DOI:10.16016/j.1000-5404.202105139

1 例复发类鼻疽的病原学鉴定及生物学特性研究

杨文波[1],张纳安[2],饶承龙[1],夏瑀培[1],章美娟[1],李 骁[1],闫晶敏[1],陈 海[3],李 倩[1],毛旭虎[1] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系临床微生物与免疫学教研室[1];430070 湖北,华中农业大学生命科学技术学院[2];572000 海南,三亚市人民医院检验科[3]

[**摘要**] **目的** 通过对 1 例复发类鼻疽进行系统病原学鉴定及生物学特性研究,分析和探讨类鼻疽菌长期滞留机体可能的适应宿主机制。**方法** 对临床收集的来源于同一个患者时隔 5 年分离到的两株类鼻疽菌,进行微生物学鉴定、全基因组测序,并使用相关软件对测序数据进行多位点序列分型(multilocus sequence typing,MLST)、同源比对进化树、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)以及插入缺失(insertion-deletion,Indel)分析;进一步在感染肺上皮 A549 细胞模型中比较感染不同时间细胞内细菌载量变化;双向电泳-质谱技术分析两株细菌在蛋白水平的表达变化。**结果** 分离到的两株类鼻疽菌,全基因组均约 7.12 Mb,COG 功能注释编码蛋白大致约 5 000 个;MLST 分型均为 ST58 型;同源比对进化树分析显示它们位于同一分支且与其他分离自中国的类鼻疽菌亲缘关系较近;SNP/Indel 分析显示复发株有 114 个 SNP 位点、55 个 Indel 位点;与原发株相比,双向电泳-质谱结果表明复发株共有 68 个蛋白的表达水平发生了显著的变化;同时复发株感染 A549 后细胞内细菌载量明显增加($P<0.05$)。**结论** 以上复发菌株的基因组学、蛋白组学以及胞内感染增殖能力的系统研究提示类鼻疽菌可能在机体长期的选择压力下微进化,通过对细菌基因转录表达、分泌系统、耐药以及能量代谢等方面的调控更加适应其在宿主体内的生存而实现长期滞留。

[**关键词**] 类鼻疽菌;复发;全基因组;差异蛋白
[**中图法分类号**] R372; R378.99; R515.9 [**文献标志码**] A

Etiological identification and biological characteristics of recurrent melioidosis: report of 1 case

YANG Wenbo[1], ZHANG Na'an[2], RAO Chenglong[1], XIA Yupei[1], ZHANG Meijuan[1], LI Xiao[1], YAN Jingmin[1], CHEN Hai[3], LI Qian[1], MAO Xuhu[1] [1]Department of Clinical Microbiology and Immunology, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]College of Life Science and Technology Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei Province, 430070; [3]Department of Clinical Laboratory Sanya People's Hospital, Sanya, Hainan Province, 572000, China

[**Abstract**] **Objective** To analyze and explore the possible adaptive mechanisms that *Burkholderia pseudomallei* (*B. pseudomallei*) could long-term reside in the host cells based on the systematic etiological identification and biological characteristics of a patient with recurrent melioidosis. **Methods** The 2 *B. pseudomallei* strains isolated from the same patient at an interval of 5 years were performed for microbiological identification and genome sequencing, and the sequencing data were further analyzed by multilocus sequence typing (MLST), phylogenetic tree analysis of homologous alignment, single nucleotide polymorphism (SNP) analysis and insertion-deletion (Indel) analysis, respectively. Furthermore, the intracellular survival of the 2 clinical isolates of *B. pseudomallei* were examined at different times by counting the viable bacteria in the A549 cells. Two-dimensional electrophoresis (2-DE) and mass spectrometry was

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81971907)
[**通信作者**] 毛旭虎,E-mail:mxh2012@hotmail.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

employed to analyze the protein expression of 2 strains of bacteria. **Results** The 2 clinical isolates had a whole genome of about 7.12 Mb, and up about 5 000 Clusters of Orthologous Groups (COG) annotations, and was identified as sequence type (ST) 58 by MLST analysis. Phylogenetic analysis of homologous alignment showed that they were located in the same branch and were closely related to other *B. pseudomallei* isolates from China. SNP/Indel analysis indicated that there were 114 SNP sites and 55 Indel sites in the recurrent strain. The results of 2-DE displayed that the expression levels of 68 proteins in the recurrent strain were significantly changed compared with the primary strain. The intracellular bacterial load of recurrent strain was significantly increased compared to the primary strain in A549 cells ($P<0.05$). **Conclusion** Based on a series of studies with genomics, proteomics and ability of intracellular survival of the 2 clinical isolates of *B. pseudomallei*, the bacterium may evolve slightly under the long-term selective pressure of the organism, and adapt to the host environment for its own survival through the regulation of bacterial transcription, secretion system, drug resistance and energy metabolism.

[**Key words**] *Burkholderia pseudomallei*; recurrence; whole genome; differential protein

Supported by the General Program of National Natural Foundation of China (81971907). Corresponding author: MAO Xuhu, E-mail: mxh2012@hotmail.com

类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*, *B. pseudomallei*,简称类鼻疽菌)是一种革兰阴性短杆菌,可以引起人兽共患疾病类鼻疽。类鼻疽作为一种热带疾病,主要流行于东南亚、澳大利亚北部以及我国海南、广东、广西、香港、台湾等地。类鼻疽临床表现多样,治疗不及时则病死率高达40%[1-2]。尽管进行了长期和适当的抗生素治疗,类鼻疽仍然保持着较高的复发率。感染类鼻疽菌后第1年复发的比例约为6%,而在10年之内达到13%[3]。复发类鼻疽是导致幸存于急性类鼻疽患者发病和死亡的重要原因。目前大部分研究聚焦于类鼻疽菌的急性感染过程,对类鼻疽的复发机制却鲜有报道。

本研究以来源于同一个患者时隔5年分离到的2株类鼻疽菌为研究对象,进行微生物学鉴定以及全基因组测序,同时检测2株类鼻疽菌的胞内存活能力和蛋白表达差异,初步分析可能与类鼻疽菌长期潜伏宿主体内有关的蛋白质,为进一步研究类鼻疽菌的持续性感染机制及防治提供有价值的参考。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞来源及主要试剂

类鼻疽菌BP145A:2012年分离于海南省三亚市人民医院心胸外科某患者,本文称为原发株;BP145B:2017年分离于同一医院呼吸内科同一患者,本文称为复发株。菌株和人肺癌上皮细胞A549均由本实验室保存。细菌基因组DNA提取试剂盒购自北京天根公司。

1.2 全基因组提取、测序

使用细菌基因组DNA提取试剂盒说明书分别提取原发株和复发株全基因组DNA,测定DNA浓度,1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA样品有无降解,于-80 ℃储存。委托上海伯豪生物技术有限公司进行三代测序。

1.3 MLST分型

表1列出了用于扩增7个管家基因的PCR引物。PCR反应体系总体积为25 μL,PCR反应条件为95 ℃预变性5 min;95 ℃变性5 s,退火30 s(gmhD、lipA-55 ℃,ace、gltB、narK、ndh-60 ℃,lepA-62 ℃),72 ℃延伸60 s,共30个循环。将扩增片段送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,获得7个管家基因的碱基序列。将7个目的片段序列上传至类鼻疽菌MLST数据库进行在线分析 https://pubmlst.org/bpseudomallei/,得到每个基因对应的等位基因号。将7个等位基因号按ace-gltB-gmhD-lepA-lipA-narK-ndh顺序串联上传比对,获得菌株的ST型(Sequence type)。

表1 MLST分型引物序列

基因		引物序列(3'→5')
ace	正义	GAATCGCCTTCACCATGTC
	反义	CCGCGCTTCTCAAAACGATA
gltB	正义	ACGCTCGCGATCGCGATGAA
	反义	TTCAGCAGGAGCGTCTGCTG
gmhD	正义	GCAGTTCCTGTATGCGTA
	反义	GAAGCACTGGTACTTGCC
lepA	正义	CATATTCGCAATTTCTCGATC
	反义	CACGAGCATCACGACGCCG
lipA	正义	TCCGATCAAGATCGTCCCGA
	反义	AGGTATTGGCCGATCGTCAG
narK	正义	CTACTCGTGCGCTGGGAT
	反义	GACGATGACGGCACCCAC
ndh	正义	AGTCGCGACGTTCTACAC
	反义	CGAGTTGCAGACGAGATAT

1.4 同源比对进化分析

以BP145A、BP145B以及从NCBI上获得的20株

类鼻疽菌菌株全基因组蛋白序列文件为输入文件,Orthofinder2 进行同源比对进化分析,http://etetoolkit.org/treeview/在线网站可视化物种进化树。

1.5 SNP/Indel 分析

bwa 软件对 145A 和 145B 进行 Genomemapping,samtools 和 bcftools 软件进行变异分析,生成结果文件。

1.6 细菌胞内生存实验

使用含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基(完全培养基)培养 A549 细胞,待细胞密度达到 80%时,更换培养基,以 MOI=10 感染 A549 细胞,共培养 90 min 后弃去培养基,PBS 洗细胞 3 次,加入预热的含 250 μg/mL 卡那霉素的完全培养基,继续孵育至相应时间点(2、4、6、8 h)后用无菌 PBS 清洗细胞 3 次,加入 1 mL 的 0.1% Triton X-100 裂解细胞,按 10 倍的梯度倍比稀释后,取 10 μL 稀释液涂布于 24 孔 LB 平板上,37 ℃培养 36 h,计数菌落。

1.7 蛋白提取

挑取 LB 琼脂平板上的类鼻疽菌单个菌落,接种到 LB 培养基中,振荡培养 12 h 后,4 ℃,4 500×*g* 离心 30 min,收集细菌沉淀和培养上清。细菌沉淀用预冷的 PBS 洗涤,重悬于裂解液中,超声 3 min,4 ℃ 12 000×*g* 离心 10 min,收集上清即为全菌蛋白(total bacterial protein,TBP)。-80 ℃保存。

1.8 双向电泳-质谱分析

取出冻存样品,加入 1.75 μL IPG Buffer 以及水化液至终体积 350 μL,混匀,室温放置 30 min,15 ℃,26 000 r/min 离心 1 h,取上清进行聚焦电泳,胶条平衡后进行 SDS-PAGE 电泳,溴酚蓝刚刚迁移出凝胶底部时终止电泳。固定 30 min,脱色 12 h,进行图像扫描,用保鲜膜包裹 4 ℃保存备用。

将保存的凝胶置于明亮的灯光下,用剪过的吸头戳取蛋白点,放入 PCR 管中,更换脱色液进行脱色至无色透明,用真空离心浓缩仪抽干至胶块呈白色颗粒状,胰酶消化 13.5 h 后,分别加入肽段萃取液Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ分别温育 1 h,合并 3 次的提取液,使用真空离心浓缩仪中干燥肽段萃取至无液体残余。用 2 μL 0.5%三氟乙酸溶液充分溶解管壁上的肽段(应无明显沉淀可见),用串联飞行时间质谱仪(5800MALDI-TOF/TOF)进行测试分析。

1.9 统计学分析

每组实验均重复 3 次,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,利用 GraphPad Prim 7.0 进行独立样本 t 检验,$P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 145A、145B 的微生物学鉴定

145A、145B 均表现出典型的类鼻疽菌菌落形态,血平板上生长 24 h 可见光滑型菌落,48 h 后变为粗糙型。出现表面褶皱,培养物伴有强烈霉臭味,革兰染色阴性,镜下可见红色短杆菌,经 16s rRNA 鉴定为类鼻疽菌。

2.2 145A 和 145B 全基因组的基本特征

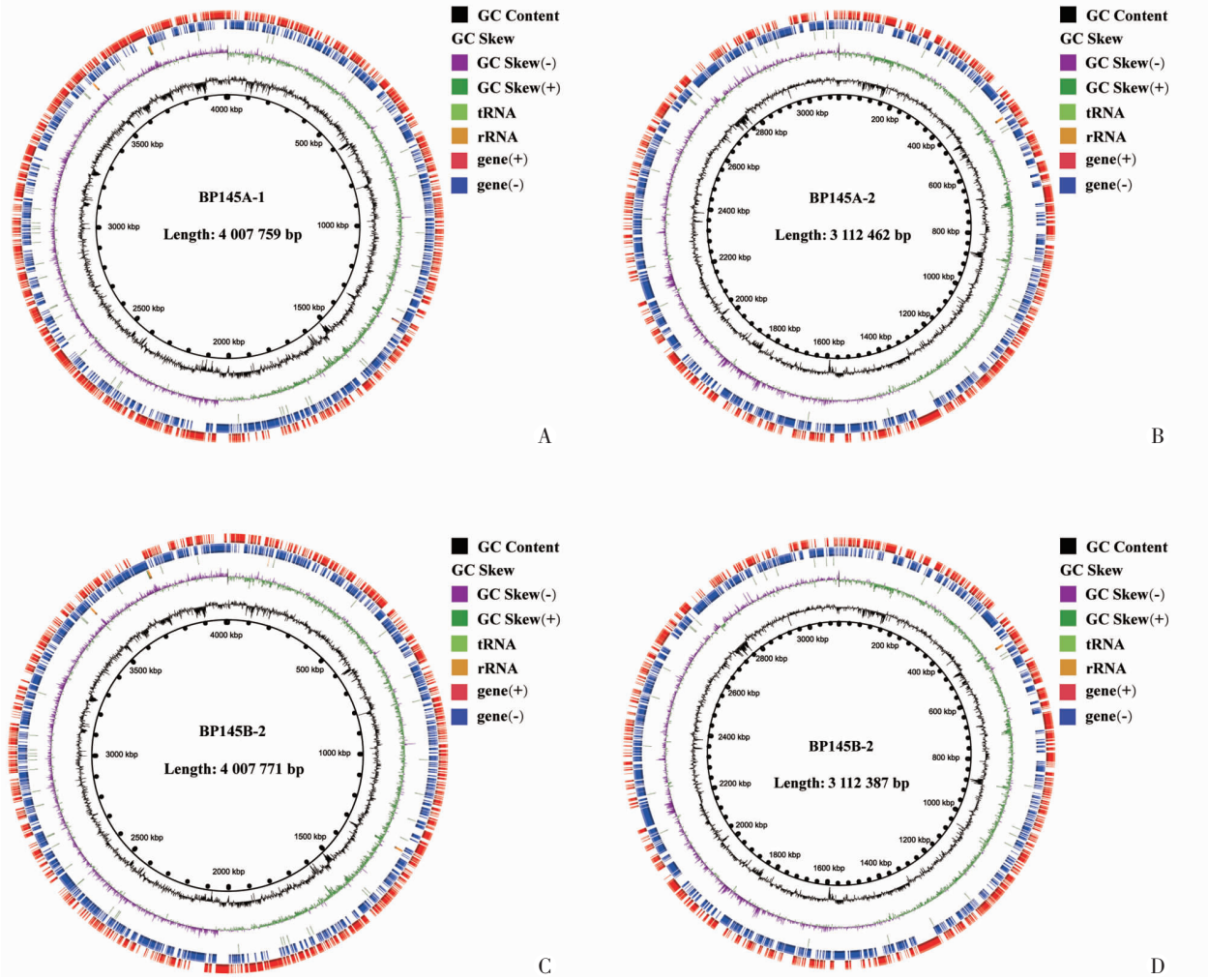
145A 的基因组全长为 7 120 221 bp,其中 1 号染色体 4 007 759 bp,2 号染色体 3 112 462 bp,平均 GC 含量为 68%,共预测到 5 869 个编码基因、88 个 tRNA、12 个 rRNA(图 1A、B)。对其编码基因对应蛋白序列进行 COG 功能注释,共有 5 099 个蛋白获得 COG 功能注释(图 2Ⅰ),占全部基因的 86.88%。145B 的基因组全长为 7 120 158 bp,1 号染色体 4 007 771 bp,2 号染色体 3 112 387 bp,平均 GC 含量为 68%,共 5 857 个编码基因、88 个 tRNA、12 个 rRNA(图 1C、D)。对其编码基因对应蛋白序列进行 COG 功能注释,共有 5 094 个蛋白获得 COG 功能注释(图 2Ⅱ),占全部基因的 86.97%。

2.3 MLST 分型

目前 PubMLST 数据库中共有 6 103 株类鼻疽菌的 MLST 分型信息,其中有 310 株类鼻疽菌来自中国,对这 310 株类鼻疽菌的分析发现,分离自我国的类鼻疽菌共有 89 个型别,表明我国环境中类鼻疽菌的菌株多样。进一步地,根据 PubMLST 数据库比对 7 个管家基因(ace、gltB、gmhD、lepA、lipA、narK、ndh),确定 145A 和 145B 的分型均为 ST58 型(图 3),表明 145A 和 145B 亲缘关系较近。在 PubMLST 数据库中,ST58 型共有 47 株,23 株来自中国,其中 BPC008、BPC025、BPC027、BPC045、BPC065、BPC079、BPC081、BPC059、BPC091、BPC096、BPC138、BPC141、BPC167、BPC104、BPC107、BPC111 等等为本室提供,19 株来自泰国,其余几株来自中国台湾、马来西亚、澳大利亚。

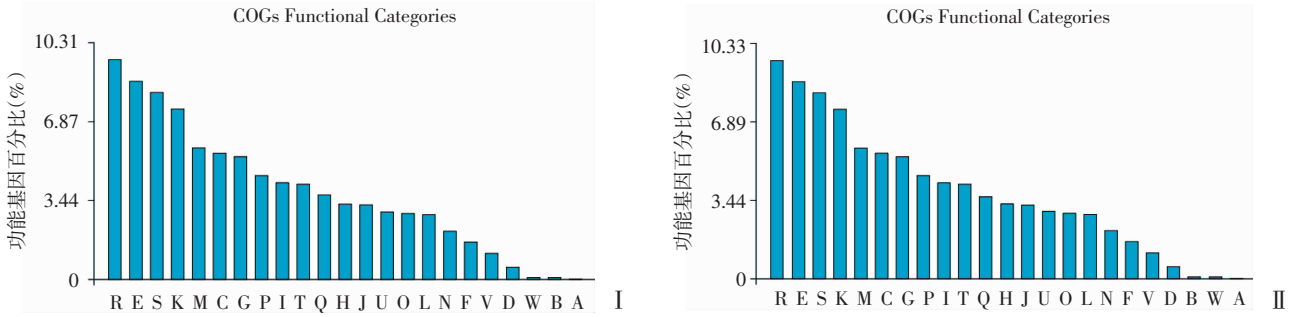
2.4 同源比对进化分析

通过 Orthofinder2 软件构建基于全基因组蛋白序列的物种系统发育树,如图 4 所示,结果表明,145A 和 145B 位于同一分支上,提示 145B 可能为 145A 在初次感染治疗之后肺部的滞留菌株。并且与国内标准菌株 BPC006 以及另一国内菌株 *B. pseudomallei* HN1 亲缘关系较近,表明 145A 可能是本地菌株变异而来。



A:145A 1 号染色体圈图;B:145A 2 号染色体圈图;C:145B 1 号染色体圈图;D:145B 2 号染色体圈图　从内向外第 1 圈为基因组大小的标识;第 2 圈为 GC 含量,向外的部分表示该区域 GC 含量高于全基因组平均 GC 含量,峰值越高表示与平均 GC 含量差值越大,向内的部分表示该区域 GC 含量低于全基因组平均 GC 含量,峰值越高表示与平均 GC 含量差值越大;第 3 圈为 GC skew 值,具体算法为(G-C/G+C),在生物意义上该值为正值时正链更倾向于转录 CDS,为负值时负链更倾向于转录 CDS;第 4 圈、第 5 圈分别为负链和正链上的 CDS

图 1　145A、145B 染色体圈图



Ⅰ:原发分离菌株 145A COG 功能注释;Ⅱ:复发分离菌株 145B COG 功能注释　A:RNA 加工和修饰;B:染色质结构和动力学;C:能量生产和转换;D:细胞周期调控、细胞分裂和染色体分配;E:氨基酸转运和代谢;F:核苷酸转运和代谢;G:碳水化合物转运和代谢;H:辅酶转运和代谢;I:脂质转运和代谢;J:翻译、核糖体结构和生物合成;K:转录;L:复制、重组和修复;M:细胞壁/细胞膜/胞外被膜生物合成;N:细胞运动;O:翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣;P:机离子转运和代谢;Q:次级代谢产物的生成、转运和代谢;R:一般功能预测;S:功能未知;T:信号转导机制;U:胞内运输、分泌和囊泡运输;V:防御机制;W:胞外结构;Y:细胞核结构;Z:细胞骨架

图 2　145A、145B 蛋白质 COG 聚类分析

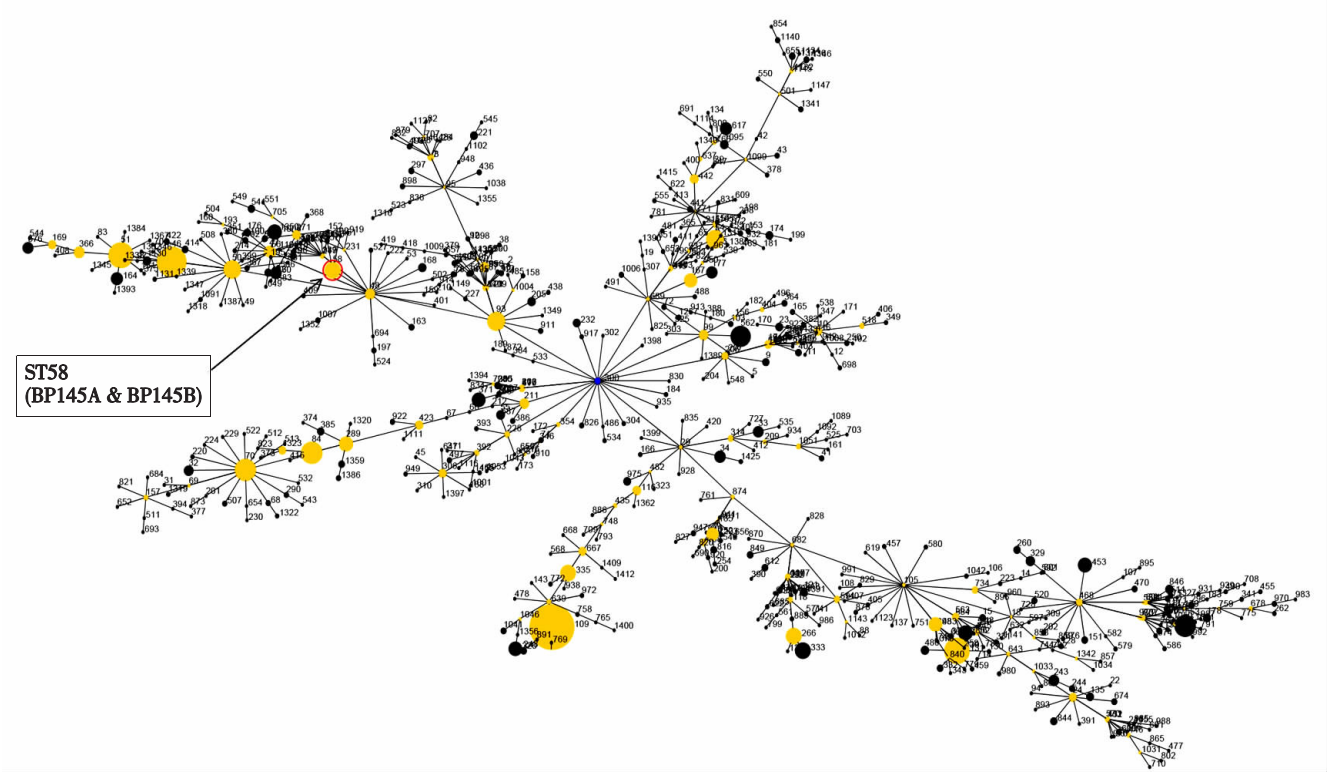


图 3 基于管家基因的 MLST 分型

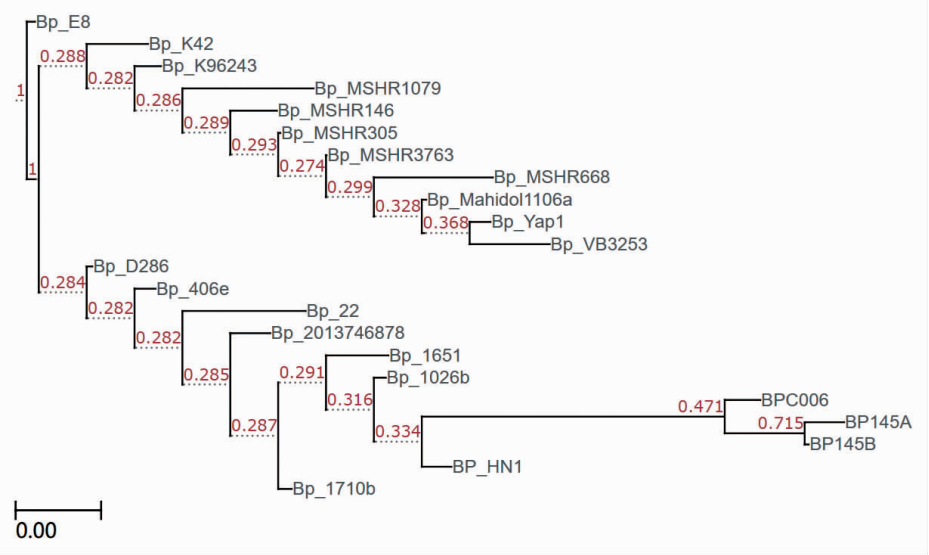


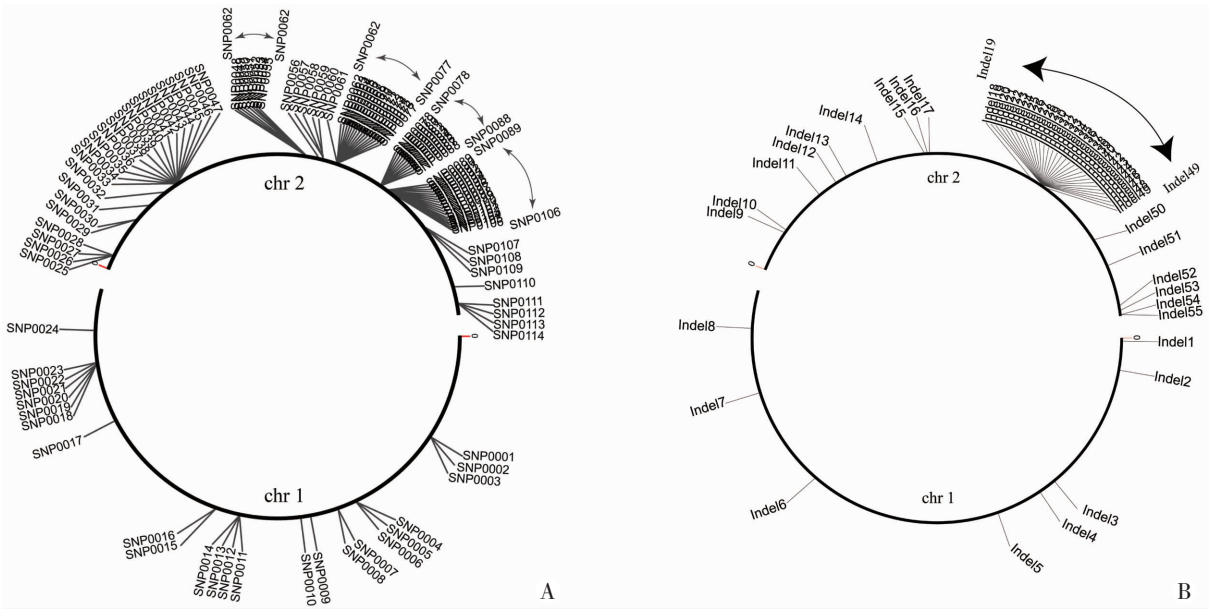
图 4 基于全基因组蛋白序列的进化树分析

2.5 SNP/Indel 分析

对 145A、145B 进行全基因组水平 SNP 分析,发现在 145B 基因组中共有 114 个 SNP(图 5A),其中有 89 个 SNP 落入编码区域,25 个 SNP 在非编码区域,1 号染色体上只有 24 个 SNP,大部分 SNP 在 2 号染色体上(90 个)。同时共检测到 55 个 Indel 位点(图 5B),其中有 31 个 Indel 位点落入编码区域,24 个 Indel 位于非编码区域,在 1 号染色体上仅有 8 个位点存在 Indel,绝大部分 Indel 位于 2 号染色体(47)。

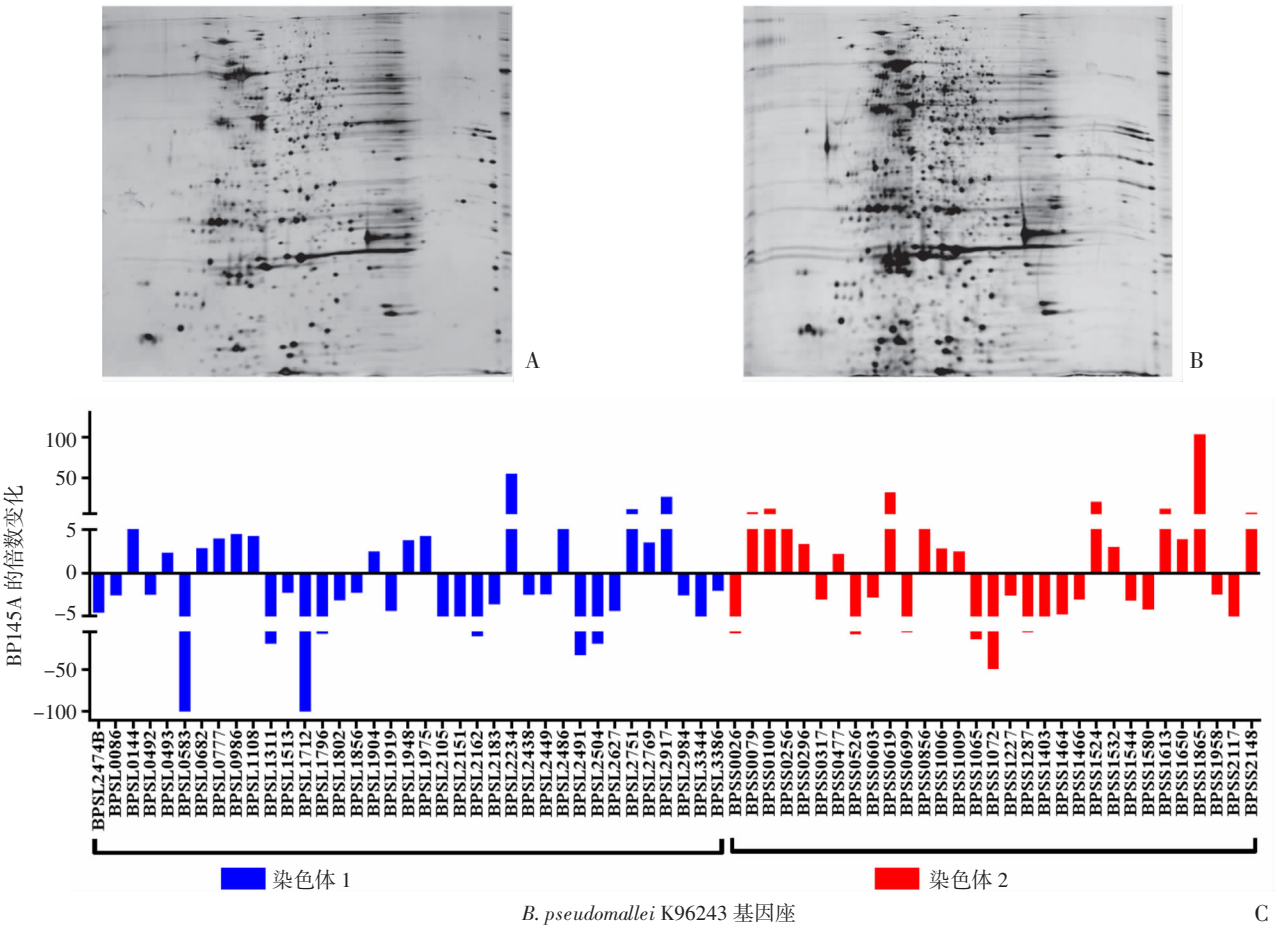
2.6 原发株和复发株蛋白表达水平的变化

对 145A 和 145B 的蛋白表达进行分析,双向电泳结果如图 6A、图 6B 所示,质谱结果显示共有 68 个蛋白的表达发生了显著改变(图 6C),属于 20 个不同的功能类别(表 2),主要集中分布在 ATP binding、Oxidoreductase activity、Hydrolase activity、Catalytic activity、DNA binding、Protein secretion by the type Ⅲ secretion system、Antibiotic resistance related protein transport 等 7 个类别,另有 18 个蛋白属未知功能(表 2)。



A:145B 相对于 145A 全基因组 SNP 位点;B:145B 相对于 145A 全基因组 Indel 位点

图 5 145B 全基因组 SNP、Indel 位点



A:145A 双向电泳图谱;B:145B 双向电泳图谱;C:145A、145B 差异蛋白变化

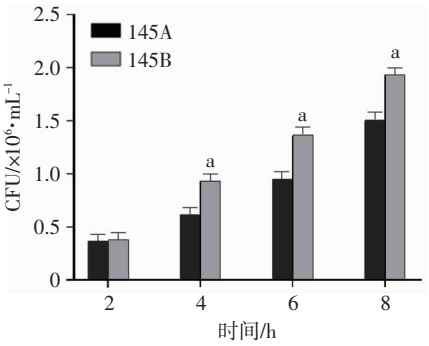
图 6 145A、145B 差异表达蛋白

表 2 差异蛋白功能类别统计

类别	蛋白名称	数目
ATP 结合	BPSS1865;BPSS0856;BPSS0477;BPSL2984;BPSL1856;BPSL0682	6
氧化还原酶活性	BPSS1464;BPSS1466;BPSL2449	3
水解酶活性	BPSL2486;BPSL1948;BPSL2504	3
催化活性	BPSL2627;BPSL2438;BPSL1712;BPSL0493	4
DNA 结合	BPSS2148;BPSS2117;BPSS0317;BPSL3344;BPSL1919;BPSL1311;BPSL0777;BPSL0583;BPSS0699	9
Ⅲ型分泌系统分泌的蛋白质	BPSS1613;BPSS1532;BPSS1524;BPSS1403;BPSS1544	5
抗生素耐药相关蛋白转运	BPSS1287;BPSS0256;BPSL2234;BPSL2151;BPSL1975;BPSL1802	6
功能未知	BPSL1108;BPSS1072;BPSL2917;BPSS1065;BPSL1904;BPSL2474B;BPSL0144;BPSL2183;BPSS1958;BPSS0026;BPSL2751;BPSL0492;BPSL0086;BPSS1227;BPSS0603;BPSL2105;BPSL1796;BPSS0079	18
其他	BPSS0619;BPSS0296 等	14

2.7 原发株和复发株胞内生存能力的改变

对 145A 和 145B 的胞内生存能力进行检测,结果如图 7 所示,在肺上皮 A549 细胞中,复发株 145B 的胞内生存能力明显强于原发株 145A。



a:$P<0.05$,与 145A 比较

图 7 145A 和 145B 胞内生存能力差异

3 讨论

本研究中,我们首先对同一个患者时隔 5 年分离到的 2 株类鼻疽菌进行了系统微生物学鉴定,表明其确为类鼻疽菌。鉴于菌株的多样性,无法准确判断导致类鼻疽复发的确切原因。为此,我们进一步通过全基因组测序、MLST 分型、进化树分析、SNP/Indel 分析排除了不同菌株导致的再感染,同时鉴定了复发株中主要的基因组变化,这些基因组的变化可能会增加细菌对抗生素的耐药性及其胞内生存能力。胞内生存实验表明复发株的胞内存活增殖能力明显增强,提示类鼻疽菌可能在机体长期的选择压力下微进化,使其更加适应在宿主体内的生存而实现长期滞留。

病原菌与宿主的相互作用是决定其感染和发病的前提。作为一种兼性胞内病原体,在感染过程中,类鼻疽菌面临来自宿主的多种威胁,包括营养缺乏[4]、抗生素、氧气限制[5]以及宿主自身防御机制[6]等,另一方面,类鼻疽菌在感染过程中将毒力蛋白注入宿主细胞内,干扰宿主免疫清除及代谢反应,以使其能在宿主细胞中长期存活。全面了解类鼻疽菌在宿主细胞内表达的蛋白对揭示类鼻疽的发病机理至关重要,因此我们使用双向电泳分析了从不同时期分离出的类鼻疽菌中提取的全菌蛋白,共发现了 68 个差异表达蛋白,这些蛋白可能是类鼻疽菌得以在宿主细胞内长期潜伏的重要原因。深入分析发现,这些差异表达蛋白涉及众多Ⅲ型分泌系统(type Ⅲ secretion system,T3SS)相关蛋白。T3SS 是许多革兰阴性的重要毒力因子,可将细菌分泌蛋白注入宿主细胞,干扰宿主生理过程[7]。研究表明,类鼻疽菌 T3SS-3 在类鼻疽菌逃逸吞噬囊泡,引起胞内持续性感染中发挥着关键作用,MUANG-SOMBUT 等[8]研究发现 T3SS-3 bsaQ 突变体表现出逃逸吞噬囊泡能力减弱,胞内生存能力降低,类似地,T3SS-3 蛋白 BsaZ[9]、BsaU[10]、BipC[11]、BopC[12]的表达缺失也会导致吞噬体逃逸的延迟。此外,我们发现差异蛋白中还涉及耐药相关蛋白,类鼻疽菌胞内寄生的特性使其可在宿主细胞中寄生以躲避宿主免疫系统和抗生素的攻击,同时类鼻疽菌自身具有较强的耐药性,对多种抗生素存在不同程度的耐药,使得目前在降低类鼻疽复发方面尚未取得较好的效果。现有研究显示,类鼻疽菌可通过多种途径来增强其耐药性,AUNKHAM 等[13]研究发现,类鼻疽菌可以通过下调外膜孔蛋白 Omp38 的表达从而对头孢他啶、美罗培南及亚胺培南产生耐药;RHOLL 等发现敲除 penA 基因后,阿莫西林、羧苄西林和氨苄西林对类鼻疽菌的 MIC 值降低 16~42 倍[14];另外,细菌可以依靠其拥有的外排

泵系统将进入胞内的抗生素重新排出,减少胞内抗生素的聚积,从而产生耐药,敲除 bpeEF-oprC 基因后,甲氧苄啶对类鼻疽菌的最小抑菌浓度(MIC)值降低近10倍,使耐甲氧苄啶菌株转变为甲氧苄啶敏感菌株[15];而 CHANTRATITA 发现编码青霉素结合蛋白的 BPSS1219 基因缺失导致头孢他啶作用靶点的改变,是类鼻疽菌对头孢他啶耐药的主要因素[16]。而在慢性或潜伏感染状态下,细菌可能以非复制性的代谢状态(类似厌氧菌)存在于细胞内,在这种情况下,它们对常规抗生素的敏感性减弱,大大增加了细菌的胞内存活能力[17]。

综上所述,本研究通过此例复发类鼻疽的系统病原学鉴定及生物学特性研究,初步发现参与调节毒力、耐药、能量代谢等方面的蛋白质表达差异,促进类鼻疽菌在宿主内的定殖和适应,这些差异表达的蛋白质可能是类鼻疽菌建立潜伏感染的关键所在。我们拟在后续研究中围绕这些蛋白质展开进一步深入研究,以期为类鼻疽菌的持续性感染机制以及防治提供理论指导。

参考文献:

[1] LIMMATHUROTSAKUL D, GOLDING N, DANCE D A B, *et al*. Predicted global distribution of Burkholderia pseudomallei and burden of melioidosis[J]. Nat Microbiol, 2016, 1(1): 1-13. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2015.8.

[2] WIERSINGA W J, VIRK H S, TORRES A G, *et al*. Limmathurotsakul D: Melioidosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 17107. DOI:10.1038/nrdp.2017.107.

[3] PEACOCK SJ. Melioidosis[J]. Curr Opin Infect Dis, 2006, 19(5): 421-428. DOI: 10.1097/01.qco.0000244046.31135.b3.

[4] SCHMIDT I H E, GILDHORN C, BÖNING M A L, *et al*. Burkholderia pseudomallei modulates host iron homeostasis to facilitate iron availability and intracellular survival[J]. PLoS Negl Trop Dis 2018, 12(1): e0006096. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006096.

[5] RUSTAD T R, HARRELL M I, LIAO R, *et al*. The enduring hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis[J]. PLoS ONE 2008, 3(1): e1502. DOI: 10.1371/journal.pone.0001502.

[6] ALLWOOD E M, DEVENISH R J, PRESCOTT M, *et al*. Strategies for intracellular survival of Burkholderia pseudomallei[J]. Front Microbiol, 2011, 2: 170.

[7] VANDER BROEK C W, STEVENS J M. TYPE Ⅲ secretion in the melioidosis pathogen Burkholderia pseudomallei[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 255. DOI:10.3389/fcimb.2017.00255.

[8] MUANGSOMBUT V, SUPARAK S, PUMIRAT P, *et al*. Inactivation of Burkholderia pseudomallei bsaQ results in decreased invasion efficiency and delayed escape of bacteria from endocytic vesicles[J]. Arch Microbiol 2008, 190(6): 623-631. DOI:10.1007/s00203-008-0413-3.

[9] BURTNICK M N, BRETT P J, NAIR V, *et al*. Burkholderia pseudomallei type Ⅲ secretion system mutants exhibit delayed vacuolar escape phenotypes in RAW 264.7 murine macrophages[J]. Infect Immun 2008, 76(7): 2991-3000. DOI:10.1128/IAI.00263-08.

[10] PILATZ S, BREITBACH K, HEIN N, *et al*. Identification of Burkholderia pseudomallei genes required for the intracellular life cycle and in vivo virulence[J]. Infect Immun, 2006, 74(6): 3576-3586. DOI: 10.1128/iai.01262-05.

[11] KANG W T, VELLASAMY K M, CHUA E G, *et al*. Functional characterizations of effector protein BipC, a type Ⅲ secretion system protein, in Burkholderia pseudomallei pathogenesis[J]. J Infect Dis, 2015, 211(5): 827-834. DOI: 10.1093/infdis/jiu492.

[12] SRINON V, MUANGMAN S, IMYAEM N, *et al*. Comparative assessment of the intracellular survival of the Burkholderia pseudomallei bopC mutant[J]. J Microbiol, 2013, 51(4): 522-526. DOI: 10.1007/s12275-013-2557-3.

[13] AUNKHAM A, SCHULTE A, WINTERHALTER M, *et al*. Porin involvement in cephalosporin and carbapenem resistance of Burkholderia pseudomallei[J]. PLoS ONE, 2014, 9(5): e95918. DOI:10.1371/journal.pone.0095918.

[14] RHOLL DA, PAPP-WALLACE KM, TOMARAS AP, *et al*. Molecular investigations of PenA-mediated beta-lactam resistance in Burkholderia pseudomallei[J]. Front Microbiol, 2011, 2: 139. DOI:10.3389/fmicb.2011.00139.

[15] PODNECKY N L, WUTHIEKANUN V, PEACOCK S J, *et al*. The BpeEF-OprC efflux pump is responsible for widespread trimethoprim resistance in clinical and environmental Burkholderia pseudomallei isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(9): 4381-4386. DOI: 10.1128/aac.00660-13.

[16] CHANTRATITA N, RHOLL DA, SIM B, *et al*. Antimicrobial resistance to ceftazidime involving loss of penicillin-binding protein 3 in Burkholderia pseudomallei[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108(41): 17165-17170. DOI: 10.2307/41321850.

[17] HAMAD MA, AUSTIN CR, STEWART AL, *et al*. Adaptation and antibiotic tolerance of anaerobic Burkholderia pseudomallei[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(7): 3313-3323. DOI:10.1128/AAC.00953-10.

(**收稿**:2021-05-26;**修回**:2021-08-31)

(编辑 邓强庭)