

· 临床论著 ·

253 例 HIV 感染合并慢性腹泻患者粪便标本的病原微生物检测分析

王慧珠 华文浩 李敏 田敬华 张燕 王玉光 李兴旺 赵辉

【摘要】 目的 探讨 HIV 感染者慢性腹泻的病原学种类及其特点,使患者得到及时的预防和治疗。**方法** 对 253 例慢性腹泻 HIV 感染者的粪便标本首先进行了涂片及染色检测,直接涂片检测蓝氏贾第鞭毛虫,采用革兰染色检测真菌孢子及菌丝,抗酸染色(萼-尼氏染色法)检测分枝杆菌,用改良抗酸染色法检测隐孢子虫,采用常规粪便培养检测志贺菌、沙门菌、肠侵袭性大肠埃希菌及真菌,采用微需氧培养检测空肠弯曲菌,采用金标法检测难辨梭状芽孢杆菌毒素(A+B)。**结果** 本研究共检测出各种病原微生物 159 株,其中真菌最多,占 45% (114/253),隐孢子虫占 12.6% (32/253),结核分枝杆菌占 2.4% (6/253),难辨梭状芽孢杆菌占 1.58% (4/253),空肠弯曲菌占 0.8% (2/253),沙门菌占 0.4% (1/253)。**结论** 真菌、隐孢子虫、分枝杆菌、难辨梭状芽孢杆菌等是 HIV 感染者慢性腹泻的主要病原菌,积极寻找病原,以期使患者得到及早的预防和治疗。

【关键词】 人类免疫缺陷病毒;腹泻,慢性;病原微生物

Detection and analysis of pathogenic microorganism in the stool specimens from 253 chronic diarrhea patients with HIV infection WANG Hui-zhu, HUA Wen-hao, LI Min, TIAN Jing-hua, ZHANG Yan, WANG Yu-guang, LI Xing-wang, ZHAO Hui. Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: ZHAO Hui, Email: zhaohui6869@sohu.com

【Abstract】 Objective To investigate the pathogenic profiles of chronic diarrhea patients with AIDS, for the better prevention and treatment. **Methods** The stool specimens in AIDS patients with chronic diarrhea were analyzed by the smear and dyeing detection method. Detection methods included direct smear for the detection of *Giardia lamblia* stiles, Grain stain method for fungi and mold, acid fast stain (Ziehl-Neelsen) for *Mycobacterium*, improved acid fast stain for the detection of *Cryptosporidium*. Stool isolation culture to identify *Shigella dysenteriae*, *Salmonella Typhi*, enteroinvasive *E. coli* and fungi; aerobic culture to identify campylobacter, gold-labeled antibodies method for the detection of *C. difficile*. **Results** Total of 159 strains of bacteria were identified, including fungi 45% (114/253) and *Cryptosporidium* 12.6% (32/253), *Mycobacterium* 2.4% (6/253), *C. difficile* 1.58% (4/253), campylobacter 0.8% (2/253), salmonella 0.4% (1/253). **Conclusions** Fungi, *Cryptosporidium*, *Mycobacterium*, *C. difficile* are the major pathogens for chronic diarrhea in patients with AIDS. The identification of pathogen could make the prevention and treatment proceeding faster and better.

【Key words】 Human immunodeficiency virus (HIV); Diarrhea, chronic; Pathogenic microorganism

随着病情的加重, HIV 感染者 CD4⁺T 细胞水平逐渐降低,免疫力下降,极易感染各种病原微生物。消化道是艾滋病并发机会性感染时常见受累部位之一,约 90% 以上的 HIV 感染者可出现消化道症

状^[1]。积极查找引起 HIV 感染者慢性腹泻的病原学种类及特点,可使其得到及时的预防和治疗。

资料与方法

一、研究对象

1. 入组要求:入组的 253 例 HIV 感染者(均经 Western blot 确认为抗-HIV 阳性),患者慢性腹泻次数 > 3 次/d,腹泻时间 > 1 个月,患者年龄 18 ~ 70 岁。排除近 1 个月内接受过影响本试验的药物治疗的患者和应用 HAART 药物(主要指蛋白酶抑制剂)抗病毒药物治疗导致慢性腹泻者,电子肠镜检查排

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2012.02.013

基金项目:“十一五”国家科技重大专项项目:艾滋病机会性感染及减少 HAART 毒副作用的中医药治疗方案/方法研究(2008ZX10005-003);中医药防治艾滋病临床科研基地建设(2009ZX10005-014)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院

通讯作者:赵辉, Email: zhaohui6869@sohu.com

除肠道肿瘤和慢性溃疡性结肠炎患者。

2. 基本资料:253 例 HIV 感染者中,来自本院 30 例,北京佑安医院 37 例,新疆乌鲁木齐北郊医院 37 例,河南上蔡县中医医院 149 例。为 2009 年 11 月至 2010 年 12 月以上 4 家医院的住院或门诊患者;其中男性 143 例,女性 110 例;年龄 18 ~ 70 岁,平均年龄 (42.9 ± 10.4) 岁。CD4 水平检测结果显示,CD4 $\geq 500/\mu\text{l}$ 者 25 例,CD4 200 ~ 499/ μl 者 130 例,CD4 < 100 ~ 200/ μl 者 98 例,CD4 < 100/ μl 者 39 例。

二、方法

1. 涂片检测:对所采集的粪便标本及时涂片,直接涂片检测原虫;革兰染色检测真菌孢子及菌丝;抗酸染色(萆-尼氏染色法)检测分枝杆菌;采用甲醛-乙酸乙酯沉淀法对患者粪便标本进行集卵,用改良抗酸染色法进行染色检测隐孢子虫卵囊。

2. 粪便常规培养检测:将新鲜的粪便标本分别接种于强选择性培养基 SS 琼脂平板和弱选择性培养基麦康凯(MAC)琼脂平板(或中国蓝琼脂平板)及含氯霉素的沙保罗琼脂平板各 1 块,将接种好的平板置于 35℃ 孵箱培养 18 ~ 24 h,检测志贺菌、沙门菌、肠侵袭性大肠埃希菌及真菌。

3. 微需氧培养检测空肠弯曲菌:将粪便标本在 3 h 内接种于具有高度选择性 SKIRROW 培养基平板上,放入微需氧产气袋中(5% 氧气、10% 二氧化碳和 85% 氮气),封闭好后立即置于 42℃ 孵箱内培养 48 h。根据菌落形态,革兰染色及生化反应进行鉴定(应用 API Campy 生化鉴定试剂盒)。

4. 难辨梭状芽孢杆菌毒素(A + B)的检测:采用金标法,采用 OXOID 产品(Xpect 难辨梭菌毒素 A/B 检测卡),粪便标本采集后 3 h 内送检,如不能在规定时间内检测,需置于 2 ~ 8℃ 冰箱内,且务必 72 h 内检测。

结 果

一、标本中各种病原微生物的检出率

自 253 例 HIV 慢性腹泻患者的粪便标本中共检出各种病原微生物 159 株,其中真菌最多,占 45% (114/253),隐孢子虫占 12.6% (32/253),结核分枝杆菌占 2.4% (6/253),难辨梭状芽孢杆菌占 1.58% (4/253),空肠弯曲菌占 0.8% (2/253),沙门菌占 0.4% (1/253)。

二、标本中真菌检出率

253 例 HIV 慢性腹泻患者的粪便标本中真菌检出最多,用含氯霉素的沙保罗琼脂平板进行真菌培养,共培养出真菌 114 株,占 45% (114/253),以上 114 例阳性患者的粪便标本在涂片革兰染色中可见大量

的真菌孢子或菌丝,同时真菌培养为阳性,见图 1。

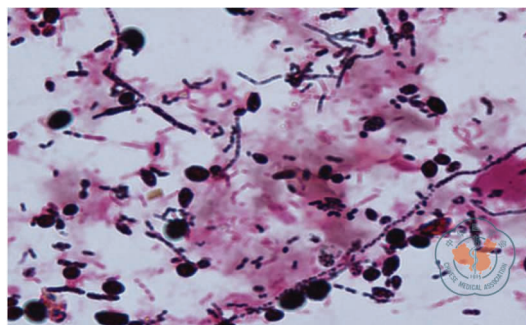


图 1 患者粪便标本涂片真菌孢子及菌丝(革兰染色 $\times 100$)

三、标本中隐孢子虫的检出率

采用改良抗酸染色法对 253 例 HIV 慢性腹泻患者的粪便标本进行染色,检测隐孢子虫卵囊,其中 32 例患者检测出隐孢子虫卵囊,占 12.6% (32/253),32 例阳性患者中 CD4 < 200/ μl 者 20 例,CD4 200 ~ 499/ μl 者 12 例。采用甲醛-乙酸乙酯沉淀法对患者粪便标本进行集卵可提高检出率,隐孢子虫用改良抗酸染色镜下卵囊呈桃红色~红色,圆形或椭圆形,直径 4 ~ 5 μm ,背景被染成微蓝绿色。卵囊着色深浅不一,染色深者内部可见 4 个月牙形的子孢子,见图 2。

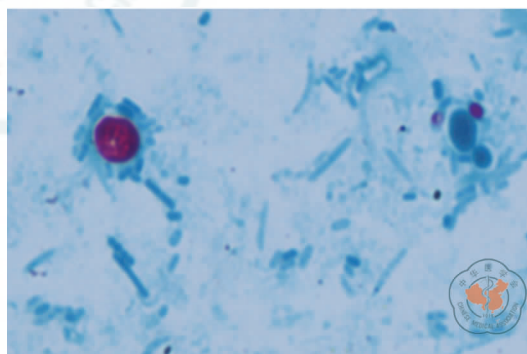


图 2 患者粪便标本中的隐孢子虫卵囊(改良抗酸染色 $\times 100$)

四、标本中结核分枝杆菌的检出率

分枝杆菌一直是 HIV 感染者在疾病中晚期时的主要病原菌,此时期 HIV 感染者肠结核易见,本次调查中结核分枝杆菌占 2.4% (6/253),6 例阳性患者中 5 例患者 CD4 水平 < 100/ μl 占总体 CD4 < 100/ μl 患者的 12.8% (5/39)。6 例患者中有 4 例行肠镜检查,其中 1 例诊断为肠结核,2 例为结肠炎,1 例未见异常。

五、标本中难辨梭状芽孢杆菌检出率

难辨梭状芽孢杆菌的检出率为 1.58%

(4/253), 采用金标法可以同时检测出难辨梭状芽孢杆菌毒素 A 和 B, 20 min 内即可得到结果。CD4 < 200/ μ l 患者 2 例, CD4 200 ~ 500/ μ l 患者 2 例, 4 例阳性患者腹泻次数均 4 次/d 以上。

六、标本中空肠弯曲菌的检出率

从 253 例 HIV 慢性腹泻患者的粪便标本中共检测出 2 株空肠弯曲菌。28 岁男性患者 1 例, 腹泻 5 ~ 6 次/d; 39 岁女性患者 1 例, 腹泻 4 ~ 5 次/d。空肠弯曲菌微需氧培养在高度选择性 SKIRROW 培养基平板上可形成无色半透明毛玻璃样小菌落, 单个菌落呈中心凸起、周边不规则形状, 且无溶血现象。空肠弯曲菌菌体轻度弯曲似逗点状, 长 1.5 ~ 5 μ m, 宽 0.2 ~ 0.8 μ m。两菌体的末端相接时呈 s 形、螺旋状, 见图 3。

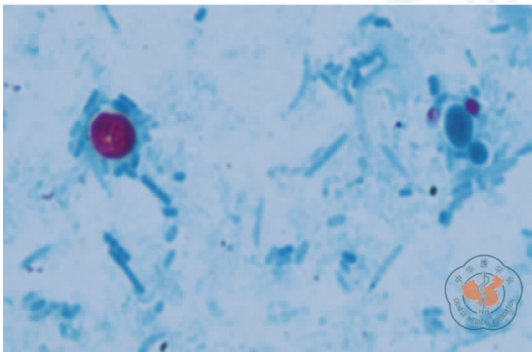


图 3 粪便标本微需氧培养空肠弯曲菌(革兰染色 $\times 100$)

讨 论

本研究中自 253 例 HIV 慢性腹泻患者的粪便标本中共检出各种病原微生物 159 株, 其中真菌检出占 45% (114/253), 114 例阳性患者首先是在涂片革兰染色中可见大量真菌孢子或菌丝, 同时真菌培养也是阳性。粪便标本里可见大量的真菌, 真菌主要来源食道和胃肠道真菌感染, 本次调查未进行胃镜检查, 因此无法区分 114 例阳性患者的真菌感染具体部位。

隐孢子虫病 (Cryptosporidiosis) 是一种全球性的人兽共患寄生虫病^[2], 隐孢子虫 (Cryptosporidium) 可感染包括人类在内的大多数脊椎动物, 寄生于人或动物的消化道上皮细胞。感染后临床主要表现为发热、腹泻、腹痛和呕吐。免疫缺陷患者尤其是艾滋病患者感染后会引发致死性腹泻, 是艾滋病患者的主要致死因素之一^[3]。世界卫生组织已于 1986 年将隐孢子虫病列为艾滋病患者严重腹泻的怀疑因素之一^[4]。本研究中发现隐孢子虫感染率为 12.6% (32/253), 仅次于真菌感染, 是引起 HIV 感染者慢

性腹泻的主要病原菌。Canning 等^[5]报道显示隐孢子虫在艾滋病患者中感染普遍, 其感染机会和危害的严重性仅次于岗地弓形虫。隐孢子虫在艾滋病患者中的感染率高达 48%, 所引起的腹泻是艾滋病患者致死的主要因素之一。黄民主等^[6]报道发现男性吸毒者隐孢子虫阳性率为 19.05%, 为隐孢子虫感染的高危人群。本研究从 253 份 HIV 慢性腹泻患者的粪便标本中共检出隐孢子虫 32 株, 阳性率为 12.6%, 低于国外的报道, 与国内的报道一致。这可能是因为隐孢子虫主要是由水源污染引起, 通常所用的自来水氯化处理不足以杀死其包囊, 而外国人饮用自来水较多, 而我民众则习惯饮开水^[7]。

HIV 感染者随着病情的加重, 其 CD4 细胞水平降低, 极易感染结核分枝杆菌及其他分枝杆菌, 本次调查中抗酸染色阳性患者 6 例, 其中 CD4 < 100/ μ l 者 5 例, 占 CD4 < 100/ μ l 患者的 12.8%, 因此当患者 CD4 < 100/ μ l 时, 要密切关注是否有分枝杆菌感染。

难辨梭状芽孢杆菌是一种革兰阳性芽孢杆菌, 属条件致病菌, 常在广谱抗菌药物治疗的患者中分离到。难辨梭状芽孢杆菌可引起严重的腹泻、伪膜性结肠炎、结肠穿孔, 甚至死亡^[8-9], 且可在医院内迅速传播。在世界各国由其引起感染的患者比例逐年增高^[10], 在 CDC 报道的院内感染疾病中已居第 4 位。AIDS 患者比普通患者更易感染难辨梭状芽孢杆菌, 是普通患者感染率的 1.3 ~ 9.9 倍, 难辨梭状芽孢杆菌是 HIV 感染者腹泻最常见病原菌之一, 随着 HIV 感染者病情的加重其感染的风险会更高^[11]。本次调查中 4 例阳性患者的 CD4 水平均 < 500/ μ l。

空肠弯曲杆菌是弯曲杆菌属成员之一, 属于革兰阴性菌, 是近年来国内外广泛重视的人畜共患病原菌^[12], 主要引起人急性肠炎和食物中毒, 引起腹泻的频率是沙门菌和志贺菌的 2 ~ 7 倍^[13-14]。接触带菌动物或摄入受到污染的禽制品、水源和牛奶是该菌感染人体的主要途径^[15]。世界卫生组织已将该病列为常见的食源性传染病之一^[16]。美国每年约有 250 万例该疾病发生。本次调查中共检出 2 例空肠弯曲杆菌, 且此 2 例患者均有严重的腹泻症状。

HIV 感染者慢性腹泻的病原菌主要以真菌、隐孢子虫、结核分枝杆菌以及难辨梭状芽孢杆菌为主^[17], 因此, 提高检测水平、积极寻找病原菌, 可使患者得到及早的预防和治疗。

参 考 文 献

- 1 魏文甫. 17 例艾滋病患者的消化道表现与临床分析. 中国中医药咨讯, 2010, 2(31): 193.
- 2 朱惠丽, 张龙现, 宁长申, 等. 人兽共患隐孢子虫种类及基因

- 型. 寄生虫与医学昆虫学报, 2007, 14(1): 48-55.
- 3 Guarino A, Spagnudo MI, Russo S, et al. Etiology and risk factors of severe and protracted diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1995, 20(2): 173-178.
- 4 张龙现, 蒋金书. 隐孢子虫和隐孢子虫病研究进展. 寄生虫与医学昆虫学报, 2001, 8(3): 184-191.
- 5 Canning EU. Protozoan infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1990, 84(1): 19-24.
- 6 黄民主, 关岚, 谢梅芝, 等. 长沙市某戒毒所男性吸毒人员中隐孢子虫感染状况的研究. *中国公共卫生*, 2003, 19(3): 301-303.
- 7 乐晓华, 王辉, 苟继周, 等. 广东和云南部分地区艾滋病患者中隐孢子虫感染的调查分析. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2008, 22(5): 339-341.
- 8 Kuijper EJ, Coignard B, Tull P, et al. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12(6): 2-18.
- 9 Kelly CP, LaMont JT. *Clostridium difficile*-more difficult than ever. *N Engl J Med*, 2008, 359(18): 1932-1940.
- 10 Hookman P, Barkin JS. *Clostridium difficile* associated infection, diarrhea and colitis. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(13): 1554-1580.
- 11 Sanchez TH, Brooks JT, Sullivan PS, et al. Bacterial diarrhea in persons with HIV infection, United States, 1992-2002. *Clin Infect Dis*, 2005, 41(11): 1621-1627.
- 12 陈杰, 孙新婷, 曾争, 等. 急性空肠弯曲菌肠炎的临床特征及耐药性分析. *传染病信息*, 2011, 24(1): 21-25.
- 13 Slutsker L, Ries AA, Greene KD, et al. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiological features. *Ann Intern Med*, 1997, 126(7): 505-513.
- 14 Blaser MJ, Wells JG, Feldman RA, et al. *Campylobacter* enteritis in the United States: a multicenter study. *Ann Intern Med*, 1983, 98(3): 360-365.
- 15 张茂俊, 张建中. 空肠弯曲菌耐药现状. *疾病监测*, 2007, 22(12): 793-796.
- 16 吴忠亮, 朱建国. 空肠弯曲杆菌检测方法的研究进展. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(7): 113-114.
- 17 Uppal B, Kashyap B, Bhalla P. Enteric Pathogens in HIV/AIDS from a Tertiary Care Hospital. *Indian J Community Med*, 2009, 34(3): 237-242.

(收稿日期: 2011-06-28)

(本文编辑: 孙荣华)

王慧珠, 华文浩, 李敏, 等. 253例 HIV感染合并慢性腹泻患者粪便标本的病原微生物检测分析[J/CD]. *中华实验和临床感染病杂志: 电子版*, 2012, 6(2): 132-138.