongshan Hospital, Linyi 276000, Shandong, China

Abstract: [Background] *Enterococcus faecalis* is a Gram-positive facultative anaerobic bacterium that can cause bacteremia, endocarditis, pulp infection, and urinary tract infection. Due to the aggravated antibiotic resistance, phage therapy has become an alternative strategy for treating *E. faecalis* infections. [Objective] To isolate virulent phages against *E. faecalis* and lay a foundation for the development of phage therapy targeting *E. faecalis*. [Methods] In this study, a phage A149 targeting vancomycin-resistant *E. faecalis* V583 was isolated, and it was observed by transmission electron microscopy. The phage was then characterized in terms of the optimal multiplicity of infection (MOI), one-step growth curve, thermal and pH stability, and whole genome sequence. The lytic spectrum and anti-bacterial curve *in vitro* were measured for the phage. Furthermore, the antibacterial properties of the phage were evaluated by treatment of the mouse model of intestinal infection with vancomycin-resistant *E. faecalis*. [Results] A phage A149 targeting vancomycin-resistant *E. faecalis* V583 was isolated, with the optimal MOI of 0.001. It had the typical morphological characteristics of the Podoviridae family. Phage A149 remained stable within a wide temperature range (20–50 °C), with a slight decrease in titer at 60 °C and complete inactivation at 70 °C and above. Phage A149 survived stably within the range of pH 4.0–10.0, with a slightly decreased titer at pH 11.0, and it was completely inactivated below pH 3.0 or above pH 12.0. Phage A149 had a short incubation period (≤ 5 min) and a high burst size (about 912 PFU/cell). Its genome did not contain antibiotic resistance genes or virulence genes. Phage A149 can effectively inhibit the growth of *E. faecalis* for 11 h *in vitro*. It demonstrated the cleavage capacity of 86.4% for tested *E. faecalis* (51/59) and reduced the count of *E. faecalis* by about 1.3 orders of magnitude in a mouse model of intestinal infection. [Conclusion] Phage A149 demonstrates the potential for treating *E. faecalis* infection, which lays a foundation for the development of phage therapy for the prevention and control of *E. faecalis*. **Keywords:** *Enterococcus faecalis*; phage; biological characteristics; evaluation of antibacterial effects *in vitro* and *in vivo*

粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*, Efs)是一种革兰氏阳性兼性厌氧细菌,在人和各种动物的肠道中广泛定殖,被认为是一种常见的肠道共生菌。但 Efs 也可作为机会致病菌,引起菌血

症、心内膜炎、尿道和伤口感染等疾病^[1-3]。随着抗生素的广泛使用, Efs 的耐药性日趋严重,尤其是耐万古霉素肠球菌(vancomycin-resistant *Enterococcus*, VRE)的出现,给临床 VRE 感染

的治疗带来了困难^[4]。研究表明肠道内的 VRE 定殖可能不会引起症状,但可持续存在较长的时间,成为 VRE 的储存库,具有引起患者和他人感染的巨大风险^[5]。因此,开发针对 VRE 感染的抗生素替代方案迫在眉睫。

噬菌体是一种能够感染并裂解细菌的病毒,可以靶向消灭特定细菌,在治疗耐药菌感染方面具有独特的优势^[6]。此外,噬菌体容易获得,杀菌速度快,对真核细胞无害、安全,并且具有与其他抗菌药物如抗生素、抗菌肽等的协同抗菌效应^[7-8],是一种十分有前景的抗生素替代疗法。先前的研究在城市污水、养殖场污水和人类粪便等各种样本中分离出了针对 Efs 的多种烈性噬菌体,并且在体外和动物模型中表现出较好的抗菌特性^[9-11],证实噬菌体是一种有效的抗菌剂,但噬菌体的裂解特异性决定了在治疗时要进行配型,因此要筛选足够的噬菌体毒株,建立针对特定细菌的噬菌体资源库。本研究分离出一株针对耐万古霉素 Efs V583 的烈性噬菌体,拟测定其生物学特性,完成全基因组测序并分析,评价其在体外和体内的抗菌能力,以期开发 Efs 感染的噬菌体疗法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品

本研究所用的菌株包括 59 株粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*)、5 株屎肠球菌 (*Enterococcus faecium*)、2 株金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、2 株单核增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 和 2 株大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 均由临沂大学微生物与宿主健康研究所保藏,其中耐万古霉素 Efs V583 为患者血液中分离^[12]。实验所用的动物均为 6-8 周龄 Specific Pathogen Free (SPF) 级的 BALB/c 小鼠,济南朋悦实验动物繁育有限公司,饲养于临沂大学动物实验基地的无病原体鼠笼内。动物实验通过了临沂大学伦理审查委员会的批准(批号:202403-12),符合动物伦理和福利要求。

分离噬菌体的牧场污水来自临沂市褚墩镇猪场。

1.2 培养基

脑心浸液 (brain-heart infusion, BHI) 肉汤 (g/L): 牛心浸粉 17.5, 胰蛋白胍 10.0, 氯化钠 5.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.5, 葡萄糖 2.0; BHI 半固体琼脂: BHI 肉汤中加琼脂粉 5.0 g/L; BHI 固体琼脂: BHI 肉汤中加琼脂粉 15.0 g/L; 肠球菌选择培养基 (g/L): 蛋白胍 20.0, 酵母浸粉 5.0, 牛胆汁物 10.0, 氯化钠 5.0, 七叶苷 1.0, 柠檬酸铁铵 0.5, 叠氮化钠 0.25, 柠檬酸钠 1.0, 琼脂 15.0。

1.3 主要试剂和仪器

无菌溶液 (sterile solution, SM) 缓冲液, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Phosphate Buffer Saline (PBS) 缓冲液, 北京索莱宝科技有限公司; PEG-8000、CsCl、氯仿和磷钨酸, 阿拉丁生化科技股份有限公司; 病毒核酸提取试剂盒, 天根生化科技 (北京) 有限公司。透射电镜, FEI 公司; 超速离心机, Beckman 公司; 0.22 μm 过滤器, MilliPore 公司; 细菌生长曲线仪, 新芝生物科技有限公司。

1.4 噬菌体的分离与纯化

噬菌体的分离及纯化的步骤参考曹海玲等^[13]的方法, 取 2.0 mL 的污水上清与 100.0 μL 的耐万古霉素 Efs V583 过夜培养物混合, 加入 2.0 mL 的 2×BHI 肉汤中, 37 °C、200 r/min 培养过夜。随后取出 1.0 mL 的混合液在 12 000 r/min 的条件下离心 5 min, 抽取并用 0.22 μm 的滤膜过滤上清液得到噬菌体原液。将噬菌体原液 10 倍倍比稀释后与 100.0 μL 宿主菌液混合, 与适量的 BHI 半固体琼脂混匀后铺双层板, 倒置于 37 °C 培养过夜。挑取清透明亮、边缘清晰的单个噬菌斑琼脂块置于 SM 缓冲液中, 与等体积的宿主菌液后混合加入 BHI 肉汤, 37 °C、200 r/min 培养过夜, 12 000 r/min 离心 5 min 后抽取并过滤上清液, 取滤液梯度稀释与宿主菌液铺双层板, 重复 3-4 次, 直到噬菌斑大小形态均一, 即得到纯化后的噬菌体。

1.5 透射电镜观察

根据陈鑫茹等^[14]的方法 PEG-8000 与噬菌体液混合,置于 4 °C 处理过夜,随后在 12 000 r/min 的条件下离心 5 min 获得沉淀,用 2.0 mL 的 SM 缓冲液重悬沉淀,加入 2.0 mL 的氯仿抽提噬菌体的浓缩液。将浓缩液加入 CsCl 梯度液后在 4 °C、5 000 r/min 的条件下离心 20 min,收集噬菌体层,与 PBS 缓冲液混合后透析过夜,得到纯化的噬菌体颗粒。磷钨酸负染色法对噬菌体颗粒染色 15 min 后置于透射电镜下观察。

1.6 最佳感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 的测定

粪肠球菌 V583 培养过夜后测定其浓度,随后与噬菌体液以噬菌体数量(PFU)/宿主细菌数量(CFU)为 10:1、1:1、0.1:1、0.01:1 和 0.001:1 的比例混合加入 10.0 mL 的 BHI 肉汤中,37 °C、200 r/min 孵育 6 h,随后各吸取 1.0 mL 混合液在 12 000 r/min 的条件下离心 5 min,吸取并使用 0.22 μm 滤膜过滤上清液后利用双层平板法测定噬菌体的效价,不同的比例均进行 3 次平行实验。

1.7 一步生长曲线的测定

取 1.0 mL 培养至对数生长期(OD_{600} 约为 0.6)的 V583 菌液在 4 °C、5 000 r/min 的条件下离心 10 min,弃去上清液,用 1.0 mL 无菌 PBS 洗涤沉淀 2 次,随后用同体积的无菌 BHI 肉汤重悬。按照最佳 MOI 为 0.001 与噬菌体混合并置于 37 °C 恒温箱内静置 15 min,随后将混合液在 12 000 r/min 的条件下离心 5 min,弃去上清液,用 1.0 mL 的 BHI 肉汤重悬沉淀并转移到 9.0 mL 的 BHI 肉汤中,置于 37 °C、200 r/min 的条件下培养。在 5–30 min 内每隔 5 min 取样 1 次,后 90 min 内每隔 10 min 取样 1 次,整个测定过程持续 2 h。取样后将混合液在 12 000 r/min 条件下离心 5 min,过滤上清后测定噬菌体的效价。每个时间点均进行 3 次平行实验,并计算平均值以绘制该噬菌体的一步生长曲线。

1.8 温度和 pH 稳定性的测定

将浓度为 10^9 PFU/mL 的噬菌体 A149 分别放在 20、30、40、50、60、70 和 80 °C 的恒温水浴锅中孵育 30 min 和 60 min 后各取出 100.0 μL 噬菌体液进行 10 倍倍比稀释,用双层平板法测定噬菌体的滴度,重复 3 次取平均值,观察各温度下噬菌体的滴度变化。

将浓度为 10^9 PFU/mL 的噬菌体 A149 分别放在 pH 2.0–14.0 (间隔 1.0) 的 BHI 肉汤中,37 °C 孵育 60 min 后各取 100.0 μL 噬菌体液进行 10 倍倍比稀释,用双层平板法进行计数,重复 3 次取平均值,观察不同 pH 条件下噬菌体的滴度变化。

1.9 噬菌体基因组测序分析

扩增和浓缩噬菌体液,取 600 μL 的噬菌体液并向其加入 2.0 μL RNase A 与 1.0 μL DNase I (终浓度为 1.0 μg/mL) 进行处理,根据病毒核酸提取试剂盒说明书提取噬菌体的核酸并送至上海派森诺生物科技有限公司进行全基因组测序,参照 Han 等^[15]的方法对噬菌体全基因组测序上机和分析。基因组数据已提交至 NCBI 数据库,GenBank 登录号为 PQ093902。使用 BRIG 软件比对分析与 A149 相似的其他噬菌体基因组。

1.10 系统发育树的构建

噬菌体的末端酶大亚基序列为噬菌体中相对保守的结构域序列,基于该序列使用 MAFFT v7^[16]对噬菌体 A149 及多个不同种属的肠球菌噬菌体进行分析并构建系统发育树。

1.11 裂解谱的测定

测定噬菌体 A149 针对多种细菌[包含 59 株粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、5 株屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、2 株金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、2 株单核增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)和 2 株大肠杆菌(*Escherichia coli*)]的裂解谱。将上述细菌培养过夜后,取 100.0 μL 细菌液与适量的 BHI 半固体琼脂混合,铺在下层 BHI 固体培养基上,静置 15 min 后,取 10.0 μL 噬菌体液点滴在平板上,37 °C 培养过夜,观察平板上是否出现空斑,随

后使用双层平板法进一步验证,能出现噬菌斑则认为该细菌可被噬菌体裂解。每组试验平行重复3次。

1.12 抑菌曲线的测定

在12孔板中将12.5 μL 培养过夜的粪肠球菌 V583 接种至适量 BHI 肉汤中,使其总量约为 2.5×10^7 CFU,按照 MOI 分别为 0.01、0.1、1、10、100 加入相应滴度的噬菌体 A149,并调整总体积为 2.5 mL,使用不加噬菌体的一组作为对照组,每个 MOI 平行重复3次。将12孔板置于细菌生长曲线仪中,每30 min 测定1次吸光度值(OD_{600}),共监测16 h。

1.13 噬菌体对粪肠球菌感染小鼠肠道模型的治疗评价

1.13.1 粪肠球菌感染小鼠肠道模型的建立

参照之前的方法进行粪肠球菌感染小鼠肠道模型的建立^[17],具体如下:将16只6–8周龄 SPF 级的 BALB/c 小鼠随机分为2组,适应环境1周后进行抗生素口服以清除小鼠体内的肠道菌群,用以模拟住院患者因大量服用抗生素造成的菌群失调。先进行3 d 的混合抗生素(AntiBiotics, Abx) (万古霉素 10.0 mg/只,新霉素 10.0 mg/只,氨苄西林 10.0 mg/只,甲硝唑 10.0 mg/只)灌胃,之后进行持续7 d 的混合抗生素饮水(Abx: 万古霉素 500.0 mg/L,新霉素 500.0 mg/L,氨苄西林 500.0 mg/L,甲硝唑 500.0 mg/L),其间通过涂布计数监测小鼠粪便中的细菌,尤其是肠球菌的数目。间隔2 d 后使用100.0 μL 耐万古霉素 Efs V583 悬液(1×10^9 CFU/mL)对2组小鼠均进行灌胃,以模拟住院患者菌群失调后肠球菌大量增殖感染肠道的过程,其间使用肠球菌选择培养基监测小鼠粪便中肠球菌的数量。

1.13.2 噬菌体对粪肠球菌感染小鼠肠道模型的治疗评价

在肠球菌稳定定殖后(V583 灌胃后第2天),对实验组小鼠以 5×10^9 PFU/只进行噬菌体 A149 的单次灌胃治疗,对照组使用同剂量的 BHI 肉

汤作为对照,之后每天取2组小鼠的粪便进行肠球菌选择性培养基计数,以评价噬菌体对粪肠球菌的清除效果。

1.14 统计分析

采用软件 GraphPad Prism 8 对实验数据进行统计学分析,误差条表示3次重复实验结果的标准误差,并使用 P 值表示数据的统计学显著性。

2 结果与分析

2.1 噬菌体 A149 的分离纯化与透射电镜观察

以耐万古霉素 Efs V583 为宿主菌从污水样本中分离出一株噬菌体,经过双层平板法对噬菌体进行3–4次纯化后,将其命名为 *Enterococcus* phage A149。如图1A所示,噬菌体 A149 的噬菌斑边界分明,周围无晕圈。分析透射电镜拍摄的图片(图1B),表明噬菌体 A149 具有典型的短尾噬菌体科(Podoviridae)的特征,头部直径约为46.2 nm,尾部结构长度约28.8 nm。从形态上观察,噬菌体 A149 归属于有尾噬菌体纲(Caudovirales)中的短尾噬菌体科。

2.2 噬菌体 A149 的最佳感染复数

将噬菌体 A149 与宿主菌按照 10:1、1:1、0.1:1、0.01:1 和 0.001:1 的比例分别混合后37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养6 h,双层平板法计算各个比例下噬菌体的效价。结果如表1所示,当 MOI=0.001 时,噬菌体 A149 生长扩增最佳,可达 1.0×10^{10} PFU/mL,所以0.001为噬菌体 A149 的最佳感染复数。

2.3 噬菌体 A149 的一步生长曲线

噬菌体 A149 的一步生长曲线测定结果如图2所示,噬菌体 A149 的潜伏期 ≤ 5 min,裂解期为5–30 min,裂解量约为912 PFU/cell,一个裂解周期约为30 min。

2.4 噬菌体 A149 的热稳定性和 pH 稳定性

在不同温度下测定噬菌体 A149 的热稳定性,结果如图3A所示,噬菌体 A149 在较宽的

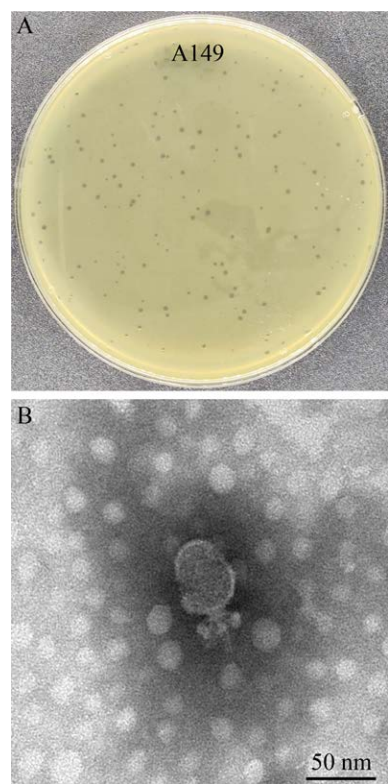


图 1 噬菌体 A149 的形态 A: 噬菌体 A149 形成的噬斑; B: 噬菌体 A149 透射电镜形态(10 000×)。 Figure 1 The morphology of bacteriophage A149. A: Plaques formed by phage A149; B: The morphology of phage A149 (transmission electron microscope, 10 000×).

表 1 噬菌体 A149 的最佳感染复数测定 Table 1 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI) of the phage A149

编号 Code	细菌 Bacteria (CFU)	噬菌体 Phage (PFU)	感染复数 MOI	6 h 滴度 6 h titer (PFU/mL)
1	1×10 ⁸	1×10 ⁹	10	3.2×10 ⁹
2	1×10 ⁸	1×10 ⁸	1	5.6×10 ⁹
3	1×10 ⁸	1×10 ⁷	0.1	9.0×10 ⁹
4	1×10 ⁸	1×10 ⁶	0.01	9.7×10 ⁹
5	1×10 ⁸	1×10 ⁵	0.001	1.0×10 ¹⁰

温度范围(20–50 °C)稳定存活, 60 °C时滴度略有下降, 70 °C及以上完全失活; 对噬菌体 A149 在不同 pH 下的稳定性进行测定, 结果如图 3B 所示, 噬菌体 A149 在 pH 4.0–10.0 范围内稳定

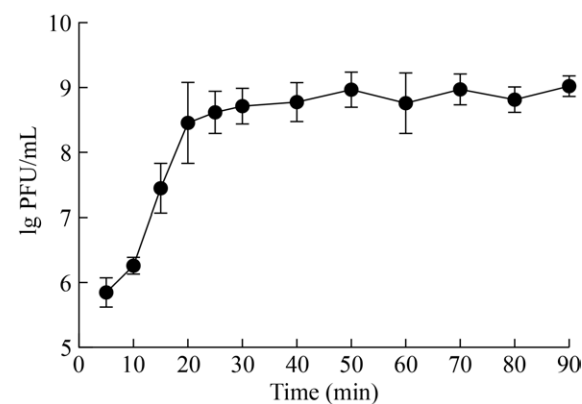


图 2 噬菌体 A149 的一步生长曲线 Figure 2 One-step growth curve of the phage A149.

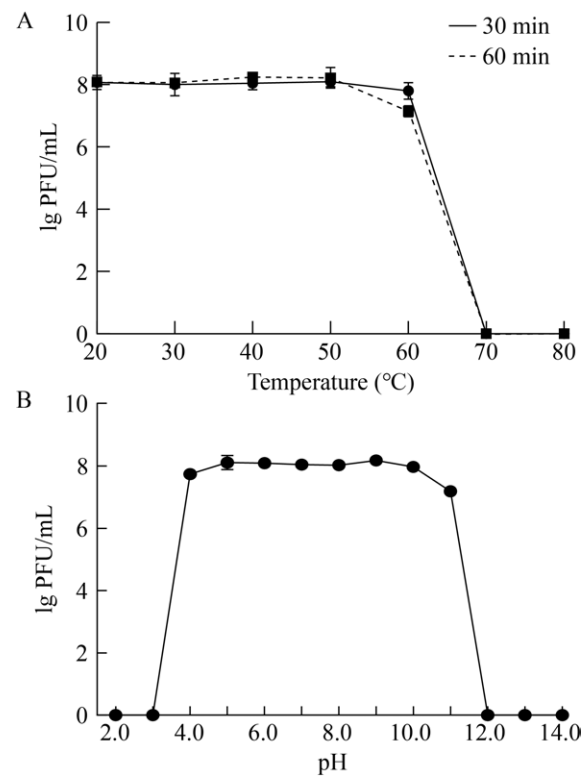


图 3 噬菌体 A149 的温度稳定性(A)和 pH 稳定性(B) Figure 3 Temperature stability (A) and pH (B) stability of phage A149.

存活, 在 pH 11.0 时滴度略微下降, pH 值低于 3.0 或高于 12.0 时完全失活。

2.5 噬菌体的全基因组分析

噬菌体 A149 的全基因组测序结果显示

(图 4), 全基因组长度为 18 561 bp, 基因组为环状双链, G+C 含量为 33.13%。通过分析全基因组的注释, 表明噬菌体 A149 含有 26 个推定的开放阅读框(open reading frame, ORF), 而已知功能的 ORF 有 13 个, 注释率约为 50% (13/26), 其余的 ORF 均被注释为假定蛋白(hypothetical protein)。该噬菌体的编码序列(coding sequence, CDS)核酸序列长度区间为

138–2 349 bp, 所有 ORF 总长为 17 778 bp, 基因组中基因密度约达到 95.78%。

全基因组 BLASTn 分析显示, 噬菌体 A149 在分类上属于病毒界(Viruses)香港病毒界(Heunggongvirae)双链 DNA 病毒门(Duplodnaviria)有尾噬菌体亚门(Uroviricota)有尾噬菌体纲(Caudoviricetes)朗特里噬菌体科(Rountreeviridae)萨尔斯噬菌体亚科(Sarlesvirinae)哥白尼病毒属

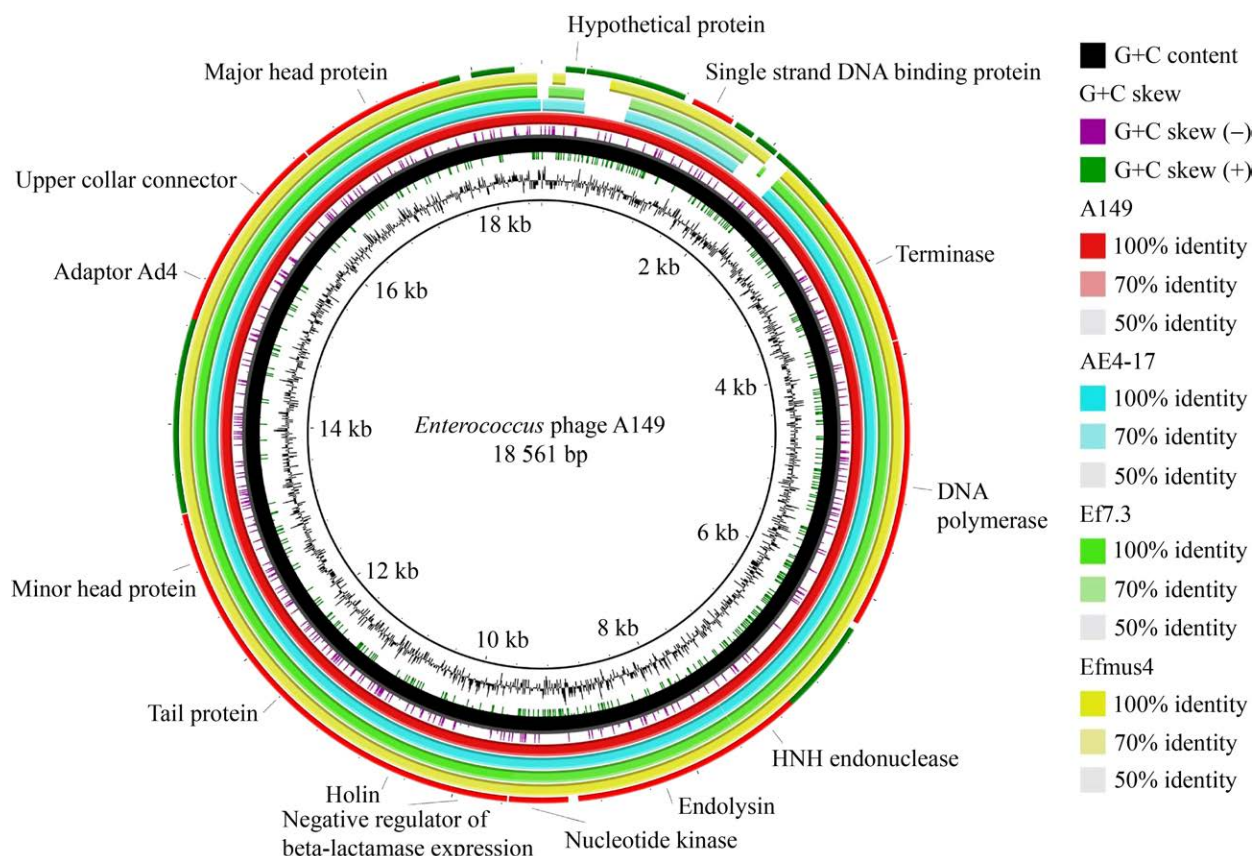


图 4 噬菌体 A149 全基因组测序分析 从内到外分别是: 最里面的黑圈代表基因组的大小, 带有波峰的黑圈代表(G+C) mol%, 向外(内)表示含量大(小)于全基因组平均(G+C) mol%; 含有紫绿色波峰的黑圈表示 G+C 偏嗜性 G-C/G+C, 向外(内)代表大(小)于 0。红色、浅蓝色、绿色、黄色的 4 个圆圈代表 A149、AE4-17、Ef7.3 和 Efmus4 的基因组序列, 颜色深浅代表了相似性程度; 最外侧圈层为开放阅读框, 红色表示已注释的蛋白, 绿色为假定蛋白。

Figure 4 Whole genome analysis of phage A149. From the inside to the outside: The innermost black circle represents the size of genome; The green and purple circles stand for G+C skew of G-C/G+C (outward means more than 0, inward means less than 0). The four circles in red, light blue, green and yellow differently represent the genomic sequences of A149, AE4-17, Ef7.3 and Efmus4 (the identity of gene is based on the shades of color); The outermost circle is the forward reading frame (red circle means annotated proteins and green for hypothetical proteins).

(Copernicovirus)。通过分析噬菌体 A149 与其他 3 种肠球菌噬菌体的比较基因圈图(图 4), 发现噬菌体 A149 的全基因组序列与肠球菌噬菌体 AE4-17 (91.01%)、Ef7.3 (95.94%)和 Efmus4 (92.34%)具有较高的遗传相似性, 尤其是噬菌体 A149 的基因序列与肠球菌噬菌体 Ef7.3 的基因序列差异在 5%以内, 即两者属于同一种的肠球菌噬菌体。

根据噬菌体 A149 蛋白的功能预测结果, 表明噬菌体 A149 基因组中包含噬菌体结构、基因复制调控及裂解相关的基因, 而在全基因序列中未发现毒力或者抗生素耐药相关的基因, 所以噬菌体 A149 不会成为跨物种基因转移的载体, 可用于噬菌体疗法。

2.6 噬菌体 A149 的系统发育树分析

基于噬菌体末端酶大亚基构建的系统发育树显示(图 5), 噬菌体 A149 与 AE4-17、Ef7.3 和 Efmus4 等噬菌体的亲缘关系最近, 均属于短尾噬菌体科(Podoviridae)。

2.7 噬菌体 A149 的裂解谱测定

测定噬菌体 A149 针对多种细菌的裂解谱, 结果如表 2 所示。噬菌体 A149 对粪肠球菌具有广谱的裂解活性, 对所测试的粪肠球菌有 86.4%的覆盖率(51/59); 对所测试的屎肠球菌(0/5)、金黄色葡萄球菌(0/2)、单核增生李斯特氏菌(0/2)和大肠杆菌(0/2)均无裂解活性。该结果表明噬菌体 A149 具有对粪肠球菌种内特异的广谱裂解效果。

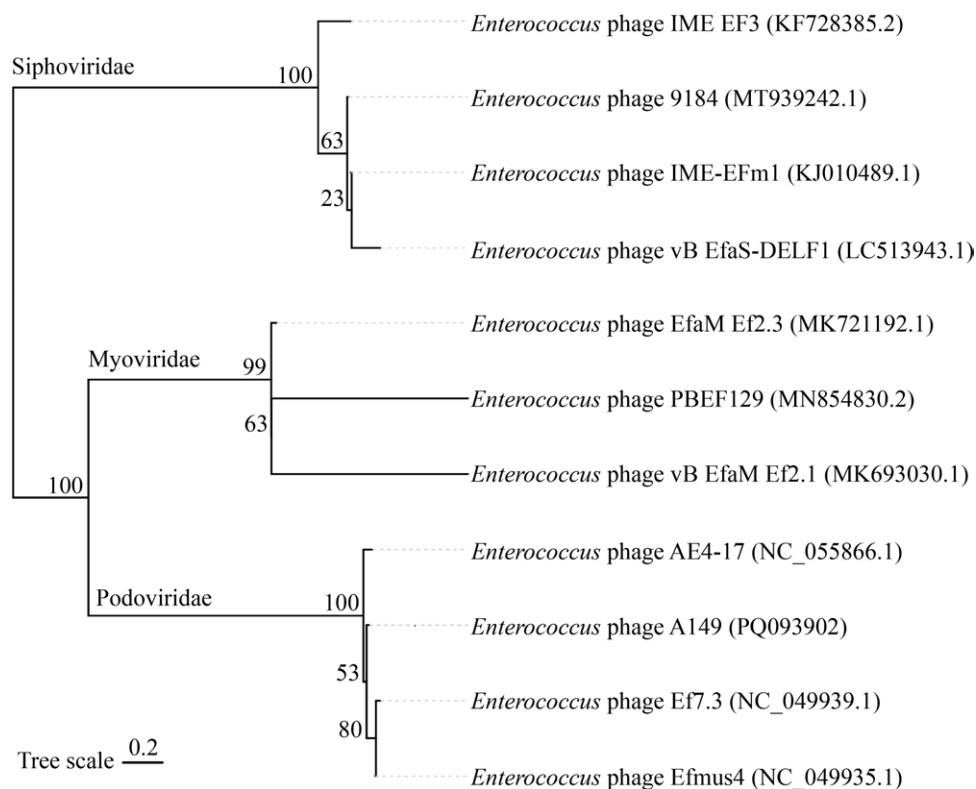


图 5 基于噬菌体末端酶大亚基氨基酸序列的系统发育树 括号中的序号为噬菌体基因组的序列号; 分支上的数字表示可信度, 数值越接近 100, 可信度越高; 标尺代表遗传距离。

Figure 5 Phylogenetic tree based on amino acid sequence of large subunit of phage terminal enzyme. Sequence number in parentheses: The sequence number of phage genome; The number on the branch: Indicates the credibility, and the closer the value is to 100, the stronger the credibility; Tree scale: The genetic distance.

表 2 噬菌体 A149 的裂解谱测定

Table 2 The lysis spectrum of the phage A149

Bacteria	Strain	Lytic effect	Bacteria	Strain	Lytic effect
<i>Enterococcus faecalis</i>	V583	++		S24E33	+
	EfsDS01	++		S24E39	++
	EfsDS02	++		S24E44	+
	EfsDS03	++		S24E49	++
	EfsDS04	++		S23E04	—
	EfsDS05	+		S23E08	++
	EfsDS06	+		S23E10	++
	EfsDS07	++		S23E17	—
	DSF02	++		S23E35	—
	DSF04	+		S23E37	—
	DSF12	++		S23E44	—
	DSF16	+		S23E47	+
	DSF17	+		HF02	++
	DSF18	—		HF03	++
	DSF19	—		HF05	++
	DSF24	++		HF07	++
	DSF25	++		HF09	++
	DSF34	++		HF18	++
	DSF35	+		HF19	++
	DSF37	++		HF20	++
	DSF42	+		HF22	+
	DSF43	+		HF24	+
	DSF44	++		HZ02	+
	DSF47	+		HZ03	+
	DSF51	+	<i>Enterococcus faecium</i>	E1071	—
	DSF53	+		E1133	—
	DSF54	++		E1644	—
	DSF64	++		E1679	—
	DSF66	+		E745	—
	DSF68	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	—
	DSF69	++		ATCC 27660	—
	DSF73	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19112	—
	S24E04	—		ATCC 19114	—
	S24E14	+	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 43895	—
	S24E25	+		ATCC 25922	—

++: 透亮空斑; +: 模糊空斑; —: 无空斑。

++: Bright spots; ++: Blurry spots; —: No spot.

2.8 噬菌体 A149 的体外抑菌曲线测定结果

测定噬菌体 A149 对耐万古霉素粪肠球菌 V583 的体外抑菌曲线, 结果如图 6 所示, 在不添加噬菌体的条件下, V583 在 8 h 左右到达稳定期; 而在添加噬菌体 149 的条件下, V583 的

生长被显著抑制, 直到 11 h 后才开始生长, 且不同 MOI 的噬菌体添加量对 V583 的抑制时间无显著性差异。添加噬菌体 11 h 后细菌开始生长是由于噬菌体抗性菌株的产生和生长。该结果表明噬菌体 A149 对 V583 的生长具有较强的体外抑制能力。

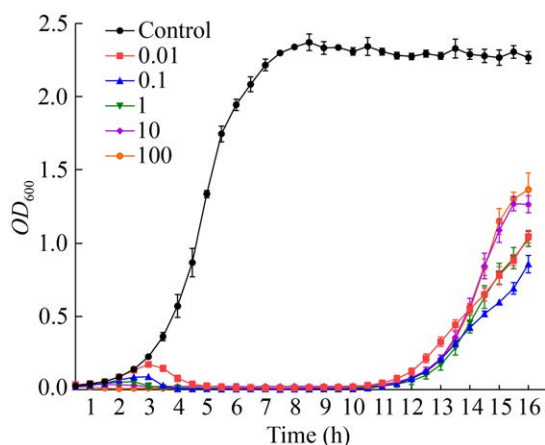


图6 不同感染复数下噬菌体 A149 的体外抑菌曲线
Figure 6 Inhibition curves of phage A149 under different multiplicity of infection (MOI) *in vitro*.

2.9 噬菌体 A149 的治疗评价

按照图 7A 的流程进行噬菌体 A149 对小鼠肠道 VRE 定殖的治疗; 对治疗后小鼠粪便中的肠球菌进行计数以评价 A149 的治疗效果, 结果如图 7B 所示, 经过混合抗生素处理和 V583 感染后, V583 可在小鼠肠道实现短期稳定的定殖 (第 1、2 天), 粪便中肠球菌载量可达 10^9 CFU/g 左右。在使用噬菌体 A149 治疗之后, 治疗组与

对照组(BHI 处理)在 2 d 后(第 3、4 天)均有显著差异, 治疗组在第二天可降低 1.3 个数量级的 V583 载量。但 V583 不能继续在对照组的小鼠肠道中实现高载量的稳定定殖, 在 V583 感染后第 5–7 天发生显著降低; 治疗组与对照组在第 5–7 天的细菌载量无显著性差异。该结果证实 A149 可在感染初期有效降低 V583 在小鼠肠道中的定殖。

3 讨论

多重耐药性肠球菌的感染是当前临床上一个突出的治疗挑战, 其中, 院内感染最为常见的肠球菌是屎肠球菌和粪肠球菌。相较于屎肠球菌, 粪肠球菌的毒力往往更强, 引起菌血症的同时也可能伴有心内膜炎^[18]。因此, 耐药粪肠球菌尤其是耐万古霉素粪肠球菌的感染严重威胁着人类健康和公共卫生安全。噬菌体作为一种历史悠久的天然抗菌剂, 在后抗生素时代再次受到人们的重视, 在治疗多重耐药菌感染的方面具有巨大的应用潜力; 已有临床案例证实, 噬菌体可成功治疗多重耐药性细菌感染^[19]。目前, 国内外对粪肠球菌噬菌体的研究相对有限, 亟须进一步筛选和研究其噬菌体的生物学

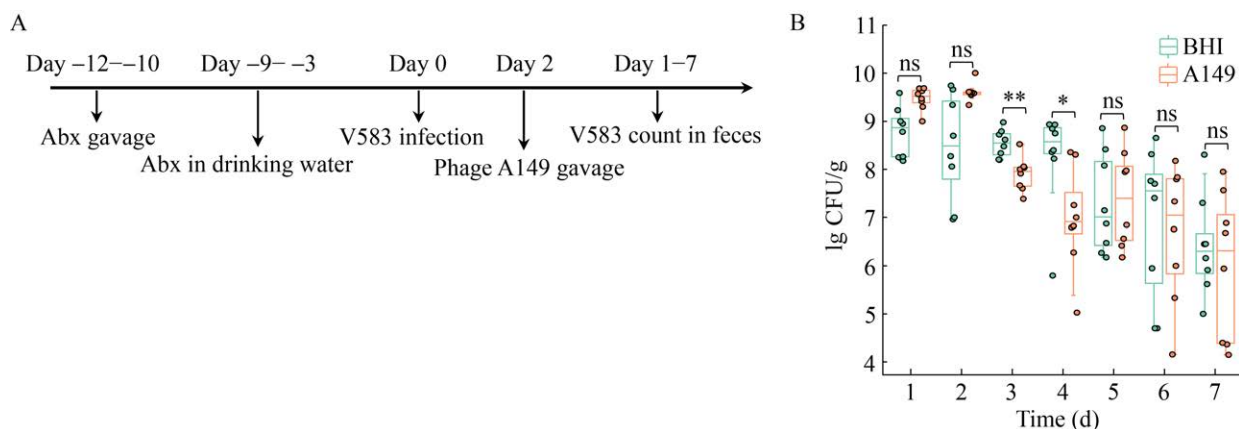


图7 噬菌体 A149 对小鼠肠道 VRE 感染的治疗评价 A: 噬菌体 A149 对小鼠肠道 VRE 感染的治疗流程图。-12、-10、-9、-3 分别表示耐万古霉素 Efs V583 感染前 12 d、10 d、9 d 以及 3 d。Abx 为 AntiBiotics 简称。B: 噬菌体 A149 治疗后粪便中的粪肠球菌计数。

Figure 7 Therapeutic evaluation of phage A149 in a mouse intestinal VRE infection model. A: Therapeutic flow chart of phage A149 in a mouse intestinal VRE infection model. -12, -10, -9, and -3 indicate at 12, 10, 9, and 3 days before VR-Efs V583 infection, respectively. Abx stands for AntiBiotics. B: *Enterococcus* count in feces after phage A149 treatment. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ns: No significant.

特性, 为建立粪肠球菌感染的噬菌体防控策略提供科学基础。

本研究分离出一株针对耐万古霉素粪肠球菌 V583 的噬菌体 A149, 其最佳感染复数为 0.001, 潜伏期短(≤ 5 min), 暴发量高(约 912 PFU/cell), 在生长特性上优于之前报道的肠球菌短尾噬菌体 Ideix 和 vB_EfaP_IME195^[9,20]。A149 可在较宽的温度范围(20–50 °C)和 pH 范围(4.0–10.0)稳定存活, 基因组不含抗生素抗性基因和毒力基因, 具有应用于治疗粪肠球菌感染的潜力。此外, A149 对粪肠球菌菌株的裂解谱为 86.4% (51/59), 在种内具有良好的广谱性; 对屎肠球菌(0/5)、单核增生李斯特氏菌(0/2)、金黄色葡萄球菌(0/2)和大肠杆菌(0/2)等均无裂解效果, 具有良好的特异性。一般认为, 短尾噬菌体的裂解谱较肌尾噬菌体(Myoviridae)和长尾噬菌体(Siphoviridae)窄^[21], 但噬菌体 A149 表现出相对较广的裂解谱, 有研究也表明肠球菌短尾噬菌体 Ump 比肌尾噬菌体 CCS1 和长尾噬菌体 CCS2、CCS3、CCS4 表现出更广泛的裂解谱^[22], 表明肠球菌短尾噬菌体的裂解谱可能相对较广。

VRE 肠道定殖是住院患者院内感染的主要来源, 因此我们模拟住院患者抗生素治疗后耐药肠球菌大量增殖造成肠道感染的特征构建了小鼠模型, 并测定了噬菌体 A149 对 VRE 肠道定殖的清除效果。相较于对照组, A149 在治疗后第 2 天可显著降低 V583 定殖, 减少约 1.3 个数量级, 具有良好的体内治疗效果。但 A149 并未实现对肠道内 V583 的完全清除, 噬菌体抗性菌的产生是其中的一个原因, 体外抑菌曲线也显示在 11 h 之后抗性菌开始进入生长期(图 6)。有研究表明噬菌体抗性菌株的产生是噬菌体不能根除肠球菌肠道感染的原因之一^[23], 证实了噬菌体抗性菌株是噬菌体疗法的局限性之一。本研究中的粪肠球菌 V583 是耐万古霉素粪肠球菌, 所以具有抗生素和噬菌体双重抗性的细菌可能已被选择出来, 并成为优势感染的菌群, 进一步增加了治疗难度。有研究表明,

一些耐药菌株在获得噬菌体抗性的同时会出现对部分抗生素的再次敏感, 因此噬菌体与抗生素的联合使用具有协同抗菌作用, 是一种值得探究的联合抗菌策略^[24]。此外, 噬菌体“鸡尾酒”疗法通过复配不同类型或不同受体的噬菌体形成组合, 可以在一定程度上有效消除噬菌体抗性, 并具备比单株噬菌体更强的杀菌能力, 是噬菌体疗法的主要研究方向之一^[25]。今后的研究应致力于筛选更多的粪肠球菌噬菌体, 并开发高效、广谱的噬菌体“鸡尾酒”疗法, 为耐药粪肠球菌感染的防控提供新的策略。

4 结论

本研究从污水样本中分离出一株可高效裂解耐万古霉素粪肠球菌 V583 的短尾噬菌体 A149, 经过对其形态学观察、生物学特性研究以及体内外抑菌实验, 表明该噬菌体具有较广的裂解谱以及较好的抑菌作用, 是治疗耐万古霉素粪肠球菌的有效生物资源, 对于粪肠球菌感染的“无抗”防控具有重要的意义。

作者贡献声明

王武华: 实验设计和执行, 论文撰写; 曾慧然: 执行实验与数据分析; 王媛: 数据收集; 李欣悦: 数据复核; 刘龙南: 数据分析与解释; 王娟: 文章审阅; 张兴林: 资金支持, 文章审阅; 马俊飞: 实验设计和文章审阅, 资金支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] BEGANOVIC M, LUTHER MK, RICE LB, ARIAS CA, RYBAK MJ, LaPLANTE KL. A review of combination antimicrobial therapy for *Enterococcus faecalis* bloodstream infections and infective endocarditis[J]. Clinical Infectious Diseases, 2018, 67(2): 303-309.
- [2] MANCUSO G, MIDIRI A, GERACE E, MARRA M, ZUMMO S, BIONDO C. Urinary tract infections: the current scenario and future prospects[J]. Pathogens, 2023, 12(4): 623.

- [3] SINGH H, DAS S, YADAV J, SRIVASTAVA VK, JYOTI A, KAUSHIK S. In search of novel protein drug targets for treatment of *Enterococcus faecalis* infections[J]. Chemical Biology & Drug Design, 2019, 94(4): 1721-1739.
- [4] EICHEL VM, LAST K, BRÜHWASSER C, von BAUM H, DETTENKOFER M, GÖTTING T, GRUNDMANN H, GÜLDENHÖVEN H, LIESE J, MARTIN M, PAPAN C, SADAGHIANI C, WENDT C, WERNER G, MUTTERS NT. Epidemiology and outcomes of vancomycin-resistant *Enterococcus infections*: a systematic review and meta-analysis[J]. Journal of Hospital Infection, 2023, 141: 119-128.
- [5] BANLA LI, SALZMAN NH, KRISTICH CJ. Colonization of the mammalian intestinal tract by enterococci[J]. Current Opinion in Microbiology, 2019, 47: 26-31.
- [6] STRATHDEE SA, HATFULL GF, MUTALIK VK, SCHOOLEY RT. Phage therapy: from biological mechanisms to future directions[J]. Cell, 2023, 186(1): 17-31.
- [7] MUKHOPADHYAY S, ZHANG PF, TO KKW, LIU YN, BAI CQ, LEUNG SSY. Sequential treatment effects on phage-antibiotic synergistic application against multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2023, 62(5): 106951.
- [8] LIU CG, GREEN SI, MIN L, CLARK JR, SALAZAR KC, TERWILLIGER AL, KAPLAN HB, TRAUTNER BW, RAMIG RF, MARESSO AW. Phage-antibiotic synergy is driven by a unique combination of antibacterial mechanism of action and stoichiometry[J]. mBio, 2020, 11(4): e01462-20.
- [9] LOSSOUARN J, BRIET A, MONCAUT E, FURLAN S, BOUTEAU A, SERR O, LEROY M, DuBOW MS, LECOINTE F, SERRON P, PETIT MA. *Enterococcus faecalis* countermeasures defeat a virulent Picovirinae bacteriophage[J]. Viruses, 2019, 11(1): 48.
- [10] BOLOCAN AS, UPADRASTA A, de ALMEIDA BETTIO PH, CLOONEY AG, DRAPER LA, ROSS RP, HILL C. Evaluation of phage therapy in the context of *Enterococcus faecalis* and its associated diseases[J]. Viruses, 2019, 11(4): 366.
- [11] LEE D, IM J, NA HJ, RYU S, YUN CH, HAN SH. The novel *Enterococcus* phage vB_EfaS_HEF13 has broad lytic activity against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2877.
- [12] SAHM DF, KISSINGER J, GILMORE MS, MURRAY PR, MULDER R, SOLLIDAY J, CLARKE B. *In vitro* susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1989, 33(9): 1588-1591.
- [13] 曹海玲, 张澳晴, 王麒麟, 郑可向, 宋国森, 张兴林, 马俊飞. 一株屎肠球菌烈性噬菌体的分离鉴定及基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 5084-5096.
- [14] CAO HL, ZHANG AQ, WANG QR, ZHENG KX, SONG GS, ZHANG XL, MA JF. Isolation, identification and genome sequencing of a virulent phage infecting *Enterococcus faecium*[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 5084-5096 (in Chinese).
- [15] 陈鑫茹, 李瑶, 付开来, 王阳, 吴珮榕, 张昱晗, 薛峰, 任建鸾, 戴建君, 汤芳. 金黄色葡萄球菌噬菌体的生物学特性分析及其对小鼠乳腺炎的治疗效果评估[J]. 中国生物工程杂志, 2024, 44(8): 85-96.
- [15] CHEN XR, LI Y, FU KL, WANG Y, WU PR, ZHANG YH, XUE F, REN JL, DAI JJ, TANG F. Biological characterization and therapeutic evaluation of *Staphylococcus aureus* bacteriophages in the treatment of mastitis in mice[J]. China Biotechnology, 2024, 44(8): 85-96 (in Chinese).
- [16] HAN GL, ZHANG JR, LUO ZD, LU B, ZHANG PF, YONG K, WANG Y, LUO Y, YANG ZX, REN MS, CAO SZ, YAO XP. Characteristics of a novel temperate bacteriophage against *Staphylococcus arlettae* (vB_SarS_BM31)[J]. International Microbiology, 2023, 26(2): 327-341.
- [17] KATO H, ROZEWICKI J, YAMADA KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization[J]. Briefings in Bioinformatics, 2019, 20(4): 1160-1166.
- [18] XU LN, WU YJ, YANG XP, PANG XX, WU YS, LI XS, LIU XY, ZHAO YZ, YU LM, WANG PK, YE B, JIANG SJ, MA JF, ZHANG XL. The Fe-S cluster biosynthesis in *Enterococcus faecium* is essential for anaerobic growth and gastrointestinal colonization[J]. Gut Microbes, 2024, 16(1): 2359665.
- [19] GÖK ŞM, DAĞI HT, KARA F, ARSLAN U, FİNDİK D. Investigation of antibiotic resistance and virulence factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical samples[J]. Mikrobiyoloji Bulteni, 2020, 54(1): 26-39.
- [20] UYTTEBROEK S, CHEN BX, ONSEA J, RUYTHOOREN F, DEBAVEYE Y, DEVOLDER D, SPIRIET I, DEYPERE M, WAGEMANS J, LAVIGNE R, PIRNAY JP, MERABISHVILI M, de MUNTER P, PEETERMANS WE, DUPONT L, van GERVEN L, METSEMAKERS WJ. Safety and efficacy of phage therapy in difficult-to-treat infections: a systematic review[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2022, 22(8): e208-e220.
- [21] WANG RH, XING SZ, ZHAO FY, LI P, MI ZQ, SHI TX, LIU H, TONG YG. Characterization and genome analysis of novel phage vB_EfaP_IME195 infecting *Enterococcus faecalis*[J]. Virus Genes, 2018, 54(6): 804-811.
- [22] DION MB, OECHSLIN F, MOINEAU S. Phage diversity, genomics and phylogeny[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(3): 125-138.
- [23] WANDRO S, GHATBALE P, ATTAI H, HENDRICKSON C, SAMILLANO C, SUH J, DUNHAM SJB, PRIDE DT, WHITESON K. Phage cocktails constrain the growth of *Enterococcus*[J]. mSystems, 2022, 7(4): e0001922.
- [24] CHATTERJEE A, JOHNSON CN, LUONG P, HULLAHALLI K, McBRIDE SW, SCHUBERT AM, PALMER KL, CARLSON PE Jr, DUERKOP BA. Bacteriophage resistance alters antibiotic-mediated intestinal expansion of enterococci[J]. Infection and Immunity, 2019, 87(6): e00085-19.
- [25] 邵健健, 杜红旭, 曲逸文, 毕师诚, 张莹莹, 马跃. 噬菌体与抗生素的联合应用及其协同作用机制[J]. 中国抗生素杂志, 2022, 47(10): 985-993.
- [25] SHAO JJ, DU HX, QU YW, BI SC, ZHANG YY, MA Y. Combined application and its synergistic mechanisms of bacteriophages and antibiotics[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2022, 47(10): 985-993 (in Chinese).
- [26] HATFULL GF, DEDRICK RM, SCHOOLEY RT. Phage therapy for antibiotic-resistant bacterial infections[J]. Annual Review of Medicine, 2022, 73: 197-211.