

综述

肺炎克雷伯菌疫苗的研制进展

吴广喜，石学银，何斌

上海交通大学医学院附属新华医院麻醉与重症医学科，上海 200092

[摘要] 肺炎克雷伯菌是导致院内呼吸道感染最常见的细菌，在革兰阴性菌导致的菌血症、泌尿系统感染中位居第二位。肺炎克雷伯菌株常发生耐药，使患者住院时间延长，对重症监护患者的影响尤其严重。为了减少肺炎克雷伯菌感染，临幊上采取了很多预防性措施。针对肺炎克雷伯菌的免疫治疗包括主动免疫和被动免疫。其中，主动免疫的疫苗包括灭活疫苗、多糖疫苗、多糖结合疫苗、蛋白疫苗、纳米疫苗等新型疫苗。文章就肺炎克雷伯菌疫苗的研幊进展作一综述。

[关键词] 肺炎克雷伯菌；耐药；免疫治疗；疫苗

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.04.020 **[中图分类号]** R378.2 **[文献标志码]** A

Development of vaccines for prevention of *Klebsiella pneumoniae*

WU Guang-xi, SHI Xue-yin, HE Bin

Department of Anesthesiology and SICU, Xin Hua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] *Klebsiella pneumoniae* is the most common cause of nosocomial respiratory tract, and the second most frequent cause of Gram-negative bacteraemia and urinary tract infections. Drug resistant isolates remain an important hospital-acquired bacterial pathogen, prolong hospital stays, and are especially problematic in high impact medical areas such as intensive care units. A variety of preventive measures were applied to reduce such incidences. The immune therapies for *Klebsiella pneumoniae* include active immunization and passive immunization. Many trials for constructing effective vaccines are followed, including inactivated vaccines, polysaccharide vaccine, conjugate vaccine, protein vaccine, and nano vaccine. This review was about the development of vaccines for the prevention of *Klebsiella pneumoniae*.

[Key words] *Klebsiella pneumoniae*; drug resistant; immune therapy; vaccine

肺炎克雷伯菌广泛存在于自然界，近年来成为仅次于大肠埃希菌的重要的条件致病菌^[1-2]。肺炎克雷伯菌是导致院内呼吸道感染最常见的细菌，在革兰阴性（G⁻）菌导致的菌血症、泌尿系统感染中位居第二位^[3]。肺炎克雷伯菌主要定植于人和动物的消化道、呼吸道、泌尿生殖道^[4]。当机体免疫力降低或长期大量使用抗生素导致菌群失调时引起感染，可引起肺炎、脑膜炎、肝脓肿、泌尿系统炎症、伤口感染与败血症等，给临床治疗带来了很大困难^[5]。新生儿、手术患者、糖尿病及肿瘤患者等免疫力低下的人群，易发生肺炎克雷伯菌感染。

抗菌药物的滥用导致耐药菌尤其是多重耐药菌迅速增加，使其不能有效控制感染，成为临幊上的难题，也给家庭和社会带来了沉重的经济负担。细菌疫苗能提高易感人群对病原菌的抵抗力，降低病原菌感染的发生率，有利于

感染性疾病的控制，因此，开发相关细菌疫苗一直是该领域的研究热点。现将肺炎克雷伯菌的耐药现状及免疫治疗的临幊研究作一综述。

1 肺炎克雷伯菌耐药现状

肺炎克雷伯菌属于G⁻菌，临幊新分离的菌株有较厚的荚膜，多数菌株有菌毛，无鞭毛和芽孢；营养要求不高，兼性厌氧；在普通培养基上生长成黏液状大菌落，容易相互融合，以接种环挑之，易拉成丝，此特征有助于鉴别。近年来，由于各种抗菌药物的广泛使用，肺炎克雷伯菌耐药现象普遍存在，且多数临幊分离的菌株呈多重耐药。全国细菌耐药监测报告显示：2014年，我国肺炎克雷伯菌对第三代头孢菌素的耐药率为36.9%，各省耐药率为

[基金项目] 国家自然科学基金（81470390, 81671944）；上海市教育委员会高峰高原学科建设计划（20152218）；上海申康医院发展中心临幊创新三年行动计划（16CR3006A）；上海市科学技术委员会科研计划项目（17411954700）（National Natural Science Foundation of China, 81470390, 81671944; Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support, 20152218; Clinical Research Plan of SHDC, 16CR3006A; Program of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, 17411954700）。

[作者简介] 吴广喜（1989—），女，博士生；电子信箱：wuguangxi0713@163.com。

[通信作者] 何斌，电子信箱：hebinicu@139.com。



14.8% ~ 54.6%，对碳青霉烯类的耐药率为 6.4%^[6]；2015 年，肺炎克雷伯菌对第三代头孢菌素的耐药率，全国为 36.5%，各地区为 18.1% ~ 54.9%，对碳青霉烯类的耐药率为 7.6%^[7]。肺炎克雷伯菌的耐药可能与产生抗生素水解酶、形成生物被膜、外膜孔蛋白的缺失、抗菌药物主动外排等机制有关。

在很多国家发现了耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌。针对肺炎克雷伯菌导致的感染，目前主要使用黏菌素（colistin）治疗。研究人员对 3 个医疗机构发现的耐黏菌素同时耐碳青霉烯类的肺炎克雷伯菌进行了分析，发现感染的暴发与患者之间的水平传播有关^[8]。因此，控制耐药肺炎克雷伯菌的播散迫在眉睫。

针对肺炎克雷伯菌疫苗的免疫治疗主要包括主动免疫和被动免疫。其中，主动免疫包括灭活疫苗、多糖疫苗、结合疫苗、核糖体疫苗和其他新型疫苗等；被动免疫包括针对肺炎克雷伯菌不同的抗原表位制备的单克隆抗体。

2 主动免疫

2.1 灭活疫苗

灭活疫苗是指先对病毒或细菌进行培养，然后用加热或化学试剂（通常是甲醛）将其灭活。目前，中国使用的灭活疫苗有百白破疫苗、流行性感冒疫苗、狂犬病疫苗和甲型肝炎灭活疫苗等。使用甲醛处理肺炎克雷伯菌菌体，得到灭活疫苗^[9]；但是肺炎克雷伯菌的灭活疫苗由于安全性有限，没有上市。随着免疫学、分子生物学、纳米科学等学科的不断发展，细菌疫苗的类型、组成都发生了很大变化，出现了多糖疫苗、多糖结合疫苗、蛋白疫苗、纳米疫苗等新型疫苗。

2.2 多糖疫苗

细菌中存在多种糖类物质，它们在细菌的识别、信号传递、黏附、感染及防御等方面发挥着重要作用，其中与致病性相关的包括荚膜多糖及脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）中的 O 抗原多糖（O-PS）等。由于多糖的免疫原性，可将特异性的多糖纯化后制成的疫苗称为多糖疫苗。

荚膜是细菌表面的特殊结构，位于细胞壁表面，是一层松散的黏液状物质。荚膜的成分因不同菌种而异。多数细菌的荚膜由多糖组成。多糖的分子组成和构型多样，结构极为复杂，因此荚膜成为血清学分型的基础。例如肺炎链球菌，根据其荚膜多糖的抗原性，至少可将其分成 85 个血清型。荚膜具有抗吞噬、黏附、抗有害物质的损伤、抗干燥等作用。当营养缺乏时，荚膜多糖可被用作碳源和

能源。荚膜多糖是细菌的主要保护性抗原和毒力因子，具有较好的免疫原性，是细菌适宜作疫苗的靶抗原之一。荚膜多糖疫苗与传统疫苗相比，由于其成分单一，不存在容易引起发热等不良反应的物质，使得疫苗更安全、有效，已成为世界上应用较多的疫苗之一。已上市的 13 价、23 价肺炎链球菌疫苗就是使用不同血清型的肺炎链球菌荚膜多糖制备的。

肺炎克雷伯菌荚膜由复杂的酸性多糖组成，大多数肺炎克雷伯菌的菌株都产生荚膜^[10]。根据荚膜多糖结构的不同，肺炎克雷伯菌可以分成 77 个血清型。荚膜形成一层厚的纤维膜，覆盖在菌体表面，保护细菌不被吞噬。荚膜多糖常用来制备疫苗，是因为荚膜位于肺炎克雷伯菌的最外层，荚膜多糖含有 4 ~ 6 个单糖的重复单位，具有良好的免疫原性，无致病性。但是，注射大剂量的荚膜多糖会导致免疫耐受^[11]。

有实验结果表明，使用单一血清型的荚膜多糖制备的单价疫苗可以抵抗肺炎克雷伯菌 77 种血清型中 40% 的脓毒症；多价疫苗（2 ~ 12 价）可以使动物抵抗 60% ~ 80% 的 77 种血清型肺炎克雷伯菌所致感染^[12]。单独使用荚膜多糖不能诱导免疫记忆。

法国巴斯德研究所的研究者^[13]比较了肺炎克雷伯菌 K2 血清型的细菌表面成分（细胞膜和细胞壁）和纯化的荚膜多糖这 2 种制剂对于小鼠的免疫保护作用。研究结果表明荚膜多糖的免疫原性来源于其他的成分，例如蛋白质和 LPS，这些成分可以作为佐剂，纯的荚膜多糖没有很强的免疫原性；在用碱处理后，这 2 种制剂的免疫保护作用都消失了。研究者对 K5 血清型的肺炎克雷伯菌的荚膜多糖疫苗，使用恒河猴进行了检测，结果显示 IgG 明显升高，而且该疫苗没有不良反应。拉丁美洲的其他实验^[14]也证实了肺炎克雷伯菌的荚膜多糖诱导的是胸腺非依赖的体液免疫，可以对肺炎克雷伯菌的感染提供保护作用。

在 20 世纪 90 年代，针对肺炎克雷伯菌导致的菌血症，使用肺炎克雷伯菌的 24 价多糖疫苗是最有前景的方法，而且已经通过了 I 期临床试验。在外伤患者，使用 24 价疫苗主动免疫后，产生了保护性的抗体^[15]。遗憾的是，24 价疫苗能提供的保护作用只能覆盖不超过 70% 的菌株。由于生产过程比较复杂，研究人员在 I 期临床试验后，没有继续这项研究。

马里兰大学的研究人员将肺炎克雷伯菌 24 价多糖疫苗和来自铜绿假单胞菌 8 个 O 多糖、外毒素 A 进行混合，制备多价疫苗，并评估了这一疫苗的作用。实验结果显示，针对 33 个抗原（24 个荚膜多糖、8 个 O 多糖、外毒素 A）的抗体滴度在 2 个月后均升高，18 个月后均降低^[15]。急性



创伤 72 h 内使用 33 价混合疫苗, 90% 的患者对 18~24 种肺炎克雷伯菌抗原产生了免疫应答。针对肺炎克雷伯菌疫苗的研究, 大部分都集中在荚膜多糖; 但由于荚膜多糖血清型众多, 限制了荚膜多糖作为疫苗的开发应用。

LPS 位于 G⁻菌细胞, 由 3 部分组成: 脂质 A、核心寡糖和 O 多糖。不同的 G⁻菌, 脂质 A 和核心寡糖的基本结构是相似的; O 特异多糖高度可变, 是由 1 个或多个寡糖的重复单位组成的。根据 O 抗原的不同, 可以将肺炎克雷伯菌分成 8 种血清型。与荚膜 K 抗原不同, O 抗原血清型种类少, 作为制备疫苗的抗原有很大优势。因此, 制备一种包含 8 种血清型 O 抗原的疫苗, 或者包含最常见的血清型 O1 抗原, 极有可能成为一种广谱抗菌疫苗。有研究^[16]表明, 使用纯化的 LPS 免疫小鼠, 可以保护小鼠抵抗致死剂量的肺炎克雷伯菌的攻击, 100 μg 的 LPS 可以预防肺炎克雷伯菌所致感染。而且, 使用肺炎克雷伯菌的 LPS 免疫后得到的单克隆抗体被动免疫, 可以抵抗致死性的内毒素休克。印度的一项研究^[17]发现, 针对肺炎克雷伯菌肺炎, 脂质体包裹的 LPS 制备纳米疫苗比游离的 LPS 更有效; LPS 被脂质体包裹后, 毒性大幅度减小, 不会导致实验动物发热。进一步研究^[18]发现, 使用这种疫苗免疫后, 气管切开后给予肺炎克雷伯菌进行攻毒试验, 4 d 后取动物肺组织进行细菌培养计数, 结果显示免疫组细菌计数明显减少, 肺损伤明显减轻。

肺炎克雷伯菌是通过呼吸道感染的, 通过鼻内给药和呼吸道给药激发黏膜免疫, 控制肺炎克雷伯菌的感染, 是一种很有前景的方法。与传统疫苗相比, 新型疫苗如亚单位疫苗更安全, 但是免疫原性差。为了增强新型疫苗的免疫原性, 有必要开发强大的、安全的佐剂和抗原递送系统。现已证实, 微米颗粒可以增强抗原呈递细胞摄取包裹在内的抗原。因此, 对于通过黏膜免疫呈递的抗原, 微米颗粒是一种强有力的佐剂。有研究^[19]使用热酚法提取了肺炎克雷伯菌的 LPS, 使用海藻酸盐包被提取的 LPS 制备了肺炎克雷伯菌的亚单位疫苗, 然后比较了不同的给药方式(肌注、气管内给药、鼻内给药)下游离的 LPS、海藻酸盐包裹的 LPS 的免疫原性。结果表明, 对于气管内给药这种方式, 与游离的 LPS 相比, 海藻酸盐包裹的 LPS 制备的亚单位疫苗效果更好。

有学者研究了导致化脓性肝脓肿的肺炎克雷伯菌 LPS 中的 O 抗原在致病性中的作用^[20]。在导致化脓性肝脓肿的肺炎克雷伯菌中, O1 血清型很常见。分离出的 O1 血清型菌株常常可以抵抗血清的杀菌作用, O1 抗原发生突变后, 对血清杀菌作用的抵抗发生改变。对于可以导致化脓性肝脓肿的肺炎克雷伯菌 O1 菌株, 在合成 O1 的基因敲

除后, 其毒力明显减小。可见, O1 抗原通过抵抗血清的杀菌作用导致细菌毒力增强, 促进细菌的播散和在内脏器官的定植。而且, O1 抗原有可能用来制备该致病菌株的疫苗, 用于抵抗肺炎克雷伯菌的感染。

2.3 结合疫苗

结合疫苗是指采用化学方法将多糖共价结合在蛋白载体上所制备成的多糖-蛋白结合疫苗, 用于提高细菌疫苗多糖抗原的免疫原性, 如 b 型流感嗜血杆菌结合疫苗、脑膜炎球菌结合疫苗和肺炎链球菌结合疫苗等。

使用肺炎克雷伯菌的菌毛蛋白和 K12 血清型的大肠埃希菌的 O 特异多糖制备的结合疫苗, 含有几种常见肠杆菌的抗原表位。使用这种结合疫苗, 针对 O 特异多糖半抗原产生的抗体和针对作为载体蛋白的菌毛产生的抗体滴度明显增加^[21]。

肺炎克雷伯菌的荚膜多糖由四糖重复单位组成。构建肺炎克雷伯菌的结合疫苗, 首先报道的是使用 2 个肺炎克雷伯菌的荚膜多糖的重复单位与牛血清白蛋白和钥孔血蓝蛋白结合, 这 2 种结合疫苗产生的都是胸腺依赖型抗原^[22]。

有研究人员^[23]使用肺炎克雷伯菌表面的离子调节蛋白和肺炎克雷伯菌 LPS 中的部分多糖构建结合疫苗。这种结合疫苗的免疫原性强于其中的任何一种成分。该疫苗安全性好, 免疫原性强, 还可以增强细胞吞噬。Chhibber 等^[24]将肺炎克雷伯菌 LPS 中提取的多糖和破伤风类毒素共价连接, 研究结果显示 100 μg 的该结合疫苗无毒, 而且不含有致热源; 使用这种结合疫苗免疫后, 肺部定植细菌的数量减少, 而且这种疫苗可以激活巨噬细胞。

2.4 蛋白疫苗

肺炎克雷伯菌免疫原性蛋白主要是外膜蛋白和菌毛蛋白。使用肺炎克雷伯菌热稳定肠毒素制备的疫苗免疫大鼠后, 大鼠产生了免疫保护作用, 而且该保护作用与大肠埃希菌存在交叉反应。有学者^[25]对未提纯的细胞毒素中类毒素的保护效应进行研究, 发现使用其制备的疫苗后, 可以抵抗肺炎克雷伯菌的攻击。免疫过的兔子后代中, 也可以检测到特异性的抗体, 该抗体对肺炎克雷伯菌感染的保护作用可以持续 1 个月^[26]。

免疫系统对肺炎克雷伯菌菌毛蛋白有很好的识别力。肺炎克雷伯菌有 2 种菌毛, 即甘露糖特异性的 I 型菌毛和甘露糖抵抗的 III 型菌毛。很多肠杆菌科的细菌表达 I 型菌毛, 大部分的肺炎克雷伯菌表达 III 型菌毛。这 2 种菌毛蛋白均不能刺激肿瘤坏死因子的表达, 但是 III 型菌毛蛋白可



以诱导中度的白介素-6 (IL-6) 的表达, I 型菌毛可以诱导少量的 IL-6 的表达。有研究^[27]表明, 使用Ⅲ型菌毛蛋白可以抵抗肺炎克雷伯菌导致的呼吸系统感染。

孙晓雨^[28]使用聚乳酸-羟基乙酸共聚物 (PLGA) 包裹肺炎克雷伯菌 I 型菌毛黏附蛋白 K (fimK) 微球制备口服免疫的疫苗, 以茯苓多糖作为黏膜佐剂, 通过肺炎克雷伯菌攻毒保护性实验, 评价疫苗的保护效力, 结果显示该疫苗对致死性肺炎克雷伯菌株的攻毒具有保护作用。

日本的一项研究发现, 使用外膜蛋白免疫后, 小鼠可以抵抗致死剂量的野生型肺炎克雷伯菌的攻击。使用重组外膜蛋白, 在没有佐剂的情况下, 可以诱导明显的抗体反应^[29]。2001 年的一项研究^[30]表明, 该重组蛋白作为黏膜免疫的载体蛋白, 可以抵抗肺炎克雷伯菌的攻击。也有研究^[31]使用 DNA 疫苗技术生产抗肺炎克雷伯菌的基于外膜蛋白的疫苗。

钟世勋等^[32]根据 GenBank 中肺炎克雷伯菌Ⅲ型菌毛结构基因 A (*MrkA*) JF759921 的序列设计出 1 对引物, 对 8 株肺炎克雷伯菌进行了克隆测序, 并应用生物信息学相关软件和方法, 预测 *MrkA* 蛋白二级结构和 B 细胞抗原表位。PCR 扩增出了 609 bp 的目的基因片段。生物信息分析结果显示其开放阅读框架为 609 bp, 编码 202 个氨基酸; 二级结构以无规卷曲为主, 有少量的 α -螺旋和 β -片层, 少见 β -转角, 推测 *MrkA* 蛋白有 8 个 B 细胞优势抗原表位区域。结果表明, *MrkA* 基因较稳定, 其在进化过程中并未发生明显变异, 为进一步分析肺炎克雷伯菌免疫机制、制备单克隆抗体和设计表位疫苗等奠定了理论基础。

2.5 核糖体疫苗

核糖体疫苗主要含有胞质成分, 不含有细胞壁成分。通过气道给予肺炎克雷伯菌核糖体疫苗和细胞壁糖蛋白后, 特异性的抗体增加。这种方式产生的抗体是特异地针对原菌株荚膜血清型的, 而荚膜有可能在梯度离心时没有完全去除。使用不含有荚膜的肺炎克雷伯菌的突变株制备的核糖体疫苗没有免疫原性, 只有在细胞壁成分存在时, 才有免疫原性。这些都说明肺炎克雷伯菌的细胞壁成分具有免疫原性, 而核糖体制剂没有免疫原性。因此, 后期研究者放弃了使用核糖体制备疫苗的想法。

2.6 其他类型疫苗

使用可生物降解的聚合物制成微胶囊, 微胶囊内包裹着抗原或佐剂, 这就是微胶囊疫苗。微胶囊疫苗可以使抗原或佐剂通过微球表面的微孔缓慢地释放出来。微孔的大小是可以通过人为调节的, 因此可以控制抗原或佐剂释

放的时间、速度。一次性注射后, 抗原在机体内可以连续、缓慢地释放数周甚至数月, 因此可以长期刺激机体持续地产生抗体。而且, 聚合体还可以保护抗原免受外界不良因素的影响, 如蛋白酶、较高或较低的 pH 值环境、有机溶剂等, 为疫苗经口服途径免疫提供了可靠的保障。微胶囊技术可以提高药物的稳定性、生物相容性, 也可以赋予药物靶向性, 具有缓释、控释性等。凭借着这一系列优越的性能, 微胶囊技术在人类医药界得到了越来越广泛的应用。

钟世勋等^[33]使用喷雾-界面配位改良法制备了肺炎克雷伯菌微胶囊疫苗。该疫苗直径约为 6.980 μm , 安全性好, 免疫后可以有效地刺激机体的体液免疫、细胞免疫、局部黏膜免疫, 具有明显的保护作用, 而且免疫保护力优于普通的灭活疫苗。常规疫苗通过口服进入消化道以后, 不可避免地会遭到胃酸的破坏, 因而免疫效果差。微胶囊疫苗可以使菌体抗原得到保护, 通过对胶囊壁材的选取及制备工艺的优化, 可以控制抗原的释放时间和释放速率。这样, 可以避免保护性抗原在消化道中的损失, 增加到达肠道的抗原的量, 从而减少了疫苗的用量, 提高了疫苗的免疫效果, 使用也非常方便。

3 被动免疫

针对肺炎克雷伯菌抗体的免疫保护作用的研究, 起始于对肺炎克雷伯菌荚膜多糖抗体的研究。使用灭活的全菌体、核糖体制剂或者菌体表面制剂免疫, 诱导机体产生抗体。在 1984—1985 年, 瑞士的血清学和免疫学研究院制备了纯化的荚膜多糖制剂。使用抗荚膜多糖的抗体被动免疫, 或者使用纯化的抗原主动免疫, 给烧伤创面脓毒症的患者提供了很好的保护作用。在志愿者中, 这种荚膜抗原是安全的, 而且具有免疫原性。但是, 上述研究仅限于一种血清型的荚膜多糖。一项临床试验结果显示, 给志愿者静脉注射超免疫球蛋白, 可以减轻疫苗相关的肺炎克雷伯菌感染的严重程度, 但是这种减轻程度没有显著差异。更为遗憾的是, 这些患者的不良反应更多。出于以上原因, 使用荚膜多糖的抗体治疗肺炎克雷伯菌的感染, 没有获得批准。预先使用无荚膜的菌株免疫小鼠, 来源于该小鼠脾脏的杂交瘤细胞可以产生肺炎克雷伯菌 LPS 的单克隆抗体。在体外, 该单抗与血清型 O1、O2ab、O2ac、O3、O4、O5 和 O12 存在免疫交叉反应。荚膜多糖有 77 种血清型, O 抗有 8 种血清型, 因此, 针对 O 抗的抗体比针对荚膜多糖的抗体更有效。

针对 *MrkA* 不同的抗原表位, 是否可产生不同的单克



隆抗体? 这些抗体产生的保护作用是否相同? Wang 等^[34]对这些问题进行了研究。通过噬菌体展示肽技术, 研究人员得到了4种针对MrkA不同抗原表位的抗体, 针对多重耐药的肺炎克雷伯菌菌株, 体外实验和在体实验显示这些抗体有很强的保护作用; 而且, 突变和表位分析显示, 2个半胱氨酸残基在维持MrkA的结构中, 发挥着很重要的作用。实验结果表明, MrkA可以作为有效的药物作用靶点, 用来制备疫苗。

4 结语

综上所述, 由于抗生素的使用, 肺炎克雷伯菌的耐药情况越来越严重。随着免疫学、分子生物学、纳米科学等学科的不断发展, 细菌疫苗的类型、组成都发生了很大变化, 出现了多糖疫苗、多糖结合疫苗、蛋白疫苗、微胶囊疫苗等新型疫苗。研制肺炎克雷伯菌的新型疫苗并应用于临床, 具有非常广阔前景。

参·考·文·献

- [1] Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens[J]. Am J Med, 2002, 49(2): 71.
- [2] Craven DE. What is healthcare-associated pneumonia, and how should it be treated?[J]. Curr Opin Infect Dis, 2006, 19(2): 153-160.
- [3] Ahmad TA, El-Sayed LH, Haroun M, et al. Development of immunization trials against *Klebsiella pneumoniae*[J]. Vaccine, 2012, 30(14): 2411-2420.
- [4] Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2016, 80(3): 629-661.
- [5] Hooi SH, Hooi ST. Culture-proven bacterial keratitis in a Malaysian general hospital[J]. Med J Malaysia, 2005, 60(5): 614-623.
- [6] 国家卫生计生委合理用药专家委员会. 全国细菌耐药监测网. 2014年全国细菌耐药监测报告[J]. 中国执业药师, 2016(2): 3-8.
- [7] 国家卫生计生委合理用药专家委员会. 全国细菌耐药监测网. 2015年全国细菌耐药监测报告[J]. 中国执业药师, 2016(3): 3-8.
- [8] Marchaim D, Chopra T, Pogue JM, et al. Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(2): 593-599.
- [9] Hackett RJ, Marcus S. Extent of specific to nonspecific resistance in mice: parenteral versus aerosol challenge[J]. Infect Immun, 1970, 1(3): 274-278.
- [10] Jr CS, Furer E, Germanier R. Purification and vaccine potential of *Klebsiella* capsular polysaccharides[J]. Infect Immun, 1985, 50(1): 225.
- [11] Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors[J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(4): 589-603.
- [12] Jones RJ, Roe EA. Vaccination against 77 capsular types of *Klebsiella aerogenes* with polyvalent *Klebsiella* vaccines[J]. J Med Microbiol, 1984, 18(3): 413.
- [13] Postal JM, Gysin J, Crenn Y. Protection against fatal *Klebsiella pneumoniae* sepsis in the squirrel monkey *Saimiri sciureus* after immunization with a capsular polysaccharide vaccine[J]. Annales De L'Institut Pasteur Immunologie, 1988, 139(4): 401-407.
- [14] Alcántar-Curiel MD, Martínez-Ramos A, García-Latorre E. Capsular polysaccharide of *Klebsiella pneumoniae*. II. Immunogenic properties[J]. Revista Latinoamericana De Microbiología, 1993, 35(1): 109-115.
- [15] Edelman R, Taylor DN, Wasserman SS, et al. Phase 1 trial of a 24-valent *Klebsiella* capsular polysaccharide vaccine and an eight-valent *Pseudomonas* O-polysaccharide conjugate vaccine administered simultaneously[J]. Vaccine, 1994, 12(14): 1288-1294.
- [16] Clements A, Jenney AW, Farn JL, et al. Targeting subcapsular antigens for prevention of *Klebsiella pneumoniae* infections[J]. Vaccine, 2008, 26(44): 5649-5653.
- [17] Chhibber S, Wadhwa S, Yadav V. Protective role of liposome incorporated lipopolysaccharide antigen of *Klebsiella pneumoniae* in a rat model of lobar pneumonia[J]. Jpn J Infect Dis, 2004, 57(4): 150.
- [18] Yadav V, Sharma S, Harjai K, et al. Lipopolysaccharide-mediated protection against *Klebsiella pneumoniae*-induced lobar pneumonia: intranasal vs. intramuscular route of immunization[J]. Folia Microbiol (Praha), 2005, 50(1): 83-86.
- [19] Jain RR, Mehta MR, Bannalikar AR, et al. Alginate microparticles loaded with lipopolysaccharide subunit antigen for mucosal vaccination against *Klebsiella pneumoniae*[J]. Biologicals, 2015, 43(3): 195-201.
- [20] Hsieh PF, Lin TL, Yang FL, et al. Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscess[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33155.
- [21] Witkowska D, Mieszala M, Czamy A, et al. A new type of glycoconjugate vaccine containing *Klebsiella* fimbriae type 1 and 3 as carrier proteins[J]. Critical Care, 1997, 1(S1): 1-52.
- [22] Zigerman JW, van Dam JE, Snippe H, et al. Immunogenic properties of octasaccharide-protein conjugates derived from *Klebsiella* serotype 11 capsular polysaccharide[J]. Infect Immun, 1985, 47(2): 421-428.
- [23] Chhibber S, Bajaj J. Polysaccharide-iron-regulated cell surface protein conjugate vaccine: its role in protection against *Klebsiella pneumoniae*-induced lobar pneumonia[J]. Vaccine, 1995, 13(2): 179.
- [24] Chhibber S, Rani M, Vanashree Y. Immunoprotective potential of polysaccharide-tetanus toxoid conjugate in *Klebsiella pneumoniae* induced lobar pneumonia in rats[J]. Indian J Exp Biol, 2005, 43(1): 40-45.
- [25] Klipstein FA, Engert RF, Houghton RA. Immunological properties of purified *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin[J]. Infect Immun, 1983, 42(2): 838.
- [26] Singh BR, Sharma VD. Potential of *Klebsiella pneumoniae* cytotoxin toxoid as vaccine against klebsielllosis in rabbits and mice[J]. Vaccine, 2001, 19(31): 4505-4510.
- [27] Lavender H, Jagnow JJ, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbria-mediated immunity to infection in the murine model of respiratory disease[J]. Int J Med Microbiol, 2005, 295(3): 153-159.
- [28] 孙晓雨. 萝藦多糖在豚鼠肺炎克雷伯菌毛黏附蛋白黏膜免疫中的佐剂效应[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [29] Rauli I, Goetsch L, Haeuw JF, et al. Carrier properties of a protein derived from outer membrane protein A of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Infect Immun, 1999, 67(11): 5547-5551.
- [30] Goetsch L, Gonzalez A, Plotnicki-Gilquin H, et al. Targeting of nasal mucosa-associated antigen-presenting cells *in vivo* with an outer membrane protein A derived from *Klebsiella pneumoniae*[J]. Infect Immun, 2001, 69(10): 6434-6444.
- [31] Kurupati P, Ramachandran NP, Poh CL. Protective efficacy of DNA vaccines encoding outer membrane protein A and OmpK36 of *Klebsiella pneumoniae* in mice[J]. Clin Vaccine Immunol, 2011, 18(1): 82-88.
- [32] 钟世勋, 迟珊珊, 王振, 等. 牛皮动物肺炎克雷伯菌III型菌毛A基因克隆测序与生物信息分析[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(1): 74-80.
- [33] 钟世勋. 牛皮动物肺炎克雷伯氏菌分离菌株的系统发育分析及其微胶囊疫苗的研制[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
- [34] Wang Q, Chen Y, Cvitkovic R, et al. Anti-MrkA monoclonal antibodies reveal distinct structural and antigenic features of MrkA[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170529.

[收稿日期] 2017-03-16

[本文编辑] 吴 洋

