

· 实验室研究 ·

昆明地区 2018–2020 年腹泻患者中艰难梭菌感染特征分析

李桂满¹ 古文鹏² 侯敏¹ 贾森泉² 王媛媛³ 白璐璐³ 尹建雯² 周永明²
伏晓庆² 卢金星³ 吴媛³

¹昆明市疾病预防控制中心微生物检验科,昆明 650228;²云南省疾病预防控制中心急性传染病防制所,昆明 650022;³中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,北京 102206

李桂满和古文鹏对本文有同等贡献

通信作者:吴媛,Email: wuyuan@icdc.cn

【摘要】目的 对 2018–2020 年昆明地区腹泻患者中艰难梭菌感染特征进行分析,为后续监测和防治提供数据支持。**方法** 收集 2018–2020 年云南省 4 家哨点医院腹泻患者粪便标本共 388 份,使用实时荧光定量 PCR 方法进行艰难梭菌毒素基因检测,对结果阳性的粪便标本进行菌株的分离,用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴定菌株。提取分离菌株的基因组 DNA 进行多位点序列分型 (MLST)。分析毒素阳性和菌株分离阳性与患者的临床特征以及艰难梭菌阳性与其他病原共感染的情况。**结果** 388 份粪便标本中,艰难梭菌内参 *tpi* 基因阳性标本 47 份,总阳性率为 12.11%。其中,非产毒艰难梭菌 4 份 (8.51%),产毒艰难梭菌 43 份 (91.49%)。47 份阳性标本分离得到 18 株艰难梭菌,阳性标本的分离率为 38.30%。其中 *tcdA*、*tcdB*、*tcdC*、*tcdR* 和 *tcdE* 基因均为阳性的菌株 14 株。18 株艰难梭菌的二元毒素均为阴性。所有分离菌株的 MLST 结果共形成 10 种序列型 (ST),其中 ST37 型 5 株 (27.78%);ST129、ST3、ST54 和 ST2 型各 2 株;ST35、ST532、ST48、ST27 和 ST39 型各 1 株。粪便毒素基因阳性 (*tcdB+*) 结果与患者年龄、就诊前发热差异有统计学意义;菌株分离阳性仅与患者年龄差异有统计学意义。同时,部分腹泻患者存在艰难梭菌与其他腹泻病毒共感染的情况。**结论** 昆明地区腹泻患者中艰难梭菌的感染多为产毒株,MLST 结果具有高度的离散特征,应加强开展艰难梭菌的监测和预防。

【关键词】 艰难梭菌; 腹泻; 毒素基因; 多位点序列分型; 共感染

基金项目: 国家科技重大专项 (2017ZX10103010); 昆明市卫生科技人才培养项目暨“十百千”工程 [2019-sw(省)-24]

Study on the features of *Clostridioides difficile* infection among diarrhea patients in Kunming from 2018 to 2020

Li Guiman¹, Gu Wenpeng², Hou Min¹, Jia Senquan², Wang Yuanyuan³, Bai Lulu³, Yin Jianwen², Zhou Yongming², Fu Xiaoqing², Lu Jinxing³, Wu Yuan³

¹Microbiology Testing Department, Kunming Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650228, China; ²Division of Acute Infectious Diseases, Yunnan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China; ³National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Li Guiman and Gu Wenpeng contributed equally to the article

Corresponding author: Wu Yuan, Email: wuyuan@icdc.cn

【Abstract】 Objective We analyze the characteristics of *Clostridioides difficile* (*C. difficile*)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220712-00624

收稿日期 2022-07-12 本文编辑 张婧

引用格式: 李桂满, 古文鹏, 侯敏, 等. 昆明地区 2018–2020 年腹泻患者中艰难梭菌感染特征分析[J]. 中华流行病学杂志, 2023, 44(4): 624–628. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220712-00624.

Li GM, Gu WP, Hou M, et al. Study on the features of *Clostridioides difficile* infection among diarrhea patients in Kunming from 2018 to 2020[J]. Chin J Epidemiol, 2023, 44(4):624–628. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220712-00624.



infection among diarrhea patients in Kunming from 2018 to 2020 and provide evidence for follow-up surveillance and prevention. **Methods** A total of 388 fecal samples of diarrhea patients from four sentinel hospitals in Yunnan Province from 2018 to 2020 were collected. Real-time quantitative PCR was used to detect the fecal toxin genes of *C. difficile*. The positive fecal samples isolated the bacteria, and isolates were identified by mass spectrometry. The genomic DNA of the strains was extracted for multi-locus sequence typing (MLST). The fecal toxin, strain isolation, and clinical patient characteristics, including co-infection with other pathogens, were analyzed. **Results** Among the 388 fecal samples, 47 samples with positive reference genes of *C. difficile* were positive, with a total positive rate of 12.11%. There were 4 (8.51%) non-toxicogenic and 43 (91.49%) toxicogenic ones. A total of 18 strains *C. difficile* were isolated from 47 positive specimens, and the isolation rate of positive specimens was 38.30%. Among them, 14 strains were positive for *tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdR*, and *tcdE*. All 18 strains of *C. difficile* were negative for binary toxins. The MLST results showed 10 sequence types (ST), including 5 strains of ST37, accounting for 27.78%; 2 strains of ST129, ST3, ST54, and ST2, respectively; and 1 strain of ST35, ST532, ST48, ST27, and ST39, respectively. Fecal toxin gene positive (*tcdB+*) results were statistically associated with the patient's age group and with or without fever before the visit; positive isolates were only statistically associated with the patient's age group. In addition, some *C. difficile* patients have co-infection with other diarrhea-related viruses. **Conclusions** The infection of *C. difficile* in diarrhea patients in Kunming is mostly toxicogenic strains, and the high diversity of strains was identified using the MLST method. Therefore, the surveillance and prevention of *C. difficile* should be strengthened.

【Key words】 *Clostridioides difficile*; Diarrhea; Toxin gene; Multi-locus sequence typing; Co-infection

Fund programs: National Science and Technology Major Project of China (2017ZX10103010); Kunming Health Science and Technology Talents Training Project and "One Hundred Thousand" Project [2019-sw(province)-24]

艰难梭菌(*Clostridioides difficile*)是引起抗生素相关性腹泻的重要病原。近年来,艰难梭菌感染(*Clostridioides difficile* infection, CDI)成为医院获得性腹泻的主要病因,已在欧、美洲地区国家引发多起暴发流行,被列为紧迫的公共卫生威胁之一^[1]。我国 CDI 呈快速增长趋势,腹泻患者中产毒艰难梭菌的检出比例高达 14%^[2]。艰难梭菌的主要致病机制是由 *tcdA* 和 *tcdB* 基因编码的肠毒素 A 和细胞毒素 B 引起,二者与调节基因 *tcdC*、*tcdR*、*tcdE* 共同构成致病决定区基因座;部分艰难梭菌可产生二元毒素,由 *cdtA* 和 *cdtB* 基因编码,也与其致病作用密切相关^[3-4]。

目前的研究结果表明,中国 CDI 特征存在地域和人群的分布差异。2009-2016 年,我国浙江省及东部和东南部医院分离得到的艰难梭菌分子型绝大多数来自 clade 1 群,其次是 clade 4 群和 clade 5 群,其中序列型(ST) 35、ST3、ST37 和 ST54 为主要型别^[2,5-9]。本课题组在 2013-2016 年曾对昆明地区 978 例腹泻患者的 CDI 特征进行了分析,其中腹泻患者粪便艰难梭菌内参基因阳性检出率为 14.11%,ST35、ST54 和 ST3 为主要型别^[10]。本研究探讨艰难梭菌在本地区腹泻人群中不同监测年度的异同点,为艰难梭菌的防治提供基础数据。

资料与方法

1. 资料来源:2018 年 7 月至 2020 年 11 月,对云南省 4 家哨点医院腹泻患者粪便标本共 388 份进行艰难梭菌的检测。腹泻患者均为医院初诊病例。哨点医院 A 和 B 为昆明市的三甲综合医院;哨点医院 C 为昆明市三甲儿童医院;哨点医院 D 为昆明市社区卫生服务中心。所有的腹泻标本既往已经开展腹泻类病毒(轮状病毒、札如病毒、诺如病毒、腺病毒、星状病毒)和细菌病原谱(致泻性大肠埃希菌、沙门菌、志贺菌、弯曲菌、耶尔森菌)的检测。

2. 粪便标本中艰难梭菌内参基因和毒素基因检测:采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根,DP328)对 388 份粪便标本进行 DNA 提取,艰难梭菌多重荧光 PCR 检测试剂盒(圣湘生物,0101060133)对提取的 DNA 同时进行 *tcdA*、*tcdB*、*cdtB* 和 *tpi*(内参基因)的测定。

3. 菌株的分离和鉴定:将艰难梭菌内参基因阳性的粪便标本接种在选择性环丝氨酸-头孢西丁-果糖琼脂平板(CCFA)上,37 °C 厌氧培养 48 h。从 CCFA 上挑取黄色、摊鸡蛋样菌落转种在脑心浸液(BHI)培养基上,37 °C 厌氧培养 24 h,用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱进行鉴定。将鉴定

为艰难梭菌的菌株再次转种于 BHI 培养基上进行纯化,提取艰难梭菌菌株的基因组 DNA,进行 *tcdA*、*tcdB*、*tcdC*、*tcdR*、*tcdE*、*cdtA* 和 *cdtB* 基因的 PCR 检测^[10]。根据《艰难梭菌感染诊断》(T/CPMA 008-2020),*tcdB*+表示样本中存在产毒艰难梭菌,本研究以 *tcdB*+为标准,进一步分析 *tcdB*+与其他因素之间的关系。

4. 多位点序列分型(MLST):PCR 扩增艰难梭菌的 7 个管家基因(*adhk*、*atpA*、*dxr*、*glyA*、*recA*、*sodA* 和 *tpi*),将 PCR 产物进行双向测序(硕擎)。采用 DNASTar 7.0 软件对测序结果进行拼接,与数据库(<https://pubmlst.org/organisms/clostridioides-difficile>)进行比对,得到所测的基因位点等位基因号以及 ST^[10]。

5. 统计学分析:采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。单因素分析采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 基本情况:388 例腹泻患者中,男性 245 例(63.14%),女性 143 例(36.86%); ≤ 5 岁的患者 214 例(55.15%),6~ 岁 21 例(5.41%),19~ 岁 83 例(21.40%), ≥ 60 岁 70 例(18.04%);腹泻天数 ≤ 5 d 患者 279 例(71.91%);水样便患者 316 例(81.44%),其次为黏液便 43 例(11.08%)和脓血便 29 例(7.48%);发热和脱水患者较少。

2. 艰难梭菌毒素基因分析:388 份粪便标本中,艰难梭菌内参基因 *tpi* 阳性标本 47 份,总阳性率为 12.11%,其中非产毒标本 4 份(8.51%),产毒标本 43 份(91.49%)。产毒标本中,*tcdA*+ 34 份,*tcdB*+ 42 份,二者均为阳性的为 33 份;*tcdA*+*tcdB*- 1 份,*tcdA*-*tcdB*+ 9 份。

tcdB+结果与患者年龄差异有统计学意义($\chi^2 = 17.52, P = 0.001$), ≤ 5 岁患者的 *tcdB*+ 比例最高(54.76%),其次为 ≥ 60 岁患者(38.10%);与就诊前发热差异有统计学意义($\chi^2 = 3.90, P = 0.048$),除此之外,与其他临床特征差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

3. 菌株分离和 MLST 结果:艰难梭菌内参基因阳性标本 47 份中分离得到 18 株艰难梭菌,阳性标本的分离率为 38.30%。其中 *tcdA*、*tcdB*、*tcdC*、*tcdR* 和 *tcdE* 基因均为阳性的菌株为 14 株(77.78%),非产毒性艰难梭菌为 4 株(22.22%)。分离菌株的二元毒素均为阴性。

表 1 2018-2020 年昆明地区腹泻患者粪便艰难梭菌毒素基因阳性(*tcdB*+)的单因素分析

因 素	阳性例数	阴性例数	χ^2 值	P 值
性别			0.03	0.871
男	27	218		
女	15	128		
哨点医院			2.47	0.480
A	0	7		
B	17	106		
C	14	121		
D	11	112		
监测科室			2.03	0.566
儿科	1	12		
感染科	14	117		
急诊科	0	14		
其他	27	203		
年龄组(岁)			17.52	0.001
≤ 5	23	191		
6~	0	21		
19~	3	80		
≥ 60	16	54		
职业			6.06	0.194
散居儿童	13	138		
幼托儿童	7	46		
学生	0	17		
农民	2	30		
工人及其他	20	115		
腹泻天数(d)			0.09	0.958
≤ 5	31	248		
6~	4	36		
≥ 10	7	62		
平均每天腹泻次数			1.78	0.412
≤ 5	25	192		
6~	13	135		
≥ 10	4	19		
粪便性状			1.39	0.500
水样便	33	283		
黏液便	4	39		
脓血便	5	24		
就诊前呕吐			0.00	0.980
是	10	83		
否	32	263		
采样前一周使用抗生素			2.34	0.311
是	4	44		
否	21	131		
不详	17	171		
发热			3.90	0.048
是	5	89		
否	37	257		
脱水			0.00	0.998
是	4	33		
否	38	313		

MLST 结果显示, 18 株艰难梭菌菌株共形成 10 种 ST, 其中 ST37 型 5 株 (27.78%); ST129、ST3、ST54 和 ST2 型各 2 株; ST35、ST532、ST48、ST27 和 ST39 型各 1 株。

4. 艰难梭菌与其他病原共感染: *tcdB+* 与任一病毒阳性共感染 12 例, 其中轮状病毒 7 例、诺如病毒 5 例、腺病毒 4 例和星状病毒 1 例。艰难梭菌 *tcdB+* 与上述病原体间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 粪便中艰难梭菌毒素基因阳性 (*tcdB+*) 与其他病原共感染情况

病原	阳性	阴性	χ^2 值	P 值
任一病毒			1.01	0.316
阳性	12	126		
阴性	30	220		
诺如病毒			0.04	0.841
阳性	5	45		
阴性	37	301		
腺病毒			0.90	0.342
阳性	4	20		
阴性	38	326		
星状病毒			0.28	0.597
阳性	1	14		
阴性	41	331		
轮状病毒			0.06	0.806
阳性	7	63		
阴性	35	283		

讨 论

2013–2016 年昆明地区的腹泻患者粪便艰难梭菌内参基因阳性检出率为 14.11%^[10], 本研究的腹泻患者粪便艰难梭菌内参基因阳性检出率则为 12.11%。在 7 年的监测时间内, 艰难梭菌粪便毒素的检出率维持在较恒定的水平。此外, 昆明地区的腹泻人群中分离到的艰难梭菌均未发现高产毒性艰难梭菌。

本研究发现 2013–2016 年分离得到的艰难梭菌以 ST3、ST35 和 ST54 为主要型别^[10]。本研究中分离得到了 ST37 型菌株, 并成为优势克隆株, 而 ST3、ST35 和 ST54 型的占比下降, 这一现象反映了本地区艰难梭菌优势型的交替过程。在过去的 20 年里, 世界各地陆续报道了由 ST37 型艰难梭菌引起的感染和暴发, 从北美洲地区的加拿大到欧洲地区的荷兰和波兰等国家^[11]。该基因型也是亚洲

许多国家的主要产毒菌株之一^[12]。一项针对 ST37 型艰难梭菌的全基因组研究显示, 来自中国的 ST37 型菌株分为 4 个不同的亚系, 与感染严重的相关分离菌株表现出更高的毒素表达水平^[11]。因此, 加强该基因型艰难梭菌的监测对于中国艰难梭菌的防治工作具有重要意义。

病原体的共感染也是一种常见的现象, 多见于临床相关报道^[13]。共感染加重了疾病的发病水平和严重程度, 会对疾病病程和临床治疗产生较大影响, 增加患者的疾病负担^[14]。有报道表明, 临床上的多细菌共感染占 25%, 而儿童呼吸道病毒的共感染率则从 1% 到 40% 不等^[15]。部分共感染的临床研究结果显示, 共感染患者较单一病原感染者临床症状更为严重, 但是也有研究显示了相反的结果^[13]。本研究中, 仅发现了艰难梭菌与致腹泻类病毒发生共感染的情况, 如轮状病毒和诺如病毒等, 未发现艰难梭菌与致腹泻类细菌的共感染情况。这种现象在本课题组 2013–2016 年监测期间的数据也有相关报道^[10]。关于艰难梭菌共感染是否会加重腹泻患者的临床症状和严重程度, 目前尚不能得到相关结论, 这也将会是后续艰难梭菌研究需要关注的领域。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 李桂满: 实施研究、起草文章; 古文鹏: 实施研究、起草文章、统计分析; 侯敏: 采集数据、指导; 贾森泉、王媛媛: 实施研究; 白璐璐、尹建雯: 分析/解释数据; 周永明: 统计分析、指导; 伏晓庆、卢金星: 指导; 吴媛: 酝酿和设计实验、指导

参 考 文 献

- [1] Leffler DA, Lamont JT. *Clostridium difficile* infection[J]. N Engl J Med, 2015, 372(16): 1539-1548. DOI: 10.1056/NEJMra1403772.
- [2] Tian TT, Zhao JH, Yang J, et al. Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from human subjects and the environment[J/OL]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151964. DOI: 10.1371/journal.pone.0151964.
- [3] Heinlen L, Ballard JD. *Clostridium difficile* infection[J]. Am J Med Sci, 2010, 340(3): 247-252. DOI: 10.1097/MAJ.0b013e3181e939d8.
- [4] Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease[J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 247-263. DOI: 10.1128/CMR.18.2.247-263.2005.
- [5] Liu XS, Li WG, Zhang WZ, et al. Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates in China from 2010 to 2015[J]. Front Microbiol, 2018, 9: 845. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00845.
- [6] Chen YB, Gu SL, Wei ZQ, et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in a tertiary hospital of China [J]. J

Med Microbiol, 2014, 63(4): 562-569. DOI: 10.1099/jmm.0.068668-0.

[7] Gao Q, Wu S, Huang HH, et al. Toxin profiles, PCR ribotypes and resistance patterns of *Clostridium difficile*: a multicentre study in China, 2012-2013[J]. Int J Antimicrob Agents, 2016, 48(6): 736-739. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2016.09.009.

[8] 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: 1621. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01621.

[9] Jin DZ, Luo Y, Huang C, et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients in eastern China[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(3): 801-810. DOI:10.1128/JCM.01898-16.

[10] Liao F, Li WG, Gu WP, et al. A retrospective study of community-acquired *Clostridium difficile* infection in southwest China[J]. Sci Rep, 2018, 8: 3992. DOI:10.1038/s41598-018-21762-7.

[11] Xu XX, Luo Y, Chen H, et al. Genomic evolution and virulence association of *Clostridioides difficile* sequence type 37 (ribotype 017) in China[J]. Emerg Microbes Infect, 2021, 10(1): 1331-1345. DOI: 10.1080/22221751.2021.1943538.

[12] Imwattana K, Knight DR, Kullin B, et al. *Clostridium difficile* ribotype 017- characterization, evolution and epidemiology of the dominant strain in Asia[J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8(1): 796-807. DOI: 10.1080/22221751.2019.1621670.

[13] 王颖硕. 儿童呼吸道病毒感染的流行病学特点[J]. 中国实用儿科杂志, 2019, 34(2): 100-104. DOI: 10.19538/j.ek2019020609.

Wang YS. Epidemiology of respiratory virus infection in children[J]. Chin J Pract Pediatr, 2019, 34(2): 100-104. DOI:10.19538/j.ek2019020609.

[14] 林立, 於梦菲. 流感病毒和细菌共感染研究进展[J]. 中国实用儿科杂志, 2018, 33(9): 721-725. DOI: 10.19538/j.ek2018090615.

Lin L, Yu MF. Research progress in coinfection with influenza virus and bacteria[J]. Chin J Pract Pediatr, 2018, 33(9): 721-725. DOI:10.19538/j.ek2018090615.

[15] Sly PD, Jones CM. Viral co-detection in infants hospitalized with respiratory disease: is it important to detect? [J]. J Pediatr (Rio J), 2011, 87(4): 277-280. DOI: 10.2223/JPED.2117.

中华预防医学会流行病学分会第八届委员会组成人员名单

(按姓氏笔画排序)

顾问	刘天锡	汪 华	陆 林	姜庆五	贺 雄				
名誉主任委员	李立明								
主任委员	詹思延								
副主任委员	叶冬青	冯子健	何 纳	何 耀	沈洪兵	胡永华			
常务委员	王 岚	王子军	王全意	王素萍	代 敏	吕 筠	朱凤才	江 宇	
	许国章	李立明	李亚斐	杨晓明	杨维中	吴 凡	吴先萍	汪 宁	
	张建中	陈 坤	赵根明	胡志斌	段广才	俞 敏	施小明	唐金陵	
	曹务春	谭红专							
委 员	丁淑军	么鸿雁	王 蓓	王建明	毛 琛	仇小强	方向华	田文静	
	白亚娜	吕 繁	庄贵华	刘 玮	刘运喜	刘雅文	刘殿武	许汴利	
	孙业桓	苏 虹	李 琦	李文庆	李石柱	李佳圆	杨西林	杨敬源	
	吴尊友	吴寰宇	邱洪斌	余宏杰	张 本	张 军	张卫东	张毓洪	
	陈可欣	陈维清	邵中军	欧剑鸣	周宝森	官旭华	孟 蕾	项永兵	
	赵亚双	胡东生	施 榕	姜 勇	姜 晶	袁 萍	贾存显	贾崇奇	
	高立冬	郭卫东	郭秀花	曹广文	梁 娴	寇长贵	彭 霞	韩秀敏	
	程锦泉	程慧健	曾小云	雷立健	蔡建芳	缪小平	潘 安	戴江红	
	魏文强								
秘书长	王 岚								
秘 书	余灿清	李银鸽							