DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2021.01.04

· 感染性疾病分子诊断技术 ·

GeneXpert 实时荧光定量 PCR 在诊断艰难梭菌感染中的临床应用*

程敬伟[1],刘畅[2],肖盟[3],孙宏莉[3],王瑶[3],杨启文[3],徐英春[3](1.首都医科大学附属北京友谊医院检验科,北京 100050;2.清华大学附属华信医院检验科,北京 100016;3.中国医学科学院北京协和医院检验科,北京 100730)

摘要:目的　评价 GeneXpert 实时荧光定量 PCR 法在诊断艰难梭菌感染中的应用价值。**方法**　收集住院腹泻患者非重复粪便标本 296 份,同时进行 GeneXpert 试验和产毒素培养(toxigenic culture, TC)。TC 包括厌氧培养、菌株基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)鉴定、PCR 扩增艰难梭菌毒素基因。以 TC 结果为参考,评价 GeneXpert 试验的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值,并评价 GeneXpert 试验和 TC 2 种方法结果的一致性。**结果**　GeneXpert 试验的敏感性、特异性、阳性预测值和阴性预测值分别为98.5%、92.6%、91.7%和 98.7%。GeneXpert 试验与 TC 一致性好(*Kappa* = 0.905)。GeneXpert 试验报告 2 株 RT027 型高毒力菌株,经核糖体分型确证为 RT027 型艰难梭菌。**结论**　GeneXpert 实时荧光定量 PCR 可快速、准确检测粪便标本中的艰难梭菌毒素基因,且可报告高毒力 RT027 型菌株,具有重要的临床应用价值。

关键词:艰难梭菌;GeneXpert;毒素

中图分类号:R446　　**文献标志码:**A

Clinical application of GeneXpert real-time fluorescence quantitation PCR in the diagnosis of *Clostridium difficile* infection

CHENG Jingwei[1], *LIU Chang*[2], *XIAO Meng*[3], *SUN Hongli*[3], *WANG Yao*[3], *YANG Qiwen*[3], *XU Yingchun*[3] (1. *Center of Clinical Laboratory, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing* 100050; 2. *Department of Clinical Laboratory, Beijing Huaxin Hospital, the First Affiliated Hospital of Tsinghua University, Beijing* 100016; 3. *Department of Clinical Laboratory, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing* 100730, *China*)

Abstract: Objective　To evaluate the application value of GeneXpert real-time fluorescence quantitation PCR (GeneXpert PCR) in the diagnosis of *Clostridium difficile* infection. **Methods**　A total of 296 unrepeated stool specimens were collected from the diarrhea inpatients, and toxigenic culture (TC) and GeneXpert PCR were performed, respectively. For TC, after anaerobic culture, bacterial clones were identified by the matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and the toxin genes of *Clostridium difficile were* detected by PCR. Taking TC results as a reference, the sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of GeneXpert PCR and the consistency of the results between GeneXpert PCR and TC were evaluaed. **Results**　The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of GeneXpert PCR were 98.5%, 92.6%, 91.7% and 98.7%, respectively, and there was good consistency between TC and GeneXpert PCR (*Kappa* = 0.905). Two strains of RT027 with high virulence were detected by GeneXpert PCR, and were confirmed as RT027 type *Clostridium difficile* by Ribotyping. **Conclusion**　GeneXpert real-time fluorescence quantitation PCR is able to detect the toxin genes of *Clostridium difficile* in stool specimens rapidly and accurately, and able to identify the RT027 strains with high virulence, which has important clinical application value.

Key words: *Clostridium difficile*; GeneXpert; toxin

艰难梭菌(*Clostridium difficile*)是一种产芽胞革兰阳性厌氧菌。大量应用广谱抗生素、免疫抑制剂或化疗药物可导致肠道菌群失调,艰难梭菌优势繁殖并分泌毒素而引发艰难梭菌感染(*Clostridium difficile* infection, CDI)[1]。临床上,约 10%~25%的抗生素相关性腹泻及 90%以上的伪膜性肠炎由 CDI 引起[2]。近年来,一种高毒力核糖体型别 027 型(RT027)艰难梭菌在欧美等国家大规模暴发流行,该菌株感染引起的发病率、复发率及死亡率更高[3]。目前,RT027 型菌株已在我国的北京、广州、武汉、香港和台湾等地区分离报道[4-6]。CDI 主要的诊断方法包括传统的厌氧培养法、基于酶免疫反

* **基金项目:**首都医科大学附属北京友谊医院“种子计划”人才项目(YYZZ2018B01)。

作者简介:程敬伟,1989 年生,男,博士研究生,主要从事病原微生物检验及耐药机制研究。

通信作者:徐英春,研究员,E-mail:xycpumch@139.com。

应的谷氨酸脱氢酶(GDH)和毒素 A/B 检测,以及核酸扩增技术(nucleic acid amplification tests, NAATs)检测毒素基因等,各方法的敏感性、特异性存在一定差异。GeneXpert 艰难梭菌核酸检测试剂盒基于实时荧光多重 PCR 技术,可同时检测毒素 B 基因、二元毒素基因以及 *tcdC* 基因 117 位的缺失(报告是否为 RT027 型菌株)。本研究旨在评价 GeneXpert 试验诊断 CDI 的临床应用价值。

1　材料和方法

1.1　标本来源　收集 2016 年 1 月至 2017 年 6 月北京协和医院住院腹泻患者非重复粪便标本 296 份。患者年龄 2~95 岁,中位年龄 58 岁;男性患者占 51%;内科患者占 58%,外科患者占 15%,其他科室患者占 27%。

1.2　主要仪器和试剂　GeneXpert 系统及配套的艰难梭菌检测试剂盒(美国 Cepheid 公司),S100 Thermal Cycle PCR 扩增仪(美国伯乐公司),毛细管电泳用 ABI 3730 测序仪(美国应用生物系统公司),艰难梭菌鉴定培养基(CDIF)、哥伦比亚血琼脂培养基、厌氧产气袋(法国生物梅里埃公司),基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF MS)仪(德国 Bruker Doltanics 公司)。

1.3　GeneXpert 试验　用拭子取少量不成形粪便,拭子在样本处理试剂中混悬,将样品管中所有液体移入检测盒的样品室,将检测盒载入 GeneXpert 全自动医用 PCR 分析系统中,根据产品说明书进行操作和结果判读。报告:仅有内参基因阳性为产毒艰难梭菌阴性;内参基因阳性及 *tcdB* 基因阳性为产毒素 B 艰难梭菌;内参基因阳性、*tcdB* 基因阳性、*tcdC*基因阳性且二元毒素基因阳性,报告为核糖体型别 027 型菌株。

1.4　产毒素培养(toxigenic culture, TC)　TC 指粪便培养分离艰难梭菌,再用 PCR 方法检测菌株是否含有毒素基因。TC 阳性:培养分离出艰难梭菌,且检测到毒素基因;TC 阴性:未分离出艰难梭菌,或分离到艰难梭菌但未检测到毒素基因。

1.4.1　艰难梭菌培养及鉴定　取不成形粪便标本直接接种于 CDIF 培养基,置于厌氧产气袋 37 ℃培养 48 h,将具有黑色菌落特征的菌株转种至哥伦比亚血琼脂培养基,厌氧培养 48 h 后取单菌落进行 MALDI-TOF MS 质谱鉴定。将单菌落均匀涂布于质谱靶板上,滴加 1 μL HCCA 肉桂酸基质,待干燥后参照仪器说明书上机检测。

1.4.2　艰难梭菌毒素基因检测　使用五重 PCR 的方法扩增艰难梭菌的 16S rDNA、毒素 A、B 编码基因 *tcdA*、*tcdB* 以及二元毒素基因 *cdtA*、*cdtB*,并对 *tcdA*基因是否存在 1.8 kb 片段缺失进行确证[7-8]。引物见表 1。

1.5　PCR-核糖体分型　PCR 扩增艰难梭菌核糖体 DNA 基因间隔区(rDNA intergenic spacer region, ISR),其中 16S-USA 端引物使用 5′-FAM 进行荧光标记,在 ABI 3730 测序仪上用毛细管电泳的方法对扩增产物进行检测,将数据提交至数据库 http://webribo.ages.at 并确定菌株核糖体型别[9],引物见表 1。

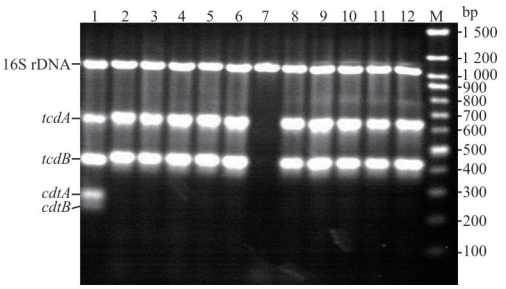
表 1　艰难梭菌毒素基因扩增及分型引物

试验	基因	引物名称	序列(5′→3′)	目标片段长度(bp)
五重 PCR	*tcdA*	TCDA-F3345	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	629
		TCDA-R3969	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	
	tcdB	TCDB-F5670	CCAAARTGGAGTGTTACAAACAGGTG	410
		TCDB-R6079A	GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA	
		TCDB-R6079B	GCATTTCTCCGTTTTCAGCAAAGTA	
	cdtA	CDTA-F739A	GGGAAGCACTATATTAAAGCAGAAGC	221
		CDTA-F739B	GGGAAACATTATATTAAAGCAGAAGC	
		CDTA-R958	CTGGGTTAGGATTATTTACTGGACCA	
	ctdB	CTDB-F617	TTGACCCAAAGTTGATGTCTGATTG	262
		CDTB-R878	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTTATAG	
	16S rDNA	PS13	GGAGGCAGCAGTGGGGAATA	1 062
		PS14	TGACGGGCGGTGTGTACAAG	
tcdA 3′端缺失	*tcdA*	NK9	CCACCAGCTGCAGCCATA	700/1 200
		NKV11	TGATGCTAATAATGAATCTAAAATGGTAAC	
毛细管电泳	ISR	16S-USA	FAM-GTGCGGCTGGATCACCTCCT	—
		23S-USA	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC	

1.6　统计学分析　采用 SPSS 22.0 软件，以 TC 结果为参考，计算 GeneXpert 试验的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值，用 *Kappa* 检验评价结果一致性。

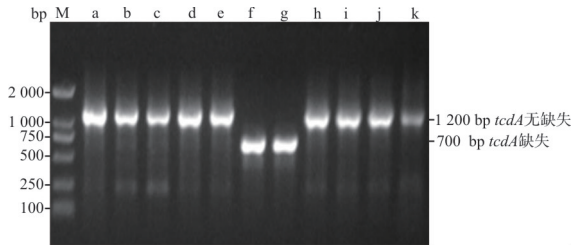
2　结果

2.1　TC 结果　296 份粪便标本中，共培养出艰难梭菌 152 株，其中 *tcdA*$^+$ *tcdB*$^+$ *cdtA/cdtB*$^+$（$A^+B^+CDT^+$）型 3 株、*tcdA*$^+$*tcdB*$^+$*cdtA/cdtB*$^-$（$A^+B^+CDT^-$）型 113 株、*tcdA*$^-$*tcdB*$^+$*cdtA/cdtB*$^-$（$A^-B^+CDT^-$）型 18 株、不产毒菌株 *tcdA*$^-$ *tcdB*$^-$ *cdtA/cdtB*$^-$（$A^-B^-CDT^-$）18 株。共检出毒素基因阳性菌株 134 例。部分菌株五重 PCR 扩增产物电泳及 *tcdA* 基因扩增产物电泳结果见图 1、图 2。



注：1 号菌株，*tcdA*、*tcdB*、*cdtA*、*cdtB* 基因阳性；2—6、8—12 号菌株，*tcdA*、*tcdB* 基因阳性；7 号菌株，阴性；M，100 bp ladder marker。

图 1　五重 PCR 扩增产物电泳分析



注：M，2 000 bp marker；a、b、c、d、e、h、i、j、k，菌株无 *tcdA* 缺失；f、g，菌株 *tcdA* 缺失。

图 2　*tcdA* 基因 PCR 扩增产物电泳分析

2.2　GeneXpert 试验结果　296 份标本中，GeneXpert 报告阳性标本 144 份，阴性标本 152 份，阳性标本中包括 142 份产毒素 B 艰难梭菌，2 份 RT027 型艰难梭菌。

2.3　GeneXpert 与 TC 检测结果的比较　以 TC 为参考，GeneXpert 试验的敏感性为 98.5%，95%置信区间为 94.7%～99.8%；特异性为 92.6%，95%置信区间为 87.4%～96.1%；阳性预测值为 91.7%，95%置信区间为 85.9%～95.6%；阴性预测值为 98.7%，95%置信区间为 95.3%～99.8%。2 种方法总一致率为 95.3%，一致性检验 *Kappa* 值为 0.905，GeneXpert 与 TC 一致性好，见表 2。GeneXpert 与 TC 检测结果不一致的标本有 14 份，其中 GeneXpert 阳性、TC 阴性标本 12 份，包括未培养出菌株标本 9 份，培养出的菌株但不产毒素标本 3 份；另外 2 份标本为 GeneXpert 阴性、TC 阳性，菌株分别为 $A^-B^+CDT^-$ 型和 $A^+B^+CDT^-$ 型。

表 2　GeneXpert 试验与 TC 检测结果的比较

GeneXpert	TC		合计
	+	−	
+	132	12	144
−	2	150	152
合计	134	162	296

2.4　GeneXpert 与 PCR－核糖体分型　GeneXpert 试验报告 2 株 RT027 型艰难梭菌；PCR－核糖体分型结果显示，与 RT027 型标准菌株条带一致，确证为 RT027 型艰难梭菌。RT027 型艰难梭菌与标准菌株的毛细管电泳图谱见图 3。

3　讨论

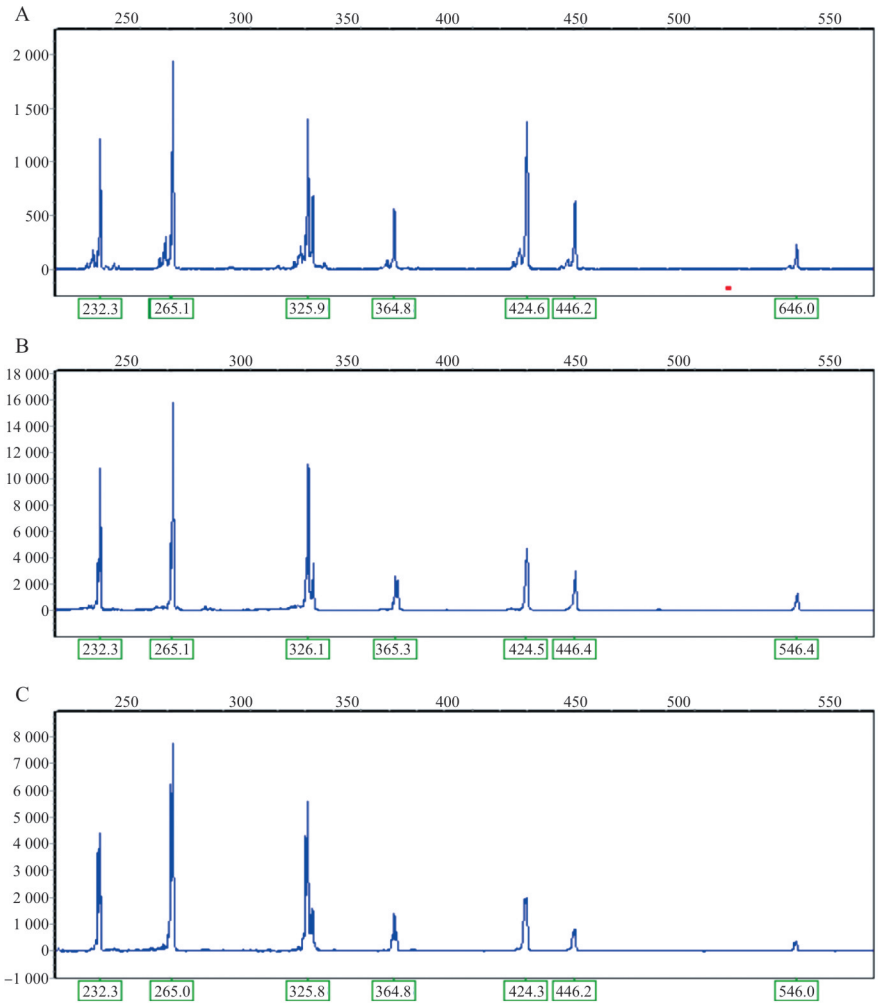
CDI 的诊断主要包括腹泻患者粪便标本中检测到艰难梭菌毒素或者产毒素的艰难梭菌，或者内镜检查为伪膜性肠炎[10]。艰难梭菌培养以及 GDH 检测具有较高的敏感性，不能区分菌株是否产毒素，而直接从粪便标本中检测毒素 A/B 的酶免疫方法敏感性较低，不推荐单独用于诊断 CDI[11-12]。CDI 诊断的金标准包括细胞毒性中和试验和 TC，但 2 种方法操作繁琐，不适应于临床常规使用。GeneXpert 试验可直接从粪便标本中快速检测毒素基因，在国外已得到广泛应用。

本研究结果表明，GeneXpert 试验的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值均在 90%以上。这与上海华山医院黄海辉教授牵头的多中心研究结果较为接近[13]，文献综述表明 GeneXpert 试验的敏感性为 94%～100%、特异性为 93%～99%[12]。GeneXpert 试验操作简便，且可在 1 h 内发出报告，具有良好的临床应用价值。此外，GeneXpert 可准确报告高毒力 RT027 型艰难梭菌，对流行病学调查和院内感染防控均有重要意义。RT027 型高毒力艰难梭菌在欧美等地区引起大规模暴发流行。近年来，我国多个城市报道了散发的 RT027 型菌株，与欧美等不同的是，我国 ST37 和 ST81 型 A^-B^+ 型艰难梭菌流行率较高，该型菌株同样可以引起临床患者重症感染。GeneXpert 检测的靶标为 *tcdB* 基因、二元毒素基因以及 *tcdC* 基因，本研究结果表明

A^-B^+型菌株同样可被 GeneXpert 准确报告为阳性标本，目前国内尚未发现 A^+B^-型艰难梭菌。

本研究中所用五重 PCR 检测艰难梭菌毒素基因为传统的 PCR 方法，之后使用电泳技术检测是否扩增出毒素基因，该方法操作复杂，在常规临床实验室不易开展。PCR-核糖体分型技术常用于艰难梭菌的流行病学调查，PCR 扩增后使用毛细管电泳技术检测艰难梭菌 ISR 多态性，然后与标准菌株比对确定其核糖体型别。该技术因缺乏标准化而难以推广和应用，目前更常用的分型方法为多位点序列分型技术。NAATs 直接检测艰难梭菌毒素基因，具有较高的敏感性，被美国胃肠病学会和美国感染病学会推荐可作为唯一的独立测试技术诊断 CDI[11,14]。欧洲临床微生物与感染病学会和中国艰难梭菌感染诊断和治疗专家共识推荐使用两步法或者三步法联合诊断 CDI，NAATs 则作为其中的重要一个步骤[10,15]。一些研究者担忧 NAATs 方法过于敏感而导致过度诊断和治疗[16]。临床应结合患者是否具有高危因素及其他实验室检查综合判断 CDI 或定植。

综上所述，GeneXpert 实时荧光定量 PCR 方法具有较高的敏感性和特异性，可为 CDI 的诊治提供可靠的科学依据。



注：A、B，临床菌株图谱；C，CA2 标准菌株图谱；横轴为 ISR 片段长度；纵轴为峰强度。

图 3　RT027 型艰难梭菌毛细管电泳分析

4　参考文献

[1] Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis[J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(7): 526-536.

[2] Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea[J]. N Engl J Med, 2002, 346(5): 334-339.

[3] Fatima R, Aziz M. The hypervirulent strain of *Clostridium Difficile*: NAP1/B1/027 - A brief overview[J]. Cureus, 2019, 11(1): e3977.

[4] Cheng JW, Xiao M, Kudinha T, *et al*. The first two *Clostridium difficile* ribotype 027/ST1 isolates identified in Beijing, China-an emerging problem or a neglected threat? [J]. Sci Rep, 2016, 6: 18834.

[5] Jia H, Du P, Yang H, *et al*. Nosocomial transmission of *Clostridium difficile* ribotype 027 in a Chinese hospital, 2012-2014, traced by whole genome sequencing[J]. BMC Genomics, 2016, 17: 405.

[6] Zhou Y, Mao L, Yu J, *et al*. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in hospitalized adults and the first isolation of *C. difficile* PCR ribotype 027 in central China[J]. BMC Infect Dis, 2019, 19(1): 232.

[7] Persson S, Torpdahl M, Olsen KE. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (*tcdA*) and toxin B (*tcdB*) and the binary toxin (*cdtA/cdtB*) genes applied to a Danish strain collection[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14(11): 1057-1064.

[8] Kato H, Kato N, Watanabe K, *et al*. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(8): 2178-2182.

[9] Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, *et al*. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(11): 1377-1382.

[10] 徐英春, 张曼. 中国成人艰难梭菌感染诊断和治疗专家共识[J]. 协和医学杂志, 2017, 8(2): 131-138.

[11] Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, *et al*. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections[J]. Am J Gastroenterol, 2013, 108(4): 478-498.

[12] Carroll KC, Bartlett JG. Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis[J]. Annu Rev Microbiol, 2011, 65: 501-521.

[13] 吴湜, 周芬芬, 倪语星, 等. 艰难梭菌核酸检测试剂盒诊断艰难梭菌感染的多中心研究[J]. 中华检验医学杂志, 2019, 42(8): 674-678.

[14] Mcdonald LC, Gerding DN, Johnson S, *et al*. Clinical Practice Guidelines for *Clostridium difficile* Infection in Adults and Children: 2017 Update by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)[J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(7): E1-E48.

[15] Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, *et al*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(Suppl 2): 1-26.

[16] Polage CR, Gyorke CE, Kennedy MA, *et al*. Overdiagnosis of *Clostridium difficile* infection in the molecular test era[J]. JAMA Intern Med, 2015, 175(11): 1792-1801.

（收稿日期:2020-10-24）
（本文编辑:刘群）

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《临床检验杂志》可直接使用缩略形式的常用词汇

对于以下医学检验工作者比较熟悉的常用词汇,本刊允许在论文撰写中直接使用其缩略语,可以不标注中文。

磷酸盐缓冲液(PBS)	白细胞介素(IL)	乙型肝炎表面抗原(HBsAg)
核糖核酸(RNA)	肿瘤坏死因子(TNF)	乙型肝炎 e 抗原(HBeAg)
脱氧核糖核酸(DNA)	干扰素(IFN)	抗 HBsAg 抗体(抗 HBs)
聚合酶链反应(PCR)	人类白细胞抗原(HLA)	抗 HBeAg 抗体(抗 HBe)
酶联免疫吸附试验(ELISA)	系统性红斑狼疮(SLE)	抗 HBcAg 抗体(抗 HBc)
免疫球蛋白 G(IgG)	类风湿关节炎(RA)	严重急性呼吸综合征(SARS)
免疫球蛋白 A(IgA)	人类免疫缺陷病毒(HIV)	红细胞(RBC)
免疫球蛋白 M(IgM)	甲型肝炎病毒(HAV)	白细胞(WBC)
免疫球蛋白 D(IgD)	乙型肝炎病毒(HBV)	血红蛋白(Hb)
免疫球蛋白 E(IgE)	丙型肝炎病毒(HCV)	