安徽农业大学学报, 2019, 46(6): 942-949
Journal of Anhui Agricultural University
[DOI] 10.13610/j.cnki.1672-352x.20200113.009　网络出版时间：2020-1-13　17:20:25
[URL] http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1162.S.20200113.1056.018.html

肺炎克雷伯氏菌毒力因子及其基因组学研究进展

赵　位[1]，喻　东[1]，程建国[2]，李秋波[2]，王　印[1]，杨泽晓[1]，姚学萍[1]，罗　燕[1*]
(1. 四川农业大学动物医学院，成都 611130；2. 四川养麝研究所，都江堰 611800)

摘　要：肺炎克雷伯氏菌（*Klebsiella pneumoniae*）属于肠杆菌科、克雷伯菌属，在人和动物肠道、呼吸道以及水、土壤、林产品和农产品中广泛存在，肺炎克雷伯氏菌作为一种机会致病菌，是目前公认的导致人和动物发病的重要革兰阴性菌。该菌可引起宿主感染肺炎、肝脓肿、脑膜炎、肠炎、子宫炎、乳腺炎及败血症。此外，随着测序技术的发展，全基因组序列分析已经广泛应用于探究肺炎克雷伯氏菌入侵以及抵抗宿主免疫系统引起致病的研究。对肺炎克雷伯氏菌毒力因子荚膜（Capsule）、脂多糖（Lipopolysaccharides，LPS）、菌毛（Fimbriae）、外膜蛋白（Outer membrane proteins）、铁载体（Siderophores）、尿囊素（Allantoin）代谢相关因子及其基因组学研究进展进行综述，并对肺炎克雷伯氏菌研究中的一些问题进行探讨。

关键词：肺炎克雷伯氏菌；致病菌；毒力因子；基因组学
中图分类号：Q93-331　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1672–352X (2019)06–0942–07

Progress on virulence factors and genomics in *Klebsiella pneumoniae*

ZHAO Wei[1], YU Dong[1], CHENG Jianguo[2], LI Qiubo[2], WANG Yin[1], YANG Zexiao[1], YAO Xueping[1], LUO Yan[1]
(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130;
2. Sichuan Institute of Musk Deer Breeding, Dujiangyan 611800)

Abstract: *Klebsiella pneumoniae* belongs to the *Klebsiella* genus of the Enterobacteriaceae, which is commonly associated with opportunistic infections and frequently isolated from respiratory and intestinal of human and animal, water, soil, forest products and agricultural products. As a commonly acknowledged pathogenic bacterium, *K. pneumoniae* has caused serious infection, including pneumonias, liver abscess, meningitis, enteritis, hysteritis, mastitis and septicemia, in human and animal. Besides, with the development of DNA sequencing technology, the mechanism of *K. pneumoniae* invades the host's immune system and causes disease has been revealed by whole genome sequencing. This review covers aspects of virulence factors (lipopolysaccharide, fimbriae, outer membrane proteins, siderophores and allantoin metabolism related factors) and genomics of *K. pneumoniae*. Meanwhile, some problems in research of *K. pneumoniae* have been discussed in this paper.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; pathogenic bacterium; virulence factor; genomics

肺炎克雷伯氏菌（*Klebsiella pneumoniae*）是定植于哺乳动物肠道、呼吸道的重要条件致病菌，在机体免疫力下降或菌群失调时可直接或间接引起感染，引发脑膜炎、肺炎、肠炎、腹膜炎、肝脓肿及败血症等多种疾病，发病率和死亡率极高，其复杂的致病机理，临床上治疗起来十分困难[1-3]。自Friediander于1883年首次从大叶性肺炎病人肺组织中分离到该菌以来，在人、家禽、家畜、水生动物及野生动物机体中均分离到该菌，近年来关于该菌致病的报道愈来愈多，现已成为仅次于大肠杆菌的致病菌[4-5]。据美国临床调查显示，10%的院内和社区获得性感染的病例是由肺炎克雷伯氏菌直接或间接引起[6]。毒力因子在肺炎克雷伯氏菌感染宿主过程中扮演重要作用。本文从肺炎克雷伯氏菌毒力因子为着眼点（荚膜、脂多糖、菌毛、外膜蛋白、铁载体及尿囊素代谢相关因子[7-8]）入手，阐述其相关

收稿日期：2019-04-14
基金项目：四川省科技厅四川省科研院所科技成果转化资金（2017YSZH0008）和四川省科技厅应用基础研究项目(2018JY0644)共同资助。
作者简介：赵　位，博士研究生，E-mail：ZWHNZM@163.com
* **通信作者：**罗　燕，教授，博士生导师，E-mail：Lycjg@163.com

的致病机理，并对全基因组测序分析在肺炎克雷伯氏菌研究中的应用进行讨论。

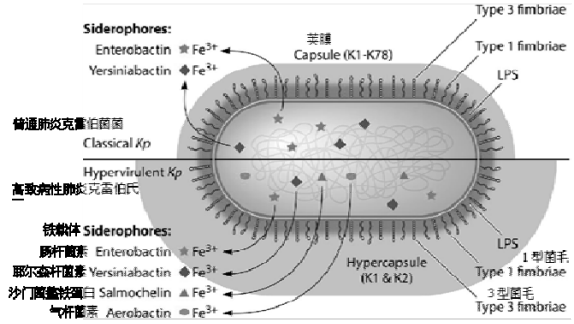

图 1　肺炎克雷伯氏菌模式图[7]

Figure 1　The pattern of *Klebsiella pneumoniae*[7]

1　毒力因子研究进展

1.1　荚膜

作为肺炎克雷伯氏菌最重要的毒力因子，荚膜（Capsule）能够帮助肺炎克雷伯氏菌逃避宿主吞噬细胞的杀伤作用，提高其存活率及保证其致病能力[7]。到目前为止，至少有 79 种类型的荚膜被证实[9-10]，其中 K1、K2、K5、K20、K54 和 K57 等荚膜型被认为与宿主感染肺炎、肝脓肿及脑脊髓膜炎等密切相关，其中 K1、K2 荚膜菌株已经被普遍认为是强致病性菌株[11-13]。现在根据毒力的强弱将肺炎克雷伯氏菌划分为普通肺炎克雷伯菌（Classic *K. pneumoniae*, cKP）和高致病性肺炎克雷伯氏菌（Hypervirulent *K. pneumoniae*，HvKP）[14-15]。第一株 HvKP 因产生大量的黏多糖于 1986 年分离自我国台湾，随后在亚洲的各个地方陆续报道出 HvKP 分离株[16]。大量研究表明，肺炎克雷伯氏菌高黏度表型与黏液表型调节基因（*rmpA* 和 *rmpA2*）、黏液相关基因（*magA*）和荚膜合成调节基因（*rcsA* 和 *rcsB*）等有关[17]，RcsAB 基因能够调控荚膜相关基因 *galF* 的表达，最终影响荚膜的生成[18-19]。研究发现，55%～100%的强致病菌中包含 *rmpA* 或 *rmpA2*[20]。同时，Yu 等[21]研究认为，部分高致病性菌株中 *rmpA* 或 *rmpA2* 基因被 *magA* 基因取代，但均表现出了高黏度表型。HvKP 菌株常伴有比较厚的荚膜，其致病性和荚膜密切相关[16,22]，不同序列类型的 HvKP 菌株其致病表型存在差异[23]。此外，荚膜的大小是影响肺炎克雷伯氏菌致病性的关键因素，荚膜包裹在菌体四周，干扰宿主的吞噬作用，且能直接抑制宿主的免疫系统，为病原菌提供保护和防御作用，为其增殖和入侵宿主细胞提供时间[24]。在构建小鼠模型中，荚膜缺失株与野生株相比，表现出更低的毒性和更低的肺部感染率，并已失去了引起宿主全身感染的能力[25]。

对肺炎克雷伯氏菌基因组研究过程中，发现各种类型的荚膜相关基因均能够定位在染色体上的一段序列，被定义为荚膜基因簇（*cps* gene cluster）。Pan 等[9]对 79 种荚膜基因簇序列比对分析发现，共有 77 种荚膜基因簇基因构成均是 5'端开始于 *galF* 基因，3'端终止于 *ugd* 基因，均包含 *galF*、*cpsACP*、*wzi*、*wza*、*wzb*、*wzc*、*gnd*、*wca*、*cpsB*、*cpsG* 和 *ugd* 等保守基因，而 K4 型荚膜基因簇中缺乏 *gnd* 基因，K50 荚膜基因簇中 *gnd* 和 *ugd* 基因缺失。传统上，细菌的荚膜型是采用血清学方法进行判定，而随着测序技术的发展，分子分型越来越多地运用于细菌的分型。Brisse 等[26-27]研究表明根据荚膜相关基因 *wzi* 或 *wzc* 序列，能够对肺炎克雷伯氏菌荚膜型进行判定。同时，Pan 等[9]认为，通过比较荚膜基因簇基因组成，可以对新荚膜型进行鉴定。此外，荚膜也是肺炎克雷伯氏菌疫苗研究的一个热点，根据欧洲肺炎克雷伯氏菌流行情况，Campbell 等[28]构建了肺炎克雷伯氏菌 24 价疫苗，临床结果显示，该疫苗对多种血清型肺炎克雷伯氏菌的感染具有保护作用。Hsu 等[29]研究发现，K57 型肺炎克雷伯氏菌荚膜基因簇基因 *orf13* 参与编码乙酰转移酶，而在 A1142 菌株荚膜基因簇中 *orf13* 基因发生突变，荚膜的乙酰化作用减弱，荚膜抗原的多样性增加，最终影响了肺炎克雷伯氏菌与宿主的相互作用，为疫苗的研制提供新思路。本课题组基于 *wzi*、*wzc* 基因及荚膜基因簇序列对一株分离于林麝肺脏的肺炎克雷伯氏菌进行荚膜分析发现，该菌株荚膜型为 K54 型，荚膜基因簇长度为 24 872 bp，其荚膜基因簇与已报道的 K54 型荚膜基因簇高度相似，为研制 K54 型肺炎克雷伯氏菌亚单位疫苗奠定基础[13]。

1.2　脂多糖

脂多糖（Lipopolysaccharides，LPS），又被称作内毒素，主要是由脂质 A、O-抗原多糖及核心寡糖构成。研究认为 LPS 随着脂质 A 结构的细微改变，而去激发不同代谢及免疫途径，脂质 A 前期在细胞质中合成，然后通过 ABC 转运蛋白 MsbA 的作用，定植在外膜上[30]。研究表明，肺炎克雷伯氏菌脂质 A 有助于抵御宿主的先天免疫，对宿主的抗菌肽具有很强的防御作用，在实验动物中，脂质 A 合成相关基因 LpxL2 的缺失，能够引起肺炎克雷伯氏菌毒力的大幅度降低，LpxL2 可以作为抗肺炎克雷伯氏菌的药物靶点[31]。

至少有 9 种 O-抗原多糖在肺炎克雷伯氏菌中被

发现，与生物合成相关的 O-抗原多糖是由 *wb* 基因簇构成，其基因组成比较保守的，包括 *glf*、*wbbN*、*wzm*、*wbbO*、*wbbM* 和 *wzt* 等基因[32]，但是对于组成各个基因的编码序列来说却表现出高度的遗传变异性，从而导致不同的 O-抗原多糖具有不同的化学性质，O-抗原多糖结构的细微变化都有可能导致细菌毒性发生显著变化[33]。在临床上，O-抗原多糖多为 O1 型，对具有强侵袭力和没有侵袭力的菌株研究发现，O1 型 O-抗原多糖在具有强侵袭力的菌株中的比例远远高于在没有侵袭力的菌株中的比例，且菌株中 O1 型 O-抗原多糖菌株在血清中抵御宿主免疫反应的能力明显高于非 O1 型 O-抗原多糖菌株，其能够阻止宿主机体的补体系统被激活，因此能够有助于肺炎克雷伯氏菌免于被补体系统介导的免疫反应所消灭[34]。有报道证实，通过制备 O-抗原单克隆抗体，能够中和肺炎克雷伯氏菌内毒素，对肺炎克雷伯氏菌引起的感染进行治疗[35]。

表 1 肺炎克雷伯氏菌毒力相关基因

Table 1 The virulence related genes of *Klebsiella pneumoniae*

毒力因子 Virulence factors	基因 Genes	参考文献 References
荚膜 Capsule	*rmpA*、*rmpA2*、*magA*、*rcsA*、*rcsB*、*galF*、*cpsACP*、*wzi*、*wza*、*wzb*、*wzc*、*gnd*、*wca*、*cpsB*、*cpsG*、*ugd*、*orf13*	[9]、[17]、[18]、[19]、[20]、[21]、[26]、[27]、[29]
脂多糖 Lipopolysaccharide	*LpxL2*、*glf*、*wbbN*、*wzm*、*wbbO*、*wbbM*、*wzt*、*hldD*、*waaF*、*waaC*、*waaL*、*waaQ*、*wabG*、*wabH*、*orf10*、*waaA*、*waaE*、*coaD*	[31]、[32]、[36]、[38]、[39]
菌毛 Fimbriae	*fimBEAICDFGHK*、*mrkABCDF*、*kpcABCD*	[40]、[41]、[42]、[43]、[44]、[47]
铁载体 Siderophore	*entABCDEF*、*fepABCDG*、*iroBCDEN*、*iucABCD*、*iutA*	[33]、[50]、[53]
外膜蛋白 Outer membrane protein	*OmpA*、*OmpK35*、*OmpK36*、*KpnO*、*OmpK26*、*AcrA*、*AcrB*	[32]、[60]、[61]、[62]、[63]、[64]
尿囊素代谢相关因子 Allantoin metabolism-related factor	*allS*、*allA*、*allR*、*gcl*、*hyi*、*glxR*、*0484*、*allB*、*0433*、*glxK*、*f261*、*allC*、*allD*、*cap*	[67]、[68]、[69]

肺炎克雷伯氏菌核心寡糖分为 1 型和 2 型，组成核心寡糖的基因簇为 *waa*，1 型和 2 型都是由 11 保守基因（*hldD*、*waaF*、*waaC*、*waaL*、*waaQ*、*wabG*、*wabH*、*orf10*、*waaA*、*waaE* 和 *coaD*）构成，1 型还具有 *wabI* 和 *wabJ* 基因，而 2 型有独特的 *wabK* 和 *wabM* 两个基因[36]。这两种不同型的基因簇的差异主要表现在近端二糖 GlcN-(1,4)-GalA 的取代基 GlcN 上面。在 1 型核心寡糖中，Glc*p*N 残基被 Kdo 残基或 α-Hep (1–4)-α-Kdo 取代，而在 2 型核心寡糖中，Glc*p*N 残基被 β-Glc*p*(1–6)-α-Glc*p* 残基取代[32]。在肺炎克雷伯氏菌 *waa* 基因簇研究中，Jung 等[37]研究发现，*wabG* 基因在核心 LPS 的合成中扮演重要作用，通过激活 *wabG* 基因可以增强细菌的致病性。此外，与野生菌株相比，构建的 *wabO*、*waaF*、*waaC* 等基因缺失株均表现出毒力降低或无致病性，且缺失株在尿路感染中的定植能力也发生大幅度降低[38-39]。

1.3 菌毛

菌毛具有粘附作用和抗原性。肺炎克雷伯氏菌菌毛至少可以分为 4 类，分别是 I 型菌毛（Type I fimbriae）、III 型菌毛（Type III fimbriae）、Kpc 菌毛和黏附素 KPF-28 菌毛[32]。I 型和 III 型菌毛是肺炎克雷伯氏菌的重要粘附因子，对菌株的致病性具有重要作用[40]。I 型菌毛存在于肺炎克雷伯氏菌染色体的一个保守区域上，由 *fim* 基因簇（*fimBEAICDFGHK*）组成。I 型菌毛粘附于外膜表面，能穿过荚膜基质向外延伸，其顶端主要由 FimA 亚基和黏附因子 FimH 构成[41]。与大肠杆菌相比，肺炎克雷伯氏菌 *fim* 基因簇在 *fimH* 基因后面还有一个特有的 *fimK*，作为一个转录调节因子，FimK 可以激发其上游基因 *fimA* 的转录[41]。研究表明[42]I 型菌毛在肺炎克雷伯氏菌所引发的尿路感染初期扮演重要作用。III 型菌毛也是定位在肺炎克雷伯氏菌染色体上的特定区域上，是由 *mrk* 基因簇构成，包括 *mrkABCDF* 基因[42]。*mrkA* 基因编码菌毛亚基，该亚基通过聚合形成菌毛的转轴[43-44]。*mrkD* 基因编码的粘合亚基，能够与胶原分子结合，位于菌毛的顶部。*mrkB*、*mrkC* 和 *mrkF* 基因分别编码了分子伴侣、引导蛋白和框架蛋白，这些蛋白对菌毛的组装和稳定性都起着重要作用[45]。通过对不同动物模型中的感染进行评估，发现肺炎克雷伯氏菌在宿主肠和肺部的增殖能力并不受 I 型和 III 型菌毛的影响，但 I

型和 III 型菌毛却是肺炎克雷伯氏菌引起宿主发生尿路感染的重要因子，在小鼠模型中，I 型菌毛有助于菌株生物膜的形成和对宿主膀胱细胞的入侵[46]。同时，有研究将 *fim* 基因簇缺失，缺失株在肺脏、脾脏和肝脏上的定植能力并未受影响。III 型菌毛缺失株在肺部中的感染也无差异[47]。Kpc 菌毛是由 *kpcABCD* 操纵子合成和组装的，有研究认为 Kpc 菌毛对肺炎克雷伯氏菌生物膜的形成具有重要作用[47]。KPF-28 是细、长、柔软，直径只有 4～5 nm 的菌毛。研究证实，KPF-28 菌毛有助于肺炎克雷伯氏菌粘附于人 Caco-2 细胞，表明肺炎克雷伯氏菌 KPF-28 菌毛在哺乳动物肠道中可能是一种定殖因子[48]。目前对于 KPF-28 和 Kpc 菌毛结构和功能的研究还较少，I 型和 III 型菌毛仍然是肺炎克雷伯氏菌感染过程中粘附的研究热点。

1.4　铁载体

细菌在体内或者体外生长代谢过程中均需要铁离子的参与。目前为止，12 种铁离子吸收相关系统在肺炎克雷伯氏菌中至少被发现，其大致分为四类[32]，即肠杆菌素（Enterobactin）、儿茶酚受体（Catechols receptor）、耶尔森杆菌素（Yersiniabactin）和气杆菌素（Aerobactin）。肠杆菌素作为肠杆菌科细菌产生的一种典型的含铁细胞，普遍存在于 cKP 和 HvKP 中，在细菌吸收铁离子过程中扮演最为重要的作用[49]。肠杆菌素合成相关基因构成了 *entABCDEF* 基因簇，同时，*fepABCDG* 基因簇参与肠杆菌素的运输，*fepB* 编码膜间质蛋白，对肺炎克雷伯氏菌感染过程中肠杆菌素的功能具有上调作用[50]。此外，在很多 HvKP 菌株中，肠杆菌素与生物膜的成熟存在相关性，并被认为可以作为一种潜在新型抗生素[51-52]。在儿茶酚受体基因中，研究相对较多的是 *iroN* 基因，该基因参与构成了 *iroBCDEN* 基因簇，存在于肺炎克雷伯氏菌的一些毒力质粒上[53]。耶尔森杆菌素最早是在高致病性耶尔森氏鼠疫杆菌中发现。研究报道，在临床菌株中，约 18% cKP 能够分泌耶尔森杆菌素，而超过 90%的 HvKP 能够分泌耶尔森杆菌素[54]。在肺部的感染过程中，耶尔森杆菌素扮演重要作用，其可帮助病原菌逃离粘膜分泌的脂质运载蛋白，从而对呼吸道造成感染[55]。此外，Perry 等[56]认为作为一个独立的铁离子转移系统，耶尔森杆菌素存在于很多种致病菌中，其被一个毒力岛所编码，参与了铁载体的合成。气杆菌素是一个氧肟酸盐型铁载体，由基因组中的 *iucABCD* 基因簇编码，*iutA* 基因编码该基因簇调节蛋白[33]。Russo 等[57]通过体内和体外试验研究表明，相比于其他 3 种铁载体，气杆菌素更有助于 HvKP 对铁离子的利用。有报道表明，气杆菌素在 cKP 和 HvKP 菌株中的检出情况大不相同，在 cKP 中检出率仅约 3%～6%，而在 HvKP 中检测率高达 93%～100% [49,58]。王春燕等[59]对 110 株高致病性肺炎克雷伯氏菌毒力因子进行研究表明，含 *rmpA* 基因和气杆菌素的高毒力肺炎克雷伯氏菌是引起肝脓肿的主要病原菌。

1.5　外膜蛋白

外膜蛋白主要分为 OmpA、外膜孔道蛋白（Outer membrane porins）和外排泵（Efflux pumps）。OmpA 是肠杆菌科细菌的主要外膜蛋白，在肠杆菌科细菌中高度保守。OmpA 能够减缓肺炎克雷伯氏菌对呼吸道上皮细胞的激活，从而减弱呼吸道上皮细胞的炎症反应[60]。肺炎克雷伯氏菌主要有两种外膜孔道蛋白，分别是 OmpK35 和 OmpK36，部分肺炎克雷伯氏菌的 OmpK35 和 OmpK36 被 KpnO 或 OmpK26 蛋白所取代[32]。单独构建 *OmpK36*、*KpnO* 和 *OmpK26* 基因缺失株时，缺失株均表现出对头孢菌素以及碳青霉烯类抗生素的抗性增强，在小鼠急性全身性感染实验中表现出毒力降低，而单独敲除 *OmpK35* 基因时，缺失株并没有表现出耐药性和致病性的差异[61]。将菌株的 *OmpK35* 和 *OmpK36* 两个基因同时敲除时，缺失株在生长上有明显缺陷，且对嗜中性粒细胞更加敏感[62-63]。外排泵的编码基因簇为 *AcrAB*，其不仅与细菌的耐药性相关，而且在肺炎克雷伯氏菌抵抗宿主先天免疫防御过程中起着重要作用[64]。外排泵的失活不仅对细菌耐药性产生影响，还使肺炎克雷伯氏菌引起小鼠感染肺炎的能力降低[65]。

1.6　尿囊素代谢相关因子

作为尿酸的衍生物，尿囊素具有麻醉镇痛、水合、抗刺激、抑菌、消炎及促进上皮生长等作用[66]。尿囊素代谢产生氨和二氧化碳，能够为肺炎克雷伯氏菌的生长提供氮源和碳源[67]。Chou 等[68]将分离于患肝脓肿病人的 31 株 HvKP 与分离于非肝脓肿病人的 29 株 cKP 进行对比发现，在 HvKP 染色体上具有一个长度为 21 745 bp 的核苷酸序列，共包含 19 个开放阅读框，其中 14 个开放阅读框（*allS*、*allA*、*allR*、*gcl*、*hyi*、*glxR*、*0484*、*allB*、*0433*、*glxK*、*f261*、*allC*、*allD*、*cap*）与尿囊素代谢相关，而 cKP 菌株中没有发现尿囊素代谢相关基因，可见这段序列参与了尿囊素的代谢，并在该肺炎克雷伯氏菌引起的肝病中发挥着重要作用。同时，Lin 等[69]在后续研究中发现尿囊素代谢相关基因缺失株对小鼠的 LD_{50} 显著增加，证实尿囊素代谢相关基因能够影响

肺炎克雷伯氏菌的毒力。此外，对 50 株分离于台湾肝脏脓肿病人的 HvKP 菌株进行调查发现，该 50 株菌中尿囊素代谢相关基因的检出率达 100%，而其他分离于血液的肺炎克雷伯氏菌尿囊素代谢基因的检出率 0%[70]。Fang 等[22]也证实，尿囊素代谢相关基因与肝脓肿具有相关性。

2 肺炎克雷伯氏菌基因组学研究概况

随着测序技术的发展，借助全基因组测序技术对肺炎克雷伯氏菌进行研究也越来越普遍。截至目前，在 Genbank（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/815?）中共收录 334 株肺炎克雷伯氏菌的完整基因组序列，基因组平均大小为 5.58 Mb，GC 含量在 56.17%～58%之间，基因组平均包含基因 5 757 个。在 2001 年，首株肺炎克雷伯氏菌 *K. pneumoniae* MGH78578（CP000647）的全基因组序列测序工作在华盛顿大学基因组测序中心完成，该菌株分离于肺炎患者的痰液[71]。台湾阳明大学基因组科学研究所于 2009 年完成 *K. pneumoniae* NTUH-K2044（AP006725）菌株的测序[72]，该菌株分离于人的肝脏，具有强致病性，引起患者同时感染肝脓肿和脑膜炎，全基因组序列比对分析显示，该菌株和致病菌 *K. pneumoniae* 78 578 在毒力基因上存在差异，在 *K. pneumoniae* NTUH-K2044 特有基因中发现了耶尔森杆菌素、毒力相关操纵子和铁载体 *iroNBCD* 基因簇及粘蛋白基因 *rmpA* 等，揭示了两个菌株定植于不同靶器官的机理。Turton 等[73]通过全基因组测序分析，发现强致病性菌株 *K. pneumoniae* KpvK54（CP023134）菌株中包含一个毒力质粒和一段耶尔森杆菌素基因簇。Liu 等[74]在病人的痰液中分离出一株多重耐药肺炎克雷伯氏菌 *K. pneumoniae* HS11286（CP003200），通过全基因组序列分析，在该菌株中发现 6（CP003223-CP003228）个天然耐药质粒，并在这些质粒上发现了 *CTX-M-14*、bla_{TEM-1}、bla_{KPC-2}、*tetG*、*cat*、*sul1*、*dfra12*、*aac(3)-Ia* 和 *aph* 等多种耐药基因，此外，还发现了一个结合转移基因。*K. pneumoniae* HS11286 菌株基因组的解读，为研究肺炎克雷伯氏菌适应性进化和耐药性传播中水平转移原件的作用提供了新的思路，该菌株已经成为研究肺炎克雷伯氏菌耐药性的重要参考菌株。对 68 株耐碳青霉烯类抗生素的肺炎克雷伯氏菌基因组分子特性分析发现，所有菌株均携带 *blaKPC* 基因，部分菌株还携带 *blaSHV*、*blaTEM*、*blaCTX-M* 和 *blaOXA* 等 β-内酰胺类耐药基因，并认为肺炎克雷伯氏菌对替加环素产生抗性与 AcrAB-TolC 外排作用密切相关。此外，该 68 个基因组中均发现铁离子吸收系统、3 型菌毛基因以及 IncFIB(pQil)、IncFIB(K)、ColRNAI、IncX1、IncX3、IncFII(K)、IncN、IncL/M(pMU407) 和 IncFIA(HI1)（JN233705、JN233704、DQ298019、EU370913、JN247852、CP000648、AY046276、U27345 和 AF250878）9 类质粒复制子[75]。除了人和动物源菌株，在植物源肺炎克雷伯氏菌研究中，Rosalino 等[76]通过基因组分析，在准备食用的蔬菜中分离出的 2 株肺炎克雷伯氏菌基因组中发现 *blaSHV-12*、*blaCTX-M-15* 和 *blaDHA-1* 等耐药基因，并呼吁当地加快食品安全标准的制定。全基因组测序分析能够更加深入地对肺炎克雷伯氏菌致病、耐药机理进行研究，对于该致病菌的预防和治疗都具有重要意义。随着测序技术以及相关学科的飞速发展，会有越来越多的肺炎克雷伯氏菌的全基因组序列被测定，对肺炎克雷伯氏菌的研究也将会变得更加全面和深入。

3 观察和展望

肺炎克雷伯氏菌作为重要的致病菌，其引起人和动物的广泛感染。自 100 多年前首次分离到该菌以来，从最开始的非致病菌株到强致病菌株的出现，对于肺炎克雷伯氏菌的研究也越来越深入。然而只有少数的几个毒力因子的致病机理被揭示。同时，关于宿主免疫系统与菌株之间的相互关系研究并不深入[7]。目前，还没有益生菌应用于肺炎克雷伯氏菌防治上的报道，对于肺炎克雷伯氏菌的治疗还依赖于各种抗生素，这势必导致肺炎克雷伯氏菌抗性的增加，比如，耐碳青霉烯类抗生素的菌株在世界各地均有报道。

现在，全基因组测序在肺炎克雷伯氏菌研究上的应用，是研究致病菌株遗传变异的有效方法。通过对不同细菌基因组序列的比较分析，能够深入地研究病原微生物和非病原微生物、致病菌株和非致病菌株之间在基因组水平上的异同。同时，还有助于建立起细菌基因型和表型之间的联系，进而深入探索各菌株具体的致病、耐药机理。但是，全基因组序列分析是基于相应的数据库与相同菌株或不同菌株在核苷酸或蛋白质之间的相似性进行分析，进而寻找出更多功能基因。而在不同宿主菌中，其所具有的功能还需要进行更多深入的试验验证。

参考文献：

[1] BRISSE S, VAN DUIJKEREN E. Identification and an-

timicrobial susceptibility of 100 Klebsiella animal clinical isolates[J]. Vet Microbiol, 2005, 105(3/4): 307-312.

[2] LI Y, SU M Y, GE X Z, et al. Enhanced aldehyde dehydrogenase activity by regenerating NAD^+ in *Klebsiella pneumoniae* and implications for the glycerol dissimilation pathways[J]. Biotechnol Lett, 2013, 35(10): 1609-1615.

[3] CLEGG S, MURPHY C N. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiol Spectr, 2016, 4(1):1-17.

[4] 赵位, 王吴优, 程建国, 等. 林麝肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定及其 *kp05372* 基因的生物信息学分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017,45(12): 23-30.

[5] 刀丽梅, 韩冠双, 曹立亭, 等. 12 株牛源肺炎克雷伯菌 ESBLs 类抗生素的耐药性与耐药基因检测[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39 (5): 49-53.

[6] MAGILL S S, EDWARDS J R, BAMBERG W, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections[J]. N Engl J Med, 2014, 370(13): 1198-1208.

[7] PACZOSA M K, MECSAS J. *Klebsiella* pneumoniae: going on the offense with a strong defense[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2016, 80(3): 629-661.

[8] 康燕菲, 田平芳, 谭天伟. 肺炎克雷伯氏菌毒力因子的研究进展[J]. 微生物学报, 2015, 55(10): 1245-1252.

[9] PAN Y J, LIN T L, CHEN C T, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp[J]. Sci Rep, 2015, 23(5): 15573.

[10] SHU H Y, FUNG C P, LIU Y M, et al. Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates[J]. Microbiology, 2009, 155(12): 4170-4183.

[11] LIN Y T, CHENG Y H, JUAN C H, et al. High mortality among patients infected with hypervirulent antimicrobial-resistant capsular type K1 *Klebsiella pneumoniae* strains in Taiwan[J]. Int J Antimicrob Ag, 2018, 52(2): 251-257.

[12] LIN Y, WANG Y P, WANG F, et al. Community-onset *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in Taiwan: clinical features of the disease and associated microbiological characteristics of isolates from pneumonia and nasopharynx[J]. Front Microbiol, 2015, 9: 122.

[13] ZHAO W, TIAN Q, LUO Y, et al. Isolation, identification, and genome analysis of lung pathogenic *Klebsiella pneumoniae* (lpkp) in forest musk deer[J]. J Zoo Wildl Med, 2017, 48(4): 1039-1048.

[14] PALACIOS M, MINER T A, FREDERICK D R, et al. Identification of two regulators of virulence that are conserved in *Klebsiella pneumoniae* Classical and hypervirulent strains[J]. mBio, 2018, 9(4):e01443-18.

[15] SHAH R K, NI Z H, SUN X Y, et al. The determination and correlation of various virulence genes, ESBL, serum bactericidal effect and biofilm formation of clinical isolated classical *Klebsiella pneumoniae* and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from respiratory tract infected patients[J]. Pol J Microbiol, 2017, 66(4): 501-508.

[16] YEH K M, KURUP A, SIU L K, et al. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(2): 466-471.

[17] HSU C R, LIN T L, CHEN Y C, et al. The role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited[J]. Microbiology, 2011, 157(12): 3446-3457.

[18] PENG D, LI X, LIU P, et al. Transcriptional regulation of galF by RcsAB affects capsular polysaccharide formation in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044[J]. Microbiol Res, 2018, 216: 70-78.

[19] SU K W, ZHOU X P, LUO M, et al. Genome-wide identification of genes regulated by RcsA, RcsB, and RcsAB phosphorelay regulators in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044[J]. Microb Pathog, 2018, 123: 36-41.

[20] LI W, SUN G, YU Y, et al. Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(2): 225-232.

[21] YU W L, KO W C, CHENG K C, et al. Association between rmpA and magA genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan[J]. Clin Infect Dis, 2006, 42(10): 1351-1358.

[22] FANG C T, CHUANG Y P, SHUN C T, et al. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications[J]. Int J Clin Exp Med, 2004, 199(5):697-705.

[23] SHI Q C, LAN P, HUANG D Y, et al. Diversity of virulence level phenotype of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from different sequence type lineage[J]. BMC Microbiol, 2018(1), 18: 94.

[24] STRUVE C. Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* studies[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 218(1): 149-154.

[25] WEI D, YUMINAGA Y, SHI J P, et al. Non-capsulated mutants of a chemical-producing *Klebsiella pneumoniae* strain[J]. Biotechnol Lett, 2018, 40(4): 679-687.

[26] BRISSE S, PASSET V, HAUGAARD A B, et al. *wzi* gene sequencing, a rapid method for determin ation of capsular type for *Klebsiella* strains[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(12): 4073-4078.

[27] PAN Y J, LIN T L, CHEN Y H, et al. Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by *wzc* sequencing[J]. PLoS One, 2013, 8(12): e80670.

[28] CAMPBELL W N, HENDRIX E, CRYZ S J, et al. Immunogenicity of a 24-valent Klebsiella capsular polysaccharide vaccine and an eight-valent Pseudomonas O-polysaccharide conjugate vaccine administered to victims of acute trauma[J]. Clin Infect Dis, 1996, 23(1): 179-181.

[29] HSU C R, LIAO C H, LIN T L, et al. Identification of a capsular variant and characterization of capsular acetylation in *Klebsiella pneumoniae* PLA-associated type K57[J]. Sci Rep, 2016, 6(1):31946.

[30] LLOBET E, MARTÍNEZ-MOLINER V, MORANTA D, et al.. Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid a structure[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112 (46):6369-6378.

[31] MILLS G, DUMIGAN A, KIDD T, et al. Identification and characterization of two *Klebsiella pneumoniae* lpxL lipid A late acyltransferases and their role in virulence[J].

Infect Immun, 2017, 85(9):IAI.00068-17.

[32] LI B, ZHAO Y L, LIU C T, et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Futur Microbiol, 2014, 9(9): 1071-1081.

[33] HSIEH P F, LIN T L, YANG F L, et al. Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscess[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33155.

[34] MERINO S, ALTARRIBA M, IZQUIERDO L, et al. Cloning and sequencing of the *Klebsiella pneum oniae* O5 *wb* gene cluster and its role in pathogenesis[J]. Infect Immun, 2000, 68(5): 2435-2440.

[35] SZIJÁRTÓ V, GUACHALLA L M, HARTL K, et al. Endotoxin neutralization by an O-antigen specific monoclonal antibody: A potential novel therapeutic approach against *Klebsiella pneumoniae* ST258[J]. Virulence, 2017, 8(7): 1203-1215.

[36] FRESNO S, JIMÉNEZ N, CANALS R, et al. A second galacturonic acid transferase is required for core lipopolysaccharide biosynthesis and complete capsule association with the cell surface in *Klebsiella pneumoniae*[J]. J Bacteriol, 2007, 189(3):1128-1137.

[37] JUNG S G, JANG J H, KIM A Y, et al. Removal of pathogenic factors from 2,3-butanediol producing *Klebsiella* species by inactivating virulence-related *wabG* gene[J]. Appl Microbiol Biot, 2013, 97(5): 1997-2007.

[38] REGUE M, IZQUIERDO L, FRESNO S, et al. A second outer core region in *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide[J]. J Bacteriol, 2005, 187(12): 4198-4206.

[39] CLEMENTS A, GABORIAUD F, DUVAL J F, et al. The major surface-associated saccharides of *Klebsiella pneumoniae* contribute to host cell association[J]. PLoS One, 2008, 3(11): e3817.

[40] STAHLHUT S G, STRUVE C, KROGFELT K A, et al. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2012, 65(2): 350-359.

[41] WANG Z C, HUANG C J, HUANG Y J, et al. FimK regulation on the expression of type 1 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43S3[J]. Microbiology, 2013, 159(7): 1402-1415.

[42] LIN C T, LIN T H, WU C C, et al. CRP-Cyclic AMP regulates the expression of type 3 fimbriae via cyclic di-GMP in *Klebsiella pneumoniae*[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162884.

[43] MURPHY C N, CLEGG S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation[J]. Future Microbiol, 2012, 7(8): 991-1002.

[44] STAHLHUT S G, STRUVE C, KROGFELT K A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbriae agglutinate yeast in a mannose-resistant manner[J]. J Med Microbiol, 2012, 61(3): 317-322.

[45] TARKKANEN A M, WESTERLUND-WIKSTRÖM B, ERKKILÄ L, et al. Immunohistological localization of the MrkD adhesin in the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Infect Immun, 1998, 66(5): 2356-2361.

[46] MURPHY C N, MORTENSEN M S, KROGFELT K A, et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections[J]. Infect Immun, 2013, 81(8): 3009-3017.

[47] ALLEN B L, GERLACH G F, CLEGG S. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*[J]. J Bacteriol, 1991, 173(2): 916-920.

[48] WU C C, HUANG Y J, FUNG C P, et al. Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase KpcI[J]. Microbiology, 2010, 156(7): 1983-1992.

[49] EL FERTAS-AISSANI R, MESSAI Y, ALOUACHE S, et al. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens[J]. Pathol Biol, 2013, 61(5): 209-216.

[50] PALACIOS M, BROBERG C A, WALKER K A, et al. A serendipitous mutation reveals the severe virulence defect of a *Klebsiella pneumoniae fepB* Mutant[J]. Msphere, 2017, 2(4): e00341-17.

[51] MAY T, OKABE S. Enterobactin is required for biofilm development in reduced-genome *Escherichia coli*[J]. Environ Microbiol, 2011, 13(12): 3149-3162.

[52] SHANKAR C, VEERARAGHAVAN B, NABARRO L E B, et al. Whole genome analysis of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates from community and hospital acquired bloodstream infection[J]. BMC Microbiology, 2018, 18(1): 6-15.

[53] SONDA T, KUMBURU H, VAN ZWETSELAAR M, et al. Molecular epidemiology of virulence and antimicrobial resistance determinants in *Klebsiella pneumoniae* from hospitalised patients in Kilimanjaro, Tanzania[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018, 37(10): 1901-1914.

[54] BACHMAN M A, OYLER J E, BURNS S H, et al. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2[J]. Infect Immun, 2011, 79(8): 3309-3316.

[55] ZHU C D, LIYANAPATHIRANA V, LI C, et al. Characterizing mobilized virulence factors and multidrug resistance genes in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Sri Lankan hospital[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2044.

[56] PERRY R D, FETHERSTON J D. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis[J]. Microbes Infect, 2011, 13(10): 808-817.

[57] RUSSO T A, OLSON R, MACDONALD U, et al. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* Ex VivoandIn vivo[J]. Infect Immun, 2015, 83(8): 3325-3333.

[58] VERNET V, PHILIPPON A, MADOULET C, et al. Virulence factors(aerobactin and mucoid phenotype) in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* blood culture isolates[J]. FEMS Microbiol Lett, 1995, 130(1): 51-57.

[59] 王春燕, 邱厚兵, 彭胡. 肺炎克雷伯菌肝脓肿微生物学特征和耐药情况分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(21):2955-2957.

[60] BABU L, UPPALAPATI S R, SRIPATHY M H, et al. Evaluation of recombinant multi-epitope outer membrane protein-based *Klebsiella pneumoniae* subunit vaccine in mouse model[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1805.

[61] YAN J J, WANG M C, ZHENG P X, et al. Associations of the major international high-risk resistant clones and virulent clones with specific ompK36 allele groups in *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan[J]. New Microbes New Infect, 2015, 5: 1-4.

[62] TSAI Y, FUNG C, LIN J, et al. *Klebsiella pneumoniae* Outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(4): 1485-1493.

[63] SUGAWARA E, KOJIMA S, NIKAIDO H. *Klebsiella pneumoniae* major porins OmpK35 and OmpK36 allow more efficient diffusion of β-lactams than their *Escherichia coli* homologs OmpF and OmpC[J]. J Bacteriol, 2016, 198(23): 3200-3208.

[64] NICOLAS-CHANOINE M, MAYER N, GUYOT K, et al. Interplay between membrane permeability and enzymatic barrier leads to antibiotic-dependent resistance in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 1422.

[65] LIN Y, HUANG Y W, HUANG H, et al. *In vivo* evolution of tigecycline-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strains in patients: relationship between virulence and resistance[J]. Int J Antimicrob Agents, 2016, 48(5): 485-491.

[66] 杨伟明, 高振宇. 皮尔复液预防腹腔粘连实验研究[J]. 遵义医学院学报, 2002, 25(5): 414-415.

[67] XUE J, TAN B, YANG S Y, et al. Influence of cAMP receptor protein (CRP) on bacterial virulence and transcriptional regulation of *allS* by CRP in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Gene, 2016, 593(1): 28-33.

[68] CHOU H C, LEE C Z, MA L C, et al. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection[J]. Infect Immun, 2004, 72(7): 3783-3792.

[69] LIN J C, KOH T H, LEE N, et al. Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan[J]. Gut Pathogens, 2014, 6(1): 21.

[70] YU W L, KO W C, CHENG K C, et al. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008, 62(1): 1-6.

[71] MCCLELLAND M, SANDERSON K E, SPIETH J, et al. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium LT2[J]. Nature, 2001, 413(6858): 852-856.

[72] WU K M, LI L H, YAN J J, et al. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis[J]. J Bacteriol, 2009, 191(14): 4492-4501.

[73] TURTON J F, PAYNE Z, MICAH K, et al. Capsular type K54, clonal group 29 and virulence plasmids: an analysis of K54 and non-K54 closely related isolates of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Epidemiol Infect, 2018, 146(14): 1813-1823.

[74] LIU P, LI P, JIANG X, et al. Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. pneumoniae HS11286, a multidrug-resistant strain isolated from human sputum[J]. J Bacteriol, 2012, 194(7): 1841-1842.

[75] RIMOLDI S G, GENTILE B, PAGANI C, et al. Whole genome sequencing for the molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the Italian ASST fatebenefratelli Sacco hospital, 2012-2014[J]. BMC Infect Dis, 2017, 17: 666.

[76] VÁZQUEZ-LÓPEZ R, SOLANO-GÁLVEZ S, LEÓN-CHÁVEZ B, et al. Characterization of gene families encoding beta-lactamases of gram-negative rods isolated from ready-to-eat vegetables in Mexico city[J]. High-Throughput, 2018, 7(4): 36.