

臺灣困難梭狀桿菌毒素基因型別分布

魏孝倫*、李欣潔、慕蓉蓉

摘要

困難梭狀桿菌是與院內感染高度相關的病原，會引起人類腹瀉至偽膜性結腸炎等輕重不等的腸道疾病，在國內已有強毒株出現，同時南部醫院更有醫療機構相關感染的報告。本研究針對 59 株困難梭狀桿菌產毒株進行 toxinotype 分析及 *Clostridium difficile* binary toxin(CDT)的測定，這些菌株是在 2008 及 2009 年分離自國內中部 8 家醫院及南部 2 家醫院，並且已知 PCR-ribotype 型別。59 株菌株中，有 48 株是產毒性 A+B+，有 11 株是產毒性 A-B+，在產毒性 A+B+ 中，有 46 株是 toxinotype 0，變異型 VI 型 1 株，新發現的型別 TN1 1 株；在產毒性 A-B+ 中，有變異型 VIII 型 6 株，V-like 型 3 株，及新發現的型別 TN2 2 株。Toxinotype 0 包含了數種 PCR-ribotype，而 VIII 則侷限於單一的 PCR-ribotype，顯示這群 VIII 型分離株來自同一個演化株。CDT 毒素方面，59 株中有 6 株(10.2%)有 CDT 毒素，有 2 株是產毒性 A+B+，其它 4 株是產毒性 A-B+。本研究發現國內 A-B+ 的變異株盛行率較歐美高，與其它亞洲國家相近；但 V-like 及 VI 型是其它亞洲國家未發現的，另外也發現了 2 型新的 toxinotype 型別(TN1、TN2)。

關鍵字：困難梭狀桿菌；Toxinotype；PCR-ribotype；*Clostridium difficile* binary toxin

前言

困難梭狀桿菌 (*Clostridium difficile*) 會引起人類 *C. difficile*-associated disease(CDAD)，其症狀可為自限性的腹瀉、結腸炎，嚴重則造成偽膜性結腸炎。CDAD 較常發生於高齡、免疫力低下、使用過抗生素、有住院史的病人[1]。引起 CDAD 的直接因素為困難梭狀桿菌毒素 A(TcdA)及毒素 B(TcdB)，這兩個毒素的基因是 *tcdA*、*tcdB*，位在染色體上總長度約 19.6 Kb 的致病位址(pathogenicity locus)[2]。目前常用於探討困難梭狀桿菌毒力的分子分型法有 toxinotyping 及 PCR-ribotyping，toxinotyping 是分析致病位址序列的變異，作法是對兩個毒素基因 *tcdA*、*tcdB* 進行限制酶圖譜分析(pulsed-field gel electrophoresis, RFLP)，所得的圖譜再與野生株 VPI10463 的型別 toxinotype 0 比對，與 toxinotype 0 不同的稱為變異型，並依序命名[1]。而 PCR-ribotyping，是針對困難梭狀桿菌 rRNA(*rrn*)操縱子的 16S-23S 間之重覆性變異序列進行增幅，以所得到的圖譜作為分型依據[3]。

衛生福利部疾病管制署研究檢驗

及疫苗研製中心

通訊作者：魏孝倫*

E-mail：slwei@cdc.gov.tw

投稿日期：2014 年 09 月 16 日

接受日期：2014 年 12 月 09 日

DOI：10.6524/EB.20151208.31(23).003

根據過去的研究，較常由病人分離到的 toxinotype 型別為 III、IV、V、VIII、IX、XII[1]，近十年來最著名的困難梭狀桿菌強毒株 B1/NAP1/027 是產毒性 A+B+，分子型別為 toxinotype III，PCR-ribotype 027，它與造成偽膜性結腸炎有高度相關，並在歐美引起大規模院內群聚感染[4]，目前已在亞洲的韓國，日本，澳洲及臺灣出現[5,6]。早期認為只有產毒性 A+B+的菌株才會引起嚴重症狀，之後發現產毒性 A-B+的困難梭狀桿菌同樣會造成病人的偽膜性結腸炎[7]，產毒性 A-B+/toxinotype VIII/PCR-ribotype 017 的菌株曾在荷蘭，法國等國家引起院內群聚感染[8]；而產毒性 A-B+/toxinotype V/PCR-ribotype 078 的菌株常分離自家禽，同時會引起人類嚴重腸道症狀，被認為是人畜共通的病原[9]。根據亞洲國家對困難梭狀桿菌臨床株的調查，發現產毒性 A-B+的菌株盛行率高於歐美國家，而臺灣最近也發現一株產毒性 A-B+/toxinotype V/PCR-ribotyping 0126 (078 的相關型) 造成病人的偽膜性結腸炎，並引起醫療機構相關感染[10]。

Clostridium difficile binary toxin(CDT)是部份困難梭狀桿菌產生的另一種毒素，是由 *cdtA* 及 *cdtB* 基因分別編碼出 CDTa 酵素活性區及 CDTb 酵素結合區，再組合而成的毒素，*cdtA* 及 *cdtB* 基因位在困難梭狀桿菌染色體有別於致病位址的區域[11]。CDT 在體外實驗會造成細胞病變效應[11]，但在動物模式中並無顯著致病性[12]，是否會造成人類疾病尚無定論。目前 CDT 的偵測應用於 toxinotype 的分型參考[1]，一項對多家醫院的調查發現，CDT 基因的平均盛行率約 6%，但各別的醫院差異很大，約在 0.2%至 12%之間，這可能與各醫院流行的產毒型別及 toxinotype 型別有關[1,11]，因 CDT 較常存在產毒性 A-B+的 toxinotype 變異型別[11]。

我們在 2008 及 2009 年進行困難梭狀桿菌的篩檢[13,14]，這次將篩檢出的 59 株產毒性困難梭狀桿菌，進行 toxinotype 分型及 CDT 毒素檢測，以了解這些產毒株的型別及分佈狀況，我們一共發現了 6 種 toxinotype，其中有 2 種是新的型別，另外兩種 VI 及 V-like 是亞洲較少見的型別，同時也討論了 toxinotype 與 PCR-ribotype 的關係。

材料與方法

一、檢體、菌株及菌株資料之收集：

(一) 菌株及檢體收集：

自 2008 年 1 月至 2009 年 12 月，本實驗室與 8 家中區及 2 家南區的醫學中心或地區醫院合作，收集 *C. difficile* 菌株及檢體，醫院分離到的 *C. difficile* 菌株送至疾病管制署（以下簡稱疾管署）研檢中心進行進一步確認；另外，醫院協助採檢呼吸照護病房病人的糞便檢體，置入厭氧保存管，於 24 小時內送至疾管署研檢中心進行 *C. difficile* 的分離純化。

(二) 菌株：

自合作醫院分讓及自行分離出 175 株 *C. difficile* 臨床分離株，經 PCR 及 ELISA 方法鑑定出 59 株產毒株。有標準菌株 3 株購自英國菌種中心

(NCTC, London, UK), 分別是: NCTC13366 分子型別為 toxinotype III, PCR-ribotype 027; NCTC13287 分子型別為 toxinotype VIII, PCR-ribotype 017 (本研究的 R17); 及 NCTC13307 分子型別為 toxinotype I, PCR-ribotype 012。另一株標準菌株 BCRC17702 (VPI10463) 購自食品工業研究所生物資源中心, 分子型別為 toxinotype 0。

本研究進行的檢體及病人資料收集經疾管署倫理委員會審核通過後執行 (編號 IRB980009)。

(三) 資料收集:

由合作醫院提供該菌株分離來源患者之性別、出生年月日、居住縣市、發病日期、採檢日期、住院日期、症狀等資料。

二、菌株分離及產毒株鑑定

檢體培養於 Cycloserine Cefoxitin Fructose Agar (Oxoid, Hampshire, UK) 選擇性培養基, 選擇黃色毛邊狀菌落, 挑一顆菌落至 1 ml 純水中, 於乾浴器煮沸 15 分鐘作為 DNA 材料, 依 Lemee 設計的方法[15], 以 *tpi*-F 及 *tpi*-R (表一) 增幅 *tpi* 基因來鑑定是否為 *C. difficile*。

表一、*C. difficile* 鑑定, *tcdA*、*tcdB* 毒素測定, toxinotype 基因分型用, *cdtA*、*cdtB* 毒素測定用引子組

| PCR 產物 | 引子 | 序列 | 片斷大小(Kb) | annealing temp (°C) | reference |
|-------------|----------------|--------------------------------|----------------|---------------------|-----------|
| <i>tpi</i> | <i>tpi</i> -F | AAAGAAGCTACTAAGGGTACAAA | 0.23 | 55 | [15] |
| <i>tcdA</i> | <i>tpi</i> -R | CATAATATTGGGTCTATTCCCTAC | | | |
| | <i>tcdA</i> -F | AGATTCCTATATTTACATGACAATAT | 0.369/ 0.11 | 55 | [15] |
| <i>tcdB</i> | <i>tcdA</i> -R | GTATCAGGCATAAAGTAATATACTTT | | | |
| | <i>tcdB</i> -F | GGAAAAGAGAATGGTTTTATTAA | 0.16 | 55 | [15] |
| | <i>tcdB</i> -R | ATCTTTAGTTATAACTTTGACATCTTT | | | |
| B1 | B1C | AGAAAATTTTATGAGTTTAGTTAATAGAAA | 3.1 | 57 | [16] |
| | B2N | CAGATAATGTAGGAAGTAAGTCTATAG | | | |
| A3 | A3C | TATTGATAGCACCTGATTTATATACAAG | 3.1 | 47 | [16] |
| | A4N | TTATCAAACATATATTTTAGCCATATATC | | | |
| <i>cdtA</i> | <i>cdtA</i> -F | TGAACCTGGAAAAGGTGATG | 0.353 | 52 | [11] |
| | <i>cdtA</i> -R | AGGATTATTTACTGGACCATTTG | | | |
| <i>cdtB</i> | <i>cdtB</i> -F | CTTATTGCAAGTAAATACTGAG | 0.49 | 52 | [11] |
| | <i>cdtB</i> -R | ACCGGATCTCTTGCTTCAGTC | | | |

產毒株是利用 *tcdA*-F 及 *tcdA*-R (表一) 增幅 *C. difficile* 的 *tcdA* 基因[15], 若產生 369 bp 的片斷表示產生毒素 A, 標示為 A+, 若產生 110 bp 的片斷, 表示不產生毒素 A, 標示為 A-; 以 *tcdB*-F 及 *tcdB*-R 增幅 *tcdB* 基因, 若產生 160 bp 片斷, 表示產生毒素 B, 標示為 B+。PCR 反應的總體積 20 μ l, 組成分為 2 μ l DNA, 0.5 μ M 引子, 200 μ M dNTP, 0.5 U Tag polymerase (BioVan, 臺灣), 10 mM Tris-HCL, 50 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂, 溫度反應條件為(1) denature: 94°C 5 分鐘; (2) cycling: 94°C 30 秒、55°C 30 秒、72°C 30 秒 30 個循環; (3) 72°C 3 分鐘。

PCR 反應預測為 A+B+或 A-B+的菌株，再以 *C. difficile* 毒素 A 及 B 測試套組(Remel Inc., KS, USA)，依廠商說明書，以 ELISA 方法測定是否產毒，若為陽性才確認為產毒株。

三、PCR ribotype 分型：

取得自先前的研究，利用 Bidet 設計之引子組（表一）增幅 *C. difficile* 的 *rrn* 基因[3]，引子以 FAM 螢光標示，PCR 反應的總體積 20 μ l，組成分為 25 ng 的 DNA，5 nM 的引子，200 μ M dNTP，1 U Tag polymerase (BioVan, 臺灣)，10 mM Tris-HCL，50 mM KCL，3 mM MgCl₂，溫度反應條件為(1) denature：95°C 5 分鐘；(2) cycling：95°C 30 秒、57°C 1 分鐘、72°C 1 分鐘 35 個循環；(3) 72°C 3 分鐘。產生的片斷以 ABI3130 片斷分析儀(Applied Biosystems)進行毛細管電泳分析，測定 PCR-ribotype[13]。

四、毒素基因分型(toxinotype)：

依照 Maja Rupnik 的方法[16]，增幅 *C. difficile* 的染色體上致病位址之 *tcdA* 毒素基因的 A3 重覆序列片斷及 *tcdB* 毒素基因的 B1 重覆序列片斷，再以限制酵素處理 PCR 產物，引子序列及反應溫度如表一。簡述如右，PCR 反應的總體積 50 μ l，組成分為 0.5 μ M 的引子，200 μ M dNTP，0.5 U Tag polymerase (BioVan, 臺灣)，10 mM Tris-HCL，50 mM KCL，1.5 mM MgCl₂，溫度反應條件為(1) denature：94°C 5 分鐘；(2) cycling：94°C 30 秒、47 或 55°C 30 秒、72°C 10 秒，45 個循環；(3) 72°C 3 分鐘。A3 片斷的增幅產物以 *EcoRI* 限制酵素處理，B1 片斷的增幅產物以 *AccI* 及 *HincII* 處理，反應總體積 10 μ l，各反應物濃度為，各基因增幅產物 5 μ l，限制酶 10 U，緩衝液 1 倍，於 37°C 反應 4 小時，經電泳分析所得之圖譜型式與網頁上(<http://www.mf.uni-mb.si/tox/>) 已知的型別比對，得知毒素型別[1]。

CDT 毒素以同時偵測到 *cdtA* 及 *cdtB* 視為陽性，*cdtA* 以引子 *cdtA-F* 及 *cdtA-R*；*cdtB* 以引子 *cdtB-F* 及 *cdtB-R*（表一）進行 PCR 反應[11]，反應總體積為 10 μ l，組成分為 0.15 μ M 的引子，200 μ M dNTP，0.5 U Tag polymerase (BioVan, 臺灣)，10 mM Tris-HCL，50 mM KCL，1.5 mM MgCl₂，溫度反應條件為(1) denature：94°C 5 分鐘；(2) cycling：94°C 45 秒、52°C 1 分鐘、75°C 1 分鐘，30 個循環；(3) 75°C 3 分鐘。

結果

一、Toxinotype 型別分佈

在 59 株產毒株中，有 46 株為 toxinotype 0，佔 78%，其它型別還包括 V-like(5.1%)、VI(1.7%)、VIII(10.2%)及無法與 Rupnik 的分型比對到的型別，我們分別命名為 TN1(1.7%)及 TN2(3.4%)（表二）。大部份的 toxinotype 型別包含了一個或以上的 PCR-ribotype 型別，toxinotype 0 型包含了 11 個 PCR-ribotype 型別；VIII 型有 6 株，均屬於 R17 型 PCR-ribotype；V-like 型有

3 株，分屬於 R23 型及 R23 相似型的 PCR-ribotype(表二)。野生型別 toxinotype 0 廣泛分佈於個各醫院，而其它變異型別也未集中於特定醫院(表二)。

表二、59 株 *C. difficile* 產毒株的產毒性、毒素基因型別、CDT、PCR-ribotype、來源醫院、分組數量、症狀數及不同年齡層患者數

| 產毒性 | Toxinotype | CDT | PCR ribotype* | 醫院** | 數量 | 有症狀數/ 無症狀數/ 無資料 | 老人/ 青年/ 小孩 *** |
|------|------------|-----|------------------|-------------------|-------|-----------------------|-------------------------|
| A+B+ | 0 | - | R10 | CA,CC,CG,CH,CI,CK | 13 | 3/4/6 | 2/0/1 |
| | 0 | - | R106 | CA,CI,CJ,CK | 9 | 2/5/2 | 1/1/0 |
| | 0 | - | R18 | CA,CC,CG | 4 | 0/1/3 | NA |
| | 0 | - | R18 related type | CA | 2 | 0/0/2 | NA |
| | 0 | - | R4 | CG | 1 | 0/0/1 | NA |
| | 0 | - | R41 | CM,SO | 4 | 0/2/2 | NA |
| | 0 | - | R45 | CA,CG,CI,SQ | 8 | 1/3/4 | 0/0/1 |
| | 0 | - | R45 related type | SQ | 1 | 1/0/0 | 0/0/1 |
| | 0 | - | R66 | CH,CI | 2 | 0/2/0 | NA |
| | 0 | - | ND | CM | 1 | 0/0/1 | NA |
| | 0 | - | R29 | SQ | 1 | 1/0/0 | 0/0/1 |
| | VI | + | R32 | CA | 1 | 0/0/1 | NA |
| TN1 | - | R15 | CC | 1 | 1/0/0 | 1/0/0 | |
| A-B+ | V-like | + | R23 | CA,CG | 2 | 0/0/2 | NA |
| | V-like | + | R23 related type | CG | 1 | 0/0/1 | NA |
| | TN2 | + | R8, ND | CA,CJ | 2 | 1/0/1 | NT |
| | VIII | - | R17 | CA,CC,CH | 6 | 3/0/3 | 1/0/2 |

* ND 表示未做

**CA, CC, CG, CH, CI, CJ, CK, CM, SO, SQ 為醫院代碼

***顯示各組有腹瀉症狀的老人(≥65 歲)、青年(15 至 64 歲)、及小孩(<15 歲)的數目, NA 表示該組無腹瀉患者, NT 表示缺年齡資料

二、CDT 毒素的盛行率

59 株中，有 6 株菌是 CDT+，其中產毒性 A+B+的有 1 株，產毒性 A-B+的有 5 株(表二)。

三、產毒株的流行病學特性

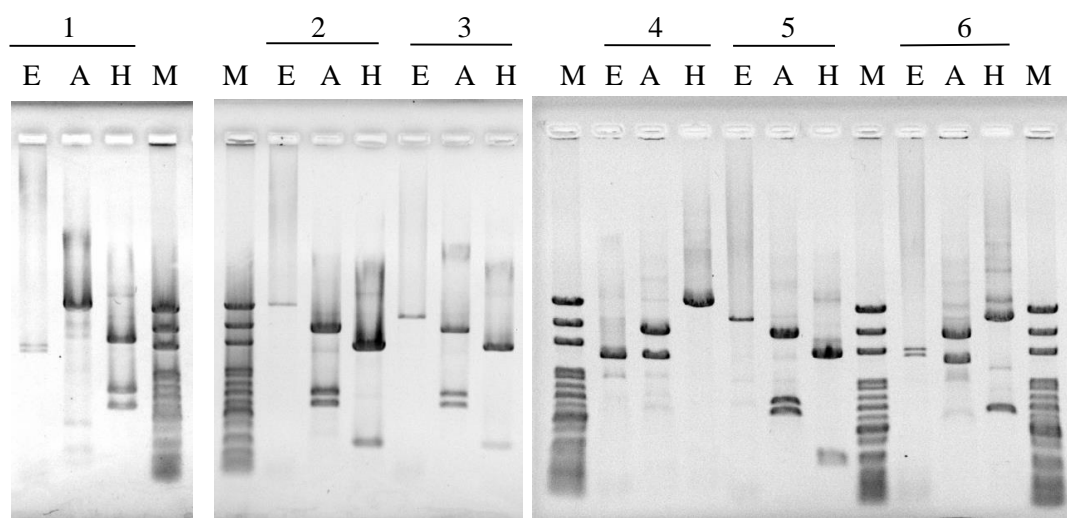
59 株產毒株中有 30 株有流行病學資料，其中 13 株與腹瀉有關，造成腹瀉症狀的菌株並未侷限於特定的 toxinotype(表二)。在 30 株有流行病學資料的菌株中，有 26 株是 A+B+產毒株，4 株是 A-B+產毒株。在 13 株腹瀉相關菌株中，A+B+產毒株佔 69.2%(9/13)，其中 toxinotype 0 佔 61.5%(8/13)，toxinotype TN1 佔 7.7%(1/13)；A-B+產毒株佔 30.8%(4/13)，其中 toxinotype VIII 佔 23%(3/13)；toxinotype TN2 佔 7.7%(1/13)。

在 13 株的腹瀉相關菌株中（表二），有 38.5%(5/13)是分離自 65 歲以上的患者，這些包括了 23.1%(3/13)的產毒性 A+B+/toxinotype 0 菌株；8%(1/13)的產毒性 A+B+/toxinotype TN1 菌株；8%(1/13)的產毒性 A-B+/toxinotype VIII 菌株。另外，有 46.2%(6/13)是分離自小於 15 歲的兒童，這些包括了 30.8%(4/13)的產毒性 A+B+/toxinotype 0 菌株；15.4%(2/13)的產毒性 A+B+/toxinotype VIII 菌株。

四、新型別的限制圖譜

Toxinotype TN1 型別中，在致病基因位址(pathogenic locus) A3 區域的 *EcoRI* 限制圖譜為第 1 型，B1 區域經 *AccI* 切出 1.2 Kb 及 2 Kb 大小的片斷，與 B1 第 5 型相同；經 *HincII* 切出 0.5 Kb 及 2.5 Kb 大小的片斷（圖一），綜合 A3 及 1B 的限制圖譜，無法在 Rupkin 的研究中找到相似的型別 (<http://www.mf.uni-mb.si/tox/>)。

Toxinotype TN2 型別中，在致病基因位址的限制圖譜與 VI 型別相似，A3 區域的 *EcoRI* 限制圖譜為第 3 型，B1 區域限制圖譜為第 5 型（圖一），唯一與 VI 型不同的是，VI 的產毒性為 A+B+，而 TN2 型為 A-B+，無法在 Rupkin 的研究中找到相似的型別 (<http://www.mf.uni-mb.si/tox/>)。



圖一、國內 *C. difficile* 臨床分離株的 toxinotype 型別。每個 lane 上方的 E、A、H 表示作用的限制酶，E 表示 *EcoRI*；A 表示 *AccI*；H 表示 *HincII*，M 為 100 bp–3 kb 標示。菌株號碼 1–6 分別代表的是 1：toxinotype 0，2：toxinotype V-like，3：toxinotype VI，4：toxinotype VIII，5：toxinotype TN2，6：toxinotype TN1。

討論

這個研究收集來自 10 家醫院的 *C. difficile* 進行 toxinotype 分型，以了解國內 *C. difficile* 的毒素基因型別及分佈狀況。

本研究發現臺灣 A-B+變異型別約佔 17%（表二），與其它亞洲國家的 14.5% 相近[16]而高於歐美國家的 1.3%–11% [2,18]。根據 Rupnik 的調查，在歐洲最流行

的型別是 toxinotype 0、III、VIII，其次為 IV、V、VI、IX、XI[1]。在 2003 年，一項跨國研究調查日本，韓國及印尼的 *C. difficile* 菌株的 toxinotype 型別[17]，發現亞洲流行的 toxinotype 型別不同於歐洲，除了野生型的 toxinotype 0 一樣為主流之外，其它的流行株則以產毒性 A-B+的變異型為主，如 VIII、XIX 型別，再其次才是 IV、IX、XII、III 等產毒性 A+B+的型別，歐洲常見的 VI、VII 型別則沒發現[17]。國內的主要流行型別為 0，其次為產毒性 A-B+的變異型，如 VIII、V-like 型、及 TN2 型(表二)，其中 V-like，TN2 型未在其他亞洲國家發現[17]，顯示臺灣產毒性 A-B+變異型的高盛行率，與亞洲其它國家相似，但流行的型別仍有很大不同。但由於本研究收集的菌株集中於中部的醫院及少數南部的醫院，而且流行病學資料多所缺漏，不能有效的代表整個臺灣的狀況，進一步有系統的收集菌株才能更精確的得知實際的流行情形。

產毒性 A+B+的 III 型別是目前最常造成偽膜性結腸炎的型別[2]，也是歐洲常見的型別，但在亞洲地區的盛行率不高[17]，推測與亞洲目前尚未有 III 型造成的群聚感染有關。產毒性 A-B+的 VIII 型在各個地區都常見，在歐洲已有 VIII 型造成的群聚感染[8]，亞洲雖有 VIII 造成偽膜性結腸炎的案例[19]，但尚無相關群聚感染，卻仍有高盛行率，推測 VIII 型在亞洲人中有高帶原率。不同於 toxinotype 0 型別包含了數個 PCR-ribotype，本研究 6 株 VIII 型分離株都屬於同一個 PCR-ribotype 017，雖然這些分離株來自 3 個不同的醫院，但依據之前的研究這些分離株有相似的「多重位址重覆變異序列分析」(Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis, MLVA)型別，推測這些分離株都來自同一個來源株(clonal origin)[13]，這與 Johnson 分析來自不同國家的 VIII/017 菌株，也發現是相同來源株的情形一致[20]。

國內臨床分離株 CDT 基因的盛行率(8.5%)高於法國的 6%及美國的 5.8%[2, 11]，由於 CDT 基因較常存在 A-B+產毒性的 toxinotype 變異型，推測與國內產毒性 A-B+變異型別的高盛行率(17%)有關。

我們發現了兩個新的 toxinotype 型別，TN1 型別與資料庫中的 XXI 型別最為相近，在致病基因位址的 A3 區有相同的 *EcoRI* 切位，在 B1 區有相同的 *AccI* 切位，但在 *HincII* 多一個限制酶切位，造成 0.5 kb 及 2.5 kb 的片段，另外，與 XXI 型別相同，產毒型都是 A+B+，都不具有 CDT (CDT-)，因此推測為 XXI 的一個 minor type; TN2 型別的 B1 限制圖譜為 3 型，A3 限制圖譜為 5 型，與 VI 型相同，但卻是產毒性 A-B+，PCR-ribotype 為 R8，也與 VI 型分離株 R32 不同，因此應為不同型別的分離株。

近期的研究認為老人的 CDAD 多屬於院內感染，而青少年的 CDAD 與社區感染較相關[1]，本研究中 13 株腹瀉相關菌株中，分離自老人(表二)的各個 toxinotype 型別株均來自住院患者(未顯示資料)，分離自未滿 15 歲兒童(表二)的有 toxinotype 0 (4 株)及 toxinotype VIII (2 株)，而這兩個型別各有 2 及 1 株的菌株是分離自門診患者，推測這些菌株應是來自社區感染。我們的結果顯示兒童的 CDAD 感染有

部份來自社區，這與之前的研究一致[1]，而社區型的感染並未侷限於特定型別。

幾乎所有型別都有腹瀉的個案，我們並未發現與腹瀉症狀關連性特別強的 toxinotype 型別，可能的原因是收集的腹瀉個案都是輕症，且部份資料缺漏，無法達到顯著的結果。

綜合上述，本研究發現我國 *C. difficile* 的毒素基因型分布有別於歐美，除了野生型外，最主要的是產毒性 A–B+ toxinotype 變異型分離株，這些變異型一樣有致病的能力，因此在監測時，不能僅著重於國外目前流行的產毒性 A+B+的強毒株，而忽視掉其它的型別。

誌謝

感謝疾病管制署提供經費執行「臺灣困難梭狀桿菌流行狀況之研究」。

參考文獻

1. Rupnik M. Heterogeneity of large clostridial toxins: importance of *Clostridium difficile* toxinotypes. FEMS microbiology reviews. 2008;32(3):541-55.
2. Geric B, Rupnik M, Gerding DN, et al. Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital. Journal of medical microbiology. 2004;53(Pt 9):887-94.
3. Bidet P, Barbut F, Lalande V, et al. Development of a new PCR-ribotyping method for *Clostridium difficile* based on ribosomal RNA gene sequencing. FEMS microbiology letters. 1999;175(2):261-6.
4. Warny M, Pepin J, Fang A, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe. Lancet. 2005;366(9491):1079-84.
5. Hung YP, Cia CT, Tsai BY, et al. The first case of severe *Clostridium difficile* ribotype 027 infection in Taiwan. The Journal of infection. 2014.
6. Clements AC, Magalhaes RJ, Tatem AJ, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread. The Lancet Infectious diseases. 2010;10(6):395-404.
7. Limaye AP, Turgeon DK, Cookson BT, et al. Fritsche TR. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A(-) B(+) strain of *Clostridium difficile*. Journal of clinical microbiology. 2000;38(4):1696-7.
8. Alfa MJ, Kabani A, Lysterly D, et al. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile* responsible for a nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. Journal of clinical microbiology. 2000;38(7):2706-14.
9. Dahms C, Hubner NO, Wilke F, et al. Mini-review: Epidemiology and zoonotic potential of multiresistant bacteria and *Clostridium difficile* in livestock and food.

- GMS hygiene and infection control. 2014;9(3):Doc21.
10. Hung YP, Lin HJ, Tsai BY, et al. *Clostridium difficile* ribotype 126 in southern Taiwan: A cluster of three symptomatic cases. *Anaerobe*. 2014.
 11. Goncalves C, Decre D, Barbut F, et al. Prevalence and characterization of a binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) from *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(5):1933-9.
 12. 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. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(8):1143-50.
 13. Wei HL, Kao CW, Wei SH, et al. Comparison of PCR ribotyping and multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) for improved detection of *Clostridium difficile*. *BMC microbiology*. 2011;11:217.
 14. Wei HL, Wei SH, Huang CW, et al. Molecular typing and epidemiology of *Clostridium difficile* in respiratory care wards of central Taiwan. *Journal of microbiology, immunology, and infection*. 2013;S1684-1182(13);00067-4.
 15. Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, et al. Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(12):5710-4.
 16. Rupnik M, Avesani V, Janc M, et al. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. *Journal of clinical microbiology*. 1998;36(8):2240-7.
 17. Rupnik M, Kato N, Grabnar M, et al. New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(3):1118-25.
 18. Pituch H, van den Braak N, van Leeuwen W, et al. Clonal dissemination of a toxin-A-negative/toxin-B-positive *Clostridium difficile* strain from patients with antibiotic-associated diarrhea in Poland. *Clinical microbiology infection*. 2001;7(8):442-6.
 19. Toyokawa M, Ueda A, Tsukamoto H, et al. Pseudomembranous colitis caused by toxin A-negative/toxin B-positive variant strain of *Clostridium difficile*. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2003;9(4):351-4.
 20. Johnson S, Sambol SP, Brazier JS, et al. International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(4):1543-7.