

• 论 著 •

婴儿艰难梭菌携带状况及菌株特征研究*

周天祥¹, 束振华^{2#}, 肖克林^{3△}, 王中兴¹, 麦光兴³, 夏 勇³, 黄 震², 范回生⁴, 古聪慧⁵

(1. 深圳市宝安区妇幼保健院检验科, 广东深圳 518133; 2. 深圳市龙岗区中心医院检验科, 广东深圳 518116; 3. 深圳市宝安区妇幼保健院中心实验室, 广东深圳 518133; 4. 深圳市龙岗区第五人民医院体检科, 广东深圳 518100; 5. 深圳市罗湖区人民医院产科, 广东深圳 518001)

摘要:目的 调查婴儿艰难梭菌的携带状况及菌株特征。方法 收集 2015 年 8—11 月在该院住院或门诊治疗的 1 岁内婴儿粪便标本 238 份, 利用免疫层析法快速初筛艰难梭菌, 阳性标本再利用 CDIF 平板进行厌氧培养以获得菌株, 利用 PCR 方法检测艰难梭菌毒素 A、B 的编码基因 *tcdA*、*tcdB* 和二元毒素编码基因 *cdtA*、*cdtB*, 运用 *slpA* 测序分型(*slpA* ST)方法对菌株进行基因分型。结果 238 份粪便标本共分离出 50 株艰难梭菌, <3 月、3~<6 月和 6 月至 1 岁三组婴儿艰难梭菌的分离率分别为 9.3%、17.6% 和 27.3%, 三组见比较差异有统计学意义($\chi^2=6.940, P=0.031<0.05$)。52.0%(26/50) 的菌株为产毒株, 其中 69.2%(18/26) 的菌株产毒模式为 *tcdA*+*tcdB*+*cdtA*-*cdtB*-。50 株艰难梭菌可分为 11 种 *slpA* ST 型, 产毒株最常见的基因型为 *slpA* ST fr-02 和 kr-02, 而非产毒株则为 xr-03。结论 1 岁内婴儿艰难梭菌携带率较高, 且过半为产毒株, 大多同时产毒素 A 和 B。产毒株与非产毒株的基因型存在差别。

关键词:艰难梭菌; 婴儿; *slpA* 测序分型; 毒素编码基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.13.003

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)13-1735-03

Clostridium difficile carriage in infants and the characteristics of isolates*

ZHOU Tianxiang¹, SHU Zhenhua^{2#}, XIAO Kelin^{3△}, WANG Zhongxing¹,

MAI Guangxing³, XIA Yong³, HUANG Zhen², FAN Huisheng⁴, GU Conghui⁵

(1. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Bao'an Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Shenzhen Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518166, China; 3. Central Laboratory, Shenzhen Bao'an Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133, China; 4. Department of Physical Examination, the Fifth Hospital of Longgang District, Shenzhen, Guangdong 518100, China; 5. Department of obstetrics, Shenzhen Luohu People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the carrying status and characteristics of *Clostridium difficile* isolated from infants. **Methods** Two hundred and thirty-eight stool specimens were collected from infant younger than 1 year old, that were hospitalized or outpatient from August to November 2015. Immunochromatography targeted GDH and toxin A&B of *C. difficile* was used for *C. difficile* screening, and those positive specimens were inoculated in CDIF and anaerobic culture. *C. difficile* isolates were genotyped by using *slpA* sequence typing (*slpA* ST), and *tcdA*, *tcdB*, *cdtA* and *cdtB* of *C. difficile* isolates were detected by PCR. **Results** Fifty *C. difficile* strains were isolated from 238 stool samples, and the isolated rates of *C. difficile* from <3 months, 3 months to <6 months, and 6 months to 1 years old groups were 9.3%, 17.6% and 27.3% ($\chi^2=6.940, P=0.031<0.05$), respectively. 52.0%(26/50) of the *C. difficile* isolates were toxigenic, and 69.2% (18/26) toxigenic isolates harbored *tcdA*+*tcdB*+*cdtA*-*cdtB*-. Fifty *C. difficile* isolates were genotyped as 11 *slpA* STs, *slpA* ST fr-02 and kr-02 were the commonest genotypes in toxigenic *C. difficile* isolates; however, that was *slpA* ST xr-03 in non-toxigenic isolates. **Conclusion** High *C. difficile* carriage is found in infants younger than 1 year old, and more than half of *C. difficile* isolates are toxigenic. Most of toxigenic isolates harbored toxin A and B. The genotype of *C. difficile* isolates is different between toxigenic isolates and non-toxigenic isolates.

Key words: *Clostridium difficile*; infant; *slpA* sequence typing; toxin encoding gene

艰难梭菌, 也称难辨梭状芽孢杆菌, 是一种专性厌氧的革兰阳性芽孢杆菌, 为肠道中的正常菌群, 当过度使用抗菌药物后, 艰难梭菌可大量繁殖, 导致艰难梭菌相关性腹泻, 甚至严重的伪膜性肠炎。2000 年以来, 艰难梭菌相关性感染的发病率呈上升趋势, 高毒力株 RT027/NAP1/BI 在欧美地区暴发流

行, 病死率迅速上升, 已成为全球关注的健康问题^[1]。

健康成人艰难梭菌的携带率通常低于 5%^[2]; 然而, 在婴幼儿时期, 艰难梭菌的携带率非常高, 可高达 10%~37%, 其对婴幼儿本身通常虽无伤害, 但可作为贮菌库, 导致成人感染^[3]。在我国, 对艰难梭菌相关性感染的认识程度还普遍不

* 基金项目: 广东省科技计划项目公益研究与能力建设专项资金(2014A020212703); 广东省医学科研基金项目(A2015142); 深圳市宝安区科技计划项目(2014083); 深圳市龙岗区科技发展资金医疗卫生(扶持类)项目(20160606173802570)。

作者简介: 周天祥, 男, 主管技师, 主要从事临床生化检验和相关研究。 # 共同第一作者。 △ 通信作者, E-mail: lcxkl@163.com。

足,与欧美等国家存在较大差距,艰难梭菌的相关研究数据较少。因此,本研究中,作者对婴儿艰难梭菌的携带状况进行初步调查,同时对分离到的菌株进行基因分型和毒素基因检测,分析其分子特征,用于相关数据的补充。

1 材料与方法

1.1 材料 收集 2015 年 8—11 月在本院住院或门诊治疗的婴儿粪便标本 238 份。婴儿年龄分布从新出生到 12 月,中位年龄 6 个月。

1.2 仪器与试剂 Mastercycler nexus PCR 仪(德国 Eppendorf)、Centrifuge 5424 高速离心机(德国 Eppendorf)、MK 2000 干式恒温仪(杭州奥盛仪器有限公司)、DYY-6C 水平电泳仪(北京六一)、UVP 凝胶成像系统(美国 UVP)、ABI 3500Dx 测序仪(美国 Thermo Fisher)。C. Diff Quik Chek Complete(美国 Alere)、CDIF 平板(法国 bioMérieux)、厌氧发生袋(法国 bioMérieux)、Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工)、TransStart FastPfu DNA Polymerase(北京全式生物)、100~2 000 bp DNA ladder(大连 Takara)、BigDye Terminator (version 3.1) cycle sequencing kit(美国 Thermo Fisher)。

1.3 方法

1.3.1 艰难梭菌初筛 利用免疫层析法(C. Diff Quik Chek Complete)筛查婴儿粪便样本中的艰难梭菌谷氨酸脱氢酶抗原(GDH)和毒素 A&B(TOX)。操作步骤按试剂说明书。本研究中,作者设定 GDH 和 TOX 任一阳性均为艰难梭菌初筛阳性。

1.3.2 菌株分离培养和鉴定 取初筛阳性的粪便标本 0.3 g 或 300 μL,加等比例的无水乙醇,剧烈混匀,室温放置 1 h,3 200×g 离心 5 min,弃上清,取沉淀 10 μL 接种于 CDIF 平板,置 37 ℃厌氧培养 48~72 h,挑取黑色典型菌落进行细菌鉴定,细菌鉴定采用 16S 基因测序。

1.3.3 艰难梭菌菌株核酸提取 从 CDIF 平板上挑 1~5 个黑色典型菌落溶于 200 μL 分子生物学级水,利用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工)提取细菌 DNA,操作按试剂说明书进行。

1.3.4 毒素 A 和 B 编码基因 tcdA、tcdB 和二元毒素编码基因 ctdA、ctdB 检测 PCR 反应体系为 20 μL,包含 5×缓冲液 4 μL、上/下游引物(10 μmol/L)各 1 μL、dNTP(2.5 mmol/L) 1.0 μL、FastPfu DNA Polymerase (5 U/μL) 0.2 μL、DNA 模板 1 μL,最后加分子生物学级水 11.8 μL。PCR 程序:95 ℃×2 min;94 ℃×30 s,58 ℃×1 min,72 ℃×1 min,共 35 个循环;72 ℃延伸 5 min。PCR 产物检测:取 5 μL PCR 产物,1.5%琼脂糖凝胶 150 V 电泳 20 min。所用引物见文献[4]。

1.3.5 基因分型 基因分型采用 slpA 测序分型方法(slpA ST)^[5]。PCR 反应液体系为 25 μL,包含 5×缓冲液 5.0 μL、上/下游引物(10 μmol/L)各 1 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL、FastPfu DNA Polymerase (5 U/μL) 0.25 μL、DNA 模板 2 μL,最后加分子生物学级水 13.75 μL。PCR 程序如下:95 ℃ 2 min;94 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,共 35 个循环;72 ℃延伸 5 min。PCR 产物检测:取 5 μL PCR 产物,1.5%琼脂糖凝胶 150 V 电泳 20 min。基因测序:采用 ABI 3500Dx 测序仪,测序试剂为 BigDye Terminator (version 3.1) cycle sequencing kit。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件分析数据。计数资料

的组间比较采用 χ^2 卡方检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 艰难梭菌初筛和菌株培养情况 238 份粪便标本,免疫层析法显示初筛阳性的共 76 份;阳性样本利用 CDIF 平板进行厌氧培养,培养成功 56 株,经 16S 测序鉴定,最后鉴定出艰难梭菌 50 株,238 份样本艰难梭菌菌株的分离率为 21.0%。按婴儿年龄分为<3 月、3~<6 月和 6 月至 1 岁 3 组,可见艰难梭菌的分离率随婴儿年龄增长呈上升趋势($\chi^2=6.940, P=0.031<0.05$)。见表 1。

表 1 不同月份婴儿艰难梭菌分离菌株分离情况

月龄	总例数(n)	艰难梭菌[n(%)]*
<3 月	43	4(9.3)
3~<6 月	74	13(17.6)
6~12 月	121	33(27.3)

注:*表示三组间比较, $\chi^2=6.940, P=0.031<0.05$ 。

2.2 艰难梭菌菌株分子特征 50 株艰难梭菌中,26 株(52.0%)为产毒株,其中 8 株(16.0%,8/50)为毒素 A 编码基因 tcdA 阴性、毒素 B 编码基因 tcdB 阳性(tcdA-tcdB+),18 株(36.0%,18/50)为 tcdA、tcdB 均为阳性(tcdA+tcdB+);50 株菌二元毒素编码基因 cdtA、cdtB 均为阴性。基因分型结果显示,50 株艰难梭菌分为 11 种 slpA ST 型。产毒株中,最常见的为 slpA ST fr-02 和 kr-02,各占 30.8%(8/26);非产毒株中,最常见的为 slpA ST xr-03,占 50.0%(12/24),其次为 serogroup D。产毒株中,8 株 slpA ST fr-02 菌株的毒素编码基因携带模式均为 tcdA-tcdB+cdtA-cdtB-,而另外 18 株 tcdA+tcdB+cdtA-cdtB-菌株则包含 6 种 slpA ST 型。见表 2。

表 2 艰难梭菌基因型和毒素编码基因携带情况

基因型 (slpA ST)	产毒株		非产毒株*	合计
	tcdA-tcdB+ cdtA-cdtB-	tcdA+tcdB+ cdtA-cdtB-		
fr-02	8	0	1	9
gc11-01	0	1	0	1
gr-03	0	2	0	2
hr-01	0	2	3	5
kr-02	0	8	0	8
og39-01	0	2	0	2
xr-03	0	3	12	15
nc0930-01	0	0	1	1
kr-02	0	0	1	1
serogroup D	0	0	5	5
serogroup I	0	0	1	1
合计	8	18	24	50

注:*表示菌株的毒素编码基因携带模式为 tcdA-tcdB-cdtA-cdtB-。

3 讨 论

艰难梭菌是一种条件致病菌,广泛分布于环境以及人和动物的粪便中。本研究发现,1 岁内婴儿艰难梭菌的总体分离率

为 21.0%，与 Tian 等^[6]的报道相似，进一步验证了婴幼儿阶段艰难梭菌携带率高这一现象。本研究还发现，在小于 3 月龄的婴儿体内，艰难梭菌的分离率较低，本文中 92.0% (46/50) 的菌株均分离自 3 个月后至 1 岁的婴儿，表明在艰难梭菌在婴儿体内繁殖还需一定时间，通常到 3 个月后检出率才逐渐增高。Rousseau 等^[7]报道，2~6 月、7~9 月和 10~12 月婴儿艰难梭菌的携带率分别为 36%、67%、75%，携带率也呈现随婴儿月龄上升的趋势，本文的结论与其一致，虽然本文中各月份婴儿艰难梭菌的检出率均较其报道的低，但这可能与人群来源不同有关。

本文对分离到的 50 株艰难梭菌进行分子特征研究，发现 48.0% 为非产毒株，52.0% 的菌株为产毒株，产毒株比例略低于 Tian 等^[6]的报道 (77.8%，7/9)，但高于 Rousseau 等^[7]的报道 (26.9%，7/26)。26 株产毒株中，69.2% (18/26) 同时产毒素 A 和 B (tcdA + tcdB+)，30.8% (8/26) 只产毒素 B 而不产毒素 A (tcdA - tcdB+)，这一比例与章黎华等^[8]和 Huang 等^[9]报道的成人分离株相当，表明目前导致感染的艰难梭菌主要为同时产毒素 A 和 B 的菌株。

本文中，笔者利用 SlpA ST 方法对菌株进行基因分型，结果显示，50 株菌可分为 11 种 slpA ST 型，在非产毒株和产毒株间，菌株的核糖体型存在明显差异。非产毒株以 slpA ST xr-03 为主，占比达 50.0% (15/24)；产毒株则以 slpA ST fr-02 (8 株) 和 kr-02 (8 株) 为主，两者占比达 61.5% (16/26)。据 Cheng 等^[10]报道，slpA ST fr-01 和 kr-03 均为目前我国艰难梭菌感染患者中主要的流行基因型。这一现象表明婴儿体内携带的艰难梭菌可能是我国成人艰难梭菌感染的一个重要来源，婴儿在其中扮演着“贮菌库”的角色，导致成人艰难梭菌感染。

此外，本文分析了艰难梭菌基因型与毒素编码基因的关系，发现产毒株共包含 7 种 slpA ST 型，其中 6 种的毒素编码基因携带模式均为 tcdA + tcdB + cdtA - cdtB-，只有 slpA ST fr-02 这一种型的毒素编码基因携带模式为 tcdA - tcdB + cdtA - cdtB-，本研究中发现的 9 株 slpA ST fr-02 中有 8 株均为这一模式，其对应的核糖体型为 RT017，以前的相关报道显示 RT017 均为 tcdA - tcdB + cdtA - cdtB-^[7,10]，本文的结果与之一致，表明这一核糖体型的菌株产毒模式有其特异性。

总之，本研究表明 1 岁内的婴儿具有较高的艰难梭菌携带率，且过半菌株为产毒株，产毒株的主要基因型与我国目前成人艰难梭菌感染者的基因型一致，表明婴儿可能作为艰难梭菌的“贮菌库”，导致成人感染。

参考文献

- [1] 曲芬, 汤一苇. 艰难梭菌感染的流行状况及诊治进展[J]. 传染病信息, 2010, 23(1): 1007-8134.
- [2] Miyajima F, Roberts P, Swale A, et al. Characterisation and carriage ratio of *Clostridium difficile* strains isolated from a community-dwelling elderly population in the United Kingdom[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e22804.
- [3] Kubota H, Makino H, Gawad A, et al. Longitudinal investigation of carriage rates, counts, and genotypes of toxigenic *Clostridium difficile* in early infancy[J]. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(19): 5806-5814.
- [4] 肖克林, 金萍, 黄丽清, 等. 高毒力艰难梭菌的基因型和毒力相关基因检测[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 35(8): 1673-4130.
- [5] 黄丽清, 肖克林, 周天祥, 等. 莫西沙星耐药的艰难梭菌多重聚合酶链反应检测和基因分型[J]. 中华传染病杂志, 2015, 33(5): 1000-6680.
- [6] Tian TT, Zhao JH, Yang J, et al. Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from human subjects and the environment [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151964.
- [7] Rousseau C, Poilane I, De Pontual LA, et al. *Clostridium difficile* carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains[J]. Clin Infect Dis, 2012, 55(9): 1209-1215.
- [8] 章黎华, 董丹凤, 江岑, 等. 院内感染艰难梭菌的毒素检测及核糖体分型研究[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2012, 32(11): 1674-8115.
- [9] 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.
- [10] Cheng JW, Xiao M, Kudinha T, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolates from a university teaching hospital in China [J]. Front Microbiol, 2016, 7(1): 1621.

(收稿日期: 2017-03-01 修回日期: 2017-05-02)

(上接第 1734 页)

- [7] 邓俊耀, 蒙娟, 胡卫, 等. 桂林地区新生儿先天性甲状腺功能减退静脉血片筛查实验 hTSH 切值建立[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(15): 2193-2196.
- [8] 章晓燕, 王薇, 赵海建, 等. 我国 2015 年新生儿遗传代谢病筛查指标切值的调查[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(9): 706-709.
- [9] 刘志娟, 叶明刚, 赵海燕, 等. 新疆地区新生儿苯丙酮尿症筛查切值的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2016, 24(9): 69-70.

- [10] 顾颜. 参加全国新生儿疾病筛查实验室室间质评 5 年回顾[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015, 23(8): 87-88.
- [11] 王治国. 临床检验质量控制技术[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2014.
- [12] 费阳, 康凤凤, 王薇, 等. 2015 年全国临床检验质量指标室间质量评价[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(6): 433-437.

(收稿日期: 2017-02-24 修回日期: 2017-04-24)