

DOI:10. 12138/j. issn. 1671—9638. 20255458

· 论 著 ·

# 基于艰难梭菌 *tcdC* 基因的新型 LAMP 检测方法的研发及临床诊断效能评估

肖园园<sup>1</sup>, 段菊屏<sup>2</sup>, 周景翔<sup>1</sup>, 黄 琴<sup>3</sup>, 卿 琰<sup>3</sup>, 王海波<sup>3</sup>, 吴安华<sup>1,4,5</sup>, 李春辉<sup>1,4,5</sup>

[1. 中南大学湘雅医院医院感染控制中心, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南中医药大学附属长沙市中医医院, 湖南 长沙 410011; 3. 湖南大学分子诊断与分子影像联合实验室, 湖南 长沙 410082; 4. 中南大学湘雅医院超级耐药菌感染防治研究中心, 湖南 长沙 410008; 5. 国家老年疾病临床研究中心(湘雅医院), 湖南 长沙 410008]

**[摘 要]** **目的** 研发一项快速鉴定艰难梭菌并能明确高产毒株的检测方法, 开展临床评估。**方法** 利用环介导等温扩增(LAMP)法, 基于 *tcdC*、*tcdA*、*tcdB* 基因来鉴定艰难梭菌, 并评估该检测技术的灵敏度、特异度和总体一致性。**结果** 共完成 499 例疑似艰难梭菌感染腹泻住院患者粪便标本检测, 艰难梭菌检出率为 12.8%(64/499), 其中产毒艰难梭菌的检出率为 10.8%(54/499)。本检测方法针对 *tcdA* 的灵敏度为 87.2%, 特异度为 98.9%, 阳性预测值为 89.1%, 阴性预测值为 98.6%; 对 *tcdB* 的灵敏度为 88.2%, 特异度为 99.6%, 阳性预测值为 90.0%, 阴性预测值为 98.7%。不同菌株总毒素量各有不同, 但 A+B+菌株平均产毒量(1.79 μg/mL)高于 A-B+菌株(0.72 μg/mL)和 A-B-菌株(<0.10 μg/mL)。**结论** 本便携式高通量 LAMP 检测方法能快速、高效鉴定艰难梭菌并且明确高毒株。

**[关 键 词]** 艰难梭菌; 艰难梭菌感染; 分子诊断; 毒素基因; 毒力调节基因; *tcdC*

**[中图分类号]** R446.1 R378.99

## Development and clinical diagnostic efficacy of a novel LAMP method targeting the *tcdC* gene in *Clostridioides difficile*

XIAO Yuanyuan<sup>1</sup>, DUAN Juping<sup>2</sup>, ZHOU Jingxiang<sup>1</sup>, HUANG Qin<sup>3</sup>, QING Yan<sup>3</sup>, WANG Haibo<sup>3</sup>, WU Anhua<sup>1,4,5</sup>, LI Chunhui<sup>1,4,5</sup> (1. Center for Healthcare-associated Infection Control, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 2. Changsha Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410011, China; 3. Joint Laboratory for Molecular Diagnosis and Molecular Imaging, Hunan University, Changsha 410082, China; 4. Super Drug-resistant Organism Infection Prevention and Control Research Center, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China; 5. National Clinical Research Center for Geriatric Disorders [Xiangya Hospital], Changsha 410008, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop a method for rapidly identifying *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) and determining high-producing toxin strains, conduct clinical evaluation. **Methods** The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was used to identify *C. difficile* based on the *tcdC*, *tcdA*, and *tcdB* genes. The sensitivity, specificity, and overall consistency of the detection method were evaluated. **Results** Feces specimens from 499 hospitalized patients suspected of *C. difficile*-associated diarrhea were detected, with *C. difficile* detection rate of

**[收稿日期]** 2024-08-10

**[基金项目]** 国家重点研发计划项目(2022YFC2009801、2022YFC2009805); 湖南省重点研发计划项目(2020SK3028); 长沙市科技计划项目(kq2202059); 中南大学湘雅医院科技成果转化基金项目(2024ZHJJ06)

**[作者简介]** 肖园园(1994-), 女(汉族), 湖南省衡阳市人, 博士研究生在读, 主要从事感染病学研究。

**[通信作者]** 李春辉 E-mail: lichunhui@csu.edu.cn; 吴安华 E-mail: dr\_wuanhua@sina.com

12.8% (64/499), out of which the detection rate of toxin-producing *C. difficile* was 10.8% (54/499). The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of the detection method for *tcdA* were 87.2%, 98.9%, 89.1%, and 98.6%, respectively, and 88.2%, 99.6%, 90.0%, and 98.73% for *tcdB*, respectively. The total toxin levels of different strains were different, but the average toxin production level of A+B+ strains (1.79 μg/mL) was higher than those of A-B+ strains (0.72 μg/mL) and A-B- strains (<0.10 μg/mL).

**Conclusion** The portable high-throughput LAMP detection method can rapidly and efficiently identify *C. difficile* and determine high-producing toxin strains.

**[Key words]** *Clostridioides difficile*; *Clostridioides difficile* infection; molecular diagnosis; toxin gene; virulence regulatory gene; *tcdC*

艰难梭菌(*Clostridioides difficile*, CD)是抗生素相关性腹泻(antibiotic-associated diarrhea, AAD)的主要病原体,已成为全球医院获得性腹泻最常见的病原体之一<sup>[1]</sup>。CD致病性取决于毒素表达:产毒株可分泌毒素 A(*tcdA* 编码)、毒素 B(*tcdB* 编码)及二元毒素,其中 *tcdA/B* 受致病决定区内 *tcdC*(负调控)、*tcdD*(正调控)及 *tcdE*(膜孔蛋白)协同调控<sup>[2-3]</sup>。RT072 高毒株因毒素高表达易引发重症,临床表现为腹泻、假膜性肠炎,严重者可进展为中毒性巨结肠或脓毒症休克<sup>[4]</sup>。由于 CD 检测条件受限,我国尚未将其纳入医院感染重点监测目标,这在一定程度上影响了疾病后续的诊治。快速鉴别艰难梭菌感染(*Clostridioides difficile* infection, CDI)及高产毒株对早期临床诊断和精准治疗至关重要。

目前,CD 鉴定主要基于病原学检测、毒素检测、基因检测等方法<sup>[5-6]</sup>。国际金标准(产毒培养或细胞培养中和试验)因操作复杂未常规应用于临床<sup>[5]</sup>。毒素 A/B 酶免疫分析(EIAs)特异度高但灵敏度受标本限制<sup>[7]</sup>,超灵敏毒素检测技术尚未普及<sup>[8]</sup>。谷氨酸脱氢酶(GDH)检测虽快速灵敏,因无法区分产毒/非产毒株,仅作初筛<sup>[9]</sup>。核酸扩增检测(NAAT)(如 PCR/qPCR)兼具良好的灵敏度和特异度,但高成本制约了其临床推广<sup>[10-12]</sup>。因此,开发兼具快速、高灵敏度/特异度及低成本的毒素基因检测技术对优化 CDI 诊疗体系具有重大意义。

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)作为一种新型分子诊断方法,通过多靶点引物设计(4~6 对特异性引物靶向 6~8 个基因区域)及 Bst DNA 聚合酶的链置换活性,可在 60~65℃ 恒温条件下实现 1 h 内 10<sup>9</sup>~10<sup>10</sup> 倍核酸扩增,兼具操作简便、高特异度及产物易检性优势<sup>[13-14]</sup>。目前已被广泛应用于临床病原体检测、肿瘤标志物

筛查、食源性致病菌鉴定及农业植物病毒监测等多领域<sup>[15-18]</sup>。本研究基于 LAMP 技术构建同步检测 CD *tcdC*、*tcdA*、*tcdB* 基因的快速诊断体系,通过多毒力基因联检进一步明确高产毒株。并与传统培养+PCR 法进行比较,以验证与评估 LAMP 法的临床检测效能,从而进一步优化 CDI 的医院感染防控与诊治策略。

1 对象与方法

1.1 研究对象 2020 年 12 月—2022 年 2 月,本研究纳入的 499 例标本均来自中南大学湘雅医院重症监护病房(ICU)住院成人患者,疑似有 CD 感染或出现明显腹泻症状(≥ 3 次/24 h、且入院超过 2 d)患者的粪便标本。

1.2 粪便中 CD 的 DNA 快速提取 采用改良热裂解法提取粪便标本中 CD DNA:取 1.2 mL 标本经 2 000 r/min 离心 2 min 后转移上清,200 μL 分装后 12 000 r/min 离心 2 min 获取沉淀;加入 100 μL 裂解液 37℃ 金属浴裂解 20 min,100℃ 煮沸 10 min,冷却后再次以 12 000 r/min 离心 2 min 取上清即可。其中,裂解液包括 5 种配方(配方 1 为基础裂解液:2 mmol/L EDTA、15 mmol/L Tris-HCl、2% Triton x-100;配方 2:基础裂解液+0.4 mg/mL 蛋白酶 K;配方 3:基础裂解液+0.3 mg/mL 溶菌酶+1% SDS;配方 4:基础裂解液+0.3 mg/mL 溶菌酶;配方 5:基础裂解液+1% SDS)。同时平行使用国外凯杰(QIAGEN)公司生产的 QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit(货号 51604)、国内天根生化科技有限公司生产的粪便基因组 DNA 提取试剂盒(货号 DP328)作为对照。DNA 纯度与浓度经 Qu-bit 4.0 荧光计(Thermo Fisher)进行测定。

1.3 LAMP 检测方案的设计 见图 1。

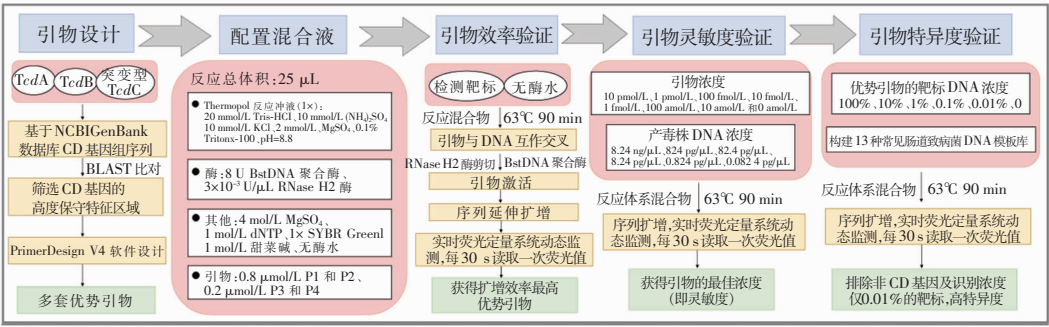


图 1 本研究 LAMP 检测技术方案图

Figure 1 Schematic design of the LAMP detection technology in this study

1.3.1 优势引物设计 研究基于 NCBI GenBank 数据库 CD 基因组序列,通过生物信息学分析筛选特异性保守区域。先采用 BLAST 算法对目标基因进行全基因组同源性比对,确定 *tcdA*、*tcdB* 及 *tcdC* 基因的高度保守特征区域,再运用 PrimerDesign V4 软件基于 LAMP 原理设计产毒株特异性引物组合。针对 *tcdC* 基因第 117 位点单碱基缺失( $\Delta$ 117 SNP),构建含突变型  $\Delta$ 117 位点的重组质粒和野生型质粒,作为平行检测模板进行引物筛选试验,最终获得可精准识别该突变靶点的高分辨力引物组合。CD 分离株毒素基因鉴定所用引物由湖南融健基因生物科技有限公司合成。

1.3.2 *tcdC* 基因不同引物的反应效率验证 采用经系统设计、筛选及比对优化的 5 套特异性引物组合混合体系,以含有第 117 位单核苷酸缺失的突变型 *tcdC* 质粒 DNA (1 pmol/L) 作为检测靶标, RNase-free 超纯水作为阴性对照,在 63℃ 恒温条件下进行 90 min 的核酸扩增反应。反应过程通过 qPCR 仪进行动态监测,每 30 s 采集一次荧光信号,实时监测并绘制扩增荧光动力学曲线。

1.3.3 LAMP 法的灵敏度检测 通过梯度稀释产毒株基因组 DNA (8.24 ng/ $\mu$ L 至 0.082 4 pg/ $\mu$ L, 10 倍稀释)评估 LAMP 法检测 *tcdA/B* 的灵敏度,以 RNase-free 超纯水为阴性对照。针对 *tcdC* 突变基因检测,则分别采用 5 组引物体系(10 pmol/L 至 0 amol/L, 10 倍稀释)。在 63℃、90 min 条件下通过实时荧光定量系统动态监测突变型质粒 DNA 的扩增曲线,每间隔 30 s 采集一次荧光信号以确定检测阈值及动态范围。

1.3.4 LAMP 法的特异度检测 通过构建 13 种常见肠道致病菌(含副溶血弧菌、金黄色葡萄球菌等)DNA 模板库,以同时具有 *tcdA*、*tcdB* CD 产毒

株为阳性对照, RNase-free 超纯水为阴性对照,验证 CD 基于 LAMP 检测体系的种属特异性。针对 *tcdC* 基因的不同引物的特异度验证,通过构建突变型靶标 10 倍梯度稀释模型(100%~0 突变型占比,总浓度 10 pmol/L)与野生型靶标混合进行检测。在 63℃ 恒温、90 min 条件下利用实时监测体系评估 CD 不同基因的特异度。

1.4 传统方法 根据《中国成人艰难梭菌感染诊断和治疗专家共识》与《ACG 临床指南:艰难梭菌感染的预防、诊断和治疗》推荐的两步法<sup>[5, 19]</sup>。采用 CD 鉴定培养基培养粪便标本,具有典型的 CD 菌落特征和气味,随后进行 GDH 检测。通过培养-生化鉴定-扩增培养后,提取纯菌株核酸进行 PCR 鉴定,以下简称“培养+PCR”法。

1.5 临床标本验证 以传统“培养+PCR”法作为参比,计算此研究 LAMP 法的阳性预测值、阴性预测值、灵敏度、特异度。所有可能阳性标本均采用二次培养鉴定及毒素检测,同时参考国家药品监督管理局(NMPA)批准的美国 Cepheid Xpert CD 核酸检测试剂盒进行复核,当三者结果不一致时,进行一代测序,同时参考患者的临床资料判断是否为感染,作为最终试验结论。

## 2 结果

### 2.1 快速提取粪便中 CD DNA

2.1.1 裂解液的最佳配比 5 种核酸裂解液配方提取的 DNA 扩增效率见图 2。仅添加溶菌酶(即配方 4)的核酸扩增效率高于其他配方,表明配方 4 是本研究从粪便标本中快速提取 CD DNA 的最优配方。

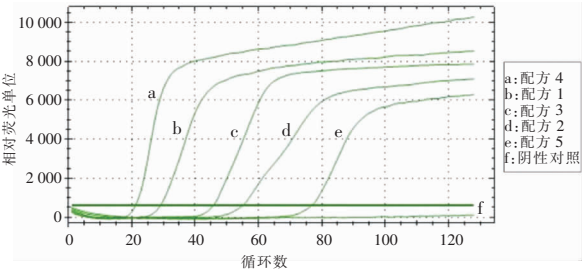


图 2 5 种裂解液配方提取 DNA 的扩增效率

Figure 2 Amplification efficiency of DNA extracted using five lysate formulations

2.1.2 三种提取方法对比 结果显示,本研究使用的最优核酸裂解液配方 4 操作时间短,约 1 h 即可完成提取,且较另外两种试剂盒提取的 DNA 浓度更高。相对于传统过柱法,本研究方法仅 2 步即可完成核酸提取,操作简单快速,大大减少了由于操作复杂、反复离心转移而带来的假阳性结果。由于成分简单,也显著降低了经济成本。见表 1。

2.2 LAMP 检测方法

2.2.1 优势引物设计 针对 *tcdA/B* 基因优化获

表 1 三种方法提取粪便中 CD DNA 的对比结果

Table 1 Comparison of CD DNA extracted from feces by three methods

| DNA 提取方法 | 标本序号 (ng/μL) |      |      |      |      | 总提取时间 (h) |
|----------|--------------|------|------|------|------|-----------|
|          | A            | B    | C    | D    | E    |           |
| 本研究      | 3.70         | 1.40 | 8.44 | 6.36 | 9.66 | 约 1       |
| 天根       | 1.45         | 0.38 | 2.10 | 3.64 | 5.14 | 约 2.5     |
| 凯基       | 0.99         | 0.34 | 1.92 | 3.25 | 5.84 | 约 2.5     |

得两对核心引物(F3/B3、FIP/BIP),并基于 *tcdC* 基因 117 位点单核苷酸缺失特征,经生物信息学筛选获得 5 套高特异性引物组合。每套引物包含阻断型引物 DP1(含核糖核苷酸 rG 及 3'端 C3Spacer 修饰,通过互补结合突变位点阻断野生型序列扩增)和辅助引物 P2-P4,见表 2。该设计通过酶促延伸阻断机制实现突变型 *tcdC* 的特异性识别,结合 *tcdA/B* 多靶点检测体系,从而同步完成 CD 毒力基因鉴定及突变型菌株分型。

表 2 各基因引物组合物及引物序列

Table 2 Primer combinations and sequences for each gene

| 各基因引物组合物       |                                 | 引物序列 (5' - 3')                                               |
|----------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| <i>tcdA</i> 基因 | <i>tcdA</i> -F3(SEQ ID NO. 5)   | TCCAATACAAGCCCTGTAG                                          |
|                | <i>tcdA</i> -B3(SEQ ID NO. 6)   | GAATCTCTTCCTCTAGTAGCT                                        |
|                | <i>tcdA</i> -FIP(SEQ ID NO. 7)  | CTGCATTAATATCAGCCCATTGTTTATTTACATTTTGTATGGATAGGTGG           |
|                | <i>tcdA</i> -BIP(SEQ ID NO. 8)  | AACTGTGGTATGATAGTGAAGCATTTTCAGTGGTAGAAGATTCAACT              |
| <i>tcdB</i> 基因 | <i>tcdB</i> -F3(SEQ ID NO. 9)   | TGATAGTATAATGGCTGAAGCT                                       |
|                | <i>tcdB</i> -B3(SEQ ID NO. 10)  | GAGATTTCAAAGTTTCTTAAGTCAG                                    |
|                | <i>tcdB</i> -FIP(SEQ ID NO. 11) | CATCTGGGAAGAAACCAACTCTTAGCAGATAATGGTAGATTTATGATGG            |
|                | <i>tcdB</i> -BIP(SEQ ID NO. 12) | AAGTGGCCCTGAAGCATATGCCAAATGGATATTCATACTACCTTCT               |
| <i>tcdC</i> 基因 |                                 |                                                              |
| 第 1 套引物        | DP1(SEQ ID NO. 21)              | GTCTTCAGAACAAGCTGGTGATGCTCTACTGGCATTTATTTT/rG/GC-C3Spacer    |
|                | P2(SEQ ID NO. 22)               | GGAGGTCATTTCTAACCAAACATCACAGCATCAGACAATTTGCTAT               |
|                | P3(SEQ ID NO. 23)               | CGTCGTCTTTTCATTTTGAACC                                       |
|                | P4(SEQ ID NO. 24)               | AATTCTTTAAGATCACAAAGGGT                                      |
| 第 2 套引物        | DP1(SEQ ID NO. 25)              | GTCTTCAGAACAAGCTGGTGATGCTCTACTGGCATTTATTTT/rG/GCGC-C3Spacer  |
|                | P2(SEQ ID NO. 26)               | GGAGGTCATTTCTAACCAAACATCACAGCATCAGACAATTTGCTAT               |
|                | P3(SEQ ID NO. 27)               | CGTCGTCTTTTCATTTTGAACC                                       |
|                | P4(SEQ ID NO. 28)               | AATTCTTTAAGATCACAAAGGGT                                      |
| 第 3 套引物        | DP1(SEQ ID NO. 29)              | TGTTTGATTAGAAATGACCTCCTCAGCTCTACTGGCATTTATTTT/rG/GC-C3Spacer |
|                | P2(SEQ ID NO. 30)               | ATAGCAAATTGTCTGATGCTGAACCTTCAATAGCTTCTTTTCGTCG               |
|                | P3(SEQ ID NO. 31)               | CTTCTTCAGCTTTACGTTGAT                                        |
|                | P4(SEQ ID NO. 32)               | TAAGAGCACAAAGGGTA                                            |

续表 2 (Table 2, Continued)

| 各基因引物组合物 |                     | 引物序列 ( 5' - 3' )                                              |
|----------|---------------------|---------------------------------------------------------------|
| 第 4 套引物  | DP1 (SEQ ID NO. 33) | TGTTTGATTAGAAATGACCTCCTCAGCTCTACTGGCATTATTTT/rG/GCG-C3Spacer  |
|          | P2 (SEQ ID NO. 34)  | ATAGCAAATTGTCTGATGCTGAACCTTCAATAGCTTTCTTTTCGTCG               |
|          | P3 (SEQ ID NO. 35)  | CTTCTTCAGCTTTACGTTGAT                                         |
|          | P4 (SEQ ID NO. 36)  | TAAGAGCACAAAGGGTA                                             |
| 第 5 套引物  | DP1 (SEQ ID NO. 37) | TGTTTGATTAGAAATGACCTCCTCAGCTCTACTGGCATTATTTT/rG/GCGC-C3Spacer |
|          | P2 (SEQ ID NO. 38)  | ATAGCAAATTGTCTGATGCTGAACCTTCAATAGCTTTCTTTTCGTCG               |
|          | P3 (SEQ ID NO. 39)  | CTTCTTCAGCTTTACGTTGAT                                         |
|          | P4 (SEQ ID NO. 40)  | TAAGAGCACAAAGGGTA                                             |

2.2.2 *tcdC* 基因不同引物的反应效率验证 基于 5 套 *tcdC* 突变特异性引物,扩增 1 pmol/L RT027 型高毒株,检测效能显示,第 5 套引物组在突变型靶标检测中呈现典型 S 型扩增曲线,其扩增效率高于其他引物组。且其阴性对照未出现非特异性扩增(荧光强度<500 RFU),见图 3。结果表明,第 5 套引物显著增强了对 *tcdC* 117 位点单碱基缺失的识别能力,为开发高分辨 CDI 毒力分型检测试剂盒奠定关键技术基础。

2.2.3 LAMP 检测方法的灵敏度检测 产毒株基因组 DNA 8.24 ng/ $\mu$ L 至 0.824 pg/ $\mu$ L 不同梯度稀释样本均呈现典型 S 型扩增曲线,而阴性对照未检测到扩增信号,证实本研究 LAMP 引物体系对 CD *tcdA/tcdB* 基因的最低检测限为 0.824 pg/ $\mu$ L,见图 4(A、B)。进一步分析 *tcdC* 基因突变检测效能

(图 5A-E),对比第 1~4 套引物,结果显示,灵敏度最优引物为第 5 套引物。采用第 5 套引物时,体系可稳定识别低至 100 amol/L 的突变型靶标,表明该引物组合通过优化设计实现了超低浓度靶标的特异性捕获。

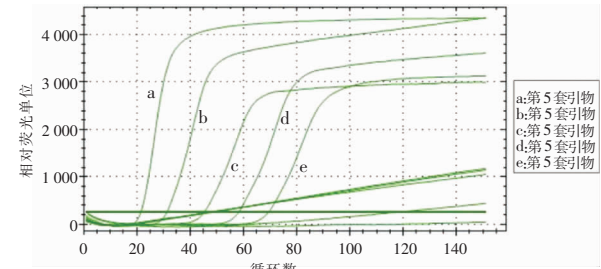
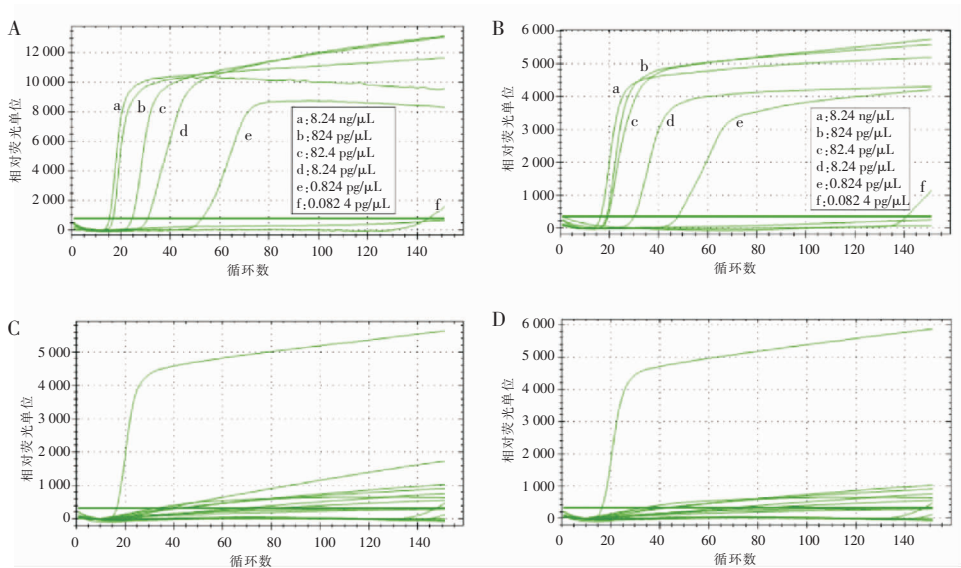


图 3 5 套引物实时荧光曲线图

Figure 3 Real-time fluorescence profiles of 5 sets of primers

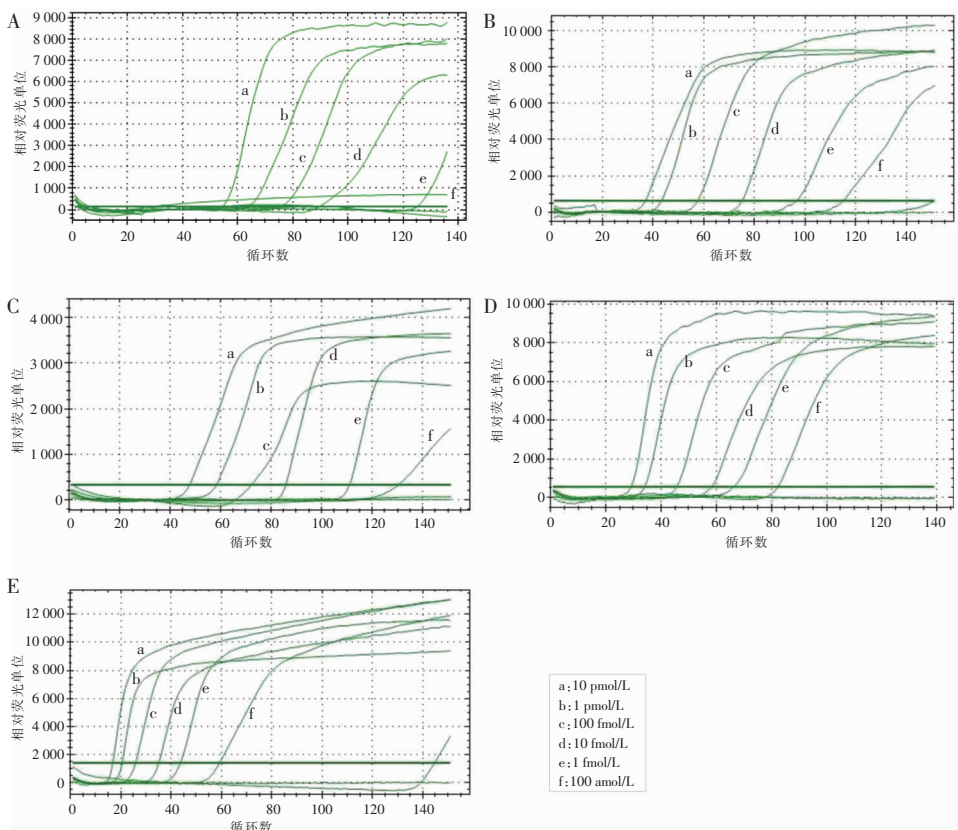


注:A、B 分别为 *tcdA*、*tcdB* 引物灵敏度检测的荧光曲线图;C、D 分别为 *tcdA*、*tcdB* 引物特异度检测的荧光曲线图。

图 4 LAMP 方法的灵敏度和特异度检测结果

Figure 4 Sensitivity and specificity of the LAMP method





注:A~E 分别为 *tcdC* 第 1~5 套引物的灵敏度检测的荧光曲线图。

图 5 LAMP 方法 *tcdC* 5 套引物的灵敏度检测结果

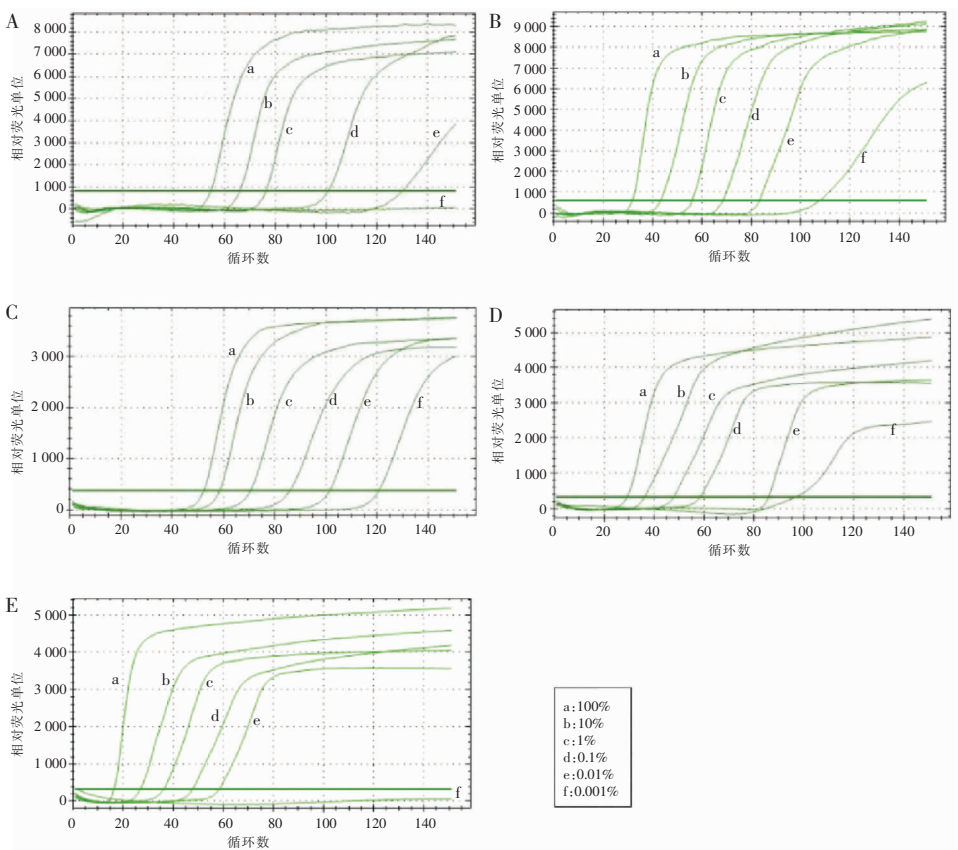
Figure 5 Sensitivity detection results of five sets of primers for *tcdC* by LAMP method

2.2.4 LAMP 检测方法的特异度检测 结果显示,实时荧光扩增曲线中针对其他 13 种肠道致病菌的基因组 DNA 模板均无扩增峰,仅阳性对照呈现标准 S 型特征,证实本 LAMP 反应可以高度特异性地排除非 *tcdA/tcdB* 的基因,仅在含目的基因的阳性组中特异性触发,表明该方法对 CD 靶基因检测具备高度特异度,见图 4(C、D)。在 *tcdC* 基因突变分析中(见图 6),采用第 5 套引物时,检测体系可精准识别 0.01% 突变型靶标(混于 99.99% 野生型背景中),其 POI 值显著低于纯野生型样本(突变型占比为 0),突变/野生型区分度达约  $10^4$  倍,展现出单碱基分辨率优势。对比显示,第 5 套引物对突变型靶标的鉴别能力显著优于第 1~4 套引物组合。

2.3 临床标本验证 共检测 499 例患者标本,成功分离 CD 64 株并进行了毒素检测,主要来源于中心 ICU(61 株),神内 ICU(3 株)。CD 检出率 12.8%,

产毒 CD 检出率为 10.8%(54 株),CD 毒素 A+B+ 菌株 50 株,占 78.1%,A-B+ 菌株 4 株,占 6.3%,A-B- 菌株 10 株,占 15.6%,未检出 A+B- 菌株。64 份阳性标本,精确检测患者感染 CD 的总毒素量,不同菌株各有不同,但 A+B+ 菌株( $1.79 \mu\text{g}/\text{mL}$ )平均产毒量高于 A-B+ 菌株( $0.72 \mu\text{g}/\text{mL}$ )和 A-B- 菌株( $<0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ )。

两种方法平行检测,共有 41 份标本均为 *tcdA* 阳性,45 份标本均为 *tcdB* 阳性;共有 447 份标本均为 *tcdA* 阴性,443 份标本均为 *tcdB* 阴性。见表 3。结果显示,LAMP 法检测 CD *tcdA* 的灵敏度为 87.2%,特异度为 98.9%,阳性预测值为 89.1%,阴性预测值为 98.6%;对 *tcdB* 的灵敏度为 88.2%,特异度为 99.6%,阳性预测值为 90.0%,阴性预测值为 98.7%。



注:A~E 分别为 *tcdC* 第 1~5 套引物特异性检测的荧光曲线图。

图 6 LAMP 方法 *tcdC* 5 套引物的特异性检测结果

Figure 6 Specificity detection results of five sets of primers for *tcdC* by LAMP method

表 3 LAMP 法与“培养 + PCR”法检测 *tcdA/B* 诊断效能  
Table 3 Diagnostic efficacy of *tcdA/B* detected by LAMP method and “culture + PCR method”

| “培养 + PCR”法 | LAMP 检测法 |     |
|-------------|----------|-----|
|             | 阳性       | 阴性  |
| <i>tcdA</i> |          |     |
| 阳性          | 41       | 5   |
| 阴性          | 6        | 447 |
| 合计          | 47       | 452 |
| <i>tcdB</i> |          |     |
| 阳性          | 45       | 5   |
| 阴性          | 6        | 443 |
| 合计          | 51       | 448 |

此外,本研究采用两种方法检测结果不一致共 11 份标本,复核结果显示,其中“培养 + PCR”对于 CD 菌株漏检 5 份,LAMP 法漏检 3 份;另 3 份培养法、Cepheid Xpert 方法均为阴性,但是本研究方法为阳性,经过测序确认为“培养 + PCR”法漏检 1 份,LAMP 法假阳性 2 份;499 份标本中,“培养 + PCR”

法漏检 6 份,LAMP 法漏检 5 份,Cepheid Xpert 方法、PCR、LAMP 法均为阴性 10 份,但传统厌氧培养后经 GDH 检测为阳性,综合患者临床资料,经毒素检测及测序确认为无毒 CD 菌株。

3 讨论

早期诊断 CDI 并发现高毒株对于临床精准治疗至关重要,现有分子诊断技术主要是针对 CD 常见毒素基因、*gluD*、*ermB* 和 *tetM* 基因<sup>[14, 20-21]</sup>。本研究研发了一套用于检测 CD *tcdA*、*tcdB* 和 *tcdC* 基因的高通量 LAMP 的便携式试剂盒。在此基础上,进一步针对毒力调节基因设计了 5 组引物,优化了基于 *tcdC* 基因来明确 CD 产毒素情况的 LAMP 检测方法,创新性地改进了碱基突变检测方法对 CD 进行诊断,是国际、国内首次利用 LAMP 法针对 *tcdC* 基因来快速鉴定 CD 高毒力株的技术<sup>[22]</sup>。

本研究针对疑似 CDI 的医院腹泻患者粪便 CD 检出率约为 12.8% (64/499),其中产毒 CD 的检出率为 10.8% (54/499),浙江杭州腹泻患者 CDI 的发生

率为 13.9%(32/230)<sup>[23]</sup>,西南地区报道住院腹泻患者粪便标本中产毒 CD 检出率为 9.75%<sup>[24]</sup>;而新疆呼和浩特临床诊断疑似 CDI 的粪便标本中检出率为 11.9%(30/252)<sup>[25]</sup>,一项前瞻性多中心研究<sup>[26]</sup>发现腹泻患者中 CD 检出率为 10.7%(209/1 954),其中产毒株约为 9.1%(177/1 954);相关荟萃分析<sup>[27]</sup>结果显示北美造血干细胞移植患者 CDI 的发病率为 14.1%,显著高于欧洲(10.7%)和亚洲(11.6%)。由此可见,CD 的流行病学在全球范围内存在地域差异,这可能是由于检出率受检测方法、手卫生依从性、抗菌药物管理、送检率、患者基础疾病等因素的影响。

此外,本 DNA 提取法的裂解液中,金属离子螯合剂 EDTA 能螯合二价金属并抑制 DNA 酶的活性,Tris-HCl 能保证反应液 pH 值稳定在一定范围内,非离子型表面活性剂 Triton x-100 以及能使细胞壁破裂内容物逸出而使细菌溶解的溶菌酶在煮沸的条件下使细菌中的 DNA 释放出来,并可直接用于 DNA 扩增。不同于传统方法推荐加入机械破坏来增加 DNA 提取量<sup>[28]</sup>,本研究中用于提取粪便中细菌 DNA 的方法不需要磁珠、硅藻柱等的参与即可简单快速、高效提取到 DNA,并且由于不需要洗脱等操作,也能大大减少 DNA 提取过程中的核酸损耗,从而大大提高 DNA 提取量。

本研究技术上基于引物激活式 LAMP 的检测方法结合了核糖核酸内切酶对目标碱基互补与核糖核苷酸碱基的识别,激活引物序列介导恒温链置换核酸扩增反应,其核酸扩增效率大大提高。本 LAMP 检测法针对 CD *tcdA* 的灵敏度为 87.2%,特异度为 98.9%,对 *tcdB* 的灵敏度为 88.2%,特异度为 99.6%。但在 499 份标本中存在 5 份假阳性结果,后续可以通过设置内部对照来优化检测方法,从而降低假阳性的风险。与传统 PCR 相比,LAMP 反应可以在恒温条件下进行,不依赖复杂、精密的温控仪器。这是由于 Bst DNA 聚合酶的链置换活性,LAMP 检测过程不涉及 DNA 变性阶段<sup>[13, 20]</sup>。此外,基于 SYBR Green I 的高通量 LAMP 测定法,反应一步完成且为闭管反应,避免了交叉污染同时无需对标本 DNA 进行纯化。而 PCR 法由于外源性 DNA 和抑制剂的存在,其敏感性会显著降低<sup>[29]</sup>。本研究中 LAMP 使用 SYBR Green I 荧光染料相对具有成本效益,可以快速嵌入 dsDNA<sup>[30]</sup>,并且能直接可视化反应,PCR 则需要凝胶电泳来确定结果,而制备凝胶和电泳不仅耗时且含有致癌成分。综上所述,本研究 LAMP 方法能在恒温条件下便

捷、高效、直观地开展检测,比传统 PCR 更适用于 CDI 的快速现场监测,尤其有助于临床早期诊断 CDI 并辅助医院感染预防与控制。

本研究利用便携式高通量 LAMP 方法快速检测 CD 是一种具备高度灵敏度和特异度的 CD 诊断方法,并且还能进一步明确高毒力菌株。其创新性强,具有操作简易、检测快速、成本低廉等优势,可广泛用于医院获得性腹泻患者的临床筛查。该方法可为 CDI 精准分型诊疗提供技术支撑,对降低 CD 高毒株感染致死率及社会经济负担具有重要防控价值。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参 考 文 献]

- [1] Guery B, Galperine T, Barbut F. *Clostridioides difficile*: diagnosis and treatments[J]. BMJ, 2019, 366: 14609.
- [2] Antonelli M, Martin-Loeches I, Dimopoulos G, et al. *Clostridioides difficile* (formerly *Clostridium difficile*) infection in the critically ill: an expert statement[J]. Intensive Care Med, 2020, 46(2): 215–224.
- [3] Kordus SL, Thomas AK, Lacy DB. *Clostridioides difficile* toxins: mechanisms of action and antitoxin therapeutics[J]. Nat Rev Microbiol, 2022, 20(5): 285–298.
- [4] See I, Mu Y, Cohen J, et al. NAP1 strain type predicts outcomes from *Clostridium difficile* infection[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(10): 1394–1400.
- [5] Kelly CR, Fischer M, Allegretti JR, et al. ACG clinical guidelines: prevention, diagnosis, and treatment of *Clostridioides difficile* infections[J]. Am J Gastroenterol, 2021, 116(6): 1124–1147.
- [6] van Prehn J, Reigadas E, Vogelzang EH, et al. European society of clinical microbiology and infectious diseases; 2021 update on the treatment guidance document for *Clostridioides difficile* infection in adults[J]. Clin Microbiol Infect, 2021, 27(Suppl 2): S1–S21.
- [7] 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.
- [8] Sandlund J, Estis J, Katzenbach P, et al. Increased clinical specificity with ultrasensitive detection of *Clostridioides difficile* toxins: reduction of overdiagnosis compared to nucleic acid amplification tests[J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(11): e00945–19.
- [9] Arimoto J, Horita N, Kato S, et al. Diagnostic test accuracy of glutamate dehydrogenase for *Clostridium difficile*: systematic review and Meta-analysis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 29754.
- [10] Usacheva EA, Jin JP, Peterson LR. Host response to *Clos-*



- tridium difficile* infection; diagnostics and detection[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2016, 7: 93–101.
- [11] Lee HS, Plechot K, Gohil S, et al. *Clostridium difficile*: diagnosis and the consequence of over diagnosis[J]. Infect Dis Ther, 2021, 10(2): 687–697.
- [12] Kraft CS, Parrott JS, Cornish NE, et al. A laboratory medicine best practices systematic review and Meta-analysis of nucleic acid amplification tests (NAATs) and algorithms including NAATs for the diagnosis of *Clostridioides (Clostridium) difficile* in adults[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(3): e00032–18.
- [13] Moosavian M, Keshavarzi R, Abbasi Montazeri E, et al. Loop mediated isothermal amplification of *Clostridioides difficile* isolates in gastrointestinal patients[J]. AMB Express, 2022, 12(1): 42.
- [14] Yu L, Li H, Zhao XN, et al. Rapid visual detection of binary toxin producing *Clostridium difficile* by loop-mediated isothermal amplification[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5): 4781–4788.
- [15] Crego-Vicente B, Del Olmo MD, Muro A, et al. Multiplexing LAMP assays: a methodological review and diagnostic application[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(12): 6374.
- [16] Wang Y, Wang Y, Luo LJ, et al. Rapid and sensitive detection of *Shigella spp.* and *Salmonella spp.* by multiple *Endonuclease* restriction real-time loop-mediated isothermal amplification technique[J]. Front Microbiol, 2015, 6: 1400.
- [17] Liu XL, Zhao XT, Muhammad I, et al. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the simultaneous detection of CVB and CSVd in chrysanthemum [J]. J Virol Methods, 2014, 210: 26–31.
- [18] Kumvongpin R, Jearanaikool P, Wilailuckana C, et al. High sensitivity, loop-mediated isothermal amplification combined with colorimetric gold-nanoparticle probes for visual detection of high risk human papillomavirus genotypes 16 and 18[J]. J Virol Methods, 2016, 234: 90–95.
- [19] 程敬伟, 刘文恩, 马小军, 等. 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(S1): 131–138.
- Cheng JW, Liu WE, Ma XJ, et al. Chinese expert consensus on diagnosis and treatment of adult *Clostridium difficile* infection[J]. Medical Journal of Peking Union Medical College Hospital, 2017, 8(S1): 131–138.
- [20] Lin MY, Li ZT, Lin QY, et al. Development and clinical application of a rapid and visual loop-mediated isothermal amplification test for tetM gene in *Clostridioides difficile* strains cultured from feces[J]. Int J Infect Dis, 2022, 122: 676–684.
- [21] Lin MY, Liu W, Wang P, et al. Rapid detection of ermB gene in *Clostridium difficile* by loop-mediated isothermal amplification[J]. J Med Microbiol, 2015, 64(8): 854–861.
- [22] 中南大学湘雅医院. 用于检测艰难梭菌核糖体 027 型毒力调节基因 *tcdC* 的方法、引物和试剂盒: 202010834557.0[P]. 2020–09–25.
- Xiangya Hospital of Central South University. Method, primer and kit for detecting *tcdC* of ribosome 027 virulence regulation gene of *C. difficile*: 202010834557.0[P]. 2020–09–25.
- [23] Chen XL, Deng J, Chen X, et al. High incidence and morbidity of *Clostridium difficile* infection among hospitalized patients with inflammatory bowel disease: a prospective observational cohort study[J]. J Dig Dis, 2019, 20(9): 460–466.
- [24] 朱晓艳, 熊丽, 郭丽霞, 等. 四川某大型综合医院艰难梭菌感染危险因素及分子特征[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(21): 2575–2580.
- Zhu XY, Xiong L, Guo LX, et al. Risk factors and molecular characteristics of *Clostridium difficile* infection in a large general hospital in Sichuan[J]. International Journal of Laboratory Medicine, 2023, 44(21): 2575–2580.
- [25] 郭素芳, 王俊瑞, 王艳艳, 等. 呼和浩特地区腹泻患者艰难梭菌检测方法比较、临床分离株的毒素特征及药物敏感性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45(12): 1288–1292.
- Guo SF, Wang JR, Wang YY, et al. Comparison of detection methods of *Clostridium difficile* in patients with diarrhea in Hohhot and analysis of toxin characteristics and drug sensitivity of clinical isolates[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2020, 45(12): 1288–1292.
- [26] Shu CH, Zhou JQ, Yu HQ, et al. Genomic epidemiology and antimicrobial resistance profiles of *Clostridioides difficile* from multi-hospitals in a city in Eastern China[J]. Infect Drug Resist, 2023, 16: 3379–3388.
- [27] Luo Y, Zhang SM, Shang H, et al. Prevalence of *Clostridium difficile* infection in the hematopoietic transplantation setting: update of systematic review and Meta-analysis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 801475.
- [28] Yuan SQ, Cohen DB, Ravel J, et al. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33865.
- [29] Zhang SQ, Tan B, Li P, et al. Comparison of conventional RT-PCR, reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification, and SYBR green I-based real-time RT-PCR in the rapid detection of bovine viral diarrhea virus nucleotide in contaminated commercial bovine sera batches[J]. J Virol Methods, 2014, 207: 204–209.
- [30] Varga A, James D. Detection and differentiation of Plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing[J]. J Virol Methods, 2005, 123(2): 213–220.

(本文编辑:左双燕)

**本文引用格式:**肖园园,段菊屏,周景翔,等. 基于艰难梭菌 *tcdC* 基因的新型 LAMP 检测方法的研发及临床诊断效能评估[J]. 中国感染控制杂志, 2025, 24(4): 451–459. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20255458.

**Cite this article as:** XIAO Yuanyuan, DUAN Juping, ZHOU Jingxiang, et al. Development and clinical diagnostic efficacy of a novel LAMP method targeting the *tcdC* gene in *Clostridioides difficile*[J]. Chin J Infect Control, 2025, 24(4): 451–459. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20255458.