

上海交通大学

SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY

学士学位论文

THESIS OF BACHELOR



论文题目：艰难梭菌的感染情况及分型研究

学生姓名：章黎华

学生学号：5087409014

专 业：医学检验

指导教师：彭奕冰

学院(系)：医学院

艰难梭菌的感染情况及分型研究

摘要

目的 估测一段时期内瑞金医院住院腹泻患者中艰难梭菌的感染率，探寻艰难梭菌感染的高危因素，检测菌株毒素基因并进行核糖体分型研究，为了解院内艰难梭菌感染情况、判定暴发流行提供依据。**方法** 采集住院腹泻患者的粪便标本，接种 CDMN 选择培养基进行艰难梭菌分离培养，并通过革兰染色、耐氧试验和凝集试验作菌落鉴定；提取阳性菌株的 DNA，选择特异性引物用 PCR 法扩增 A、B 毒素基因；核糖体分型针对细菌基因组 16S~23S rDNA 间区序列进行扩增，并根据电泳结果的多态性实现分型。**结果** 合计收到住院腹泻患者的粪便标本 539 份，其中阳性 44 例，阳性率占 8.2%。阳性菌株（44 株）分为 3 种毒素型：A+B+型、A-B+型和 A-B-型，分别占 57%、34%和 9%。核糖体型别分为 18 种，以 R8 型、R4 型为主，分别占 20%、18%。**结论** 估测得 2010 年至 2012 年间瑞金医院住院腹泻患者中艰难梭菌的感染率约为 7-9%。患者感染艰难梭菌可能与持续暴露于医院环境、近期使用抗生素、严重的基础疾病、免疫功能低下等危险因素有关。研究中菌株毒素型以 A+B+型为主，核糖体分型存在相对优势的型别，但无证据提示院内艰难梭菌感染的暴发流行。

关键词：艰难梭菌，感染，危险因素，毒素，核糖体分型

RESEARCH OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* INFECTION AND PCR-RIBOTYPING FOR STRAINS

ABSTRACT

Objective To estimate the *Clostridium difficile* infection rates among hospitalized patients presenting with diarrhea in Ruijin Hospital through one period of time, explore the risk factors associated with *Clostridium difficile* infection, detect the toxin genes and perform PCR-ribotyping for the strains in order to have knowledge of nosocomial *Clostridium difficile* infection and judge outbreaks in the hospital. **Methods** To collect the stool samples from hospitalized patients with diarrhea, inoculate onto selective culture media CDMN for the culture of *Clostridium difficile*, then do the identification by Gram staining, aero-tolerance test and agglutination assay; to extract DNA from the positive strains, amplify toxin gene A and B by PCR with specific primers; to perform PCR-ribotyping through amplification of the genomic 16S~23S rDNA intergenic spacer region sequence, followed by electrophoresis to distinguish different ribotypes according to the polymorphism of the bands. **Results** 539 stool samples from hospitalized patients with diarrhea have been collected in all, of which 44 are positive for *Clostridium difficile* (8.2%). 44 positive strains have been divided into 3 toxin types: A+B+ strains, A-B+ strains, and A-B- strains, which account for 57%, 34% and 9%, respectively. All the strains belong to 18 ribotypes, mainly ribotype R8(20%) and ribotype R4(18%). **Conclusions** From 2010 to 2012, the *Clostridium difficile* infection rate among hospitalized patients with diarrhea in Ruijin Hospital is estimated to range from 7% to 9%. The reason why these patients have been infected with *Clostridium difficile* may be associated with risk factors such as prolonged exposure to healthcare environment, recent use of antibiotics, severe comorbidities and impaired immune status. All these clinical isolates in the study are mainly A+B+ strains; and there exist relatively predominant ribotypes, but no evidence suggests nosocomial outbreak of *Clostridium difficile* infection.

Key words: *Clostridium difficile*, infection, risk factors, toxin, ribotype

目 录

第一章 绪论	1
1.1 引言	1
1.2 发病机制	1
1.3 临床表现	2
1.4 流行状况	2
1.4.1 发病率	2
1.4.2 严重程度、复发率和致死率	3
1.4.3 感染类型	3
1.4.4 传播途径	3
1.4.5 危险因素	4
1.4.6 高毒力株与暴发菌株	4
1.5 分子分型技术	4
1.5.1 PFGE	5
1.5.2 REA	5
1.5.3 Toxinotyping	5
1.5.4 PCR-ribotyping	5
1.5.5 RAPD/AP-PCR	5
1.5.6 MLVA	5
1.5.7 AFLP	5
1.5.8 MLST	5
1.5.9 SlpA-ST	5
1.6 实验检测方法	6
1.6.1 细菌厌氧培养	6
1.6.2 细胞培养毒素中和试验	6
1.6.3 酶免疫法检测毒素	6
1.6.4 ELISA 法检测谷氨酸脱氢酶	6
1.6.5 PCR 检测毒素基因	6
1.7 治疗	6
1.7.1 抗菌治疗	6
1.7.2 免疫治疗	7
1.7.3 菌群调节治疗	7
1.8 预防	7
第二章 材料和方法	9
2.1 材料	9
2.1.1 仪器	9



2.1.2	试剂	9
2.1.3	标本	9
2.1.4	临床资料	9
2.2	方法	9
2.2.1	艰难梭菌拉氧头孢诺氟沙星 (CDMN) 选择培养基配制	9
2.2.2	标本前处理	10
2.2.3	分离培养	10
2.2.4	菌株鉴定	10
2.2.5	菌株保存与复苏	11
2.2.6	细菌 DNA 抽提	11
2.2.7	毒素基因检测及核糖体分型	11
第三章	结果	13
3.1	艰难梭菌感染率	13
3.2	毒素基因检测	13
3.3	核糖体分型	14
第四章	讨论	15
第五章	结论	17
	参考文献	18
	致谢	21
	综述	22
	译文及原文	32

第一章 绪论

1.1 引言

艰难梭菌(*Clostridium difficile*)是一种专性厌氧的革兰阳性芽孢杆菌,广泛分布于自然界及人和动物的粪便中。其芽孢抵抗力较强,对一般消毒剂不敏感,可在外界环境中存活数周至数月。艰难梭菌本是人体肠道的正常菌群,但当患者出现由于各种原因导致的肠道菌群失调后,可引起艰难梭菌感染(*Clostridium difficile* infection, CDI)的相关疾病,包括腹泻、伪膜性肠炎、中毒性巨结肠等。自1977年起认识到艰难梭菌与抗生素相关性腹泻有关以来,艰难梭菌一直是引发院内获得性腹泻的主要病原体之一。随着广谱抗生素的大量使用,全球范围内艰难梭菌相关性腹泻(*Clostridium difficile*-associated diarrhea, CDAD)的发生率不断增高,逐渐引起临床医务工作者的关注和重视。而各地暴发流行株的出现,也把关于CDI流行病学的研究提到了突出位置。

1.2 发病机制

艰难梭菌是一种机会致病菌,属于人类肠道的正常菌群,正常1岁以内的婴儿带菌率为15%~70%,健康成人则低于3%。人体肠道内的菌群主要为厌氧杆菌、需氧的阴性杆菌及少量阳性球菌和真菌,当长期使用抗生素(尤其是广谱抗生素)后,破坏了肠道的微生态平衡,导致正常菌群大量减少,而耐药的艰难梭菌过度生长并释放毒素而致病^[1]。艰难梭菌感染后,分泌的肠毒素与肠上皮细胞结合并激活下游信号通路,导致炎症细胞的聚集和大量炎性介质的释放,这一系列事件的发生将最终引起肠道的水肿和坏死,患者主要表现为腹痛和腹泻^[2]。

与CDAD发病有关的毒素是毒素A、B及二元毒素。毒素A是一种308kDa的肠毒素,对白细胞有趋化作用,可引起显著肠道炎症、液体分泌和黏膜损伤,使肠壁出现渗出、出血及坏死,也有一定的细胞毒性作用,但小于毒素B;毒素A羧基末端还包含一Gal α -3Gal β 1-4GlcNAc糖类受体结合区,可能与毒素与肠道的结合有关。毒素B是一种270kDa的细胞毒素,可刺激单核细胞释放炎性细胞因子,对哺乳动物细胞产生细胞毒性作用,直接破坏肠壁细胞导致伪膜形成,毒素B对肠道的损伤作用是毒素A的10倍^[1,3]。毒素A启动细胞损伤后,毒素B即可侵入肠黏膜,引起细胞病变,破坏细胞骨架,导致一系列感染相关的临床表现。毒素A和B分别由*tcdA*和*tcdB*基因编码。此外,艰难梭菌致病性决定区(Pathogenicity Locus, PaLoc)尚存在负向调节基因*tcdC*、正向调节基因*tcdD*以及膜孔蛋白基因*tcdE*。*tcdC*基因的多态性或部分碱基缺失可导致毒素A、B产生增加。近年来在某些变异菌株中还检测到另一种二元毒素(binary toxin),由位于致病性决定区外2个不同位置的染色体基因*cdtA*和*cdtB*编码。*cdtA*基因可阻断肌动蛋白片段的合成而诱导细胞死亡,*cdtB*基因介导毒素与细胞结合并进入细胞^[4]。艰难梭菌的相关毒素基因见图1。

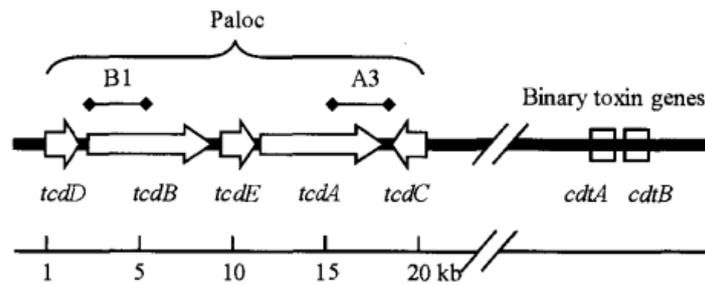


图 1 艰难梭菌致病性决定区的主要基因及二元毒素相关基因

另外，艰难梭菌的表面蛋白及其特异性血清抗体反应在 CDAD 的发病中起重要作用。病原体黏附是黏膜感染的关键早期步骤，由表面蛋白所介导。已被鉴别出的艰难梭菌表面蛋白有细菌表面配体（包括：鞭毛 cap 蛋白 FliD、鞭毛蛋白 FliC、细胞壁蛋白 Cwp66）和蛋白酶 Cwp84 两种^[3]。研究发现艰难梭菌感染者血清中产生了上述表面蛋白的特异性抗体，证实在艰难梭菌的致病过程中有这些表面蛋白的表达^[5]。

1.3 临床表现

CDAD 主要在医疗系统中传播，是医院感染性腹泻的主要病因。患者的临床表现多样，多为轻至中度水样腹泻，重症者出现威胁生命的中毒性巨结肠和败血症，约 1%~5% 的患者需结肠切除、重症监护甚至导致死亡^[4]。常见的症状包括腹痛、腹泻、发热、厌食、恶心和疲乏等。实验室检查伴有白细胞增高、C-反应蛋白增高和清蛋白降低^[6]。艰难梭菌感染后可从轻微腹泻发展至伪膜性肠炎，症状发生发展需 5 到 10 天，而抗生素使用不当可使症状持续 10 周。患者表现为突发性腹泻，粪便有恶臭气味，可见黏液。部分急性伪膜性肠炎患者可不出现腹泻，但有腹痛、发热的表现，最终导致电解质紊乱、低蛋白血症和麻痹性肠梗阻^[7]。感染如不及时根治，相关症状可反复出现，因此确诊腹泻是否由 CDI 引起对于采取针对性治疗措施相当重要。

1.4 流行状况

1.4.1 发病率

艰难梭菌现已被公认为发达国家最重要的院内感染病原体之一。2001 年以来，艰难梭菌感染在欧美各国广泛流行。一项加拿大魁北克地区的前瞻性临床研究显示，2004 年常规住院患者的 CDAD 平均发病率是 22.5/1000，为 1997 年的四倍^[8]。在美国，艰难梭菌的感染率逐年稳步上升，非暴发时期医疗机构内感染率在 0-15%，而感染暴发时期将会升至 16-20%^[9]。2008 年抽取欧洲 34 个国家 106 所医院进行 CDI 流行病学调查研究后发现，虽然欧洲各国 CDI 流行情况不一致，但总体呈增长趋势是比较肯定的(0.0~36.3，平均 4.1/10000 病人日)^[10]。

即使在报道较少的亚洲国家，艰难梭菌感染也有迅速上升势头。新加坡 CDI 的发病率从 2001 年的 1.49/万升至 2006 年的 6.64/万^[11]，韩国的 CDI 病例数也在逐年增加^[12]。而在中国，由于缺乏大规模的研究，使得国内 CDI 的发病率还未知，但近年来仅有的一些研究表明，国内住院患者艰难梭菌的感染率可能低于西方国家。上海华山医院开展了一项为期一年（2007-2008）的研究，对 587 份疑似艰难梭菌感染的粪便标本进行细菌培养，其中 74 例（12.6%）为阳性^[2]。

鉴于研究对象的地域差异性较大,各地报道的 CDI 发病率均不一致,但总的来说,据加拿大医院感染监测中心估计,世界范围内的成人 CDI 发病率呈增加趋势(4.6/1000 个入院患者,或者 65/10 万病人日)^[13]。

1.4.2 严重程度、复发率和致死率

艰难梭菌感染后临床表现的疾病谱呈现多样化,从无症状带菌、腹泻、伪膜性肠炎,到严重的中毒性巨结肠、休克、死亡都有可能。目前中国医疗系统中还没有针对 CDI 严重程度的明确界定^[2],国外也没有普遍接受的疾病严重性分级系统,而建立一个标准化的 CDI 疾病分级系统将对交叉研究间的比较和疾病预后判断有着积极作用^[14]。

文献荟萃分析表明,CDI 的复发比例约为 15-20%^[15]。有研究中对复发的定义是:在前次腹泻发作缓解且停止使用抗生素后 7-30 天内,患者再次出现感染症状且细菌培养阳性。该研究 56 名被确诊艰难梭菌感染的患者里有 5 个复发案例(8.9%),且复发分离到的菌株与各自首发的分离株具有相同的毒素特点和 PCR 核糖体型别^[16]。CDI 复发的原因可能与一体多病、机体免疫应答的缺陷、防御功能的改变和宿主遗传学因素等有关^[17]。一些研究显示,老年、有严重基础疾病的患者,其 CDI 复发率更高^[15]。

CDI 发展成伪膜性肠炎后,CDAD 的致死率是 6-30%^[18]。英国卫生部的监测表明,CDI 的死亡率可能与年龄增加有关,小于 45 岁的患者 CDI 总死亡率是 0.2/100 万,而大于 84 岁的人群 CDI 总死亡率达 2055/100 万^[19]。另有研究推测,高毒力菌株的出现、低蛋白血症、医疗机构的长期停留、免疫抑制、化学治疗等均可能与 CDI 疾病严重程度及其相关死亡率增加有关^[15]。另外,CDI 复发患者可能有更高的死亡率,但该问题尚需进一步研究证实。

1.4.3 感染类型

艰难梭菌的感染类型包括医院获得性感染和社区相关性感染两大类。长久以来,人们普遍认为 CDI 流行于医疗系统中,这可能与住院患者自身的高度易感性以及持续暴露于医院环境、使用抗生素等因素有关。尽管如此,越来越多的证据表明社区相关性艰难梭菌感染(CA-CDI)率呈逐渐增加趋势,包括一些以前认为处于低风险的人群也越来越受到重视。

目前,对医院获得性 CDI 和社区相关性 CDI 的界定尚缺乏统一标准。集中的问题是:病原菌究竟是在医院环境中获得的,还是作为一种肠道微生态菌群在患者入院时已经携带,只是在住院期间发展成致病菌,这是研究者们始终难以解答的。现在比较公认的划分标准是采用分组方法^[15]:发病前 12 周内未曾住院的归为社区相关性艰难梭菌感染(CA-CDI);入院后 48h 至出院后 4 周内发病归为医院获得性 CDI;若患者出院后 4~12 周发病,则归为不确定感染。

1.4.4 传播途径

在医院环境中,艰难梭菌可存在于地面和医疗器械等容易造成交叉污染的地方,接触传播是主要途径,尤其要引起注意的是通过医务人员的手进行院内的广泛传播^[2]。另有证据显示艰难梭菌的芽孢可通过气溶胶播散^[20],或许空气也是院内 CDI 的传播媒介。

在社区环境中,与家庭内腹泻成员的接触或不慎摄入污染的食物是造成 CA-CDI 的主要原因^[14]。由于婴儿的带菌率高,与婴儿的频繁接触是发生社区获得性 CDAD 的高危因素^[21]。某些动物,包括猪、马、狗、猫、鸽等,亦携带艰难梭菌,且艰难梭菌与这些动物的肠道疾病也有关联,所以动物可能是病原菌的宿主^[22]。若动物确实是 CDI 的传染源之一,则食物将成为疾病的一种重要传播媒介^[23]。

1.4.5 危险因素

概括地说, CDI 的危险因素大致包括三方面: 宿主因素、频繁暴露于高危环境以及破坏肠道正常微生物群的因素^[9]。宿主因素为老年、女性、免疫抑制、有基础疾病或伴随疾病等。频繁暴露于高危环境指的是长期停留在医疗系统中或者与已被感染的室友家人、手中携带病原的医务人员有密切的接触。而破坏肠道正常微生物群的因素包括近期使用抗生素、长期运用制酸药(尤其是质子泵抑制剂) 以及其它影响胃肠道微生态稳定的医疗行为等。其实, 单一的危险因素或许不足以诱发疾病, 但以上多项危险因素往往密切相关、互相影响, 又常集中出现在同一住院病人身上, 如此看来, CDI 多发于住院病人也就不难解释了。不仅如此, 艰难梭菌在高危病人中的感染更加普遍, 比如 ICU、老年、肿瘤化疗、外科手术、干细胞移植、小儿科患者等^[2]。

除此之外, 近年来还陆续发现了一些其它的危险因素, 如: 长期使用抗肿瘤药物; 近期内有胃肠道手术史; 使用饲管喂养或给药; 长期通便灌肠、使用促胃肠蠕动及粪便软化药; 8 周内曾到外地旅游者; 与近期住过院患者有接触等^[15]。早期发现和鉴别 CDI 高危因素, 有利于优化治疗方案和改善预后。

1.4.6 高毒力株与暴发菌株

与艰难梭菌高致病性有关的暴发株, 报道最多的是 BI/NAP1/027 型, 该菌株最初在加拿大出现暴发流行, 近些年来已有全球性播散趋势, 在欧美广泛发现, 亚洲亦有零星报道, 但在我国尚未见诸报端^[15]。这种非典型菌株于 1984 年首次分离时, 在人群中还十分罕见, 且对喹诺酮敏感^[24]。但随着喹诺酮类抗生素的广泛使用, 近年来高毒性的 BI/NAP1/027 型艰难梭菌株已对喹诺酮类产生耐药^[25], 成为临床治疗的难题。

通常情况下, 艰难梭菌的 *tcdA* 和 *tcdB* 毒素基因受 *tcdC* 基因的负调控。而 BI/NAP1/027 型菌株的 *tcdC* 基因存在突变, 导致毒素的产生难以抑制和调节, 因此, 较之普通菌株, 它能产生的 A 毒素水平为 16 倍, B 毒素水平为 23 倍^[24]。由于具有更高的毒力, 故该型菌株感染后疾病的严重性显著增加, 致死率将高达 65%^[26]。BI/NAP1/027 型菌株还能产生二元毒素(由 *cdtA*、*cdtB* 基因编码), 属毒素型别 III 型(toxinotype III)。关于该毒素的作用尚存在争议, 但它被认为在引发严重疾病时有辅助作用^[25]。

2005 年, 艰难梭菌 078 型/毒素型别 V 型在荷兰出现。078 型主要侵害年轻人, 更多属于社区获得性 CDI^[22]。艰难梭菌 078 型和 BI/NAP1/027 型有类似的毒素, 其 *tcdC* 基因有 39bp 的缺失, 并含第 184 位点突变, 导致终止密码子提前产生。此外, 人类和动物间艰难梭菌 078 型的基因序列高度一致^[27], 表明该型艰难梭菌在人和动物之间可能不存在种族差异, 为其传播创造了有利条件。

近年来, 许多学者开始关注 A-B+型艰难梭菌菌株, 有报道称, 这些菌株也能造成严重疾病并引起暴发流行。A-B+型菌株在加拿大、韩国、中国上海的流行率分别为 3%、21.4%和 23.2%^[22], 且在亚洲的流行率明显高于世界其它地区。对在英国、比利时和美国分离到的 A-B+型艰难梭菌菌株进行分型比较, 发现它们具有同源性^[28]。

1.5 分子分型技术

分子分型技术是基于菌株间 DNA 的不同而应用于细菌鉴定、耐药基因的检测以及流行病学等方面研究的技术。在艰难梭菌感染的暴发或流行中, 利用现代分子分型技术, 可对其进行流行病溯源研究和进化分析。上文提及的 BI/NAP1/027 型暴发株, 即: restriction endonuclease

analysis(REA) type BI, North American pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) type 1, PCR ribotype 027, 就是采用 3 种方法对同种菌株进行分型的结果。

艰难梭菌的分子分型技术主要分为三类^[26]：①基于限制性酶切片电泳的技术，包括脉冲场凝胶电泳 (PFGE)、限制性核酸内切酶分析 (REA)、毒素基因分型 (Toxinotyping) 等；②基于 PCR 扩增的技术，包括核糖体分型 (PCR-ribotyping)、随机扩增多态性 DNA 分析 (RAPD) 又称任意引物 PCR (AP-PCR)、多位点可变数目串联重复序列分析 (MLVA)、扩增片段长度多态性分析 (AFLP) 等；③基于序列分析的技术，包括多位点序列分析 (MLST)、表层蛋白 A 基因序列分型 (SlpA-ST) 等。

1.5.1 PFGE 将细菌包埋后裂解释放出的 DNA 采用内切酶酶切，不同细菌产生不同大小和数目的酶切片段，经脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分离形成不同带型，采用软件 (Bionumerics) 对这些指纹图谱进行分析，从而研究其流行病学的特点。

1.5.2 REA 选择合适的核酸内切酶对细菌基因组 DNA 进行酶切，然后用琼脂糖电泳分离，依据产生的不同带型对细菌进行分型。通常采用 HindIII 作为内切酶，菌株间的条带差异在 6 个以下归为一个群。

1.5.3 Toxinotyping 是一种基于编码 A、B 毒素基因的改变对艰难梭菌进行毒素分型的技术。将致病位点 PaLoc 基因划分为 10 个互相叠加的片段，设计引物分别扩增后用凝胶电泳分离这些片段，继而将片段用不同酶进行酶切，结合片段长度多态性和酶切位点多态性可将细菌分为不同的毒素型别。

1.5.4 PCR-ribotyping 基于 16S~23S rDNA 基因间区(IGS)的扩增进行分型。由于艰难梭菌染色体内存在若干个拷贝的核糖体操纵子，而该拷贝数在不同的基因间区不相等，故扩增出的不同带型可作为分型依据。核糖体分型广泛应用于艰难梭菌暴发的研究。

1.5.5 RAPD/ AP-PCR 用适当选择的一系列人工随机合成的寡聚核苷酸单链为引物，以所研究的基因组 DNA 为模版进行扩增，从而获得基因组指纹图谱。

1.5.6 MLVA 通过软件寻找基因的可变数目串联重复序列 (VNTR)，并设计相应的引物对其扩增后判定其串联重复序列可变重复数目，从而形成一定的数组。不同细菌对应不同数组，进而得以区分。每个 VNTR 由重复单位和重复拷贝的数目确定，此方法充分利用了重复单位的序列长度变化和拷贝数的不同产生的多样性，是迄今分辨能力最高的方法。

1.5.7 AFLP 细菌基因组 DNA 由 2 种限制性内切酶消化后产生粘性末端，在特异性双链寡核苷酸接头的作用下连接形成模版 DNA，再对此经修饰的片段进行 PCR 扩增和电泳分析，即得到 AFLP 图谱。

1.5.8 MLST 是基于对多个管家基因序列的分析来对细菌进行分型的方法。选取艰难梭菌的 7 个管家基因扩增并测序，分析这些基因中 400-600bp 的片段，对每个基因位点上的不同序列指派一个不同的等位基因数值，从而生成等位基因图谱用于菌株鉴定。每个等位基因图谱即为一个序列型 (ST)。

1.5.9 SlpA-ST 是基于表层蛋白 A 编码基因可变区域序列多态性的分型方法。根据可变区域序列设计引物扩增得到长约 1kb 的片段，经限制性酶消化后，片段通过测序分析其基因或电泳分析其带型，将不同细菌区分开。

现今用于艰难梭菌分子分型的方法多样化，且各种方法都存在其优势和不足，如：PFGE 和核糖体分型虽具有较好的分辨力和分型能力，但前者实验周期长、DNA 易降解，后者实验方法

难以标准化, 室间实验数据也不方便比较。MLST 操作容易, 重复性高, 实验周期短, 但分型能力较差, 且测序费用较高。很多情况下, 单用某种分型方法不能达到理想的研究目的, 可将多种分型方法同时应用, 以期获得更全面的信息。

1.6 实验检测方法

1.6.1 细菌厌氧培养 艰难梭菌的厌氧培养灵敏度较高, 在环丝氨酸-头孢西丁-果糖-卵黄琼脂 (CCFA) 培养基上形成粗糙型黄色菌落, 脂酶、卵磷脂酶为阴性^[29]。但该方法耗时较长, 且培养阳性不能确定其是否产生毒素。

1.6.2 细胞培养毒素中和试验 该方法一度被认为是临床诊断 CDAD 的金标准^[30]。粪便离心沉淀, 上清液过滤除菌后加入细胞培养液。若为产毒株, 通过细胞培养会产生细胞病变效应, 且可以被特异性抗毒素所中和。细胞毒试验的灵敏度和特异性分别为 93% 和 89%^[31]。但由于细胞培养时间长、对设备要求高, 使其应用受到一定限制, 无法大范围推广。

1.6.3 酶免疫法检测毒素 许多实验室采用酶免疫法 (EIA) 来检测艰难梭菌毒素, 若 EIA 法得到连续两次阴性结果, 基本足以排除 CDAD 的可能^[31]。毒素 A 羧基端包含可被单克隆抗体 PCG-4 识别的抗原决定簇, 许多厂商据此研制商品化 ELISA 试剂盒, 用于艰难梭菌毒素 A 的特异性检测^[32]。

1.6.4 ELISA 法检测谷氨酸脱氢酶 这是一种确定粪便标本中艰难梭菌存在与否的简便、快速的方法。谷氨酸脱氢酶 (GDH) 是艰难梭菌的共同抗原, 但和细菌培养相似, 检测 GDH 不能确定菌株是否产毒素。据此, Ticehurst 等^[33]采用两步法检测艰难梭菌, 弥补了上述缺点。第一步先用快速法筛选艰难梭菌 GDH 抗原, 然后第二步对 GDH 阳性者做细胞毒试验或 EIA 检测毒素用于确证。两步法的灵敏度达 98%, 特异性为 89%。

1.6.5 PCR 检测毒素基因 分子诊断技术为 CDI 的快速诊断提供了越来越重要的工具。与金标准细胞毒试验相比, 基因诊断试剂盒具有灵敏度极高、特异性稍低的特点。采用 PCR 法检测能在收到标本当天出报告, 但同时也面临着成本预算过高、从粪便中抽提分离 DNA 困难等问题。采用 Real-time PCR 方法可直接在无症状携带者和有症状患者的粪便中检测 *tcdB* 基因^[34]。

综上所述, 每种检测方法各有其利弊。细菌厌氧培养和细胞培养毒素中和试验虽是直观而传统的经典方法, 但其检测时间长, 后者对技术要求也较高, 故不适于广泛投入临床应用。免疫和分子生物学方法的优点是省时且操作简便, 但成本较高, 特异性稍差些。目前尚无最佳的单一检测方法, 满足既有高灵敏度和特异性, 又经济、快速、有效。较优化的方案是把多种方法联合应用以取长补短, 特别是将 EIA 和 PCR 联用来代替细胞毒试验, 在保证灵敏度和特异性高的同时, 也具有相对较短的周转时间 (turn around time)。

1.7 治疗

随着艰难梭菌高毒力株、耐药株的相继出现和流行, CDI 的严重程度和复发率越来越高, 无疑给疾病的治疗提出了更高的要求。治疗原则是先停用腹泻相关抗生素, 给予液体和补充电解质等支持治疗, 然后视情况采取针对性措施。总体而言, 恢复肠道正常菌群是治疗 CDAD 的关键。

1.7.1 抗菌治疗

尽管万古霉素是唯一被美国 FDA 批准治疗 CDAD 的药物^[17], 许多权威专家建议仅在遇到严

重危及生命的病例或甲硝唑治疗无效时再用万古霉素。20 世纪 90 年代后期, 为避免由于万古霉素的频繁使用导致耐万古霉素肠球菌(VRE)的出现, 美国 CDC 推荐采用甲硝唑作为治疗 CDAD 的标准方法, 口服万古霉素不作为 CDAD 治疗的首选药物^[4]。研究表明, 对于轻型 CDAD, 万古霉素和甲硝唑的疗效相同; 但对于重型 CDAD, 万古霉素疗效更优^[35]。近年来, 甲硝唑治疗 CDAD 的有效性有所下降, 主要问题与它的药代动力学有关^[36]。严重的 CDAD 推荐用万古霉素治疗, 但仍有一定的复发率(11-19%)^[9]。此外, 甲硝唑与万古霉素对高毒力株 NAP1 型的疗效相仿^[17]。

除去上述两种经典药物, 针对 CDAD 的其它抗菌药物^[6]有: 聚苯乙烯吸附剂(Tolevamer)、硝唑尼特、雷莫拉宁、利福昔明等。另有报道国内使用中医疗法亦取得成效^[2]。2011 年 5 月 27 日, 美国 FDA 发布公告, 批准非达霉素(Fidaxomicin)口服片剂用于治疗 CDAD (<http://www.fda.gov>)。

1.7.2 免疫治疗

所谓免疫治疗, 就是使用免疫球蛋白或者针对艰难梭菌菌体或其毒素的特异性抗体, 提高血清抗体水平来抵抗病原菌, 以达到保护机体的作用。已有学者开展大量动物实验和临床试验, 来验证免疫疗法的可行性。有报道采用静脉注射人免疫球蛋白配合基础疗法治疗重症 CDAD 病例获得成功^[6]。已发现单克隆抗体 MDX-066 和 MDX-1388, 分别具有直接抵抗毒素 A 和毒素 B 的作用, 临床试验验证了其辅助标准抗菌疗法对预防 CDI 复发的价值^[37]。

除了利用外源性抗体对人体进行被动免疫, 为预防 CDI 的发生, 还可以通过接种疫苗采取主动免疫方法诱导机体产生对菌体成分或毒素的中和抗体, 但疫苗从研制成功到真正投入使用之前还有待充分的实验对其安全性和有效性做出评估。

1.7.3 菌群调节治疗

多数 CDAD 是肠道菌群失调的结果, 因此微生态制剂在 CDAD 的治疗方面有较大应用前景。肠道益生菌, 如: *boulardii* 酵母菌, 乳酸杆菌、双歧杆菌等, 对于调节菌群紊乱、恢复肠道正常微生态环境起着积极作用。有随机对照试验用抗生素和益生菌结合治疗 CDI, 发现使用益生菌后 CDI 的风险明显降低^[9]。最近英国一则报道称, 一种含有干酪乳杆菌、保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌的特殊酸奶饮品可以减低 50 岁以上使用抗生素患者 CDI 的发病风险^[38]。所以, 诸如地衣芽孢杆菌活菌剂、双歧三联活菌剂等益生菌活菌制剂也许对治愈感染有一定帮助。另一种恢复肠道菌群的方法是用正常人的粪便行灌肠术, 以改善肠道微生态环境。

如今, 治疗 CDI 的方法不断扩充, 除了两种经典抗生素以外, 还有许多其它的选择。但由于患者之间存在个体差异, 临床医生在治疗时仍需根据实际情况挑选合适的方案。特别是暴发性重症 CDAD 患者可给予口服万古霉素及静脉注射甲硝唑联合治疗, 必要时采取结肠切除手术^[1]。复发患者的治疗可采用抗生素结合免疫球蛋白或微生态制剂。

1.8 预防

预防 CDI 的关键是要及时阻断粪-口传播途径和减少危险因素。艰难梭菌院内感染的两大高危因素是接触病原菌和使用抗生素^[28]。因此, 对 CDAD 患者应单独隔离并配备独立的便池; 医务人员进入病房应戴手套、穿防护服, 接触病患后必须用肥皂和流水洗手; 还要经常使用含氯消毒剂对医院环境和医疗器械进行严格消毒, 保持医院环境清洁, 防止交叉污染^[4,6]。预防 CDI 的

另一方面重要措施是严格限制抗生素的使用,这需要建立规范化的抗生素使用管理制度来指导临床医生的合理用药。对于社区相关性 CDI,预防的要点在于避免与带菌者的接触和污染性食物的摄入。另外,接种疫苗诱导机体的主动免疫也是一条预防 CDI 的新思路。

如今,对医务人员普及 CDI 相关知识,积极开展对 CDI 的检测方法、治疗方案、预防措施以及流行病学的探讨和研究,是亟待解决的重要课题。在院内感染逐渐普遍的今天,艰难梭菌作为一种医院获得性腹泻的常见病原体,理应引起临床工作者的重视和关注。

第二章 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 仪器

GNP-9270 型隔水式恒温培养箱、高压锅、Polystyrene CC 水浴箱、Shangping MD100-2 电子天平、XW-80A 旋涡振荡器、Beckman GS-15R 离心机、PTC-100™ Thermal Cycler PCR 扩增仪、BIO-RAD PowerPac 1000 电泳仪、Tanon-4100 数码凝胶图像分析系统等

2.1.2 试剂

CDMN 培养基基质及添加试剂 (OXOID)、艰难梭菌乳胶凝集试剂盒 (*C. difficile* test kit, for the detection of *C. difficile* antigen, OXOID)、无水乙醇、PBS (pH7.2)、0.05M NaOH、Tris-HCl (pH7.0)、TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)、PrimeSTAR HS DNA Polymerase 及配套 PCR 反应试剂 (TaKaRa)、Ex Taq 酶及配套 PCR 反应试剂 (TaKaRa)、琼脂糖、TAE 缓冲液等

2.1.3 标本

瑞金医院住院腹泻患者的粪便标本来源于瑞金医院检验科临检组。选取性状为烂糊状、稀薄、水样、粘液状的粪便标本用于艰难梭菌的分离培养。

2.1.4 临床资料

本研究 44 例 CDI 患者中，男性 25 例，女性 19 例；大于 35 岁的有 40 例 (91%)，其中大于 60 岁的为 18 例 (41%)；患者来自 11 个不同病区，以消化科 (34%)、感染科 (18%)、血液科 (14%) 为主，其余散在分布于其它病区。

对 44 例 CDI 患者的临床诊断中，23% 患有肿瘤，20% 患有肝炎或肝硬化；34 例患者在住院期间有使用过抗生素的记录，占 77%，且多为广谱抗生素，如头孢菌素、喹诺酮类等。

2.2 方法

2.2.1 艰难梭菌拉氧头孢诺氟沙星 (*Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin, CDMN) 选择培养基配制

称取 34.5g *Clostridium difficile* Agar Base，加热溶解于 500mL 蒸馏水，121℃ 高压灭菌 15 分钟；待冷却至 50℃ 左右时，按无菌操作，加 1 瓶 CDMN Selective Supplement (粉剂需预先加 2mL ddH₂O 溶解)；将约 50mL 蛋清与生理盐水等体积混匀，再加入上述基质液中；充分摇匀后，浇制平板。待冷却凝固后，平板用 parafilm 膜封口，4℃ 保存。

2.2.2 标本前处理

将液状稀便标本与无水乙醇按 1:1 的比例混合(半成形糊状便挑取 3-5g 与 0.5mL 无水乙醇混合), 用旋涡振荡器充分混匀, 在室温下静置 1 小时。

2.2.3 分离培养

用无菌棉签蘸取上述处理后的粪便标本上清液, 密涂法接种于平衡至室温的 CDMN 培养基; 将平板放入厌氧袋中, 同时加入气体发生袋和指示条, 用塑料棒封紧厌氧袋口, 37°C 培养 2 天。艰难梭菌的菌落呈不透明灰白色, 粗糙, 微隆起, 形状不规则, 边缘不整齐, 有特殊气味。

2.2.4 菌株鉴定

2.2.4.1 革兰染色镜检

艰难梭菌镜下形态为革兰阳性的粗长杆菌, 有时可见芽孢, 培养 2 天或转种后染色性可变为革兰阴性。

2.2.4.2 耐氧试验

挑取 CDMN 平板上的单个菌落, 同时分区划线接种于两块血平板上, 分别置于需氧、厌氧环境 37°C 培养 1 天。艰难梭菌为专性厌氧菌, 仅在厌氧血平板上生长, 在需氧血平板上不生长。此方法兼有菌株转种分纯的作用。

2.2.4.3 凝集试验

用艰难梭菌乳胶凝集试剂盒 (*C. difficile* test kit, for the detection of *C. difficile* antigen, OXOID), 严格按照操作说明书检测。每次实验时同时作阴、阳性对照, 阳性菌株显示细颗粒状凝集。

本课题中艰难梭菌的鉴定程序如图 2 所示。



图 2 艰难梭菌鉴定程序

2.2.5 菌株保存与复苏

依照鉴定程序判断为阳性的菌株-80℃冷冻保存于专用 cryobank tubes(Mast Diagnostics)待用，操作方法参考厂商提供的说明书。

菌株复苏时，取出 cryobank tubes 置于冰上，用镊子按无菌操作从管中夹出 2-3 颗玻璃珠，在新鲜血平板上轻轻滚动，然后弃去玻璃珠，将平板放入 37℃孵箱，厌氧培养 1-2 天。复苏出的菌株再转种一次，用于后续细菌 DNA 抽提。

2.2.6 细菌 DNA 抽提

挑取平板培养出的细菌，用 PBS 配制浓度约为 1×10^8 CFU/mL 的菌液，取 200 μ L 上述 PBS 溶解的菌液，加 800 μ L 0.05M 的氢氧化钠，轻轻颠倒混匀；60℃水浴 45 分钟；加 240 μ L 1M Tris-HCl (pH7.0)，轻轻颠倒混匀，静置 1 分钟；13000rpm 离心 10 分钟，取上清即可。使用分光光度计在 260nm 波长处检测 DNA 含量。抽提得到的 DNA 于-20℃保存待用。

2.2.7 毒素基因检测及核糖体分型

2.2.7.1 引物设计与合成

本课题中用到的 3 对引物如表 1 所示。毒素 A 基因(*tcdA*)的扩增选用引物 NKV011 和 NK9，毒素 B 基因(*tcdB*)的扩增选用引物 NK104 和 NK105；核糖体分型根据细菌基因组 16S rDNA 3'端和 23S rDNA 5'端的高度保守区设计引物，对 16S~23S rDNA 间区(IGS)序列进行扩增。

引物均由英潍捷基（上海）贸易有限公司合成。

表 1 毒素基因检测和核糖体分型的引物序列

引物名称	序列 (5'-3')	基因
NKV011	TTTTGATCCTATAGAATCTAACTTAGTAAC	<i>tcdA</i>
NK9	CCACCAGCTGCAGCCATA	
NK104	GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC	<i>tcdB</i>
NK105	CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT	
16S	GTGCGGCTGGATCACCTCCT	intergenic spacer
23S	CCCTGCACCCTTAATAACTTGACC	

2.2.7.2 PCR 扩增体系及条件

详见表 2。

表 2 毒素基因检测和核糖体分型的 PCR 扩增体系及条件

	<i>tcdA</i>		<i>tcdB</i>		ribotyping	
反应体系	DNA	2μL	DNA	2μL	DNA	5μL
	5×PS Buffer	10μL	10×Ex Taq Buffer	5μL	10×Ex Taq Buffer	5μL
	dNTPs	4μL	dNTPs	4μL	dNTPs	4μL
	P1	0.5μL	P1	0.5μL	P1	5μL
	P2	0.5μL	P2	0.5μL	P2	5μL
	PrimeSTAR	0.5μL	Ex Taq	0.5μL	Ex Taq	0.5μL
	ddH ₂ O	32.5μL	ddH ₂ O	37.5μL	ddH ₂ O	25.5μL
	总体积	50μL	总体积	50μL	总体积	50μL
反应条件	95°C 20s, 60°C 2min, 反应 35 个循环		95°C 20s, 55°C 2min, 反应 35 个循环		预变性 94°C 5min; 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1min, 反应 30 个循环; 后 延伸 72°C 5min	

注：模版 DNA 浓度约为 100-150ng/μL；反应 Buffer 中均含有 Mg²⁺；dNTPs 在 50μL 中的终浓度为 200μM；引物粉剂事先用 TE 溶解，配成浓度 20μM 待用；PrimeSTAR HS DNA Polymerase 浓度 2.5U/μL，Ex Taq 浓度 5U/μL。

2.2.7.3 电泳条件

PCR 扩增产物采用琼脂糖电泳观察结果，电泳条件详见表 3。电泳胶用琼脂糖溶于电泳缓冲液 TAE 配制。

表 3 毒素基因检测和核糖体分型的电泳条件

	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	ribotyping
电泳胶浓度	1.5%	2%	2%
电压	100V	100V	100V
电泳时间	25min	25min	60min

2.2.7.4 电泳结果成像

电泳胶中的 DNA 用溴化乙锭染色，借助 Tanon-4100 数码凝胶图像分析系统观察电泳结果并采集图像。

第三章 结果

3.1 艰难梭菌感染率

本课题集中于两个时段收集腹泻标本并分离培养艰难梭菌，详细情况见表 4。

表 4 标本总数与阳性率

标本收集时段	标本总数	阳性例数	阳性率
2010 年 12 月—2011 年 4 月	228	17	7.5%
2011 年 11 月—2012 年 2 月	311	27	8.7%
合计	539	44	8.2%

合计收得瑞金医院住院腹泻患者的粪便标本 539 份，其中阳性 44 例，阳性率占 8.2%。根据两个时段收集标本中艰难梭菌的阳性率，初步估测得 2010 年至 2012 年间瑞金医院住院腹泻患者中艰难梭菌的感染率约为 7-9%。

3.2 毒素基因检测

测得 44 株阳性菌株中，产毒株为 40 株，非产毒株为 4 株；毒素型以 A+B+型为主，为 25 株（57%），A-B+型 15 株（34%），A-B-型 4 株（9%）。毒素 A 与毒素 B 基因的扩增结果分别见图 3 和图 4。

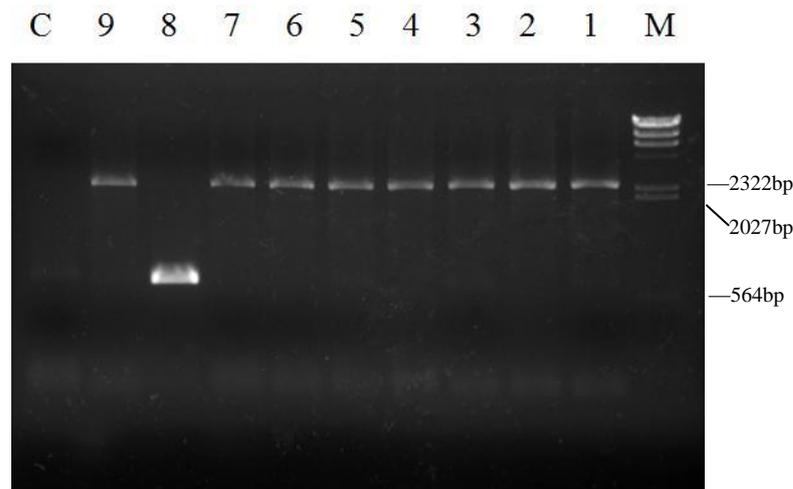


图 3 毒素 A 基因扩增产物电泳结果

如图所示，M 代表 λ -HindIII digest DNA Marker，C 代表水对照。用引物 NKV011 和 NK9 对 *tcdA* 进行扩增，阳性菌株显示 2535bp 的扩增产物，阴性菌株由于其毒素 A 基因重复区序列中有 1548bp 和 273bp 的两段缺失^[32]，故显示 714bp 的扩增产物。图中 1 至 9 号标本除 8 号为毒素 A 基因阴性，其余都为阳性。

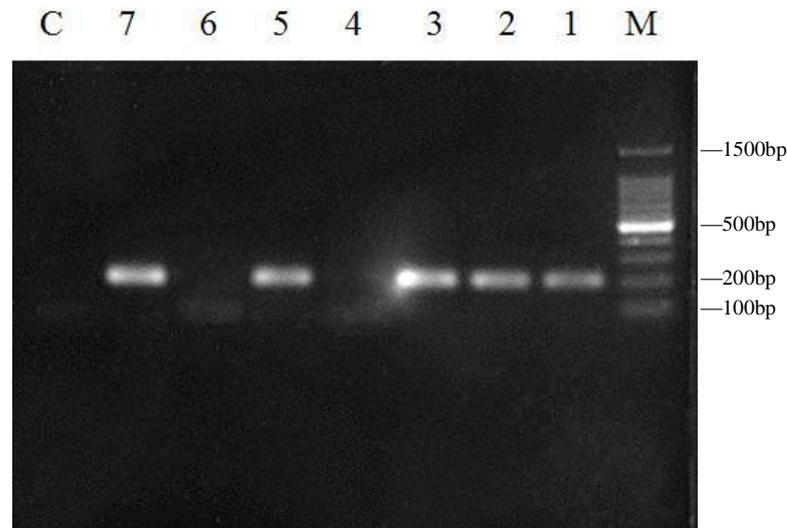


图4 毒素 B 基因扩增产物电泳结果

如图所示，M 代表 100bp DNA Ladder Marker，C 代表水对照。用引物 NK104 和 NK105 对 *tcdB* 进行扩增，阳性菌株显示 204bp 的扩增产物，阴性菌株无扩增产物。图中 1、2、3、5、7 号为毒素 B 基因阳性，4、6 号为阴性。

3.3 核糖体分型

对收集的 44 株艰难梭菌用引物 16S(5'-GTGCGGCTGGATCACCTCCT-3')和 23S(5'-CCCT-GCACCTTAATAACTTGACC-3')进行扩增，得到 18 种核糖体型别，按检测到的先后顺序依次命名为 R1~R18 型。其中，存在优势型别：R8 型 9 株 (20%)，R4 型 8 株 (18%)。查阅临床资料，发现同型菌株的病区分布无明显集中性，而同一病区亦可出现多种不同型别的艰难梭菌菌株。核糖体分型结果见图 5。

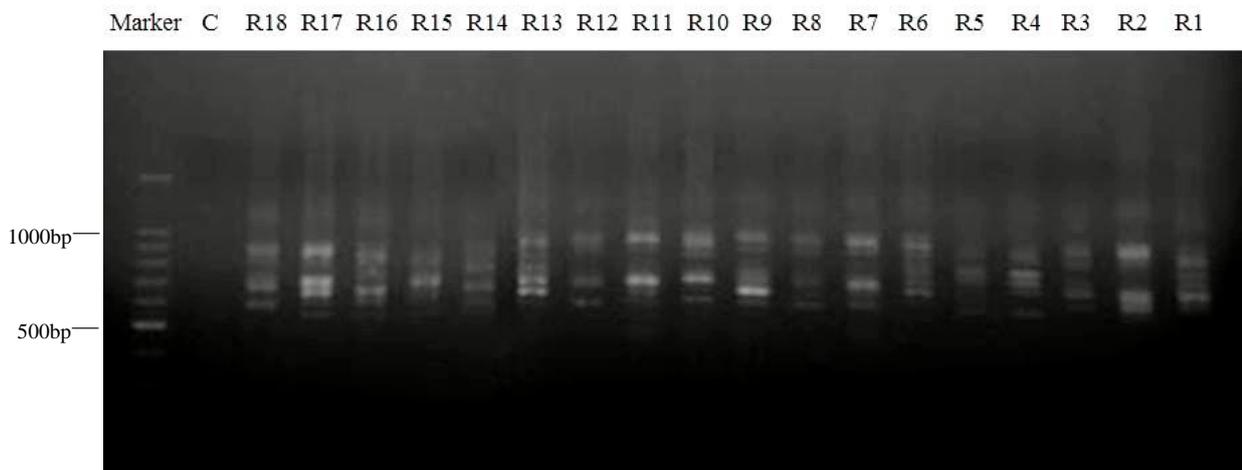


图5 艰难梭菌核糖体分型电泳结果

如图所示，Marker 为 100bp DNA Ladder Marker，C 为水对照。44 株阳性菌株共分为 18 种核糖体型别 (R1~R18 型)。

第四章 讨论

近年来, CDAD 已经受到越来越多的关注, 尤其是在北美和欧洲国家。由于发病率的提高, 疾病严重程度的不断升级, 以及复发、耐药、致死等相关问题的涌现, 给临床的诊断和治疗提出了新的挑战。与此同时, 各地相继出现 CDI 的暴发流行, 使得关于艰难梭菌的流行病学研究也成了一大热点。国内外许多学者正持续致力于相关课题的探索中。

本研究收集了住院腹泻患者的粪便标本 539 份, 其中 44 例鉴定为艰难梭菌阳性, 阳性率占 8.2%。标本主要分 2010 年 12 月至 2011 年 4 月、2011 年 11 月至 2012 年 2 月两段时期收集, 阳性率分别为 7.5%、8.7%。阳性率的升高提示院内艰难梭菌的感染率可能有增加趋势, 但也不排除因为后期倾向于选择腹泻严重的粪便标本而导致第二阶段阳性率有所增高。根据两段时期收集标本中艰难梭菌的阳性率, 初步估计 2010-2012 年间瑞金医院住院腹泻患者中艰难梭菌的感染率约为 7-9%。

有研究发现, CDI 与宿主因素、近期使用抗生素以及频繁暴露于高危环境等因素有关^[9]。本研究中的 44 例阳性患者中, 中老年患者占了绝大多数, 其中大于 35 岁的有 40 例 (91%), 大于 60 岁的为 18 例 (41%)。阳性患者来自 11 个不同病区, 集中分布于消化科 (34%)、感染科 (18%)、血液科 (14%), 其余散在分布于其它病区。此外, 大部分阳性患者具有肿瘤、肝炎、肝硬化、胰腺炎、溃疡性结肠炎等较严重的基础疾病, 或者有近期手术史, 此类患者往往自身免疫功能不佳, 或服用了一些有免疫抑制作用的抗肿瘤、抗移植后排异的药物造成抵抗力低下, 所以对病原菌有较高的易感性。许多报道都得出老年住院患者更易患 CDAD 的结论, 这是因为他们自身集合了多种危险因素, 如: 长期滞留于医疗机构、使用抗生素、一体多病、免疫力不足等。

由于艰难梭菌是抗生素相关性腹泻的主要病原体, 故近期抗生素的使用是导致 CDAD 发生的重要原因之一。44 例阳性患者中有 34 例在住院期间有使用过抗生素的记录, 占 77%, 且多为广谱抗生素, 如头孢菌素、喹诺酮类等。广谱抗生素是临床医生在病原菌未确定前的早期治疗用药, 还常用于预防外科手术的术后感染。然而, 大量使用会破坏肠道微生态环境, 抑制或杀灭许多敏感菌, 导致肠道菌群失调, 此时耐药的艰难梭菌就开始大量生长繁殖, 从正常菌群变成了致病菌。研究中阳性患者多是在入院后 1 周内分离得到艰难梭菌, 虽不能保证抗生素的使用一定始于标本采集之前, 但近期使用抗生素无疑是引发 CDAD 的高危因素。另外, 还发现本项研究中 36% 的阳性患者使用过质子泵抑制剂 (PPIs), 且主要出现在消化科。PPIs 的作用机理是通过抑制胃酸分泌达到保护胃粘膜的目的, 而胃酸作为一种胃肠道的天然屏障, 可能对艰难梭菌的芽孢有一定的抵抗能力^[14], 所以 PPIs 的使用也许是消化科病人感染艰难梭菌的危险因素之一。

尽管人群中有一定比例的艰难梭菌携带者, 但多数 CDAD 都是外源性感染^[1]。在医院内, 由于对粪便等污染物的处理措施不够完善、对环境和医疗器械的消毒不充分, 艰难梭菌常通过医务人员的手和患者间的交叉接触进行传播。当然, 暴露于这样的环境中越久, 感染的风险就越高。

虽然持续住院、年龄大于 65 岁、抗生素治疗等仍然是 CDI 的主要危险因素, 但近来关于社区起病的 CDI 严重病例的报道越来越多, 且部分社区获得性 CDI 还发生于低危人群中^[23]。这可能与接触病原菌携带者和污染食物, 甚至与到暴发流行地区旅行有关。即使在入院后才开始发病, 也不能完全排除社区获得性 CDI 的可能。

目前, 由于国内对 CDI 相关性疾病的认识和重视程度还不够, 很少有医院开展专门针对 CDI 的实验室检测项目。另一方面, 虽然报道了不少 CDI 的检测方法, 但尚缺少公认的标准化的检测流程和手段。传统的细菌厌氧培养法检测时间较长; 细胞培养毒素中和试验虽一度被奉为金标

准,但耗时且对技术要求高;ELISA法检测艰难梭菌共同抗原GDH可用于筛查,却不能用于确诊;EIA或ELISA法检测A、B毒素省时而简便,但也存在一些局限;PCR法检测毒素基因灵敏度和特异性都较高,但限于成本问题,目前还多用于科研。总之,单一的方法难以同时满足经济、快速、高效,较优化的方案是联合应用多种检测方法以取长补短。

本研究采用PCR法检测艰难梭菌毒素A、B基因,将44株阳性菌分为3种毒素型:A+B+型、A-B+型和A-B-型。PCR法直接针对毒素基因,避免了其它方法的某些不足。比如:对于A-B+型菌株,若用细胞培养法观察细胞毒现象,不能把它与A+B+型菌株区别;而用仅针对毒素A的ELISA试剂盒,又无法将其检出^[28]。虽然A+B+型菌株较常见,并有明显的临床表现,但A-B+型菌株也能造成严重疾病并引起暴发流行(绪论中已提及),且相对A+B+型具有更高的克林霉素耐药率^[22]。而感染A-B-型的患者可能多为轻型或携带者。由于*tcdA*基因中G+C的比例较低,为引物序列的选择带来一定困难,而引物中G+C的含量低会使扩增特异性下降^[39],故实验选择了高特异性酶来弥补此缺陷,得到了理想的扩增效果。

随着各地艰难梭菌感染的频繁暴发和逐渐流行,关于CDI流行病学的研究越来越多,分子分型技术作为其研究手段,也日趋多样化。常用的有:脉冲场凝胶电泳(PFGE)、限制性核酸内切酶分析(REA)、核糖体分型(PCR-ribotyping)、多位点可变数目串联重复序列分析(MLVA)、多位点序列分析(MLST)等。其中,PFGE是北美洲对艰难梭菌分型的金标准,而欧洲艰难梭菌参比实验室则以核糖体分型为标准方法。MLVA是迄今为止分辨能力最强的分型方法^[26]。

本研究选择核糖体分型法,对阳性菌株的相关性进行分析。44株艰难梭菌共分为18种核糖体型,其中,存在相对优势的型别:R8型9株(20%),R4型8株(18%)。但发现各型艰难梭菌菌株在病区分布上并无规律可循,同型菌株的病区分布无明显集中性,而同一病区亦可出现多种不同型别的菌株。无证据显示存在院内CDI的暴发流行。值得注意的是,研究中曾先后3次从同一患者体内分离到阳性菌株,但最后一型的型别却不同于前两次,提示存在复发感染异型菌株的可能。此外,核糖体型别与毒素基因并无必然联系。研究中,多数情况下A、B毒素基因在同型中均一致,但也有同型菌株毒素基因不相同的情况出现。前者或许是因为这些患者感染了同种菌株,而后者中的菌株虽可能来源相同,但推测在传播和进化过程中已发生了不同程度的变异。

核糖体分型广泛应用于院内艰难梭菌暴发的研究。若在医院环境中一定范围内发现了同型菌株有丛集式出现的现象,应高度怀疑院内感染暴发的可能,需展开深入的流行病学调查加以确认。医疗环境的交叉污染是CDI的潜在威胁之一,有研究发现了部分患者标本与其周围环境中的艰难梭菌存在相同的核糖体型别^[40],提示感染可能来自病房或医疗器械等。此外,还可从医务人员的手上采集标本进行增菌培养,观察菌株在院内的散播是否由医务人员的手作为媒介。

核糖体分型方法的分辨力和分型能力都较好,但其操作需借助于电泳的步骤,难以将实验方法标准化,同时,参考菌株不易获得进一步限制了实验室之间数据的相互比较^[26]。因此,要实现研究数据的交流和共享,还需依靠其它的分型方法。MLVA的分辨能力强,重复性较好,并能弥补核糖体分型的缺点,已成功用于很多细菌和真菌的分型研究,也是一种对艰难梭菌变异株亚型分析的新工具。研究显示,MLVA的分型结果与核糖体分型具有高度的一致性,且可以通过选择不同数量的可变数目串联重复序列(VNTR)位点进行组合,以达到所需的检测暴发株或分析同源性的目的^[41]。MLST操作简单,实验周期短,重复性高,分型结果便于比较,但分型能力差一些,且测序费用较高,有条件的实验室可选用。

近期新建立了一种基于毛细管电泳的核糖体分型,由于有网络数据库的支持,使得不同实验室间的数据交流变为可能^[26]。随着医学信息科技的发展,相信未来将会开发出带有参考菌株分型数据的软件和可供资源共享的平台,改善现今数据“不兼容”的局面。另外,由于不同型菌株间在致病性、耐药性等方面存在差异,可将分型结果结合患者的临床表现和药敏试验进行综合分析,以期得到较全面的认识和结论。

第五章 结论

1. 估测得 2010 年至 2012 年间瑞金医院住院腹泻患者中艰难梭菌的感染率约为 7-9%。
2. 患者感染艰难梭菌可能与持续暴露于医院环境、近期使用抗生素、严重的基础疾病、免疫功能低下等危险因素有关。
3. 研究中菌株毒素型以 A+B+型为主；核糖体型别分为 18 种，其中存在相对优势的型别，但无证据提示院内 CDI 的暴发流行；核糖体型别与毒素基因无必然联系。

参考文献

- [1] 胡云建. 院内感染艰难梭菌相关性腹泻[J]. 中国医学科学院学报, 2008; 30(5): 618-621.
- [2] Jin K, Wang SX, Huang ZH, *et al.* *Clostridium difficile* infections in China[J]. JBR, 2010; 24(6): 411-416.
- [3] 邱敏霞, 刘诗. 难辨梭状芽孢杆菌相关性腹泻研究进展[J]. 胃肠病学, 2008; 13(5): 309-311.
- [4] 刘杨, 王明贵. 艰难梭菌相关性腹泻研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2006; 6(4): 280-283.
- [5] Pechine S, Janoir C, Collignon A. Variability of *Clostridium difficile* surface proteins and specific serum antibody response in patients with *Clostridium difficile*-associated disease[J]. J Clin Microbiol, 2005; 43 (10): 5018-5025.
- [6] 曲芬, 汤一苇. 艰难梭菌感染的流行状况及诊治进展[J]. 传染病信息, 2010; 23(1): 8-10.
- [7] 沈秋生. 难辨梭状芽孢杆菌致伪膜性肠炎的诊治现状[J]. 抗感染药学, 2004; 1(3): 101-102.
- [8] 王飞, 贺蓓. 难辨梭状芽孢杆菌相关性腹泻暴发流行的调查[J]. 中华医学杂志, 2006; 86(6): 432.
- [9] McFarland LV. Renewed interest in a difficult disease: *Clostridium difficile* infections--epidemiology and current treatment strategies[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2008; 25: 24-35.
- [10] Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, *et al.* *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey[J]. Lancet, 2011; 377: 63-73.
- [11] Lim PL, Barkham TM, Ling LM, *et al.* Increasing incidence of *Clostridium difficile*-associated disease, Singapore[J]. Emerg Infect Dis, 2008; 14(9): 1487-1489.
- [12] Shin BM, Kuak EY, Yoo HM, *et al.* Multicentre study of the prevalence of toxigenic *Clostridium difficile* in Korea: results of a retrospective study 2000-2005[J]. J Med Microbiol, 2008; 57: 697-701.
- [13] Khanna S, Pardi DS. The growing incidence and severity of *Clostridium difficile* infection in inpatient and outpatient settings[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2010; 4: 409-416.
- [14] Janka J, O'Grady NP. *Clostridium difficile* infection: current perspectives[J]. Curr Opin Crit Care, 2009; 15: 149-153.
- [15] 王浦, 陈焯, 姜泊. 艰难梭菌感染的流行病学研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2011; 31(4): 235-238.
- [16] Huang H, Wu S, Wang M, *et al.* *Clostridium difficile* infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes[J]. Int J Antimicrob Agents, 2009; 33: 339-342.
- [17] DuPont HL, Garey K, Caeiro JP, *et al.* New advances in *Clostridium difficile* infection: changing epidemiology, diagnosis, treatment and control[J]. Curr Opin Infect Dis, 2008; 21: 500-507.

- [18] Aslam S, Hamill RJ, Musher DM. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies[J]. Lancet Infect Dis, 2005; 5(9): 549-557.
- [19] Freeman J, Bauer MP, Baines SD, *et al.* The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections[J]. Clin Microbiol Rev, 2010; 23: 529-549.
- [20] Roberts K, Smith CF, Snelling AM, *et al.* Aerial dissemination of *Clostridium difficile* spores[J]. BMC Infect Dis, 2008; 8: 7.
- [21] Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, *et al.* A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection[J]. J Antimicrob Chemother, 2008; 62: 388-396.
- [22] Cheng Y, Lu JX, Yan SK, *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.
- [23] Indra A, Schmid D, Huhulescu S, *et al.* Characterization of clinical *Clostridium difficile* isolates by PCR ribotyping and detection of toxin genes in Austria[J]. J Med Microbiol, 2008; 57: 702-708.
- [24] 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: 1079-1084.
- [25] Loo VG, Poirier L, Miller MA, *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: 2442-2449.
- [26] 严其容, 程颖, 卢金星. 艰难梭菌分子分型技术及其应用[J]. 中华流行病学杂志, 2011; 32(10): 1046-1049.
- [27] Bakker D, Corver J, Harmanus C, *et al.* Relatedness of human and animal *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates determined on the basis of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and tetracycline resistance[J]. J Clin Microbiol, 2010; 48: 3744-3749.
- [28] Riley TV. Nosocomial diarrhoea due to *Clostridium difficile*[J]. Curr Opin Infect Dis, 2004; 17: 323-327.
- [29] 洪秀华, 刘运德. 临床微生物学检验[M]. 第2版, 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 422-423.
- [30] Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, *et al.* Multiplex PCR targeting *tpi*, *tcdA*, and *tcdB* genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*[J]. J Clin Microbiol, 2004; 42(12): 5710-5714.
- [31] Gade R, Turett G. The Utility of Repeated Stool Toxin Testing for Diagnosing *Clostridium difficile* Colitis[J]. South Med J, 2009; 102(10): 1007-1009.
- [32] Kato H, Kato N, Katow S, *et al.* Deletions in the repeating sequences of the toxin A gene of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains[J]. FEMS Microbiol Lett, 1999; 175: 197-203.
- [33] Ticehurst JR, Aird DZ, Dam LM, *et al.* Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin[J]. J Clin Microbiol, 2006; 44: 1145-1149.
- [34] Fenner L, Widmer AF, Goy G, *et al.* Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of *Clostridium difficile*[J]. J Clin Microbiol, 2008; 46(1): 328-330.
- [35] Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, *et al.* A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease

severity[J]. Clin Infect Dis, 2007; 45: 302-307.

[36] Musher DM, Aslam S, Logan N, *et al.* Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole[J]. Clin Infect Dis, 2005; 40: 1586-1590.

[37] Bauer MP, van Dissel JT, Kuijper EJ. *Clostridium difficile*: controversies and approaches to management[J]. Curr Opin Infect Dis, 2009; 22: 517-524.

[38] Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, *et al.* Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomized double blind placebo controlled trial[J]. BMJ, 2007; 335: 80.

[39] Kato N, Ou CY, Kato H, *et al.* Identification of Toxigenic *Clostridium difficile* by the Polymerase Chain Reaction[J]. J Clin Microbiol, 1991; 29: 33-37.

[40] Rotimi VO, Jamal WY, Mokaddas EM, *et al.* Prevalent PCR ribotypes of clinical and environmental strains of *Clostridium difficile* isolated from intensive-therapy unit patients in Kuwait[J]. J Med Microbiol, 2003; 52: 705-709.

[41] 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*[J]. BMC Microbiol, 2011; 11: 217.

致谢

光阴荏苒，4年的大学生活即将接近尾声。回首过去的点点滴滴，成长的轨迹仍然清晰可见。在这4年的时光里，我不仅丰富了自己的专业知识和技能，更收获了许多为人处世的经验和能力。

感谢检验系老师和所有曾经为我们授课的教职人员，是你们孜孜不倦的付出和循循善诱的教导，向我们求知的心田注入了新的能量；是你们各具特色的人格魅力，让我们深受感染，并不断鞭策自己努力成为一个于社会有价值的人。

感谢大学期间的辅导员沈理、孙月霞、应雅韵老师，是你们对我在学习、工作、生活上的关照和提点，为我在疑惑和困难时指引方向，使我明确目标，勇往直前。

感谢我的同学和朋友，是你们一如既往的鼓励和陪伴，让我能够有人一起探讨学业上的问题和难点，共同分享生活上的失意与喜悦。

感谢把我养育成人的父母，是你们无微不至的关怀、始终如一的支持和默默无闻的奉献，为我提供了良好的学习环境，也使我的生活充满温馨与快乐。

感谢此次毕业论文实习期间指导和帮助过我的人：我的导师彭奕冰老师，我的学姐董丹凤、江岑，还有瑞金医院检验科和微生物科的各位老师。我的毕业论文能够顺利完成离不开你们的一份心血，而你们身上严谨求实的治学态度和勤奋执着的钻研精神值得我效仿和学习。

最后，衷心感谢曾经给予我关心、支持、指导、帮助的人，谢谢你们陪我一起走过。

艰难梭菌感染的流行状况及诊治方法研究进展

摘要

随着艰难梭菌的感染率在全球范围内逐渐增高，艰难梭菌相关性腹泻(*Clostridium difficile*-associated diarrhea, CDAD)已引起了国内外临床工作者的广泛关注和重视。近几十年内，艰难梭菌感染(*Clostridium difficile* infection, CDI)的流行病学不断改变，高毒力株、耐药菌株相继出现，使该病在全球尤其是欧洲和北美的暴发流行迅速增多，同时，疾病的严重程度、复发率和病死率均明显升高。由于传播途径和危险因素趋于多样化，大大提高了医院和社区 CDI 的风险。CDAD 的诊断主要依赖于临床表现以及厌氧培养、细胞毒试验、菌体或毒素抗原检测、毒素基因扩增等实验检测方法。治疗以恢复肠道正常菌群为目的，需选用针对性的抗生素，亦可辅助以免疫疗法和微生态制剂。

关键词：艰难梭菌，流行病学，感染，诊断，治疗

RESEARCH PROGRESS OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* INFECTION IN THE EPIDEMIOLOGY, DIAGNOSIS AND TREATMENT

ABSTRACT

With the increasing *Clostridium difficile* infection (CDI) rates throughout the world, *Clostridium difficile*-associated diarrhea (CDAD) has aroused great concern of clinical workers from both home and abroad. In the past several decades, owing to the continuously-changing epidemiology of CDI and the emergence of hypervirulent strains and drug-resistant strains, the prevalence and outbreaks of CDI have increased rapidly worldwide, especially in Europe and North America. Meanwhile, the severity, recurrence rates and mortality of the disease have all risen significantly. Because of the diversity of transmission and risk factors, the risk of nosocomial CDI and community-associated CDI has been much higher than before. The diagnosis of CDAD depends on clinical manifestations and laboratory methods such as anaerobic culture, cytotoxicity test, bacterial or toxin antigen detection, and toxin gene amplification, etc. The treatment aims at restoring normal gut flora. Antibiotics directly against *Clostridium difficile* should be chosen in assistance with immunotherapy and probiotics.

Key words: *Clostridium difficile*, epidemiology, infection, diagnosis, treatment

艰难梭菌是一种专性厌氧的革兰阳性芽孢杆菌，广泛分布于自然界及人和动物的粪便中。其芽孢抵抗力较强，可在外界环境中存活数周至数月。艰难梭菌本是人体肠道的正常菌群，但当患者由于各种原因出现肠道菌群失调后，艰难梭菌便会过度生长并释放毒素，引起艰难梭菌感染 (*Clostridium difficile* infection, CDI) 的相关疾病，包括腹泻、伪膜性肠炎、中毒性巨结肠等。自 1977 年起认识到艰难梭菌与抗生素相关性腹泻有关以来，艰难梭菌一直是引起院内获得性腹泻的常见病原体。随着广谱抗生素的大量使用，全球范围内艰难梭菌相关性腹泻 (*Clostridium difficile*-associated diarrhea, CDAD) 的发生率不断增高，尤其是欧洲和北美 CDI 的暴发流行迅速增长，重症病例数、复发率和病死率均明显上升，高毒力株、耐药株也相继出现，使临床诊断和治疗 CDAD 面临着新的挑战。本文就国内外 CDI 的流行状况及诊治方法研究进展作一综述。

1 流行状况

1.1 发病率和严重程度

艰难梭菌现已被公认为发达国家最重要的院内感染病原体之一。2001 年以来，艰难梭菌感染在欧美各国广泛流行。一项加拿大魁北克地区的前瞻性临床研究显示，2004 年常规住院患者 CDAD 的平均发病率是 22.5/1000，为 1997 年的四倍^[1]。在美国，艰难梭菌的感染率逐年稳步上升，非暴发时期院内感染率在 0-15%，而感染暴发时期将会升至 16-20%。至 2010 年，据疾病预防控制中心估计，美国每年已有 45-75 万艰难梭菌感染的病例^[2]。2008 年抽取欧洲 34 个国家 106 所医院进行 CDI 流行病学调查研究后发现，虽然欧洲各国 CDI 流行情况不一致，但总体呈增长趋势是比较肯定的(0.0~36.3，平均 4.1/10000 病人日)^[3]。

即使在报道较少的亚洲国家，艰难梭菌感染也有迅速上升势头。新加坡 CDI 的发病率从 2001 年的 1.49/万升至 2006 年的 6.64/万，毒素阳性率从 7% 升至 11%^[4]。韩国的 CDI 病例数也在逐年增加，产毒株的检出率从 2002 年的 7% 上升至 2004 年的 50.3%^[5]。而在中国，由于开展厌氧菌培养鉴定的实验室很少，尚无确切的统计数据^[6]。虽然缺乏大规模的研究使得国内 CDI 的发病率还未知，但目前仅有的一些研究表明，近年来国内住院患者艰难梭菌的感染率可能低于西方国家^[7]。

鉴于研究对象的地区差异性较大，各地报道的 CDI 发病率均不一致，但总的来说，据加拿大医院感染监测中心估计，世界范围内的成人 CDI 发病率呈增加趋势(4.6/1000 个入院患者，或者 65/10 万病人日)^[8]。

艰难梭菌定植于 3% 健康成人和近 80% 健康婴儿的肠道中。在住院患者粪便中的携带率达到 16-35%，随着住院时间的延长和抗生素的应用，艰难梭菌定植的危险将逐渐升高^[9]。艰难梭菌感染后临床表现的疾病谱呈现多样化，从无症状带菌、腹泻、伪膜性肠炎，到严重的中毒性巨结肠、休克、死亡都有可能。发展成伪膜性肠炎后，CDAD 的致死率是 6-30%^[10]。英国卫生部的监测表明，CDI 的死亡率可能与年龄增加有关，小于 45 岁的患者 CDI 总死亡率是 0.2/100 万，而大于 84 岁的人群 CDI 总死亡率达 2055/100 万^[11]。另有研究推测，高毒力菌株的出现、低蛋白血症、医疗机构的长期停留、免疫抑制、化学治疗等均可能与 CDI 疾病严重程度及其相关死亡率增加有关^[12]。

1.2 感染类型与传播途径

艰难梭菌的感染类型包括医院获得性感染和社区相关性感染两大类。长久以来，人们普遍认为 CDI 流行于医疗系统中。的确，住院患者有相对更高的艰难梭菌感染率，这可能与他们自身的高度易感性以及持续暴露于医院环境、使用抗生素等因素有关。尽管如此，越来越多的证据表

明社区相关性艰难梭菌感染(CA-CDI)率呈逐渐增加趋势,包括一些以前认为处于低风险的人群也出现了感染。有研究对2008-2009年间英国南部某地CA-CDI流行情况进行回顾性分析,发现58例CA-CDI患者来自总人口数为41.8万的人群,估计CA-CDI发生率为1.29/万人^[13]。

目前,对医院获得性CDI和社区相关性CDI的界定尚缺乏统一标准。集中的问题是:病原菌究竟是在医院环境中获得的,还是作为一种肠道微生态菌群在病人入院时已经携带,只是在住院期间发展成致病菌,这是研究者们始终难以解答的。现在比较公认的划分标准是采用分组方法^[12]:发病前12周内未曾住院的归为社区相关性艰难梭菌感染(CA-CDI);入院后48h至出院后4周内发病归为医院获得性CDI;若患者出院后4~12周发病,则归为不确定感染。

在医院环境中,艰难梭菌可存在于地面和医疗器械等容易造成交叉污染的地方,接触传播是主要途径,尤其要引起注意的是通过医务人员的手进行院内的广泛传播^[7]。艰难梭菌的芽孢抵抗力强、难以灭活,一些以酒精为主要成分的清洁剂对其不起作用,必须使用含氯的消毒剂才能将其杀灭^[14]。而想要去除沾染于手上的芽孢,需要借助肥皂和流水的冲洗。另有证据显示芽孢可通过气溶胶播散^[15],或许空气也是院内CDI的传播媒介。

在社区环境中,与家庭内腹泻成员的接触或不慎摄入污染的食物是造成CA-CDI的主要原因^[16]。由于婴幼儿的带菌率高,与婴幼儿的频繁接触是发生社区获得性CDAD的高危因素^[17]。同时,艰难梭菌也会存在于食物中,加拿大一项研究从60份零售肉馅标本中分离艰难梭菌,发现20%为阳性^[18]。某些动物,包括猪、马、狗、猫、鸽等,亦携带艰难梭菌,且艰难梭菌与这些动物的肠道疾病也有关联。若动物确实是CDI的传染源之一,则食物将成为疾病的一种重要传播媒介^[9]。

1.3 危险因素

由于CDI发病率、疾病严重程度和死亡率不断提高,许多研究者开始探讨CDI的危险因素。概括地说,CDI的危险因素大致包括三方面:宿主因素、频繁暴露于高危环境以及破坏肠道正常微生态菌群的因素^[2]。宿主因素为老年、女性、免疫抑制、有基础疾病或伴随疾病等。频繁暴露于高危环境指的是长期停留在医疗系统中或者与已被感染的室友家人、手中携带病原的医务人员有密切的接触。而破坏肠道正常微生态菌群的因素包括近期使用抗生素、长期运用制酸药^[12](尤其是质子泵抑制剂)以及其它影响胃肠道微生态稳定的医疗行为等。其实,单一的危险因素或许不足以诱发疾病,但以上多项危险因素往往密切相关、互相影响,又常集中出现在同一住院病人身上,如此看来,CDI多发于住院病人也就不难解释了。不仅如此,艰难梭菌在高危病人中的感染更加普遍,比如ICU、老年、肿瘤化疗、外科手术、干细胞移植、小儿科患者等^[7]。

除此之外,近年来还陆续发现了一些其它的危险因素,如:长期使用抗肿瘤药物;近期内有胃肠道手术史;使用饲管喂养或给药;长期通便灌肠、使用促胃肠蠕动及粪便软化药;8周内曾到外地旅游者;与近期住过院患者有接触等^[12]。早期发现和鉴别CDI高危因素,有利于优化治疗方案和改善预后。

另有报道显示,过往被视为低危人群的非住院年轻人、围产期妇女也开始有艰难梭菌感染^[16]。这表明疾病的易感性有所增加,而且未来可能还有新的危险因素出现。

1.4 毒力因子与暴发菌株

与艰难梭菌高致病性有关的暴发株,报道最多的是BI/NAP1/027型,即:restriction endonuclease analysis (REA) type BI, North American pulsed-field gel electrophoresis type 1, PCR ribotype 027, 限制性内切酶分析BI型/北美脉冲场凝胶电泳1型/核糖体分型027型。该菌株已

有全球性的播散趋势，在欧美广泛发现，亚洲亦有零星报道，我国尚未见诸报端^[12]。自从在加拿大出现暴发流行后，BI/NAP1/027 型艰难梭菌株的暴发被相继多次报道。至 2007 年 11 月，美国已有 38 个州的住院患者中发现了 BI/NAP1/027 型菌株^[19]。加拿大的一项前瞻性研究^[20]收集了来自 88 家医院的艰难梭菌菌株，在暴发逐渐平息后仍发现 BI/NAP1/027 型菌株的持续存在（占总分离株的 57%）。Biller 等^[21]在美国宾夕法尼亚州的一家医院发现了一次该菌株的流行，首次治疗时用左氧氟沙星无效，后改用莫西沙星。这种非典型菌株于 1984 年首次分离时，在人群中还十分罕见，且对喹诺酮敏感^[22]。随着喹诺酮类抗生素的广泛使用，近年来高毒性的 BI/NAP1/027 型艰难梭菌株已对喹诺酮类产生耐药^[23]，给临床治疗带来了难题。

通常情况下，艰难梭菌主要产生两种毒素：肠毒素（毒素 A）和细胞毒素（毒素 B），分别由 *tcdA* 和 *tcdB* 基因编码，受 *tcdC* 基因的负调控。不同的是，BI/NAP1/027 型菌株 *tcdC* 基因存在突变，导致毒素的产生难以抑制和调节，因此，较之普通菌株，它能产生的 A 毒素水平为 16 倍，B 毒素水平为 23 倍^[22]。由于具有更高的毒力，故该型菌株感染后疾病的严重性显著增加，致死率将高达 65%^[6]。BI/NAP1/027 型菌株还能产生一种二元毒素（由 *cdtA*、*cdtB* 基因编码），故该菌株属毒素型别 III 型（toxintype III）。关于二元毒素的作用尚存在争议，但它被认为在引发严重疾病时有辅助作用^[23]。BI/NAP1/027 型菌株的 *tcdC* 基因功能失常是因为该基因第 117 位上单个核苷酸的缺失，导致提前形成终止密码子，灭活了 *tcdC* 基因对 *tcdA* 和 *tcdB* 基因的下调作用^[24]。该型菌株 *tcdC* 基因有 18 个碱基对缺失，可能与其对喹诺酮类的高度耐药和暴发流行有关^[12]。

2005 年，艰难梭菌 078 型/毒素型别 V 型在荷兰出现。078 型主要侵害年轻人，多属于社区获得性 CDI^[25]。艰难梭菌 078 型和 BI/NAP1/027 型有类似的毒素，其 *tcdC* 基因有 39bp 的缺失，并含第 184 位点突变，导致终止密码子提前产生。此外，人类和动物间艰难梭菌 078 型的基因序列高度一致^[26]，说明该型艰难梭菌在人和动物之间可能不存在种族差异，为其传播创造了有利条件。所以有理由推测，若没有行之有效的预防和控制措施，艰难梭菌 078 型的感染率也许会逐年递增。

2 诊断

近年来全球艰难梭菌感染率的不断提高使得临床医生对 CDAD 的关注不断升级，越来越多研究和临床案例的报导以及微生物学、免疫学及分子生物学技术的快速发展给临床诊断提供了不少指导和帮助。目前对 CDI 相关性疾病的诊断主要依赖临床表现和实验室检测。

2.1 临床表现

CDI 的临床表现多样，多为轻至中度水样腹泻，重症者出现威胁生命的中毒性巨结肠和败血症。常见的症状包括腹痛、腹泻、发热、厌食、恶心和疲乏等。实验室检查伴有白细胞增高、C-反应蛋白增高和清蛋白降低^[27]。艰难梭菌感染后可从轻微腹泻发展至伪膜性肠炎，症状发生发展需 5 到 10 天，而抗生素使用不当可使症状持续 10 周。患者表现为突发性腹泻，粪便有恶臭气味，可见黏液。部分急性伪膜性肠炎患者可不出现腹泻，但有腹痛、发热的表现，最终导致电解质紊乱、低蛋白血症和麻痹性肠梗阻^[28]。感染如不及时根治，相关症状可反复出现，因此确诊腹泻是否由 CDI 引起对于采取针对性治疗措施相当重要。

2.2 实验室检测

2.2.1 细菌厌氧培养 艰难梭菌的厌氧培养灵敏度较高,在环丝氨酸-头孢西丁-果糖-卵黄琼脂(CCFA)培养基上形成粗糙型黄色菌落,脂酶、卵磷脂酶为阴性^[29]。但该方法耗时较长,且培养阳性不能确定其是否产生毒素。

2.2.2 细胞培养毒素中和试验 该方法一度被认为是临床诊断 CDAD 的金标准^[30]。粪便离心沉淀,上清液过滤除菌后加入细胞培养液。若为产毒株,通过细胞培养会产生细胞病变效应,且可以被特异性抗毒素所中和。细胞毒试验的灵敏度和特异性分别为 93%和 89%^[31]。但由于细胞培养时间长、对设备要求高,使其应用受到一定限制,无法大范围推广。

2.2.3 酶免疫法检测毒素 许多实验室采用酶免疫法(EIA)来检测艰难梭菌毒素,其灵敏度和特异性范围分别为 50-90%、70-95%^[31]。当临床怀疑艰难梭菌相关性肠炎时,标准的方法要送检三份粪便标本^[32]。研究表明,第二次检测的累积阴性预测值(NPV)能从第一次的 85%提高到 96%,而第三次重复实验对于提高诊断价值的作用不大^[31]。因此,在现今医疗资源有限的大环境下,EIA 法检测艰难梭菌毒素连续两次得到阴性结果,基本足以排除 CDAD 的可能。

2.2.4 ELISA 法检测谷氨酸脱氢酶 这是一种确定粪便标本中艰难梭菌存在与否的简便、快速的方法。谷氨酸脱氢酶(GDH)是艰难梭菌的共同抗原,但和细菌培养相似,检测 GDH 不能确定菌株是否产毒素。据此,Ticehurst 等^[33]采用两步法检测艰难梭菌,弥补了上述缺点。第一步先用快速法筛选艰难梭菌 GDH 抗原,然后第二步对 GDH 阳性者做细胞毒试验或 EIA 检测毒素用于确证。两步法的灵敏度达 98%,特异性为 89%。

2.2.5 PCR 检测毒素基因 分子诊断技术为 CDI 的快速诊断提供了越来越重要的工具。目前美国已有三家公司生产的艰难梭菌基因诊断试剂盒通过了美国食品药品监督管理局认证,他们分别是 BD GeneOhm、Cepheid 和 Prodesse 公司^[27]。与金标准细胞毒试验相比,基因诊断试剂盒具有灵敏度极高、特异性稍低的特点。PCR 法能在收到标本当天出报告,但同时也面临着成本预算过高、从粪便中抽提分离 DNA 困难等问题。Ann 等^[34]研发了一种可直接用于粪便标本 *tcdB* 基因检测的实时 PCR 方法。他们以细胞毒试验合并 PCR 法作为金标准,评估了结合检测 GDH (EIA 法)、A/B 毒素(EIA 法)和 *tcdB* 基因(PCR 法)的三步法方案的应用价值。该方案仅对 GDH-EIA 阳性且 A/B 毒素-EIA 阴性的标本加做 *tcdB* 基因的 PCR 检测,大大提高了检测效率。

综上所述,每种检测方法各有其利弊。细菌厌氧培养和细胞培养毒素中和试验虽是直观而传统的经典方法,但其检测时间长,后者对技术要求也较高,故不适于广泛投入临床应用。免疫和分子生物学方法的优点是省时且操作简便,但成本较高,特异性稍差些。目前尚无最佳的单一检测方法,满足既有高灵敏度和特异性,又经济、快速、有效。较优化的方案是把多种方法联合应用以取长补短,特别是将 EIA 和 PCR 联用来代替细胞毒试验,在保证灵敏度和特异性高的同时,也具有相对较短的周转时间(turn around time)。

3 治疗

随着艰难梭菌高毒力株、耐药株的相继出现和流行,CDI 的严重程度和复发率越来越高,无疑给疾病的治疗提出了更高的要求。治疗原则是先停用腹泻相关抗生素,给予液体和补充电解质等支持治疗,然后视情况采取针对性措施。总体而言,恢复肠道正常菌群是治疗 CDAD 的关键。

3.1 抗菌治疗

尽管万古霉素是唯一被美国 FDA 批准治疗 CDAD 的药物^[35],许多权威专家建议仅在遇到严重危及生命的病例或甲硝唑治疗无效时再用万古霉素。20 世纪 90 年代后期,鉴于甲硝唑对疾病的遏制效果与口服万古霉素相似,为避免由于万古霉素的频繁使用导致耐万古霉素肠球菌(VRE)的出现,美国 CDC 推荐采用甲硝唑作为治疗 CDAD 的标准方法,口服万古霉素不作为 CDAD 治疗的首选药物^[36]。研究表明,对于轻型 CDAD,万古霉素和甲硝唑的疗效相同;但对于重型 CDAD,万古霉素疗效更优^[37],因为随着腹泻严重程度发展,病人结肠中甲硝唑的浓度有显著下降,成为导致甲硝唑疗法失败和疾病复发的因素之一。近年来,甲硝唑治疗 CDAD 的有效性有所下降,主要问题与它的药代动力学有关^[38]。健康人口服甲硝唑 90%以上在小肠内吸收,而 CDAD 患者药物在肠腔停留时间大大减少,致使多数药物都被排泄,吸收量有限。严重的 CDAD 推荐用万古霉素治疗,但仍有一定的复发率(11-19%)^[2]。研究表明,甲硝唑与万古霉素对高毒力株 NAP1 型的疗效相仿^[35]。

除去上述两种经典药物,针对 CDAD 的其它抗菌药物^[27]有:①聚苯乙烯吸附剂(Tolevamer),通过吸附毒素 A、B,抑制由毒素导致的肠道液体积聚,从而迅速减少腹泻液量,明显降低 CDI 的病死率。②硝唑尼特,口服给药肠道内药物浓度高,适用于使用甲硝唑无效或复发者。③雷莫拉宁,通过阻断肽聚糖合成而达到抗菌目的,能减少毒素产生,有效杀死芽孢并防止其再生。④利福昔明,通过抑制细菌 RNA 合成而发挥抗菌活性。

2011 年 5 月 27 日,美国 FDA 发布公告,批准非达霉素(Fidaxomicin)口服片剂用于治疗 CDAD (<http://www.fda.gov>)。

3.2 免疫治疗

所谓免疫治疗,就是使用免疫球蛋白或者针对艰难梭菌菌体或其毒素的特异性抗体,提高血清抗体水平来抵抗病原菌,以达到保护机体的作用。已有学者开展大量动物实验和临床试验,来验证免疫疗法的可行性。有报道采用静脉注射人免疫球蛋白配合基础疗法治疗重症 CDAD 病例获得成功^[27]。另一试验从免疫了艰难梭菌的牛体内提取抗体,注入已用万古霉素治疗 10 天的 CDI 患者,未发现不良反应。宿主的免疫应答是 CDI 是否会复发的重要预测指征,有研究发现体内产生抗毒素 A、B 抗体的患者没有再次复发 CDI^[2]。目前已发现单克隆抗体 MDX-066 和 MDX-1388,分别具有直接抵抗毒素 A 和毒素 B 的作用,临床试验验证了其辅助标准抗菌疗法对预防 CDI 复发的价值^[39]。

除了利用外源性抗体对人体进行被动免疫,为预防 CDI 的发生,还可以采取主动免疫方法诱导机体产生对菌体成分或毒素的中和抗体。于是研制合适的疫苗成了亟待解决的新问题,但疫苗真正投入使用之前还有待充分的实验对其安全性和有效性做出评估。

3.3 菌群调节治疗

多数 CDAD 是肠道菌群失调的结果,因此微生态制剂(益生菌活菌制剂)在 CDAD 的治疗方面有较大应用前景。肠道益生菌,如: *boulardii* 酵母菌,乳酸杆菌、双歧杆菌等,对于调节菌群紊乱、恢复肠道正常微生态环境起着积极作用。赵继顺等^[40]探讨了 *boulardii* 酵母菌对小儿抗生素相关性肠炎的疗效,发现其可降低致病菌的浓度及其相关毒素产量,从而缩短腹泻病程,提高治愈率。*boulardii* 酵母菌能预防复发,但对首发 CDAD 的患者无效^[41]。有随机对照试验使用抗生素和益生菌结合治疗 CDI,发现使用益生菌后 CDI 的风险明显降低^[2]。最近英国一则报道称,一种含有干酪乳杆菌、保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌的特殊酸奶饮品可以减低 50 岁以上使用抗

生素患者 CDI 的发病风险^[42]。另一种恢复肠道菌群的方法是用正常人的粪便行灌肠术，荷兰已针对 CDI 反复发作的患者开展了相关临床试验^[39]。

如今，治疗 CDI 的方法不断扩充，除了两种经典抗生素以外，还有许多其它的选择。但由于患者之间存在个体差异，临床医生在治疗时仍需根据实际情况挑选合适的方案。特别是暴发性重症 CDAD 患者可给予口服万古霉素及静脉注射甲硝唑联合治疗，必要时采取结肠切除手术^[43]。复发患者的治疗可采用抗生素结合免疫球蛋白或微生态制剂。

4 结语

随着广谱抗生素的频繁使用，CDI 在国内外已广泛流行，发病率呈逐年上升趋势。过去几十年间，高毒力株和耐药株的出现导致 CDI 的流行病学不断改变，也使得疾病严重程度、复发率和死亡率明显增高，给临床诊治带来了一定的困境。建立标准化的 CDI 疾病分级系统、检测程序和治疗方案已迫在眉睫，而新型实验检测方法和治疗手段的研发，也给未来 CDI 的诊治带来了更多的选择和希望。鉴于目前疾病传播途径和感染危险因素趋于多样化，CDI 的发生范围已从医院蔓延至社区，对疾病的预防和控制提出了更高的要求。在院内限制抗生素的过度使用、注意患者隔离和环境消毒、加强医务人员的手卫生防护，在社区避免与高危人群和其它污染源的接触，是防控 CDI 的重要措施。此外，对医务人员和群众普及 CDI 相关知识，有助于降低院内和社区 CDI 的发病风险。

参考文献

- [1] 王飞, 贺蓓. 难辨梭状芽孢杆菌相关性腹泻暴发流行的调查[J]. 中华医学杂志, 2006; 86(6): 432.
- [2] McFarland LV. Renewed interest in a difficult disease: *Clostridium difficile* infections--epidemiology and current treatment strategies[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2008; 25: 24-35.
- [3] Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey[J]. Lancet, 2011; 377: 63-73.
- [4] Lim PL, Barkham TM, Ling LM, et al. Increasing incidence of *Clostridium difficile*-associated disease, Singapore[J]. Emerg Infect Dis, 2008; 14(9): 1487-1489.
- [5] Shin BM, Kuak EY, Yoo HM, et al. Multicentre study of the prevalence of toxigenic *Clostridium difficile* in Korea: results of a retrospective study 2000-2005[J]. J Med Microbiol, 2008; 57: 697-701.
- [6] 严其容, 程颖, 卢金星. 艰难梭菌分子分型技术及其应用[J]. 中华流行病学杂志, 2011; 32(10): 1046-1049.
- [7] Jin K, Wang SX, Huang ZH, et al. *Clostridium difficile* infections in China[J]. JBR, 2010; 24(6): 411-416.
- [8] Khanna S, Pardi DS. The growing incidence and severity of *Clostridium difficile* infection in inpatient and outpatient settings[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2010; 4:409-416.
- [9] Indra A, Schmid D, Huhulescu S, et al. Characterization of clinical *Clostridium difficile* isolates by PCR ribotyping and detection of toxin genes in Austria[J]. J Med Microbiol, 2008; 57: 702-708.
- [10] Aslam S, Hamill RJ, Musher DM. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies[J]. Lancet Infect Dis, 2005; 5: 549-557.
- [11] Freeman J, Bauer MP, Baines SD, et al. The changing epidemiology of *Clostridium difficile* infections[J]. Clin Microbiol Rev, 2010; 23: 529-549.
- [12] 王浦, 陈焯, 姜泊. 艰难梭菌感染的流行病学研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2011; 31(4): 235-238.
- [13] Fellmeth G, Yarlagadda S, Iyer S. Epidemiology of community-onset *Clostridium difficile* infection in a community in the South of England[J]. J Infect Public Health, 2010; 3: 118-123.
- [14] Mayfield JL, Leet T, Miller J, et al. Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*[J]. Clin Infect Dis, 2000; 31: 995-1000.
- [15] Roberts K, Smith CF, Snelling AM, et al. Aerial dissemination of *Clostridium difficile* spores[J]. BMC Infect Dis, 2008; 8: 7.
- [16] Janka J, O'Grady NP. *Clostridium difficile* infection: current perspectives[J]. Curr Opin Crit Care, 2009; 15: 149-153.
- [17] Wilcox MH, Mooney L, Bendall R, et al. A case-control study of community-associated *Clostridium difficile* infection[J]. J Antimicrob Chemother, 2008; 62: 388-396.
- [18] Rupnik M. Is *Clostridium difficile*-associated infection a potentially zoonotic and foodborne disease? [J]. Clin Microbiol Infect, 2007; 13: 457-459.
- [19] Dubberke ER, Reske KA, Noble-Wang J, et al. Prevalence of *C. difficile* environmental

contamination and strain variability in multiple healthcare facilities[J]. *Am J Infect Control*, 2007; 35: 315-318.

[20] Hubert B, Loo VG, Bourgault AM, *et al.* A portrait of the geographic dissemination of the *Clostridium difficile* North American pulsed-field type1 strain and the epidemiology of *C. difficile*-associated disease in Quebec[J]. *Clin Infect Dis*, 2007; 44: 238-244.

[21] Biller P, Shank B, Lind L, *et al.* Moxifloxacin therapy as a risk factor for *Clostridium difficile*-associated disease during an outbreak: attempts to control a new epidemic strain[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2007; 28: 198-201.

[22] 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: 1079-1084.

[23] Loo VG, Poirier L, Miller MA, *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: 2442-2449.

[24] Curry SR, Marsh JW, Muto CA, *et al.* *TcdC* genotypes associated with severe *TcdC* truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*[J]. *J Clin Microbiol*, 2007; 45: 215-221.

[25] Cheng Y, Lu JX, Yan SK, *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.

[26] Bakker D, Corver J, Harmanus C, *et al.* Relatedness of human and animal *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates determined on the basis of multilocus variable-number tandem-repeat analysis and tetracycline resistance[J]. *J Clin Microbiol*, 2010; 48: 3744-3749.

[27] 曲芬, 汤一苇. 艰难梭菌感染的流行状况及诊治进展[J]. *传染病信息*, 2010; 23(1): 8-10.

[28] 沈秋生. 难辨梭状芽孢杆菌致伪膜性肠炎的诊治现状[J]. *抗感染药学*, 2004; 1(3): 101-102.

[29] 洪秀华, 刘运德. *临床微生物学检验*[M]. 第2版, 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 422-423.

[30] Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, *et al.* Multiplex PCR targeting *tpi*, *tcdA*, and *tcdB* genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*[J]. *J Clin Microbiol*, 2004; 42(12): 5710-5714.

[31] Gade R, Turett G. The Utility of Repeated Stool Toxin Testing for Diagnosing *Clostridium difficile* Colitis[J]. *South Med J*, 2009; 102(10): 1007-1009.

[32] Manabe YC, Vinetz JM, Moore RD, *et al.* *Clostridium difficile* colitis: an efficient clinical approach to diagnosis[J]. *Ann Intern Med*, 1995; 123: 835-840.

[33] Ticehurst JR, Aird DZ, Dam LM, *et al.* Effective detection of toxigenic *Clostridium difficile* by a two-step algorithm including tests for antigen and cytotoxin[J]. *J Clin Microbiol*, 2006; 44: 1145-1149.

[34] Larson AM, Fung AM, Fang FC. Evaluation of *tcdB* Real-Time PCR in a Three-Step Diagnostic Algorithm for Detection of Toxigenic *Clostridium difficile*[J]. *J Clin Microbiol*, 2010; 48(1): 124-130.

[35] DuPont HL, Garey K, Caeiro JP, *et al.* New advances in *Clostridium difficile* infection: changing epidemiology, diagnosis, treatment and control[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2008; 21:500-507.

[36] 刘杨, 王明贵. 艰难梭菌相关性腹泻研究进展[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2006; 6(4):

280-283.

[37] Zar FA, Bakkanagari SR, Moorthi KM, *et al.* A comparison of vancomycin and metronidazole for the treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea, stratified by disease severity[J]. Clin Infect Dis, 2007; 45: 302-307.

[38] Musher DM, Aslam S, Logan N, *et al.* Relatively poor outcome after treatment of *Clostridium difficile* colitis with metronidazole[J]. Clin Infect Dis, 2005; 40: 1586-1590.

[39] Bauer MP, van Dissel JT, Kuijper EJ. *Clostridium difficile*: controversies and approaches to management[J]. Curr Opin Infect Dis, 2009; 22: 517-524.

[40] 赵继顺, 赵成广, 毛志芹等. *Boulardii* 酵母菌治疗小儿抗生素相关性肠炎的疗效观察[J]. 小儿急救医学, 2003; 10(4): 233-234.

[41] Riley TV. Nosocomial diarrhoea due to *Clostridium difficile*[J]. Curr Opin Infect Dis, 2004; 17: 323-327.

[42] Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, *et al.* Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomized double blind placebo controlled trial[J]. BMJ, 2007; 335: 80.

[43] 胡云建. 院内感染艰难梭菌相关性腹泻[J]. 中国医学科学院学报, 2008; 30(5): 618-621.

译文及原文

中国艰难梭菌的感染情况

摘要

过去 20 年中，艰难梭菌感染已成为西方国家院内感染的主要因素之一。然而，关于中国医疗系统中艰难梭菌感染状况的信息还十分有限。鉴于国内老年人口数量庞大且不断增加以及被广泛认识到的过度使用广谱抗生素的问题，了解国内艰难梭菌感染的流行病学和潜在危险因素显得十分重要。笔者对包括中文杂志在内的可获取的出版研究刊物做了一次文献综述。一篇对目前可得文献做的综述中指出了国内存在艰难梭菌的感染，而这种感染并非某地区所特有。这项发现将促进研究者们开展更为精心设计且大范围的研究，从而对中国艰难梭菌的实际感染情况，包括与之相关危险因素的鉴定，提出更可靠的基于流行病学的结论。这些研究结果最终将为建立适当的策略来预防艰难梭菌感染及其在中国和其它发展中国家造成的巨大不利影响提供有价值的信息。

关键词：艰难梭菌，综述，流行，发病率，危险因素

引言

艰难梭菌是一种厌氧的革兰阳性杆菌，它形成的芽孢能抵抗医院内常规使用的许多消毒剂，且能在医院环境中存活 6 个月以上。因此，艰难梭菌可通过医疗设备、地面和医务人员的手在院内进行广泛传播。艰难梭菌是西方国家院内感染的主要病原菌之一，近年来其流行趋势正以惊人的速度在增加。然而，艰难梭菌感染的流行病学在包括中国在内的发展中国家仍不清楚，且因为出版的英文文献中着眼于艰难梭菌在中国感染情况的文献数量有限，使得其流行病学的研究变得越发困难。与此同时，中国医生普遍对艰难梭菌感染的认识不够，仅一小部分传染病专家知道在对表现出腹泻症状的住院患者进行常规鉴别诊断时，要把艰难梭菌考虑在内。这篇综述从英文和国内医学文献中概述了与国内艰难梭菌感染相关的信息，从而能为全球卫生服务提供者、流行病学家、卫生制度决策者、新型抗艰难梭菌疗法的研发者提供现时的参考，以满足他们对如何理解与应对全球艰难梭菌感染趋势的潜在兴趣。

发病率与疾病流行趋势

有文章充分记载了在过去的 10-20 年中西方国家艰难梭菌感染的发病率正在逐渐上升。1996 年，美国医院中艰难梭菌的感染率是每 1000 万病人中 31 例；到 2003 年，感染率猛增至每 1000 万病人中 61 例。感染控制和流行病学专家协会的研究表明：在住院患者中，艰难梭菌的检出率为 13.1%，发病率为 12.4%，比前述数据有明显提升。根据一项研究，在美国短期住院后出院的患者中被诊断为艰难梭菌相关性疾病的人数从 1996 年的 8.2 万(31/10 万人)上升至 2003 年的 17.8

万(61/10 万人),翻了一倍多。在美国的另一项研究中,从 2000-2006 年间,每年医院起病及与医疗设施相关的艰难梭菌感染的总发病率有显著提高(7.0-8.5 例/10 万病人日)。相比之下,荷兰被鉴定出 6201 例艰难梭菌感染的病例(118.3/10 万人),而在 2008 年参与统计的 14 家荷兰医院中,艰难梭菌感染的发病率为每 10 万位入院患者中 18 名。此外,自加拿大首先报道了高产毒性 NAP-1/027 型艰难梭菌后,这种菌株已经传播到美国、欧洲和亚洲并引发当地的暴发流行。NAP-1/027 型菌株肠毒素的高表达及对喹诺酮的耐药性使艰难梭菌感染后的相关致死率增加到一个高度惊人的水平,6.9%。根据一篇关于艰难梭菌全球性感染的流行病学概述,北美和欧洲艰难梭菌感染率的提高很大程度上与这种型别有关。

与此同时,已出版的文献中鲜有国内艰难梭菌感染总体发病率的报道。作为一家中国上海的主要教学医院,华山医院开展了一项为期一年(2007-2008)的研究,对 587 例疑似艰难梭菌感染的粪便标本进行检测。74 位病人(12.6%)通过细菌培养检出为艰难梭菌阳性,其中 13 名(17.6%)病人感染的菌株不产毒素。在中国南方的常规住院患者中,1994-1997 年间来自广州中山大学第一附属医院的 183 名腹泻患者接受了检测鉴定,其中 21 名(11.5%)被诊断为艰难梭菌感染。另一项在华南地区的研究显示,257 位被确诊为因使用抗生素导致腹泻的住院患者中,5.06%测得有艰难梭菌感染。有人在华北地区的北京医院进行了一次研究,发现 1998-2001 年间的 71428 名住院患者里,36 例被鉴定为艰难梭菌感染。

由于艰难梭菌的感染在恶性肿瘤患者中比较普遍,关于其发病率的研究也着眼于这些特殊的住院人群。内蒙古地区一组接受常规化疗的病人中(N=2778),44 名(1.6%)有艰难梭菌感染。但在同一地区展开的另一项研究中,1074 名接受化疗的患者内就有 38 名(3.5%)被诊断为艰难梭菌感染。天津的一次研究中,4697 位接受化疗的患者中有 87 位(1.9%)鉴定为艰难梭菌阳性。对于其他住院人群,据一项研究报道称,在 1998-1999 年里的三个月间,140 名神经科病房住院患者中的发病率为 3.57%。另一研究报导了 36 名接受神经外科手术后发生抗生素相关性腹泻的病人中,有 2 例是艰难梭菌感染。(又有记载)44 名接受异体造血干细胞移植的腹泻病人中,12 例(27.27%)被诊断为艰难梭菌感染。一项研究表明,小儿科病人中慢性持续性腹泻患者的艰难梭菌感染率是 1.59%(11/693),但急性腹泻患者的感染率却为 0%。

尽管还没有权威而系统性的认定,某些因素仍被认为可能影响国内住院患者中艰难梭菌感染的发病率。国内医师的观点是:中国住院患者接受的总体临床医疗条件不如西方国家严格;在中国医院内缺乏将粪便标本从腹泻患者运送至实验室检测的明确操作规程,还有临床医生往往在实验室确诊之前就开始治疗。与西方国家的情况相似,用传统细菌培养的方法来诊断艰难梭菌感染在许多医院里不配套开展,而因为诊断试剂盒的成本高,新型基于毒素检测的诊断方法也无法应用于常规的临床实践。

中国艰难梭菌感染的复发率

控制艰难梭菌感染的一个重要衡量指标是防止它在相同患者群中的再次感染。当前还缺少关于艰难梭菌感染复发率的可靠信息。华山医院开展了一项为期一年的研究,发现 56 名被确诊艰难梭菌感染的患者里有 5 个复发案例(8.9%)。此研究中对复发的定义是:在前次腹泻发作缓解且停止使用抗生素后 7-30 天内,患者再次出现感染症状且细菌培养阳性。研究发现,所有复发分离到的菌株都有一个相似点,它们与各自首发的分离株具有相同的毒素特点和 PCR 核糖体型别。但是,在接受异体造血干细胞移植的病人中,即便采取了适当的抗生素疗法,依然有高度的复发率(16.67%)。

中国艰难梭菌感染性疾病的严重程度

因为在中国医疗系统里还没有关于艰难梭菌感染严重程度的明确界定,导致医生们对感染严重程度的描述往往不一致,而且许多研究中常无法描述相关感染的严重程度。一则极端的报道中140名神经科病房的病人里有5例(3.57%)被诊断为艰难梭菌感染,其中4例被描述为重型或极重型感染,而仅1例被归为轻微型。在此5位病人中,2人死于与重型艰难梭菌感染相关的并发症。

中国艰难梭菌感染的相关危险因素

基础疾病的存在(一体多病)可能是艰难梭菌感染的一大危险因素。与常规住院患者相比,患有恶性肿瘤会增加艰难梭菌的感染率。一项研究中,华南地区21位艰难梭菌感染的病人里恶性肿瘤患者占据了10例(47.6%),相较之下,接受外科手术的患者为8例(38.1%),而有重要脏器慢性疾病的患者为3例(14%)。艰难梭菌感染的另一个重要因素是慢性病引起的体质下降。华北地区一项研究显示,36例艰难梭菌感染的病例中,28名患者(77.8%)有严重慢性疾病。另一项研究中44名感染者里的30名亦长期受慢性病困扰。

与艰难梭菌感染增加有关的另一危险因素是广谱抗生素的使用,特别是头孢菌素、广谱青霉素、喹诺酮类和氨基糖苷类抗生素。在中国,抗生素简便易得、且常被过度使用;多数研究已表明使用一种以上的抗生素有导致艰难梭菌感染的可能,这种现象即抗生素相关性腹泻(AAD)。据推测,不合理地使用抗生素,尤其是广谱抗生素,会导致肠道正常菌群的大量减少,从而使机会致病菌能够定植并致病。艰难梭菌是机会致病菌之一,它能分泌肠毒素。肠道菌群的缺失削弱了它们分解毒素的能力,使得艰难梭菌感染后,产生的肠毒素与肠上皮细胞结合并激活下游信号通路,导致炎症细胞的聚集和大量炎性介质的释放。这一系列事件的发生最终引起肠道的水肿和坏死,患者表现为腹痛和腹泻。

根据对接受化疗或异体造血干细胞移植的病人进行的观察研究,宿主的免疫状态也会引起艰难梭菌感染率的提高。然而,由于这些病人大多数都在感染期间使用了广谱抗生素,研究结果往往被混淆。

其它被认为与艰难梭菌感染增加相关的因素还有:住院、使用呼吸插管、胃管等。这些危险因素与C反应蛋白的升高和清蛋白的降低有关。但目前还缺少强有力的临床数据作为这些因素与疾病相关性的明确支撑。

国内地方性艰难梭菌菌株

一项对住院患者的研究中,在56株被鉴定为毒素阳性的艰难梭菌分离株里,43株(77%)为毒素A和毒素B双阳性,13株(23%)为毒素A阴性、毒素B阳性。此外,这些临床分离株中未发现产二元毒素或TcdC缺失的菌株。耐药性方面,56株艰难梭菌中对莫西沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、红霉素、克林霉素、四环素和利福平耐药的分别占46.4%、100%、60.7%、71.4%、71.4%、35.7%和25.0%,而所有菌株对甲硝唑、万古霉素、美罗培南和哌拉西林/他佐巴坦都敏感。这些菌株分属14种不同的核糖体型别,一种特殊的克隆株SH II占总分离株的25%,但没有属于核糖体型027的菌株。在两份相关稿件中报道了一则更近期的研究结果,一家北京的综合性医院里112名腹泻病人中有12例(10.7%)被鉴定为艰难梭菌感染,其中8例(66.7%)为产毒株;5例是毒素A和毒素B双阳性;3例是毒素A阴性、毒素B阳性。研究还对8株毒素阳性菌株的不同耐药水平做了检测。对氨苄西林、克林霉素、甲硝唑耐药的分别占37%、87.5%和12.5%;但这次实验中所有菌株对万古霉素都敏感。这8株分离株被分为4种基因型,ZR I为主要型别(占62.5%)。

艰难梭菌感染的治疗

采取中断或改换抗生素、质子泵抑制剂（PPI）和其它药物的方式可能就足以使艰难梭菌相关性腹泻得以缓解。Chen 等人的研究中记录了 11 名患者中 100% 在停用抗生素后轻型艰难梭菌感染便能够消除。由于艰难梭菌感染的患者肠道中乳酸杆菌、双歧杆菌和其它肠道正常菌群显著减少，地衣芽孢杆菌活菌剂、双歧三联活菌剂、酪酸菌等益生菌处方也许有助于治愈感染。某研究中的 10 名有症状患者在使用了地衣芽孢杆菌活菌剂后，伪膜性肠炎被治愈了。对中度或重度感染的病例，可采用含有针对艰难梭菌毒素的特异性抗体的 γ 球蛋白来治疗。但是，最常用的方案还是给予甲硝唑治疗，因为此药能抑制细菌 DNA 的合成，而且易于获得。虽然如此，考虑到甲硝唑引起的胃肠道副作用，逐渐增长的耐药率和它相对而言的低效性，中国医生经常倾向于使用万古霉素（治疗艰难梭菌感染），因为它具有起效快、高效、复发及耐药率低的优点。一项研究中 102 位接受化疗后出现腹泻的患者里，87 位艰难梭菌阳性的患者都能够用万古霉素有效地治愈。

在中国用中药治疗艰难梭菌感染在临床应用中已属常见。一则报道中，72 例用中医疗法（即：葛根、黄芩和黄连煎药）治疗抗生素相关性腹泻的患者相比对照组而言，症状消除得更快。另一项研究中，采用四种中药材合并万古霉素的治疗组总有效率为 93.33%，而仅采用万古霉素的治疗组总有效率仅为 76.66%。Dai 等人用大蒜制剂治疗伪膜性肠炎也得到了相同的结论。

结论

由于缺乏大规模的研究，中国艰难梭菌感染的确切发病率仍然未知；但这样的研究需要借助于简便而经济的诊断试验。目前仅有的一些研究表明，近年来在总体住院患者中，国内患者艰难梭菌的感染率可能低于西方国家。然而，艰难梭菌在高危患者中的感染也许更加普遍，比如 ICU 病房和接受肿瘤治疗的患者。经实验室检测确诊为艰难梭菌感染的病例，多数为毒素 A 和毒素 B 双阳性，仅一种毒素（毒素 B）为阳性的也可见，此外尚未鉴别出新的毒素亚型。治疗艰难梭菌感染的抗生素疗法与西方国家相似，而采用其它不同方法（包括中医疗法）治疗的案例也曾有报导。

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

JBR

Journal of Biomedical Research, 2010, 24(6):411–416

Review

[http://elsevier.com/wps/
find/journaldescription.cws_
home/723905/description#description](http://elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/723905/description#description)

Clostridium difficile infections in China[☆]

Ke Jin^{a,b,c}, Shixia Wang^{c,d}, Zuhu Huang^{a,b,c}, Shan Lu^{b,c,d*}^aDepartment of Infectious Diseases, ^bJiangsu Province Key Laboratory in Infectious Diseases, ^cChina-US Vaccine Research Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China;^dDepartment of Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01655, USA.

Received 19 July 2010, Revised 25 October 2010, Accepted 3 November 2010

Abstract

Clostridium difficile (*C. difficile*) infection has become one of the major hospital-associated infections in Western countries in the last two decades. However, there is limited information on the status of *C. difficile* infection in Chinese healthcare settings. Given the large and increasing elderly population and the well-recognized problem of over-prescribing of broad spectrum antibiotics in China, it is critical to understand the epidemiology and potential risk factors that may contribute to *C. difficile* infection in China. A literature review of available published studies, including those in Chinese language-based journals, was conducted. A review of the currently available literature suggested the presence of *C. difficile* infections in China, but also suggested that these infections were not particularly endemic. This finding should lead to better designed and greatly expanded studies to provide a more reliable epidemiologically-based conclusion on the actual status of *C. difficile* infection in China, including the identification of any associated risk factors. Such information is ultimately valuable to develop appropriate strategies to prevent *C. difficile* infection and the vast negative impact of such infections in China and other developing countries.

Keywords: *Clostridium difficile*, review, prevalence, incidence, risk factors

INTRODUCTION

Clostridium difficile (*C. difficile*) is an anaerobic Gram-positive bacillus that possesses the ability to form spores resistant to many commonly used hospital disinfectants and can survive in the hospital setting more than six months^[1]. Therefore it can be widespread in the hospitals through medical devices, floors and hands of medical staff^[2,3]. *C. difficile* is one of the major emerging hospital infections in Western coun-

tries and its prevalence is increasing at an alarming rate in recent years. However, the epidemiology of *C. difficile* infections in developing countries, including China, is unclear and is further complicated by the limited number of publications focused on *C. difficile* infections in China in the English-based literature. At the same time, the awareness of *C. difficile* infections among general healthcare providers in China is poor and only a small subset of infectious disease specialists understand that *C. difficile* infections should be included in the routine differential diagnoses for hospitalized patients presenting with diarrhea. This review summarizes the information related to *C. difficile* infections in China from both English-based and domestic medical literatures, and should provide a current reference to worldwide healthcare providers, epidemiologists, health policy decision makers

[☆]This study was supported by Jiangsu Province's Key Laboratory in Infectious Diseases

*Corresponding author: Shan Lu, M.D., Ph.D. China-US Vaccine Research Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China, or Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01655, USA. Tel: 1-508-856-6791, E-mail address: shan.lu@umassmed.edu.

These authors reported no conflict of interest.

and developers of novel anti-*C. difficile* treatments for their potential interest in understanding and managing the global trend of *C. difficile* infections.

INCIDENCE AND DISEASE TRENDS

It is well documented that the incidence of *C. difficile* infections is rising in Western countries over the past 1-2 decades. In 1996, the rate of *C. difficile* infections in the United States hospitals was 31 cases/10 million patients; by 2003, this rate soared to 61 cases/10 million patients^[4]. The study by the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology showed that the detection rate of *C. difficile* was 13.1% and the incidence was 12.4% in hospitalized patients, a significant increase over the previous data^[5]. According to one study, in short-stay hospitals in the United States, the number of discharges for which *C. difficile*-associated disease was listed as a diagnosis more than doubled from 82,000 (31/100,000 population) in 1996 to 178,000 (61/100,000 population) in 2003^[6] and in another study in the United States, from 2000-2006, there was a significant increase in the overall incidence rate of healthcare facility onset, and healthcare facility-associated *C. difficile* infections (7.0-8.5 cases per 100,000 patient days) each year^[7]. For comparison purposes, a total of 6,201 episodes of *C. difficile* infections were identified (118.3/100,000 population)^[8] and in the Netherlands, in 2008, the incidence of *C. difficile* infection was 18.0 per 100,000 admissions from 14 participating hospitals^[9]. Furthermore, since Canada first reported a highly virulent *C. difficile* NAP-1/027, this strain has spread to the USA, Europe and Asia, and caused local outbreaks^[10-14]. Overexpression of exotoxins and resistance to quinolones by NAP-1/027 increased *C. difficile* infection-related mortality rate to 6.9%, a highly alarming level^[11,15]. Based on a review of the global epidemiology of *C. difficile* infections throughout the world, this strain has been largely responsible for increases in *C. difficile* infection rates in North America and Europe^[16].

At the same time, there is a lack of published reports on the overall incidence of *C. difficile* infections at the national level in China. In one study, conducted for a one-year period (2007-2008) at Huashan Hospital, a major teaching hospital in Shanghai, China, stool samples of 587 suspected cases of *C. difficile* infections were examined^[4,5,17-20]. Seventy-four patients (12.6%) tested positive for *C. difficile* by bacterial culture and among these, up to 13 (17.6%) were toxin negative^[20]. Among the general inpatient population in southern China, 183 patients with diarrhea from the

First Affiliated Hospital of Zhongshan Medical University in Guangzhou were identified between 1994 and 1997^[10]. Among these 183 patients, 21 (11.5%) were diagnosed with *C. difficile* infections. A second study in southern China showed that, among 257 hospitalized patients with a diagnosis of diarrhea caused by the use of antibiotics, 5.06% were tested positive for *C. difficile*^[21]. In a study conducted in northern China at Beijing Hospital, 36 cases of *C. difficile* infection were identified among a total of 71,428 inpatients from 1998 to 2001^[11].

The incidence of *C. difficile* infections has also been studied among specific inpatient populations since this type of infection is quite prevalent in patients with malignancy. Among a group of patients receiving routine chemotherapy in the Inner Mongolia region ($N = 2,778$), 44 patients (1.6%) had *C. difficile* infection^[13]. However, in another study conducted in the same region, among 1,074 patients receiving chemotherapy, 38 patients (3.5%) were diagnosed with *C. difficile* infection^[14]. One study of 4,697 patients receiving chemotherapy in Tianjin identified 87 patients (1.9%) who were positive for *C. difficile*^[15]. For other inpatient populations, one study reported an incidence rate of 3.57% among 140 patients in an inpatient neurology ward during a 3-month period in 1998-1999^[22]. In another study, two cases of *C. difficile* infection were reported among 36 patients with diarrhea associated with antibiotic use from post-operative neurosurgery^[23]. In a population of 44 patients with diarrhea who received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, 12 cases (27.27%) were diagnosed with *C. difficile* infection^[24]. In a pediatric population, *C. difficile* infection rate was observed to be 1.59% (11/693) in patients with persistent and chronic diarrheal disease and 0% in patients with acute diarrheal disease in one study^[25].

Several factors may influence the incidence of *C. difficile* infection rates in hospitalized patient populations in China although none has been systematically determined. It was the opinion of local physicians in China that the overall clinical condition of hospitalized patients in China is less severe than those admitted in Western countries; there is a lack of clear guidelines in Chinese hospitals for sending stool samples from patients with diarrhea for laboratory testing, and clinicians may begin treatment without laboratory confirmation of diagnosis. Similar to that in Western countries, a diagnosis of *C. difficile* infection, using traditional bacterial culture methods, is not consistently conducted in many hospitals and newer toxin-based diagnostics are not available in routine clinical

practice due to the high cost of such diagnostic kits.

C. DIFFICILE RELAPSE RATE IN CHINA

One important parameter for *C. difficile* control is to prevent recurrent infection in the same patient population. Currently, there is a lack of reliable information on the relapse rate of *C. difficile* infections. In one study conducted at the Huashan Hospital, 5 (8.9%) recurrent cases among 56 confirmed *C. difficile* infections were observed during a one-year study period^[20]. In this study, recurrences were defined as patients with the reappearance of symptoms and positive culture at least 7 days but less than 30 days after resolution of the previous diarrheal episodes and discontinuation of antimicrobial therapy. It was also observed that all isolates from the recurrent episode were similar in that they shared the same toxin profile and same PCR ribotype as the isolates from the initial episode. However, among patients receiving allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, a high relapse rate (16.67%) was observed even when proper antibiotic treatment was employed^[21].

SEVERITY OF C. DIFFICILE DISEASE IN CHINA

Since no clear definition of severity has been associated with *C. difficile* infection in Chinese-based hospitals, an inconsistent description of infection severity often occurs and many studies often fail to describe severity associated with this infection. In one extreme report among 140 patients in the neurological ward, five cases (3.57%) were diagnosed with *C. difficile* infection. Four cases were described as severe or worse and only one case was classified as mild^[22]. Two out of these five patients died as a result of complications associated with severe *C. difficile* infection.

RISK FACTORS ASSOCIATED WITH C. DIFFICILE INFECTIONS IN CHINA

Underlying co-morbidity has been identified as a possible risk factor in *C. difficile* infections. Malignancy appears to contribute to an increased rate of *C. difficile* infections when compared to the general hospitalized population. In one study, among 21 patients with *C. difficile* infection in southern China, malignancy accounted for 10 cases (47.6%) compared with *C. difficile* infection in patients receiving surgery (8 cases; 38.1%) and chronic diseases of major organs (3 cases; 14%)^[10]. Poor health due to chronic illness appeared as another key factor in *C. difficile* infection

rates. In a study conducted in northern China, out of 36 cases of *C. difficile* infection, 28 patients (77.8%) presented with severe chronic illness^[26] and in another study, 30 out of 44 cases with *C. difficile* infection also suffered from chronic diseases^[27].

Another risk factor associated with increased *C. difficile* infection is the use of broad spectrum antibiotics, especially cephalosporins, broad-spectrum penicillin, quinolones and aminoglycosides^[10,11,28]. In China, antibiotics are readily available and are often over-prescribed; it is clear from most studies that use of more than one type of antibiotic may lead to *C. difficile* infection as part of the phenomenon called antibiotic associated diarrhea (AAD). It is hypothesized that the inappropriate use of antibiotics, especially the broad-spectrum antibiotics, causes a significant reduction of naturally-occurring gut flora, allowing opportunistic pathogens to colonize and possibly cause disease. *C. difficile*, being one of these opportunistic pathogens, secretes exotoxins. These exotoxins, when accompanied by the loss of gut flora and their ability to degrade these toxins, allows *C. difficile* toxins to bind intestinal epithelial cells and activate the downstream signaling pathway, leading to the aggregation of inflammatory cells and the massive release of inflammatory mediators. This cascade of events eventually results in edema or necrosis of the intestinal tract, which is presented as abdominal pain and diarrhea in the patient.

The immune status of the host may also contribute to increased *C. difficile* infection rates as was observed in patients receiving chemotherapy or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation^[13-15,24]. However, these results are also confounded by the fact that many of these patients are also receiving broad spectrum antibiotics at the time of *C. difficile* infection.

Other risk factors associated with increased *C. difficile* infections were identified as having residence in a nosocomial setting and the use of respiratory intubation and stomach intubation^[29] as these risk factors were associated with a high level of C reactive protein (CRP) and low level of albumin^[27]. However, there is a lack of strong clinical data to definitively support these relationships.

ENDEMIC C. DIFFICILE STRAINS IN CHINA

In one study conducted in hospitalized patients, among 56 isolates of *C. difficile* that were identified positive for toxins, 43 (77%) were positive for both toxin A and toxin B, 13 (23%) were negative for toxin A and positive for toxin B^[20]. Furthermore, neither

binary toxin nor TcdC deletion was identified in any of the isolates. As for the drug resistance of these 56 *C. difficile* isolates, resistance to moxifloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, erythromycin, clindamycin, tetracycline and rifampicin was found in 46.4%, 100%, 60.7%, 71.4%, 71.4%, 35.7% and 25.0% of the isolates, respectively, and all strains were susceptible to metronidazole, vancomycin, meropenem and piperacillin/tazobactam. Fourteen different ribotypes were identified, a specific clone, SH II, accounted for 25% of isolates whereas no isolates belonged to ribotype 027. In a more recent study reported in two related manuscripts, 12 cases (10.7%) of *C. difficile* infection were identified from 112 patients with diarrhea in a general hospital in Beijing^[30,31]. Among these 12 patients, 8 (66.7%) were toxin positive; five were positive for both toxin A and toxin B while three were negative for toxin A but positive for toxin B. Various levels of drug resistance of eight toxic positive *C. difficile* isolates have been identified^[32]. Thirty-seven percent were identified as resistant to ampicillin, 87.5% to clindamycin, and 12.5% to metronidazole; however, none of the isolates from this study was resistant to vancomycin. These eight isolates were mapped onto four gene types with ZR I as the dominant type (62.5%)^[30,32].

TREATMENT OF *C. DIFFICILE* INFECTION

Discontinuation or a change in antibiotics, proton pump inhibitor (PPI) and other agents may be enough to rid of *C. difficile* associated diarrhea. In one study, Chen *et al.*^[10] documented that in 100% of patients (11/11) discontinuation of antibiotics eliminated mild *C. difficile* infection. Since the number of *Lactobacillus*, *Bifidobacteria*, and other naturally-occurring gut bacteria decreased significantly in patients with *C. difficile* infection^[24,33], prescription of probiotics such as *Live Bacillus Licheniformis* preparation Dral, *Bifid Lriple Viable*, and *Lostridium Butyricum*, *Miyarisan* may be beneficial^[14,24]. In one study, in all 10 symptomatic patients included in the study, pseudomembranous colitis disappeared after the use of *Live Bacillus Licheniformis* preparation Dral^[34]. In moderate or severe cases, gamma globulin, which may contain specific antibodies against toxins of *C. difficile*, has been prescribed^[35]. However, the most commonly used treatment was the addition of metronidazole due to its ability to inhibit bacterial DNA synthesis, and because it is easily affordable^[36]. However, due to gastrointestinal side effects, increasing drug resistance rate, and relative inefficiency of metronidazole, local physicians

in China typically prefer vancomycin over metronidazole, considering the fast-acting, high-efficacy, low recurrence and resistance rates of vancomycin^[10,13]. In one study, among 102 patients who developed diarrhea after receiving chemotherapy, 87 cases were positive for *C. difficile* and all were effectively treated with vancomycin^[15].

Chinese herbal medicine has commonly been used in clinical practice for *C. difficile* infection in China. One report treated 72 cases with antibiotic-associated colitis using a *Puerariae Radix*, *Scutellariae Radix*, and *Rhizoma Coptidis* decoction and showed that the disappearance of symptoms occurred faster in those who received the herbal remedy compared to control^[26]. In another study, total effective rate in the group that received Four Miraculous Drugs plus vancomycin was 93.33% while the total effective rate was 76.66% in the vancomycin alone group^[37]. Dai *et al.* also reached the same conclusion when using garlic preparations in the treatment of pseudomembranous colitis^[38].

CONCLUSION

The actual incidence of *C. difficile* infections in China is not known due to a lack of large-scale studies; however, easy to use and inexpensive diagnostic tests are needed for such studies. Some of the limited studies conducted so far suggest that the *C. difficile* infection rate in the general in-patient population may be lower than rates reported in the Western countries in recent years. However, *C. difficile* infection in high risk patients such as those in ICU and oncology service may be more prevalent. For *C. difficile* infections confirmed with laboratory tests, most are dual positive for both toxin A and toxin B, and positivity for only one toxin (toxin B) was also observed. No new toxin subtype has been identified. The antibiotic treatment for *C. difficile* infection is similar to what is used in the Western countries. Use of alternative approaches including herbal medications is reported in selected studies.

References

- [1] Vonberg RP, Kuijper EJ, Wilcox MH, Barbut F, Tull P, Gastmeier P, *et al.* Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(Suppl 5):2-20.
- [2] Mutters R, Nonnenmacher C, Susin C, Albrecht U, Kropatsch R, Schumacher S. Quantitative detection of *Clostridium difficile* in hospital environmental samples by real-time polymerase chain reaction. *J Hosp Infect* 2009;71:43-8.
- [3] Dubberke ER, Reske KA, Noble-Wang J, Thompson A, Killgore G, Mayfield J, *et al.* Prevalence of *Clostrid-*

- ium difficile environmental contamination and strain variability in multiple health care facilities. *Am J Infect Control* 2007;35:315-8.
- [4] Huang H, Wu S, Wang M, Zhang Y, Fang H, Palmgren AC, *et al.* Molecular and clinical characteristics of Clostridium difficile infection in a University Hospital in Shanghai, China. *Clin Infect Dis* 2008;47:1606-8.
- [5] Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Antimicrobial resistance in Clostridium difficile. *Int J Antimicrob Agents* 2009;34:516-22.
- [6] McDonald LC, Owings M, Jernigan DB. Clostridium difficile infection in patients discharged from US short-stay hospitals, 1996-2003. *Emerg Infect Dis* 2006;12:409-15.
- [7] Dubberke ER, Butler AM, Yokoe DS, Mayer J, Hota B, Mangino JE, *et al.* Multicenter study of Clostridium difficile infection rates from 2000 to 2006. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31:1030-7.
- [8] Kotila S, Virolainen A, Snellman M, Ibrahim S, Jalava J, O. L. Incidence, case fatality and genotypes causing Clostridium difficile infections, Finland, 2008. *Clin Microbiol Infect* 2010; doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03384.x. [Epub ahead of print].
- [9] Hensgens M, Goorhuis A, Notermans D, van Benthem B, Kuijper E. Changing epidemiology of infections in the Netherlands in 2008/09. *Ned Tijdschr Geneesk* 2010;154:1317.
- [10] Chen DM, Chen QG, Chen JX. 21 cases of Clostridium difficile colitis. *Guangdong Medical J (in Chinese)* 2000;21:519.
- [11] Wang W, Liu X. Clinical analysis of 36 cases of Clostridium difficile colitis. *Chin J Medicine (in Chinese)* 2004;39:32-3.
- [12] Yang YH, Zhang CP, Cai H. Investigation on the causes of intestinal bacterial flora imbalance and treatment of drug-resistant. *Chin J Nosocomiol (in Chinese)* 2006;16(1):83-5.
- [13] Du RL. Clinical study on chemotherapy-induced diarrhea. *Inner Mongolia Med J (in Chinese)* 2007;39:158-60.
- [14] Chen C, Qiu L. The study enteroflora and treatment of digestive tract chemotherapy-induced diarrhea. *Chin J Clin Gastroenterol (in Chinese)* 2006;18:89-90.
- [15] Jiang Z, Qiu L, Zhu X. Clinical research on norvancomycin treatment of chemotherapy-related diarrhea. *Chin J Intern Med (in Chinese)* 2003;42:869-70.
- [16] Gerding DN. Global epidemiology of Clostridium difficile infection in 2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010;31(Suppl 1):S32-S4.
- [17] Huang H, Fang H, Weintraub A, Nord CE. Distinct ribotypes and rates of antimicrobial drug resistance in Clostridium difficile from Shanghai and Stockholm. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:1170-3.
- [18] Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Comparison of a commercial multiplex real-time PCR to the cell cytotoxicity neutralization assay for diagnosis of Clostridium difficile infections. *J Clin Microbiol* 2009;47:3729-31.
- [19] Huang H, Weintraub A, Fang H, Nord CE. Community acquired Clostridium difficile infection due to a moxifloxacin susceptible ribotype 027 strain. *Scand J Infect Dis* 2009;41:158-9.
- [20] Huang H, Wu S, Wang M, Zhang Y, Fang H, Palmgren AC, *et al.* Clostridium difficile infections in a Shanghai hospital: antimicrobial resistance, toxin profiles and ribotypes. *Int J Antimicrob Agents* 2009;33:339-42.
- [21] Yang Y, Zhang J, Cai H. Intestinal tract dysbacteriosis: causes, drug resistance and treatment investigation. *Chin J Nosocomiol (in Chinese)* 2006;16:83-5.
- [22] Chen W, Jin G, Liu Y. Report of Clostridium difficile infection in elderly patients in neurological department. *Military Med J South China (in Chinese)* 2001;15:13-5.
- [23] Liu X, Song J, Zhang X. Antibiotic-associated diarrhea in post-operative neurosurgical patients: clinical features, diagnosis and treatment of 36 cases. *Chin J Mod Med (in Chinese)* 2006;16:1235-41.
- [24] Jia JS, Huang XJ, Liu DH, Xiu LP, Zhang YC, Wu T, *et al.* Relationship between Clostridium difficile associated diarrhea and intestinal microecosystem disorder in patients received allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Exp Hematol* 2008;16:135-9.
- [25] Cai X, Lu D, SQ C. Changes of pathogens and antibiotic sensitivity in children with persistent and chronic diarrheal disease during a decade. *Clin Med of China (in Chinese)* 2001;17:634-5.
- [26] Wang Y. Integrated treatment of 72 cases with antibiotic-associated colitis. *Chin J Integrative Med (in Chinese)* 2003;23:586.
- [27] Huang Y, Nie Y. Clinic epidemic comparisons of Clostridium difficile-associated diarrhea with antibiotic-associated diarrhea. *J Guangdong Med Coll (in Chinese)* 2009;27:373-5.
- [28] Kuijper E, Barbut F, Brazier J. Update of Clostridium difficile infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill* 2008;13:18492.
- [29] Chen W, Jin G, Liu YY. Report on hospital outbreaks of Clostridium difficile infection in hospitalized elderly patients. *Chin J Nosocomiol (in Chinese)* 2001;11:23-4.
- [30] Cheng Y, Lu J, Yan S. Primary study on the gene typing, molecular characteristics of virulence and resistance associated gene of 12 Clostridium difficile clinical isolates in China. *Chin J Zoonoses (in Chinese)* 2009;25:401-5.
- [31] Cheng Y, Lu JX, Yan SK, Jia HB, Li WG. Study on toxin characteristics of Clostridium difficile isolated

- from hospital. *Dis Surv (in Chinese)* 2009;24:193-5.
- [32] Cheng Y, Lu J, Yan S. Study on drug resistance of *Clostridium difficile* isolated from hospital. *Dis Surv (in Chinese)* 2009;24:346-8.
- [33] Cao Y, Zhang X, Pan LJ. The clinical research between *Clostridium difficile* colonitis and intestinal microecosystem. *Chin J Mod Med (in Chinese)* 2002;12:47-51.
- [34] Xu X, Yang Z. Report on the treatment of Live Bacillus Licheniformis preparation Dral in 10 cases with pseudomembranous colitis after abdominal surgery. *J Qiqihar Med Coll (in Chinese)* 2001;22:1027.
- [35] Wei H, Wang K. Observation of high-dose intravenous gamma globulin treatment in children with antibiotic associated diarrhea. *Med J Qilu (in Chinese)* 2002;17:234.
- [36] Luan X, Wang J, Yang X. Clinical analysis in 28 patients with *clostridium difficile* colitis. *J Taishan Med Coll (in Chinese)* 2004;25:295-6.
- [37] He S, Yuan H. Integrated treatment of 60 cases with Pseudomembranous colitis. *Guangxi J Trad Chin Med (in Chinese)* 2006;29:22-3.
- [38] Dai T. Garlic preparations as an adjuvant of antipyretic dryingdampness agents for the treatment of Pseudomembranous Colitis. *J Hubei Univ Chin Med (in Chinese)* 2010;12.