

困難梭狀芽孢桿菌國內外現況分析

洪羽屏^{*1,2}、蘇資茜²、黃一修²、林建州¹、吳和生¹

摘要

困難梭狀芽孢桿菌(*Clostridium difficile*)是一種革蘭氏陽性、會產生內孢子的人類致病菌，通常與抗生素所造成的腹瀉相關。困難梭狀芽孢桿菌感染症(CDI)的症狀包括腹瀉(diarrhea)、偽膜性腸炎(pseudomembranous colitis)和巨結腸症(megacolon)等，通常是服用廣效性抗生素(broad-spectrum anti-microbial agent)而破壞了正常菌叢(indigenous microbiota)所提供的定殖抗性(colonization resistance)所導致。造成 CDI 相關症狀的主因為 TcdA 和 TcdB 兩種毒素，目前 CDI 的治療，先建議停止目前使用的抗生素，再依照其疾病嚴重程度使用甲硝唑乙醇(metronidazole)及萬古黴素(vancomycin)。新型抗生素 fidaxomicin 可針對再復發之 CDI 做更有效的治療。在預防方面，目前尚無有效的疫苗可供預防，而以不活化 TcdA 和 TcdB 為基礎的疫苗正在研究中。北美與許多歐洲國家，高致病性菌株的出現以及高致死率，是導致 CDI 愈來愈嚴重的主因，在亞洲國家的發生率也逐漸攀升。臺灣的一份研究報告指出，2003-2007 年間，65 歲以上的病人 CDI 感染個案增加了 5-6 倍，所以感控人員應注意 CDI 案例的增加趨勢，必要時需進行分子型別調查(molecular typing)。由於 *C. difficile* 的擴散及傳播快速，增加區域性的監測有其必要性。

關鍵字：困難梭狀芽孢桿菌；困難梭狀芽孢桿菌感染症；正常菌叢；定殖抗性；分子型別調查

前言

困難梭狀芽孢桿菌感染症(*Clostridium difficile* infection, CDI)是抗生素相關性腹瀉最常見的原因，症狀包括腹瀉(diarrhea)、偽膜性腸炎(pseudomembranous colitis, PMC)和巨結腸症(megacolon)等等，通常是服用廣效性抗生素(broad-spectrum anti-microbial agent)所導致。過去的 10 到 15 年間，CDI 的病例增加快速[1]，不僅在歐美國家，在其他亞洲國家，中國、日本、南韓發生率也逐漸攀升[2]。除了抗生素之外，老年化也是危險因子之一，65 歲以上老人 CDI 的發生率較高；另外一個重要的危險因子在醫療照護體系，許多流行疫情發生在醫療院所及長照安養機構的院內感染[3]。

¹衛生福利部疾病管制署研究檢驗及疫苗研製中心

投稿日期：2014 年 3 月 6 日

²國立成功大學醫學院微生物與免疫學研究所

接受日期：2014 年 4 月 28 日

通訊作者：洪羽屏^{*1,2}

DOI：10.6524/EB.20150224.31(4).002

E-mail：Yu-ping@cdc.gov.tw

北美與許多歐洲國家，CDI 發生率攀升的原因為高致病株 the North American Pulse Field type (NAP1)/ribotype 027 的出現[4]。在美國，1984-1993 年間，從健康照護機構共分離超過 6,000 個菌株，其中 14 株為 NAP1/ribotype 027，所佔的比例小於 0.02%，但在 2000 年到 2003 年發生的 8 次大流行疫情，187 個病例中，NAP1/ribotype 027 就占了 96 株，超過 50%[5]。許多報告也指出，這些新出現的高致病性菌株，是造成 CDI 越來越嚴重的原因之一[4-6]。也由於這些流行疫情的發生，美國疾病預防控制中心(CDC)從 2011 年開始，在 10 個州(約 11 萬人口)進行 CDI 病例的監測，初步的監測報告已公佈(http://www.cdc.gov/hai/eip/cdiff_techinfo.html)。

病原菌

Clostridium difficile (困難梭狀芽孢桿菌)為革蘭氏陽性、含內孢子、對氧氣極端挑剔的絕對厭氧菌，最早是在1935年被Hall 和O' Toole等人發現[7]。*C. difficile*所產生的孢子，因呈休眠狀態生長代謝停止，對於物理性或化學處理具有抗性，可在一般環境下存活非常長的時間，所以孢子被視為主要的傳播方式，並且與CDI反覆發作有關[8]。

*C. difficile*存在於人類及動物的大腸，分為產毒及非產毒的菌株，只有產毒菌株才能造成人類疾病。引起腸炎的兩個關鍵因素在於宿主對*C. difficile*的定殖抗性(colonization resistance)及免疫反應。人類大腸內有超過4,000種正常菌群，這些微生物群落藉由競爭營養源及附著生長空間提供了定殖抗性來抵禦致病原入侵，一旦抗生素破壞了這些屏蔽的正常菌群而降低了定殖抗性，便給予腸道致病菌入侵的機會，正常菌群的豐度分布與*C. difficile*致病與否也有相關[9]。而年長、營養不良、免疫不全及其他疾病合併的病人具有較差的免疫保護力。

傳染途徑及致病機轉

*C. difficile*被視為抗生素相關性腹瀉的主要病因，儘管有研究報告[7]曾在小於一歲的健康嬰兒糞便中分離出*C. difficile*，暗示人類感染為內源性。但更多證據支持*C. difficile*可被傳播並藉由外在途徑攝入，尤其在一些群聚及爆發流行的情況，是經由感染病人排出糞便中之孢子散布，研究報告也指出[10]，*C. difficile*是一個重要的院內感染致病因。

造成CDI相關症狀的主因為毒素A(TcdA)和毒素B(TcdB)，均為醣基轉移酶(glycosyltransferase)[11]，藉由醣基化蘇胺酸殘基(Thr)使Rho GTPase無法活化，造成細胞肌動蛋白(actin)無法聚合，使得細胞型態改變，上皮細胞間隙受到破壞，造成細胞死亡，並引發一連串的發炎反應，導致腹瀉及偽膜性腸炎。所有的產毒株都含有*tcdB*基因，但 *tcdA*基因則不一定同時存在。某些菌株會產生第三種毒素，為二元毒素，藉由不可逆的二磷酸腺苷核醣基化(adenosine diphosphate ribosylation)肌動蛋白，可長期誘導宿主細胞微管突出，幫助細菌附著[12]。

臨床症狀與治療

診斷CDI應結合臨床症狀與實驗室發現。CDI病例定義[3]為：出現水瀉症狀(24小時內出現三次以上不成形糞便)，且從糞便*C. difficile*毒素試驗檢出陽性或分離出產毒的*C. difficile*菌株，或者藉由大腸結腸鏡、病理組織切片檢查發現偽膜性腸炎。CDI復發之診斷標準也相同[3]。

CDI的治療，首先建議停止目前使用的抗生素，再依照其疾病嚴重程度使用甲硝唑乙醇(metronidazole)及萬古黴素(vancomycin)作治療。針對輕度或中度疾病使用metronidazole，而vancomycin則使用在較嚴重的疾病[13]。2011年5月美國食品藥物管理局(FDA)核准新型抗生素fidaxomicin(屬於macrolide類)上市，可針對再復發之CDI做更有效的治療，臺灣已於2012年7月核准上市，但健保尚未給付。歐洲臨床微生物和感染學會(European Society of Clinical Microbiology and Infection Diseases, ESCMID)在2013年10月更新了CDI的治療指引[14]，指引中依建議強度(Strength of Recommendation, SoR)和證據等級(Quality of Evidence, QoE)將病患區分為不同群組，包括非嚴重的CDI、嚴重的CDI、第一次復發或有復發風險的CDI、多次復發的CDI、及無法口服抗生素的CDI等，分別進行治療。指引中整理了最新的研究證據，也將fidaxomicin納入。此外，指引當中也提到，腹瀉會帶走病患大量的電解質及水分，所以補充電解質和水分是必要的。而針對多次復發的CDI病人建議使用細菌或糞便腸道移植進行治療。

實驗室診斷[3] (表一)

- 一、檢體蒐集和運送：最適合用來診斷CDI的檢體為水狀、鬆散、不成形的糞便，肛門拭子的檢體通常不適合，會降低毒素試驗的靈敏性。在病人症狀發生期採集單一糞便檢體通常較為有效，且基於成本效益考量無須重複採檢送驗。
- 二、菌株培養分離：菌株培養分離為最直接的證據，也是分子流行病學調查所必須。臨床最常使用的選擇性培養基為CCFA，內含cycloserine、cefoxitin及fructose，額外添加牛膽酸鈉(taurocholate)或溶菌酶(lysozyme)可增加*C. difficile*的分離率，因可增加孢子的發芽率，另外以去氧處理過的培養基可得到較佳結果。在CCFA上的菌落型態為扁平、黃色、毛玻璃狀，周圍培養基成黃色暈開。此菌落有典型特殊的氣味，在wood's lamp照射下會發出螢光。革蘭氏染色呈現典型的革蘭氏陽性菌。觀察培養基上的菌落並以革蘭氏染色作確認，如未符合以上標準再進行生化反應試驗。
- 三、細胞毒素中和試驗：大部分實驗室使用human foreskin fibroblast cells來進行毒素中和試驗，其敏感性較佳，可偵測極低效價(1:160)的毒素存在。
- 四、Glutamate dehydrogenase assay(GDH)檢測：GDH為*C. difficile*的特異性抗原，以EIA方法進行，呈現較佳的敏感度(85%~95%)與特異性(89%~99%)、有較佳的陰性預測值(negative predictive value)可用於快速篩檢。

- 五、酵素免疫分析法(EIA)毒素偵測：市售有許多商業化偵測毒素的套組，有單獨偵測毒素A(TcdA)及B(TcdB)或同時偵測兩種毒素，敏感性為63%~94%，特異性為75%~100%。
- 六、核酸放大試驗(Nucleic acid amplification tests, NAAT)：利用聚合酶鏈鎖反應(PCR)偵測毒素基因，為高敏感度及高特異性，並且省時。

美國[3]及歐盟[14]建議以兩階段的方式進行檢測：先以EIA方法進行GDH或毒素TcdA/B篩檢，篩檢陽性的檢體再進行核酸放大試驗(NAAT)偵測毒素基因，以確定是否為產毒性的*C. difficile*。

表一、*C. difficile* infection糞便實驗室診斷方法的比較

檢驗方法	敏感度	特異性	應用
菌株培養分離	低	中等	臨床上並不實用，無法區分產毒與非產毒菌株。
產毒性培養	高	高	定義敏感性與特異性的黃金標準，太耗時因此臨床上不適用。
細胞毒素中和試驗	高	高	診斷取決於實驗人員操作能力、耗時。
GDH試驗	高	低	高敏感性，但無法區分產毒與非產毒菌株，需再利用EIA毒素偵測試驗確認產毒株。
酵素免疫分析法(EIA)毒素偵測	低	高	快速且具專一性。必須同時偵測毒素A和B。缺點為低敏感性，與GDH合併使用。
核酸放大試驗(NAAT)	高	高	以PCR方法為基礎的毒素基因檢測，適用於病人急性腹瀉症狀發生時。

表格資料來自參考文獻[13]

流行病學

*C. difficile*菌株的核酸分型 (ribotyping) 地理分布盛行區如表二，2003年高致病株NAP1/ribotype 027在加拿大及美國出現引發流行，其在毒素抑制基因*tcdC*上有點突變(point mutation)，增加*tcdA*及*tcdB*的毒素產生；此外NAP1/ribotype 027菌株也能產生二元毒素，與高致死率、復發率相關，並出現在社區。1998-2009年，美國的醫療院所診斷出的感染數由25,200例增加至110,600例，並於2008-2009年間達到高峰[13]。類似於北美的NAP1/ribotype 027菌株，ribotype 078菌株於2005年在歐洲造成流行，造成社區的傳播率上升，並且缺乏有效的抗生素治療與預防方法[6]。

雖然高致病性的ribotype 027在亞洲相當罕見，其變種*tcdA/tcdB*⁺ ribotype 017卻是東亞最主要的流行株[2]，在中國、日本、南韓、臺灣等地分離出具毒力 (toxigenic) 的菌株中佔23%~48%。而ribotype 018在東京及南韓也曾爆發流行。在亞洲，*C. difficile*在院內感染控制報告為低盛行率，然而因監測資料不足，真實的盛行率未知。一項2004-2008年在韓國進行的全國性研究[10]，發現在17個醫療院所中，發生率從每千人1.7位上升到每千人2.7位，較同期美國醫療院所的每千人8.75位低。另外2007-2008年中國上海單一醫院每千人中有1.7位的感染發生率[13]。

相較中國，香港有較多的研究調查進行，Cheng等人報告2009年間在五間醫療院所分離出的345株*C. difficile*具毒力菌株中，ribotype 002佔了9.4%，ribotype 017只佔0.7%，而且70%的strains並不屬於北美和歐洲盛行的23個ribotype之一，11.6%無法分型[15]。

印度一份2012年針對急性腹瀉病人的研究報告指出[13]，住院病人有8%培養出*C. difficile*，門診病人有1.3%培養出*C. difficile*。在巴基斯坦[13]，抗生素相關腹瀉(antibiotic associated diarrhea, AAD)的病人，有29%分離出*C. difficile*。新加坡則有高致病株ribotype 027造成散發性的院內感染群聚事件[13]。馬來西亞及泰國的研究報告[13]指出：AAD病人被檢測出TcdA的陽性率由14%上升到44%，而TcdB的陽性率從44%增加到46%，顯示*C. difficile*的發生率上升。菲律賓的研究報告[13]也指出44%結腸炎個案為*C. difficile*陽性，顯示菲律賓國家結腸炎的疾病流行模式由之前的阿米巴寄生蟲感染轉換為*C. difficile*感染。

在臺灣，2009年的一份研究報告指出，在2003-2007年間，65歲以上的病人CDI個案增加了5-6倍[16]。2013年Chia J等人針對北部某醫學中心2002~2007年間住院病人的檢體，分離出110株具毒力的*C. difficile*，利用瓊脂稀釋法(agar dilution)、多位點可變數目串聯重複序列分析(multilocus variable-number tandem-repeat analysis, MLVA)、*tcdC*基因分型，發現70株具有*tcdA*及*tcdB(A⁺B⁺)*，40株具有*tcdB(A⁺B⁻)*，顯示這六年間，具毒力菌株(A⁺B⁺)明顯增加(p=0.05)，有七株(6.4%)抗藥性菌株被發現，包含2株抗metronidazole及5株抗vancomycin菌株[17]。另一項針對中臺灣六間醫院呼吸照護病房進行的研究調查，利用PCR ribotyping及MLVA方法分離149位病人的檢體發現：*C. difficile* infection (CDI)及*C. difficile* colonization的盛行率分別為4% and 19%[18]。至於分子型別方面，亞洲其他國家流行的ribotype 017曾被分離，然而北美及歐洲流行的高致病菌株(ribotype 027與078)尚未被發現[19]。這些研究結果顯示醫療院所中具毒力的*C. difficile*定殖率增加，感控人員應注意CDI案例的增加趨勢，必要時需進行*C. difficile*的分子型別調查。

表二、*C. difficile* 核酸分型分布地區

strain	地理分布
027	美國、加拿大、跨越歐洲(荷蘭、愛爾蘭、德國)、智利、東亞地區有少數報告
078	歐洲(西班牙、德國、法國)
017	中國、南韓、北歐(荷蘭、蘇格蘭)、日本
018	日本、南韓
014	美國、西班牙、法國、日本、中國、南韓
001	中國、日本、南韓、西班牙、德國、蘇格蘭
002	日本、香港、南韓

表格資料來自參考文獻 [13]

預防與感染防治措施[20]

目前尚無有效的疫苗可供預防，而以不活化毒素 A 及 B 為基礎的疫苗正在研究中[13]。CDI 相關的危險因子包括：抗生素治療，特別是 beta-lactam 類、腸胃道處置及手術、較年長者及抗生素濫用等。最有效的預防方式仍是限制抗生素使用。經由健康照護工作者的手將病原帶給病人是最可能暴露感染源的機制，因此洗手是最有效降低手部污染的方法，手套的使用可進一步減少病原的移轉(carry-over)。環境中 *C. difficile* 污染相當常見，特別是受到糞便污染的地方。直接接觸於被污染的病人照護用品 (如：直腸肛門溫度計)及病人房間常接觸的表面 (如：燈源開關)也被視為感染來源。對於 *C. difficile* 環境感染控制的建議為仔細清潔再以次氯酸鹽類消毒劑消毒，目前並無美國環保署(EPA)認可的產品可將 *C. difficile* 孢子去活化。

監測模式

北美與歐盟國家，由於 CDI 疫情已流行數十年，具有完備的流行病學監測資料。以美國來說，監測地區內的流行病學家會監控所有診斷實驗室的毒素檢測或分子檢測方法，一旦出現新的 CDI 感染個案，會持續檢測其糞便檢體至少 8 周，並進行疫調(含接觸史、臨床及風險因子等資訊)。新增個案會被分成三類[3]：

- 一、Healthcare facility-onset (HCFO)：檢體為入院 3 天後所採集或來自長照機構的居民。
- 二、Community-onset healthcare facility-associated (CO-HCFA)：檢體來自門診病人或入院 3 天內病人，具有醫療照護暴露病史(表示此個案已住院一段時間或是來自長照機構)。
- 三、Community - associated (CA)：檢體來自門診病人，無任何住院或醫療照護病史。個別醫院/實驗室會將陽性 CDI 個案報告給各地方的公共衛生機關，再匯整回報給美國 CDC 於網路上定期公告監測資料。而歐盟 CDC 的 13 個會員國在流行病學監測及傳染病控制的網絡架構下也已實施 CDI 之國家級規模的監測，並定期發布監測資料 (http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance_reports/annual_epidemiological_report/Pages/epi_index.aspx)。

結語

亞洲方面對於 CDI 的疾病監測資料仍嫌不足。現今交通往來頻繁，疫病傳播快速，散布流行不無可能，況且臺灣過去只有個別醫療院所的零星統計報告[17-19]，實際 CDI 盛行率不明，隨著人口年齡結構老化，感染風險因子增加，增加 CDI 區域性的監測有其必要性。未來如要進行監測，可參考美國 CDC 建立的標準檢驗程序，以二階段檢驗系統進行偵測，並要求所有診斷實驗室(含醫院、健康照護機構、私人實驗室及官方實驗室)都須遵循。個別實驗室的監測資訊應被報告給地方衛生機關，中央主管機關可蒐集各實驗室的資訊匯整統計並每年公告出版，提供給臨床醫師及感控人員做為參考。可視疫情流行程度列入法定傳染病以利疫情監控。

參考文獻

1. Ananthkrishnan AN. Clostridium difficile infection: epidemiology, risk factors and management. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8 : 17-26.
2. Collins DA, Hawkey PM, Riley TV. Epidemiology of Clostridium difficile infection in Asia. *Antimicrob Resist Infect Control* 2013; 2 : 21.
3. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for Clostridium difficile infection in adults: 2010 update by the society for healthcare epidemiology of America (SHEA) and the infectious diseases society of America (IDSA). *Infect Control Hosp Epidemiol. : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 2010; 31 : 431-55.
4. 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. *Lancet* 2005; 366 : 1079-84.
5. McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of Clostridium difficile. *N Engl J Med.* 2005; 353 : 2433-41.
6. Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of Clostridium difficile infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. *Clin Infect Dis.*2008; 47 : 1162-70.
7. Hall IC, O'Toole E. Intestinal flora in new-born infants: With a description of a new pathogenic anaerobe, bacillus difficilis. *Am J Dis Child.*1935; 49 : 390-402.
8. Rodriguez-Palacios A, Lejeune JT. Moist-heat resistance, spore aging, and superdormancy in Clostridium difficile. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77 : 3085-91.
9. Johnson S. Recurrent Clostridium difficile infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes. *J Infect.* 2009; 58 : 403-10.
10. Kim YS, Han DS, Kim YH, et al. Incidence and clinical features of Clostridium difficile infection in Korea: a nationwide study. *Epidemiol Infect.* 2013; 141 : 189-94.
11. Voth DE, Ballard JD. Clostridium difficile toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18 : 247-63.
12. Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, et al. Clostridium difficile toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria. *PLoS Pathog.* 2009; 5 : e1000626.
13. Burke KE, Lamont JT. Clostridium difficile Infection: A Worldwide Disease. *Gut and liver* 2014; 8 : 1-6.
14. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 : 1-26.

15. Cheng VC, Yam WC, Lam OT, et al. Clostridium difficile isolates with increased sporulation: emergence of PCR ribotype 002 in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011; 30 : 1371-81.
16. 張上淳、蘇秋霞、周偉惠等:困難腸梭菌院內感染流行病學研究。疫情報導 2009; 25(3): 163-177。
17. Chia JH, Lai HC, Su LH, et al. Molecular epidemiology of Clostridium difficile at a medical center in Taiwan: persistence of genetically clustering of A(-)B(+) isolates and increase of A(+)B(+) isolates. *PLoS One* 2013; 8 : e75471.
18. Wei HL, Wei SH, Huang CW, et al. Molecular typing and epidemiology of Clostridium difficile in respiratory care wards of central Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2013 pii: S1684-1182(13)00067-4.
19. Lin YC, Huang YT, Tsai PJ, et al. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of clinical isolates of Clostridium difficile in taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55 : 1701-5.
20. CDC Guidelines for environmental infection control in health-care facilities recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). *MMWR* 2003; 52 : 1-42.