

艰难梭菌感染的检测技术

复旦大学附属中山医院
微生物实验室
鲍容

环境检测?
病原体检测?

病毒?
细菌?

病区内多人腹泻, 怎么办?

艰难梭菌?
如何证实?

复旦大学附属中山医院微生物实验室

艰难梭菌

(*Clostridium difficile*, CD)

- 专性厌氧
- 革兰阳性杆菌
- 有动力 (鞭毛), 无荚膜
- 芽孢: 菌体次极端。能耐受干燥、热和许多消毒剂。
- 储菌源: 人、动物和环境。
- 毒素: 毒素A, 毒素B, 二元毒素。

艰难梭菌毒素

- 毒素A和B, 由染色体基因tcdA和tcdB编码, 是致病性决定区PaLoc的一部分, 尤其存在于致病性艰难梭菌。
- 毒素A(toxin A): 有肠毒性和细胞毒性。通过粘附上皮细胞cAMP系统使水和盐分泌增加导致分泌性腹泻, 甚至引起粘膜出血。
- 毒素B (toxin B): 细胞毒素, 无肠毒素作用, 可直接损伤肠壁细胞, 引起炎症反应, 导致渗出性腹泻。
- 二元毒素(the binary toxin): 某些菌株存在, 由cdtA和cdtB基因编码, 位于PaLoc 外侧细菌染色体上。发病机制复杂。

美国每年因艰难梭菌感染导致 15,000至20,000人死亡!

Year	Hospitalizations
2001	14887
2002	18588
2003	20042
2004	24617
2005	30113
2006	32705
2007	32922
2008	34850
2009	33541
2010	34805

- 定植5%健康成人, 30-70%婴儿。
- 25-30%抗生素相关腹泻。
- 2006-2010年艰难梭菌结肠炎发生率增加47%。

图2. 美国艰难梭菌结肠炎患者住院情况。

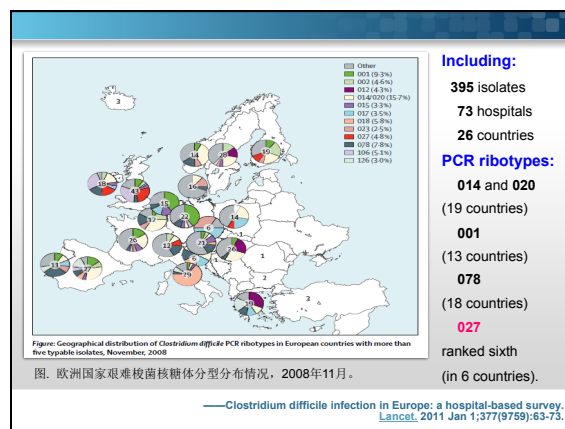
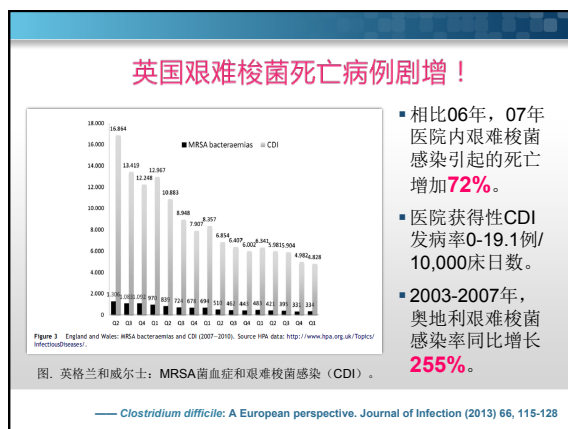
— Clostridium Difficile Colitis in the United States: A Decade of Trends, Outcomes, Risk Factors for Colectomy, and Mortality after Colectomy. J Am Coll Surg (2013) 217:802-812.

2001-2010年美国住院病人艰难梭菌感染情况

Year	Overall	Principal CDI	Secondary CDI
2001	4.5	3.4	1.1
2002	5.5	4.5	1.0
2003	6.5	5.0	1.5
2004	7.5	5.5	2.0
2005	7.5	5.5	2.0
2006	7.0	5.0	2.0
2007	7.5	5.5	2.0
2008	8.6	5.5	3.1
2009	8.2	5.5	2.7
2010	8.2	5.5	2.7

图1. Clostridium difficile infection (CDI) incidence among hospitalized adults in the United States (N = 2,196,446 CDI discharges). Error bars indicate 95% confidence intervals.

— American Journal of Infection Control 42 (2014) 1028-32



“超级臭虫”国外现身

国内艰难梭菌感染现状?

我国流行病学现状

由于艰难梭菌属于绝对厌氧菌, 分离培养技术要求非常高, 耗时长, 直到2012年, 我国才有国家食品药品监督管理网 (SFDA) 批准的酶免疫检测试剂盒上市。因此, 迄今国内仅有少数几家医院将艰难梭菌的检测列入临床微生物科的常规检测项目, 其他相关研究较少。

虽然缺乏全国性的监测资料, 但一些研究者的报道提示, CDI在我国并不少见, 重症感染亦有报道。黄海辉等对复旦大学附属华山医院的调查结果显示, 2007-2009年医院获得性CDI发病率为13.0-17.1/10000入院患者。李兰娟等报道, 在浙江大学医学院附属第一医院, CDI占医院感染性腹泻的30.7%。陈文平等报道, 在该院神经内科病房5例CDI中, 4例为重症感染, 其中1例为假膜性肠炎, 治疗后可痊愈, 2例死亡。黄耀宗等报道, 以急性肠病 (IBD) 合并CDI率为12.3%, 且感染率随着IBD病程进展的上升而增高。但目前为止, 中国地区很少有暴发流行的报道, 而且分离菌株以核糖体分型017型最为常见, 未有高毒力的302型菌株报道。

ICU-Onset Clostridium difficile Infection in a University Hospital in China: A Prospective Cohort Study

Xiaohui Wang^{1,2}, Lin Cai³, Ruijia Yu^{1,2}, Wenzhi Huang³, Zhiyong Zong^{1,2,4*}

1.Center of Infectious Diseases, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, China, 2.Division of Infectious Diseases, State Key Laboratory of Biopharmacy, Chengdu, China, 3.Department of Intensive Care Unit, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, China, 4.Department of Infectious Control, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, China.

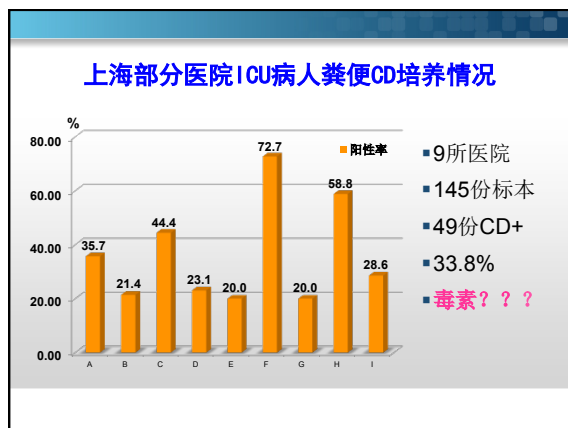
Abstract Journal of Medical and Biolog Research (2014) 4:71-72. 1930-1090. <http://dx.doi.org/10.15674/14-431X20140320> PMID: 24344374.

Factors associated with Clostridium difficile diarrhea in a hospital in Beijing, China

Z. Lv, G.L. Peng and J.R. Su
Clinical Laboratory Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing, China.

- There were 1,277 patients in the ICU during the study period and 124 (9.7%) developed ICU-onset diarrhea, of which 31 patients had CDI. The incidence of ICU-onset CDI was 25.2 cases per 10,000 ICU days.
- Center of Infectious Diseases, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, China.

- Medical charts of a total of 130 inpatients (62 males and 68 females) with hospital-acquired diarrhea (45 with CDAD; 85 without CDAD) were retrospectively reviewed.



目的

- 何为艰难梭菌?
- 实验室检测方法哪些?
- 不同方法特点?
- 最新指南推荐?

复旦大学附属中山医院微生物实验室

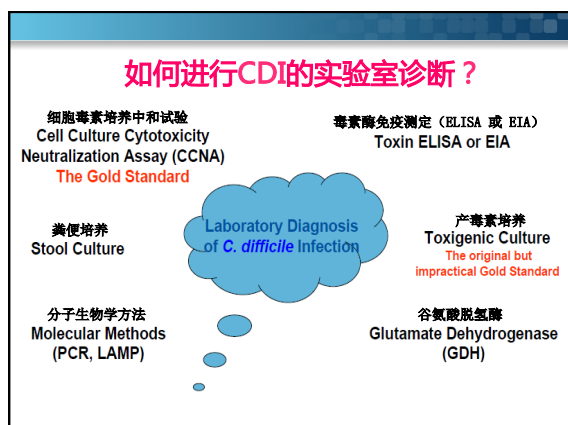
艰难梭菌“年鉴”

Author	Published	Findings
Finney	Johns Hopkins Med J 1893; 4: 53-5.	First description of pseudomembranous colitis (PMC).
Hall JC	Am J Dis Child 1935;49: 390-402.	First described <i>C. difficile</i> as a colonizing organism in children.
Hafiz S	1974	The presence of <i>C. difficile</i> in environmental sites and in animal dung .
Bartlett, Larson	1977-1978	The identification of <i>C. difficile</i> and its toxins as the causative agent of PMC .
Banno	1982-1983	Detection of toxins A and B .

—Clostridium difficile 30 years on: what has, or has not, changed and why? International Journal of Antimicrobial Agents 33, S1(2009) S2-S8

艰难梭菌诊断

Author	Published	Findings
Chang TW	Infect Immun; 1978;20:526-9.	The cell cytotoxicity assay .
George WL	J Clin Microbiol 1979;9:214-9.	Selective media containing cycloserine and cefoxitin for the culture of <i>C. difficile</i> from stool.
Lyerly DM	J Clin Microbiol 1983;17:72-8	The enzyme immunoassay for toxin A.
Lyerly DM	J Clin Microbiol 1991;29:2639-42	Detect glutamate dehydrogenase .
Kato N et al	J Infect Dis 1993;167:455-8	PCR for the detection of <i>C. difficile</i> in stool
Ticehurst JR	J Clin Microbiol 2006;44:1145-9	Two-step algorithm .
Sloan LM	J Clin Microbiol 2008;46:1996-2001	Real-time PCR .



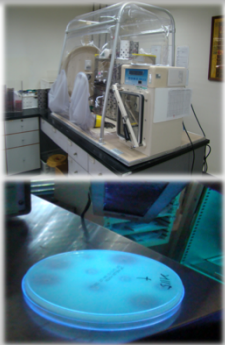
粪便培养

- **选择性培养基**
CCFA(cycloserine-cefoxitin-fructose agar): 环丝氨酸、头孢西丁和果糖。
✓ 环丝氨酸、头孢西丁抑制粪便标本中大部分的肠杆菌科细菌、葡萄球菌和链球菌的生长。
- **增菌液体培养基 (Enrichment broth)** : 环丝氨酸-头孢西丁-甘露醇液体培养基+牛磺胆酸盐, 溶菌酶和半胱氨酸
✓ 牛磺胆酸盐可以促进CD孢子萌发。半胱氨酸氢氯化物促进CD生长。
- **比较**: CCFA: 常见艰难梭菌厌氧菌培养接种法。
增菌液体培养基: 比CCFA检测率增加**20%**, 减少**30%**的污染率, 但至少增加**24h**的检测时间。

—Impact of strain type on detection of toxigenic *Clostridium difficile*: comparison of molecular diagnostic and enzyme immunoassay approaches. J Clin Microbiol 2010;48:3719-24.

粪便CD培养

- 培养时间: **2-5 days**
- 培养条件: **厌氧**环境
- 生长温度: 30℃~37℃
- 菌落特点: 扁平、黄色, 毛玻璃状菌落, 周边有黄色的环, 有特殊的马厩味, 菌落在紫外线照射下可见**黄绿色荧光**
- 革兰染色, 生化鉴定

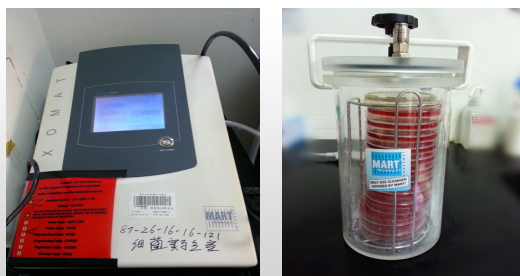


chromID琼脂选择性培养基

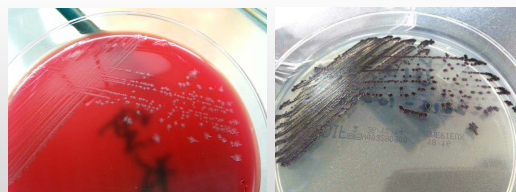
与传统培养基相比

- **快速检测、鉴定CD可能性增大, 菌落呈黑色。**
- **便于发现CD, 提高检出率, 节省分离、鉴定时间。**
- **价格略贵。**

CD培养-厌氧系统 & 厌氧罐

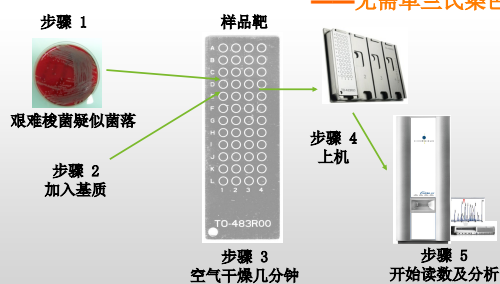


CD菌落-血平板 vs 显色平板



MALDI-TOF, MS鉴定

——无需革兰氏染色



粪便培养



- **结合毒素培养** (toxigenic culture, TC), 即细菌培养后进行毒素检测, 作为**诊断CDI的参考方法**。
- **收集CD菌株**最重要手段
- 有利于耐药监测。



- 不能区分产毒素和非产毒性的细菌。
- **操作繁琐, 成本高, 报告结果时间长。**
- 不易于实验室开展作为CDI的主要诊断方法。

产毒素培养 (toxigenic culture, TC)

▪ 方法:

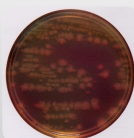
粪便 → 50%酒精 → 铺于CCYE平板 → 培养48小时后检查生长情况 → 平板上克隆转至液体培养基培养48小时 → 离心 → 上清液加入细胞培养皿 → 检查对细胞的毒性作用



- 用于分子分型, 毒力因子的研究, 以及耐药情况的监测。
- **可作为评价其他检测方法的标准。**



- 操作繁琐, 不适用于临床检测。



细胞毒素培养中和试验

(cell culture cytotoxin neutralization, CCGN)

- **检测标本:** 粪便标本或培养后的菌株

- **直接检测毒素B**

▪ 方法:

粪便 → 使用PBS进行1.5倍的稀释 → 离心 → 上清液加入到细胞培养皿中 → 共培养24 ~ 48小时 → 检查对细胞的毒性作用

细胞毒素中和试验

- ☺ **特异性高** (85-100%)，CDI诊断**金标准**。
- ☹ **敏感性比较：**
与培养法相比，敏感率为**66.7%**。
与TC相比，敏感率为**67%**。
- ☹ **操作过程复杂**，耗时长，费人力。
- ☹ **报告时间：** **48-72h**。

— J Clin Microbiol 2009, 47:3211-7
Ann Intern Med 2009, 151: 176-9

毒素酶免疫测定——EIA assay

EIA toxin A or toxin A/B试剂盒

第一代, toxin A only
第二代, toxin A + toxin B



- ☺ **快速**，操作简单，成本较低。
- ☺ **特异性75-100%**，可用于实验室常规检测。
- ☹ **敏感性低**，63-94%。以液体培养基增菌后TC为参考方法，EIA 敏感率**<60%**。
- ☹ 对于大量**血便**的样本容易出现**假阳性**结果。
- ☹ 由于毒素的降解，不能进行重复试验

— J Clin Microbiol 2009, 47:3211-17
J Clin Microbiol 2008, 46:3833-35

Premier™ Toxins A&B

- 检测毒素A/B
- 操作简便、快速
- 96孔微量板，可用于大样本操作



ImmunoCard Toxins A&B

- 同时检测毒素A & B
- 15 分钟内可得到检验结果
- 标本不需要前处理，试剂不需要稀释，结果易读
- 可及时进行单个操作使用，每个操作卡片自带质控



Vidas难辨梭菌毒素A&B检测试剂盒（梅里埃）

- 60 个测试
- 定性
- 75 分钟
- 标本量：200 μl
- 离心：5 分钟，12,000倍
- 标本：粪便
- 与细胞毒方法比较，：
- 特异性：99.8 %
- 与生物梅里埃全线产品配合使用：ChromID艰难梭菌彩色培养基，Vidas GDH，药敏鉴定(ATB/B-test)，菌株分型(Diversilab)



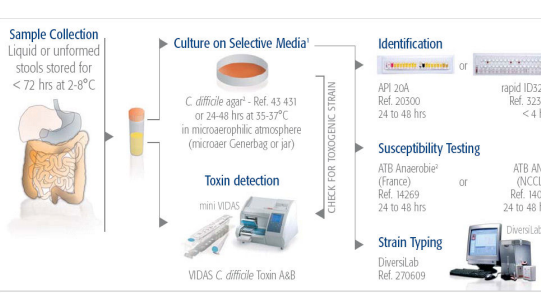
迄今为止，国内**唯一**获得国家药监局CFDA注册证的艰难梭菌毒素检测试剂

梅里埃对CD的Total solution方案

为难辨梭菌 (C. difficile) 检测提供完全的方案

毒素检测	VIDAS® C. difficile Toxin A & B	Ref. 30118
培养	Clostridium difficile Agar	Ref. 43431 ¹
鉴定	API® 20A & rapid ID 32A	Ref. 20300/32300
敏感性测试	ATB™ ANA ² /ATB ANAEROBIE ³	Ref. 14269 ¹ /14001 ¹
菌株分型	Diversilab® Clostridium difficile	Ref. 270609

¹ 不在美国出售
² 美国临床实验室标准化委员会 (CLSI/NCCLS) 标准
³ 法国 CASPM 标准



Sample Collection
Liquid or unformed stools stored for < 72 hrs at 2-8°C

Culture on Selective Media¹
C. difficile agar² - Ref. 43 431 or 24-48 hrs at 35-37°C in microaerophilic atmosphere (microaer Generbag or jar)

Toxin detection
mini VIDAS VIDAS C. difficile Toxin A&B

Identification
API 20A Ref. 20300 24 to 48 hrs or rapid ID32 A Ref. 32300 < 4 hrs

Susceptibility Testing
ATB Anaerobie² (France) Ref. 14269 24 to 48 hrs or ATB ANA² (NCCLS) Ref. 14001 24 to 48 hrs

Strain Typing
Diversilab Ref. 270609

¹ Recommended by the ESGGD (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)
² Not sold in the US

抗原检测方法——GDH assay

GDH(谷氨酸脱氢酶)：可由产毒素和不产毒素的艰难梭菌以及其他的梭菌产生。

- ☺ **敏感性较高**，具有较高的阴性预测值。
- 与TC相比，GDH 检测敏感率为**87.6%**。Meta-analysis of GDH tests, 与TC相比， GDH检测敏感率**79.2%–98%**。
- **筛选试验**（大样本检测）。
- 作为**两步法**中的第一步检测手段，对粪便标本进行初筛。

- ☹ **特异性低**，低于毒素EIA和分子诊断方法。
- GDH阳性仅表示存在CD并不能区分是否毒株，阳性标本必须进行确诊试验。

— J Clin Microbiol 2009, 47:3211-17.
J Hosp Infect 2011;77:1-6.

C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE®

- 同时检测GDH和毒素A & B
- 独特的半透膜专利技术
- 结果报告在30分钟内
- 结果易于解释
- 敏感率中等(66.7%)特异性高(98.7%)



- ☺ **抗原+ 辅证艰难梭菌**
- ☺ **抗原+ 毒素+ 艰难梭菌存在，产毒素**
- ☹ **抗原- 毒素- 不存在艰难梭菌**

分子生物学检测——PCR

- ☺ **敏感性较高**，具有较高的阴性预测值。
- **毒素基因检测**，一个或多个基因。
- **报告时间短**。
- **费用较高**，需配备用于进行艰难梭菌诊断的设备。

快速检测，缩短病人住院时间，防止CDI医院感染暴发。
缩短CDI检测时间，降低实验室人员劳动力成本。

- ☹ 对于携带者检测阳性。
- **过度敏感**，及其少量的，不重要的基因残留可能被检测到

— J Clin Microbiol 2010, 48:124-30
J Clin Microbiol 2010, 48:4519-24

四种FDA认证的分子生物学检测方法特点

Table 40.3 Features of the four FDA cleared molecular assays available in the USA

Assay	Targets	Extraction	Internal control	TAT (min)	Cost/test (US \$) ^a	References
BD GeneOhm®	<i>tcdB</i>	Manual	Yes	75-90	25-49	[43, 45, 57, 64]
Prodesse ProGastro™	<i>tcdB</i>	EasyMag	Yes	180	25	[65, 66, 71]
GeneXpert®	<i>tcdB</i> nt 117 del <i>tcdC</i>	Automated (infinity platform)	Yes	29-45	45	[49, 54, 56, 67, 68]
illumigene®	<i>tcdA</i>	Manual	Yes	70	25-49	[69, 70]

tcdB toxin B gene, *tcdC* toxin C gene, nt nucleotide, del deletion, *tcdA* toxin A gene
^aPrices are variable and are negotiated based upon volume of testing

— Yi-Wei Tang, Charles W. Stratton. Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology, 2013

欧洲临床微生物学和传染性疾病学学会 (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) : data review and recommendations for diagnosing Clostridium difficile-infection (CDI).

- 将**产毒素培养法**作为参考方法进行比较：
 - 孔型EIAs（检测毒素A和B）敏感率为**66%**。
 - PCR方法敏感率为 **86%**，特异性为**97%**。
- **CDI诊断方法**：
 - 结合**两个阳性**检测结果 (EIA, GDH, and/or PCR) 。
 - 接受**任何阴性**检测结果，包括单一的EIA 毒素A/B检测（表明腹泻疾病并非由艰难梭菌所致）。

— Clin Microbiol Infect 2009, 15:1053-1066

Point-counterpoint: what is the current role of algorithmic approaches for diagnosis of Clostridium difficile infection?

- **美国微生物学会评论和实践指南**：
 - Recent commentaries and practice guidelines from (the American Society for Microbiology, **ASM**)

核酸扩增试验 (NAAT)，检测CDI具有高灵敏度和特异性，可能是**最好的**检测方法。

Nucleic acid amplification tests (NAATs), which typically show both high sensitivity and specificity for detection of CDI, may ultimately be the best tests.

— J Clin Microbiol 2010, 48:4347-4353

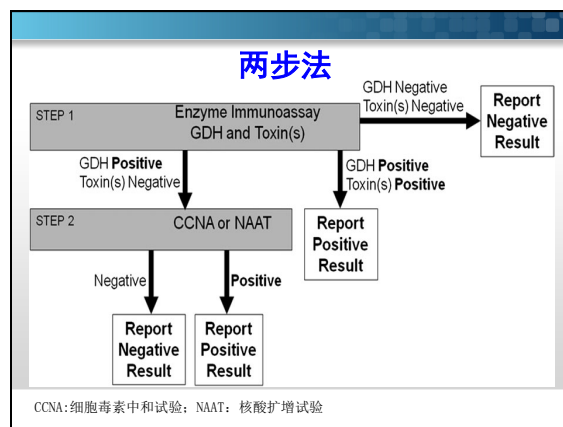
Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by美国医疗保健流行病学协会 (the Society for Healthcare Epidemiology of America, SHEA) and 美国传染病学会 (the Infectious Diseases Society of America, IDSA).

• CDI诊断:

两步法, 第一步以GDH为筛查试验, 第二步以CCCN确认, 或以细菌培养与产毒素培养相结合的方法进行确认。

由于EIA的检测缺乏敏感性, 不推荐其作为GDH检测阳性后的确认实验。

—Infect Control Hosp Epidemiol 2010, 31:431-455



检测艰难梭菌感染的五种方法比较

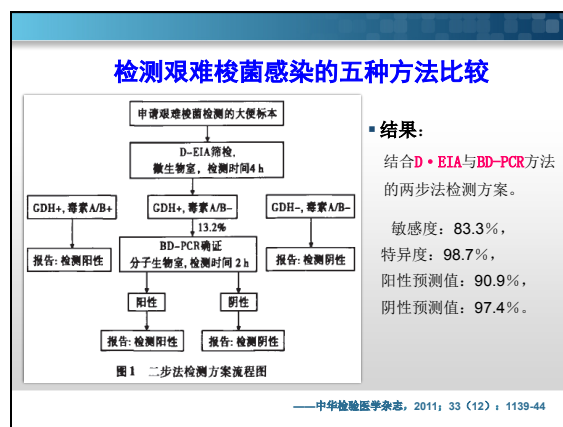
表1 不同检测方法与金标准 TCC 检测结果比较(份)

检测方法	TCC 检测		合计
	+	-	
A/B-EIA	15	1	16
+	9	149	158
-	16	2	18
D-EIA	8	148	156
+	20	2	22
-	4	148	152
BD-PCR	19	10	29
+	5	140	145
-			

目的: 选择1种适于**早期诊断**艰难梭菌感染的实验方案。

方法: **TGC (金标准, 参比标准)**
Premier Toxin A&B EIA(A/B, EIA)
C. Diff Quick ChekComplete(D-EIA)
BD GeneOhm Cdiff assay(BD-PCR)
实验室发展的PCR(LD-PCR)

—中华检验医学杂志, 2011; 33 (12): 1139-44



小结

- 细菌培养:** 敏感性高, 特异性低, 操作繁琐, 耗时, 不易区分产毒素和非产毒性的细菌。结合**毒素培养**可替代CCCN作为CDI诊断**参考方法**。
- 细胞毒素培养中和试验 (CCCN Test):** CDI诊断**金标准**。特异性高, 敏感性随毒素降解而降低。操作复杂。
- EIA toxin A or A/B:** 特异性较高, 但敏感性低, **不能作为一个单独的试验诊断CDI**。
- GDH Assays:** 敏感性较高, 可用于**筛选试验**。特异性低, GDH阳性仅代表存在CD并不能区分产毒株。

小结

- **产毒素培养**：不适用于临床检测，但可作为评价其他检测方法的标准。
- **PCR**：快速、敏感、特异。但**成本高**，在被推荐为常规检测前需积累更多的实际应用的数据。
- **两步法/三步法**：取长补短，选择多样。或许是获得**最佳诊断**的优选方法。

艰难梭菌的诊断试验

试验	敏感性	特异性	实用性	费用	适用范围
细菌培养	低	中等	有限	\$ 5 - 10	不用于诊断；只有产毒株导致疾病。
毒素培养	高	高	有限	\$ 5 - 10	参考方法；流行病学工具；诊断CD有限。
细胞毒素培养中和试验	高	高	有限	\$ 5 - 25	参考方法；诊断CD有限。
GDH	高	低	广泛	\$ 5 - 15	作为筛选试验；诊断须经确认试验。
毒素酶免疫测定	低	高	广泛	\$ 5 - 15	须检测毒素A+B；灵敏度低。
核酸扩增试验	高	高	广泛	\$ 20 - 50	仅于急性疾病；警惕误报问题。

— Guidelines for Diagnosis, Treatment, and Prevention of Clostridium difficile Infections. Am J Gastroenterol 2013; 108:478-498

2013美国CDI诊治及预防指南：总结和推荐强度

诊断测试

1. 只有腹泻病人的粪便应检测艰难梭菌。（强烈推荐，高质量证据）
2. 艰难梭菌毒素基因核酸扩增试验（NAAT）如PCR，优于毒素A+B酶免疫测定，作为诊断CDI的标准。（强烈推荐，中等质量的证据）
3. 难辨梭菌谷氨酸脱氢酶（GDH）检测可以用在两步法或三步法中的筛选步骤，与随后毒素A和B（EIA）测试一起进行CDI诊断，但其敏感性低于核酸扩增试验。（强烈推荐，中等质量的证据）
4. 鼓励重复测试。（强烈推荐，中等质量的证据）
5. 不应该作为治愈的测试。（强烈推荐，中等质量的证据）

— Guidelines for Diagnosis, Treatment, and Prevention of Clostridium difficile Infections. Am J Gastroenterol 2013; 108:478-498

谢谢！

