



专论与综述

肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶的研究进展

刘源平¹ 王兆飞¹ 孙爱喜² 孙建和^{*1}

1 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

2 上海元宋生物技术有限公司 上海 201401

摘要: 肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是在临床引起多种感染的常见条件致病菌之一。多重耐药肺炎克雷伯菌株的出现,给防控细菌感染带来了巨大阻力。肺炎克雷伯菌噬菌体编码的解聚酶是一种稳定性高、特异性强的生物酶,具有分解细菌胞外多糖、限制细菌生长等多种功能。解聚酶可为防控肺炎克雷伯菌感染提供新思路,在抗菌应用中具有广阔前景。本文就肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶的研究进展进行综述。

关键词: 肺炎克雷伯菌,噬菌体,解聚酶,抗生素耐药性,抗菌应用

Advance in the depolymerase employed by *Klebsiella pneumoniae* phage

LIU Yuanping¹ WANG Zhaofei¹ SUN Aixi² SUN Jianhe^{*1}

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

2 Shanghai Yuansong Biotechnology Company Limited, Shanghai 201401, China

Abstract: *Klebsiella pneumoniae* is one of the common pathogenic bacteria that causes a variety of clinical infections. The emergence of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains has brought numerous obstacles in prevention and control of bacterial infections. The depolymerase encoded by *Klebsiella pneumoniae* phage is a biological enzyme with high stability and strong specificity. It has many functions such as decomposing bacterial extracellular polysaccharides and restricting the bacterial growth, etc. The depolymerase provides new ideas to prevent and control *Klebsiella pneumoniae* infection and has broad prospects in antibacterial applications. This article reviews the advance of depolymerase employed by phage of *Klebsiella pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, phage, depolymerase, antibiotic resistance, antibacterial application

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2019YFA0904000); National Natural Science Foundation of China (31772744)

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

Received: 01-06-2021; **Accepted:** 23-08-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFA0904000); 国家自然科学基金(31772744)

***通信作者:** E-mail: sunjhe@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2021-06-01; **接受日期:** 2021-08-23

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是一种常见的病原菌,近年来,由于抗生素的不合理使用,肺炎克雷伯菌的耐药性问题日趋严重,给临床防控带来巨大挑战。产超广谱 β -内酰胺酶(Extended-Spectrum β -Lactamase, ESBLs)肺炎克雷伯菌的耐药性尤其强烈,此前往往使用碳青霉烯类抗生素对其进行针对性防治,但近年来耐受碳青霉烯类抗生素的肺炎克雷伯菌不断出现,而且形势越发严峻^[1],因此创新细菌感染的治疗方案或完善抗生素的替代策略非常重要。

噬菌体作为主要感染细菌的病毒,具有良好的抗菌前景,噬菌体编码的裂菌相关功能分子在抗菌过程中起重要作用。其中,噬菌体编码的解聚酶具有分解细菌胞外多糖的功能,成为噬菌体抗菌研究的新兴方向,解聚酶具有稳定性高、特异性强及高效抑制生物被膜(Biofilm)形成等独特优势,拥有巨大的抗菌应用潜力。

本文围绕国内外肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶的研究成果,概述解聚酶蛋白的结构与功能、挖掘与表征,分析其抗菌效果与应用前景,以期防

控包括肺炎克雷伯菌在内的多种耐药性病原菌提供新思路。

1 肺炎克雷伯菌备受关注,防控策略已成为研究热点

1.1 肺炎克雷伯菌研究领域持续升温

肺炎克雷伯菌是一种血清型众多、致病性强的革兰氏阴性菌,拥有革兰氏阴性菌的广泛特征:有薄肽聚糖层、厚外膜(Outer Membrane, OM)和较厚的荚膜,具有 O 抗原和 K 抗原,多数有菌毛,无芽孢和鞭毛^[2]。肺炎克雷伯菌可引起严重的临床获得性感染,包括尿路感染、呼吸道感染、血液感染及化脓性肝脓肿^[3],给临床防治带来困难。此外,肺炎克雷伯菌还可引起猪、牛、鸡等多种动物的感染,造成畜牧业的巨大损失。

通过分析 Scopus 数据库中 10 216 篇与肺炎克雷伯菌相关的文献(图 1),发现肺炎克雷伯菌相关论文发表量呈现逐年上升趋势,尤其近 10 年内上升幅度较大,提示肺炎克雷伯菌感染日趋严重,对肺炎克雷伯菌的研究和防控正逐渐受到广泛关注。

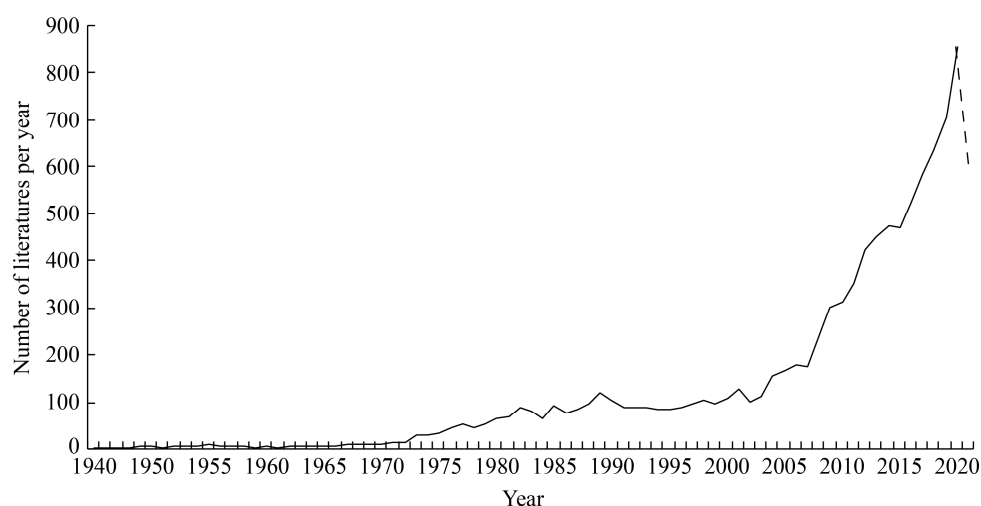


图 1 肺炎克雷伯菌相关研究的文献发表量

Figure 1 Trend chart of the published articles on *Klebsiella pneumoniae* each year

注:数据来源为 Scopus 数据库

Note: The data source is the Scopus Library

1.2 肺炎克雷伯菌的防控策略

1.2.1 基于药敏试验优选抗生素

临床上, 抗生素仍然是治疗肺炎克雷伯菌感染的主要药物。基于患者体内所分离细菌的药敏试验结果, 优选抗生素, 优化治疗策略。但此法耗时较长, 而且效果不稳定, 对于广谱耐药菌株感染病例收效甚微^[4-5]。

1.2.2 基于噬菌体的鸡尾酒治疗

针对抗生素治疗效果差的现状, 基于噬菌体的杀菌作用, 优选多种噬菌体进行科学组合可实施有效治疗, 例如 Guo 等应用噬菌体鸡尾酒疗法成功治疗奶牛乳腺炎, 并可降低奶牛乳腺炎的发生^[6]。在实践中, 通过建立噬菌体库, 针对临床菌株优选敏感噬菌体, 改善了噬菌体裂菌谱相对较窄的局限性^[7]。当然, 还可通过对噬菌体的定向改造, 使其能够侵染并裂解特定的细菌。如李艳秀等通过同源重组方法拓宽了 T4 噬菌体在沙门菌中的宿主范围^[8]。另外, 实践证明将一种或多种噬菌体与抗生素联合能拓展噬菌体和抗生素的杀菌效果, 如将噬菌体鸡尾酒制剂应用于对抗尿路感染中的肺炎克雷伯菌^[9]。

1.2.3 基于噬菌体编码的裂菌功能分子进行抗菌治疗

噬菌体编码裂解细菌的多种功能分子, 如裂解酶、穿孔素、解聚酶等^[10-11]。这些噬菌体裂菌功能相关蛋白拥有比原噬菌体更广泛的作用范围, 而且更加安全高效, 是重要的潜在新型抗菌制剂。Guo 等在革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌的裂解酶方面开展了系列研究工作, 研制了金黄色葡萄球菌、链球菌、肺炎克雷伯菌、大肠杆菌等噬菌体编码的裂解酶^[6,12-18], 其对革兰氏阳性菌具有高效裂解作用, 但对革兰氏阴性菌往往需要与乙二胺四乙酸 (Ethylenediamine Tetraacetic Acid, EDTA) 或氯仿等联用才能发挥高效的抑菌效果, 尚难用于临床。然而解聚酶具有高效降解细菌胞外多糖、破坏细菌生物被膜的功能, 是对抗革兰氏阴性菌的利器, 为提升抗生

素、噬菌体、裂解酶的抗菌效果提供了可行性, 具有独特的应用潜力。

2 噬菌体解聚酶能够特异性破坏细菌胞外多糖结构

2.1 解聚酶在噬菌体侵染中发挥重要作用

部分细菌会在细胞壁周围生成胞外聚合物基质 (Extracellular Polymeric Substance, EPS)。EPS 主要由多糖和蛋白质构成, 能够使细菌免受宿主的免疫反应及酶解反应, 并使其耐药性提高 10-1 000 倍^[19]。EPS 还可以增强细菌对噬菌体的防御能力, 阻碍噬菌体吸附到细菌表面, 影响噬菌体的吸附和侵入过程^[20]。针对细菌产生的 EPS, 部分噬菌体编码合成多糖解聚酶 (Polysaccharide Depolymerase)^[21] 分解细菌表面的荚膜多糖和 EPS, 使细菌暴露于噬菌体的攻击中^[22]。解聚酶本身一般不具有细胞毒性^[23]。解聚酶最直观的表现是能够在噬菌斑周围产生晕环现象^[24], 晕环的大小反映了解聚酶的活性。此外, 解聚酶在抑制细菌生物被膜形成方面效果显著^[25], 具有用于抑制病原菌生长、与其他抗菌制剂联用的应用潜力。

2.2 解聚酶的多样性

随着噬菌体解聚酶不断被分离鉴定, 其类型体现出复杂的多样性。

根据存在形式, 可将解聚酶分为结构蛋白和可溶性蛋白 2 类。绝大多数的噬菌体解聚酶属于第一类, 因其基因序列靠近噬菌体结构蛋白的开放阅读框, 因此通常以结构蛋白的形式存在, 而且绝大多数为尾丝蛋白 (Tail Spike Protein, TSP)。少数的解聚酶蛋白不由结构蛋白基因编码, 因此被认为是可溶性蛋白, 随宿主菌裂解而释放^[26]。

根据功能, 可将解聚酶分为水解酶 (Hydrolase) 和裂解酶 (Lyase) 这 2 类。水解酶可以水解宿主菌脂多糖 O 抗原的侧链或荚膜多糖中的氧苷键, 具体可分为唾液酸酶、左旋糖苷酶、木糖苷酶、葡

聚糖酶、鼠李糖苷酶和肽酶。然而裂解酶可以定向切割 1,4-糖苷键,使多糖裂解为单糖,具体可分为透明质酸酶、藻酸盐裂解酶和果胶酸裂解酶^[23,26]。

2.3 解聚酶分解胞外多糖的机制

大部分解聚酶由噬菌体尾丝蛋白编码,接触并识别细菌表面的多糖结构^[25]。例如,肺炎克雷伯菌噬菌体尾丝蛋白可以与肺炎克雷伯菌 EPS 上的糖苷键结合并将其断开,分解 EPS^[20,27]。EPS 结构较为复杂,其表面有多个分解位点,每种分解位点都可能对应的噬菌体解聚酶将其分解^[28]。不同的噬菌体可以产生不同的解聚酶,作用于同一宿主菌的 EPS 产生不同的寡糖产物^[29]。对于解聚酶的具体水解机制,目前尚无明确的阐述。在噬菌体侵染过程中,噬菌体的尾丝蛋白若能识别 EPS 上的受体,则能发挥解聚功能,将 EPS 分解,协助噬菌体完成侵染过程,如图 2 所

示^[30]。无论是噬菌体结构蛋白形态的解聚酶,还是游离形态的解聚酶,都能够有效水解细菌外膜结构和生物被膜结构^[26]。

其中解聚酶的催化活性结构域往往为单链右手 β -螺旋结构^[31-32],例如大肠杆菌噬菌体 K5A 编码的尾丝蛋白 KflA^[33]。在噬菌体将细菌裂解后,可以在细菌溶解产物中检测到游离的噬菌体解聚酶^[34]。

3 肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶的结构与功能具有保守性和特异性

3.1 研究肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶具有理论和应用价值

随着肺炎克雷伯菌在临床病例中的分离率越来越高,其耐药性越来越严重,解决其耐药问题刻不容缓。目前对肺炎克雷伯菌裂解酶的研究已经比较深入,但对解聚酶的研究尚处于初步了

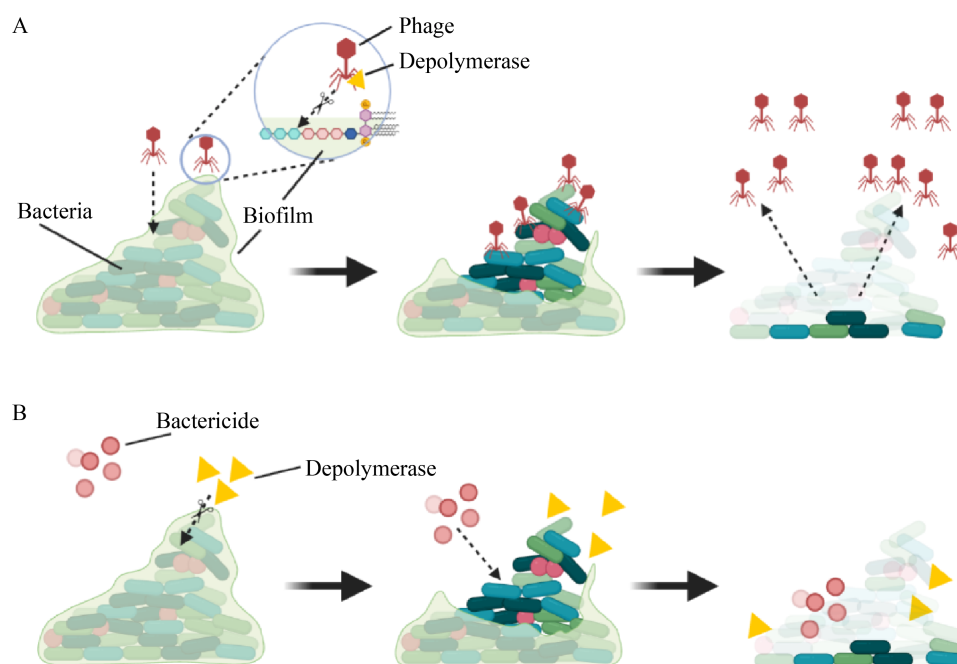


图 2 解聚酶的水解作用示意图^[30]

Figure 2 Schematic diagram of the hydrolysis of depolymerase^[30]

注: A: 编码解聚酶的噬菌体侵染生物被膜所覆盖细菌的过程示意图; B: 游离解聚酶和杀菌剂共同作用杀菌的过程示意图

Note: A: Schematic diagram of the process of phage infecting bacteria covered by biofilms; B: Schematic diagram of the process of sterilization by the combined action of free depolymerase and bactericides

解阶段。由于单纯使用裂解酶仍有一定局限性,尤其是革兰氏阴性菌的厚外膜结构及生物被膜结构^[35],降低了裂解酶的抗菌效果。然而解聚酶正是细菌外膜结构的克星,因此开发解聚酶的重要性不亚于裂解酶。

从解聚酶的分类来看,肺炎克雷伯菌的解聚酶绝大多数是由尾纤蛋白基因编码的结构蛋白型解聚酶^[26],可以降解细菌多糖的主要成分——半乳糖醛酸,这是解聚酶中的常见类型。研究肺炎克雷伯菌解聚酶可以揭示解聚酶作用的普遍规律,具有典型性和代表性^[36]。

3.2 肺炎克雷伯菌解聚酶具有模块化结构

Squeglia 等对肺炎克雷伯菌 KP32 噬菌体编码的解聚酶 KP32 的 gp38 蛋白进行了研究,发现 KP32 的 gp38 蛋白呈现独特的三聚体模块化结构(图 3);解聚酶蛋白三聚体的每条单链均包含催化结构域和非催化结构域,其中催化结构域主要由单链右手 β -螺旋结构组成,非催化结构域分为 2 部分:碳水化合物结合模块(Carbohydrate Binding Module, CBM)和凝集素模块(图 4);结构分析表明 KP32 的 gp38 蛋白只有完成三聚化才能正常发挥其功能;该解聚酶的结合位点在链与链之间的羧基位点上;Glu170、Asp229、Glu239 和 Asp241 这 4 个氨基酸位点在催化中起主要作用,其中 Glu170-Asp241 区段最重要;BLASTp 序列比对分析表明, KP32 的 gp38 解聚酶蛋白与肺炎克雷伯菌噬菌体 K5、K11 和克雷伯氏菌噬菌体 K64-1 的解聚酶的相似性分别为 86.61%、27.44%、39.29%,而且催化氨基酸残基序列相同^[37]。解聚酶的模块化结构为解聚酶的改造提供了可能性。

3.3 肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶的结构与功能高度特异

虽然肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶在构造模式上有一定规律,但不同解聚酶氨基酸序列之间差异较大,对应多样化的肺炎克雷伯菌,肺炎克雷伯菌最常见的菌株为 K1、K2、K5、K20、K54、

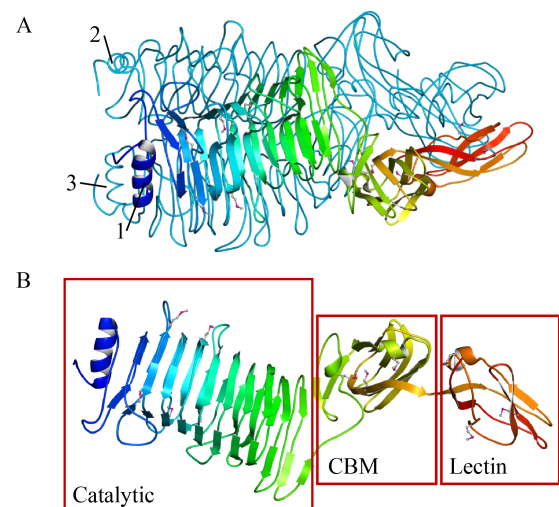


图 3 肺炎克雷伯菌噬菌体所编码解聚酶 KP32 gp38 的三维结构^[37]

Figure 3 Three-dimensional structure of depolymerase KP32 gp38 encoded by *Klebsiella pneumoniae* phage^[37]

注:解聚酶的三维结构是从日本蛋白质结构数据库(Protein Data Bank Japan, PDBJ)查询而来,从图 3 中可以明显看出解聚酶蛋白的三聚体结构和模块化特性。A: KP32 gp38 三聚体结构;1、2、3 分别表示三聚体中的 3 个相同单体;B: KP32 gp38 单体结构

Note: The three-dimensional structure of the depolymerase in figure 3 was queried from the Protein Data Bank Japan (PDBJ). From the figure, the trimeric structure and modularity of the depolymerase protein can be clearly seen. A: Structure of KP32 gp38 trimer; 1, 2, and 3 are three identical monomers in the trimer; B: Structure of KP32 gp38 monomer

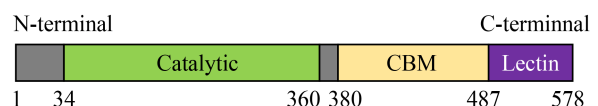


图 4 肺炎克雷伯菌噬菌体所编码解聚酶 KP32 gp38 的结构示意图^[37]

Figure 4 The structure of depolymerase KP32 gp38 encoded by *Klebsiella pneumoniae* phage^[37]

K57 荚膜抗原型,但近年发现了 KN1、KN2 等新的抗原型^[38],肺炎克雷伯菌荚膜组成差异较大,目前已知肺炎克雷伯菌 K1 的荚膜中含有 N-乙酰神经氨酸(聚唾液酸)^[39-40],而许多其他肺炎克雷伯菌荚膜抗原的生化组成尚不明确。通常一种解聚酶只能对某一种特定抗原型的肺炎克雷伯菌发挥作用,表现出高度的特异性^[26]。

4 肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶的挖掘与应用

4.1 解聚酶基因的挖掘

目前在 GenBank 数据库中的肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶基因数量较少，而且有些以尾纤

蛋白命名，不易查找。表 1 汇总了部分肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶的基因序列及其针对的荚膜抗原类型。

对肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶基因的挖掘可简要分为 2 步。首先，确定噬菌体能够合成解聚

表 1 肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶基因相关信息

Table 1 Information on depolymerase genes deposited in *Klebsiella pneumoniae* phage

噬菌体 Phage	形态分类 Classification	解聚酶 Depolymerase	血清型 Serotype	GenBank 登录号 GenBank accession No.	参考文献 References
NTUHK2044-K1-1	Podoviridae	ORF34	K1	YP_009098385	[41]
VB_KpnS_GH-K3	Podoviridae	gp32	K3	YP_009820105	[42]
KN1-1	Podoviridae	KN1dep	KN1	BBF66844	[38]
KN4-1	Siphoviridae	KN4dep	KN4	BBF66888	[38]
0507-KN2-1	Myoviridae	ORF96	KN2	YP_008532047	[43]
IME321	Podoviridae	ORF42	KN1	AXE28435	[21]
KpV71	Podoviridae	Dep_kvp71	K1	AMQ66478	[44]
KpV74	Podoviridae	Dep_kvp74	K2	APZ82768	[44]
KP36	Siphoviridae	gp50	K63	YP_009226011	[45]
SH-KP152226	Podoviridae	Dep42	—	QDF14644	[46]
K5-2	Podoviridae	ORF37	K5	APZ82804	[47]
K5-2	Podoviridae	ORF38	K30, K69	APZ82805	[47]
K5-4	Podoviridae	ORF37	K5	APZ82847	[47]
K5-4	Podoviridae	ORF38	K8	APZ82848	[47]
KP32	Podoviridae	gp37	K3	YP_003347555	[48]
KP32	Podoviridae	gp38	K21	YP_003347556	[48]
KN3-1	Podoviridae	KN3dep	KN3	BBF66867.1	[38]
KN3-1	Podoviridae	K56dep	K56	BBF66868.1	[38]
KpV41	Podoviridae	ORF46	K1	ALO80736	[47]
KpV41	Podoviridae	ORF55	—	KT964103	[47]
KLPN1	Siphoviridae	ORF34	K1	YP_009195374	[49]
KLPN1	Siphoviridae	ORF35	K1	YP_009195375	[49]
ΦK64-1	Myoviridae	S1-1	K11	BAW85694	[50]
ΦK64-1	Myoviridae	S1-2	KN4	BAW85692	[50]
ΦK64-1	Myoviridae	S1-3	K21	BAW85693	[50]
ΦK64-1	Myoviridae	S2-1	KN5	BAW85695	[50]
ΦK64-1	Myoviridae	S2-2	K25	BAW85696	[50]
ΦK64-1	Myoviridae	S2-3	K35	BAW85697	[50]
ΦK64-1	Myoviridae	S2-4	K1	BAW85698	[50]
ΦK64-1	Myoviridae	S2-5	K64	BAQ02780	[50]
ΦK64-1	Myoviridae	S2-6	K30, K69	BAW85699	[50]
ΦK64-1	Myoviridae	S2-7	—	BAW85700	[50]
ΦK64-1	Myoviridae	S2-8	—	BAW85701	[50]

注：—：未在文献中查阅到解聚酶所针对的荚膜抗原血清型

Note: —: The serological type of the capsular antigen targeted by the depolymerase has not been found in the literature

酶的最简易便捷的判断方法是观察噬菌体能否产生有晕环的噬菌斑,若能,则可初步推测噬菌体基因组中含有解聚酶基因;将噬菌体测序后与已有的解聚酶序列进行比对,选择相似度高的序列作为假定的解聚酶序列,由于不同解聚酶基因之间的差异较大,有时无法从所选取的噬菌体基因组中搜索到与在库解聚酶基因相似度高的基因片段,此时可选取基因组中的尾纤蛋白(Tail Fiber Protein, TFP)或尾刺蛋白(Tail Spike Protein, TSP)作为假定的解聚酶序列。在此基础上,利用解聚酶催化结构域通常为单链右手 β -螺旋结构的特性,可以对所选基因进行蛋白二级结构预测,观察其是否具有单链右手 β -螺旋结构,以此可作为早期判断基因序列是否为解聚酶序列的辅助依据。初步挖掘完成后,针对所选基因构建表达载体,表达对应蛋白测定其解聚酶活性。研究者通过上述方法,已挖掘鉴定了不少解聚酶蛋白,例如 Pertics 等分离鉴定了一种专门针对 K2 荚膜血清型的解聚酶蛋白 B1dep^[51]; Li 等分离了一株针对新血清型 KL64 肺炎克雷伯菌的噬菌体,准确地预测了 P510dep 蛋白的解聚酶功能^[52]。

4.2 解聚酶的分析与鉴定

对肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶的分析策略需结合实际情况进行设计。例如 Cai 等利用 HH-pred 分析工具发现新分离的肺炎克雷伯菌噬菌体 VB_KpnS_GH-K3 的 gp32 蛋白(简称 GH-K3)与噬菌体 KP36 的解聚酶相似,猜测其可能是一种解聚酶蛋白,并在后续实验中印证了此猜测^[43]。Liu 等用 70 °C 处理噬菌体 P13 30 min 后,噬菌体全部失活,但其解聚酶活性仍保持在 90% 以上,由此推断该噬菌体所编码的解聚酶具有热稳定性,随后,他们通过向噬菌体悬液中加入丙酮、沉淀、超滤、离心、纯化等方法,成功地分离出一种热稳定解聚酶^[53]。

临床实践也是鉴定解聚酶的有效方式。Wu 等

基于肺炎克雷伯菌噬菌体 SH-KP152226 编码的 Dep42 蛋白能够迅速分解 K47 荚膜,而且能显著降解和抑制生物被膜形成的现象,初步鉴定其为解聚酶;还发现当解聚酶 Dep42 与抗生素联合使用时,可以增强多粘菌素对肺炎克雷伯菌生物被膜的抑制作用,提示解聚酶与抗生素联合使用可能是对抗耐药菌感染的新策略^[47]。

4.3 解聚酶的抗菌应用

随着解聚酶分析鉴定工作的推进,新的解聚酶不断被发现,探索解聚酶的应用成为热点。目前尚无解聚酶治疗人体细菌感染的实例,但在体外实验和动物实验中,解聚酶展现了良好的抗菌和治疗效果。Latka 等发现由 KP34 噬菌体解聚酶、不产生解聚酶的噬菌体 KP15 和环丙沙星组成的三重鸡尾酒可显著降低生物被膜中的生物量,噬菌体 KP34 的解聚酶可以作为噬菌体的辅助性抗生物被膜制剂^[54]。Hsieh 等构建了小鼠菌血症模型,并使用产解聚酶的肺炎克雷伯菌噬菌体 K5-2 和 K5-4 进行治疗,发现治疗组小鼠死亡率显著降低,推测除噬菌体的裂菌作用外,解聚酶也发挥了重要功能^[48]。Volozhantsev 等用致命的 K57 荚膜抗原型肺炎克雷伯菌株感染小鼠,0.5 h 后,以 50 μ g/只的剂量注射解聚酶 Dep_kpv79 和 Dep_kpv767, 80%–100% 的实验组小鼠存活^[55]。王灿使用 BALB/c 小鼠作为实验材料,构建肺炎克雷伯菌腹腔感染模型,以此来评价 Dp42 的体内杀菌活性;他们将肺炎克雷伯菌与解聚酶 Dp42 共同孵育 0.5 h 后,注射于小鼠腹腔,不论是低剂量(2×10^7 CFU)感染还是高剂量(10^8 CFU)感染,小鼠的死亡率均明显降低(16.7% vs 100%; 25% vs 100%);直接将肺炎克雷伯菌注射于小鼠腹腔(2×10^7 CFU 和 2×10^8 CFU),采用预防性给药(感染前 6 h)和治疗性给药(感染后 0.5 h)的方式,无论是低剂量感染还是高剂量感染,解聚酶 Dp42 均具有明显的保护效果,实验动物的存活率均为 100%^[56]。

分析表明,解聚酶的治疗效果显著是因为其能够分解荚膜,使细菌暴露在免疫攻击下,如补体介导的杀伤^[57]。这些数据进一步证实噬菌体多糖解聚酶是一种很有前途的抗菌治疗工具^[53]。

5 肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶的应用前景

5.1 肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶应用于动物治疗

肺炎克雷伯菌噬菌体编码的解聚酶可以特异性地分解肺炎克雷伯菌的荚膜,而且活性稳定,无需佐剂。在动物实验中,应用解聚酶治疗受细菌感染的个体,细菌的荚膜多糖被分解后,对血清介导免疫反应的抗性降低,从而显著提高了动物的存活率^[46,48]。例如 Li 等发现解聚酶 K64-ORF41 可使细菌对血清或中性粒细胞的杀伤更敏感^[58]。此外,解聚酶不会对用于治疗感染的其他药物(例如抗生素)产生拮抗效应^[44],因此可作为高效、安全的免疫辅助制剂。

5.2 利用肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶对肺炎克雷伯菌进行分型

临床上需要先对肺炎克雷伯菌进行分离和分型,再施以对应的抗菌剂。经典的噬菌体分型技术受到噬菌体特异性的限制,这是由于单一噬菌体通常可以感染多个血清抗原型的肺炎克雷伯菌,如 Blundell-Hunter 等分离的噬菌体 GBH013 和 GBH017 可以同时作用于 K1 和 K2 这 2 个荚膜抗原血清型^[59]。然而常用的基因分型方法对突变菌株的准确度不高,因此找寻新的准确分型途径具有重要意义。在实践中,噬菌体解聚酶体现出高度特异性,基于解聚酶的“TSP 分型”技术应运而生。纯化后的解聚酶对荚膜抗原特异性强,通常呈一一对应的关系,可以建立完整的解聚酶库,根据不同解聚酶对病原菌的不同作用效果,即可快速判断病原菌的荚膜抗原分型^[36]。

5.3 对肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶进行改造

肺炎克雷伯菌解聚酶结构具有模块化的特点,理论上可以对其进行修饰改造。从应用的角

度出发,增强解聚酶分解效率、拓宽解聚酶的抗菌谱、实现多酶整合都是较为可行的改造方向。通过对催化结构域进行修饰,增强其水解糖苷键的效率;通过定制化改造解聚酶的识别位点,使之可以作用于更多的病原菌。在之前的研究中, Pan 等发现天然肺炎克雷伯菌噬菌体 ΦK64-1 的尾丝蛋白可以编码 11 种解聚酶,因此 ΦK64-1 的宿主谱较广^[50]。这为噬菌体改造提供了一种新的思路,可以尝试通过同源重组将多种解聚酶基因整合到一种噬菌体中,改造噬菌体的裂菌谱,或者增强单一噬菌体的临床抑菌效果,以弥补噬菌体疗法的缺陷,提高噬菌体疗法的有效性。此外, Eckstein 等成功在大肠杆菌内组装了侵染肺炎克雷伯菌的噬菌体,揭示了在无细菌宿主情况下进行噬菌体体外组装的可能性^[60]。

6 未来展望

在细菌耐药越发严重的背景下,开发新的抗菌策略更加重要且紧迫。噬菌体因其高效、显著的抗菌效果,具有独特的应用潜力。然而在噬菌体应用过程中尚存在不足,这制约着噬菌体的实际临床应用。

解聚酶作为噬菌体编码的蛋白分子,可高效降解细菌胞外多糖,弥补噬菌体制剂的抗菌缺陷。特别是解聚酶可以有效抑制革兰氏阴性菌生物被膜的形成或降解生物被膜,可补齐噬菌体裂解酶对革兰氏阴性菌裂解效果欠佳的短板。但解聚酶本身也存在局限:解聚酶的高度特异性限制了其裂菌谱;针对新型菌株,目前还没有高效快速的方法发掘对应的解聚酶;目前在 GenBank 数据库中的肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶序列较少,解聚酶基因序列仅在 N 端附近较为保守,其他位置变异程度很大,这大大增加了挖掘潜在解聚酶的难度;形态多变的宿主菌、不稳定的环境会减弱解聚酶的作用效果,解聚酶有时甚至无法识别同一宿主菌在不同状态下形成的细菌表面多糖。

现阶段要将解聚酶应用于临床仍困难重重。

为了发挥解聚酶独特的抗菌效果,尤其是针对高耐药性、多病原感染的病例治疗,可采取如下工作策略:寻找广谱的噬菌体解聚酶,不仅能够作用于多种抗原型细菌,而且对大部分革兰氏阴性菌发挥作用;探索普适性强、裂菌谱广、抑菌性强的解聚酶鸡尾酒组合方案;通过同源重组的方式,增加噬菌体编码的解聚酶种类,改造噬菌体;通过基因工程改造解聚酶的蛋白结构,尤其是通过改造识别位点拓宽解聚酶的宿主谱。在未来的抗菌治疗过程中,解聚酶或有举足轻重的作用。通过定向的改良或者与其他抗菌剂联用的方式,发挥其优势,解聚酶有望成为对抗耐药菌感染的利器。

REFERENCES

- [1] Reinert RR, Low DE, Rossi F, Zhang XJ, Wattal C, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the *in vitro* activity of tigecycline[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 60(5): 1018-1029
- [2] Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1998, 11(4): 589-603
- [3] Pan YJ, Lin TL, Chen YH, Hsu CR, Hsieh PF, Wu MC, Wang JT. Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by wzc sequencing[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e80670
- [4] Li XY, Li Y, Fan GR, Lin Y, Xu HB. Clinical pharmacist participated in the anti-infection treatment of a patient with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection[J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2021, 26(8): 1294-1296 (in Chinese)
李晓云, 李岩, 范国荣, 林毅, 徐红冰. 临床药师参与 1 例耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌血流感染患者的抗感染治疗[J]. 临床肺科杂志, 2021, 26(8): 1294-1296
- [5] He XX, Wang JZ, Rao ZG. Clinical analysis of 11 cases of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* liver abscess[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2021, 21(4): 423-426 (in Chinese)
贺小旭, 王佳珍, 饶芝国. 高毒力肺炎克雷伯菌肝脓肿 11 例临床分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(4): 423-426
- [6] 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: 690377. DOI: 10.3389/fcimb.2021.690377
- [7] 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.
- [8] Li YX, Shi DL, Li M, Xiao YY, Zhang ZB, Chen ZY, Zhong HX, Liu QX, Yao HC, Zhang W. Recombinant T4 coliphage gp37 gene can expand its host range in *Salmonella*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(2): 406-415 (in Chinese)
李艳秀, 石冬琳, 李敏, 肖宇屹, 张子博, 陈正阳, 钟黄新, 刘庆新, 姚火春, 张炜. 重组 T4 噬菌体 gp37 基因可扩大其在沙门氏菌中的宿主范围[J]. 微生物学报, 2020, 60(2): 406-415
- [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): 1-13
- [10] Ackermann HW. 5500 Phages examined in the electron microscope[J]. Archives of Virology, 2007, 152(2): 227-243
- [11] Drulis-Kawa Z, Majkowska-Skrobek G, Maciejewska B. Bacteriophages and phage-derived proteins — application approaches[J]. Current Medicinal Chemistry, 2015, 22(14): 1757-1773
- [12] Wang ZF, Kong LC, Liu Y, Fu Q, Cui ZL, Wang J, Ma JJ, Wang HG, Yan YX, Sun JH. A phage lysin fused to a cell-penetrating peptide kills intracellular methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in keratinocytes and has potential as a treatment for skin infections in mice[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018. DOI: 10.1128/aem.00380-18
- [13] Wang ZF, Ma JJ, Wang J, Yang DH, Kong LC, Fu Q, Cheng YQ, Wang HG, Yan YX, Sun JH. Application of the phage lysin Ply5218 in the treatment of *Streptococcus suis* infection in piglets[J]. Viruses, 2019, 11(8): 715
- [14] Yang X, Ji WH, Cao DM, Sun JH, Yan YX. Expression and antibacterial activity of stx phage endolysin of *Escherichia coli* O157[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University: Agricultural Science, 2012, 30(4): 25-30 (in Chinese)
杨曦, 吉文汇, 曹冬梅, 孙建和, 严亚贤. 大肠杆菌 O157 Stx 噬菌体裂解酶的克隆表达及活性分析[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2012, 30(4): 25-30
- [15] Sun L, Ji WH, Fu Q, Yan YX, Zeng QY, Sun JH. Identification of the key amino acid sites in the domain A5 of lysin encoded by phage infecting *Streptococcus suis* 2[J]. Chinese Veterinary Science, 2016, 46(8): 1020-1024 (in

- Chinese)
- 孙亮, 吉文汇, 傅强, 严亚贤, 曾巧英, 孙建和. 猪链球菌 2 型噬菌体裂解酶催化域 A5 的关键氨基酸位点的鉴定[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(8): 1020-1024
- [16] Ji WH, Sun L, Huang QQ, Wang HA, Yan YX, Sun JH. Catalytic domain of endolysin Ly7917 harbored in lysogenic phage of *Streptococcus suis* 7[J]. Microbiology China, 2016, 43(1): 156-163 (in Chinese)
- 吉文汇, 孙亮, 黄庆庆, 王恒安, 严亚贤, 孙建和. 猪链球菌 7 型噬菌体裂解酶 Ly7917 催化域的裂菌活性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(1): 156-163
- [17] Liu Y, Wang ZF, Kong LC, Yan YX, Sun JH. Identification of the minimum domains and the key amino acids of the lysin Ply5218 encoded by prophage from *Streptococcus suis* serotype 9[J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University: Agricultural Science, 2019, 37(1): 41-46 (in Chinese)
- 刘洋, 王兆飞, 孔里程, 严亚贤, 孙建和. 猪链球菌 9 型噬菌体裂解酶 Ply5218 最小功能域及关键氨基酸位点的鉴定[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2019, 37(1): 41-46
- [18] Wu LF, Wang ZF, Wang ZH, Gao C, Chen G, Yan YX, Sun JH. Characterization of a phage effectively lysing multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and preparation of its lysin[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2021, 29(3): 1-9 (in Chinese)
- 吴丽飞, 王兆飞, 王中华, 高超, 陈冈, 严亚贤, 孙建和. 高效裂解多重耐药金黄色葡萄球菌的噬菌体分离及裂解酶的制备[J]. 中国动物传染病学报, 2021, 29(3): 1-9
- [19] Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase[J]. Microbiology, 1998, 144(11): 3039-3047
- [20] Wang C, Li PY, Niu WK, Yuan X, Liu HY, Huang Y, An XP, Fan H, Zhangxiang LL, Mi LY, et al. Protective and therapeutic application of the depolymerase derived from a novel KN₁ genotype of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage in mice[J]. Research in Microbiology, 2019, 170(3): 156-164
- [21] Latka A, Leiman PG, Drulis-Kawa Z, Briers Y. Modeling the architecture of depolymerase-containing receptor binding proteins in *Klebsiella* phages[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2649
- [22] Oliveira H, Costa AR, Konstantinides N, Ferreira A, Akturk E, Sillankorva S, Nemec A, Shneider M, Dötsch A, Azeredo J. Ability of phages to infect *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex species through acquisition of different pectate lyase depolymerase domains[J]. Environmental Microbiology, 2017, 19(12): 5060-5077
- [23] Cai RP, Gu JM, Han WY. Advances in research on classification, structural characteristics and applications of bacteriophage depolymerase[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2020, 40(6): 1258-1264 (in Chinese)
- 蔡若鹏, 顾敬敏, 韩文瑜. 噬菌体解聚酶的分类与结构特征及其应用研究进展[J]. 中国兽医学报, 2020, 40(6): 1258-1264
- [24] Kassa T, Chhibber S. Thermal treatment of the bacteriophage lysate of *Klebsiella pneumoniae* B5055 as a step for the purification of capsular depolymerase enzyme[J]. Journal of Virological Methods, 2012, 179(1): 135-141
- [25] Sugimoto A, Shiraki M, Hatakeyama S, Saito T. Secretion pathway for the poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase in *Ralstonia pickettii* T1[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2008, 94(2): 223-232
- [26] Pires DP, Oliveira H, Melo LDR, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(5): 2141-2151
- [27] Kim S, Oh DB, Kang HA, Kwon O. Features and applications of bacterial sialidases[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91(1): 1-15
- [28] Schwarzer D, Buettner FFR, Browning C, Nazarov S, Rabsch W, Bethe A, Oberbeck A, Bowman VD, Stummeyer K, Mühlenhoff M, et al. A multivalent adsorption apparatus explains the broad host range of phage phi92: a comprehensive genomic and structural analysis[J]. Journal of Virology, 2012, 86(19): 10384-10398
- [29] Domingo-Calap P, Beamud B, Mora-Quilis L, González-Candelas F, Sanjuán R. Isolation and characterization of two *Klebsiella pneumoniae* phages encoding divergent depolymerases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(9): 3160
- [30] Gutiérrez D, Rodríguez-Rubio L, Martínez B, Rodríguez A, García P. Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 825
- [31] 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
- [32] Knirel YA, Shneider MM, Popova AV, Kasimova AA, Senchenkova SN, Shashkov AS, Chizhov AO. Mechanisms of *Acinetobacter baumannii* capsular polysaccharide cleavage by phage depolymerases[J]. Biochemistry: Moscow, 2020, 85(5): 567-574
- [33] Thompson JE, Pourhossein M, Waterhouse A, Waterhouse, Amy H, Thomas G, Marie D, Jeremy PR, Ian S. The K5 lyase KflA combines a viral tail spike structure with a

- bacterial polysaccharide lyase mechanism[J]. Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(31): 23963-23969.
- [34] Kimura K, Itoh Y. Characterization of poly-gamma-glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: possible role in phage infection of *Bacillus subtilis* encapsulated with poly-gamma-glutamate[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(5): 2491-2497
- [35] Zhou Y, Wan QY, Bao HD, Zhang H, Pang MD, Wang R. Research' advances on the structure, function and application of phage tail spike protein[J]. Chinese Veterinary Science, 2021. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2021.0154 (in Chinese)
- 周艳, 万启阳, 包红朵, 张辉, 庞茂达, 王冉. 噬菌体尾突蛋白的结构功能及应用的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2021. DOI: 10.16656/j.issn.1673-4696.2021.0154
- [36] Knecht LE, Veljkovic M, Fieseler L. Diversity and function of phage encoded depolymerases[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2949
- [37] 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
- [38] 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
- [39] Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008, 62(1): 1-6
- [40] Hsu CR, Liao CH, Lin TL, Yang HR, Yang FL, Hsieh PF, Wu SH, Wang JT. Identification of a capsular variant and characterization of capsular acetylation in *Klebsiella pneumoniae* PLA-associated type K57[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 31946
- [41] 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
- [42] Cai RP, Wang ZJ, Wang G, Zhang H, Cheng MJ, Guo ZM, Ji YL, Xi HY, Wang XW, Xue YB, et al. Biological properties and genomics analysis of vB_KpnS_GH-K3, a *Klebsiella* phage with a putative depolymerase-like protein[J]. Virus Genes, 2019, 55(5): 696-706
- [43] 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
- [44] 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
- [45] 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
- [46] Wu YQ, Wang R, Xu MS, Liu YN, Zhu XC, Qiu JF, Liu QM, He P, Li QT. A novel polysaccharide depolymerase encoded by the phage SH-KP152226 confers specific activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* via biofilm degradation[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2768
- [47] 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
- [48] 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
- [49] Hoyle L, Murphy J, Neve H, Heller KJ, Turton JF, Mahony J, Sanderson JD, Hudspeth B, Gibson GR, McCartney AL, et al. *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*-bacteriophage combination from the caecal effluent of a healthy woman[J]. PeerJ, 2015, 3: e1061
- [50] 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. DOI: 10.1128/jvi.02457-16
- [51] 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
- [52] Li M, Li P, Chen L, Guo GL, Xiao YY, Chen L, Du H, Zhang W. Identification of a phage-derived depolymerase specific for KL64 capsule of *Klebsiella pneumoniae* and its anti-biofilm effect[J]. Virus Genes, 2021. DOI: 10.1007/s11262-021-01847-8
- [53] Liu Y, Li GY, Mo ZL, Chai ZH, Shang AQ, Mou HJ. Properties of *Klebsiella* phage P13 and associated exopolysaccharide depolymerase[J]. Journal of Ocean University of China, 2014, 13(1): 163-168

- [54] Latka A, Drulis-Kawa Z. Advantages and limitations of microtiter biofilm assays in the model of antibiofilm activity of *Klebsiella* phage KP34 and its depolymerase[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 20338
- [55] Volozhantsev NV, Shpirt AM, Borzilov AI, Komisarova EV, Krasilnikova VM, Shashkov AS, Verevkin VV, Knirel YA. Characterization and therapeutic potential of bacteriophage-encoded polysaccharide depolymerases with β galactosidase activity against *Klebsiella pneumoniae* K57 capsular type[J]. Antibiotics, 2020, 9(11): 732
- [56] Wang C. Study on the expression and antibacterial activity of the depolymerase from A *Klebsiella pneumoniae* lysate phage[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Medical University, 2019 (in Chinese)
王灿. 肺炎克雷伯菌噬菌体解聚酶克隆表达及抗菌活性研究[D]. 合肥: 安徽医科大学硕士学位论文, 2019
- [57] Mi LY, Liu YN, Wang C, He TT, Gao S, Xing SZ, Huang Y, Fan H, Zhang X, Yu WG, et al. Identification of a lytic *Pseudomonas aeruginosa* phage depolymerase and its anti-biofilm effect and bactericidal contribution to serum[J]. Virus Genes, 2019, 55(3): 394-405
- [58] Li JY, Sheng YY, Ma RJ, Xu MS, Liu FL, Qin R, Zhu MX, Zhu XC, He P. Identification of a depolymerase specific for K64-serotype *Klebsiella pneumoniae*: potential applications in capsular typing and treatment[J]. Antibiotics, 2021, 10(2): 144
- [59] Blundell-Hunter G, Enright MC, Negus D, Dorman MJ, Beecham GE, Pickard DJ, Wintachai P, Voravuthikunchai SP, Thomson NR, Taylor PW. Characterisation of bacteriophage-encoded depolymerases selective for key *Klebsiella pneumoniae* capsular exopolysaccharides[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2021, 11: 686090. DOI: 10.3389/fcimb.2021.686090
- [60] Eckstein S, Stender J, Mzoughi S, Vogeles K, Kühn J, Friese D, Bugert C, Handrick S, Ferjani M, Wölfel R, et al. Isolation and characterization of lytic phage TUN₁ specific for *Klebsiella pneumoniae* K64 clinical isolates from Tunisia[J]. BMC Microbiology, 2021, 21(1): 187