

TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 联合检测难辨梭菌菌属基因及毒素基因方法学的建立

邵冬华 季娜 梁国威 刘静

【摘要】 目的 建立一种简便、快速难辨梭菌菌属鉴定及其毒素基因筛查的荧光定量 PCR 检测方法。方法 采用 TaqMan-MGB 探针,通过 real-time PCR 分析系统,同时检测难辨梭菌菌属基因磷酸丙糖异构酶(*Tpi*)、A 毒素(*TcdA*)、B 毒素(*TcdB*)及缺失部分基因的 A 毒素(*TcdAT*),从特异度、灵敏度及其抗干扰性等方面评价该方法,并联合全自动酶联荧光免疫系统(VIDAS)检测 50 例临床不明原因腹泻病例粪便标本探讨其应用价值。结果 难辨梭菌非产毒株 *Tpi* 基因(*tpi*)的检测下限是 6×10^{-2} CFU/ μ l,产毒株 *tpi*、*tcdA*、*tcdB*、*tcdAT* 的检测下限为 6×10^{-1} CFU/ μ l;难辨梭菌非产毒株 *tpi* 检测下限批内、批间变异率分别为 2.1% 和 2.3%;产毒株 *tpi*、*tcdA*、*tcdB*、*tcdAT* 的检测下限批内、批间变异率依次为 3.0% 和 3.4%、2.9% 和 3.2%、5.3% 和 5.7%、2.7% 和 2.8%。临床常见分离菌株及梭菌属其他细菌对检测无干扰。50 例不明原因腹泻病例粪便标本中,采用 TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 与 VIDAS 酶标免疫检测 39 例阴性标本其符合率为 100%;6 例两方法检测均为阳性;3 例 VIDAS 酶标免疫检测为可疑及 2 例为阴性,经 TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 检测为 A-/B+ 菌株。结论 建立的 TaqMan-MGB 探针实时荧光定量 PCR 具有高通量、高灵敏度和重复性好的特性,且可筛查携带缺失部分基因的 *TcdA* 难辨梭菌菌株。

【关键词】 难辨梭菌; TaqMan-MGB 探针; 实时荧光定量 PCR; 菌属基因; 毒素基因

Using the real-time PCR assay to establish TaqMan-MGB probe for rapid identification of *Clostridium difficile* and its toxin Shao Donghua, Ji Na, Liang Guowei, Liu Jing. Department of Clinical Laboratory, Aerospace Center Hospital, Beijing 100049, China

Corresponding author: Liang Guowei, Email: htyysdh2006@qq.com

【Abstract】 Objective To develop a real-time PCR assay for the rapid identification of *Clostridium* (*C.*) *difficile* and its toxin. Methods TaqMan real-time PCR was developed for the rapid identification of species specific gene (*tpi*) of *C. difficile* strains and the toxins A (*TcdA*), B (*TcdB*) and truncated toxin A (*TcdAT*). Sensitivity, specificity and anti-interference ability of these methods were estimated, as well. Feces sampled from fifty diarrhea patients were tested by real-time PCR and compared to the results from VIDAS assay. Results The detection limits of *tpi* were 6×10^{-2} CFU/ μ l and 6×10^{-1} CFU/ μ l in the non-toxin producing and toxin producing strains, respectively. The coefficients of variability (*CV*) of intra-assay and inter-assay for the detection limits of *tpi* in the non-toxin producing strain were 2.1% and 2.3%. The *CV*s of intra-assay and inter-assay for the detection limit of *tpi*, *tcdA*, *tcdB* and *tcdAT* in the toxin producing strain were 3.0% and 3.4%, 2.9% and 3.2%, 5.3% and 5.7%, 2.7% and 2.8%, respectively. No interference was detected from other genus or species in clostridium. From 50 clinical samples, thirty-nine of them were negative and six of them were positive under the TaqMan-MGB probe technique in accordance with VIDAS. Five samples appeared positive using the TaqMan-MGB probe technique, in which 3 were dubious and 2 were negative under VIDAS. Conclusion The newly developed method was a sensitive and reliable assay for rapid identification of *C. difficile* and its toxin. This method could be used to screen *C. difficile* isolates harboring truncated toxin A to avoid misdiagnosis, clinically.

【Key words】 *Clostridium difficile*; TaqMan-MGB probe; Real-time PCR; Bacteria genus gene; Toxin gene

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2014.05.024

作者单位: 100049 北京, 航天中心医院检验科

通信作者: 梁国威, Email: htyysdh2006@qq.com

难辨梭菌(*Clostridium difficile*)是院内抗生素相关腹泻和伪膜性肠炎的主要病因,致病性与其肠毒素 A(TcdA)和细胞毒素 B(TcdB)相关。目前临床实验室大多采用酶免疫方法检测难辨梭菌及其毒素,虽然该方法操作简便快速,但其灵敏度不高且存在交叉反应等问题。近年研究发现临床分离的部分菌株编码 A 毒素的基因 *tcdA* 常出现 110 bp 的缺失,一部分携带缺失 *tcdA* 基因(*tcdAT*)的菌株(即 A-/B+ 菌株)无法采用目前的酶免疫方法检测^[1]。基于此本研究拟通过 TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 技术同时快速检测难辨梭菌菌属基因磷酸丙糖异构酶(Tpi)、*tcdA*、*tcdB* 及 *tcdAT*,为院内抗生素相关性腹泻和伪膜性肠炎的临床诊断、鉴别诊断及治疗选择提供依据。

材料与方 法

1. 实验菌株:①阳性菌株:难辨梭菌非产毒株(ATCC43593)购自中国工业微生物菌种保藏中心,产毒株(ATCC9689)由北京中日友好医院惠赠;②其他阴性对照菌株:产气荚膜梭菌(ATCC13124)、索氏梭菌(ATCC9714)、双酶梭菌(ATCC638)、生孢梭菌(ATCC11437)、拜氏梭菌(ATCC8260)购自中国工业微生物菌种保藏中心;大肠埃希菌(ATCC25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC29213)、阴沟肠杆菌(ATCC700323)、铜绿假单胞菌(ATCC27853)、克柔念珠菌(ATCC6258)为本实验室保存标准菌株;③临床分离菌株:40 株均来自航天中心医院检验科细菌室菌种库收集的临床常见分离菌,分别为沙门菌、副溶血性弧菌、大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌、弗氏柠檬酸杆菌、产吡啶金黄杆菌、脑膜脓毒性黄杆菌、变形杆菌、雷氏普罗威登斯菌、日沟维肠杆菌、摩氏摩根菌、克氏柠檬酸杆菌、粘质沙雷菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、少动鞘氨醇单胞菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、头状葡萄球菌、缓慢葡萄球菌、沃氏葡萄球菌、路邓葡萄球菌、尿肠球菌、粪肠球菌、肺炎链球菌、变异链球菌、唾液链球菌、化脓链球菌、咽峡炎链球菌、缓症链球菌、白色念珠菌、克柔念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌,以上实验室菌种库标本经微生物鉴定仪(生物梅里埃

公司,Vitek II,法国)鉴定确认。

2. 主要试剂和仪器:PCR 反应中 MASTER MIX 购自天根生化科技(北京)有限公司的荧光定量 PCR 反应试剂盒;厌氧培养瓶及厌氧培养袋购自法国梅里埃公司;台式高速冷冻离心机购自美国贝克曼公司;ABI7500 型实时荧光 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

3. 试验方法:

(1)DNA 提取:采用加热法提取细菌 DNA。将上述细菌培养后的纯菌落配成 2 个麦氏单位的菌悬液,100 °C 加热 15 min,-20 °C 冷冻 10 min,重复 3 次,10 000 r/min 离心 5 min,上清即为细菌 DNA 粗提液。紫外分光光度计 A260 处检测 A 值,确定细菌 DNA 浓度。将上述细菌 DNA 稀释成浓度为 35 ng/μl 的模板,-20 °C 保存备用。采用天根生化科技(北京)有限公司的粪便基因组提取试剂盒提取粪便 DNA,操作按说明书执行。

(2)设计引物和探针:采用 ABI 公司的 TaqExpress 软件(Foster City,CA)。见表 1。反应体系均为 20 μl,其中细菌基因组 DNA 1 μl,其他用量(终浓度):上下游引物各 1 μl(0.25 μmol/L),TaqMan-MGB 探针 1 μl(0.25 μmol/L);反应体系的循环参数为 95 °C 2 min,95 °C 15 s 和 57 °C 1 min,共 40 个循环。

(3)灵敏度和特异度试验:将难辨梭菌产毒株和非毒株基因组 DNA 35 ng/μl 做倍比稀释,配制浓度(ng/μl)分别为 3.5、0.35、0.035、0.003 5、0.000 35 的模板,检测 *tpi*、*tcdA*、*tcdB* 及 *tcdAT* 的检测下限。上述所有菌株分别应用实时荧光 PCR 反应,以验证设计引物的特异性。

(4)干扰性和重复性试验:将 1 μl 难辨梭菌产毒株的基因组 DNA 与上述所有阴性对照菌的基因组

表 1 难辨梭菌 *tpi*、*tcdA*、*tcdB*、*tcdAT* 引物及探针序列

引物	序 列 (5' ~ 3')	序列位置 (GenBank 号:NC_013315)
<i>tpi</i> 上游	TTCAAATGTAGCCGAAATAATGG	3 531 170 ~ 3 531 192
<i>tpi</i> 下游	GAAATTAACAAGGTCTAGGTAATCATTAC	3 531 241 ~ 3 531 269
<i>tpi</i> -probe	FAM-ATATAGATGGAGCTTTAGTA-MGB	3 531 202 ~ 3 531 221
<i>tcdA</i> 上游	ACACCTTAACCCAGCCATAGAGT	720 522 ~ 720 544
<i>tcdA</i> 下游	TTTCTGCGGTAGCTGAATTAATA	720 590 ~ 720 613
<i>tcdA</i> -probe	FAM-TAACTTCACAGATACTACTA-MGB	720 552 ~ 720 571
<i>tcdB</i> 上游	TAAATCAATGGAAAGATGTAAATAGTG	711 080 ~ 711 106
<i>tcdB</i> 下游	TTTTTCAATGTGTTTATCAA AAATGC	711 139 ~ 711 165
<i>tcdB</i> -probe	FAM-CATAAAAAACATTAACATTATA-MGB	711 109 ~ 711 130
<i>tcdAT</i> 上游	GATATTACTTCGAGCCTAATACAGC	727 034 ~ 727 058
<i>tcdAT</i> 下游	CTATCTGAGGTAAACCATTTCTAAAGT	727 103 ~ 727 129
<i>tcdAT</i> -probe	FAM-TGCGAATGGTTATAAAA-MGB	727 065 ~ 727 081

DNA 各 1 μl 混合, 配成混合 DNA 模板, 调整模板浓度为 0.035 ng/μl, 取 1 μl 混合 DNA 作为反应模板进行 TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 扩增, 分析混合模板是否影响 *tpi*、*tcdA*、*tcdB* 及 *tcdAT* 的检测下限, 评价该方法的抗干扰性。再对 *tpi*、*tcdA*、*tcdB*、*tcdAT* 基因的检测下限做批内、批间 10 次重复性检测, 观察检测下限变异率 (CV) 值大小以判断该方法的重复性。

4. 临床标本检测: 从血液科、消化科及重症 ICU 收集 50 例不明原因腹泻患者粪便标本, 分别用 TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 和全自动酶联荧光免疫系统 (VIDAS) 检测, 以说明建立的方法对难辨梭菌菌属鉴定及毒素基因检测与 VIDAS CDAB 相比具有的准确性及其优势。

结 果

1. 特异度和灵敏度: 本研究检测 *tpi* 仅 2 株难辨梭菌标准菌株呈现特异性扩增曲线, 对 *tcdA*、*tcdB* 及 *tcdAT* 检测仅难辨梭菌产毒株出现特异性扩增曲线, 其他阴性对照菌包括梭菌属在内的 5 株标准菌株均无扩增曲线 (图 1)。应用 TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 检测 *tpi*、*tcdA*、*tcdB* 及 *tcdAT* 检测下限, 产毒株上述 4 个基因的检测下限为 0.035 ng, 非产毒株 *tpi* 的检测下限为 0.003 5 ng (图 2、3)。

2. 干扰性和重复性试验: 应用混合模板验证 TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 的抗干扰性, 结果显示混合模板对难辨梭菌产毒株检测下限的特异性扩增不受其他菌株干扰, 不影响上述 4 个基因的检出 (图 4)。对 4 个基因检测下限做批内、批间 10 次重复性检测, 显示重复性良好 (表 2)。

3. 临床标本检测: 使用建立的 TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 和 VIDAS 同时检测 50 例临床不明原因腹泻患者粪便标本, 结果见表 3。

讨 论

目前鉴定难辨梭菌的实验室诊断方法包括厌氧培养、细胞毒性试验、菌体及毒素抗原检测、毒素基因扩增检测等, 其中毒素检测和培养细胞的毒素中和试验是目前实验室检测难辨梭菌的金标准。这些方法的共性是实验条件要求高、操作复杂、时间长、灵敏度低, 菌属及毒素鉴定无法同时完成, 大部分临床实验室无条件开展。利用普通 PCR 和琼脂糖凝胶电泳检测难辨梭菌毒素 A 和 B, 是分子生物学实验室常用的检测方法。与细胞毒性试验金标准相比, 具有灵敏度高, 特异度稍低, 仅检测毒素等特点^[2]。本研究应用 TaqMan-MGB 探针能够区分一个碱基的差异, 只有完全配对, 才有荧光检测信号。其优势是提高信噪比, 无背景荧光, 并拥有更高的淬灭效率, 探针设计较短, 因此该方法与常规 PCR 相比其灵敏度和特异度均较理想。

基于上述原理, 本研究利用 TaqMan-MGB 探针特点建立了具有高灵敏性和特异性的 *tpi*、*tcdA*、*tcdB* 及 *tcdAT* 联合检测方法, 可同时进行菌属鉴定及其毒素检测。通过检测难辨梭菌菌属基因 *tpi* 的特异性片段进行准确的菌种鉴定, 从而替代传统生化反应法和气液色谱分析法。研究表明, 阴性对照菌包括梭菌属在内的 5 株标准菌株 (均为难辨梭菌的近缘

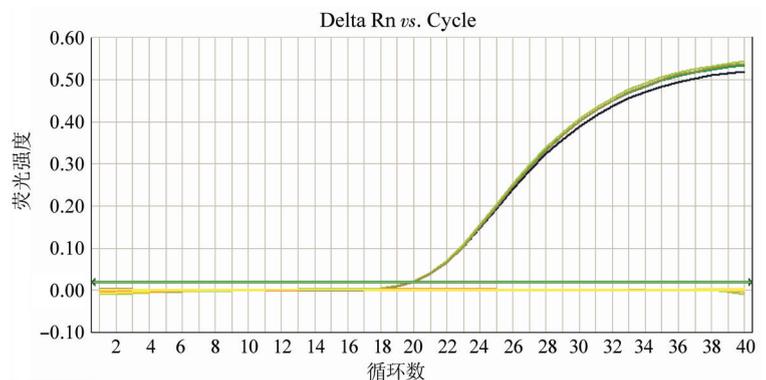


图 1 难辨梭菌 ATCC9689 产毒株 *tpi*、*tcdA*、*tcdB* 及 *tcdAT* 基因联合检测扩增曲线

表 2 难辨梭菌 *tpi*、*tcdA*、*tcdB*、*tcdAT* 检测下限批内和批间的 CV 值 (%)

检测基因	批内		批间	
	s_x	CV (%)	s_x	CV (%)
<i>tpi</i> (产毒株)	1.057	3.0	1.186	3.4
<i>tcdA</i>	1.010	2.9	1.102	3.2
<i>tcdB</i>	1.808	5.3	2.014	5.7
<i>tcdAT</i>	0.856	2.7	0.989	2.8
<i>tpi</i> (非产毒株)	0.720	2.1	0.783	2.3

表 3 50 例临床不明原因腹泻患者粪便标本难辨梭菌 *tpi*、*tcdA*、*tcdB*、*tcdAT* 检测结果

病例数	VIDAS 检测结果	TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 检测				难辨梭菌检出情况
		<i>tpi</i>	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>tcdAT</i>	
39	-	-	-	-	-	非难辨梭菌
5	+	+	+	+	+	难辨梭菌 A+/B+ 株
1	+	+	+	+	-	难辨梭菌 A-/B+ 株
3	-/+	+	+	+	-	难辨梭菌 A-/B+ 株
2	-	+	+	+	-	难辨梭菌 A-/B+ 株

注: -/+ 为可疑

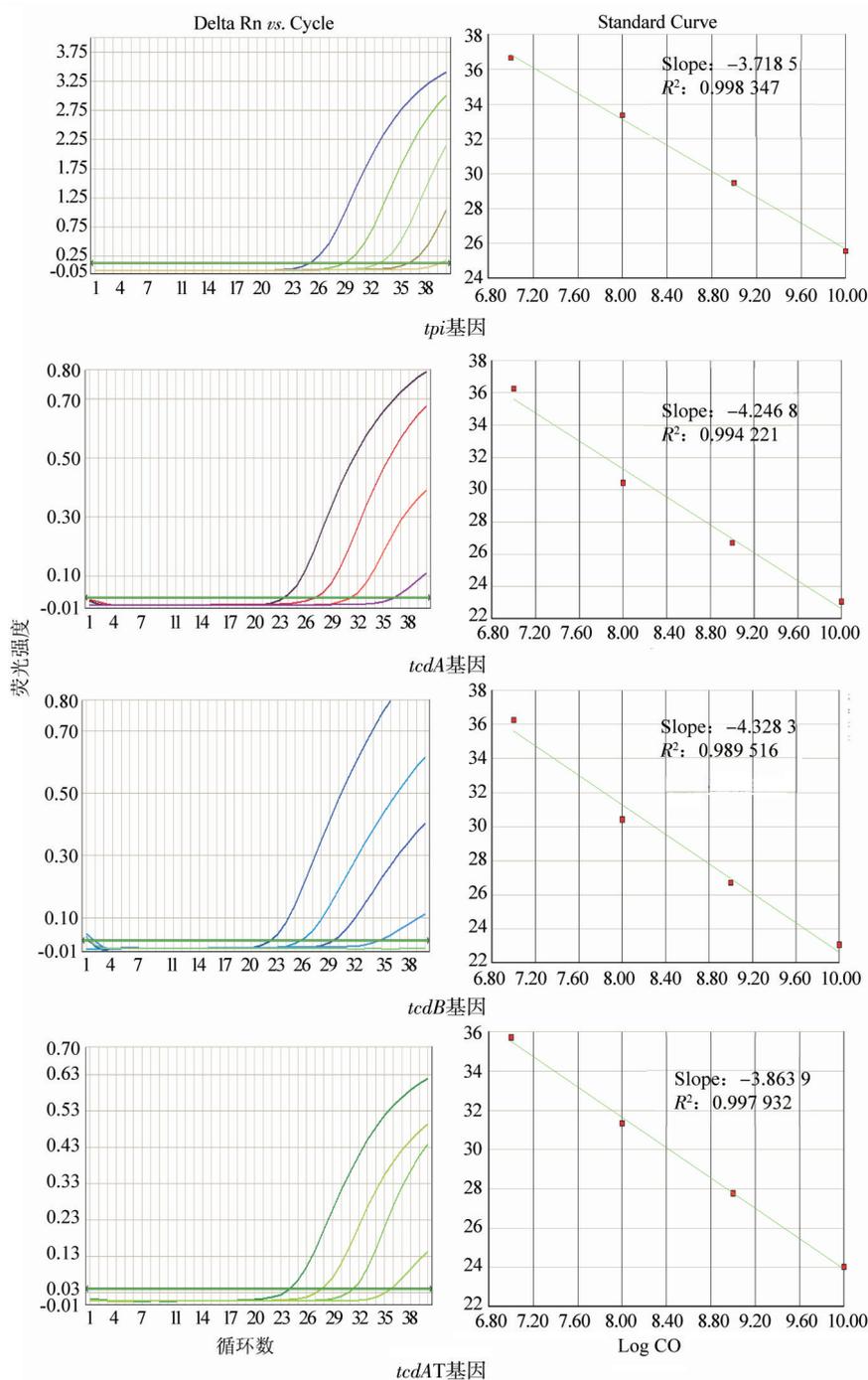


图2 难辨梭菌 ATCC9689 产毒株 *tpi*、*tcdA*、*tcdB* 和 *tcdAT* 基因检测下限扩增曲线及其斜率

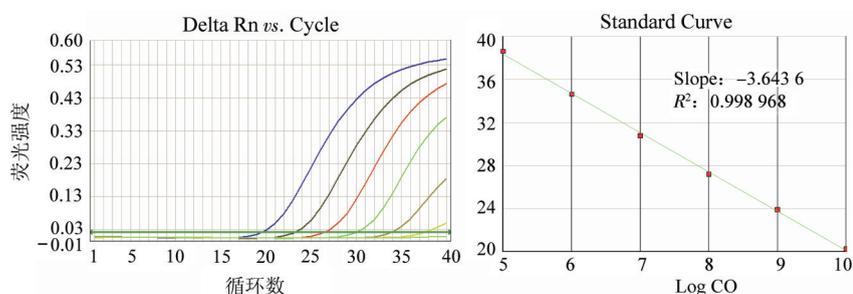


图3 难辨梭菌非产毒株 ATCC43593 的 *tpi* 基因检测下限扩增曲线及其斜率

菌株)鉴定结果准确无误。梭菌属中的索氏梭菌基因组序列与艰难梭菌相似,特别是难辨梭菌 *tcdB* 基因与索氏梭菌的细胞毒素基因高度匹配,可利用 MGB 探针的特点将两者很好地区分开。干扰性实验中,阴性对照菌株对难辨梭菌的检测无干扰,进一步证实该方法的特异性和稳定性。难辨梭菌分为产毒和非产毒难辨梭菌,可能产毒株的基因组明显大于非产毒株,造成相同浊度的菌悬液中含有的 *tpi* 基因拷贝数产毒株要高于非产毒株,导致同一方法检测产毒株 4 个基因的检测下限为 0.035 ng。非产毒株菌属基因 *tpi* 的检测下限为 0.003 5 ng。根据 0.5 个麦氏单位大致相当于 1×10^8 CFU/ml, 2 个麦氏单位大致相当于 6×10^8 CFU/ml 计算,难辨梭菌非产毒株的检测下限为 6×10^{-2} CFU/ μ l, 产毒株的检测下限为 6×10^{-1} CFU/ μ l。与国内外相关文献报道相比^[3-6],灵敏度明显高于 PCR 琼脂糖电泳法与常规 real-time PCR。对 *tpi*、*tcdA*、*tcdB* 及 *tcdAT* 的检测下限做批内、批间重复性测试,最大变异率为 *tcdB*, 分别为 5.3% 和 5.7%,其敏感性和重复性均可满足临床需要。

难辨梭菌相关性腹泻患者分离出的菌株通常可产生 A 和 B 两种毒素,但部分菌株为 A-/B+ 菌株,即 A 毒素编码基因存在部分缺失。由于 B 毒素潜在的肠毒素活性或与其他毒素联合作用,A-/B+ 菌株仍可导致严重的难辨梭菌相关性腹泻。有研究显示,从上海地区医院初次感染患者中分离的 56 株难辨梭菌产毒株,有 13 株 (23.2%) 为 A-/B+ 株^[7]。程颖等^[8]报道在分离的 8 株难辨梭菌产毒株中,有 3 株 (37.5%) 为 A-/B+ 菌。可见 A-/B+ 菌株在我国

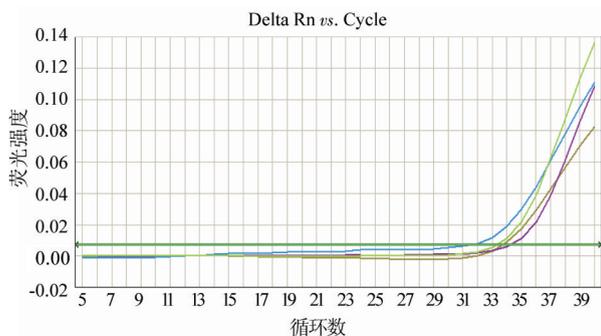


图4 难辨梭菌 ATCC9689 产毒株干扰性试验

感染患者中具有较高比例。目前临床检测难辨梭菌毒素大多使用 VIDAS^[9,10]。该方法对 A+ 菌株检测阳性率为 100%，但对 A-/B+ 菌株的检测阳性率为 83%（根据试剂盒说明书），有文献报道仅为 70.7%^[11]。因此本研究根据 A 毒素部分缺失株的特点设计引物，在 *tcdA* 基因的下半段，即 A 毒素发生缺失的部分设计了 *tcdAT* 的引物及探针。当 *tcdA* 扩增为阳性而 *tcdAT* 扩增为阴性时，可判断为 A-/B+ 菌株；两者均为阳性时，为 A+/B+ 菌株。本文 50 例临床不明原因腹泻患者粪便标本检测结果显示，TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR（本方法）阴性结果与 VIDAS 检测符合率为 100%；即 VIDAS 检测为阳性，本方法也为阳性；VIDAS 检测结果为可疑，本方法检测为 A-/B+ 菌株；2 例 VIDAS 检测为阴性，本方法检测为 A-/B+ 菌株。由此可见，本研究建立的方法可弥补酶免疫方法的缺陷，提高难辨梭菌 A 毒素部分基因缺失产毒株的筛查，减少漏诊的发生。

American Journal of Gastroenterology 的难辨梭菌诊断、治疗及预防指南（2013 版）中强烈推荐核酸检测，并指出核酸检测优于酶免疫方法^[12]。本研究建立的 TaqMan-MGB 探针实时荧光 PCR 可高敏感检测难辨梭菌菌属基因及毒素基因，具有良好的检测灵敏度和重复性，适合临床应用。

参 考 文 献

[1] 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(12): 5710-5714.
 [2] Planche T, Aghaizu A, Holliman R, et al. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection by toxin detection kits: a systematic review [J].

Lancet Infect Dis, 2008, 8(12): 777-784.
 [3] Jia HB, Wang J, Yang H, et al. Establishment of multiplex PCR for the rapid identification and toxin detection of *Clostridium difficile* strains [J]. Chin J Microbiol Immunol, 2011, 31(8): 755-759. (in Chinese)
 贾红兵, 王静, 杨辉, 等. 艰难梭菌分离株快速鉴定和毒素检测的多重 PCR 方法的建立 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2011, 31(8): 755-759.
 [4] Shao JD, Wu L, Wang YQ, et al. Rapid detection of *Clostridium difficile* in human stool by real-time fluorescence PCR [J]. Chin J Health Lab Technol, 2011, 21(7): 1604-1606. (in Chinese)
 邵景东, 吴琳, 王毅谦, 等. 实时荧光 PCR 快速检测粪便中艰难梭菌方法 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(7): 1604-1606.
 [5] Kim H, Jeong SH, Kim M, et al. Detection of *Clostridium difficile* toxin A/B genes by multiplex real-time PCR for the diagnosis of *C. difficile* infection [J]. J Med Microbiol, 2012, 61 (Pt 2): 274-281.
 [6] de Jong E, de Jong AS, Bartels CJ, et al. Clinical and laboratory evaluation of a real-time PCR for *Clostridium difficile* toxin A and B genes [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2012, 31(9): 2219-2225.
 [7] Huang H, Wu S, Wang M, et al. *Clostridium difficile* infections in Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotyping [J]. Int J Antimicrob Agents, 2008, 12: 19.
 [8] Cheng Y, Lu JX, Yan SK, et al. Study on toxin characteristics of *Clostridium difficile* isolated from hospital [J]. Dis Surveill, 2009, 24(3): 193-195. (in Chinese)
 程颖, 卢金星, 鄢盛恺, 等. 临床分离艰难梭菌毒素携带特征研究 [J]. 疾病监测, 2009, 24(3): 193-195.
 [9] Alcalá L, Marín M, Madrid M, et al. Comparison of immunocard toxins A & B and the new semiautomated vidas *Clostridium difficile* toxin A & B tests for diagnosis of *C. difficile* infection [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(3): 1014-1015.
 [10] Herrera-Cáceres JO, Camacho-Ortiz A, Galindo-Fraga A, et al. Concordance between two enzyme immunoassays for the detection of *Clostridium difficile* toxins [J]. Arch Med Res, 2010, 41(2): 92-96.
 [11] Shin BM, Lee EJ, Kuak EY, et al. Comparison of VIDAS CDAB and CDA immunoassay for the detection of *Clostridium difficile* in a *tcdA*-*tcdB*+ *C. difficile* prevalent area [J]. Anaerobe, 2009, 15(6): 266-275.
 [12] Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections [J]. Am J Gastroenterol, 2013, 108: 478-498.

(收稿日期: 2013-11-18)

(本文编辑: 张林东)