

重症加强治疗病房腹泻患者艰难梭菌检测的敏感方法

陆晓凤 吴建祥 徐少毅 蔡继明 吴晓燕

【摘要】目的 对重症加强治疗病房(ICU)腹泻患者的粪便标本进行艰难梭菌检测,了解本院ICU腹泻患者艰难梭菌的感染情况。**方法** 采用前瞻性观察性研究方法,选择2013年6月至2014年7月入住浙江省嘉兴学院附属第二医院ICU的腹泻患者25例,每例患者收集2份粪便标本,一份行厌氧培养,另一份采用定量聚合酶链反应(PCR)及凝胶电泳进行毒素基因检测。**结果** 25份粪便标本经厌氧培养,其中6份粪便标本培养出艰难梭菌(24%),药敏结果提示对甲硝唑及万古霉素均敏感。艰难梭菌毒素检测显示,25份粪便标本直接提取DNA后进行PCR扩增,5份标本粪便艰难梭菌毒素A/B检测为阳性,且均为毒素B阳性(20%)。两种方法检测艰难梭菌阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.13, P>0.05$)。5例毒素检测阳性患者均治愈。**结论** 本院ICU艰难梭菌相关性腹泻比较严重,对于临床疑诊患者应及时进行艰难梭菌检测以指导治疗。

【关键词】 艰难梭菌; 腹泻; 聚合酶链反应; 厌氧培养; 毒素检测

艰难梭菌感染(CDI)是抗菌药物相关性腹泻(AAD)的常见原因,临床上约25%~33%的AAD和100%的伪膜性肠炎与艰难梭菌有关^[1]。近年来,艰难梭菌引起的医院感染特别是在重症加强治疗病房(ICU)中的发生率和病死率日益增多^[2],流行为菌株毒性增强,在欧美已有过多次暴发流行^[3],引起了人们的高度关注,但国内研究相对较少。上海华山医院报道2007年产毒艰难梭菌分离率为10.04%^[4],湖南湘雅医院2009年至2011年的分离率为15.09%^[5]。为了解本院ICU患者艰难梭菌的感染情况,为临床医生诊断及治疗艰难梭菌相关性腹泻(CDAD)提供客观依据,本研究采用两种方法对患者粪便中的艰难梭菌进行检测,并对两种方法检出率进行比较,报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象的选择:采用前瞻性观察性研究方法,选择2013年6月至2014年7月入住本院ICU的腹泻患者25例,每例患者收集2份标本,一份进行厌氧培养,另一份采用定量聚合酶链反应(PCR)及凝胶电泳技术进行毒素基因检测。筛选标准:年龄>18岁,每日腹泻>3次,粪便性状为稀便或水样便或血性便,腹泻前3个月内使用过抗菌药物。同一患者不重复收集标本。

本研究符合医学伦理学标准,经医院伦理委员会批准,并获得患者及家属的知情同意。

1.2 试验菌株及主要仪器、试剂:产毒艰难梭菌菌株ATCC 9689购自美国菌种保藏中心。厌氧微生物培养罐;厌氧琼脂平皿;PCR仪(StepOnePlus,美国ABI公司);粪便及艰难梭菌DNA提取试剂盒、定量PCR试剂盒均购自凯杰中国上海公司;引物根据Primer Premier 5.0软件自行设计,由

Invitrogen 中国公司合成。

1.3 细菌培养与试验方法

1.3.1 细菌培养和药敏试验:将粪便标本直接接种于新鲜配制的厌氧琼脂平皿,置于厌氧罐中37℃培养48h,采用梅里埃Compact鉴定仪ANC卡鉴定,鉴定编码148013051,鉴定率为99%。鉴定为艰难梭菌的菌株后再进行药敏试验。

1.3.2 定量扩增及凝胶电泳检测:根据试剂盒说明书处理粪便标本后直接提取DNA。将ATCC 9689标准菌株1mL接种在厌氧培养基中,置于厌氧罐中37℃增菌培养48h,根据说明书要求提取基因组DNA。毒素A与毒素B的编码基因*tedA*、*tedB*引物见表1。PCR反应体系按照说明书进行。PCR扩增*tedA*、*tedB*反应条件均为:预变性95℃5min,95℃10s,62℃30s,共40个循环。以ATCC 9689提取的DNA作为阳性对照,超纯水代替模板DNA作为空白对照。*tedA*、*tedB*基因经PCR扩增后进行凝胶电泳检测。

表1 产毒艰难梭菌毒素A与毒素B编码基因的聚合酶链反应(PCR)扩增引物序列

基因	引物	引物序列(5'-3')	引物大小(bp)
tedA	上游引物	TCTACCACTGAAGCATTAC	157
	下游引物	TAGTACTGTAGGTTTATTG	
tedB	上游引物	AGCAGTTGAATATAGTGTTTA	144
	下游引物	CATGCTTTTTTACTTTCTGG	

1.4 临床治疗:按《成人艰难梭菌感染临床实践指南》^[6],立即停用可能诱发CDI的抗菌药物;对1例中度CDI患者选择口服甲硝唑500mg、每日3次,疗程14d;对3例重症CDI患者选择口服或鼻饲万古霉素(0.5g/支,浙江新昌制药有限公司生产)125mg、每日4次,疗程14d;对1例严重复杂的CDI患者鼻饲万古霉素500mg、每日4次,并联合静脉滴注甲硝唑500mg、8h1次,疗程14d。

1.5 统计学处理:应用SPSS 17.0软件对计数资料进行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.021

基金项目:浙江省重点科技创新团队基金项目(2010R50019)

作者单位:314000 浙江嘉兴,浙江省嘉兴学院附属第二医院危重症医学科(陆晓凤、吴建祥、徐少毅、蔡继明),检验科(吴晓燕)

通讯作者:徐少毅,Email: jxicu@aliyun.com

2 结果

2.1 艰难梭菌厌氧培养结果:从25份粪便样本中培养出艰难梭菌6株(24%),药敏结果提示对甲硝唑及万古霉素两种抗菌药物均敏感。艰难梭菌菌落为纯培养,形态见图1。

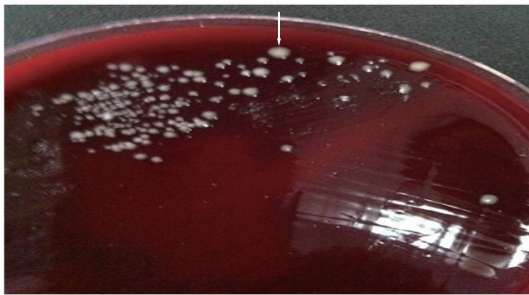
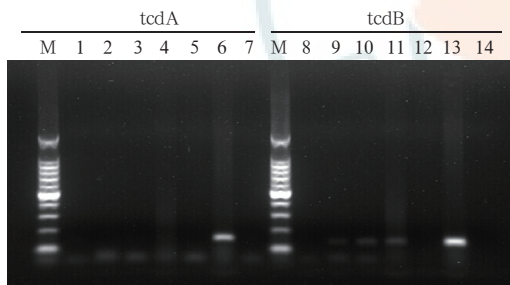


图1 腹泻患者粪便标本经厌氧培养出艰难梭菌菌落,箭头所示为典型菌落形态

2.2 艰难梭菌毒素检测结果:从25份粪便标本中直接提取DNA并进行PCR扩增(见图2),5份粪便艰难梭菌毒素A/B检测阳性,且均为毒素B阳性(20%)。两种方法检测艰难梭菌阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.13, P>0.05$)。



M为Marker, 1~5为tcdA阴性标本, 6为tcdA阳性对照, 7为tcdA阴性对照, 8,12为tcdB阴性标本, 9~11为tcdB阳性标本, 13为tcdB阳性对照, 14为tcdB阴性对照

图2 腹泻患者粪便标本直接提取DNA后产毒艰难梭菌毒素A、B基因(tcdA、tcdB)聚合酶链反应(PCR)扩增结果

2.3 治疗结果:5例毒素检测阳性患者均治愈,暂未复发。

3 讨论

艰难梭菌为革兰阳性产芽孢厌氧杆菌,通过分泌毒素A、毒素B引起AAD、结肠炎甚至致死性伪膜性肠炎,统称为CDI^[7]。毒素A为肠道毒素,可绑定黏膜细胞从而导致出血;而外毒素B是一种细胞毒素,只能与破坏的细胞绑定,导致更大的破坏,其细胞毒性是前者的1000倍。

粪便的艰难梭菌培养是最简便和灵敏的检测方法,为流行病学研究所必需^[6],特别在艰难梭菌暴发流行时,需进行基因分型及药敏试验。本研究提示,细菌培养与定量PCR检测两者的检出率无统计学差异,但厌氧培养花费时间较长;而指南^[6]推荐的酶免疫二步法,由于所选用的谷氨酸脱氢酶(GDH)检测试剂盒不同导致结果有差异。近年来,国外不少学者开始研究采用实时PCR(real-time PCR)直接从粪便标本中检测毒素基因,其方法敏感、特异,而且经济^[8]。我们建立了一种定量PCR检测艰难梭菌毒素A/B的方法,在

12h内能快速检测毒素基因,一份标本的检测成本价50元,且粪便标本24h内送检有效,并可在-70℃保存30d左右,相信该方法会有很大的临床应用前景。

本研究提示,本院ICU中CDAD的比例为20%,比国内报道的院内CDI发生情况严重^[4-5]。5例毒素阳性患者均为毒素B阳性,其中4例为重症及严重复杂的CDI,毒力及致病力强,考虑与PCR核糖型017菌株(A⁻B⁺)的流行及逐渐增多趋势有关^[9];而其中1例粪便培养阳性、PCR毒素检测阴性的患者,我们考虑可能为其他细菌感染,如产气荚膜梭菌,但患者肠道存在非产毒性艰难梭菌,可见毒素检测的重要性及必要性。

目前甲硝唑及万古霉素对控制CDI较为有效,但停药后20%左右的患者可多次复发,临床效果不尽如人意^[10],除有耐药菌株出现外,AAD病原菌复杂及以往经验性CDI治疗不能正确评估病情亦为重要原因。有资料显示,CDI患者2周内均使用过三代头孢菌素、β-内酰胺类、氟喹诺酮类抗菌药物,抗菌药物的合理使用仍然是关键。余超和周秀华^[11]采用粪便灌肠治疗ICU1例机械通气CDI腹泻患者取得成功。本研究提示,对高度怀疑CDI的ICU患者,常规进行粪便厌氧培养及毒素基因检测是非常重要的并值得临床推广的手段,可以帮助临床医师及时进行CDI的诊断和治疗。

参考文献

- [1] Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*—more difficult than ever [J]. N Engl J Med, 2008, 359 (18): 1932–1940.
- [2] 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 [J]. Lancet, 2005, 366 (9491): 1079–1084.
- [3] Musgrave CR, Bookstaver PB, Sutton SS, et al. Use of alternative or adjuvant pharmacologic treatment strategies in the prevention and treatment of *Clostridium difficile* infection [J]. Int J Infect Dis, 2011, 15 (7): e438–448.
- [4] Jin K, Wang S, Huang Z, et al. *Clostridium difficile* infections in China [J]. J Biomed Res, 2010, 24 (6): 411–416.
- [5] 刘元元,刘文恩,简子娟,等. 住院腹泻患者艰难梭菌检测与分析[J]. 中国感染控制杂志, 2012, 11 (4): 293–296, 299.
- [6] Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA) [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2010, 31 (5): 431–455.
- [7] Bartlett JG, Chang TW, Gurwith M, et al. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia [J]. N Engl J Med, 1978, 298 (10): 531–534.
- [8] Goldenberg SD, Cliff PR, French GL. Glutamate dehydrogenase for laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48 (8): 3050–3051.
- [9] 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.
- [10] Musgrave CR, Bookstaver PB, Sutton SS, et al. Use of alternative or adjuvant pharmacologic treatment strategies in the prevention and treatment of *Clostridium difficile* infection [J]. Int J Infect Dis, 2011, 15 (7): e438–448.
- [11] 余超,周秀华. 粪菌灌肠治疗重症监护病房艰难梭菌感染腹泻1例报告并文献复习[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (5): 309–310.

(收稿日期:2014-12-18)(本文编辑:李银平)