

文章编号 1006-8147(2014)01-0045-03

论 著

泌尿系感染患者大肠埃希菌 fimH 基因检测及 粪便来源菌株同源性分析

王悦,刘德梦

(天津医科大学第二医院感染性疾病研究所,天津 300211)

摘要 目的:检测尿路致病性大肠埃希菌 I 型菌毛相关基因 fimH 携带率,调查相同泌尿系感染患者粪便中大肠埃希菌的同源性,对相关基因 fimH 进行序列分析。方法:89 株来自反复发作性尿路感染和急性单纯性膀胱炎患者清洁中段尿分离的大肠埃希菌。PCR 方法检测 I 型菌毛基因 fimH,采用 Fisher 确切概率法比较两组携带率是否有差异。取 9 名患者粪便同时培养的大肠埃希菌进行药敏初筛分型,同源性分析采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术,对其 fimH 基因 PCR 扩增产物进行序列分析。结果:89 株检出 81 株 fimH 阳性,两组检出率分别为(64/70)91.4%和(17/19)89.4%, $P>0.05$ 。9 名患者中 5 名患者粪便同时分离大肠埃希菌各自存在相同的 PFGE 型,同一患者粪便同型株中 fimH 阳性者序列比对无差异,不同型株 fimH 阳性者其序列均有 6~7 处变异。结论: fimH 基因存在于绝大多数尿路致病性大肠埃希菌中。引起泌尿系感染的大肠埃希菌部分来源于肠道。

关键词 大肠埃希菌;泌尿系感染;I 型菌毛; fimH 基因;同源性

中图分类号 R691.3

文献标志码 A

Examination of fimH gene of *E.coli* strains and the homology analysis of *E.coli* strains for patients with urinary tract infections

WANG Yue, LIU De-meng

(Institute of Infection Disease, The Second Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To examine carrying rate of uropathogenic *Escherichia coli* type I fimbriae, and investigate the homology of *Escherichia coli* for patient with urinary tract infections and analyze fimH gene sequence. **Methods:** A total of 89 *Escherichia coli* were acquired from patients with urinary tract infections and acute cystitis. Type I fimbriae fimH gene by PCR were detected. Fisher exact probability test were used to determine whether differences of carrying rates between the groups were significant. *Escherichia coli* were taken from urine and fecal of 9 patients and cultured at the same time. The early screening of the *Escherichia coli* were achieved by drug-sensitive test and homology analysis was carried out by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique. PCR amplification products of fimH gene sequence were also analyzed. **Results:** Among the 89 strains, eighty one were fimH-positive. Detection rates of the two groups were respectively (64/70) 91.4% and (17/19) 89.4%, ($P>0.05$). *Escherichia coli* of 5 patients out of nine with simultaneous separation from the urine and fecal revealed the same PFGE type and the fimH-positive strains of the same patient with the same PFGE type strain showed no difference in sequence alignments. Six to seven variations were found in the sequences of fimH-positive strains of the different PFGE type had. **Conclusion:** The results suggest that the fimH gene exists in most urinary tract pathogenic *E.coli*. And *Escherichia coli* causing urinary tract infection are partly from intestinal tract.

Key words *Escherichia coli*; urinary tract infection; type I fimbriae; fimH gene; homology

泌尿系感染(urinary tract infections, UTI)是一种常见疾病,尤其多见于女性患者。UTI 主要由大肠埃希菌引起^[1],通常将引起 UTI 的大肠埃希菌称为尿路致病性大肠埃希菌(uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC)。同时,大肠埃希菌又为人群肠道的正常寄生菌^[2],一般认为引起 UTI 的大肠埃希菌是从肠道移行到膀胱而导致发病^[3]。许多毒力因子都与 UPEC 的致病有关,研究认为粘附因子是 UPEC 重要的毒力因子^[4],其中,I 型菌毛被认为是 UPEC 最

基础及最重要的粘附毒力因子,其粘附蛋白 FimH 作为 I 型菌毛中起主要作用的结构单位,成为 UP-EC 研究领域中的重点。本研究目的在于检测引起 UTI 的大肠埃希菌的 I 型菌毛携带情况,调查 UTI 患者自身粪便分离的大肠埃希菌的同源性,并对其 fimH 序列进行比对分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 选取 89 株本院 2010-2012 年临床诊断为 UTI 的门诊和住院患者清洁中段尿培养分离的大肠埃希菌。其中 9 例同时进行清洁中段尿

作者简介 王悦(1987-),女,硕士在读,研究方向:细菌的致病及耐药机制;通信作者:刘德梦, E-mail: tjlf@eyou.com。

和便培养,分离鉴定其中的大肠埃希菌。

将 89 株 UTI 患者尿中分离出的大肠埃希菌分为 2 组:反复发作性尿路感染组 70 株,急性单纯膀胱炎组 19 株。

1.1.2 主要仪器 PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司)、脉冲场凝胶电泳仪(美国 BIO-RAD 公司)、凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司)、DYY-6D 型电泳仪、恒温振荡仪(德国 Eppendorf 公司)。

1.1.3 主要试剂 Premix、DNA Marker DL 2000、核酸内切酶 *Xba*I 及蛋白酶 K 均购自大连宝生物 TaKaRa 生物工程公司,乙二胺四乙酸(EDTA)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)和十二烷基硫酸钠(SDS)均购于上海生工生物公司。引物序列由上海生物工程公司合成,序列为:

fimH-f:CATGCCATGGCCATGAAACGAGTTATT ACC

fimH-r:CCCAAGCTTTTGATAAACAAAAGTCA C^[5]

引物扩增的目的基因片段长度大小为 900 bp。

1.2 方法

1.2.1 便标本细菌分离 便标本分别接种于血琼脂培养皿,37℃培养 16~18 h,在每个培养皿上挑取 35~40 个单个菌落,经常规生化鉴定后选取其中大肠埃希菌,-20℃保存。

1.2.2 药物敏感试验 采用 K-B 纸片扩散法测定每例 UTI 患者的大肠埃希菌(尿和便标本分离的所有菌株)对三类五种抗菌药物(氨苄西林、环丙沙星、头孢噻肟、头孢哌酮、庆大霉素)的敏感性,判断标准参照 CLSI 2012 版。根据大肠埃希菌药敏表型进行初步分型。

1.2.3 脉冲场凝胶电泳(PFGE) 取适量细菌悬浮于 CSB 中,取 200 μL 菌液于 1.5 mL eppendorf 管中,加入 20 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL)混匀,加入 200 μL 1% Seakem Gold:1%SDS 液,混匀后注入模具。胶块凝固后,放入 1.5 mL 细胞裂解液中,54℃,摇床孵育 2 h。用灭菌水洗胶块 2 次,再用 TE 洗 4 次,切 2 mm 宽胶块放入 1.5 mL eppendorf 管中,用限制性内切酶 *Xba*I 于 37℃酶切 2 h。将胶块贴于梳齿包埋于 1%SeaKemGold Agarose,待胶凝固后,放入含 0.5×

TBE 缓冲液电泳槽中,电泳 19 h,经 EB 染色,脱色后,凝胶成像仪照相。PFGE 分型按照美国疾病预防控制中心推荐的分型方案进行^[6]。

1.2.4 PCR 检测 fimH 基因 采用煮沸法提取大肠埃希菌 DNA,PCR 反应体系:Premix Taq 12.5 μL,上下游引物(10 mmol/L)各 1 μL,DNA 模板 2 μL,ddH₂O 8.5 μL。PCR 反应条件:预变性 94℃ 4 min,变性 94℃30 s,退火 55℃ 30 s,延伸 72℃ 1 min,共 30 个循环,72℃延伸 8 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳,电压 120 V,电泳 30 min,以 DNA 标志物 DL2000 为参照,用电泳仪观察特异性扩增条带。选择阳性菌株的 PCR 产物测序,将序列与 GeneBank 进行同源性比对,同源性一致的菌株做阳性对照株。

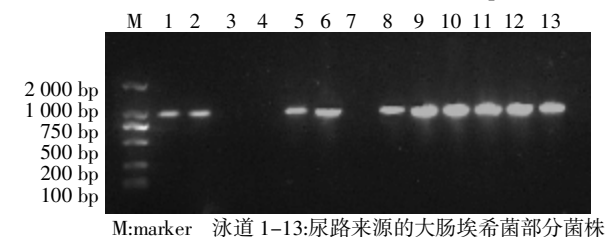
1.2.5 fimH 序列分析 DNA 测序由英俊生物公司协助完成。

1.3 统计方法 用 SPSS 16.0 软件处理分析实验数据,采用 Fisher 确切概率法进行检验,以 $P<0.05$ 作为判断数据差异是否有统计学意义。

2 结果

2.1 89 株尿路来源的大肠埃希菌 fimH 检测情况

89 株尿路来源大肠埃希菌中共检测出 81 株 fimH 基因阳性,总阳性率为 91%,反复发作性尿路感染组与急性单纯型膀胱炎组检出率分别为 91.4%(64/70)和 89.4%(17/19),两组检出率差异无统计学意义, $P=0.677$ 。在 1%琼脂糖凝胶电泳图上可见到特异性条带,基因片段长度大小为 900 bp,见图 1。



泳道 1-13:尿路来源的大肠埃希菌部分菌株
图 1 PCR 扩增 fimH 基因部分电泳图
Fig 1 The partial electropherogram of the amplified fimH genes by PCR

2.2 大肠埃希菌同源性分析

2.2.1 药敏表型分组结果 9 例患者中 5 例患者各自尿便分离的大肠埃希菌存在相同的药敏表现类型,其余 4 例尿便分离大肠埃希菌无药敏表型一致者,见表 1。

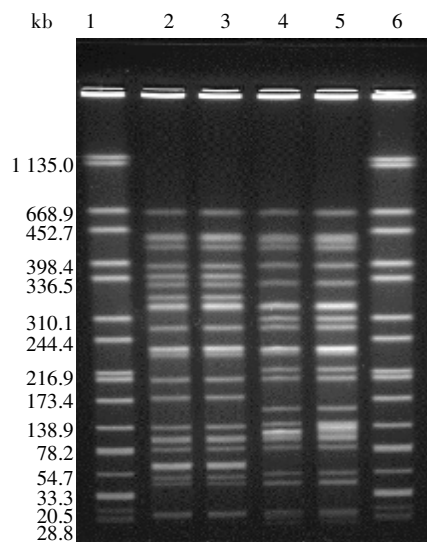
表 1 9 名患者尿便标本药敏表型分组

Tab 1 Grouping of the drug susceptibility phenotypic of the urine and fecal specimens of 9 patients

便标本	1(n=30)	2(n=32)	3(n=28)	4(n=30)	5(n=24)	6(n=30)	7(n=27)	8(n=20)	9(n=20)
药敏表现类型数	3	2	2	2	1	2	1	1	1
与尿标本药敏相同菌株数	0	13	5	0	24	12	27	0	0

n 代表每例患者便标本中所取的克隆株数

2.2.2 PFGE 分型结果 自身尿便分离的大肠埃希菌药敏表型一致的 5 对菌株在 PFGE 图上显示具有分别相同的条带数,且相应条带大小相同,相似系数达 95%以上,最高可达到 100%。由此认为,上述 5 名患者中同一患者自身尿便分离出的大肠埃希菌属于同一菌株。而自身尿便分离的大肠埃希菌药敏表型不一致者,其相似系数可低于 40%,则菌株之间无相关性,PFGE 分型结果一致者部分结果见图2。



泳道 1、6: H9812 为沙门氏菌标准对照株; 2、3 号患者便标本菌株; 3、5 号患者尿标本菌株; 4、6 号患者便标本菌株; 5、6 号患者尿标本菌株

图2 部分大肠埃希菌 PFGE 结果图

Fig 2 The PFGE results gram of partial *E.coli*

2.2.3 5 例患者 *fimH* 基因检测 上述 5 名患者中 2、3、6 号患者便分离的大肠埃希菌各有 2 种药敏表型,根据其药敏表型取 6 株大肠埃希菌,5、7 号患者只存在一种药敏表型,取 2 株大肠埃希菌,取 5 名患者尿分离的大肠埃希菌各 1 株,共有 13 株大肠埃希菌进行 *fimH* 基因检测。结果除 2、3 号患者便分离的与其尿标本药敏表型不同的 2 株大肠埃希菌的 *fimH* 基因为阴性外,其它菌株 *fimH* 基因均阳性。

2.3 测序结果 将 5 名患者 13 株大肠埃希菌 *fimH* PCR 产物送英骏生物公司测序。序列分析结果显示,同一患者 PFGE 分型相同的尿便来源大肠埃希菌的 *fimH* 基因序列对比具有高度同源性(>99.9%),而同一患者 PFGE 分型不同的尿便来源大肠埃希菌 *fimH* 基因序列则分别存在 6~7 处的碱基变化,包括第 79 位(T-A)、第 129 位(T-C)、第 157 位(G-A)、第 298 位(A-T)、第 640 位(C-A)、第 701 位(T-C)、第 817 位(T-C)。第 79 位以及第 640 位点碱基改变并未导致氨基酸序列改变,而第 129 位(T-C)、第 157 位(G-A)、第 298 位(A-T)、第 701 位

(T-C)和第 817 位(T-C)的改变导致了氨基酸第 43 位精氨酸(Arg)被半胱氨酸(Cys)取代,第 53 位甘氨酸(Gly)被精氨酸(Arg)取代,第 100 位异亮氨酸(Ile)被苯丙氨酸(Phe)取代,第 234 位和第 273 位半胱氨酸(Cys)被精氨酸(Arg)取代。

3 讨论

长期以来,人们普遍认为导致泌尿系感染的大肠埃希菌部分来自于消化道^[3],但实际对同一患者尿便分离的大肠埃希菌的同源性分析研究在国内外罕见报道。在本研究中,9 例泌尿系感染患者中,有 5 例患者自身尿便分离出的大肠埃希菌经 PFGE 分析证实,同一患者尿便分离的大肠埃希菌存在相同 PFGE 条带型,证实为同一克隆株,由此证实了上述观点。并且,实验再次显示便标本分离出的大肠埃希菌具有两种以上的多克隆株。

大肠埃希菌引起 UTI 的先决条件是借助菌毛粘附素黏附于尿道上皮细胞^[7]。I 型菌毛作为重要的毒力因子在 UPEC 中分布广泛,直接参与细菌对宿主细胞的粘附与侵入,同时也参与细胞内细菌群落形成(intracellular bacterial communities, IBCs), IBCs 与尿路感染复发密切相关。在 UPEC 中, I 型菌毛相关粘附因子基因 *fimH* 阳性率很高,国内文献报道的阳性率为 91.1%,另有研究发现健康人粪便中的大肠埃希菌 *fimH* 基因的阳性率达 81.3%(74/91)^[8]。本实验中,89 株尿路来源大肠埃希菌中 *fimH* 基因阳性率为 91%,与文献报道基本一致,并且,反复发作性尿路感染组与急性单纯性膀胱炎组检出率差异无统计学意义,由此证实, I 型菌毛在大肠埃希菌中存在的普遍性。

I 型菌毛由 *fim* 基因簇编码,其中 *fimH* 基因编码 I 型菌毛顶端的粘附蛋白 FimH。UPEC 菌株 FimH 的受体(单甘露糖受体)主要存在于尿路上皮细胞,而人肠道中大肠埃希菌 FimH 的主要受体为三甘露糖受体蛋白。国外研究发现,尿路来源的大肠埃希菌 *fimH* 基因与正常肠道中的大肠埃希菌的 *fimH* 基因序列比对存在变异,这种改变可以降低粘附蛋白 FimH 与三甘露糖蛋白受体的结合,增加 FimH 与单甘露糖蛋白受体的亲和力^[9],研究证明,发生 *fimH* 基因变异的细菌更易在尿路上皮细胞定植并致病^[10]。在本实验中,对 5 名患者大肠埃希菌 I 型菌毛相关 *fimH* 基因的序列分析,并未发现分离于同一患者自身尿便且经 PFGE 证实为同一克隆株的大肠埃希菌的 *fimH* 基因发生改变,而同一患者自身尿便中经 PFGE 证实为不同克隆株的大肠埃希

(下转第 53 页)

有无吸烟、饮酒等不良嗜好与术后感染无显著相关性($P>0.10$),考虑与样本构成中女性患者较多,且样本量较小有关。大量医学研究已证明,有吸烟史的患者常伴发呼吸系统疾病,如慢性支气管炎,肺功能欠佳,手术创伤可使患者呼吸功能减弱,考虑到口腔颌面部手术的特殊性,患者不能进行有效地咳嗽,导致分泌物积聚,细菌大量生长繁殖,肺部感染率明显增高,对于同期预防性行气管切开患者,气道分泌物增多尤为明显。肺部感染进而引起体温升高、白细胞升高等全身症状,影响伤口愈合,并发感染。长期饮酒患者常伴有肝肾功能异常,免疫力相应降低,术后易出现电解质紊乱,更易出现感染症状。饮酒吸烟等不良嗜好与血管化腓骨肌皮瓣移植修复颌骨节段性缺损术后感染是否有关联,仍有待扩大样本量,行进一步验证。

综上所述,在应用腓骨肌皮瓣修复下颌骨节段性缺损的临床治疗中,要全面了解患者的年龄、病变性质、术前化疗、手术时间以及术中同期颈清等导致患者术后发生感染的高危因素,吸烟、饮酒等不良嗜好与伤口愈合间接相关的因素,也要同等重视,并给以相应的控制。术前应制定细致严谨的手术方案并充分模拟,同时要做到与患者有一个良好的沟通,通过查体对患者进行全面的体质评估,加

强术前干预;术中要完善相应手术专业技能,减少出血,在允许范围内减小损伤,以力求缩短手术时间;术后应合理使用抗生素,无菌原则换药,对症治疗。通过以上防范措施,尽可能的将影响患者术后感染的风险降到最低,从而有效合理地防控血管化腓骨瓣移植修复颌骨节段性缺损手术的术后感染。

参考文献:

- [1] 彭歆,毛驰,俞光岩,等. 游离组织瓣修复上颌骨缺损 65 例临床研究[J]. 中华口腔颌面外科杂志, 2003, 1(1): 9
- [2] 陈巨峰, 李金, 洗淡, 等. 游离腓骨肌皮瓣在颌骨缺损修复重建中的应用[J]. 中华口腔医学研究杂志(电子版), 2010, 4(1): 77
- [3] Hidalgo D A. Fibula free flap: a new method of mandible reconstruction[J]. Plast Reconstr Surg, 1989, 84(1): 71
- [4] Kroll S S, Schusterman M A, Reece G P, et al. Choice of flap and incidence of free flap success[J]. Plast Reconstr Surg, 1996, 98(3): 459
- [5] Jones N F, Johnson J T, Shestak K C, et al. Microsurgical reconstruction of the head and neck. Interdisciplinary collaboration between head and neck surgeons and plastic surgeons in 305 cases[J]. Ann Plast Surg, 1996, 36(1): 37
- [6] 刘邦华, 孔维佳, 杨成章, 等. 喉癌术后感染的调查分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(10): 1134
- [7] 邹烂辉. 外科术后切口感染相关因素及对策研究[J]. 中国医药指南, 2009, 17(6): 126

(2013-07-04 收稿)

+++++

(上接第 47 页)

菌的 *fimH* 基因序列发生了改变, 这种改变是否对 *FimH* 结构及功能产生影响, 尚需进一步进行研究。本研究样本例数较少, 但仍能阐明本实验所力求证实的现象, 在今后的研究中, 笔者预扩大研究样本例数, 进行进一步探索。

参考文献:

- [1] Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection[J]. Nat Rev Urol, 2010, 7(12): 653
- [2] Turnbaugh P J, Hamady M, Yatsunenko T, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins[J]. Nature, 2009, 457(7228): 480
- [3] Hooton T M. Recurrent urinary tract infection in women[J]. Int J Antimicrob Agents, 2001, 17(4): 259
- [4] Mulvey M A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli* [J]. Cellular Microbiol, 2002, 4(5): 257
- [5] Asadi Karam M R, Oloomi M, Habibi M, et al. Cloning of *fimH* and *fliC* and expression of the fusion protein *FimH/FliC* from Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) isolated in Iran[J]. Iran J Microbiol, 2012, 4(2): 55

- [6] Ribot E M, Fair M A, Gautom R, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet[J]. Foodborne Pathogen Dis, 2006, 3(1): 59
- [7] Kariyawasam S, Nolan L K. *PapA* gene of avian pathogenic *Escherichia coli* [J]. Avian Dis, 2011, 55(4): 532
- [8] Schlager T A, Whittam T S, Hendley J O, et al. Variation in frequency of the virulence factor gene in *Escherichia coli* clones colonizing the stools and urinary tracts of healthy prepubertal girls[J]. J Infect Dis, 2003, 188(7): 1059
- [9] Sokurenko E V, Courtney H S, Maslow J, et al. Quantitative differences in adhesiveness of type-1 fimbriated *Escherichia coli* due to structural differences in *fimH* genes[J]. J Bacteriol, 1995, 177(13): 3680
- [10] Sokurenko E V, Chesnokova V, Doyle R J, et al. Diversity of the *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin - differential binding to mannoses and uroepithelial cell [J]. J Biol Chem, 1997, 272(28): 17880

(2013-09-02 收稿)