

一株 ST37 型肺炎克雷伯菌的全基因组测序及毒力因子比较分析

梁慧贤, 闫鹤*

(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 该研究从病猪的肝脏分离到一株多重耐药 ST37 型 (Sequence type, ST) 肺炎克雷伯菌 KP200, ST37 型是耐广谱 β -内酰胺临床分离株中常见型别。基于全基因组测序数据, 比较 KP200 和来自 NCBI 所有 ST37 型 (160 株) 肺炎克雷伯菌毒力因子的携带情况, 通过单拷贝核心基因进化分析 ST37 型肺炎克雷伯菌的毒力与遗传进化关系。结果表明, KP200 携带 7 类毒力因子相关基因包括: 荚膜 (*cpsACP*, *galF*, *gnd*, *ugd*, *manB* 和 *manC*)、1 型菌毛 (*fimBEACDFGHK*)、3 型菌毛 (*mrkABCD*)、肠杆菌素 (*entABCDEF* 和 *fepABCDG*)、沙门菌素 (*iroE* 和 *iroN*)、气杆菌素 (*iutA*) 以及细菌 VI 型分泌系统 T6SS (*tssJFGKIBCDMHL*)。携带 5 类以上的毒力因子的 ST37 型肺炎克雷伯菌占比 100%。单拷贝核心基因进化分析结果显示, KP200 与其他来自人源的 5 株肺炎克雷伯菌亲缘关系较近且毒力因子携带情况相似。该研究表明猪源 ST37 肺炎克雷伯菌 KP200 携带毒力因子种类多, 具有潜在的致病性, ST37 型肺炎克雷伯菌毒力因子携带情况与单拷贝核心基因进化关系存在一定的关联性。该研究结果可对 ST37 型肺炎克雷伯菌的毒力与遗传进化关系的相关性提供基础数据。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 毒力因子; 全基因组测序; 进化分析

文章编号: 1673-9078(2021)12-272-279

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.12.0272

Whole-genome Sequencing of A *Klebsiella pneumoniae* ST37 Strain and Comparative Analysis of Virulence Factors

LIANG Huixian, YAN He*

(College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: In this study, a multi-drug resistant ST37 (Sequence type, ST) *Klebsiella pneumoniae* KP200 strain was isolated from the liver of sick swine. ST37 type is a common type among clinical isolates resistant to broad-spectrum β -lactam. Based on the whole-genome sequencing data, virulence factors carried by KP200 and all *K. pneumoniae* ST37 strains (160 strains) from NCBI were investigated, and the relationship between the virulence and genetic evolution of ST37 *K. pneumoniae* was analyzed by single-copy core gene evolution. The results showed that KP200 carried 7 types of virulence factor-related genes including capsule (*cpsACP*, *galF*, *gnd*, *ugd*, *manB* and *manC*), type 1 fimbriae (*fimBEACDFGHK*), type 3 fimbriae (*mrkABCD*), enterobactin (*entABCDEF* and *fepABCDG*), salmochelin (*iroE* and *iroN*), aerobactin (*iutA*) and bacterial Type VI secretion system T6SS (*tssJFGKIBCDMHL*). *K. pneumoniae* ST37 carrying more than 5 types of virulence factors accounted for 100%. The results of single-copy core gene evolution analysis showed that KP200 and the other 5 *K. pneumoniae* strains of human origin had a close relationship and similar virulence factors. This study showed that ST37 *K. pneumoniae* KP200 strains of swine origin carried a wide variety of virulence factors and had potential pathogenicity. There was an evolutionary relationship between the virulence factors carried by ST37 *K. pneumoniae* and the evolution of single-copy core genes. The results of this study can provide basic data for the

引文格式:

梁慧贤, 闫鹤. 一株 ST37 型肺炎克雷伯菌的全基因组测序及毒力因子比较分析[J]. 现代食品科技, 2021, 37(12): 272-279

LIANG Huixian, YAN He. Whole-genome sequencing of a *Klebsiella pneumoniae* ST37 strain and comparative analysis of virulence factors [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(12): 272-279

收稿日期: 2021-03-15

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0500606)

作者简介: 梁慧贤 (1995-), 女, 在读研究生, 研究方向: 病原微生物, E-mail: 2428130024@qq.com

通讯作者: 闫鹤 (1972-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 病原微生物, E-mail: yanhe@scut.edu.cn

correlation between the virulence factors of ST37 *K. pneumoniae* and genetic evolution.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; virulence factors; whole genome sequencing; evolutionary analysis

肺炎克雷伯菌是一种引起人与动物感染条件致病菌^[1], 在兽医临床上, 肺炎克雷伯菌可以引起猪发病, 已成为规模化猪场病原菌之一^[2], 其对猪场造成的危害不容忽视。猪感染肺炎克雷伯菌会引发多种器官组织病变, 导致极高的致病率和致死率^[3]。国内外都有报道猪场发生猪感染肺炎克雷伯菌大爆发的事件, 引起猪感染疾病进而死亡, 给猪场造成巨大的经济损失^[4-5]。现阶段, 研究者主要探究猪源肺炎克雷伯菌的耐药性^[2,6-7], 其毒力因子的携带情况以及毒力因子与进化之间的关系缺乏完整的研究。

肺炎克雷伯菌在感染宿主过程可通过毒力因子起到自身免疫防御的效果, 从而使肺炎克雷伯菌成功入侵宿主细胞, 进而存活、增殖^[8]。根据肺炎克雷伯菌侵染过程, 相关毒力因子分为五类: 荚膜、脂多糖、菌毛(1型菌毛以及3型菌毛)、铁载体因子(肠杆菌素、耶尔森菌素、气杆菌素、沙门菌素)^[8]以及细菌VI型分泌系统(T6SS)^[9]。第一类毒力因子荚膜是包裹细胞的多糖基质, 是肺炎克雷伯菌必需的毒力因子^[10]。荚膜由位于染色体上的荚膜多糖基因簇(*wzi*、*wza*、*wzb*、*wzc*、*gnd*、*wca*、*cpsB/manB*、*cpsG/manC*和*galF*)合成^[11], 荚膜合成的调控基因*rcsA*和*rcsB*可以增加荚膜的合成^[8]。第二类毒力因子脂多糖(LPS)也称为内毒素, 是所有革兰氏阴性菌细胞壁的主要和必要的成分^[8]。第三类毒力因子菌毛是肺炎克雷伯菌粘附的重要介质, 在肺炎克雷伯菌中, 1型和3型菌毛是主要的具有致病性的粘附因子。1型菌毛是细菌细胞表面上的细丝状突起^[12], 由基因簇*fimBEACDFGHK*编码; 3型菌毛则是细菌细胞表面上的螺旋状细丝, 由*mrkABCD*基因簇编码^[13], 与生物膜形成有关^[14]。第四类毒力因子铁载体因子, 包括肠杆菌素、耶尔森菌素、气杆菌素和沙门菌素。肠杆菌素被认为是肺炎克雷伯菌主要的铁吸收系统^[15], 生物合成与基因簇*entABCDEF*和编码介导其转运的蛋白质基因簇*fepABCDG*有关^[16]。最后一类是VI型分泌系统(T6SS), 是一种属于多功能收缩注射系统(CIS)的多蛋白的装置^[17], 作为一种新型的毒力因子, 在重塑细菌群落中和直接或间接地在发病机理中起关键作用^[18]。越来越多的研究表明, 猪源肺炎克雷伯菌携带多种毒力因子, 其毒力威胁不容忽视。Liu等^[19]发现中国四川省猪场分离的1株猪源高毒力肺炎克雷伯菌SCs11, 携带含有耶尔森氏菌高致病岛的新型整合和结合元件。Chen等^[20]报道了从猪肺组织中分离的肺炎克

雷伯菌 ZYST1 中携带含有两个 T6SS 基因簇的新的多重耐药和毒力元件。携带多种毒力因子的猪源肺炎克雷伯菌给兽医临床提出新的挑战。

全基因组序列正迅速成为预测肺炎克雷伯菌的毒力因子的有利工具, 尤其是对于了解相关菌株基因特征和进化关系具有重要意义^[21]。国内外已有研究者通过全基因组测序方法研究肺炎克雷伯菌的毒力因子携带情况^[20,22]。基于7个管家基因(*rpoB*、*gapA*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*infB*和*tonB*)的核苷酸序列的多位点序列分型(Multilocus sequence typing, MLST)方法常用于肺炎克雷伯菌的进化分析^[23]。

鉴于目前对猪源 ST37 型肺炎克雷伯菌携带的毒力基因与进化之间的关系尚缺乏了解。因此本研究基于全基因组测序, 对一株多重耐药猪源 ST37 型肺炎克雷伯菌 KP200 和不同来源的 160 株 ST37 型肺炎克雷伯菌进行比较毒力因子分析, 并进一步通过菌株比较基因组分析, 探究菌株毒力与遗传进化关系的相关性, 为全面掌握肺炎克雷伯菌的毒力因子提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

肺炎克雷伯菌 KP200 分离自广东省某养猪场的患腹泻的猪的肝脏。药敏试验结果显示, KP200 对头孢西汀、头孢他啶、头孢噻肟、头孢噻吩、苯唑西林、氨基曲南、庆大霉素、卡那霉素、链霉素、环丙沙星、恩诺沙星、氟苯尼考、氯霉素、四环素、米诺环素、复方新诺明以及红霉素表现出耐药, 对多粘菌素 B、美罗培南以及亚胺培南敏感。

1.2 相关试剂

Luria-Bertani 液体培养基, 广州环凯微生物科技有限公司; Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)、dNTPs、缓冲液、琼脂糖, 日本 TaKaRa 公司; 引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒, Marker DL2000, 北京博迈德生物技术有限公司; 核酸染料, 上海捷瑞生物工程有限公司。

1.3 16S rRNA 基因 PCR 扩增

通过细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒提取细菌 DNA。使用 16S rRNA 基因全长通用引物, 引物序列

为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') 扩增目标条带, 预期条带大小为 1500 bp。PCR 反应体系及条件为: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。将 PCR 扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳, 于凝胶成像系统中观察结果。将符合预期模板大小的扩增产物委托上海美吉生物医药科技有限公司测序, 然后将得到的 16S rDNA 序列提交到 (National Center for Biotechnology Information) NCBI 核酸数据库中进行 BLAST 在线分析。

1.4 全基因组测序与注释

肺炎克雷伯菌 KP200 通过 Illumina MiSeq 和 Pacbio RS II 测序仪进行全基因组测序。测序所得 raw reads 序列使用 SPAdes v3.9.0 和 Canu v1.4 软件进行组装, 并通过 PGAP (Prokaryotic genome annotation pipeline) 进行基因预测与功能注释。采用 Glimmer 3.02 软件进行开放阅读框 (Open reading frame, ORF) 预测, 将所有预测蛋白序列与非冗余蛋白数据库 NR、Swiss-Prot 数据库、eggNOG (Evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups) 数据库进行 BLASTp ($E < 1e^{-10}$) 比对, 完成蛋白序列功能注释。

1.5 MLST 分析

根据 PasteurMLST 数据库, 确定 7 个管家基因 (*rpoB*、*gapA*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*infB*、*tonB*) 的等位基因号, 得出肺炎克雷伯菌 KP200 菌株的 ST 型别。

1.6 毒力因子分析

使用毒力因子 Virulence Factors of Pathogenic Bacteria (VFDB) 数据库, 对肺炎克雷伯菌 KP200 和 NCBI GenBank 数据库中所有 ST37 型肺炎克雷伯菌 (160 株), 进行毒力因子分析。

1.7 单拷贝基因组进化

通过 prokka v1.14.6 (默认参数)^[24] 获得肺炎克雷伯菌 KP200 和 160 株 ST37 型肺炎克雷伯菌的注释基因文件和蛋白文件。统一使用 orthofinder v2.4.0^[25] (推荐参数) 得到 161 株菌株的单拷贝同源蛋白序列文件, 接着使用 muscle v3.8.31^[26] (推荐参数) 进行多蛋白序列比对, 最后使用默认参数的 MEGA X^[27] 构建单拷贝核心同源蛋白序列 Maximum-likelihood (ML) 进化树, Bootstrap 值设置为 1000 次。

1.8 数据分析

肺炎克雷伯菌 KP200 和 160 株 ST37 型肺炎克雷伯菌携带的毒力基因携带情况进行汇总统计, 包括单个毒力基因的携带菌株数以及每株菌携带毒力因子的种类数。基于单拷贝基因组进化树聚类, 将 161 株 ST37 型肺炎克雷伯菌存在差异的毒力基因以热图的形式展现。

2 结果与讨论

2.1 肺炎克雷伯菌 KP200 基因组的基本特征

肺炎克雷伯菌 KP200 的基因组全长为 5257665 bp, 平均 GC 含量为 58.78%, 共有 5106 个编码基因, 基因组测序的圈图如图 1 所示。根据 PasteurMLST 数据库比对 7 个管家基因 (*rpoB-1*、*gapA-2*、*mdh-2*、*pgi-1*、*phoE-13*、*infB-9* 和 *tonB-16*), 确定肺炎克雷伯菌 KP200 的分型为 ST37。尽管 ST37 型肺炎克雷伯菌不属于某一特定的克隆群, 但 ST37 型是耐广谱 β -内酰胺临床肺炎克雷伯菌的重要型别^[19,26]。

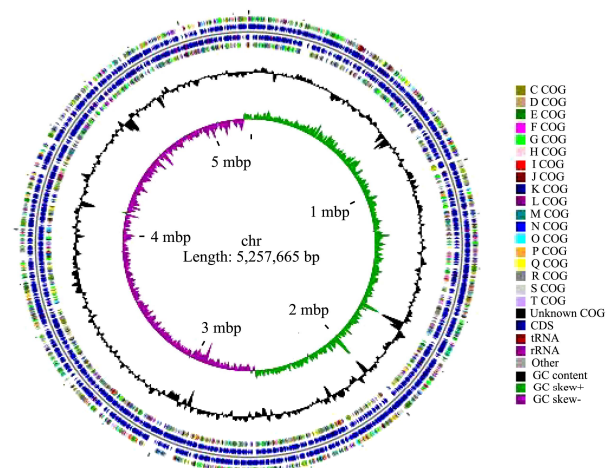


图 1 肺炎克雷伯菌 KP200 全基因组染色体圈图

Fig.1 Circular map of *Klebsiella pneumoniae* KP200 chromosome

注: 从内到外, 第一圈代表刻度; 第二圈代表 GC Skew; 第三圈代表 GC 含量; 第四圈和第七圈代表每一个编码序列 (CDS) 所属的同源蛋白簇 (COG); 第五圈和第六圈代表 CDS、tRNA 及 rRNA 在基因组上的位置。

2.2 161 株肺炎克雷伯菌的毒力基因预测结果

研究表明, ST37 型是耐广谱 β -内酰胺临床分离株中常见型别^[19,28], 因此需要进一步全面掌握该型别携带的毒力因子。NCBI 目前已有的 160 株 ST37 型肺炎克雷伯菌, 其中来自人源 (109 株), 未知来源 (33 株), 鸡源 (9 株), 环境来源 (8 株) 以及食品 (1 株)。目前为止, 只有 KP200 为猪源的 ST37 型肺炎克雷伯

菌。目前大多数研究主要集中于临床肺炎克雷伯菌的毒力情况进行分析^[29-30]。尽管有研究对宠物医院的ST37型肺炎克雷伯菌携带的耐药基因情况进行监测^[31]，但是目前没有针对猪源ST37型肺炎克雷伯菌的毒力因子携带情况进行分析的研究。161株肺炎克雷伯菌经过毒力因子分析，共发现76种毒力因子，其中19种毒力因子为所有菌株共有的。161株菌种都携带的21种毒力基因分别为：1型菌毛基因*fimACFGI*、3型菌毛基因 *mrkDCHJ*、肠杆菌素 *entABCEF* 和 *fepABC*、荚膜合成调节基因 *rcaAB*。

针对差异的毒力基因分析表明（图2），荚膜相关基因在161株菌中分布存在差异：133株菌携带 *cpsACP* 基因，158株菌携带 *galF* 基因，109株菌携带 *gnd* 基因，118株菌携带 *ugd* 基因，81株菌携带 *manBC* 基因，然而包括KP200在内的161株ST37型肺炎克雷伯菌中存在荚膜基因的缺失。研究表明，与无荚膜的肺炎克雷伯菌相比，有荚膜的肺炎克雷伯菌被先天免疫细胞吞噬的可能性更低^[32]。LPS相关基因在161株菌中分布同样存在差异，其中11株菌携带 *glf*、*wbbM*、*wbbO*、*wzm*、*wzt* 基因，9株菌携带 *kfoC* 基因，12株菌携带 *wbbN* 基因，携带完整LPS毒力因子的菌株共有9株。结果表明，包括KP200在内的大多数

ST37型肺炎克雷伯菌存在LPS合成相关的基因缺失，可能导致毒力减弱^[33]。

1型菌毛编码基因簇 *fimBEACDFGHK* 在161株菌中分布存在差异（图2），158株菌携带1型菌毛基因 *fimH*；160株菌携带1型菌毛基因 *fimDE*；157株菌携带1型菌毛基因 *fimB*，只有KP200和来自中国临床肺炎克雷伯菌5422两株菌携带1型菌毛基因 *fimK*，该基因一般认为其功能涉及1型纤维调节^[34]，进一步分析得出携带完整的1型菌毛基因 *fimA*、*fimB*、*fimC*、*fimD*、*fimE*、*fimF*、*fimG*、*fimH*、*fimI* 和 *fimK* 的菌株只有KP200和5422。而研究表明，在90%的临床和环境肺炎克雷伯菌分离株中以及几乎所有的肠杆菌科菌株中表达1型菌毛^[12]。3型菌毛携带情况：159株菌携带3型菌毛基因 *mrkA*，158株菌携带3型菌毛基因 *mrkB*，160株菌携带3型菌毛基因 *mrkFI*，因此共有包括KP200在内的158株菌携带完整的编码3型菌毛基因 *mrkABCD*。在3型菌毛中，大部分的结构由 *mrkA* 亚基和位于尖端的粘附素 *mrkD* 组成。基因 *mrkBCE* 参与组装和表达调控，而 *mrkF* 参与菌毛的表面稳定性^[35]。据报道，检测3型菌毛基因主要针对基因 *mrkD* 的检测^[36-37]。

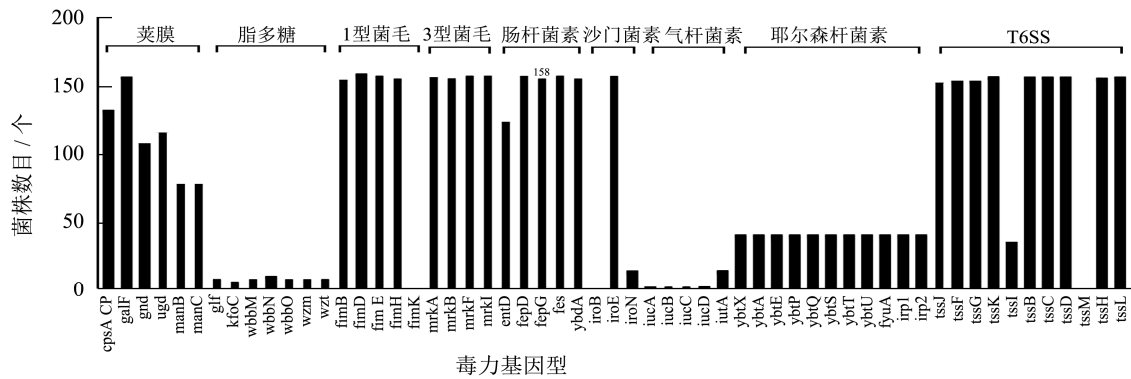


图2 161株肺炎克雷伯菌毒力基因分布图

Fig.2 Results of virulence factors detection for the 161 isolates of *Klebsiella pneumoniae*

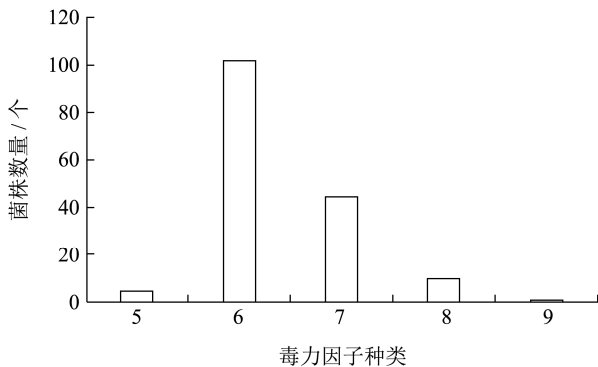


图3 161株ST37型肺炎克雷伯菌毒力因子携带情况

Fig.3 The virulence factors of 161 *Klebsiella pneumoniae* isolates

铁载体因子分析结果表明（图2），161株肺炎克雷伯菌基因组均携带 *entABCEF* 和 *fepABC* 肠杆菌素基因，仅 *entD*、*fepD*、*fepG*、*fes* 和 *ybdA* 在161株肺炎克雷伯菌的分布存在差异，进一步分析得出肠杆菌素相关基因存在于所有的ST37型肺炎克雷伯菌中，与Paczosa等^[8]的研究结果相符。针对沙门菌素分析，仅有KP200和其他15株肺炎克雷伯菌携带 *iroN* 沙门菌素基因。据报道，检测沙门菌素主要针对基因 *iroB*^[38] 和 *iroN*^[39] 的检测。KP200不携带携带耶尔森杆菌素相关基因，26.09%（42/161）的菌株携带耶尔森杆菌素相关基因，Hsieh等^[16]研究发现仅18%的非高毒力肺炎克雷伯菌携带耶尔森杆菌素，说明ST37型肺炎克雷伯菌

的毒力值得关注。161株肺炎克雷伯菌基因组中，仅有包括肺炎克雷伯菌KP200在内的16株携带气杆菌素转运基因*iutA*，常作为识别高毒力肺炎克雷伯菌的特征基

因之一^[38]。研究发现，仅有6%的非高毒力的临床肺炎克雷伯菌发现气杆菌素^[40]，而本次研究中仅有2.48%（4/161）携带完整编码气杆菌素基因*iucABCD-iutA*。

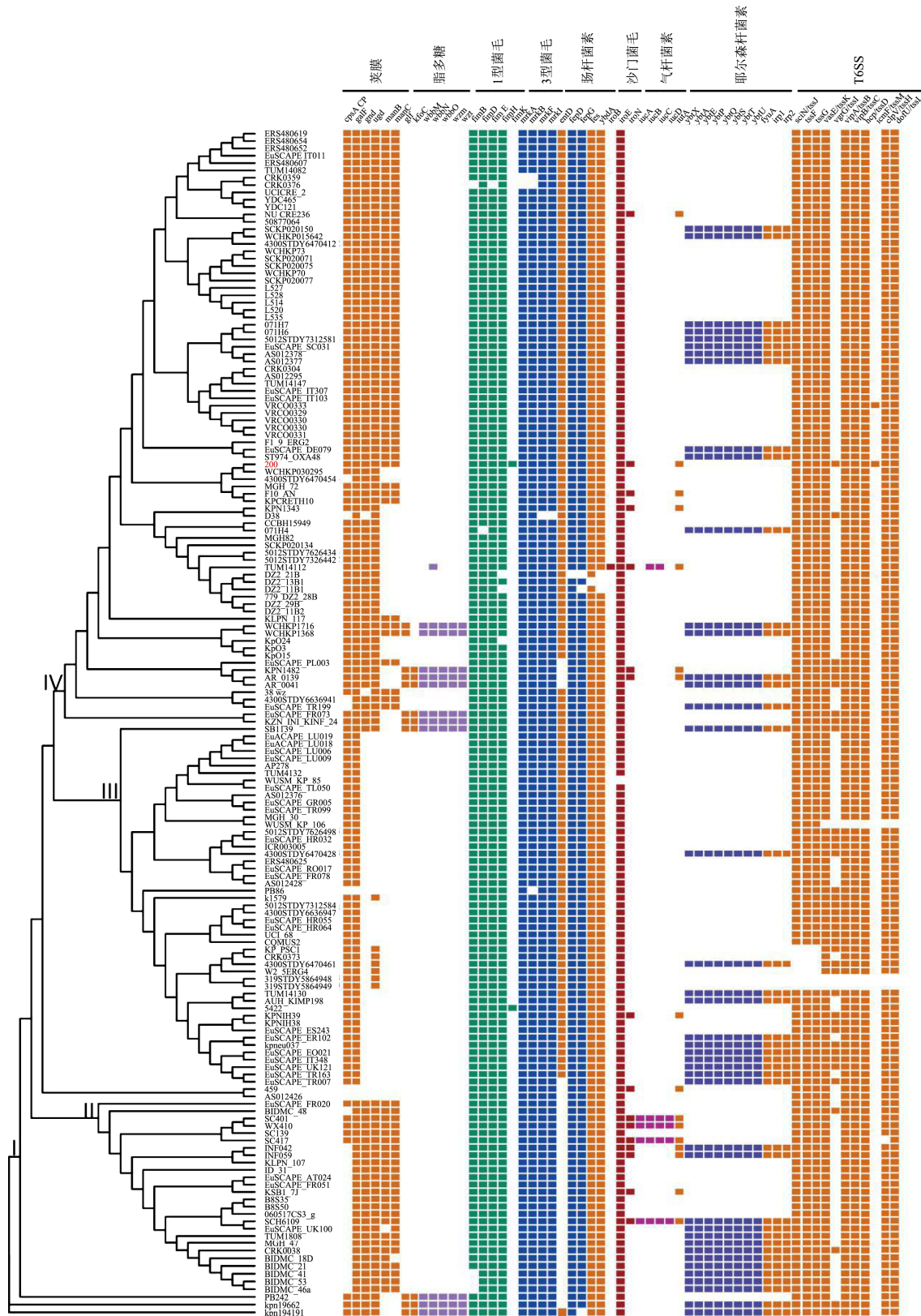


图4 161株ST37型肺炎克雷伯菌进化关系及毒力因子分布图

Fig.4 Evolution relationship and virulence factors profiles of 161 *Klebsiella pneumoniae* isolates

注：同一类型的毒力因子的毒力基因用不同颜色高亮显示，其余使用橘黄色显示，仅显示161株中有差异的毒力因子。

本研究是首次探讨 ST37 型肺炎克雷伯菌 T6SS 的基因携带情况。对 T6SS 相关基因分析表明(图 2), KP200 携带完整的 T6SS 基因, 161 株肺炎克雷伯菌携带 T6SS 基因存在差异: 55 株菌携带 *tssJFG* 基因, 158 株菌携带 *tssKBCDL* 基因, 37 株菌携带 *tssI* 基因, 157 株菌携带 *tssH* 基因, 2 株菌携带 *tssM* 基因。该结果与 Storey 等^[9]对全球 700 个基因组进行 T6SS 基因对比分析结果相似: T6SS 基因在整个肺炎克雷伯菌中具有广泛的多样性。更有研究发现, 猪源肺炎克雷伯菌除了携带两个 T6SS 基因簇外还携带相关的信号通路调控蛋白同源物 *tfoX* 和 *qstR* 以及自然感受态蛋白 *comEA* 和 *comEC*, 有利于肺炎克雷伯菌的杀伤作用和吸收外来 DNA 的作用^[20]。

161 株肺炎克雷伯菌携带的毒力因子的种类统计的分析结果可以看出(图 3), 所有菌株都携带 5 类以上毒力因子, 其中仅有未知来源肺炎克雷伯菌 AR_0139 携带 9 类毒力因子, 4 株人源菌株(肺炎克雷伯菌 AS012426、3189STDY5864948、3189STDY5864949 以及 PB86)仅携带 5 类毒力因子, 携带 6 类毒力因子的菌株数量最多为 102 株。该结果比 Kim 等^[41]通过 PCR 检测的分离自肝脓肿病人粪便的 ST37 型肺炎克雷伯菌携带的毒力因子种类多。同样地, 本研究结果比 Shao 等^[42]通过 PCR 检测的分离自重症新生儿血液的 ST37 型肺炎克雷伯菌携带的毒力因子种类多。本研究与其他研究者的研究结果存在差异可能是由于仅通过 PCR 检测的毒力因子种类较少, 不能全面地反映 ST37 型肺炎克雷伯菌携带毒力因子种类, 表明了本研究基于全基因组序列研究 ST37 型肺炎克雷伯菌携带毒力因子种类情况的重要意义。

2.3 单拷贝基因组进化分析与毒力情况的关系

目前, 基于全基因组进化方法分析菌株之间的进化关系已较为普遍, 但对于肺炎克雷伯菌主要是研究临床爆发菌株之间的进化关系, 尚未将 ST37 型菌株的毒力情况与进化关系相结合进行研究。161 株 ST37 型肺炎克雷伯菌共检测到 2563 个单拷贝基因, 基于单拷贝基因构建系统进化树, 进化树分析结果表明(图 4), 161 株 ST37 型肺炎克雷伯菌主要位于四个不同的分支。该结果与 Zhang 等^[43]对分离自家禽生产环境中 ST37 型肺炎克雷伯菌的进化结果相似。本研究将毒力基因型与单拷贝基因组进化关系相对应(图 4)。结果显示, KP200 位于第四个分支, 且与其他来自人源的 5 株肺炎克雷伯菌形成一个簇, 它们携带的毒力因子分布大致相同, 亲缘关系较近。该结果与 Yang 等^[44]对分离自牛和人的肺炎克雷伯菌的进化分析结果相

似: 牛源肺炎克雷伯菌分离株与人源肺炎克雷伯菌分离株高度混合。除此之外, 含气杆菌素毒力基因的 3 株来自中国的环境样本菌株(SC401、SC417 以及 WX410)的亲缘关系相对于其他菌株更为接近。该结果与 Marques 等^[45]对 18 个家庭的人和伴侣动物的粪便分离的肺炎克雷伯菌的进化分析结果相似: 从同一环境的人和伴侣动物的粪便分离的肺炎克雷伯菌亲缘关系较近, 且携带的毒力因子相似。

3 结论

本研究对 1 株多重耐药猪源 ST37 型肺炎克雷伯菌 KP200 和 160 株 ST37 型肺炎克雷伯菌进行毒力因子比较分析, 以及探讨 ST37 型肺炎克雷伯菌的毒力与遗传进化关系。毒力因子分析表明, 肺炎克雷伯菌 KP200 携带 7 类毒力因子, 毒力因子种类较多, 具有潜在的致病性。进一步对 161 株 ST37 型肺炎克雷伯菌毒力基因型与进化关系之间的分析发现, 所有菌株都携带多种类型的毒力因子, 毒力因子分布具有差异性, 且亲缘关系较近的菌株其毒力基因型较为相似。本研究在猪源肺炎克雷伯菌的毒力及进化研究中具有一定的意义。

参考文献

- [1] Davis G S, Price L B. Recent research examining links among *Klebsiella pneumoniae* from food, food animals, and human extraintestinal infections [J]. *Curr Environ Health Rep*, 2016, 3(2): 128-135
- [2] 潘姣姣,高佳敏,孙世浩,等.猪源性肺炎克雷伯菌的分离鉴定[J].*当代畜牧*,2020,2:19-21
PAN Jiaojiao, GAO Jiamin, SUN Shihao, et al. Isolation and identification of *Klebsiella Pneumoniae* from pigs and its drug resistance analysis [J]. *Contemporary Animal Husbandry*, 2020, 2: 19-21
- [3] Bowring B G, Fahy V A, Morris A, et al. An unusual culprit: *Klebsiella pneumoniae* causing septicemia outbreaks in neonatal pigs? [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 203: 267-270
- [4] None. *Klebsiella pneumoniae* infection causes mastitis in pigs [J]. *Veterinary Record*, 2014, 175(24): 617-620
- [5] 杨留战,杨旭夫,苑士祥,等.哺乳仔猪克雷伯氏肺炎杆菌病的调查[J].*中国兽医科技*,1989,1:19-20
YANG Liuzhan, YANG Xufu, YUAN Shixiang, et al. Investigation of *Klebsiella pneumoniae* disease in suckling piglets [J]. *Chinese Veterinary Science*, 1989, 1: 19-20
- [6] Mobasser G, Teh C, Ooi P T, et al. The emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from swine in

- Malaysia [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2019, 17: 227-232
- [7] Kock R, Daniels-Haardt I, Becker K, et al. Carbapenem-resistant enterobacteriaceae in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review [J]. Clin Microbiol Infect, 2018, 24(12): 1241-1250
- [8] 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
- [9] Storey D, McNally A, Astrand M, et al. *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system-mediated microbial competition is *PhoPQ* controlled and reactive oxygen species dependent [J]. PLoS Pathog, 2020, 16(3): e1007969
- [10] Lawlor M S, Handley S A, Miller V L. Comparison of the host responses to wild-type and *cpsB* mutant *Klebsiella pneumoniae* infections [J]. Infect Immun, 2006, 74(9): 5402-5407
- [11] Arakawa Y, Ohta M, Wacharotayankun R, et al. Biosynthesis of *Klebsiella* K2 capsular polysaccharide in *Escherichia coli* HB101 requires the functions of *rmpA* and the chromosomal *cps* gene cluster of the virulent strain *Klebsiella pneumoniae* chedid (O1:K2) [J]. Infect Immun, 1991, 59(6): 2043-2050
- [12] Stahlhut S G, Tchesnokova V, Struve C, et al. Comparative structure-function analysis of mannose-specific *FimH* adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 2009, 191(21): 6592-6601
- [13] Tarkkanen A M, Westerlund-Wikstrom B, Erkkila 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
- [14] 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
- [15] El F 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 (Paris), 2013, 61(5): 209-216
- [16] Hsieh P F, Lin T L, Lee C Z, et al. Serum-induced iron-acquisition systems and *TonB* contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess [J]. J Infect Dis, 2008, 197(12): 1717-1727
- [17] Zoued A, Brunet Y R, Durand E, et al. Architecture and assembly of the type VI secretion system [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1843(8): 1664-1673
- [18] Chassaing B, Cascales E. Antibacterial weapons: targeted destruction in the microbiota [J]. Trends Microbiol, 2018, 26(4): 329-338
- [19] Liu D, Yang Y, Gu J, et al. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI) carried by a new integrative and conjugative element (ICE) in a multidrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain SCs11 [J]. Vet Microbiol, 2019, 239: 108481
- [20] Chen F, Zhang W, Schwarz S, et al. Genetic characterization of an MDR/virulence genomic element carrying two T6SS gene clusters in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate of swine origin [J]. J Antimicrob Chemother, 2019, 74(6): 1539-1544
- [21] Wyres K L, Lam M, Holt K E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae* [J]. Nat Rev Microbiol, 2020, 18(6): 344-359
- [22] Devanga R N, Muthuirulandi S D, Triplicane D H, et al. The influence of biofilms on carbapenem susceptibility and patient outcome in device associated *K. pneumoniae* infections: insights into phenotype vs genome-wide analysis and correlation [J]. Front Microbiol, 2020, 11: 591679
- [23] Diancourt L, Passet V, Verhoef J, et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 4178-4182
- [24] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation [J]. Bioinformatics, 2014, 30(14): 2068-2069
- [25] Emms D M, Kelly S. OrthoFinder: phylogenetic orthology inference for comparative genomics [J]. Genome Biol, 2019, 20(1): 238
- [26] Edgar R C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(5): 1792-1797
- [27] Kumar S, Stecher G, Li M, et al. Mega X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. Mol Biol Evol, 2018, 35(6): 1547-1549
- [28] 苏乐斌,李柏生,谭海芳,等.广东省肇庆市肺炎克雷伯菌临床分离株的耐药性与MLST分型研究[J].中国抗生素杂志, 2019,44(2):260-265
- SU Lebin, LI Bosheng, TAN Haifang, et al. Drug resistance and MLST typing of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Zhaoqing, Guangdong [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2019, 44(2): 260-265
- [29] Liu C, Guo J. Characteristics of ventilator-associated pneumonia due to hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* genotype in genetic background for the elderly in two tertiary hospitals in China [J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2018,

- 7: 95
- [30] Remya P A, Shanthi M, Sekar U. Characterisation of virulence genes associated with pathogenicity in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Indian J Med Microbiol, 2019, 37(2): 210-218
- [31] Xia J, Fang L X, Cheng K, et al. Clonal spread of 16S rRNA methyltransferase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST37 with high prevalence of ESBLs from companion animals in China [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 529
- [32] Domenico P, Salo R J, Cross A S, et al. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Infect Immun, 1994, 62(10): 4495-4499
- [33] Shankar Sinha S, Valencia G A, Janes B K, et al. The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia [J]. Infect Immun, 2004, 72(3): 1423-1430
- [34] Rosen D A, Hilliard J K, Tiemann K M, et al. *Klebsiella pneumoniae* *FimK* promotes virulence in murine pneumonia [J]. J Infect Dis, 2016, 213(4): 649-658
- [35] 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
- [36] Hirai J, Sakanashi D, Kinjo T, et al. The first case of community-acquired pneumonia due to capsular genotype K2-ST86 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Okinawa, Japan: a case report and literature review [J]. Infect Drug Resist, 2020, 13: 2237-2243
- [37] Zhang S, Zhang X, Wu Q, et al. Clinical, microbiological, and molecular epidemiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae*-induced pyogenic liver abscess in southeastern China [J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2019, 8: 166
- [38] Yan Q, Zhou M, Zou M, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* induced ventilator-associated pneumonia in mechanically ventilated patients in China [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(3): 387-396
- [39] Fu L, Tang L, Wang S, et al. Co-location of the *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-65}, *rmtB* and virulence relevant factors in an IncFII plasmid from a hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolate [J]. Microb Pathog, 2018, 124: 301-304
- [40] 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
- [41] Kim J H, Jeong Y, Lee C K, et al. Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from stool samples of patients with liver abscess caused by hypervirulent *K. pneumoniae* [J]. J Korean Med Sci, 2020, 35(2): e18
- [42] Shao L, Yao B, Yang J, et al. Characterization of a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST3330 clone responsible for a nosocomial outbreak in a neonatal intensive care unit [J]. Ann Palliat Med, 2020, 9(3): 1092-1102
- [43] Zhang R, Li J, Wang Y, et al. Presence of NDM in non-*E. coli* Enterobacteriaceae in the poultry production environment [J]. J Antimicrob Chemother, 2019, 74(8): 2209-2213
- [44] Yang Y, Higgins C H, Rehman I, et al. Genomic diversity, virulence, and antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains from cows and humans [J]. Appl Environ Microbiol, 2019, 85(6): e02654-18
- [45] Marques C, Belas A, Aboim C, et al. Evidence of sharing of *Klebsiella pneumoniae* strains between healthy companion animals and cohabiting humans [J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(6): e01537-18