



研究报告

四川地区猪源艰难梭菌分子分型调查

梁伟^{Δ1} 王博^{Δ1} 赵勤^{1,2,3} 全柯吉¹ 武耀民¹ 缪昌¹ 曹三杰^{*1,2,3}

1 四川农业大学动物医学院猪病研究中心 四川 成都 611130

2 四川农业大学国家级动物类实验教学示范中心 四川 成都 611130

3 农业农村部兽用药物与兽医诊断技术四川科学观测站 四川 成都 611130

摘要:【背景】艰难梭菌是一种重要的人畜共患肠道病原菌，可引起人和多种动物抗生素相关性腹泻或假膜性肠炎。四川作为我国主要的生猪产区，还未有猪源艰难梭菌流行病学调查的相关报道，对猪源艰难梭菌的防控及保障猪肉安全带来挑战。【目的】调查四川地区猪源艰难梭菌的感染、流行情况，并对分离出的艰难梭菌进行分子分型研究。【方法】收集来自四川生猪主要产区 6 个养殖场中猪的粪便标本($n=110$)，采用厌氧培养技术在艰难梭菌鉴别培养基上进行分离培养；采用 PCR 方法扩增艰难梭菌 4 个毒素基因(*tcdA*、*tcdB*、*cdtA*、*cdtB*)和 7 个管家基因(*adhA*、*atpA*、*dxr*、*glyA*、*recA*、*sodA*、*tpi*)，对分离株进行毒素基因分型和多位点序列分型。【结果】从 110 份样品中，经革兰氏染色镜检及 PCR 鉴定，共分离出 20 株艰难梭菌，分离率高达 18.18%；毒素基因分型结果显示共获得 3 种毒素基因型，包括 $tcdA^+tcdB^+cdtA/cdtB^+$ ($n=3$)、 $tcdA^+tcdB^+cdtA/cdtB^-$ ($n=6$)、 $tcdA^-tcdB^-cdtA/cdtB^-$ ($n=11$)；多位点序列分型结果显示获得 5 个 ST 型，包括 ST11 ($n=3$)、ST3 ($n=1$)、ST35 ($n=2$)、ST36 ($n=4$)、ST109 ($n=10$)；进化树结果显示，所有分离株聚集为 2 个大群，分别为 3 个分支和 17 个分支。【结论】四川主要生猪产区猪群存在艰难梭菌感染，分离株的分子分型呈多样性，主要流行型为 ST11、ST3、ST35、ST36、ST109 型，并且存在 ST11 型高毒力菌株流行的风险。

关键词: 四川地区，猪，艰难梭菌，毒素基因分型，多位点序列分型

Foundation item: Sichuan Provincial International Science and Technology Innovation Cooperation Project/Hong Kong, Macao and Taiwan Provincial Science and Technology Innovation Cooperation Project in China (2019YFH0067)

ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: Tel: 86-28-86293053; E-mail: csanjie@sicau.edu.cn

Received: 01-02-2021; Accepted: 21-02-2021; Published online: 13-04-2021

基金项目: 四川省国际科技创新合作/港澳台科技创新合作项目(2019YFH0067)

Δ对本文贡献相同

*通信作者: Tel: 028-86293053; E-mail: csanjie@sicau.edu.cn

收稿日期: 2021-02-01; 接受日期: 2021-02-21; 网络首发日期: 2021-04-13

Molecular typing investigation of *Clostridium difficile* from pigs in Sichuan, China

LIANG Wei^{Δ1} WANG Bo^{Δ1} ZHAO Qin^{1,2,3} QUAN Keji¹ WU Yaomin¹
MIAO Chang¹ CAO Sanjie^{*1,2,3}

1 Research Center of Swine Disease, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

2 National Teaching and Experiment Center of Animals, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

3 Sichuan Science-Observation Experimental Station of Veterinary Drugs and Veterinary Diagnostic Technique, Ministry of Agriculture, Chengdu, Sichuan 611130, China

Abstract: [Background] *Clostridium difficile* is an important zoonotic enteric pathogen that can cause antibiotic-associated diarrhea or pseudomembranous colitis in human and various animals. As the main pig producing area in China, Sichuan has not yet reported on the epidemiological investigation of *Clostridium difficile* from pigs, which brings challenges to the prevention and control of *Clostridium difficile* from pigs and the guarantee of pork safety. [Objective] To investigate the infection and prevalence of *Clostridium difficile* from pigs in Sichuan province, and to study the molecular typing of the isolated *Clostridium difficile*. [Methods] Stool samples ($n=110$) of pigs suspected of being infected with *Clostridium difficile* from six farms in Sichuan were collected and isolated on the identification medium of *Clostridium difficile* by anaerobic culture. Four toxin genes (*tcdA*, *tcdB*, *cdtA*, *cdtB*) and seven housekeeping genes (*adhA*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sodA*, *tpi*) of *Clostridium difficile* were amplified by PCR method. Toxin genotyping and multilocus sequence typing were performed on the isolates. [Results] In 110 samples, 20 strains of *Clostridium difficile* were isolated by Gram staining microscopy and PCR identification, and the isolation rate was as high as 18.18%. Toxin genotyping results showed that three toxin genotypes were obtained, including $tcdA^+tcdB^+cdtA/cdtB^+$ ($n=3$), $tcdA^+tcdB^+cdtA/cdtB^-$ ($n=6$), $tcdA^-tcdB^-cdtA/cdtB^-$ ($n=11$). The multilocus sequence typing result showed that five ST types, including ST11 ($n=3$), ST3 ($n=1$), ST35 ($n=2$), ST36 ($n=4$), and ST109 ($n=10$). The phylogenetic tree results showed that all the isolates were clustered into two groups with 3 branches and 17 branches, respectively. [Conclusion] *Clostridium difficile* infections were found in pig herds in the main pig producing areas in Sichuan, and the molecular types of isolates were diverse. The main epidemic types were ST11, ST3, ST35, ST36 and ST109, and there was the risk of ST11 strain with high virulence.

Keywords: Sichuan, pig, *Clostridium difficile*, toxin genotyping, multilocus sequence typing (MLST)

艰难梭菌(*Clostridium difficile*)是革兰氏阳性、产芽孢、纯厌氧的条件致病菌,也是重要的人畜共患肠道病原菌,于1935年首次在新生儿肠道发现,感染后可导致人和多种动物(猪、牛、禽等)抗生素相关性腹泻(Antibiotic Associated Diarrhea, AAD)或假膜性结肠炎(Pseudomembranous Colitis, PMC)的发生^[1-2]。艰难梭菌定植于宿主的盲肠和结肠内,芽孢抵抗力强,在外界环境存活数周至数月^[3-4]。动物源食品感染是艰难梭菌在人和动物之间流行的重要途径,北美、欧洲和澳洲的猪群普遍存在艰

难梭菌感染(*Clostridium difficile* Infection, CDI)^[5-7],我国广东、湖南等地区的猪群、鸡群、鸭群也有CDI相关报道^[8],表明CDI在多种动物间广泛存在。同时有文献报道,在荷兰和澳大利亚猪群中分离的艰难梭菌在人群中存在广泛的交叉传播^[9]。在屠宰加工过程中,动物小肠内容物里的芽孢会污染肉制品,在人和动物间形成交叉传播,对人类健康造成威胁^[10],而且目前尚无相应的疫苗为人和动物建立免疫屏障^[9]。长期以来,我国对于人源艰难梭菌的流行病学调查较多,而猪源艰难梭菌流行病学

的调查则较少。猪肉是关系国计民生和社会稳定的重要食品,保障猪肉安全具有重要意义。因此,对于猪群中艰难梭菌感染的调查研究亟待开展。

艰难梭菌分为产毒株和非产毒株,主要致病因素是毒素 A (*C. difficile* Toxin A, TcdA)、毒素 B (*C. difficile* Toxin B, TcdB)及二元毒素(*C. difficile* Transferase Toxin, CDT),进行毒素基因分型可直观地了解其毒力强弱,用于预测 CDI 患者的死亡率和预后^[10-12]。多位点序列分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)是以管家基因的序列多态性为基础,以不同序列号的组合决定菌株序列型的方法^[13]。艰难梭菌的 MLST 分型是基于对 7 个管家基因的测序分析,具有分辨率高、重复性强、共享性优的特点,不受有无参考菌株的限制,而且有公共网络数据平台支持(<https://pubmlst.org/cdifficile/>)。截至目前,艰难梭菌 MLST 数据库已有近 500 种不同的 ST 型别,是国际上应用最为广泛的 MLST 数据库^[13-15]。本研究通过对四川省主要生猪产区(广安市、崇州市、眉山市、宜宾市、阆中市、南充市)分离的艰难梭菌进行分子分型研究,以期为四川地区的艰难梭菌防控提供依据,并对艰难梭菌由猪向人传播的潜在风险进行评估。

1 材料

1.1 样品采集及处理

样品采集地点为四川地区(广安市、崇州市、眉山市、宜宾市、阆中市、南充市) 6 家养猪场(包

括集约化养猪场和个体养猪场),集约化养猪场规模在 2 500 头左右,个体养猪场规模在 100 头以内。共采集 110 份新鲜粪便样本,如表 1 所示,采样时间在 2017 年 3 月-2017 年 11 月之间。取样后立即将样品放入冰盒,24 h 内运至实验室进行处理^[16]。将 1 g 粪便悬浮于 1 mL 无菌磷酸盐缓冲液(PBS)中涡旋形成均匀悬浮液,分成两等份。参考 Perry 等^[17]方法,将其中一份与无水乙醇等比例混合后静置处理 30 min,另一份保存在-20 °C 备用;将处理过的样本接种到艰难梭菌鉴别培养基(ChromID *Clostridium difficile* Agar, CDIF 培养基)进行艰难梭菌的分离鉴定。

1.2 主要试剂和仪器

脑心浸液干粉(BHI)、厌氧指示剂、厌氧罐, Oxoid 公司;艰难梭菌鉴别培养基(CDIF),梅里埃公司;牛磺胆酸钠 T8510,北京索莱宝科技有限公司;细菌基因组提取试剂盒,天根生物科技(北京)有限公司; *Ex Taq* DNA 聚合酶、DL1000 DNA Marker 和 DL10000 DNA Marker,宝生物工程(大连)有限公司。恒温培养箱, Thermo 公司;PCR 扩增仪、电泳仪和电泳槽, Bio-Rad 公司;凝胶成像系统, Nikon 公司。

2 方法

2.1 细菌分离鉴定

取 100 μ L 经无水乙醇处理过的样本在 CDIF 培养基上均匀涂布,然后立即倒置放入厌氧罐(含厌

表 1 采样信息

Table 1 Sampling information

养猪场编号 No. of farm	采样地点 Place	总样本量 Total samples	腹泻样品量 Number of diarrhea samples	正常样品量 Number of normal samples	仔猪各日龄样品量 Number samples of piglets at each day of age	
					1-7 日龄 1-7 days old	>7 日龄 >7 days old
LS	广安市 Guangan	43	26	17	43	0
CZ	崇州市 Chongzhou	4	4	0	3	1
PS	眉山市 Meishan	5	5	0	5	0
JA	宜宾市 Yibin	12	8	4	12	0
LZ	阆中市 Langzhong	6	6	0	6	0
PA	南充市 Nanchong	40	3	37	29	11

注: LS、JA、PA 为集约化养猪场; CZ、PS、LZ 为个体养猪场

Note: LS, JA and PA are intensive swine farms; CZ, PS and LZ are individual swine farms

氧袋及厌氧指示剂)并密封, 37 °C 厌氧培养 24 h 后用接种环挑取疑似单菌落, 在脑心浸液琼脂培养基上均匀划线, 在厌氧罐中 37 °C 厌氧孵育 48 h。随后根据菌落形态、大小、干燥度及是否产生特殊的马粪气味以及革兰染色镜鉴的结果对艰难梭菌进行初步鉴定。

水煮法粗提 DNA, 将 10 mL 细菌培养液 8 000 r/min 离心 5 min, 收集细菌沉淀加入 100 μL 无菌 PBS 溶液, 形成均一的菌液, 在沸水中放置 10 min, 再放入-20 °C 冰浴 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清作为艰难梭菌 DNA 模板, -20 °C 保存备用。PCR 扩增 16S rRNA 基因鉴定艰难梭菌, 片段大小为 1 231 bp。16S rRNA 引物序列为 27F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCA G-3')和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGAC-3')。

16S rRNA 基因的 PCR 反应体系(25 μL): 模板 DNA 1 μL, *Ex Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 12.5 μL, 27F 和 1492R 引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 补齐。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 53 °C 40 s, 72 °C 60 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经电泳后成像, 观察结果。

经 PCR 鉴定后的菌株与 50%甘油等比例混合, 做好标记和记录, -80 °C 冷冻保存。

2.2 毒素基因分型

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取所有艰难

梭菌分离株的基因组 DNA, 保存于-20 °C 备用。参照唐海先^[1]及 Persson 等^[18]多重 PCR 检测艰难梭菌毒素基因 *tcdA*、*tcdB*、*cdtA*、*cdtB* 所用引物进行毒素基因 PCR 扩增, 引物序列如表 2 所示, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。按表 2 中毒素基因引物浓度配制引物预混液, 用于多重 PCR 反应。多重 PCR 反应体系(25 μL): 模板 DNA 1 μL, *Ex Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 12.5 μL, 引物预混液 2 μL, ddH₂O 补齐。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 50 s, 54 °C 40 s, 72 °C 50 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经电泳后成像, 观察结果。

2.3 多序列位点分型

所有分离株均采用多位点序列分型分析。参考唐海先^[1]及 Griffiths 等^[19]的方法, 选取 *adk*、*atpA*、*dxr*、*glyA*、*recA*、*sodA*、*tpi* 这 7 个管家基因进行 PCR 扩增, 对艰难梭菌分离株进行 MLST 分型, 引物序列如表 3 所示, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系(25 μL): 模板 DNA 1 μL, *Ex Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 12.5 μL, 管家基因 F、R 引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 补齐。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 50 °C 40 s, 72 °C 70 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经电泳后成像, 观察结果。将与预期条带大小一致的样品进行 Sanger 测序, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行。

表 2 艰难梭菌毒素基因引物信息

Table 2 Primer information of *Clostridium difficile* toxin gene

基因名称	引物名称	引物序列	引物使用浓度	大小
Gene name	Primers name	Primers sequence (5'→3')	Primers concentration (μmol/L)	Size (bp)
<i>tcdA</i>	tcdA-F3345	GCATGATAAGGCAACTTCAGTGGTA	0.60	629
	tcdA-R3969	AGTTCCTCCTGCTCCATCAAATG	0.60	
<i>tcdB</i>	tcdB-F5670	CCAAARTGGAGTGTACAAACAGGTG	0.40	410
	tcdB-R6079A	GCATTTCTCCATTCTCAGCAAAGTA	0.20	
	tcdB-R6079B	GCATTTCTCCGTTTTTCAGCAAAGTA	0.20	
<i>cdtA</i>	cdtA-F793A	GGGAAGCACTATATTAAGCAGAAGC	0.05	221
	cdtA-F793B	GGGAAACATTATATTAAGCAGAAGC	0.05	
	cdtA-R958	CTGGGTTAGGATTATTACTGGACCA	0.10	
<i>cdtB</i>	cdtB-F617	TTGACCCAAAGTTGAI GTCTGATTG	0.10	262
	cdtB-R878	CGGATCTCTTGCTTCAGTCTTATAG	0.10	

注: 引物浓度为多重 PCR 引物预混液中各引物的浓度

Note: Primer concentration is the concentration of each primer in the multiplex PCR primer premix

表 3 艰难梭菌 MLST 管家基因引物信息

Table 3 Primer information of *Clostridium difficile* MLST housekeeper gene

基因名称 Gene name	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	产物大小 Product size (bp)
<i>adk</i>	adk1F	TTACTTGGACCTCCAGGTGC	635
	adk1R	TTTCCACTTCCTAAGGCTGC	
<i>atpA</i>	atpA1F	TGATGATTTAAGTAAACAAGCTG	674
	atpA1R	AATCATGAGTGAAGTCTTCTCC	
<i>dxr</i>	dxr3F	GCTACTTTCCATTCTATCTG	525
	dxr4R	CCAACTCTTTGTGCTATAAA	
<i>glyA</i>	glyA1F	ATAGCTGATGAGGTTGGAGC	625
	glyA1R	TTCTAGCCTTAGATTCTTCATC	
<i>recA</i>	recA2F	CAGTAATGAAATTGGGAGAAGC	705
	recA2R	ATTCAGCTTGCTTAAATGGTG	
<i>sodA</i>	sodA5F	CCAGTTGTCAATGTATTCATTC	585
	sodA6R	ATAACTTCATTTGCTTTTACACC	
<i>tpi</i>	tpi2F	ATGAGAAAACCTATAATTGCAG	640
	tpi2R	TTGAAGGTTTAACTCCACC	

注：引物既是扩增引物也是测序引物

Note: Amplification primers are also the sequencing primers

2.4 多序列位点分型测序数据分析

将每个艰难梭菌分离株的 7 个管家基因双向测序结果用 DNAMAN V9 软件(LynnonBiosoft)进行拼接整理后与标准序列比对剪切，结果以“fasta”格式上传到艰难梭菌 MLST 分型数据库(<https://pubmlst.org/cdifficile/>)进行分析与比对，以确定艰难梭菌序列类型(ST)。利用分子进化遗传学分析软件(MEGA 7.0)，通过邻接法构建系统进化树分析各分离株的遗传进化关系及菌株之间的相互关系。

3 结果与分析

3.1 猪源艰难梭菌分离情况

经细菌形态观察(图 1A)、革兰氏染色镜检(图 1B)以及 16S rRNA 基因 PCR 扩增鉴定(图 2)，在 110 份仔猪粪便样本中共分离出 20 株艰难梭菌，分离率高达 18.18%。从 52 份腹泻仔猪粪便样本分离出 18 株艰难梭菌，而且均从 1-7 日龄腹泻仔猪中分离，分离率为 34.62% (18/52)；从 58 份正常仔猪粪便样本中分离出 2 株艰难梭菌，分离率为 3.45% (2/58)，菌株具体情况如表 4 所示。

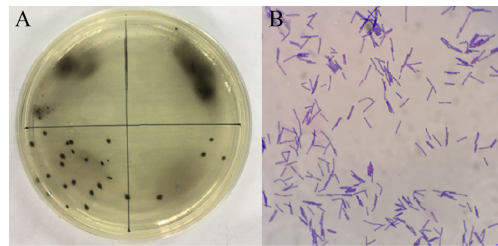


图 1 艰难梭菌细菌形态与镜检图

Figure 1 Morphology and microscopic view of *Clostridium difficile*

注：A：艰难梭菌在 CDIF 鉴别培养基上的形态(左下角黑色菌落)；B：艰难梭菌经革兰氏染色后在显微镜(1 000×)下的形态

Note: A: Morphology of *Clostridium difficile* on CDIF identification medium (black colonies in lower left corner); B: Morphology of *Clostridium difficile* under a microscope (1 000×) after Gram staining

3.2 毒素基因分型结果

多重 PCR 结果如图 2 所示，在 20 株艰难梭菌分离株中，45% (n=9)的分离株至少有一种毒素基因阳性，为产毒株艰难梭菌；55% (n=11)的分离株毒素基因扩增呈阴性，为不产毒株艰难梭菌。其中，C1、C2、P1 分离株(15%，n=3)毒素基因分型为 $tcdA^+tcdB^+cdtA/cdtB^+$ ($tcdA$ 阳性， $tcdB$ 阳性， $cdtA/cdtB$ 阳性)；B3、B4、B5、B19、LW3、LW6 分离株(30%，n=6)毒素基因分型为 $tcdA^+tcdB^+cdtA/cdtB^-$

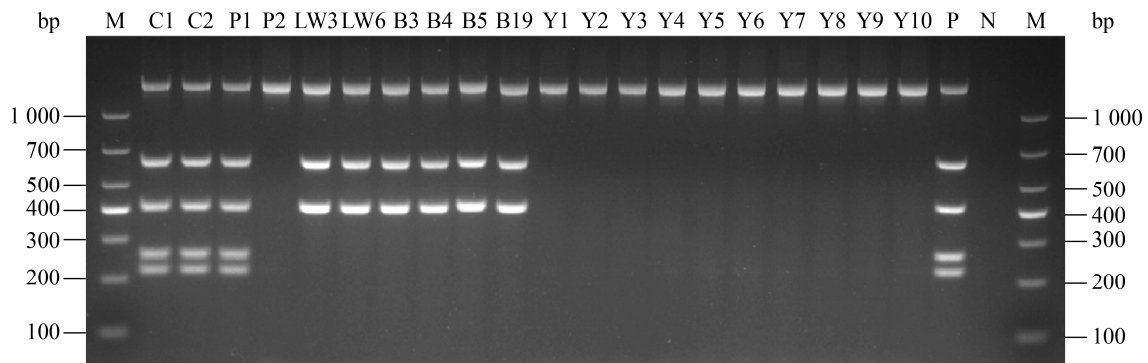


图 2 毒素基因和 16S rRNA 基因的 PCR 扩增电泳图

Figure 2 PCR amplification electrophoresis of toxin gene and 16S rRNA gene

注: M: DL1000 DNA Marker; C1、C2、P1、P2、LW3、LW6、B3、B4、B5、B19、Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8、Y9、Y10: 20 株艰难梭菌分离株; P: 艰难梭菌阳性模板; N: 阴性模板; 1 231 bp 为艰难梭菌 16S rRNA 基因特异性条带, 629 bp 为艰难梭菌 *tcdA* 基因特异性条带, 410 bp 为艰难梭菌 *tcdB* 基因特异性条带, 221 bp 为艰难梭菌 *cdtA* 基因特异性条带, 262 bp 为艰难梭菌 *cdtB* 基因特异性条带

Note: M: DL1000 DNA Marker; C1, C2, P1, P2, LW3, LW6, B3, B4, B5, B19, Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, Y8, Y9, Y10: 20 *Clostridium difficile* isolates; P: *Clostridium difficile* positive template; N: Negative template; 1 231 bp was *Clostridium difficile* 16S rRNA gene specific band, 629 bp was *Clostridium difficile tcdA* gene specific band, 410 bp was *Clostridium difficile tcdB* gene specific band, 221 bp was *Clostridium difficile cdtA* gene specific band, 262 bp was *Clostridium difficile cdtB* gene specific band

表 4 猪源艰难梭菌分离情况

Table 4 Isolation of *Clostridium difficile* from pigs

养猪场编号 No. of farm	采样地点 Place	分离数量 Split amount	菌株编号 No. strain
LS	广安市 Guangan	4	B3, B4, B5, B19
CZ	崇州市 Chongzhou	2	C1, C2
PS	眉山市 Meishan	2	P1, P2
JA	宜宾市 Yibin	10	Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y6, Y7, Y8, Y9, Y10
LZ	阆中市 Langzhong	2	LW3, LW6
PA	南充市 Nanchong	0	

(*tcdA* 阳性, *tcdB* 阳性, *cdtA/cdtB* 阴性); P2、Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8、Y9、Y10 分离株(55%, $n=11$)毒素基因分型为 *tcdA⁻tcdB⁻cdtA/cdtB⁻* (*tcdA* 阴性, *tcdB* 阴性, *cdtA/cdtB* 阴性)。

3.3 多序列位点分型结果

以艰难梭菌分离株的 DNA 为模板进行管家基因的 PCR 扩增, PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 结果见图 3, 与预期结果一致。

20 株艰难梭菌分离株中共检出 5 种 ST 型 (表 5), 分离株 C1、C2、P1 为 ST11 ($n=3$, 15%) 型, 分离株 P2 为 ST3 ($n=1$, 5%) 型, 分离株 B3、

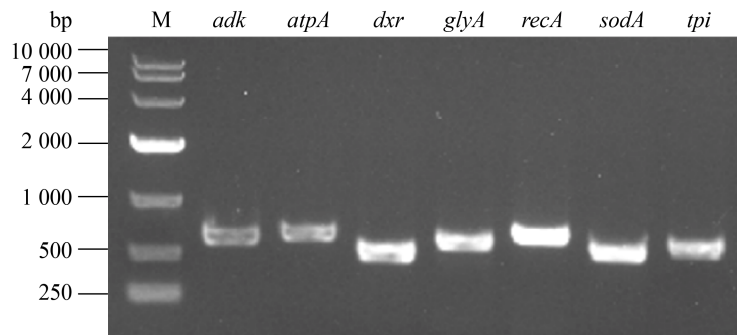


图 3 艰难梭菌 MLST 管家基因的 PCR 扩增结果

Figure 3 MLST amplification results of *Clostridium difficile*

Note: M: DL10000 DNA Marker

表 5 20 株猪源艰难梭菌 MLST 数据分析

Table 5 MLST data of 20 *Clostridium difficile* strains

菌株数 No. of strains	菌株编号 Strain No.	等位基因 Alleles							ST 型
		<i>adk</i>	<i>atpA</i>	<i>dxr</i>	<i>glyA</i>	<i>recA</i>	<i>soda</i>	<i>tpi</i>	ST types
3	C1, C2, P1	5	8	5	11	9	11	8	ST11
1	P2	1	1	2	1	1	1	1	ST3
4	B3, B4, B5, B19	2	1	2	3	1	5	1	ST36
2	LW3, LW6	2	5	8	1	1	3	6	ST35
10	Y1-Y10	3	12	10	18	6	18	15	ST109

B4、B5、B19 为 ST36 ($n=4$, 20%)型, 分离株 LW3、LW6 为 ST35 ($n=2$, 10%)型, 分离株 Y1、Y2、Y3、Y4、Y5、Y6、Y7、Y8、Y9、Y10 为 ST109 ($n=10$, 50%)型。依据 7 个管家基因组成的序列, 用 MEGA 7.0 构建系统发育树, 如图 4 所示, 20 株艰难梭菌分离株分别位于 2 个大分支上: 第 1 分支共 3 株菌, 第 2 分支共 17 株菌。

4 讨论与结论

艰难梭菌作为一种重要的人兽共患病原菌, 能

够引起人和多种动物(猪、牛、禽等)抗生素相关性腹泻和假膜性肠炎, 目前已成为一个重要的公共卫生问题^[20-21]。动物源食品是艰难梭菌在人和动物之间传播的重要途径, 并且艰难梭菌产生的芽孢在环境中抵抗力极强, 是其传播的主要载体^[2,5]。国内关于猪源艰难梭菌报道较少, 四川作为生猪大省, 猪场中艰难梭菌的感染和流行情况也未有相关报道, 对猪源艰难梭菌的防控及保障猪肉食品安全带来了挑战。

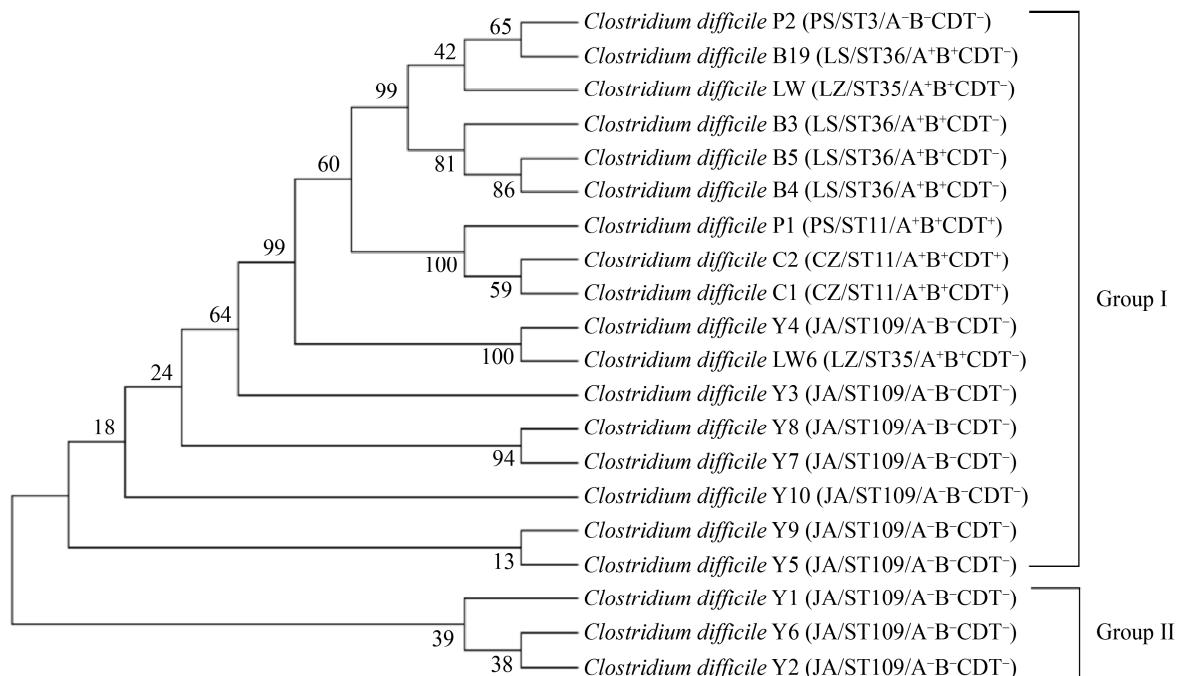


图 4 20 株艰难梭菌 MLST 分型的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree based on MLST typing of 20 *Clostridium difficile* strains

注: 括号内标注依次为养殖场编号(即采样地点)、菌株 MLST 分型、菌株毒素基因分型

Note: The number of the breeding farm (i.e. the sampling site), MLST typing and toxin genotyping of the strains are marked in parentheses

本研究首次对四川地区猪源艰难梭菌进行流行病学调查, 从采集的 110 份仔猪粪便样品中分离到 20 株艰难梭菌, 分离率高达 18.18%, 表明艰难梭菌在四川地区猪群中存在, 为猪场艰难梭菌的防控提供理论数据。另外, 从 1-7 日龄腹泻仔猪粪便中分离出 18 株艰难梭菌, 从 7 日龄以上腹泻仔猪粪便中未分离出艰难梭菌, 从未腹泻仔猪粪便中分离出 2 株艰难梭菌, 充分说明猪场的艰难梭菌主要由腹泻仔猪携带, 并且正常的仔猪也能够携带艰难梭菌。Zhang 等^[22]在 2015-2016 年对我国山东、湖北、广东、河南、江苏这 5 个地区进行了艰难梭菌(猪源、鸡源、鸭源)流行病学调查, 检出率为 8.2%, 表明艰难梭菌在食用动物中广泛存在。斯洛文尼亚^[23]、德国^[24]和澳大利亚^[25]的仔猪艰难梭菌分离率在 50%-73%之间, 属于较高水平。这些结果说明, 国内外艰难梭菌在猪群中都广泛流行和存在^[26], 而且自艰难梭菌首次分离以来, CDI 在人和动物之间普遍存在^[5,7,26]。目前, 艰难梭菌已成为继耐甲氧西林金黄色葡萄球菌之后造成医源性感染最主要的病原菌^[27]。这提醒我们对猪源艰难梭菌的防控和研究必须引起高度重视。

毒素基因分型是容易被忽视的一种分型方法, 由于没有统一的分型数据库, 该方法的研究并不多。艰难梭菌毒素基因分型能够初步判定艰难梭菌的毒力强弱^[18]。本研究运用多重 PCR 方法检出 3 种毒素基因型, 包括 $tcdA^+tcdB^+cdtA/cdtB^+$ ($n=3$)、 $tcdA^+tcdB^+cdtA/cdtB^-$ ($n=6$)和 $tcdA^-tcdB^-cdtA/cdtB^-$ ($n=11$)。有研究表明, 艰难梭菌强毒株分泌 TcdA、TcdB 和 CDT 毒素, 常规菌株仅分泌 TcdA 和 TcdB 毒素^[10]。崇州市分离株 C1、C2 和眉山市分离株 P1 的毒素基因均呈阳性, MLST 分型为 ST11 型艰难梭菌, 为高毒力流行风险毒株^[28]; 仔猪表现出消瘦、精神萎靡、严重腹泻。广安市分离株 B3、B4、B5、B19 和阆中市分离株 LW3、LW6 毒素基因 $tcdA$ 和 $tcdB$ 呈阳性, 而 $cdtA$ 和 $cdtB$ 呈阴性,

仔猪腹泻程度中等, 较为消瘦。眉山市分离株 P2 和宜宾市分离株 Y1-Y10 毒素基因呈阴性, 仔猪表现为轻微腹泻或不腹泻。初步表明艰难梭菌在四川地区猪群中广泛存在, 而且毒力强弱各不相同。

本研究通过 MLST 对艰难梭菌分离株进行 ST 分型研究, 共检出 5 种 ST 型别。崇州地区仔猪携带 ST11 ($n=2$)型艰难梭菌, 眉山地区仔猪携带 ST11 ($n=1$)、ST3 ($n=1$)型艰难梭菌, 广安地区仔猪携带 ST36 ($n=4$)型艰难梭菌, 阆中地区仔猪携带 ST35 ($n=2$)型艰难梭菌, 宜宾地区仔猪携带 ST109 ($n=10$)型艰难梭菌。国外研究报道, ST11 型艰难梭菌是与动物关系最密切、在人类中暴发流行过的高毒力型别^[28]。本研究从猪群中发现了高毒力 ST11 型艰难梭菌, 具有公共卫生意义。除 ST36 外, 其他 ST 型均在人群中存在流行情况^[29-32]。Gu 等^[29]发现 ST3 型(17.1%)和 ST54 型(17.1%)是浙江杭州最流行的菌株, 其次是 ST35 型(14.3%)。Huang 等^[30]报道 ST3 型艰难梭菌是上海某医院流行的 ST 型, 并且发现了 ST11 型艰难梭菌。Yan 等^[31]对在山东济南分离出的 104 株艰难梭菌进行 MLST 发现 ST3 ($n=6$, 5.8%)、ST35 ($n=16$, 15.4%)型艰难梭菌。Chen 等^[32]在浙江杭州某医院分离出 31 株 ST35 (19.3%)型艰难梭菌、12 株 ST3 (7.5%)、1 株 ST109 (0.6%); 与本研究不同的是, 他们分离出的 ST3 型毒素基因分型是 $tcdA^+tcdB^+cdtA/cdtB^-$, ST109 型的毒素基因分型是 $tcdA^-tcdB^+cdtA/cdtB^-$, 表明艰难梭菌在我国四川地区猪群中分布广泛, 流行型别复杂、分化度较高, 存在 ST11 型高毒力菌株的流行, 对人类健康造成威胁。

本研究通过对四川主要生猪产区(广安市、崇州市、眉山市、宜宾市、阆中市、南充市)养猪场分离的 20 株艰难梭菌进行毒素基因分型及 MLST 分型研究, 反映了四川地区猪群 CDI 情况, 发现 MLST 分子分型结果呈多样性, 而且存在 ST11 型高毒力流行风险菌株, 突显了四川地区猪源艰难梭菌的防控和研究工作意义。

REFERENCES

- [1] Tang HX. Detection and analysis of *Clostridium difficile* in patients with diarrhea[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangzhou Medical University, 2014 (in Chinese)
唐海先. 腹泻患者艰难梭菌检测及分析[D]. 广州: 广州医科大学硕士学位论文, 2014
- [2] Leffler DA, LaMont JT. *Clostridium difficile* infection[J]. The New England Journal of Medicine, 2015, 372(16): 1539-1548
- [3] Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*: more difficult than ever[J]. The New England Journal of Medicine, 2008, 359(18): 1932-1940
- [4] Liu SD, Wu AH. Research advance in virulence and spore of *Clostridium difficile*[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2016, 15(6): 436-440 (in Chinese)
刘思娣, 吴安华. 艰难梭菌毒力与芽孢研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2016, 15(6): 436-440
- [5] Rodriguez C, Taminiau B, Van Broeck J, Delmée M, Daube G. *Clostridium difficile* in food and animals: a comprehensive review[A]//Donelli G. Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health[M]. Cham: Springer, 2016, 932: 65-92
- [6] Hensgens MPM, Keessen EC, Squire MM, Riley TV, Koene MGJ, De Boer E, Lipman LJA, Kuijper EJ. *Clostridium difficile* infection in the community: a zoonotic disease?[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2012, 18(7): 635-645
- [7] Danz HR, Lee S, Chapman-Bonofiglio SP, Ginese M, Beamer G, Girouard DJ, Tzipor S. The Impact of actotoxumab treatment of gnotobiotic piglets infected with different *Clostridium difficile* isogenic mutants[J]. Journal of Infectious Diseases, 2020, 221(2): 276-284
- [8] Zhang LJ. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from food animals in China[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2017 (in Chinese)
张莉娟. 动物源艰难梭菌分子分型及耐药性分析[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2017
- [9] Riley TV, Lyras D, Douce GR. Status of vaccine research and development for *Clostridium difficile*[J]. Vaccine, 2019, 37(50): 7300-7306
- [10] Rodriguez C, Avesani V, Taminiau B, Van Broeck J, Brévers B, Delmée M, Daube G. Investigation of *Clostridium difficile* interspecies relatedness using multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis and antimicrobial susceptibility testing[J]. The Veterinary Journal, 2015, 206(3): 349-355
- [11] Aktories K, Schwan C, Jank T. *Clostridium difficile* toxin biology[J]. Annual Review of Microbiology, 2017, 71(1): 281-307
- [12] Sarah Walker A, Eyre DW, Wyllie DH, Dingle KE, Griffiths D, Shine B, Oakley S, O'Connor L, Finney J, Vaughan A, et al. Relationship between bacterial strain type, host biomarkers, and mortality in *Clostridium difficile* infection[J]. Clinical Infectious Diseases, 2013, 56(11): 1589-1600
- [13] Behringer M, Miller WG, Oyarzabal OA. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA*-RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR[J]. Journal of Microbiological Methods, 2011, 84(2): 194-201
- [14] Chen LD. Toxin detection, MLST typing and drug sensitivity analysis of *Clostridium difficile* from different sources[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of Southern Medical University, 2016 (in Chinese)
陈丽丹. 不同来源的艰难梭菌其毒素、MLST 分型及药敏情况的分析[D]. 广州: 南方医科大学博士学位论文, 2016
- [15] Oksi J, Anttila VJ, Mattila E. Treatment of *Clostridioides (Clostridium) difficile* infection[J]. Annals of Medicine, 2020, 52(1/2): 12-20
- [16] Knight DR, Squire MM, Riley TV. Laboratory detection of *Clostridium difficile* in piglets in Australia[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2014, 52(11): 3856-3862
- [17] Perry JD, Asir K, Halimi D, Orenga S, Dale J, Payne M, Carlton R, Evans J, Gould FK. Evaluation of a chromogenic culture medium for isolation of *Clostridium difficile* within 24 hours[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(11): 3852-3858
- [18] Persson S, Torpdahl M, Olsen KEP. 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]. Clinical Microbiology and Infection, 2008, 14(11): 1057-1064
- [19] Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, Bowden R, Crook DW, Fung R, Golubchik T, Harding RM, Jeffery KJM, Jolley KA, et al. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(3): 770-778
- [20] Lim SC, Knight DR, Riley TV. *Clostridium difficile* and one health[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2020, 26(7): 857-863
- [21] Putsathit P, Neela VK, Joseph NMS, Ooi PT, Ngamwongsatit B, Knight DR, Riley TV. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* isolated from piglets[J]. Veterinary Microbiology, 2019, 237: 108408
- [22] Zhang LJ, Yang L, Gu XX, Chen PX, Fu JL, Jiang HX. The first isolation of *Clostridium difficile* RT078/ST11 from pigs in China[J]. PLoS One, 2019, 14(2): e0212965
- [23] Avbersek J, Janezic S, Pate M, Rupnik M, Zidaric V, Logar K, Vengust M, Zemljic M, Pirs T, Oceppek M. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia[J]. Anaerobe, 2009, 15(6): 252-255
- [24] Schneeberg A, Neubauer H, Schmoock G, Baier S, Harlizius

- J, Nienhoff H, Brase K, Zimmermann S, Seyboldt C. *Clostridium difficile* genotypes in piglet populations in Germany[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(11): 3796-3803
- [25] Moono P, Putsathit P, Knight DR, Squire MM, Hampson DJ, Foster NF, Riley TV. Persistence of *Clostridium difficile* RT 237 infection in a Western Australian piggery[J]. Anaerobe, 2016, 37: 62-66
- [26] Gould LH, Limbago B. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen?[J]. Clinical Infectious Diseases, 2010, 51(5): 577-582
- [27] Miller BA, Chen LF, Sexton DJ, Anderson DJ. Comparison of the burdens of hospital-onset, healthcare facility-associated *Clostridium difficile* infection and of healthcare-associated infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community hospitals[J]. Infection Control & Hospital Epidemiology, 2011, 32(4): 387-390
- [28] Wu YC, Lee JJ, Tsai BY, Liu YF, Chen CM, Tien N, Tsai PJ, Chen TH. Potentially hypervirulent *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 lineage isolates in pigs and possible implications for humans in Taiwan[J]. International Journal of Medical Microbiology, 2016, 306(2): 115-122
- [29] Gu SL, Chen YB, Lv T, Zhang XW, Wei ZQ, Shen P, Li LJ. Risk factors, outcomes and epidemiology associated with *Clostridium difficile* infection in patients with haematological malignancies in a tertiary care hospital in China[J]. Journal of Medical Microbiology, 2015, 64(3): 209-216
- [30] Huang HH, Wu S, Chen RJ, Xu SH, Fang H, Weintraub A, Nord CE. Risk factors of *Clostridium difficile* infections among patients in a university hospital in Shanghai, China[J]. Anaerobe, 2014, 30: 65-69
- [31] Yan Q, Zhang J, Chen C, Zhou H, Du P, Cui Z, Cen R, Liu L, Li W, Cao B, et al. Multilocus sequence typing (MLST) analysis of 104 *Clostridium difficile* strains isolated from China[J]. Epidemiology & Infection, 2013, 141(1): 195-199
- [32] Chen YB, Gu SL, Wei ZQ, Shen P, Kong HS, Yang Q, Li LJ. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* in a tertiary hospital of China[J]. Journal of Medical Microbiology, 2014, 63(4): 562-569