

· 论 著 ·

艰难梭菌实验室不同检测方法的比较*

李 敏, 万 钢, 马小亮, 徐新民, 王慧珠, 华文浩[△]
(首都医科大学附属北京地坛医院检验科, 北京 100015)

摘要:目的 比较不同方法检测艰难梭菌(CD)的临床可行性。方法 选取 2016 年疑似抗菌药物相关腹泻患者大便标本, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)和鉴定培养基培养法进行检测, 比较两种检测方法的灵敏性、特异性和一致性。结果 ELISA 检出抗原阳性标本 29 例, 其中毒素阳性 25 例, 毒素阴性 4 例; 鉴定培养基培养法检出可疑菌株 29 例, 经质谱仪鉴定, 其结果为 CD28 例, 1 例未检出种属; ELISA 和鉴定培养基培养法的灵敏度和特异度分别为 97%、100% 和 93%、95%, 两者有极好的一致性($Kappa=0.92$)。结论 ELISA 具有快速、高效、省时、操作简单、判读容易等特点, 可快速准确地筛检 CD 相关性腹泻病患; 培养基培养法特异性好, 可以快速得到感染株; 二者联合使用可大大提高 CD 检出率, 并对后期治疗有很大帮助。

关键词:艰难梭菌; 酶联免疫吸附试验; 抗原; 毒素; 鉴定培养基

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.011

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)22-3102-03

Comparison of different laboratory detection methods of *Clostridium difficile**

LI Min, WANN Gang, MA Xiaoliang, XU Xinmin, WANG Huizhu, HUA Wenhao[△]

(Department of Clinical Laboratory, Affiliated Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China)

Abstract: **Objective** To compare the clinical feasibility of different methods for detecting *Clostridium difficile*(CD). **Methods** The stool samples were collected from the patients with suspected antibiotic-related diarrhea during 2016, and the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and identification medium culture method were used for detection. Then the sensitivity, specificity and consistency were compared between the two methods. **Results** 29 cases of antigen-positive specimens were measured by ELISA, including 25 cases of toxin-positive and 4 cases of toxin negative; 29 suspected strains were cultured by the selective identification medium, which were identified by the mass spectrometry as 28 strains of *Clostridium difficile* and 1 strain of undetected species; the sensitivity and specificity of ELISA method and identification culture medium method were 97%, 100% and 93%, 95% respectively, both methods showed extremely good consistency($Kappa=0.92$). **Conclusion** The ELISA method has the characteristics of fastness, high efficiency, time saving, simple operation, easy interpretation and so on, and can rapidly and accurately screen CD related diarrhea diseases; the medium culture method has a good specificity and can rapidly obtain the infectious strain; their combined use can greatly increase the CD detection rate and has great help for late treatment.

Key words: *clostridium difficile*; enzyme linked immunosorbent assay; antigen; toxin; identification medium

艰难梭菌(CD)又称难辨梭状芽孢杆菌,为厌氧性细菌,一般寄生于人的肠道内^[1]。CD对氨苄西林、头孢菌素、克林霉素、红霉素等耐药。过度使用这些抗菌药物,会引起菌群失调,使耐药的CD被药物选择出来并大量生长繁殖,大量释放毒素,从而引起伪膜性肠炎等炎症^[2]。随着抗菌药物过度使用问题的不断出现,CD相关性疾病的发病率呈上升趋势,甚至出现死亡病例^[3]。本研究对不同的CD检测方法进行比较分析,旨在为临床提供参考。

1 材料与与方法

1.1 标本来源 选取 2016 年本院疑似 CD 感染所致抗菌药物相关性腹泻患者大便标本 51 份作为研究对象。

1.2 试剂与仪器 CD 鉴定培养基购自上海梅里埃公司,CD 谷氨酸脱氢酶抗原及毒素检测试剂盒(批号 T30525C)购自美国 Techlab 公司,厌氧装置购自法国 BioMerieux 公司,微生物及生物战剂快速鉴定生物质谱仪 MALDI-TOF 购自德国布鲁克公司,标准菌株为 ATCC43255 菌株。

1.3 方法

1.3.1 酶联免疫吸附试验(ELISA) 取 750 μ L 标本稀释液于 1.5 mL 的 EP 管内,加一滴结合物,充分混匀标本;取 25 μ L 标本于加有稀释液和结合物的 EP 管内,震荡混匀;取 500 μ L

震荡混匀后的混合物加于反应板样本孔,充分渗透 15 min;加 300 μ L 缓冲液于反应孔,充分渗透后加两滴底物,10 min 内读取结果,并对结果进行重复确认。结果判断:出现两条线为抗原、毒素双阳性;出现左边一条线为抗原阳性、毒素阴性;只出现中间的一条线为抗原、毒素双阴性;出现右侧一条线为抗原阴性、毒素阳性。

1.3.2 难辨梭菌鉴定培养基培养 参考文献[4]将大便与无水酒精按 1:1 充分混匀,1 h 后取 500 μ L 混合物分区划线接种于鉴定培养基上。将接种后的培养基置于厌氧培养袋内,放置厌氧发生器,密封厌氧袋,置于 35 $^{\circ}$ C 培养 24~48 h。取黑色菌落涂片并作革兰染色镜检,可见革兰阳性芽孢杆菌,48 h 或传代后转为阴性。

1.3.3 质谱仪鉴定 利用质谱仪对可疑菌落进行质谱分析,确定菌株种属。

1.4 统计学处理 采用 SAS9.1 软件对 ELISA 和鉴定培养基培养法进行 $Kappa$ 一致性检验,并分别计算两种方法的灵敏度和特异度。

2 结果

2.1 ELISA 检测结果 抗原、毒素双阳性 25 例,检出率为 49%,其中 3 例原始标本毒素读板为阴性,但其培养阳性产物

* 基金项目:北京市医院管理局培育计划项目(PX2016025);首都医科大学附属北京地坛医院感染科国家临床重点专科项目。

作者简介:李敏,女,主管技师,主要从事病原微生物研究。 [△] 通信作者, E-mail: dtjykhua@126.com。

再次进行毒素检测时为阳性;抗原阳性而毒素阴性 4 例,检出率为 8%;抗原、毒素双阴性 22 例,检出率为 53%。

2.2 鉴定培养基培养结果 培养出可疑菌株 29 株,22 株未见可疑菌株。CD 鉴定培养基菌落见图 1,CD 革兰染色涂片结果见图 2。

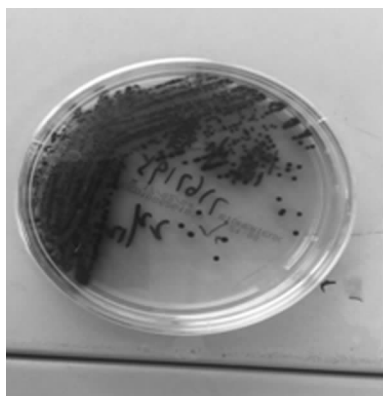


图 1 黑色、圆形或不规则菌落

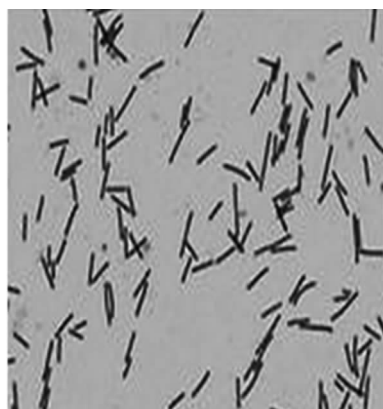


图 2 革兰阳性大杆菌(100×,油镜)

2.3 质谱仪鉴定结果 质谱仪鉴定 CD28 例,未检出种属 1 例。

2.4 两种方法检测结果比较 经一致性检验得到两种方法的 $Kappa$ 值为 0.92。ELISA 和鉴定培养基培养法的灵敏度和特异度分别为 97%、100%和 93%、95%。见表 1。

表 1 两种方法检测结果比较(n)

ELISA	鉴定培养基培养法		合计
	阳性	阴性	
阳性	28	1	29
阴性	1	21	22
合计	29	22	51

3 讨论

CD 广泛存在于自然环境中,如土壤、干草、沙及动物的粪便甚至自然水源中,一般消毒剂很难把其杀灭^[5]。CD 为新生儿正常菌群,50%左右的 12 月龄婴儿肠道中寄生有 CD,2 岁以上儿童带菌率约 3%,但健康成人中 CD 检出率并不高。CD 引起的相关性腹泻是由于服用大量抗菌药物后,打破了肠道内的菌群平衡,从而导致 CD 积累了大量数目,进而产生大量外毒素 A 和 B。外毒素 A 由肠道毒素和细胞毒素组成,可锁定肠道黏膜及细胞导致出血;外毒素 B 是一种细胞毒素,可锁定已经破坏的细胞导致更大的损伤。多数 CD 会产生这两种毒素,而不产生毒素的 CD 通常不会引起严重的腹泻。抗菌药物相关性腹泻依据严重程度不同可表现为轻度、自限性的腹泻,

也可表现为严重危及生命的假膜性肠炎。国内采取的药物干预主要为万古霉素联合甲硝唑^[6],另外还有尝试性使用菌群移植的方法^[7]。但是,严重患者即便给予万古霉素联合甲硝唑治疗依旧可能出现死亡病例,目前 CD 已经引起临床部门的高度重视^[8-10]。肠道菌群在维持人体平衡,包括代谢、免疫功能及肠道微生物平衡方面有重要的作用^[11-12],因此要运用适当的方法及时检测出失衡原因,并给予适当治疗。

ELISA 操作简便,对操作人员要求不高,一般检测人员在一级实验室就可进行检测。本研究结果显示:ELISA 检出的 CD 抗原、毒素双阳性结果,与鉴定培养基培养法和质谱仪鉴定结果一致;所有 CD 抗原阴性的标本,其毒素检测均为阴性,最终鉴定也均为阴性。这表明 ELISA 检测 CD 感染具有高效、快速的特点,且灵敏性、特异性较好。在确定为抗原、毒素双阳性的 25 份标本中,3 份原始标本毒素检测结果为阴性,但在后续培养中检出阳性菌株,且再次进行毒素检测时为阳性。结合临床症状,最终将这 3 份标本确定为毒素阳性,其原因可能是标本发生毒素降解,或者原始样本毒素滴度低于检出水平。检测结果为阴性的标本,建议多次送检标本,这样可以提高 CD 感染的阳性检出率^[13]。在今后研究中,本课题组将会继续增加扩大标本来源,对不产毒株是否会导致患者出现腹泻症状进行深入研究。

培养基培养法具有特异性好,可比较容易获得病原学菌株,利于进行进一步分型及药敏方面的检测。本研究结果显示,CD 选择性培养基培养出阳性 29 例,其中 1 例在 ELISA 中检测结果为抗原、毒素双阴性,最终经质谱仪鉴定为未知菌株。由于该患者停止使用抗菌药物后迅速痊愈,没有得到后续标本,因此无法确定其病原体是变异株还是未知新菌株。经一致性检验,ELISA 和培养基培养法有极好的一致性,每一方法单独进行检测就可以很好地完成临床需求。但是鉴于耐药株的出现,建议有条件的医院联合使用两种方法,进一步准确确定是否感染产毒株,以便及时发现、及时治疗、防止疾病扩散。

综上所述,ELISA 具有快速、高效、省时、操作简单、判读容易等特点,可快速准确地筛检 CD 相关性腹泻病患,培养基培养法特异性好,可以快速得到感染株,二者联合使用可大大提高 CD 检出率,并对后期治疗有很大帮助。考虑抗菌药物相关性腹泻还有其他微生物参与的可能,本课题将会进一步确定更全面的检测方法,以呈现抗菌药物相关性腹泻更广谱的病原菌。

参考文献

- [1] 周庭银. 临床微生物学诊断与图解[M]. 3 版. 上海:上海科学技术出版社,2012:304-306.
- [2] 陈东科,孙长贵. 实用临床微生物检验与图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:533.
- [3] Carroll KC, Bartlett JG. Biology of clostridium difficile: implications for epidemiology and diagnosis[J]. Annu Rev Microbiol, 2011, 65: 501-521.
- [4] 周庭银,倪语星,胡继红,等. 临床微生物检验标准化操作指导[M]. 3 版. 上海:上海科技出版社,2015:508-509.
- [5] 杨雪妹,吴允孚. 艰难梭菌感染的流行病学和诊治进展[J]. 中国感染与化疗杂志,2013,13(4):312-316.
- [6] 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.
- [7] 李宁,菌群移植治疗肠道疾病 406 例疗效分析[J]. 中外胃肠外科杂志,2017,(20):44-46. (下转第 3106 页)

技术方法提高了临床检测的有效性,但高昂的费用限制了它们的推广和普及。

本研究联合应用 G 显带技术和 MLPA 技术检测发育异常患儿,结果显示:87 例患者中有 22 例存在染色体核型异常,异常率为 25.3%;39 例正常男性(46,XY)中有 6 例存在 Y 染色体微缺失或微重复(SRY 基因均为阳性),异常率为 15.4%,与相关文献 14% 的检出率相近^[6];异常区域主要包括 DAZ、BPY、CDY,临床表现多为小阴茎或性腺发育不全;1 例正常男性(46,XY)发现 SHOX 调控区异常,1 例正常女性(46,XX)发现 NF1 基因异常。有研究表明 SHOX 基因与矮小症、骨骼畸形有关^[10],患儿的临床表征即为身材矮小,与本检测结果相符。NF1 为肿瘤抑制基因,自发突变率很高,且未发现明确的突变热点。该基因可能与神经纤维瘤、多发咖啡斑等疾病有关^[11],其是否可作为诊断标准或预后评估仍需要进一步的研究证实。

本研究中有 9 例性腺发育不全患者存在染色体核型异常,其中 6 例为 46,XY,小 Y 染色体。有研究认为小 Y 染色体是 Y 异染色质部分或完全丢失,导致常染色质排列松散,造成其基因功能丧失;也有研究认为小 Y 染色体是 Y 染色质排列过度紧密影响其基因功能发挥^[12]。本研究发现,6 例患儿 Y 染色体拷贝数与正常男性无差异(SRY 基因均为阳性),其可能是 Y 染色质结构过度紧密造成,需应用其他检测技术进一步确定其致病原因和致病机理。

本研究结果显示 MLPA 检测结果与 G 显带核型分析具有很好的一致性,如:2 例 45,X 核型,其 MLPA 检测结果为无 Y 染色体拷贝,X 染色体拷贝数均低于正常女性;1 例 45,X/46,XY 嵌合型,其 MLPA 检测结果为 X、Y 染色体拷贝数均小于正常男、女性;2 例女性伴 46,XY 核型,其 MLPA 检测结果与正常男性一致;1 例男性 47,XXY 核型,其 MLPA 检测结果 Y 染色体拷贝数与正常男性一致,X 染色体与正常女性一致。对于嵌合型,应用 MLPA 技术检测能够更好地确定正常核型与异常核型所占的比例,判断临床症状的轻重程度,尽早诊断确定单一性别,有助于患儿通过手术或药物进行治疗,对于避免日后出现心理障碍、保证生活质量具有重要意义。

综上所述,染色体核型分析是性发育异常最基本的检测内容,MLPA 技术弥补了染色体核型分析低分辨率的不足。MLPA 技术联合染色体核型分析为临床诊断儿童发育异常提供了一条有效、准确的检测流程,有利于提高染色体异常的检出率和准确率。

参考文献

[1] Schoumn JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex

ligation-dependent probe amplification[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(12): e57.

[2] Pohovski LM, Dumic KK, Odak L, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability [J]. *Mol Cytogenet*, 2013, 6(1): 7-13.

[3] Bartnik M, Nowakowska B, Derwinnska K, et al. Application of array comparative genomic hybridization in 256 patients with developmental delay or intellectual disability [J]. *J Appl Genet*, 2014, 55(1): 125-144.

[4] Manolakos E, Vetro A, Kefalas K, et al. The use of array-CGH in a cohort of Greek children with developmental delay [J]. *Mol Cytogenet*, 2010, 3(1): 22-30.

[5] 王松涛, 潘虹, 裴珮等. MLPA 技术检测发育迟缓和智力障碍患儿的染色体微小重排的应用价值 [J]. *中华医学杂志*, 2014, 94(32): 2514-2518.

[6] Leona MP, Katja KD, Ljubica O, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification workflow for the detection of submicroscopic chromosomal abnormalities in patients with developmental delay/intellectual disability [J]. *Mol Cytogenet*, 2013, 6(1): 7.

[7] Bier De, White SJ. Genotyping multiallelic copy number variation with multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) [J]. *Method Mol Biol*, 2017, 1492(1): 147-153.

[8] 唐新华, 杨必成, 朱宝生, 等. 染色体核型分析与 BoBs 技术联合检测染色体异常和染色体微缺失综合征的产前诊断新模式的建立及应用 [J]. *中华妇产科杂志*, 2016, 51(5): 325-330.

[9] 王增阁, 郭奇伟, 周裕林. 染色体微缺失微重复综合征遗传检测的现状 & 展望 [J]. *中华检验医学杂志*, 2016, 39(6): 407-409.

[10] 谢理玲. 人矮小同源盒基因在身材矮小中的研究进展 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2014, 29(20): 1526-1527.

[11] 张佳, 李明, 姚志荣. 二例散发性 I 型神经纤维瘤病患儿的 NF1 基因突变分析 [J]. *中华医学遗传学杂志*, 2016, 33(2): 200-202.

[12] 黄海燕, 张香改, 高羽, 等. 117 例大小 Y 染色体临床意义分析 [J]. *中国计划生育学杂志*, 2007, 15(2): 105-107.

(收稿日期:2017-03-19 修回日期:2017-07-08)

(上接第 3103 页)

[8] Leffler DA, Lamont JJ. Clostridium difficile infection [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(3): 287-288.

[9] 林倩云, 费稼希, 陈烨. 艰难梭菌毒素致病基因调控机制和抗毒素治疗 [J]. *胃肠病学*, 2017, 22(1): 47-50.

[10] 谢玲林. 艰难梭菌感染的机制与防治进展 [J]. *基层医学论坛*, 2017, 21(1): 110-111.

[11] Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host bacterial mutualism in the intestine [J]. *Science*, 2005, 307(5717):

1915-1920.

[12] Ley RE, Peterson DA, Gordon JL. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine [J]. *Cell*, 2006, 124(4): 837-848.

[13] 廖亚龙, 侯铁英, 邵裕燊, 等. 艰难梭菌感染临床特征与危险因素分析 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(21): 4837-4840.

(收稿日期:2017-03-28 修回日期:2017-07-17)