

DOI: 10. 3969/j. issn. 1671-9638. 2014. 02. 001

· 论 著 ·

## 中美艰难梭菌 A - B + 株毒力编码区域转录及 B 毒素表达的研究

李先平, 李文革, 王 晶, 卢金星

(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206)

**[摘要]** **目的** 研究中国艰难梭菌 A - B + 型分离株 BJ08 和美国艰难梭菌 A - B + 型暴发流行株 US1 的毒力编码区域 PaLoc 各基因转录及 B 毒素的表达, 为预防和控制中国可能暴发的艰难梭菌感染提供理论支持。**方法** 每隔 3 h 提取 BJ08 与 US1 艰难梭菌和培养上清, 用荧光定量聚合酶链反应(PCR)法测定各时间段两菌株毒力编码区域 PaLoc 各基因(*tcdA*、*tcdB*、*tcdC*、*tcdR*、*tcdE*)的表达; 用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测 BJ08 和 US1 各时间段的细胞和培养液上清中 B 毒素的含量。**结果** US1 的生长速率稍快于 BJ08, 衰退速率显著快于 BJ08( $P < 0.05$ ); 它们都不表达 A 毒素, 但是都检测到 *tcdA* 基因的转录, 而且 *tcdA* 转录没有明显差异。BJ08 的 *tcdB*、*tcdC* 和 *tcdE* 基因的转录要比 US1 早 3 h。B 毒素在两种菌株的胞内和胞外合成或分泌没有明显差异。**结论** 中国艰难梭菌 A - B + 型高分离株 BJ08 与美国艰难梭菌 A - B + 型暴发流行株 US1 相比, 有相似的毒力表达或更强的基因调控能力, 要警惕中国艰难梭菌 BJ08 暴发流行的可能。

**[关键词]** 艰难梭菌; 毒力编码区; PaLoc; B 毒素; 抗生素相关腹泻; 假膜性肠炎; 医院感染

**[中图分类号]** R378.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2014)02-0065-06

## Comparison of transcriptions of pathogenicity locus genes and expressions of toxin B of A - B + *Clostridium difficile* between China and the United States

LI Xian-ping, LI Wen-ge, WANG Jing, LU Jin-xing (State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

**[Abstract]** **Objective** To study gene transcriptions of pathogenicity locus (PaLoc) and toxin B expressions of A - B + *Clostridium difficile* (*C. difficile*) strain BJ08 isolated in China and strain US1 isolated in *C. difficile* infection outbreak regions in the United States, and provide theoretical support for prevention and control of possible outbreak of *C. difficile* infection in China. **Methods** Cells and supernatants of *C. difficile* were collected every 3 hours, gene expressions of PaLoc domain, including *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR* and *tcdE* genes, were detected by real-time polymerase chain reaction (PCR), the expressions of toxin B in cells and supernatants were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The growth rate of strain US1 was slightly faster than that of BJ08, and the degradation rate of US1 was significantly faster than that of BJ08 ( $P < 0.05$ ); No toxin A was detected but mRNA of *tcdA* were detected in both BJ08 and US1, and there was no significant difference in *tcdA* expression between BJ08 and US1. The transcriptions of *tcdB*, *tcdC* and *tcdE* of BJ08 were 3 hours earlier than those of US1. There was no significant difference in the production of toxin B in supernatants and cells between strain BJ08 and US1. **Conclusion** Compared with US1, there is similar virulence or stronger gene regulation of BJ08, possible outbreak of *C. difficile* infection in China should be alerted.

**[收稿日期]** 2013-11-05

**[基金项目]** 国家科技支撑计划课题 (2012BAI11B05)

十二五国家科技重大专项课题 (2013ZX10004221)

**[作者简介]** 李先平 (1975-), 男 (汉族), 山东省临沂市人, 助理研究员, 主要从事厌氧菌致病机制研究。

**[通信作者]** 卢金星 E-mail: lujinxing@icdc.cn

[Key words] *Clostridium difficile*; pathogenicity locus; toxin B; antibiotic-associated diarrhea; pseudomembrane colitis; healthcare-associated infection

[Chin Infect Control, 2014, 13(2): 65-70]

艰难梭菌是革兰阳性厌氧产孢梭菌。自从 BI/NAP1/027 型高毒株出现后,发生过多次艰难梭菌感染暴发流行, BI/NAP1/027 型高毒株(A+B+) 一度成为研究艰难梭菌的热点<sup>[1-2]</sup>。近年来, A-B+ 型艰难梭菌引起的艰难梭菌感染暴发流行相继被报道<sup>[3-4]</sup>, 对 A-B+ 型艰难梭菌的研究逐渐成为艰难梭菌新的研究热点。艰难梭菌能引起很多疾病, 从轻度的腹泻到致命的假膜性肠炎, 而且 95% 的抗生素相关的假膜性肠炎与艰难梭菌有关。

产毒艰难梭菌含有毒力编码区域——PaLoc (pathogenicity locus) 区域。A+B+ 型艰难梭菌的 PaLoc 区域是 19.6 kb 的一个编码区域, A-B+ 型艰难梭菌的 PaLoc 区域由于 *tcdA* 基因存在不同程度的缺失, 所以要短很多。A-B+ 型的 *tcdA* 3' 末端一般有 1.8 kb 的缺失, 有些甚至有 6 kb 的缺失。本研究中 BJ08 和 US1 的 *tcdA* 3' 末端有 1.8 kb 的缺失。A-B+ 型艰难梭菌的 PaLoc 区域包括毒力编码基因 *tcdA*、*tcdB* 以及毒力调控基因 *tcdR*、*tcdC* 和 *tcdE* 5 个基因。其中, *tcdA* 基因由于存在不同程度的缺失, 不能编码 A 毒素; *tcdB* 基因编码 270 kD 的 B 毒素。本研究中, 我们研究和比较了中国高分离株 BJ08 和美国艰难梭菌暴发流行株 US1 在生长速率和毒力编码区域 PaLoc 各基因转录及 B 毒素表达的差异。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验设备及试剂 厌氧罐及充气装置 MARK II (荷兰 Mark II); Cary 50Bio 紫外线可见分光光度计(美国 Varian); 台式高速冷冻离心机(德国 Sigma); 超声波细胞破碎仪(德国 Bandelin); BioTek 酶标仪(美国 BioTek); ABI 7500 Fast 荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(美国 ABI)。细菌总 RNA 提取试剂盒、Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒和 Super Real 荧光定量预混试剂 SYBR Green, 均购自中国天根生化科技有限公司; 艰难梭菌 A/B 毒素酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(加拿大 HCB)。

1.1.2 实验菌株 菌株 BJ08 是本科室从中日友好

医院分离的艰难梭菌 A-B+ 株; 菌株 US1 是美国从艰难梭菌感染暴发区域分离的 A-B+ 株(美国 Tufts 大学冯汉平博士赠送)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 菌落生长曲线、菌落计数及其样本处理 将保存的菌株 BJ08、US1 接种于 CCFA 筛选平板, 厌氧 37℃ 培养 48 h 后, 挑选单菌落接种于预还原的 5 mL BHI 液体培养基, 180 r/min 震荡培养 24 h, 再取 10 μL 接种于预还原的 5 mL BHI 液体培养基 180 r/min 震荡培养 12 h。取一定量的菌液接种于 250 mL 预还原的 BHI 液体培养基, 使其含菌量达到  $3 \times 10^6$  CFU/mL。37℃ 厌氧环境下 180 r/min 震荡培养, 每隔 3 h, 取 1 mL 菌液用紫外线分光光度计测量 600 nm 下的 OD 值, 直到培养的第 30 小时<sup>[5]</sup>; 同时取 1 mL 菌液梯度稀释, 取 100 μL 涂布于 BHI 血平板, 37℃ 培养 24 h, 菌落计数。同时根据细菌含量取 5~20 mL 不等的菌液, 5 000 r/min 离心 10 min, 取 500 μL 上清, -20℃ 保存, 用于 B 毒素的测定。细菌沉淀物平均分成两部分: 一部分 -20℃ 保存, 用于 B 毒素的测定; 另一部分 -80℃ 保存, 用于提取 RNA, 进行 *tcdA*、*tcdB*、*tcdC*、*tcdR* 及 *tcdE* mRNA 的测定。

1.2.2 荧光定量 PCR 从 -80℃ 冰箱取出保存的细菌沉淀, PBS 洗涤 2 次, 根据菌落计数, 调整其细菌含量, 使每份样本含有  $1 \times 10^7$  CFU 艰难梭菌。然后根据天根细菌总 RNA 提取试剂盒说明书进行 RNA 的提取。取一定量的总 RNA 进行逆转录反应, 然后进行荧光定量 PCR, 各基因的引物见表 1。16S 为内参, 反应体系为 20 μL, 具体为:  $2 \times$  Super-Real PreMix Plus 10 μL; 正、反向引物(20 μmol/L) 各 0.5 μL; cDNA 模板 2 μL;  $50 \times$  ROX 0.4 μL; 无 RNA 酶水 6.6 μL。反应条件为两步法, 预变性: 95℃ 15 s; 反应(40 循环): 95℃ 10 s, 60℃ 32 s; 溶解曲线反应: 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 95℃ 30 s, 60℃ 15 s。

1.2.3 ELISA 法检测细胞培养液上清和细胞内的 B 毒素 从 -20℃ 冰箱取出保存的细菌沉淀, PBS 洗涤 2 次, 根据菌落计数, 调整其细菌含量, 使每份样本含有  $1 \times 10^7$  CFU 艰难梭菌。然后用超声波破碎仪作用 15 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 分别取

50  $\mu$ L 上清进行 B 毒素的检测。具体检测方法见 ELISA 试剂盒说明书。加入终止液后,用酶标仪在 450 nm 波长检测 OD 值。

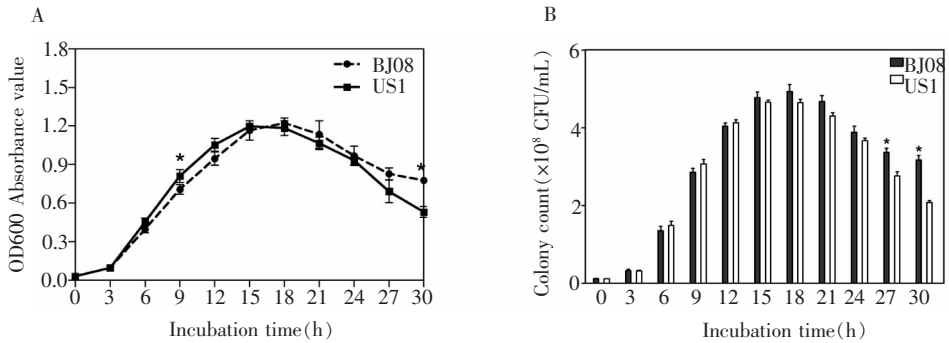
表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Primer	Primer sequence(5'-3')
<i>tcdA</i> -F	TTCGCTTAGGCAGTGTAT
<i>tcdA</i> -R	CAGACTCTATGGCTGGGTTA
<i>tcdB</i> -F	TAAAGTAATGATGCCACAAG
<i>tcdB</i> -R	CAGTATGACCTGAACCACC
<i>tcdC</i> -F	AAAGGCTGAAGAACAACG
<i>tcdC</i> -R	TTGACCTCATCACCATCT
<i>tcdR</i> -F	TTGACGAAAATGTCTTGAA
<i>tcdR</i> -R	CTTTGAATACCAGATAATTCTT
<i>tcdE</i> -F	ATGTGCTTATGTGGATTACC
<i>tcdE</i> -R	CCTTAGCATTCAATTCATCT
16S-F	GGTAAATGCGTAGATATTAGG
16S-R	CATCGTTACAGCGTGGACTA

## 2 结果

2.1 BJ08 和 US1 生长曲线及其菌落计数 BJ08 和 US1 生长曲线的趋势相似。指数生长期从第 3 小时开始,15 h 进入稳定生长期,稳定生长期持续 6 h 左右。21 h 后,OD 值明显下降,细菌生长进入衰退期。图 1A 显示,在指数生长期,US1 的生长速率稍快于 BJ08。两者在平台期的 OD 值没有明显差异,进入衰退期后,US1 的 OD 值急剧下降,而 BJ08 的 OD 值下降较为平缓。在第 30 小时,两者的 OD 值有显著差异( $P < 0.05$ )。图 1B 表示的是 BJ08 和 US1 在不同生长阶段的菌落计数,两者在生长的对数期及其平台期菌落计数没有明显差异,在衰退期的第 27 和 30 小时,BJ08 的菌落计数显著高于 US1( $P < 0.05$ )。总体而言,两个菌株的菌落计数和各自的生长曲线相一致。



A: Growth curves of BJ08 and US1; B: Colony counts of BJ08 and US1 (\*,  $P < 0.05$ ).

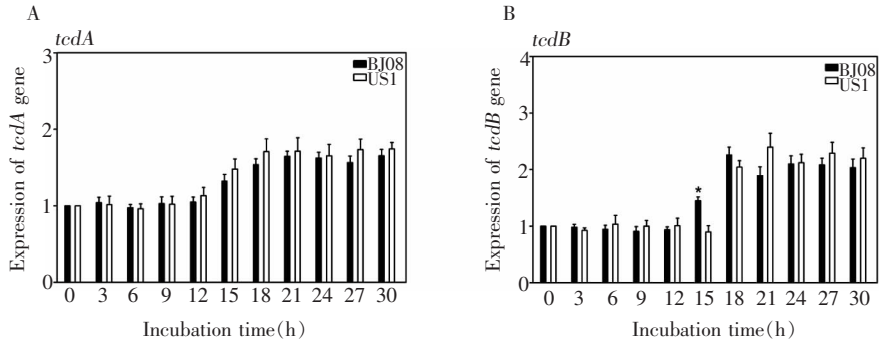
图 1 BJ08 和 US1 生长曲线及其菌落计数的比较

Figure 1 Comparison of growth curves and colony counts between BJ08 and US1

2.2 BJ08 和 US1 的 *tcdA* 及 *tcdB* mRNA 表达 虽然 BJ08 和 US1 的 *tcdA* 末端存在 1.8 kb 缺失,但检测到 *tcdA* 的转录。为了更合理地比较,我们通过菌落计数,把细菌调整到  $10^7$  CFU。提取  $10^7$  CFU 细菌的总 RNA,进行逆转录和定量 PCR<sup>[5]</sup>。图 2A 所示:在培养的第 15 小时,即菌株生长进入稳定期后,*tcdA* 的 mRNA 开始表达。21 h 达到最高水平,并且一直保持在较高的表达水平。BJ08 和 US1 在各个时间段 *tcdA* mRNA 的表达都无明显差异。图 2B 所示,BJ08 *tcdB* mRNA 的表达较早,第 15 小时就开始转录,18 h 达到最高水平,一直保持到 30 h。US1 第 18 小时才开始表达,并且一开始

就到达最高水平,一直持续到 30 h。

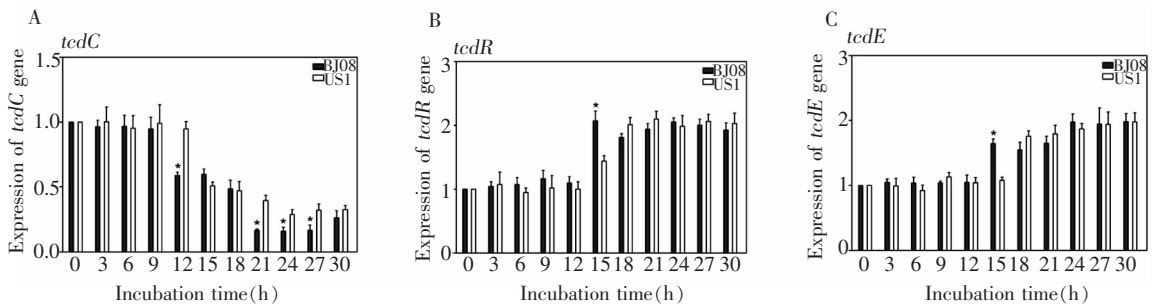
2.3 菌株 BJ08 和 US1 *tcdC*、*tcdR* 和 *tcdE* mRNA 的表达 图 3A 显示,BJ08 从第 12 小时开始,*tcdC* mRNA 的转录显著下降;US1 从第 15 小时起,其转录开始下降。而且第 21、24 和 27 小时,BJ08 的转录量显著低于 US1。图 3B 显示,BJ08 和 US1 的 *tcdR* mRNA 都是从 15 h 开始转录,但是 BJ08 表达水平显著高于 US1,其余的时间段,两者表达水平无显著差异。*tcdE* 和毒素的外分泌相关<sup>[6]</sup>,图 3C 显示,BJ08 的 *tcdR* mRNA 从 15 h 开始转录,US1 从 18 h 开始转录。第 15 小时,BJ08 表达水平显著高于 US1,其余时间段,两者表达水平无显著差异。



A: mRNA expressions of *tcdA* of BJ08 and US1; B: mRNA expressions of *tcdB* of BJ08 and US1 (\*:  $P < 0.05$ ).

图 2 菌株 BJ08 和 US1 在不同培养时间 *tcdA* 和 *tcdB* mRNA 的表达

Figure 2 mRNA expressions of *tcdA* and *tcdB* in different incubation time of BJ08 and US1 respectively



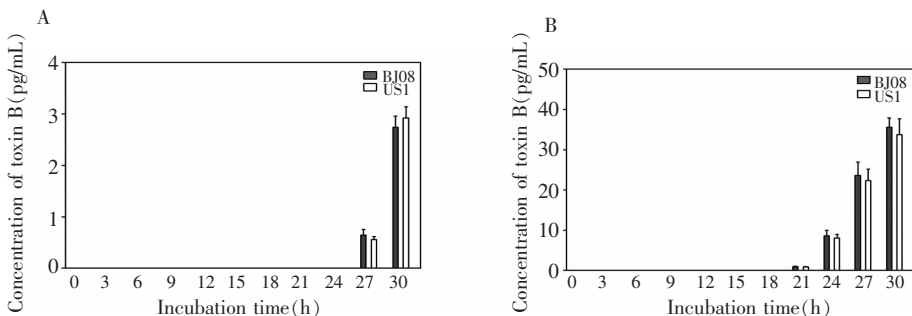
A: mRNA expressions of *tcdC* of BJ08 and US1; B: mRNA expressions of *tcdR* of BJ08 and US1; C: mRNA expressions of *tcdE* of BJ08 and US1(\*:  $P < 0.05$ ).

图 3 BJ08 和 US1 的 *tcdC*, *tcdR* 及 *tcdE* 在不同时间段 mRNA 的表达

Figure 3 mRNA expressions of *tcdC*, *tcdR* and *tcdE* in different incubation time of BJ08 and US1 respectively

2.4 BJ08 和 US1 细胞培养上清液及细胞中 B 毒素的表达 图 4A 显示,在细胞培养上清中,菌株 BJ08 和 US1 都在第 27 小时检测到毒素 B 的表达,两者在细胞培养上清中毒素 B 的表达无明显差异。图 4B 是 BJ08 和 US1 细胞中 B 毒素表达的比较,第

21 小时检测到 B 毒素的表达,随着培养时间的延长,B 毒素的表达显著上升,第 30 小时 B 毒素的表达量是第 21 小时的 35 倍左右。两者在细胞中 B 毒素的表达无显著差异。



A: Concentration of toxin B in supernatants of BJ08 and US1; B: Concentration of toxin B in cells of BJ08 and US1.

图 4 BJ08 和 US1 细胞培养液上清及细胞中 B 毒素的表达

Figure 4 Expressions of toxin B in supernatants and cells in BJ08 and US1

### 3 讨论

由于艰难梭菌感染的暴发和流行,艰难梭菌已经成为欧美医院常规检测的项目。目前在中国大陆,缺少系统的艰难梭菌的流行病学资料,对艰难梭菌腹泻的严重性还没有系统地评价。根据有限的资料,我们发现中国的艰难梭菌流行病学有自己的特点,其中一个重要的特点是中国的艰难梭菌 A-B+ 株分离率高,达 23.2%~48%<sup>[7-8]</sup>,而欧美的分离率偏低,加拿大 A-B+ 菌株仅占 3%<sup>[9]</sup>。中国 A-B+ 型艰难梭菌的高分离率引起我们对 A-B+ 艰难梭菌的研究兴趣。

本研究显示, BJ08 和 US1 生长曲线趋势相似。但在衰退后期, US1 的 OD 值急剧下降,而 BJ08 的 OD 值下降较为平缓;菌落计数也显示衰退后期 US1 的菌落计数显著少于 BJ08。其原因可能是 BJ08 细胞比 US1 细胞具有更强的环境耐受能力,具体机制还需要进一步探讨。为了使不同时间段的定量 PCR 结果更具有可比性,我们参考了 Gerber 的方法<sup>[5]</sup>并对其进行了改进,对每一个时间段的样本取 10<sup>7</sup> CFU 细菌进行总 RNA 提取,逆转录后进行相对定量 PCR 比较。BJ08 和 US1 虽然不分泌 A 毒素,但是检测到 *tcdA* 的转录。虽然转录的 *tcdA* 不能表达 A 毒素,但是不能排除其表达小的短肽来参与毒力调节的可能性。因为早期的研究发现纯化的 B 毒素在体外几乎没有毒力,只有在 A 毒素的存在下,在体外才有毒力,故认为艰难梭菌中的 A 毒素在调节 B 毒素的表达方面起主要作用<sup>[10]</sup>。后来, A-B+ 野生株的发现,以及 A-B+ 株引起艰难梭菌感染的暴发和流行<sup>[11]</sup>,使人们对 A、B 毒素的作用进行了重新定位。综合早期的研究成果以及我们的实验结果,推测 A-B+ 株的 *tcdA* 可能表达某种短肽来调控 B 毒素。

菌株 BJ08 和 US1 的 *tcdA* mRNA 表达在各个时间段都没有明显差异,而且最高水平和基础水平的差距较小,这可能与 A-B+ 菌株不表达毒素 A 有关。虽然 BJ08 的 *tcdB* mRNA 表达比 US1 提前 3 h,但是在上清液和细胞中,两者的 B 毒素含量都无明显差别,可能是由于 ELISA 检测方法不够灵敏。定量 PCR 法能比 ELISA 法提前 6 h 检测到 B 毒素的表达。因为定量 PCR 检测的灵敏性,所以临床上多用定量 PCR 来替代 ELISA 进行艰难梭菌相关性疾病(CDAD)的初筛<sup>[12]</sup>。一般认为 *tcdC* 对毒

素的合成有负调控作用<sup>[13]</sup>,但最近一篇文献<sup>[14]</sup>认为 *tcdC* 对毒素的合成没有调控作用。我们的实验发现, BJ08 和 US1 *tcdC* 的转录与 *tcdA*、*tcdB* 的转录呈负相关,至少在转录水平上说明了 *tcdC* 对 *tcdA* 和 *tcdB* 的转录有负调控功能。BJ08 的 *tcdC* 比 US1 的下降早,且衰退期 BJ08 *tcdC* 的下降水平显著低于 US1,但 BJ08 和 US1 的 *tcdA*、*tcdB* 以及 B 毒素的表达都没有显著差异。也许在不同的菌株中 *tcdC* 的调控强度不一, *tcdC* 的具体作用还待进一步探讨。关于 *tcdE* 的作用也存在分歧,一般认为 *tcdE* 和毒素的外分泌有关<sup>[15]</sup>,但也有研究证明 *tcdE* 和毒素的分泌无关<sup>[16]</sup>。我们的实验结果表明, *tcdE* 与 *tcdA* 及 *tcdB* 的转录呈正相关。细胞中 BJ08 和 US1 的 B 毒素含量在衰退期显著升高,可能与衰退期艰难梭菌毒素合成增加有关。

我们的实验证明,中国高分离株 BJ08 和美国艰难梭菌感染暴发区域分离的 US1 的生长速率以及 B 毒素的产量没有显著差异。既然 US1 菌株能在美国引起艰难梭菌感染的暴发流行,提示我们要密切关注 BJ08 可能在中国引起的艰难梭菌感染的暴发和流行。

### [参考文献]

- [1] 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(9491):1079-1084.
- [2] McDonald L C, Killgore G E, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile* [J]. N Engl J Med, 2005, 353(23):2433-2441.
- [3] Drudy D, Harnedy N, Fanning S, et al. Isolation and characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in Dublin, Ireland [J]. Clin Microbiol Infect, 2007, 13(3): 298-304.
- [4] Shin B M, Kuak E Y, Yoo S J, et al. Emerging toxin A-B+ variant strain of *Clostridium difficile* responsible for pseudomembranous colitis at a tertiary care hospital in Korea [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008, 60(4):333-337.
- [5] Gerber M, Walch C, Löffler B, et al. Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile* [J]. J Med Microbiol, 2008(Pt 6), 57:776-783.
- [6] Govind R, Dupuy B. Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein *TcdE* [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(6):e1002727.
- [7] 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.
- [8] Huang H, Wu S, Wang M, et al. *Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes [J]. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33(4): 339 - 342.
- [9] Martin H, Willey B, Low D E, et al. Characterization of *Clostridium difficile* strains isolated from patients in Ontario, Canada, from 2004 to 2006 [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(9): 2999 - 3004.
- [10] Lyerly D M, Saum K E, MacDonald D K, et al. Effects of *Clostridium difficile* toxins given intragastrically to animals [J]. Infect Immun, 1985, 47(2): 349 - 352.
- [11] Alfa M J, Kabani A, Lyerly D, et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(7): 2706 - 2714.
- [12] Peterson L R, Manson R U, Paule S M, et al. Detection of toxigenic *Clostridium difficile* in stool samples by real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *C. difficile*-associated diarrhea [J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(9): 1152 - 1160.
- [13] Matamouros S, England P, Dupuy B. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator *TcdC* [J]. Mol Microbiol, 2007, 64(5): 1274 - 1288.
- [14] Bakker D, Smits W K, Kuijper E J, et al. *TcdC* does not significantly repress toxin expression in *Clostridium difficile* 630ΔErm [J]. PLoS One, 2012, 7(8): e43247.
- [15] Govind R, Dupuy B. Secretion of *Clostridium difficile* toxins A and B requires the holin-like protein *TcdE* [J]. PLoS Pathog, 2012, 8(6): e1002727.
- [16] Olling A, Seehase S, Minton N P, et al. Release of *TcdA* and *TcdB* from *Clostridium difficile* *cdi* 630 is not affected by functional inactivation of the *tcdE* gene [J]. Microb Pathog, 2012, 52(1): 92 - 100.

## · 学术动态 ·

### 抗菌蜂蜜预防腹膜透析相关感染：一项随机对照试验

陈玉华 译, 吴安华 校

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

**背景** 目前缺少指导预防腹膜透析相关感染策略的研究证据。抗菌蜂蜜作为一种新型、廉价、有效的局部预防性使用的药物, 不会诱导细菌耐药。因此, 我们评估, 对鼻内定植金黄色葡萄球菌的患者, 与同时进行腹膜管外出口部位常规护理加上鼻内莫匹罗星去定植的方法相比, 腹膜管外出口部位每日使用蜂蜜, 是否会延迟首次出现腹膜透析相关感染的时间。

**方法** 此项非盲试验在澳大利亚、新西兰的 26 个中心进行。研究对象是在进行腹膜透析的患者。将这些患者用合适的分配算法按照 1:1 的比例随机分为两组, 实验组外出口部位每日局部使用抗菌蜂蜜, 并结合外出口部位常规护理; 对照组采取外出口部位常规护理及鼻内使用莫匹罗星(仅针对鼻腔内定植有金黄色葡萄球菌的患者)。试验的主要终点为腹膜透析相关感染(出口处皮肤感染、窦道感染或腹膜炎)。该试验澳大利亚、新西兰临床试验登记处登记号 12607000537459。

**结果** 共 371 名患者, 其中 186 人纳入实验组,

185 人设为对照组。实验组[16 个月(四分位间距, 难以估计)]和对照组[17.7 个月(不可估计)]的平均无腹膜透析相关感染生存时间比较, 差异无显著性, 未调整风险比为 1.12, 95% 的置信区间 0.83~1.51,  $P=0.47$ 。在亚组分析中, 蜂蜜增加了糖尿病患者的主要终点(1.85, 1.05~3.24;  $P=0.03$ ) 和发生腹膜炎(2.25, 1.16~4.36) 的风险。实验组和对照组严重不良反应事件(分别为 298 例与 327 例,  $P=0.1$ ) 和死亡(分别为 14 例与 18 例,  $P=0.9$ ) 的发生率没有显著差异。实验组中 11 例(6%) 患者发生局部皮肤反应。

**结论** 研究表明, 不推荐常规使用抗菌蜂蜜进行腹膜透析相关感染的预防。

摘译自: Johnson D W, Badve S V, Pascoe E M, et al. Antibacterial honey for the prevention of peritoneal-dialysis-related infections (HONEYPOT): a randomised trial [J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(1): 23 - 30.