

艰难梭菌感染实验室检测技术及其研究进展

龙海燕, 杨菁玉 综述, 冯 萍[△]审校(四川大学华西医院感染性疾病中心, 成都 610041)

【关键词】 艰难梭菌; 细菌培养; 毒素检测; 免疫学; 分子生物学

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2015. 08. 049 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)08-1143-03

艰难梭菌(CD)是一种专性厌氧的革兰染色阳性芽孢杆菌,它广泛分布于自然环境、动物和人的粪便中,芽孢抵抗力较强,可在外界环境存活数周至数月。CD 本身没有侵袭性,部分产毒细菌通过分泌毒素 A、毒素 B 及二元毒素引起抗菌药物相关性腹泻、结肠炎甚至致死性假膜性肠炎,统称为艰难梭菌感染(CDI)。广谱抗菌药物的使用、炎性反应肠病、慢性肝病、器官移植、化疗、长期使用激素、丙种球蛋白减少等患者以及怀孕及分娩前后的妇女更易发生 CDI^[1]。目前,CD 是公认的院内感染和抗菌药物相关性腹泻最重要的病因。进入 21 世纪以来,CDI 发病率和疾病严重程度在全球范围内呈上升趋势。而我国多数医院对 CDI 检查手段有限,诊断率低,因此,目前对早期、快速、准确、廉价地诊断 CDI 提出了更高要求,以期早期治疗,降低住院时间、病死率等。本文就现有 CDI 检测技术及其进展作一综述。

1 CD 毒素检测

1.1 细胞毒性试验(CTA) CTA 是通过验证标本中存在特异性毒性效应产物来诊断 CDI,主要原理是将过滤的粪便抽提物接种至处于生长的健康单层细胞中培养 24~48 h,若样本中存在 CD 毒素则会出现特殊的细胞病变效应(细胞变圆),为明确其特异性需再在样本中加入特定的抗毒素进行细胞毒素中和试验。研究发现,毒素 B 所致的细胞病变效力是毒素 A 的 $10^3 \sim 10^4$ 倍^[2]。CTA 因其敏感性和特异性高曾被美国食品药品监督管理局认定为检测 CDI 的金标准。但是 CTA 需要难度较高细胞培养技术,测定时间长,受标本稀释浓度等影响使其在常规临床微生物实验室应用有一定困难。

1.2 A/B 毒素的免疫学检测(A/B EIA) 该方法是通过检测 CD 产生的主要毒素来判断 CDI。CD 通常产生 A、B 两种毒素,以前免疫学常针对的是毒素 A,但近年国内外均有 A/B⁺ 株报道,且该菌株仍可导致严重 CDI^[3]。因此,现在都同时检测 A、B 两种毒素以提高检测的灵敏度。目前主要采用酶联免疫法、免疫层析法等。其基本原理是通过抗原抗体反应使酶标抗体(或抗原)结合到载体上,经洗涤或层析后与底物反应显色,根据颜色深浅进行定性或定量分析,数小时即可得出结果,是一种快速、简单、便宜、设备技术要求不高的检测手段,目前已经有大量的商品试剂盒上市。以前 A/B EIA 是应用最为广泛的诊断方法。但有研究表明,与产毒株培养相比其敏感性为 32.8%~57.1%,而且在临床中标本留取到正式进入检测的时间如果较长,则毒素容易分解,易造成假阴性^[4]。目前普遍认为 EIA 不能被作为一个单独诊断 CDI 的检查方法。CD 毒素是导致 CDI 最直接的原因,因此毒素检测对于 CDI 诊断具有很高特异性,但是其敏感性仍值得商榷。曾有报道,1 例经肠

镜检查诊断为伪膜性肠炎的患者携带有 CD 产毒株,但是却未检测到 CD 毒素,在一定程度上提示若只依靠毒素检测可能会导致某些 CDI 的漏诊^[5]。而关于毒素阳性与疾病严重程度的关系也存在一定分歧,这可能是由检测方法不同导致^[6-8]。英国卫生部所发布的指南指出,只有检测出 CD 毒素的患者才能上报 CDI,因此毒素检测在临床上仍占有重要的位置。

2 CD 细菌学检测

2.1 细菌培养 这是 CDI 的传统检测方法,其主要步骤是预处理大便后,接种至 CD 选择性培养基-环丝氨酸头孢西丁果糖琼脂(CCFA)中,厌氧环境下至少培养 48 h。如果有着足够相关经验,根据培养基上菌落形态及革兰染色阳性的证实就可明确有无 CD,可疑者可进行进一步的生化鉴定。目前在传统的培养方法上也有一定的改进,如在 CCFA 中加入牛磺胆酸钠或者溶菌酶更有助于芽孢的富集,从而提高了敏感性^[9]。CD 培养敏感性高,培养得到的细菌可以进一步进行毒素分析、细菌分型、耐药分析等,有利于流行病学调查研究。但是厌氧菌标本收集要求高,培养难度大,阳性率受操作人员经验影响大,所需时间长,检验成本较高,在临床实验室未常规开展,主要用于科研方面。若培养为细菌阳性者也不能区别其是否产毒,因此,限制其进一步的应用。

2.2 CD 共同抗原(GDH)检测 CD 共同抗原是 CD 表面大量表达的谷氨酸脱氢酶,目前主要用免疫学方法直接检测大便中的 GDH 抗原。Crobach 等^[10] 研究发现,GDH 检测与细菌培养和产毒株培养比较,其平均敏感性分别为 88% 和 60%。Shetty 等^[11] 用 Meta 分析发现,GDH 检测的阴性预测值在 94.6%~100%。GDH 稳定性和灵敏度较高,不易受到标本存放时间的影响,但不能区分是否为产毒株,且其最大优势在于有很高的阴性预测值,阴性结果者即可基本排除 CD 的存在,阳性者可再进一步行毒素或产毒基因检测,因此可以作为二步法或三步法的筛查试验。

3 CD 产毒菌株检测

3.1 产毒菌株培养(TC) TC 包括 CD 培养和毒素检测两个步骤。CD 培养阳性者再进行毒素检测,后者主要有细胞毒性检测,聚合酶链反应(PCR)检测毒性基因,免疫法检测毒素 A/B 等。聚合酶链反应(PCR)只是检测毒素基因,其有不一定表达或表达量太少无法致病的可能,而 A/B EIA 敏感性不高,因此目前产毒菌株培养是指 CD 培养加细胞毒性检测才是公认的诊断 CDI 的金标准^[12]。因其耗时长(2~5 d)、操作难度大、需要专业研究员等原因限制了在临床的应用,目前主要用于新检测方法评估、流行病学调查、耐药性研究等。最近基于毒素 A/B 具有葡萄糖醛基转移酶活性,能够裂解立体化学结

[△] 通讯作者, E-mail: fengp_62@163.com。

构的有色物质(这些物质类似 A/B 毒素的天然底物 UDP 葡萄糖)的原理发展出有色培养基,给产毒菌株培养带来了新的思路。研究表明有色培养基较传统方法更省时,更易辨别,且有较高的敏感性^[13-14]。

3.2 核酸扩增试验(NAAT)

3.2.1 PCR 因为所有产毒菌株都携带 B 毒素基因,因此大部分 PCR 主要针对艰难梭菌 B 毒素基因 tcdB,也有针对艰难梭菌 A 毒素基因 tcdA,负向调节基因 tcdC,编码二元毒素的基因 cdtA 和 cdtB,CD 的特异性基因等。在普通 PCR 基础上已经发展出实时荧光 PCR,多重 PCR 等技术应用于 CDI 检测。Deshpande 等^[15]用 Meta 分析发现,实时荧光 PCR 与 TC 和 CTA 相比,其平均敏感性和特异性分别为 90%、96%、89%、97%。Persson 等^[16]使用多重 PCR 检测 tcdA、tcdB、ctdA、cdtB 和 tcdC,发现其对 027 核酸型有很高特异性,并且能检测其他 CD 临床类型,对流行病学也有重要意义。目前已经有多种商品试剂盒上市,有些可直接用于粪便检测,耗时 1~5 h 不等,因其快速、高敏感性而被广泛认可。但是 PCR 仍存在问题,如引物结合区基因修饰导致假阴性结果;只携带产毒基因却不表达或少量表达而不足以致病;无法区分疾病严重程度;新型菌株出现时易漏诊,检测费用昂贵等。

3.2.2 环介导等温扩增技术(LAMP) 因 LAMP 对目标基因长度只能控制在 200 bp 左右,因此其针对的是 tcdA。LAMP 是利用链置换反应在一定温度下进行,反应只需将基因模板、4 种针对靶基因的 6 个区域的特异性引物、链置换型 DNA 合成酶、基质等共同置于一定温度(60~65 ℃)下,经 1 个步骤即可完成。Lalande 等^[17]以产毒株培养为金标准,用 LAMP 检测 CD 发现,敏感性和特异性分别可达 91.8% 和 99.1% 且可 1 h 内出结果。Boyanton 等^[18]用实时荧光 PCR 与 LAMP 相比发现两者在敏感性上相差无几,后者特异性稍低一些,但都远远超过 A/B EIA。该方法检测时间短(1 h 左右)、设备简单、操作简便、费用相对便宜,配合相应显色试剂还能实现肉眼判别结果。但其缺点是容易污染,造成假阳性结果;有些产毒菌株有 tcdA 缺失,从一定程度上影响了 LAMP 准确度。

3.2.3 依赖解螺旋酶恒温扩增技术(HDA) 该技术是 2004 年报道的一种新型恒温基因扩增技术。HDA 基本原理是先用解旋酶解开双链 DNA,再依靠单链 DNA 结合蛋白与模板单链

结合,使模板单链处于单链状态并保护它的完整性,引物与模板杂交,然后在 DNA 聚合酶催化下扩增,新合成的双链 DNA 即产物作为底物进入下一轮扩增。目前有分别针对 tcdA、tcdB 的 HDA。Deak 等^[19]发现 AmpliVue C. Difficile assay(针对 tcdA)与 LAMP 法比较,其敏感性和特异性分别为 96%、100%。有学者对 The Portrait Toxigenic C. difficile assay(针对 tcdB)进行了一个多中心的临床检测评价,发现该法以 TC 为金标准,其敏感性和特异性分别为 98.2%、92.8%,可在 90 min 内出结果^[20]。HDA 模仿自然界 DNA 合成方式,不易引起非特异性扩增,具有高敏感性和高保真性。反应在同一温度下可以进行,因而不需要昂贵的 PCR 仪,很适合基层实验室的使用,为一种崭新的恒温扩增技术,虽然还有待更进一步的探索研究,但是具有很大的发展前景。

目前 NAAT 因其敏感性高、快速而被广泛认可,2013 年《美国胃肠病学杂志》发表的关于 CDI 诊断的指南中指出,建议 NAAT 可以单独作为一种诊断手段^[1]。它有利于临床 CDI 诊治和控制措施的快速开展,从而减少经验性治疗、平均住院时间、CD 传播的发生率等,因此可一定程度上降低整体医疗支出^[21]。但在临床应用中仍发现一些问题:难以区分无症状携带者;导致 CDI 发病率报道的增加^[22]。因此,建议临床医生把检测手段与临床症状相结合以综合判断病情。

4 二步法和三步法

CTA 和 TC 因敏感性高而曾先后推荐为 CDI 的诊断金标准,但其技术要求高,耗费时间长;A/B EIA 虽然方便、快速、便宜但敏感性不足;NAAT 敏感性高、快速,但费用昂贵。因此很多指南推荐二步法和三步法,但关于该法的具体构成存在不一致性。2012 年英国卫生部更新的指南建议:使用 NAAT 或 GDH 为初筛试验,阳性者再加敏感的 A/B EIA,全阳性考虑 CDI;NAAT(GDH)阳性,A/B EIA 阴性,考虑 CD 携带,有传染的可能性,可选择性地再进行 PCR 检测;全阴性不考虑 CDI。2013 年美国《胃肠病学杂志》发表的指南建议,GDH 为初筛试验,阴性者排除 CDI;阳性者必须再进行 NAAT 或 A/B EIA 检测;NAAT 阳性则考虑 CDI,反之排除;A/B EIA 阳性者考虑 CDI,阴性者还需再用 NAAT 进行确诊^[2]。无论二步法或三步法构造怎样,其都具有很好的敏感性和特异性^[23-24];虽然确诊可能会稍有延长,但能够迅速排除 CDI,明显缩减疾病负担费用^[25]。见表 1。

表 1 CDI 实验室检测技术比较

诊断方法		敏感性	特异性	特点
毒素检测	CTA	高	高	准确度高,耗时长,高技术,难以临床常规应用。
	A/B EIA	低	高	快速,价格便宜,缺乏敏感性,无法独立诊断。
细菌学检测	细菌培养	低	中等	没有诊断价值,需要进一步毒素检测。
	GDH	高	低	稳定、灵敏,阴性预测值高,可做筛查试验。
产毒菌株检测	TC	高	高	金标准,耗时长,要求高,难以临床常规应用。
	NAAT			
	PCR	高	高	快速、敏感,费用较高。
	LAMP			快速、敏感,费用较 PCR 稍低,但无法检测 tcdB。
	HDA			快速、敏感,费用较 PCR 低,可基层应用。
二步法和三步法		高	高	准确度高,可迅速排除 CDI,总体上减少医疗费用

5 小 结

CD 正在不断进化,CDI 的地理范围、严重程度、发病特点、人群种类也在不断变化。诊断 CDI 的检测技术也经历了产毒细菌分离培养、免疫学检测到分子生物学技术检测时代。细菌分离培养是金标准,但对本、技术人员要求高,耗时长;免疫学检测快速但是敏感性较低;NAAT 则以更敏感、更快速而被大家推崇,虽然费用稍高,但是随着不同的 NAAT 技术发展,费用正在逐步降低,有望走向临床;二步法和三步法同时具有很好的敏感性和特异性,可针对性检测,从而在整体效益上明显缩减医疗费用,也有临床应用前景。但是因检测到 CD 产毒基因并不代表 CDI,因此 CDI 诊断需要结合患者症状和其他生化辅助指标以综合评判患者的病情,以免过度治疗。如何提高 CDI 诊断率仍将是生物学工作者及临床医生的一大难题,本综述对 CDI 的诊断技术进行复习,希望对提高 CDI 的诊断意识及水平有一些帮助。

参考文献

- [1] Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of clostridium difficile infections[J]. Am J Gastroenterol, 2013, 108(4): 478-498.
- [2] Sullivan NM, Pellett S, Wilkins TD. Purification and characterization of toxins A and B of clostridium difficile[J]. Infect Immun, 1982, 35(3): 1032-1040.
- [3] Lyras D, O'Connor JR, Howarth PM, et al. Toxin B is essential for virulence of clostridium difficile[J]. Nature, 2009, 458(7242): 1176-1179.
- [4] René P, Frenette CP, Schiller I, et al. Comparison of eight commercial enzyme immunoassays for the detection of clostridium difficile from stool samples and effect of strain type[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 73(1): 94-96.
- [5] Polage CR, Chin DL, Leslie JL, et al. Outcomes in patients tested for clostridium difficile toxins[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012, 74(4): 369-373.
- [6] Guerrero DM, Chou C, Jury LA, et al. Clinical and infection control implications of clostridium difficile infection with negative enzyme immunoassay for toxin[J]. Clin Infect Dis, 2011, 53(3): 287-290.
- [7] Humphries RM, Usanb DZ, Rubinb Z. Performance of clostridium difficile toxin enzyme immunoassay and nucleic acid amplification tests stratified by patient disease severity[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(3): 869-873.
- [8] Longtin Y, Trottier S, Brochu G, et al. Impact of the type of diagnostic assay on clostridium difficile infection and complication rates in a mandatory reporting program[J]. Clin Infect Dis, 2013, 56(1): 67-73.
- [9] Foster NF, Riley TV. Improved recovery of clostridium difficile spores with the incorporation of synthetic taurocholate in cycloserine-cefoxitin-fructose agar(CCFA)[J]. Pathology, 2012, 44(4): 354-356.
- [10] Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, et al. European soci-

ety of clinical microbiology and infectious diseases (ESC-MID); data review and recommendations for diagnosing clostridium difficile-infection (CDI) [J]. Clin Microbiol Infect, 2009, 15(12): 1053-1066.

- [11] Shetty N, Wren MWD, Coen PG. The role of glutamate dehydrogenase for the detection of clostridium difficile in faecal samples; a meta-analysis[J]. J Hosp Infect, 2011, 77(1): 1-6.
- [12] Dubberke ER, Han Z, Bobo L, et al. Impact of clinical symptoms on interpretation of diagnostic assays for clostridium difficile infections[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8): 2887-2893.
- [13] Carson KC, Boseiwaqa LV, Thean SK, et al. Isolation of clostridium difficile from faecal specimens-a comparison of chromID C. difficile agar and cycloserine cefoxitin-fructose agar[J]. J Med Microbiol, 2013, 62(9): 1423-1427.
- [14] Luk S, To WK, Ng TK, et al. A cost-effective approach for detection of toxigenic clostridium difficile; toxigenic culture using chromID clostridium difficile agar[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(2): 671-673.
- [15] Deshpande A, Pasupuleti V, Rolston DD, et al. Diagnostic accuracy of real-time polymerase chain reaction in detection of clostridium difficile in the stool samples of patients with suspected clostridium difficile infection; a meta-analysis[J]. Clin Infect Dis, 2011, 53(7): 81-90.
- [16] Persson S, Jensen JN, Olsen KE. Multiplex PCR method for detection of clostridium difficile tcdA, tcdB, cdtA, and cdtB and internal in-frame deletion of tcdC[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(12): 4299-4300.
- [17] Lalande V, Barrault L, Wadel S, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for diagnosis of clostridium difficile infections[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(7): 2714-2716.
- [18] Boyanton BL, Sural P, Loomis CR, et al. Loop-mediated isothermal amplification compared to real-time PCR and enzyme immunoassay for toxigenic clostridium difficile detection[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(3): 640-645.
- [19] Deak E, Miller SA, Humphries RM. Comparison of the illumigene, simplexa, and ampliVue clostridium difficile molecular assays for diagnosis of C. difficile Infection[J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(3): 960-963.
- [20] Buchan BW, Mackey TLA, Daly JA, et al. Multicenter clinical evaluation of the portrait toxigenic C. difficile assay for detection of toxigenic clostridium difficile strains in clinical stool specimens[J]. J Clin Microbiol, 2012, 50(12): 3932-3936.
- [21] Barbut F, Surgers L, Eckert C, et al. Does a rapid diagnosis of clostridium difficile infection impact on quality of patient management[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(2): 136-144.

- [3] Duan J, Zheng C, Gao K, et al. Ultrasonography of lower limb vascular angiopathy and plaque formation in type 2 diabetes patients and finding its relevance to the carotid atherosclerotic formation[J]. Pak Med Sci, 2014, 30(1): 54-58.
- [4] Gibbons GW, Shaw PM. Diabetic vascular disease: characteristics of vascular disease unique to the diabetic patient[J]. Semin Vasc Surg, 2012, 25(2): 89-92.
- [5] Lepantalo M, Apelqvist J, Setaccic C, et al. Chapter V: diabetic foot[J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 2011, 42(S2): 60-74.
- [6] Sayed A, Taha A, Elkholy M, et al. Tibial angioplasty in diabetic patients: should all vessels be treated[J]. Int Angiol, 2012, 31(3): 239-244.
- [7] Jude EB, Oyibo SO, Chalmers N, et al. Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome[J]. Diabetes Care, 2001, 24(8): 1433-1437.
- [8] Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes[J]. JAMA, 2005, 293(2): 217-228.
- [9] Gemechu FW, Seemant F, Curley CA. Diabetic foot infections[J]. Am Fam Physician, 2013, 88(3): 177-184.
- [10] Caselli A, Latini V, Lapenna A, et al. Transcutaneous oxygen tension monitoring after successful revascularization in diabetic patients with ischaemic foot ulcers[J]. Diabet Med, 2005, 22(4): 460-465.
- [11] Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, et al. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the international brachial artery reactivity task force[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(2): 257-265.
- [12] 俞同福, 王德杭, 冯阳, 等. 多排螺旋 CT3D 血管成像 (CTA) 临床应用[J]. 实用放射学杂志, 2003, 19(8): 747-750.
- [13] Schoenberg SO, Londy FJ, Licato P, et al. Multiphase-multistep gadolinium-enhanced MR angiography of the abdominal aorta and runoff vessels[J]. Invest Radiol, 2001, 36(5): 283-291.
- [14] Sumpio BE, Lee T, Blume PA. Vascular evaluation and arterial reconstruction of the diabetic foot[J]. Clin Podiatr Med Surg, 2003, 20(4): 689-708.
- [15] Cao P, Eckstein HH, De Rang P, et al. Chapter II: diagnostic methods[J]. Eur J Vasc Endo Surg, 2011, 42(2): 13-32.
- [16] 李建峰, 卢志娟, 林家东. 2 型糖尿病患者足背动脉超声检测的价值评估[J]. 中国现代医生, 2010, 48(17): 48-49.
- [17] 陈国胜. 彩色多普勒超声对糖尿病患者下肢动脉的检测分析[J]. 中国医药导刊, 2011, 13(7): 1132-1133.
- [18] 王洪, 郝宏. 踝臂指数与彩色多普勒超声对糖尿病足患者下肢动脉病的预测价值[J]. 广东医学, 2010, 31(9): 1141-1144.
- [19] Wen XR, Lü XF, Liu CC, et al. The ultrasound image characteristics of lower extremities arteries in diabetic foot[J]. Sichuan Univ Med Sci Ed, 2012, 43(5): 739-742.
- [20] 徐海波. 彩色多普勒超声对糖尿病合并下肢动脉闭塞性病变的诊断价值[J]. 吉林医学, 2012, 33(24): 5253.
- [21] 杨海云, 高传江, 欧冰, 等. 彩色多普勒超声诊断 II 型糖尿病患者下肢动脉病变[J]. 中国介入影像与治疗学, 2009, 6(6): 506-508.
- [22] Marti X, Romera A, Vila R, et al. Role of ultrasound arterial mapping in planning therapeutic options for critical ischemia of lower limbs in diabetic patients[J]. Ann Vasc Surg, 2012, 26(8): 1071-1076.
- [23] 翁焕, 谢丹, 翁增杰, 等. 2 型糖尿病足溃疡患者下肢血管病变分析及彩色多普勒血流显像的应用[J]. 广东医学, 2010, 31(18): 2400-2402.
- [24] Zheng Y, Wang L, Krupka TM, et al. The feasibility of using high frequency ultrasound to assess nerve ending neuropathy in patients with diabetic foot[J]. Eur J Radiol, 2013, 82(3): 512-517.

(收稿日期: 2014-10-30 修回日期: 2014-12-22)

(上接第 1145 页)

- [22] Williamson DA, Basu I, Freeman J, et al. Improved detection of toxigenic clostridium difficile using the cepheid xpert C difficile assay and impact on C difficile infection rates in a tertiary hospital: a double-edged sword[J]. Am J Infect Control, 2013, 41(3): 270-272.
- [23] Goldenberg SD, Cliff PR, Smith S, et al. Two-step glutamate dehydrogenase antigen real-time polymerase chain reaction assay for detection of toxigenic clostridium difficile[J]. J Hosp Infect, 2010, 74(1): 48-54.
- [24] Larson AM, Fung AM, Fang FC. Evaluation of ted real-time PCR in a three-step diagnostic algorithm for detection of toxigenic clostridium difficile[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(1): 124-130.
- [25] Vasoo S, Stevens J, Portillo L, et al. Cost-effectiveness of a modified two-step algorithm using a combined glutamate dehydrogenase/toxin enzyme immunoassay and real-time PCR for the diagnosis of clostridium difficile infection[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2012, 47(1): 75-78.

(收稿日期: 2014-10-17 修回日期: 2014-11-22)