

· 实验室研究 ·

不同来源产气荚膜梭菌 β_2 毒素编码基因的 PCR 检测方法建立及遗传多态性分析

郑浩然^{1,2} 王媛媛² 白璐璐² 钟佳鑫² 卢金星² 吴媛² 邓慧玲³¹陕西中医药大学, 西安 712046; ²中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206; ³西安市中心医院, 西安 710003

通信作者: 吴媛, Email: wuyuan@icdc.cn; 邓慧玲, Email: denghuiling70@126.com

【摘要】 目的 建立并优化产气荚膜梭菌 β_2 毒素编码基因(*cpb₂*)和非典型 *cpb₂*(*aty-cpb₂*)的 PCR 检测方法, 分析 2016–2021 年中国 9 个地区 *cpb₂* 流行特征和遗传多态性。方法 使用 PCR 方法对 188 株产气荚膜梭菌菌株的 *cpb₂* 进行检测, 通过全基因组测序获取 *cpb₂* 序列以分析其遗传多态性, 使用 Mega 11、Makeblastdb 软件对 110 株产气荚膜梭菌所携带的 *cpb₂* 构建系统发育树并建库, 通过 Blastn 算法比对后得出 *cpb₂* 两种不同基因型, 即共有 *cpb₂*(*con-cpb₂*)和 *aty-cpb₂* 之间的序列相似性。结果 针对产气荚膜梭菌 *cpb₂* 和 *aty-cpb₂* 建立及改进的 PCR 检测方法的特异性好。 *cpb₂* 的 PCR 检测结果与全基因组测序结果高度一致 (Kappa=0.946, $P < 0.001$)。来自中国 9 个地区的菌株中共有 107 株菌携带 *cpb₂*, 94 株 A 型菌株携带 *aty-cpb₂*, 6 株 A 型菌株携带 *con-cpb₂*, 7 株 F 型菌株携带 *aty-cpb₂*。两种不同基因型的 *cpb₂* 核苷酸序列相似性为 68.97%~70.97%, 相同基因型的 *cpb₂* 核苷酸序列相似性为 98.00%~100.00%。结论 本研究建立了特异性好、一致性高的 *cpb₂* 的 PCR 检测方法, 并针对既往检测 *aty-cpb₂* 的 PCR 方法特异性差的缺陷进行了改进。 *cpb₂* 以 *aty-cpb₂* 为主且 *cpb₂* 的不同基因型之间核苷酸序列差异大。

【关键词】 产气荚膜梭菌; β_2 毒素; 遗传多态性**基金项目:** 国家重点研发计划(2021YFC2301000); 传染病预防控制国家重点实验室自主研究课题(2021SKLID207)

Establishment of PCR assays and genetic polymorphism analysis of genes encoding *Clostridium perfringens* β_2 toxin from different sources

Zheng Haoran^{1,2}, Wang Yuanyuan², Bai Lulu², Zhong Jiaxin², Lu Jinxing², Wu Yuan², Deng Huiling³¹Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712046, China; ²National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; ³Xi'an Central Hospital, Xi'an 710003, China

Corresponding authors: Wu Yuan, Email: wuyuan@icdc.cn; Deng Huiling, Email: denghuiling70@126.com

【Abstract】 **Objective** To establish and optimize PCR methods for the gene encoding of *Clostridium perfringens* β_2 toxin (*cpb₂*) and atypical-*cpb₂* (*aty-cpb₂*), analyze the epidemiological characteristics and genetic polymorphism of the *cpb₂* of *Clostridium perfringens* in 9 Chinese areas from 2016 to 2021. **Methods** The *cpb₂* of 188 *Clostridium perfringens* strains were examined by PCR; the *cpb₂* sequences were acquired by whole-genome sequencing to analyze the genetic polymorphism. Using Mega 11 and the Makeblastdb tool, a phylogenetic tree, and *cpb₂*-library based on 110 strains carrying the *cpb₂* were produced. Using the Blastn technique, a comparison was made to discover sequence similarity between consensus-*cpb₂* (*con-cpb₂*) and *aty-cpb₂*. **Results** The

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220819-00718

收稿日期 2022-08-19 本文编辑 张婧

引用格式: 郑浩然, 王媛媛, 白璐璐, 等. 不同来源产气荚膜梭菌 β_2 毒素编码基因的 PCR 检测方法建立及遗传多态性分析[J]. 中华流行病学杂志, 2023, 44(4): 636-642. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220819-00718.Zheng HR, Wang YY, Bai LL, et al. Establishment of PCR assays and genetic polymorphism analysis of genes encoding *Clostridium perfringens* β_2 toxin from different sources[J]. Chin J Epidemiol, 2023, 44(4): 636-642. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20220819-00718.

specificity of PCR assay for the *cpb₂* and *aty-cpb₂* was verified. The PCR results for *cpb₂* amplification were highly consistent with the whole-genome sequencing approach (Kappa=0.946, $P<0.001$). A total of 107 strains from nine regions in China carried *cpb₂*, 94 types A strains carried *aty-cpb₂*, 6 types A strains carried *con-cpb₂*, and 7 types F strains carried *aty-cpb₂*. The nucleotide sequence similarity between the two coding genes was 68.97%-70.97%, and the similarity between the same coding genes was 98.00%-100.00%. **Conclusions** In this study, a specific PCR method for *cpb₂* toxin was developed, and the previous PCR method for detecting *aty-cpb₂* was improved. *aty-cpb₂* is the primary gene encoding of β_2 toxin. There is a significant nucleotide sequence variance between the various *cpb₂* genotypes.

【Key words】 *Clostridium perfringens*; β_2 toxin; Genetic polymorphism

Fund programs: National Key Research and Development Program of China (2021YFC2301000); Open Project Supported by State Key Laboratory of Infectious Disease Prevention and Control (2021SKLID207)

产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)是一种革兰染色阳性并且对外界环境具有较强抵抗能力的厌氧菌。广泛分布于自然界的土壤、水以及健康动物(包括人类)的胃肠道当中,能够利用自身产生的 20 余种毒素在人类和动物中引发气性坏疽、坏死性肠炎、食物中毒、抗生素相关性腹泻(AAD)等疾病^[1]。

毒素分型方法是以产气荚膜梭菌菌株分类系统的基础,不同类型疾病与菌株的毒素型别息息相关,该方法于 2018 年被修订为 7 种类型即 A~G 型(此前为 A~E 型)^[2]。除此之外,不同类型的菌株还可能携带一种或多种不参与分型的次要毒素,如产气荚膜梭菌溶素 O/θ 毒素、 β_2 毒素等^[3]。目前,参与分型的主要毒素在引发相关疾病的发病机制中已经得到充分的证明,但是大部分次要毒素(如 β_2 毒素、唾液酸酶等)在致病过程中发挥的作用仍不清楚^[3-4]。

产气荚膜梭菌 β_2 毒素编码基因(*cpb₂*)位于质粒,具有 2 种等位基因形式:共有 *cpb₂*(*con-cpb₂*)和非典型 *cpb₂*(*aty-cpb₂*)^[5]。共有 β_2 毒素蛋白和非典型 β_2 毒素蛋白之间具有 62.0% 的氨基酸一致性和 80.0% 的相似性,非典型 β_2 毒素蛋白之间的氨基酸一致性为 96.2%~98.9%,相似性为 97.0%~99.2%^[6]。该毒素自从仔猪分离的产气荚膜梭菌菌株中发现以来,许多研究认为 *con-cpb₂* 常见于猪的分离物中,*aty-cpb₂* 则更常见于产气荚膜梭菌的非猪分离物中^[6-7]。最近的研究显示,儿童自闭症可能与产气荚膜梭菌 β_2 毒素有关,但由于目前尚不清楚该毒素在菌株致病过程中发挥的作用,其病因学意义仍不清楚^[8-9]。

为了解和探究我国产气荚膜梭菌 β_2 毒素的遗传多态性及其与主要分型毒素、宿主之间的关系,

本研究对 2016-2021 年从中国 9 个地区收集的产气荚膜梭菌共 188 株进行 *cpb₂* 的筛查,通过建立及优化的 PCR 方法分别鉴定 *cpb₂* 和 *aty-cpb₂*,结合二代测序技术,分别就地理来源、宿主来源同毒素型别与 *cpb₂* 之间的关系对菌株进行分析,并探究我国 β_2 毒素的遗传基因多态性,为我国针对产气荚膜梭菌的防控工作提供参考依据。

材料与方法

1. 菌株来源:2016-2021 年,本课题组在 AAD 的日常监测工作中分离得到 188 株产气荚膜梭菌。其中,62 份粪便样本来自 AAD 患者,86 份粪便样本来自健康人群,14 份样本来自被产气荚膜梭菌污染的食物,其余 26 份样本分别来自于羊、牛、猪的粪便。

2. 菌株分离纯化鉴定:将疑似被产气荚膜梭菌污染的食品、动物粪便及人类粪便样本用浓度 95% 的乙醇休克处理后在 72 h 内送至本实验室。样本在 5% 羊血琼脂板上 37 °C 厌氧培养 24 h,挑选出疑似为产气荚膜梭菌的菌落(圆形、扁平、半透明、边缘整齐,在血平板上有双层溶血环)。通过 16S rDNA 序列测序的方法对这些细菌进行种属鉴定,在美国国立生物技术信息中心(NCBI)网站进行比对,以确定是否为产气荚膜梭菌,将鉴定后的菌株保存在 -80 °C 冰箱中。

3. 菌株基因组 DNA 的提取:取 10 μ l 产气荚膜梭菌菌株接种至 5%~8% 羊血琼脂板,37 °C 厌氧培养 24 h,将纯化培养后的菌落悬浮在 1.0 ml 的蒸馏水中,12 000 r/min 离心 2 min 后弃去悬液,使用细菌基因组提取试剂盒(天根生物科技公司),按说明书步骤进行核酸提取。

4. 引物设计与毒素基因的检测:使用 Oligo 7.6 软件设计引物,并在 Primer-Blast 网站上验证引物的特异性。采用 PCR 方法对 *cpb₂* 进行检测,扩增反应体系为 25.0 μ l,模板 DNA 2.0 μ l,正、反向引物各 1.0 μ l,水 8.5 μ l, Taq Premix (TaKaRa, 日本) 12.5 μ l。扩增的特异性片段使用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳法进行结果分析,每次实验均设置阴性对照。

5. 全基因组测序:根据 Illumina 公司提供的标准执行,使用细菌全基因组提取试剂(Promega, 美国)对核酸进行提取,使用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo, 美国)测定核酸浓度,使用 5400 Fragment Analyzer System (Agilent, 美国)评价核酸质量和序列完整性。使用 Illumina Nova 技术对 188 株产气荚膜梭菌进行测序,提取获得 *cpb₂* 的核苷酸序列。

6. β_2 毒素基因的遗传分析:使用 Mega 11 软件的最大似然法构建 *cpb₂* 的系统发育树,Bootstrap 设置 1 000 次。*cpb₂* 系统发育树中 L77965 等参考序列选自 DNA 序列数据库 (GenBank)。使用 Makeblastdb 软件将 110 株菌株(107 株实验室菌株所携带的 *cpb₂* 序列+3 条来自 GenBank 的 *cpb₂* 序列)所携带的 *cpb₂* 进行建库,使用 Blastn 算法进行比对,*E* 值设置为 1.0×10^{-2} ,从而得出 *con-cpb₂* 和 *aty-cpb₂* 之间的相似性。

7. 统计学分析:采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,使用配对设计的 χ^2 检验比较 PCR 方法与全基因组测序检测到的 *cpb₂* 的结果是否存在差异,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。引入一致性检验作为评价判断一致性程度的指标, $0.81 \leq \text{Kappa} \leq 1.00$ 且 $P < 0.05$ 说明两种方法具有高度的一致性。

结 果

1. 引物设计:本研究设计了一对引物(引物 1)对 *cpb₂* 进行检测,并对 Jost 等^[7]在检测 *aty-cpb₂* 时所使用的引物(引物 2)进行了改进(表 1)。两对引物的设计及改进原则见图 1。

2. 特异性验证及一致性评价:基于引物 1 的 PCR 方法使用艰难梭菌、肉毒梭菌和水作为阴性对照,基于引物 2 的 PCR 方法使用艰难梭菌、肉毒梭菌、携带 *con-cpb₂* 的产气荚膜梭菌菌株以及水作为阴性对照,两对引物的阴性对照中均不存在扩增反应,证实了两对引物的特异性。配对设计 χ^2 检验及一致性检验显示,使用引物 1 的 PCR 方法对 *cpb₂* 的

表 1 检测 *cpb₂* 及 *aty-cpb₂* 的引物序列和扩增条件

引物名称	目的基因	引物序列(5'-3')	引物来源
引物 1	<i>cpb₂</i>	CPB ₂ -F ₁ : TTYAAATATGATCCTAACCAA	本研究
		CPB ₂ -R ₁ : TCATCCCATGTACAAACTTGAG	
引物 2	<i>aty-cpb₂</i>	atyCPB ₂ -F: ATTATGTTTAGRAATACAGTTA	文献[7]
		atyCPB ₂ -R: CAATAWCCTTCACCAAATACT	

注:*cpb₂*:产气荚膜梭菌 β_2 毒素编码基因;*aty-cpb₂*:非典型 *cpb₂*; 两对引物扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min;4 $^{\circ}$ C 保存

检测结果与全基因组测序方法对 *cpb₂* 的检测结果无差异且两种方法的检测结果高度一致($\chi^2=0.80$, $P=0.375$; $\text{Kappa}=0.946$, $P < 0.001$)。见表 2。

3. β_2 毒素分型及测序鉴定:全基因组的测序结果显示,共有 106 株携带 *cpb₂* 的产气荚膜梭菌菌株,其中携带 *con-cpb₂* 的菌株共 6 株,携带 *aty-cpb₂* 的菌株共 100 株。基于引物 1 的 PCR 检测方法筛选出 103 株携带 *cpb₂* 的菌株,基于引物 2 的 PCR 检测方法筛选出 101 株携带 *aty-cpb₂* 的菌株。对两种 PCR 结果为阳性而全基因组结果显示为阴性的扩增产物进行测序,将该序列在 GenBank 上进行 BLAST 序列比对,最终鉴定该菌株所携带的 *cpb₂* 为 *aty-cpb₂*。

4. 不同地理来源、毒素型别和 *cpb₂* 之间的流行特征分析:收集到的菌株中大多数来自山东省(84/188, 44.7%),然后依次为河北省(47/188, 25.0%)、云南省(16/188, 8.5%)、广西壮族自治区(14/188, 7.4%)、浙江省(11/188, 5.8%)、北京市(6/188, 3.2%)、陕西省(6/188, 3.2%)以及湖南省(2/188, 1.1%)和四川省(2/188, 1.1%)。见表 3。*cpb₂* 在各地区之间的流行情况虽然差异无统计学意义,但 *aty-cpb₂* 和 *con-cpb₂* 两种等位基因在山东省、云南省出现的相对频率分别为 65.5%(55/84)、18.8%(3/16),而其他地区则分别为 44.2%(46/104)、1.7%(3/172)。

虽然来自各地的菌株数量不尽相同,但是大多数菌株为 A 型(174/188, 92.6%)。唯一的 D 型来自河北省,唯一的 E 型来自山东省,二者均未携带 β_2 毒素,其余皆为 F 型菌株(12/188, 6.4%)。*aty-cpb₂* 是编码 β_2 毒素的主要基因型,在 A 型菌株中被检测发现,在 7 株携带 β_2 毒素的 F 型菌株中均被检测发现,而 *con-cpb₂* 仅在 6 株 A 型菌株中检测发现。见表 3。

CPB ₂ -F ₁	a	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	c
	b	T	T	Y	A	A	A	T	A	T	G	A	T	C	C	d
	L77965	.	.	T	
	MH900548.1	.	.	C	
	AY609183.1	.	.	T	
AY609161.1	.	.	T		
CPB ₂ -R ₁	a	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	c
	b	T	C	A	T	C	C	C	A	T	G	T	A	C	A	d
	L77965	
	MH900548.1	
	AY609183.1	
AY609161.1		
atyCPB ₂ -F	a	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	c
	b	A	T	T	A	T	G	T	T	T	A	G	R	A	A	d
	CP180	A	.	.	
	CP90	A	.	.	
	AY609161.1	G	.	.	
AY609183.1	G	.	.		
atyCPB ₂ -R	a	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	c
	b	C	A	A	T	A	W	C	C	T	T	C	A	C	C	d
	CP180	A	
	CP90	A	
	AY609161.1	T	
AY609183.1	T		

注：^a引物；^b目的基因(L77965、MH900548.1为 *con-cpb₂* 序列, AY609183.1、AY609161.1为 *aty-cpb₂* 序列, 来自 GenBank; CP180、CP90为 *aty-cpb₂* 的序列, 来自本实验室); ^c目的基因核苷酸序列位点; ^d引物序列方向为目的基因序列方向的 5'~3'

图 1 两种引物兼并碱基的设计及改进原则

表 2 基于引物 1 的 PCR 检测结果与全基因组测序结果

引物 1 的 PCR 检测结果	全基因组测序结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	102	4	106
阴性	1	81	82
合计	103	85	188

5. 不同宿主来源、毒素型别和 *cpb₂* 之间的流行特征: 在 188 株菌株中, A 型普遍存在于不同种类的

分离物中, 携带 *cpb₂* 的情况并不相同。唯一的 D 型来自人类, 唯一的 E 型来自羊, 二者均不含 *cpb₂*。12 株 F 型菌株中, 11 株来自人类, 1 株来自食物, 所携带的 *cpb₂* 均为 *aty-cpb₂*。

共有 148 株产气荚膜梭菌菌株来自人类, 这些菌株分别为 A 型 (136/148, 92.0%)、D 型 (1/148, 0.6%)、F 型 (11/148, 7.4%)。 *cpb₂* 主要以 *aty-cpb₂* 形式存在于 A 型菌株当中 (72/148, 48.7%), 以

表 3 不同地理来源、毒素型别和 *cpb₂* 间的流行特征

毒素型别	<i>cpb₂</i> 携带情况	省 份									合计
		北京	广西	河北	湖南	山东	陕西	四川	云南	浙江	
A	未携带	3(50.0)	3(21.4)	28(59.6)	-	26(31.0)	3(50.0)	1(50.0)	9(56.3)	1(9.1)	74(39.4)
	<i>aty-cpb₂</i>	2(33.0)	10(71.4)	15(31.9)	2(100.0)	51(60.7)	2(33.0)	1(50.0)	3(18.8)	8(72.7)	94(50.0)
	<i>con-cpb₂</i>	1(17.0)	-	1(2.1)	-	1(1.2)	-	-	3(18.8)	-	6(3.2)
D	未携带	-	-	1(2.1)	-	-	-	-	-	-	1(0.5)
E	未携带	-	-	-	-	1(1.2)	-	-	-	-	1(0.5)
F	未携带	-	-	2(4.3)	-	1(1.2)	-	-	1(6.1)	1(9.1)	5(2.7)
	<i>aty-cpb₂</i>	-	1(7.2)	-	-	4(4.7)	1(17.0)	-	-	1(9.1)	7(3.7)
合计		6(100.0)	14(100.0)	47(100.0)	2(100.0)	84(100.0)	6(100.0)	2(100.0)	16(100.0)	11(100.0)	188(100.0)

注: *cpb₂*: 产气荚膜梭菌 β₂ 毒素编码基因; *aty-cpb₂*: 非典型 *cpb₂*; *con-cpb₂*: 共有 *cpb₂*; 括号外数据为分离株的数量, 括号内数据为分离株占省份、毒素型别情况的构成比 (%); -: 未从该地区分离到对应类型的菌株

*con-cpb₂*形式存在于 A 型菌株的 β_2 毒素仅为 3.4% (5/148), 其余皆为未携带 β_2 毒素的 A 型菌株 (59/148, 39.9%)。F 型菌株中检测到含有 β_2 毒素的菌株所携带的编码基因均为 *aty-cpb₂* (6/11, 54.6%), 其余全部为未携带 β_2 毒素的 F 型菌株 (5/11, 45.4%)。

从 14 株食物来源分离出的菌株中, 大多数菌株为 A 型且携带编码基因为 *aty-cpb₂* 的 β_2 毒素 (10/14, 71.4%), 仅 1 株为 F 型菌株携带 β_2 毒素且编码基因为 *aty-cpb₂*。

从 26 株动物来源分离出的菌株中, 毒素型别分别为 A 型 (25/26, 96.2%)、E 型 (1/26, 3.8%)。2 株分离自牛的菌株均携带 β_2 毒素且编码基因均为 *aty-cpb₂*。分离自羊的菌株共 23 株, 检测到携带 β_2 毒素的有 10 株, 均为 A 型且编码基因均为 *aty-cpb₂* (10/23, 43.5%), 其余菌株均未携带 β_2 毒素 (12/23, 52.2%)。仅 1 株菌株分离自猪, 该菌株携带 β_2 毒素且编码基因为 *con-cpb₂*。见表 4。

6. β_2 毒素基因的遗传多态性: 以 *con-cpb₂* 的原型 (L77965) 及 *aty-cpb₂* 原型 (AY609183、AY609161) 作为参照, 在 *cpb₂* 的系统发育树中鉴定了两个谱系 (第 1 组和第 2 组)。第 1 组包含本研究 101 株菌株携带的 *aty-cpb₂* 核苷酸序列和 19 株来自 GenBank 的 *aty-cpb₂* 核苷酸序列, 第 2 组包含本研究 6 株菌株携带的 *con-cpb₂* 核苷酸序列和 13 株来自 GenBank 的 *con-cpb₂* 核苷酸序列。本研究的 *cpb₂* 核苷酸序列中, 第 1 组和第 2 组之间的 *cpb₂* 序列相似性为 68.97%~70.97%, 第 1 组组内的 *cpb₂* 序列相似性均 >98.00%, 与 AY609183、AY609161 的相似性分别为 97.99%~100.00%、97.24%~99.87%; 第 2 组组内的 *cpb₂* 序列相似性为 100.00%, 与 L77965 的相似性为 90.85%。通常, 对产气荚膜梭菌 β_2 毒素进行遗传多态性分析时, 引入产气荚膜梭菌 β_2 毒素核苷酸序列作为外

群。见图 2。

讨 论

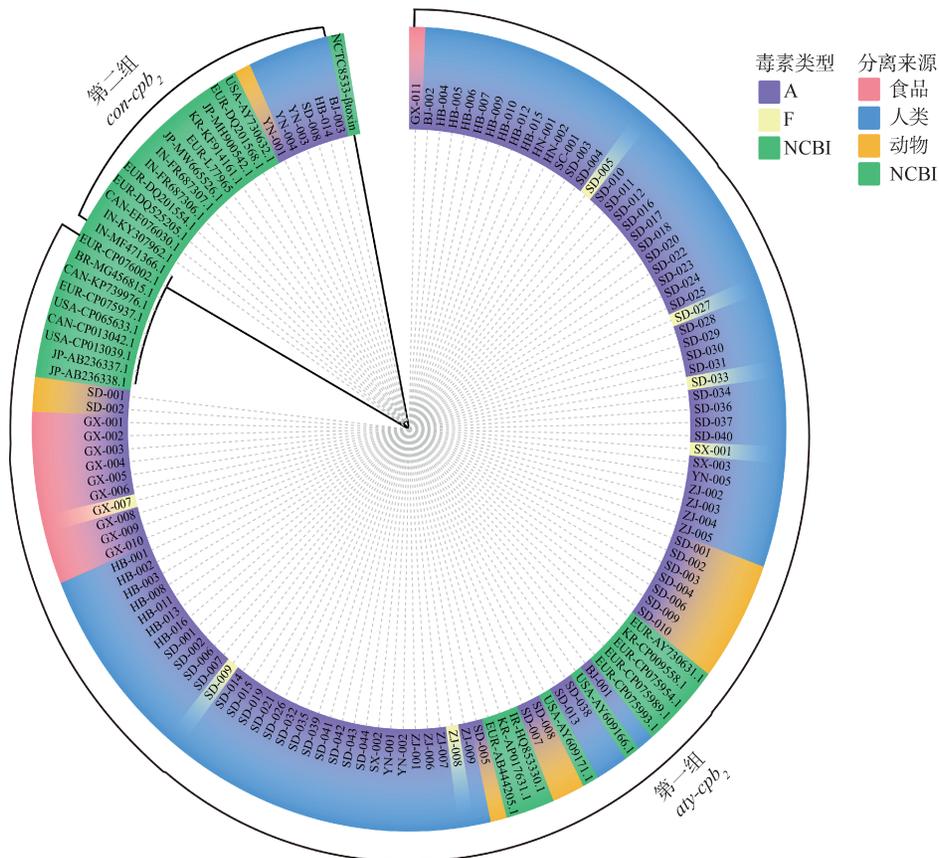
目前研究尚无法确定 β_2 毒素在发病机制中的真正作用, 早期研究认为携带 β_2 毒素的产气荚膜梭菌比未携带该毒素的菌株更容易导致易感宿主发生更明显的坏死性肠道病变, 但是这项研究中并未使用携带相同 β_2 毒素编码基因的菌株, 并且除 β_2 毒素以外的混杂因素也可能影响病变的严重程度^[7,10]。除在自闭症患儿的粪便中发现了该毒素的存在外, β_2 毒素可能也在早产儿坏死性小肠结肠炎的发病过程中发挥一定作用^[11]。由于缺乏特异性试剂 (如针对 β_2 毒素蛋白的单克隆抗体) 和/或可用的高度纯化抗原, β_2 毒素在分子水平上的作用机制仍然未知^[12], 国内外学者正在开发一种有效的特定试剂以了解 β_2 毒素真正的生物学功能以及在致病过程中发挥的真正作用^[6,13]。本研究发现, 在检测过程中使用扩增体系、程序与既往研究一致的情况下, 检测效果较差。因此, 本研究建立了一种全新 *cpb₂* 的 PCR 检测方法并对先前检测 *aty-cpb₂* 的 PCR 方法进行了改进, 并对两种 PCR 方法进行了特异性验证, 结果显示, 该方法消除了之前检测 *aty-cpb₂* 时产生非特异性扩增条带影响结果判断的劣势。

本研究中提供了有关中国存在的不同产气荚膜梭菌毒素型别中 *cpb₂* 在不同地区、不同宿主之间的分布情况。遗传多态性分析表明, *cpb₂* 的不同基因型之间核苷酸序列差异大。本研究在对携带 β_2 毒素的菌株在毒素分型的基础上进行遗传分组并引入原型相关组, 更好地确定了该毒素编码基因的不同基因型在我国不同物种和不同地区间的流行情况。

表 4 不同宿主来源、毒素型别和 *cpb₂* 之间的流行特征分析

毒素型别	<i>cpb₂</i> 携带情况	宿主来源					合计
		人类	羊	牛	猪	食物	
A	未携带	59(39.8)	12(52.2)	-	-	3(21.4)	74(39.4)
	<i>aty-cpb₂</i>	72(48.8)	10(43.5)	2(100.0)	-	10(71.4)	94(50.0)
	<i>con-cpb₂</i>	5(3.4)	-	-	1(100.0)	-	6(3.2)
D	未携带	1(0.5)	-	-	-	-	1(0.5)
E	未携带	-	1(4.3)	-	-	-	1(0.5)
F	未携带	5(3.4)	-	-	-	-	5(2.7)
	<i>aty-cpb₂</i>	6(4.1)	-	-	-	1(7.2)	7(3.7)
合计		148(100.0)	23(100.0)	2(100.0)	1(100.0)	14(100.0)	188(100.0)

注: *cpb₂*: 产气荚膜梭菌 β_2 毒素编码基因; *aty-cpb₂*: 非典型 *cpb₂*; *con-cpb₂*: 共有 *cpb₂*; -: 未从该宿主来源中分离到对应类型的菌株



注: *cpb₂*:产气荚膜梭菌β₂毒素编码基因; *aty-cpb₂*:非典型 *cpb₂*; *con-cpb₂*:共有 *cpb₂*; NCBI:美国国立生物技术信息中心; BJ、GX、HB、HN、SD、SX、SC、YN、ZJ 分别表示菌株分离地为北京、广西、河北、湖南、山东、陕西、四川、云南、浙江地区, 编号代表实验室菌株编号; EUR、USA、JP、KR、IN、CAN、BR、IR 分别表示菌株来源地为欧洲地区、美国、日本、韩国、印度、加拿大、巴西、伊朗, 编号为菌株来源地-GenBank ID; 菌株 NCTC8533 (GenBank ID: KP064408) 所携带的β₂毒素基因为外群

图2 *cpb₂*系统发育树状图

值得注意的是,β₂毒素被认为是可以广泛地存在于各种毒素型别产气荚膜梭菌中的一种次要毒素^[3,14]。但在我国中部地区一家医院进行的临床腹泻患者粪便产气荚膜梭菌的调查显示,β₂毒素的检出率仅为3.3%^[15],类似的研究在日本也得到了相似的结果,β₂毒素的检出率为1.4%^[16]。但由于本研究存在样本来源分散、时间跨度大且缺少宿主的健康状况的局限,无法分析造成检出率出现差异的原因,也无法分析不同编码基因的β₂毒素在产气荚膜梭菌引发疾病中发挥的真正作用。

本研究结果可用于监测系统,为该领域的相关学者提供有关数据以更好地控制携带β₂毒素的产气荚膜梭菌菌株所带来的危害,有助于在全国范围建立监测系统,了解由产气荚膜梭菌不同毒素型别的菌株在我国引发人类和动物相关疾病及可能存在的某些联系。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 郑浩然:查阅文献、实验操作、采集/整理/分析解释数据、论文撰写;王媛媛:数据整理、实验操作;白璐璐:采集/分析解

释数据;钟佳鑫:实验操作;卢金星:论文指导/审核;吴媛:研究设计、论文指导/修改、经费支持、论文审核;邓慧玲:论文指导/修改/审核

参 考 文 献

- [1] Revitt-Mills SA, Rood JI, Adams V, et al. *Clostridium perfringens* extracellular toxins and enzymes: 20 and counting[J]. Microbiol Austr, 2015, 36(3): 114-117. DOI: 10.1071/MA15039.
- [2] Rood JI, Adams V, Lacey J, et al. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme[J]. Anaerobe, 2018, 53: 5-10. DOI: 10.1016/j. anaerobe. 2018.04.011.
- [3] Gohari IM, Navarro MA, Li JH, et al. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*[J]. Virulence, 2021, 12(1):723-753. DOI:10.1080/21505594.2021.1886777.
- [4] Chiarezza M, Lyras D, Pidot SJ, et al. The NanI and NanJ sialidases of *Clostridium perfringens* are not essential for virulence[J]. Infect Immun, 2009, 77(10):4421-4428. DOI: 10.1128/iai.00548-09.
- [5] Gibert M, Jolivet-Renaud C, Popoff MR. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*[J]. Gene, 1997, 203(1): 65-73. DOI: 10.1016/s0378-1119(97)

00493-9.

[6] Serroni A, Magistrali CF, Pezzotti G, et al. Expression of deleted, atoxic atypical recombinant beta2 toxin in a baculovirus system and production of polyclonal and monoclonal antibodies[J]. Microb Cell Factor, 2017, 16(1): 94. DOI:10.1186/s12934-017-0707-8.

[7] Jost BH, Billington SJ, Trinh HT, et al. Atypical *cpb2* genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin[J]. Infect Immun, 2005, 73(1): 652-656. DOI:10.1128/IAI.73.1.652-656.2005.

[8] Góra B, Gofron Z, Grosiak M, et al. Toxin profile of fecal *Clostridium perfringens* strains isolated from children with autism spectrum disorders[J]. Anaerobe, 2018, 51: 73-77. DOI:10.1016/j.anaerobe.2018.03.005.

[9] Finegold SM, Summanen PH, Downes J, et al. Detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in the gut microbiota of autistic children[J]. Anaerobe, 2017, 45: 133-137. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2017.02.008.

[10] Manteca C, Daube G, Jauniaux T, et al. A role for the *Clostridium perfringens* $\beta 2$ toxin in bovine enterotoxaemia? [J]. Vet Microbiol, 2002, 86(3): 191-202. DOI:10.1016/s0378-1135(02)00008-1.

[11] Sim K, Shaw AG, Randell P, et al. Dysbiosis anticipating necrotizing enterocolitis in very premature infants[J]. Clin Infect Dis, 2015, 60(3):389-397. DOI:10.1093/cid/ciu822.

[12] Forti K, Ferroni L, Pellegrini M, et al. Molecular characterization of *Clostridium perfringens* strains isolated in Italy[J]. Toxins (Basel), 2020, 12(10):650. DOI: 10.3390/toxins12100650.

[13] Zeng J, Song FY, Yang Y, et al. The generation and characterization of *Clostridium perfringens* recombinant protein and antibodies of Beta2 toxin[J]. J Immunol Res, 2016, 2016:5708468. DOI:10.1155/2016/5708468.

[14] Li JH, Adams V, Bannam TL, et al. Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2013, 77(2):208-233. DOI:10.1128/mmb.00062-12.

[15] Wang BY, Dong WJ, Ma LY, et al. Prevalence and genetic diversity of *Clostridium perfringens* isolates in hospitalized diarrheal patients from central China[J]. Infect Drug Resist, 2021, 14:4783-4793. DOI:10.2147/idr.S338593.

[16] Matsuda A, Aung MS, Urushibara N, et al. Prevalence and genetic diversity of toxin genes in clinical isolates of *Clostridium perfringens*:coexistence of alpha-toxin variant and binary enterotoxin genes (*bec/cpile*) [J]. Toxins (Basel), 2019, 11(6):326. DOI:10.3390/toxins11060326.



读者·作者·编者

本刊常用缩略语

本刊对以下较为熟悉的一些常用医学词汇将允许直接用缩写,即在文章中第一次出现时,可以不标注中文和英文全称。

OR	比值比	HBeAg	乙型肝炎核心抗原
RR	相对危险度	HBeAg	乙型肝炎e抗原
CI	可信区间	HBsAg	乙型肝炎表面抗原
P_n	第n百分位数	抗-HBs	乙型肝炎表面抗体
AIDS	艾滋病	抗-HBc	乙型肝炎核心抗体
HIV	艾滋病病毒	抗-HBe	乙型肝炎e抗体
MSM	男男性行为者	ALT	丙氨酸氨基转移酶
STD	性传播疾病	AST	天冬氨酸氨基转移酶
DNA	脱氧核糖核酸	HPV	人乳头瘤病毒
RNA	核糖核酸	DBP	舒张压
PCR	聚合酶链式反应	SBP	收缩压
RT-PCR	反转录聚合酶链式反应	BMI	体质指数
Ct 值	每个反应管内荧光信号达到设定的 阈值时所经历的循环数	MS	代谢综合征
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳	FPG	空腹血糖
PFGE	脉冲场凝胶电泳	HDL-C	高密度脂蛋白胆固醇
ELISA	酶联免疫吸附试验	LDL-C	低密度脂蛋白胆固醇
A 值	吸光度值	TC	总胆固醇
GMT	几何平均滴度	TG	甘油三酯
HBV	乙型肝炎病毒	CDC	疾病预防控制中心
HCV	丙型肝炎病毒	WHO	世界卫生组织
HEV	戊型肝炎病毒		