

艰难梭菌耐药基因、毒力基因分布与核心基因的功能特征

岳靖林¹ 滑明溪² 段昂² 杜鹏程² 霍成³ 陈晨¹

【摘要】目的 分析艰难梭菌基因组中耐药基因、毒力基因和核心基因的分布,明确该菌耐药和毒力的分子特征。**方法** 采用Prokka和FastTree等软件分析已公布的艰难梭菌2 455个基因组的核心基因和系统发生树,并进一步采用Abricate软件和自主开发的软件解析不同核心基因组和分子分型对应的耐药基因和毒力基因的分布特征,明确耐药基因、毒力基因与基因组型的关系。**结果** 基于基因组学特征,Clade IV 为新发现的进化分支,Clade C- I / II / III发现了新的分子分型,万古霉素耐药性的发生具有进化聚集性,临床高毒菌株的基因组分布日益广泛。核心基因组比较分析表明Clade 5中细胞运动性相关基因占比最小。**结论** 通过分析已发表的艰难梭菌基因组序列,描绘该菌耐药基因、毒力基因的进化聚集性、广泛性和核心基因的功能特异性,有助于对该菌的院内传播和流行病学进行研究,为改进临床治疗策略提供更多依据。

【关键词】 艰难梭菌; 耐药基因; 毒力基因; 核心基因

Characteristics of antimicrobial resistance genes, virulence genes and core genes of *Clostridium difficile* Yue Jinglin¹, Hua Mingxi², Duan Ang², Du Pengcheng², Huo Cheng³, Chen Chen¹. ¹Institute of Infectious Diseases, Peking University Ditan Teaching Hospital, Beijing 100015, China; ²Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; ³Pathology Department, Sinopharm Tongmei General Hospital, Datong 037001, China
Corresponding author: Chen Chen, Email: chenchen.bj2008@163.com

【Abstract】Objective To investigate the distribution of antibiotic resistance genes, virulence genes and core genes in *Clostridium difficile* (*C. difficile*) genomes, and to identify the molecular characteristics of antimicrobial resistance and virulence of *C. difficile*. **Methods** The core genes and phylogenetic tree of 2 455 *C. difficile* genomes were analyzed by Prokka and FastTree software. Abricate software and self-developed software were furtherly used to analyze the distribution characteristics of antibiotic resistance genes and virulence genes corresponding to different core genomes and molecular types, so as to clarify the relationship between drug resistance genes, virulence genes and genotype. **Results** Based on genomic characteristics, Clade IV is a newly discovered evolutionary branch. New molecular typings were found in Clade C- I / II / III, and the occurrence of vancomycin resistance showed evolutionary aggregation. The genomes of clinical strains with high virulence were widely distributed. The comparative analysis of the core genomes showed that the proportion of cell motility related genes in Clade 5 was the smallest. **Conclusions** By analyzing the published genome sequences of *C. difficile*, the distributive characteristics of antimicrobial resistance genes, virulence genes and core genes were described, which

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2021.06.008

基金项目: 国家重点研发计划 (No. 2018YFE0192500)

作者单位: 100015 北京, 北京大学地坛医院教学医院传染病研究所¹; 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所²; 037001 大同市, 山西国药同煤总医院病理科³

通信作者: 陈晨, Email: chenchen.bj2008@163.com

could provide more basis for better understanding of the bacterium and improvement of clinical treatment strategies.

【Key words】 *Clostridium difficile*; Antimicrobial resistance gene; Virulence gene; Core gene

艰难梭菌 (*Clostridium difficile*) 是一类革兰染色阳性厌氧芽孢杆菌。艰难梭菌感染 (*Clostridium difficile* infection, CDI), 常引起以肠道感染为主的一系列病症, 其严重程度包括从轻度 and 可能复发的腹泻到危及生命的并发症, 如伪膜性肠炎、中毒性巨结肠和结肠穿孔^[1]。早在20世纪70年代后期, 艰难梭菌就被确认为抗菌药物相关腹泻的病原菌之一^[2]。20世纪末, 艰难梭菌已成为发达国家医院获得性感染的最常见病原之一^[3]。2000年, Freeman等^[4]在北美分离了多位点序列分型1型 (sequence type 1, ST1)、核糖体分型027型流行菌株, 该菌株具有致病性高、传播能力强且病死率高的特点, 后续研究表明艰难梭菌毒素A (*Clostridium difficile* toxin A, TcdA) 和毒素B (*Clostridium difficile* toxin B, TcdB) 是该菌的主要致病因素, 一些艰难梭菌亚型可产生第3种毒力因子, 名为二元毒素 (binary toxin, CDT)^[5]。近年来, 因临床中抗菌药物的大量使用, 多重耐药艰难梭菌的出现和扩散使其预防和治疗的选择更为复杂化^[6-7]。此外, 一个细菌物种的核心基因组定义为该菌所有基因组共有基因的集合。细菌核心基因的研究在开发新药物和扩展对生物学的认识方面具有巨大的潜力, 但目前关于艰难梭菌核心基因的研究尚少, 且不够深入^[8]。

既往开展的基于细菌耐药谱表型和多位点序列分型、核糖体分型等细菌分子分型的研究, 尽管有助于深入了解艰难梭菌临床耐药表型和分子特征, 但无法准确、全面描述艰难梭菌的基因组特征和耐药基因、毒力基因的分布。此外, 目前有关艰难梭菌核心基因的研究所用菌株数量较少, 不足以准确体现该菌核心基因组的特征。为进一步明确艰难梭菌的院内传播、流行病学及目前临床用药的抗菌药物耐药情况, 本研究利用美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库中2 290个基因组序列数据, 分析耐药基因、毒力基因的分布以及核心基因的功能, 阐释艰难梭菌的耐

药、毒力和核心基因组特征, 报道如下。

材料与方法

一、基因组序列下载

截止至2021年3月9日, 在NCBI-genome库中以关键词 “*Clostridium difficile*” 搜索得到了2 290个已组装好的艰难梭菌基因组, 下载基因组组装序列。

二、多位点序列分型

使用BLAST软件, 将下载获得的基因组序列与艰难梭菌多位点序列分型 (multiple locus sequence typing, MLST) 数据库进行比对, 通过识别*adk*、*atpA*、*dxr*、*glyA*、*recA*、*sodA*及*tpi*共7个基因位点的型别, 明确各个菌株的分子分型。

三、系统发育树构建

以艰难梭菌参考菌株*C. difficile* 630 (序列号: NC_009089.1) 的为参考基因组序列, 构建保守序列的比对信息: 首先利用Bowtie 2^[9]和MUMmer软件 (<http://www.tigr.org/software/mummer/>) 进行序列比对, 然后使用Samtools软件 (<http://www.htslib.org/>) 过滤不可靠的序列, 最后根据比对信息构建多重序列比对结果。利用多重序列比对结果, 应用FastTree v2.1.11 (<http://www.microbesonline.org/fasttree/>) 构建最大似然树。最优树的选择, 通过1万次迭代, 计算bootstrap value 获得。

四、耐药基因的识别

使用Prokka^[10]软件对下载的基因组序列进行基因预测和初步功能注释, 利用Abricate软件 (<https://github.com/tseemann/abricate>) 识别耐药基因, 当比对相似度 $\geq 80\%$ 且序列覆盖度 $\geq 70\%$ 时, 认为基因组中存在该耐药基因。

五、毒力基因的识别

通过VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) 数据库查询, 艰难梭菌中存在4个毒力基因, 下载参考序列。使用BLAST软件将艰难梭菌

基因组序列与毒力基因参考序列进行比对, 当比对相似性 $\geq 90\%$ 且序列覆盖度 $\geq 70\%$ 时, 认为该基因组中存在该毒力基因。

六、核心基因的识别及功能分析

基于Prokka软件的基因预测和注释结果, 利用Roary软件进行核心基因与泛基因组分析^[11]。然后利用BLAST软件 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 将核心基因序列与COG数据库进行比对, 进行功能注释。其中, 比对期望值 (E value) 截断值为 $5e-1$ 。

结 果

一、艰难梭菌基因组的分子分型

已发表的2 455个艰难梭菌基因组, 来源于1935至2019年, 共覆盖了欧洲、亚洲等38个国家。2 290个基因组平均大小为4.2 Mb, 平均GC含量为28.7%, 共覆盖了151个序列型 (sequence type, ST), 其中占比 $> 1.5\%$ 的序列型共16个,

表1 艰难梭菌 (2 455 个) 基因组的 ST 分型分布

Index	ST	基因组数量	比例 (%)
1	1	328	13.4
2	2	221	9.0
3	37	165	6.7
4	8	161	6.6
5	11	146	5.9
6	3	135	5.5
7	42	131	5.3
8	15	113	4.6
9	17	101	4.1
10	6	48	2.0
11	14	48	2.0
12	未知	47	1.9
13	10	38	1.5
14	54	38	1.5
15	26	37	1.5
16	55	37	1.5
17	其他	661	26.9

注: 未知: 基因组的分子分型未知; 其他: 基因组分子分型占比小于1.5%

见表1。

二、艰难梭菌基因组的进化

根据艰难梭菌的序列型别, 前期分子进化研究将艰难梭菌的基因组分为8个主要的进化枝^[12]。本研究基于已公布的2 455个艰难梭菌基因组的151个序列型, 每个序列型随机挑选出1个基因组, 最终随机得到151个基因组。然后利用151个基因组信息构建系统发育树, 发现该进化树覆盖了既往研究中报道的所有进化枝, 且发现了1个新的进化枝Clade-IV (图1)。其中Clade 1以ST3为代表, 包含了最多的序列类型, 共计82个; Clade 2以ST1为代表, 包含了29个序列型; Clade 3以ST5为代表, 包含了5个序列型; Clade 4以ST37为代表, 包含了19个序列型; Clade 5以ST11为代表, 包含8个序列型; Clade C- I 以ST206为代表, 本研究中未发现ST206, 但通过进化枝的划分与等位基因谱的比较, 发现ST360、ST641、ST665和ST666归属于Clade C- I。Clade C- II 以ST200为代表, 本研究中不仅发现了ST200, 还新发现ST600归属于Clade C- II。Clade C-III以ST204为代表; 本研究未发现ST204, 但新发现ST361归属于Clade C-III。本研究还新发现了一个进化枝Clade-IV, ST669归属于该分支 (表2)。

三、艰难梭菌的耐药基因分析

本研究重点对随机挑选出的151个不同ST分型的艰难梭菌基因组的耐药基因进行分析, 共发现23个耐药基因 (表3), 且基因组中耐药基因的分布差异较大 (图1)。其中, 几乎所有分子分型的艰难梭菌基因组均携带耐药基因cdeA, 其编码产物是多种药物外排转运蛋白。含有万古霉素的耐药基因的基因组共涵盖了约100个以上的分子分型, 相关耐药基因主要包括vanS-Cd、vanG-Cd、vanT-Cd、vanR-Cd及vanZ1, 其中, vanS-Cd编码万古霉素耐药组氨酸激酶VanS, vanG-Cd编码D-丙氨酸-D-丝氨酸连接酶, vanT-Cd编码膜结合丝氨酸外消旋酶VanT-Cd, vanR-Cd编码VanS的转录调控蛋白VanR, vanZ1编码糖肽抗性蛋白VanZ1。 β -内酰胺类的耐药基因主要包括bla_{CDD-1}及bla_{CDD-2}, 分别在79和61个基因组分子分型中被发现, 分别编码D类-内酰胺酶CDD-1和D类-内酰胺酶CDD-2。克林霉素和红霉素的耐药基因为erm (B) _18, 主要编

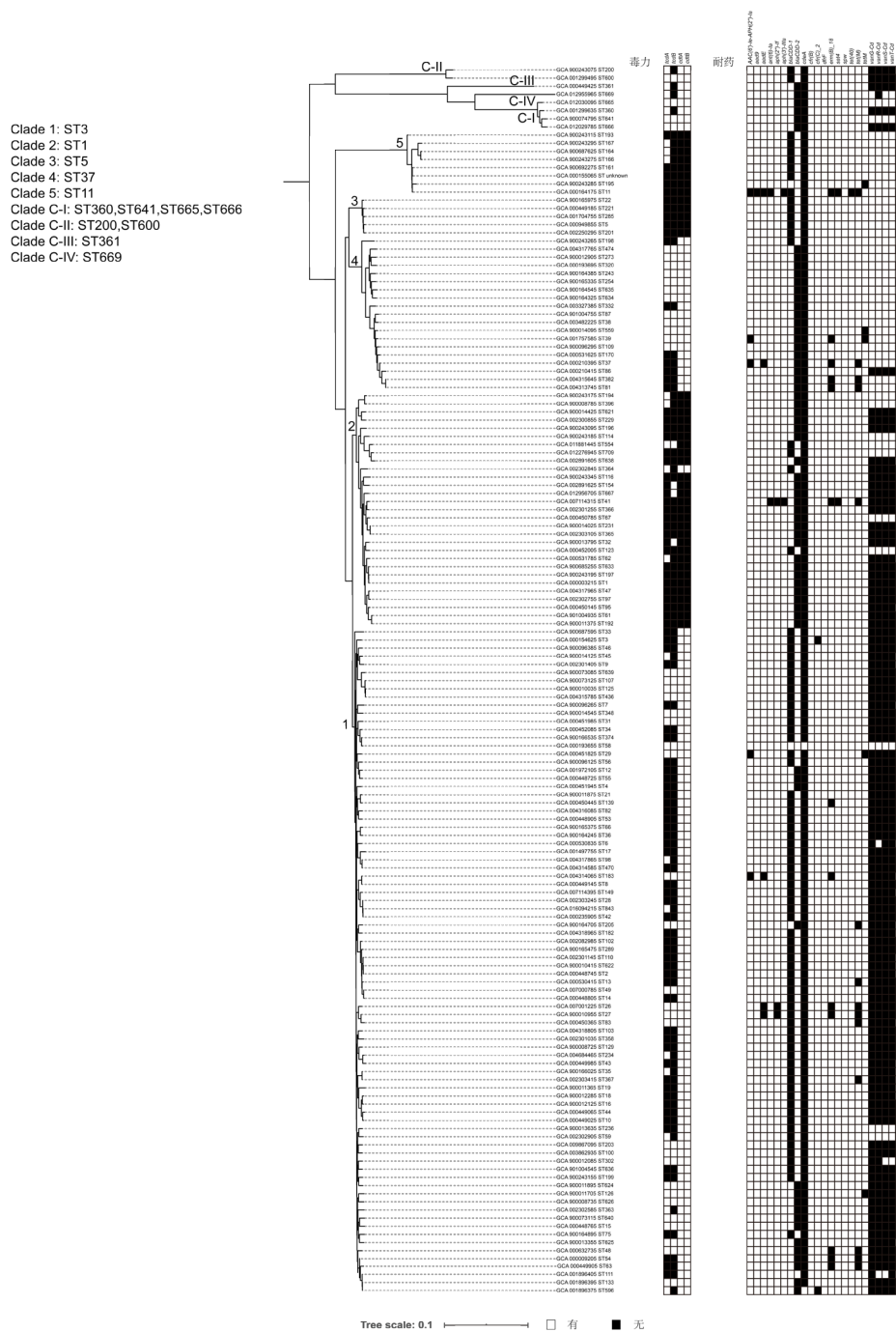


图1 基于151个分子分型的艰难梭菌基因组进化及耐药基因、毒力基因的分布

码相关核糖体甲基化酶,涵盖了13个基因组分子分型。此外,含有编码四环素耐药核糖体保护蛋白 Tet (M) 的基因tet (M) 的基因组在14个基因组分子分型中被发现。仅有5个基因组分子分型中含有aadE耐药基因,主要编码氨基糖苷6-腺苷转移酶 AadE,使链霉素产生耐药性。其他包含较少分子分型的基因组中的耐药基因主要反映对氨基糖苷

类、氯霉素、大环内酯、阿卡米星、链阳霉素、链丝霉素等的耐药性。此外,基于基因组序列型进化的角度(图1),万古霉素的耐药相关基因表现出一定的进化聚集性,主要富集于Clade 1、Clade 2、Clade C-I/II/III,在Clade 3、Clade 4、Clade 5中缺失。其他类别的耐药基因并无明显的进化聚集性。总之,艰难梭菌基因组中的耐药基因具有多样

表2 艰难梭菌 Clade-C 菌株的序列型及等位基因谱

ST	<i>adk</i>	<i>atpA</i>	<i>dxr</i>	<i>glyA</i>	<i>recA</i>	<i>sodA</i>	<i>tpi</i>	Clade	参考文献/研究
177	13	18	22	33	18	31	28	C- I	[13]
206	13	18	22	40	18	38	32	C- I	[13]
335	13	17	22	33	18	31	51	C- I	[12]
360	13	18	22	33	18	31	26	C- I	本研究
641	13	46	22	33	18	31	26	C- I	本研究
200	15	21	28	38	21	36	30	C- II	[13]/本研究
337	25	21	38	53	21	36	53	C- II	[12]
338	25	21	38	53	21	48	53	C- II	[12]
600	53	21	58	87	48	36	30	C- II	本研究
204	16	23	29	39	23	37	33	C-III	[13]
336	24	36	37	54	31	49	50	C-III	[12]
341	26	35	39	52	31	49	52	C-III	[12]
345	27	37	39	55	31	49	54	C-III	[12]
347	28	39	41	57	30	50	56	C-III	[12]
361	30	41	43	59	34	53	58	C-III	本研究
669	58	49	62	69	37	52	64	C-IV	本研究

表3 艰难梭菌 151 个基因组中识别的耐药基因及其耐药谱

耐药基因	分子分型数量	比例 (%)	进化枝	抗菌药物
AAC (6') - I e-APH (2'') - I a	5	3.3	Clade 1/4/5	氨基糖苷类
aad9	1	0.7	Clade 5	氨基糖苷类
aadE	5	3.3	Clade 1/4/5	链霉素
ant (6) - I a	2	1.3	Clade 2/5	链霉素
aph (2'') - I f	3	2.0	Clade 1/2	阿米卡星/庆大霉素/卡那霉素/短霉素
aph (3') -IIIa	2	1.3	Clade 2/5	阿米卡星/卡那霉素
bla _{CDD-1}	83	55.0	Clade 1/2/3/4/5/C- II	β-内酰胺
bla _{CDD-2}	65	43.0	Clade 1/2/4/C- I /C-III/C-IV	β-内酰胺
cdeA	149	98.7	Clade 1/2/3/4/5/C- I /C- II /C-III/C-IV	四环素/吡啶酮类/氟喹诺酮类/ 甘氨酸环素
cfr (B)	0	0.0	—	大环内酯/林肯(酰)胺/链阳霉素
cfr (C) _2	2	1.3	Clade 1	氯霉素/氟苯尼考/克林霉素/林肯霉素/ 利奈唑胺/达福普丁/普那霉素/ 维及霉素/泰妙菌素
dfrF	0	0.0	—	甲氧苄氨嘧啶
erm (B) _18	13	8.6	Clade 1/2/4/5	红霉素/林肯霉素/克林霉素/奎奴普丁/ 普那霉素/维及霉素
sat4	2	1.3	Clade 2/5	链丝菌素
spw	0	0.0	—	氨基糖苷类
tet (40)	1	0.7	Clade 5	四环素
tet (M)	14	9.3	Clade 1/2/4/5	四环素
tetM	5	3.3	Clade 1/4/5	四环素
vanG-Cd	107	70.9	Clade 1/2/4/C- I /C- II /C-III	万古霉素
vanR-Cd	106	70.2	Clade 1/2/4/C- I /C- II /C-III/C-IV	万古霉素
vanS-Cd	105	69.5	Clade 1/2/4/C- I /C- II /C-III	万古霉素
vanT-Cd	106	70.2	Clade 1/2/4/C- I /C- II /C-III	万古霉素
vanZ1	117	77.5	Clade 1/2/3/4/5/C- I /C- II /C-III/C-IV	万古霉素

性，一定程度上提示临床用药的抗性问题的日益严重，亟需关注。

四、艰难梭菌的毒力基因分析

在2 455个艰难梭菌基因组中，tcdA和tcdB毒力基因可以分为4类（表4）： A^+B^+ 、 A^+B^- 、 A^-B^+ 及 A^-B^- 。其中， A^+B^+ 类型所包含的分子分型最多，共87个； A^-B^+ 覆盖了19个分子分型， A^+B^- 仅覆盖了3个分子分型（ST32、ST154、ST667），此3类中均含有PaLoc。此外，在41个基因组分子分型中发现了CdtLoc，且绝大多数是cdtA和cdtB同时存在。同时含有PaLoc和CdtLoc的基因组分子分型为40个，仅含有PaLoc的基因组基因组分子分型为69个，仅含有CdtLoc的基因组仅1个，二者均未找到的基因组则涵盖了41个分子分型（表5）。从进化看（图1），Clade 1、Clade 4和Clade C- I / II /III的毒力类型均表现为 $PaLoc^+CdtLoc^-$ 和 $PaLoc^-CdtLoc^-$ ，其中Clade 1约3/4的基因组为 $PaLoc^+CdtLoc^-$ ，Clade 4约40%的基因组为 $PaLoc^+CdtLoc^-$ ，Clade C- I / II /III约40%的基因组为 $PaLoc^+CdtLoc^-$ 。Clade 2的毒力类型表现为 $PaLoc^+CdtLoc^+$ 和 $PaLoc^+CdtLoc^-$ 两种，其中约90%的基因组为 $PaLoc^+CdtLoc^+$ 。Clade 3和Clade 5的毒力类型表现为严格的 $PaLoc^+CdtLoc^+$ 。总之，

艰难梭菌的毒力基因主要富集于Clade 1、Clade 2、Clade 3和Clade 5，Clade 4和Clade C- I / II /III缺失。此外，本研究利用有明确时间信息的1 604个艰难梭菌基因组，分析了携带不同类型tcdA/tcdB毒力基因的基因组分子分型的生长情况，可以看到与其他类型相比， A^-B^+ 类菌株的ST型在2011至2019年度呈现了明显的增长（图2），且发现了新的尚未报道的ST360、ST361和ST669归属于该类菌株。综上，近年来，艰难梭菌高毒菌株的扩散成为临床治疗面对的新挑战。

五、艰难梭菌的核心基因分析

核心基因定义为1个细菌物种所有基因组共有的基因的集合。前期分子进化研究将艰难梭菌的基因组分为8个主要的进化枝，本研究还新发现了1个进化分支Clade C-IV。本研究从每个进化枝（Clade C- I / II /III /IV合并为Clade-C）随机挑选5个代表性基因组，进行核心基因组分析。6组中，Clade-C拥有最小的核心基因组，Clade 1/2/3/4/5的核心基因的数量则无显著变化（表6）。本研究进一步进行COG功能分析，发现Clade 5中细胞运动性相关（N）基因的占比最小，其他组间该类基因占比差异并无统计学意义（图3）。

表 4 携带不同类型 tcdA/tcdB 毒力基因的艰难梭菌基因组 151 个分子分型的分布

tcdA/tcdB毒力基因类型	分子分型数量	比例（%）	进化枝
tcdA ⁺ tcdB ⁺	87	57.6	Clade 1/2/3/4/5
tcdA ⁺ tcdB ⁻	3	2.0	Clade 2
tcdA ⁻ tcdB ⁺	19	12.6	Clade 1/2/5/C- I /C- II /C-III/C-IV
tcdA ⁻ tcdB ⁻	42	27.8	Clade 1/2/4/C- I /C- II
合计	151	100.0	—

表 5 携带不同类型毒素基因座的艰难梭菌基因组 151 个分子分型的分布

毒素基因座类型	分子分型数量	比例（%）	进化枝
PaLoc ⁺ CdtLoc ⁺	40	26.5	Clade 2/3/5
PaLoc ⁻ CdtLoc ⁺	1	0.7	Clade 2
PaLoc ⁺ CdtLoc ⁻	69	45.7	Clade 1/2/4/C- I /C- II /C-III/C-IV
PaLoc ⁻ CdtLo ⁻	41	27.2	Clade 1/4/C- I /C- II
合计	151	100.0	

注：“—”代表该毒素基因座类型不存在；“+”代表该毒素基因座类型存在

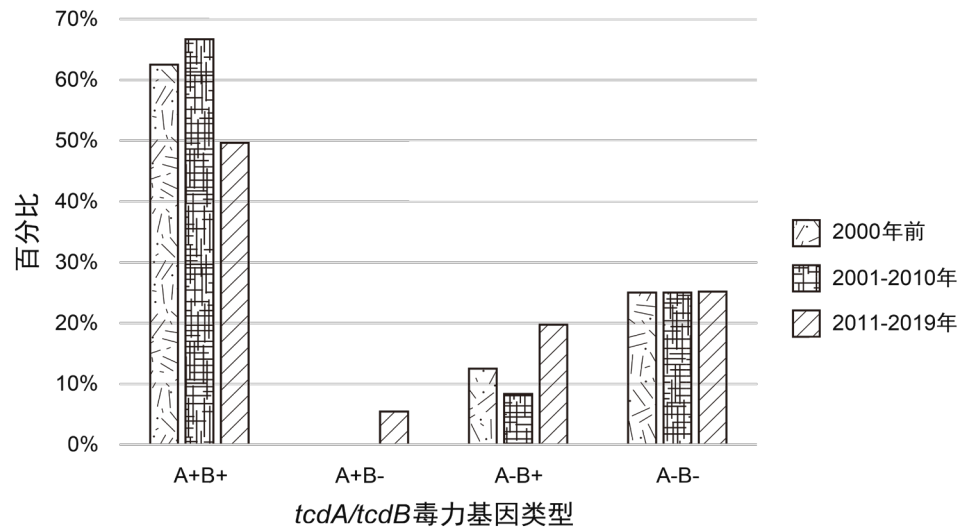


图2 携带不同tcdA/tcdB毒力基因的艰难梭菌基因组ST型的时间分布

表 6 艰难梭菌不同进化谱系核心基因组的 COG 功能分布

COG功能分类	Clade 1	Clade 2	Clade 3	Clade 4	Clade 5	Clade-C
C: 能量产生与转换	172	170	170	176	171	174
D: 细胞周期调控, 细胞及染色体分裂	23	21	21	24	23	22
E: 氨基酸运输与代谢	247	246	251	245	227	240
F: 核苷酸运输和代谢	73	72	72	73	73	72
G: 碳水化合物运输和代谢	246	254	240	264	243	195
H: 辅酶运输和代谢	87	86	84	89	87	91
I: 脂质运输和代谢	51	53	52	51	53	50
J: 核糖体结构及翻译	140	140	137	144	143	142
K: 转录	286	274	276	307	285	253
L: 复制、重组和修复	116	107	126	114	113	104
M: 细胞壁/膜的生成	128	129	122	128	126	109
N: 细胞运动性	53	53	51	47	28	45
O: 蛋白修饰	67	68	69	69	71	65
P: 无机离子的转运与代谢	124	126	125	130	127	130
Q: 次生代谢物的生物合成、运输和分解代谢	27	26	25	22	22	26
R: 常规功能预测	269	266	255	271	259	244
S: 功能未知	866	877	936	973	881	721
T: 信号转导机制	148	151	145	152	144	125
U: 细胞内运输, 分泌和囊泡运输	13	12	12	13	13	13
V: 防御机制	88	95	84	105	93	89
合计	3 224	3 226	3 253	3 397	3 182	2 910

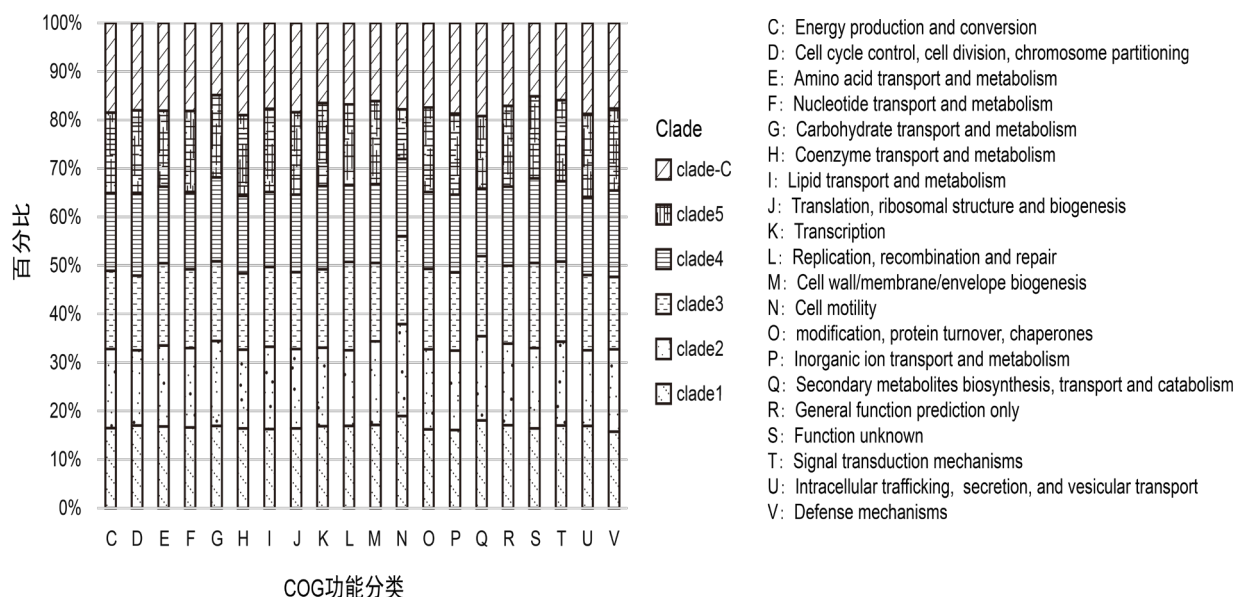


图3 艰难梭菌不同进化谱系核心基因组的COG功能比例分布

讨 论

既往研究采用比较基因组学、MLST等方法的全基因组分析表明,艰难梭菌的进化经历了不同谱系。目前,艰难梭菌包括至少6种进化枝: Clade 1~5, 以及第6种未知的谱系C- I。此外,基于艰难梭菌环境样本的一项研究又发现了至少两种不同的未知谱系C- II和C-III^[12]。本研究中2 455个艰难梭菌基因组共计151种序列型,基于序列型构建的系统发育树包括了9种不同的进化枝: Clade 1~5, Clade I / II / III / IV。其中, Clade 1~5与既往研究一致,所包含的代表性序列型也一致。而 Clade I 发现了新的序列型ST360、ST641、ST665和ST666, Clade II发现了新的序列型ST600, Clade III发现了新的序列型ST361和Clade IV (ST669)为本研究新发现的进化枝^[13]。近年来产生了大量的艰难梭菌基因组数据,使研究者能够深入了解艰难梭菌的进化、传播与流行病学,但这并不能完全代表全球人群。这个物种已经分化成至少9个谱系,其他的可能还未被发现。因此,对艰难梭菌进一步的持续检测和研究十分必要。

抗菌治疗在CDI的发生发展中起着核心作用。长期使用抗菌药物导致肠道菌群失调是CDI发生的重要基础,如果艰难梭菌对所使用的抗菌药物同时具有耐药性,则会导致发生CDI的风险增加。

143个代表性基因组中,耐药基因盖的分子分型最多的依次为cdeA、vanS-Cd、vanG-Cd、vanT-Cd、vanR-Cd、vanZ1、bla_{CDD-1}、bla_{CDD-2}、tet (M) 及erm (B) _18, 分别介导对氟喹诺酮类、万古霉素、β-内酰胺类、四环素类药物、克林霉素和红霉素的耐药性。甲硝唑和万古霉素仍然是治疗CDI的一线抗菌药物^[14]。虽然这两种药物对大多数CDI病例仍然有效,但临床上已分离出敏感性显著降低的菌株^[15]。本研究中万古霉素耐药基因覆盖了约100个以上的分子分型,然而临床上万古霉素的耐药性并不高。肠球菌对万古霉素的主要耐药机制为一组功能相似的连接酶,导致合成D-丙氨酸-D-乳酸取代正常的细胞壁肽聚糖末端D-丙氨酸-D-丙氨酸,使万古霉素不能与其靶点结合;或者合成D-丙氨酸-D-丝氨酸取代正常细胞壁的结构。但当前艰难梭菌对于万古霉素敏感性降低的机制仍未明确^[16]。在肠球菌和金黄色葡萄球菌对万古霉素的耐药研究中, vanS-Cd、vanG-Cd、vanT-Cd、vanR-Cd为万古霉素多酶耐药途径中的关键基因, vanZ1仅为附属基因并非耐药所必需^[17]。但在艰难梭菌中,这些耐药基因的作用可能与其他菌种不同。进化上,万古霉素耐药基因有一定的进化聚集性,提示Clade 1、Clade2、Clade C- I / II / III菌株未来出现因万古霉素耐药导致CDI治疗失败的风险较高。这些证据提示:目前艰难梭菌的临床用药存在耐药性的风险,

艰难梭菌对抗菌药物的耐药机制也亟需关注。

艰难梭菌的主要毒力因子为毒素A (TcdA) 和毒素B (TcdB), 由艰难梭菌致病决定区 (pathogenicity locus, PaLoc) 的tcdA和tcdB基因编码^[18]。一些艰难梭菌亚型可产生第三种毒力因子CDT, 由二元毒素基因座 (Cdt locus, CdtLoc) 中的cdtA和cdtB基因编码^[8]。TcdA和TcdB均具有明确的毒性作用, 在受感染宿主中引起广泛的结肠炎症和上皮组织损伤, 表现为腹泻^[5]。仅产生TcdB但不产生TcdA (A^-B^+) 的菌株也可引起与 A^+B^+ 菌株感染症状类似的疾病, 包括从轻度腹泻甚至更严重的疾病类型, 使得TcdA在CDI中的重要性受到质疑^[19]。本研究发现, $A-B^+$ 类菌株在2019至2011年度在ST型上有较快的扩散, 且发现了未报道的ST360、ST361和ST669归属于该类菌株。第三种毒力因子为CDT, 与产气荚膜梭菌的蓖麻毒素同源, 可增强艰难梭菌的毒力和疾病严重程度, 导致更高的致死率和复发风险^[8]。一些有临床症状的患者体内分离出仅产生CDT而不产生TcdA和TcdB的菌株^[20]。本研究发现约1/4基因组中含有cdtA和cdtB, 文献报道产生CDT的菌株在医院环境中已越来越普遍^[8], 提示CDT的毒性作用不容忽视。既往研究中Clade 1、Clade 2、Clade 3和Clade 5为主要产毒菌株, Clade 4和Clade C-1为主要非产毒菌株, 对其他进化枝的了解较少, 但Clade C-II包含ST200, 其毒力类型为tcdA⁻tcdB⁺^[21]。Clade 2、Clade 3和Clade 5菌株常携带二元毒素基因^[22], 这与本研究分析结果一致。此外, 以ST204为代表的Clade C-III是非产毒的^[23], 但本研究发现新纳入Clade C-III的ST361的毒力类型为tcdA⁻tcdB⁺, 为产毒菌株, 提示Clade C-III枝可能是多样性的。高毒菌株的出现和扩散增加了临床治疗难度。因此, 研究艰难梭菌的毒力因子和致病机制, 有望为临床治疗和诊断提供新的思路 and 依据。

核心基因可作为开发临床检测方法和疫苗、基因编辑疗法等的候选靶标^[24]。通过对不同进化簇的艰难梭菌核心基因组的研究, 发现Clade 5中细胞运动性相关基因的占比最小。既往研究报道Clade 5与Clade 1/2/3/4进化枝在进化历史上有较大的不同, 且Clade 5为高毒力进化簇, 在动物感染和人类感染中均有发现^[25]。这种核心基因组的

不同可能与Clade 5的进化历史和所属的生境来源有关。

综上, 本研究分析来自NCBI数据库中的2 455个艰难梭菌基因组序列, 描绘了该菌耐药基因、毒力基因的进化聚集性、广泛性和核心基因的功能特异性, 有助于对该菌的院内传播和流行病学进行研究, 为改进临床治疗策略提供更多依据。

参 考 文 献

- [1] Guery B, Galperine T, Barbut F. *Clostridioides difficile*: diagnosis and treatments[J]. BMJ,2019,366:14609.
- [2] Hartley-Tassell LE, Awad MM, Seib KL, et al. Lectin activity of the TcdA and TcdB toxins of *Clostridium difficile*[J]. Infect Immun,2019,87(3):e00676-18.
- [3] Seo MR, Kim J, Lee Y, et al. Prevalence, genetic relatedness and antibiotic resistance of hospital-acquired *Clostridium difficile* PCR ribotype 018 strains[J]. Int J Antimicrob Agents,2018,51(5):762-767.
- [4] Freeman J, Bauer MP, Baines SD, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections[J]. Clin Microbiol Rev,2010,23(3):529-549.
- [5] Aktories K, Papatheodorou P, Schwan C. Binary *Clostridium difficile* toxin (CDT)--A virulence factor disturbing the cytoskeleton[J]. Anaerobe,2018,53:21-29.
- [6] 熊号峰, 刘景院, 李兴旺. 重症艰难梭菌感染者诊治研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2015,9(5):37-40.
- [7] 李继霞, 公衍文, 武静, 等. 急性淋巴细胞白血病合并抗菌药物相关腹泻一例[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2018,12(6):617-620.
- [8] Caputo A, Fournier PE, Raoult D. Genome and pan-genome analysis to classify emerging bacteria[J]. Biol Direct,2019,14(1):5.
- [9] Langmead B, Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. Nat Methods,2012,9(4):357-359.
- [10] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. Bioinformatics,2014,30(14):2068-2069.
- [11] Page AJ, Cummins CA, Hunt M, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis[J]. Bioinformatics,2015, 31(22):3691-3693.
- [12] Janezic S, Potocnik M, Zidaric V, et al. Highly divergent *Clostridium difficile* strains isolated from the environment[J]. PLoS One,2016,11(11):e0167101.
- [13] Martínez-Meléndez A, Morfin-Otero R, Villarreal-Treviño L, et al. Molecular epidemiology of predominant and emerging *Clostridioides difficile* ribotypes[J]. J Microbiol Methods,2020,175:105974.
- [14] Spigaglia P, Mastrantonio P, Barbanti F. Antibiotic resistances of *Clostridium difficile*[J]. Adv Exp Med Biol,2018,1050:137-159.
- [15] Peng Z, Ling L, Stratton CW, et al. Advances in the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infections[J]. Emerg Microbes Infect,2018,7(1):15.
- [16] 王丽, 所鸿. 艰难梭菌的耐药性及耐药机制研究进展[J]. 世界最新

医学信息文摘,2019,19(20):97-99.

- [17] Stogios PJ, Savchenko A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance[J]. Protein Sci,2020,29(3):654-669.
- [18] Monot M, Eckert C, Lemire A, et al. *Clostridium difficile*: New insights into the evolution of the pathogenicity locus[J]. Sci Rep,2015,5:15023.
- [19] King AM, Mackin KE, Lyras D. Emergence of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains: epidemiological and clinical considerations[J]. Future Microbiol,2015,10(1):1-4.
- [20] Geric B, Carman RJ, Rupnik M, et al. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters[J]. J Infect Dis,2006,193(8):1143-1150.
- [21] Janezic S, Dingle K, Alvin J, et al. Comparative genomics of toxinotypes identifies module-based toxin gene evolution[J]. Microb Genom,2020,6(10):mgen000449.
- [22] Dingle KE, Griffiths D, Didelot X, et al. Clinical *Clostridium difficile*: clonality and pathogenicity locus diversity[J]. PLoS One,2011,6(5):e19993.
- [23] Kuwata Y, Tanimoto S, Sawabe E, et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from a university teaching hospital in Japan[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis,2015,34(4):763-772.
- [24] Klasson L, Andersson SGE. Evolution of minimal-gene-sets in host-dependent bacteria[J]. Trends Microbiol,2004,12(1):37-43.
- [25] Elliott B, Dingle KE, Didelot X, et al. The complexity and diversity of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* clade 5[J]. Genome Biol Evol,2014,6(12):3159-3170.

(收稿日期: 2021-02-27)

(本文编辑: 孙荣华)

岳靖林, 滑明溪, 段昂, 等. 艰难梭菌耐药基因、毒力基因分布与核心基因的功能特征[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2021,15(6):409-418.