

• 综 述 •

艰难梭菌实验室诊断研究进展*

郭旭光,王 婷,汤 昕 综述,夏 勇[△] 审校

(广州医科大学附属第三医院检验科,广东广州 510150)

摘 要:艰难梭菌是一种产毒素或非产毒素的厌氧芽孢杆菌,是抗菌药物相关性腹泻和艰难梭菌感染的主要病原菌。由于过度使用抗菌药物,艰难梭菌感染患者人数急剧上升,导致院内感染的发病率和病死率增加。艰难梭菌感染的诊断主要基于临床症状和实验室检查,但是由于缺乏相应的临床症状和使用不恰当的检测方法,常出现误诊。因此,实验室检测对艰难梭菌感染的诊断至关重要,为了减少不恰当、不必要的检查,本研究将对艰难梭菌实验室检查进行综述。

关键词:艰难梭菌; 实验室; 诊断; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.16.030

文章编号:1673-4130(2018)16-2043-03

中图法分类号:R446.5

文献标识码:A

艰难梭菌是一种产毒素或非产毒素的厌氧芽孢杆菌,是人类肠道正常菌群之一,为革兰阳性粗大杆菌,位于菌体近端至颈端有卵圆形芽孢,无荚膜,有鞭毛。艰难梭菌芽孢抵抗力强,能在体外环境中存活数周至数月,在 100 ℃ 的温度下 1 h 才死亡。长期使用抗菌药物容易导致人肠道正常菌群失调,艰难梭菌生长占优势,导致抗菌药物相关性腹泻(AAD),即引起艰难梭菌相关性腹泻(CDI)和艰难梭菌感染(CDAD),严重者可引起伪膜性肠炎(PMC)甚至死亡。艰难梭菌感染的诊断主要基于临床症状和实验室检查,但是由于缺乏相应的临床症状和使用不恰当的检测方法,常出现误诊。因此,实验室检测对艰难梭菌感染的诊断至关重要,为了减少不恰当、不必要的检查,本研究将对艰难梭菌的实验室检查方法进行综述。

1 艰难梭菌概述

AAD 主要是由于 CDI 所引起^[1],由于 CDI 导致的腹泻只是众多临床症状之一,表现为自限性、轻微性或严重性。CDI 的临床症状主要表现为腹泻,即在 24 h 内有 3 次或以上的未成形大便;粪便中检测到艰难梭菌毒素或产生毒素的梭状芽孢杆菌;肠镜检查或病理学检查结果提示假膜性结肠炎;大部分患者有 8 周内应用抗菌药物或抗肿瘤药物治疗史^[2-3]。CDI 的并发症有伪膜性结肠炎、爆发型肠炎、中毒性巨结肠。有临床意义的艰难梭菌产生毒素 A、B 导致肠道黏膜跨膜电阻减少、黏膜水肿和肠道上皮细胞的损伤^[4]。毒素 A、B 分别由一个位于 19.6 kb 的致病性决定区的 *tcdA*、*tcdB* 基因编码。毒素 A 是一种肠毒素,使肠壁中性粒细胞浸润,释放淋巴因子,引起机体液体大

量分泌和出血性坏死;毒素 B 是一种细胞毒素,使肌动蛋白解聚,损坏细胞骨架,导致细胞固缩坏死,直接损坏肠壁细胞^[5]。研究表明,毒素 B 的毒力比毒素 A 强 10 倍,且现在发现仅有产生毒素 B,不产生毒素 A 的菌株和同时产生毒素 A、B 的菌株。位于该致病性决定区除了这 2 种毒力基因,还有 3 种调控基因即 *tcdE*、*tcdC* 和 *tcdR*。*tcdR* 对毒素 A、B 的表达具有正向调节作用,而 *tcdC* 具有负向调节作用。*tcdE* 则编码类噬菌体穿孔素。一些高产毒菌株还有可能产生二元毒素(CDT),使艰难梭菌毒素 A、B 的毒力增强,从而使症状加重^[6]。SHEA/IDSA 的临床实践指导方针和 ACG 国家的指导方针建议针对仅腹泻患者的粪便样本,应在 24 h 或更少的时间内进行检测^[7]。目前,艰难梭菌检测方法主要有细菌培养法、单一毒素检测法、毒素基因检测法和两步法等。细胞毒素或毒力基因检测主要有细胞毒素中和培养(CCNAs)法、酶联免疫吸附法(ELISA)、聚合酶链反应(PCR)法和荧光原位杂交法(FISH);两步法是 ELISA 法检测谷氨酸脱氢酶(GDH)联合其他细胞毒素检测法或 CCNAs 法^[8]。

2 艰难梭菌的生物学特性

艰难梭菌是严格厌氧的革兰阳性细菌,对氧气非常敏感。在菌体近端至颈端有卵圆形芽孢,其芽孢在体外环境中可存活数周至数月,在 100 ℃ 的温度下 1 h 才会死亡,芽孢可以使细菌在艰难的条件下生存,并促进菌体在环境中的传播,艰难梭菌无荚膜,有鞭毛,在常规的厌氧培养条件下不易生长,在环丝氨酸-头孢西丁-果糖琼脂(CCFA)培养基中可形成白色或淡黄色、不透明、边缘不整齐、表面粗糙的菌落,在紫外线

* 基金项目:广州市荔湾区科信局民生科技项目(20151217081)。

[△] 通信作者, E-mail: gysyxy@gmail.com。

本文引用格式:郭旭光,王婷,汤昕,等.艰难梭菌实验室诊断研究进展[J].国际检验医学杂志,2018,39(16):2043-2045.

照射下可呈黄绿色荧光^[9]。

3 实验室检测方法

3.1 大便培养 常用于检测艰难梭菌的选择性培养基一般是 CCFA 培养基,艰难梭菌在该培养基中生长占优势。环丝氨酸和头孢西丁的主要作用是在不影响艰难梭菌生长的情况下,抑制大多数革兰阴性菌和革兰阳性菌;果糖琼脂则提供营养物质,CCFA 培养基中所含的中性红试剂则可用作 pH 指示剂。厌氧条件下培养 48 h 后,培养基中可形成白色或淡黄色、不透明、边缘不整齐、表面粗糙的菌落,有马粪味,在紫外线照射下可见有黄绿色荧光。一般通过菌落形态、革兰氏染色及气味判断是否有艰难梭菌的生长。目前,艰难梭菌的阳性率比较低,艰难梭菌难以培养和分离^[10]。在 CCFA 培养基中加入胆红素盐,尤其是牛磺胆酸钠,可以促进艰难梭菌的生长。另外还可以用显色培养基,如艰难梭菌在难辨梭菌鉴定培养基(CDIF)中可形成黑色菌落。大便培养可以更直观地检测出艰难梭菌,但培养通常需要 2~3 d,甚至长达 9 d 的时间才能得到结果,而且必须配合毒素检测,因为有 10% 或者更多的住院患者可能会有艰难梭菌定植,不能区分艰难梭菌产毒株和非产毒株,不能为临床快速诊断疾病提供依据^[11-12]。

3.2 毒素培养(TC) CDI 主要是由艰难梭菌产毒株引起的,艰难梭菌不产毒株无临床意义。因此,毒素 A、B 的检测十分重要。TC 可以分为艰难梭菌培养和毒素检测两个部分,即将培养出的菌落重新接种培养到肉汤培养基中培养,取上清液过滤并加到细胞株中继续培养,通过观察细胞毒素引起的细胞病变,以及加入中和抗毒素变化判断有无产毒菌株。该方法虽能检测菌株在体外的产毒能力,但不能准确反映该菌株在宿主体内的情况^[13]。

3.3 细胞毒素中和试验(CCNA) 细胞毒素中和试验被认为是检测艰难梭菌感染的“金标准”。用于该方法检测的标本应是新鲜粪便标本,因为标本久置,会导致菌株毒素活力降低,易出现假阴性结果^[14]。粪便标本经过稀释、离心、过滤后,将滤液滴加到微量滴定板上单层细胞中(常用人包皮成纤维细胞、Vero 细胞和 McCoy 细胞等细胞系),并进行 24~48 h 孵育培养,观察由细胞毒素引起的细胞病变,然后通过特异性抗血清中和试验确定细胞病变的特异性。然而检测结果受所用细胞系种类的限制而有差异,操作繁琐,且费用昂贵,不利于在基层医院中开展^[15]。

3.4 谷氨酸脱氢酶(GDH)试验 GDH 是在所有艰难梭菌中高效表达的一种代谢酶,被认为是艰难梭菌表达最普遍的抗原。GDH 试验阳性并不能区分产毒菌株和非产毒菌株,需要再进一步验证,可用 CCNA、EIA、TC 或分子方法。GDH 试验的敏感度和阴性预测值很高,因此 GDH 阴性则可确定不含有艰难梭菌,阳性则需做确证试验^[16-17]。目前倾向于用 GDH 作为

CDI 的初筛试验,对 GDH 阳性标本再采用 CCNA 或 ELISA 检测的两步法。因为 CCNA 和 TC 检测费用高,耗时长,分子方法逐渐被重视。以 GDH 和 EIA 检测毒素作为初筛,对阳性标本再用环介导等温扩增确认。虽然该两步法的灵敏度低于其他方法,但是它的阴性预测值和阳性预测值足够支持阳性结果的可信度^[18]。

3.5 EIA 检测 基于 EIA 的试剂盒在市面上有多种形式存在,例如免疫层析、固相分析和微孔板。虽然 EIA 检测快速、实用、便宜,但是对于 CDI 的检测结果不平行(灵敏度为 63%~94%,特异度为 75%~100%),差异大。EIA 灵敏度的差异可能是由于多种因素造成的,如不同菌株毒素的抗原变异,标本储存和运输条件影响,冻融循环,以及实验室间的技术差异等。根据 SHEA 和 IDSA 指南,EIA 检测毒素比 CCNA 的灵敏度低。因此,为避免假阴性结果,EIA 不应单独用于诊断 CDI^[19-20],结合 GDH 筛查与 EIA 的两步法或三步法可提高 CDI 诊断的准确率。目前临床上常用 EIA 联合检测 GDH 和毒素 A、B^[21]。

3.6 核酸扩增试验(NAATs) 如今,许多感染都是通过分子方法诊断的,主要包括 RT-PCR 和环介导等温扩增。新一代的 NAATs 可以放大并检测出特定病原体的 DNA 或 RNA 序列,灵敏度及特异度高,速度快,应用广泛。根据 ESCMID 指南,NAATs 可作为两步法或三步法中的一部分用于 CDI 的诊断^[22-24]。但是值得注意的是,NAATs 灵敏度高,易导致假阳性结果,特别是其他病原体引起腹泻的粪便标本,由于无症状,可能无法识别出假阳性结果。NAATs 和毒素检测呈阳性的粪便标本比只有 NAATs 阳性的粪便标本含有更多的细菌和毒素,后者是反对使用 NAATs 作为独立测试的理由^[25]。

综上所述,目前检测艰难梭菌的方法主要有:毒素 A、B 检测,GDH 试验,编码毒素 A、B 的 tcdA、tcdB 检测,以及细菌形态和革兰氏染色。各种方法检测艰难梭菌的原理各不相同,敏感度与特异度也相差较大,各个方法不能单独作为 CDI 的诊断方法,需根据实际情况将不同方法联合使用。为了确保结果的可信性,粪便标本应新鲜,不宜久置,取腹泻患者有异常的粪便标本,做好标本的前处理,以减少试验误差,同时需要根据实验室的具体情况制定检测艰难梭菌的标准化流程,同时结合患者临床表现,得到准确的检测报告。

参考文献

- [1] RUPNIK M. How to detect *Clostridium difficile* variant strains in a routine laboratory[J]. Clin Microbiol Infect, 2001,7(8):417-420.
- [2] KIM H, RILEY T V, KIM M, et al. Increasing prevalence of toxin A-negative, toxin B-positive isolates of *Clostridi-*

- um difficile in Korea; Impact on laboratory diagnosis[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(3): 1116-1117.
- [3] BARTLETT J G, GERDING D N. Clinical recognition and diagnosis of *Clostridium difficile* infection[J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(S1): S12
- [4] BABADY N E, STILES J, RUGGIERO P, et al. Evaluation of the cepheid Xpert *clostridium difficile* epi assay for diagnosis of *clostridium difficile* infection and typing of the NAP1 strain at a cancer hospital [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(12): 4519-4524.
- [5] QUINN C D, SEFERS S E, BABIKER W, et al. C. Diff quik chek complete enzyme immunoassay provides a reliable first-line method for detection of *clostridium difficile* in stool specimens[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(2): 603-605.
- [6] ALCALA L, MARTIN A, MARIN M, et al. The undiagnosed cases of *Clostridium difficile* infection in a whole nation; where is the problem? [J]. Clin Microbiol Infect, 2012, 18(7): 204-213.
- [7] SARKER M R, PAREDES-SABJA D. Molecular basis of early stages of *Clostridium difficile* infection: germination and colonization [J]. Future Microbiol, 2012, 7(8): 933-943.
- [8] ECKERT C, JONES G, BARBUT F. Diagnosis of *Clostridium difficile* infection; the molecular approach[J]. Future Microbiol, 2013, 8(12): 1587-1598.
- [9] SOLOMON K. The host immune response to *Clostridium difficile* infection[J]. Therapeut Adv Infect Dis, 2013, 1(1): 19-35.
- [10] ADLERBERTH I, HUANG H, LINDBERG E, et al. Toxin-producing *clostridium difficile* strains as long-term gut colonizers in healthy infants[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(1): 173-179.
- [11] CHIANG D, NG S, LA M V, et al. Performance assessment of the BD MAX Cdiff assay in comparison to Xpert C. difficile assay in a setting with very low prevalence of toxigenic *Clostridium difficile* PCR ribotype 027[J]. Anaerobe, 2014, 30(SI): 156-158.
- [12] CAROFF D A, EDELSTEIN P H, HAMILTON K, et al. The bristol stool scale and its relationship to *clostridium difficile* infection[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(9): 3437-3439.
- [13] VALIENTE E, CAIRNS M D, WREN B W. The *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 lineage; a pathogen on the move [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(5): 396-404.
- [14] YANG J J, NAM Y S, KIM M J, et al. Evaluation of a chromogenic culture medium for the detection of *clostridium difficile*[J]. Yonsei Med J, 2014, 55(4): 994-998.
- [15] BUSS S N, LEBER A, CHAPIN K, et al. Multicenter evaluation of the biofire filmarray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(3): 915-925.
- [16] DUBBERKE E R, BURNHAM C A D. Diagnosis of *clostridium difficile* infection treat the patient, not the test [J]. JAMA, 2015, 175(11): 1801-1802.
- [17] DAVIES K A, BERRY C E, MORRIS K A, et al. Comparison of the vidas C-difficile GDH automated enzyme-linked fluorescence immunoassay (ELFA) with another commercial enzyme immunoassay (EIA) (Quik Chek-60), two selective media, and a PCR assay for *glud* for detection of *clostridium difficile* in fecal samples[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(6): 1931-1934.
- [18] POPIEL K Y, GHEORGHE R, EASTMOND J, et al. Usefulness of adjunctive fecal calprotectin and serum procalcitonin in individuals positive for *clostridium difficile* toxin gene by PCR assay[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(11): 3667-3669.
- [19] ZACHARIOUDAKIS I M, ZERVOU F N, PLIAKOS E E H, et al. Colonization with toxinogenic C-difficile upon hospital admission, and risk of infection; a systematic review and Meta-analysis[J]. Am J Gastroenterol, 2015, 110(3): 381-390.
- [20] YOO J, LEE H, PARK K G, et al. Evaluation of 3 automated real-time PCR (Xpert C. difficile assay, BD MAX Cdiff, and IMDx C. difficile for Abbott m2000 assay) for detecting *Clostridium difficile* toxin gene compared to toxigenic culture in stool specimens [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2015, 83(1): 7-10.
- [21] DESAI K, GUPTA S B, DUBBERKE E R, et al. Epidemiological and economic burden of *Clostridium difficile* in the United States; estimates from a modeling approach [J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1): 1-10.
- [22] NEUENDORF M, GUADARRAMA-GONZALEZ R, LAMIK B, et al. A prospective study of two isothermal amplification assays compared with real-time PCR, CCNA and toxigenic culture for the diagnosis of *Clostridium difficile* infection[J]. BMC Microbiol, 2016, 16(1): 1-6.
- [23] LARCOMBE S, HUTTON M L, LYRAS D. Involvement of bacteria other than *clostridium difficile* in antibiotic-associated diarrhoea[J]. Trend Microbiol, 2016, 24(6): 463-476.
- [24] JACKSON M, OLEFSON S, MACHAN J T, et al. A high rate of alternative diagnoses in patients referred for presumed *clostridium difficile* infection[J]. J Clin Gastroenterol, 2016, 50(9): 742-746.
- [25] REIGADAS E, ALCALA L, MARIN M, et al. Clinical significance of direct cytotoxicity and toxigenic culture in *Clostridium difficile* infection [J]. Anaerobe, 2016, 37(SI): 38-42.