



噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的研究进展

钟家琪¹, 周雨非¹, 徐雨林¹, 龚思烨¹, 张灼阳^{2*}

1 上海交通大学医学院, 上海 200025

2 上海交通大学医学院基础医学实验教学中心, 上海 200025

钟家琪, 周雨非, 徐雨林, 龚思烨, 张灼阳. 噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的研究进展[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 61-75.
ZHONG Jiaqi, ZHOU Yufei, XU Yulin, GONG Siye, ZHANG Zhuoyang. Review of bacteriophage therapy for *Klebsiella pneumoniae* infection[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 61-75.

摘要: 随着细菌的进化以及部分抗生素的滥用, 耐药细菌的感染已成为 21 世纪主要的公共卫生挑战之一。其中, 耐药肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)问题尤为突出。噬菌体在治疗耐药细菌感染引起的疾病方面展现出一定的潜力及独特优势, 但目前噬菌体治疗尚缺乏统一的临床指导规范。虽然临床上有少数将噬菌体用于治疗肺炎克雷伯菌感染的成功案例, 但多数情况下是采用噬菌体配合抗生素疗法, 噬菌体在其中的作用仍不明确。本文综合评述国内外研究数据, 回顾与噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染相关的数个重点问题, 包括噬菌体的特性以及影响其疗效的因素, 旨在为肺炎克雷伯菌和其他耐药细菌的噬菌体治疗提供参考。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 耐药细菌; 噬菌体治疗

Review of bacteriophage therapy for *Klebsiella pneumoniae* infection

ZHONG Jiaqi¹, ZHOU Yufei¹, XU Yulin¹, GONG Siye¹, ZHANG Zhuoyang^{2*}

1 School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

2 Experimental Teaching Center, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China

Abstract: With the evolution of bacteria and the overuse of certain antibiotics, drug-resistant bacterial infections have emerged as a major public health challenge in the 21st century. *Klebsiella pneumoniae*, in particular, has aroused wide concern due to its drug-resistant nature.

*Corresponding author. E-mail: sakuyaandy@163.com

Received: 2023-06-08; Accepted: 2023-09-11; Published online: 2023-09-19

Bacteriophages have demonstrated the potential and advantages in treating bacterial infections caused by drug-resistant strains, while there are no clinical guidelines for phage therapy. Notably, even though a few successful cases of bacteriophage therapy have been documented in the treatment of *K. pneumoniae* infections, bacteriophages are used in combination with antibiotics in most cases and the role bacteriophages play remains unclear. This article provides an overview of bacteriophage therapies for *K. pneumoniae* infections, including their characteristics and the factors influencing their efficacy. We compiled and analyzed data from available studies, with the intention of offering valuable insights for the application of bacteriophage therapy in combating *K. pneumoniae* and other drug-resistant bacteria.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; drug-resistant bacteria; bacteriophage therapy

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是一种革兰氏阴性肠杆菌, 主要定殖于人的上呼吸道和肠道。它是导致人类呼吸系统感染的主要病原体之一, 并且是重要的机会性医院感染致病菌。肺炎克雷伯菌感染可涉及多个器官和部位, 可能引起肺炎、脑膜炎、尿路感染、败血症和化脓性肝脓肿等不同类型的感染性疾病^[1]。

随着细菌的演变以及部分抗生素的滥用, 耐药细菌感染已成为 21 世纪主要的公共卫生挑战之一。根据《柳叶刀》刊登的一项研究分析, 2019 年有超过 120 万人死于耐药细菌感染, 这一数字已经超过艾滋病毒(human immunodeficiency virus, HIV)/艾滋病或疟疾造成的死亡人数, 肺炎克雷伯菌也是 6 种最主要的耐药细菌之一^[2]。

目前, 临床上主要使用抗生素治疗肺炎克雷伯菌感染, 包括喹诺酮类、 β -内酰胺类和碳青霉烯类等多种药物。对于部分耐药菌株, 常采用具有结构多样性的药物联合治疗。然而, 随着病原菌的不断演化, 多重耐药菌日益增多, 迫切需要加快研发新型抗生素, 并探索新的治疗方法^[3]。噬菌体作为一种专性感染细菌并导致其裂解死亡的病毒, 在治疗细菌感染, 尤其是耐药细菌感染方面具有一定的潜力与优势。

1 肺炎克雷伯菌噬菌体

截至 2022 年 12 月 31 日, 美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的统计数据共记录了 162 种针对肺炎克雷伯菌的噬菌体及其基因组信息, 其均属于香港病毒界(Heunggongvirae)、尾噬菌体门(Uroviricota)、有尾噬菌体纲(Caudoviricetes)。其中 82 种(50.62%)属于长尾噬菌体科(Siphoviridae), 有关分布情况见图 1。

1.1 肺炎克雷伯菌噬菌体类型

噬菌体按其不同生活周期可分为裂解性噬菌体与溶原性噬菌体两类。裂解性噬菌体将 DNA 注入宿主细菌, 在细菌中完成复制和衣壳组装, 直接裂解细菌释放子代噬菌体; 溶原性噬菌体将 DNA 注入宿主细菌后, 会整合入宿主细菌的基因组 DNA, 并随宿主基因组 DNA 一同复制, 只在特定条件下(如环境应激时)进入溶解周期^[4]。由于裂解性噬菌体能够更稳定地裂解细菌, 因此被认为在治疗细菌感染方面具有更大的潜力。此外, 研究表明溶原性噬菌体更容易携带毒力因子^[5], 这可能是因为细菌的部分 DNA 本质上是噬菌体残留物, 在染色体和质粒上的不同位置对细菌的毒力和耐药性也有不同的影响^[6]。这一定程度上限制了溶原性噬菌体在治疗细菌感染中的应用。

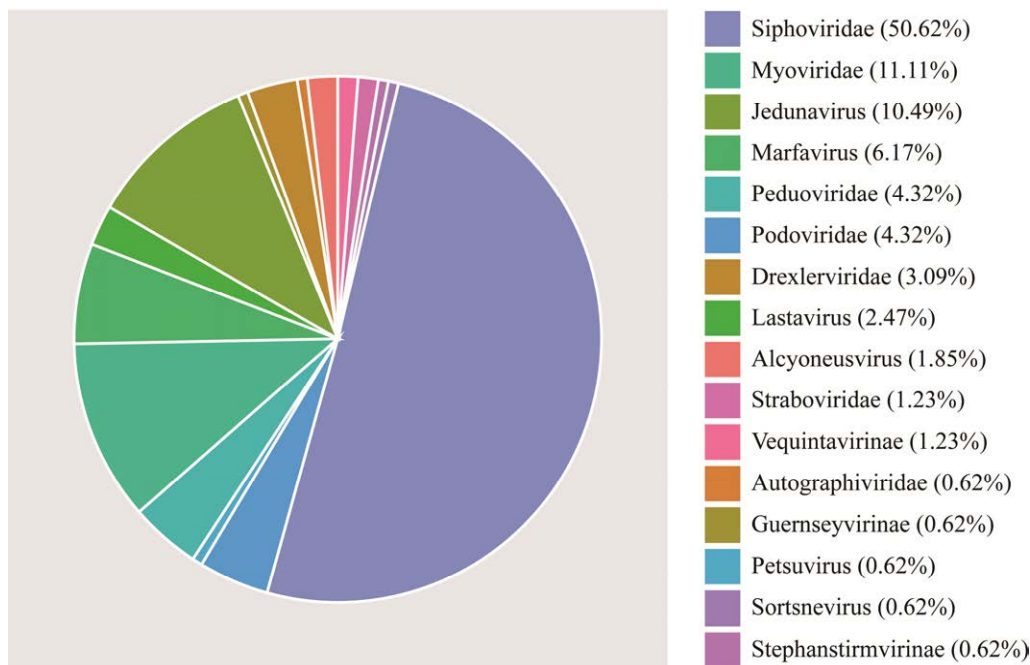


图 1 肺炎克雷伯菌噬菌体种属分布

Figure 1 Phage species distribution of *Klebsiella pneumoniae*.

1.2 肺炎克雷伯菌噬菌体基因编码产物

裂解性噬菌体不仅可以直接被用于治疗, 其部分基因编码产物同样具备裂解细菌的能力, 是“替抗”(替代抗生素治疗)的重要研究领域之一。

在噬菌体的生命周期中, 多种基因编码的酶发挥着关键的作用。噬菌体感染细菌的过程始于吸附阶段, 通常使用尾丝蛋白(tail filament protein, TSP)识别宿主表面的特定受体^[7]。对于革兰氏阴性菌而言, 主要受体位于脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)。部分细菌可以产生荚膜, 其既可阻断噬菌体受体结合蛋白与宿主受体的结合, 又可作为噬菌体吸附的受体^[7]。Dunstan 等^[8]的研究表明荚膜多糖和 OmpK36 孔蛋白中的结构是肺炎克雷伯菌噬菌体感染过程中不可缺少的受体。在吸附注入过程中, 多糖解聚酶(polysaccharide depolymerase, PSD)与肽聚糖水解酶(peptidoglycan hydrolase, PGH)在不

同阶段发挥作用^[5,9]。首先, 噬菌体 PSD 降解由荚膜多糖(capsular polysaccharides, CPS)和 LPS 等组成的细菌屏障, 使噬菌体受体结合蛋白能够与宿主受体结合。随后噬菌体尾刺蛋白在 PGH 的帮助下穿透细菌细胞壁, 有利于噬菌体将遗传物质注入宿主细菌。

1.2.1 噬菌体编码的 PSD

噬菌体 PSD 根据其作用机制可分为水解酶和裂解酶。水解酶催化糖苷键的水解, 包括唾液酸酶、鼠李糖苷酶、左旋酶、木聚糖酶、葡聚糖酶和 LPS 去乙酰化酶等^[10-12]; 裂解酶利用 β 消除机制裂解糖苷键, 包括透明质酸裂解酶、果胶酸裂解酶、藻酸盐裂解酶、K5 裂解酶和 O 抗原特异性多糖裂解酶^[10-12]。目前已经分离出 24 种对特定肺炎克雷伯菌荚膜多糖类型具有降解活性的酶^[13]。其中对噬菌体 K64-1 的研究最为突出, 其共编码 9 种不同的解聚酶(表 1)^[14]。

表 1 针对不同荚膜类型的肺炎克雷伯菌噬菌体多糖解聚酶

Table 1 The phage polysaccharide depolymerases of *Klebsiella pneumoniae* targeting different capsular types

<i>K. pneumoniae</i> bacteriophage	Phage-encoded depolymerase	<i>K. pneumoniae</i> capsule types	References
0507-KN2-1	ORF96	KN2	[15]
NTUH-K2044-K1-1	K1-ORF34	K1	[16]
KP36	depoKP36	K63	[17]
K5-2	K5-2 ORF37	K30/K69	[18]
	K5-2 ORF38	K5	
K5-4	K5-4 ORF37	K5	[18]
	K5-4 ORF38	K8	
K64-1	S1-1	K11	[14]
	S1-2	KN4	
	S1-3	K21	
	S2-1	KN5	
	S2-2	K25	
	S2-3	K35	
	S2-4	K1	
	S2-5	K64	
KpV71	kpv71_52	K1	[19]
	kpv74_56	K2/K13	
KP32	KP32gp37	K3	[20]
	KP32gp38	K21	
KN1-1	KN1dep	KN1	[21]
KN3-1	KN3dep	KN3	[21]
	K56dep	K56	
KN4-1	KN4dep	KN4	[21]

噬菌体 PSD 在体外试验中已成功作为外源抗菌物质，降解细菌荚膜和 LPS 等屏障结构，使细菌失去或修饰其用于提高毒力、促进定殖和形成生物被膜的表面结构，并使其对抗生素或宿主免疫防御重新敏感。例如细菌受到 PSD 处理后，对巨噬细胞的吞噬作用和血清的杀菌作用重新变得敏感^[20]。Olszak 等^[22]发现假单胞菌噬菌体 *LKA1* 基因编码的尾刺蛋白具有 O 抗原特异性多糖裂解酶活性，可以裂解细菌 LPS。因巨噬细胞对铜绿假单胞菌的吞噬作用主要是

由细菌鞭毛蛋白介导和启动的，所以 LPS 的裂解不直接影响吞噬作用的强度，而是增加补体介导的杀伤作用。

噬菌体 PSD 可外源性地降解细菌多糖，但到目前为止 PSD 在体内试验方面的研究仍局限于动物实验。蜡螟幼虫对于肺炎克雷伯菌感染的先天免疫与高等生物非常相似，Majkowska-Skrobek 等^[20]利用蜡螟幼虫模型评估 PSD 预孵育对细菌毒力的影响以及 PSD 在体内治疗的功效，试验结果表明幼虫注射荚膜血清特异性 PSD 预处理后的细菌，以及同时注射细菌和酶，都可显著增加幼虫存活率及存活时间。Tu 等^[23]解析了针对 K1 类型荚膜的 PSD 分子结构及作用机制，并证明该酶能够显著提高感染高剂量肺炎克雷伯菌小鼠的存活率。

细菌感染过程中形成的生物被膜是由细菌附着于接触表面后，分泌多糖基质、纤维蛋白和脂质蛋白等，将其自身包绕其中而形成的大量细菌聚集结构^[24]。由于生物被膜基质的渗透性差以及膜内细菌的多克隆性^[11]，其形成被认为是慢性感染中抗生素治疗失败最常见的原因^[25]。目前已有研究证实，PSD 在对抗细菌形成生物被膜方面具有功效。例如，来自噬菌体 vB-EcoM-ECOO78 的 PSD Dpo42 针对大肠埃希菌的生物被膜形成表现出剂量依赖性的预防活性^[26]。Asghar 等^[27]分离出 2 种针对超广谱 β -内酰胺酶(β -lactamase, ESBL)的肺炎克雷伯菌噬菌体 A \forall L 和 A \forall M，其在独立及混合使用条件下均能有效降低生物被膜活性，但其作用机制是否与 PSD 相关仍待进一步研究。

1.2.2 噬菌体编码的 PGH

在噬菌体生活周期结束时，为释放后代病毒颗粒到胞外空间，噬菌体需要裂解宿主细胞。在完整的裂解周期中，噬菌体需要进行 2 次细菌细胞壁的水解。噬菌体 PGH 在这 2 次细胞壁

水解过程中发挥作用。首先, 在噬菌体感染开始时, 病毒粒子相关裂解酶(virion-associated lysins, VAL)从外部攻击宿主细胞的细胞壁, 局部降解细菌肽聚糖, 促进噬菌体尾刺蛋白穿刺与噬菌体 DNA 的注入^[12]。这个阶段中, VAL 帮助噬菌体进入宿主细胞。随后, 在宿主细菌的细胞质中, 噬菌体合成负责裂解宿主的内溶素(endolysin)。内溶素能在裂解周期后期从内部裂解细菌肽聚糖, 降解细菌细胞壁, 使细菌裂解并释放噬菌体后代。在噬菌体释放前, 大多数内溶素需要另一种噬菌体编码的穿孔素蛋白(holins)的作用才能穿过细胞膜到达细胞壁。穿孔素蛋白是噬菌体基因组编码的一种小疏水蛋白, 因其能够在细菌细胞膜上形成孔道而得名。穿孔素蛋白在裂解期合成, 当其达到临界浓度后, 可以在细胞膜上形成孔道, 使内溶素与肽聚糖底物结合, 内溶素迅速降解宿主细菌的肽聚糖细胞壁, 导致细菌内外渗透压失衡, 细菌继而裂解^[28-30]。对于感染革兰氏阴性细菌的噬菌体, 噬菌体不仅需要破坏细胞壁肽聚糖, 还必须克服外膜屏障。膜融合蛋白(spanins)是噬菌体裂解外膜所需的蛋白质。在大多数噬菌体中, 膜融合蛋白基因位于编码穿孔素和内溶素基因的下游^[31]。

PGH 具有多种酶活性, 可分为 3 类: (1) 糖苷酶: 包括溶菌酶、氨基葡萄糖苷酶和裂解转糖基酶等, 它们能够切割聚糖骨架中的糖苷键; (2) 酰胺酶: 这类酶能够切割连接 N-乙酰胞壁酸和肽侧链第一个氨基酸 L-丙氨酸的酰胺键; (3) 内肽酶: 这类酶能够切割肽侧链与肽交联桥之间的肽键^[10,12,28]。

近年来, 内溶素作为一种新型抗菌剂相较于 VAL 已开展更广泛的动物与临床研究。Kim 等^[32]利用内溶素 LysSAP26 成功治愈鲍曼不动杆菌感染的小鼠模型, 该内溶素对多种革兰氏

阴性和阳性耐药菌株均具有抑菌活性, 可显著提高感染小鼠的存活率, 且在较高剂量下未观察到细胞毒性。

目前大多数酶制剂处于临床或临床前试验阶段, 并已针对部分病原细菌进行测试。荷兰生物技术公司 Microcos 开发出第一款用于人类的内溶素产品 Staphfekto SA.100。据报道该产品可成功治疗慢性和复发性金黄色葡萄球菌相关皮肤病, 且在长期日常治疗后不会导致细菌产生耐药性^[33]。Jun 等^[34]在 2017 年于韩国进行一项关于蛋白质 SAL200 的研究, 该研究是一项第一阶段、单中心、随机、双盲、安慰剂对照、单剂量和剂量递增的研究。SAL200 是一种基于噬菌体内溶素的新型候选药物, 用于治疗葡萄球菌感染, 其活性成分是重组形式的噬菌体内溶素 SAL-1^[34]。该药物没有观察到严重的不良反应。

此外, 内溶素还可以与抗生素联合使用, 以增强抗生素的效果。Kim 等^[35]研究噬菌体内溶素 SAL200 联合标准抗生素(standard antibiotics, SOC)的抗葡萄球菌作用, 该研究使用小鼠和蜡螟幼虫感染模型评估联合应用的体外杀菌活性和随后的体内杀菌活性, 结果显示, 联合使用后抗生素的最低抑制浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)显著降低。这项研究揭示 SAL200 能够恢复抗生素在细菌耐药性方面的有效性, 并验证 SAL200 与标准抗生素在体外和体内具有协同作用^[35]。

2 噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染相关研究

2.1 安全性分析

特定的噬菌体表面表达特定的糖类和蛋白质, 因此只能特异性地识别特定种属的细菌或菌株。噬菌体不会感染真核细胞, 因此不会导

致人体细胞的裂解死亡。此外,研究表明,噬菌体释放的基因产物也具有种属特异性,理论上不会对人体的正常菌群产生干扰^[4]。然而,这些观点还需要进一步验证。

一项对 22 株肺炎克雷伯菌噬菌体的全基因组研究^[36]表明,不携带毒力基因和耐药基因的噬菌体表现出较好的安全性。然而,该研究也揭示基因组中仍然存在相当比例的功能未知的开放阅读框(open reading frame, ORF),可能对噬菌体用于治疗带来潜在威胁。此外,需要注意的是,噬菌体在其生活周期中会经历组装过程,可能将毒力基因组装进入衣壳中,从而对人体产生毒害作用,或者将携带的耐药基因和毒素编码基因转移到目标细菌,这种情况在溶原性噬菌体中尤甚。目前有 2 种替代策略可用于改造噬菌体以获得所需的功能。第一种是基因组修饰,能够使已知的噬菌体的特性改变。目前已有临床案例报道进行噬菌体基因组修饰后的工程噬菌体被用于治疗播散型耐药脓肿分枝杆菌^[37]。第二种是按需求直接设计构建噬菌体,使用合成基因组学构建根据噬菌体生物学的已知规则设计。噬菌体合成基因组学不受天然噬菌体的限制,虽仍处于起步阶段,但可见巨大的应用前景^[38]。

除基因组问题以外,噬菌体及其基因产物对人体来说属于外源性物质,具有一定的抗原性,还可能导致人体产生过敏反应^[39]。另外,噬菌体侵染细菌后会释放更多的子代噬菌体,并使人体产生相应的中和抗体^[4]。更多的子代噬菌体在人体中的药物代谢动力学反应将非常复杂,不能用已知的简单的药物代谢模型来进行预测,给药剂量以及给药途径都需要进一步研究。例如建立相关的新型“代谢模型”等,这也是未来需研究的方向。综上所述,虽然噬菌体治疗显示出较大的潜力,但在临床应用之前,

必须深入研究以解决上述安全性和药代动力学等方面的问题。

2.2 体外及动物实验

噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的研究一般从体外实验开始。首先从污水等样本中分离与目标菌株特异性识别的噬菌体;随后,对其活力和代时等生物学特性进行检测,并使用光密度值作为指标比较其对细菌的裂解活性;研究还对噬菌体基因组进行测序,比较不同噬菌体之间的基因组差异,从基因层面明确其活性位点以及裂解细菌的机制^[40]。

在确定噬菌体的相关生物学特性后,临床前实验常使用小鼠建立动物感染模型,探究该噬菌体治疗肺炎克雷伯菌引起的肺炎、肝脓肿和菌血症等感染性疾病的疗效。Singh 等^[41]使用分子和透射电镜分析得到 3 株最活跃的噬菌体 ϕ KpBHU4、 ϕ KpBHU7 和 ϕ KpBHU14,并通过肺炎克雷伯菌感染小鼠模型研究其组成的鸡尾酒疗法在不同浓度和给药频次下的治疗效果。结果显示,在肺炎克雷伯菌感染后及时并多次重复给药有助于提高噬菌体治疗的有效性。除小鼠模型外,Thiry 等^[40]利用大蜡螟幼虫模型评价噬菌体控制肺炎克雷伯菌株 ST23 和 ST258 感染的能力。研究表明,在感染前 1 h 预防或感染后 1 h 治疗使用噬菌体均能取得显著效果。

综合前述动物实验^[27,40-41]来看,噬菌体疗法的特点主要表现在:注射噬菌体后,动物体内细菌数量减少,细胞因子分泌减少,实验动物的死亡率降低;噬菌体对细菌具有高度特异性,因此其抗菌谱较窄。结果表明噬菌体有望作为肺炎克雷伯菌感染的潜在治疗方案,并值得进一步深入研究。

2.3 临床案例

噬菌体治疗由于其特殊的药理学特性以及伦理学问题等,将噬菌体制剂用于临床治疗仍

处于探索阶段, 尚未进行大规模的临床试验, 相关研究成果通常以病例报告的形式呈现。目前, 噬菌体治疗尚未像抗生素等药物应用一样建立明确的规范体系, 也没有成为常规的细菌感染治疗药物。临床上还没有针对噬菌体抗菌治疗的系统指导规范, 其应用通常满足以下条件: (1) 常规抗菌治疗无效, 患者感染的是耐药性极强的菌株; (2) 体外实验已证明将使用的噬菌体对特异的细菌有效, 并且基因分析表明其具有较高的安全性; (3) 由于噬菌体的本质是一种病毒, 其用于治疗的风险性还未完全阐明, 应用时需要医生和患者及其家属做好充分沟通, 确认患者依从性良好^[42-43]。在动物实验中, 通常会注射致死剂量的细菌, 以实验动物的死亡率作为噬菌体治疗有效性的评价指标。然而, 在实际的临床实践中, 面对的情况更加复杂, 无法通过衡量死亡率的变化来评价噬菌体疗法的疗效。因此, 尽管动物实验已提供初步的信息, 但还需要更多的研究来验证噬菌体治疗在临床实践中的实际效果。

在使用噬菌体疗法时, 研究人员会根据肺炎克雷伯菌的感染部位选择合适的给药途径。对于泌尿道感染, 常用膀胱灌注给药法。例如, 2020年曾毅刚等^[44]使用 117、135、178 和 GD168 号噬菌体混合液膀胱灌注并联合美罗培南和阿米卡星治疗, 成功治愈一名泛耐药肺炎克雷伯菌泌尿道感染的患者。对于呼吸道感染, 可采用雾化吸入。2021年李莉莎等^[45]又借助肺炎克雷伯菌噬菌体库筛选出噬菌体进行雾化吸入治疗, 治愈一名泛耐药肺炎克雷伯菌肺部感染的患者。研究表明, 雾化吸入的噬菌体未入血, 噬菌体在体内可被代谢清除或稀释, 且经 2 次雾化吸入治疗即可达到噬菌体治疗最佳效果。此外, 感染创面局部给药也可供选择。再如, 2022年比利时 Eskenazi 等^[46]采用预先适应的噬

菌体疗法联合抗生素治疗成功治愈一名泛耐药肺炎克雷伯菌感染的创伤骨折患者。患者曾多次复发感染, 最后选择在手术清创后进行噬菌体局部干预, 经过 6 d 噬菌体短程治疗后继续使用抗生素治疗, 治疗过程中未观察到与噬菌体治疗相关的不良反应, 患者后康复良好。

此外, 随着微生物组学的发展, 靶向肠道微生物群中肺炎克雷伯菌的噬菌体疗法在改善原发性硬化性胆管炎、特定的非酒精性脂肪性肝病和炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)等非感染性疾病中表现出一定的疗效, 但其实验仍停留在体外动物模型阶段, 且具体病理生理机制仍未阐明^[47-49]。

近年的文献更多地倾向于报道治疗成功的案例, 对于噬菌体治疗未能改善临床结局的试验并未报道^[50]。在检索过程中, 没有找到近期的失败案例, 因此无法对噬菌体疗法做出完整的评价。尽管如此, 无论是从体外实验和动物实验中噬菌体裂解肺炎克雷伯菌的能力来看, 还是从临床实践中的效果来看, 都对噬菌体作为一种特殊的抗菌药物的发展前景持积极态度。另一方面, 深入的基础研究仍有待展开, 噬菌体临床应用的规范问题亟待解决。

3 噬菌体疗效影响因素

3.1 感染部位噬菌体浓度

Cairns 等^[51]的一项体外动力学模拟实验揭示了噬菌体-宿主相互作用的特点。实验结果表明, 只有足够高的噬菌体浓度才能有效抑制细菌的生长, 且噬菌体浓度越高, 抑菌效果越好。然而, Singh 等^[41]对肺炎克雷伯菌致败血症小鼠模型的噬菌体疗效分析显示, 在细菌感染早期, 高浓度噬菌体组相较于低浓度组具有更高的致死率。这可能是因为细菌感染早期, 较高剂量的噬菌体会对细菌裂解达成适合作用浓度,

短时间内大量细菌裂解释放出大量的内毒素入血,进而引发内毒素血症并降低治疗效果。此外,内毒素在体内大量聚积还会引起白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- α)和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等炎症细胞因子的大量暴发,导致内毒素休克^[52]。因此,使用较低剂量的噬菌体可能会获得更好的治疗效果并降低风险。

针对肺炎克雷伯菌感染引发的不同症状,为使噬菌体尽快到达感染部位并发挥最大疗效,应根据感染部位的不同采取相应的给药方式^[53]。例如,对于泌尿道感染,采用膀胱灌注噬菌体混合液的方式进行治疗^[44];对于肺部感染,采用雾化吸入治疗的方法^[45];在腹腔内感染小鼠模型中,腹膜内给药相较于口服给药,在血浆中具有更高的噬菌体滴度和生物利用度^[54]。此外,还有肌肉注射、皮下给药等不同途径^[55]来进行治疗。

由于噬菌体的特殊性质,即其为蛋白质结构,容易受到蛋白质变性因素的影响而失活,从而极大地影响疗效,蛋白质变性的因素包括高温、有机溶剂、溶剂离子强度,还包括胃内的pH值,以及配方或封装过程中的机械应力。因此,为保证噬菌体能够在对应感染部位达到相应治疗所需浓度,在噬菌体药物的配方和保存过程中需要考虑如何确保噬菌体的活力和稳定性。目前,有多种方法可用于噬菌体的稳定和封装,常见的方法包括喷雾干燥、喷雾冷冻干燥、冷冻干燥、挤压滴法、乳液和聚合技术^[56]。此类方法可提高噬菌体药物的质量和稳定性,从而更好地发挥其治疗作用。

3.2 噬菌体的耐药性

虽然噬菌体疗法具有替代抗生素治疗的潜在能力,但在广泛应用后,细菌也会不可避免地产生对噬菌体的耐药变异,因此降低治疗效

果。亦有研究已经在人体中观察到细菌的耐噬菌体变异^[9]。

关于细菌对噬菌体产生耐药性的机制,已有文献对其进行综述^[57],主要的耐药机制包括:(1)通过外膜载体使噬菌体将DNA注入囊泡中而避免感染;(2)通过细菌表面噬菌体受体突变、阻断和阶段性改变等抑制噬菌体吸附;(3)通过表达蛋白质阻断噬菌体DNA注入;(4)通过甲基化等修饰识别外源DNA,从而裂解噬菌体DNA;(5)抑制噬菌体DNA复制;(6)通过噬菌体诱导染色体岛(phages induce chromosomal islands, PICI)的作用,干扰噬菌体组装,使产生的噬菌体颗粒中携带的DNA并非来自于噬菌体的基因组;(7)通过造成流产感染的方式,以被感染细菌死亡为代价,阻止噬菌体增殖,达到保护周围细菌的目的。

就肺炎克雷伯菌噬菌体耐药性而言,抑制噬菌体吸附是被报道最多的耐药机制。例如,Tan等^[58]发现肺炎克雷伯菌可破坏*wcaJ*基因来阻止噬菌体117受体荚膜异多糖酸的生物合成,从而抑制噬菌体117的吸附。Hesse等^[59]将分离出的噬菌体与肺炎克雷伯菌混合培养,得到3种吸附受损的抗性突变体,其突变位点分别位于荚膜合成、LPS合成和GalU催化的多糖代谢基因位点附近。理论上,对噬菌体耐药的肺炎克雷伯菌在使用噬菌体疗法的患者体内也有可能分离到,但是目前还未找到相应的研究结果支持。

为克服噬菌体耐药性对治疗的影响,研究人员进行包括鸡尾酒疗法在内的多种探索。例如,Majkowska-Skrobek等^[60]的体外研究表明,由荚膜特异性和非荚膜特异性的噬菌体组成的噬菌体鸡尾酒疗法可有效抑制肺炎克雷伯菌中噬菌体耐药性的发展。此外,部分研究^[61-62]表明噬菌体耐药突变体会产生巨大的“代价”,例

如降低对免疫系统杀菌作用的抵抗力或恢复对抗生素的敏感性。噬菌体和抗生素的联合使用能有效地降低突变率, 提高疗效^[9,63-65]。同时, 由于噬菌体宿主谱较窄等原因, 治疗中建议使用噬菌体鸡尾酒疗法或及时更换有效识别致病菌株的噬菌体, 许多研究也都强调组合方法的重要性^[46,66-67]。

有一个假设是, 与普通药物不同, 噬菌体具有自己的基因组, 可产生针对细菌新突变的变异。因此, 如果出现噬菌体耐药的公共卫生问题, 可能不会像抗生素耐药性问题那样严重。这一设想在单核细胞增多性李斯特菌、大肠埃希菌等菌株中已经得到证实^[68-70], 但是在肺炎克雷伯菌中仍需要更多相关研究的支持。

3.3 噬菌体对胞内细菌的作用

包括肺炎克雷伯菌在内的许多致病菌能够侵入真核细胞, 通过抑制细胞的凋亡、自噬和内体形成等方法抵御宿主细胞的防御机制^[71]。因此, 消除感染也需要杀灭细胞中藏匿的致病菌。传统观点认为, 在正常情况下, 噬菌体难以与哺乳动物细胞膜有效地相互作用, 因此很难进入哺乳动物细胞^[72], 从而导致噬菌体疗法对胞内菌感染疗效欠佳。

然而, 后续的研究^[73-76]表明噬菌体可借助细胞的大型胞饮作用、网格蛋白介导的胞吞作用和胞膜窖介导的胞吞作用进入细胞。噬菌体能够黏附在哺乳动物细胞上, 并在数小时内被内化, 从而在细胞内积累。噬菌体在被哺乳动物组织吸收后可能会有多种结果, 已被证明的包括: 细胞导致的噬菌体失活^[77]、细胞发生转胞吞作用和活性噬菌体的分泌^[78]、噬菌体在全身传播^[79], 以及机体免疫系统对噬菌体的灭活^[80]。因此, 噬菌体经自然途径进入哺乳动物细胞后, 并不总是能稳定地发挥作用, 噬菌体在细胞内的杀菌活性还需要进一步的研究和验证。

近年来, 研究人员发现人工包装或修饰噬菌体可提高其进入目标细胞的效率, 从而实现更好的疗效。在其他肠道杆菌中, 研究发现物理封装和表面化学共轭可提高噬菌体的生物利用率^[81-82]。在与肺炎克雷伯菌相关的感染中, 也已取得一些突破。例如, Colom 等^[83]发现在肺炎克雷伯菌的烧伤感染中, 脂质体包裹噬菌体的鸡尾酒疗法相比常规鸡尾酒疗法具有一定优势。另外, Farkas 等^[81]的研究表明, 使用阳离子脂质作为传递载体, 将噬菌体送入被感染的巨噬细胞内, 24 h 内对特定肺炎克雷伯菌的胞内杀伤率为 94.6%。在此过程中, 脂质为噬菌体提供 100% 的中和抗体保护。相比之下, 未被包裹的噬菌体在 3 h 内被中和。

可见, 近期研究人员已发现可能的使噬菌体进入细胞并有效地杀灭胞内肺炎克雷伯菌的方法, 但其仍处于实验阶段, 前景仍需进一步观察。

4 回顾与展望

如前所述, 在抗生素耐药问题日益突出的当下, 将噬菌体用于肺炎克雷伯菌乃至其他耐药细菌感染的治疗具有潜在的优势。第一, 噬菌体具有高度特异性, 尽管单一噬菌体的抗菌谱较窄, 但多种噬菌体混合的鸡尾酒疗法可能实现常见菌株的全覆盖; 第二, 噬菌体的分离和获取相对较容易, 易于控制治疗成本; 第三, 噬菌体的基因表达产物不仅可辅助噬菌体和抗生素疗法以增强疗效, 还可作为独立的治疗方法, 突破噬菌体宿主范围的限制。

然而, 噬菌体在治疗中仍存在局限性。噬菌体的活性容易受到温度、pH 等环境因素的影响, 需要研制相应的配方和制剂来封装和稳定噬菌体; 细菌对噬菌体产生耐药性也是不可避免的, 但可通过鸡尾酒疗法或与抗生素联合使

用等方法加以缓解；尽管理论上将噬菌体应用于治疗具有较高的安全性，但噬菌体的基因组中仍存在许多功能未知的 ORF，需要进一步研究和挖掘。另外，噬菌体对胞内菌的杀灭能力仍存在限制，但最近的研究正在探索噬菌体进入人体细胞并保持胞内杀菌活性的方法。噬菌体相关研究的数据量、可选用的噬菌体种类以及对噬菌体基因组学的认知都还相对有限。因此，需要持续筛选更多更高效的噬菌体，并构建更完善的噬菌体库。

噬菌体疗法正在迅速发展。全球范围内，越来越多的报道证实噬菌体成功治愈临床病例中的多重耐药菌感染，噬菌体鸡尾酒疗法已成为部分治疗方案的选择。为使噬菌体疗法标准化，噬菌体与传统药物相互作用、用药时机、顺序和最佳剂量等方面亟待开展广泛研究，在噬菌体疗法推广之前仍然需要大量的研究实践。尽管如此，无法否认噬菌体在泛耐药肺炎克雷伯菌感染乃至其他耐药细菌感染的治疗方面具有可观的潜力。如果借此减少或替代传统抗生素的使用，将能改变全球抗击耐药菌感染的局面，在不久的将来，它有可能成为潜在的抗菌治疗药物。

参考文献

- [1] BENGOCHEA JA, SA PESSOA J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2019, 43(2): 123-144.
- [2] MURRAY CJL, IKUTA KS, SHARARA F, SWETSCHINSKI L, AGUILAR GR, GRAY A, HAN C, BISIGNANO C, RAO P, WOOL E, JOHNSON SC, BROWNE AJ, CHIPETA MG, FELL F, HACKETT S, HAINES-WOODHOUSE G, HAMADANI BHK, KUMARAN EAP, MCMANIGAL B, AGARWAL R, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. *Lancet (London, England)*, 2022, 399(10325): 629-655.
- [3] PACZOSA MK, MECSAS J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2016, 80(3): 629-661.
- [4] MATSUZAKI S, RASHEL M, UCHIYAMA J, SAKURAI S, UJIHARA T, KURODA M, IKEUCHI M, TANI T, FUJIEDA M, WAKIGUCHI H, IMAI S. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases[J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2005, 11(5): 211-219.
- [5] HERRIDGE WARREN P, PREETHA S, JESSICA O, BROOK THOMAS C, LESLEY H. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2020, 69(2): 176-194.
- [6] KANG FQ, CHAI ZL, LI BP, HU MD, YANG ZL, WANG X, LIU WT, REN HG, JIN Y, YUE JJ. Characterization and diversity of *Klebsiella pneumoniae* prophages[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(11): 9116.
- [7] NOBREGA FL, VLOT M, de JONGE PA, DREESENS LL, BEAUMONT HJE, LAVIGNE R, DUTILH BE, BROUNS SJJ. Targeting mechanisms of tailed bacteriophages[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 16(12): 760-773.
- [8] DUNSTAN RA, BAMERT RS, TAN KS, IMBULGODA U, BARLOW CK, TAIAROA G, PICKARD DJ, SCHITTENHELM RB, DOUGAN G, SHORT FL, LITHGOW T. Epitopes in the capsular polysaccharide and the porin OmpK36 receptors are required for bacteriophage infection of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Cell Reports*, 2023, 42(6): 112551.
- [9] CHEGINI Z, KHOSHBAYAN A, VESAL S, MORADABADI A, HASHEMI A, SHARIATI A. Bacteriophage therapy for inhibition of multi drug-resistant uropathogenic bacteria: a narrative review[J]. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2021, 20(1): 30.
- [10] DANIS-WLODARCZYK KM, WOZNIAC DJ, ABEDON ST. Treating bacterial infections with bacteriophage-based enzybiotics: *in vitro*, *in vivo* and clinical application[J]. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(12): 1497.
- [11] MACIEJEWSKA B, OLSZAK T, DRULIS-KAWA Z. Applications of bacteriophages versus phage enzymes to combat and cure bacterial infections: an ambitious and also a realistic application?[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(6): 2563-2581.

- [12] LATKA A, MACIEJEWSKA B, MAJKOWSKA-SKROBEK G, BRIERS Y, DRULIS-KAWA Z. Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(8): 3103-3119.
- [13] SQUEGLIA F, MACIEJEWSKA B, ŁATKA A, RUGGIERO A, BRIERS Y, DRULIS-KAWA Z, BERISIO R. Structural and functional studies of a *Klebsiella* phage capsule depolymerase tailspike: mechanistic insights into capsular degradation[J]. *Structure*, 2020, 28(6): 613-624.e4.
- [14] PAN YJ, LIN TL, CHEN CC, TSAI YT, CHENG YH, CHEN YY, HSIEH PF, LIN YT, WANG JT. *Klebsiella* phage ΦK64-1 encodes multiple depolymerases for multiple host capsular types[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(6): e02457-e02416.
- [15] HSU CR, LIN TL, PAN YJ, HSIEH PF, WANG JT. Isolation of a bacteriophage specific for a new capsular type of *Klebsiella pneumoniae* and characterization of its polysaccharide depolymerase[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70092.
- [16] LIN TL, HSIEH PF, HUANG YT, LEE WC, TSAI YT, SU PA, PAN YJ, HSU CR, WU MC, WANG JT. Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of *Klebsiella pneumoniae*: implication in typing and treatment[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2014, 210(11): 1734-1744.
- [17] MAJKOWSKA-SKROBEK G, ŁATKA A, BERISIO R, MACIEJEWSKA B, SQUEGLIA F, ROMANO M, LAVIGNE R, STRUVE C, DRULIS-KAWA Z. Capsule-targeting depolymerase, derived from *Klebsiella* KP36 phage, as a tool for the development of anti-virulent strategy[J]. *Viruses*, 2016, 8(12): 324.
- [18] HSIEH PF, LIN HH, LIN TL, CHEN YY, WANG JT. Two T7-like bacteriophages, K5-2 and K5-4, each encodes two capsule depolymerases: isolation and functional characterization[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 4624.
- [19] SOLOVIEVA EV, MYAKININA VP, KISLICHKINA AA, KRASILNIKOVA VM, VEREVKIN VV, MOCHALOV VV, LEV AI, FURSOVA NK, VOLOZHANTSEV NV. Comparative genome analysis of novel Podoviruses lytic for hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* of K1, K2, and K57 capsular types[J]. *Virus Research*, 2018, 243: 10-18.
- [20] MAJKOWSKA-SKROBEK G, LATKA A, BERISIO R, SQUEGLIA F, MACIEJEWSKA B, BRIERS Y, DRULIS-KAWA Z. Phage-borne depolymerases decrease *Klebsiella pneumoniae* resistance to innate defense mechanisms[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2517.
- [21] PAN YJ, LIN TL, CHEN YY, LAI PH, TSAI YT, HSU CR, HSIEH PF, LIN YT, WANG JT. Identification of three Podoviruses infecting *Klebsiella* encoding capsule depolymerases that digest specific capsular types[J]. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12(3): 472-486.
- [22] OLSZAK T, SHNEIDER MM, LATKA A, MACIEJEWSKA B, BROWNING C, SYCHEVA LV, CORNELISSEN A, DANIS-WLODARCZYK K, SENCHENKOVA SN, SHASHKOV AS, GULA G, ARABSKI M, WASIK S, MIROSHNIKOV KA, LAVIGNE R, LEIMAN PG, KNIREL YA, DRULIS-KAWA Z. The O-specific polysaccharide lyase from the phage LKA1 tailspike reduces *Pseudomonas* virulence[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 16302.
- [23] TU IF, LIN TL, YANG FL, LEE IM, TU WL, LIAO JH, KO TP, WU WJ, JAN JT, HO MR, CHOU CY, WANG AHJ, WU CY, WANG JT, HUANG KF, WU SH. Structural and biological insights into *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharide degradation by a bacteriophage K1 lyase: implications for clinical use[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2022, 29(1): 9.
- [24] YIN W, WANG YT, LIU L, HE J. Biofilms: the microbial protective clothing in extreme environments[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(14): 3423.
- [25] FLEMMING HC, WINGENDER J, SZEWZYK U, STEINBERG P, RICE SA, KJELLEBERG S. Biofilms: an emergent form of bacterial life[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2016, 14(9): 563-575.
- [26] GUO ZM, HUANG J, YAN GM, LEI LC, WANG S, YU L, ZHOU L, GAO AC, FENG X, HAN WY, GU JM, YANG JL. Identification and characterization of Dpo42, a novel depolymerase derived from the *Escherichia coli* phage vB_EcoM_ECOO78[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1460.
- [27] ASGHAR S, AHMED A, KHAN S, LAIL A, SHAKEEL M. Genomic characterization of lytic bacteriophages AϕL and AϕM infecting ESBL *K. pneumoniae* and its therapeutic potential on biofilm dispersal and *in vivo* bacterial clearance[J]. *Microbiological Research*, 2022, 262: 127104.
- [28] OLIVEIRA H, SÃO-JOSÉ C, AZEREDO J.

- Phage-derived peptidoglycan degrading enzymes: challenges and future prospects for *in vivo* therapy[J]. *Viruses*, 2018, 10(6): 292.
- [29] GRABOWSKI Ł, LEPEK K, STASIŁOJC M, KOSZNIK-KWAŚNICKA K, ZDROJEWSKA K, MACIĄG-DORSZYŃSKA M, WĘGRZYN G, WĘGRZYN A. Bacteriophage-encoded enzymes destroying bacterial cell membranes and walls, and their potential use as antimicrobial agents[J]. *Microbiological Research*, 2021, 248: 126746.
- [30] REUTER M, KRUGER DH. Approaches to optimize therapeutic bacteriophage and bacteriophage-derived products to combat bacterial infections[J]. *Virus Genes*, 2020, 56(2): 136-149.
- [31] KONGARI R, RAJAURE M, CAHILL J, RASCHE E, MIJALIS E, BERRY J, YOUNG R. Phage spanins: diversity, topological dynamics and gene convergence[J]. *BMC Bioinformatics*, 2018, 19(1): 326.
- [32] KIM S, JIN JS, CHOI YJ, KIM J. LysSAP26, a new recombinant phage endolysin with a broad spectrum antibacterial activity[J]. *Viruses*, 2020, 12(11): 1340.
- [33] TOTTÉ JEE, van DOORN MB, PASMANS SGMA. Successful treatment of chronic *Staphylococcus aureus*-related dermatoses with the topical endolysin staphefekt SA.100: a report of 3 cases[J]. *Case Reports in Dermatology*, 2017, 9(2): 19-25.
- [34] JUN SY, JANG IJ, YOON S, JANG K, YU KS, CHO JY, SEONG MW, JUNG GM, YOON SJ, KANG SH. Pharmacokinetics and tolerance of the phage endolysin-based candidate drug SAL200 after a single intravenous administration among healthy volunteers[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(6): e02629-e02716.
- [35] KIM NH, PARK WB, CHO JE, CHOI YJ, CHOI SJ, JUN SY, KANG CK, SONG KH, CHOE PG, BANG JH, KIM ES, PARK SW, KIM NJ, OH MD, BIN KIM H. Effects of phage endolysin SAL200 combined with antibiotics on *Staphylococcus aureus* infection[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2018, 62(10): e00731-e00818.
- [36] 崔泽林, 郭晓奎, 汤荣, 陈雯静, 俞琦, 洪庆, 李莉. 基于基因组学的肺炎克雷伯菌噬菌体安全性评估[J]. *基因组学与应用生物学*, 2017, 36(3): 1114-1122.
- CUI ZL, GUO XK, TANG R, CHEN WJ, YU Q, HONG Q, LI L. Safety assessment of *Klebsiella pneumoniae* phages based on genomics[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2017, 36(3): 1114-1122 (in Chinese).
- [37] DEDRICK RM, GUERRERO-BUSTAMANTE CA, GARLENA RA, RUSSELL DA, FORD K, HARRIS K, GILMOUR KC, SOOTHILL J, JACOBS-SERA D, SCHOOLEY RT, HATFULL GF, SPENCER H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*[J]. *Nature Medicine*, 2019, 25(5): 730-733.
- [38] STRATHDEE SA, HATFULL GF, MUTALIK VK, SCHOOLEY RT. Phage therapy: from biological mechanisms to future directions[J]. *Cell*, 2023, 186(1): 17-31.
- [39] 高雅, 王兆飞, 严亚贤. 噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(9): 3271-3280.
- GAO Y, WANG ZF, YAN YX. Advances in the treatment of *Klebsiella pneumoniae* infection with bacteriophage therapy[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(9): 3271-3280 (in Chinese).
- [40] THIRY D, PASSET V, DANIS-WLODARCZYK K, LOOD C, WAGEMANS J, de SORDI L, van NOORT V, DUFOUR N, DEBARBIEUX L, MAINIL JG, BRISSE S, LAVIGNE R. New bacteriophages against emerging lineages ST23 and ST258 of *Klebsiella pneumoniae* and efficacy assessment in *Galleria mellonella* larvae[J]. *Viruses*, 2019, 11(5): 411.
- [41] SINGH A, SINGH AN, RATHOR N, CHAUDHRY R, SINGH SK, NATH G. Evaluation of bacteriophage cocktail on septicemia caused by colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in mice model[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 778676.
- [42] 崔泽林, 郭晓奎, 李莉, 冯婷婷. 噬菌体抗菌治疗安全性评估体系的建立[J]. *微生物学报*, 2018, 58(11): 2033-2039.
- CUI ZL, GUO XK, LI L, FENG TT. Establishment of safety assessment system of phage therapy[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(11): 2033-2039 (in Chinese).
- [43] PELFRENE E, WILLEBRAND E, CAVALEIRO SANCHES A, SEBRIS Z, CAVALERI M. Bacteriophage therapy: a regulatory perspective[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 71(8): 2071-2074.
- [44] 曾毅刚, 包娟, 谭德猛, 张义元, 郭明权, 朱哲, 邵恩明, 朱同玉. 噬菌体在泌尿道泛耐药肺炎克雷伯菌感染患者中的应用[J]. *中华泌尿外科杂志*, 2020, 41(9): 677-680.
- ZENG YG, BAO J, TAN DM, ZHANG YY, GUO MQ,

- ZHU Z, SHAO EM, ZHU TY. Application of phage in patients with urinary tract pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection[J]. Chinese Journal of Urology, 2020, 41(9): 677-680 (in Chinese).
- [45] 李莉莎, 李建辉, 何斌, 吴楠楠, 朱同玉, 郭晓奎, 陈峥宏. 噬菌体治疗泛耐药肺炎克雷伯菌肺部感染的临床应用及效果初探[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2021, 41(9): 1272-1276.
- LI LS, LI JH, HE B, WU NN, ZHU TY, GUO XK, CHEN ZH. Clinical application and effect of phage on the treatment of pulmonary infection by pan-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science Edition), 2021, 41(9): 1272-1276 (in Chinese).
- [46] ESKENAZI A, LOOD C, WUBBOLTS J, HITES M, BALARJISHVILI N, LESHKASHELI L, ASKILASHVILI L, KVACHADZE L, van NOORT V, WAGEMANS J, JAYANKURA M, CHANISHVILI N, de BOER M, NIBBERING P, KUTATELADZE M, LAVIGNE R, MERABISHVILI M, PIRNAY JP. Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related infection due to pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Nature Communications, 2022, 13: 302.
- [47] FEDERICI S, KREDO-RUSSO S, VALDÉS-MAS R, KVIATCOVSKY D, WEINSTOCK E, MATIUHIN Y, SILBERBERG Y, ATARASHI K, FURUICHI M, OKA A, LIU B, FIBELMAN M, WEINER IN, KHABRA E, CULLIN N, BEN-YISHAI N, INBAR D, BEN-DAVID H, NICENBOIM J, KOWALSMAN N, et al. Targeted suppression of human IBD-associated gut microbiota commensals by phage consortia for treatment of intestinal inflammation[J]. Cell, 2022, 185(16): 2879-2898.e24.
- [48] GAN L, FENG YL, DU B, FU HY, TIAN ZY, XUE GH, YAN C, CUI XH, ZHANG R, CUI JH, ZHAO HQ, FENG JX, XU ZY, FAN Z, FU TT, DU SH, LIU SY, ZHANG Q, YU ZH, SUN Y, et al. Bacteriophage targeting microbiota alleviates non-alcoholic fatty liver disease induced by high alcohol-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Nature Communications, 2023, 14: 3215.
- [49] ICHIKAWA M, NAKAMOTO N, KREDO-RUSSO S, WEINSTOCK E, WEINER IN, KHABRA E, BEN-ISHAI N, INBAR D, KOWALSMAN N, MORDOCH R, NICENBOIM J, GOLEMBO M, ZAK N, JABLONSKA J, SBERRIO-LIVNAT H, NAVOK S, BUCHSHTAB N, SUZUKI T, MIYAMOTO K, TERATANI T, et al. Bacteriophage therapy against pathological *Klebsiella pneumoniae* ameliorates the course of primary sclerosing cholangitis[J]. Nature Communications, 2023, 14: 3261.
- [50] WIENHOLD SM, LIENAU J, WITZENRATH M. Towards inhaled phage therapy in western Europe[J]. Viruses, 2019, 11(3): 295.
- [51] CAIRNS BJ, TIMMS AR, JANSEN VAA, CONNERTON IF, PAYNE RJH. Quantitative models of *in vitro* bacteriophage-host dynamics and their application to phage therapy[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(1): e1000253.
- [52] HAO WT, LI KC, GE XY, YANG HY, XU CJ, LIU S, YU HH, LI PC, XING RG. The effect of N-acetylation on the anti-inflammatory activity of chitooligosaccharides and its potential for relieving endotoxemia[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(15): 8205.
- [53] RASTOGI V, PRAGYA, VERMA N, MISHRA AK, NATH G, GAUR PK, VERMA A. An overview on bacteriophages: a natural nanostructured antibacterial agent[J]. Current Drug Delivery, 2018, 15(1): 3-20.
- [54] DHUNGANA G, NEPAL R, REGMI M, MALLA R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a novel virulent *Klebsiella* phage Kp_Pokalde_002 in a mouse model[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 684704.
- [55] DĄBROWSKA K. Phage therapy: what factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review[J]. Medicinal Research Reviews, 2019, 39(5): 2000-2025.
- [56] MALIK DJ, SOKOLOV IJ, VINNER GK, MANCUSO F, CINQUERRUI S, VLADISAVLJEVIC GT, CLOKIE MRJ, GARTON NJ, STAPLEY AGF, KIRPICHNIKOVA A. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2017, 249: 100-133.
- [57] AZAM AH, TANJI Y. Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(5): 2121-2131.
- [58] TAN DM, ZHANG YY, QIN JH, LE S, GU JM, CHEN LK, GUO XK, ZHU TY. A frameshift mutation in *wcaJ* associated with phage resistance in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microorganisms, 2020, 8(3): 378.
- [59] HESSE S, RAJAURE M, WALL E, JOHNSON J,

- BLISKOVSKY V, GOTTESMAN S, ADHYA S. Phage resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 evolves via diverse mutations that culminate in impaired adsorption[J]. *mBio*, 2020, 11(1): e02530-e02619.
- [60] MAJKOWSKA-SKROBEK G, MARKWITZ P, SOSNOWSKA E, LOOD C, LAVIGNE R, DRULIS-KAWA Z. The evolutionary trade-offs in phage-resistant *Klebsiella pneumoniae* entail cross-phage sensitization and loss of multidrug resistance[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(12): 7723-7740.
- [61] FANG QQ, FENG Y, McNALLY A, ZONG ZY. Characterization of phage resistance and phages capable of intestinal decolonization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in mice[J]. *Communications Biology*, 2022, 5: 48.
- [62] GORDILLO ALTAMIRANO F, FORSYTH JH, PATWA R, KOSTOULIAS X, TRIM M, SUBEDI D, ARCHER SK, MORRIS FC, OLIVEIRA C, KIELTY L, KORNEEV D, O'BRYAN MK, LITHGOW TJ, PELEG AY, BARR JJ. Bacteriophage-resistant *Acinetobacter baumannii* are resensitized to antimicrobials[J]. *Nature Microbiology*, 2021, 6(2): 157-161.
- [63] OECHSLIN F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy[J]. *Viruses*, 2018, 10(7): 351.
- [64] TAGLIAFERRI TL, JANSEN M, HORZ HP. Fighting pathogenic bacteria on two fronts: phages and antibiotics as combined strategy[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 22.
- [65] AL-MADBOLY LA, ABDELAZIZ AA, ABO-KAMER AM, NOSAIR AM, ABDELKADER K. Characterization and genomic analysis of novel bacteriophage NK20 to revert colistin resistance and combat pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a rat respiratory infection model[J]. *Life Sciences*, 2023, 322: 121639.
- [66] MARTINS WMBS, LI M, SANDS K, LENZI MH, PORTAL E, MATHIAS J, DANTAS PP, MIGLIAVACCA R, HUNTER JR, MEDEIROS EA, GALES AC, TOLEMAN MA. Effective phage cocktail to combat the rising incidence of extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 16[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 1015-1023.
- [67] MULANI MS, KAMBLE EE, KUMKAR SN, TAWRE MS, PARDESI KR. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 539.
- [68] OYEJOBI GK, ZHANG XX, XIONG DY, OGOLLA F, XUE H, WEI HP. Phage-bacterial evolutionary interactions: experimental models and complications[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2023, 49(2): 283-296.
- [69] PETERS TL, SONG YX, BRYAN DW, HUDSON LK, DENES TG. Mutant and recombinant phages selected from *in vitro* coevolution conditions overcome phage-resistant *Listeria monocytogenes*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(22): e02138-e02220.
- [70] BORIN JM, AVRANI S, BARRICK JE, PETRIE KL, MEYER JR. Coevolutionary phage training leads to greater bacterial suppression and delays the evolution of phage resistance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(23): e2104592118.
- [71] VERMEULEN LMP, de SMEDT SC, REMAUT K, BRAECKMANS K. The proton sponge hypothesis: fable or fact?[J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e V*, 2018, 129: 184-190.
- [72] AZIMI T, MOSADEGH M, NASIRI MJ, SABOUR S, KARIMAEI S, NASSER A. Phage therapy as a renewed therapeutic approach to mycobacterial infections: a comprehensive review[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 2943-2959.
- [73] YAN W, BANERJEE P, XU M, MUKHOPADHYAY S, IP M, CARRIGY NB, LECHUGA-BALLESTEROS D, TO KKW, LEUNG SSY. Formulation strategies for bacteriophages to target intracellular bacterial pathogens[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2021, 176: 113864.
- [74] STONEHAM CA, HOLLINSHEAD M, HAJITOU A. Clathrin-mediated endocytosis and subsequent endo-lysosomal trafficking of adeno-associated virus/phage[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(43): 35849-35859.
- [75] GOSWAMI A, SHARMA PR, AGARWAL R. Combatting intracellular pathogens using bacteriophage delivery[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2021: 1-18.
- [76] BICHET MC, CHIN WH, RICHARDS W, LIN YW, AVELLANEDA-FRANCO L, HERNANDEZ CA, ODDO A, CHERNYAVSKIY O, HILSENSTEIN V, NEILD A, LI J, VOELCKER NH, PATWA R, BARR JJ.

- Bacteriophage uptake by mammalian cell layers represents a potential sink that may impact phage therapy[J]. *iScience*, 2021, 24(4): 102287.
- [77] GEIER MR, ATTALLAH AFM, MERRIL CR. Characterization of *Escherichia coli* bacterial viruses in commercial sera[J]. *In Vitro*, 1975, 11(1): 55-58.
- [78] NGUYEN S, BAKER K, PADMAN BS, PATWA R, DUNSTAN RA, WESTON TA, SCHLOSSER K, BAILEY B, LITHGOW T, LAZAROU M, LUQUE A, ROHWER F, BLUMBERG RS, BARR JJ. Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers[J]. *mBio*, 2017, 8(6): e01874-e01917.
- [79] GHOSE C, LY M, SCHWANEMANN LK, SHIN JH, ATAB K, BARR JJ, LITTLE M, SCHOOLEY RT, CHOPYK J, PRIDE DT. The virome of cerebrospinal fluid: viruses where we once thought there were none[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2061.
- [80] SWEERE JM, van BELLEGHEM JD, ISHAK H, BACH MS, POPESCU M, SUNKARI V, KABER G, MANASHEROB R, SUH GA, CAO XO, de VRIES CR, LAM DN, MARSHALL PL, BIRUKOVA M, KATZNELSON E, LAZZARESCHI DV, BALAJI S, KESWANI SG, HAWN TR, SECOR PR, et al. Bacteriophage trigger antiviral immunity and prevent clearance of bacterial infection[J]. *Science*, 2019, 363(6434): eaat9691.
- [81] FARKAS ME, AANEI IL, BEHRENS CR, TONG GJ, MURPHY ST, O'NEIL JP, FRANCIS MB. PET imaging and biodistribution of chemically modified bacteriophage MS2[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2013, 10(1): 69-76.
- [82] HSU BB, PLANT IN, LYON L, ANASTASSACOS FM, WAY JC, SILVER PA. *In situ* reprogramming of gut bacteria by oral delivery[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 5030.
- [83] COLOM J, CANO-SARABIA M, OTERO J, CORTÉS P, MASPOCH D, LLAGOSTERA M. Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(14): 4841-4849.