

• 论 著 •

## PCR-核糖体分型技术基因分型艰难梭菌\*

肖克林<sup>1</sup>, 金萍<sup>2</sup>, 黄丽清<sup>3</sup>, 梁霞<sup>4</sup>, 周天祥<sup>3</sup>, 王中兴<sup>3</sup>, 王秦宁<sup>5</sup>, 孔繁荣<sup>5</sup>

(深圳市宝安区妇幼保健院: 1. 中心实验室; 2. 儿科 ICU; 3. 检验科; 4. 药剂科, 广东深圳 518133;

5. 悉尼大学韦斯特米德医院感染性疾病和微生物中心, 澳大利亚悉尼 2145)

**摘要:**目的 调查区域性的艰难梭菌基因型分布和毒素 A、B 的携带情况。方法 68 株艰难梭菌临床菌株收集自悉尼大学韦斯特米德医院, 利用 PCR-核糖体分型技术进行基因分型, 利用 PCR 方法检测毒素 A、B 编码基因 *tcdA*、*tcdB*。结果 68 株菌可分为 31 种核糖体型(RT), 最常见的为 RT014 (19.1%) 和 RT002 (11.8%); 94.1% (64 株) 的菌株 *tcdA*、*tcdB* 均为阳性。结论 悉尼地区主要流行的艰难梭菌基因型为 RT014 和 RT002, 绝大部分临床菌株均携带毒素 A、B。

**关键词:**艰难梭菌; 核糖体型; 毒素 A、B

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.06.033

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)06-0793-03

PCR-ribotyping for genotyping *Clostridium difficile* clinical isolates\*Xiao Kelin<sup>1</sup>, Jin Ping<sup>2</sup>, Huang Liqing<sup>3</sup>, Liang Xia<sup>4</sup>, Zhou Tianxiang<sup>3</sup>,Wang Zhongxing<sup>3</sup>, Wang Qinning<sup>5</sup>, Kong Fanrong<sup>5</sup>

(1. Central Laboratory; 2. PICU; 3. Department of Clinical Laboratory; 4. Department of Pharmacy, Bao'an District Maternal and Child Health Care Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133, China; 5. Center for

Infectious Diseases and Microbiology, Westmead Hospital, University of Sydney, Sydney, NSW, Australia, 2145)

**Abstract:** **Objective** To investigate the genotype and production of toxin A and B of *C. difficile* clinical isolates collected from Sydney, Australia. **Methods** Sixty-eight *C. difficile* clinical isolates were collected from Westmead Hospital, the University of Sydney, which were genotyped by using PCR-ribotyping, and toxin A, B coding gene *tcdA*, *tcdB* were detected by using PCR method. **Results** Thirty-one PCR-ribotypes (RTs) were confirmed in the 68 *C. difficile* clinical isolates, RT014 (19.1%) and RT002 (11.8%) were the common genotypes. Sixty-four of 68 (94.1%) isolates contained *tcdA* and *tcdB* for toxin A and B. **Conclusion** The common prevalent PCR-ribotypes of *C. difficile* were RT014 and RT002 in Sydney, most of the *C. difficile* clinical isolates contained toxin A and B.

**Key words:** *Clostridium difficile*; ribotype; toxin A and B

艰难梭菌(*C. difficile*), 是一种革兰氏染色阳性、可形成芽孢的专性厌氧菌, 它是导致医院感染性腹泻的常见病原菌<sup>[1]</sup>。艰难梭菌相关性腹泻(*C. difficile*-associated diarrhea, CDAD)的临床表现差异较大, 患者症状可为轻度腹泻或重度致死性的伪膜性肠炎<sup>[2]</sup>。2002 年下半年, 加拿大魁北克省发现 CDAD 的发病率呈明显上升趋势, 患者病情严重, 病死率高<sup>[3]</sup>; 随后, 在北美和欧洲多地均有相似报道<sup>[4-5]</sup>, 引起人们的高度关注。艰难梭菌基因型与患者病情相关, 感染不同的基因型, 疾病的发展和预后可能完全不同, 如感染了高毒力基因型, 如 BI/NAP1/027, 可导致严重后果, 甚至死亡。因此, 对艰难梭菌进行基因分型有极大的临床意义。本研究中, 笔者利用 PCR-核糖体分型方法对 68 株悉尼大学韦斯特米德医院收集的临床菌株进行基因分型, 并对其毒素 A、B 编码基因进行检测, 以分析其基因型分布及毒素携带情况。

## 1 材料与方法

**1.1 艰难梭菌参考菌株** 选取 25 株核糖体型(ribotype, RT)明确的艰难梭菌作为参考菌株。10 株来自于国际对照研究<sup>[6]</sup>, 由美国 CDC Dr. Limbago 提供, 4 株来自于斯洛文尼亚, 由 Prof. Rupnik 提供, 11 株来自澳大利亚, 由西澳大学 Prof.

Riley 提供。见表 1。

**1.2 艰难梭菌临床菌株** 68 株艰难梭菌临床菌株收集自澳大利亚悉尼大学韦斯特米德医院感染性疾病和微生物中心。

**1.3 DNA 提取** 将菌株接种于哥伦比亚血平板上厌氧培养 48~72 h, 然后挑 1~5 个菌落溶于 200  $\mu$ L 去离子水, 100  $^{\circ}$ C 煮沸 10 min。将悬浮液以 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液用于 PCR。

**1.4 PCR-核糖体分型** 参照 Stubbs 等<sup>[7]</sup>报道的方法。PCR 反应体积为 50  $\mu$ L, 包含 10  $\times$  PCR buffer 5.0  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 8.0  $\mu$ L, dNTP (25 mmol/L) 0.8  $\mu$ L, 16S 和 23S 引物(50  $\mu$ mol/L) 各 0.25  $\mu$ L, AmpliTaq Gold<sup>TM</sup> polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.75  $\mu$ L, DNA 模板 10  $\mu$ L, 最后加分子生物学级水 24.95  $\mu$ L。PCR 程序如下: 95  $^{\circ}$ C 15 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 55  $^{\circ}$ C 1 min, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。电泳条件如下: 2% 琼脂糖凝胶, 8  $\mu$ L PCR 产物 100 V 电泳 2 h, 分子量标识选用 100~1 500 bp DNA ladder。

**1.5 毒素编码基因检测** 毒素 A、B 编码基因 *tcdA*、*tcdB* 利用 PCR 方法进行检测。*tcdA* 选用 Lemee 等<sup>[8]</sup>报道的引物, *tcdB* 选用 Kato 等<sup>[9]</sup>报道的引物。PCR 反应体积为 25  $\mu$ L, 包

\* 基金项目: 宝安区科技计划项目(2013071, 2014083)。 作者简介: 肖克林, 男, 副主任技师, 主要从事临床分子诊断和相关研究。

含 10×PCR buffer 2.5 μL、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.0 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 1.0 μL、(上、下游)引物 (50 μmol/L) 各 0.25 μL、HotStar Taq polymerase (5 U/μL) 0.1 μL、DNA 模板 2 μL,最后加分子生物学级水 17.9 μL。PCR 程序如下:95 ℃ 15 min;95 ℃ 1 min,58 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。电泳条件如下:2% 琼脂糖凝胶,5 μL PCR 产物 100 V 电泳 30 h,分子量标识选用 100~1 500 bp DNA ladder。

表 1 25 株艰难梭菌参考菌株的核糖体型

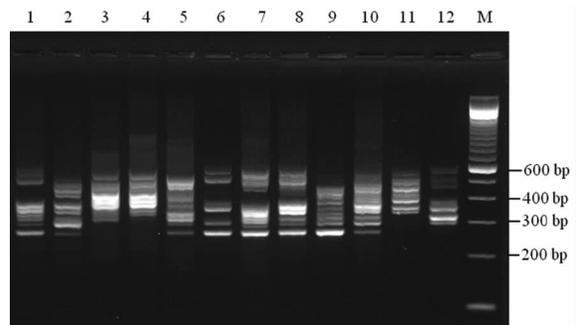
菌株号	来源	核糖体型
UK3	英国	001
UK2	英国	106
US34	美国	053
CA7	加拿大	015
CA10	加拿大	019
CA8	加拿大	056
CA1	加拿大	153
NL9	荷兰	002
NL8	荷兰	014
NL1	荷兰	027
1470	斯洛文尼亚	017
8864	斯洛文尼亚	036
51377	斯洛文尼亚	066
VPI 10463	斯洛文尼亚	087
RPH61	澳大利亚	005
WA161	澳大利亚	010
WA156	澳大利亚	012
WA111	澳大利亚	018
PMH45	澳大利亚	020
WA93	澳大利亚	054
WA132	澳大利亚	070
WA94	澳大利亚	078
PMH3	澳大利亚	103
WA151	澳大利亚	237
WA12	澳大利亚	239

## 2 结 果

**2.1 艰难梭菌临床菌株核糖体型分布情况** 68 株艰难梭菌临床菌株中,37 株 PCR-核糖体分型电泳带型可在 25 种参考带型中找到,鉴定出了核糖体型;另外 31 株未发现带型一致的参考菌株,无法分型。PCR-核糖体分型示意图见图 1。68 株临床菌株分成 31 种核糖体型,包括 10 种已知核糖体型和 21 种未知核糖体型(命名为 AU001~AU020)。最常见的基因型为 RT014,占 19.1%(13 株),其次为 RT002,占 11.8%(8 株),第 3 位为 RT056 和 AU006,各占 8.8%(6 株),另 RT078 和 AU015 各有 3 株,其余 25 种核糖体型则分别有 1~2 株。

**2.2 临床菌株毒素 A、B 编码基因 *tcdA*、*tcdB* 携带情况** 64 株(94.1%)临床菌株 *tcdA*、*tcdB* 均为阳性,3 株(4.4%)为 *tc-*

*dA* 阴性、*tcdB* 阳性,1 株(1.5%)*tcdA*、*tcdB* 均为阴性。



M:DNA 分子标识(invitrogen 100 bp DNA Ladder);1~5:5 例临床菌株,6~12:7 例参考菌株(6:RT001,7:RT014,8:RT015,9:RT017,10:RT027,11:RT078,12:RT106)。

图 1 艰难梭菌 PCR-核糖体分型示意图

## 3 讨 论

近十余年,艰难梭菌高毒力 RT027 在全球多个地区爆发流行,导致了严重的临床后果和沉重的经济负担。对临床分离出的艰难梭菌进行基因分型和毒力检测,从而制定合理的临床诊疗方案和防控措施,可有效地降低患者的死亡率,并可有效地控制 CDAD 院内感染的发生。

当前,用于艰难梭菌基因分型的方法很多,包括有 PCR-核糖体分型(PCR-ribotyping)、细菌全基因组限制性内切酶酶切法(REA)、脉冲场凝胶电泳(PFGE)、多位点测序分型(MLST)、多位点数量可变的末端重复序列分析(MLVA)、扩增片段长度多态性分析(AFLP)、表面膜蛋白 A 基因测序分型(*slpA* ST)以及近年兴起的全基因组测序(WGS)等<sup>[6,10-11]</sup>,各种方法各有优缺点,PCR-核糖体分型和脉冲场凝胶电泳是最常用的两种方法,其分别在欧洲和北美地区得到广泛应用。PCR-核糖体分型利用艰难梭菌 16S rRNA 至 23S rRNA 基因间隙区(ISR)的核苷酸序列多态性(基因组上存在多个拷贝,且序列长度长短不一)这一特性进行基因分型,相较于 PFGE,其操作更简便快捷,且即使基因组 DNA 断裂或部分降解也不受影响<sup>[7]</sup>。因此,本研究中笔者选用了 PCR-核糖体分型技术。

艰难梭菌的基因型分布存在地区差异,在不同地区可能完全不同。Bauer 等<sup>[12]</sup>报道,2008 年 11 月欧洲常见的艰难梭菌基因型为 RT014/020、RT001 和 RT078,而同期北美常见的流行株则为 RT027、RT002、RT106、RT017 和 RT078<sup>[13]</sup>。2013 年,Collins 等<sup>[14]</sup>统计发现,近二十年来亚洲常见的基因型为 RT017、RT018、RT014、RT002 和 RT001。本研究结果显示,68 株临床菌株包含了 31 种核糖体型,最常见的为 RT014,其次为 RT002,未检出高毒力 RT027。这一结果与 Ferguson 等<sup>[15]</sup>的报道相似,表明 RT014 和 RT002 为现阶段澳大利亚最常见的艰难梭菌基因型。

毒素 A、B 是艰难梭菌最主要的致病因子,毒素 A 是一种肠毒素,毒素 B 为一种细胞毒素,两者均为葡萄糖基转移酶,可催化靶细胞内的 GTP 结合蛋白 Rho、Rac 和 Cdc42 的苏氨酸 35/37 单糖基化,使这些小分子 GTP 酶活性灭失,细胞内部发生生理学变化,从而导致细胞死亡。毒素 A、B 的编码基因分别为 *tcdA* 和 *tcdB*,均位于细菌染色体上的毒力基因位点(PaLoc)<sup>[16]</sup>。当前的研究表明,大部分艰难梭菌产毒株均同时产毒素 A 和 B(A+B+),只有小部分只产毒素 B(A-

B+) [17]。本研究显示,在 68 株艰难梭菌临床菌株中,67 株 (98.5%) 为产毒株,其中 64 株 *tcdA*、*tcdB* 均为阳性,为毒素 A+B+,3 株 *tcdA* 阴性、*tcdB* 阳性,为毒素 A-B+。这一结果表明悉尼地区流行的艰难梭菌产毒特性与其他地区菌株一样,以同时产毒素 A 和 B 为主。

总之,本研究表明悉尼地区分离的艰难梭菌基因型分布与北美和欧洲地区不同,有其自身的地区特异性,但菌株的产毒特性与其他地区相似,绝大部分均为毒素 A+B+。

参考文献

[1] Burnham CA, Carroll KC. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection: an ongoing conundrum for clinicians and for clinical laboratories[J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26(3): 604-630.

[2] 何英. 艰难梭菌相关性腹泻的实验室诊断[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(7): 837-840.

[3] Pepin J, Valiquette L, Alary ME, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity[J]. CMAJ, 2004, 171(1): 466-472.

[4] Warny M, Pepin J, Fang A, et al. Toxin production by an emerging strain of *clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in north america and Europe[J]. Lancet, 2005, 366(2): 1079-1084.

[5] Kuijper EJ, Coignard B, Tüll P, et al. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe[J]. Clin Microbiol Infect, 2006, 12 Suppl 6: 2-18.

[6] Killgore G, Thompson A, Johnson S, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2): 431-437.

[7] Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, et al. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile*

and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(2): 461-463.

[8] Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, et al. Multiplex pcr targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (toxin a), and *tcdB* (toxin b) genes for toxigenic culture of *clostridium difficile*[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(1): 5710-5714.

[9] Kato H, Kato N, Watanabe K, et al. Identification of toxin a-negative, toxin b-positive *clostridium difficile* by pcr[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(2): 2178-2182.

[10] Huber CA, Foster NF, Riley TV, et al. Challenges for standardization of *Clostridium difficile* typing methods[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(9): 2810-2814.

[11] He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile* [J]. Nat Genet, 2013, 45(1): 109-113.

[12] Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey[J]. Lancet, 2011, 377(9759): 63-73.

[13] Tenover FC, Akerlund T, Gerding DN, et al. Comparison of strain typing results for *Clostridium difficile* isolates from North America[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(5): 1831-1837.

[14] Collins DA, Hawkey PM, Riley TV. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2013, 2(1): 21.

[15] Ferguson JK, Cheng AC, Gilbert GL, et al. *Clostridium difficile* laboratory testing in Australia and New Zealand: national survey results and Australasian Society for Infectious Diseases recommendations for best practice[J]. Pathology, 2011, 43(1): 482-487.

[16] 罗珊. 艰难梭菌致病相关研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(19): 2575-2577.

[17] Drudy D, Fanning S, Kyne L. Toxin a-negative, toxin b-positive *clostridium difficile*[J]. Int J Infect Dis, 2007, 11(1): 5-10.

(收稿日期: 2014-11-08)

(上接第 792 页)

重要实验依据,在诊疗男性不育中具有重要意义。

参考文献

[1] 张伟伟, 卓胜楠, 张云山, 等. 男性不育患者卵裂期胚胎 Y 染色体微缺失检测分析[J]. 中国计划生育学杂志, 2013, 21(11): 746-749.

[2] Tiepolo L, Zuffardi O. localization of factors controlling Spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm[J]. Hum Genet, 1976, 34(2): 119-124.

[3] 杨卓, 徐丹菲, 张东红, 等. Y 染色体 AZFa 区域 sY84 位点基因多态性分析[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(11): 1036-1037.

[4] Voget PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. human Y chromosome azoospermia factor(AZF) mapped to different subregions in Yq11 [J]. Hum Mol Genet, 1996, 5(7): 933-943.

[5] Gatta V, Raicu F, Ferlin A, et al. Testis transcriptome analysis in male infertility: new insight on the pathogenesis of oligo-azoospermia in cases with without AZFc microdeletion[J]. BMC Genomics, 2010, 11(1): 401-410.

[6] Kim B, Lee Y, Kim Y, et al. Polymorphic expression of DAZ proteins in the human testis[J]. Human Reprod, 2009, 24(6): 1507-1515.

[7] 杨慧敏, 陈国武. 上海地区原发性男性不育患者 Y 染色体 AZF 微缺失分析[J]. 检验医学, 2012, 27(6): 479-481.

[8] 谭建强, 蔡稔. 柳州地区 530 例男性不育患者细胞遗传学与分子遗传学的分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2012, 20(1): 18-20.

[9] 郝胜菊, 冯暄, 闫有圣. 甘肃部分地区 373 例男性不育患者 Y 染色体 AZF 微缺失基因诊断的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(10): 43-45.

[10] Chang PL, Sauer MV, Brown S. Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons[J]. Hum Reprod, 1999, 14(11): 2689.

[11] 阮健, 贺小进, 吴欢, 等. 无精及严重少精症患者 Y 染色体微缺失分析[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(7): 702-704.

[12] 叶长灿, 江悦华, 王捷, 等. Y 染色体微缺失与男性无精少精的相关关系[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(4): 566-568.

(收稿日期: 2014-12-18)