



研究报告

一株新型牛源肺炎克雷伯菌噬菌体的分离鉴定

罗梓丹^{Δ1} 耿尚景超^{Δ1} 芦彪¹ 韩光丽¹ 王印^{1,2} 罗燕^{1,2} 杨泽晓^{1,2}
曹随忠^{1,2} 姚学萍^{*1,2}

1 四川农业大学动物医学院 四川 成都 611130

2 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 四川 成都 611130

摘要:【背景】肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是一种广泛分布于环境中的重要致病菌,该菌较高的耐药性致其在养殖业中治疗较为困难。【目的】分离一株裂解性肺炎克雷伯菌噬菌体,对分离株进行生物学特性鉴定和基因组学分析。【方法】使用双层平板法从四川省某奶牛场中分离、纯化出一株裂解性噬菌体,测定其裂解谱、热稳定性、酸碱耐受度、最佳感染复数及一步生长曲线等生物学特性,并进行全基因组的测序及注释分析。【结果】得到一株裂解性肺炎克雷伯菌噬菌体 vB_Kpn_B01,该噬菌体拥有透明且无晕环的噬菌斑,热稳定性较高,在极酸或极碱环境下不进行裂解活动,特异性较强,属长尾噬菌体科(Siphoviridae)。vB_Kpn_B01 全基因组大小为 113 227 bp,GC 含量为 47.97%。注释结果显示噬菌体拥有 149 个编码序列和 25 个 tRNAs,不含耐药基因及毒力基因。通过噬菌体的进化树分析发现,该噬菌体为 Sugarlandvirus。【结论】vB_Kpn_B01 拥有高效的生长特性和对不利环境的低耐受性,拥有裂解宿主菌的必备基因,并不含耐药基因及毒力基因,具有应用于畜牧业中防治多重耐药细菌的潜力。

关键词: 噬菌体,肺炎克雷伯菌,生物学特性,全基因组测序

Isolation and identification of a novel bovin *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB_Kpn_B01

LUO Zidan^{Δ1} GENG Shangjingchao^{Δ1} LU Biao¹ HAN Guangli¹ WANG Yin^{1,2}
LUO Yan^{1,2} YANG Zexiao^{1,2} CAO Suizhong^{1,2} YAO Xueping^{*1,2}

1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

2 Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 611130, China

Abstract: [Background] *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) is an important pathogen that can infect

Foundation items: Double Branch Plan of Discipline Construction of Sichuan Agricultural University (3572070); New Technology Promotion Project of Higher Vocational and Technical Colleges in Chongqing (GZTG201610)

ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: E-mail: yaoxueping74@126.com

Received: 31-12-2020; Accepted: 02-02-2021; Published online: 15-03-2021

基金项目: 四川农业大学学科建设双支计划资助项目(3572070); 重庆市高等职业院校新技术推广项目(GZTG201610)

Δ对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: yaoxueping74@126.com

收稿日期: 2020-12-31; 接受日期: 2021-02-02; 网络首发日期: 2021-03-15

both humans and bovine. The wide spread of *Klebsiella pneumoniae* and its high drug resistance have caused great difficulties in the treatment of the disease. **[Objective]** To isolate a lytic *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage. Its biological properties were studied, and the entire genome analysis of the bacteriophage was performed. **[Methods]** *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage was isolated by the double-layer agar culture method from a dairy farm trough in Sichuan province. We used the same method to conduct host range, thermostability, pH, optimal multiplicity of infection (MOI), and one-step growth experiment. Phage morphology was observed by transmission electron microscopy (TEM). The whole genome of the bacteriophage was sequenced. **[Results]** A lytic *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage vB_Kpn_B01 was isolated which had strong specificity. The morphology of plaque was round, transparent plaques with clear boundaries. Phage found in this study was double-stranded DNA bacterial viruses belonging to the Siphoviridae family, and the size of it was 113 227 bp. Comparative genome analysis revealed that vB_Kpn_B01 genome possesses the highest similarity to the bacteriophages in the genus of Sugarlandvirus. The genome of vB_Kpn_B01 comprises 149 coding sequences (CDS) and 25 tRNAs, but does not contain any known antibiotic resistant genes or virulent genes. **[Conclusion]** Phage vB_Kpn_B01 has a strong lysis ability and the necessary genes to lyse host bacteria. It has the potential to be used in the prevention and treatment of multi-drug resistant bacteria in animal husbandry.

Keywords: bacteriophage, *Klebsiella pneumoniae*, biological properties, whole genome sequencing

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)为革兰氏阴性杆菌, 属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)克雷伯菌属(*Klebsiella*)^[1]。肺炎克雷伯菌作为一种条件致病菌主要存在于人和动物的肠道、呼吸道和泌尿生殖道中^[2]。当机体免疫力降低或过度使用抗生素而导致菌群失调时, 肺炎克雷伯菌会引起多种疾病甚至是死亡^[3]。在畜牧养殖业中, 肺炎克雷伯菌可引起牛重症肺炎、败血症、脑膜炎、乳腺炎等疾病, 而且具有较高的发病率和死亡率^[4-5]。近年来, 抗生素的滥用导致了肺炎克雷伯菌的耐药菌普遍存在, 给疾病的治疗带来了巨大的困难。2001年, 研究者在美国发现有碳青霉烯类抗生素耐药的肺炎克雷伯菌出现^[6]。从那时起, 许多国家均已陆续发现肺炎克雷伯菌的耐药菌株^[7-9]。这给该细菌病的治疗带来极大的难度, 并引起了临床研究的高度重视。

噬菌体(Bacteriophage, Phage)属于一种在自然环境中大量存在并能杀死宿主细菌的病毒。噬菌体共分为2种: 一种为温和性噬菌体, 正常情况下温和噬菌体不会大量增殖, 也不会裂解宿主菌; 另一种为烈性噬菌体, 其进入宿主细胞后直接进行复制并裂解细菌, 更适合代替抗生素在临

床上的使用^[10]。目前, 特异性强的肺炎链球菌噬菌体已证实能用于控制由该细菌所引起的肺炎^[11], 而利用噬菌体消除肺炎克雷伯菌生物膜的研究也取得了有效进展^[12]。多个临床研究表明, 噬菌体不仅对宿主菌有良好的控制作用, 而且对机体几乎没有毒副作用^[13-14]。鉴于噬菌体具有较强的特异性及抗菌能力, 利用噬菌体防治细菌性疾病的相关研究在国内外引起了广泛的关注^[15]。

本研究从四川省某奶牛场中分离出一株裂解性肺炎克雷伯菌噬菌体 vB_Kpn_B01, 并对其进行生物学特性及基因组学分析, 为探索噬菌体作为细菌性疾病治疗剂提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 菌株及样品来源

本研究所使用细菌均为四川农业大学动物医学院动物检疫实验室保存, 其中选择致病性肺炎克雷伯菌 KP18 为宿主菌; 水样、粪样及乳样均采自四川省邛崃市某奶牛场。

1.2 主要试剂和仪器

TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0、DNaseI、RNaseA、Mung Bean Nuclease 和 6×Loading Buffer, 宝生物工程(大连)有限公

司; 0.22 μm 一次性针头式过滤器, Millipore 公司; SM Buffer, NaCl 5.8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g, 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5) 50 mL, 2%明胶 5 mL, 加蒸馏水至 1 L, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min; 其他国产分析纯试剂均购自万科化学试剂公司。

Quantity One 凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 日立透射电镜 HT7700, 由兰州兽医研究所提供使用。

1.3 噬菌体分离纯化

噬菌体分离及纯化使用双层平板法^[16]。将经滤纸过滤的样品与 LB 液体培养基等体积混合, 置于 37 °C、120 r/min 培养过夜, 8 000 \times g 离心 10 min, 收集上清, 使用 0.22 μm 一次性针头式过滤器过滤菌液, 取过滤液与对数生长期的宿主菌混合于温热的半固体 LB 培养基中(0.6%质量体积分数), 滤液、宿主菌液及半固体培养基的混合体积比为 1:1:100, 反复混匀后倒入固体 LB 培养基(1.2%质量体积分数)上, 置于 37 °C 恒温培养箱静置 12 h。

挑取单个噬菌斑置于 1 mL SM Buffer 中, 4 °C 静置过夜, 使噬菌体充分溶解于缓冲液中, 将浸泡液梯度稀释, 再次使用双层平板法进行纯化, 反复 3-5 次直至噬菌体斑形态规则均一。

1.4 噬菌体形态鉴定

取纯化的噬菌体原液滴于覆有炭膜的铜网上, 静置 15 min, 用滤纸吸干铜网上的多余液体, 滴加 2%磷钨酸(PTA, pH 7.0)染色 10 min, 静置使其干燥后使用透射电子显微镜观察噬菌体。

1.5 噬菌体裂解谱测定

选取 4 株牛源克雷伯菌、1 株林麝源肺炎克雷伯菌、10 株奶牛乳房炎相关菌株及 2 株猪源志贺杆菌, 采用双层平板法进行噬菌体宿主范围的鉴定, 观察是否有噬菌斑的出现, 设置 3 个重复平行试验。

1.6 噬菌体氯仿敏感性、噬菌体热稳定性及酸碱耐受度测定

将噬菌体液与氯仿溶液等体积混合, 对照组不添加氯仿, 溶液制备好后, 放入 37 °C 水浴锅

中培养 1 h, 试验组与对照组进行梯度稀释。

将噬菌体液置于 40、50、60、70 和 80 °C 水浴锅中分别静置 20、40 和 60 min。采用双层平板法测定滴度。

将噬菌体液以 1:10 的体积比置于 pH 分别为 3.0、5.0、9.0、11.0 的 SM Buffer 中, 37 °C 静置 1 h。

采用双层平板法测定各试验的噬菌体滴度, 设置 3 个重复平行试验。

1.7 噬菌体最佳感染复数(Multiplicity of Infection, MOI)及一步生长曲线

取对数生长期的肺炎克雷伯菌, 按照感染复数分别为 0.01、0.1、1、10、100 加入噬菌体, 37 °C、200 r/min 培养 6 h。采用双层平板法测定各试验的噬菌体滴度, 设置 3 个重复平行试验。

取对数生长期的肺炎克雷伯菌, 按最佳感染复数加入噬菌体后迅速置于摇床中 37 °C、170 r/min 振荡培养, 并开始计时。分别在 20、40、60、90、120 和 160 min 取样 100 μL , 梯度稀释后用双层平板法测定噬菌体滴度, 重复 3 次。绘制一步生长曲线, 得出噬菌体潜伏期、裂解期, 计算裂解量。

裂解量计算公式: 裂解量=裂解末期噬菌体效价/感染初期宿主菌浓度。

1.8 噬菌体全基因组测序

使用 TaKaRa MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver.5.0 提取噬菌体基因组, 测序采用 Illumina 测序平台。获取测序数据后, 噬菌体全基因组序列利用软件 Newbler 2.9 进行序列拼接, 全基因组使用 Prokka^[17]在线基因功能注释, 序列相似性比对分析使用 BLAST 在线工具(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)。使用 MEGA 6.0 构建遗传进化树。利用 CG View (http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/) 构建噬菌体全基因组图谱。将基因组注释序列提交到 NCBI, 获取序列号 MT380195.1。

2 结果与分析

2.1 肺炎克雷伯菌噬菌体的分离纯化

本试验以肺炎克雷伯菌 KP18 为宿主菌, 从四

川省奶牛场饮用水槽中分离筛选到一株裂解性噬菌体, 并命名为 vB_Kpn_B01。经过双层平板法多次纯化后, 噬菌体 vB_Kpn_B01 拥有直径在 1.5–2.0 mm 之间的透明噬菌斑, 具有清晰光滑的边界, 无晕环(图 1A)。

2.2 噬菌体形态特征

经透射电镜观察, vB_Kpn_B01 拥有一个正多面体的头部, 其直径约为 70 nm, 尾部长为 160 nm、宽为 20 nm (图 1B)。根据 ICTV 制定的新国际病毒分类方法^[18], vB_Kpn_B01 为有尾噬菌体目、长尾噬菌体科(Siphoviridae)。

2.3 噬菌体裂解谱

vB_Kpn_B01 无法裂解金黄色葡萄球菌、无乳链球菌及产酸克雷伯氏菌等细菌(表 1), 这表明 vB_Kpn_B01 具有很强的特异性。

2.4 氯仿敏感性、热稳定性和酸碱耐受度

试验结果表明, vB_Kpn_B01 经过氯仿处理后, 效价从最初的 4.76×10^9 PFU/mL 骤降至 9.60×10^4 PFU/mL, 表明噬菌体对氯仿具有较强的敏感性, 其具有囊膜。

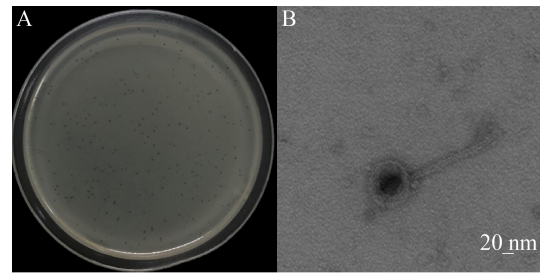


图 1 噬菌体 vB_Kpn_B01 的形态

Figure 1 Morphology of bacteriophage vB_Kpn_B01

注: A: 噬菌体噬菌斑; B: 噬菌体透射电镜图

Note: A: Plaques of the bacteriophage; B: Transmission electron micrograph of the bacteriophage

试验考察了噬菌体在不同温度下的耐受度, 结果表明, vB_Kpn_B01 能在温度范围较广的环境内存活, 但在 50 °C 以上的环境内噬菌体效价明显降低, 在 80 °C 静置 40 min 后噬菌体完全失活(图 2A)。

vB_Kpn_B01 在 pH 4.0–7.0 的环境下, 仍拥有稳定的裂解能力, 但在极端 pH 条件下 (<4.0 或 >9.0), 噬菌体的效价明显下降(图 2B), pH > 8.0 后噬菌体基本丧失裂解能力。

表 1 噬菌体 vB_Kpn_B01 的裂解谱

Table 1 Host range of bacteriophage vB_Kpn_B01

No.	Bacteria	Source	Phage vB_Kpn_B01
KP17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cattle	+
KP18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cattle	+
KP19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cattle	+
KPP1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Cattle	+
LKP1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Moschus berezovskii</i>	+
KO1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Cattle	-
SC1	<i>Shigella castellani</i>	Pig	-
SC2	<i>Shigella castellani</i>	Pig	-
SA1	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cattle	-
SA2	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cattle	-
SA3	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cattle	-
SA4	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cattle	-
SA5	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cattle	-
S1	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cattle	-
S2	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cattle	-
S3	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cattle	-
S4	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cattle	-
S5	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Cattle	-

注: +: 裂解; -: 不裂解

Note: +: Lysis; -: No lysis

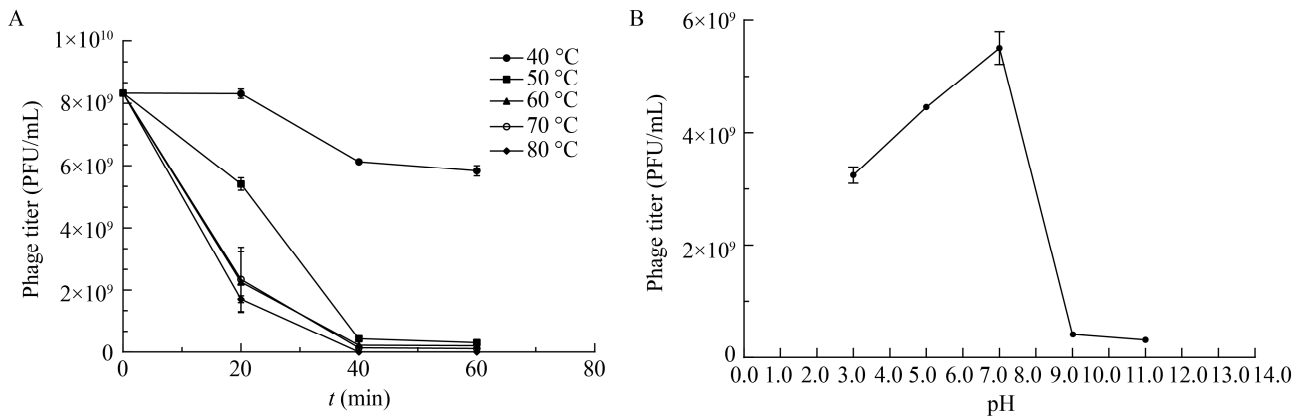


图2 噬菌体 vB_Kpn_B01 热稳定性(A)及酸碱耐受度(B)
Figure 2 Resistance of bacteriophage vB_Kpn_B01 to temperature (A) and pH (B)

2.5 噬菌体 MOI 及一步生长曲线

在 MOI 为 0.01 时,噬菌体获得最高效价(表 2),因此 0.01 为 vB_Kpn_B01 的最佳感染复数。

根据一步生长曲线(图 3),vB_Kpn_B01 的潜伏期为 40 min,裂解时间为 60–90 min,裂解量为 42.5 PFU/cell。

2.6 噬菌体全基因组测序

2.6.1 全基因组概述

全基因组测序显示, vB_Kpn_B01 的全基因组大小为 113 227 bp, GC 含量为 47.97%。BLASTn 比对结果显示, vB_Kpn_B01 全基因组与从北京医院污水中分离的肺炎克雷伯菌噬菌体(GenBank: NC_041899.1)最为相似,全序列有 97% 的全基因组覆盖率及 97.38% 的序列一致性。全基因组注释表明, vB_Kpn_B01 包含 149 个编码序列(Coding Sequence, CDS)和 25 个 tRNAs。

表 2 vB_Kpn_B01 的最佳感染复数(MOI)测定
Table 2 Determination of optimal multiplicity of infection (MOI) of vB_Kpn_B01

MOI	Bacteria (CFU)	Phage (PFU)	Phage titer (PFU/mL)
0.01	1×10^9	1×10^7	8.90×10^{11}
0.1	1×10^9	1×10^8	8.00×10^{10}
1	1×10^9	1×10^9	3.94×10^{10}
10	1×10^8	1×10^9	3.02×10^{10}
100	1×10^7	1×10^9	4.19×10^{10}

2.6.2 基因功能预测

使用 Prokka 对噬菌体基因组功能进行预测,将预测结果进行可视化处理(图 4),其中有 35 个 CDS 在正义链上,其他在反义链上。噬菌体的全基因组中有 34 个 CDS 已知其功能,115 个 CDS 为假想蛋白编码序列。其中已知功能的 CDS 又分为裂解相关基因(红色)、DNA 复制及表达相关基因(黄色)和结构蛋白基因(绿色)(图 4)。

裂解相关基因及其他基因:与噬菌体裂解宿主有关的基因分别为细菌内溶素和穿孔素蛋白,它们可以帮助噬菌体裂解细菌,并在细菌体内释放子代病毒。未在 vB_Kpn_B01 中发现耐药基因及毒力基因。

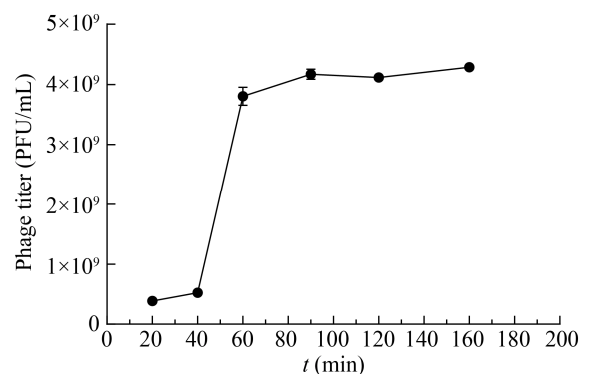


图3 噬菌体 vB_Kpn_B01 的一步生长曲线
Figure 3 One-step grown curve of bacteriophage vB_Kpn_B01

Length: 113 227 bp

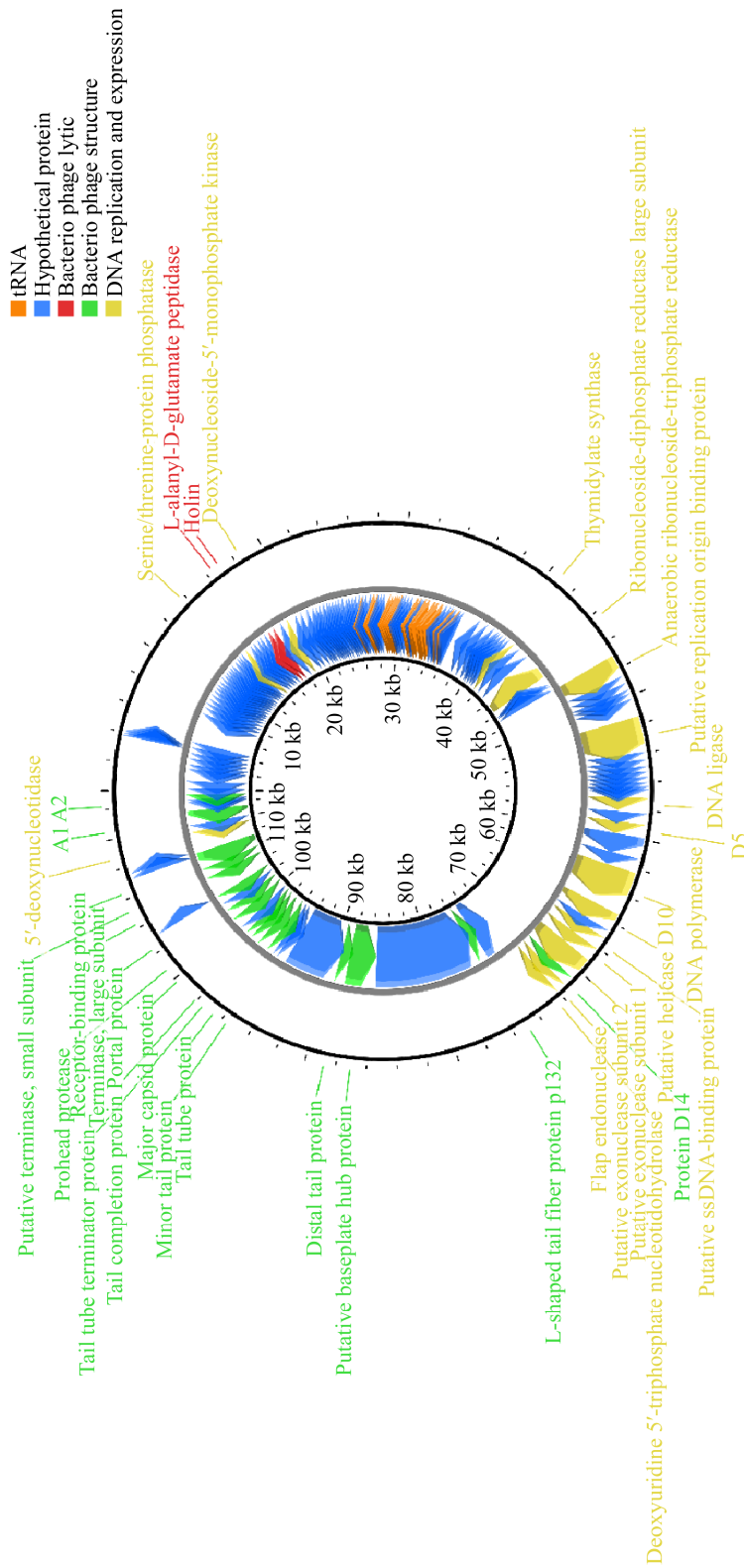


图 4 噬菌体 vB_Kpn_B01 全基因组

Figure 4 Complete genome of bacteriophage vB_Kpn_B01

注: 基因组箭头代表基因的方向, 颜色代表功能基因的不同区域; 橙色: tRNA; 黄色: DNA复制与表达基因; 绿色: 裂解相关基因; 红色: 裂解相关基因; 蓝色: 结构蛋白基因; 蓝色: 假想蛋白

Note: The arrow represents the direction of the gene, and the color represents different domains of functional genes: Red: Lyase related genes; Orange: tRNA; Yellow: DNA replication and expression genes; Green: Structural protein genes; Blue: Hypothetical protein genes

结构蛋白基因: 在 34 个 CDS 中, 有 16 个结构蛋白编码基因, 其中包含了头部、尾部及其他结构蛋白基因。编码结构蛋白的基因在基因组中位置较为紧密, 这可能有利于噬菌体感染宿主细菌后的生命周期的调控。

DNA 复制及表达相关基因: 相关基因包括 DNA 聚合酶和 DNA 聚合酶等 16 个 CDS, 这些基因参与核酸的代谢、修复、重组及表达, 其不同的转录方向及处在位置的不同可能与噬菌体感染细菌后在细胞内相关基因表达时间不同有关。

2.6.3 噬菌体 vB_Kpn_B01 系统发育分析

为进一步分析 vB_Kpn_B01 与其他长尾科噬菌体的亲缘关系, 我们使用保守且有进化意义的主要衣壳蛋白、末端酶大亚基及 DNA 聚合酶的氨基酸序列构建遗传进化树(图 5), 从图 5 中可看出, vB_Kpn_B01 与 IME260、KPN4 等噬菌体都位于 Sugarlandvirus, 与其他属的亲缘关系较远。所以, vB_Kpn_B01 属于有尾噬菌体目, 长尾噬菌体科(Siphoviridae), Sugarlandvirus。

3 讨论与结论

噬菌体具有高度的特异性, 能够杀死特定的宿主细菌, 并且不会造成体内的菌群失衡, 从而避免继发性感染。与抗生素治疗所产生的药物残留及耐药菌等问题相比, 噬菌体治疗的优势显得尤为突出^[19]。本研究发现噬菌体 vB_Kpn_B01 对温度变化具有较好的适应性, 对强酸和强碱环境的耐受度较低。由于应用环境和免疫系统的差异, 噬菌体作为治疗剂使用时, 其生命周期是必要考虑的因素之一^[20-22]。然而最佳感染复数的测定又将决定噬菌体“鸡尾酒”制剂的组成配比和噬菌体储备浓度的有效性^[22]。所以本研究通过最佳感染复数及一步生长曲线试验, 得到裂解量为 42.5 PFU/cell, 这表明这株噬菌体裂解力较强, 可以作为噬菌体生物制剂

的备选株。总之, 生物学特性的鉴定是噬菌体能够成为生物治疗剂的先决条件, 也是噬菌体能否运用于生产及实际应用中的理论基础。

基因组学是从分子水平了解噬菌体特性的有效方法之一。基因组的遗传多样性和相似性与噬菌体的裂解能力密切相关^[23]。从全基因注释得出噬菌体 vB_Kpn_B01 不仅有直接裂解宿主菌^[24]的相关蛋白(细菌内溶素及穿孔素蛋白), 而且还具有辅助裂解过程并抑制宿主菌繁殖的结构蛋白^[25-28](蛋白质 A1 及 A2 等)。这些蛋白的发现都有利于噬菌体裂解途径的探索性研究。此外, 噬菌体 vB_Kpn_B01 中还注释出大量 tRNAs。由于病毒的蛋白合成是高度依赖于宿主翻译机制进行的, 因此在噬菌体基因组序列中发现大量 tRNA 的情况是较少的^[29-31]。但 tRNA 的存在可减少病毒对宿主的依赖, 从而扩大宿主谱的范围, 提高噬菌体的生存适应能力^[32-33]。同时, 噬菌体 vB_Kpn_B01 基因组未发现任何已知的毒力和耐药基因, 这表明该噬菌体不参与耐药基因在菌株之间的转导^[34-35], 具有较高的生产安全性。

国外已有多项研究表明, 使用噬菌体治疗奶牛的亚临床症状是有效的^[36-38]。同时, 为了减少治疗过程中肺炎克雷伯菌的噬菌体耐药株的出现, 研究已经开始探索使用噬菌体“鸡尾酒疗法”或噬菌体与抗菌药物联合治疗, 并取得了一定的效果^[39-40]。但是在畜牧养殖业中, 大多数研究都集中于金黄色葡萄球菌所引起的乳腺炎上, 对于肺炎克雷伯菌所引起的细菌性疾病的研究较少, 所以新型裂解性肺炎克雷伯菌噬菌体的发现及相关特性研究显得尤为重要。基于本研究对噬菌体 vB_Kpn_B01 进行的相关特性试验分析, vB_Kpn_B01 具有成为安全抑菌剂的潜力, 拥有制备为特异性生物治疗剂的价值, 并在畜牧业细菌性疾病防控中有良好的发展前景。

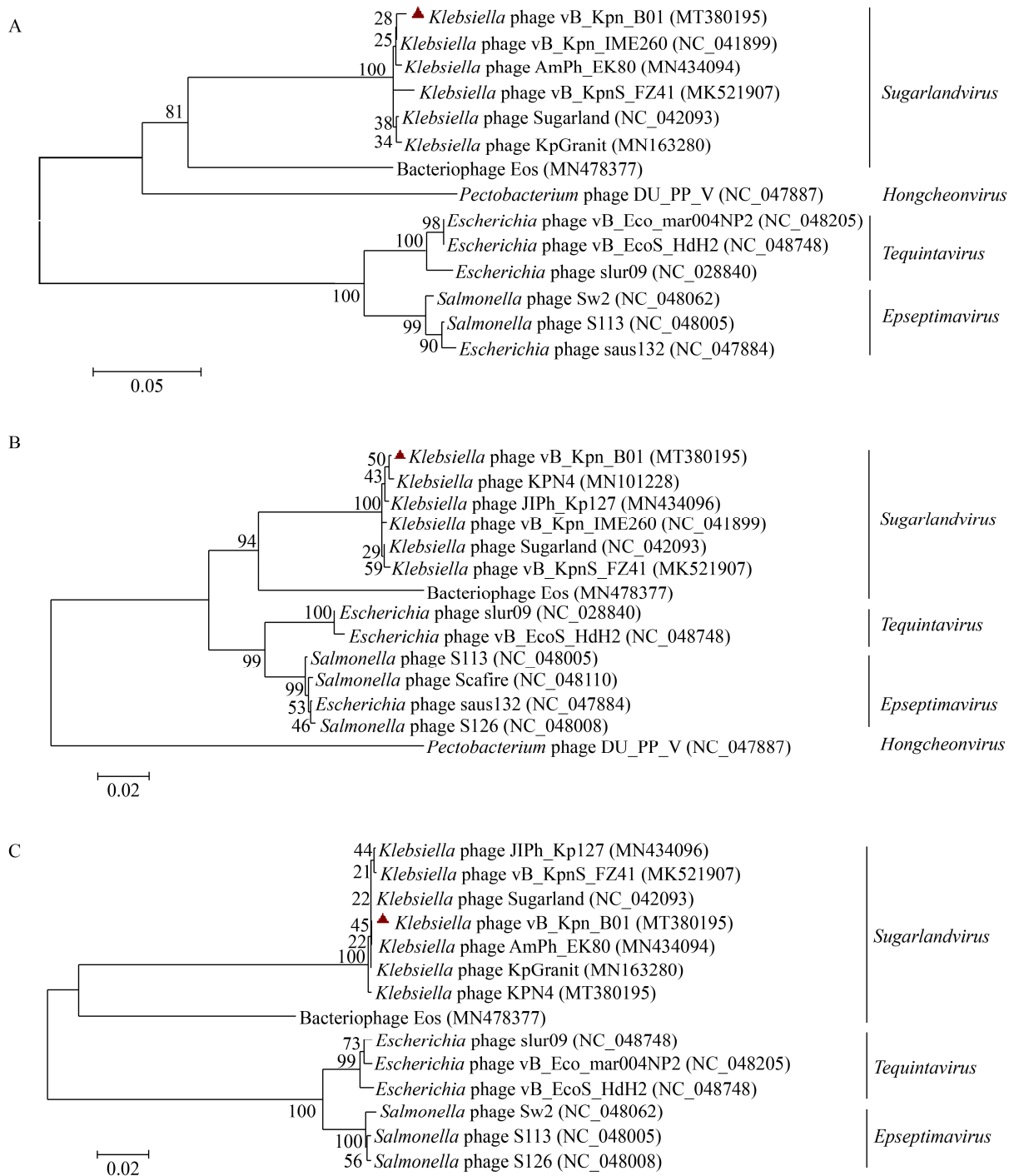


图 5 使用主要衣壳(A)、末端酶大亚基(B)及 DNA 聚合酶(C)构建的进化树

Figure 5 Phylogenetics trees were formed based on major capsid protein (A), terminase large subunit (B) and DNA polymerase (C) of the bacteriophage

注: 分支点上的数字代表可信度, 数值越接近 100, 可信度越强; 标尺: 代表遗传距离, 标尺越短代表亲缘关系越近; 三角形: 噬菌体 vB_Kpn_B01

Note: The number on the branch point represents the credibility, the closer the value is to 100, the stronger the credibility is; Scale: The genetic distance, the shorter the ruler is, the closer the relationship is; Triangle: Bacteriophage vB_Kpn_B01

REFERENCES

- [1] Yinnon AM, Butnaru A, Raveh D, Jerassy Z, Rudensky B. *Klebsiella* bacteraemia: community versus nosocomial infection[J]. QJM: an International Journal of Medicine, 1996, 89(12): 933-942
- [2] Vading M, Naucler P, Kalin M, Giske CG. Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality[J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195258
- [3] Tomas JM, Camprubi S, Williams P. Surface exposure of the O-antigen in *Klebsiella pneumoniae* O1:K1 serotype strains[J]. Microbial Pathogenesis, 1988, 5(2): 141-147
- [4] Xu H. Diagnosis and treatment of *Klebsiella pneumoniae* in beef cattle[J]. China Dairy Cattle, 2012(14): 42-43 (in Chinese)
许惠. 肉牛肺炎克雷伯氏菌病的诊治报告[J]. 中国奶牛, 2012(14): 42-43
- [5] Huang JB, Wu CL, Li J, Tao L. A case of bovine *Klebsiella pneumoniae* mixed with *E. coli*[J]. Guangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2017, 33(6): 307-308 (in Chinese)
黄敬斌, 吴翠兰, 李军, 陶立. 一例牛肺炎克雷伯氏菌和大肠杆菌混合感染的诊断报告[J]. 广西畜牧兽医, 2017, 33(6): 307-308
- [6] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(4): 1151-1161
- [7] Kola A, Piening B, Pape UF, Veltzke-Schlieker W, Kaase M, Geffers C, Wiedenmann B, Gastmeier P. An outbreak of carbapenem-resistant OXA-48: producing *Klebsiella pneumoniae* associated to duodenoscopy[J]. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 2015, 4(1): 1-4
- [8] Li JX, Gong YW. Analysis of multidrug-resistant strain hospital infections[J]. Laboratory Medicine, 2013, 28(9): 784-788 (in Chinese)
李继霞, 公衍文. 多重耐药菌医院感染状况分析[J]. 检验医学, 2013, 28(9): 784-788
- [9] Bakour S, Sahli F, Touati A, Rolain JM. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 isolated from cerebrospinal fluid of a child in Algeria[J]. New Microbes and New Infections, 2015, 3: 34-36
- [10] Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy[J]. Future Microbiology, 2013, 8(6): 769-783
- [11] Gu JM, Liu XH, Li Y, Han W, Lei LC, Yang YJ, Zhao HL, Gao Y, Song J, Lu R, et al. A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e31698
- [12] Verma V, Harjai K, Chhibber S. Restricting ciprofloxacin-induced resistant variant formation in biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 by complementary bacteriophage treatment[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009, 64(6): 1212-1218
- [13] Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, 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
- [14] Merabishvili M, Pirnay JP, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, Glonti T, Krylov V, Mast J, Van Parys L, et al. Quality-controlled small-scale production of a well-defined bacteriophage cocktail for use in human clinical trials[J]. PLoS One, 2009, 4(3): e4944
- [15] Wright A, Hawkins CH, Ånggård EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy[J]. Clinical Otolaryngology, 2009, 34(4): 349-357
- [16] Karumidze N, Kusradze I, Rigvava S, Goderdzishvili M, Rajakumar K, Alavidze Z. Isolation and characterisation of lytic bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*[J]. Current Microbiology, 2013, 66(3): 251-258
- [17] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. Bioinformatics: Oxford, England, 2014, 30(14): 2068-2069
- [18] Magnus L, Mason WS, Taylor J, Kann M, Glebe D, Dény P, Sureau C, Norder H, Consortium IR. ICTV virus taxonomy profile: *Hepadnaviridae*[J]. The Journal of General Virology, 2020, 101(6): 571-572
- [19] Skurnik M, Strauch E. Phage therapy: facts and fiction[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2006, 296(1): 5-14
- [20] Pettit RK, Weber CA, Kean MJ, Hoffmann H, Pettit GR, Tan R, Franks KS, Horton ML. Microplate Alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(7): 2612-2617
- [21] O'Flynn G, Ross RP, Fitzgerald GF, Coffey A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(6): 3417-3424
- [22] Taha OA, Connerton PL, Connerton IF, El-Shibiny A. Bacteriophage ZCKP1: a potential treatment for *Klebsiella pneumoniae* isolated from diabetic foot patients[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 2127
- [23] Hendrix RW. Bacteriophages: evolution of the majority[J]. Theoretical Population Biology, 2002, 61(4): 471-480
- [24] Wang IN, Smith DL, Young R. Holins: the protein clocks of bacteriophage infections[J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54: 799-825
- [25] Hofstetter H, Monstein HJ, Weissmann C. The readthrough protein A1 is essential for the formation of viable Q β particles[J]. Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Nucleic

- Acids and Protein Synthesis, 1974, 374(2): 238-251
- [26] Rumnieks J, Tars K. Crystal structure of the read-through domain from bacteriophage Q β A1 protein[J]. Protein Science, 2011, 20(10): 1707-1712
- [27] Reed CA, Langlais C, Kuznetsov V, Young R. Inhibitory mechanism of the Q β lysis protein A2[J]. Molecular Microbiology, 2012, 86(4): 836-844
- [28] Bernhardt TG, Wang IN, Struck DK, Young R. A protein antibiotic in the phage Qbeta virion: diversity in lysis targets[J]. Science, 2001, 292(5525): 2326-2329
- [29] Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2004, 28(2): 127-181
- [30] Bailly-Bechet M, Vergassola M, Rocha E. Causes for the intriguing presence of tRNAs in phages[J]. Genome Research, 2007, 17(10): 1486-1495
- [31] Delesalle VA, Tanke NT, Vill AC, Krukonis GP. Testing hypotheses for the presence of tRNA genes in mycobacteriophage genomes[J]. Bacteriophage, 2016, 6(3): e1219441
- [32] Mavrich TN, Hatfull GF. Bacteriophage evolution differs by host, lifestyle and genome[J]. Nature Microbiology, 2017, 2: 17112
- [33] Morgado S, Vicente A. Global *in-silico* scenario of tRNA genes and their organization in virus genomes[J]. Viruses, 2019, 11(2): 180
- [34] Hsu BB, Gibson TE, Yeliseyev V, Liu Q, Lyon L, Bry L, Silver PA, Gerber GK. Dynamic modulation of the gut microbiota and metabolome by bacteriophages in a mouse model[J]. Cell Host & Microbe, 2019, 25(6): 803-814.e5
- [35] Chadha P, Katare OP, Chhibber S. *In vivo* efficacy of single phage versus phage cocktail in resolving burn wound infection in BALB/c mice[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 99: 68-77
- [36] Gill JJ, Pacan JC, Carson ME, Leslie KE, Griffiths MW, Sabour PM. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis in lactating dairy cattle[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(9): 2912-2918
- [37] Titze I, Lehnher T, Lehnher H, Krömker V. Efficacy of bacteriophages against *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis[J]. Pharmaceuticals, 2020, 13(3): 35
- [38] Schmelcher M, Powell AM, Camp MJ, Pohl CS, Donovan DM. Synergistic streptococcal phage λ SA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(20): 8475-8486
- [39] Hyman P. Phages for phage therapy: isolation, characterization, and host range breadth[J]. Pharmaceuticals, 2019, 12(1): 35
- [40] Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG Jr. Bacteriophage therapy[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(3): 649-659