

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.07.030

网络首发 [https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200224.1627.010.html\(2020-02-25\)](https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200224.1627.010.html(2020-02-25))

## 自建分子检测方法在腹泻患者艰难梭菌感染调查中的应用\*

于翔<sup>1</sup>, 杨昆豫<sup>1#</sup>, 李嘉嘉<sup>1</sup>, 把丽美<sup>1</sup>, 毛小琴<sup>1,2△</sup>

(1. 云南省第一人民医院/昆明理工大学附属医院, 昆明 650032;

2. 云南省临床微生物分子研究中心, 昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 评估自建的 PCR 方法对粪便标本中艰难梭菌的直接检测能力。**方法** 收集云南省第一人民医院 244 例腹泻患者的粪便标本, 分别采用 PCR 方法与传统厌氧培养法对标本进行直接检测, 阳性标本进行毒素 A/B 的 PCR 直接检测和酶联免疫荧光法检测, 利用 MLST 分型技术对 PCR 方法检测阳性的粪便标本进行艰难梭菌分型。**结果** 收集的 244 例腹泻患者粪便标本中艰难梭菌厌氧培养检测出 12 例阳性, PCR 法检测出 28 例阳性, 检出率分别为 4.92% 和 11.48%, 差异有统计学意义 ( $P=0.008$ )。对 28 例患者阳性粪便标本进行毒素 A/B 检测显示, PCR 法检测出 24 例阳性, 酶联免疫荧光法检出 11 例阳性, 检出率分别为 85.71% 和 39.28%, 差异有统计学意义 ( $P=0.0003$ )。对检出的阳性粪便标本进行 MLST 分型, 结果显示仅存在散发性的患病, 没有发生暴发性流行。**结论** 自建的分子诊断方法对粪便标本中艰难梭菌的直接检测能力好, 适于实验室对艰难梭菌的快速筛查。

**[关键词]** 艰难梭菌; 检测方法; MLST 分型

**[中图分类号]** R378.99 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)07-1159-05

## Application of a self-developed molecular detection method in investigation of Clostridium difficile infection in patients with diarrhea\*

YU Xiang<sup>1</sup>, YANG Kunyu<sup>1#</sup>, LI Jiajia<sup>1</sup>, BA Limei<sup>1</sup>, MAO Xiaoqin<sup>1,2△</sup>

(1. Yunnan First People's Hospital/the Affiliated Hospital of Kunming University of Science and Technology, Kunming, Yunnan 650032, China; 2. Clinical Microbiology Molecular Research Center of Yunnan Province, Kunming, Yunnan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the direct detection ability of a self-developed PCR detection method for Clostridium difficile in feces samples. **Methods** Feces of 244 patients with diarrhea in Yunnan First People's Hospital were collected. Samples were tested by PCR and traditional anaerobic culture. The positive samples were detected by PCR and enzyme-linked immunofluorescence assay for Toxin A/B. Then MLST typing technology was used to classify Clostridium difficile in positive samples. **Results** A total of 12 positive Clostridium difficile strains were detected in 244 samples by anaerobic culture and 28 were detected by PCR. The detection rate was 4.92% and 11.48%, respectively. The difference was statistically significant ( $P=0.008$ ). Among the 28 positive samples tested for Toxin A/B, 24 were detected by PCR and 11 were detected by enzyme-linked immunofluorescence assay. The detection rate was 85.71% and 39.28%, respectively. The difference was statistically significant ( $P=0.0003$ ). MLST typing of positive samples showed that only sporadic diseases existed and no outbreaks occurred. **Conclusion** The self-developed PCR detection method has better direct detection ability for Clostridium difficile in feces samples, which is suitable for rapid and large-scale epidemiological investigation.

**[Key words]** Clostridium difficile; test method; multilocus sequence typing

艰难梭菌 (Clostridium difficile, CD) 是一种条件致病菌, 当宿主免疫力状态不佳或肠道环境平衡被破

坏后, CD 会在人体内大量繁殖, 此时会由非侵袭状态转变成为侵袭状态。抗生素的大量使用可导致肠道

\* 基金项目: 云南省卫生科技计划项目 (2016NS206)。 作者简介: 于翔 (1975-), 主治医师, 本科, 主要从事急重症医学研究。 # 共同

第一作者: 杨昆豫 (1963-), 副主任医师, 本科, 主要从事急重症医学研究。 △ 通信作者, E-mail: maoxq\_123@163.com。

内菌群失衡,诱发 CD 感染,可出现严重的炎症反应,继而引发结肠炎、伪膜性结肠炎等疾病<sup>[1-2]</sup>。据文献报道,CD 的感染率较高,且感染的严重性、复发率和病死率均呈逐年上升的趋势,已逐步成为世界范围内关注的重要公共卫生问题<sup>[3-5]</sup>。此外,不同基因型的 CD 致病能力有很大差异,因此早发现、早干预、早治疗是疾病防治的关键。

CD 的早发现是疾病防治的起始环节,也是目前的难点之一。传统的细菌培养方法是金标准,但耗时长且阳性检出率很低,目前国内开展 CD 检测的实验室很少,更缺乏系统的流行病学调查的数据。因此,本实验前期自建了 CD 的 PCR 检测方法,其对 CD 菌株检测有很好的灵敏度和特异度<sup>[6]</sup>,但其对临床粪便标本中 CD 的直接检测能力是后续进行 CD 流行病学调查的关键。因此,本研究首先评估了自建 PCR 方法在粪便标本中对 CD 的直接检出能力,包括菌体和毒素两方面,在此基础上对筛选出的 CD 阳性患者的粪便标本进行了 MLST 分型研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

粪便标本宏基因组 DNA 提取试剂盒和细菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物科技公司,DP302);琼脂糖(西班牙 Biowest 公司,172155);2×TSINGKE Master MIX(硕擎生物技术有限公司,TSE001);厌氧产气袋(法国梅里埃公司,45534),CCFA 培养基(北京索莱宝科技有限公司,LA2000)。

### 1.2 样品和标准菌株

实验菌株分离至 2016 年 8 月至 2017 年 12 月云南省第一人民医院腹泻患者粪便标本,共 244 例,其中男 140 例,女 104 例,年龄 18~98 岁。CD 标准菌株 ATCC9689 为国家卫生健康委员会惠赠。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 CD 厌氧培养与质谱鉴定

将收集的粪便样品用等体积乙醇预处理,充分混匀,室温状态下静置 30 min 后用离心机 4 000 r/min

离心 15 min,然后将菌液转接到 CD 选择性培养基 CCFA 中,培养基放置在密封的厌氧袋中,37 °C 恒温培养 48 h。挑选出 CD 典型菌落进行革兰染色观察鉴定,疑似样品进行飞行时间质谱仪最终鉴定。

#### 1.3.2 PCR 方法对粪便标本中 CD 的直接检测

用基因组提取试剂盒提取粪便样品中的 CD 基因组。用本实验室之前筛选到的 CD 特异性基因设计引物<sup>[1]</sup>,采用 50 μL 的 PCR 体系,其中包括模板 1 μL,上下游引物各 2 μL, Taq 酶 0.25 μL。PCR 反应条件:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 25 s,共 35 个循环,72 °C 最后延伸 1 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶,120 V 电泳 30 min,凝胶成像系统观察结果,条带正确样品测序验证。

#### 1.3.3 酶联免疫荧光法检测 CD 毒素 A/B

取 PCR 检测阳性的样品 200 μL,加入 1 mL 样品稀释液,吹吸后振荡将二者彻底混匀。4 °C 条件下 12 000×g 离心 5 min,吸取离心后样品上清液 300 μL,加入 VIDAS 试剂条中。然后将试剂条装入 VIDAS 仪器中,进行 CD 毒素蛋白检测。

#### 1.3.4 PCR 方法对粪便标本中 CD 毒素 A/B 的直接检测

将 PCR 检测阳性的粪便标本用试剂盒提取菌体基因组,根据查阅文献设计引物,毒素 A 引物:TcdA-f 5'-ATG GAT AGG TGG AGA AGT CA-3',TcdA-r 5'-TAG CTG TAA TGC TTC AGT GG-3';毒素 B 引物:TcdB-f 5'-GGC TGA AGC TAA TGC AGA TA-3',TcdB-r 5'-TTA GCT CTT GCA TCG TCA AA-3'。构建 50 μL 反应体系,其中包括模板 2 μL,上下游引物各 1 μL,2×TSINGKE Master MIX 25 μL,用 ddH<sub>2</sub>O 补至 50 μL。反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,共循环 35 次,最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min,凝胶成像系统观察结果,条带大小正确样品测序验证。

表 1 MLST 分型用 CD 基因引物

基因	引物	碱基序列(5'→3')	产物长度(bp)
adk	adk-F	TTA CTT GGA CCT CCA GGT GC	635
	adk-R	TTT CCA CTT CCT AAG GCT GC	
atpA	atpA-F	TGA TGA TTT AAG TAA ACA AGC TG	674
	atpA-R	AAT CAT GAG TGA AGT CTT CTC C	
dxr	dxr-F	GCT ACT TTC CAT TCT ATC TG	525
	dxr-R	CCA ACT CTT TGT GCT ATA AA	
glyA	glyA-F	ATA GCT GAT GAG GTT GGA GC	625
	glyA-R	TTC TAG CCT TAG ATT CTT CAT C	

续表 1 MLST 分型用 CD 基因引物

基因	引物	碱基序列(5'→3')	产物长度(bp)
recA	recA-F	CAG TAA TGA AAT TGG GAG AAG C	705
	recA-R	ATT CAG CTT GCT TAA ATG GTG	
sodA	sodA-F	CCA GTT GTC AAT GTA TTC ATT TC	585
	sodA-R	ATA ACT TCA TTT GCT TTT ACA CC	
tpi	tpi-2-F	ATG AGA AAA CCT ATA ATT GCA G	640
	tpi-2-R	TTG AAG GTT TAA CAC TTC CAC C	

1.3.5 CD MLST 分型

参照文献[7]设计 CD 7 个管家基因的引物作为分型检测引物,见表 1。对 tpi 阳性的粪便标本提取粪便 DNA 后进行 CD 7 个管家基因 adk,dxr,atpA,tpi,sodA,glyA,recA 的 PCR 扩增,测序后进行 MLST 分型。采用 40 μL 的 PCR 反应体系,包括 DNA 模板 2 μL,上下游引物各 1 μL,premix rtaqDNA 聚合酶 20 μL、ddH<sub>2</sub>O 16 μL。扩增条件:95 °C 预变性 15 min;94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 70 s,共 35 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min。琼脂糖凝胶电泳检测电泳条带,然后将 PCR 产物测序,测序序列与数据库([http://pubmlst.org/clostridium\\_difficile](http://pubmlst.org/clostridium_difficile))进行对比,得到特定位点的等位基因号,将等位基因组合形成相应的等位基因谱,与数据库进行比对后获得菌株型别。

1.4 统计学处理

采用 SPSS23.0 统计软件进行分析。计数资料以率表示,采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 自建 PCR 方法与传统培养鉴定法对粪便中 CD 菌体的检出能力比较

对收集到的 244 例腹泻患者粪便标本同时利用厌氧培养与自建的 PCR 方法进行检测。结果显示:两种方法检出的阳性例数分别为 12 例和 28 例,阳性率分别为 4.92%、11.48%,且厌氧培养阳性菌均为 PCR 检测阳性菌株,PCR 方法的阳性检出率明显高于厌氧培养方法( $P = 0.008$ ),见表 2。部分粪便标本 CD 特异基因 PCR 产物电泳,见图 1。

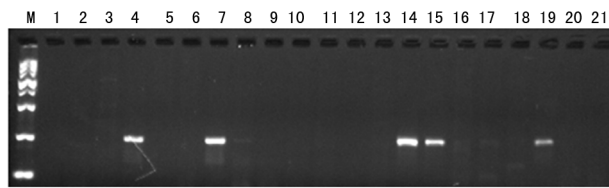
表 2 两种方法对 CD 检出能力比较

方法	阳性例数(n)	阴性例数(n)	合计(n)	阳性率(%)
PCR	28	216	244	11.48
厌氧培养	12	232	244	4.92

2.2 自建 PCR 方法和酶联免疫荧光法对粪便中 CD 毒素 A/B 的检出能力比较

对 PCR 检测为 CD 阳性的 28 例患者粪便标本进行两种方法的毒素 A/B 检测。结果显示:PCR 法检测为阳性有 24 例,酶联免疫荧光法检测为阳性有 11 例,检出率分别为 85.71%、39.28%,PCR 方法的毒

素检出率明显高于酶联免疫荧光法( $P = 0.0003$ ),见表 3。本次检测阳性的标本均为 A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 双阳型,未检测到单独的 A 毒素和 B 毒素阳性,酶联免疫荧光法检测为阳性的标本在 PCR 方法检测中也均为阳性。部分标本的 PCR 毒素检测结果见图 2、3。

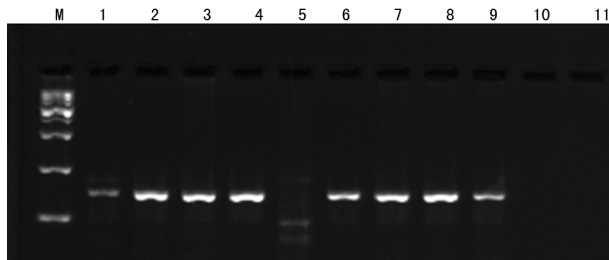


M:5 000 bp DNA 标记物;1~21:编号分别为 1~21 号的粪便标本 CD 特异基因 PCR 产物,其中 4、7、14、15、19 号为阳性标本。

图 1 部分粪便标本 CD 特异基因 PCR 产物电泳图

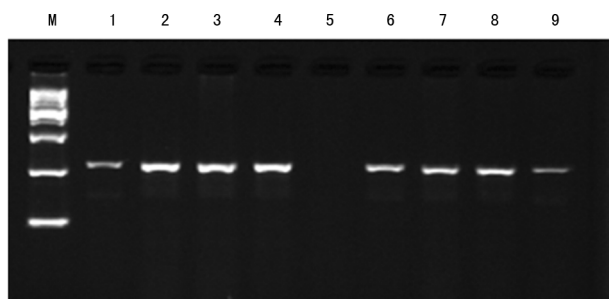
表 3 艰难梭菌毒素 A/B 两种方法的检测结果

方法	A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> (n)	A <sup>-</sup> B <sup>-</sup> (n)	合计(n)	阳性率(%)
PCR	24	4	28	85.71
酶联免疫荧光法	11	17	28	39.28



M:5 000 bp DNA 标记物;1~11:CD 阳性样品毒素 A 的 PCR 产物。

图 2 部分阳性 CD 毒素 A 的 PCR 检测结果图



M:5 000 bp DNA 标记物;1~9:CD 阳性样品毒素 B 的 PCR 产物。

图 3 部分阳性 CD 毒素 B 的 PCR 检测结果图

2.3 CD MLST 分型

表 4 28 例 CD 特异基因阳性的粪便 CD MLST 分型结果

标本号	adk	atpA	dxr	glyA	recA	sodA	tpi	ST 型
34、159、171	1	1	2	1	5	3	1	2
54、136	1	1	2	1	1	1	1	3
19、140、198	1	1	6	1	8	5	1	15
57	1	1	2	1	1	5	3	17
139、219	1	1	6	1	4	3	4	26
108	1	1	2	1	6	5	3	33
14	2	5	8	1	1	3	6	35
151、183、231	3	7	3	8	6	9	11	37
4、7	3	7	10	8	7	2	10	39
162	1	4	7	1	1	3	3	54
153	1	1	2	6	1	1	3	98
15、125、167	1	3	6	1	1	1	3	129
59	2	1	2	1	1	1	11	139
64、240	3	3	10	8	7	2	15	158
68	2	5	8	1	1	3	1	218
91	1	1	2	1	1	1	3	354

对 PCR 检测为 CD 阳性的 28 例患者粪便标本, 通过扩增 CD 的 7 个管家基因后进行 MLST 分型分析。结果显示: 28 份标本的扩增产物经凝胶电泳检测均有条带出现, 且目的条带清晰, 见图 4。28 份标本的基因型分布较分散, 未发现优势型别, 表明本院近期的 CD 感染为散发, 而非暴发流行, 见表 4。

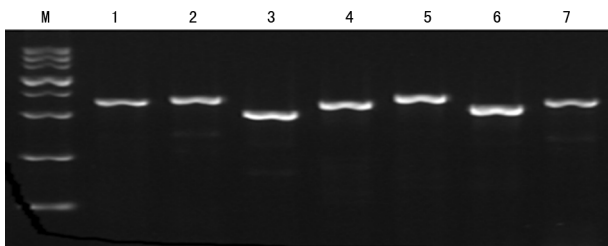


图 4 4 号标本 CD MLST 7 个管家基因 PCR 产物电泳结果图

图 4 4 号标本 CD MLST 7 个管家基因 PCR 产物电泳结果图

### 3 讨 论

CD 是一种厌氧菌, 寄生于人体肠道内, 在肠道正常菌群形成的生物学屏障完好时呈现为正常携带状态, 如在婴幼儿携带率可达 50%。由于近年来大量抗生素的使用破坏了这种屏障保护作用, 导致内源性或医院获得性 CD 的大量繁殖而致病。已证实 CD 是抗生素相关伪膜性肠炎的主要病原菌, 也是抗生素相关性结肠炎和抗生素相关性腹泻的病原菌<sup>[8]</sup>。长期以来, 我国的医学界对 CD 感染的认识及研究都不足, 实验室缺乏检测手段, 感染的临床症状不特异等导致很多 CD 感染被漏诊、误诊, 而不及时的诊治可能会危及患者生命。

目前世界上对 CD 的检测主要采用粪便样品培养和毒素实验<sup>[9-10]</sup>, 有的费时费力, 有的时效性较短, 不利于大规模推广。目前市面上已有商品化 CD 核酸检测试剂盒和酶联免疫荧光法毒素 A/B 检测试剂盒, 但受限于试剂盒无注册证、试剂盒和仪器设备成本昂贵等问题, 很难在基层实验室推广。笔者在前期自建了 CD 的核酸检测方法, 并用 CD 标准菌株进行了灵敏度、特异度的方法学评估, 结果显示本实验室自建的分子检测方法检测下限达到了每微升 100 个质粒, 且无特异性扩增<sup>[6]</sup>, 这为本研究奠定了方法学基础。本研究将自建的 CD 核酸检测方法与传统的检测方法做比较, 初步评估了自建的核酸扩增方法对临床粪便标本中的 CD 直接检测的能力, 结果显示在 CD 的检出率方面明显高于传统培养方法, 更为快速、简便且不受菌体的存活状态影响。受限于设备及人员条件, 本实验未对 PCR 检测阳性而厌氧培养阴性的菌株进行进一步验证, 后续实验当中可对 PCR 扩增序列进行酶链载体后测序比对, 以验证方法的准确性, 去除假阳性结果。

针对 CD 的 A 毒素和 B 毒素检测, 本实验 PCR 检测方法方法与酶联免疫荧光法进行比较, 结果显示自建方法具有更高的阳性检出率。在检测的 28 例 CD 阳性标本中有 24 例为毒素阳性, 这与 PCR 菌体检测的阳性结果符合度高, 间接证明自建的 PCR 方法对 CD 的检出能力强。4 株 PCR 毒素检测阴性样品, 可能是非产毒株, 或是因方法学灵敏度问题而导致假阴性亦或是产二元毒素样品, 还需进一步实验进行验证。

CD 可以通过医疗设备从一个患者传播至另一个



患者,导致医院内感染,从而引起医院内暴发性流行<sup>[11]</sup>。不同的 CD 核糖体型,致病力有很大区别,其中核糖体型 027 型 CD 毒力高,致死率明显高于其他基因型<sup>[12-13]</sup>。本研究结果显示,28 株菌分为 16 个不同 ST 型,除了 ST2 型、ST15 型、ST37 型和 ST129 型各有 3 株菌,大多数基因型都只有 1 株菌,表明没有暴发流行的情况,同其他地区的暴发流行有所区别<sup>[14]</sup>。通过对收集到的阳性标本的患者信息进行分析,发现这些患者散布在医院的众多科室,在抗生素使用较多的科室和患者中相对较多,但没有集中趋势,与 MLST 分型的结果相符。这与国内其他报道的 CD 感染趋势是一致的<sup>[15]</sup>。

由于腹泻患者标本收集相对不易,合格率不高,造成培养阳性率仅为 5% 左右。尽管核酸扩增方法能提高检出率到 10% 以上,这与实际的感染率仍可能存在较大的出入。此外,本研究收集的标本数少,阳性率低,在方法学比较时纳入评估的标本数和分型的标本数不够,造成结果的可信度降低。后期将加大筛查样本量,尽可能收集本地区多家医院的标本进行筛查,以获得本院和本地区 CD 的流行情况,为 CD 的防治提供更为可靠的实验依据。

## 参考文献

- [1] GREENHILL C. Clostridium difficile; the importance of toxin A is re-established in clostridium difficile infection [J]. Nature Rev, 2010, 7(12): 654.
- [2] YOUNG V B, HANNA P C. Overlapping roles for toxins in clostridium difficile infection[J]. J Infect Dis, 2014, 209(1): 9-11.
- [3] ANANTHAKRISHNAN A N. Clostridium difficile infection: epidemiology, risk factors and management[J]. Nature Rev, 2011, 8(1): 17-26.
- [4] BAUER M P, NOTERMANS D W, VAN BENTHEM B H, et al. Clostridium difficile infection in Europe: a hospital-based survey[J]. Lancet, 2011, 377(9759): 63-73.
- [5] BALDAN R, CAVALLERIO P, TUSCANO A, et al. First report of hypervirulent strains polymerase chain reaction ribotypes 027 and 078 causing severe clostridium difficile infection in Italy[J]. IDSA, 2010, 50(1): 126-127.
- [6] 于翔, 把丽美, 毛小琴. 艰难梭菌快速分子诊断方法的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(2): 178-181.
- [7] GRIFFITHS D, FAWLEY W, KACHRIMANI DOU M, et al. Multilocus sequence typing of Clostridium difficile[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(3): 770-778.
- [8] CHAUGHTAI S, GANDHI B, CHAUGHTAI Z, et al. Clostridium difficile peritonitis: An emerging infection in peritoneal dialysis patients [J]. BMJ Case Reports, 2018, 353: 72-83.
- [9] PLANCHE T, WILCOX M. Reference assays for Clostridium difficile infection: one or two gold standards[J]. J Clin Pathol, 2010, 64(1): 1-5.
- [10] CS MERZ C K, M FORMAN, GLUCK L. Comparison of four commercially available rapid enzyme immunoassays with cytotoxin assay for detection of clostridium difficile toxin (s) from stool specimens[J]. J Clin Microbiol, 1994, 32(5): 1142-1147.
- [11] WATKINS R R, MANGIRA C, MUAKKASSA F, et al. Clostridium difficile infection in trauma, surgery, and medical patients admitted to the intensive care unit[J]. Surg infect, 2018, 19(5): 488-493.
- [12] WALKER A S, EYRE D W, WYLLIE D H, et al. Relationship between bacterial strain type, host biomarkers, and mortality in clostridium difficile infection[J]. IDSA, 2013, 56(11): 1589-1600.
- [13] WEHRHAHN M C, KEIGHLEY C, KURT OVIC J, et al. A series of three cases of severe clostridium difficile infection in australia associated with a binary toxin producing clade 2 ribotype 251 strain[J]. Anaerobe, 2019, 55: 117-123.
- [14] SHOAEI P, SHOJAEI H, KHORVASH F, et al. Clostridium difficile infection in cancer patients with hospital acquired diarrhea at the teaching hospitals in Iran: Multilocus sequence typing analysis (MLST) and antimicrobial resistance pattern[J]. Ann Ig, 2019, 31(4): 365-373.
- [15] 应建飞, 汪一萍, 俞燕红, 等. 重症监护室腹泻患者中艰难梭菌感染的基因分型及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(22): 2766-2768.