卫生, 2005, 21(4): 482- 483.
〔7〕 戴天有, 刘德全, 曾燕君, 等. 装修房屋室内空气的污染 [J]. 环境科学研究, 2002, 15(4): 482- 483.
〔8〕 Berra E, Benizri E, Ginouves A, et al. HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia[J]. EMBO J, 2003, 22(16): 4082- 4090.
〔9〕 刘君卓, 高星, 张金良, 等. 居住环境和公共场所有害因素及其防治 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 50- 51.
〔10〕 贾松树, 胡巅, 王立争, 等. 新装修居室空气中甲醛浓度的变化 [J]. 环境与健康杂志, 2002, 19(6): 447- 448.
〔11〕 张进, 董四清, 金辄, 等. 酚试剂和乙酰丙酮法测定空气中甲醛的研究 [J]. 环境科学与技术, 2004, 27(4): 34- 35.
〔12〕 刘凤琴, 宋献光, 董国光, 等. 用化学法和现场检测仪法测定室内空气中甲醛的对照实验 [J]. 贵州化工, 2005, 30(4): 19- 21.

收稿日期: 2008-10-27 (宋艳萍编校)

文章编号: 1001-0580(2009)06-0724-03 中图分类号: R 378.2 文献标志码: A 【论 著】

尿道致病性大肠埃希菌 P菌毛基因分型*

吴庆刚[1], 姜永[1], 李波清[2], 郑明寰[2], 陈锦英[3]

摘 要: 目的 明确国内分离的 45株尿道致病性大肠埃希菌 (UPEC) P菌毛的 papG和 papA的基因型分布状况及两者可能的组合形式, 为国内 UPEC菌株的致病机制、遗传变异、流行病学分析和免疫防治等研究提供基础依据。方法 应用 papG和 papA多重 PCR基因分型方法对 45株 UPEC菌株进行 papG和 papA基因分型, 并分析基因型分布与组合形式。结果 45株 UPEC P菌毛的 papG均为II型, 与国外报道显著不同。其中 44株 (97.8%) papA基因可成功分型, 1株 (UPEC4030, 2.2%) 不能分型, 提示为未知基因型。44株 papA基因分型结果阳性菌株中, 11个基因型分布如下: 24株 (54.55%) 具有单一型; 13株 (29.55%) 具有 2个基因型; 4株 (9.09%) 和 3株 (6.82%) 分别具有 3个和 4个基因型。单一基因型较为常见的为 F7-2 (25.00%)、F11 (6.82%) 和 F16 (9.09%)。受试菌株各种基因型出现的频次, 优势基因型依次为 F10和 F13各 12株 (27.27%)、F7-2和 F11各 11株 (25.00%)、F14为 10株 (22.27%)、F16为 9株 (20.45%)。具有 2个以上基因型的组合形式与国外不同, 并首次发现了 4个基因型 (F8+F9+F13+F14) 组合的 UPEC菌株。结论 国内分离的 45株 UPEC菌株 papG高度保守, 而 papA呈现高度多态性, 并出现与国外不同的基因型。

关键词: 尿道致病性大肠埃希菌; P菌毛; 基因分型

Study on P pili genotyping of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated WU Qing-gang, JIANG Yong, LI Bo-qing, et al. Wuxi Center for Disease Control and Prevention (Wuxi 214023, China)

Abstract Objective To define the genotypic distribution and combination forms of papG and papA of 45 uropathogenic Escherichia coli (UPEC) strains isolated in China, and to lay a foundation of further study on pathogenesis, genetic variation, epidemiological analysis as well as immunotherapy. **Methods** The papA and papG genes of 45 UPEC stains were typed by the multiplex PCR assay and the genotypic distribution and combination forms of the two genes were analysed. **Results** Among the 45 strains, all the strains carried class II genotypes of papG (44, 97.8%) were found by the multiplex papA PCR assay (F-PCR) to containing one or more of 11 known papA alleles (F-types). Only one strain (UPEC4030) was negative according to F-PCR assay and by PCR. Hence, it was suspected of harboring novel variant of papA. Of the F-PCR positive strains, 24 (54.55%) had a single F types, 13 (29.55%) had two types, 4 (9.09%) and 3 (6.82%) had three and four types. F7-2 (25.00%), F11 (6.82%) and F16 (9.09%) tended to occur alone. Among the 11 known F types, nine F types occurred at least once in the population in decreasing order of prevalence as follows: F10 and F13 (27.27%), F7-2 and F11 (25.00%), F14 (22.27%), F16 (20.45%). The combination forms with more than 2 papA genotypes were different from those found abroad. The strains containing four F types (F8, F9, F13 and F14) were found for the first time. **Conclusion** The results suggested that the papG sequences of UPEC strains isolated in China were highly conservative and the papA sequences possessed polymorphisms. The 45 UPEC strains isolated had different papA genotypes from those found outside China and their clinical and epidemiological meaning need further study.

Key words uropathogenic E. coli; P pili; genotyping

大肠埃希菌是尿路感染的主要致病菌, 85%以上的菌株具有 P菌毛, P菌毛能特异性地粘附、定植于人泌尿道上皮细胞, 进而引起尿道上行性感染, 这类菌株称为尿道致病性大肠埃希菌 (Uropathogenic E. coli, UPEC)[1]。P菌毛包括 2种蛋白, 其中 P菌毛尖端 PapG粘附素是 UPEC粘附定植的关键因子, 人类特有的 PapG依其受体结合特异性不同分为 I、II 2种血清型; I、II型 PapG粘附能力不同, 因此, 其菌株致病性也有差别[2]。另 1种蛋白是 PapA (或称 F抗原, P fimbrial Antigen), 占 P菌毛蛋白总量的 99.9%; PapA是 UPEC血清学分型的基础, 现共发现 11个血清型, 与血清型相对应的是 11个基因型[3]。对于 UPEC菌株的 papG和 papA 2个基因型的流行病学研究国外已有报道[2-4]。本研究应用 papG和 papA多重 PCR基因分型方法[3-5]对国内分离的 45株 UPEC

* 基金项目: 卫生部科研基金项目 (WKJ2006-2-10)
作者单位: 1. 江苏省无锡市疾病预防控制中心, 214023; 2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所; 3. 天津医科大学基础医学院
作者简介: 吴庆刚 (1966-), 男, 北京人, 副研究员, 博士后, 研究方向: 病原生物学与疾病预防控制。

进行 papG和 papA基因分型,以期明确国内 UPEC P菌毛的 papG和 papA的基因型分布状况及两者可能的组合形式,为 UPEC的致病机制、遗传变异、流行病学分析和免疫防治等的研究提供基础依据。

1 材料与方法

1.1 材料

(1)菌株、质粒和培养基:分离自江苏省无锡市第二人民医院、天津医科大学总医院和第二医院、北京协和医院 1992~2006年尿路感染者尿标本尿道致病性大肠埃希菌(UPEC)45株,均经常规细菌学方法鉴定,再经 D-甘露糖抵抗血凝反应(MRHA)和 papC PCR法双重鉴定确定为带有 P菌毛菌株。(2)标准菌株:UPEC132,其 P菌毛 papA和 papG分别为 F13型和Ⅱ型;UPECJ96为 F13型和Ⅰ型 papG代表株;UPEC1442为 F12型 papA代表株;*E. coli* k-12p678-54为无菌毛代表株(美国 Hull RA和 de Ree JM教授惠赠)。(3)质粒:pPIL110-75、pPIL110-37、pANN921、pPIL288-10、pF-10、pPIL291-15、pCT10、pF14、pF15和 pF16(美国 Hull RA和 de Ree JM教授惠赠),分别带有血清型为 F7-1、F7-2、F8、F9、F10、F11、F13、F14、F15和 F16的 UPEC菌株染色体上编码 P菌毛的粘附基因群[3]。(2)试剂和仪器:脂质双层(LB)固体和液体培养基(北京博大泰克公司);DNA提取设备为 genomic DNA isolation kit(北京博大泰克公司),PCR引物由上海 Sangon公司合成;DNA标准分子量(大连 TaKaRa公司);PE2400DNA扩增仪(美国 GE公司)。

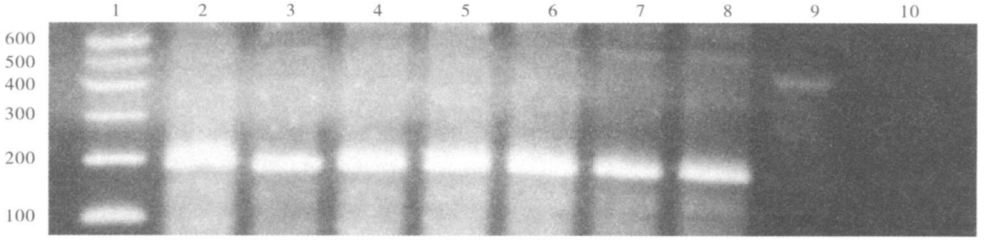
1.2 方法

1.2.1 papG多重 PCR扩增 (1)根据文献[4]合成用于 papG基因分型的 2对寡核苷酸引物分别对应于该基因的 5′和 3′端,预期扩增 papGⅠ、Ⅱ型基因中 461、190bp片段。引物序列为:Ⅰ型上游:5′-TCGTGCTCAGGTCCGGAATTT-3′,下游:5′-TGGCATCCCCCAACATTATCG-3′;Ⅱ型上游:5′-GGGATGAGCGGGCCTTTGAT-3′,下游:5′-CGGGCCCCCAAGTAACTCG-3′。(2)反应体系与反应条件如下:10×扩增缓冲液 5μl,$MgCl_2$ 2mmol/L混合 4种脱氧核糖核苷酸(dNTP)200μmol/L,混合 4种引物各 20pmol,模板 DNA 10ng加双蒸水(DDW)至 50μl,混合后加入 TaqDNA聚合酶 2U。预变性 95℃ 7min;94℃ 1min,61℃ 1min,72℃ 1min 3个循环;91℃ 1min,63℃ 1min,72℃ 1min 25个循环;72℃延伸 10min。

1.2.2 papA多重 PCR扩增 (1)根据文献[3]合成 13条寡核苷酸引物,其中 F7-1r、F7-2r、F8r、F9r、F10r、F11r、F12r、F13r、F14r、F15r、F12/15r、F16r分别代表 11个不同基因型 papA下游引物,Ff为上游共有引物,预期扩增 375、183、251、416、312、277、393、400、320、455、179、239bp片段,其中 F12r和 F12/15r为扩增 F12型 UPEC papA基因片段的 3′端共同引物。引物序列如下:上游引物 Ff 5′-GGCAGTGGTGTCTTTTGGTG-3′;下游引物 F7-1r 5′-TTTCACCCGTTTTCCACTCG-3′,产物 375bp;F7-2r 5′-TTTGGGTTGACTTTCCCCATC-3′,产物 183bp;F8r 5′-GTACCACCTACAGCACTTGG-3′,产物 251bp;F9r 5′-AAGGCCCCGTTGACGTTTT-3′,产物 416bp;F10r 5′-CTCCTCATTATGACCAGAAACCCT-3′,产物 312bp;F11r 5′-GGCCCAGTAAAAGATAATTGAACC-3′,产物 277bp;F12r 5′-CCCATCGACAAGACTTGACA-3′,产物 393bp;F13r 5′-GGGTATTAGCATCACCTTCGGAG-3′,产物 400bp;F14r 5′-GCAGCATATCTTTATTGTTCCC-3′,产物 320bp;F15r 5′-GCTACATTCTTGCCACTTGC-3′,产物 455bp;F12/15r 5′-AATTCTTGGGCGTTGAGGATCCA-3′,产物 179bp;F16r 5′-GTTCCCGCTTTATTACCAGC,产物 239。为了扩增片段在电泳胶上易于分辨,将上游通用引物与 12条下游引物的 PCR反应分为 poolA(Ff+F11r、F14r、F13r、F15r)、poolB(Ff+F12/15r、F8r、F7-1r、F9r)、poolC(Ff+F7-2r、F16r、F10r、F12r)3个组。(2)反应体系与反应条件如下:10×扩增缓冲液 5μl,$MgCl_2$ 3mmol/L混合 4种 dNTP200μmol/L,poolA、B、C内 5种引物各 20pmol,模板 DNA(质粒 DNA/细菌染色体 DNA),加 DDW至 50μl,混合加入 TaqDNA聚合酶 4u。预变性 94℃ 10min;94℃ 1min,62℃ 1min,72℃ 1min 10sec 3个循环;94℃ 1min,67℃ 1min,72℃ 1.5min 25个循环;72℃延伸 10min。

2 结果

2.1 papG基因片段多重 PCR扩增结果(图 1) Ⅰ、Ⅱ型 papG阳性对照菌株 UPECJ96、UPEC132扩增出预期约 461、190 bp特异性产物;无菌毛阴性对照菌株 *E. coli* k-12p678-54经同样操作未被扩增。45株 UPEC分离株 papG扩增产物全部为 papGⅡ型,扩增阳性率为 100%。



注:1:DNA Marker;2~7:UPEC4119、UPEC1200、UPEC134、UPEC4030、UPECSH2、UPEC102;8:UPEC132;9:UPECJ96;10:*E. coli* k-12p678-54。

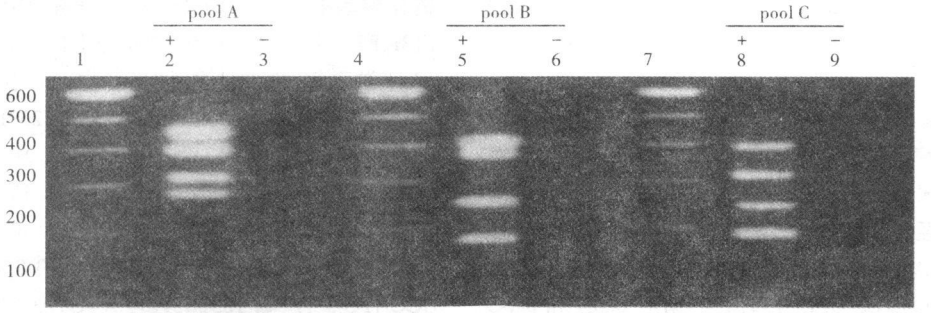
图 1 UPEC菌株 papG PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳(2%)

2.2 papA多重 PCR基因分型结果

2.2.1 papA基因型标准质粒和代表菌株(图 2) 10个 papA基因型标准质粒和 F12菌株分属 3个 papA基因分型 PCR组,经多重 PCR扩增,均获得 papA基因分型预期的特异性扩增产物。

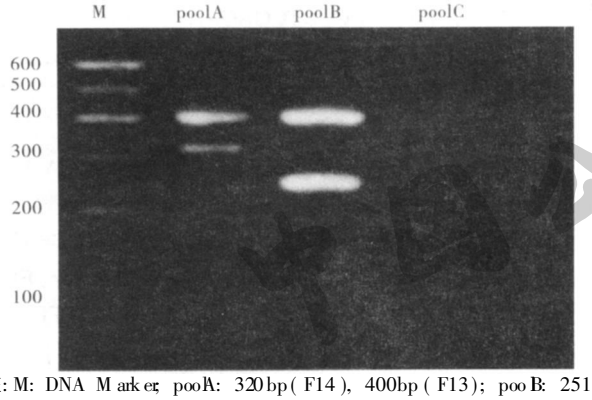
2.2.2 45株 UPEC菌株(图 3) 45株 UPEC papA多重 PCR基因分型扩增阳性率为 97.8%(44/45株),仅有 1株(UPEC4030)经同样操作,3组多重 PCR扩增没有结果。44株 papA阳性菌株中,11个基因型分布如下:具有单一基因型 24株,54.55%;具有 2个基因型 13株,29.55%;具有 3个基因型 4株,9.09%;具有 4个基因型 3株,6.82%,均为 F8+F9+F13+F14。44株 UPEC papA阳性菌株中,含 F10和 F13各 12株,27.27%;F7-2和 F11各 11株,25.00%;F14 10株,22.72%;F16 9株,20.45%;F8、F9和 F15各 3株,6.82%;F7-1、F12为 0株;按基因型出现频次计算,F10和 F13最多,12株;其余依次为 F7-2和 F11,11株;F14为 10株;F16为 9,

为国内 UPEC的优势基因型; F7-2、F16、F10、F11、F13和 F15可以以单一基因型出现, 尤其 F7-2未发现有联合出现血清型的菌株; F8、F9、F10、F11、F13、F14常与其他基因型联合出现。



注: 1、4、7: DNA Marker; 3、6、9: E. coli k-12p678-54; 2: pPIL291-15(F11)、pF14(F14)、pCT10(F13)、pF15(F15); 5: UPEC1442和 pF15(F12/15)、pANN921(F8)、pPIL110-75(F7-1)、pPIL288-10(F9); 8: pPIL110-37(F7-2)、pF16(F16)、pF-10(F10)、UPEC1442(F12)。

图 2 标准质粒与 **F12**菌株 **papA**多重 **PCR**扩增后琼脂糖凝胶电泳 (**2%**)



注: M: DNA Marker; poolA: 320bp(F14), 400bp(F13); poolB: 251bp(F8), 416bp(F9) poolC: (-)。

图 3 **UPEC106**菌株 **papA**多重 **PCR**扩增后琼脂糖凝胶电泳 (**2%**)

3 讨 论

本研究结果显示, 国内分离的 45株 UPEC菌株其基因分型均为Ⅱ型 papG。国外研究发现, 自Ⅰ型标准株 UPECJ96分离鉴定以来, 也仅发现 8株 UPECⅠ型菌株, 其 papG与 papA的组合形式皆为Ⅰ型 papG与 F13型 papA[3]。在本试验中, 可能由于本研究所用菌株数目相对较少, 没有检出Ⅰ型 papG菌株的存在, 如扩大样本量是否会检出 UPECJ96样的Ⅰ型菌株, 尚需进一步探讨。

本研究结果还显示, 45株 UPEC菌株进行 papA多重 PCR基因分型, 44例出现阳性结果其中单一基因型为 F7-2、F11、F16与国外报道相一致[3,5], 优势血清型为 F13、F7-2、F10、F11、F14、F16与国外报道 F7-2、F10、F11有差别[3,5,6]。具有 4个基因型的 UPEC菌株 (F8+F9+F13+F14)在国内外尚未见报道。国外已有Ⅰ型 papG+F13型 papA和Ⅱ型 papG+F7-2、F10、F11、F16型 papA组合形式的报道, 但仅仅是对少量 UPEC菌株的单一研究结果[3-5]。对 45株 UPEC菌株进行总体研究表明, 国内 UPEC菌株尚有Ⅱ型 PapG+F8、F9、F13、F14、F15papA组合形式, 国外未见这些组合形式的报道。UPEC106、UPEC238等菌株同时具有 F8、F9、F13、F14等 4个基因型, 与Ⅱ型 papG的组合形式属首次发现。致病岛 (PAI) 最早是用来描述 UPEC染色体上 2个分子量很大、编码许多毒力相关基因的不稳定的外源 DNA片段。已有报道, 3株 UPEC(536、J96和 CFT073)的 12个 PAIs[6-8]。UPEC的粘附基因群提示其必有 PAI存在。以上结果提示, 国内 UPEC菌株的流行病学信息、遗传变异特点及其致病岛与国外菌株存在不同之处, 了解国内菌株的特点和演变规律, 将有助于 UPEC的毒力、致病机制及其防治研究的深入。

本研究结果提示, 国内分离的 UPEC菌株 papG高度保守, 而 papA呈现高度多态性, 其流行病学信息和遗传变异特点与国外菌株存在很大不同之处, 且可能有不同于国外的未知 papA基因型的 UPEC菌株存在。

参考文献

〔1〕 Struve C, Krogfelt KA. *In vivo* detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection[J]. Microbiology, 1999, 145: 2683-2690.

〔2〕 Girón JA, Torres AG, Freer E, et al. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells[J]. Mol Microbiol, 2002, 44: 361-379.

〔3〕 Johnson JR, Stell AL, Scheutz F, et al. Analysis of the F antigen-specific papA alleles of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* using a novel multiplex PCR-based assay[J]. Infect Immun, 2000, 68(3): 1587-1599.

〔4〕 Johnson JR, Brown JJ. A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for indentification of variant PapG genes encoding the gal(α1-4)Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*[J]. J Infect Dis, 1996, 173: 920-926.

〔5〕 Johnson JR, Stell AL, Kaster N, et al. Novel molecular variants of allele I of the *Escherichia coli* P fimbrial adhesin gene papG[J]. Infect Immun, 2001, 69: 2318-2327.

〔6〕 Lane MC, Simms AN, Mobley HL, et al. Complex interplay between Type 1 fimbrial expression and flagellum-mediated motility of uropathogenic *Escherichia coli*[J]. J Bacteriol, 2007, 189: 5523-5533.

〔7〕 Hagan EC, Mobley LT. Uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane antigens expressed during urinary tract infection[J]. Infect Immun, 2007, 75: 3941-3949.

〔8〕 徐建国. 分子细菌学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 197-200.

收稿日期: 2008-10-16 (孔繁学编辑 宋艳萍校对)