

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.12.006

· 论 著 ·

## 利用生物信息学探索介导鲍曼不动杆菌血流感染的相关蛋白

冯文艳, 张扣兴

(中山大学附属第三医院, 广东 广州 510530)

**【摘要】** **目的** 探索介导鲍曼不动杆菌(AB)血流感染的相关蛋白,为 AB 血流感染提供新的研究方向。**方法** 在 AB 基因数据库中检索多位点序列分型(MLST)相同,分离部位不同的 AB 菌株,采用生物信息学的方法分析仅存在于血流感染 AB 中的差异蛋白,并进行功能注释分析。**结果** 在设定的检索条件下,共检索 10 株 AB,按 MLST 分为 3 组,其中 ST92 型 4 株(分离自血、痰各 2 株)、ST137 型 4 株(分离自血、痰各 2 株)、ST365 型 2 株(分离自血、痰各 1 株)。基因、蛋白数据库分析结果显示,部分蛋白仅存在于血流感染 AB 中,不存在于分离自痰的 AB 中,其中 ST92、ST137、ST365 型血流感染 AB 中分别存在 20、4、22 个特有蛋白。特有蛋白参与的生物学过程主要集中在:细菌毒力与侵袭力、细菌代谢、DNA 合成、DNA 损伤及修复、转录、翻译、基因转座、以及噬菌体相关蛋白等通路上。**结论** 由于个体差异性,同一 MLST 的 AB 上述蛋白表达的差异,可能是导致其发生血流感染的原因。

**【关键词】** 鲍曼不动杆菌;血流感染;生物信息学;多位点序列分型;相关蛋白

**【中图分类号】** R378.99 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-9638(2018)12-1060-05

## Exploring on related proteins mediating *Acinetobacter baumannii* bloodstream infection based on bioinformatics

FENG Wen-yan, ZHANG Kou-xing (The Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510530, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the related protein mediating *Acinetobacter baumannii* (AB) bloodstream infection(BSI), provide a new research direction for AB bloodstream infection(BSI). **Methods** AB strains with the identical multilocus sequence typing (MLST) but isolated from different sites were retrieved from AB gene database, related differential protein which only existed in AB of BSI were analyzed by bioinformatics, and functional annotation analysis was conducted. **Results** Under the established retrieval conditions, a total of 10 strains of AB were retrieved and divided into three groups according to MLST, including 4 strains of ST92 (2 strains from blood, and 2 from sputum), 4 strains of ST137 (2 from blood, and 2 from sputum), and 2 strains of ST365 (1 from blood, and 1 from sputum). Gene and protein database analysis results showed that partial protein only existed in AB of BSI, didn't exist in AB isolated from sputum, there were 20, 4, and 22 specific protein in AB causing ST92, ST137, and ST365 BSI, respectively. The biological process in which specific protein involved was mainly concentrated on bacterial virulence and invasiveness, bacterial metabolism, DNA synthesis, DNA damage and repair, transcription, translation, gene translocation, and phage-related protein. **Conclusion** Because of individual difference, AB of the same MLST expressing the above differential protein may be the cause of BSI.

**【Key words】** *Acinetobacter baumannii*; bloodstream infection; bioinformatics; multilocus sequence typing; related protein

[Chin J Infect Control, 2018, 17(12): 1060-1064]

[收稿日期] 2018-03-06

[作者简介] 冯文艳(1993-),女(汉族),海南省海口市人,硕士研究生,主要从事重症感染研究。

[通信作者] 张扣兴 E-mail:kxz6210@126.com

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*, AB) 为非发酵革兰阴性杆菌,有荚膜和菌毛,无鞭毛,定植远多于感染,属于条件致病菌<sup>[1]</sup>,主要引起呼吸道感染,也可引发败血症、泌尿系统感染、继发性脑膜炎等,是医院感染的重要病原菌,其中 ST92 型(此为 Bartual 方案分型,与法国巴斯德研究所方案中 ST2 型对应)是世界上分布最广的 ST 型<sup>[2]</sup>。近年来,AB 的感染不断增多,且其耐药性日益严重,多重耐药鲍曼不动杆菌(MDR-AB)、泛耐药鲍曼不动杆菌(PDR-AB)、耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌(CRAB)等广泛传播,给治疗带来很大挑战。临床观察及临床数据调查显示,AB 感染在重症监护病房(ICU)普遍存在<sup>[3-4]</sup>,与单纯的肺部感染相比,血流感染治疗极为困难,患者病死率高、预后差,且与耐药性无明确相关性,耐药性高的 AB 若定植于痰,不发生血流感染,则患者预后良好<sup>[5]</sup>。AB 入血的机制尚不清楚,目前,许多研究对 AB 血流感染的危险因素进行分析,发现深静脉置管、机械通气、粒细胞缺乏等是主要危险因素<sup>[6-8]</sup>,但 AB 多发生于 ICU 或术后患者,大多身体状况较差、免疫力低下,这些危险因素在临床治疗中不可避免,不适当的初始治疗是重要危险因素,早诊断、早治疗是关键<sup>[9-10]</sup>。临床观察发现,即便是同一多位点序列分型(MLST)的 AB 感染,进行同样的临床操作(深静脉置管、机械通气等),部分患者仅限于肺部感染,而另一部分患者却更易发生血流感染,推测影响 AB 血流感染的因素不仅有有创操作、患者自身免疫等外部及患者因素,菌株的生物学特性差异也是重要原因,具体机制尚不清楚。推测找到 AB 自身侵袭宿主的可能关键蛋白,有助于防治 AB 血流感染。本研究主要采用生物信息学方法对已报道的 AB 基因组学进行分析,探索介导 AB 血流感染的相关蛋白。

## 1 资料与方法

1.1 菌株资料收集 在 AB 基因、蛋白数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/403/>)中对目标菌株进行检索,检索策略为:(1) MLST 相同,但是分离部位不同的 AB 菌株;(2)考虑到 AB 存在进化,因此菌株分离年份必须相同;

(3)考虑 AB 的地区分布差异,所检索的 AB 菌株均从中国医院分离;(4)菌株存在完整的基因组学数据,将同一 MLST、不同分离部位的 AB 分为同一组别。

1.2 分析方法 利用在线工具软件(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>),对检索到的相同 ST 分型 AB 基因组学数据、蛋白数据进行分析,由于蛋白执行相应的功能,直接介导了 AB 的不同生物学特性,因此,重点选择蛋白数据进行分析,找出仅存于血流感染 AB 的特有蛋白。随后,在 Uniprot(<http://www.uniprot.org/>)、UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>)、KEGG (<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)等数据库对筛选出的特异蛋白进行功能鉴定、聚类分析。

## 2 结果

2.1 菌株一般信息 在设定的检索条件下,共检索 10 株 AB,其中 ST92 型 4 株(分离自血、痰各 2 株)、ST137 型 4 株(分离自血、痰各 2 株)、ST365 型 2 株(分离自血、痰各 1 株)。将 10 株 AB 按 MLST 分为 3 组,见表 1。

表 1 10 株纳入研究的 AB 信息

Table 1 Information of 10 strains of AB that were included in this study

| MLST  | 菌株编码      | 分离部位 | 总基因数  | 总蛋白数  |
|-------|-----------|------|-------|-------|
| ST92  | 2011BJAB2 | 痰    | 3 923 | 3 784 |
|       | 2011BJAB5 | 血    | 4 062 | 3 904 |
|       | 2011BJAB8 | 痰    | 3 979 | 3 804 |
|       | 2011ZJAB3 | 血    | 3 954 | 3 786 |
| ST137 | 2011BJAB7 | 痰    | 3 936 | 3 776 |
|       | 2011LNAB3 | 血    | 3 836 | 3 664 |
|       | 2011SDAB1 | 痰    | 3 956 | 3 789 |
|       | 2011SDAB3 | 血    | 3 944 | 3 790 |
| ST365 | 2011GDAB1 | 痰    | 3 874 | 3 717 |
|       | 2011GDAB3 | 血    | 3 767 | 3 597 |

2.2 蛋白差异分析 对不同组别 AB 基因、蛋白数据库进行数据分析,结果显示,部分蛋白仅存在于血流感染 AB 中,不存在于分离自痰的 AB 中,其中 ST92、ST137、ST365 型血流感染 AB 中分别存在 20、4、22 个特有蛋白。见图 1。

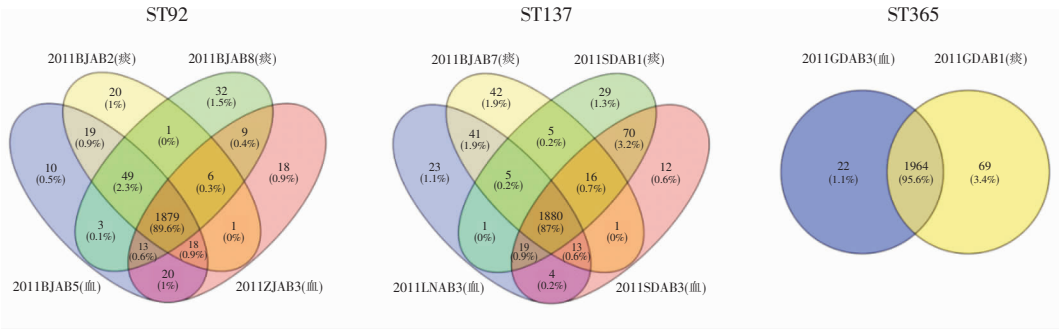


图 1 3 组 MLST AB 的差异蛋白数据分析结果

Figure 1 Data analysis of differential protein of 3 groups of MLST AB

针对仅存在于血流感染 AB 的特有蛋白进行功能注释、分析,结果发现,存在于 ST92 型血流感染 AB 中的 20 个特有蛋白,其生物学过程主要集中于细菌代谢、DNA 合成、DNA 损伤及修复、转录翻译、基因转座、以及噬菌体相关蛋白等通路上;存在于 ST137 型血流感染 AB 中的 4 个特有蛋白,其生物

学过程主要集中于细菌毒力、细菌代谢、基因转座等通路上;存在于 ST365 型血流感染 AB 中的 22 个特有蛋白,其生物学过程主要集中于细菌毒力与侵袭力、细菌代谢、DNA 合成、DNA 损伤及修复、转录翻译、基因转座、以及噬菌体相关蛋白等通路上,见表 2。

表 2 不同 MLST 血流感染 AB 中的特有蛋白及其生物学功能

Table 2 Specific protein in AB causing BSI of different types of MLST and their biological functions

| MLST 分型 | 蛋白  | 生物学功能               |
|---------|---|---------------------|
| ST92    | LysM domain-containing protein, NADH-dependent alcohol dehydrogenase, calcineurin-like phosphoesterase, porphyrin biosynthesis protein, partition protein   | 细菌的代谢相关             |
|         | chromosome partitioning protein ParB, DNA ligase, recombinase RecA, 5'-3' exonuclease, nucleotide pyrophosphohydrolase, DNA recombination protein RecF, sigma-70 family RNA polymerase sigma factor, site-specific integrase, IS5/IS1182 family transposase                           | DNA 合成与修复、转录翻译、基因转座 |
|         | inovirus Gp2 family protein, phage minor tail protein L, tail assembly protein, tail protein, tail length tape measure protein, DUF2612 domain-containing protein   | 噬菌体相关蛋白             |
| ST137   | Plug domain-containing protein, type I secretion protein  | 毒力                  |
|         | aldehyde dehydrogenase, partial<br>Tn3 family transposase   | 细菌的代谢相关<br>基因转座     |
| ST365   | BrnT family toxin, outer membrane protein assembly factor BamB  | 毒力、侵袭               |
|         | alcohol dehydrogenase, partial, sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase Sul2, flavin reductase, lkyl hydroperoxide reductase subunit F, two-component sensor histidine kinase AdeS, phosphatidylserine decarboxylase, short chain dehydrogenase, signal peptide peptidase SppA | 细菌的代谢相关             |
|         | translation elongation factor Tu, partial, replication initiation protein, DNA polymerase III subunit gamma/tau, site-specific DNA-methyltransferase, elongation factor Tu, Arc family DNA-binding protein, tyrosine recombinase, IS5/IS1182 family transposase                       | DNA 合成与修复、转录翻译、基因转座 |
|         | tail tape measure protein, partial, DUF4062 domain-containing protein, DUF1376 domain-containing protein, DUF559 domain-containing protein  | 噬菌体相关蛋白             |

### 3 讨论

AB 在大自然环境中广泛分布,尤其在医院环境中广泛定植,是引发医院内获得性感染的重要条件致病菌。研究<sup>[11]</sup>认为,AB 在痰培养中常见,血流感

染中少见,但近年随着住院患者医疗操作的逐渐增多,以及对 AB 的认识及重视程度进一步加深,血流感染中 AB 检出率越来越高。临床上,患者一旦发生血流感染,病死率极高,预后差。目前,针对 AB 血流感染的相关研究也越来越多,主要集中于对导致 AB 血流感染的危险因素分析。

临床工作中发现,长期卧床的 ICU 患者,在危险因素相同情况下,有些患者仅限于肺部感染,有些患者易发生血流感染,推测影响 AB 血流感染的相关因素可能还有 AB 的生物学特性差异,但具体机制尚不清楚。

课题组前期的综述中将 AB 的致病力主要分为以下几类:(1)对患者的侵袭因素;(2)适应营养物质匮乏等恶劣生存环境的能力;(3)抵抗损伤的能力;(4)外在影响因素<sup>[12]</sup>。本研究对 AB 基因数据库进行检索,找到若干株 MLST 相同,但是分离部位不同的 AB 菌株。随后,对检索到的相同 ST 分型 AB 基因组学数据、蛋白数据进行分析,探讨仅存在于血流感染 AB 中的特有蛋白。ST92、ST137、ST365 三种不同 MLST 血流感染 AB 特有蛋白的功能主要集中在细菌毒力与侵袭力、细菌代谢、DNA 合成、DNA 损伤及修复、转录翻译、基因转座、以及噬菌体相关蛋白等通路上,这些蛋白的功能可归于上述的致病力分类中。

在细菌代谢通路中,存在于 ST92 型血流感染的 AB 中的 LysM domain-containing protein 可正向调控病原菌中铁离子代谢,以促进病原菌的生长<sup>[13-14]</sup>,存在于 ST137、ST365 型血流感染的 AB 中的 alcohol dehydrogenase 可介导乙醇代谢,并增强 AB 的致病力<sup>[15]</sup>;在 DNA 损伤修复通路中,存在于 ST92 型血流感染 AB 中的 recombinase RecA、存在于 365 型血流感染 AB 中的 tyrosine recombinase 等重组酶相关蛋白,可以修复损伤的 DNA,避免氧化应激对 AB 产生的致命损伤<sup>[16]</sup>;存在于 ST92 型、ST365 型血流感染 AB 中的 IS5/IS1182 family transposase、存在于 ST137 型血流感染 AB 中的 Tn3 family transposase 等基因转座酶,可介导耐药基因在 AB 中的转移,从而导致治疗抵抗<sup>[17]</sup>。上述通路中的相关蛋白,均能增强 AB 在恶劣环境下的生存能力及抵抗损伤的能力。

外膜蛋白 A 不仅可介导 AB 黏附并侵袭真核宿主细胞,还可导致宿主细胞死亡并引起免疫刺激,在 AB 的侵袭过程中扮演重要的角色<sup>[18-20]</sup>。研究发现,血流感染 ST365 型 AB 中外膜蛋白组装因子 outer membrane protein assembly factor BamB 能正向促进外膜蛋白的组装与表达,增强 AB 的侵袭性并介导其入血。同时,存在于 ST92 型血流感染 AB 中的转录起始因子 sigma-70 family RNA polymerase sigma factor、存在于 ST365 型血流感染 AB 中的翻译延长因子 translation elongation factor Tu 及存在

于 ST137 型血流感染 AB 中的分泌相关蛋白 type I secretion protein 可能也参与了 AB 侵袭相关蛋白,如外膜蛋白 A 的转录、翻译以及分泌过程,进而促进了 AB 侵袭过程。

噬菌体是一种普遍存在的,能够感染宿主菌并导致其裂解的一类病毒生物体,由于其专一性高、受抗菌药物耐药性影响小,临床上可用于细菌感染性疾病的治疗<sup>[21]</sup>。然而研究发现,在 ST92 型、ST365 型血流感染 AB 的特有蛋白中存在一类噬菌体相关蛋白,此类噬菌体相关蛋白如何影响 AB 的致病力及侵袭力仍需进一步的试验研究。

综上所述,本研究发现血流感染 AB 中存在一类特有的细菌致病力相关蛋白、噬菌体相关蛋白,在相同 MLST 的 AB 中,由于细菌群体中的个体差异,表达此类特有蛋白的 AB,能在临床治疗的情况下存活,且存在高侵袭力的生物学特性,进而介导了血流感染的发生。本研究的创新性在于首次提出探索 AB 菌株入血的特异危险因子,以期早期预判其入血的可能性,早诊断、早治疗,对改善 AB 感染患者的预后有重大意义,但本研究也有局限性,由于数据库筛选样本难度大,耗时长,数据库样本量少,且尚未完成实验验证,只是提出初步设想。数据库的前期研究为后期实验验证提供了指导方向,也为广大研究者提供了新的思路,目前课题组正收集多中心的样本及资料,检测血流感染和非血流感染 AB 相关的特异蛋白,研究此类特殊蛋白,阐明其介导 AB 入血的具体机制,为临床上 AB 血流感染的预判、治疗提供帮助。

#### [参 考 文 献]

- [1] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(3): 538 - 582.
- [2] 符一骐. 中国部分地区鲍曼不动杆菌多位点序列分型及碳青霉烯类抗生素耐药机制研究[D]. 浙江:浙江大学,2012.
- [3] Gonzalez-Villoria AM, Valverde-Garduno V. Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* increasing success remains a challenge as a nosocomial pathogen[J]. J Pathog, 2016, 2016: 7318075.
- [4] Lee H, Lee H. Clinical and economic evaluation of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization in the intensive care unit[J]. Infect Chemothe, 2016, 48(3): 174 - 180.
- [5] Freire MP, de Oliveira Garcia D, Garcia CP, et al. Blood-stream infection caused by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated

- with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(4): 352 - 358.
- [6] 王南菲. 鲍曼不动杆菌血流感染患者死亡危险因素及流行特征分析[D]. 浙江:浙江大学, 2017.
- [7] 张岩岩, 朱婉, 张静萍, 等. 多重耐药鲍曼不动杆菌血流感染危险因素分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(2): 134 - 139.
- [8] 孙建, 黄金伟. 鲍曼不动杆菌血流感染的危险因素及预后分析[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(8): 945 - 948.
- [9] Lee HY, Huang CW, Chen CL, et al. Emergence in Taiwan of novel imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST455 causing bloodstream infection in critical patients[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2015, 48(6): 588 - 596.
- [10] Chopra T, Marchaim D, Johnson PC, et al. Risk factors and outcomes for patients with bloodstream infection due to *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(8): 4630 - 4635.
- [11] 徐腾飞, 刘志武, 金凤玲. 2012—2015 年医院血流感染病原菌分布及耐药性变迁[J]. 中国感染控制杂志, 2017, 16(10): 936 - 940.
- [12] 李志涛, 张扣兴. 鲍曼不动杆菌的致病力/毒力因素[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(8): 566 - 570.
- [13] Gentile V, Frangipani E, Bonchi C, et al. Iron and *Acinetobacter baumannii* biofilm formation[J]. Pathogens, 2014, 3(3): 704 - 719.
- [14] Modarresi F, Azizi O, Shakibaie MR, et al. Iron limitation enhances acyl homoserine lactone (AHL) production and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* [J]. Virulence, 2015, 6(2): 152 - 161.
- [15] Smith MG, Gianoulis TA, Pukatzki S, et al. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis[J]. Genes Dev, 2007, 21(5): 601 - 614.
- [16] Aranda J, Bardina C, Becceiro A, et al. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence[J]. J Bacteriol, 2011, 193(15): 3740 - 3747.
- [17] Aziz RK, Breitbart M, Edwards RA. Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(13): 4207 - 4217.
- [18] Choi CH, Lee JS, Lee YC, et al. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells[J]. BMC Microbiol, 2008, 8: 216.
- [19] Choi CH, Hyun SH, Lee JY, et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity[J]. Cell Microbiol, 2008, 10(2): 309 - 319.
- [20] Sugawara E, Nikaido H. OmpA. Is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii* [J]. J Bacteriol, 2012, 194(15): 4089 - 4096.
- [21] 付丽娜, 王丽丽, 李晓宇, 等. 噬菌体对三大耐药菌的防控作用研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(10): 836 - 841.

(本文编辑:豆清娅、左双燕)