

國立臺灣大學醫學院微生物學科暨研究所

博士論文

Department or Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Doctoral Dissertation



使用兩種能辨識不同微生物表面結構之噬菌體以移除  
小鼠腸道中耐碳青黴烯類抗生素的克雷伯氏肺炎桿菌

Decolonization of carbapenem-resistant *Klebsiella*  
*pneumoniae* from the intestinal microbiota of model  
mice by phages targeting two surface structures

劉如芸

Ju-Yun, Liu

指導教授：王錦堂 教授

Prof. Jin-Town, Wang

中華民國 113 年 8 月

August 2024

## 致 謝



本論文的完成，需要感謝許多人的幫助，其中尤其感謝微生物所王錦堂老師的指導，讓我對論文中的研究能夠有更深層的探討及進步；以及王老師研究室裡的學姐及學弟妹，其中稚容、佩芳及怡均學姊的幫助，使得研究遇到問題時可以解決一些我所沒有看到的面向，依吟、伊翔、俐吟、俊堂、淨妤學弟妹的幫忙，讓我在在職進修的路上不至於孤立無援；另一方面需要感謝財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心提供研究環境及研究材料上的幫助，首先感謝黃彥智博士大力支持我繼續攻讀博士學位，及中心主任余俊強及秦咸靜主任的支持，讓我得以順利拿到學位，其中莊曉莉博士、及隔離操作箱團隊成員林大哥、富哥、賴大哥、婕妤、璵甄在工作上的幫助，也讓我沒有後顧之憂的得以著手進行學術研究的探討，感謝以上老師、同學及同事的大力幫忙，讓這一份論文可以撰寫完成。

## 目次



|   |      |
|---|------|
| 致謝.....   | i    |
| 目次.....   | ii   |
| 圖次.....   | iv   |
| 表次.....   | vi   |
| 中文摘要.....   | vii  |
| Abstract.....   | viii |
| 一、前言.....   | 1    |
| (一) 克雷伯氏肺炎桿菌 ( <i>Klebsiella pneumoniae</i> , KP) .....                             | 1    |
| (二) 抗碳青霉烯類克雷伯氏肺炎桿菌 (Carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> , CRKP) ..... | 3    |
| (三) 噬菌體 (Bacteriophage 或 Phage) .....   | 4    |
| (四) 疫苗 (Vaccine) .....  | 6    |
| (五) 試驗動物 .....  | 8    |
| (六) 腸道微生物群 (Intestinal microbiota, IM) .....  | 9    |
| (七) 試驗目的 .....  | 10   |
| 二、材料與方法 .....   | 11   |
| (一) 測定 90 位健檢收集之人類糞便檢體中，腸道微生物中含有 KP 的比例及分型 .....                                    | 11   |
| (二) 克雷伯氏肺炎桿菌菌種 .....  | 11   |
| (三) 噬菌體 .....   | 11   |
| (四) 試驗動物 .....  | 12   |
| (五) 聚合酶鏈式反應 (Polymerase chain reaction, PCR) .....                                  | 12   |
| (六) 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) .....   | 12   |
| (七) 建立腸道微生物相中有定植克雷伯氏肺炎桿菌之試驗小鼠 .....   | 13   |

|      |   |    |
|------|---|----|
| (八)  | 使用疫苗接種預防 NTUH-K2044 (K1) 定植於腸胃道.....                              | 14 |
| (九)  | 腸道中微生物相的培養、分離及鑑定.....   | 15 |
| (十)  | 腸道微生物相中 KP 的分離、鑑定及噬菌斑測試.....                                      | 15 |
| (十一) | 噬菌體殺傷測定 (體外試驗) .....  | 16 |
| (十二) | 觀察噬菌體治療是否移除 KP 及對腸道微生物相的影響.....                                   | 16 |
| (十三) | 糞便檢體中微生物總 DNA 的萃取 .....   | 17 |
| (十四) | 噬菌體增生、濃縮及純化.....  | 18 |
| (十五) | 噬菌體濃度 (Titer) 測定 .....  | 20 |
| (十六) | 次世代定序儀檢測.....   | 20 |
| 三、   | 結果與討論.....  | 22 |
| (一)  | 健檢受檢者腸道微生物相中 KP 定植的比例.....  | 22 |
| (二)  | 建立腸道微生物相中有定植克雷伯氏肺炎桿菌之試驗小鼠.....                                    | 22 |
| (三)  | 克雷伯氏肺炎桿菌定植前後對腸道微生物相的影響.....                                       | 24 |
| (四)  | 使用疫苗接種預防 KP 定植於腸胃道.....   | 25 |
| (五)  | 觀察兩種噬菌體治療對於移除腸道中定植的 KP 及對於腸道中其它微生物相的影響.....                       | 26 |
| (六)  | 使用 Real-time PCR 檢測腸道中 CRKP、 $\phi$ K64-1 和 $\phi$ KO1-1 數量 ..... | 29 |
| (七)  | 噬菌體治療後試驗小鼠腸道微生物相的變化.....  | 29 |
| (八)  | 兩種噬菌體聯合治療後對 K64 莢膜型 CRKP 的噬菌斑檢測.....                              | 31 |
| 四、   | 結論.....   | 32 |
| 五、   | 參考文獻.....   | 36 |

## 圖次



|      |  |    |
|------|--|----|
| 圖 1  | 使用無特定病原菌試驗小鼠管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 的試驗流程圖  | 49 |
| 圖 2  | 使用抗生素處理無特定病原菌試驗小鼠再管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 的試驗流程圖  | 50 |
| 圖 3  | 使用無菌試驗小鼠管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 後與無特定病原菌試驗小鼠同籠一週的試驗流程圖  | 51 |
| 圖 4  | 使用已經於腸道內定植 NTUH-K2044 (K1) 的試驗小鼠與無特定病原菌試驗小鼠同籠飼養示意圖   | 52 |
| 圖 5  | 使用已經於腸道內定植 NTUH-K2044 (K1) 的試驗小鼠與無特定病原菌試驗小鼠同籠飼養的試驗流程圖  | 53 |
| 圖 6  | 使用已經於腸道內定植 NTUH-K2044 (K1) 的試驗小鼠與疫苗接種後無特定病原菌試驗小鼠同籠飼養示意圖  | 54 |
| 圖 7  | 使用疫苗肌肉注射接種無特定病原菌試驗小鼠後，預防 NTUH-K2044(K1) 在腸道定植的試驗流程圖  | 55 |
| 圖 8  | 使用兩種噬菌體移除腸道中 NTUH-K2044 (K1) 的試驗流程圖  | 56 |
| 圖 9  | 使用兩種噬菌體移除腸道中 K64 的試驗流程圖  | 58 |
| 圖 10 | 以 PCR 方式檢測 90 位健檢人類糞便檢體內 KP 檢測結果   | 60 |
| 圖 11 | 以 PCR 方式檢測 90 位健檢人類糞便檢體內 K1 檢測結果   | 61 |
| 圖 12 | 將 NTUH-K2044 (K1) 定植於無特定病原菌小鼠 (SPF mice) 腸道中，並使用培養及次世代基因定序方式分析 NTUH-K2044 (K1) 定植腸道內前、後的微生物相差異 | 62 |
| 圖 13 | 體外試驗中，使用 $\phi$ K1-1 和 $\phi$ KO1-1 感染後，NTUH-K2044 (K1) 菌液塗盤結果                                 | 64 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 圖 14 | 使用兩種噬菌體 ( $\phi$ K64-1 及 $\phi$ KO1-1) 感染兩株 K64 莢膜型菌株，並在不同病毒感染劑量下，兩種 K64 莢膜型菌株的存活率 .....   | 65 |
| 圖 15 | 選取 6 隻小鼠的糞便檢體 (三隻於噬菌體處理 56 天後，腸道中仍定植 CRKP；三隻於噬菌體處理後第 7 天便檢測不到 CRKP)，使用 Real-time PCR 檢測 K64、 $\phi$ K64-1 及 $\phi$ KO1-1 在試驗流程中，小鼠糞便檢體中數量的改變 ..... | 66 |
| 圖 16 | 使用 $\phi$ K64-1 和 $\phi$ KO1-1 去除 CRKP 前後腸道菌群香農多樣性指數及厚壁菌門/擬桿菌門比率的變化 .....  | 68 |
| 圖 17 | $\phi$ K64-1 和 $\phi$ KO1-1 去除 CRKP 後腸道菌相主成分分析及顯著差異前 5 名微生物 .....  | 70 |
| 圖 18 | 從小鼠糞便檢體中分離純化出 CRKP 的噬菌斑測試 .....  | 72 |

## 表次

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 表 1 | 引子序列總表.....  | 73 |
| 表 2 | PCR 及 Real-time 條件總表 .....   | 74 |
| 表 3 | 11 種選擇性培養基及 5 種非選擇性培養基之名稱、培養的微生物種類及<br>培養條件.....   | 75 |
| 表 4 | 無特定病原菌試驗小鼠管餵接種克雷伯氏肺炎桿菌後，腸道微生物菌相<br>變化.....   | 76 |
| 表 5 | 無特定病原菌試驗小鼠經飲水中加入抗生素處理後，再管餵接種克雷伯<br>氏肺炎桿菌，存活之試驗小鼠的腸道微生物菌相變化.....  | 77 |
| 表 6 | 無菌試驗小鼠管餵接種克雷伯氏肺炎後再與無特定病原菌試驗小鼠同籠<br>一周後的腸道微生物菌相變化.....  | 78 |
| 表 7 | 預先每周一次連續三周肌肉注射疫苗，觀察到疫苗接種可以種減緩腸道<br>內 KP 的定植 .....  | 79 |
| 表 8 | 使用兩種噬菌體治療 NTUH-K2044 (K1) 定植腸道中的試驗小鼠，並以<br>PCR 方式檢測試驗過程中，試驗小鼠糞便檢體萃取出總 DNA 內，是<br>否含有 NTUH-K2044 (K1) 定植於腸道中的結果 ..... | 80 |
| 表 9 | 使用兩種噬菌體治療 CRKP 定植腸道中的試驗小鼠，並以 PCR 方式檢測<br>試驗過程中，試驗小鼠糞便檢體萃取出總 DNA 內，是否含有 CRKP<br>定植於腸道中的結果.....                        | 81 |

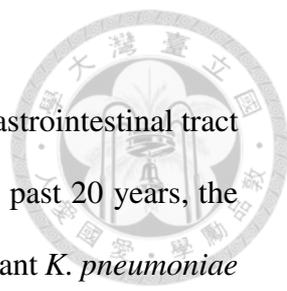
## 中文摘要



克雷伯氏肺炎桿菌是人類胃腸道微生物群的正常組成部分，但是在某些情況下它可能會導致疾病。過去 20 年來，抗抗生素細菌的盛行率不斷增加，例如抗碳青黴烯類克雷伯氏肺炎桿菌。因此我們試圖從具有人類腸道微生物群的小鼠模型中針對性消除抗碳青黴烯類克雷伯氏肺炎桿菌。為了建立人源化微生物群定植小鼠腸道中，我們透過糞便微生物移植將含有 K64 莢膜型的抗碳青黴烯類克雷伯氏肺炎桿菌及人類微生物群餵食無菌小鼠。然後，我們使用兩種噬菌體，一種針對克雷伯氏肺炎桿菌的莢膜 ( $\phi$  K64-1)，一種針對克雷伯氏肺炎桿菌的 O1 脂多醣 ( $\phi$  KO1-1)，用以消除腸道中的抗碳青黴烯類克雷伯氏肺炎桿菌。在未處理的對照組和經  $\phi$  KO1-1 治療的 K64 莢膜型的抗碳青黴烯類克雷伯氏肺炎桿菌定植小鼠中，沒有觀察到抗碳青黴烯類克雷伯氏肺炎桿菌的變化，而在經  $\phi$  K64-1 治療的小鼠中，觀察到短暫的抗碳青黴烯類克雷伯氏肺炎桿菌消除。在同時接受  $\phi$  KO1-1 和  $\phi$  K64-1 治療的一半小鼠中，透過聚合酶連鎖反應和培養的方式在噬菌體治療 56 天後的試驗小鼠新鮮糞便中，檢測不到抗碳青黴烯類克雷伯氏肺炎桿菌。但是在另外一半的試驗小鼠中，抗碳青黴烯類克雷伯氏肺炎桿菌暫時消除，但在噬菌體治療 35 天後恢復。 $\phi$  K64-1 和  $\phi$  KO1-1 聯合治療中，使 52.3% 攜帶抗碳青黴烯類克雷伯氏肺炎桿菌的試驗小鼠腸道內，實現了噬菌體治療後的 56 天抗碳青黴烯類克雷伯氏肺炎桿菌的去定植。值得一提的是，在噬菌體治療後腸道微生物群的組成並沒有很顯著的改變。因此，這種策略不僅可用於根除腸道微生物群中的抗藥性細菌種類，還可能用於治療其他與菌叢失調相關的疾病。

關鍵字：抗碳青黴烯類克雷伯氏肺炎桿菌、噬菌體治療、微生物群、移除定植、受體

## Abstract



*Klebsiella pneumoniae* is a normal component of the human gastrointestinal tract microbiota. However, in some cases, it can cause disease. Over the past 20 years, the prevalence of antibiotic-resistant bacteria, such as carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (CRKP), has been increasing. We attempted to specifically eliminate CRKP from a mouse model with the human intestinal microbiota. To establish humanized microbiota-colonized mice, we administered K64 CRKP-containing human microbiota to germ-free mice by fecal microbiota transplantation. Then, we used two phages, one targeting the capsule ( $\phi$ K64-1) and one targeting O1 lipopolysaccharide ( $\phi$ KO1-1) of K64 *K. pneumoniae*, to eliminate CRKP. In untreated control and  $\phi$ KO1-1-treated K64-colonized mice, no change in CRKP was observed, while in mice treated with  $\phi$ K64-1, a transient reduction was observed. In half of the mice treated with both  $\phi$ KO1-1 and  $\phi$ K64-1, CRKP was undetectable in feces by PCR and culture for 56 days. However, in the other 50% of the mice, *K. pneumoniae* was transiently reduced but recovered 35 days after treatment. Combination treatment with  $\phi$ K64-1 and  $\phi$ KO1-1 achieved long-term decolonization in 52.3% of mice carrying CRKP. Importantly, the composition of the intestinal microbiota was not altered after phage treatment. Therefore, this strategy may be useful not only for eradicating drug-resistant bacterial species from the intestinal microbiota but also for the treatment of other dysbiosis-associated diseases.

Keywords: Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP), Phage treatment, Microbiota, Decolonization, Receptor



## 一、前言

### (一) 克雷伯氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP)

克雷伯氏菌屬 (*Klebsiella* spp.) 為革蘭氏陰性兼氣性厭氧菌，桿狀，屬於腸內桿菌科 (Enterobacteriaceae)，於 1887 年由德國微生物學家 Edwin Klebs 所描述並以此命名，其不具鞭毛且無運動性，在 LB (Luria-Bertani) 培養基上會形成大而黏的菌落。此菌屬皆有特別的莢膜 (Capsular)，可以抵抗免疫細胞的吞噬作用 (Phagocytosis)，且莢膜上的多醣體也是毒力因子之一，因為莢膜上的多醣體，使菌落呈現黏稠樣，並可增強細菌在宿主內的致病力。克雷伯氏菌屬包含 12 種，在臨床上 KP 是此菌屬中最重要之致病菌。KP 外表有大量黏性多醣形成的莢膜包覆，常存在於正常人的腸胃道及呼吸道，是正常菌叢之一 (Bowers *et al.*, 2016)，亦存在於水、空氣和穀物中，也是一種重要伺機性感染的病原菌 (Opportunistic pathogen)，所以在某些情況下可能會導致疾病。

KP 對於免疫衰弱者引起的肺炎、泌尿道感染 (Urinary tract infection, UTI)、敗血症、外科傷口感染，還可能引起化膿性肝膿瘍 (Pyogenic liver abscess, PLA) 和壞死性筋膜炎 (Fang *et al.*, 2007; Rahim *et al.*, 2019) 等等感染病症，同時也常以社區感染 (Community-acquired) 的形式存在，此外，不論國內外，此菌皆是歷年來院內感染 (Nosocomial infection) 的十大元兇之一 (Podschun and Ullmann, 1998; Carpenter *et al.*, 1990; Jong *et al.* 1995; Sahly and Podschun, 1997)。而且之前更發現一種克雷伯氏肺炎桿菌感染症，該菌株在原本健康或僅帶有糖尿病的成人引起有生命危險的化膿性肝膿瘍，有時還會併發轉移性眼內炎 (Endophthalmitis) 或腦膜炎 (Meningitis) (Ko *et al.*, 2002; Lau *et al.*, 2000)，此症的發生率在台灣遠高於歐美地區，且有逐年增加的趨勢。

克雷伯氏肺炎桿菌有許多致病因子，已知的致病因子包括：

1. 細菌表面抗原：菌體外由多醣型成的莢膜，被認為是主要的致病因子；多醣體 (Capsular polysaccharides, CPS) 可以包覆整個細菌表面，使細菌具有抵

抗宿主免疫細胞的吞噬作用和血清毒殺作用 (Serum-killing)，此外 CPS 也能抑制某些抗生素的作用 (Ehrenworth and Baer, 1956)。脂多醣體 (Lipopolysaccharides, LPS)，主要由三個結構組成，分別是：(1) 疏水性脂質 A：是細菌內毒素活性的根源，並且幫助脂多糖分子固定在外膜上 (Tzeng *et al.*, 2002)；(2) 核心寡糖：在結構上分為內核心寡糖和外核心寡糖，其主要功能是將疏水性脂質 A 及多糖鏈連接在一起；(3) 多糖鏈：又稱多聚 O 抗原鏈 (O polysaccharide)，是細菌菌體抗原的抗原決定簇，提供抗原定位誘導宿主的體液免疫反應 (Vinogradov *et al.*, 2002)。LPS 除了具有類似莢膜的作用外，亦會引發病患產生敗血性休克的免疫反應 (McCallum *et al.*, 1989；Merino *et al.* 1992；Podschun and Ullmann, 1998)。CPS 的結構為 K 抗原 (K antigen)，LPS 的結構為 O 抗原 (O antigen)，依據這兩種抗原的變異可以區分不同 KP 致病能力的血清型。於 2014 年 Li 等人歸納出當時約有 11 種 O 抗原及 77 種 K 抗原，而在亞洲地區 K1 及 K2 是被認為最主要導致化膿性肝膿瘍的菌株 (Joanna *et al.*, 2013)；於 2015a 年 Pan 等人將 K 抗原增加至 97 種，而截至 2022 年 Singh 等人歸納出約有 80 多種 K 抗原，並且新命名為 KpSC CPSs (*K. pneumoniae* species complex capsular polysaccharides)。

2. 黏附因子：細菌常藉由表面黏附蛋白與宿主細胞受器的作用來達到附著的目的，如第一型與第三型菌毛 (Type I and III fimbriae) (Tricia *et al.*, 1998)，以及非菌毛型的黏附蛋白 KPF-28 (Domenico *et al.*, 1994；Domenico *et al.*, 1989；Domenico *et al.*, 1999)。第一型菌毛在腸桿菌科屬於高度保留的菌毛，可以結合到宿主細胞表面含有甘露糖 (Mannose) 的醣蛋白上，為一種甘露糖敏感性的黏附因子，此菌毛造成的細菌毒性主要是因為可以黏附到泌尿生殖器、呼吸道及腸道的表皮細胞或黏膜上，侵入下層組織造成感染 (Matsumoto *et al.*, 1990；Robert *et al.*, 1982)。第三型菌毛可以黏附到多種人類細胞上，包括呼吸道內皮細胞以及尿道上皮細胞。而非菌毛型的黏附蛋白 KPF-28，在臨

床上發現許多具有抗藥性的 KP 會表達 KPF-28，並且在人類腸道的菌叢中，使 KP 能黏附在上皮細胞，進而侵入下層組織 (Martino *et al.*, 1996)。

3. 鐵離子螯合作用：細菌競爭宿主体內鐵質來源的能力，即鐵攝取系統 (Iron acquisition system)，KP 會分泌鐵螯合化合物，螯鐵分子 (Siderophores)，此類化合物對鐵離子具有極高的親和力，可以從宿主的鐵結合蛋白獲取鐵離子，鐵離子是 KP 的重要代謝輔因子，並且能使失去鐵離子的宿主免疫細胞失去免疫作用 (Hsieh *et al.*, 2008；Yuan *et al.*, 2020)。

## (二) 抗碳青霉烯類克雷伯氏肺炎桿菌 (Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)

由於抗藥性細菌持續增加及擴散，世界衛生組織 (World Health Organization, WHO) 於 2011 年將「對抗抗生素抗藥性」訂為世界衛生日之主題，強調「今日不採取行動，明日則無藥可治」，以呼籲各國對抗藥性議題之重視。依據台灣院內感染監視資訊系統 (Taiwan Nosocomial Infections Surveillance, TNIS) 公佈，2016 年醫學中心加護病房院內型肺炎菌種前 3 名依序為 *Pseudomonas aeruginosa*、*K. pneumoniae* 及 *Acinetobacter baumannii* (Taiwan Centers for Disease Control. Annual Report of Nosocomial Infections Surveillance System, 2016)。且醫學中心加護病房對 Carbapenem 類的抗藥性比例從 2007 年的 4.6%，逐年上升至 2017 年第三季 29.9%，區域醫院加護病房從 2007 年的 2.8% 上升至 2017 年的 22.3%。

人類的消化道被複雜的微生物群落 (腸道微生物群, Gut's microbiome) 定植，而人類腸道菌群與健康及疾病之間的相互關係日漸得到認可及重視 (Lepage *et al.*, 2013)。糞便微生物群的移植 (Fecal microbiota transplant, FMT) 是近年來治療復發性艱難梭菌 (*Clostridium difficile*) 感染 (由腸道生態失調引起的疾病) 有希望的干預治療措施 (Lee *et al.*, 2016)。最近的一項研究還顯示，糞便微生物移植對於根除致病性抗生素耐藥菌和消除抗生素耐藥基因是有效的 (Millan *et al.*,



2016)，也包括腸道正常菌群中的 CRKP 也是 (Bowers *et al.*, 2016)。而耐抗生素的克雷伯氏肺炎桿菌 (CRKP) 的流行也是日益嚴重的問題 (Srinivasan and Patel, 2008 ; Hidron *et al.*, 2009 ; Sisto *et al.*, 2012 ; Chiu *et al.*, 2013)，當患者的免疫系統被削弱或受損時，糞便中帶有 CRKP 的患者可能更易感染到 CRKP (Falagas *et al.*, 2014)。若將 CRKP 從住院患者的腸道中去除，可以預防 CRKP 感染 (Septimus and Schweizer, 2016)。醫療單位建議可以選擇性去除腸胃道中多重耐藥性菌是值得執行的，尤其是抗藥性的革蘭氏陰性菌更是值得被關注的問題 (Septimus and Schweizer, 2016 ; Saidel-Odes *et al.*, 2012)。有研究指出口服 Gentamicin 和 Polymyxin E 可以進行選擇性根除腸胃道中的 CRKP (Saidel-Odes *et al.*, 2012)。

### (三) 噬菌體 (Bacteriophage 或 Phage)

噬菌體簡單定義就是可以生長在細菌中的病毒，而噬菌體就像細菌一樣普遍存在於一般周圍環境中，因為噬菌體感染細菌個體後，會造成細菌的死亡，大多數的噬菌體以裂解細胞的方式被釋放至胞外而因此溶解和殺死細菌，所以噬菌體可以用來對抗細菌。某些致病性細菌對大部分或是全部的抗生素產生抗藥性，已經成為醫學臨床上嚴重的問題，許多新型抗生素剛上市不久便可發現有耐藥性菌株的產生，因此迫使研究人員不得不去尋找替代的抗菌療法，而其中之一就是被重新重視的噬菌體療法 (Phage therapy)，此種療法即為利用一隻可專一性感染並殺死特有病原菌的噬菌體，來對抗細菌感染的治療方式 (Bruce and Bull, 1996 ; Barrowa and Soothill, 1997)。事實上使用噬菌體來對抗細菌的觀念早在 1917 年 (Felix d’Hérelle, 1917) 法國微生物學家 Felix d’Herelle 發現噬菌體時，即提出可做為醫療上抗菌的方法，所以在抗生素被發現之前，噬菌體被用於治療細菌的感染，而在此後的幾十年間學者也進行相當多相關研究，但是當時發現體外試驗與體內試驗的結果差距很大，且由於噬菌體具有對細菌表面結構的專一性，造成裂解細菌的狹隘性，加上盤尼西林 (Penicillin) 抗生素的產生，所以在抗生素被發

明使用後，噬菌體便不常被用於治療細菌的感染，使得噬菌體療法沉寂了一段時間，直到後來使用抗生素造成抗藥性菌的株問題逐漸嚴重，加上現代的實驗技術精進，才又激起學者的重視及研究 (Carlton, 1999)，現今僅會使用噬菌體治療難以用抗生素治療的特殊疾病 (Kortright *et al.*, 2019)。

而前人研究指出，使用抗生素去除腸道內定植微生物與格蘭氏陰性菌的選擇有相關性 (Saidel-Odes *et al.*, 2012; Septimus and Schweizer, 2016)，另一個研究指出，目前已經開發出使用由噬菌體傳遞 RNA 引導的核酸酶 Cas9，以產生特異性的抗菌劑，並且減少微生物群中的特定菌株 (Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012)。上面兩種方法不論在體外或體內試驗都降低了目標菌株的濃度，不過影響是短暫的，他們通過使用噬菌體遞送的 CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/ CRISPR associated protein 9) 在腸道微生物群中針對特異性的菌株並將其基因改造而使得數量降低。但是這種方法除了應用噬菌體外，還需要對目標菌株進行基因改造 (Lam *et al.*, 2021)，方法較為複雜。如今，研究學者已經發現了非常多種噬菌體的存在，而且每種噬菌體能夠感染少數幾種的細菌，因此使用噬菌體療法的同時，選用噬菌體是非常重要的，但是也可以避免像抗生素一樣攻擊廣泛的細菌。而至目前為止，已有許多有關噬菌體療法的動物試驗報告發表，在小鼠試驗方面 Smith 及 Huggibs 於 1982 年指出，全身性感染 *Escherichia coli* 的試驗鼠經過噬菌體治療後具有降低致死率的效果；且 1996 年 Merrill 等人指出，使用噬菌體長時間治療因 *E. coli* 感染所導致的菌血症 (Bacteremia)，其效果較使用抗生素的對照組為佳；並且在 1996 年 Levin 及 Bullu 也指出，因為噬菌體在宿主內是以指數成長，所以給單一劑量噬菌體的抗菌效果要比給多次劑量抗生素的效果要好；而於 2002 年 Morita 等人研究指出，當單獨給予高劑量的噬菌體時，宿主沒有因為噬菌體的給予而產生副作用。不過無論是單個噬菌體還是多個噬菌體聯合療法，對微生物群的影響也是短暫的，一項體外研究表明，如果多個噬菌體組合目標為同一細菌株，則抗噬菌體的細菌出現之頻

率更高 (Hesse *et al.*,2020)。



#### (四) 疫苗 (Vaccine)

疫苗是一種生物製劑，施打疫苗後可刺激免疫細胞針對特定的傳染病或惡性疾病，使宿主主動獲得免疫力並且記憶於免疫系統內，避免後續接觸疾病時免疫系統無法即時作用而獲得保護力。現今疫苗的有效性及保護力，已得到廣泛的研究和驗證，並且普遍使用於人體。有許多的科學文章共識，說明疫苗是一種對抗和根除傳染病非常安全和有效的方法 (Hub staff report, 2017 ; HealthyChildren.org, 2019 ; Orenstein *et al.*, 1985 ; Ellenberg and Chen,1997)。疫苗製劑中通常含有一種類似於致病微生物的物質，常由微生物的弱化或死亡形式、其毒素或其表面蛋白結構而製成，這些物質會刺激人體的免疫細胞，使免疫細胞活化進而產生免疫系統的反應來對抗外來物質。疫苗可以是預防性的，用以預防或改善未來自然或外來病原體感染的影響，也可以是治療性的，用來對抗已經發生的疾病，例如癌症 (Melief *et al.*, 2015 ; Bol *et al.*,2016 ; Brotherton, 2015 ; Frazer, 2014)，而其中一些疫苗可以完全的預防病原體感染，進而提供完全的保護力 (Ledford, 2020)。

疫苗通常含有減毒、滅活或死亡的生物體或從中提取的純化產品，目前有下列幾種類型的疫苗在使用中 (National Institute of Allergy and Infectious Diseases , 2015) :

1. 減毒疫苗 (Attenuated vaccine, 或稱減毒活疫苗, live attenuated vaccine, LAV) : 是通過降低病原體的毒力但仍保持病原體的活力而產生的疫苗 (Badgett *et al.*, 2002)。減毒作用是降低病原體的致病因子或是改變致病因子，使病原體變得無害或毒力降低 (Pulendran and Ahmed, 2011)，例如：病毒種類的麻疹疫苗、輪狀病毒疫苗，或是細菌種類的卡介苗、傷寒疫苗等，均是此類疫苗。
2. 不活化疫苗 (Inactivated vaccine) : 是由病毒顆粒、細菌或其他病原體培養生

長後，將病原體殺死但是保留完整病原體顆粒而產生的疫苗（Petrovsky and Aguilar, 2004），例如 A 型肝炎不活化疫苗、日本腦炎不活化疫苗等屬於此類型。

3. 類毒素疫苗（Toxoid vaccine）：類毒素是一種細菌毒素（一般是外毒素），在經過化學處理（福馬林）或熱處理後，其毒性已被抑制或是沒有毒性，但是其抗原特性仍保留（Parham, 2021），所以若使用類毒素作為疫苗接種，會產生免疫反應，且免疫系統會記憶類毒素的抗原分子，但因為類毒素毒性較弱，不會造成對應的病症，例如白喉、破傷風疫苗便是此類型疫苗。
4. 亞單位疫苗（Subunit vaccine）：又稱次單位疫苗、次單元疫苗，採用病原微生物表面的有效抗原片段製作的疫苗種類，例如肺炎球菌疫苗、腦膜炎球菌疫苗等。
5. 結合型疫苗（Conjugate Vaccines）：是一種將弱抗原以強抗原作為載體結合製成的疫苗，因某些微生物表面具有較弱的免疫性抗原，混合兩者的目的是使免疫系統對弱抗原產生更強的反應，例如 B 型流感嗜血桿菌疫苗。
6. 基因疫苗（Genetic vaccines）：包括病毒載體疫苗（Viral vector vaccines）、RNA 疫苗（RNA vaccines）和 DNA 疫苗（DNA vaccines）。病毒載體疫苗是使用安全的病毒將病原體基因插入其內，用以產生特定的抗原，例如表面蛋白，進而刺激免疫反應。RNA 疫苗（或 Messenger RNA, mRNA 疫苗）是一種新型疫苗，由包裹在脂質奈米級顆粒載體中的 mRNA 組成，可將特定蛋白質的製造指示送至細胞核糖體（Ribosomes）進行生產，例如 COVID-19 疫苗中的 BNT 疫苗（Pfizer-BioNTech vaccine）及莫德納疫苗（Moderna mRNA vaccine）；DNA 疫苗是注射含有病毒或細菌的 DNA 序列，在宿主細胞中插入和表達此 DNA 序列後，進而由細胞直接產生抗原，引起保護性免疫反應。

## (五) 試驗動物

實驗小鼠用作實驗動物有很長的歷史，最早在 17 世紀就有人使用牠來進行動物實驗 (Hedrich and Bullock, 2004)，故小鼠的動物實驗技術也最為成熟 (Hau *et al.*, 2003)。因實驗小鼠在生物學、醫學研究上的重要性，小鼠是繼人類後第二個全基因組得到測序的哺乳動物物種 (Crow and Little, 2002)；實驗小鼠的優點如下 (Remy Melina, 2022)，使牠成為使用最廣泛的實驗動物 (Suckow *et al.*, 2001)：

1. 成本相對低廉：因小鼠的體型小，活動空間也較小，並且可以群飼，因此飼養成本相對於其他實驗動物低廉。
2. 生殖能力優良：小鼠為多次發情動物而且整年皆可繁衍。平均發情週期為 4-5 天，懷孕三週即可產下子代，每胎可得到約 8-12 仔鼠，如此優良的生殖效率對實驗數據的累積而言，可說是助益良多。
3. 生長快、易於飼養：實驗小鼠的壽命普遍在 1-3 年之間，每天需要食用的食物大約是每 10 克體重 1.2-1.8 克，每天需要飲用的水大約是每 10 克體重 1.5 毫升 (Suckow *et al.*, 2001)。
4. 操作及取得方便：小鼠的體型嬌小，方便一手掌控，並進行各種處理，同時目前已有數個動物中心可提供穩定的小鼠貨源，不虞匱乏。
5. 基因特性明確：在 1935 年前，界定了小鼠基因 11 個部位。大多數是毛皮顏色和眼睛顏色之基因。近年來則辨識了超過 1000 個基因部位，可供實驗設計上的利用。同時小鼠和人類的基因相似度高，能模擬 90% 以上人類的疾病生理狀況。
6. 品系種類繁多：小鼠有許多雜交品系 (ICR) 與近交品系 (C57BL/6 及 FVB)，可供不同實驗需求使用。
7. 易於基因改造：因小鼠的全基因組已經全部解碼，因此易於基因改造，得到需要的實驗動物模式。現今市面上的基因轉殖鼠選擇，絕大部分是選用近親品系，因為牠在遺傳上的變異性低，可大大減少因個體差異導致的實驗誤差，

目前最常被使用的品系為 FVB 以及 C57BL/6 兩種，前者毛色為白色，後者則為黑色，其中以 FVB 得到轉殖鼠的機率較高，生殖力也比較好；而 C57BL/6 則擁有比較高的轉殖基因表現率，同時能以食物誘發多種病灶產生，適合疾病模式研究。

#### (六) 腸道微生物群 (Intestinal microbiota, IM)

大量的文獻指出腸道微生物群在影響人類生理及疾病中產生了關鍵的影響 (Collins *et al.*, 2012; Kamada *et al.*, 2013; Schroeder and Bäckhed, 2016; Sampson *et al.*, 2016)，現今臨床研究上越來越多考慮使用活的微生物作為一種治療方式，例如：糞便微生物群的移植 (FMT)。透過將人類糞便檢體中的糞便微生物群移植到無菌小鼠體內，進而建立人源化腸道微生物的試驗小鼠模型，為模擬人類微生物系統提供了創新且強大的工具 (Park and Im, 2020)。然而，在設計這樣的模型時需要考慮許多因素，因為從人類捐贈者的基因遺傳疾病、生活環境、飲食習慣等等，轉移到到試驗小鼠的遺傳背景，種種因素都會影響微生物在腸道中的定殖 (Schroeder and Bäckhed, 2016)。所以創造試驗小鼠飲食或是基因環境與人類捐贈者的條件相符合是非常重要的，因為需要考慮到全球研究人員對準確性和可重複性的需求，所以能夠提供連續且穩定的人類腸道菌群試驗小鼠，這一點就顯得更加重要。人類和小鼠腸道菌叢在”門(Phylum)”方面具有 90% 的相似性 (Krych *et al.*, 2013)。儘管這數字似乎表明腸道微生物群的高度相似，但仔細觀察就會發現微生物菌群的關鍵差異，特別是在微生物的組成和豐度方面。最明顯的差異是兩個主要門的比率：厚壁菌門/擬桿菌門的比率 (Firmicutes/Bacteroidetes ratio, F/B ratio)，人類具有更大的 F/B 比率，而小鼠則相反 (Guinane *et al.*, 2013; Alkadhi *et al.*, 2014; Krych *et al.*, 2013; Nagpal *et al.*, 2018; Ley *et al.*, 2005)。依據  $\beta$ -多樣性分析，在啮齒類試驗動物中，小鼠的腸道微生物群似乎比大鼠更接近人類 (Nagpal *et al.*, 2018)；而依據次世代基因定序 (Next Generation Sequencing,

NGS)分析指出，雖然在人類和小鼠腸道中發現了許多常見微生物”屬(Genus)”，但這些微生物屬名在豐富度上存在很大差異，總共只有 4%的細菌基因被發現具有相當的一致性 (Hugenholtz and de Vos, 2018)。



#### (七) 試驗目的

因為克雷伯氏肺炎桿菌為一個常存在於正常人的腸道及呼吸道的正常菌叢之一，而 Fung 等人於 2012 年指出，腸道中的克雷伯氏肺炎桿菌與肝膿瘍處培養出來的克雷伯氏肺炎桿菌具有相同的基因型態，進而證明腸道中的克雷伯氏肺炎桿菌有可能誘導肝膿瘍的產生；而克雷伯氏肺炎桿菌的抗藥性在過去 30 年內逐漸增加，因此希望尋找具有專一性的噬菌體將克雷伯氏肺炎桿菌從腸道中移除；本研究希望在小鼠腸道中建立一個人源性腸道微生物相且具有克雷伯氏肺炎桿菌定植的動物平台，再以噬菌體將腸道內的克雷伯氏肺炎桿菌移除，以提供臨床研究及治療上針對克雷伯氏肺炎桿菌另外的治療方向。



## 二、 材料與方法

### (一) 測定 90 位健檢收集之人類糞便檢體中，腸道微生物中含有 KP 的比例及分型

於 2015 年收集台大醫院體檢之人的糞便檢體 90 件，先以試劑套組將糞便檢體中的微生物總 DNA 抽取後，進行 PCR 檢測腸道微生物中是否含有 KP，引子如表 1，PCR 條件如表 2，並確定 KP 的荚膜型態為 K1 的比例。

### (二) 克雷伯氏肺炎桿菌菌種

收集來自台灣大學附設醫院和臺北榮民總醫院之住院患者的糞便檢體，並使用 EMB 瓊脂平板 (Eosin methylene-blue agar plate) 分離克雷伯氏肺炎桿菌。分離出的菌株經由 *wzc* 測序確定其荚膜分型 (Pan *et al.*, 2013)，並以 *wzy* PCR 基因分型進行菌株確認 (Pan *et al.*, 2015a)，其中挑選一株國內常見的 K1 菌株 (NTUH-K2044)，其基因體已被定序註解完畢 (Wu *et al.*, 2009)；一株 CB-0001 (K64)，因在我們的研究中指出 CRKP 的荚膜型有分為多種，其中最常見的是 K64 荚膜型的 CRKP (Pan *et al.*, 2015b)。

### (三) 噬菌體

收集各處未經處理的水或土壤，使用瓊脂覆蓋法將克雷伯氏肺炎桿菌塗佈瓊脂平板上，再將收集得到的水或土壤經稀釋後塗佈於 LB 瓊脂平板 (Luria Bertani agar, LB agar) 上，並觀察瓊脂平板上是否有噬菌斑的出現，若有則將之挑出擴增，目的是將噬菌體從自然界中分離純化出來，其後再以其他同抗原的菌株測定其效價，高效價噬菌體將通過融合溶菌法 (Confluent lysis method) 進行擴增和純化 (Lin *et al.*, 2014) 或是以不同抗原的菌株測定其專一性。將分離出對 NTUH-K2044 (K1) 及 CB-0001 (K64) 菌株具有專一性的噬菌體分別命名為  $\phi$ K1-1 及  $\phi$ K64-1，再使用噬菌體噬菌斑測試來試驗清除 KP 的效率 (Lin *et al.*, 2014)；

Pan *et al.*, 2017)。以前述的方法分離出  $\phi$ K1-1 及  $\phi$ K64-1，且因為克雷伯氏肺炎桿菌莢膜上可分為 K 抗原及 O 抗原，為了獲得對 O1 型 LPS 具有專一性的噬菌體，我們使用 *magA* 缺失突變來建造一個莢膜陰性菌株，進而篩選到對於 O1 型 LPS 具有專一性的噬菌體命名為  $\phi$ KO1-1 (Hsieh *et al.*, 2014)。

#### (四) 試驗動物

將來自財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心 (National Laboratory Animal Center, NLAC) 5-7 週齡 C57BL/6JNarl 小鼠，公母不拘，分別為無特定病原菌試驗小鼠 (Specific pathogen free mice, SPF mice) 或是無菌試驗小鼠 (Germ-free mice, GF mice) 飼養在台灣大學醫學院 (NTUCM) 實驗動物中心的獨立換氣飼育籠 (Individually Ventilated Cages, IVC Cages) (IACUC 編號: 20160494) 或是國家實驗動物中心的無菌隔離操作箱中 (IACUC 編號: NLAC-110-M-004)。

#### (五) 聚合酶鏈式反應 (Polymerase chain reaction, PCR)

使用 PCR 檢測試驗小鼠糞便檢體中是否含有克雷伯氏肺炎桿菌，先以試劑套組將試驗小鼠糞便檢體中的微生物總 DNA 抽取出來後，引子如表 1，PCR 條件如表 2，將跑完 PCR 的產品以 1.5% 的洋菜膠跑電泳，再使用 EtBr (Ethidium bromide) 將 DNA 染色後，使用 UV 照膠系統檢測結果。

#### (六) 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR)

使用 Real-time PCR 量測試驗小鼠糞便檢體中 CB-0001 (K64)、 $\phi$  K64-1 及  $\phi$  KO1-1 的數量，先以試劑套組將試驗小鼠糞便檢體中的微生物總 DNA 抽取出來後，引子如表 1，Real-time PCR 條件如表 2，使用儀器為即時定量核酸反應系統 (ABI StepOnePlus Real-Time PCR System) 及 SYBR Green 試驗套組 (SYBR™ Green PCR Master Mix, REF:4364344)，利用電腦軟體計算其 Ct 值 (Threshold cycle)，並依據標準曲線計算檢體內所含的微生物數量。



## (七) 建立腸道微生物相中有定植克雷伯氏肺炎桿菌之試驗小鼠

### 1. 使用無特定病原菌試驗小鼠

使用無特定病原菌 7 週齡 C57BL/6JNarl 試驗小鼠，以管餵接種的方式給予試驗小鼠 NTUH-K2044 (K1)，濃度為  $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  CFU/mL，每隻管餵 0.2 mL，每組分別為 3、3 及 4 重複，並於管餵接種克雷伯氏肺炎桿菌後的 D0、D1、D7、D14、D28 採取糞便檢體，試驗流程圖如圖 1，使用培養的方式檢測腸道內是否有定植克雷伯氏肺炎桿菌，並且計算腸道微生物相的總類及數量。

### 2. 使用抗生素先處理無特定病原菌試驗小鼠

使用無特定病原菌 6 週齡 C57BL/6JNarl 試驗小鼠，以抗生素 (Cefoperazone, 500  $\mu\text{g/mL}$ ) 放於飲水中餵食 4 天後，更換為一般飲水 2 天後，再以管餵接種的方式給予試驗小鼠 NTUH-K2044 (K1)，濃度為  $1 \times 10^5$  CFU/mL，每隻管餵 0.2 mL，每組 4 重複，並於抗生素處理前 (-D6) 及餵食克雷伯氏肺炎桿菌後的 D0、D1、D7、D14、D28 採取糞便檢體，試驗流程圖如圖 2，使用培養的方式檢測腸道內是否有定植克雷伯氏肺炎桿菌，並且計算腸道微生物相的總類及數量。因為死亡率過高，因此再進行一次上述試驗，使用無特定病原菌 6 週齡 C57BL/6JNarl ( $n=8$ )，一樣將抗生素投與飲用水中 4 天後移除 2 天，再管餵接種 NTUH-K2044 (K1)，但是濃度降低為  $5 \times 10^4$  CFU/mL，採樣時間不變，也是使用培養的方式檢測腸道內是否有定植克雷伯氏肺炎桿菌，並且計算腸道微生物相的總類及數量。

### 3. 使用無菌試驗小鼠

使用無菌 7 週齡 C57BL/6JNarl 試驗小鼠，以管餵接種的方式給予試驗小鼠 NTUH-K2044 (K1)，濃度為  $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  CFU/mL，每隻管餵 0.2 mL，再與無特定病原菌 7 週齡 C57BL/6JNarl 試驗小鼠同籠飼養一週，每組 4 重複，並於管餵接種克雷伯氏肺炎桿菌後的 D7、D14、D28 採取糞便檢體，試驗流程圖如圖 3，使用培養的方式檢測腸道內是否有定植克雷伯氏肺炎桿菌，並且計算腸

道微生物相的總類及數量。

#### 4. 使用已經於腸道內定植 NTUH-K2044 (K1) 的試驗小鼠與無特定病原菌試驗小鼠同籠飼養

使用無特定病原菌 8 週齡 C57BL/6JNarl ( $n=3+2$ ) 試驗小鼠與 2 ( $n=1+1$ ) 隻腸道中已定植 NTUH-K2044 (K1) 的 C57BL/6JNarl 小鼠同籠飼養 1 周後分開 (IVC 飼育盒每盒中不超過 4 隻試驗小鼠)，同籠飼養示意圖如圖 4，於一開始同籠飼養前先採取糞便檢體 D0，以培養的方式計算 D0 之腸道微生物相的總類及數量；並且於同籠飼養後的 D3、D7、D14、D28 再次採取試驗小鼠糞便檢體，試驗流程圖如圖 5，使用培養的方式檢測腸道內是否有定植克雷伯氏肺炎桿菌，並且計算腸道微生物相的總類及數量。最後將 D0 及 D28 的試驗小鼠糞便檢體，先以試劑套組將糞便檢體中的微生物總 DNA 抽取後，以次世代定序儀 (陽明大學 Illumina system) 檢測腸道內微生物相的改變，並與培養所計算出來的腸道微生物相的總類及數量進行比較。

#### (八) 使用疫苗接種預防 NTUH-K2044 (K1) 定植於腸胃道

使用的疫苗屬於亞單位疫苗的一種，選取 K1 及 K2 莢膜型 KP 上之 CPS 抗原片段組合而成，由中央研究院生物化學研究所吳世雄老師研究室及本研究室共同研發製作，並由 Lin 等人於 2022 年發表；我們使用無特定病原菌 5 週齡 C57BL/6JNarl ( $n=17$ ) 試驗小鼠，將試驗小鼠分為三組：(I) 對照組 (沒有注射疫苗及佐劑， $n=2$ )；(II) 佐劑對照組 (僅肌肉注射佐劑， $n=5$ )；(III) 疫苗加上佐劑試驗組 (肌肉注射疫苗加上佐劑， $n=10$ )；每周肌肉注射試驗物質一次，每次體積 0.2 mL，總共三次後，將試驗小鼠 ( $n=17$ ) 隨機分為六組 ( $n=3$  隻 $\times$ 5 組+2 隻 $\times$ 1 組)，每 2-3 隻試驗小鼠分別與 1 隻腸道中已定植 NTUH-K2044 (K1) 的 C57BL/6JNarl 小鼠同籠飼養 1 周後分開 (IVC 飼育盒每盒中不超過 4 隻試驗小鼠)，同籠飼養示意圖如圖 6，並且於同籠飼養後的 D1、D2、D3、D5、D7、

D14 及 D21 採取試驗小鼠糞便檢體，試驗流程圖如圖 7，以培養的方式確定腸道內是否定植 NTUH-K2044 (K1) 及計算 NTUH-K2044 (K1) 數量。



#### (九) 腸道中微生物相的培養、分離及鑑定

將新鮮採取的試驗小鼠糞便檢體在厭氧操作箱中稀釋 50 倍 (20 mg/mL)，再以序列 10 倍稀釋的方式稀釋菌液，最後分別吸取不同稀釋濃度的菌液 0.05 mL，分別塗抹於 5 種非選擇性培養基及 11 種選擇性培養基上 (Seiko *et al.*, 1997)，並在不同環境中分別培養 1-4 天 (表 3)。培養完成後，於不同培養基上挑選不同型態的單一菌落，進行格蘭氏染色、顯微鏡檢查及微生物好氧測試，再計數每個樣品的微生物分群數量，最後以 Log 10 的記述方式表示微生物數量 (微生物菌數以 Log 10/每克 (g) 表示，說明每克檢體中可以培養出來的微生物數量為  $n \times 10^x$ ，顯示方式為  $X \text{ Log}_{10} n$ )。

#### (十) 腸道微生物相中 KP 的分離、鑑定及噬菌斑測試

在使用噬菌體治療後，試驗小鼠的糞便檢體先以試劑套組將糞便檢體中的微生物總 DNA 抽取出來後，以 PCR 的方式檢測 KP，有些試驗小鼠是能夠被檢測到具有 KP 的，因此我們使用選擇性培養基 (DHL 瓊脂, Nissui. Code. 05040) 或/及 LB 培養基分別添加了 Ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 來分離及培養 KP。將試驗小鼠糞便稀釋 10 倍和 100 倍後，採用平板法將稀釋的菌液塗佈於培養基上，以 37°C 培養過夜後，篩選菌落，並以 PCR 確認是否為 KP。經過分離挑選的 KP 以培養液 (LB Broth) 培養 4 小時後，取 200  $\mu\text{l}$  加入 3 ml 培養基 (含 0.7% 洋菜基的 LB Broth, Top agar) 中充分混合均勻，再將其倒在 LB 培養基上，等待培養基凝固後，滴上不同辨識莢膜的噬菌體 ( $\phi\text{K1-1}$ 、 $\phi\text{KO1-1}$  或  $\phi\text{K64-1}$ )，放入 37°C 的培養箱中培養過夜，觀察 LB 培養基上是否產生噬菌斑，用以辨認 KP 的莢膜型。

### (十一) 噬菌體殺傷測定 (體外試驗)

進行噬菌體殺傷試驗 (Mateus *et al.*, 2014)，將細菌 ( $1 \times 10^4$  CFU/mL) 與噬菌體 ( $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$  PFU/mL；即病毒感染劑量，Multiplicity of infection, MOI= $10$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ ) 混合均勻後，在  $37^\circ\text{C}$  下培養 30 分鐘，通過平板連續稀釋計數存活細菌 CFU 以計算存活率。

### (十二) 觀察噬菌體治療是否移除 KP 及對腸道微生物相的影響

#### 1. 使用 NTUH-K2044 (K1) 搭配人源性腸道微生物相定植小鼠腸道

使用無菌 7 週齡 C57BL/6JNarl 試驗小鼠，並收集一位人類的糞便檢體 (100 倍稀釋) 及額外加上實驗室分離出的 NTUH-K2044 (K1) 菌株 ( $1 \times 10^5$  CFU/mL)，分別以管餵接種的方式給予無菌試驗小鼠，每隻管餵 0.2 mL，於 1 周後 (D0) 檢測腸道內是否有定植克雷伯氏肺炎桿菌，確定有定植克雷伯氏肺炎桿菌後，將試驗小鼠分為五組：(I) 陰性對照組 (人類的糞便檢體， $n=4$ )；(II) 試驗對照組 (無噬菌體治療， $n=5$ )；(III) 口服接種  $\phi\text{K1-1}$  試驗組 ( $n=4$ )；(IV) 口服接種  $\phi\text{KO1-1}+\phi\text{K1-1}$  試驗組 ( $n=10$ )；(V) 口服接種  $\phi\text{K1-1}$  加上腹腔注射  $\phi\text{K1-1}$  試驗組 ( $n=4$ )；噬菌體連續給予五天，但是因為老鼠具有食糞現象，怕腸胃道微生物交互感染影響試驗結果，因此將每隻小鼠獨籠飼養，試驗流程圖如圖 8， $\phi\text{K1-1}$  濃度為  $1 \times 10^{11}$  PFU/mL， $\phi\text{KO1-1}$  濃度為  $1 \times 10^9$  PFU/mL，每隻管餵及/或腹腔注射 0.2 mL，並於噬菌體治療後的 D0、D3、D7、D14、D35 採取糞便檢體，先以試劑套組將糞便檢體中微生物的總 DNA 取出來後，以 PCR 方式檢測腸道內是否仍有定植克雷伯氏肺炎桿菌。

#### 2. 使用 K64 莢膜型的 KP 搭配人源性腸道微生物相定植小鼠腸道

使用無菌 7 週齡 C57BL/6JNarl 試驗小鼠，並收集一位含有 K64 莢膜型 CRKP 的人類糞便檢體或是一位人類的糞便檢體 (100 倍稀釋) 額外加上實驗室分離出的 CB-0001 菌株 (K64， $1 \times 10^5$  CFU/mL)，分別以管餵接種的方式給予無菌試驗

小鼠，每隻管餵 0.2 mL，於 1 周後 (D0) 檢測腸道內是否有定植克雷伯氏肺炎桿菌，確定有定植克雷伯氏肺炎桿菌後，將試驗小鼠分為五組：(I) 試驗對照組 (無噬菌體治療， $n=4$ )；(II) 口服接種  $\phi$ KO1-1 試驗組 ( $n=4$ )，(III) 口服接種  $\phi$ K64-1 試驗組 ( $n=4$ )，(IV) 口服接種  $\phi$ KO1-1+ $\phi$ K64-1 試驗組 ( $n=28$ ) (V) 口服接種  $\phi$ KO1-1+ $\phi$ K64-1 加上腹腔注射  $\phi$ KO1-1+ $\phi$ K64-1 試驗組 ( $n=16$ )；噬菌體給予的時間點有三次，分別為試驗開始後的第 1、3、5 天 (1D、3D、5D)，但是因為老鼠具有食糞現象，怕腸胃道微生物交互感染影響試驗結果，因此將每隻小鼠獨籠飼養，試驗流程圖如圖 9， $\phi$ KO1-1 及  $\phi$ K64-1 濃度分別為  $1 \times 10^9$  PFU/mL，每隻管餵及/或注射腹腔 0.2 mL，並於噬菌體治療後的 D0、D7、D14、D21、D28、D35、D56 採取糞便檢體，先以試劑套組將糞便檢體中微生物的總 DNA 取出來後，以 PCR 方式檢測腸道內是否仍有定植克雷伯氏肺炎桿菌，再以次世代定序儀檢測比較，試驗小鼠糞便檢體 (人源腸道微生物定植的情況) 及使用噬菌體清除 K64 菌株後，試驗小鼠腸道微生物相的差異。

### (十三) 糞便檢體中微生物總 DNA 的萃取

使用 QIAGEN 之 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit，將試驗小鼠糞便中的微生物總 DNA 萃取純化出來。

1. 取試驗小鼠糞便約 180-220 mg，放於 2 mL 微量離心管中，加入 1 mL 的 InhibitEX Buffer，將糞便顆粒打散，並於 95°C 加熱 5 分鐘後，全速離心 1 分鐘。
2. 取另一個乾淨的 2 mL 微量離心管，加入 25  $\mu$ L 的 Proteinase K，再加入步驟 1 的上清液 600  $\mu$ L 後，再加入 600  $\mu$ L 的 Buffer AL，混合均勻。
3. 於 70°C 加熱 10 分鐘後，再加入 600  $\mu$ L 的酒精 (96-100%)，並混合均勻。
4. 將步驟 3 的溶液移入 QIAamp spin column，全速離心 1 分鐘，移除濾液，可重複此步驟多次，將步驟 3 的溶液全數過濾。



5. 再加入 500  $\mu\text{L}$  的 Buffer AW1，全速離心 1 分鐘，移除濾液。
6. 再加入 500  $\mu\text{L}$  的 Buffer AW2，全速離心 1 分鐘，移除濾液。
7. 將 QIAamp spin column 全速離心 3 分鐘，使濾膜乾燥。
8. 將 QIAamp spin column 移至一個新的 1.5 mL 微量離心管，加入 100  $\mu\text{L}$  純水於 QIAamp spin column 的濾膜上(可將純水稍微加溫至 40 度左右，提高 DNA 的萃取)，使純水濕潤 QIAamp spin column 的濾膜約 1 分鐘後，全速離心 1 分鐘，便可得到萃取的微生物總 DNA。
9. 萃取出的 DNA 可冰存於 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱備用。

#### (十四) 噬菌體增生、濃縮及純化

##### 1. 試劑：

###### (1) LB 培養液及培養基

使用 BD Dicofo™ LB Broth 或 Agar 加入適量的蒸餾水溶解均勻後，培養液分裝於適當大小的血清瓶或錐形瓶中，培養基裝於適當大小的血清瓶中，加蓋並以高溫高壓滅菌 ( $121^{\circ}\text{C}$ ，20 min)，培養液待其溫度降低至室溫即可使用，培養基則使其溫度降至約  $55-60^{\circ}\text{C}$  後，分別鋪平於無菌塑膠培養皿中，待其凝固後即可使用。

###### (2) SM Buffer (1 L)

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| NaCl                                 | 5.8 g  |
| MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O | 2 g    |
| 1M Tris-Cl (pH 7.5)                  | 50 mL  |
| <hr/>                                |        |
| ddH <sub>2</sub> O                   | 950 mL |

###### (3) 三氯甲烷

###### (4) Top Agar

|          |        |
|----------|--------|
| LB Broth | 20 g/L |
|----------|--------|



|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| Bacto™ Agar                      | 0.7%      |
| (5) Buffer L1 (需滅菌並儲存於 4°C)      |           |
| NaCl                             | 300 mM    |
| Tris-HCl (pH 7.5)                | 100 mM    |
| EDTA                             | 10 mM     |
| BSA                              | 0.2 mg/ml |
| Rnase A (Roche)                  | 20mg/ml   |
| Dnase I (Roche)                  | 6 mg/ml   |
| (6) Buffer L2 (需滅菌並儲存於 4°C)      |           |
| Polyethylene glycerol 6000       | 30%       |
| NaCl                             | 3 M       |
| (7) EndoTrap® Red Kit (需儲存於 4°C) |           |

因 KP 屬於革蘭氏陰性菌，因此裂解性噬菌體將宿主細菌進行裂解同時釋放出細胞壁上的內毒素 LPS，對於後續使用在動物試驗上有安全性的疑慮，因此利用 EndoTrap® Red Kit 純化噬菌體懸浮液，降低噬菌體懸浮液中內毒素的污染。

## 2. 實驗方法：

- (1) 5 mL 新鮮 KP 菌液以 LB 培養液培養至 OD600 吸光值約為 0.5-0.6。加入 100 µl 含有噬菌體之懸浮液，混合均勻後於 37°C 搖晃培養隔夜。
- (2) 再加入 200 µl 三氯甲烷，並置於 37°C 搖晃培養 15 分鐘。
- (3) 於 4°C，10,000 rpm 離心 15 分鐘。
- (4) 收取上清液，以 0.45µm 過濾器過濾，即得到增生之噬菌體溶液。
- (5) 取 15 µl Buffer L1 與 5 mL 含有噬菌體之懸浮液混合，放入 37°C 培養箱搖晃 30 分鐘。

- 
- (6) 加入 1 mL Buffer L2 並溫和搖勻，靜置於冰上 60 分鐘。
- (7) 以 4°C，13,000g 離心 10 分鐘，盡可能除去上清液，使沉澱乾燥。
- (8) 使用 SM Buffer 回溶沉澱，即可得到純噬菌體顆粒。
- (9) 使用 EndoTrap Red Kit 中的管柱，移開上蓋後才移開下蓋，使 storage buffer 流出，純化噬菌體過程中不可使管柱乾裂。
- (10) 加入 3 倍管柱體積的 Regeneration buffer，待 buffer 流出後再重複一次。
- (11) 再加入 3 倍管柱體積的 equilibration buffer，待 buffer 流出後再重複一次。
- (12) 將使用 SM Buffer 回溶之噬菌體顆粒溶液加入管柱上方，待管柱中 equilibration buffer 流出後，接住流出之純化後的噬菌體顆粒溶液。
- (13) 再以 3 倍管柱體積的 Regeneration buffer 清洗管柱後，加入 storage buffer，使 storage buffer 充滿管柱後，蓋上下蓋及上蓋，儲存於 4°C。

#### (十五) 噬菌體濃度 (Titer) 測定

1. 將經過增生的噬菌體懸浮液，以 SM buffer 進行連續 10 倍稀釋 ( $10^{-1}$ ~ $10^{-10}$ )。
2. 取出 100  $\mu$ L 稀釋過後的噬菌體懸浮液，分別與 200  $\mu$ L 新鮮 KP 菌液共同培養於 37°C 下，15-20 分鐘。
3. 加入 3 mL 的 Top agar 混合均勻後，再倒於 LB agar 上，等待 Top agar 凝固後，置於 37°C 培養隔夜，觀察並計數噬菌斑生成數。

#### (十六) 次世代定序儀檢測

1. 使用國立陽明大學基因體研究中心 Illumina 測序平台 (Illumina MiSeq, 200M

讀數)，對每一個樣品來自細菌 16S rRNA 基因的 V3 / V4 高變異區做 PCR 三重複的擴增，並將 Nextera XT DNA 指標試劑套組標記於擴增的 DNA 上，以方便 Illumina 16S 資料庫的比對，使用 2x300 bp 的片段在 MiSeq 資料庫中交叉比對後，再以總體基因體學 (Metagenomics，或稱宏基因體學) 進行分析後產出結果報告。

2. 通過 16s rDNA 測序確定糞便檢體中微生物群的組成，擴增細菌 16S rRNA 基因的 V4 高變異區做 PCR 擴增 (Caporaso *et al.*, 2012)，再使用 GeneJET 凝膠提取試劑盒 (Thermo Scientific) 純化擴增產物，並在 Qubit 2.0 熒光計 (Qubit) 上使用 Qubit dsDNA HS 分析試劑盒 (Qubit) 進行定量。將擴增的產物使用 Illumina NEBNext®Ultra™ DNA 製備試劑盒 (NEB)，進行純化後，加以比對資料庫 (Wu *et al.*, 2020)。



### 三、 結果與討論

#### (一) 健檢受檢者腸道微生物相中 KP 定植的比例

於 2015 年在台大醫院收集 90 件健檢受檢者的糞便檢體進行微生物總 DNA 的抽取後，以 PCR 的方式進行腸道微生物 KP 的鑑定，經過 PCR 的檢測後結果如圖 10 所示，90 件檢體中有 62 件檢體經過 PCR 檢測後發現糞便檢體中具有 KP，因此約為 69% 左右的健檢受檢者人腸道中會有 KP 的定植；再使用 K1 引子進行 PCR 檢測後得知，其中 62 件檢體中有 11 件為 K1 莢膜型（健檢受檢者中 12% 為 K1 莢膜型 KP，圖 11），因此我們優先使用 K1 莢膜型 KP 使之定植於試驗小鼠腸道中，再進一步探討如何移除腸胃道中的 KP。

#### (二) 建立腸道微生物相中有定植克雷伯氏肺炎桿菌之試驗小鼠

##### 1. 使用無特定病原菌試驗小鼠

使用無特定病原菌 7 週齡 C57BL / 6JNarl（不同管餵接種濃度，每組  $n=3$ 、3、4）試驗小鼠，以管餵接種的方式給予試驗小鼠 NTUH-K2044（K1），濃度為  $1 \times 10^3$ 、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  CFU/mL，每隻管餵 0.2 mL，並於餵食克雷伯氏肺炎桿菌後的 D0、D1、D7、D14、D28 採取糞便檢體，以培養的方式檢測腸道菌相的改變及使用選擇性培養基檢測克雷伯氏肺炎桿菌。試驗結果發現，試驗小鼠死亡率為 8.3%，但是無特定病原菌試驗小鼠無論何種餵食濃度，於 D7 時均無克雷伯氏肺炎桿菌存在於腸道中（NTUH-K2044（K1）濃度低於  $1 \times 10^3$  CFU/g），且只有一隻試驗小鼠，餵食接種 NTUH-K2044（K1）濃度  $1 \times 10^5$  CFU/mL，於 D1 有克雷伯氏肺炎桿菌的發現（表 4），並且發現克雷伯氏肺炎桿菌會影響到腸道菌相，*Clostridium spp.* 及 *Fusiform bacteria* 在餵食克雷伯氏肺炎桿菌後，使其濃度低於  $1 \times 10^3$  CFU/g。



## 2. 使用抗生素先處理無特定病原菌試驗小鼠

使用無特定病原菌 6 週齡 C57BL/6JNarl ( $n=4$ ) 試驗小鼠，以抗生素放於飲水中餵食 4 天，再更換為一般飲水 2 天後，以管餵接種的方式給予試驗小鼠 NTUH-K2044 (K1)，濃度為  $1 \times 10^5$  CFU/mL，每隻管餵 0.2 mL，並於餵食克雷伯氏肺炎桿菌後的 D0、D1、D7、D14、D28 採取糞便檢體，以培養的方式檢測腸道菌相的改變及使用選擇性培養基檢測克雷伯氏肺炎桿菌。試驗結果發現，在餵食克雷伯氏肺炎桿菌後，無特定病原菌試驗小鼠的死亡率高達 75%，但是存活的小鼠腸道中則是 100% 定植有克雷伯氏肺炎桿菌，而因為抗生素的作用，小鼠腸道菌相改變(如表 5)。若是將餵食的 NTUH-K2044(K1) 濃度降為  $5 \times 10^4$  CFU/mL 後，使用無特定病原菌 6 週齡 C57BL/6JNarl ( $n=8$ ) 試驗小鼠，重複上述試驗步驟，則試驗結果發現死亡率降為 25%，而試驗小鼠腸道中定植克雷伯氏肺炎桿菌的比率降低至 17%。

## 3. 使用無菌試驗小鼠

使用無菌 7 週齡 C57BL/6JNarl (不同管餵接種濃度，每組  $n=4$ ) 試驗小鼠，以管餵接種的方式給予試驗小鼠 NTUH-K2044(K1)，濃度為  $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  CFU/mL，每隻管餵 0.2 mL，再與無特定病原 8 週齡 C57BL/6JNarl 小鼠同籠飼養一週後，結果發現死亡率分別為 0%、25%、75% ( $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$  CFU/mL)，而腸道內定植克雷伯氏肺炎桿菌的比率分別為 25%、100、100%，而管餵接種  $5 \times 10^4$  CFU/mL 之 NTUH-K2044 (K1) 腸道菌相的變化如表 6。

## 4. 使用已經於腸道內定植 NTUH-K2044 (K1) 的試驗小鼠與無特定病原菌試驗小鼠同籠飼養

使用無特定病原菌 8 週齡 C57BL/6JNarl ( $n=3+2$ ) 試驗小鼠與 1 隻腸道中已定植 NTUH-K2044 (K1) 的 C57BL/6JNarl 小鼠同籠飼養 1 周後分開，於一開始

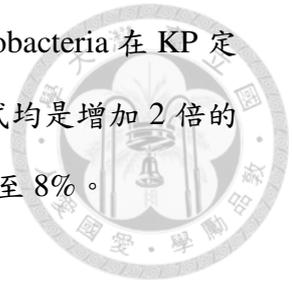
同籠飼養前先採取糞便檢體 D0，以培養的方式計算 D0 之腸道微生物相的總類及數量；並且於同籠飼養後的 D3、D7、D14、D28 再次採取試驗小鼠糞便檢體，使用培養的方式檢測腸道內是否有定植克雷伯氏肺炎桿菌，並且計算腸道微生物相的總類及數量。結果顯示無特定病原菌試驗小鼠死亡率為 0%，且於 D7 時腸道內定植克雷伯氏肺炎桿菌的比率為 80%，而於 D14 時定植比率為 100%，且可持續定植克雷伯氏肺炎桿菌於腸道內至 D48。而我們使用同籠飼養的方式，使試驗小鼠腸道中定植克雷伯氏肺炎桿菌，死亡率約為 7.7% (6/78)，而 D14 後的定植率為 100%，且克雷伯氏肺炎桿菌至少可以定植於試驗小鼠腸道中 1 年的時間。

### (三) 克雷伯氏肺炎桿菌定植前後對腸道微生物相的影響

F/B 比率被廣泛認為對維持正常腸道菌相或是免疫系統穩定具有重要影響，因此 F/B 比率的增加或減少被認為是腸道生態失衡，其中比率若是增加通常與肥胖有關，而比率若是減少通常與炎症性腸病 (Inflammatory bowel disease, IBD) 有關 (Stojanov *et al.*, 2020)。

在成功建立具有克雷伯氏肺炎桿菌 (NTUH-K2044, K1) 定植於腸道中的試驗小鼠動物模式後，需要比較克雷伯氏肺炎桿菌定植前後的腸道微生物相，因此使用兩種方式做比較，分別為腸道微生物相培養及次世代定序儀檢測，結果如圖 12 所示，可以發現在尚未定植 KP 之前，使用培養方式的無特定病原試驗小鼠腸道微生物相，F/B 比例為 15.12% (圖 12 A1)，使用 NGS 則為 16.05% (圖 12 B1)，而在定植 KP 後，不論使用培養或是 NGS 均發現腸道微生物相的改變，培養方式的 F/B 比例為 66.10% (圖 12 A2)，NGS 則為 38.10% (圖 12 B2)；由結果顯示，在未定植 KP 前 F/B 的比例均約為 15% 左右，兩種方式比較差異不大，但是於定植 KP 後的 F/B 比例就差別較大，其 F/B 的比例結果均是以上升為主，而其造成差異的可能結果是因為 NGS 為使用微生物 DNA 擴增後的結果，便是將腸道中不論死亡或是存活微生物均計算出來，而培養的方式則僅能將存活及適

合於培養基上生長的微生物培養計算，因此會有差異；而 Proteobacteria 在 KP 定植前後也是出現比例增加的趨勢，不論是培養或是 NGS 的方式均是增加 2 倍的比例，培養的方式由 1% 增加至 2%，NGS 的方式則由 4% 增加至 8%。



#### (四) 使用疫苗接種預防 KP 定植於腸胃道

使用無特定病原 5 週齡 C57BL/6JNarl ( $n=17$ ) 試驗小鼠，將試驗小鼠分為三組（試驗對照組  $n=2$ ，佐劑對照組  $n=5$ ，疫苗+佐劑接種試驗組  $n=10$ ），每周肌肉注射 1 次，連續三周後，再將試驗小鼠與腸道中已定植 KP 的試驗小鼠同籠飼養一周，於同籠飼養後的 D1、D2、D3、D5、D7、D14 及 D21 採取糞便檢體，以培養的方式確定腸道內是否定植 KP，試驗結果如表 7 所示，試驗小鼠死亡率為 6%；在對照組（沒有注射疫苗及佐劑， $n=1$ ，1 隻試驗小鼠於同籠後 3 天死亡）中，於同籠第 2 天腸胃道中即出現 KP 至試驗結束（21 天），且 KP 數量隨著時間漸漸增加，由 D2 的  $1 \times 10^3$  CFU/g 增加至 D21 的  $1 \times 10^5$  CFU/g；在佐劑對照組（僅肌肉注射佐劑， $n=5$ ）中，也是於同籠第 2 天腸胃道中即出現 KP 機率為 20%，第三天出現 KP 的機率增加到 80%，至 D7 即為 100% 有 KP，且糞便檢體中 KP 的數量與對照組差異不大；而在疫苗+佐劑接種試驗組（肌肉注射疫苗加上佐劑， $n=10$ ）中，於同籠後第三天才在糞便檢體中觀察到 KP，且出現機率為 20%，其後慢慢增加於 D14 才有 100% 的出現機率；由本次試驗結果得知，肌肉注射疫苗可以減緩 KP 在腸胃道中的定植，但是無法預防 KP 定植於腸胃道中，不過於試驗期 D21 天的 KP 數量顯示，肌肉注射疫苗可以減少 KP 在腸胃道中定植的數量，且疫苗注射後可能可以降低死亡率；不過因為接種疫苗預防 KP 定植於腸胃道中的預試驗，為一個初步測試的動物試驗，試驗動物使用數量較小，僅能夠了解疫苗接種的大概保護作用，試驗本身不具有統計上的意義。

(五) 觀察兩種噬菌體治療對於移除腸道中定植的 KP 及對於腸道中其它微生物相的影響

Ley 等人於 2005 年提出小鼠腸道中有 85% 的腸道微生物在人類腸道中找不到，而 2015 年 Nguyen 等人也提出人類及小鼠的腸道菌相的差異，因此我們使用含有或外加克雷伯氏肺炎桿菌的人類腸道菌相建立於小鼠腸道中，再使用噬菌體治療，用來移除腸道中的克雷伯氏肺炎桿菌，並且了解噬菌體的治療對於人源性腸道微生物相的影響。

1. 使用 NTUH-K2044 (K1) 搭配人源性腸道微生物相定植小鼠腸道

在噬菌體治療後 D0、D3、D7、D14、D35 收集試驗小鼠糞便檢體，從糞便檢體中萃取微生物總 DNA 後，並使用 PCR 檢測 KP 的定植，結果如表 8 所示。在所有陰性對照組 ( $n=4$ ) 的人源性腸道微生物相試驗小鼠糞便檢體中均沒有 KP 出現，而在管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 及人源性腸道微生物相後的試驗小鼠存活率約為 56%，剩下存活的試驗小鼠中腸道定植 NTUH-K2044 (K1) 為 100%，所有未經噬菌體治療 (試驗對照組， $n=3$ ) 的人源性腸道微生物相試驗小鼠糞便檢體，至試驗結束 (D35) 均檢測到克雷伯氏肺炎桿菌；而在單獨以  $\phi$ K1-1 治療的試驗小鼠中 ( $n=2$ )，也是至試驗結束均檢測到克雷伯氏肺炎桿菌；在管餵接種  $\phi$ K1-1 和  $\phi$ KO1-1 的試驗小鼠中 ( $n=6$ )，其中 4 隻也是至試驗結束均檢測到克雷伯氏肺炎桿菌；其中 1 隻在噬菌體治療後的 3 天內沒有被 PCR 檢測到克雷伯氏肺炎桿菌，但是之後均有被 PCR 檢測到；最後的 1 隻小鼠，在噬菌體治療後直到試驗結束，均沒有被檢測到克雷伯氏肺炎桿菌；而於管餵接種加上腹腔內注射  $\phi$ K1-1 和  $\phi$ KO1-1 治療的試驗小鼠中 ( $n=2$ )，表現出 1 週內無法被 PCR 檢測到克雷伯氏肺炎桿菌，但是在 D14 時被 PCR 檢測出克雷伯氏肺炎桿菌。由以上的結果可以得知，管餵接種  $\phi$ K1-1 和  $\phi$ KO1-1 約有 17% 左右的機率可以在試驗期間 (噬菌體接種後 35 天內)，以 PCR 檢測無法被檢測出克雷伯氏肺炎桿菌，然而使用管餵接種加上腹腔內注射  $\phi$ K1-1 和  $\phi$ KO1-1 治療的結果並沒有較單獨只

使用口服接種的效果好，甚至於噬菌體治療 14 天後，全部的試驗小鼠均被 PCR 檢測到克雷伯氏肺炎桿菌。

依據上述的試驗結果得知，使用管餵接種  $\phi$ K1-1 和  $\phi$ KO1-1 用來清除腸道內的 KP 效果不如預期，所以我們再次進行體外試驗的噬菌體殺傷測定確認 NTUH-K2044 (K1) 的殺傷力，於 37°C 下試管中培養 NTUH-K2044 (K1) 菌液 4 小時後，菌液中加入  $\phi$ K1-1 和  $\phi$ KO1-1 (MOI=1000)，混合均勻後，37°C 下搖晃培養過夜，再取其中 1mL 菌液塗抹於 LB 培養基上，再次於 37°C 下培養過夜，結果如圖 13 所示。培養基上出現 3 種大小及黏性不同的菌落，挑出其中不同的單一菌落於 37°C 下的 LB 培養液培養 4 小時後，取 1 mL 菌液加入 3 mL 的 Top agar 混合均勻，平鋪於 LB 培養基上，待其凝固後，分別於不同區域滴上不同的噬菌體 ( $\phi$ K1-1 或  $\phi$ KO1-1)，再於 37°C 下培養過夜，結果發現，每隻菌株不論使用  $\phi$ K1-1 或  $\phi$ KO1-1 均會產生噬菌斑，而再次於 LB 培養基上培養，菌落型態則恢復成為大而且具有黏性的菌落，因此推測 NTUH-K2044 (K1) 可能因為某些原因將 K1 型莢膜及 O1 型脂多醣不表現於微生物表面，用來躲避噬菌體的感染，在躲過噬菌體的感染後又會恢復成原本的表現型，因此我們將試驗目標轉針對於抗藥性的 KP 菌株。

## 2. $\phi$ K64-1 和 $\phi$ KO1-1 消除 K64 莢膜型克雷伯氏肺炎桿菌的體外試驗

使用體外試驗進行單獨及聯合使用針對兩種不同微生物表面結構的噬菌體 ( $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1)，對兩種 K64 莢膜型的克雷伯氏肺炎桿菌菌株 (CB-0001 和 S84) 進行消除試驗。使用病毒感染 (MOI) 為 1000、100 及 10 下， $\phi$ K64-1 殺死了大部分的 K64。噬菌體感染後的存活細菌 (即  $\phi$ K64-1 無法感染者) 是莢膜陰性菌株，會形成相對非粘液型菌落，Alcian blue staining 呈陰性 (數據未顯示)。然而，這些莢膜陰性的菌株可以被  $\phi$ KO1-1 感染消除， $\phi$ KO1-1 針對克雷伯氏肺炎桿菌表面 LPS 的 O1 抗原 (Fang *et al.*, 2004)。雖然  $\phi$ KO1-1 不能感染具有完整莢膜的野生型 K64 菌株，但  $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 的組合在 MOI 為

1,000 及 100 下，感染殺死了所有的 K64 菌株。不過在 MOI=10 的情況下，只有感染殺死了一半的 K64 菌株（圖 14A）。在體外試驗中，以噬菌體進行感染後，存活的細菌菌株均是沒有莢膜的細菌。野生型對  $\phi$ K64-1 敏感，而沒有莢膜的突變細菌對  $\phi$ K64-1 有抗性，但是對  $\phi$ KO1-1 敏感（圖 14B）。

### 3. 使用 K64 莢膜型 KP 搭配人源性腸道微生物相定植小鼠腸道

在噬菌體治療後 D0、D7、D14、D21、D28、D35、D56 收集試驗小鼠糞便檢體，從糞便檢體中萃取微生物總 DNA 後，並使用 PCR 檢測 KP 的結果，如表 9 所示。試驗小鼠在管餵接種人源性腸道微生物相及 CRKP 後的存活率為 100%，並且在定植 CRKP 一周後進行噬菌體治療，在所有未處理噬菌體（試驗對照組）及僅以管餵接種  $\phi$ KO1-1 治療的人類腸道菌相試驗小鼠糞便檢體中，從始至終均檢測到克雷伯氏肺炎桿菌；而在單獨管餵接種  $\phi$ K64-1 治療的試驗小鼠中，克雷伯氏肺炎桿菌在噬菌體治療後的 2 週內無法被 PCR 檢測到，但在治療的 3 週後再次被 PCR 檢測到。而在 28 隻管餵接種  $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 的試驗小鼠中，其中一隻試驗小鼠從始至終均檢測到克雷伯氏肺炎桿菌；其中一隻試驗小鼠在噬菌體治療後的一周內沒有被 PCR 檢測到克雷伯氏肺炎桿菌，但是之後均有被 PCR 檢測到；其中 11 隻試驗小鼠在 2 週內無法被 PCR 檢測到克雷伯氏肺炎桿菌，但是在治療 3 週後，克雷伯氏肺炎桿菌再次被檢測到；最後的 15 隻試驗小鼠，在噬菌體治療後直到試驗結束，均沒有被檢測到克雷伯氏肺炎桿菌。而於管餵接種加上腹腔內注射  $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 治療的 16 隻試驗小鼠中，8 隻試驗小鼠表現出 2 週內無法被 PCR 檢測到克雷伯氏肺炎桿菌，而其餘 8 隻試驗小鼠在 56 天內為克雷伯氏肺炎桿菌無法被檢測出來。由以上的結果可以得知，管餵接種  $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 約有 52.3% 左右的機率可以在試驗期間（噬菌體接種後 56 天內），以 PCR 檢測 CRKP 無法被檢測到，然而使用管餵接種加上腹腔內注射  $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 治療的結果並沒有較單獨只使用管餵接種的效果好，試驗結果也是大約 50% 的機率在試驗期間以 PCR 檢測不到 CRKP。

(六) 使用 Real-time PCR 檢測腸道中 CRKP、 $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 數量

挑選使用 K64 莢膜型 KP 搭配人源性腸道微生物相定植小鼠腸道試驗，組別第 IV 組中 6 隻試驗小鼠的微生物總 DNA (D0、D7、D14、D28、D56) 進行 Real-time PCR 檢測 (6 隻試驗小鼠為噬菌體處理後的第 56 天檢體採樣 PCR 結果，其中 3 隻試驗小鼠 CRKP 陽性、3 隻試驗小鼠 CRKP 陰性檢體)，其檢測結果如圖 15 所示。在所有未經噬菌體治療的人源性腸道菌相的試驗小鼠中，克雷伯氏肺炎桿菌的平均數量為  $3,480 \pm 473$  CFU/g (圖 15A)。Real-time PCR 檢測為陰性時，PCR 的結果也是陰性，因此可以證實 PCR 和 real-time PCR 結果是一致的。而在使用  $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 治療後，試驗小鼠的糞便檢體中檢測出的  $\phi$ K64-1 在治療後 7 天達到最高峰，平均為  $26,669 \pm 18,717$  PFU/g，不過在治療後的第 14 天下降至  $753 \pm 538$  PFU/g，而在治療後的第 56 天幾乎檢測不到 (圖 15B)。但是  $\phi$ KO1-1 則不同，在噬菌體治療後第 7 天平均達到  $82,976 \pm 9,553$  PFU/g，第 14 天增加到  $87,839 \pm 6,224$  PFU/g，此後繼續增加，在第 56 天仍然有很高的數量，平均達到  $125,125 \pm 18,676$  PFU/g (圖 15C)。

(七) 噬菌體治療後試驗小鼠腸道微生物相的變化

挑選使用 K64 莢膜型 KP 搭配人源性腸道微生物相定植小鼠腸道試驗，組別第 IV 組中 4 隻試驗小鼠的微生物總 DNA (D0、D7、D14、D56) 進行 16S rDNA 測序檢測 (4 隻試驗小鼠為噬菌體處理後的第 56 天檢體採樣 PCR 結果，其中 1 隻試驗小鼠 CRKP 陽性 (Fail 組，FD0、FD7、FD14、FD56)、3 隻試驗小鼠 CRKP 陰性檢體 (SD0、SD7、SD14、SD56)，本試驗的 16S rDNA 測序結果已經上傳至 NCBI (PRJNA766775)。香農多樣性指數 (Shannon's diversity index) 通常用於表示群落中的物種多樣性，無菌試驗小鼠以管餵接種的方式接種人源性腸道微生物菌相，因此在噬菌體治療前香農多樣性指數最高 (SD0)，然後差異在 SD14 至 SD56 逐漸變小 (圖 16A)，香農多樣性指數逐漸變小的原因可能是因為

人源性的腸道菌相不易在老鼠腸道中定植，所以微生物的多樣性會逐漸降低，後期仍保留在小鼠腸道中的微生物大多是可以適應小鼠腸道的微生物相，另外，也有可能是因為噬菌體的處理， $\phi$ K64-1 可以辨識微生物表面 K64 抗原的莢膜，因為腸道微生物較少此抗原的莢膜，所以  $\phi$ K64-1 的數量才會急遽下降；而  $\phi$ KO1-1 可以辨識微生物表面 O1 抗原的脂多醣，在腸道微生物中有著較多此類抗原，因此  $\phi$ KO1-1 的數量才會維持恆定，也因為  $\phi$ KO1-1 的存在，可能造成了腸道微生物多樣性的改變，進而影響到了香農多樣性指數逐漸變小。F/B 比率在噬菌體處理前最高 (SD0)。然而，SD14 和 SD56 之間沒有顯著差異，在 SD56 時降至 0.5 以下，表明胃腸道微生物群可能逐漸恢復平衡 (圖 16B)。

主成分分析 (Principal components analysis, PCA) 是一種降維方法，通常用於降低大型數據集的維數，方法是將大量變量轉換為仍包含大型數據集中大部分信息的較小變量。各組的 PCA 組成相似度包括 PC1 13.98% 及 PC2 11.85%，而 Fail 組與其他組 SD0、SD7、SD14 和 SD56 (圓圈內) 差異很大 (圖 17A)，這說明了腸道內定植了 CRKP 有一定程度影響到腸道微生物相；另外，我們可以從 Welch 的 t 檢驗分析中了解到，不同群體腸道微生物相的種類存在顯著差異，擷取前五個微生物物種在噬菌體治療成功或是失敗組的腸道微生物群中存在最顯著差異，這五個微生物物種分別是 *Blautia hydrogenotrophica*、*Longicatena caecimuris*、*Neglecta timonensis*、*Butyricimonas paravirosa*、*Enterocloster lavalensis* (圖 17B)。最近，大量研究集中在 *Blautia. Spp.* (包括 *B. hydrotrophica*) 的益生菌作用上，例如生物轉化及其調節宿主健康和緩解代謝綜合症的能力 (Liu *et al.*, 2021)，而 *B. hydrotrophica* 物種的豐富度在糖尿病前期受試者中較低，而低聚木糖的豐富度增加 (Yang *et al.*, 2015)，因此，*B. hydrotrophica* 的豐富度可能與糖尿病前期的狀況有關。而 *L. caecimuris* 於 2016 年在小鼠的腸道微生物群中被分離出來 (Lagkouvardos *et al.*, 2016)，*N. timonensis*、*B. paravirosa*、*E. lavalensis* 也分別於 2016 (Bessis *et al.*, 2016)、2014 (Sakamoto *et al.*, 2014) 及 2009 (Domingo

*et al.*, 2009) 年在人類的腸道微生物群中被分離出來，而 *E. lavalensis* 在 2020 年被重新分類 (Haas and Blanchard, 2020)，但是到目前為止 *L. caecimuris*、*N. timonensis*、*B. paravirosa* 及 *E. lavalensis* 均未被多加研究與疾病或是健康有關。



#### (八) 兩種噬菌體聯合治療後對 K64 莢膜型 CRKP 的噬菌斑檢測

在聯合噬菌體治療失敗 56 天後的試驗小鼠糞便檢體中分離及純化出 10 株 KP，並通過 PCR 確定為 K64 莢膜型。我們觀察到經過噬菌斑的體外試驗結果得知，試驗小鼠腸道中分離純化出來的 K64 莢膜型 CRKP，全部皆可被  $\phi$ K64-1 (噬菌體濃度為  $1 \times 10^6$  及  $1 \times 10^5$  PFU/mL) (圖 18) 感染，證實 K64 莢膜型 CRKP 於試驗小鼠腸道中沒有其他變異。

#### 四、 結論



我們已經成功的建立了在腸道中被 KP 定植的試驗小鼠模型，也知道 KP 在腸道中定植前後會影響腸道微生物相。在無菌試驗小鼠與無特定病原菌試驗小鼠共同飼養的治療組中，無菌試驗小鼠最初沒有腸道微生物菌相，因此我們發現微生物菌相的培養逐漸從一開始（D7）只培養出好氧菌（如 Streptococcaceae）到試驗後期（D28）可以培養到厭氧菌（如 Bacteroidaceae）。然而，腸道微生物菌相逐漸達到平衡後，能夠被培養到的 NTUH-K2044（K1）數量變得更低（由 D7 的  $1 \times 10^8$  CFU/g 左右降低至 D28 的  $1 \times 10^6$  CFU/g 左右數量，降低約 100 倍）。後續我們用已經定植 NTUH-K2044（K1）於腸道的無特定病原菌試驗小鼠與一般無特定病原菌試驗小鼠同籠飼養的結果顯示，無論是已經定植或是後來才定植 NTUH-K2044（K1）的試驗小鼠，其腸道微生物相最後的結果與圖 12 A2 差異不大（數據未顯示），而且直至飼養一年後仍然可以檢測到 NTUH-K2044（K1）。而我們比較了 NTUH-K2044（K1）定植成功前後小鼠的腸道微生物相，發現在培養和 16S rRNA 基因定序方法中，Bacteroidetes 減少，Firmicutes 增加。Mouzaki 等人（2013）指出，非酒精性脂肪性肝炎（Nonalcoholic steatohepatitis, NASH）的存在與糞便中 Bacteroidetes 的百分比之間成負相關，且與飲食或是身體質量指數（Body Mass Index, BMI）無相關性，這表明腸道微生物相可能在發展非酒精性脂肪性肝疾病（Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD）中佔有一席之地。在人類的研究中發現，肥胖個體的 Firmicutes 與 Bacteroidetes 的比率（F/B 比率）明顯高於瘦個體，Ley 等人（2005 及 2006）指出，隨著研究時間的推移來看，肥胖個體的 F/B 比率下降與體重減輕呈現正相關；另一項研究也指出，F/B 比率可能是顯示健康和疾病的重要指標（Cho and Blaser, 2012）。

人類正在重新進入無抗生素時代，因為微生物的抗藥性逐漸增加，替代抗生素的方法開發已成為現代醫學和生物技術的重要任務之一。在發現和廣泛使用抗生素之前，已經有研究人員提出可以通過使用噬菌體來預防和/或治療細菌感

染 (Alexander *et al.*, 2001)。而我們也已經成功的建立了在無菌試驗小鼠腸道中定植人源性腸道微生物相並且含有 NTUH-K2044 (K1) 的小鼠模型，進而使用  $\phi$ K1-1 及  $\phi$ KO1-1 治療，希望能夠移除腸道中的 NTUH-K2044 (K1)，試驗結果發現在管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 及人類糞便稀釋液後的試驗小鼠存活率約為 56%，而使用 PCR 檢測結果發現，存活的試驗小鼠腸道中 100% 定植 NTUH-K2044 (K1)，而於管餵接種  $\phi$ K1-1 和  $\phi$ KO1-1 的試驗小鼠中，在 D3 檢體中可能無法檢測出 NTUH-K2044 (K1)，但在 D7 又可以被檢測出來，由試驗結果得知，管餵接種  $\phi$ K1-1 和  $\phi$ KO1-1 約有 17% 左右的機率可以在試驗期間（噬菌體接種後 35 天內）以 PCR 檢測不到 NTUH-K2044 (K1) (表 8)。我們進一步發現 NTUH-K2044 (K1) 的菌落形態在  $\phi$ K1-1 和  $\phi$ KO1-1 治療後有所不同，我們推測這是 NTUH-K2044 (K1) 避免噬菌體感染的機制。細菌已經進化出防禦和調節機制來應對各種環境壓力，包括病毒（噬菌體）的攻擊，例如 Devaki 等人 (2011) 發現的多功能 CRISPR-Cas 系統，不過這次試驗的結果下，CRISPR-Cas 系統可能不是主要原因，因為我們使用了可以識別 NTUH-K2044 (K1) 菌株 CPS ( $\phi$ K1-1) 及 LPS ( $\phi$ KO1-1) 的噬菌體，並且觀察到 NTUH-K2044 (K1) 菌落在不同形態下具有不同的粘性及菌落型態 (圖 13)，因此我們推測 NTUH-K2044 (K1) 降低 CPS 及 LPS 的表達以避免噬菌體感染。因此，我們將進一步使用其他不同莢膜型的 KP 進行試驗。

之前 2015 年收集的健檢糞便檢體結果指出，K64 莢膜型是台灣當時最流行的 CRKP 類型 (Pan *et al.*, 2015b)；因此，我們選擇 K64 莢膜型克雷伯氏肺炎桿菌 CB-0001 作為進一步研究的菌株。試驗結果顯示，無菌試驗小鼠無論使用含有 K64 莢膜型 KP 或是外加 CB-0001 (K64) 菌株的人類糞便稀釋液進行腸道微生物相的移植，無菌試驗小鼠存活率為 100%，而且也是 100% 會定植 K64 於試驗小鼠腸道中，而後使用噬菌體  $\phi$ K64-1 治療，只能暫時抑制 K64 菌株，此結果與先前在噬菌體治療研究中的發現一致。然而如 PCR 的結果所示 (表 9)，聯合兩

種噬菌體治療下 52.3% 的試驗小鼠可以長期（56 天）的將 K64 莢膜型 CRKP 於腸道中去除；而另外 47.7% 的試驗小鼠中，K64 莢膜型 CRKP 在噬菌體治療 3 週後再次出現，表現出短暫的抑制結果（約 2 週），這與單獨使用  $\phi$ K64-1 治療觀察到的結果相似。而前人研究指出，將三種噬菌體混合後，使用於 LF82 定植的 CEABAC10 基因轉殖小鼠上，短暫數週的時間，顯著減少了黏附侵入型大腸桿菌（Adherent-invasive Escherichia coli, AIEC）的數量和腸道切片中粘附菌群的出現（Galtier *et al.*, 2017），此結果與我們的研究相類似。儘管糞便微生物移植已被證實能夠成功根除耐藥菌株（Davido *et al.*, 2017；Feehan and Garcia-Diaz, 2020），但是未知及潛在的副作用使這種方法不太讓人接受，而且 FMT 治療方式比使用聯合噬菌體療法更為複雜。在我們的體外研究中，未檢測到對  $\phi$ KO1-1 和  $\phi$ K64-1 均具有抗性的突變體（圖 18），但是仍有接近一半的試驗小鼠沒有將 K64 莢膜型 CRKP 清除。 $\phi$ K64-1 對 K64 具有特異性，因此當 K64 減少並且  $\phi$ K64-1 迅速減少時（圖 15B），這可能是造成 K64 無法徹底淘汰的原因；而腸道微生物相中的 O1 脂多醣會被  $\phi$ KO1-1 識別，因此  $\phi$ KO1-1 的數量仍然保持不變（圖 15C）。聯合噬菌體治療失敗可能是由於  $\phi$ K64-1 劑量不足（由於試驗小鼠的胃容量有限，通過管餵接種方式允許  $\phi$ K64-1 的最大劑量為  $1 \times 10^9$  PFU/mL）或是投藥的時間不夠久（本次試驗管餵接種噬菌體為隔天 1 次，連續 3 次），所以如果可以提高噬菌體的劑量濃度或是增加管餵接種噬菌體的次數，可能會在試驗小鼠中達到更高清除 CRKP 的效率，所以在人類患者的噬菌體治療中，更高劑量的口服接種也可能達到更高的成功率。

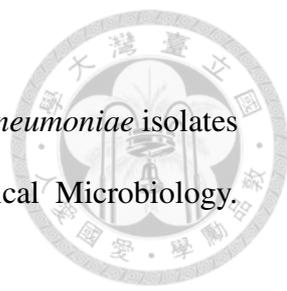
使用抗生素治療用來消除或抑制腸道中的細菌種類，最大的一個副作用是改變了腸道微生物相的組成；我們研究中使用聯合噬菌體治療，在治療期間和治療後引起的微生物相變化較少，並且 F/B 比率在治療後 8 周恢復到治療前狀態（F/B 比率約為 0.5）。這表明聯合噬菌體治療不僅具有減少或消除 CRKP 的潛力，而且在治療與腸道微生物生態失調和全身性疾病相關的其他細菌物種方面也

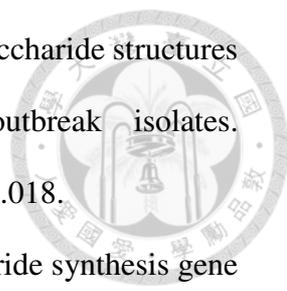
具有巨大潛力。總而言之，在試驗小鼠的模式中，使用兩種噬菌體  $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 的組合治療，有 52.3% 的試驗小鼠的腸道中，會長期（8 周的試驗期）去除 CRKP，而且腸道微生物群在處理噬菌體治療的前後，沒有很大程度的改變。這些數據表明，使用針對細菌不同表面構造的兩種噬菌體可以成功清除腸道某一種特定細菌，因此可能用來治療某些腸道菌相失衡相關的疾病。

## 五、參考文獻

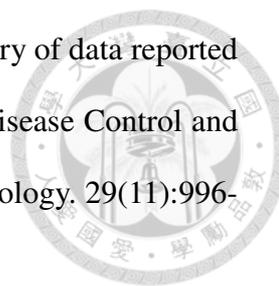
1. Bowers *et al.* (2016). KlebSeq, a diagnostic tool for surveillance, detection, and monitoring of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology* 54(10):2582-96. DOI: 10.1128/jcm.00927-16.
2. Fang *et al.* (2007). *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: An emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess. *Clinical Infectious Diseases*. 45(3):284-293. DOI: 10.1086/519262.
3. Rahim *et al.* (2019). Monomicrobial *Klebsiella pneumoniae* necrotizing fasciitis: An emerging life-threatening entity. *Clinical Microbiology and Infection*. 25(3): 316-323. DOI: 10.1016/j.cmi.2018.05. 008.
4. R. Podschun and U. Ullmann. (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(4):589-603. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>.
5. Carpenter *et al.* (1990) *Klebsiella pulmonary* infections: occurrence at one medical center and review. *Reviews of Infectious Diseases*. 12(4):672-682. DOI: 10.1093/clinids/12.4.672.
6. Jong *et al.* (1995) Rapidly fatal outcome of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in alcoholics. *Chest*. 107(1):214-7. DOI: <https://doi.org/10.1378/chest.107.1.214>.
7. H. Sahly and R. Podschun. (1997) Clinical, bacteriological, and serological aspects of *Klebsiella* infections and their spondylarthropathic sequelae. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 4(4): 393–399. DOI: 10.1128/cdli.4.4.393-399.
8. Ko *et al.* (2002) Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerging Infectious Diseases*. 8(2):160-6.

DOI:10.3201/eid0802.010025.

- 
9. Lau *et al.* (2000) Identification of a major cluster of *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with liver abscess in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*. 38(1):412-4. DOI: 10.1128/JCM.38.1.412-414.
  10. L. Ehrenworth and H. Baer (1956) The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae* for mice: the relationship to the quantity and rate of production of type-specific capsular polysaccharide. *Journal of Bacteriology*. 72(5):713-7. DOI:10.1128/jb.72.5.713-717.
  11. Tzeng *et al.* (2002) Endotoxin of *Neisseria meningitidis* composed only of intact lipid A: inactivation of the meningococcal 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid transferase. *Journal of Bacteriology*. 184 (9): 2379-88. DOI:10.1128/JB.184.9.2379-2388.
  12. Vinogradov *et al.* (2002) Structures of lipopolysaccharides from *Klebsiella pneumoniae*. Elucidation of the structure of the linkage region between core and polysaccharide O chain and identification of the residues at the non-reducing termini of the O chains. *The Journal of Biological Chemistry*. 277(28):25070-81. DOI: 10.1074/jbc.M202683200.
  13. McCallum *et al.* (1989) A high-molecular-weight fraction of smooth lipopolysaccharide in *Klebsiella* serotype O1:K20 contains a unique O-antigen epitope and determines resistance to nonspecific serum killing. *Infection and Immunity*. 57(12):3816-22. DOI: 10.1128/IAI.57.12.3816-3822.
  14. Merino *et al.* (1992) Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infection and Immunity*. 60(6): 2529-2535. DOI: 10.1128/iai.60.6.2529-2535.
  15. Li *et al.* (2014) Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*. 9(9):1071-81. DOI:10.2217/fmb.14.48.

- 
16. Joanna *et al.* (2013) The capsular polysaccharide and lipopolysaccharide structures of two carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* outbreak isolates. Carbohydrate Research. 369:6-9. DOI: 10.1016/j.carres.2012.12.018.
17. Y. J. Pan *et al.* (2015a). Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. Scientific Reports. 5(1):15573. DOI: 10.1038/srep15573.
18. Singh *et al.* (2022) LPS O Antigen Plays a Key Role in *Klebsiella pneumoniae* Capsule Retention. Microbiology Spectrum. 10(4):1-18. DOI:10.1128/spectrum.01517-21.
19. Tricia *et al.* (1998) Characterization of the Type 3 Fimbrial Adhesins of *Klebsiella* Strains. Infection and Immunity. 66(6):2887-94 DOI:10.1128/IAI.66.6.2887-2894.
20. Domenico *et al.* (1994) Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. Infection and Immunity. 62(10):4495-9. DOI:10.1128/IAI.62.10.4495-4499.
21. Domenico *et al.* (1989) Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. Infection and Immunity. 57(12):3778-82. DOI:10.1128/iai.57.12.3778-3782.
22. Domenico *et al.* (1999) Surface Antigen Exposure by Bismuth Dimercaprol Suppression of *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysaccharide. Infection and Immunity. 67(2):664-9. DOI: 10.1128/IAI.67.2.664-669.
23. Matsumoto *et al.* (1990) Increased renal scarring by bacteria with mannose-sensitive pili. Urological Research. 18(5):299-303. DOI: 10.1007/BF00300774.
24. Robert C. F. and Charles P. D. (1982) *Klebsiella pneumoniae*-induced experimental pyelitis: the effect of piliation on infectivity. The Journal of Urology. 128(1):197-201. DOI: 10.1016/s0022-5347(17)52817-7.
25. Martino *et al.* (1996) A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing

- Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infection and Immunity*. 64(6): 2266–2273. DOI: 10.1128/iai.64.6.2266-2273.
26. Hsieh *et al.* (2008) Serum-Induced Iron-Acquisition Systems and TonB Contribute to Virulence in *Klebsiella pneumoniae* Causing Primary Pyogenic Liver Abscess. *The Journal of Infectious Diseases*. 197(12):1717–27. DOI: 10.1086/588383.
27. Yuan *et al.* (2020) RcsAB and Fur Coregulate the Iron-Acquisition System via entC in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 in Response to Iron Availability. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10:282. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00282.
28. Taiwan Centers for Disease Control. Annual Report of Nosocomial Infections Surveillance System (2016). Accessed Jan 27, 2018.
29. Lepage *et al.* (2013) A metagenomic insight into our gut's microbiome. *Gut*. 62(1):146-58. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301805.
30. Lee *et al.* (2016) Frozen vs Fresh Fecal Microbiota Transplantation and Clinical Resolution of Diarrhea in Patients with Recurrent *Clostridium difficile* Infection: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 315(2):142-9. DOI: 10.1001/jama.2015.18098.
31. Millan *et al.* (2016) Fecal Microbial Transplants Reduce Antibiotic-resistant Genes in Patients with Recurrent *Clostridium difficile* Infection. *Clinical Infectious Diseases*. 62(12):1479-86. DOI: 10.1093/cid/ciw185.
32. Bowers *et al.* (2016) KlebSeq: A Diagnostic Tool for Surveillance, Detection, and Monitoring of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 54(10):2582-96. DOI: 10.1128/JCM.00927-16.
33. A. Srinivasan and J. B. Patel. (2008). *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing organisms: An ounce of prevention really is worth a pound of cure. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 29(12):1107-09. DOI: 10.1086/594129.
34. Hidron *et al.* (2009). NHSN annual update: Antimicrobial-resistant pathogens



- associated with healthcare-associated infections: Annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 29(11):996-1011. DOI: 10.1086/591861.
35. Sisto *et al.* (2012). Carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* from micronet network hospitals, Italy, 2009 to 2012. *European Communicable Disease Bulletin*. 17(33):20247. DOI: 10.2807/ese.17.33.20247.
36. Chiu *et al.* (2013) National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: The emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase. *PLoS One*. 8(7):e69428. DOI: 10.1371/journal.pone.0069428.
37. Falagas *et al.* (2014). Deaths attributable to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Emerging Infectious Diseases*. 20(7):1170-5. DOI: 10.3201/eid2007.121004.
38. E. J. Septimus and M. L. Schweizer. (2016) Decolonization in Prevention of Health Care-Associated Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 29(2):201-22. DOI: 10.1128/CMR.00049-15.
39. Saidel-Odes *et al.* (2012) A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of selective digestive decontamination using oral gentamicin and oral polymyxin E for eradication of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage. *Infection Control and Hospital Epidemiology*. 33(1):14-9. DOI: 10.1086/663206.
40. R. L. Bruce and J. J. Bull. (1996) Phage Therapy Revisited: The Population Biology of a Bacterial Infection and Its Treatment with Bacteriophage and Antibiotics. *The American Naturalist*. 147(6):881-98. DOI: 10.1086/285884.
41. P. A. Barrowa and J. S. Soothill. (1997) Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends in Microbiology*. 5(7):268-71. DOI: 10.1016/S0966-842X(97)01054-8.

- 
42. d'Hérelles, Félix. (1917) Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentérique. Acad Sci Paris. 165(11):373-5.
43. R. M. Carlton. (1999) Phage therapy: past history and future prospects. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis (Warsz)*. 47(5):267-74. PMID: 10604231.
44. Kortright *et al.* (2019). Phage therapy: A renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell Host & Microbe*. 25(2):219–32. DOI: 10.1016/j.chom.2019.01.014.
45. G. Gasiunasa *et al.* (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(39):E2579–E2586. DOI: 10.1073/pnas.1208507109.
46. M. Jinek *et al.* (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 337(1096):816–21. DOI: 10.1126/science.1225829.
47. K. N. Lam *et al.* (2021). Phage-delivered CRISPR-Cas9 for strain-specific depletion and genomic deletions in the gut microbiome. *Cell Reports*. 37(5):109930. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109930.
48. H. W. Smith and M. B. Huggins. (1982) Successful Treatment of Experimental *Escherichia coli* Infections in Mice Using Phage: Its General Superiority over Antibiotics. *Society for General Microbiology*. 128(2):307-18. DOI: 10.1099/00221287-128-2-307.
49. C. R. Merrill *et al.* (1996) Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(8):3188-92. DOI: 10.1073/pnas.93.8.3188.
50. B. R. Levin and J. J. Bull. (1996) Phage Therapy Revisited: The Population Biology

- of a Bacterial Infection and Its Treatment with Bacteriophage and Antibiotics. The American Society of Naturalists. 147(6):881-98. DOI: 10.1086/285884.
51. M. Morita *et al.* (2002) Characterization of a virulent bacteriophage specific for *Escherichia coli* O157:H7 and analysis of its cellular receptor and two tail fiber genes. FEMS Microbiology Letters, 211(1):77-83. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11206.x.
52. S. Hesse *et al.* (2020). Phage resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 evolves via diverse mutations that culminate in impaired adsorption. mBio. 11(1):e02530-19. DOI: 10.1128/mBio.02530-19.
53. Jan 11, Hub staff report / Published; 2017 (2017-01-11). "The science is clear: Vaccines are safe, effective, and do not cause autism". The Hub. Retrieved 2019-04-16. <https://hub.jhu.edu/2017/01/11/vaccines-autism-public-health-expert/>.
54. "Vaccine Safety: The Facts". Healthy Children.org. Retrieved 2019-04-16. Last Updated 2021-11-22. <https://www.healthychildren.org/English/safety-prevention/immunizations/Pages/Vaccine-Safety-The-Facts.aspx>.
55. W. A. Orenstein *et al.* (1985). Field evaluation of vaccine efficacy. Bulletin of the World Health Organization. 63 (6): 1055–1068. PMID: PMC2536484.
56. S. S. Ellenberg and R.T. Chen. (1997) The complicated task of monitoring vaccine safety. Public Health Reports. 112(1):10–20. PMID: PMC1381831.
57. C. J. M. Melief *et al.* (2015) Therapeutic cancer vaccines. The Journal of Clinical Investigation. 125(9):3401-12. DOI:10.1172/JCI80009.
58. K. F. Bol *et al.* (2016) Prophylactic vaccines are potent activators of monocyte-derived dendritic cells and drive effective anti-tumor responses in melanoma patients at the cost of toxicity. Cancer Immunology, Immunotherapy. 65(3):327-339. DOI:10.1007/s00262-016-1796-7.
59. J. M. L. Brotherton. (2015). HPV prophylactic vaccines: lessons learned from 10

- years experience. *Future Virology*. 10(8):999–1009. DOI:10.2217/fvl.15.60.
60. I. H. Frazer (2014). Development and implementation of papillomavirus prophylactic vaccines. *Journal of Immunology*. 192(9):4007-11. DOI:10.4049/jimmunol.1490012.
61. H. Ledford (2020). What the immune response to the coronavirus says about the prospects for a vaccine. *Nature*. 585 (7823):20–21. DOI:10.1038/d41586-020-02400-7.
62. Vaccine Types. National Institute of Allergy and Infectious Diseases. 2012-04-03. Archived from the original on 2015-09-05. Retrieved 2015-01-27. <https://web.archive.org/web/20150905205720/http://www.niaid.nih.gov/topics/vaccines/Pages/typesVaccines.aspx>.
63. M. R. Badgett *et al.* (2002). Evolutionary Dynamics of Viral Attenuation. *Journal of Virology*. 76(20):10524-9. DOI:10.1128/JVI.76.20.10524-10529.
64. B. Pulendran and R. Ahmed. (2011). Immunological mechanisms of vaccination. *Nature Immunology*. 12(6):509-17. DOI:10.1038/ni.2039.
65. N. Petrovsky and J. C. Aguilar. (2004). Vaccine adjuvants: current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*. 82(5):488-96. doi:10.1111/j.0818-9641.2004.01272.x.
66. P. Parham. (2021). *The Immune System*. 5th Ed. W. W. Norton & Company. New York. ISBN-13. 978-0393533354.
67. H. J. Hedrich, and G. Bullock. (2004) *The Laboratory Mouse*. Elsevier Ltd. p.517-26. ISBN 978-0-12-336425-8. DOI:10.1016/B978-0-12-336425-8.X5051-1.
68. J. Hau *et al.* (2003) *Handbook of Laboratory Animal Science*, the Second Edition. Florida: CRC Press. ISBN-13.978-0849318931.
69. J. F. Crow and C. C. Little (2002), *Cancer and Inbred Mice*. *Genetics*. 161(4):1357-61. DOI: 10.1093/genetics/161.4.1357.

- 
70. R. Melina. (2022) Why Do Medical Researchers Use Mice? Live Science. Last updated 2022-02-19. <https://www.livescience.com/32860-why-do-medical-researchers-use-mice.html>.
71. M. A. Suckow *et al.* (2001) *The Laboratory Mouse*. Florida: CRC Press. ISBN 0-8493-0322-2. *The Mouse*.
72. S. M. Collins *et al.* (2012) The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*. 10:735–742. DOI:10.1038/nrmicro2876
73. N. Kamada *et al.* (2013) Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology*. 13:321–335. DOI:10.1038/nri3430.
74. B. O. Schroeder and F. Bäckhed. (2016) Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature Medicine*. 22:1079–1089. DOI:10.1038/nm.4185.
75. T. R. Sampson *et al.* (2016) Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*. 167(6):1469-1480.e12. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.018.
76. J. C. Park and S. H. Im. (2020) Of men in mice: the development and application of a humanized gnotobiotic mouse model for microbiome therapeutics. *Experimental and Molecular Medicine*. 52(9):1383–1396. DOI:10.1038/s12276-020-0473-2.
77. L. Krych *et al.* (2013) Quantitatively different, yet qualitatively alike: a meta-analysis of the mouse core gut microbiome with a view towards the human gut microbiome. *PloS ONE*. 8(5):e62578. DOI:10.1371/journal.pone.0062578.
78. C. M. Guinane *et al.* (2013) Microbial Composition of Human Appendices from Patients following Appendectomy. *Mbio*. 4(1):e00366-12. DOI: 10.1128/mBio.00366-12.
79. S. Alkadhi *et al.* (2014) The murine appendiceal microbiome is altered in

spontaneous colitis and its pathological progression. *Gut Pathog.* 6: 2510. DOI: 10.1186/1757-4749-6-25\.

80. R. Nagpal *et al.* (2018) Comparative microbiome signatures and short-chain fatty acids in mouse, rat, non-human primate, and human feces. *Frontiers in Microbiology.* 9:2897. DOI:10.3389/fmicb.2018.02897.
81. R. E. Ley *et al.* (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 102(31):11070-5. DOI: 10.1073/pnas.0504978102.
82. F. Hugenholtz and W. M. de Vos. (2018) Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 75(1):149-160. DOI: 10.1007/s00018-017-2693-8.
83. C. P. Fung *et al.* (2012) *Klebsiella pneumoniae* in Gastrointestinal Tract and Pyogenic Liver Abscess. *Emerging Infectious Diseases.* 18(8): 1322–1325. DOI: 10.3201/eid1808.111053.
84. Y. J. Pan *et al.* (2013) Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by *wzc* sequencing. *PLoS One* 8(12):e80670. DOI: 10.1371/journal.pone.0080670.
85. K. M. Wu *et al.* (2009) Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *Journal of Bacteriology.* 191(14):4492-501. DOI: 10.1128/JB.00315-09.
86. Y. J. Pan *et al.* (2015b) Identification of capsular types in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains by *wzc* sequencing and implications for capsule depolymerase treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 59(2):1038-47. DOI: 10.1128/AAC.03560-14.
87. T. L. Lin *et al.* (2014) Isolation of a bacteriophage and its depolymerase specific for K1 capsule of *Klebsiella pneumoniae*: Implication in typing and treatment. *The Journal of Infectious Diseases.* 210(11):1734-44. DOI: 10.1093/infdis/jiu332.
88. Y. J. Pan *et al.* (2017) *Klebsiella* phage  $\Phi$ K64-1 encodes multiple depolymerases

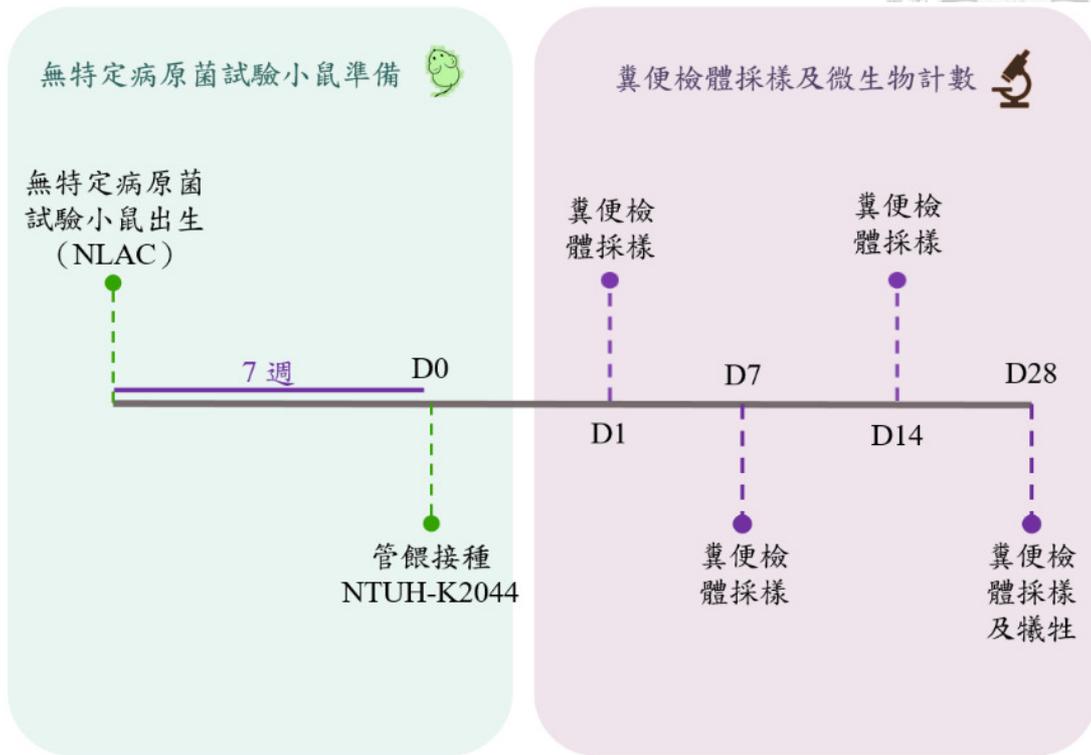
- for multiple host capsular types. *Journal of Virology*. 91(6):e02457-16. DOI: 10.1128/jvi.02457-16.
89. P. F. Hsieh *et al.* (2014) D-galactan II is an immunodominant antigen in O1 lipopolysaccharide and affects virulence in *Klebsiella pneumoniae*: Implication in vaccine design. *Frontiers in Microbiology*. 5(608):1-14. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00608.
90. T. L. Lin *et al.* (2022) Development of *Klebsiella pneumoniae* Capsule Polysaccharide-Conjugated Vaccine Candidates Using Phage Depolymerases. *Frontiers in Immunology*. 13:843183. DOI: 10.3389/fimmu.2022.843183.
91. Seiko *et al.* (1997) Changes in normal vaginal flora of African Green Monkeys (*Cercopithecus aethiops*) during the menstrual cycle. *Experimental Animals*. 46(1):47-52. DOI: 10.1538/expanim.46.47.
92. L. Mateus *et al.* (2014). Efficiency of phage cocktails in the inactivation of *Vibrio* in aquaculture. *Aquaculture*. 424-425:167-173. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.01.001.
93. J. G. Caporaso *et al.* (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*. 6(8):1621-4. DOI: 10.1038/ismej.2012.8.
94. I. W. Wu *et al.* (2020) Gut Microbiota as Diagnostic Tools for Mirroring Disease Progression and Circulating Nephrotoxin Levels in Chronic Kidney Disease: Discovery and Validation Study. *International Journal of Biological Sciences*. 16(3):420-34. DOI: 10.7150/ijbs.37421.
95. S. Stojanov *et al.* (2020). The influence of probiotics on the Firmicutes/Bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*. 8(11):1715. DOI: 10.3390/microorganisms8111715.
96. R. E. Ley *et al.* (2005) Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA. 102(31):11070-5. DOI: 10.1073/pnas.0504978102.

- 
97. T. L. A. Nguyen *et al.* (2015) How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models and Mechanisms*. 8(1):1-16. DOI: 10.1242/dmm.017400.
98. C. T. Fang *et al.* (2004) A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *The Journal of Experimental Medicine*. 199(5):697-705. DOI: 10.1084/jem.20030857.
99. X. Liu *et al.* (2021) Blautia-a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes*. 13(1):e1875796. DOI: 10.1080/19490976.2021.1875796.
100. J. Yang *et al.* (2015) Xylooligosaccharide supplementation alters gut bacteria in both healthy and prediabetic adults: a pilot study. *Frontiers in Physiology*. 6:216. DOI: 10.3389/fphys.2015.00216.
101. I. Lagkouvardos *et al.* (2016) The Mouse Intestinal Bacterial Collection (miBC) provides host-specific insight into cultured diversity and functional potential of the gut microbiota. *Nature Microbiology*. 1(10):16131. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.131.
102. S. Bessis *et al.* (2016) 'Neglecta timonensis' gen. nov., sp. nov., a new human-associated species. *New Microbes and New Infections*. 13:13-14. DOI: 10.1016/j.nmni.2016.05.016.
103. M. Sakamoto *et al.* (2014) *Butyricimonas faecihominis* sp. nov. and *Butyricimonas paravirosa* sp. nov., isolated from human faeces, and emended description of the genus *Butyricimonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64(9):2992-7. DOI: 10.1099/ijs.0.065318-0.
104. M. C. Domingo *et al.* (2009) *Clostridium lavalense* sp. nov., a glycopeptide-resistant species isolated from human faeces. *International Journal of Systematic*

- and Evolutionary Microbiology. 59(3):498-503. DOI: 10.1099/ijs.0.001958-0.
105. K. N. Haas and J. L. Blanchard. (2020) Reclassification of the *Clostridium clostridioforme* and *Clostridium sphenoides* clades as *Enterocloster* gen. nov. and *Lacrimispora* gen. nov., including reclassification of 15 taxa. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 70(1):23-34. DOI: 10.1099/ijsem.0.003698.
106. M. Mouzaki *et al.* (2013) Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology. 58(1):120-7. DOI: 10.1002/hep.26319.
107. R. E. Ley *et al.* (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. Nature. 444(7122):1022-3. DOI: 10.1038/4441022a.
108. I. Cho and M. J. Blaser. (2012) The human microbiome: at the interface of health and disease. Nature Reviews Genetics. 13(4): 260-70. DOI: 10.1038/nrg3182.
109. S. Alexander *et al.* (2001) Bacteriophage Therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy. 45(3):649-59. DOI: 10.1128/AAC.45.3.649-659.2001.
110. B. Devaki *et al.* (2011) CRISPR-cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. Annual review of genetics. 45:273-97. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132430.
111. M. Galtier *et al.* (2017). Bacteriophages targeting adherent invasive *Escherichia coli* strains as a promising new treatment for Crohn's disease. Journal of Crohn's and Colitis. 11(7):840-7. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjw224.
112. B. Davido *et al.* (2017) Is faecal microbiota transplantation an option to eradicate highly drug-resistant enteric bacteria carriage? Journal of Hospital Infection. 95(4):433-7. DOI: 10.1016/j.jhin.2017.02.001.
113. A. Feehan and J. Garcia-Diaz. (2020). Bacterial, gut microbiome-modifying therapies to defend against multidrug resistant organisms. Microorganisms. 8(2):166. DOI: 10.3390/microorganisms8020166.

圖 1 使用無特定病原菌試驗小鼠管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 的試驗流程圖



試驗小鼠：無特定病原菌 7 週齡 C57BL/6JNarl

D：管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 後的天數

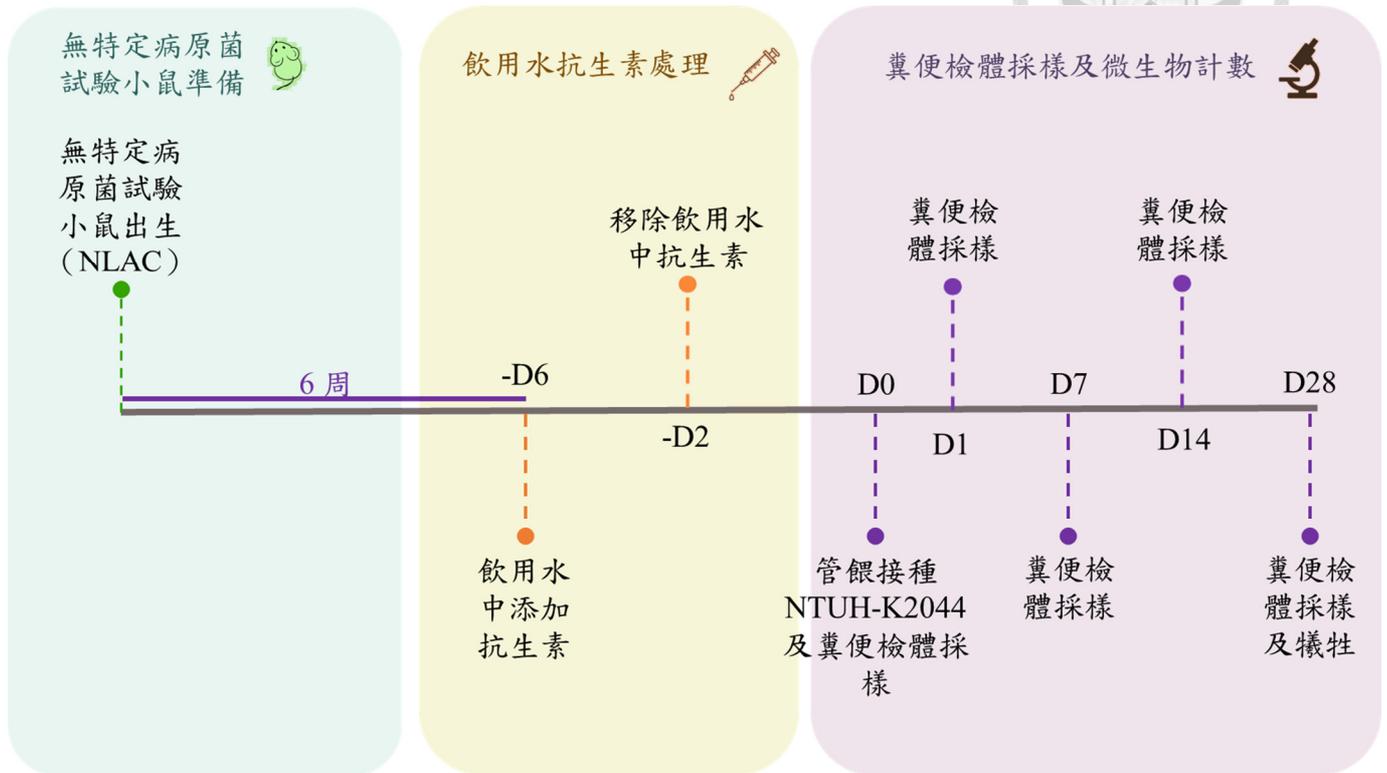
NTUH-K2044 (K1) 濃度： $1 \times 10^3$  ( $n=3$ )、 $1 \times 10^4$  ( $n=3$ )、 $1 \times 10^5$  ( $n=4$ ) CFU/mL

管餵體積：0.2 mL

死亡率：8.3%

28 天後 NTUH-K2044 (K1) 定植率：0%

圖 2 使用抗生素處理無特定病原菌試驗小鼠再管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 的試驗流程圖



試驗小鼠：無特定病原菌 6 週齡 C57BL/6JNarl

D：管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 後的天數

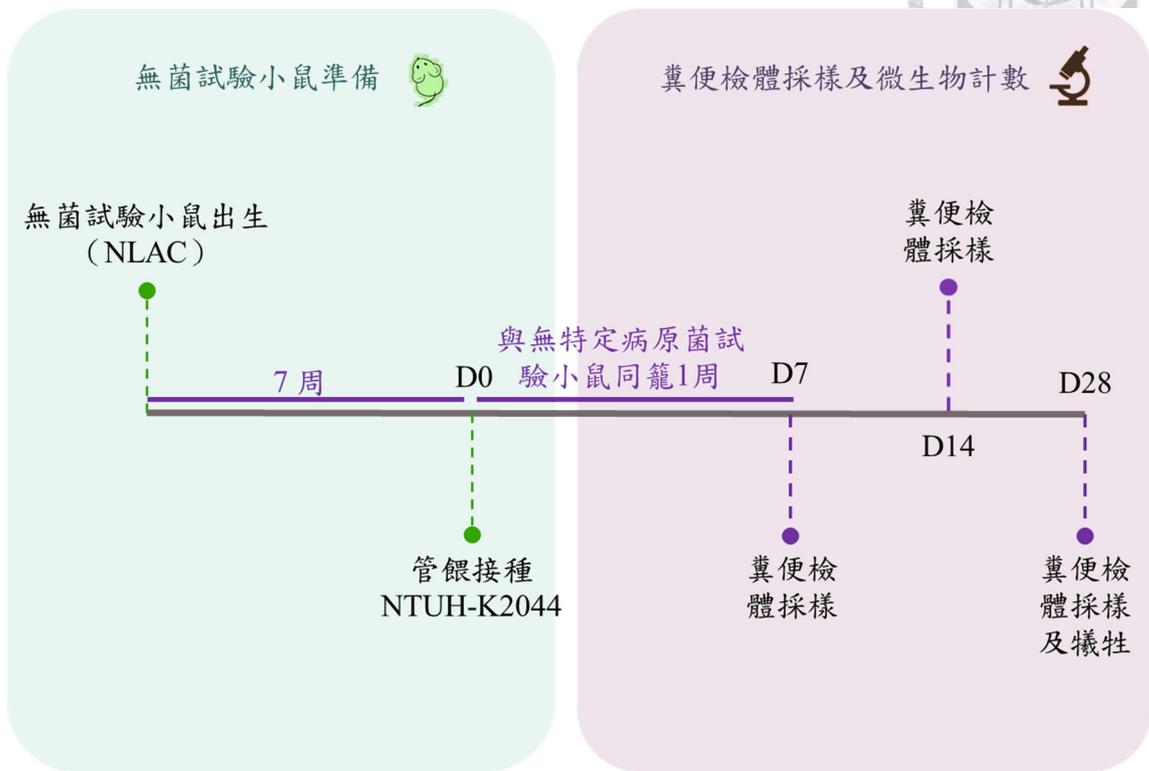
NTUH-K2044 (K1) 濃度： $1 \times 10^5$  ( $n=4$ ) CFU/mL、 $5 \times 10^4$  ( $n=8$ ) CFU/mL

管餵體積：0.2 mL

死亡率：75%、25%

28 天後 NTUH-K2044 (K1) 定植率：100%、17%

圖 3 使用無菌試驗小鼠管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 後與無特定病原菌試驗小鼠同籠一週的試驗流程圖



試驗小鼠：無菌 7 週齡 C57BL/6JNarl

D：管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 後的天數

NTUH-K2044 (K1) 濃度： $1 \times 10^4$  ( $n=4$ )、 $5 \times 10^4$  ( $n=4$ )、 $1 \times 10^5$  ( $n=4$ ) CFU/mL

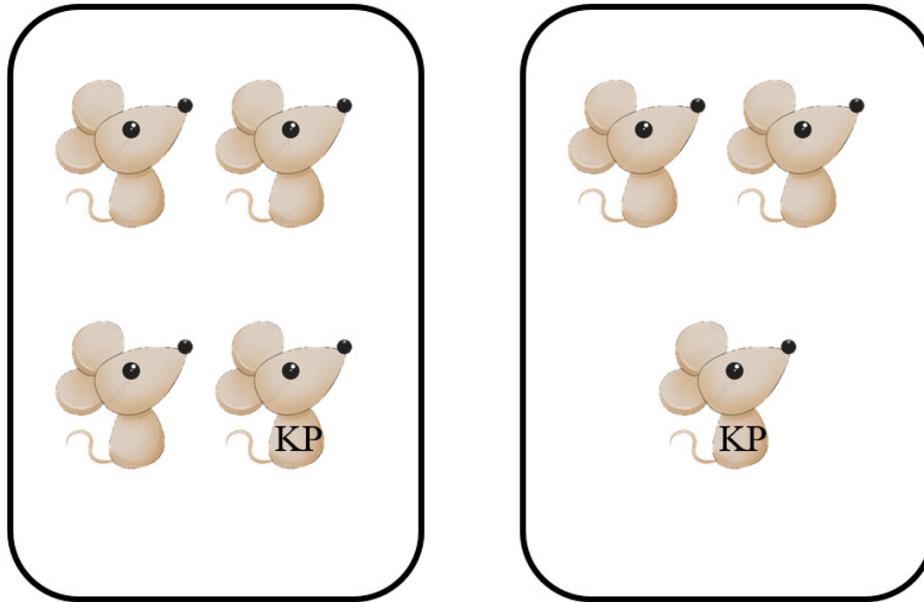
管餵體積：0.2 mL

同籠試驗小鼠：無特定病原菌 8 週齡 C57BL/6JNarl

死亡率：0%、25%、75%

28 天後 NTUH-K2044 (K1) 定植率：25%、100%、100%

圖 4 使用已經於腸道內定植 NTUH-K2044 (K1) 的試驗小鼠與無特定病原菌  
試驗小鼠同籠飼養示意圖



KP：腸道內已經定植 NTUH-K2044 (K1) 的無特定病原菌 8 週齡 C57BL/6JNarl  
( $n=1+1$ )

空白：無特定病原菌 8 週齡 C57BL/6JNarl ( $n=3+2$ )

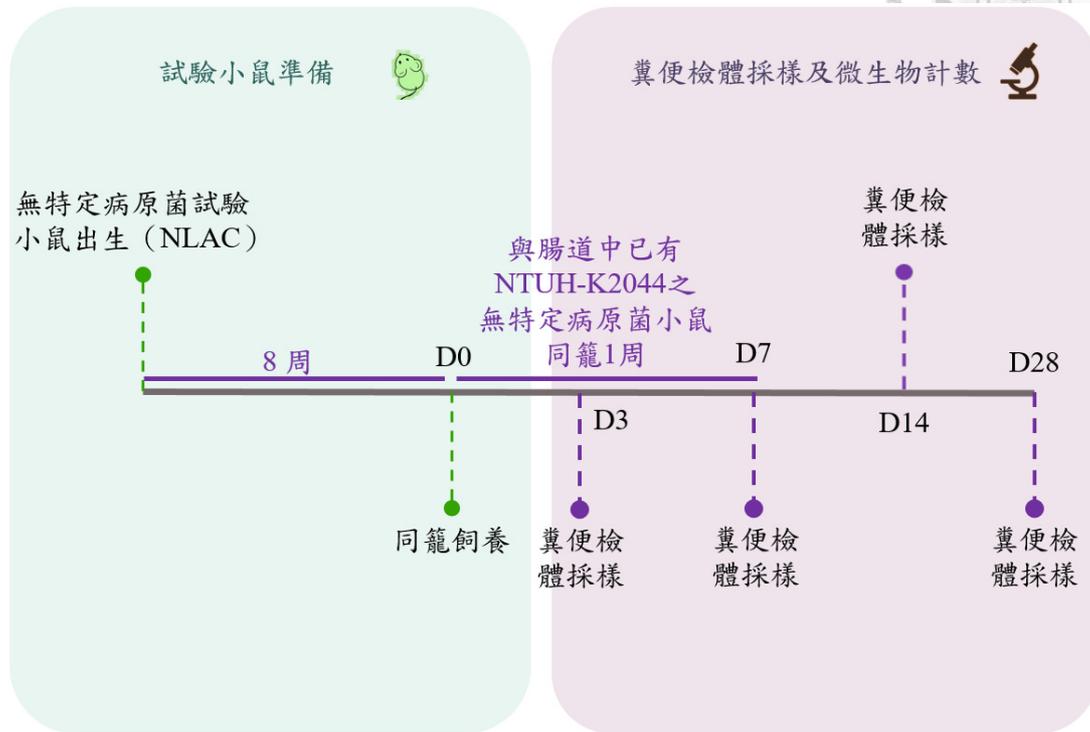
：IVC 飼育箱

依據實驗動物照護及使用指引，試驗所使用之 IVC 飼育箱籠底面積最多一籠只能飼養 4 隻八週齡以上試驗小鼠。

死亡率：0%

14 天後 NTUH-K2044 (K1) 定植率：100%

圖 5 使用已經於腸道內定植 NTUH-K2044 (K1) 的試驗小鼠與無特定病原菌試驗小鼠同籠飼養的試驗流程圖



D：與腸道內含有 NTUH-K2044 (K1) 的無特定病原菌試驗小鼠同籠飼養後的天數

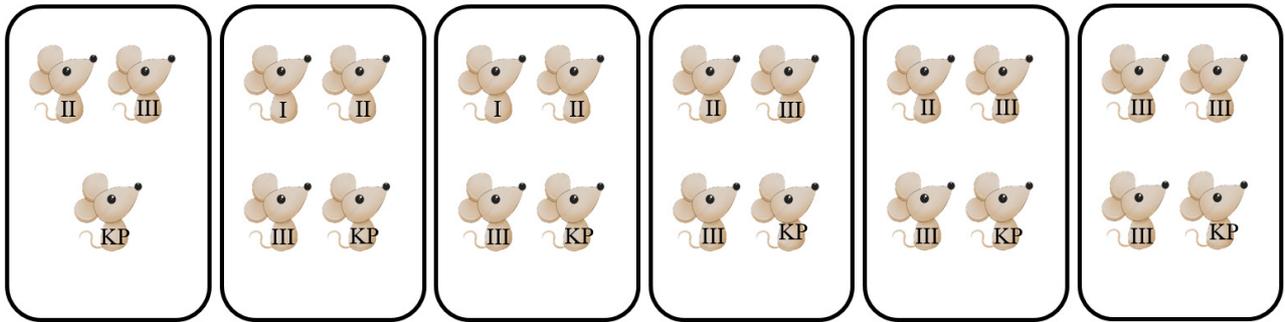
試驗小鼠：無特定病原菌 8 週齡 C57BL/6JNarl ( $n=3+2$ )

同籠試驗小鼠：無特定病原菌 8 週齡 C57BL/6JNarl ( $n=1+1$ )

死亡率：0%

14 天後 NTUH-K2044 (K1) 定植率：100%

圖 6 使用已經於腸道內定植 NTUH-K2044 (K1) 的試驗小鼠與疫苗接種後無特定病原菌試驗小鼠同籠飼養示意圖



試驗小鼠：無特定病原菌 5 週齡 C57BL/6JNarl

I：對照組（沒有注射疫苗及佐劑， $n=2$ ）

II：佐劑對照組（僅肌肉注射佐劑， $n=5$ ）

III：疫苗加上佐劑試驗組（肌肉注射疫苗加上佐劑， $n=10$ ）

KP：腸道內已經定植 NTUH-K2044 (K1) 的無特定病原菌 8 週齡 C57BL/6JNarl

（ $n=6$ ，每籠一隻）

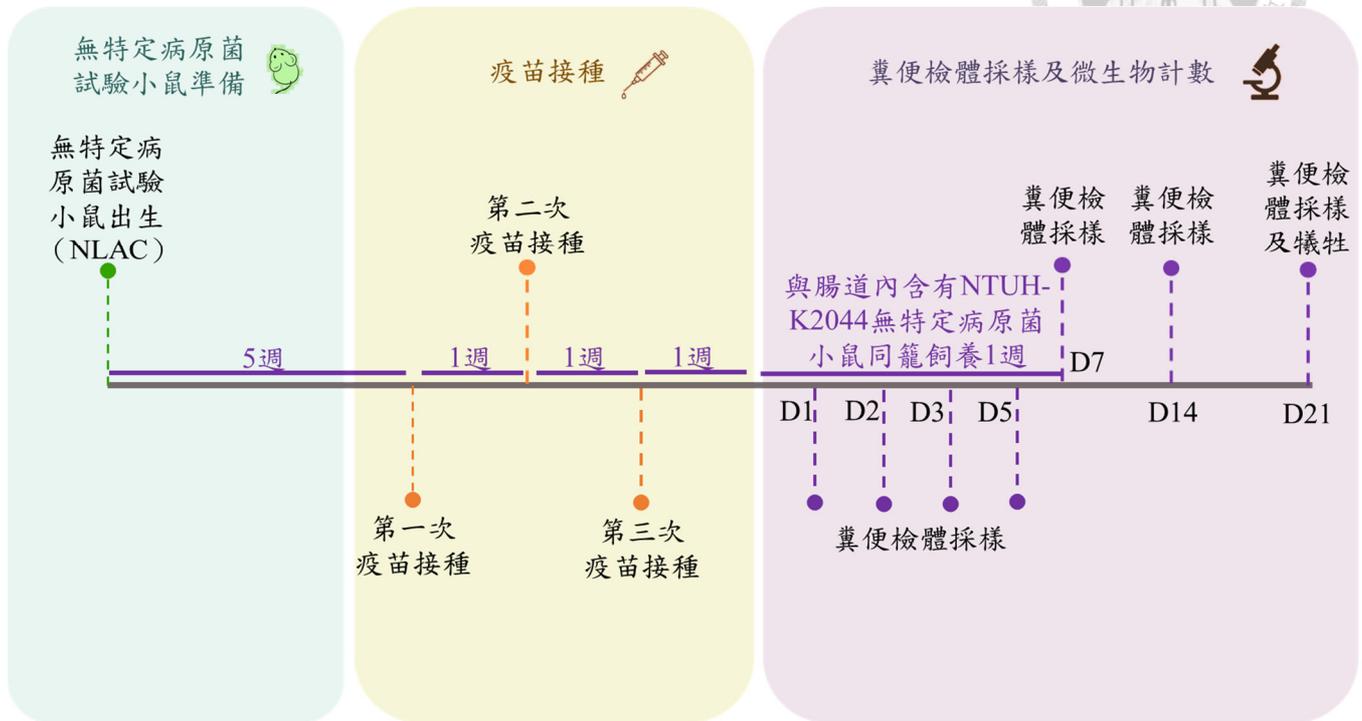
：IVC 飼育箱

依據實驗動物照護及使用指引，試驗所使用之 IVC 飼育箱籠底面積最多一籠只能飼養 4 隻八週齡以上試驗小鼠。

死亡率：6%

14 天後 NTUH-K2044 (K1) 定植率：100%

圖 7 使用疫苗肌肉注射接種無特定病原菌試驗小鼠後，預防 NTUH-K2044(K1) 在腸道定植的試驗流程圖



D：與腸道內含有 NTUH-K2044 (K1) 的無特定病原菌試驗小鼠同籠飼養後的天數

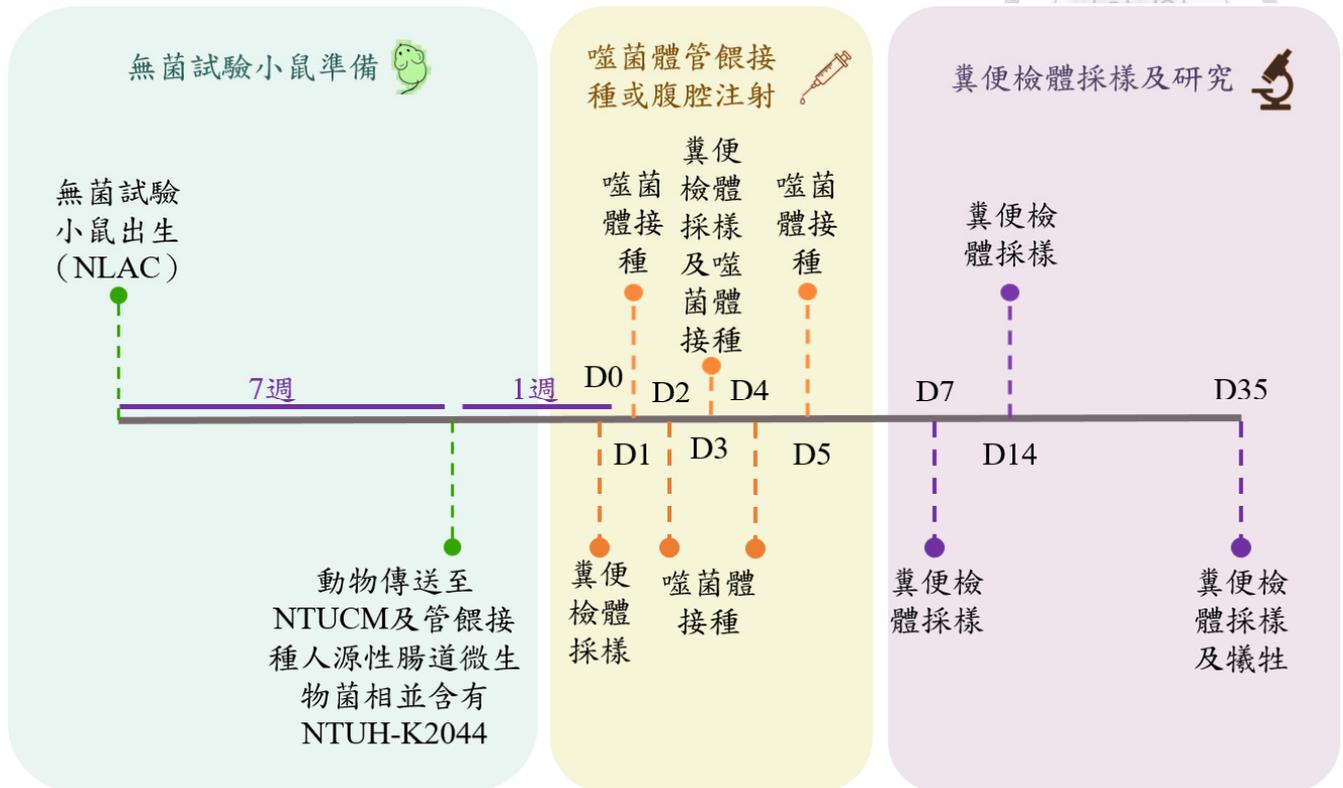
試驗小鼠：無特定病原菌 5 週齡 C57BL/6JNarl ( $n=2+5+10$ )

同籠試驗小鼠：無特定病原菌 8 週齡 C57BL/6JNarl ( $n=1+1+1+1+1+1$ )

死亡率：6%

14 天後 NTUH-K2044 (K1) 定植率：100%

圖 8 使用兩種噬菌體移除腸道中 NTUH-K2044 (K1) 的試驗流程圖



NTUCM：台灣大學醫學院實驗動物中心

NLAC：財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心

試驗小鼠：無菌 7 週齡 C57BL/6JNarl

I：陰性對照組 ( $n=4$ )

II：試驗對照組 ( $n=5$ )

III：口服接種  $\phi$ K1-1 試驗組 ( $n=4$ )

IV：口服接種  $\phi$ KO1-1+ $\phi$ K1-1 試驗組 ( $n=10$ )

V：口服接種  $\phi$ K1-1 加上腹腔注射  $\phi$ K1-1 試驗組 ( $n=4$ )

腸道微生物接種體積：0.2 mL (NTUH-K2044 (K1) 濃度： $1 \times 10^5$  CFU/mL+人源性糞便檢體 100 倍稀釋)

噬菌體接種/注射治療體積：0.2 mL ( $\phi$ KO1-1 濃度為  $1 \times 10^9$  PFU/mL,  $\phi$ K1-1 濃度為  $1 \times 10^{11}$  PFU/mL)

D：噬菌體處理後的天數

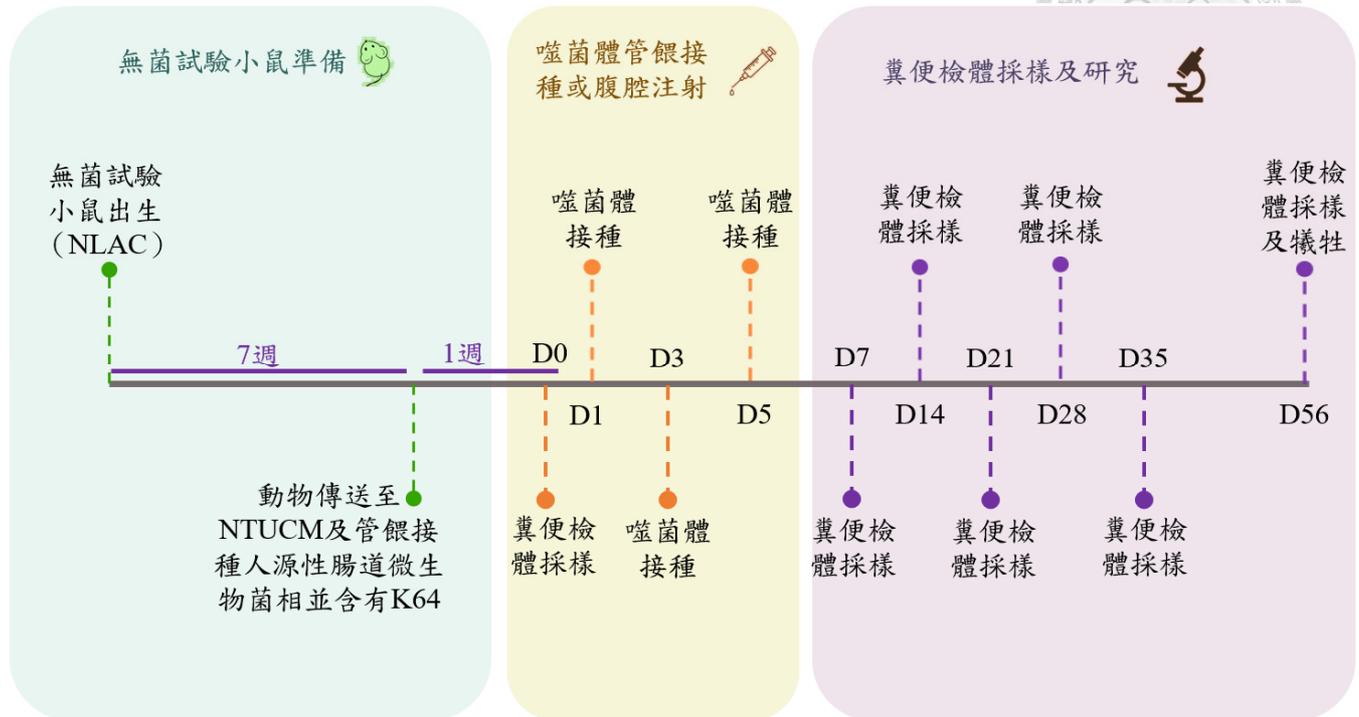
死亡率：56%

管餵接種 7 天後 NTUH-K2044 (K1) 定植率：100%

成功移除腸道中定植的 NTUH-K2044 (K1) 的比例為 17%。



圖 9 使用兩種噬菌體移除腸道中 K64 的試驗流程圖



NTUCM：台灣大學醫學院實驗動物中心

NLAC：財團法人國家實驗研究院國家實驗動物中心

噬菌體接種治療： $\phi$ KO1-1 及  $\phi$ K64-1 濃度分別為  $1 \times 10^9$  PFU/mL

D：噬菌體處理後的天數

試驗小鼠：無菌 7 週齡 C57BL/6JNarl

I：試驗對照組 ( $n=4$ )

II：口服接種  $\phi$ KO1-1 試驗組 ( $n=4$ )

III：口服接種  $\phi$ K64-1 試驗組 ( $n=4$ )

IV：口服接種  $\phi$ KO1-1+ $\phi$ K1-1 試驗組 ( $n=28$ )

V：口服接種及腹腔注射  $\phi$ K64-1+ $\phi$ K1-1 試驗組 ( $n=16$ )

腸道微生物接種體積：0.2 mL (CB-0001 (K64) 濃度： $1 \times 10^5$  CFU/mL+人源性糞便檢體 100 倍稀釋或是已經含有 K64 噬菌體模型 KP 的人源性糞便檢體 100 倍稀釋)

噬菌體接種/注射治療體積：0.2 mL ( $\phi$ KO1-1 濃度為  $1 \times 10^9$  PFU/mL， $\phi$ K64-1 濃度為  $1 \times 10^9$  PFU/mL)

D：噬菌體處理後的天數

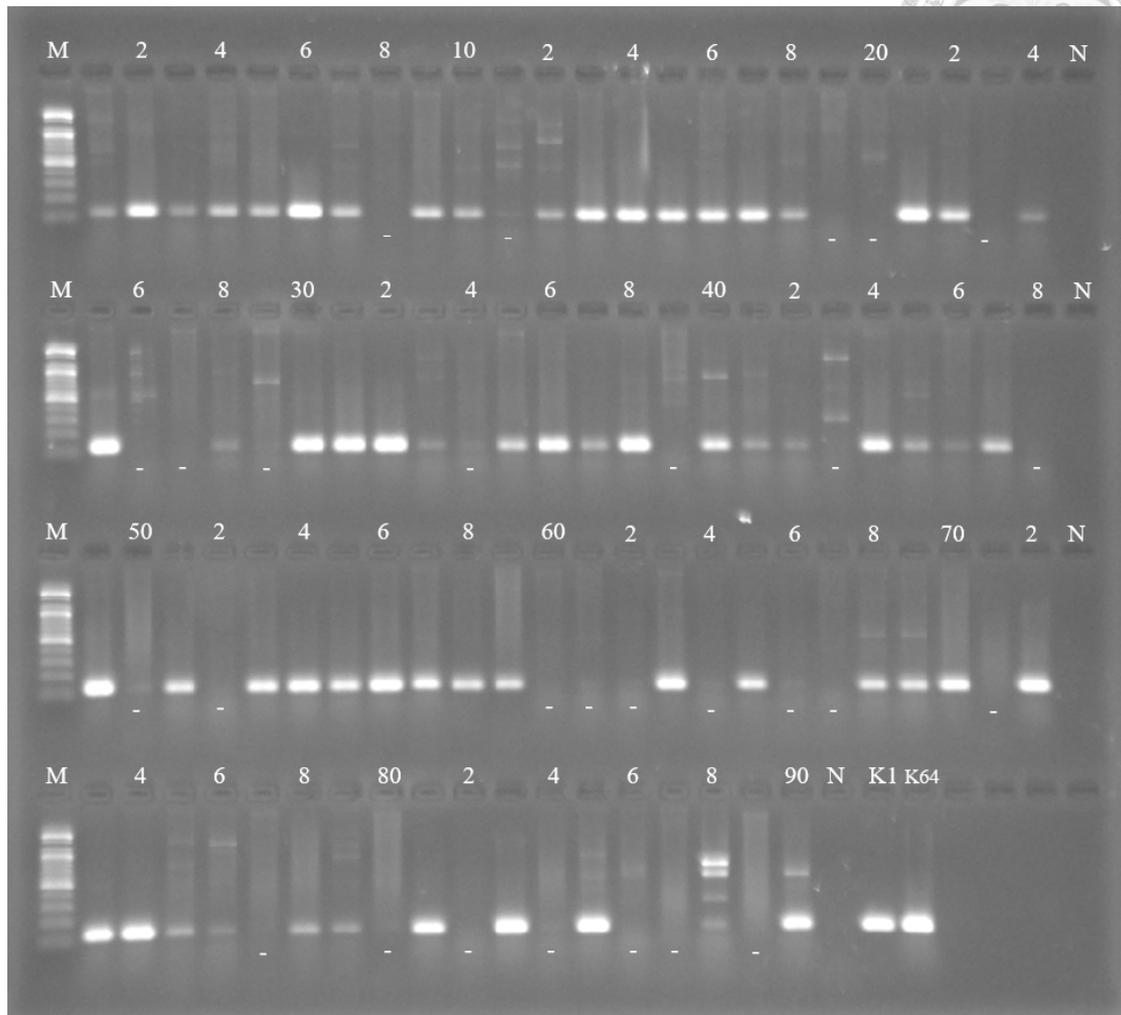
死亡率：0%

管餵接種 7 天後 CRKP (K64) 定植率：100%

成功移除腸道中定植的 CRKP (K64) 的比例為 52%。



圖 10 以 PCR 方式檢測 90 位健檢人類糞便檢體內 KP 檢測結果



N：陰性對照組

K1、K64：陽性對照組（K1 及 K64 皆屬於 KP，因此針對 KP 的引子會將其序列擴增）

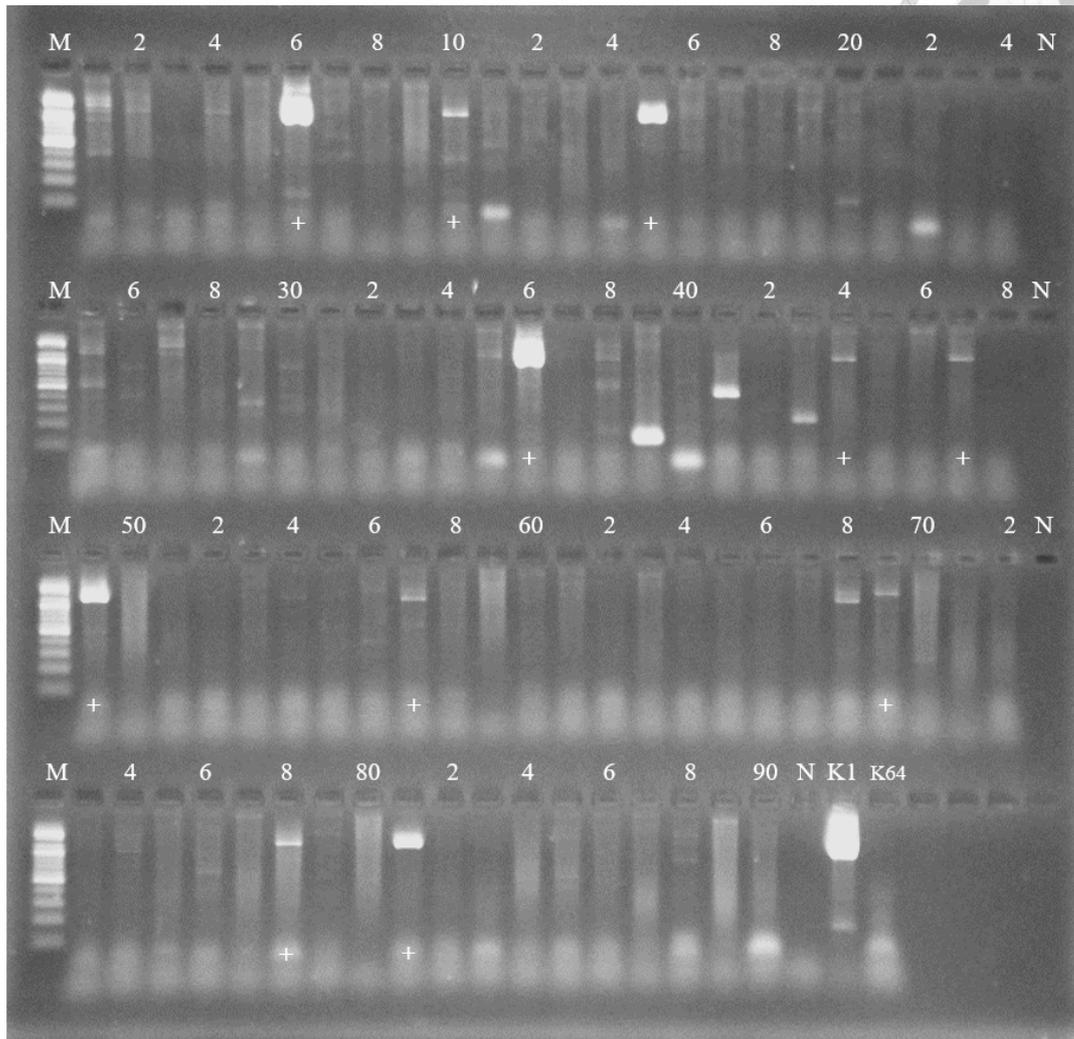
-：表示以 PCR 檢測結果為陰性，便是檢體內沒有 KP 的序列存在

M：PCR 檢測時用來表示分子量的 Marker/Ladder

數字：健檢人類糞便檢體編號

90 件檢體中有 62 件檢體經過 PCR 檢測後發現糞便檢體中具有 KP，因此約為 69%左右的健檢受檢者人腸道中會有 KP 的定植。

圖 11 以 PCR 方式檢測 90 位健檢人類糞便檢體內 K1 檢測結果



N：陰性對照組

K1：陽性對照組

K64：試驗對照組（針對 K1 的引子無法擴增 K64 莢膜型 KP）

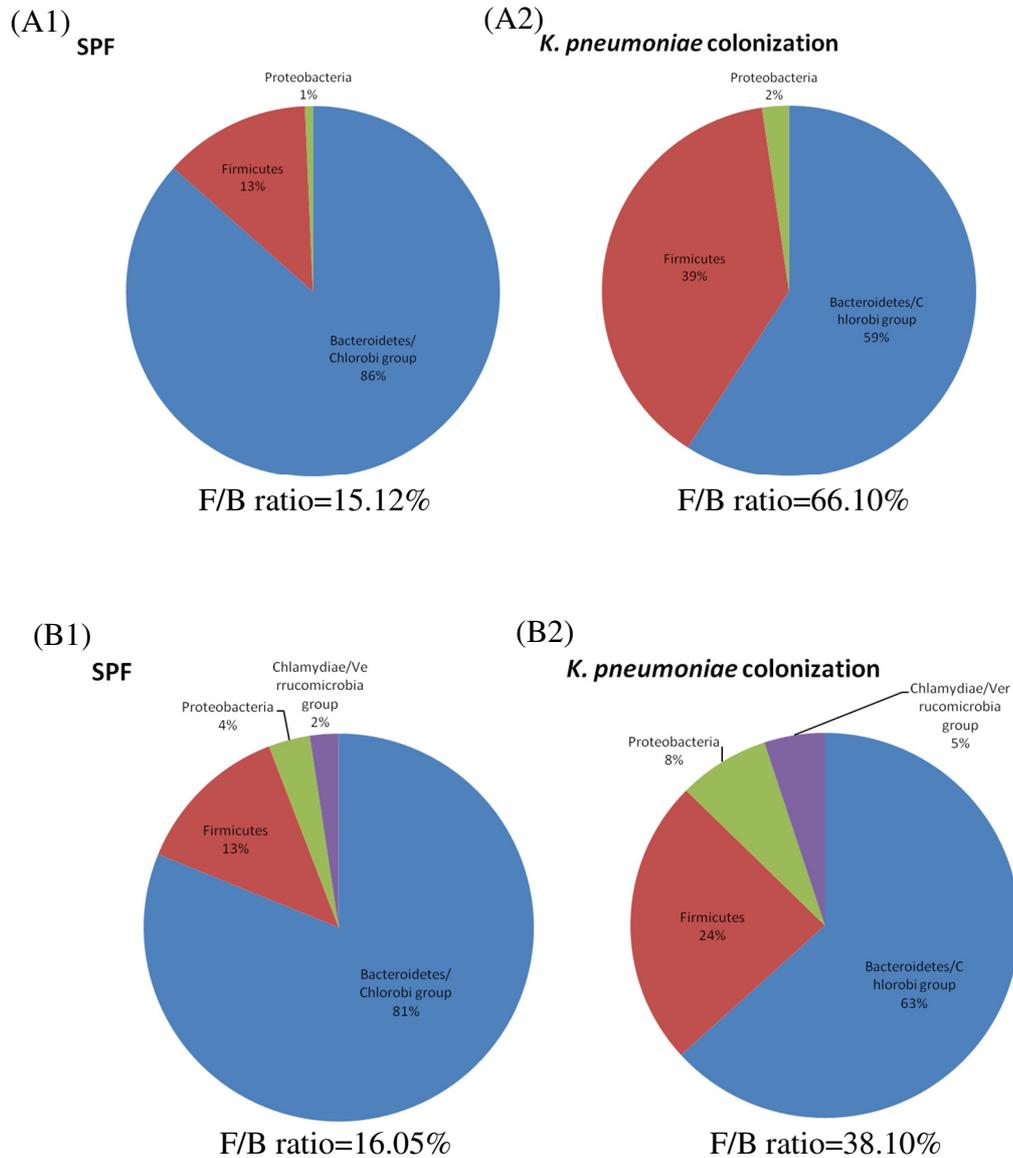
＋：表示以 PCR 檢測結果為陽性，便是檢體內含有 KP 的序列存在

M：PCR 檢測時用來表示分子量的 Marker/Ladder

數字：健檢人類糞便檢體編號

90 件檢體中有 11 件為 K1 莢膜型，因此健檢受檢者中約有 12% 為 K1 莢膜型 KP。

圖 12 將 NTUH-K2044 (K1) 定植於無特定病原菌小鼠 (SPF mice) 腸道中，並使用培養及次世代基因定序方式分析 NTUH-K2044 (K1) 定植腸道內前、後的微生物相差異



(A1)及(A2)為使用培養方式計算腸道微生物相，(B1)及(B2)為使用 NGS 方式計算腸道微生物相，(A1)及(B1)為定植 KP 前，(A2)及(B2)為定植 KP 後。

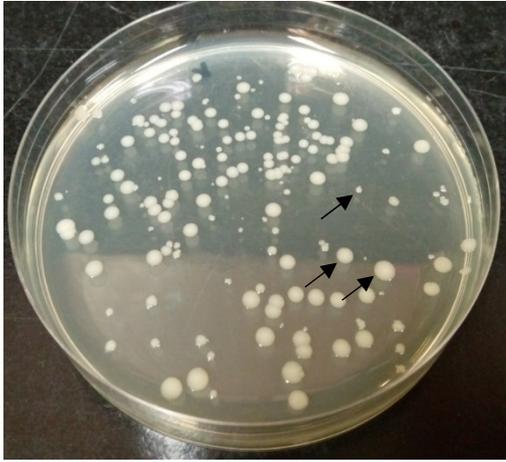
F/B ratio：為厚壁菌門/擬桿菌門的比率

培養方式的無特定病原試驗小鼠腸道微生物相，F/B 比例為 15.12% (A1)，

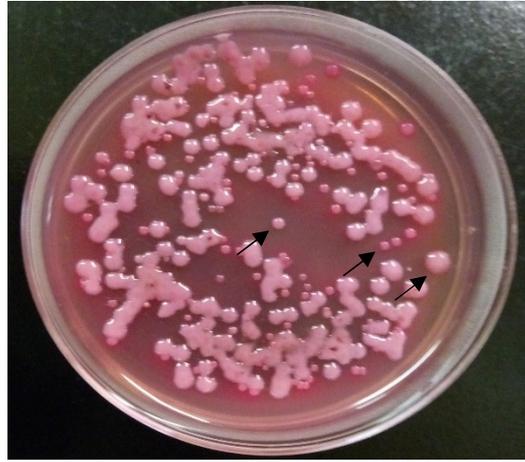
使用 NGS 則為 16.05% (B1)，而在定植 KP 後，不論使用培養或是 NGS 均發現腸道微生物相的改變，培養方式的 F/B 比例為 66.10% (A2)，NGS 則為 38.10% (B2)；由結果顯示，在未定植 KP 前 F/B 的比例均約為 15% 左右，兩種方式比較差異不大，但是於定植 KP 後的 F/B 比例就差別較大，其 F/B 的比例結果均是以上升為主。

圖 13 體外試驗中，使用  $\phi$ K1-1 和  $\phi$ KO1-1 感染後，NTUH-K2044 (K1) 菌液塗盤結果

(A)



(B)



菌液塗盤後於 37°C 下培養隔夜

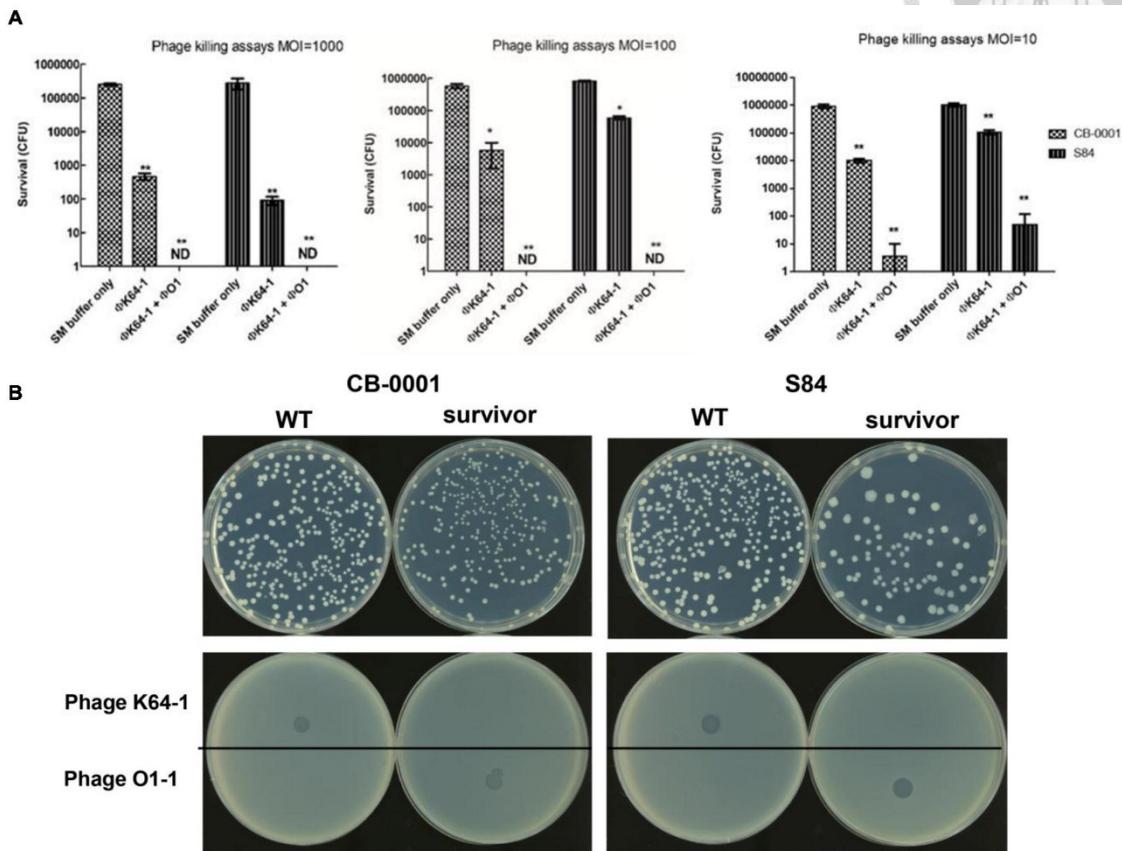
↓：箭頭指出 3 種不同菌落型態的 NTUH-K2044 (K1)

(A)：LB agar 加入 Ampicillin (100  $\mu$ g/mL) 培養 NTUH-K2044 (K1)

(B)：DHL 選擇性培養基加入 Ampicillin (100  $\mu$ g/mL) 培養 NTUH-K2044 (K1)

病毒感染 (MOI) 為 1,000

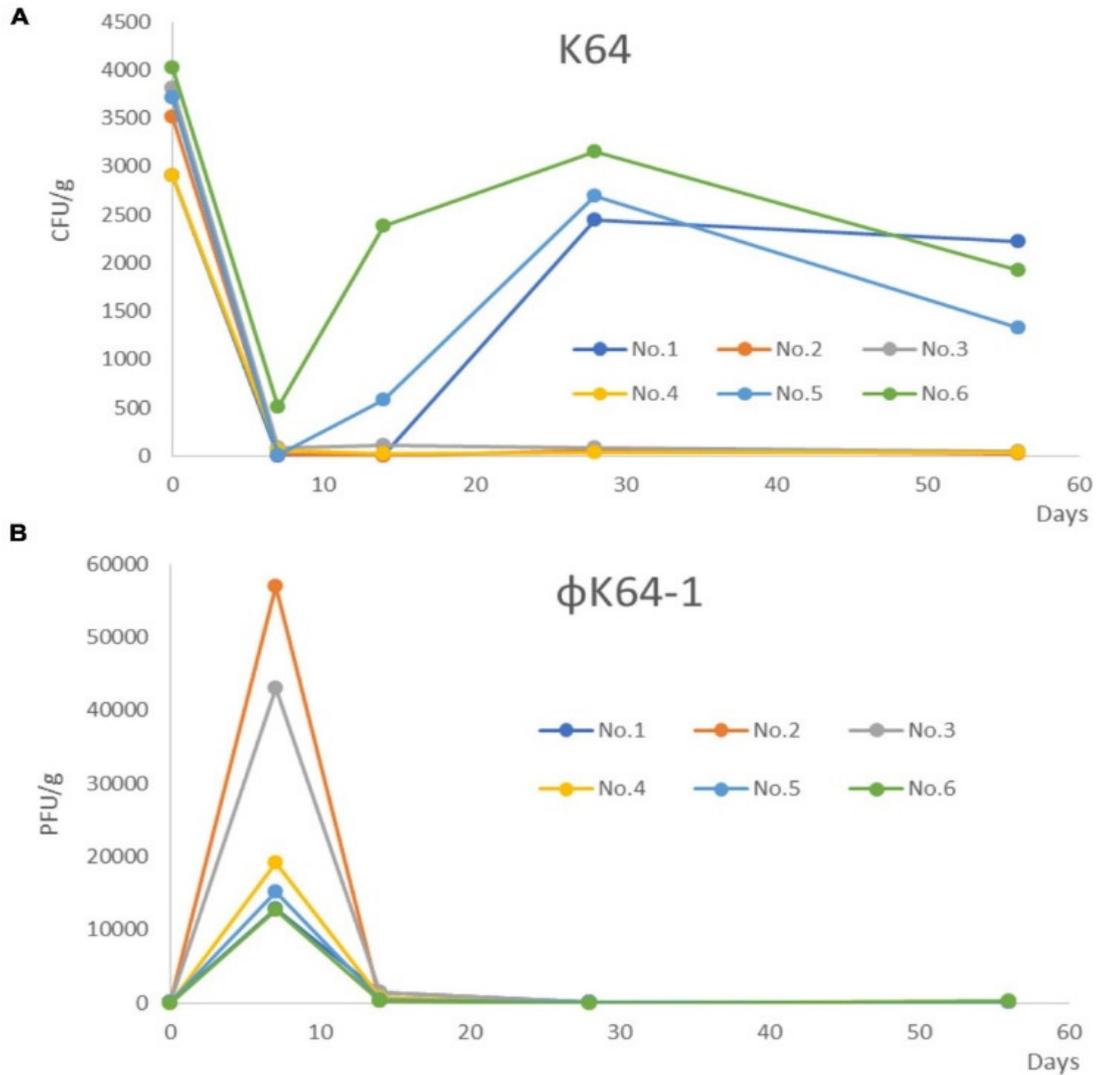
圖 14 使用兩種噬菌體 ( $\phi$ K64-1 及  $\phi$ KO1-1) 感染兩株 K64 莢膜型菌株，並  
在不同病毒感染劑量下，兩種 K64 莢膜型菌株的存活率

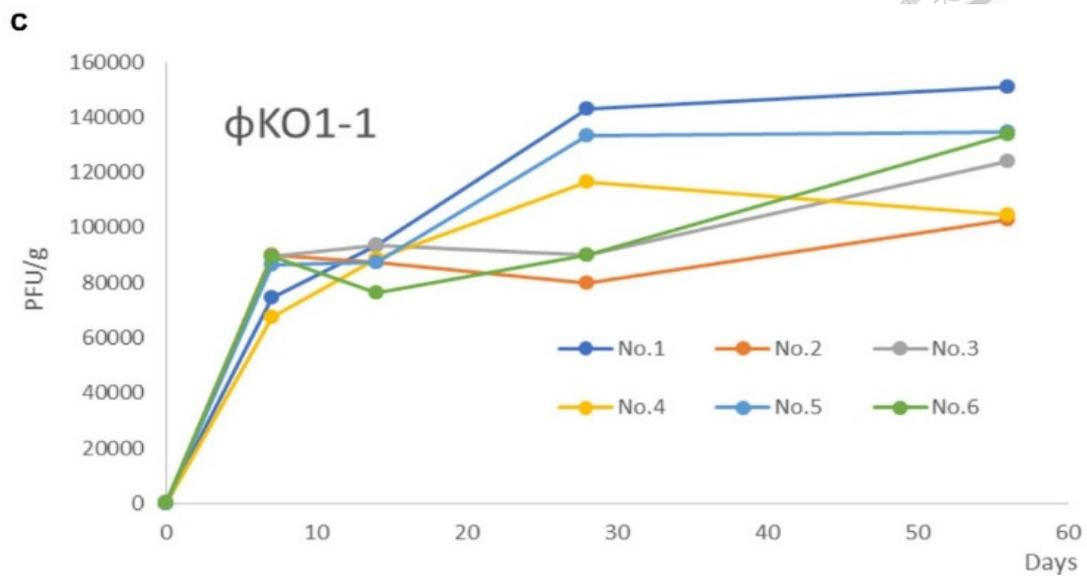


(A) 兩種噬菌體對兩種 K64 莢膜型菌株 (CB-0001 和 S84) 的感染消除作用。將細菌與緩衝液 (SM, 對照組)、 $\phi$ K64-1 或  $\phi$ K64-1+ $\phi$ KO1-1 以 MOI=10、100 和 1,000 混合均勻培養過夜後，與最初計數比較來計算細菌存活率，並顯示為來自三個獨立實驗的平均值 $\pm$ 標準偏差[SD]。\*\*: Student's t-test  $p < 0.01$  (與對照相比)。ND: 沒有存活細菌。

(B) 野生型 K64 和莢膜陰性存活菌株的表現型和受噬菌體感染特性。(上圖) LB 瓊脂上野生型和莢膜陰性存活菌株的菌落型態差異。(下圖) $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 ( $1 \times 10^8$  PFU) 在野生型 K64 和莢膜陰性存活菌株上的噬菌斑測試。

圖 15 選取 6 隻小鼠的糞便檢體（三隻於噬菌體處理 56 天後，腸道中仍定植 CRKP；三隻於噬菌體處理後第 7 天便檢測不到 CRKP），使用 Real-time PCR 檢測 K64、 $\phi$ K64-1 及  $\phi$ KO1-1 在試驗流程中，小鼠糞便檢體中數量的改變





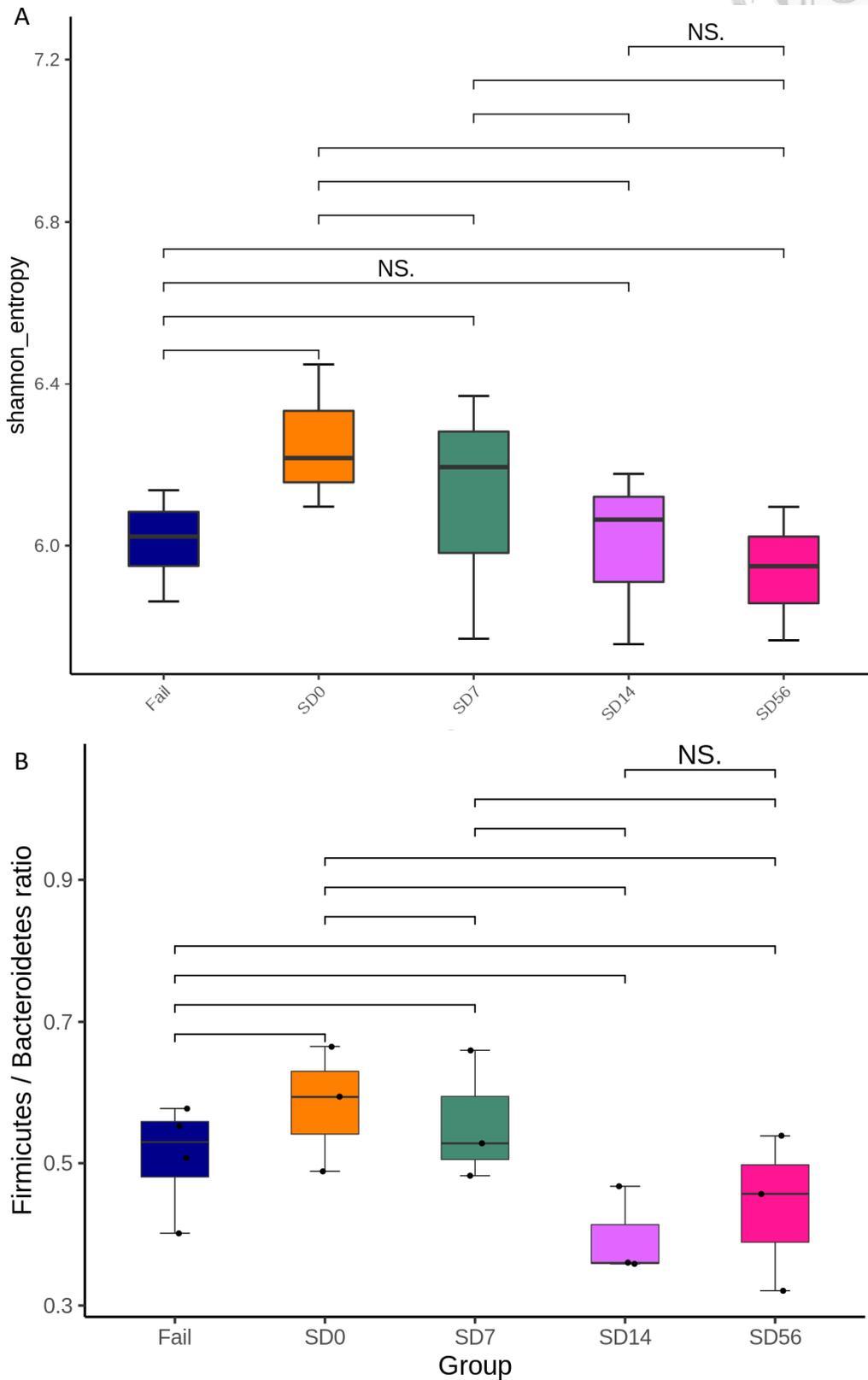
在使用  $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 治療人類腸道菌相小鼠 ( $n=6$ ) 腸道中克雷伯氏肺炎桿菌的定植，改變了 K64、 $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 的數量。

(A) 試驗小鼠腸道中 K64 的量。Real-time PCR 的結果所示，兩種噬菌體聯合治療組中，No. 2-4 號小鼠 ( $n=3$ ) 中，Real-time PCR 的結果顯示出 K64 莢膜型的 CRKP 長時間的被消除 (試驗期 56 天)。而 No.1、No.5、No.6 試驗小鼠腸道中的克雷伯氏肺炎桿菌在治療 1 週後再次被檢測到。

(B) 小鼠腸道中  $\phi$ K64-1 的量。 $\phi$ K64-1 的數量在噬菌體治療後 7 天達到高峰，平均為  $26,669 \pm 18,717$  PFU/g，然後迅速下降。

(C) 小鼠腸道中  $\phi$ KO1-1 的量。在噬菌體治療後 7 天時  $\phi$ KO1-1 的平均數量為  $82,976 \pm 9,553$  PFU/g，並且數量持續上升。

圖 16 使用  $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 去除 CRKP 前後腸道菌群香農多樣性指數及厚壁菌門/擬桿菌門比率的變化



(A) 香農多樣性指數。SD0 的物種多樣性最高，然後物種多樣性逐漸降低。SD14 和失敗組之間沒有顯著差異。

(B) 厚壁菌門/擬桿菌門比率 (F/B)。Fail、SD0、SD7 組 F/B 比率均大於 0.5，SD14、SD56 組間差異無統計學意義。

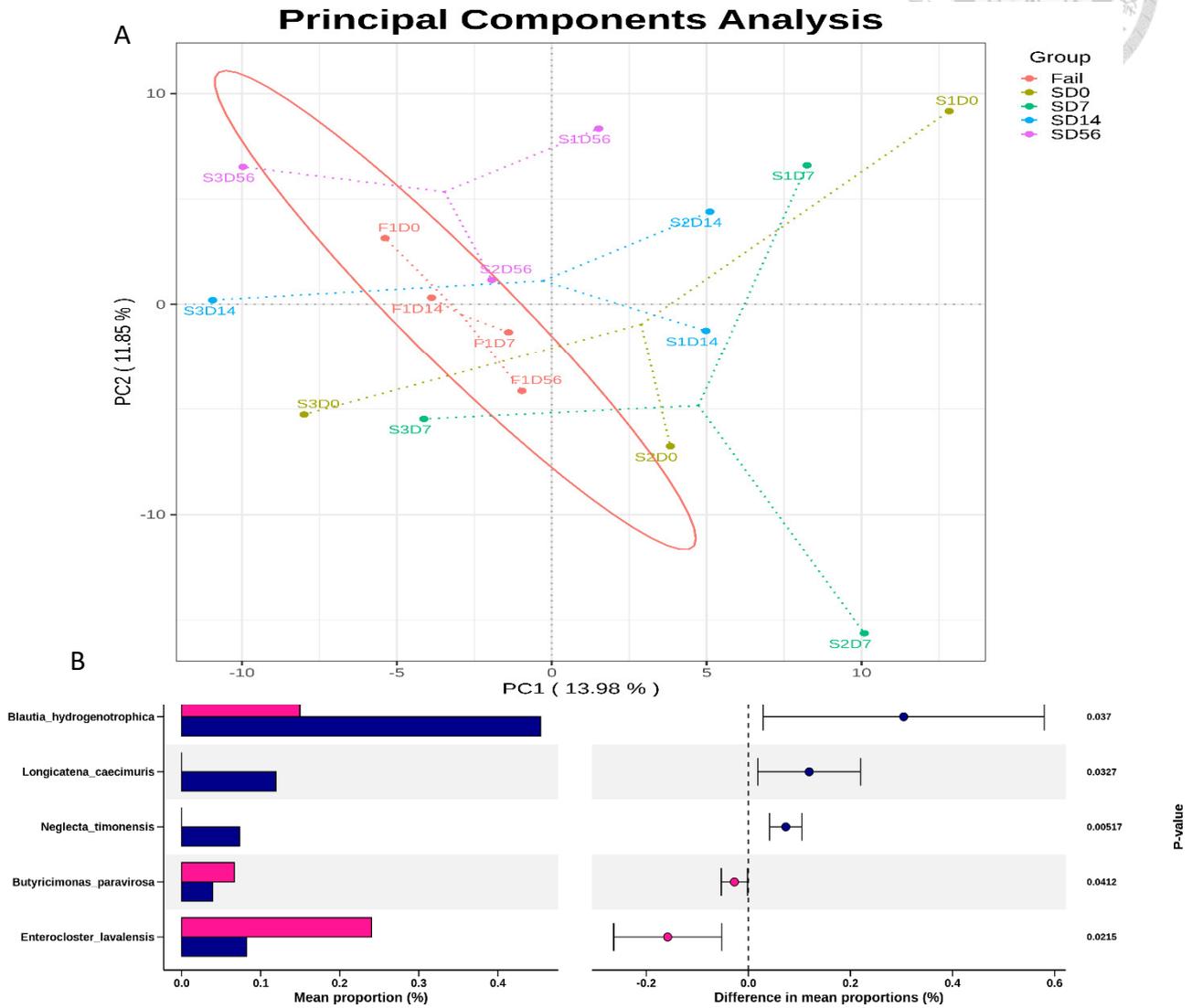
S：噬菌體治療後 PCR 檢測不到 CRKP。

Fail：噬菌體治療後 PCR 檢測到 CRKP。

D：噬菌體治療後的天數。



圖 17  $\phi$ K64-1 和  $\phi$ KO1-1 去除 CRKP 後腸道菌相主成分分析及顯著差異前 5 名微生物



S1、S2、S3：噬菌體治療後 PCR 檢測不到 CRKP。

Fail、F1：噬菌體治療後 PCR 檢測到 CRKP。

D：噬菌體治療後的天數。

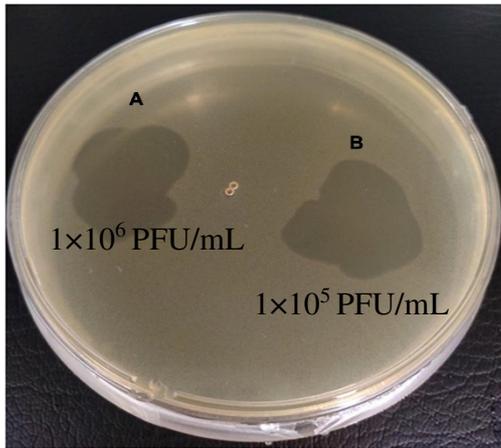
(A) 各組的 PCA 組成相似度包括 PC1 13.98%及 PC2 11.85%，而 Fail 組與其他組 SD0、SD7、SD14 和 SD56 (圓圈內) 差異很大，這說明了腸道內定植了 CRKP 有一定程度影響到腸道微生物相

(B) 從 Welch 的 t 檢驗分析中了解到，不同群體腸道微生物相的種類存在顯著

差異，擷取前五個微生物物種在噬菌體治療成功或是失敗組的腸道微生物群中存  
在最顯著差異。



圖 18 從小鼠糞便檢體中分離純化出 CRKP 的噬菌斑測試



從經過餵食噬菌體 56 天後的小鼠糞便檢體中，分離純化出之 CRKP，經過 PCR 鑑定為 K64 莢膜型，挑選 10 株分離純化出的 K64 菌株，進行噬菌斑測試，分別以濃度  $1 \times 10^6$  及  $1 \times 10^5$  PFU/mL 之  $\phi$ K64-1 測試，均有噬菌斑產生，證明腸道中的 K64 莢膜型 KP，仍是可以被  $\phi$ K64-1 辨認。

表 1 引子序列總表

| 名稱                      | 引子序列                              | 產品大小 (bp) |
|-------------------------|-----------------------------------|-----------|
| KP Forward              | 5'-AGCACAGAGAGCTTG-3'             | 126       |
| KP Reverse              | 5'-ACTTTGGTCTTGCGAC-3'            |           |
| K1 Forward              | 5'-GGTGCTCTTTACATCATTGC-3'        | 1280      |
| K1 Reverse              | 5'-GCAATGGCCATTTGCGTTAG-3'        |           |
| K64 Reverse             | 5'-CTTTTAGGGCTACGGCACC-3'         | 770       |
| K64 Reverse             | 5'-CCGCGCGCAGGAACATTAG-3'         |           |
| qPCR K64 Forward        | 5'-AACAGTTTGCTTATTTCTTGAGTGATG-3' | 73        |
| qPCR K64 Reverse        | 5'-AATAACCCAATAAACCCAAATCGA-3'    |           |
| qPCR $\phi$ K64 Forward | 5'-TCTGTAACCTTCGCTGCGTTCA-3'      | 221       |
| qPCR $\phi$ K64 Reverse | 5'-AGAGCACCAAACCAAGCCATA-3'       |           |
| qPCR $\phi$ O1 Forward  | 5'-CCACTCCCAACCAATCGACA-3'        | 194       |
| qPCR $\phi$ O1 Reverse  | 5'-AGACCAACGCTAAGGCTTCC-3'        |           |

表 2 PCR 及 Real-time 條件總表

| 名稱                   | 步驟                    | 溫度 (°C) | 時間 (秒) | 重複 (次) |
|----------------------|-----------------------|---------|--------|--------|
| <i>K. pneumoniae</i> | 起始                    | 95      | 600    |        |
|                      | DNA 變性 (Denaturation) | 95      | 30     |        |
|                      | 引子黏合 (Annealing)      | 60      | 30     | 35     |
|                      | 引子延長 (Extension)      | 72      | 45     |        |
|                      | 結束                    | 72      | 600    |        |
|                      | 保存                    | 4       | ∞      |        |
| Real-time PCR        | 起始                    | 95      | 30     |        |
|                      | DNA 變性                | 95      | 5      | 45     |
|                      | 引子黏合及延長               | 60      | 30     |        |

表 3 11 種選擇性培養基及 5 種非選擇性培養基之名稱、培養的微生物種類及  
培養條件

| 培養基   | 微生物種類                   | 培養條件                               |
|---|-------------------------|------------------------------------|
| SM10 agar                                   | Anaerobes               | } Anaerobic conditions 37°C, 96 hr |
| EGE agar                                    | Anaerobes               |                                    |
| <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> |                         |                                    |
| EG agar                                     | Anaerobes               | } Steel wool method<br>37°C, 72 hr |
| BL agar                                     | Anaerobes               |                                    |
| NBGT agar                                   | Bacteroidaceae          |                                    |
| BS agar                                     | Bifidobacteriaceae      |                                    |
| ES agar                                     | Eubacteriaceae          |                                    |
| VS agar                                     | Veillonellaceae         |                                    |
| NN agar                                     | Clostridium perfringens |                                    |
| LBS agar                                    | Lactobacillaceae        |                                    |
| <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> |                         |                                    |
| TS agar                                     | Aerobes                 | } Aerobic<br>37°C, 24-48 hr        |
| DHL agar                                    | Enterobacteriaceae      |                                    |
| TATAC agar                                  | Streptococcaceae        |                                    |
| PEES agar                                   | Staphylococcaceae       |                                    |
| PD agar                                     | Yeasts, Molds           |                                    |
| NAC agar                                    | Pseudomonas             |                                    |



表 4 無特定病原菌試驗小鼠管餵接種克雷伯氏肺炎桿菌後，腸道微生物菌相變化

| Log/g                   | D0  | D1  | D7  | D14  | D28 |
|-------------------------|-----|-----|-----|------|-----|
| Enterobacteriaceae      | 8.7 | 7.7 | 8.3 | 7.9  | 5.6 |
| Streptococcaceae        | 7.0 | 6.6 | 6.1 | 6.3  | 5.9 |
| Staphylococcaceae       | 6.4 | 7.5 | 7.0 | 6.3  | 6.3 |
| Lactobacillaceae        | 8.7 | 8.5 | 8.9 | 9.5  | 9.5 |
| Bacteroidaceae          | 8.8 | 8.6 | 8.6 | 9.0  | 8.0 |
| Bifidobacteriaceae      | 6.5 | 8.4 | 8.6 | 9.2  | 8.8 |
| Eubacteriaceae          | 8.0 | 8.5 | 8.3 | 8.5  | 9.3 |
| <i>Clostridium</i> spp. | 8.5 | -   | -   | -    | -   |
| Fusiform bacteria       | 8.5 | -   | -   | -    | -   |
| <i>K. pneumoniae</i>    | -   | 3.2 | -   | -    | -   |
| Total                   | 9.3 | 9.2 | 9.3 | 10.0 | 9.8 |

無特定病原菌試驗小鼠品系：C57BL/6Jnar1

-：微生物數量低於  $1 \times 10^3$  CFU/g

微生物菌數以 Log 10/每克 (g) 表示，說明每克檢體中可以培養出來的微生物數量為  $n \times 10^x$ ，顯示方式為 X Log<sub>10</sub> n

D：管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 菌液於試驗小鼠的天數

D0：管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 菌液，每隻試驗小鼠 0.2 mL，濃度為  $1 \times 10^5$  CFU/mL

表 5 無特定病原菌試驗小鼠經飲水中加入抗生素處理後，再管餵接種克雷伯氏肺炎桿菌，存活之試驗小鼠的腸道微生物菌相變化

| Log/g                   | -D6 | D0  | D1   | D7  | D14  | D28 |
|-------------------------|-----|-----|------|-----|------|-----|
| Enterobacteriaceae      | 8.7 | -   | -    | 5.0 | 5.5  | 5.8 |
| Streptococcaceae        | 7.0 | 9.7 | 10.2 | 5.7 | 6.0  | 6.3 |
| Staphylococcaceae       | 6.4 | 6.3 | 7.6  | 6.2 | 6.5  | 6.4 |
| Lactobacillaceae        | 8.7 | 8.3 | 8.7  | 8.9 | 9.0  | 9.1 |
| Bacteroidaceae          | 8.8 | -   |      | 8.5 | 9.8  | 8.8 |
| Bifidobacteriaceae      | -   | -   |      | 7.0 | 7.3  | -   |
| Eubacteriaceae          | 6.5 | -   |      | 8.3 | 9.7  | 8.6 |
| <i>Clostridium</i> spp. | 8.5 | -   |      | -   | -    | -   |
| Fusiform bacteria       | 8.5 | -   |      | -   | -    | -   |
| <i>K. pneumoniae</i>    | -   | -   |      | 5.5 | 5.3  | 5.9 |
| Total                   | 9.3 | 9.7 | 10.2 | 9.1 | 10.0 | 9.4 |

無特定病原菌試驗小鼠品系：C57BL/6Jnar1

-：微生物數量低於  $1 \times 10^3$  CFU/g

微生物菌數以 Log 10/每克 (g) 表示，說明每克檢體中可以培養出來的微生物數量為  $n \times 10^x$ ，顯示方式為 X Log<sub>10</sub> n

D：管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 菌液於試驗小鼠的天數

-D6：抗生素 (Cefoperazone, 500 µg/mL) 加入飲用水中餵食 4 天後移除

D0：移除抗生素飲用水後，一般飲水飲用 2 天，再管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 菌液，每隻試驗小鼠 0.2 mL，濃度為  $1 \times 10^5$  CFU/mL

表 6 無菌試驗小鼠管餵接種克雷伯氏肺炎後再與無特定病原菌試驗小鼠同籠  
一周後的腸道微生物菌相變化



| Log/g                   | D7  |     |     |      | D14  |      |      |      | D28  |      |      |      |      |
|-------------------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                         | No. | 1   | 2   | 3    | 4    | 1    | 2    | 3    | 4    | 1    | 2    | 3    | 4    |
| Enterobacteriaceae      | 9.4 | 9.7 | 9.5 | 9.9  | 9.6  | 9.6  | 9.9  | 9.9  | 9.9  | 9.2  | 8.7  | 9.0  | 9.0  |
| Streptococcaceae        | -   | -   | 3.0 | -    | 9.5  | 9.9  | 9.9  | 9.8  | 9.8  | 9.8  | 9.6  | 9.7  | 9.6  |
| Bacteroidaceae          | -   | -   | -   | -    | 3.0  | -    | -    | -    | -    | 10.0 | 9.9  | 9.6  | 10.2 |
| Eubacteriaceae          | 8.6 | 8.3 | 8.7 | 8.7  | 9.4  | 9.3  | 9.9  | 8.5  | 9.7  | 9.8  | 9.5  | 9.6  |      |
| <i>Clostridium</i> spp. | -   | -   | 9.0 | 9.8  | 9.7  | 9.6  | 9.8  | 9.9  | 9.3  | -    | 9.5  | -    |      |
| <i>K. pneumoniae</i>    | 8.9 | 8.6 | 8.9 | 8.4  | 8.0  | 7.5  | 8.0  | 7.5  | 6.0  | 6.3  | 6.5  | 6.7  |      |
| Total                   | 9.5 | 9.7 | 9.6 | 10.0 | 10.2 | 10.2 | 10.5 | 10.3 | 10.4 | 10.3 | 10.2 | 10.4 |      |

無菌及無特定病原菌試驗小鼠品系：C57BL/6Jnar1

-：微生物數量低於  $1 \times 10^3$  CFU/g

微生物菌數以 Log 10/每克 (g) 表示，說明每克檢體中可以培養出來的微生物數量為  $n \times 10^x$ ，顯示方式為 X Log<sub>10</sub> n

D：管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 菌液於試驗小鼠的天數

D0：數據沒有顯示，因為是無菌試驗小鼠，開始時腸道中沒有定植任何微生物

D7：D0 時以管餵接種 NTUH-K2044 (K1) 菌液，每隻試驗小鼠 0.2 mL，濃度為  $5 \times 10^4$  CFU/mL，並與 SPF 試驗小鼠同籠 7 天後，以培養的方式檢測腸道微生物相

No.：試驗小鼠 4 重複

表 7 預先每周一次連續三周肌肉注射疫苗，觀察到疫苗接種可以種減緩腸道  
內 KP 的定植

| 同籠後天數    | 疫苗+佐劑接種試驗組                   | 佐劑對照組                       | 試驗對照組                       |
|----------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <i>n</i> | 10                           | 5                           | 2                           |
| D1       | -(0%)                        | -(0%)                       | -(0%)                       |
| D2       | -(0%)                        | 1(20%)[1×10 <sup>3</sup> ]  | 2(100%)[1×10 <sup>3</sup> ] |
| D3       | 2(20%)[1×10 <sup>3</sup> ]   | 4(80%)[1×10 <sup>3</sup> ]  | 1(100%)[1×10 <sup>3</sup> ] |
| D5       | 3(30%)[1×10 <sup>3</sup> ]   | 4(80%)[1×10 <sup>3</sup> ]  | 1(100%)[1×10 <sup>3</sup> ] |
| D7       | 8(80%)[3.5×10 <sup>3</sup> ] | 5(100%)[4×10 <sup>4</sup> ] | 1(100%)[1×10 <sup>4</sup> ] |
| D14      | 10(100%)[5×10 <sup>3</sup> ] | 5(100%)[2×10 <sup>4</sup> ] | 1(100%)[3×10 <sup>4</sup> ] |
| D21      | 10(100%)[4×10 <sup>4</sup> ] | 5(100%)[1×10 <sup>5</sup> ] | 1(100%)[1×10 <sup>5</sup> ] |

無特定病原菌試驗小鼠品系：C57BL/6Jnar1

-：糞便檢體中 KP 的數量小於 1×10<sup>3</sup> CFU/g，因培養基上沒有培養出菌落

%：使用培養方式，於腸道中有培養出 KP 的百分比

[ ]：糞便檢體中培養出的 KP 平均數量

D：施打疫苗後的試驗小鼠與已經於腸道中定植 KP 之無特定病原菌試驗小鼠同籠後的天數

*n*：試驗小鼠重複數

表 8 使用兩種噬菌體治療 NTUH-K2044 (K1) 定植腸道中的試驗小鼠，並以 PCR 方式檢測試驗過程中，試驗小鼠糞便檢體萃取出來的總 DNA 內，是否含有 NTUH-K2044 (K1) 定植於腸道中的結果

| 組別(n)   | 噬菌體處理                        | 存活數量 | D0 | D3 | D7 | D14 | D35 |
|---------|------------------------------|------|----|----|----|-----|-----|
| I(4)*   | 陰性對照組                        | n=4  | -  | -  | -  | -   | -   |
| II(5)*  | 試驗對照組                        | n=3  | +  | +  | +  | +   | +   |
| III(4)* | 管餵 $\phi$ K1-1               | n=2  | +  | +  | +  | +   | +   |
| IV(10)* | 管餵 $\phi$ KO1-1+ $\phi$ K1-1 | n=4  | +  | +  | +  | +   | +   |
|         |                              | n=1  | +  | -  | +  | +   | +   |
|         |                              | n=1  | +  | -  | -  | -   | -   |
| V(4)*   | 管餵及腹腔注射 $\phi$ K1-1          | n=2  | +  | -  | -  | +   | +   |

\*：每組試驗組的試驗動物數量

n：試驗小鼠存活的數量，存活率約為 56%，腸道中定植 NTUH-K2044 (K1) 的成功率為 100%

＋：表示 PCR 檢測腸道微生物結果為 KP 陽性，代表腸道微生物相中包含有 KP

-：表示 PCR 檢測腸道微生物結果為 KP 陰性，代表腸道微生物相中以 PCR 的方式檢測不出 KP

D：噬菌體治療後的天數

管餵或腹腔注射噬菌體治療濃度： $\phi$ KO1-1 及  $\phi$ K1-1 濃度分別為  $1 \times 10^9$  及  $1 \times 10^{11}$  PFU/mL

成功移除腸道中定植的 NTUH-K2044 (K1) 的比例為 17%

表 9 使用兩種噬菌體治療 CRKP 定植腸道中的試驗小鼠，並以 PCR 方式檢測試驗過程中，試驗小鼠糞便檢體萃取出來的總 DNA 內，是否含有 CRKP 定植於腸道中的結果

| 組別(n)   | 噬菌體處理                      | 存活數量         | D0  | D7 | D14 | D21 | D35 | D56 |
|---------|----------------------------|--------------|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| I(4)*   | 試驗對照組                      | n=4          | +   | +  | +   | +   | +   | +   |
| II(4)*  | 管餵 $\phi$ KO1-1            | n=4          | +   | +  | +   | +   | +   | +   |
| III(4)* | 管餵 $\phi$ K64-1            | n=4          | +   | -  | -   | +   | +   | +   |
| IV(28)* | 管餵 $\phi$ KO1-1+           | n=11         | +   | -  | -   | +   | +   | +   |
|         |                            | $\phi$ K64-1 | n=1 | +  | -   | +   | +   | +   |
|         |                            | n=1          | +   | +  | +   | +   | +   | +   |
|         |                            | n=15         | +   | -  | -   | -   | -   |     |
| V(16)*  | 管餵及腹腔注射                    | n=8          | +   | -  | -   | +   | +   | +   |
|         | $\phi$ KO1-1+ $\phi$ K64-1 | n=8          | +   | -  | -   | -   | -   | -   |

\*：每組試驗組的試驗動物數量

n：試驗小鼠存活的數量，存活率約為 100%，腸道中定植 CRKP 的成功率為 100%

＋：表示 PCR 檢測腸道微生物結果為 CRKP 陽性，代表腸道微生物相中包含有 CRKP

-：表示 PCR 檢測腸道微生物結果為 CRKP 陰性，代表腸道微生物相中以 PCR 的方式檢測不出 CRKP

D：噬菌體處理後的天數

管餵或腹腔注射噬菌體治療濃度： $\phi$ KO1-1 及  $\phi$ K64-1 濃度分別為  $1 \times 10^9$  PFU/mL

成功移除腸道中定植的 CRKP 的比例為 52.3%