

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.12.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200422.0825.004.html\(2020-04-22\)](https://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.R.20200422.0825.004.html(2020-04-22))

ICU 患者粪便样品艰难梭菌分离及抗生素耐药性检测^{*}

洪伟¹,程玉梅²,周青帅¹,赵行行¹,饶凤琴¹,崔古贞³,齐晓岚¹,官志忠¹
(1. 地方病与少数民族疾病教育部重点实验室与贵州省分子生物学重点实验室/贵州医科大学,贵阳 550004;
2. 贵州医科大学附属医院综合 ICU,贵阳 550004;3. 贵州医科大学基础医学院,贵阳 550025)

[摘要] **目的** 探索贵州地区典型重症监护科(ICU)艰难梭菌感染及抗生素耐药性状况。**方法** 采用肛拭子法采集 ICU 患者粪便标本;扩增 16S rDNA 对菌株进行分类鉴定;使用 MEGA6.0 软件构建系统发育进化树;使用梯度稀释法测定分离的艰难梭菌菌株对 16 种常用抗生素的耐药性。**结果** 从 ICU 200 份粪便样本中分离到 12 株艰难梭菌(阳性率 6%)。所有菌株对氯霉素、甲砒霉素、甲硝唑、利福平和阿莫西林敏感。12 株艰难梭菌均对氨苄青霉素、卡那霉素和 D-环丝氨酸具有抗性。对克拉霉素、四环素、链霉素、红霉素、头孢西丁、诺氟沙星、克林霉素、万古霉素的耐药率分别为 20%、58%、75%、50%、17%、42%、8%和 8%。**结论** 12 株艰难梭菌具有独特的抗生素耐药谱,如对克林霉素、四环素、利福平的耐药性与其他地区具有明显差异,提示分离菌株可能具有独特特征。

[关键词] 艰难梭菌;贵州省;重症监护科;抗生素;耐药性
[中图分类号] R378.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)12-1911-08

Clostridium difficile isolation and antibiotic resistance detection in stool samples from ICU patients^{*}

HONG Wei¹,CHENG Yumei²,ZHOU Qingshua¹,ZHAO Xingxing¹,RAO Fengqin¹,
CUI Guzhen³,QI Xiaolan¹,GUAN Zhizhong¹

(1. Education Ministry Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases and Guizhou Provincial Key Laboratory of Medical Molecular Biology/Guizhou Medical University,Guiyang,Guizhou 550004,China ;2. Comprehensive ICU,Affiliated Hospital of Guizhou Medical University,Guiyang , Guizhou 550004,China ;3. School of Basic Medical Sciences,Guizhou Medical University,Guiyang,Guizhou 550025,China)

[Abstract] **Objective** To explore the infection and antibiotic resistance status of *Clostridium* (*C.*) *difficile* in typical ICU. **Methods** The stool samples from ICU patients were collected by adopting the anal swab method;16S rDNA was amplified for identifying the bacterial strain. The MEGA6.0 software was used to construct the phylogeny evolutionary tree. The gradient dilution method was used to detect the antibiotic resistance of isolated *C. difficile* strain to 16 commonly used antibiotics. **Results** Twelve strains of *C. difficile* were isolated from 200 fecal samples in ICU (positive rate 6%). All isolated strains were susceptible to chloramphenicol,thiamphenicol,metronidazole,rifampin and amoxicillin. Twelve strains of *C. difficile* had the resistance to ampicillin,kanamycin and D—cycloserine. The resistance rates to clindamycin,tetracycline,streptomycin,erythromycin,cefoxitin,norfloxacin,clindamycin and vancomycin were 20%,58%,75%,50%,17%,42%,8% and 8%,respectively. **Conclusion** 12 strains of *C. difficile* have a unique antibiotic resistance spectrum. For example,the resistance to clindamycin,tetracycline and rifampicin is significantly different from other regions,suggesting that the isolated *C. difficile* strains may have unique characteristics.

[Key words] *Clostridioides difficile*;Guizhou Province; intensive care unit; antibiotic; drug resistance

艰难梭菌是一种革兰阳性极端厌氧、产芽孢微生物^[1],是抗生素相关性伪膜性结肠炎的病原体^[2]。25%~33%的抗生素相关性腹泻和 90% 的伪膜性结肠炎是由艰难梭菌感染(CDI)引起。随着核糖体 23S rRNA 基因中 207 号位点 G→A 的突变,导致菌株对万古霉素耐药性增加。

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(31560318;31601012;31760318);贵州省科技厅基础研究计划重点项目(黔科合基础[2020]1Z067)。
作者简介:洪伟(1985—),副教授,博士,主要从事艰难梭菌研究。

型、078 型艰难梭菌的出现,CDI 暴发频次显著提高^[3]。艰难梭菌通常对甲硝唑和万古霉素敏感,不同地区流行艰难梭菌对常见抗生素的耐药性具有明显的差异,如在美国分离到的艰难梭菌对克林霉素的耐药率为 36%^[4],而在亚洲和欧洲分离的艰难梭菌对克林霉素的耐药率维持在较高水平(61.0%~89.3%)^[5]。在美国、加拿大和德国艰难梭菌对莫西沙星的耐药率分别为 36%、83%和 68%^[6]。TANG 等^[7]报道,艰难梭菌对环丙沙星、克林霉素、红霉素、甲硝唑和万古霉素的耐药率分别为 98.3%、81.7%、80.2%、0 和 0。

艰难梭菌对常用的抗生素的耐药性可能导致 CDI 的复发,流行病学特征改变和产生新的耐药菌株^[8]。重症监护科(ICU)住院患者常常接受多种类和大剂量的抗生素治疗,因此 CDI 发病率高于其他科室。不仅如此,由于 ICU 患者病情复杂,CDI 的发生往往危及患者的生命^[9]。然而,目前贵州省典型 ICU CDI 状况还尚未见报道,因此开展该地区 ICU CDI 和耐药性研究具有重要的临床指导意义。本研究旨在初步探索贵州省典型 ICU CDI 和抗生素耐药情况。

1 材料与方法

1.1 粪便样品采集

选择 2018 年 10 月至 2019 年 4 月,在贵州医科大学附属医院采集的 ICU 部分住院患者粪便标本。采用肛门拭子法采集标本^[10],标本采集后立即置于无菌 2 mL 离心管中,离心管编号后置于 4℃保存。收集样品每周送至实验室进行艰难梭菌培养。样品采集前告知患者标本用途,经贵州医科大学人体试验伦理委员会批准(2019 伦审第 076 号)。

1.2 菌株和培养基

艰难梭菌 630(CD630)质控菌株从美国典型菌种保藏中心购得。脑心浸出液(BHI)采购于北京索莱宝公司、酵母提取物、中性红、琼脂粉、厌氧产气袋、厌氧培养罐、脱纤维羊血、头孢西丁、D-环丝氨酸、D-果糖、新鲜鸡蛋。粪便样品使用两种分离培养基分离艰难梭菌:(1)CCFA 培养基^[11];(2)CCEY 培养基^[12]。

1.3 艰难梭菌鉴定

典型艰难梭菌菌落呈圆形、边缘粗糙不透明、呈

微黄色、可分解中性红形成浅黄色水解圈^[13]。具有该形态特征的菌落,挑取至牛脑心浸出液培养基(BHIS)中培养。取 0.5 μL 培养液作为菌液 PCR 模板,使用 16S rDNA 通用引物 27F 和 1494R^[14],使用诺维赞 Phanta[®]高保真 DNA 聚合酶扩增待测菌株 16S rDNA^[15]。PCR 产物送上海生物有限公司测序。测序结果使用 BLAST 比对,以鉴定菌株。

1.4 抗生素耐药性及最低抑菌浓度(MIC)试验

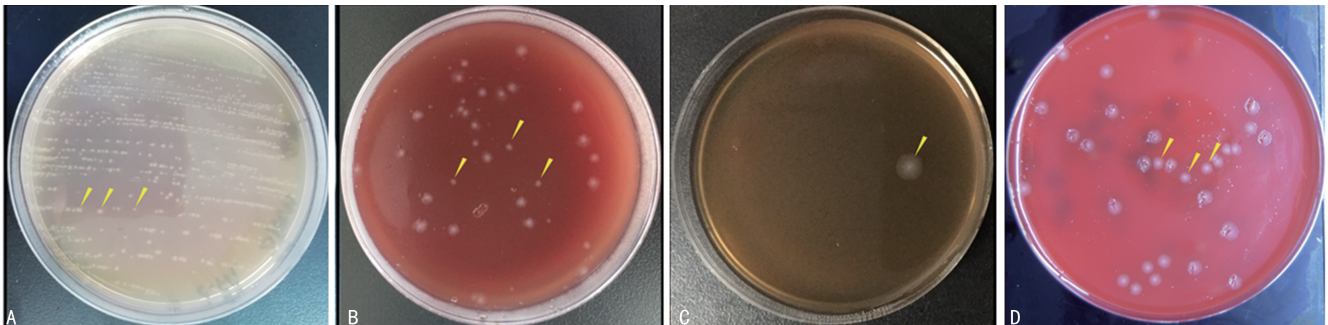
分离到的艰难梭菌对抗生素的敏感性(氯霉素、氨苄青霉素、克拉霉素、四环素、D-环丝氨酸、链霉素、红霉素、甲砒霉素、卡那霉素、头孢西丁、诺氟沙星、克林霉素、甲硝唑、万古霉素、利福平、阿莫西林)通过连续梯度稀释法测定^[16]。艰难梭菌被接种(5%接种率)至 96 孔板中,每个孔中含有 150 μL 的 BHIS。抗生素起始浓度设置为 128 μg/mL,连续 2 倍稀释 10 次,至浓度 0.25 μg/mL,获得不同抗生素浓度梯度(128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25 μg/mL),每组设置 3 个重复。96 孔板厌氧过夜培养后使用酶标仪(BioTeck)测定 600 nm 处的吸光度(OD)值,OD 值大于或等于 0.2 视为菌体生长。

最低抑菌浓度(MIC)测定。将细菌最低抗生素浓度稀释 2 倍,以同样的接种量和培养条件培养,若细菌无生长现象,该浓度即为 MIC(参照美国临床实验室标准化委员会中液体稀释法的判定标准),若细菌生长,稀释后浓度为 MIC。

2 结果

2.1 艰难梭菌分离

在 200 份粪便标本中,经菌株分离和 16S rDNA 鉴定确认,共分离艰难梭菌 12 株,分别编号 ZQS-1~ZQS-12,分离的典型艰难梭菌菌落形态如图 1 所示。CD630 在 BHIS 培养基上形成 1~2 mm 菌落,菌落边缘粗糙、不透明、微黄、近圆形(图 1A)。ZQS-8 菌落形态与 CD630 相似,菌落直径 3~5 mm,边缘粗糙、不透明(图 1B)。ZQS-9 菌株形态与 CD630 相似,边缘粗糙、不透明,菌落最大(图 1C),大菌落的形成可能的原因是平板上无其他菌落竞争营养。ZQS-11 菌株菌落形态与 CD630 相似,边缘粗糙、不透明、菌落大小为 4~5 mm(图 1D)。



A:CD 630 质控菌株菌落形态;B:ZQS-8 菌落形态;C:ZQS-9 菌落形态;D:ZQS-11 菌落形态。

图 1 ICU 分离的典型艰难梭菌菌落形态

2.2 艰难梭菌进化树构建

ICU 分离艰难梭菌菌株与常见梭菌的进化关系。以常见梭菌为参照,构建 12 株艰难梭菌进化树。艰难梭菌在进化树中形成独立分支(*CD* ATCC 9689,*CD* GMU1,*CD* 630,ZQS-1~ZQS-12),提示相对于其他梭菌,艰难梭菌具有独特分类地位。ICU 临床分离 ZQS-1~ZQS-12 菌株与 *CD* 630,*CD* GMU1 菌株亲缘关系较近,与 *CD* ATCC 9689 亲缘关系较远。ZQS-1~ZQS-12 菌株可进一步分为两支,其中 ZQS-1、ZQS-3、ZQS-2、ZQS-9、ZQS-6、ZQS-8 聚为一支;ZQS-5、ZQS-4、ZQS-7、ZQS-10、ZQS-11、ZQS-12 聚为一支,提示 12 株艰难梭菌可能有两种不同的进化距离和不同的分类地位(图 2)。

2.3 艰难梭菌抗生素耐药性测定

如图 3A 所示,12 株艰难梭菌仅能耐受 0.25~2 $\mu\text{g/mL}$ 的氯霉素,对氯霉素较为敏感。如图 3B 所示,临床分离的艰难梭菌对氨苄青霉素的耐药性差异较大,耐受氨苄青霉素浓度 4~64 $\mu\text{g/mL}$,其中 ZQS-8、ZQS-9 对氨苄青霉素耐药性最高(64 $\mu\text{g/mL}$);ZQS-7、ZQS-10、ZQS-11、ZQS-12 对氨苄青霉素的耐药性次之(16 $\mu\text{g/mL}$)。如图 3C 所示,ZQS-8、ZQS-9 分别对 16 $\mu\text{g/mL}$ 和 64 $\mu\text{g/mL}$ 克拉霉素具有抗性,其他菌株对克拉霉素敏感。如图 3D 所示,12 株艰难梭菌对四环素的耐药性可分为 3 个等级:(1)ZQS-1、

ZQS-2、ZQS-3、ZQS-4、ZQS-5、ZQS-6 菌株能够耐受 2~8 $\mu\text{g/mL}$ 的四环素;(2)ZQS-8、ZQS-9 菌株对四环素耐药性较强,其中 ZQS-8 能够在 32 $\mu\text{g/mL}$ 的抗性培养基中生长良好,相比之下 ZQS-9 能够耐受最高 128 $\mu\text{g/mL}$ 的四环素,但生长却受到了一定程度的抑制;(3)四环素对 ZQS-7、ZQS-9、ZQS-10、ZQS-11、ZQS-12 有明显抑制作用,但是却不能完全抑制菌体的生长,即使在 64 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下,这些菌株均有微弱的生长现象。

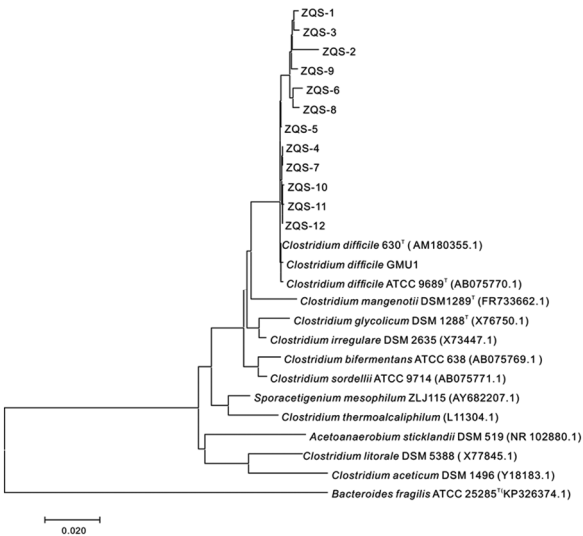
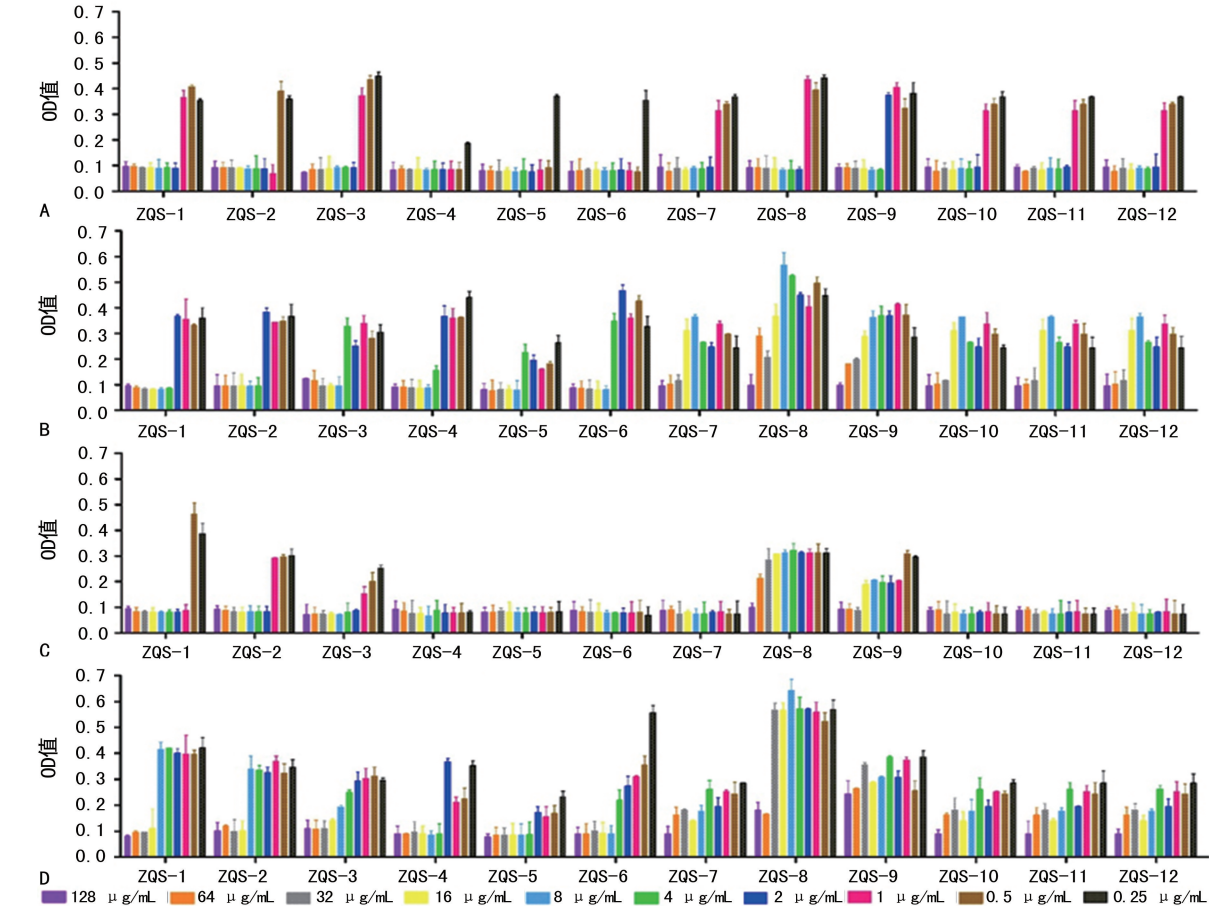


图 2 基于菌株 16S rDNA 序列的系统发育树



A:氯霉素;B:氨苄青霉素;C:克拉霉素;D:四环素。

图 3 艰难梭菌对不同浓度氯霉素、氨苄青霉素、克拉霉素、四环素的耐药性

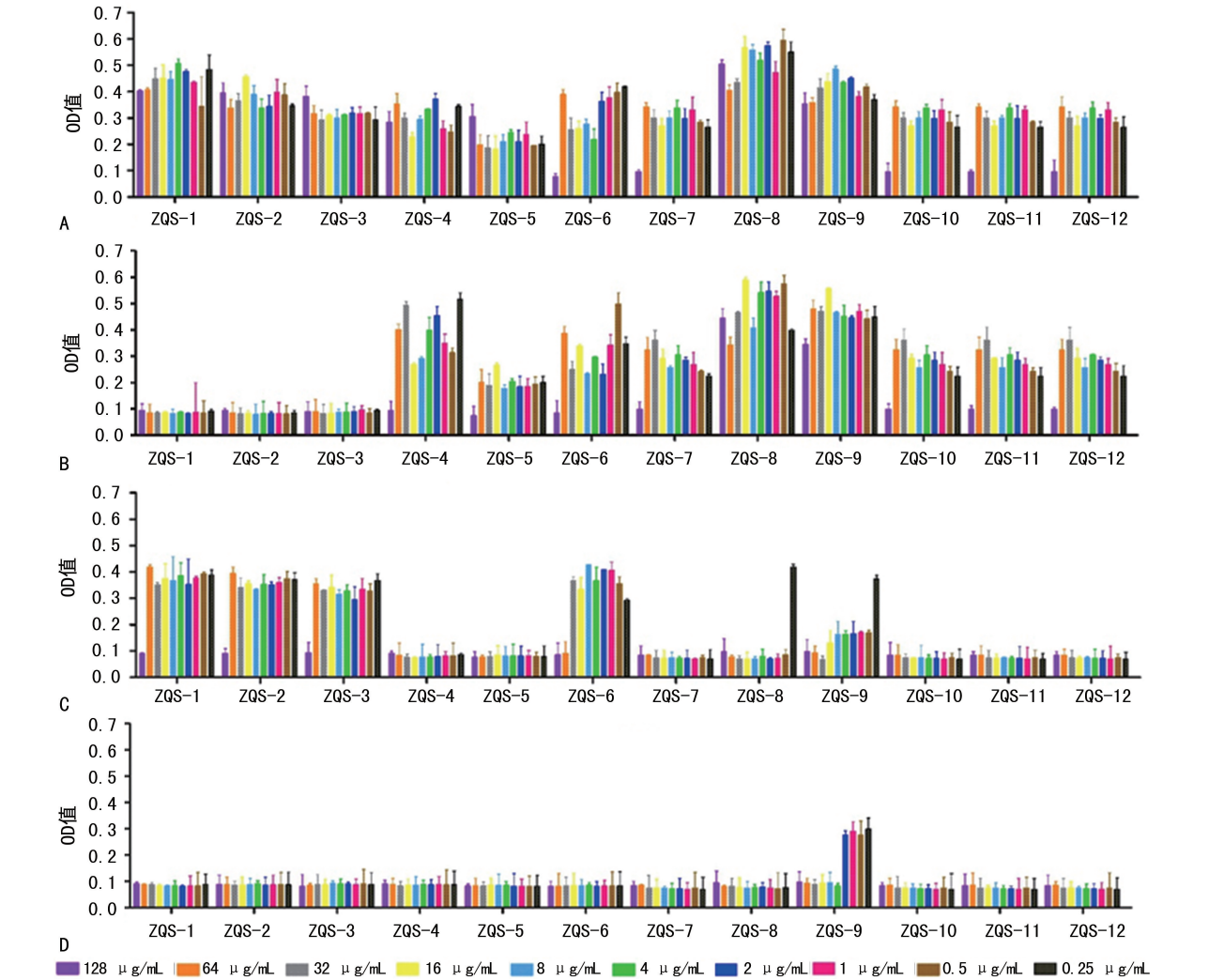


图 4 艰难梭菌对不同浓度 D-环丝氨酸、链霉素、红霉素、甲砒霉素的耐药性

如图 4 所示,12 株 ICU 分离艰难梭菌对 D-环丝氨酸具有较高耐药性(64~128 $\mu\text{g/mL}$)。对链霉素的耐药性分为:(1)ZQS-1、ZQS-2、ZQS-3 对链霉素极其敏感(在 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素培养基中不能生长);(2)ZQS-4、ZQS-5、ZQS-6、ZQS-7、ZQS-8、ZQS-9、ZQS-10、ZQS-11、ZQS-12 对链霉素耐受性较强(能够在 64~128 $\mu\text{g/mL}$ 的链霉素培养基中生长)。对红霉素的耐药性可分为:(1)对红霉素敏感(ZQS-4、ZQS-5、ZQS-7、ZQS-8、ZQS-9、ZQS-10、ZQS-11、ZQS-12);(2)能够耐受 32~64 $\mu\text{g/mL}$ 的红霉素(ZQS-1、ZQS-2、ZQS-3、ZQS-6)。除 ZQS-9 菌株以外(能够耐受 2 $\mu\text{g/mL}$),所有菌株都对甲砒霉素敏感(在 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 的甲砒霉素培养基中不能生长)。

如图 5 所示,12 株艰难梭菌对卡那霉素有很强的耐药性(>128 $\mu\text{g/mL}$);除 ZQS-11 能够耐受 16 $\mu\text{g/mL}$ 头孢西丁外,其他菌株都只能耐受 8 $\mu\text{g/mL}$ 的头孢西丁;对诺氟沙星耐受浓度为 16~64 $\mu\text{g/mL}$;除 ZQS-11 能够耐受 64 $\mu\text{g/mL}$ 诺氟沙星外,其他菌株对诺氟沙星较为敏感(耐受 0.5~2 $\mu\text{g/mL}$)。

如图 6 所示,12 株艰难梭菌中,ZQS-7、ZQS-8 在

最高 64 $\mu\text{g/mL}$ 的甲硝唑培养基中有微弱生长现象,可能发展为耐甲硝唑耐药菌株。其他菌株对甲硝唑敏感,大多数菌株在 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 的甲硝唑培养基中没有生长现象;12 株艰难梭菌对万古霉素敏感,仅能在 0.5~2 $\mu\text{g/mL}$ 万古霉素培养基中生长;12 株艰难梭菌均对利福平极其敏感,在利福平浓度 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 的培养基中,所有菌株均没有生长现象;12 株艰难梭菌对阿莫西林敏感,最高耐受浓度 2 $\mu\text{g/mL}$ (ZQS-10、ZQS-12)。

2.4 MIC 分析

16 种抗生素对 12 株艰难梭菌的 MIC 见表 2、3。ICU 分离得到的艰难梭菌中 ZQS-8、ZQS-9 具有多重耐药性,分别对氨苄青霉素、克拉霉素、四环素、链霉素、卡那霉素和诺氟沙星具有耐药性,ZQS-6 对万古霉素、氨苄青霉素、链霉素、红霉素、卡那霉素具有耐药性。除此之外,ZQS-1、ZQS-2、ZQS-3 对氨苄青霉素、四环素、红霉素和卡那霉素具有耐药性;ZQS-4、ZQS-5 对氨苄青霉素、链霉素和卡那霉素具有耐药性。ZQS-7、ZQS-10、ZQS-12 对氨苄青霉素、链霉素、卡那霉素和诺氟沙星具有耐药性。ZQS-11 对氨苄青

菌株对氨苄青霉素和卡纳霉素具有耐药性;20%、58%、75%、50%、17%、42%、8%和8%的菌株分别对克拉霉素、四环素、链霉素、红霉素、头孢西丁、诺氟沙星、克林霉素、万古霉素具有耐药性,见表2。

菌株对氨苄青霉素和卡纳霉素具有耐药性;20%、58%、75%、50%、17%、42%、8%和8%的菌株分别对克拉霉素、四环素、链霉素、红霉素、头孢西丁、诺氟沙星、克林霉素、万古霉素具有耐药性,见表2。

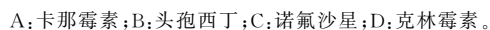
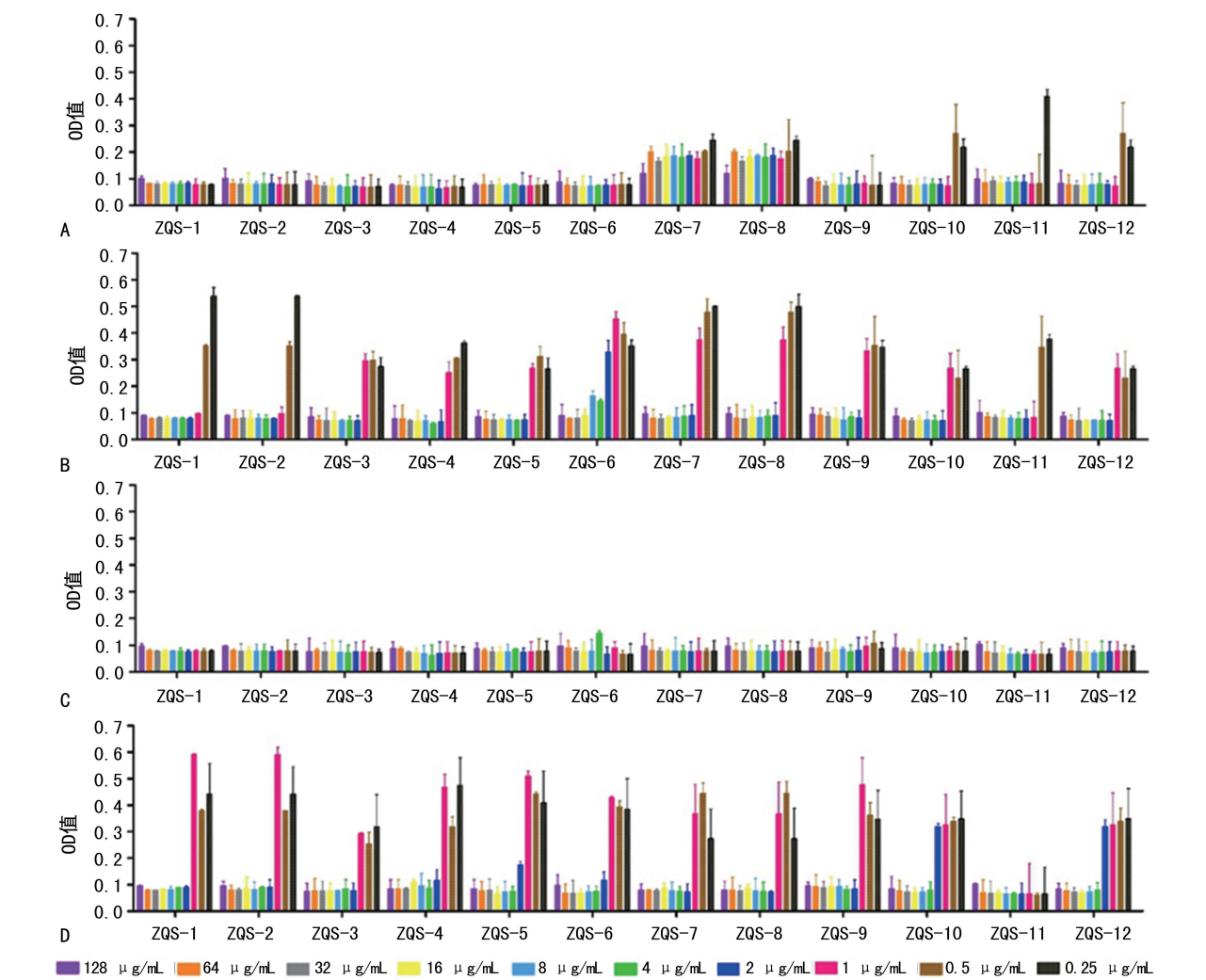


图 5 艰难梭菌对不同浓度卡那霉素、头孢西丁、诺氟沙星、克林霉素的耐药性

表 1 艰难梭菌的最低抑菌浓度值分析 ($\mu\text{g/mL}$)

[illegible]

续表 1 艰难梭菌的最低抑菌浓度值分析 (μg/mL)												
抗生素	ZQS-1	ZQS-2	ZQS-3	ZQS-4	ZQS-5	ZQS-6	ZQS-7	ZQS-8	ZQS-9	ZQS-10	ZQS-11	ZQS-12
诺氟沙星	32	32	32	32	64	32	128	128	128	128	64	128
克林霉素	1	1	1	4	4	4	4	4	4	4	128	2
甲硝唑	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	1	<0.25	<0.25	1	0.5	<0.25
万古霉素	0.5	0.5	1	1	1	2	1	1	1	1	0.5	1
利福平	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25	<0.25
阿莫西林	2	2	2	2	4	4	4	2	2	4	<0.25	2



A:甲硝唑;B:万古霉素;C:利福平;D:阿莫西林。
图 6 艰难梭菌对不同浓度甲硝唑、万古霉素、利福平、阿莫西林的耐药性

表 2 艰难梭菌对 16 种抗生素的耐药性								
抗生素	耐药折点 (μg/mL)	MIC 解释标准 (μg/mL)			药敏结果			耐药率 (%)
		敏感	中介	耐药	敏感	中介	耐药	
氯霉素	32	≤8	16	≥32	12	0	0	0
氨苄青霉素	2	≤0.5	1	≥2	0	0	12	100
克拉霉素	8	≤4	6	≥8	10	0	2	20
四环素	16	≤4	8	≥16	2	3	7	58
D-环丝氨酸	—	—	—	—	—	—	—	—
链霉素	16	≤4	8	≥16	3	0	9	75
红霉素	8	≤4	6	≥8	6	0	6	50

续表 2 艰难梭菌对 16 种抗生素的耐药性

抗生素	耐药折点 ($\mu\text{g/mL}$)	MIC 解释标准($\mu\text{g/mL}$)			药敏结果(n)			耐药率(%)
		敏感	中介	耐药	敏感	中介	耐药	
甲磺霉素	32	≤ 8	16	≥ 32	12	0	0	0
卡那霉素	64	≤ 16	32	≥ 64	0	0	12	100
头孢西丁	64	≤ 16	32	≥ 64	9	1	2	17
诺氟沙星	128	≤ 32	64	≥ 128	1	6	5	42
克林霉素	8	≤ 2	4	≥ 8	4	7	1	8
甲硝唑	32	≤ 8	16	≥ 32	12	0	0	0
万古霉素	2	≤ 0.5	1	≥ 2	3	8	1	8
利福平	8	≤ 8	16	≥ 32	12	0	0	0
阿莫西林	8	≤ 2	4	≥ 8	8	4	0	0

—:无数据。

3 讨 论

在过去的 10 年中 CDI 发病率和致死率呈增加趋势。多重耐药艰难梭菌的出现,使得 CDI 预防和治疗面临挑战^[5]。CDI 的发生与抗生素的使用具有密切的关系,如氨苄青霉素、阿莫西林、头孢菌素类等的使用都是 CDI 的高危因素^[17]。本研究从 ICU 200 份粪便标本中分离到 12 株艰难梭菌(阳性率 6%),并测定其对 16 种抗生素的耐药性。所有菌株对氯霉素、甲磺霉素、甲硝唑、利福平和阿莫西林敏感。其中利福平对艰难梭菌抑制效果最佳,但因为利福平为治疗肺结核的一线药物,且不良反应较大,所以在临床上未使用该药物治疗 CDI。12 株艰难梭菌均对氨苄青霉素、卡那霉素和 D-环丝氨酸具有抗性。对克拉霉素、四环素、链霉素、红霉素、头孢西丁、诺氟沙星、克林霉素、万古霉素的耐药率分别为 20%、58%、75%、50%、17%、42%、8%和 8%。

在西班牙、波兰、新西兰艰难梭菌对克林霉素的耐药性约为 74%、65%和 61%。在中国、日本、韩国和伊朗艰难梭菌对克林霉素的耐药性约为 73.5%、87.7%、81.0%和 89.3%^[5]。在 ICU 分离的 12 株艰难梭菌中仅有 8%的菌株对克林霉素敏感。在日本、韩国艰难梭菌对红霉素的耐药率分别为 87.7%和 80.0%,ICU 分离的 12 株艰难梭菌对红霉素的耐药率为 50.0%。日本、韩国、美国、新西兰艰难梭菌对四环素的耐药性为 0、0、6.7%和 0%,ICU 分离的 12 株艰难梭菌对四环素的耐药性高达 58%,与 HUANG 等^[18]的研究一致。在日本、韩国、美国艰难梭菌对利福平的耐药性分别为 0、0 和 11.2%^[5],ICU 分离的 12 株艰难梭菌对利福平耐药性为 0,与 O'CONNOR 等^[19]报道 29.1%的耐药性具有较大差异,造成这种差异的原因是不同地域流行的菌株可能具有不同的起源。12 株菌种中有一株对万古霉素耐药(MIC $\geq 2 \mu\text{g/mL}$)。甲硝唑和万古霉素通常对艰难梭菌具有良

好的抗菌活性,耐药菌株罕见,因此万古霉素临床耐药菌株的出现应引起足够的重视^[20]。以上结果提示 12 株艰难梭菌可能具有独特的特点,值得进一步深入研究。

综上所述,本研究首次探索了贵州局部地区典型 ICU 病房中 200 例住院患者的 CDI 状况,并对分离的艰难梭菌菌株进行了分类鉴定。已获得的艰难梭菌菌株可扩充贵州省艰难梭菌菌种资源库,为后续的研究提供材料。更重要的是,本研究测定了所有菌株对 16 种常见抗生素的耐药性数据,这些菌株表现出明显的区域特征,对艰难梭菌多重耐药性的监测具有积极意义。然而,本研究未进一步对分离艰难梭菌进行核糖体分型和研究其携带毒力基因特征,在未来的工作中有待进一步完善。

参考文献

[1] AHARON O,MAJA R. *Clostridium difficile*, and, *Clostridioides difficile*: two validly published and correct names[J]. Anaerobe,2018,52(1):125-126.

[2] ONG G K B,REIDY T J,HUK M D,et al. *Clostridium difficile* colitis: a clinical review [J]. Am J Surg,2017,213(3):565-571.

[3] COLLINS D A,HAWKEY P M,RILEY T V. Epidemiology of *Clostridium difficile* infection in Asia [J]. Antimicrob Res Infecti Control, 2013,2(1):1-9.

[4] TICKLER I A,GOERING R V,WHITMORE J D,et al. Strain Types and Antimicrobial Resistance Patterns of *Clostridium difficile* Isolates from the United States,2011 to 2013[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(7):

- 4214-4218.
- [5] BANAWAS S S. *Clostridium difficile* infections: a global overview of drug sensitivity and resistance mechanisms[J]. Bio med Res Int, 2018, 2018(1): 1-9.
 - [6] REIL M, HENSGENS M P M, KUIJPER E J, et al. Seasonality of *clostridium difficile* infections in southern germany[J]. Epidemiol Infect, 2012, 140(10): 1787-1793.
 - [7] TANG C, CUI L, XU Y, et al. The incidence and drug resistance of *Clostridium difficile* infection in mainland China: a systematic review and meta-analysis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 37865.
 - [8] SPIGAGLIA P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridium difficile* infection [J]. Ther Adv Infect Dis, 2016, 3(1): 23-42.
 - [9] BOBO L D, DUBBERKE E R, KOLLEF M. *Clostridium difficile* in the ICU: the struggle continues[J]. Chest, 2011, 140(6): 1643-1653.
 - [10] SCARIA J, JANVILISRI T, FUBINI S, et al. *Clostridium difficile* transcriptome analysis using pig ligated loop model reveals modulation of pathways not modulated in vitro[J]. J Infect Dis, 2011, 203(11): 1613-1620.
 - [11] WILSON K H, KENNEDY M J, FEKETY F R. Use of sodium taurocholate to enhance spore recovery on a medium selective for *Clostridium difficile* [J]. J Clin microbiol, 1982, 15(3): 443-446.
 - [12] HILL K A, COLLINS J, WILSON L, et al. Comparison of two selective media for the recovery of *Clostridium difficile* from environmental surfaces [J]. J Hosp Infect, 2013, 83(2): 164-166.
 - [13] HONG W, CHENG Y M, RAO F Q, et al. Co-infection of *Clostridioides (Clostridium) difficile* GMU1 and *Bacillus cereus* GMU2 in one patient in Guizhou, China [J]. Anaerobe, 2018, 54(2): 159-163.
 - [14] ROTH A, FISCHER M, HAMID M E, et al. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(1): 139-147.
 - [15] WOLCOTT R D, HANSON J D, REES E J, et al. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing [J]. Wound Repair Regen, 2016, 24(1): 163-174.
 - [16] RELLER L B, WEINSTEIN M, JORGENSEN J H, et al. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices[J]. Clin Infect Dis, 2009, 49(11): 1749-1755.
 - [17] OWENS R C, DONSKEY C J, GAYNES R P, et al. Antimicrobial-associated risk factors for *Clostridium difficile* infection [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(Suppl 1): S19-31.
 - [18] HUANG H, WEINTRAUB A, FANG H, et al. Antimicrobial susceptibility and heteroresistance in Chinese *Clostridium difficile* strains [J]. Anaerobe, 2010, 16(6): 633-635.
 - [19] O'CONNOR J R, GALANG M A, SAMBOL S P, et al. Rifampin and rifaximin resistance in clinical isolates of *Clostridium difficile* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52(8): 2813-2817.
 - [20] 周芬芬, 吴湜, 徐少华, 等. 艰难梭菌临床分离株 5 年前后耐药性变化[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(2): 116-120.

(收稿日期: 2019-12-24 修回日期: 2020-02-06)