

住院腹泻患者艰难梭菌检测与分析

刘元元, 刘文恩, 简子娟, 谷秀梅, 彭婉婵, 张运丽

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

[摘要] **目的** 通过对住院腹泻患者粪便标本中的艰难梭菌进行筛查和不同时期检出率的比较, 了解某院腹泻患者艰难梭菌的感染情况。**方法** 收集该院 2009 年 2—12 月和 2011 年 4—7 月住院腹泻患者粪便标本 106 份, 进行厌氧培养和 API 鉴定, 对培养鉴定获得的菌株应用聚合酶链反应(PCR)扩增法进行 A、B 毒素及二元毒素基因检测; 酶联荧光免疫法检测毒素 A/B。**结果** 106 份标本中, 厌氧培养艰难梭菌阳性 16 株(15.09%)。16 株菌经 PCR 扩增, A、B 毒素均阳性, 二元毒素均阴性。直接毒素 A/B 检测阳性率为 12.26%(13/106), 与厌氧培养阳性率比较, 差异无统计学意义($\chi^2 = 0.16, P > 0.05$)。2009 年 2—12 月和 2011 年 4—7 月两个时期的标本厌氧培养艰难梭菌阳性率分别为 22.81%(13/57)、6.12%(3/49), 两者比较, 差异有统计学意义($\chi^2 = 5.73, P < 0.05$); 毒素 A/B 检出率分别为 17.54%(10/57)、6.12%(3/49), 差异无统计学意义($\chi^2 = 3.18, P > 0.05$)。艰难梭菌检测阳性患者住院期间均使用过头孢类、喹诺酮类、碳青霉烯类、广谱青霉素、克林霉素等其中一种或多种抗菌药物。**结论** 该院艰难梭菌相关性腹泻比较严重, 抗菌药物的使用是诱使艰难梭菌感染的重要因素。

[关键词] 艰难梭菌; 腹泻; 毒素 A/B; 医院感染; 实验室技术和方法

[中图分类号] R442.2 R446 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2012)04-0293-05

Detection and analysis of *Clostridium difficile* in hospitalized patients with diarrhea

LIU Yuan-yuan, LIU Wen-en, JIAN Zi-juan, GU Xiu-mei, PENG Wan-chan, ZHANG Yun-li
(Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective** To investigate *Clostridium difficile* (*C. difficile*) infection in hospitalized patients with diarrhea by screening *C. difficile* in stool specimens and comparing detection rate in different periods. **Methods** 106 stool specimens of inpatients with diarrhea between February-December 2009 and April-July 2011 were collected, anaerobic culture and API identification were performed, *C. difficile* isolates were detected toxin A, toxin B and binary toxin gene by polymerase chain reaction(PCR); enzyme-linked fluorescence immunoassay was used for toxin A/B detection. **Results** Of 106 specimens, 16(15.09%) were positive for *C. difficile*. PCR amplification of toxin A/B were both positive, binary toxin was negative. The positive rate was 12.26% (13/106) by direct detection of toxin A/B, there was no significant difference compared with positive rate of anaerobic culture($\chi^2 = 0.16, P > 0.05$). Positive rate of anaerobic culture was 22.81%(13/57) in February -December 2009 and 6.12%(3/49) in April-July 2011, the difference was statistically significant ($\chi^2 = 5.73, P < 0.05$); the detection rate of toxin A and B was 17.54%(10/57) and 6.12%(3/49) respectively, there was no significant difference($\chi^2 = 3.18, P > 0.05$). Patients with *C. difficile* infection used one or more antimicrobial agents, such as cephalosporins, quinolones, carbapenems, broad-spectrum penicillin and clindamycin during hospitalization period. **Conclusion** *C. difficile*-associated diarrhea is serious in this hospital, antimicrobial use is an important factor for inducing *C. difficile* infection.

[Key words] *Clostridium difficile*; diarrhea; toxin A/B; healthcare-associated infection; laboratory technique and method

[Chin Infect Control, 2012, 11(4): 293-296, 299]

[收稿日期] 2012-02-15

[基金项目] 湖南省卫生厅课题资助(B2011-006)

[作者简介] 刘元元(1987-), 女(汉族), 山东省泰安市人, 检验师, 主要从事微生物检验及细菌耐药研究。

[通讯作者] 刘文恩 E-mail: liuwenen@hotmail.com

艰难梭状芽孢杆菌又称艰难梭菌,是一种存在于人体肠道内的厌氧革兰阳性芽孢杆菌,属条件致病菌。当肠道环境遭到破坏,受抑制的艰难梭菌大量繁殖,可引起腹泻,严重者发展为假膜性肠炎。近年来,艰难梭菌引起的医院感染发生率和病死率日益增多^[1],流行菌株毒性增强,在欧美已经有过多次暴发流行,引起了世界各国的高度关注,但国内研究相对较少。为了解本院住院患者艰难梭菌的感染情况,本研究采用两种方法对其粪便中的艰难梭菌进行了检测,现报告如下。

1 材料与方 法

1.1 研究对象 选择 2009 年 2—12 月及 2011 年 4—7 月间住院患者中的腹泻患者,通过询问病史及查阅病历资料收集患者信息。筛选标准:腹泻次数 >3 次/d,腹泻前使用过抗菌药物,大便性状为稀便或水样便。

1.2 标本采集及分组 采集符合筛选标准患者的大便标本,同一患者不重复收集标本。2009 年 2—12 月间采集标本 57 份,作为第 1 组;2011 年 4—7 月间采集标本 49 份,作为第 2 组。

1.3 仪器与试剂 厌氧培养采用 Mart Anoxomat Mark II 厌氧微需氧微生物细胞培养系统;艰难梭菌毒素检测仪器,为梅里埃 miniVIDAS 荧光免疫分析仪;ABI 2720 PCR 仪;艰难梭菌基础培养基及选

择添加剂,购自 OXOID 公司;艰难梭菌毒素 A/B 检测试剂盒,购自法国生物梅里埃公司。

1.4 实验方法

1.4.1 厌氧培养及毒素基因的聚合酶链反应(PCR)检测 粪便标本与无水乙醇以 1:1 体积混合,振荡,室温静置 1 h。将处理过的粪便标本接种于新鲜配制的艰难梭菌拉氧头孢诺氟沙星(CDMN)选择培养基上,置于厌氧罐中 35℃ 培养 48 h。取出平板后通过涂片镜检、耐氧实验及 API 20A 鉴定。对于培养鉴定阳性的艰难梭菌,提取基因组 DNA,PCR 检测 tcd A、tcd B 及二元毒素基因,引物见表 1。PCR 扩增条件分别为 tcd A:预变性 95℃ 1 min,95℃ 15 s,62℃ 2 min,72℃ 40 s 共 30 个循环,终延伸 72℃ 10 min;tcd B:预变性 95℃ 1 min,95℃ 20 s,55℃ 30 s,60℃ 2 min 共 30 个循环,终延伸 72℃ 10 min;cdt A:预变性 94℃ 1 min,94℃ 45 s,52℃ 1 min,72℃ 80 s 共 30 个循环,终延伸 72℃ 10 min;cdt B:预变性 94℃ 1 min,94℃ 45 s,52℃ 1 min,72℃ 80 s 共 30 个循环,终延伸 72℃ 10 min。

1.4.2 毒素 A/B 检测 取 200 μL 水样便或 200 mg 稀便于离心管中,加入 1 000 μL 稀释液,振荡混匀,12 000×g 离心 5 min,取上清 300 μL 于试剂条加样孔中,上机检测。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 软件对数据进行 χ^2 检验。

表 1 PCR 扩增 tcd A、tcd B 及二元毒素基因所需引物序列

Table 1 Primers of amplifying tcd A, tcd B and binary toxins by PCR

PCR 产物	引物	序列(5' - 3')	片段(bp)
tcdA	NK1	GGACATGGTAAAGATGAATTC	546
	NK2	CCCAATAGAAGATTCAATATTAAGCTT	
tcdB	NK104	GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC	204
	NK105	CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT	
cdtA	Cdta pos	TGAACCTGGAAAAGGTGATG	353
	Cdta rev	AGGATTATTTACTGGACCATTTG	
cdtB	Cdtb pos	CTTATTGCAAGTAAATACTGAG	490
	Cdtb rev	ACCGGATCTCTTGCTTCAGTC	

2 结果

2.1 艰难梭菌培养阳性患者临床基本情况 经厌氧培养,从粪便中培养出艰难梭菌 16 株,分纯后菌落形态见图 1。临床资料显示,厌氧培养阳性患者

年龄多在 44 岁以上(1 例除外),分布于 10 个科室,住院期间用过一种或多种抗菌药物,用药时间均 >7 d。患者具体年龄、科室分布、使用抗菌药物种类及时间见表 2。

2.2 艰难梭菌检测结果 在收集的 106 份标本中,厌氧培养艰难梭菌阳性 16 株(15.09%),经 PCR 扩

增,16 株菌 tcd A、tcd B 基因均阳性,cdt A、cdt B 基因均阴性;毒素 A/B 检出率为 12.26% (13/106),与厌氧培养阳性率比较,差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.16, P > 0.05$)。PCR 扩增结果见图 2。

2.3 不同时期艰难梭菌检测结果比较 第 1 组 (2009 年 2—12 月)57 份标本和第 2 组 (2011 年 4—7 月)49 份标本用两种方法进行艰难梭菌检测,结果见表 3。



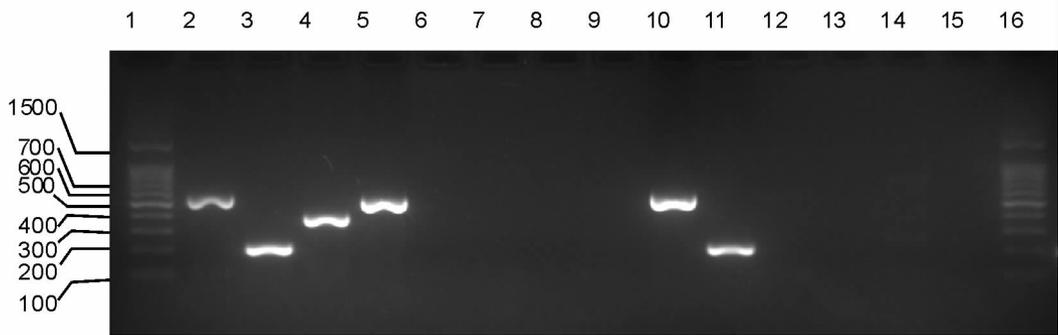
图 1 艰难梭菌菌落形态

Figure 1 Morphology of *C. difficile* colony

表 2 感染艰难梭菌的 16 例患者基本情况

Table 2 Basic condition of 16 patients with *C. difficile* infection

患者编号	年龄(岁)	科室	使用抗菌药物种类	抗菌药物累积使用时间(d)
1	57	脊柱外科	头孢类、喹诺酮类、广谱青霉素	27
2	57	脊柱外科	头孢类、喹诺酮类	11
3	53	脊柱外科	头孢类、喹诺酮类、广谱青霉素	18
4	75	脊柱外科	头孢类、碳青霉烯类、广谱青霉素、克林霉素	38
5	55	普通外科	头孢类	6
6	49	普通外科	头孢类、喹诺酮类	15
7	54	血管外科	头孢类	16
8	73	神经外科	头孢类、喹诺酮类	19
9	44	骨科	头孢类、广谱青霉素、氨基糖苷类	17
10	52	血液科	头孢类、碳青霉烯类、喹诺酮类	54
11	56	血液科	碳青霉烯类、喹诺酮类	7
12	23	血液科	头孢类、碳青霉烯类、广谱青霉素	16
13	72	肿瘤科	头孢类、碳青霉烯类、喹诺酮类、大环内酯类	28
14	79	神经内科	头孢类、喹诺酮类、大环内酯类	15
15	56	心内科	头孢类、喹诺酮类、克林霉素	17
16	53	消化内科	头孢类、喹诺酮类	10



1,16: marker;2—5: tcd A,tcd B,cdt A and cdt B 阳性对照(positive control of tcdA,tcdB,cdtA and cdtB);6—9: tcdA,tcdB,cdtA,cdtB 阴性对照(negative control of tcdA,tcdB,cdtA and cdtB);10—11: tcdA,tcdB 阳性标本(specimen of positive tcdA and tcdB);12—15: tcdA,tcdB,cdtA,cdtB 阴性标本(specimen of negative tcdA,tcdB,cdtA and cdtB)

图 2 A、B 毒素及二元毒素基因扩增结果

Figure 2 Amplification results of toxins A,B and binary toxin

3 讨论

近年来,艰难梭菌已成为医院感染最重要的病

原体之一。2000 年以来,加拿大、美国以及欧洲一些国家已经多次出现艰难梭菌感染的暴发流行,研究称这主要归因于一种流行株 BI/NAP1/027 型高毒力菌株的出现^[2-3];2005 年,在荷兰又发现了另一种

表 3 第 1 组和第 2 组标本艰难梭菌检测结果比较

Table 3 Comparison of detection results of *C. difficile* in two groups

检测方法	阳性率(%)		χ^2	P
	第 1 组	第 2 组		
厌氧培养	22.81(13/57)	6.12(3/49)	5.73	<0.05
毒素 A/B	17.54(10/57)	6.12(3/49)	3.18	>0.05

高毒力菌株 078 核糖型^[4]。与其他核糖型相比,027 型和 078 型具有更强的致病性和更高的死亡率,因此引起全球广泛关注。据报道^[5-7],住院患者艰难梭菌感染率在英国为 15.00%,加拿大 17.00%,印度 15.00%。而中国尚缺少大范围的流行病学资料,仅在少数地区有过报道。华山医院^[8]2007 年艰难梭菌产毒株分离率为 10.40%;中国疾病预防控制中心^[9]从 112 份腹泻标本中检测出 8 株产毒艰难梭菌,分离率为 7.14%。

本研究中产毒艰难梭菌分离率为 15.09%,同国外报道基本一致,比国内其他地区高,说明我院艰难梭菌感染情况严重。艰难梭菌阳性患者的临床资料显示,患者平均年龄为 57 岁,大部分住院期间使用过头孢类、喹诺酮类或碳青霉烯类等抗菌药物,平均累积使用抗菌药物时间为 20 d,而使用这几类药物是诱发艰难梭菌相关性腹泻的重要因素之一,符合国外的一些报道^[3]。年龄偏大及头孢类、喹诺酮类或碳青霉烯类等抗菌药物的使用是艰难梭菌感染的高危因素。研究中我们还发现若将两个时间段的标本对比分析,厌氧培养艰难梭菌阳性率有较大差异($P < 0.05$)。究其原因,可能是 2011 年卫生部对抗菌药物滥用进行了专项整治,医院抗菌药物实行临床应用分级管理制度,使得临床医生对应用抗菌药物更加合理、规范的缘故;另外,我院 2010 年搬至新医疗区,可能因为环境的改变,使得院内常年积存的芽孢引发的感染状况得以改善,所以 2011 年 4—7 月的标本艰难梭菌检出率低于 2009 年 2—12 月的标本。以上提示,要减少院内艰难梭菌感染,限制抗菌药物的不合理使用是关键措施。

目前,国外检测艰难梭菌的方法有厌氧培养、组织细胞毒素检测、酶联免疫法、PCR 等。本研究选用了厌氧培养后 PCR 扩增、酶联荧光免疫法进行检测,结果显示两种方法检出率基本一致。厌氧培养花费时间较长,需要特殊的仪器设备,但当艰难梭菌感染暴发流行时,对菌株进行基因分型以及检测药物敏感性等仍需厌氧培养;在培养的基础上采用 PCR 法分别检测 A、B 毒素,操作比较繁琐,所需时

间长,有人改进后采用多重 PCR 一步即可检测 3 种毒素^[10],快速、特异;后来研究者又发展了一种更加方便的方法,采用 Real-time PCR 直接从粪便标本中检测毒素基因^[11],敏感、特异,但实验要求较高,相信未来会有很大的应用前景;酶联荧光免疫法检测毒素 A/B,操作简单,省时省力,许多实验室应用这种方法,但有研究^[12]显示该方法假阴性率较高,原因可能是粪便标本在检测前被不恰当处理或储存的缘故。综合考虑,目前而言,酶联荧光免疫法更适合于临床快速诊断,当然还要结合临床症状及其他检查以防漏检。

在艰难梭菌感染率递增及高毒力菌株暴发流行的形势下,我们必须做好感染的预防和控制工作,谨慎使用抗菌药物,防止交叉感染;同时对病例进行积极跟踪和监督,只有这样,医院内艰难梭菌感染才可以被控制。

[参 考 文 献]

- [1] Kelly C P, LaMont J T. Current concepts: *Clostridium difficile*-more difficult than ever[J]. N Engl J Med, 2008, 359(18):1932-1940.
- [2] McDonald L C, Killgore G E, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile*[J]. N Engl J Med, 2005, 353(23):2433-2441.
- [3] Loo V G, Poirier L, Miller M A, et al. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality[J]. N Engl J Med, 2005, 353(23):2442-2449.
- [4] Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078[J]. Clin Infect Dis, 2008, 47(9): 1162-1170.
- [5] Djuretic T, Wall P G, Brazier J S, et al. *Clostridium difficile* update on its epidemiology and role in hospital outbreaks in England and Wales[J]. J Hosp Infect, 1999, 41(3):213-218.
- [6] Dhawan B, Chaudhry R, Sharma N, et al. Incidence of *Clostridium difficile* infection; a prospective study in an Indian hospital[J]. J Hosp Infect, 1999, 43(4):275-280.
- [7] Butterworth S A, Koppert E, Clarke A, et al. Recent trend in diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in a tertiary care facility[J]. Am J Surg, 1998, 175(5):403-407.
- [8] Jin K, Wang S X, Huang Z H, et al. *Clostridium difficile* infections in China[J]. Journal of Biomedical Research, 2010, 24(6):411-416.
- [9] Cheng Y, Lu J X, Yan S K, et al. Primary study on the gene typing, molecular characteristics of virulence and resistance associated gene of 12 *Clostridium difficile* clinical isolates in China[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2009, 25(5):401-405.

次为金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌。凝固酶阴性葡萄球菌为条件致病菌,其表面具有细胞黏质因子,不但有抗吞噬作用,还有助于黏附定植,并能阻止抗菌药物向细菌内渗透,故检出率高。由于新生儿败血症患儿常有多种基础疾病,因此免疫力低下,容易发生以表皮葡萄球菌为主的环境菌感染,其病原菌与原发病灶感染菌种往往相同,所以在新生儿有局部感染时要警惕败血症。本研究中 MRSA、MRCNS 的耐药率普遍高于 MSSA 和 MSCNS,这可能与 MRSA、MRCNS 的多重耐药机制有关。利福平对人体的肝脏有一定副作用,故新生儿不宜使用;万古霉素为糖肽类抗菌药物,其纯度高,安全性好,已作为临床治疗 MRSA、MRCNS 引起的全身性感染的首选药物。国外已有耐万古霉素金黄色葡萄球菌株的临床报道,应引起临床医生的高度重视,合理使用万古霉素,防止耐药菌株的产生。

本组病例检出的病原菌中,G⁻菌以大肠埃希菌为主,占 12.03%,其次是铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌。大肠埃希菌为条件致病菌,19 株中有 5 株(26.32%)产 ESBLs,产 ESBLs 菌株耐药性高于不产 ESBLs 的菌株。其耐药机制为:产 ESBLs 株药物诱导的靶位点基因突变、*qnr* 基因通过质粒介导耐药^[5]。对产 ESBLs 菌株,可使用抗菌药物与酶抑

制剂的复方制剂,重症患儿可用亚胺培南或美罗培南;由于喹诺酮类抗菌药物对幼儿动物具有软骨损伤作用,故即使体外药敏试验敏感,新生儿科也应慎用。

综上所述,新生儿败血症抗感染治疗过程中,在经验用药前应尽可能送血培养,获得药敏结果后,应根据经验用药效果及药敏结果调整抗菌药物,同时还应考虑药物对新生儿肝、肾的毒副作用,避免滥用抗菌药物,减少耐药菌株的产生。

[参 考 文 献]

- [1] 余加林,吴仕孝. 新生儿败血症诊疗方案[J]. 中华儿科杂志, 2003,41(12):897-899.
- [2] Tiskumara R, Fakharee S H, Liu C Q, *et al.* Neonatal infections in Asia[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2009, 94(2): 144-148.
- [3] 许莉. 56 例新生儿败血症病原学及药敏结果分析[J]. 中外医学研究, 2010, 8(9): 4-5.
- [4] Yalaz M, Cetin H, Akisu M, *et al.* Neonatal nosocomial sepsis in a level-III NICU: evaluation of the causative agents and antimicrobial susceptibilities[J]. Turk J Pediatr, 2006, 48(1): 13-18.
- [5] 应华永,徐瑞龙,胡付品,等. 肺炎克雷伯菌中质粒介导喹诺酮耐药基因 *qnr* 的检测及耐药特征[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(3): 293-295.

(上接第 296 页)

- [10] Persson S, Torpdahl M, Olsen K E. 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.
- [11] Barbut F, Braun M, Burghoffer B, *et al.* Rapid detection of toxigenic strains of *Clostridium difficile* in diarrheal stools

by real-time PCR[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(4): 1276-1277.

- [12] Lozniewski A, Rabaud C, Dotto E, *et al.* Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis: usefulness of premier cytoclone A + B enzyme immunoassay for combined detection of stool toxins and toxigenic *C. difficile* strains[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(5): 1996-1998.