

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2014.01.001

· 论 著 ·

中国部分地区艰难梭菌 PCR-核糖体分型及毒素基因多态性研究

王晶¹, 李春辉², 杜鹏程¹, 曹波¹, 陈晨¹, 卢金星¹, 李中杰¹, 余宏杰¹, 程颖¹

(1 中国疾病预防控制中心, 北京 102206; 2 中南大学湘雅医院, 湖南长沙 410008)

[摘要] 目的 了解中国部分地区艰难梭菌聚合酶链反应(PCR)-核糖体型别分布及其 A、B 毒素基因多态性, 为建立适宜中国的艰难梭菌分子检测和分子分型技术提供基础数据, 同时在基因水平上为艰难梭菌感染导致的复杂临床表现提供依据。方法 对中国 3 个城市(北京、广州、济南)分离的 64 株艰难梭菌临床株进行 PCR-核糖体分型, 并对不同型别的 26 株代表菌株的 A、B 毒素基因进行扩增测序。结果 64 株艰难梭菌中, 毒素基因型以 A+B+ 型(45 株, 70.31%) 为主, A-B+ 型 19 株(29.69%)。共存在 9 种 PCR-核糖体型别, 以 017 型(21 株, 32.81%) 为主要型别, 其次为 001 型(13 株, 20.31%)、012 型(11 株, 17.19%)。A-B+ 菌株中, 14 株(73.68%) 是 017 型, 1 株是 001 型。A、B 毒素基因呈现一定的多态性, 其中有 7 种 A 毒素序列型别(TSTA), 6 种 B 毒素序列型别(TSTB), 8 种 A、B 毒素序列型别组合(TSTG)。结论 我国部分地区的艰难梭菌可能以 PCR-核糖体 017 型为主, A、B 毒素基因在菌株间存在多态性, 且核糖体型别与毒素基因多态性间存在相对应的关联。应进一步扩大菌株数量和范围, 探寻适合我国的分子检测和分子分型方法, 从而帮助医院更好地预防和控制艰难梭菌感染。

[关键词] 艰难梭菌; 艰难梭状芽孢杆菌; 假膜性肠炎; 核糖体分型; A 毒素基因; B 毒素基因; 抗生素相关腹泻; 医院感染

[中图分类号] R378.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2014)01-0001-07

PCR ribotyping and toxin gene polymorphism of *Clostridium difficile* in China

WANG Jing¹, LI Chun-hui², DU Peng-cheng¹, CAO Bo¹, CHEN Chen¹, LU Jin-xing¹, LI Zhong-jie¹, YU Hong-jie¹, CHENG Ying¹ (1 Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2 Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective** To understand the distribution of PCR ribotypes and toxin gene polymorphism of *Clostridium difficile* (*C. difficile*) in some areas of China, provide the reference sequences for the establishment of appropriate molecular detection and typing methods, and support clinical decision for the complex *C. difficile* infections. **Methods** Sixty-four *C. difficile* isolates collected from 3 cities(Beijing, Guangzhou, Jinan) were performed PCR-ribotyping analysis. Among them, *tcdA* and *tcdB* of 26 representative strains were amplified and sequenced. **Results** Among 64 *C. difficile* isolates, 45(70.31%) were type A+B+, 19(29.69%) were type A-B+. Nine different PCR ribotypes were obtained. The top 3 ribotypes were 017(21 isolates, 32.81%), 001(13 isolates, 20.31%), and 012(11 isolates, 17.19%). Among A-B+ strains, 14(73.68%) were ribotype 017, 1 was ribotype 001. Toxin gene sequences showed polymorphism, there were 7 TSTA, 6 TSTB, and 8 TSTG. **Conclusion** The dominant Chinese ribotype may be 017, and toxin genes show certain polymorphism among strains, there is a corresponding relationship between PCR ribotypes and toxin gene polymorphism. Further study will be performed with expanding strains, so as to find appropriate molecular detection and molecular typing method, and help hospitals to prevent and

[收稿日期] 2013-09-20

[基金项目] 国家自然科学基金(No. 81101218)

[作者简介] 王晶(1987-), 女(汉族), 河北省保定市人, 硕士, 主要从事艰难梭菌分子分型研究。

[通信作者] 程颖 E-mail: chengying@chinacdc.cn

control *C. difficile* infection.

[Key words] *Clostridium difficile*; pseudomembranous colitis; ribotyping; *tcdA* gene; *tcdB* gene; antibiotic-associated diarrhea; healthcare-associated infection

[Chin Infect Control, 2014, 13(1): 1-7]

艰难梭菌是医院住院患者抗生素相关性腹泻的重要病因。由产毒素性艰难梭菌引起的感染(*Clostridium difficile* infection, CDI)以腹泻、结肠炎或罕见的肠梗阻为主要临床症状,乙状结肠镜下可见肠黏膜的炎性水肿和斑片假膜,重症患者死亡率高达 67%^[1-2]。该菌的主要传播形式是芽孢,其对多种抗菌药物和消毒剂有很强的抵抗力,可反复感染,复发率高达 20%^[3-4]。美国疾病预防控制中心(CDC)医院感染监测网络—国家医疗安全网络(NHSN)根据感染部位估计目前艰难梭菌引起的直接医疗成本为 10.1 亿~16.2 亿美元。因此,美国对艰难梭菌开展了专项监测,为有针对性的预防工作提供依据。同时欧盟也设立了艰难梭菌监测网络,2008 年该监测网络对 34 个国家 106 所医院进行了 CDI 流行病学调查,结果显示,欧洲治疗 CDI 大约每年花费 3 亿欧元,且患者中 65 岁以上人群占 63%^[5]。目前控制 CDI 的首要措施是合理使用抗菌药物,传统的药物为甲硝唑和万古霉素^[6]。但这两种药物使用后,20%~25% 的 CDI 患者会复发^[7]。自 2011 年美国 FDA 批准非达霉素作为治疗 CDI 的新药之后,非达霉素成为 CDI 领域的研究新热点^[8]。

前期我们研究组针对已经公布的不同来源的艰难梭菌 A、B 毒素进行了单核苷酸的多态性(SNP)分析,结果显示,不同菌株 A、B 毒素基因之间存在高变性^[9]。同时艰难梭菌的生物信息学分析表明,该菌基因组序列的分歧度很大,这些直接导致艰难梭菌不同的致病力和临床表现,对 CDI 的流行病学监测造成影响。因此,有必要对我国艰难梭菌 A、B 毒素基因多态性进行研究,探寻不同聚合酶链反应(PCR)-核糖体型别的艰难梭菌 A、B 毒素多态性存在的规律,为建立适宜我国艰难梭菌产毒株的分子检测和分型方法的改进提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及分离培养与鉴定 选取我国 3 个城市(北京、济南、广州)分离的具有代表性的 64 株艰难梭菌临床株,其中北京 46 株,分离自 2010—

2011 年;济南 9 株,分离自 2010—2012 年;广州 9 株,分离自 20 世纪 80 年代。其中 BJ08 是北京分离的第 1 株 A-B+ 株。另外,有 1 株参考菌株, VPI 10463(早期出现的 A+B+ 株)。

转运拭子挑取粪便样本,运输至实验室。接种环挑取粪便样本接种于环丝氨酸—头孢西丁—果糖—卵黄琼脂(cycloserine-cefoxitin-fructose-egg yolk agar, CCFA)培养基,37℃ 厌氧培养 48~72 h; CCFA 培养基上挑取典型的单个疑似菌落(扁平黄色毛玻璃样,特殊马粪臭味,光镜下革兰染色阳性杆菌,近终端有芽孢)接种于脑心浸液琼脂(brain heart infusion agar, BHI)培养基,37℃ 厌氧培养 48 h;进行乳胶凝集、脯氨酸纸片法、REF203001apiR 20A 反应 3 类生化鉴定,初步鉴定是否为艰难梭菌。将初步鉴定阳性的艰难梭菌单个菌落接种于 BHI 培养基上,厌氧过夜培养,按照 DNA 提取试剂盒说明提取 DNA,用 GDH、16S rDNA 基因分别扩增(表 1),均阳性者为艰难梭菌。

1.2 DNA 提取和毒素基因检测 接种艰难梭菌单菌落于 BHI 血平板上(固体培养基),培养过夜,按照 DNA 提取试剂盒说明提取 DNA,溶于 TE, -20℃ 保存。

采用目前国际上艰难梭菌参比实验室(荷兰)推荐的检测艰难梭菌 A、B 毒素基因的 PCR 方案,分别选用 *tcdA-F/tcdA-R* 和 NK104/NK105 进行扩增^[10]。PCR 反应体系为 50 μL: TAKARA Premix Taq 酶 25 μL, dd H₂O 20 μL, 上、下游引物(25 pmol/μL)各 1 μL, DNA 模板(20~80 ng/μL) 3 μL。反应条件:*tcdA* 扩增 95℃ 15 min; 94℃ 30 s, 52℃ 30 s, 72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 5 min; *tcdB* 扩增 95℃ 5 min; 95℃ 20 s, 62℃ 120 s, 72℃ 40 s, 35 个循环; 72℃ 5 min。将 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶 110 V 电泳 30 min。在凝胶成像仪上观察结果并将扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司—北京测序部进行 Sanger 测序。

1.3 PCR-核糖体分型 PCR-核糖体分型(PCR ribotyping)是基于 16S~23S rDNA 基因间隔区(intergenic spacer, ITS)进行 PCR 扩增来分型的。该部分实验是在荷兰艰难梭菌参比实验室完成。按照

O'Neill 方法进行扩增(引物见表 1)。PCR 反应体系 50 μL :Premix 25 μL , H₂O 20 μL , 上、下游引物 16S/23S 各 1 μL , DNA 模板 3 μL 。反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 120 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。将 PCR 产物用 3% 的琼脂糖凝胶 200 V 电泳 3 h,在凝胶成像仪上观察结果。

1.4 *tcdA* 和 *tcdB* sanger 测序和序列分析 挑选不同种核糖体型别的代表性菌株 26 株,利用 ABI3730 对其基因组 *tcdA* 和 *tcdB* 区域开展测序工作。参考艰难梭菌 630 (A+B+ 菌株代表)和艰难梭菌 M68 (A-B+ 菌株代表)为基因组序列,自行设计引物。用 Primer Premier v 5.0 分别设计 9 对和 8 对引物(表 1),使得扩增产物覆盖 *tcdA* 和 *tcdB* 全长,每个扩增产物大约 700~1 800 bp,且相邻扩增产物间有 200 \pm bp 重叠,以保证所得序列的连贯性和可重复性。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司—北京测序部合成(见表 1)。反应体系 50 μL :TAKARA Premix Taq 酶 25 μL , dd H₂O 20 μL ,上、下游引物(25 pmol/ μL)各 1 μL ,DNA(20~80 ng/ μL)3 μL 。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, X $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 120 s,34 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。其中的退火温度(X)因引物的 T_m 值不同而不同,通常在 50 $^{\circ}\text{C}$ ~55 $^{\circ}\text{C}$ 。纯化后的 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司—北京测序部,用 BigDye-terminator 测序试剂盒上样于 3730 XL DNA 分析仪上,上、下游引物双向进行 Sanger 测序。

用 DNASTAR Larsergen version 7.1 软件中的 seqman 对同一株基因的不同扩增片段进行组装拼接,以艰难梭菌 630 和 M68 为模板确定样本菌株基因序列的起始和终止位点。用 MUSCLE(v3.6)对 A、B 序列进行多重比对,perl 脚本统计两两间相似度和碱基差异数,碱基完全相同为同一型别。

2 结果

2.1 A、B 毒素检测 对 *tcdA*、*tcdB* 检测位点进行 PCR 并测序,将得到的序列通过 BLAST 与标准序列进行比对,证实入选菌株均为产毒素型艰难梭菌。毒素基因 *tcdA*、*tcdB* 的扩增结果:*tcdA* 基因扩增得到 369 bp 产物为 *tcdA* 基因阳性菌株(A+),扩增得到的 110 bp 产物为 *tcdA* 基因阴性(A-)菌株(见图 1);*tcdB* 基因阳性菌株(B+)扩增得到 203 bp 的产物(见图 2)。在分离到的 64 株艰难梭菌中,

毒素型以 A+B+ 型(45 株,70.31%)为主,A-B+ 型 19 株(29.69%)。

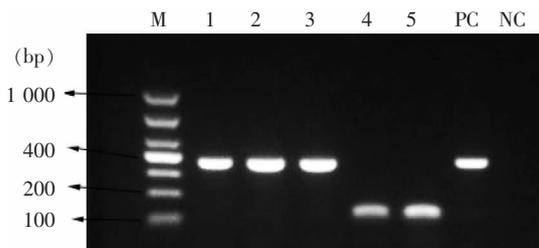
表 1 扩增引物

Table 1 Primers for amplification

Gene	Primer	sequence(5'→3')	
GDH	F	TTCTAATTTAGCAGCAGCTTC	
	R	GTCTTGATGGTTGATGAGTAC	
16S rDNA	PS13	GGAGGCAGCAGTGGGGAATA	
	PS14	TGACGGCGGTGTGTACAAG	
<i>tcdA</i>	AF	AGATTCCTATATTTACATGACAATAT	
	AR	GTATCAGGCATAAAGTAATATA CTTT	
<i>tcdB</i>	NK104	GTGTAGCAATGAA-AGTCCAA GTTTACGC	
	NK105	CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT	
16S	P3	CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG	
23S	P5	GCGCCCTTTGTAGCTTGACC	
<i>tcdA</i>	A1F	AGATGGTGCATGGTCAGTTG	
	A1R	CATTTCCCAACGGTCTAGTC	
	A2F	AATAGAGATGAAACTTTATT	
	A2R	CATCTCCTTGTAACTGTATG	
	A3F	AACAAAAATAGCACCATACT	
	A3R	TAACACTTGCATCAAGTAAT	
	A4F	AAGCAACATGCAATTTATTT	
	A4R	CCACTGAAGTTGCCTTATCA	
	A5F	TAAATGTACTACCTACAATAACAGAGGG	
	A5R	CTTGTATATAAATCAGGTGCTATCAATA	
	A6F	CTTGGATATGTAGAATTTAT	
	A6R	AATCCTAAATGATCTCTATC	
	A7F	TATTGATAGCACCTGATTTATATACAAG	
	A7R	AGTTGAGGCTATGAAAGTGT	
	A8F	GACCTAATGGATTGAGTAT	
	A8R	AATTTATTTTGGTAAAGTAT	
	A9F	CACTTTCATAGCCTCAACTG	
	A9R	GATGGTATGAGGTGCAAAAT	
	<i>tcdB</i>	B1F	GGATATTTCTGATAGAGAAAT
		B1R	TCACTATTTACATCTTTT
		B2F	GAAGAATATCATAATATGTC
		B2R	TTAATCTTAGGTCTATCAGA
		B3F	TTACAAGGAGATAAAAATTAG
		B3R	TACTAACTTACCATTTACAG
B4F		GAATTTAAACTAATAGAATC	
B4R		TCTTCTTTTGTACTTCCAA	
B5F		TACTTTTAGTTCCCTTAGCA	
B5R		TCAGATACAAATAAACCTTC	
B6F		GTTGATTTATTATCTAAATC	
B6R		GTAATAAATACACCTGTTTG	
B7F		TAATAACTTTGGAATGATGG	
B7R		TCACTTTCATTTCCATATC	
B8F		GGAAATGAAGAAGGTGAAG	
B8R		ACTTTGTAAGAATGTCAACT	

2.2 PCR-核糖体分型 对收集的 64 株菌株用 PCR-核糖体分型方法进行分型,得到 9 种核糖体型别,其中,核糖体 017 型(21 株,32.81%)为主要型别,其次为 001 型(13 株,20.31%)、012 型(11 株,17.19%)、046 型(6 株,9.38%)、014 型(4 株,

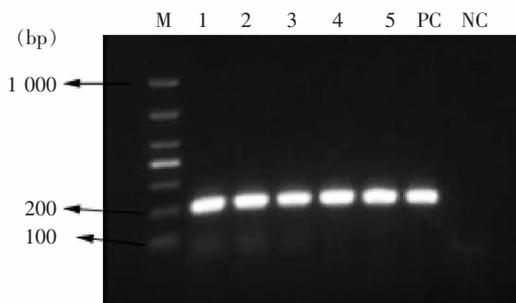
6.25%)、002 型 (4 株, 6.25%)、053 型 (2 株, 3.13%)、103 型 (2 株, 3.13%)、207 型 (1 株, 1.55%)。A-B+ 菌株中, 14 株 (73.68%) 是 017 型, 1 株为 001 型。



M: 1 000 bp DNA ladder marker; PC: Positive control VPI10463; NC: Negative control; 1—3: *tcdA* positive; 4—5: *tcdA* negative

图 1 *tcdA* 基因 PCR 扩增结果

Figure 1 PCR amplification of *tcdA* gene



M: 1 000 bp DNA ladder marker; PC: Positive control VPI10463; NC: Negative control; 1—5: *tcdB* positive

图 2 *tcdB* 基因 PCR 扩增结果

Figure 2 PCR amplification of *tcdB* gene

2.3 A、B 毒素序列型别及其与 PCR-核糖体型别的关系 以 VPI10463 的 A、B 基因序列为参考序列(A01、B01), 将不同核糖体型别代表菌株的 A、B

毒素序列与 VPI10463 进行比较, 根据碱基差异数量对序列进行序列型别编号, 见表 2。所得 26 个 *tcdA* 序列形成了 7 种 A 毒素序列型别 (toxin sequence type A, TSTA), 即 TSTA A02—A08, 其中 A02—A07 是 A+B+ 菌株, 序列长度为 8 133 bp, A08 是 A-B+ 菌株, 存在 1 823 bp 的碱基缺失; 26 个 *tcdB* 序列形成了 6 种 B 毒素序列型别 (toxin sequence type B, TSTB), 即 TSTB B02—B07, 其中 B02—B06 是 A+B+ 菌株, 序列长度为 7 101 bp, B07 A-B+ 菌株为 7 104 bp。将菌株的 A、B 毒素序列进行组合, 得到 8 种序列组合 (toxin sequence type group, TSTG), 即 A02B04、A03B05、A03B06、A04B05、A05B05、A06B02、A07B03、A08B07。A、B 毒素序列组合 (TSTG) 与 PCR-核糖体型别的关系见表 3。9 种 PCR-核糖体型别中, 017 型分布在 3 种不同的 TSTG, 其余 8 种型别与特定 TSTG 一一对应; 8 种 TSTG 中, 有 3 种 (A03B05、A05B05、A06B02) 每种对应 2 种核糖体型别, 其余 5 种与 1 种核糖体型别一一对应。同时以 VPI10463 的 *tcdA* (A01) 和 *tcdB* (B01) 为参照, 分别将 A、B 整条基因序列从 5' 端至 3' 端分成 4 个区域: 葡糖基转移酶区、蛋白酶自主合成区、传送区、受体结合区^[11]。根据 A 基因 4 个不同分区单核苷酸的多态性 (SNP) 分布, 发现 SNP 主要发生在传送区和受体结合区, 且受体结合区非同义突变的 SNP 更高, 说明该区经历着过激烈的正进化选择压力。B 基因 4 个分区 SNP 的分布显示, SNP 主要发生在葡糖基转移酶区和受体结合区两个区域, 表示该两区经历着过激烈的正进化选择压力。其中 A08 为缺失 3' 端 1 823 bp 序列, 与其他型别序列差异最大; B07 与其他 B 毒素基因型别差异最大, 而 A08B07 正是核糖体 017 型中 A-B+ 菌株。

表 2 代表菌株与 VPI10463 A、B 毒素序列的比较

Table 2 Comparison in *tcdA* and *tcdB* between representative strains and VPI10463

Ribotyping	Representative strain	Toxin genotyping	TSTA	Length (bp)	TSTB	Length (bp)	<i>tcdA</i> compares with VPI10463	<i>tcdB</i> compares with VPI10463
87	VPI10463	A+B+	A01	8 133	B01	7 101	0	0
17	BJ08	A-B+	A08	6 310	B07	7 104	1 982	366
	GZ7	A+B+	A05	8 133	B05	7 101	12	2
	ZR30	A+B+	A06	8 133	B02	7 101	12	1
1	JN12	A+B+	A04	8 133	B05	7 101	10	2
12	ZR20	A+B+	A06	8 133	B02	7 101	12	1
46	ZR80	A+B+	A02	8 133	B04	7 101	4	2
14	GZ5	A+B+	A05	8 133	B05	7 101	12	2
2	ZR75	A+B+	A03	8 133	B05	7 101	9	2

续表 2 (Table 2, continued)

Ribotyping	Representative strain	Toxin genotyping	TSTA	Length (bp)	TSTB	Length (bp)	<i>tcdA</i> compares with VPI10463	<i>tcdB</i> compares with VPI10463
53	ZR81	A + B +	A03	8 133	B05	7 101	9	2
103	ZR50	A + B +	A07	8 133	B03	7 101	13	1
207	ZR2	A + B +	A03	8 133	B06	7 101	9	6

BJ; Beijing; ZR; China-Japan Friendship Hospital; JN; Jinan; GZ; Guangzhou

表 3 A、B 基因序列组合与 PCR-核糖体分型的关系

Table 3 Correlation of TSTG and PCR-ribotype

PCR-ribotype	No. of strains	No. of strains belonging to the following TST							
		A02B04	A03B05	A03B06	A04B05	A05B05	A06B02	A07B03	A08B07
001	9	-	-	-	9	-	-	-	-
002	1	-	1	-	-	-	-	-	-
012	2	-	-	-	-	-	2	-	-
014	1	-	-	-	-	1	-	-	-
017	9	-	-	-	-	1	1	-	7
046	1	1	-	-	-	-	-	-	-
053	1	-	1	-	-	-	-	-	-
103	1	-	-	-	-	-	-	1	-
207	1	-	-	1	-	-	-	-	-

3 讨论

自 1978 年 Bartlett 等发现艰难梭菌是引起抗生素相关性腹泻的主要病原菌以来,其在海外得到广泛研究^[12]。最新数据显示,艰难梭菌在医院感染相关病原中排名第 1 位,超过了耐甲氧西林金黄色葡萄球菌^[13]。加拿大医院感染中心估计,世界范围内成人 CDI 发病率目前呈增加趋势(4.6/1 000 例入院患者,或 65/100 000 患者住院日)^[14]。然而,由于艰难梭菌培养要求高,厌氧设备昂贵,我国大部分医院未开展艰难梭菌的检测,导致长期以来我国对艰难梭菌的研究难以开展,目前尚未形成 CDI 的流行病学基础数据。但我国是抗菌药物消耗大国,抗菌药物滥用情况非常严重,细菌整体的耐药率远远高于发达国家^[15],而 CDI 正是由于抗菌药物滥用而引发的感染。因此,可以推测我国医院艰难梭菌感染状况是不容乐观的。我们前期一些研究表明,艰难梭菌 A、B 毒素基因之间存在高度多态性,并且发现不同国家和地区检测艰难梭菌 A、B 毒素的 PCR 引物间也存在一定的差异,引物位置处存在 SNP,可能造成检测时出现假阴性的结果^[9]。根据本研究对 A、B 毒素基因多态性的分析结果,提示我们可以避开 SNP 密集的区域,如 A 基因的受体结合区,B 基因的葡糖基转移酶区和受体结合区,而在相对保守的区域,比如 A 基因的葡糖基转移酶区和蛋白酶自主合成区,B 基因的蛋白酶自主合成区和传送区,

设计艰难梭菌的检测引物,减少假阴性率,提高检出率。另外,有报道^[16-18]显示,A - B + 菌株在拉丁美洲、北美洲、亚洲等国家的分离率为 2.5%~75%,存在明显的地区差异,亚洲 A - B + 菌株分离率明显高于欧美国家;同时,核糖体型别也存在地区特异性,高毒株 027 型在欧洲广泛引起暴发,亚洲报道少见,在我国尚未见报道;核糖体 017 型在全球多个国家和地区均有报道,如欧洲的瑞典、德国,亚洲的日本、韩国及我国香港。根据中南大学湘雅医院和伯明翰大学在长沙一所大型医院关于 CDI 的最新研究显示,主要流行株为核糖体 017 型,占到 48%^[19],而本研究发现核糖体 017 型 A、B 毒素序列多态性更高。面对这些现状,医院应该进一步加强对艰难梭菌的监测和流行病学研究,这就需要有适合我国艰难梭菌的检测技术和分子分型方法。艰难梭菌感染的主要致病因子是肠毒素 A(*tcdA*)和细胞毒素 B(*tcdB*),A、B 毒素常用来作为艰难梭菌的检测靶点和分型依据,是目前艰难梭菌的研究热点之一^[11]。由此可见,对我国艰难梭菌 A、B 毒素基因多态性的研究是非常有必要的。

分子分型是监测艰难梭菌感染和暴发必不可少的工具。艰难梭菌的各种分型方法各有优缺点,但在全球尚未达成统一。目前来看,PCR-核糖体分型方法较简单,对设备要求也不高,是欧洲艰难梭菌分型的主要方法,且建立了可参照对比的 160 个 PCR 核糖体的文库^[20]。但由于结果分析需要参比菌株,

使得该分型方法在我国使用受限。本研究将 PCR-核糖体分型与 A、B 基因结合起来, 尝试寻找两者间的内在联系。研究发现, 64 株艰难梭菌中, A-B+ 菌株所占比率达到 29.69%, 核糖体 017 型为主要型别(32.81%); 同时 A、B 毒素基因序列呈现高度多态性, 且 A、B 毒素序列的多态性与核糖体型别间也存在一定的对应关系。比如, 根据本实验数据, 9 种 PCR-核糖体型别中有 8 种与 1 种 TSTG 一一对应, 但核糖体 017 型 A、B 毒素序列呈现了更高的多态性, 分布在 3 种 TSTG 中(A05B05、A06B02、A08B07); 8 种 TSTG 中, A03B05、A05B05、A06B02 分别分布在 2 种核糖体型别中, 其余 5 种只与 1 种核糖体型别一一对应。这提示我们可能通过建立一种基于 A、B 序列多态性的分型方法, 而该分型方法结果能与 PCR-核糖体分型结果相对应, 那么我们新建立的分型方法就可能替代核糖体分型。A、B 毒素的多态性不仅影响毒素分子学特征, 而且在疾病中也扮演重要角色, 即可能导致不同的致病能力和引起不同的临床表现。因此, 本研究也为临床上诊断和治疗 CDI 在基因水平上提供了依据。本研究的限制在于菌株来源只有 3 个地区, 且每种核糖体型别中测序菌株的数量有限, 应扩大菌株数量和地区来源作进一步的研究, 并结合 SNP 生物信息学分析, 为建立适宜我国的艰难梭菌临床分子检测和分子分型技术提供依据。

艰难梭菌感染在我国医院可能是很严重却被忽视的一个重大问题。研究提示, 医院应进一步增强意识, 对艰难梭菌广泛开展检测并进行研究, 形成我国艰难梭菌感染的流行病学基础数据。预防和控制 CDI 的首要措施是合理使用抗菌药物。同时, 可以对大型医院和高危人群进行定期监测, 发现和了解艰难梭菌的流行病学变化和变异趋势。这样可以为临床的诊疗提供新途径, 从而帮助医院更好地预防和控制 CDI。

[参考文献]

[1] Vaishnavi C. Established and potential risk factors for *Clostridium difficile* infection [J]. Indian J Med Microbiol, 2009, 27(4): 289-300.

[2] Chan S, Kelly M, Helme S, et al. Outcomes following colectomy for *Clostridium difficile* colitis [J]. Int J Surg, 2009, 7(1): 78-81.

[3] Fimlaid K A, Bond J P, Schutz K C, et al. Global analysis of the sporulation pathway of *Clostridium difficile* [J]. PLoS

Genet, 2013, 9(8): e1003660.

- [4] Jung K S, Park J J, Chon Y E, et al. Risk factors for treatment failure and recurrence after metronidazole treatment for *Clostridium difficile*-associated diarrhea [J]. Gut Liver, 2010, 4(3): 332-337.
- [5] 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.
- [6] Cohen S H, Gerding D N, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA) [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2010, 31(5): 431-455.
- [7] Kelly C P, Lamont J T. *Clostridium difficile*-more difficult than ever [J]. N Engl J Med, 2008, 359(18): 1932-1940.
- [8] Cornely O A, Crook D W, Esposito R, et al. Fidaxomicin versus vancomycin for infection with *Clostridium difficile* in Europe, Canada, and the USA: a double-blind, non-inferiority, randomised controlled trial [J]. Lancet Infect Dis, 2012, 12(4): 281-289.
- [9] Cheng Y, Du P, Chen C, et al. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* infection diagnosed by polymerase chain reaction [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011, 32(5): 520-522.
- [10] 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(8): 2178-2182.
- [11] Pruitt R N, Chambers M G, Ng K K, et al. Structural organization of the functional domains of *Clostridium difficile* toxins A and B [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(30): 13467-13472.
- [12] Cohen S H, Gerding D N, Johnson S, et al. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing *Clostridia* [J]. N Engl J Med, 1978, 298(10): 531-534.
- [13] Miller B A, Chen L F, Sexton D J, et al. Comparison of the burdens of hospital-onset, healthcare facility-associated *Clostridium difficile* infection and of healthcare-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community hospitals [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011, 32(4): 387-390.
- [14] Khanna S, Pardi D S. The growing incidence and severity of *Clostridium difficile* infection in inpatient and outpatient settings [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2010, 4(4): 409-416.
- [15] 胡燕, 白继庚, 胡先明, 等. 我国抗生素滥用现状、原因及对策探讨 [J]. 中国社会医学杂志, 2013, 30(2): 128-130.
- [16] Collins D A, Hawkey P M, Riley T V. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia [J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2013, 2(1): 21.
- [17] Akerlund T, Alefjord I, Dohnhammar U, et al. Geographical clustering of cases of infection with moxifloxacin-resistant *Clostridium difficile* PCR-ribotypes 012, 017 and 046 in

Sweden, 2008 and 2009 [J]. Euro Surveill, 2011, 16(10), pii:19813.

[18] Arvand M, Hauri A M, Zaiss N H, et al. *Clostridium difficile* ribotypes 001, 017, and 027 are associated with lethal *C. difficile* infection in Hesse, Germany [J]. Euro Surveill, 2009, 14(45), pii:19403.

[19] Hawkey P M, Marriott C, Liu W E, et al. Molecular epidemi-

ology of *Clostridium difficile* infection in a major Chinese hospital; an underrecognized problem in Asia? [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(10): 3308 - 3313.

[20] Kuijper E J, van den Berg R J, Brazier J S. Comparison of molecular typing methods applied to *Clostridium difficile* [J]. Methods Mol Biol, 2009, 551:159 - 171.

· 学术动态 ·

一项中断时间序列研究与集群随机试验:减少耐药细菌在重症监护室中定植和传播的干预措施

曾 翠 译, 吴安华 校

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

背景 重症监护室(ICU)是耐药细菌传播的高危科室,在设置标准预防措施时缺乏对“全面筛查和隔离携带或感染耐药细菌者”效果评估的对照研究,本研究评估此干预措施对减少 ICU 中耐药细菌的定植与传播的效果。

方法 本研究在欧洲的 13 个 ICU 分 3 个阶段进行。第 1 阶段为为期 6 个月的基线调查;第 2 阶段为中断时间序列的研究,为期 6 个月,用于推进洗必泰的身体擦浴与手卫生依从性;紧随其后的第 3 阶段为为期 12~15 个月的集群随机试验。第 3 阶段,用计算机将 13 个 ICU 随机分组,对所有患者进行常规筛查[显色培养法筛查耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐万古霉素肠球菌(VRE)]或快速筛查[PCR 法筛查 MRSA、VRE 及显色培养法筛查高耐药的肠杆菌科细菌(HRE,对第三代或第四代头孢菌素耐药的肠杆菌科细菌)]。所有患者入 ICU 时需进行第 1 次筛查,此后前 3 周每周筛查 2 次,3 周后每周筛查 1 次;采集部位包括会阴、鼻腔及伤口(若有)处。入住 ICU 超过 3 d 的患者纳入研究并收集基本信息(人口统计学资料、病情与病史、感染/定植危险因素);对于已确定的耐药细菌携带(感染)者实施标准预防措施。研究目的主要为获得不同研究阶段患者在每 100 住院日中的耐药菌感染率及变化趋势。耐药菌每 100 住院日感染率通过微生物监测获得,并用多级泊松分层回归模型分析,用似然比检验不同筛查组的每 100 住院日中的耐药菌感染率的阶段变化和变化趋势。

结果 13 个 ICU 中,7 个被分配进行快速筛查,6 个进行常规筛查。各阶段平均手卫生执行率依次为 52%、69%、77%,随研究进展有所提高。在第 2 阶段初期,接受洗必泰擦浴的患者比率已从 0% 上升至 100%,并维持到第 3 阶段结束。趋势变化中,各阶段耐药菌周发病率比(weekly incidence rate ratio, IRR)依次为 1.014 (0.996~1.031)、0.976 (0.954~0.999)、1.015 (0.998~1.998)。第 2 阶段耐药菌周 IRR 的下降主要是由于 MRSA 的减少(周 IRR 为 0.925,95% 可信区间为 0.890~0.962)。阶段变化中,第 2、3 阶段耐药菌周 IRR 为 0.955 (0.676~1.676)、0.634 (0.349~1.349)。常规筛查组检出的每 100 住院日耐药菌感染率略低于快速筛查组,但差异无统计学意义 ($P=0.06$)。

讨论 改善手卫生与推行洗必泰身体擦浴可减少每 100 住院日耐药菌感染率,特别是 MRSA 感染率。在持续高依从性的手卫生和洗必泰擦浴情况下,无论采用何种筛查方式(快速筛查或常规筛查),全面筛查和隔离多重耐药菌携带者将不会降低每 100 住院日耐药菌感染率。

摘译自:Derde L P G, Cooper B S, Goossens H, et al. Interventions to reduce colonisation and transmission of antimicrobial-resistant bacteria in intensive care units: an interrupted time series study and cluster randomised trial[J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(1): 31 - 39.