

研究报告



## 超广谱 $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯菌噬菌体 F20 的分离鉴定及其对小鼠败血症治疗效果

陈松建<sup>1</sup> 王书伟<sup>1</sup> 张改<sup>1</sup> 李振江<sup>1</sup> 李亚辉<sup>1</sup> 王山梅<sup>2</sup> 王中全<sup>3</sup> 靳静<sup>\*1</sup>

1 河南医学高等专科学校病原生物学与免疫学教研室 河南 郑州 451191

2 河南省人民医院检验科 河南 郑州 450001

3 郑州大学基础医学院病原生物学教研室 河南 郑州 450001

**摘要:**【背景】肺炎克雷伯菌是引起临床感染的重要条件致病菌之一,肺炎克雷伯菌中产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(Extended-spectrum beta-lactamases, ESBLs)的耐药菌株增多迫切需要找到一种新的治疗方法。【目的】自污水中分离超广谱  $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯菌噬菌体,并明确其生物学特性、观察其治疗小鼠产 ESBLs 肺炎克雷伯菌感染的疗效。【方法】电镜观察 F20 形态,调查其噬菌谱、生长曲线等生物学特性。建立小鼠败血症感染模型观察 F20 治疗小鼠肺炎克雷伯菌感染的疗效。【结果】F20 在其宿主菌的菌苔上形成裂解性噬菌体所具有的完全透明的噬菌斑,电镜观察 F20 具典型的有尾噬菌体目长尾病毒科病毒的形态特征。一步生长曲线显示 F20 的潜伏期为 18 min,裂解量为 89 PFU/细胞。稳定性试验显示 F20 在 pH 5.0–9.0 及 50 °C 环境均具良好稳定性。使用噬菌体 F20 对败血症小鼠治疗后,治疗组小鼠各外周血和各脏器(肺脏、肝脏、脾脏和肾脏)中的细菌数也显著小于对照组细菌数( $P < 0.001$ ),与对照组相比下降大约 1–3 数量级。F20 治疗败血症小鼠存活率达到 87.5%,无毒副作用,而对照组小鼠在 1 d 内全部死亡,可显著提高小鼠的存活率( $P < 0.001$ )。【结论】新分离的裂解性噬菌体 F20 在小鼠体内能安全有效地治疗超广谱  $\beta$ -内酰胺酶肺炎克雷伯菌引起的败血症,可作为生物抗菌剂的有效成分。

**关键词:** 肺炎克雷伯菌, 败血症, 噬菌体 F20, 感染

**Foundation item:** Science and Technology Development Program of Henan Province (162102310341)

**\*Corresponding author:** E-mail: Jing7772006@126.com

**Received:** 19-07-2018; **Accepted:** 03-09-2018; **Published online:** 17-09-2018

**基金项目:** 河南省科技厅科技发展计划项目(162102310341)

**\*通信作者:** E-mail: Jing7772006@126.com

**收稿日期:** 2018-07-19; **接受日期:** 2018-09-03; **网络首发日期:** 2018-09-17

## Characterization and application of a novel phage F20 in the rescue septicemia mice caused by extended spectrum beta-lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae*

CHEN Song-Jian<sup>1</sup> WANG Shu-Wei<sup>1</sup> ZHANG Gai<sup>1</sup> LI Zhen-Jiang<sup>1</sup> LI Ya-Hui<sup>1</sup>  
WANG Shan-Mei<sup>2</sup> WANG Zhong-Quan<sup>3</sup> JIN Jing<sup>\*1</sup>

1 Department of Pathogen Biology and Immunology, Henan Medical College, Zhengzhou, Henan 451191, China

2 Clinical Laboratory, Henan Province People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450001, China

3 Department of Pathogen Biology, School of Basic Medical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450001, China

**Abstract:** [Background] *Klebsiella pneumoniae* is a ubiquitous opportunistic bacterium. The high prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in *Klebsiella pneumoniae* has propelled the need to explore alternative antibacterial therapies. [Objective] The present study focused on the isolation and characterization of a novel virulent *Klebsiella pneumoniae* extended-spectrum beta-lactamases-producing phage isolated from sewage therapy. Moreover, we used the mouse model of septicemia to examine the efficacy of phage therapy in treating infections caused by *K. pneumoniae* produced ESBLs. [Methods] The morphology of the *Klebsiella* phage F20 was observed with electron microscopy. One-step growth kinetics, host range, and pharmacokinetics of the phage were determined. In addition, F20 was used to rescue mice from bacteremia caused by extended-spectrum beta-lactamases-producing *Klebsiella pneumoniae* KP-20 *in vivo* experiments. [Results] F20 exhibited lytic activity evident in clear areas on the bacterial lawns. Morphologically, F20 was classified as a member of the *Siphoviridae* family and the *Caudovirales* order. The phage is highly infectious with a short latent period (18 min) and a large burst size (89 PFU/cell). The phage is stable over a wide pH range (5.0 to 9.0) and at high temperatures (50 °C). Administration of F20 after KP-20 challenge significantly decreased the bacterial burden in the blood and organs (lung, liver, spleen and kidney) of mice, and bacterial titers significantly decreased by 1–3 orders of magnitude in mice treated with phage therapy ( $P < 0.001$ ). Administration of F20 can rescue 87.5% of the mice and have no adverse effect, but the control group resulted in a 0 survival rate within 1 day. Phage treatment can significantly improve the survival of mice ( $P < 0.001$ ). [Conclusion] Our study provides the experimental evidence that F20 shows significant treatment efficacy against *Klebsiella pneumoniae* infection in mice without any adverse effects. The characteristic of the phage F20 greatly increase its utility as biological bactericide.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, Septicemia, Phage F20, Infection

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是引起临床感染的重要条件致病菌之一,可引起肺炎、肠炎、脑膜炎、外伤感染及泌尿感染、败血症等疾病。近来肺炎克雷伯菌感染率在临床上有逐年增多的趋势,尤其是产超广谱 $\beta$ -内酰胺酶(Extended-spectrum beta-lactamase, ESBLs)的耐药菌株日益增多,严重影响临床感染的治疗效果<sup>[1]</sup>。

噬菌体是感染细菌、真菌、放线菌或螺旋体等微生物的病毒总称,可分为毒性噬菌体和温和噬菌体两种类型。由于毒性噬菌体裂解细菌的特异性和

高效性,使得针对细菌性感染(特别由耐药性细菌引起感染)的噬菌体疗法受到特别的关注<sup>[2]</sup>。目前在前苏联和东欧国家中使用噬菌体治疗多种革兰阴性菌和革兰阳性菌引起的各种全身感染中已取得较好的治疗效果<sup>[3-4]</sup>,但有关产生ESBLs肺炎克雷伯菌感染性疾病治疗的研究报道均非常有限,因此探索肺炎克雷伯菌感染治疗的新方法势在必行。本研究从污水中分离出1株裂解ESBLs肺炎克雷伯菌噬菌体,明确其生物学特性,通过建立产ESBLs肺炎克雷伯菌感染的小鼠败血症模型来研

究噬菌体 F20 治疗产 ESBLs 肺炎克雷伯噬菌体败血症的可行性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株来源及 ESBLs 鉴定

31 株肺炎克雷伯菌(KP1-KP31)分离于河南省人民医院住院病人的送检标本, 以上菌株经全自动细菌鉴定系统 Phoenix™ 进行鉴定, 按照美国实验室标准委员会(NCCLS)推荐的方法进行产 ESBLs 细菌表型筛选和确证实验。

### 1.2 主要试剂和仪器

营养肉汤和普通营养琼脂培养基, 杭州天和微生物试剂有限公司; TIANamp 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒(离心柱型), 天根生化科技有限公司; QuickCut™ 限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Bam*H I 和 *Kpn* I, 宝生物工程(大连)有限公司;  $\lambda$ DNA/*Hind* III Marker 和 DS™ 2000 Marker, 广州东盛生物科技有限公司。透射电镜显微镜, 日本电子株式会社。

### 1.3 噬菌体 F20 的分离和纯化

采集郑州市龙湖镇居民地下污水, 参照文献[5]的方法分离可裂解 31 株肺炎克雷伯菌的噬菌体, 筛选到 1 株裂解性较强和噬菌谱较宽的噬菌体, 命名为 F20。挑取单个噬菌斑进行 6 次分离纯化噬菌体。按照文献[6]的方法增殖噬菌体, 得到高浓度的 F20 噬菌体 SM 悬液, 过滤后置 4 °C 保存备用。参照文献[7]的方法将噬菌体 F20 经 CsCl 梯度离心、透析和去内毒素后作为本实验中的治疗性噬菌体。

### 1.4 噬菌体的电镜观察

取噬菌体悬液( $10^{10}$  PFU/mL)滴于铜网上, 自然沉淀 15 min, 用 2% 的磷钨酸对噬菌体进行染色 10 min, 干燥后用透射电镜显微镜 80 kV 下观察噬菌体形态。

### 1.5 F20 一步生长曲线测定

F20 一步生长曲线的测定按照传统的方法<sup>[8]</sup>, 将等体积的噬菌体( $10^6$  PFU/mL)与处于对数生长

前期的敏感宿主菌 KP-20 ( $10^8$  CFU/mL)菌液混合[感染复数(Multiplicity of infection, MOI)=1:100], 混匀后迅速置于 37 °C 振荡(150 r/min)培养, 分别在 0、10、20、30、40、50 min 取样 200  $\mu$ L 离心(12 000 $\times$ g, 4 °C, 1 min), 取上清测量噬菌体的滴度, 重复实验 3 次, 绘制一步生长曲线。

### 1.6 F20 温度和 pH 稳定性

参照文献[9]的方法测定 F20 的热稳定性和 pH 稳定性, 将纯化的浓度为  $1\times 10^{10}$  PFU/mL 的 F20 悬液分别置于 50、60、70、80 °C 的水浴中作用 1 h, 每间隔 10 min 测定不同温度下噬菌体活性。10  $\mu$ L 纯化的噬菌体悬液( $10^{11}$  PFU/mL)分别加入 1 mL 不同 pH 值(3.0-11.0)的 SM 缓冲溶液, 充分混匀, 37 °C 水浴作用 1 h 后分别取样测定噬菌体的效价。试验重复 3 次。

### 1.7 噬菌体基因组酶切分析

按照 TIANamp 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒说明书提取噬菌体 F20 基因组。取提纯后的噬菌体核酸 ddH<sub>2</sub>O 洗脱液, 用限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Bam*H I 和 *Kpn* I 于 37 °C 条件下分别进行酶解反应(30 min), 10  $\mu$ L 反应体系: 噬菌体 F20 核酸 ddH<sub>2</sub>O 洗脱液 8  $\mu$ L, 酶 1  $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer 1  $\mu$ L。将酶切产物于 0.7% 琼脂糖凝胶中电泳(80 V) 1 h 后凝胶成像系统进行拍照, 判定噬菌体的核酸类型并初步估算其基因组大小。

### 1.8 噬菌体 F20 治疗败血症小鼠的疗效

#### 1.8.1 F20 对小鼠的安全性

10 只健康的 6-8 周龄(体重 20 g 左右) SPF (Specific pathogen free)级的 BALB/c 雌性小鼠作为实验用动物(购自郑州大学实验动物中心)用于 F20 安全性评价。尾静脉注射去内毒素噬菌体 F20 生理盐水稀释液 100  $\mu$ L ( $10^{10}$  PFU/mL), 观察进食量、活动情况、体温, 体重变化和生存情况。

#### 1.8.2 噬菌体 F20 治疗败血症小鼠疗后体内各脏器细菌数检测

周龄、体重相似的 10 只 BALB/c 雌性小鼠随机分为 2 组: 实验组和细菌对照组。10 只小鼠腹

腔注射肺炎克雷伯噬菌 KP-20 菌液 100  $\mu$ L ( $10^9$  CFU/mL)建立肺炎克雷伯败血症感染模型, 2 h 后, 治疗组 5 只小鼠尾静脉注射  $10^{10}$  PFU/mL 噬菌体溶液 100  $\mu$ L (MOI=10:1), 剩余 5 只小鼠尾静脉注射生理盐水 100  $\mu$ L 作为细菌对照组。2 h 后, 所有小鼠乙醚麻醉后断颈处死, 无菌抽取心脏血 100  $\mu$ L 注射入 EDTA 抗凝的 EP 管中。同时无菌采集小鼠肝脏、脾脏、肾脏和肺脏的组织, 各脏器称重后分别加入 2 mL 生理盐水, 使用组织匀浆器匀浆, 灭菌生理盐水倍比稀释, 琼脂双层法进行菌落计数。

### 1.8.3 噬菌体 F20 对感染最小致死量败血症小鼠的存活率的影响

16 只 BALB/c 雌性小鼠腹腔注射肺炎克雷伯噬菌 F20 菌液 100  $\mu$ L ( $10^9$  CFU/mL), 建立肺炎克雷伯败血症感染模型。2 h 后对 8 只小鼠实施噬菌体 F20 治疗, 尾静脉注射  $10^{10}$  PFU/mL 噬菌体溶液 100  $\mu$ L。8 只小鼠作为对照组, 尾静脉注射生理盐水 100  $\mu$ L。每天观察 2 组小鼠死亡情况和毒性反应, 连续观察 10 d。

### 1.9 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件分析。噬菌体数目取 lg 对数后表示为: 平均值 $\pm$ 标准差。小鼠体内细菌数的差异比较使用 Kruskal-Wallis 非参数检验, Kaplan-Meier 方法对小鼠的生存曲线进行统计分析,  $P < 0.05$  具有显著差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 F20 的噬菌斑观察和噬菌谱研究

以肺炎克雷伯菌 KP-20 临床菌株为宿主菌时, 从地下污水中成功分离到噬菌体 F20。如图 1 所示, F20 噬菌斑直径约为 4 mm–5 mm, 且完全透明, 外周环绕宽度约为 8 mm 的半透明晕环, 表现出裂解性噬菌体的噬斑特征。31 株肺炎克雷伯菌临床分离株(KP-1–KP-31)用于 F20 噬菌谱的调查, F20 可以裂解其中的 6 株(占 19%), 其中, KP-20 是其最为敏感的宿主菌。

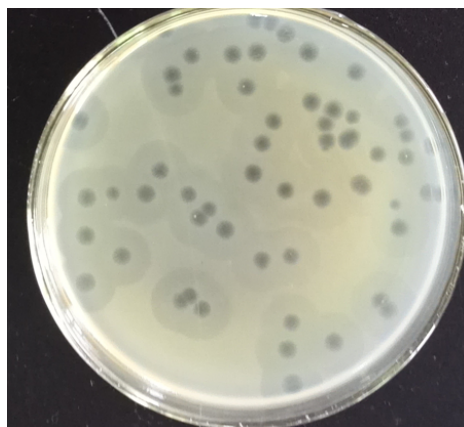


图 1 噬菌体 F20 的噬菌斑

Figure 1 Plaque morphology of the isolated bacteriophage F20

### 2.2 F20 噬菌体的电镜观察

纯化后的噬菌体 F20 经负染后, 电镜下观察如图 2 所示, F20 由一个呈二十面体的立体对称头部(约 55 nm $\times$ 60 nm)和一个较长不可收缩的柔软的尾部(长约 150 nm $\times$ 7 nm)构成(图 2)。因此 F20 按照国际病毒分类委员会(ICTVdB)的分类标准, 该噬菌体属有尾病毒目长尾噬菌体科。

### 2.3 F20 的一步生长曲线

噬菌体 F20 感染宿主菌后, 以培养时间为横坐标, 反应体系中总噬菌体活性的对数为纵坐标, 绘制 F20 的一步曲线(图 3)。结果显示, F20 感染 KP-20 菌株的潜伏期为 18 min, 裂解量约为 89 PFU/细胞, 裂解期为 8 min。

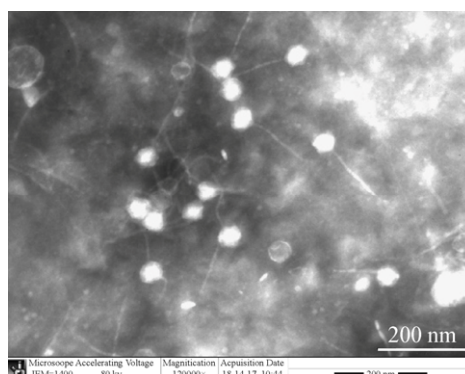


图 2 噬菌体 F20 的电镜照片

Figure 2 Electron micrograph of the isolated phage F20

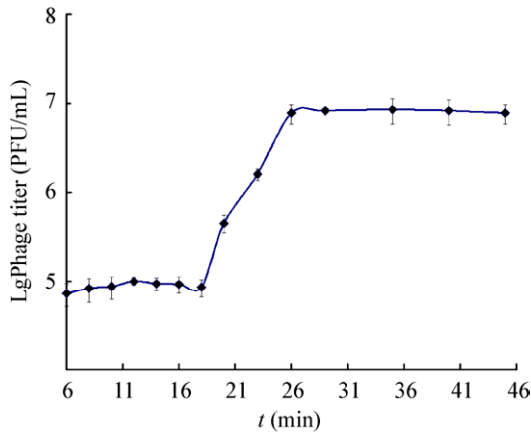


图3 噬菌体 F20 的一步生长曲线

Figure 3 One step growth curve of the phage F20

## 2.4 F20 温度和 pH 稳定性

F20 在 60 °C 和 70 °C 时活性迅速下降,但在 50 °C 水浴中 1 h 活性减少并不明显(图 4)。F20 在 pH 5.0-9.0 缓冲液中处理 1 h 后,仍保持较高的活性;在 pH ≤4.0 和 pH ≥10.0 缓冲液中处理 1 h 后, F20 活性大部分丧失,下降约 4 个数量级(图 5)。

## 2.5 F20 基因组酶切分析

F20 基因组核酸类型为 dsDNA, 酶切后琼脂糖凝胶电泳得到如图 6 所示产物, 基因组含有 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切位点, 被 *Bam*H I 酶切主要形成 7 条带, 被 *Eco*R I 酶切主要形成 6 条带, 但不含有 *Hind*

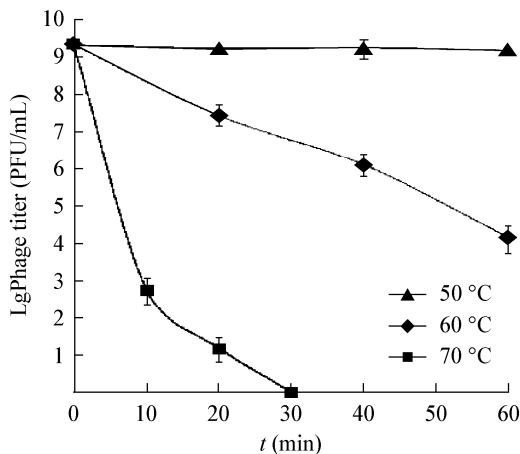


图4 噬菌体 F20 的热稳定性

Figure 4 Effect of temperature on viability of F20

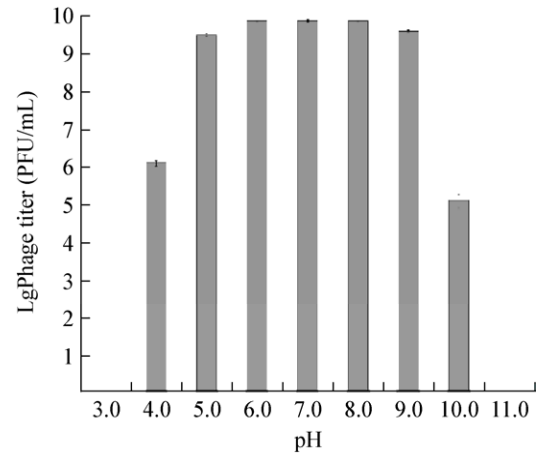


图5 噬菌体 F20 的酸碱稳定性

Figure 5 Effect of pH on viability of F20

III 和 *Kpn* I 酶切位点, 根据酶切结果可粗略估计噬菌体 F20 基因组的大小在 50 kb 左右。

## 2.6 噬菌体 F20 治疗败血症小鼠的疗效

### 2.6.1 噬菌体 F20 对小鼠的安全性

尾静脉注射大剂量 F20 ( $10^{10}$  PFU/mL) 的 10 只

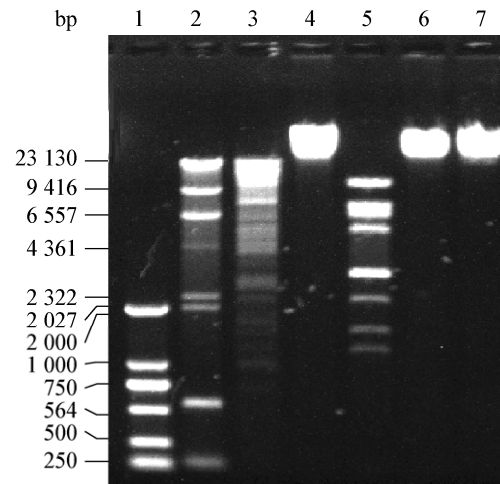


图6 噬菌体 F20 的酶切图

Figure 6 DNA restriction endonuclease digestion of PF20

注: 1:  $\lambda$ DNA/*Hind* III Marker; 2: DL2000 Marker; 3: *Eco*R I 酶切后产物; 4: *Hind* III 酶切后产物; 5: *Bam*H I 酶切后产物; 6: *Kpn* I 酶切后产物; 7: F20 基因组。

Note: 1:  $\lambda$ DNA/*Hind* III Marker; 2: DL2000 Marker; 3: DNA digested with *Eco*R I; 4: DNA digested with *Hind* III; 5: DNA digested with *Bam*H I; 6: DNA digested with *Kpn* I; 7: Genomic F20.

小鼠均未出现精神不振、被毛粗乱、食欲减退、体重下降及死亡等任何临床症状,解剖也未发现组织脏器任何病理变化,说明噬菌体 F20 对实验小鼠具有良好的安全性。

### 2.6.2 噬菌体 F20 治疗败血症小鼠后体内各脏器细菌数检测

如图 7 所示,在小鼠腹腔注射肺炎克雷伯菌 KP-20 后,细菌迅速扩散至小鼠全身,使用噬菌体 F20 治疗败血症小鼠 2 h 后,治疗组小鼠血液中细菌数和对照组小鼠细菌数分别为 $(2.21\pm 0.26)\times 10^3$  CFU/mL 和 $(3.65\pm 0.38)\times 10^6$  CFU/mL,治疗组血液中细菌数显著减少( $P<0.001$ )。同时治疗组小鼠各脏器(肺脏、肝脏、脾脏和肾脏)中的细菌数也显著小于对照组细菌数( $P<0.001$ ),与对照组相比下降大约 1-3 个数量级。

### 2.6.3 噬菌体 F20 对败血症小鼠存活率的影响

噬菌体 F20 治疗后的 10 d,治疗组 8 只败血症小鼠 7 只存活,存活率达到 87.5%,而对照组 8 只小鼠在治疗后的 1 d 内全部死亡,存活率 0,噬菌体 F20 治疗可显著提高败血症小鼠的存活率( $P<0.001$ ) (图 8)。

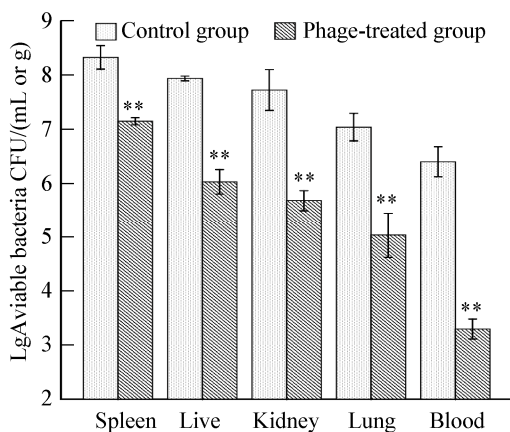


图 7 噬菌体治疗后小鼠全血和各脏器内肺炎克雷伯菌落总数的测定

Figure 7 Bacterial counts blood and organs tissue after phage F20 treatment of *K. pneumoniae* infection in septicemia mice model

注: \*\*: 与对照相比  $P<0.001$ .

Note: \*\*: Compared to control group  $P<0.001$ .

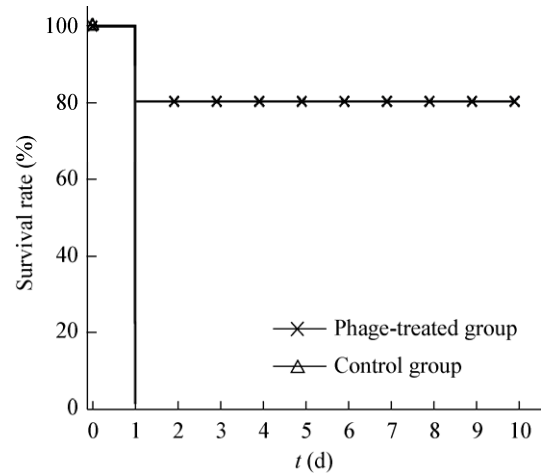


图 8 噬菌体 F20 治疗小鼠败血症生存曲线

Figure 8 Survival rate after F20 treatment for intraperitoneal infection with *K. pneumoniae*

## 3 讨论

超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)是指由细菌质粒介导的能使第三代头孢菌素和单菌霉素失活的一类酶。ESBLs 主要由细菌质粒介导可在菌株间快速转移,因此产 ESBLs 菌株的扩散和传播难以有效的控制,从而造成严重的医院感染,甚至引起医院内暴发流行。自 1983 年德国学者 Knothe 等首次报道超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)以来<sup>[10]</sup>,产 ESBLs 肺炎克雷伯菌株在各国临床标本中的检出率也呈逐年上升趋势,我国产 ESBLs 肺炎克雷伯菌检出率也高达 34.6%–69.8%<sup>[11]</sup>,因此寻求抗生素以外新的抗感染治疗方法尤为重要。

噬菌体是一种理想的杀菌工具,目前利用噬菌体治疗各种耐药菌感染已取得了一些可喜的成果<sup>[12]</sup>。毒性噬菌体(即裂菌性噬菌体)在固体培养基上形成清晰、透亮的溶菌空斑,即透明噬斑;而温和噬菌体(即溶原性噬菌体)在固体培养基上形成浑浊的半透明噬斑。本研究分离的 F20 在其宿主菌菌苔上出现边缘清晰、透明的噬菌斑,直径大小 4 mm–5 mm 左右,外周环绕清晰的晕环,表现出典型裂菌性噬菌体的噬斑特性。噬菌体形态是分类的重要依据之一,1991 年国际细菌病毒分类委员会根据核酸类型、颗粒的形态和囊膜的有

无, 将噬菌体分成 12 个科。电镜观察肺炎克雷伯菌噬菌体 F20 复合对称形, 分为头部和尾部, 头部呈球形, 尾部较长并呈不可收缩的柔软样。按照该分类标准 F20 应属于长尾噬菌体科, 其形态与已报道的肺炎克雷伯菌噬菌体 K1BP108 和  $\Phi$ B01E 形态不相似(均为短尾噬菌体科)<sup>[13-14]</sup>, 提示在不同地域不同时间分类出的肺炎克雷伯菌噬菌体形态会有较大差距。噬菌体增殖形式与细胞型生物二分裂繁殖的“指数生长”模式不同, 表现为“一步生长”的特点, 各种噬菌体都有独特的一步生长曲线。F20 具有较短的潜伏期(18 min)和较大的裂解量 89 PFU/细胞, 表明噬菌体 F20 的裂解能力非常强。对于临床上噬菌体治疗的前景而言, 潜伏时间短裂解量大的噬菌体也特别被看好。虽然噬菌体裂解细菌具有专一性, 但可筛选宽噬菌谱的噬菌体技术以及采用多种噬菌体混合的“鸡尾酒”噬菌体制剂来治疗多种菌株的感染, 这也是未来噬菌体应用的一种趋势<sup>[15]</sup>。

本研究中 F20 经过 CsCl 梯度离心和透析后, 基本上已经除去了内毒素、外毒素等引起的毒副作用物质, 尾静脉注射大剂量 F20 后持续观察到 14 d, 小鼠健康状况良好。也未出现因细菌快速裂解而导致的各种毒副作用, 表明噬菌体 F20 通过提纯后可作为一种安全的生物制剂在临床使用。动物实验也证明 F20 对肺炎克雷伯菌导致的败血症具有很好的治疗效果, 对照组 8 只败血症小鼠在 1 d 内全部死亡, 存活率 0, 而噬菌体治疗组, 尾静脉注射  $10^8$  CFU 的 F20 噬菌体后 7 只存活, 存活率达到 87.5%, 对照组小鼠体内较高的细菌负荷是其 1 d 内迅速死亡的主要原因。对照组和治疗组败血症小鼠治疗后体内各脏器细菌数检测显示: F20 噬菌体在体内对产生超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)的肺炎克雷伯菌有很好的裂解作用, 治疗组小鼠各血液和各脏器(肺脏、肝脏、脾脏和肾脏)中的细菌数也显著小于对照组细菌数( $P < 0.001$ ), 治疗组与对照组相比下降大约 1-3 个数量级, 尤

以血液中下降最明显, 这可能是 F20 提高肺炎克雷伯菌败血症小鼠存活率的直接原因。

## 4 结论

本研究新分离的裂解性噬菌体 F20 具有较短的潜伏期和较大的裂解量, 较广的宿主谱, 经过纯化后可快速有效地治疗产生超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs)肺炎克雷伯菌株引起的小鼠败血症, 显著提高小鼠的存活率, 且对小鼠健康状况无影响。噬菌体 F20 可作为一种简捷、安全、高效的生物制剂, 在对可产生 ESBLs 肺炎克雷伯菌感染的治疗上有着极为广阔的前景。

## REFERENCES

- [1] 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
- [2] Lu TK, Koeris MS. The next generation of bacteriophage therapy[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(5): 524-531
- [3] Hanlon GW. Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections[J]. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2007, 30(2): 118-128
- [4] Hu B, Wang J, Yan Q, et al. Application of phages in the treatment of bacteremia caused by Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*, 2006, 26(5): 438-441 (in Chinese)  
胡北, 王晶, 严群, 等. 噬菌体治疗实验性小鼠耐亚胺培南铜绿假单胞菌感染的研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2006, 26(5): 438-441
- [5] Jin J, Li ZJ, Wang SW, et al. Characterization of Z22, a lytic bacteriophage that infects clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2013, 8(10): 885-888 (in Chinese)  
靳静, 李振江, 王书伟, 等. 鲍曼不动杆菌噬菌体 Z22 生物学特性研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2013, 8(10): 885-888
- [6] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [7] Jin J, Li ZJ, Li YH, et al. Pharmacokinetics of the *Acinetobacter baumannii* phage ZZ1 in mice[J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2014, 9(2): 143-145 (in Chinese)  
靳静, 李振江, 李亚辉, 等. 鲍曼不动杆菌噬菌体 ZZ1 在小鼠体内的药代动力学研究[J]. *中国病原生物学杂志*, 2014, 9(2): 143-145
- [8] Pajunen M, Kiljunen S, Skurnik M. Bacteriophage  $\phi$ YeO3-12, specific for *Yersinia enterocolitica* serotype O:3, is related to coliphages T3 and T7[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(18): 5114-5120

- [9] Capparelli R, Parlato M, Borriello G, et al. Experimental phage therapy against *Staphylococcus aureus* in mice[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51(8): 2765-2773
- [10] Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*[J]. *Infection*, 1983, 11(6): 315-317
- [11] Zhang YW, Zeng J, Liu WE, et al. Emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from clinical infections in China[J]. *Journal of Infection*, 2015, 71(5): 553-560
- [12] Abedon ST. Phage therapy: various perspectives on how to improve the art[A]//Medina C, López-Baena FJ. Host-Pathogen Interactions: Methods and Protocols[M]. New York: Humana Press, 2018: 113-127
- [13] Drulis-Kawa Z, Mackiewicz P, Kęsik-Szeloch A, et al. Isolation and characterisation of KP34-a novel  $\phi$ KMV-like bacteriophage for *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(4): 1333-1345
- [14] D'Andrea MM, Marmo P, de Angelis LH, et al.  $\phi$ BO1E, a newly discovered lytic bacteriophage targeting carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of the pandemic Clonal Group 258 clade II lineage[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 2614
- [15] Yu L, Wang S, Guo ZM, et al. A guard-killer phage cocktail effectively lyses the host and inhibits the development of phage-resistant strains of *Escherichia coli*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(2): 971-983

### 2019 年中国微生物学会及各专业委员会学术活动计划表(3-1)

序号	活动名称	主办/协办单位	时间	人数	地点	联系方式
1	海洋微生物药物创新论坛	中国微生物学会海洋微生物学专业委员会	1 月	60	福建 厦门	林厚文 13801985620
2	生物信息学培训班	中国微生物学会病毒学专业委员会	3 月	50	山东 泰安	吴莹 1590145568
3	第四届国际休克与脓毒症学术会议	中国微生物学会微生物毒素	3 月 29-31 日	1200	广东 广州	刘志锋 13711598120
4	人兽共患病学术交流研讨会	中国微生物学会人兽共患病病原学专业委员会	4 月	200	岳阳/ 浙江莫干山	蒋毅 13520419382
5	生物安全培训	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	4 月	100	北京	贾晓娟 010-64806013
6	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会第五次学术交流会	中国微生物学会微生物生物安全专业委员会	4 月	100	山东 梁山	贾晓娟 010-64806013
7	第六届中国微生物与白酒酿造技术研讨会	中国微生物学会工业微生物学专业委员会	5 月	200	湖北 宜昌	胡育骄 010-53218310
8	2019 年人兽共患病国际研讨会暨中国狂犬病年会	中国微生物学会	5 月 10-11 日	2000	安徽 合肥	娜日莎, 刘霞 010-84039863
9	第十届传染病防控基础研究与应用技术论坛	中国微生物学会分析微生物学专业委员会	6 月	800	甘肃 敦煌	吕相征 13693022236
10	全国昆虫病毒学学术研讨会	中国微生物学会病毒学专业委员会	6 月 21-22 日	200	江苏 镇江	吴莹 1590145568
11	中国微生物学会第八届地质微生物学学术研讨会	中国微生物学会地质微生物学专业委员会	6 月 13-15 日	500	山东 青岛	张晓华 13606428332
12	第四届中国放线菌生物学与产业化暨第二届微生物药物学学术研讨会	中国微生物学会分子微生物学与生物工程专业委员会	7 月	300	山东 青岛	李越中 0531-88564288