



专论与综述

噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的研究进展

高雅 王兆飞 严亚贤*

上海交通大学农业与生物学院 上海市兽医生物技术重点实验室 上海 200240

摘要: 肺炎克雷伯菌是肠杆菌科家族中的一员, 在各种环境中广泛存在, 可导致诸如奶牛乳房炎在内的多种动物疫病, 引起人类的肺炎、尿路感染、菌血症、伤口性感染和化脓性脓肿在内的多种临床感染。该菌对抗生素的耐受日趋严重, 而且高毒力菌株不断出现, 给该菌的防控带来了巨大挑战。噬菌体是一种裂解细菌的病毒, 因其具有治疗耐药细菌感染的潜力而备受关注, 世界各地均有使用噬菌体成功治疗耐药细菌感染的案例。本文基于国内外对肺炎克雷伯菌及其噬菌体的研究数据, 综述了肺炎克雷伯菌的流行病学调查情况和噬菌体在治疗肺炎克雷伯菌感染方面的应用, 以期为基于肺炎克雷伯菌噬菌体的抗菌研究和临床应用提供参考。

关键词: 肺炎克雷伯菌, 噬菌体, 抗生素耐药性, 噬菌体疗法

Advances in the treatment of *Klebsiella pneumoniae* infection with bacteriophage therapy

GAO Ya WANG Zhaofer YAN Yaxian*

Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: *Klebsiella pneumoniae* is a member of the *Enterobacteriaceae* family and exists widely in a variety of environments. It can cause human and various animal diseases including mastitis, pneumonia, urinary tract infection, wound infection and lead to bacteremia and suppurative abscess, et al. Nowadays, the bacterial tolerance to antibiotics is becoming more and more serious, and the emergence of highly virulent strains has brought considerable challenges to the prevention and control of the bacteria. Bacteriophages are a group of viruses that can infect and kill host bacteria, have attracted much attention because of their potential to treat drug-resistant bacterial infections. Cases of successfully using bacteriophages to treat drug-resistant bacterial infections have been reported all over the world. Based on the research data of *K. pneumoniae* and its bacteriophage at home and abroad, this paper summarizes the epidemiological investigation of *K. pneumoniae* and the application of bacteriophage in the treatment of this bacterial infection, in order to provide references for authors in the antibacterial research and clinical application based on bacteriophage of *K. pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, bacteriophage, antibiotic resistance, bacteriophage therapy

Foundation items: Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program (T20180205); National Key Research and Development Program of China (2019YFA0904000)

*Corresponding author: E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn

Received: 31-05-2021; Accepted: 19-08-2021; Published online: 27-08-2021

基金项目: 上海市科技兴农推广项目(沪农科推字[2018]第 2-5 号); 国家重点研发计划(2019YFA0904000)

*通信作者: E-mail: yanyaxian@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2021-05-31; 接受日期: 2021-08-19; 网络首发日期: 2021-08-27

近些年来,肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)的耐药问题逐渐突出,多重耐药菌株及高毒力菌株不断出现,寻找合适的解决方法是目前抗感染治疗的重点及趋势。噬菌体是能特异性感染细菌等微生物的病毒,可用于治疗细菌感染,特别是在治疗耐药细菌的感染方面极具潜力。早在 20 世纪初期,噬菌体制剂就被应用于临床治疗。目前,噬菌体制剂在包括格鲁吉亚、波兰和俄罗斯在内的许多国家的商业化使用已被批准。经过多年探索,噬菌体在防控金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、大肠杆菌等较为常见致病菌中的应用已日渐成熟,但肺炎克雷伯菌作为近些年才逐步被研究人员所重视的条件致病菌之一,关于其噬菌体治疗相关的报道较少。本文基于国内外对肺炎克雷伯菌及其噬菌体的研究数据,综述了肺炎克雷伯菌的感染现状,简述了噬菌体疗法的研究进展,主要分析了噬菌体在治疗肺炎克雷伯菌感染方面的应用,并提出了未来对基于肺炎克雷伯菌噬菌体的抗菌研究和应用的展望。

1 肺炎克雷伯菌研究概况

肺炎克雷伯菌是一种常见的革兰氏阴性致病菌,在环境中广泛存在。作为一种人兽共患病病原,肺炎克雷伯菌已成为除大肠杆菌外最常见的条件致病菌。肺炎克雷伯菌通过受污染的食物或水传播,并与社区获得性感染、医院获得性感染有关。该菌由于携带抗菌药物抗性编码基因的各种质粒,可产生多重耐药表型,对人类和动物健康、生态环境都是一个挑战^[1]。在动物安全方面,可引起诸如奶牛乳房炎、肺炎、菌血症在内的多种动物疫病^[2];在食品安全方面,从生鲜蔬菜、鸡肉、猪肝、生鲜牛奶等食品中均有分离出多重耐药肺炎克雷伯菌菌株的报道,尽管存在于食品链中的肺炎克雷伯菌可能不会对食品本身造成危害,但可能会增加食物链上的耐药基因库^[3];在临床安全方面,肺炎克雷伯菌引发的院内感染较为严重,受到了广泛关注。从“低致病性条件致病菌”到“高发病率主要病原菌”的转变,使得肺炎克雷伯

菌逐渐引起科研人员的重视,目前的研究大多集中在肺炎克雷伯菌的毒力和耐药性等方面。

1.1 经典肺炎克雷伯菌与高毒力肺炎克雷伯菌

肺炎克雷伯菌是目前临床上最为常见的条件致病菌之一,经典型肺炎克雷伯菌(“Classic” *K. pneumoniae*, cKP)通常可引起医院获得性感染,在免疫力低下的患者中致病。在不断进化的过程中,亚洲最初出现了具有高黏性表型的高毒力肺炎克雷伯菌(“Hypervirulent” *K. pneumoniae*, hvKP)^[4],而后世界各地都零星出现严重感染病例。相较于 cKP,高毒力肺炎克雷伯菌往往更具致病性,而且常伴随严重的后遗症。这些菌株的出现对公众健康造成了巨大的威胁,因此,尽早地分离鉴定出 hvKP 菌株,评估其与临床和流行病学数据的相关性,对临床预防和治疗具有重大意义。最初研究者以菌落呈现高黏液性作为筛选 hvKP 的标志,但是后来的研究证实并非所有的 hvKP 都表现出该特性,一些 cKP 也可以表现出高黏液黏度表型^[5-6]。荚膜多糖(Capsular Polysaccharide, CPS)被认为是肺炎克雷伯菌最重要的毒力因子之一,根据 CPS 抗原的不同,可将肺炎克雷伯菌分为 82 个血清型,其中 K1、K2、K5、K20、K54、K57 型荚膜血清型与 hvKP 密切相关,是最常见、毒力最强的型别^[7]。随着对肺炎克雷伯菌毒力基因研究的逐步深入,研究人员逐渐结合关键毒力基因型来定义 hvKP 菌株,*iroB*、*iucA*、*peg-344*、*rmpA* 和 *rmpA2* 是目前用于定义 hvKP 较为准确的分子标记^[6]。

1.2 肺炎克雷伯菌的耐药性

除高毒力菌株的出现为临床带来了巨大挑战外,耐药性菌株的产生更是困扰临床治疗的另一难题。早期研究人员认为高毒力与耐药性不会叠加出现^[8],但近年来关于高耐药 hvKP 分离株的报道越来越多。车皓月等^[9]对我国某三甲医院多个科室 2019 年上半年分离出的 672 株肺炎克雷伯菌分布情况及细菌耐药特征进行分析发现,菌株呈现出不同程度的耐药性,在某些科室,出现高耐药情况的

菌株对常用抗菌药物的耐药率均大于 40%。法国、印度和俄罗斯也报道了相关的感染病例^[10-11]。肺炎克雷伯菌耐药问题日渐突出,使得对肺炎克雷伯菌感染的防控困难重重。

目前关于肺炎克雷伯菌的耐药机制尚未完全研究透彻,但关于常见抗生素耐药机制的研究已有进展,目前已知的大致可分为如下几种:肺炎克雷伯菌因其自身产生的 β -内酰胺水解酶对 β -内酰胺抗生素产生耐受现象^[12];对于氨基糖苷类抗生素,其耐药性主要是通过产生氨基糖苷类修饰酶,如 N-乙酰转移酶、O-核苷酸转移酶和 O-磷酸转移酶实现,这些酶通过共价修饰药物上的特定氨基或羟基来灭活氨基糖苷类药物,肺炎克雷伯菌中最常见的修饰酶为 aac(3)-II 和 aac(6')-Ib^[13-14];革兰氏阴

性细菌对喹诺酮类药物的耐药性主要由喹诺酮类药物耐药性的点突变介导,这些点突变决定了回转酶和拓扑异构酶 IV 基因的区域,从而导致靶向修饰^[15];肺炎克雷伯菌对多黏菌素类抗生素的耐药性主要是通过通过在脂多糖的类脂 A 中引入了带正电荷的 4-氨基-4-脱氧-L-阿拉伯糖和/或磷酸乙醇胺来实现^[16];对于更多抗生素耐药机制的研究仍在进一步进行中。

在本课题组的研究中,用商品化标准规格的抗生素药敏试验(纸片扩散法)对实验室现有的多株肺炎克雷伯菌菌株进行多种抗生素耐药性的测定后,如表 1 所示,发现所有菌株均呈现不同程度的耐药现象,而且部分菌株对实验中全部抗生素均出现耐药性。

表 1 肺炎克雷伯菌株的耐药性判定(药敏试验纸片扩散法)
Table 1 Determination of drug resistance of the *K. pneumoniae* (antimicrobial sensitivity testing by disk diffusion method)

No. of strain	Source	Antibiotic susceptibility						
		MEM	AMP	GN	AK	TZP	CIP	FEP
KP-hos-1	Hospital	S	R	I	S	R	S	S
KP-hos-2		I	R	R	R	R	R	R
KP-hos-3		R	R	R	R	R	R	R
KP-hos-4		S	R	S	S	I	I	S
KP-hos-5		S	R	R	R	R	R	R
KP-hos-6		S	R	R	S	R	S	S
KP-hos-7		R	R	R	R	R	R	R
KP-hos-8		S	R	S	S	R	R	R
KP-hos-9		S	R	S	S	I	S	I
KP-hos-10		S	R	S	S	R	I	S
GM-KP-1	Dairy farms	S	R	I	S	R	S	S
GM-KP-2		S	R	S	S	S	S	S
GM-KP-3		S	R	R	S	I	S	S
GM-KP-4		S	R	S	S	R	S	R
GM-KP-5		S	R	S	S	I	R	R
GM-KP-6		S	R	S	S	I	I	R
KP-1	Lab preservation	S	R	S	S	I	S	S
KP-2		S	R	S	S	I	R	S
KP-3		S	R	S	S	S	S	S
KP-4		S	R	S	S	S	S	S

注: R: 耐药; I: 中度敏感; S: 敏感。药敏实验判定标准详见各抗生素药敏纸片说明书
Note: R: Resistance; I: Intermediate; S: Sensitivity. The criteria for determining drug sensitivity experiments can be found in the instruction manual of each antibiotic drug sensitivity paper

2 噬菌体疗法

2.1 噬菌体疗法的研究进展

噬菌体是一种在自然界中广泛存在并且能够感染细菌等微生物的病毒,是地球上最丰富的实体,其数量可达 10^{31} 之多^[17]。抗生素的大量不当使用,致使细菌耐药问题日益严重,而在探寻预防和控制细菌的替代疗法时,曾经由于抗生素的普及而日渐淡出的噬菌体疗法再次回到人们的视野。几十年来,在格鲁吉亚共和国等国家,噬菌体疗法一直被应用于治疗细菌感染,并且专门建立了噬菌体研发中心,旨在开发噬菌体治疗^[18]。

在本课题组前期的研究中,试图通过噬菌体疗法,包括噬菌体鸡尾酒疗法、噬菌体裂解酶疗法、噬菌体-抗生素联用等策略治疗畜牧业中的常见动物疫病,并且已经取得了一定的成果。近几年我们的研究主要聚焦在奶牛乳房炎的治疗上,我们使用由 3 种大肠杆菌噬菌体[vB_EcoM_SYGD1 (简称 SYGD1)、vB_EcoP_SYGE1 (简称 SYGE1) 和 vB_EcoM_SYGMH1 (简称 SYGMH1)]制成的混合鸡尾酒制剂成功治愈了因大肠杆菌感染而引起的奶牛乳房炎^[19]。我们从牛奶样品中分离出 5 株多重耐药铜绿假单胞菌,并从奶牛场污水中针对性地分离出一株铜绿假单胞菌噬菌体 vB_PaeS_PAJD-1 (简称 PAJD-1),该噬菌体的细胞壁水解酶对多重耐药铜绿假单胞菌蛋白表现出很强的溶菌能力和广泛的抗菌谱,表明噬菌体 PAJD-1 可作为治疗多重耐药铜绿假单胞菌感染的候选药物^[20]。

2.2 噬菌体疗法的优势与局限性

噬菌体疗法是使用烈性噬菌体治疗细菌感染的疗法。与其他抗菌疗法相比,噬菌体疗法有以下几个方面的优势:(1) 噬菌体对菌株具有高度特异性;(2) 噬菌体是细菌在自然界的天敌;(3) 噬菌体容易从环境中分离;(4) 噬菌体能够清除特定病原菌而不影响机体内的共生菌群;(5) 由于对真核细胞没有亲和力,噬菌体不能感染真核细胞等。与

此同时,由于单一噬菌体本身可能具有抗菌谱窄及可引起机体免疫应答等不足,科学家也采用噬菌体与抗生素联用、噬菌体鸡尾酒疗法、噬菌体裂解酶与抗菌制剂联用等策略提高噬菌体的疗效^[21]。

3 肺炎克雷伯菌噬菌体

目前已有文献对 2019 年及之前世界各地已报道的 109 株肺炎克雷伯菌噬菌体的基因组信息进行了整理,这些噬菌体主要从污水及临床患者中分离,基因组大小从 19 260–346 602 bp 不等,肌尾噬菌体科(Myoviridae)、短尾噬菌体科(Podoviridae)、长尾噬菌体科(Siphoviridae)所占比重较大^[22]。截至目前,NCBI 数据库中又陆续公布了许多新分离到的肺炎克雷伯菌噬菌体的基因组信息。我们对 2020–2021 年报道的含有较为详细信息的 99 株噬菌体基因组信息进行整理,结果如表 2 所示。

关于已测序噬菌体基因组的详细信息,诸多文献中也有相关报道。Sofy 等^[23]从埃及食品样品中分离出一株新型噬菌体 KPP-5,能够裂解不同来源的多重耐药肺炎克雷伯菌,对其生物学特性及基因组信息分析后发现该噬菌体潜伏期较短,为 25 min;其在不同温度和 pH 水平下表现出较高的稳定性;具有线性的 dsDNA 基因组,长度为 38 245 bp,GC 含量为 50.8%,预测的开放阅读框为 40 个,而且未发现噬菌体毒力基因或耐药基因,显示了该噬菌体可作为生物防制剂的潜力。Pertics 等^[24]分离并鉴定了一株针对医院 K2 荚膜血清型肺炎克雷伯菌的噬菌体 B1,其在多个温度环境下仍能保持较高的稳定性,研究者们对其解聚酶蛋白进行了表达纯化,肯定了噬菌体 B1 及其解聚酶作为候选抗菌药物的发展前景。Zhang 等^[25]鉴定了一株肺炎克雷伯菌的裂解性噬菌体,将其命名为 vB_KpnP_Bp5,该噬菌体潜伏期为 5 min,暴发期为 40 min,最适 pH 值为 4.0–10.0,可耐受 50 °C 高温,系统发育分析显示基因排列和基因含量具有较高的保守性,在肺炎克雷伯菌感染小鼠模型中,噬菌体能显著减轻肺炎克雷伯菌对肺组织的损伤。根据崔泽林等^[26]

表 2 2020–2021 年已报道的肺炎克雷伯菌噬菌体的基因组信息

Table 2 Genomic information of *Klebsiella pneumoniae* phage reported from 2020 to 2021

No.	Phage	Family	GenBank accession No.	Genome size (bp)
1	Muenster	Myoviridae	MT708547	346 937
2	vB_KvM-Eowyn	Myoviridae	LR881104	265 389
3	Miami	Myoviridae	MT701590	253 383
4	vB_KpnM_M1	Myoviridae	MW448170	176 329
5	vB_KoM-MeTiny	Myoviridae	LR883651	175 419
6	vB_KpnM_VAC13	Myoviridae	MZ322895	174 826
7	vB_KpnM_05F	Myoviridae	LR746310	174 231
8	P-KP2	Myoviridae	MT157285	172 138
9	Metamorpho	Myoviridae	MT701588	171 475
10	AShe-2020a	Myoviridae	CP062992	168 979
11	vB_KpnM_BovinicUrsus	Myoviridae	MW021752	166 829
12	vB_KpnM_311F	Myoviridae	LR877331	166 710
13	vB_KpnM_17-11	Myoviridae	MW239157	165 894
14	KPP-1	Myoviridae	MT438396	143 369
15	vB_KpnM_Seu621	Myoviridae	MT939253	142 896
16	vB_KpM_FBKp34	Myoviridae	MW394390	141 376
17	BUCT_49532	Myoviridae	MZ374361	49 532
18	vB_KpnP_cmc20193	Myoviridae	MT559528	48 861
19	MEW1	Myoviridae	MT894004	47 129
20	vB_KpnP_P184	Podoviridae	MW495044	76 617
21	vB_KpP_FBKp27	Podoviridae	MW394388	76 339
22	SJM3	Podoviridae	MT251348	62 420
23	LASTA	Podoviridae	MT251347	62 420
24	BUCT610	Siphoviridae	MZ318367	46 774
25	vB_KleS-HSE3	Siphoviridae	MT075871	46 747
26	KP_LB_001	Siphoviridae	MW119258	46 218
27	P528	Drexlerviridae	MW021764	51 895
28	Solomon	Drexlerviridae	MT701592	51 775
29	066039	Drexlerviridae	MW042802	51 633
30	vB_KpnS_ZX2	Drexlerviridae	MW722081	51 632
31	MMBB	Drexlerviridae	MT894005	50 346
32	LF20	Drexlerviridae	MW417503	50 107
33	B1	Drexlerviridae	MW672037	50 040
34	ABTNL-2	Drexlerviridae	MZ221764	49 159
35	vB_KpnS_2811	Drexlerviridae	LR757892	49 131
36	Kp_Pokalde_002	Studiervirinae	MT425185	41 816
37	TUN1	Studiervirinae	HG994092	41 181
38	KP32_isolate 194	Studiervirinae	MH172262	41 161
39	066015	Studiervirinae	MW042788	40 967
40	066013	Studiervirinae	MW042787	40 967
41	P509	Studiervirinae	MT542697	40 954
42	066056	Studiervirinae	MW042808	40 952
43	066024	Studiervirinae	MW042792	40 770
44	KP32_isolate 192	Studiervirinae	MH172261	40 635
45	066041	Studiervirinae	MW042803	40 613
46	066019	Studiervirinae	MW042789	40 606
47	066032	Studiervirinae	MW042798	40 605
48	066028	Studiervirinae	MW042796	40 605
49	P560	Studiervirinae	MT966873	40 562

(待续)

(续表 2)

50	KP32_isolate 195	Studiervirinae	MH172263	40 540
51	066027	Studiervirinae	MW042795	40 526
52	066059	Studiervirinae	MW042810	40 523
53	066058	Studiervirinae	MW042809	40 522
54	066023	Studiervirinae	MW042791	40 516
55	NL_ZS_1	Studiervirinae	MT813140	40 428
56	KP32_isolate 196	Studiervirinae	MH172264	40 337
57	066134	Studiervirinae	MW042812	40 243
58	066121	Studiervirinae	MW042811	40 243
59	066038	Studiervirinae	MW042801	40 243
60	066036	Studiervirinae	MW042799	40 243
61	066031	Studiervirinae	MW042797	40 243
62	066026	Studiervirinae	MW042794	40 243
63	066025	Studiervirinae	MW042793	40 243
64	066022	Studiervirinae	MW042790	40 243
65	NL_ZS_2	Studiervirinae	MT813141	40 222
66	066053	Studiervirinae	MW042807	40 185
67	066037	Studiervirinae	MW042800	40 174
68	066046	Studiervirinae	MW042806	39 887
69	066045	Studiervirinae	MW042805	39 865
70	066042	Studiervirinae	MW042804	39 833
71	P510	Studiervirinae	MT966872	39 383
72	Kpn-11mx	Studiervirinae	MW296877	38 774
73	NL_ZS_3	Studiervirinae	MT813142	38 741
74	66044	Studiervirinae	MZ359670	38 704
75	KPP-5	Studiervirinae	MW600722	38 245
76	SRD2021	Slopekvirinae	MZ208805	45 212
77	CX1	Slopekvirinae	MT090077	45 013
78	VLC5	Slopekvirinae	MT197175	44 932
79	vB_KpnP_Dlv622	Slopekvirinae	MT939252	44 687
80	Kp_Pokalde_001	Slopekvirinae	MW590329	44 535
81	Pone	Slopekvirinae	MT701589	44 346
82	vB_KpnP_cmc20192	Slopekvirinae	MT559527	44 314
83	VLC6	Slopekvirinae	MT197176	44 294
84	vB_KpnP_cmc20191	Slopekvirinae	MT559526	44 066
85	vB_Kpn_B01	Demereviridae	MT380195	113 227
86	Shaphc-TDM-1124-4	Demereviridae	MW713578	112 841
87	Paty	Beijerinckvirinae	MW366784	41 264
88	vB_KpP_FBKp16	Molineuxvirinae	MW394389	44 010
89	vB_KpM_FBKp24	Unknown	MW394391	307 210
90	KpnM6E1	Unknown	MT580897	167 920
91	vB_Kpn_1825-KPC53	Unknown	CP058330	119 621
92	vB_Kpn_3	Unknown	MZ079855	112 003
93	vB_KpnP_ZX1	Unknown	MW722080	60 982
94	Geezett	Unknown	MZ504995	50 707
95	RAD2	Unknown	MW655991	49 276
96	BUCT_47333	Unknown	MZ398021	47 333
97	vB_Kpns_ZX4	Unknown	MW722082	45 424
98	vB_KpnP_ZX5	Unknown	MW722083	39 565
99	vB_KpnP_ZX8	Unknown	MZ424865	39 398

注：表中基因组大小以同一科目中由大到小的顺序排列

Note: The genome size in the table is arranged in the order from large to small in the same subject

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

对 NCBI 数据库中登录的 22 株肺炎克雷伯菌噬菌体进行的全基因组分析,肺炎克雷伯菌噬菌体基因组大小不等、跨度较大,目前已注释的开放阅读框表达的相关功能蛋白主要有参与噬菌体组装、裂解、调控、DNA 操作、转座、结构组成和一些其他的功能蛋白。

4 噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的临床前研究

在噬菌体特性等研究的基础上,已发现在相关动物感染模型中噬菌体可以用于防控肺炎克雷伯菌引起的感染,并且取得了系列进展。Kumari 等^[27]研究发现,在小鼠烧伤感染模型中,应用噬菌体制剂治疗比抗生素或化学物质治疗的效果更显著。Chadha 等^[28]在小鼠烧伤感染模型中比较了单种噬菌体与由 5 种噬菌体组成的噬菌体鸡尾酒的疗效,发现噬菌体鸡尾酒显示了更好的效果。Cao 等^[29]研究表明,在肺部感染后的 2 h 内,注射噬菌体(10^9 PFU/小鼠)可明显降低肺部细菌载量,降低细胞炎症因子水平,小鼠存活率从对照组的 30%有效提升至 80%。Singla 等^[30]发现以脂质体材料包被的噬菌体可以在肺部感染发生的 3 d 前或疾病发生的 1 d 前对疾病进行有效预防,而非脂质体包被的噬菌体作用有效时间明显缩短。

5 噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的临床研究

5.1 噬菌体治疗细菌感染的临床研究现状

在动物实验中,为了证明噬菌体的有效性,通常会用致命剂量的细菌注射动物,而且噬菌体治疗通常在细菌感染后迅速实施,而临床的实际情况却往往更为复杂。近些年来,随着噬菌体治疗的兴起,相关药代动力学、药效学的研究逐渐增多,噬菌体作为一种特殊的“药物”,具有独特的药代动力学和生物利用度特征。不同的给药途径、噬菌体本身的多样性以及患者(或动物模型)自身的生理差异使噬菌体治疗在临床应用时展示出较大的个体差异,

也造成了治疗效果的巨大差异,但目前相关的研究报道较少^[31]。

5.2 噬菌体成功治疗肺炎克雷伯菌感染的临床应用实例

国外噬菌体治疗的临床案例主要集中在格鲁吉亚 Eliava 研究所噬菌体治疗中心、波兰科学院免疫与实验性治疗研究所等老牌机构^[32]。Nir-Paz 等^[33]报道了一名由耐药鲍曼杆菌和肺炎克雷伯菌引起的左胫骨感染患者在接受了噬菌体治疗后,可以观察到阳性菌落总数的减少和组织的愈合,成功避免了患者被截肢。Taha 等^[34]报道了一株从埃及吉萨淡水中分离出来的噬菌体 ZCKP1,其对从糖尿病患者足部分离出来的肺炎克雷伯菌 KP/01 具有杀菌活性,展现了噬菌体对糖尿病所引起的并发症(糖尿病足)具有潜在的治疗价值。在中国,成立于 2017 年的上海噬菌体与耐药研究所于 2018 年初启动了国内首个伦理审批的噬菌体治疗临床试验。石鑫^[35]使用肺炎克雷伯菌噬菌体鸡尾酒制剂(JD902、JD905、JD908 和 JD910-2),在经过 4 个阶段的治疗后,成功治疗了一名由泛耐药性肺炎克雷伯菌引起的泌尿系统感染患者。曾毅刚等^[36]使用噬菌体混合液,同时联合应用美罗培南、阿米卡星,以膀胱灌注的方式进行 2 次治疗,成功治愈了上海噬菌体与耐药研究收治的一例泌尿道复杂性泛耐药肺炎克雷伯菌感染患者。

6 噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的挑战与展望

作为抗生素治疗的有效补充手段,噬菌体用于临床抗感染治疗在越来越多的国家和地区受到重视,因此亟须系统深入的基础研究以推动噬菌体临床应用的规范化及安全性。除了噬菌体治疗目前存在的通用问题如携带毒力基因、诱导机体产生免疫反应、抗菌谱窄等,关于噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的现有挑战还包括:(1) 比起金黄色葡萄球菌噬菌体等,国内外关于肺炎克雷伯菌噬菌体基因组

的研究还停留在早期阶段,数据量较少,没有建立较为系统的肺炎克雷伯菌噬菌体库,许多未知功能蛋白的存在也成为噬菌体使用的潜在威胁。(2) 对于肺炎克雷伯菌噬菌体的安全性评价,不论是环境安全性还是机体安全性目前仍无统一的标准。(3) 截至目前报道的关于肺炎克雷伯菌噬菌体治疗的可参考临床案例较少,临床治疗中使用的噬菌体的具体滴度无可靠资料以供参考,只能根据临床的使用效果进行经验性施用。(4) 在临床治疗中,噬菌体通常直接从自然界中分离,在进行临床试验之前,仅对其裂解能力进行评估,但在有限的治疗时间内无法对噬菌体的其他性能如分子水平的安全性做进一步评估。(5) 在临床治疗中,通常是噬菌体与抗生素联用治愈患者,二者相辅相成,较难区分单一组分的具体疗效。在仅使用噬菌体制剂的过程中也有出现病情反复情况的报道。(6) 在本课题组的研究中,我们发现肺炎克雷伯菌会产生抗噬菌体的突变株,也为后续研究和应用带来了极大挑战。当然,这些挑战也将成为未来应用噬菌体治疗肺炎克雷伯菌感染的主要研究方向。

基于以上挑战,我们提出如下解决方向:(1) 丰富肺炎克雷伯菌噬菌体库,增加可供选择的噬菌体数目。(2) 积极探索肺炎克雷伯菌噬菌体的相关功能蛋白,如裂解酶、解聚酶等。(3) 基于生物信息学分析从基因水平上提高噬菌体使用的安全性。(4) 推动噬菌体产业化进程,明确产品安全标准,协同有关部门建立标准的生产和制造相关法规。(5) 积极探索噬菌体与抗生素、功能肽、酶类等联用的杀菌效果。(6) 噬菌体各研究单位间应积极进行优势资源整合,加强校企合作产学研融合,共同推动噬菌体产业在我国的发展。

尽管噬菌体疗法的广泛使用是一个具有挑战性的过程,但将带来远超出其本身的社会、商业和经济效益。随着噬菌体制剂的完善和标准化,以及动物和临床试验数据的不断积累,我们相信噬菌体将成为未来抗击超级细菌的新型重要武器。

REFERENCES

- [1] Hu YJ, Anes J, Devineau S, Fanning S. *Klebsiella pneumoniae*: prevalence, reservoirs, antimicrobial resistance, pathogenicity, and infection: a hitherto unrecognized zoonotic bacterium[J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2021, 18(2): 63-84
- [2] Machado VS, Bicalho RC. Prepartum application of internal teat sealant or intramammary amoxicillin on dairy heifers: effect on udder health, survival, and performance[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(2): 1388-1402
- [3] Hartantyo SHP, Chau ML, Koh TH, Yap M, Yi T, Cao DYH, Gutiérrez RA, Ng LC. Foodborne *Klebsiella pneumoniae*: virulence potential, antibiotic resistance, and risks to food safety[J]. Journal of Food Protection, 2020, 83(7): 1096-1103
- [4] Prokesh BC, TeKippe M, Kim J, Raj P, TeKippe EM, Greenberg DE. Primary osteomyelitis caused by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2016, 16(9): e190-e195
- [5] Catalán-Nájera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? [J]. Virulence, 2017, 8(7): 1111-1123
- [6] Russo TA, Olson R, Fang CT, Stoesser N, Miller M, MacDonald U, Hutson A, Barker JH, La Hoz RM, Johnson JR. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2018. DOI: 10.1128/jcm.00776-18
- [7] Shi Y, Wang Z, Zhang HY, Li Y. Study on capsular serotypes, virulence genes and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae*[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2021, 42(14): 1720-1725 (in Chinese)
施瑜, 王震, 张汉园, 李莹. 肺炎克雷伯菌荚膜血清型、毒力基因和耐药性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(14): 1720-1725
- [8] Zhang HF, Wang RL. Research progress of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Lung Diseases: Electronic Edition, 2021, 14(2): 253-255 (in Chinese)
张慧芳, 王瑞兰. 高毒力肺炎克雷伯菌的研究进展[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2021, 14(2): 253-255
- [9] Che HY, Cai Y. Analysis of distribution and drug resistance of 672 *Klebsiella pneumoniae* strains[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2021, 37(7): 868-872 (in Chinese)
车皓月, 蔡芸. 672 株肺炎克雷伯菌的分布情况及耐药现状分析[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(7): 868-872
- [10] Khaertynov KS, Anokhin VA, Davidyuk YN, Nicolaeva IV,

- Khalioullina SV, Semyenova DR, Alatyrev EY, Skvortsova NN, Abrahamyan LG. Case of meningitis in a neonate caused by an extended-spectrum-beta-lactamase-producing strain of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1576
- [11] Surgers L, Boyd A, Girard PM, Arlet G, Decré D. ESBL-producing strain of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2016, 22(9): 1687-1688
- [12] Bonomo RA. B-lactamases: a focus on current challenges[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2017, 7(1): a025239
- [13] Haldorsen BC, Simonsen GS, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6)-Ib[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2014, 78(1): 66-69
- [14] Galani I, Nafplioti K, Adamou P, Karaikos I, Giamarellou H, Souli M, Collaborators S. Nationwide epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Greek hospitals, with regards to plazomicin and aminoglycoside resistance[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2019, 19(1): 167
- [15] Galani I, Karaikos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: mechanisms of resistance including updated data for novel β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations[J]. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2021: 1-12
- [16] Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2016, 48(6): 583-591
- [17] Zalewska-Piątek B, Piątek R. Phage therapy as a novel strategy in the treatment of urinary tract infections caused by *E. coli*[J]. *Antibiotics*, 2020, 9(6): 304
- [18] Rios AC, Moutinho CG, Pinto FC, del Fiol FS, Jozala A, Chaud MV, Vila MMDC, Teixeira JA, Balcão VM. Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art[J]. *Microbiological Research*, 2016, 191: 51-80
- [19] Guo MT, Gao Y, Xue YB, Liu YP, Zeng XY, Cheng YQ, Ma JJ, Wang HG, Sun JH, Wang ZF, et al. Bacteriophage cocktails protect dairy cows against mastitis caused by drug resistant *Escherichia coli* infection[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 555
- [20] Wang ZF, Xue YB, Gao Y, Guo MT, Liu YP, Zou XW, Cheng YQ, Ma JJ, Wang HG, Sun JH, et al. Phage vB_PaeS-PAJD-1 rescues murine mastitis infected with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 524
- [21] Chan BK, Abedon ST, Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy[J]. *Future Microbiology*, 2013, 8(6): 769-783
- [22] Herridge WP, Shibu P, O'Shea J, Brook TC, Hoyle L. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2020, 69(2): 176-194
- [23] Sofy AR, El-Dougdoug NK, Refaey EE, Dawoud RA, Hmed AA. Characterization and full genome sequence of novel KPP-5 lytic phage against *Klebsiella pneumoniae* responsible for recalcitrant infection[J]. *Biomedicine*, 2021, 9(4): 342
- [24] Pertics BZ, Cox A, Nyúl A, Szamek N, Kovács T, Schneider G. Isolation and characterization of a novel lytic bacteriophage against the K2 capsule-expressing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain 52145, and identification of its functional depolymerase[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(3): 650
- [25] Zhang C, Yuan JZ, Guo CM, Ge CL, Wang XY, Wei DY, Li X, Si HB, Hu CH. Identification and complete genome of lytic “Kp34likevirus” phage vB_KpnP_Bp5 and therapeutic potency in the treatment of lethal *Klebsiella pneumoniae* infections in mice[J]. *Virus Research*, 2021, 297: 198348
- [26] 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)
- 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
- [27] Kumari S, Harjai K, Chhibber S. Bacteriophage versus antimicrobial agents for the treatment of murine burn wound infection caused by *Klebsiella pneumoniae* B5055[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2011, 60(2): 205-210
- [28] 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
- [29] Cao F, Wang XT, Wang LH, Li Z, Che J, Wang LL, Li XY, Cao ZH, Zhang JC, Jin LJ, et al. Evaluation of the efficacy of a bacteriophage in the treatment of pneumonia induced by multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* in mice[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015: 752930
- [30] Singla S, Harjai K, Katare OP, Chhibber S. Bacteriophage-loaded nanostructured lipid carrier: improved pharmacokinetics mediates effective resolution of *Klebsiella pneumoniae*-induced lobar pneumonia[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2015, 212(2): 325-334

- [31] Melo LDR, Oliveira H, Pires DP, Dabrowska K, Azeredo J. Phage therapy efficacy: a review of the last 10 years of preclinical studies[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2020, 46(1): 78-99
- [32] Wu NN, Zhu TY. Application of phage in solid organ transplantation[J]. *Organ Transplantation*, 2019, 10(4): 410-415 (in Chinese)
吴楠楠, 朱同玉. 噬菌体在实体器官移植中的应用[J]. *器官移植*, 2019, 10(4): 410-415
- [33] Nir-Paz R, Gelman D, Khouri A, Sisson BM, Fackler J, Alkalay-Oren S, Khalifa L, Rimón A, Yerushalmy O, Bader R, et al. Successful treatment of antibiotic-resistant, poly-microbial bone infection with bacteriophages and antibiotics combination[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2019, 69(11): 2015-2018
- [34] 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
- [35] Shi X. Clinical application and mechanism of phage therapy for drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2019 (in Chinese)
石鑫. 噬菌体治疗耐药肺炎克雷伯菌感染的临床应用和机制研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2019
- [36] 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(9): 677-680 (in Chinese)
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(9): 677-680