by Inhibiting CD8+ T Cell Function[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz),2022,70(1):25.
[7] CAI X, EBELL M H, HAINES L. Accuracy of Signs, Symptoms, and Hematologic Parameters for the Diagnosis of Infectious Mononucleosis: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. J Am Board Fam Med,2021,34(6):1141-1156.
[8] 张之南,沈悌.血液病诊断及疗效标准[M].北京:科学出版社,2007:152-154.
[9] MING Y, CHENG S, CHEN Z, et al. Infectious mononucleosis in children and differences in biomarker levels and other features between disease caused by Epstein-Barr virus and other pathogens: a single-center retrospective study in China[J]. Peer J,2023,11:15071.
[10] ZHAO L, WANG H, WEI H X, et al. The pathophysiologic significance of lymphocyte subset determination in children with infectious mononucleosis, mycoplasma pneumonia and Henoch-Schönlein purpura[J]. BMC Pediatr,2022 ,22(1):698.
[11] YE W, ZHANG W, WU S, et al. Study of surface activation markers on CD3- CD16+ NK cells and their correlation with clinical manifestations in children with infectious mononucleosis[J]. Microbiol Immunol,2021,65(9):400-404.
[12] YANG D, GONG Z, YE C, et al. Positive correlation between VCA-IgM and Th1/Th2 immunocytokines in children with infectious mononucleosis[J]. Am J Transl Res,2022,14(10): 7578-7584.
[13] YAN Z, YAO Z, WANG H, et al. Plasma EBV-DNA and peripheral blood mononuclear cell EBV-DNA have disparate clinical relevance in patients with extranodal NK/T-cell lymphoma[J]. J Clin Virol,2022,157:105320.
[14] WANG Y, YANG J, WEN Y. Lessons from Epstein-Barr virus DNA detection in cerebrospinal fluid as a diagnostic tool for EBV-induced central nervous system dysfunction among HIV-positive patients[J]. Biomed Pharmacother,2022,145:112392.
[15] MIURA M, SHIMIZU H, SAITO D, et al. Multicenter, cross-sectional, observational study on Epstein-Barr viral infection status and thiopurine use by age group in patients with inflammatory bowel disease in Japan (EBISU study)[J]. J Gastroenterol,2021,56(12):1080-1091.
[16] WANG Y, LUO Y, TANG G, et al. HLA-DR Expression Level in CD8+ T Cells Correlates With the Severity of Children With Acute Infectious Mononucleosis[J]. Front Immunol,2021,12:753290.
[17] 李海霞,陶永明,赵秋霞,等.传染性单核细胞增多症患儿调节性T细胞与EB病毒DNA浓度的相关性研究[J].实用临床医药杂志,2021,25(15):98-101.
[18] 徐晓梅,高健,陈必全.热毒宁联合阿糖腺苷治疗传染性单核细胞增多症患儿的临床效果及对T淋巴细胞亚群和炎症因子水平的影响[J].中国医药,2021,16(12):1874-1877.
[19] 李慧,刘晶,杨金英.传染性单核细胞增多症患儿外周血T淋巴细胞亚群变化及其临床意义[J].海南医学,2023,34(9):1295-1299.

收稿日期:2023-10-25
(本文编辑:吴迪汉)

老年住院患者艰难梭菌定植情况、流行病学特征及定植危险因素分析

杜恒超

【关键词】 老年人;艰难梭菌;定植;流行病学;危险因素
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.02.033
【中图分类号】 R516;R181.3　**【文献标志码】** A　**【文章编号】** 1671-0800(2024)02-0257-04

艰难梭菌是梭菌属中的一种专性厌氧、有芽孢、产毒素的革兰阳性粗大杆菌,生长营养要求较高,分离培养困难,多栖生在肠道内,可通过粪口途径引发外源性感染,还可在使用大量抗菌药物后由肠道艰难梭菌引发内源性感染[1-2]。研究显示[3],约25%的抗生素相关性腹泻、75%的抗生素相关性肠炎及近100%的假膜性肠炎由艰难梭菌引起。本研究拟分析老年住院患者艰难梭菌定植情况、流行病学特征及定植危险因素,以期为艰难梭菌感染的防控提供依据,现报道如下。

1　资料与方法

1.1　临床资料　收集2022年1—12月浙江省荣军医院收治入院的老年住院患者300例,纳入标准:(1)年龄≥65岁;(2)病例资料完整者。排除标准:无粪便或不接受粪便检测者。其中男197例,女103例;年龄66～97岁,平均(86.2±9.6)岁。本研究获得浙江省荣军医院人体研究伦理委员会批准,所有研究对象均同意参加本研究并签署书面知情同意书。

基金项目: 嘉兴市科技计划项目(2022A030124)
作者单位: 314000 浙江省嘉兴,浙江省荣军医院
通信作者: 杜恒超,Email:413719333@qq.com

1.2 方法

1.2.1 艰难梭菌的采集与鉴定 患者入院后均采集其粪便标本，每份粪便样本≥3 mg，将粪便样本按照每份 1 mg 分装，取 1 mg 粪便标本置于离心管内，并向离心管内注入等体积的无水乙醇，充分震荡后，静置 30 min，3 500 r/min，离心 15 min，弃去上清液，将沉淀物接种于艰难梭菌鉴定（identification of clostridium difficile，CDIF）选择性培养基上，35 ℃温箱厌氧孵育 48 h，根据艰难梭菌的扁平状菌落、镜下革兰染色细菌形态及芽孢位置、马厩性气味等特征挑选可疑菌落，使用梅里埃 VITEK MS IND MALDI TOF 质谱系统（matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry，MALDI-TOF-MS）进行鉴定，鉴定为艰难梭菌阳性的菌株接种于平板上，37 ℃下厌氧培养 48 h，并进行纯化、分离，保存艰难梭菌菌株[4]。

1.2.2 DNA 的提取 将培养 1 ～ 2 d 的艰难梭菌菌落置于无菌 0.9%氯化钠注射液中制成 0.5 麦氏浊度的菌悬液，以 10 000 r/min，离心 1 min，弃去上清液，并加入 180 μl 的裂解液，混匀，加入 200 mg/ml 的溶菌酶 20 μl，将浓度调整至 20 mg/ml，37℃下孵育 30 min，转至赛默飞世尔核酸自动提取仪提取核酸，所有操作严格按照说明书进行[5]。

1.2.3 艰难梭菌毒素检测 参考文献[6-7]设计毒素 A、B 的基因引物，见表 1。反应体系：体积为 25 μl，含 12.5 μl 的 2×Tap Master Mix1，10 pmol 引物；反应程序：94 ℃热启动 5 min、94 ℃变性 40 s、52 ℃退火 40 s、72 ℃延伸 40 s，共循环 30 次后，72 ℃再延伸 10 min。所得产物经 1%琼脂糖凝胶电泳，电压 110 V，时间 20 ～ 30 min，使用培清 JS-680D 全自动凝胶成像分析仪分析。

1.2.4 多位点序列分型（Multilocus sequence typing，MLST） 参考文献[8]选取 7 对看家基因引物（adk、atpA、dxr、glyA、recA、sodA 及 tpi）测序，引物序列见表 2。反应体系：25 μl 的 2×pfu Master Mix，上、下游引物（10 pmol/L）及 DNA 模板各 2 μl，19 μl 的 ddH_2O；反应程序：94 ℃ 15 min、94 ℃ 30 s、50 ℃ 40 s、72 ℃ 70 s、共循环 35 次后，72 ℃再延伸 5 min；扩增产物使用 ABI3730xl 全自动测序仪（美国应用生物系统公司）进行测序，测序峰图使用 Cromas 软件进行分析。将每一份样品测定的 7 家基因序列提交到公用数据库（http://pubmlst.Org/Clostridium difficile）中比对，获得相应的等位基因谱和 ST 型。

1.2.5 信息采集 收集患者病例资料，包括年龄、性别、发热情况、基础疾病（高血压、糖尿病、高血脂及免疫功能低下）、白细胞计数、血清蛋白、血清肌酐、外科手术史、ICU 收治、住院时间、自理能力、失能时间、抗生素暴露、使用化疗药物、恶性肿瘤及肝硬化情况。

1.3 观察指标 （1）统计艰难梭菌定植率。（2）艰难梭菌毒素基因检测。（3）产毒艰难梭菌的 MLST 分型。（4）单因素分析老年住院患者艰难梭菌定植的危险因素。（5）多因素 Logistic 回归分析老年住院患者艰难梭菌定植的危险因素。

1.4 统计方法 数据采用 SPSS22.0 软件处理，计量资料以均数±标准差表示，采用 t 检验；计数资料采用 χ^2 检验。采用 Logistic 回归分析危险因素。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 艰难梭菌定植率 300 例患者粪便标本中，95 例患者发现艰难梭菌定植，定植率 31.67%。

2.2 艰难梭菌毒素基因检测 95 株艰难梭菌菌株中，非产毒艰难梭菌（毒素基因为 tcdA-/tcdB-）16 株（16.84%），产毒艰难梭菌 79 株（83.16%），产毒艰难梭菌中毒素基因为 tcdA+/tcdB+者 51 株（64.56%），毒素基因为 tcdA-/tcdB+者 28 株（35.44%）。

2.3 产毒艰难梭菌的 MLST 分型 79 株产毒艰难梭菌基因组 DNA 测序所得数据与数据库比较得出等位基因，共分析出 12 个 ST 型，其中 ST39 型最为常见，共 17 株（21.52%）；其次为 ST54 型 14 株（17.72%），剩余其他各型分别为 ST3 型 8 株（10.12%），ST81 型 8 株（10.12%），ST35 型 7 株（8.86%），ST99 型 7 株（8.86%），ST5 型 6 株（7.59%），ST42 型 5 株（6.33%），ST2 型 3 株（3.80%），ST278 型 2 株（2.53%），ST102 型 1 株（1.27%），ST294 型 1 株（1.27%）。

2.4 危险因素的单因素分析 患者年龄较大、免疫功能低下、住院时间长及抗生素暴露均为老年住院患者艰难梭菌定植的危险因素（均 $P < 0.05$），见表 3。

2.5 危险因素的多因素分析 经 Logistic 分析显示，年龄较大、免疫功能低下、住院时间长及抗生素

暴露是老年住院患者艰难梭菌定植的独立危险因素（均 $P < 0.05$），见表 4。

3　讨论

近年来，由于抗菌药物的大量使用，导致艰难梭菌等致病菌的耐药性日益增强，高毒力艰难梭菌菌株NAP1/027/BI的出现，致使艰难梭菌感染暴发，并在世界范围的流行，其高致病率及高死亡率引起广泛关注[9-10]。研究老年人群中艰难梭杆菌感染的分子学流行病学特征及危险因素，对艰难梭杆菌感染的临床防治具有重要意义。

本研究中，300 例粪便标本中，95 例患者发现艰难梭菌定植，定植率为 31.67%，高于钱娇等[11]研究中

表 1　艰难梭菌毒素检测所用引物

基因	引物	引物序列（5’→3’）	片段长度（bp）
tcdA	NK1	GGACATGGTAAAGATGAATTC	546
	NK2	CCCAATAGAAGATTCAATATTAAGCTT	
tcdB	NK104	GTGTAGCAATGAAAGTCCAAGTTTACGC	204
	NK105	CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACCT	

表 2　MLST 引物

基因	引物	引物序列（5’→3’）	片段长度（bp）
adk	adk1F	TTACTTGGACCTCCAGGTGC	635
	adk1R	TTTCCACTTCCTAAGGCTGC	
atpA	atpA1F	TGATGATTTAAGTAAACAAGCTG	674
	atpA1R	AATCATGAGTGAAGTCTTCTCC	
dxr	dxr3F	GCTACTTTCCATTCTATCTG	525
	dxr4R	CCAACTCTTTGTGCTATAAA	
glyA	glyA1F	ATAGCTGATGAGGTTGGAGC	625
	glyA1R	TTCTAGCCTTAGATTCTTCATC	
recA	recA2F	CAGTAATGAAATTGGGAGAAGC	705
	recA2R	ATTCAGCTTGCTTAAATGGTG	
sodA	sodA5F	CCAGTTGTCAATGTATTCATTTC	585
	sodA5R	ATAACTTCATTTGCTTTTACACC	
tpi	tpi2F	ATGAGAAAACCTATAATTGCAG	640
	tpi2R	TTGAAGGTTTAACACTTCCACC	

表 3　老年住院患者艰难梭菌定植危险因素单因素分析

因素	感染组（n=95）	未感染组（n=205）	$t(\chi^2)$值	P 值
性别[男/女，例]	64/31	133/72	（0.17）	＞ 0.05
年龄（岁）	88.5±5.0	85.2±5.2	5.17	＜ 0.05
发热[例（%）]	40（42.11）	79（38.54）	（0.34）	＞ 0.05
合并高血压[例（%）]	21（22.11）	37（18.05）	（0.68）	＞ 0.05
合并糖尿病[例（%）]	24（25.26）	40（19.51）	（1.27）	＞ 0.05
合并高血脂[例（%）]	19（21.05）	34（16.59）	（0.87）	＞ 0.05
免疫功能低下[例（%）]	24（25.26）	28（13.66）	（6.10）	＜ 0.05
白细胞计数（$\times 10^9$/L）	14.16±3.64	13.58±3.57	1.30	＞ 0.05
血清蛋白（g/L）	34.45±4.17	33.92±4.06	1.04	＞ 0.05
血清肌酐（μmol/L）	89.13±10.44	90.71±10.62	1.20	＞ 0.05
外科手术史[例（%）]	18（18.95）	33（16.10）	（0.37）	＞ 0.05
ICU 收治[例（%）]	29（30.53）	53（25.85）	（0.71）	＞ 0.05
住院时间（d）	41.78±8.13	23.14±7.62	19.29	＜ 0.05
自理能力（分）	60.73±10.11	62.45±9.83	1.39	＞ 0.05
失能时间（年）	1.03±0.36	0.97±0.25	1.67	＞ 0.05
抗生素暴露[例（%）]	43（45.26）	64（31.22）	（5.58）	＜ 0.05
使用化疗药物[例（%）]	9（9.47）	16（7.80）	（0.23）	＞ 0.05
恶性肿瘤[例（%）]	11（11.58）	19（9.27）	（0.38）	＞ 0.05
肝硬化[例（%）]	6（6.32）	8（3.90）	（0.85）	＞ 0.05

表 4　Logistic 回归分析老年住院患者艰难梭菌定植的独立危险因素

变量	β值	*SE* 值	Wald χ^2 值	*P* 值	*OR* 值(95%*CI*)
年龄较大	0.823	0.259	10.097	＜0.05	2.277(1.822 ～ 2.733)
免疫功能低下	0.768	0.274	7.856	＜0.05	2.155(1.715 ～ 2.596)
住院时间长	0.845	0.242	12.192	＜0.05	2.328(1.887 ～ 2.769)
抗生素暴露	0.705	0.285	6.119	＜0.05	2.024(1.682 ～ 2.366)
常量	12.467	2.145	33.781	—	—

28.6%的感染率，这可能与本研究对象为老年长期住院患者有关。本研究对艰难梭菌菌株进行毒素基因鉴定及 MLST 分型结果显示，与祁琪等[12]研究中基本一致。但国外研究显示[13]，产毒艰难梭菌常见 ST 型为 ST42 型、ST17 型、ST378 型。国内外研究中艰难梭菌常见 ST 型差距较大，说明不同国家艰难梭菌主导菌株差异较大。

本研究分析老年住院患者艰难梭菌感染的危险因素，结果显示，年龄较大、免疫功能低下、住院时间长及抗生素暴露是老年住院患者艰难梭菌定植的独立危险因素。说明年龄较大、免疫功能低下、住院时间长及抗生素暴露的老年住院患者是感染艰难梭菌的高危人群。其原因可能为：(1)老年患者随年龄增高，免疫衰退，机体免疫功能低下，难以抵抗细菌等致病微生物的入侵，机体难以及时清除衰老的死亡细胞，艰难梭菌感染风险较高。(2)长期住院患者多伴有自身免疫功能异常，可增加艰难梭菌感染风险。虞美玲等[14]研究显示，住院时间长是艰难梭菌感染的独立危险因素，与本研究基本一致。(3)抗生素暴露可对患者机体产生影响，导致肠道菌群失调，筛选或诱导出耐药菌株，艰难梭菌定植风险较高。

综上所述，老年住院患者艰难梭菌定植率较高，定植菌株多为产毒艰难梭菌，其基因型以ST39 型最为常见，其次为ST54 型；而年龄较大、免疫功能低下、住院时间长及抗生素暴露是老年住院患者艰难梭菌定植的独立危险因素，临床针对此类高危人群应及时采取干预措施。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

参　考　文　献

[1] DEANE J, FOUHY F, RONAN N J, et al. A multicentre analysis of clostridium difficile in persons with cystic fibrosis demonstrates that carriage may be transient and highly variable with respect to strain and level[J]. J Infect,2021,82(3):363-370.

[2] CANDEL-PEREZ C, SANTAELLA-PASCUAL J, ROS-BERRUEZO G, et al. Occurrence of clostridioides (clostridium) difficile in poultry giblets at slaughter and in retail pork and poultry meat in southeastern spain[J]. J Food Prot, 2021,84(2):310-314.

[3] DAI W, YANG T, YAN L,et al. Characteristics of clostridium difficile isolates and the burden of hospital-acquired clostridium difficile infection in a tertiary teaching hospital in chongqing, southwest China[J]. BMC Infect Dis,2020,20(1):277.

[4] AZRAD M, TKHAWKHO L, HAMO Z, et al. The diagnostic performance and accuracy of 3 molecular assays for the detection of Clostridium difficile in stool samples, compared with the Xpert® C. difficile assay[J]. J Microbiol Methods,2020,168:105784.

[5] SONG J, SHEN X, HUANG Z, et al. Clostridium difficile toxin A and toxin B inhibit YAP in the colonic epithelial cells[J]. J Biochem Mol Toxicol,2021,35(2):22652.

[6] KATO N, OU C Y, KATO H, et al. Identification of toxigenic clostridium difficile by the polymerase chain reaction[J]. J Clin Microbiol, 1991, 29(1): 33-37.

[7] KATO H, KATO N, WATANABE K, et al. Identification of toxin a-negative, toxin b-positive clostridium difficile by PCR[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36 (8):2178-2182.

[8] GRIFFITHS D, FAWLEY W, KACHRIMANIDOU M, et al. Multilocus sequence typing of Clostridium diffcile[J]. J Clin Microbiol, 2010,48: 770-778.

[9] KHANNA S, ASSI M, LEE C, et al. Efficacy and safety of rbx2660 in punch cd3, a phase iii, randomized, double-blind, placebo-controlled trial with a bayesian primary analysis for the prevention of recurrent clostridioides difficile infection[J]. Drugs,2022,82(15): 1527-1538.

[10] MAGDESIAN K G, BARNUM S, PUSTERLA N. Fecal PCR testing for detection of clostridium perfringens and clostridioides difficile toxin genes and other pathogens in foals with diarrhea: 28 cases[J]. J Vet Diagn Invest,2022,34(3):396-401.

[11] 钱娇,许春燕,田发霞,等.艰难梭菌感染的危险因素分析[J].中国卫生检验杂志,2020,30(21):2679-2681.

[12] 祁琪,陈云波,张洁,等.神经外科住院患者定植及感染产毒艰难梭菌的分子流行病学特征[J].中华医院感染学杂志,2022,32(6):885-889.

[13] PREHN J, REIGADAS E, VOGELZANG E H, et al. European society of clinical microbiology and infectious diseases: 2021 update on the treatment guidance document for clostridioides difficile infection in adults[J]. Clin Microbiol Infect,2021,27(2):1-21.

[14] 虞美玲,赵冰,陈影,等.上海市某家综合医院 EICU 艰难梭菌感染和定植的流行病学及危险因素分析[J].中华危重病急救医学,2021,33(11):1358-1361.

收稿日期：2023-11-05

(本文编辑：钟美春)