



梁芮萁, 黄淇星, 王璐, 王顺, 白慧方, 李俊, 艾泽, 张蕾. 肠炎沙门菌噬菌体 vB_SalP_QS 的生物学特性及治疗小鼠沙门菌肠道感染的研究[J]. 中国农业大学学报, 2024, 29(09):90-101.

LIANG Ruiqi, HUANG Qixing, WANG Lu, WANG Shun, BAI Huifang, LI Jun, AI Ze, ZHANG Lei. Biological characterization of *Salmonella enterica* phage vB_SalP_QS and treatment of *Salmonella enteric* infection in mice[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2024, 29(09):90-101.

DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2024.09.08

肠炎沙门菌噬菌体 vB_SalP_QS 的生物学特性及治疗小鼠 沙门菌肠道感染的研究

梁芮萁^{1#} 黄淇星^{1#} 王璐¹ 王顺¹ 白慧方¹ 李俊¹ 艾泽¹ 张蕾^{1,2*}

(1. 吉林农业大学 动物科学技术学院|动物医学院, 长春 130118;

2. 长春博瑞科技股份有限公司, 长春 130051)

摘要 为探索针对耐药沙门菌的噬菌体治疗方法,以沙门菌 SE-21 为宿主菌,从污水中分离得到一株烈性噬菌体并命名为 vB_SalP_QS。在鉴定 vB_SalP_QS 生物学特性的基础上,对 vB_SalP_QS 和 vB_SalP_SE29 混合噬菌体治疗由沙门菌 SE-21 引起小鼠肠炎的治疗效果进行评价。结果表明:1)电镜观察可见该噬菌体属于有尾病毒目(Caudovirales),其效价为 8×10^8 PFU/mL。2)vB_SalP_QS 的最佳感染复数(MOI)为 0.01,潜伏期为 40 min,裂解期为 50 min。温度为 4~60 °C 具有较好的活性,在 pH 4~pH 10 范围内非常稳定。平板点滴法试验表明 vB_SalP_QS 可以裂解 17 株沙门菌,裂解率为 44.7%。3)噬菌体 vB_SalP_QS 的全基因组测序分析显示,噬菌体 vB_SalP_QS 全长 42 293 bp,GC 含量为 49%,共含有 72 个开放阅读框,且不含有溶源性、毒力因子及整合酶基因。4)小鼠体内治疗试验显示,宿主菌 SE-21 对小鼠最小致死量为 5×10^8 CFU/mL,感染小鼠经 vB_SalP_QS ($100 \mu\text{L } 1 \times 10^7$ PFU/mL)和 vB_SalP_SE29 ($100 \mu\text{L } 1 \times 10^7$ PFU/mL)混合治疗后存活率为 100%,单独用 vB_SalP_QS 治疗组 ($200 \mu\text{L } 1 \times 10^7$ PFU/mL)的小鼠存活率为 80%,单独用 vB_SalP_SE29 治疗组 ($200 \mu\text{L } 1 \times 10^7$ PFU/mL)的小鼠存活率为 70%,对照组全部死亡。5)病理组织观察表明,混合噬菌体可以有效杀灭沙门菌 SE-21 的同时,还能更好地保护小鼠肠绒毛,可显著提高感染 SE-21 的小鼠存活率。综上,噬菌体 vB_SalP_QS 具有良好的酸碱稳定性、热稳定性以及安全性,混合噬菌体联合治疗效果优于噬菌体单一治疗。本研究为噬菌体制剂治疗沙门菌感染提供了重要依据,也为混合噬菌体鸡尾酒疗法的临床应用奠定基础。

关键词 沙门菌; 混合噬菌体; 全基因组测序; 生物学特性; 治疗效果

中图分类号 S85

文章编号 1007-4333(2024)09-0090-12

文献标志码 A

Biological characterization of *Salmonella enterica* phage vB_SalP_QS and treatment of *Salmonella enteric* infection in mice

LIANG Ruiqi^{1#}, HUANG Qixing^{1#}, WANG Lu¹, WANG Shun¹, BAI Huifang¹, LI Jun¹, AI Ze¹,
ZHANG Lei^{1,2*}

(1. College of Animal Science and Technology|College of Veterinary Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2. Changchun Borui Science & Technology Co., Ltd, Changchun 130051, China)

收稿日期: 2024-04-30

基金项目: 2023 年吉林省博士后优先资助项目; 吉林农业大学国家级大学生创新创业训练计划项目; 吉林省自然科学基金(20220101311JC)

第一作者: 梁芮萁(ORCID:0009-0008-3064-2916), 硕士研究生, E-mail:lrq18443400872@163.com

黄淇星(ORCID:0009-0009-3027-2481), 本科生, E-mail:a1171180975@163.com

注: #梁芮萁和黄淇星对本文具有同等贡献。

通讯作者: 张蕾(ORCID:0000-0002-1869-5096), 副教授, 主要从事噬菌体及其衍生物与宿主细菌作用机制研究, E-mail:zhanglei0221@jlu.edu.cn

Abstract In order to study the phage therapy methods for drug-resistant *Salmonella*, a virulent bacteriophage was isolated from sewage with *Salmonella* SE-21 as the host bacterium and named vB_SalP_QS. On the basis of identifying the biological characteristics of vB_SalP_QS, vB_SalP_QS and vB_SalP_SE29 hybrid phage for the treatment of enteritis in mice caused by SE-21 was evaluated. The results showed that: 1) The phage belonged to the order of caudoviruses (Caudovirales) by electron microscopy. The potency of the phage was 8×10^8 PFU/mL. 2) Biological characterization showed that the phage vB_SalP_QS had an optimal multiplicity of infection (MOI) of 0.01, with an incubation period of about 40 min, and a lysis period of about 50 min. It had good activity at temperatures ranging from 4 °C to 60 °C, and it was very stable within the range of pH 4–pH 10. vB_SalP_QS could lyse 17 strains of *Salmonella* by The plate spot test. The cracking rate was 44.7%. 3) The phage vB_SalP_QS was 42 293 bp in total length, had a GC content of 49%, contained a total of 72 open reading frames (ORFs), and had no lysogeny, virulence factors, and integrase genes. 4) *In vivo* therapeutic tests in mice showed that the minimum lethal dose of the host bacterium SE-21 was 5×10^8 CFU/mL, and the survival rate of infected mice treated with vB_SalP_QS (100 μ L 1×10^7 PFU/mL) and vB_SalP_SE29 (100 μ L 1×10^7 PFU/mL) was 100%. The survival rate of mice in the vB_SalP_QS treatment group (200 μ L 1×10^7 PFU/mL) was 80%. The survival rate of mice in the vB_SalP_SE29 treatment group (200 μ L 1×10^7 PFU/mL) was 70%. All control mice died. 5) Pathological observations showed that mixed phage could effectively kill *Salmonella* SE-21 and also better protect the intestinal villi of mice, which could significantly improve the survival rate of mice infected with SE-21. In conclusion, phage vB_SalP_QS has good acid-base, thermal stability as well as safety, and the therapeutic effect of mixed phage combination therapy is higher than that of phage monotherapy. This study provides an important experimental basis for the treatment of *Salmonella* infections with phage preparations and lays the foundation for the clinical application of mixed phage therapy.

Keywords *Salmonella*; mixed phage; whole-genome sequencing; biological properties; therapeutic effect

沙门菌(*Salmonella*)属于肠杆菌科,革兰氏阴性肠道杆菌,是一种人兽共患病原菌^[1],也是全世界范围内常见的食源性病原菌,可引起畜禽产生败血症、肠炎、腹泻等各种疾病并导致人类产生小肠结肠炎、菌血症及腹泻等。治疗沙门菌造成的肠道感染,传统方法多采用抗生素治疗。然而,随着沙门菌对多种常用抗生素耐药性的增加,肠道沙门菌感染的治疗变得更具难度。因此,迫切需要开发一种新的针对沙门菌感染的治疗策略。

噬菌体(Bacteriophage)是一种能在细菌体内完成自我生长繁殖的病毒,广泛分布于自然环境中。噬菌体对细菌具有高度特异性,能够特异性感染杀死其目的菌株,并且不会对机体的正常菌群产生影响^[2]。此外,噬菌体的分离途径简单,研发周期短,所需成本低^[3]。治疗过程中所需剂量较少,进入动物机体能够快速遍布全身,具有少量、高效等优点^[4]。目前,噬菌体疗法已被广泛应用于抑制细菌的生长和感染的治疗中^[5],Cheng等^[6]研究指出噬菌体可有效杀灭耐万古霉素的粪肠球菌,并缓解小鼠菌血症模型中的肠道菌群失衡。Atterbury等^[7]研究指出,噬菌体具有对抗沙门菌感染的潜力,特别是

在减少沙门菌在鸡体内的定植和降低发病率方面。Boire等^[8]通过口服噬菌体能够有效降低雏鸡体内沙门菌的数量。

高度特异性是制约噬菌体治疗细菌感染的一个主要因素,而混合噬菌体疗法(鸡尾酒疗法)是将多种噬菌体联合应用来杀灭细菌的一种治疗方法,其可有效的解决噬菌体特异性强这一问题,并对噬菌体耐药菌具有疗效,从而在很大程度上提高噬菌体的可应用性^[9]。范亚娟^[10]研究表明,混合噬菌体鸡尾酒制剂在一定时间内有杀灭鼠伤寒沙门菌和鸡白痢沙门菌的效果,在1 h内可杀灭90%以上的细菌,高效杀菌效果可持续3 h。李越^[11]研究表明,靶向细菌不同受体的噬菌体鸡尾酒制剂在体外有效延缓噬菌体抗性发展,在体内有效降低雏鸡肠道中沙门菌载量,降低炎症因子表达,维持肠道组织正常结构。杨玉莹^[12]的研究指出噬菌体鸡尾酒制剂比单一噬菌体抑制沙门菌的能力更强。Gao等^[13]研究指出,噬菌体鸡尾酒针对抗性肠炎沙门氏菌的适应性权衡导致抗生素敏感性增加和毒性降低。但是噬菌体在治疗过程中存在特异性强、易产生噬菌体抗性细菌等问题,因此,寻找裂解能力强、安全

稳定的噬菌体以及研制混合噬菌体制剂对于高效治疗沙门菌感染非常重要。基于此,本研究以耐药沙门菌 SE-21 为宿主菌,从污水中分离得到一株对其有强裂解能力的烈性噬菌体 vB_SalP_QS,分析其生物学特性和全基因组,并运用噬菌体 vB_SalP_QS 联合有共同宿主菌 SE-21 的噬菌体 vB_SalP_SE29(实验室分离并保存)构建了混合噬菌体制剂,并且评价了其安全性以及体内、体外的治疗效果,为混合噬菌体疗法的临床应用提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、样品及实验动物

本研究所需的菌株 *S. typhimurium*-CVCC2229 购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心, *S. enteritidis*-CMCCB50041 购自中国医学细菌保藏管理中心,其余所需菌株均由本实验室分离并保存。污水样品采自长春市各大医院、河流及养殖场;噬菌体 vB_SalP_SE29 为实验室分离并保存(已知其生物学特性,已完成全基因组测序);实验用 SPF 级 6~8 周昆明小鼠购买自辽宁长生生物股份有限公司。

1.1.2 主要试剂

酵母提取物、DNaseI、RNaseA 等试剂购自北京索莱宝科技有限公司;氯仿购自华天生物科技有限公司;病毒 DNA 提取试剂盒购自 OMEGA。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体的分离纯化及效价鉴定

取 100 mL 污水加入 1 mL 对数期的宿主菌 SE-21, 37 °C、180 r/min 培养 6~7 h, 10 000 r/min 离心 1 min, 0.22 μm 滤膜过滤。双层琼脂平板法 37 °C 过夜培养,挑取单个噬菌斑加入宿主菌 SE-21 中, 37 °C 培养 4~6 h, 离心过滤即为噬菌体增殖原液。重复上述操作,直到平板出现的噬菌斑形状大小均一,即获得纯化的噬菌体^[14],命名为 vB_SalP_QS。

取 100 μL 噬菌体浓缩液滴于铜网上,自然沉淀 15 min,利用 2% 的磷钨酸(PTA)对噬菌体染色,利用透射电镜观察并记录噬菌体形态和大小。将纯化好的噬菌体双层平板法培养,选择噬菌斑范围在 20~300 个的平板进行计数。重复 3 次计算噬菌体效价。

噬菌体效价(PFU/mL)=噬菌斑平均数×稀释倍数/0.1 mL。

1.2.2 噬菌体 vB_SalP_QS 裂解谱、最佳感染复数(MOI)、一步生长曲线的测定

利用点滴法测定 vB_SalP_QS 的宿主谱,测试菌株为 28 株沙门菌和 10 株大肠杆菌。若观察到清晰的噬菌体裂解圈,则表明噬菌体能有效裂解该菌株。

将噬菌体悬液 10 倍倍比稀释后(MOI=10~0.001)与对数生长期的宿主菌 SE-21 混合, 37 °C, 180 r/min 培养 6 h, 离心过滤膜,利用双层平板法测定其最高滴度即为噬菌体最佳 MOI。

以最佳 MOI 向试管中加入噬菌体和 SE-21, 37 °C 孵育 15 min, 离心弃上清后重悬于等体积 37 °C 预热的 LB 液体培养基, 37 °C 恒温培养。从试验起始,每 10 min 取样 1 次至 130 min 结束,滤膜除菌,双层平板法测定其滴度,绘制噬菌体 vB_SalP_QS 的一步生长曲线。

1.2.3 噬菌体 vB_SalP_QS 的最适温度及 pH 测定

取 8×10^8 PFU/mL 噬菌体裂解液 0.5 mL 分别放入不同温度(4、25、37、50、60、70 和 80 °C)恒温水浴锅中,每隔 10 min 取样至 60 min,双层平板法检测噬菌体效价。取 0.1 mL 8×10^8 PFU/mL 噬菌体裂解液与 37 °C 预温的各 pH(pH 2~pH 12) SM 液 0.9 mL 混合, 37 °C 恒温水浴 1.5 h, 检测噬菌体效价,平行检测 3 次。

1.2.4 噬菌体 vB_SalP_QS 体外杀菌活性的检测

取 1 mL 对数期 SE-21 菌液分别接种于 2 个 100 mL 无菌 LB 液体培养基中, 37 °C 的恒温培养 2 h;按照最优的 MOI 值,将噬菌体 vB_SalP_QS, vB_SalP_SE29 及混合噬菌体(vB_SalP_QS+vB_SalP_SE29)增殖液加入至其中一个 LB 液体培养基中进一步培养,另一个无菌 LB 液体培养基作为参照组不加入噬菌体。37 °C、180 r/min 恒温培养 160 min。从培养开始起,每隔 10 min 对培养液进行采样,测定其 OD₆₀₀ 的吸光值变化^[6]。

1.2.5 噬菌体基因组提取及生物信息学分析

利用病毒 DNA 提取试剂盒提取噬菌体 vB_SalP_QS 的全基因组并送至北京诺禾致源生物科技有限公司,利用 Illumina novaseq 进行全基因组测序,SPAdes 软件进行组装拼接。CGView 绘制噬菌体的全基因组图谱,NCBI-BLAST 比对噬菌体

的 ORF 并对阅读框进行注释。通过 GO 和 KEGG 等数据库进行快速注释来预测存在的编码序列 (CDS) 及其功能, Genbank 和 BLAST 比较和整合分析预测的开放阅读框架 (ORFs)。通过 NCBI 及噬菌体注释工具 PHASTER 进行预测和比较分析每个阅读框的功能, 以寻找较高相似性的功能。利用 MEGA11 软件运用 Neighbour Joining 构建 DNA

序列比对得到最初发育树结果。

1.2.6 噬菌体 vB_SalP_QS 体内治疗效果的评估

1.2.6.1 沙门菌 SE-21 最小致死量的确定 将小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只, 每只小鼠的注射体积均为 200 μ L, 对照组攻毒时用 PBS, 具体分组与攻毒剂量见表 1。观察并记录 7 d 内小鼠的死亡数, 确定最小致死量 (MLD)。

表 1 沙门菌 SE-21 攻毒分组及注射剂量
Table 1 *Salmonella* SE-21 Challenge Grouping and injection doses

组别 Group	数量 Quantity	菌株 Strain	攻毒剂量/(CFU/mL) Virulence dose
对照 Control	10	PBS	0
攻毒组 1 Challenge group 1	10	SE-21	5.0×10^9
攻毒组 2 Challenge group 2	10	SE-21	5.0×10^8
攻毒组 3 Challenge group 3	10	SE-21	5.0×10^7
攻毒组 4 Challenge group 4	10	SE-21	5.0×10^6
攻毒组 5 Challenge group 5	10	SE-21	5.0×10^5

1.2.6.2 噬菌体 vB_SalP_QS、vB_SalP_SE29 及混合噬菌体鸡尾酒治疗效果分析 将小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只。以 $2\times$ MLD 腹腔接种 SE-21。在接种 1 h 后分别腹腔注射 200 μ L $1\times10^5\sim1\times10^8$ PFU/mL 的噬菌体 vB_SalP_QS 和 vB_SalP_SE29, 对照组小鼠则腹腔注射等量无菌 PBS 缓冲液, 具体分组治疗剂量见表 2, 观察并记录小鼠 7 d 的存活及健康情况。

小鼠的健康状况根据疾病的进展程度分为 0 到 5 级^[12]。健康正常 (5 分); 轻微疾病, 身体活动减少和皮毛皱褶 (4 分); 中度疾病, 如嗜睡和驼背 (3 分); 严重病情有上述症状, 再加上部分闭眼周围渗出物堆积 (2 分); 濒死状态 (1 分); 死亡 (0 分)。

1.2.6.3 噬菌体 vB_SalP_QS 安全性试验 参考赵以恒^[15]的方法, 分别将噬菌体 vB_SalP_QS ($1\times$

10^7 PFU/mL, 100 μ L) 和 vB_SalP_SE29 (1×10^7 PFU/mL, 100 μ L) 制成混合噬菌体制剂。试验设计分组与注射剂量见表 3, 腹腔注射后观察 7 d。每天观察小鼠的变化, 并记录死亡数。

1.2.7 噬菌体治疗后小鼠肠道组织病理学观察

在分别用噬菌体 vB_SalP_QS、噬菌体 vB_SalP_SE29 以及混合噬菌体治疗 48 h 后采集小鼠空肠、回肠、十二指肠浸泡在组织固定液中, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱固定 24 h 以上; 横向提取肠管样本并对肠管两侧修剪整齐; 使用无水乙醇由低至高浓度脱水 (即 75% $\rightarrow$ 80% $\rightarrow$ 85% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 95% $\rightarrow$ 100%) 进行梯度脱水; 二甲苯进行透明处理; 将组织在 56 $^{\circ}$ C 的蜡浴中浸蜡后包埋; 切割宽度约为 3 μ m。将切片放入展片池 (40 $^{\circ}$ C) 中促使其彻底铺展, 待切片完全展平后 80 $^{\circ}$ C 干燥 1 h 用 HE 染色。

表2 vB_SalP_QS和vB_SalP_SE29单独治疗分组及注射剂量

Table 2 Treatment subgroups and injection dose of vB_SalP_QS and vB_SalP_SE29

组别 Group	数量 Quantity	噬菌体剂量/(PFU/mL) Phage dose
对照 Control	10	PBS
治疗组1 Treatment group 1	10	1.0×10^5
治疗组2 Treatment group 2	10	1.0×10^6
治疗组3 Treatment group 3	10	1.0×10^7
治疗组4 Treatment group 4	10	1.0×10^8

表3 噬菌体安全性试验组注射剂量

Table 3 Dosage of phage safety test group injections

组别 Group	数量 Quantity	噬菌体剂量/(PFU/mL) Phage dose
对照 Control	5	PBS
vB_SalP_QS	5	1.0×10^7
vB_SalP_SE29	5	1.0×10^7
混合噬菌体 Mixed phages	5	1.0×10^7

2 结果与分析

2.1 噬菌体 vB_SalP_QS 纯化及效价测定

以沙门菌 SE-21 为宿主菌,从污水中分离得到噬菌体 vB_SalP_QS。利用双层平板法传代培养 6 次后得到大小形态均一的噬菌斑(图 1(a)),大小约为 3.2 mm。经 6 轮纯化后,通过将噬菌体

倍比稀释与宿主菌 SE-21 双层平板法培养,测得其效价为 8×10^8 PFU/mL。电镜观察可见,该噬菌体头部为典型二十面体并且尾部较长(图 1(b)),全长 (200 ± 2) nm,头部直径为 (75 ± 2) nm,尾部长 (135 ± 2) nm。根据国际噬菌体分类标准(ICTV),该噬菌体属于有尾噬菌体目(Caudovirales)。

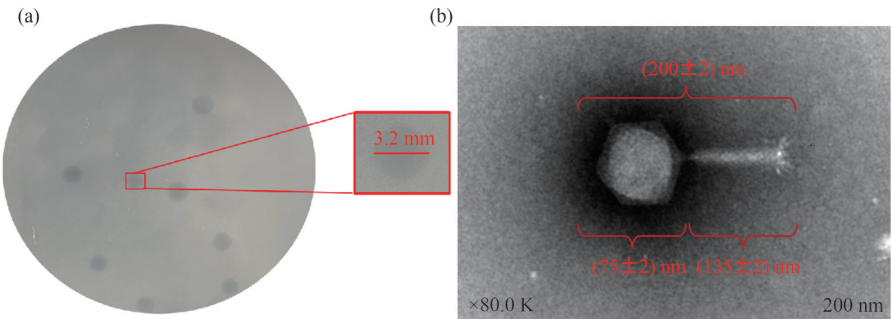


图1 噬菌体 vB_SalP_QS 噬菌斑形态(a)和透射电镜观察(b)

Fig. 1 Morphology (a) and transmission electron microscopy observation (b) of the vB_SalP_QS

2.2 噬菌体 vB_SalP_QS 裂解谱、最佳 MOI 和一步生长曲线的测定

通过点滴法测定噬菌体 vB_SalP_QS 的裂解谱,共验证 38 株菌,其中包括 28 株沙门菌,10 株大肠杆菌。vB_SalP_QS 可裂解 17 株沙门菌,裂解率为 44.7%(表 4)。

噬菌体最佳感染复数结果显示,vB_SalP_QS 在 MOI=0.01 时滴度最高(图 2(a))。一步生长曲线结果显示,前 40 min 上升缓慢,40~90 min 上升较快,90 min 后曲线较为平稳(图 2(b)),表明噬菌体 vB_SalP_QS 的潜伏期约为 40 min,裂解期约为 50 min,90 min 后趋于平稳。

表 4 噬菌体 vB_SalP_QS 裂解谱测定
Table 4 The lytic spectrum of vB_SalP_QS

菌株 Strain	敏感性 Sensitivity	菌株 Strain	敏感性 Sensitivity
<i>S. enteritidis</i> -29	+	<i>Salmonella</i> -S1	—
<i>S. enteritidis</i> -SE-E-1	+	<i>Salmonella</i> -S2	—
<i>S. tphimurium</i> -M	+	<i>Salmonella</i> -S3	—
<i>S. typhimurium</i> -CVCC2229	+	<i>Salmonella</i> -S4	—
<i>S. enteritidis</i> -CMCCB50041	+	<i>Salmonella</i> -S5	—
<i>Salmonella albicanta</i> -G	+	<i>Salmonella</i> -S6	—
<i>Salmonella albicanta</i> -28	—	<i>Salmonella</i> -S7	—
<i>Salmonella</i> -414	+	<i>Salmonella</i> -S8	+
<i>Salmonella</i> -B9	+	<i>Salmonella</i> -S9	—
<i>Salmonella</i> -L2	+	<i>Salmonella</i> -S10	—
<i>Salmonella</i> -JSST	+	<i>E. coli</i> -3-1	—
<i>Salmonella</i> -L5	+	<i>E. coli</i> -6-1	—
<i>Salmonella</i> -CMCL	+	<i>E. coli</i> -12-1	—
<i>Salmonella</i> -P	+	<i>E. coli</i> -26-1	—
<i>Salmonella</i> -14028	—	<i>E. coli</i> -29-1	—
<i>Salmonella</i> -YLA	+	<i>E. coli</i> -F1-10-2-2	—
<i>Salmonella</i> -JSSTV	+	<i>E. coli</i> -2-3	—
<i>E. coli</i> -F6-10-2	—	<i>E. coli</i> -26-4-1	—
<i>E. coli</i> -2-1	—	<i>Salmonella</i> -SE-21	+

注：“+”细菌能被噬菌体裂解；“—”细菌不能被噬菌体裂解
Note: “+” Bacteria can be lysed by phage; “—” Bacteria cannot be lysed by phage.

2.3 噬菌体最适温度及 pH 测定

噬菌体最适温度及 pH 测定结果显示,vB_SalP_QS 在 4~60℃基本可以保持活性,超过 60℃时噬菌体活性较低,当温度达到 70℃并持续 40 min 以及 80℃持

续 20 min 时完全失去活性(图 3(a))。vB_SalP_QS 在 pH 4~pH 10 效价变化不显著($P>0.05$)(图 3(b))。结果表明,vB_SalP_QS 温度为 4~60℃,pH 4~pH 10 范围内均有较好的活性。

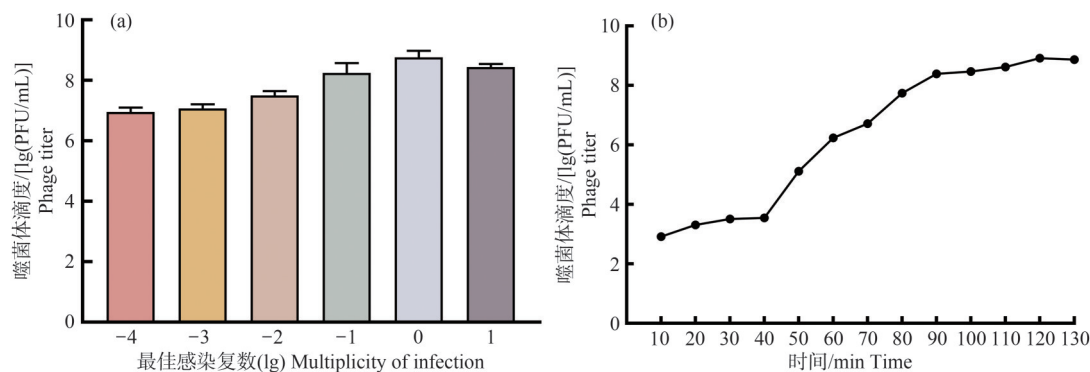


图2 噬菌体 vB_SalP_QS 最佳 MOI(a) 和一步生长曲线测定(b)

Fig. 2 Determination of multiplicity of infection (a) and one-step growth curve (b) of the vB_SalP_QS

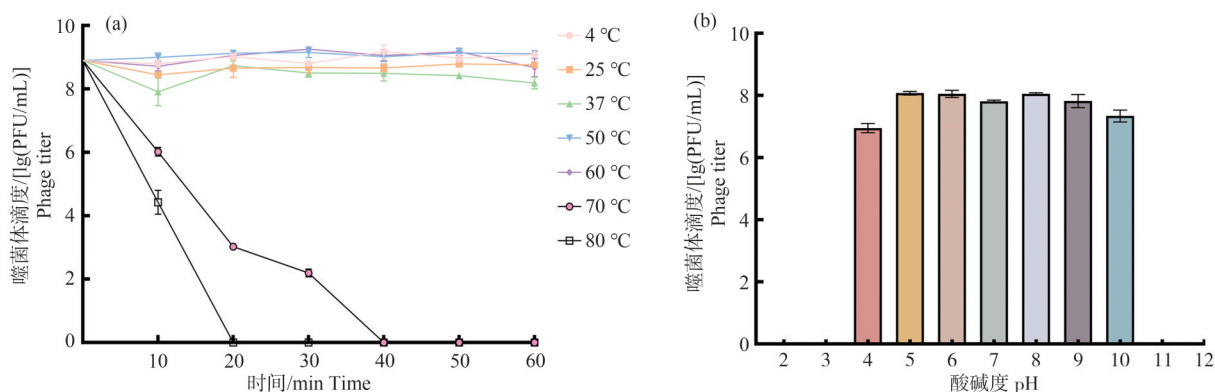


图3 噬菌体 vB_SalP_QS 温度稳定性测定(a) 和 pH 稳定性测定(b)

Fig. 3 The temperature stability (a) and PH stability (b) of the vB_SalP_QS

2.4 噬菌体 vB_SalP_QS 对宿主菌 SE-21 的裂解活性

噬菌体 vB_SalP_QS 对沙门菌 SE-21 体外杀菌试验结果如图 4 所示,噬菌体 vB_SalP_QS 处理组前 40 min OD_{600} 呈现上升趋势噬菌体可能处于潜伏期,40 min 后至 160 min 出现相对明显的下降,表明噬菌体 vB_SalP_QS 对宿主菌 SE-21 具有体外强裂解活性。噬菌体 vB_SalP_SE29 为实验室分离并保存,前期研究表明噬菌体 vB_SalP_SE29 与噬菌体 vB_SalP_QS 有着共同的宿主菌 SE-21,且噬菌体 vB_SalP_SE29 对宿主菌 SE-21 也有很好的裂解效果。噬菌体 vB_SalP_QS, vB_SalP_SE29 及混合噬菌体 (vB_SalP_QS + vB_SalP_SE29) 对沙门菌 SE-21 体外杀菌试验结果如图 4 所示,3 组噬菌体均具有体外裂解活性并且在 40 min 之后混合噬菌体组的杀菌效率显著高于单一噬菌体组。而在 150 min 后单一噬菌体处理组的 OD_{600} 呈上升或平行趋势,而混合噬菌体处理组的 OD_{600} 仍处于下降趋势,借

此推断单一噬菌体处理组可能是产生了抗性菌株,而混合噬菌体组可以很好的遏制抗性菌株的出现且可以更好的杀灭沙门菌 SE-21。

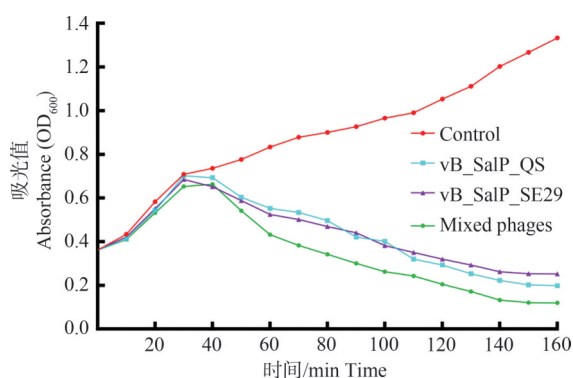


图4 单独及混合噬菌体针对沙门菌 SE-21 体外杀菌效果

Fig. 4 Bactericidal effect of phage on SE-21 *in vitro*

2.5 噬菌体 vB_SalP_QS 基因组学分析

噬菌体 vB_SalP_QS 全基因组长度为 42 293 bp, GC 含量为 49.53%, 编码 72 个预测开放阅读框

(ORFs)(图 5(a))。通过对所有 ORF 的编码蛋白进行基因序列比较,结果发现,其中 35 个 ORF (49%)编码的蛋白与数据库中已知功能的蛋白存在同源性;而剩余的 37 个 ORF (51%)编码的蛋白质功能尚不明确。噬菌体 vB_SalP_QS 基因组的平均 ORF 大小为 556.58 bp,所有 ORF 编码蛋白的分子质量范围从 3.1~92.4 ku,最小的编码单元为 ORF20,其编码了 29 个氨基酸;而最大的为 ORF09,其编码了 828 个氨基酸。

噬菌体 vB_SalP_QS 发育树结果如图 5(b)所示。选取与噬菌体 vB_SalP_QS 同源性及其序列覆盖

率均超过 90% 的 21 株噬菌体,其中包括 *Salmonella* phage vB_SalP_LDW16 (登录号 NC 073194.1)、*Salmonella* phage vB_SenS_SP8 (ON381768.1)、*Salmonella* phage vB_SpuS_Sp4 (MH358359.1)等 20 株沙门菌噬菌体及 1 株气单胞菌噬菌体 *Aeromonas* phage PZL-Ah152 (MW671054.1)。结果表明噬菌体 vB_SalP_QS、*Salmonella* phage vB_SalP_LDW16 和 *Salmonella* phage vB_SenS_SP8 位于同一个分支,均属于 *Salmonella* phage,这表明它们之间具有较高的遗传关系。

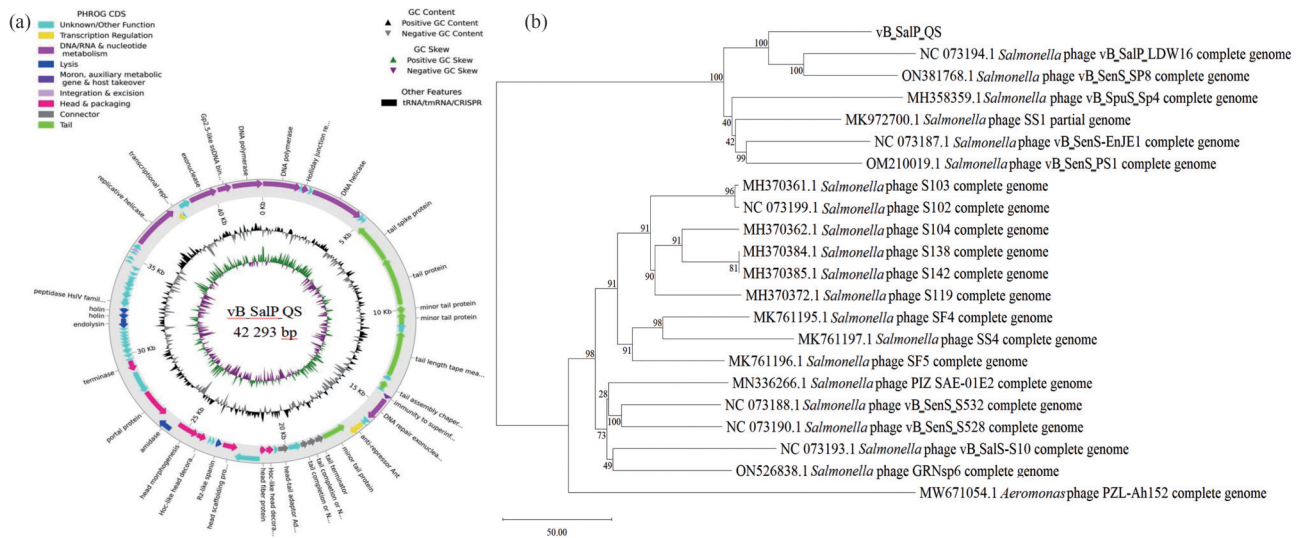


图5 噬菌体 vB_SalP_QS 全基因组圈图(a)和发育树(b)

Fig. 5 Whole genome circle map (a) and developmental tree (b) of the vB_SalP_QS

2.6 沙门菌 SE-21 引起小鼠最小致死量的确定

小鼠腹腔接种不同剂量沙门菌 SE-21, 攻毒组全部死亡的剂量是 5×10^9 CFU/mL 和 5×10^8 CFU/mL (图 6), 即沙门菌 SE-21 的 MLD 是 5×10^8 CFU/mL, 且 24 h 时活着的小鼠出现严重症状, 精神萎靡、呆滞、禁食、全身蜷缩、活动困难、被毛杂乱、肛门有少许分泌物, 睁眼困难且眼角出现黄白色粘稠分泌物。

2.7 噬菌体的治疗剂量及存活率的检测

小鼠腹腔治疗结果表明, vB_SalP_QS ($200 \mu\text{L}$ 1.0×10^5 PFU/mL ~ 1.0×10^8 PFU/mL) 的保护率分别是 30%、60%、80% 和 100% (图 7(a)), vB_SalP_SE29 的保护率分别是 30%、50%、70% 和 90% (图 7(b))。综上, 后续联合治疗试验, vB_SalP_QS 和 vB_SalP_SE29 的用量均选择 $200 \mu\text{L}$ $1.0 \times$

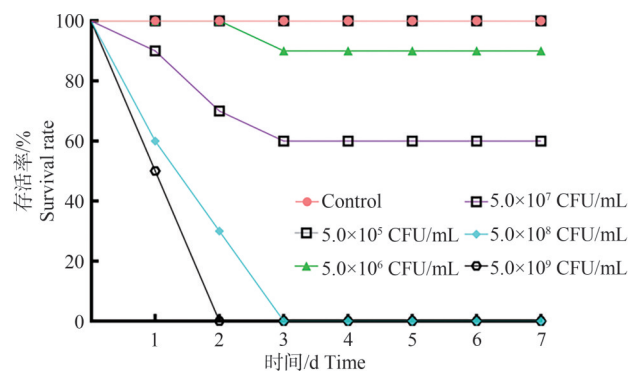


图6 沙门菌 SE-21 对小鼠的最小致死量

Fig. 6 Minimum lethal dose of SE-21 in mice

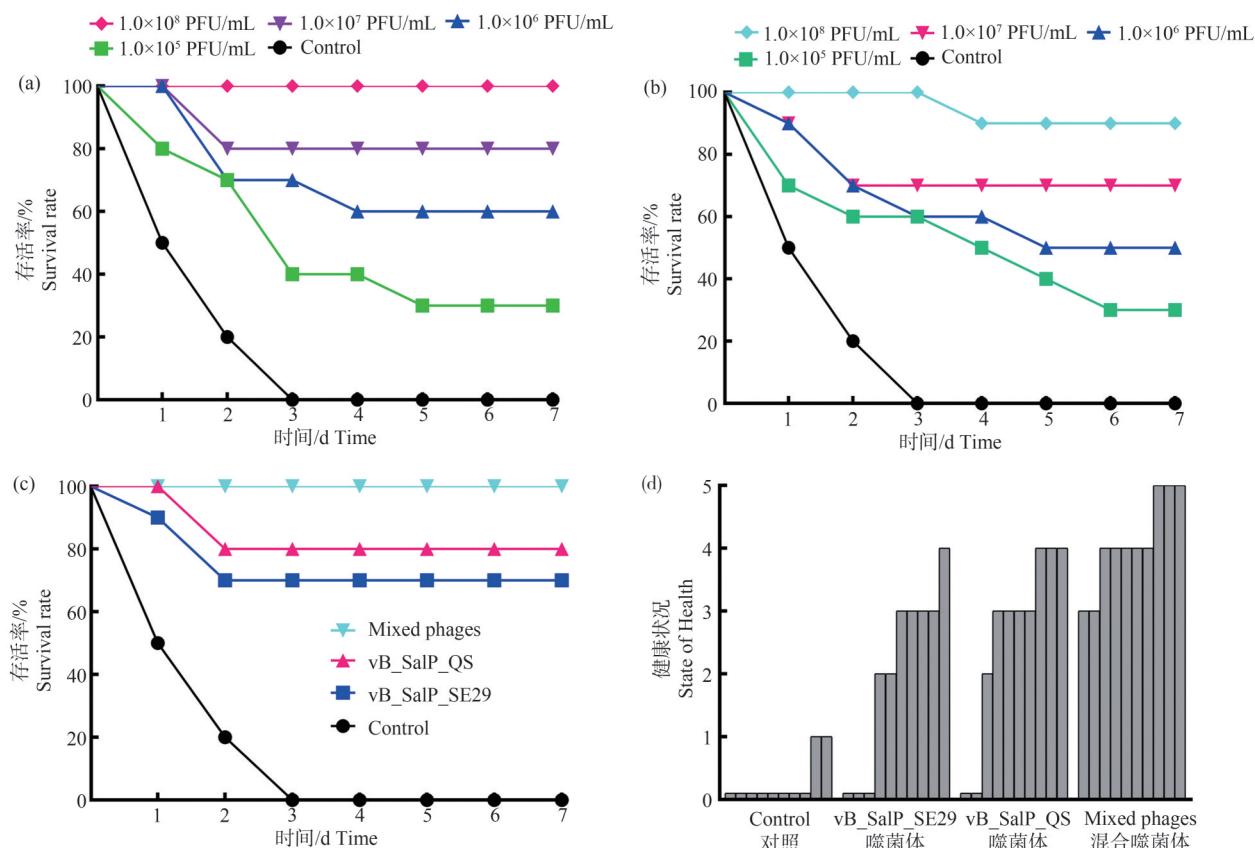
10^7 PFU/mL。

噬菌体治疗后对小鼠的保护率结果如图 7(c) 所示; 小鼠腹腔接种 $2 \times \text{MLD}$ 的沙门菌 SE-21, 1 h 后分别用 vB_SalP_QS ($200 \mu\text{L}$ 1.0×10^7 PFU/mL)

单独治疗, vB_SalP_SE29 ($200\ \mu\text{L}\ 1.0\times 10^7\ \text{PFU}/\text{mL}$) 单独治疗以及混合噬菌体也是以 $1.0\times 10^7\ \text{PFU}/\text{mL}$ (vB_SalP_QS/ $100\ \mu\text{L}$ +vB_SalP_SE29/ $100\ \mu\text{L}$) 混合治疗小鼠。结果显示, 混合噬菌体1周内小鼠存活率仍为100%, 单独 vB_SalP_QS 治疗组的小鼠存活率为80%, 而单独 vB_SalP_SE29 治疗组的小鼠存活率为70%, 对照组小鼠在第3天全部

死亡。

采用上述治疗方案进行治疗后观察小鼠的健康状况, 24 h内对照组小鼠平均得分为0.2分, 单一噬菌体 vB_SalP_SE29 组平均得分为2分, 单一噬菌体 vB_SalP_QS 组平均得分为2.6分, 混合噬菌体组平均得分为4.1分; 混合噬菌体治疗效果高于单一噬菌体治疗效果(图7(d))。



(a) 噬菌体 vB_SalP_QS 治疗小鼠的存活率; (b) 噬菌体 vB_SalP_SE29 治疗小鼠的存活率; (c) 混合噬菌体治疗小鼠的存活率; (d) 噬菌体治疗小鼠健康系数。

(a) Survival rate of phage vB_SalP_QS-treated mice; (b) Survival rate of phage vB_SalP_SE29-treated mice; (c) Survival rate of mixed phage cocktail-treated mice; (d) Health coefficient of phage-treated mice.

图7 噬菌体治疗效果的评价

Fig. 7 Evaluation of the therapeutic efficacy of phage

2.8 噬菌体 vB_SalP_QS 和 vB_SalP_SE29 安全性测定

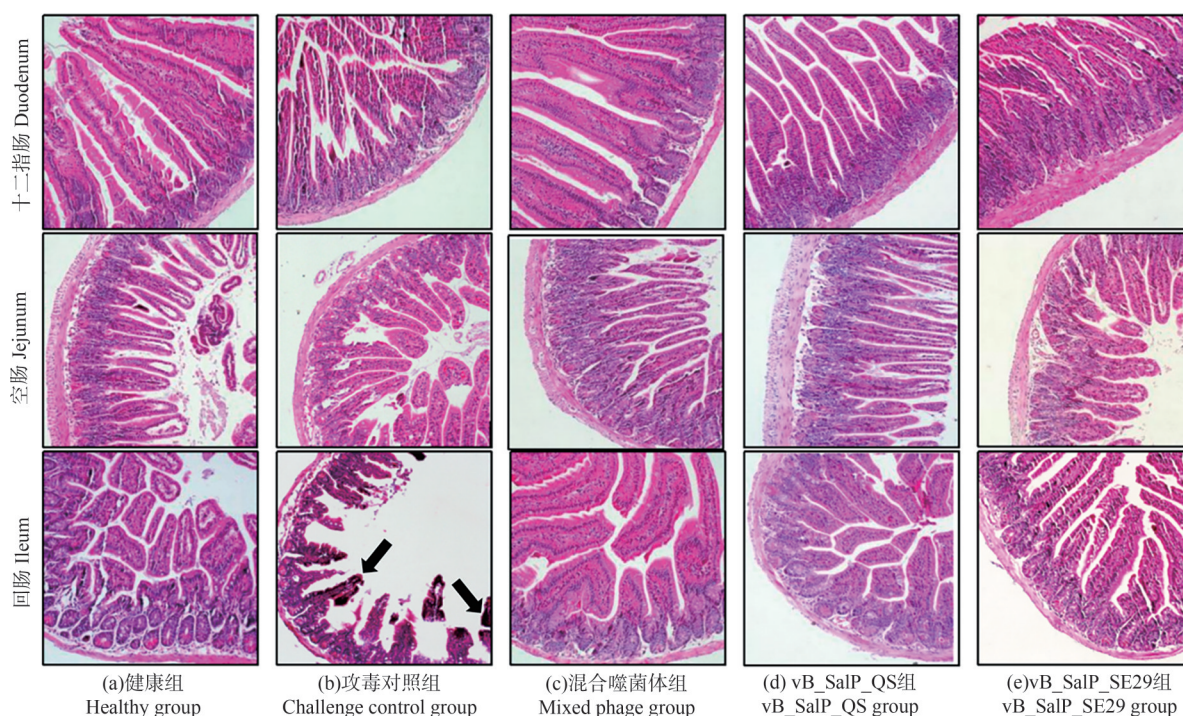
3组噬菌体试验组和1组PBS对照组腹腔接种后一周内均未出现任何临床症状, 生长状况良好, 存活率均为100%。脱颈处死小鼠后, 剖检也均未发现有病理变化。结果表明噬菌体对试验小鼠具有良好的安全性。

2.9 病理组织切片的观察

用各组小鼠十二指肠、空肠和回肠组织制备病理切片(图8)。攻毒对照组小鼠(图8(b))可见小肠组织出血, 肠系膜显示出液化特征, 结肠内粪便不成形, 呈土黄色恶臭稀便, 回肠组织炎性细胞明显增多, 肠绒毛断裂萎缩, 排列稀疏。混合噬菌体(vB_SalP_QS+vB_SalP_SE29)治疗组与单一噬菌体组(vB_SalP_QS)和(vB_SalP_SE29)治疗组相比, 混合

噬菌体治疗组(图(c))的小鼠肠绒毛与正常组小鼠(图(a))相接近,排列比较整齐。与攻毒对照组相比,治疗组小鼠未见小肠出血变化。病理组织学结果表

明:经噬菌体治疗能够有效减轻小鼠感染沙门菌 SE-21 肠道的病理变化,减缓疾病引发的症状,且混合噬菌体对小鼠肠炎的治疗效果要优于单一噬菌体。



箭头指出回肠组织出血,肠系膜显示出液化特征。

Arrows point to ileal tissue haemorrhage with mesentery showing liquefied features.

图8 各组小鼠肠组织病理学检测(200X)

Fig. 8 Histopathological analysis of the intestine of mice in each group (200X)

3 讨论

沙门菌(*Salmonella*)是一种常见的肠道致病菌,对人类和动物的健康造成了严重威胁。在治疗领域,传统治疗方法多采用抗生素治疗。然而在过去的几十年里,随着抗生素的滥用,沙门菌对多种常用抗生素耐药性增加导致传统抗生素治疗出现了一系列的限制和挑战^[16],如治疗效果不佳、耐药性提高等。根据统计,到2050年,每年将有一千万人死于多重耐药性细菌感染^[17],这些耐药沙门菌菌株在人类和动物中迅速传播,给公共卫生和养殖业造成了巨大的危害。

噬菌体是一种针对细菌感染的病毒,具有高度的特异性和选择性。近年来,越来越多的研究表明,噬菌体在治疗沙门菌肠道感染方面具有巨大的潜力。噬菌体疗法作为一种潜在的减抗替抗方案在治疗领域备受关注^[18],噬菌体安全、有效、无耐药

性且不破坏机体内体的菌群结构,可以利用细菌宿主在体内快速增加数量且可以穿透生物膜。噬菌体治疗细菌感染时,免疫系统和噬菌体之间会出现一种协同作用,会存在一种动态平衡的过程,即通过噬菌体的作用降低病原菌的数量,减轻感染严重程度,为免疫系统提供更好的清除残余病原菌的条件,最终实现控制感染和治愈的效果。这种相互作用被称为“免疫噬菌体协同”,强调了噬菌体疗法与免疫系统之间的协同效应,以达到更好的治疗效果。

应用单一噬菌体治疗存在宿主范围窄、细菌易产生噬菌体耐药性等缺点,而应用混合噬菌体鸡尾酒疗法能够有效地扩展噬菌体的靶菌谱^[12],能够减少抗性菌的产生,还能够提高治疗的成功率。2009年,噬菌体鸡尾酒疗法(Biphage-PA)第一阶段临床试验获得美国FDA批准^[19]。噬菌体体外裂解试验中单一噬菌体组 OD₆₀₀ 在 150 min 后出现略微上升

或平行趋势而混合噬菌体组仍然处于下降趋势,推测单一噬菌体组可能出现了抗性菌株,而混合噬菌体可以遏制抗性菌的出现。从噬菌体对小鼠保护率试验结果可以看出,混合噬菌体(vB_SalP_QS+vB_SalP_SE29)治疗组存活率可以达到100%,而单一噬菌体组存活率分别为70%和80%。混合噬菌体治疗组可以有效的杀灭病原菌以及控制并延长抗性菌出现的时间,给机体免疫系统更多的时间去识别清除残留的、未被噬菌体消灭的病原菌,最终将病原菌彻底清除。说明混合噬菌体(vB_SalP_QS+vB_SalP_SE29)对小鼠感染沙门菌后保护效果更好。刘晓贺^[9]研究表明,将2种特异性噬菌体联合使用,治疗细菌感染的治愈率显著提高。另外,一项针对多重耐药肺炎克雷伯菌感染^[20]的噬菌体治疗研究显示,噬菌体鸡尾酒疗法能够有效抑制细菌生长。

综上所述,噬菌体 vB_SalP_QS 具有良好的酸碱耐受性、热稳定性以及安全性,联合应用 vB_SalP_QS 和 vB_SalP_SE29 混合噬菌体可以有效的杀灭小鼠体内沙门菌 SE-21,能够显著提高感染 SE-21 的小鼠的存活率,病理组织切片结果显示混合噬菌体比单独噬菌体表现出更大的应用潜力。为噬菌体制剂治疗沙门菌感染提供了重要依据,也为混合噬菌体鸡尾酒疗法的临床应用奠定了基础。

4 结 论

本研究分离到的噬菌体 vB_SalP_QS 具有良好的酸碱耐受性、热稳定性及安全性。混合噬菌体组(vB_SalP_QS+vB_SalP_SE29)在体内和体外的治疗效果均优于噬菌体单一组。

参考文献 References

- [1] Karama M, Lawal O U, Parreira V R, Soni M, Chen Y H, Cenci-Goga B T, Grisoldi L, Greyling J, Goodridge L. Draft genome sequences of two *Salmonella* Uzaramo isolates from poultry in South Africa [J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2024, 13(1): e0102623
- [2] Fang Q Q, Yin X, He Y L, Feng Y, Zhang L W, Luo H, Yin G, McNally A, Zong Z Y. Safety and efficacy of phage application in bacterial decolonisation: A systematic review [J]. *The Lancet Microbe*, 2024, 5(5): e489-e499
- [3] Wu N N, Dai J, Guo M Q, Li J H, Zhou X, Li F, Gao Y, Qu H P, Lu H Z, Jin J, Li T, Shi L, Wu Q G, Tan R M, Zhu M L, Yang L, Ling Y, Xing S P, Zhang J Z, Yao B X, Le S, Gu J M, Qin J H, Li J, Cheng M J, Tan D M, Li L L, Zhang Y Y, Zhu Z Q, Cai J F, Song Z G, Guo X K, Chen L K, Zhu T Y. Pre-optimized phage therapy on secondary

- Acinetobacter baumannii* infection in four critical COVID-19 patients[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2021, 10(1): 612-618
- [4] 陈义宝, 孙二超, 杨斓, 童贻刚, 宋娇阳, 吴斌. 产志贺毒素大肠杆菌噬菌体 vB_EcoM_PHB05 的生物学特性及全基因组分析[J]. *中国兽医科学*, 2018, 48(4): 428-437
- Chen Y B, Sun E C, Yang L, Tong Y G, Song J Y, Wu B. Characterization and complete genome sequence analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia* bacteriophage vB_EcoM_PHB05 [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2018, 48(4): 428-437 (in Chinese)
- [5] Weber-Dąbrowska B, Żaczek M, Łobocka M, Łusiak-Szelachowska M, Owczarek B, Orwat F, Łodej N, Skaradzińska A, Łaczmański Ł, Martynowski D, Kaszowska M, Górski A. Characteristics of environmental *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* bacteriophages and their therapeutic applications[J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(2): 434
- [6] Cheng M J, Liang J M, Zhang Y F, Hu L Y, Gong P J, Cai R P, Zhang L, Zhang H, Ge J L, Ji Y L, Guo Z M, Feng X, Sun C J, Yang Y J, Lei L C, Han W Y, Gu J M. The bacteriophage EF-P29 efficiently protects against lethal vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and alleviates gut microbiota imbalance in a murine bacteremia model[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 837
- [7] Atterbury R J, Van Bergen M A P, Ortiz F, Lovell M A, Harris J A, Boer A D, Wagenaar J A, Allen V M, Barrow P A. Bacteriophage therapy to reduce *salmonella* colonization of broiler chickens[J]. *Applied And Environmental Microbiology*, 2007, 73(14): 4543-4549
- [8] Borie C, Albala I, Sanchez P, Sanchez M L, Ramirez S, Navarro C, Morales M A, Retamales A J, Robeson J. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens[J]. *Avian Diseases*, 2008, 52(1): 64-67
- [9] 刘晓贺. 应用噬菌体 GH15 和噬菌体 K 联合治疗金黄色葡萄球菌感染的实验研究[D]. 长春: 吉林大学, 2013
- Liu X H. Combination utility of phages GH15 and K against the infection of *Staphylococcus aureus*[D]. Jilin: Jilin University, 2013 (in Chinese)
- [10] 范亚娟. 沙门噬菌体鸡尾酒制剂的研制及体外杀菌效果评价[D]. 南京: 南京农业大学, 2020
- Fan Y J. Development of *Salmonella* bacteriophage cocktail preparation and evaluation of its in vitro sterilization effect [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [11] 李越. 沙门噬菌体的分离、表征及其应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022
- Li Y. Isoiation, characterization and application of *Salmonella* phage [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022 (in Chinese)
- [12] 杨玉莹. 沙门噬菌体的疗效观察及裂解酶的表达和应用[D]. 重庆: 西南大学, 2021
- Yang Y Y. Efficacy of bacteriophage for *Salmonella* spp. and the expression and application of lytic enzymes [D]. Chongqing: Southwest University, 2021 (in Chinese)
- [13] Gao D Y, Ji H Y, Wang L K, Li X X, Hu D Y, Zhao J N, Wang S, Tao P, Li X M, Qian P. Fitness trade-offs in phage cocktail-resistant *Salmonella enterica* serovar enteritidis results in increased antibiotic susceptibility and reduced virulence[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(5): e0291422
- [14] 张洋, 贾凯翔, 张秀文, 高娜, 刘哲群, 刘长宇, 单晓枫, 钱爱东, 张旭, 徐凤宇, 张蕾. 噬菌体 PZL-Ah1 的生物学特性及其治疗嗜水气单胞菌感染的效果评价[J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43(6): 602-608
- Zhang Y, Jia K X, Zhang X W, Gao N, Liu Z Q, Liu C Y, Shan X F, Qian A D, Zhang X, Xu F Y, Zhang L. Biological characteristics of

- bacteriophage PZL-Ah1 and evaluation of its efficacy in the treatment of *Aeromonas hydrophila* infection [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 43(6):602-608 (in Chinese)
- [15] 赵以恒. 多重耐药大肠杆菌噬菌体分离鉴定及鸡尾酒疗法研究[D]. 扬州:扬州大学, 2023
- Zhao Y H. Isolation of identification of bacteriophages to multiple drug resistant *Escherichia coli* and therapeutic study of cocktail [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023 (in Chinese)
- [16] Cui L L, Liu Q X, Jiang Z Y, Song Y, Yi S J, Qiu J H, Hao G J, Sun S H. Characteristics of *Salmonella* from Chinese native chicken breeds fed on conventional or antibiotic-free diets [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2021, 8:607491
- [17] Lange C, Chesov D, Heyckendorf J, Leung C C, Udwadia Z, Dheda K. Drug-resistant tuberculosis: An update on disease burden, diagnosis and treatment[J]. *Respirology*, 2018, 23(7):656-673
- [18] 梁冰纯, 赵文鹏, 韩博, 高健. 噬菌体治疗动物细菌感染性疾病的研究进展[J]. 中国兽医杂志, 2023, 59(1):107-110
- Liang B C, Zhao W P, Han B, Gao J. Advances in phage therapy for bacterial infectious diseases in animals[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2023, 59(1):107-110 (in Chinese)
- [19] Rhoads D D, Wolcott R D, Kuskowski M A, Wolcott B M, Ward L S, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: Results of a phase I safety trial[J]. *Journal of Wound Care*, 2009, 18(6): 237-238, 240-243
- [20] 付涵宇. 噬菌体治疗多重耐药肺炎克雷伯菌所致肺炎的疗效研究[D]. 北京:首都儿科研究所, 2023
- Fu H Y. Efficacy of phage therapy in the treatment of pneumonia due to multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*[D]. Beijing: Capital Institute of Pediatrics, 2023 (in Chinese)

责任编辑: 秦梅



第一作者简介: 梁芮萁, 本科毕业于吉林农业大学, 现为吉林农业大学预防兽医学学术型硕士研究生。主要研究方向为微生态制剂的研发及动物疫病防控、噬菌体与宿主的相互作用机制, 在这个领域深入研究了噬菌体诱导细菌产生噬菌体抗性机制的研究, 寻找噬菌体吸附于细菌上的受体及受体基因。在读研期间一直秉持着对科研的极高热情和期待, 具有团队合作意识及持之以恒、不断进取的精神, 刻苦钻研, 态度端正, 目标明确, 认真学习专业知识与技能, 始终坚信科研能够推动知识的边界, 并为解决实际问题提供新的思路和方法, 保持着端正的科研态度和明确的研究目标, 希望能够在探索微生物的过程中充分发挥自己的价值。



第一作者简介: 黄淇星, 现为吉林农业大学动物科学专业本科生, 在学术上, 对噬菌体研究抱有浓厚兴趣, 并在该领域积极探索和学习。在大学期间, 认真完成了专业课程的学习, 还积极参与了多项课外学术活动。曾加入吉林农业大学挑战杯竞赛, 与团队成员共同完成了噬菌体治疗耐药细菌性疾病的应用与研究项目, 还积极参与了全国大学生生命科学竞赛, 希望在本科期间充分发挥自身价值。



通讯作者简介: 张蕾, 博士, 副教授, 硕士研究生导师。吉林大学预防兽医学博士。吉林省畜牧兽医学学会理事, *Frontiers in Microbiology*, *MDPI-viruses*, *MDPI-antibiotics* 审稿人。研究方向为兽医学, 在噬菌体及其衍生物与宿主细菌作用机制、噬菌体及其衍生物相关生物制品的研发等方面开展了产学研用工作。主持 2019—2020 年吉林省青年人才托举工程、吉林省科技发展计划项目青年成长科技计划项目、吉林省教育厅科学技术研究项目重点项目、吉林省博士后科研人员择优资助项目等。荣获吉林农业大学第四届教师教学创新大赛高级职称组一等奖, 吉林省科技进步三等奖(2/6)。以第一作者(通讯)身份在 *Frontiers in Microbiology* 等 SCI 收录期刊发表学术论文 13 篇。以第一发明人身份授权专利 1 项, 授权实用新型专利 2 项。