

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.12.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210521.0827.002.html\(2021-05-21\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210521.0827.002.html(2021-05-21))

一株泛耐药肺炎克雷伯菌噬菌体的分离及其对细菌耐药性变化的影响^{*}

胡 岚,王 鹤[△],王 超,齐文杰
(首都医科大学附属北京友谊医院感染内科 100050)

[摘要] **目的** 探讨泛耐药肺炎克雷伯菌噬菌体的分离及其对细菌耐药性变化的影响。**方法** 收集该院污水站处理前污水,提取肺炎克雷伯菌噬菌体,筛选出泛耐药菌株的噬菌体,对其生物学特性进行分析,并探讨其与细菌在体外试验中相互作用的关系。**结果** 通过处理提取并纯化分离得到噬菌体 φKPN338HL7,经过 3 次纯化后,双层 LB 平板可见清晰、等圆、大小均一、外缘光滑透明、直径 3~4 mm 的噬菌斑,噬菌体效价约为 5×10¹⁰ pfu/mL,最佳感染复数(MOI)=4 时能产生最佳裂解效果。经过一段时间的噬菌体刺激后,该菌株对于亚胺培南及厄他培南的敏感性有所改变。**结论** 噬菌体可以诱导细菌耐药性变化,为抗生素再次使用提供了可能。

[关键词] 噬菌体;裂解性噬菌体;泛耐药;肺炎克雷伯杆菌;药敏试验;MIC 值
[中图分类号] Q939.48 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)12-1998-04

Isolation of phage from a strain of pan-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* and its effect on bacterial drug resistance change^{*}

HU Lan,WANG He[△],WANG Chao,QI Wenjie
(Department of Infection Internal Medicine,Affiliated Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University,Beijing 100050,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the isolation of phage of pan- drug resistant *Klebsiella pneumoniae* and of its effect on bacterial drug resistance change. **Methods** The sewage was collected from the sewage treatment station of this hospital. The phages of *Klebsiella pneumoniae* were extracted. The phages of pan-drug resistant strains were screened, their biological characteristics were analyzed, and their interaction with bacteria in the in vitro experiment was investigated. **Results** The phage φKPN338HL7 was isolated and purified by treatment. After 3 times of purification, the phage plaque with equal circle, uniform, smooth and transparent outer edge and a diameter of 3—4 mm could be clearly seen in the double layer LB plate,the phage titer was about 5×10¹⁰ pfu/mL,when the maximal multiplicity of infection(MOI)=4,the optimal splitting decomposition effect could be produced. After a period of phage stimulation,the sensitivity of this strain to imipenem and ertapenem had some change. **Conclusion** Phage can induce the change of bacterial drug resistance,and provides the possibility for the reuse of antibiotics.

[Key words] phage; lytic phage; pan-drug resistant; klebsiella pneumoniae; drug sensitivity test; MIC value

随着抗生素的广泛应用,细菌耐药现象日益严重。噬菌体作为一种可以杀灭细菌的病毒,有着抗生素无法比拟的优势,同时,由于它的生物学特性,对于临床推广和应用也有很大的局限。深入的了解噬菌体的特性,以及它在吞噬细菌后对于细菌可能产生的影响,对于将来发展噬菌体疗法以应对泛耐药细菌的

危害有着一定的意义和价值。本研究探讨一株泛耐药肺炎克雷伯菌噬菌体的分离及其对细菌耐药性变化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

本院细菌室保存的一株泛耐药肺炎克雷伯菌

^{*} 基金项目:首都卫生发展科研专项项目(2016-3-2023)。 作者简介:胡岚(1972—),副主任医师,硕士,主要从事耐药菌及感染免疫研究。
[△] 通信作者,E-mail:coffin_1985@sina.com。

株。液体 LB 培养基:胰蛋白胨(英国 Thermo Fisher Scientific 公司)10 g,酵母提取物(英国 Thermo Fisher Scientific 公司)5 g,NaCl 10 g,加去离子水(或蒸馏水)至 1 L,pH 7.4;0.7%半固体 LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,琼脂粉(美国 Sigma 公司)7 g,加去离子水(或蒸馏水)至 1 L,pH 7.4;1.5%固体 LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,琼脂粉 15 g,加去离子水(或蒸馏水)至 1 L,pH 7.4。将上述培养基配置完毕后送消毒供应室高压灭菌。SM 液:100 mmol/L NaCl,100 mmol/L MgSO₄,50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液(美国 Amresco 公司),pH 7.5,送消毒供应室高压灭菌。CaCl₂,氯仿,聚乙二醇 PEG8000(美国 Sigma 公司)。0.45 μm、0.22 μm 生物滤膜(美国 Millipore 公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株的制备

一株泛耐药肺炎克雷伯菌菌株通过血培养基培养方式进行保留、传代。无菌条件下划线法接种在固体 LB 平板上,经过 37 ℃ 过夜培养,次日挑选独立菌落接种于 10 mL 的液体 LB 培养液(或肉汤培养液)中,37 ℃ 160 r/min 振荡培养 6 h 至对数生长早期,本研究所用菌均为对数生长早期致病菌。

1.2.2 污水标本制备

本院污水处理指定站点留取未经处理前的污水 3L(2~3 次)。加入固体 CaCl₂ 至 CaCl₂ 的终末浓度为 1 mmol/L,10 000 r/min 离心 20 min,取上清液加入 PEG8000 至终浓度为 10.0%(W/V),4 ℃ 冰箱过夜,12 000 r/min 离心 20 min,沉淀用 5 mL 噬菌体稀释液重悬,加入等体积的氯仿,振荡摇匀 30 s,5 000 r/min 离心 20 min,取上清液先后用 0.45 μm、0.22 μm 滤膜过滤掉细菌及杂质,仅留取小于 0.22 μm 物质包括噬菌体[或将废水 14 170×g 离心 15 min,取上清液通过 0.22 μm 滤膜滤过细菌,将上清液加入等体积的含有肺炎克雷伯菌的 LB 培养液中,37 ℃ 过夜至少 12 h,用以扩增噬菌体,次日将培养液加入氯仿(32 μL/mL)萃取,4 ℃ 14 170×g 离心 15 min]。

1.2.3 噬菌体分离

取上述制备完毕的污水 100 μL,加入宿主菌(对数生长期的肺炎克雷伯菌 LB 液)液体 200 μL,混匀后室温放置 15 min,加入 47 ℃ 融化的 0.7%琼脂 LB 培养基 2 mL,混匀后再倾倒入固体 LB 平板上,37 ℃ 过夜培养,次日观察噬菌斑的出现情况。对有噬菌斑的,挑取单个噬菌斑,适当稀释后按上述方法再做噬菌斑形成实验,重复 3 次用以纯化噬菌体。最后,挑取纯化后的单个噬菌斑,接种于 5 mL 宿主菌中,

37 ℃ 160 r/min 振荡培养 6 h 以扩增噬菌体,10 000 r/min 离心 20 min,收集上清液以 0.22 μm 滤膜过滤即得较纯的噬菌体液。噬菌体提纯,去除内毒素,提纯前后测定标本中内毒素水平。

1.2.4 噬菌体滴度测定

将噬菌体液用液体 LB 培养基 10 倍连续稀释,每稀释度取 100 μL,加入 200 μL 宿主菌液,然后按上述方法铺双层琼脂平板。滴度(PFU/mL)=噬斑数×稀释倍数×100,最终取 10 次结果的平均值为其液体滴度。

1.2.5 细菌鉴定及耐药性分析

制备噬菌体完毕后,将制备完毕的噬菌体回种到细菌培养基,证明其活性,观察噬菌体溶液、细菌菌液、培养液共同培养后的变化,37 ℃ 过夜保存,当出现由清凉再次变为浑浊后,将细菌菌液在无菌条件下接种到固体 LB 平板上,37 ℃ 过夜培养,次日挑选独立菌株送本院细菌室鉴定细菌及耐药性分析,对比细菌耐药性的变化情况。

2 结 果

2.1 肺炎克雷伯菌耐药情况

本院一株肺炎克雷伯菌为泛耐药菌株,噬菌体裂解刺激前药敏结果见表 1。

表 1 肺炎克雷伯菌的噬菌体刺激前后药敏结果

项目	噬菌体刺激前		噬菌体刺激后	
	MIC 值	结果	MIC 值	结果
阿米卡星	≤2	S	≤2	S
氨苄西林	≥32	R	≥32	R
氨苄西林/舒巴坦	≥32	R	≥32	R
氮曲南	≥64	R	≥64	R
头孢他啶	≥64	R	≥64	R
环丙沙星	≥4	R	≥4	R
头孢曲松	≥64	R	≥64	R
头孢替坦	≥64	R	≥64	R
厄他培南	≥8	R	2	I
头孢吡肟	≥64	R	≥64	R
庆大霉素	≥16	R	≥16	R
亚胺培南	≥16	R	4	I
左旋氧氟沙星	≥8	R	≥8	R
呋喃妥因	256	R	256	R
复方新诺明	80	R	80	R
妥布霉素	8	I	8	I
哌拉西林/他唑巴坦	≥128	R	≥128	R

MIC:最低抑菌浓度;R:敏感;I:中度敏感;S:耐药。

2.2 噬菌体 φKPN338HL7 的分离

本实验筛选出一株能裂解泛耐药肺炎克雷伯菌

的噬菌体, 根据国际命名规则将其命名为 ϕ KPN338HL7, 经过 3 次纯化后, 双层 LB 平板可见清晰、等圆、大小均一、外缘光滑透明、直径 3~4 mm 的噬菌斑, 见图 1。

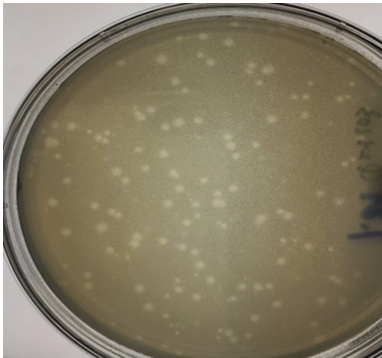


图 1 分离得到的噬菌体在双层 LB 平板上形成的噬菌斑

2.3 ϕ KPN338HL7 滴度测定

根据不同浓度的噬菌体液与细菌混合后, 培养所得的双层平板结果显示本实验的噬菌体效价约为 5×10^{10} pfu/mL, 见图 2。

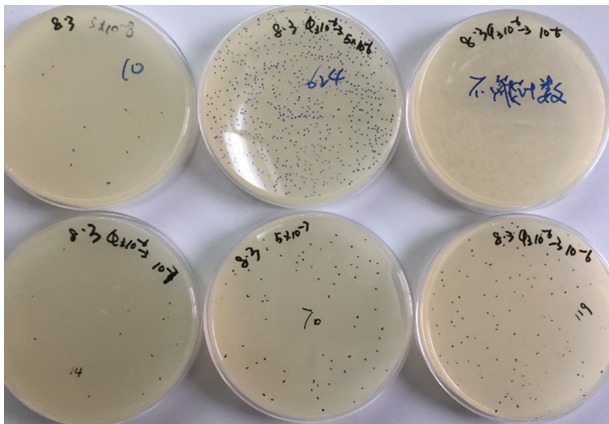


图 2 不同浓度的噬菌体液与细菌液混合培养后形成的噬菌斑

2.4 ϕ KPN338HL7 溶原性测定

将 1 mL 悬液放入 2 mL 标准冻存管中, 置于电动搅拌器上, 距离 15 W 紫外线灯管 30 cm 以外照射, 并将照射后的噬菌体液与细菌液共同培养, 并应用单纯细菌液做阴性对照、未照射噬菌体与细菌混合液做阳性对照, 结果显示被照射灭活过的噬菌体无法再形成噬菌斑, 与单纯细菌液铺板结果一致, 因此, 可以证明该噬菌体为裂解性噬菌体, 非溶原性噬菌体。

2.5 ϕ KPN338HL7 最佳感染复数(MOI)测定

本研所得到的噬菌体以 0.001、0.01、0.1、1、2、3、4、6、8 的 MOI 进行感染, 结果显示 ϕ KPN338HL7 的 MOI=4 时所能产生最佳裂解效果, 见图 3。

2.6 ϕ KPN338HL7 诱导细菌耐药性变化

细菌在短暂培养液中传代并不会改变细菌的耐

药性, 而经过一段时间的噬菌体刺激后, 该菌株对于亚胺培南及厄他培南的敏感性有所改变, 其他种类的抗生素无明显变化, 见表 1。

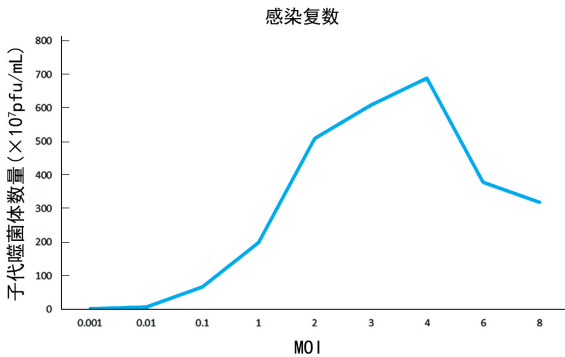


图 3 噬菌体感染复数结果

3 讨 论

随着医学不断地发展与进步, 人们对细菌的认识越来越深入, 抗生素的发明和应用为医学带来巨大的进步。随着抗生素的广泛使用, 细菌的耐药性也是不断地提高, 给公共卫生带来了巨大的挑战, 对于泛耐药的定义, 目前国内外基本可以达成一定的共识, 认为是对几乎所有分类的常用抗菌药物全部耐药, 仅对 1~2 种抗生素敏感时, 称为泛耐药^[1]。所以在这种情况下, 临床上很难应用有效的药物对患者进行治疗, 目前迫切的需要寻找到新的抗生素或者新的治疗方法来挽救这些患者的生命。

噬菌体治疗细菌感染早已成为可能, 有诸多体外实验提示噬菌体可以有效地对抗细菌, 挽救生命^[2-5]。噬菌体用于治疗细菌感染有很多特点, 首先噬菌体是一种病毒, 它可以自我的复制、增殖, 每一个裂解周期就可以释放出更多的子代噬菌体, 如果噬菌体裂解周期比细菌增殖速度快, 那么 1 个噬菌体就可以消灭它所能识别的所有病原体。同时噬菌体又有非常严格的宿主专一性, 仅能识别专一的某种或者某类病原体, 这既是它的优势也是它的劣势, 优势是它不会对其他的细菌产生任何作用, 这样可以非常有效地保护好机体内其他的细菌免受损伤, 从而避免了广谱抗生素常发生的细菌菌群紊乱, 这种高度的专一性使得噬菌体可以进行“靶向”治疗^[6]。但是这同时也带来了问题, 有时候尽管是同种同属的细菌, 基因型稍有差异, 那么噬菌体就有可能不能识别, 而恰恰这一点也是限制了噬菌体发展的重要原因。已有很多关于利用噬菌体治疗人类疾病的报道^[7-8], 但宿主谱狭窄一直是治疗中存在的问题。正因为如此, 国内外才出现了许多“鸡尾酒疗法”的研究^[9-10], 即将不同的噬菌体混合以提高宿主谱, 从而达到有效的治疗目的。

噬菌体制剂是目前比较前沿的制剂类型, 国内并没有相应的成品及药品申报, 美国亚瑟安德鲁医学公

司(arthurandrew medical inc.)研制生产的高活性复合噬菌体制剂 Floraphge 是全球首款复合制剂。另外,一种名叫分歧杆菌 Actiphage 噬菌体软膏也被广泛用于治疗结核性口腔溃疡。

上海的一些研究所也在采用噬菌体治疗耐药菌,但研究进展缓慢。在国外主要以格鲁吉亚等应用最为广泛,而俄罗斯、英国、美国等也有个案报告。

理论上只要噬菌体生长的速度大于细菌的增殖速度就可能完成对容器内所有细菌的杀灭,但实际上很难构建一个数学模型来揭示噬菌体的代谢动力学, TIWARI 等^[11]的研究表明,噬菌体发挥作用时要借助中性粒细胞,并在细菌体内不断繁殖裂解,同时超过 72 h 后噬菌体又会被机体的免疫系统清除,这种巧妙的平衡关系使得给药时机与传统抗生素有着本质的区别,因此这种药代动力学研究起来是非常困难的。

本研究从医院处理前污水中成功分离出一株能裂解泛耐药肺炎克雷伯菌的噬菌体,并将其命名为 ϕ KPN338HL7。该噬菌体裂解的空斑清晰透明,这一点符合裂解性噬菌体的特点,其经过紫外线诱导照射之后,再进行噬菌斑实验时,并不能形成有效的噬菌斑,这表明紫外线照射对于噬菌体这类病毒可以起到灭活的作用,同时也证明此次分离得到的噬菌体是非溶原性噬菌体。因此可以通过这种紫外线诱导的方法得到鉴别溶原性与裂解性噬菌体的结论,溶原性噬菌体相对温和,因此临床上意义有限,而裂解性噬菌体其生物学特性比较猛烈,通常条件下可以快速裂解杀灭细菌,为临床提供治疗的可能,本实验所提取到的噬菌体就属于此类。此前有研究已经证实,除紫外线外,医院常用的消毒剂对噬菌体的影响相对小^[12],其对噬菌体的影响率在 50% 以下,包括 84 消毒液、双氧水、苯扎溴铵、石碳酸、戊二醛、碘伏等。噬菌体在某种层面上具有一定的稳定性,这也为噬菌体将来可以在临床广泛应用提供了一定的支持。

目前噬菌体的提取方法多种多样,有应用透析膜、冰水冷凝等。本研究发现,最简单的实验方法也可以得到同样的结果,同时本研究提供的方法简单,可操作性好,适合一些基层单位开展。在噬菌体的保存方面,本研究与彭帆等^[13]研究的结果类似,噬菌体的有效保存温度在 $-20\sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$,而小于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,则会在半年左右降低噬菌体的裂解活性,降低的速度则是多个指数等级的。

本研究也观察到噬菌体与细菌长时间培养,可使浑浊的细菌培养液变清亮后再次变为浑浊,接种后不能再形成噬菌斑,提示细菌可能发生了基因的突变,使得表面的蛋白位点改变,噬菌体不能再对其进行识别,出现了“逃逸”的现象,这种情况属于噬菌体对细

菌外部环境的选择结果,类似于抗生素的选择,也是细菌强大的适应性表现。但是本研究也显示,诱导突变的细菌使某些抗生素敏感性发生一定的变化。这可能提示了细菌在发生基因突变的同时,某些耐药基因也被改变,抑或丢失,使得原本无效的药物可能再次有效,这需要对其进行基因分析。在以后的研究中,有待进一步的研究噬菌体是如何改变耐药细菌的耐药性,从而为治疗泛耐药细菌的感染提供一种有效的治疗可能。

参考文献

- [1] Chinese XDR Consensus Working Group, GUAN X, HE L, et al. Laboratory diagnosis, clinical management and infection control of the infections caused by extensively drug-resistant Gram-negative bacilli: a Chinese consensus statement[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22 Suppl 1: S15-25.
- [2] 王韧韬, 刘又宁. 噬菌体治疗细菌感染的临床应用与进展[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2020(6): 539-543.
- [3] JAULT P, LECLERC T, JENNES S, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial[J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19(1): 35-45.
- [4] HOYLE N, ZHVANIYA P, BALARJISHVILI N, et al. Phage therapy against *Achromobacter xylosoxidans* lung infection in a patient with cystic fibrosis: a case report[J]. Res Microbiol, 2018, 169(9): 540-542.
- [5] LEITNER L, SYBESMA W, CHANISHVILI N, et al. Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial[J]. BMC Urol, 2017, 17(1): 90.
- [6] KAKASIS A, PANITSA G. Bacteriophage therapy as an alternative treatment for human infections. A comprehensive review[J]. Int J Antimicrob Agents, 2019, 53(1): 16-21.
- [7] JENNES S, MERABISHVILI M, SOENTJENS P, et al. Use of bacteriophages in the treatment of colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in a patient (下转第 2006 页)

- tilization[J]. *Diabetes*, 2006, 55 (12): 3418-3428.
- [7] TAN Y, XIN X, MING Q. Prevalence and characteristics of overweight and obesity among Chinese youth aged 12-18 years: a multistage nationwide survey [J]. *Public Health*, 2018, 155:152-159.
- [8] CHEN M, WANG H, LI X, et al. PLIN1 deficiency affects testicular gene expression at the meiotic stage in the first wave of spermatogenesis[J]. *Gene*, 2014, 543(2):212-219.
- [9] MACPHERSON R E, RAMOS S V, VANDENBOOM R, et al. Skeletal muscle PLIN proteins, ATGL and CGI-58, interactions at rest and following stimulated contraction[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, 304(8):R644-650.
- [10] BOSMA M, HESSELINK M K, SPARKS L M, et al. Perilipin 2 improves insulin sensitivity in skeletal muscle despite elevated intramuscular lipid levels [J]. *Diabetes*, 2012, 61 (11):2679-2690.
- [11] KLEINERT M, PARKER B L, CHAUDHURI R, et al. mTORC2 and AMPK differentially regulate muscle triglyceride content via Perilipin 3[J]. *Mol Metab*, 2016, 5(8):646-655.
- [12] RAMOS S V, TURNBULL P C, MACPHERSON R E, et al. Changes in mitochondrial perilipin 3 and perilipin 5 protein content in rat skeletal muscle following endurance training and acute stimulated contraction[J]. *Exp Physiol*, 2015, 100(4):450-462.
- [13] LAURENS C, BOURLIER V, MAIRAL A, et al. Perilipin 5 fine-tunes lipid oxidation to metabolic demand and protects against lipotoxicity in skeletal muscle[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:38310.
- [14] BOSMA M, SPARKS L M, HOOVELD G J, et al. Overexpression of PLIN5 in skeletal muscle promotes oxidative gene expression and intramyocellular lipid content without compromising insulin sensitivity[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831(4):844-852.
- [15] BINDESBØLL C, BERG O, ARNTSEN B, et al. Fatty acids regulate perilipin5 in muscle by activating PPAR δ [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54 (7):1949-1963.
- (收稿日期:2020-08-15 修回日期:2021-03-12)
-
- (上接第 2001 页)
- with acute kidney injury-a case report[J]. *Crit Care*, 2017, 21(1):129.
- [8] 王宁宁, 魏晓宇, 尚津宇, 等. 噬菌体治疗细菌感染的机制及现状[J]. *吉林医药学院学报*, 2019, 40(6):437-439.
- [9] SCHOOLEY R T, BISWAS B, GILL J J, 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- e00917.
- [10] FAZZINO L, ANISMAN J, CHACNSF J M, et al. Phage cocktail strategies for the suppression of a pathogen in a cross-feeding coculture[J]. *Microb Biotechnol*, 2020, 13(6):1997-2007.
- [11] TIWARI B R, KIM S, RAHMAN M, et al. Antibacterial efficacy of lytic *Pseudomonas* bacteriophage in normal and neutropenic mice models[J]. *Microbiology*, 2011, 49(6):994-999.
- [12] 王小亭, 李亚辉, 靳静等. 6 种常用消毒剂对 28 株噬菌体杀菌作用影响的研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11(6):545-549, 561.
- [13] 彭帆, 童贻刚, 柏长青. 多耐药鲍曼不动杆菌噬菌体 IME-AB6 的分离、生物特性及保存方法研究[J]. *生物技术通讯*, 2013, 24(5):641-644.
- (收稿日期:2020-08-18 修回日期:2021-01-02)