

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2018.06.009

不同时期艰难梭菌感染状况分析*

刘元元 李晓哲 董海新

(济宁医学院附属医院, 济宁 272000)

摘要 **目的** 掌握医院艰难梭菌近几年的感染状况,为医院感染监测和防控提供现实依据。**方法** 收集院内 2014 年 1 月至 2014 年 12 月 106 例住院腹泻患者粪便标本为前期组,同时选择 2016 年 1 月至 2016 年 12 月 90 例住院腹泻患者粪便标本为后期组,采用艰难梭菌显色平板筛选可疑菌落,通过镜检和质谱仪进行鉴定;同时对粪便标本通过酶免疫分析方法检测毒素 A、B;对于培养阳性的菌株采用 PCR 扩增毒素 A、B 基因片段;比较两个时期艰难梭菌感染情况以及不同方法检出率的差异。**结果** 两个检测方法厌氧培养及酶免疫分析监测艰难梭菌感染阳性率无统计学差异。同一时期不同方法阳性率比较无统计学意义,另外 PCR 扩增结果除后期组 2 株阴性外均产毒素 A、B。**结论** 两个时期艰难梭菌感染率均较高,说明我院艰难梭菌感染形势严峻,应高度关注,及时监测,防止传播和流行。

关键词 艰难梭菌;毒素 A/B;腹泻

中图分类号:R37 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2018)12-410-03

Analysis of Clostridium difficile infection in different periods

LIU Yuanyuan, LI Xiaozhe, DONG Haixin

(The Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining 272000, China)

Abstract: Objective To understand the infection status of Clostridium difficile in recent years, and provide a practical basis for nosocomial surveillance, prevention and control. **Methods** The collected 106 fecal specimens of hospitalized patients with diarrhea from January 2014 to December 2014 was the former group, and 90 fecal specimens of hospitalized patients with diarrhea from January 2016 to December 2016 was the latter group. And the suspicious colonies were screened in Clostridium difficile color plate and identified by microscopy and mass spectrometry. Toxins A and B in fecal specimens were detected by enzyme immunoassay assay. The gene fragments of toxin A and toxin B were amplified by PCR for cultured positive strains. The infection status of clostridium difficile between two periods and the detection rates of different methods were compared. **Results** There were no significant differences of the positive rates with anaerobic culture and enzyme immunoassay and the different methods at the same time. Besides, except two strains of the later group toxins A and B were positive by PCR amplification. **Conclusion** The positive rates of clostridium difficile with different methods have no obvious differences. The infection rates of clostridium difficile during two periods are relatively higher, and the detection rates are essentially in agreement. This indicates that the situation of clostridium difficile infection is severe in our hospital, which should be paid close attention and monitored in time to prevent its spread and epidemic.

Keywords: Clostridium difficile; Diarrhea; Toxin A/B

艰难梭菌,是定植在人类肠道的正常菌群,一旦菌群失调,成为条件致病菌后,轻可引起腹泻,重则导致爆发性伪膜性肠炎,甚至死亡。近十几年来,随着抗生素的不合理使用,世界范围内艰难梭

菌感染日趋严重,已成为美国院内感染最主要的致病菌^[1],欧洲也发生了多次暴发事件^[2]。分析认为可能与高毒力菌株核糖体分型 O27 型播散有关。我国大陆地区 90 年代后陆续开始艰难梭菌感染监测,2015 年已有 O27 型的报道^[3]。由于国内研究起步晚,目前仅有局部的研究报道,尚无全国性的流行病学调查数据。笔者调查了济宁医学院附属

* [基金项目] 济宁医学院附属医院“苗圃”科研计划项目 (JYFY-MP-2013-MS-010)

医院艰难梭菌感染状况。报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选自 2014 年 1 月至 12 月住院病人腹泻患者 106 例(前期组)及 2016 年 1 月至 12 月腹泻患者 90 例(后期组),大便通常为稀便、水样便或半成形便,腹泻 ≥ 3 次/24h,持续超过 2d。

1.2 试剂与仪器

艰难梭菌显色培养基、厌氧罐、艰难梭菌毒素检测试剂盒、VIDAS 荧光免疫分析仪(梅里埃公司),细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN),基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱仪(MALDI-TOF-MS)。

1.3 方法

1.3.1 艰难梭菌培养 将粪便标本与等比例无水乙醇混合,室温静置 1h,漩涡震荡混匀后离心,取沉淀接种于艰难梭菌鉴别培养基或显色培养基上,37℃ 厌氧培养 48h。取可疑菌落进行耐氧试验,染色镜检,观察是否为革兰阳性芽孢杆菌。镜检符合者传代培养,采用质谱仪进行菌种鉴定。

1.3.2 艰难梭菌毒素 A/B 检测 按照操作说明书,取适量粪便标本加于样本稀释液中震荡混匀,离心取上清,加入毒素检测试剂条加样孔中,放入 VIDAS 仪器中检测。

1.3.3 艰难梭菌 PCR 毒素检测 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒,按操作说明,提取艰难梭菌基因组 DNA,进行 *tcdA*、*tcdB* 基因扩增。引物参照前期设计,反应体系为 25 μ l,包括上下游引物 1 μ l、模板 DNA 2 μ l、Taq Master Mix 12.5 μ l、去离子水 8.5 μ l,扩增程序:95℃ 1min,95℃ 15s、62℃ 2min、72℃ 40s(*tcdA*),95℃ 20s、55℃ 30s、60℃ 2min(*tcdB*) 30 个循环,72℃ 延伸 10min。扩增完成后,1% 琼脂糖凝胶电泳 30min。

1.4 统计学方法

应用 SPSS17.0 软件进行数据分析。

2 结果

2.1 不同方法艰难梭菌检测情况

为验证两种不同检测方法检测艰难梭菌的情况,将前期组 106 例及后期 90 例非重复标本合并,综合比较,厌氧培养阳性率 15.82% (31/196) 与酶免疫分析检测阳性率 12.24% (24/196) 差异无统

计学意义($P > 0.05$)。两种方法诊断结果一致性一般($Kappa = 0.684, P < 0.001$),见表 1。厌氧培养所得艰难梭菌经 PCR 扩增,前期组培养阳性菌株 16 例均可检测出毒素 A、B,后期组 13 株毒素阳性,2 株毒素阴性,产毒株阳性率为 14.4%。见图 1。

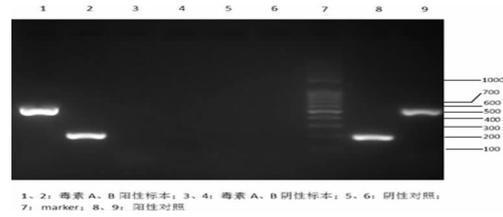


图 1 毒素扩增结果

表 1 不同方法艰难梭菌检出情况

厌氧培养	酶免疫分析		合计
	阳性	阴性	
阳性	20	11	31
阴性	4	161	165
合计	24	172	196

注:经 McNemar 检验, $P = 0.118$ 。

2.2 不同时期艰难梭菌检测情况

无论采用哪种方法,前期后期艰难梭菌感染率都在 10% 以上。经比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 不同时期同一方法艰难梭菌检出情况比较

方法	对比	检测数	艰难梭菌阳性(n/%)	P
厌氧培养	前期组	106	16/15.09	0.764
	后期组	90	15/16.67	
酶免疫分析	前期组	106	13/12.26	0.993
	后期组	90	11/12.22	

2.3 艰难梭菌培养阳性患者临床分布情况

前期组均为成人标本,主要分布科室为外科,在性别分布上无统计学意义($P > 0.05$)。后期组未限制年龄,儿科、血液、肾内所占比例较高,在年龄及性别分布上差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 3。住院期间阳性患者多单一或联合使用过一代、三代头孢类、喹诺酮类等抗生素。

表 3 培养阳性患者分布情况

分组	因素	送检数	艰难梭菌培养阳性(n/%)	χ^2	P	
前期组	性别	男	65	12/18.46	1.487	0.223
		女	41	4/9.76		
后期组	性别	男	56	12/21.43	2.420	0.120
		女	34	3/8.82		
	年龄	儿童	21	5/23.81	0.447	0.504
		成人	69	10/14.49		

3 讨论

目前艰难梭菌检测方法有多种,不同方法各有优缺点。一般公认的最好方法为组织细胞毒素检测,该方法敏感性、特异性可达 98% 以上,主要缺点是技术要求高,检测周期相对较长,而且操作繁琐,无法实现标准化操作。厌氧培养耗费时间较长,需要专门的厌氧设备,接种要求苛刻,但对于菌株的基因分型以及检测药物敏感性等仍具有重要的应用价值;酶免疫学方法操作简便快速,实用性好,灵敏度、特异度相对较低,适合临床快速筛查和早期诊断;核酸扩增方法实验要求高,仪器昂贵,但较敏感、特异。本文选用显色培养、酶免法、PCR 方法,阳性率无显著差异。前期厌氧培养曾选用成品艰难梭菌鉴别平板,但阳性率较低。改用显色平板后,阳性率明显提高,同其他报道结果一致。

本文显示,艰难梭菌感染患者中男女阳性率虽有一定差异,但并无统计学意义,而国内荟萃分析表明^[4],男性比女性感染率要高。分析原因可能是不同地区、不同医院感染状况本身存在不同或者标本量不充足所致的偏倚,为排除该偏倚,下一步应继续增大标本量。一直以来普遍认为高龄是艰难梭菌感染的危险因素之一,>65 岁成人是感染的主要人群^[5-7]。有研究者对不同年龄人群感染状况分析发现,1 岁以内随月份增加儿童艰难梭菌感染率有上升趋势,所以儿童艰难梭菌感染也不容忽视。故后期收集的标本包含来源于儿童的部分。从后期阳性标本看,儿童和成人感染率也无统计学差异,说明我院艰难梭菌感染涵盖年龄跨度大,需普遍关注。

两个时期进行显色培养及酶免疫学检测阳性率基本一致,说明从 2014 年至 2017 年院内持续有艰难梭菌感染发生,且感染率前后并无大的差别,与国内艰难梭菌感染率水平相符^[8]。在医院科室构成上,外科、儿科、血液、肾内等阳性率相对偏高,其他科室也有散在分布,表明我院艰难梭菌感染范围广泛,但又有集中某些科室分布的趋势。可能与这些科室抗生素使用过多、住院时间长,环境定植污染等因素有关。长期以来,医院一直在规范抗生素的合理使用,严格遵循抗生素使用分级管理制度,减少抗生素滥用,而且尽量缩短患者住院时间,加强工作人员手卫生及患者周围环境卫生,对特殊

感染患者进行隔离治疗。尽管如此,我院艰难梭菌感染形势依然不容乐观,院感部门应加大监控力度,尤其是对感染率高的科室应严密监测,及时制定有效预防控制措施,减少定植与传播。

参考文献:

- [1] Miller BA, Chen LF, Sexton DJ, et al. Comparison of the burdens of hospital-onset, healthcare facility-associated Clostridium difficile Infection and of healthcare-associated infection due to methicillin-resistant Staphylococcus aureus in community hospitals [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2011, 32 (4): 387-390. DOI: 10.1086/659156.
- [2] Wiegand PN, Nathwani D, Wilcox MH, et al. Clinical and economic burden of clostridium difficile infection in europe: a systematic review of healthcare-facility-acquired infection [J]. J Hosp Infect, 2012, 81 (1): 1-14. DOI: 10.1016/j.jhin.2012.02.004.
- [3] Wang P, Zhou Y, Wang Z, et al. Identification of clostridium difficile ribotype 027 for the first time in mainland China [J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2014, 35 (1): 95-98. DOI: 10.1086/674405.
- [4] 谢和宾, 曾鸿, 尹柯, 等. 我国住院腹泻患者艰难梭菌感染率的荟萃分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(5): 961-964.
- [5] Steele SR, McCormick J, Melton GB, et al. Practice parameters for the management of clostridium difficile infection [J]. Dis Colon Rectum, 2015, 58 (1): 10-24. DOI: 10.1097/DCR.0000000000000289.
- [6] Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ. European society of clinical microbiology and infectious diseases: update of the treatment guidance document for clostridium difficile infection [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20 Suppl 2: 1-26. DOI: 10.1111/1469-0691.12418.
- [7] Abou CCN, Pepin J, Valiquette L. Prediction tools for unfavourable outcomes in clostridium difficile infection: a systematic review [J]. PLoS One, 2012, 7 (1): e30258. DOI: 10.1371/journal.pone.0030258.
- [8] 千铁儿, 于永沛, 吴建浓, 等. 腹泻患者产毒素艰难梭菌阳性率的荟萃分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2015 (11): 2516-2519. DOI: 10.11816/cn.ni.2015-150553.

(收稿日期 2018-10-07)

(本文编辑:甘慧敏)