

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2017.04.023

· 综述 ·

艰难梭菌分子分型方法研究进展

Advances in molecular typing of *Clostridium difficile*

李志荣(LI Zhi-rong)^{1,2}, 赵建宏(ZHAO Jian-hong)^{1,2}

(1 河北医科大学第二医院, 河北 石家庄 050000; 2 河北省临床检验中心, 河北 石家庄 050000)

(1 The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China; 2 Hebei Provincial Center for Clinical Laboratory, Shijiazhuang 050000, China)

[关键词] 艰难梭菌; 分子分型; 分子流行病学

[中图分类号] R378.8 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2017)04-0377-06

艰难梭菌(*Clostridium difficile*, CD)是一种革兰阳性厌氧芽孢杆菌, 20 世纪 80 年代发现它是引起抗生素相关性假膜性肠炎的原因之一, 由其引起的艰难梭菌感染(*Clostridium difficile* infection, CDI)现已成为抗生素相关性腹泻的主要原因^[1-2]。CDI 可表现为从轻度的自限性腹泻到严重的假膜性肠炎甚至死亡。在过去的十多年中, CD 的流行病学情况发生了变化, 自 2004 年起在北美和欧洲相继出现了 CD 强毒株: NAP-1/027/ST1^[3-4]。到 2008 年, 又发现了另一强毒株 PCR RT078/NAP 07-08/ST11 的传播流行^[5]。快速、准确的分子分型对 CD 暴发流行的早期监测和追踪溯源具有重要意义。本文对常用的 CD 分型方法及其最新研究进展进行综述。

1 CD 分型的历史回顾

CD 常用的分型技术可分为 2 类: 表型分型和基因型分型。血清型分型法是 20 世纪 80 年代中期常用的表型分型方法, 采用玻片凝集的原理, 该方法最初能够分出 6 个不同的 CD 血清型^[6], 经进一步改进后可分出 15 种型别^[7]。传统的其他表型分型方法还包括免疫印迹法分型^[8]、细菌素/噬菌体分

型^[9]、抗菌谱分型^[10]等。表型分型方法比较直观, 但是具有重复性低、分型率低和分辨力不足等缺点。20 世纪 90 年代出现基因分型技术, 因其具有更好的分型率和分辨力, 使之逐步取代表型分型技术^[11]。基因型分型技术分为基于电泳条带和基于序列 2 种类型。最常用基于电泳条带型的技术包括限制性内切酶分析(restriction endonuclease analysis, REA)、脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)、毛细管或常规 PCR 核糖体分型(PCR-ribotyping, PCR RT)和多位点可变数目串联重复序列分析(multiple locus variable-number tandem repeat analysis, MLVA)。近年来被实验室推崇的基于序列分析的分型技术为多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)。此外, 以序列分析为基础的全基因组测序技术(whole genome sequencing, WGS)也逐渐兴起, 成为研究 CD 菌株之间差异(如单核苷酸多态性分析)的分型技术。

2 常用的 CD 分型方法

2.1 PCR RT PCR RT 是 CD 最常用的分子分型技术之一。由 Gürtler 等人首次创建, 分型依据是根据 16S 和 23S rDNA 之间的间隔区变异性(inter-

[收稿日期] 2016-06-15

[基金项目] 科技部课题资助项目(2005DKA21202-6); 河北省科技厅资助项目(10966142D); 河北省自然科学基金资助项目(H2013206450)

[作者简介] 李志荣(1985-), 男(汉族), 河北省邯郸市人, 主管检验师, 主要从事临床微生物致病及耐药机制研究。

[通信作者] 赵建宏 E-mail: zhaojh_2002@yahoo.com

genic spacer region, ISR)^[12]。所使用的引物以 16S rRNA 基因的 3' 端和 23S rRNA 基因的 5' 端保守区为目标设计。因为 CD 基因组包含多个 16S—23S rRNA 操纵子,其数量和间隔区大小的不同使得 PCR 扩增后产生不同的扩增产物,经普通琼脂糖凝胶电泳分离得到的电泳带型称为核糖体型。现在用于 CD 的 PCR RT 的引物有两种^[13-14]。其中,Stubbs 等人所描述的 O' Neill 引物比 Bidet 引物的分辨力更好。分辨力是指区分无关菌株的能力,其数据基于辛普森指数(Simpson index, SI)^[15]。采用 O' Neill 引物进行分型时,PCR 产物的大小通常为 250~600 bp,然后由琼脂糖凝胶电泳或最近研究的毛细管电泳分离,从而达到分型目的。在欧洲,PCR 核糖型的命名原则是 UK(United Kingdom)加三位数的后缀(如 UK001)。毛细管电泳核糖型别则为前缀 CE 加上三位数的后缀(即 CE001)。然而,由于 PCR 核糖体型别的判定需要与参考菌株进行电泳谱型对比,不易在实验室间统一实现。因此,当前很多实验室也会依据本实验室的菌株型别进行排序命名(如本实验室的型别命名以 HB 加上两位数的后缀而成)^[16]。迄今为止,PCR RT 能够识别 400 多种不同的 CD 类型。

2.2 PFGE 分型 在北美地区,PFGE 曾是最常用的 CD 分子分型技术之一。PFGE 利用稀有酶切位点限制性内切酶(例如 SmaI)对细菌染色体组 DNA 进行消化,通过在 3 个不同方向的脉冲电场,从而使细菌 DNA 片段得以有效分离。由于在电泳过程中的脉冲方向呈线性增加,可以逐步使更大的片段能够通过凝胶迁移,从而可以区分传统琼脂糖凝胶电泳下不能分辨的大片段 DNA。PFGE 所得到的指纹谱型被称为 NAP 型。型别类型使用前缀 NAP(北美脉冲场型)后跟一个数字表示脉冲场型的分组和一个字母表示的亚组(即 NAP 1b)。

尽管仪器设备昂贵,操作程序复杂和运行缓慢,但在美国 PulseNet 的大力推动下,PFGE 分型方法仍在 20 世纪 90 年代成为北美地区大多数 CD 病原体的金标准。但是,由于细菌 DNA 的降解导致许多 CD 无法被分型。此外,PFGE 的标准操作流程和应用还需要进一步的优化^[17]。

有报道称 PFGE 比 PCR RT 具有更好的分辨力(SI 值分别为 0.843 和 0.688)^[18]。然而,另一项关于 PCR RT 初步分型技术比对的研究中,最常见的 39 个 PCR RT 型,却只能被分为 16 个 PFGE 类型。所有基于电泳指纹图谱分型面临的共同问题是

对电泳条带的识别,尤其是当条带的谱型差别不大的时候。因此,如何定义 PFGE 和 PCR 的不同型别对于识别新的型别非常必要。在欧洲,新的 PCR 核糖体型别常由参考实验室来验证。早期的 20 个 PCR RT 型分离自多个欧洲国家,遍布欧洲艰难梭菌感染研究网络(European *Clostridium difficile* infection surveillance network, ECDIS - NET)的各参考实验室^[19]。

2.3 MLST 分型 MLST 于 2004 年首次用于 CD 群体构成和全球流行病学研究^[20]。该方法是基于基因测序的分子分型方法,通常测序的片段是七个长度约在 300 bp 和 500 bp 之间的管家基因(MLST 7HG)。根据每个管家基因的序列变异情况,分配给它一个不同的等位基因编码,这样七个等位基因的编码组合就形成了一个序列类型(ST 型)。将 MLST 分型方法产生的序列数据上传至一个全球实验室公用的 Web 数据库,即可方便不同实验室对 ST 型的确定、研究 CD 的群落构成和全球流行情况。目前,有 2 种不同的 MLST 分型方案^[20-21],这 2 种分型方案都包括 7 个管家基因,其中 3 个基因位点在 2 个方案中都被应用到(triosephosphate isomerase, *tpi*; recombinase A, *recA*; superoxide dismutase A, *sodA*)。后续研究发现 Lemee 方案中的丙氨酸连接酶(DDL)位点是一个无效的等位基因,因此应用较少。而 Griffiths 分型方案则被广泛应用^[21]。据报道,MLST 和 PCR RT 方法的分辨力是相当的^[18, 21]。

相比基于电泳指纹图谱的分型方法(如 PCR RT),MLST 更不容易受到基因重组的影响。一个管家基因的重组仅会改变单一基因位点,这使得即便产生了新的 ST 型,仍会与原始的 ST 型保持较近的亲缘关系,也就维护了系统进化分析的相关性。用 MLST 进行系统发育分析,可将 CD 至少分成 5 个不同的进化分支^[21],而位于第 6 个分支的菌株可能是单系进化^[22]。多数 ST 型都属于第一分支,而且这一分支无主要的亚分支。导致这一结果的原因可能与分型方案选择的管家基因位点相关。选择不同的管家基因或者在当前的 MLST 方案中加入新的管家基因,或许可增加对位于第一分支的菌株的分析效果。

基于测序的 MLST 分型方法的一个主要优势是其所得出的数据易于解释。测序的数据比较明确、客观,具有高度重复性,并易于实验室间的交流。此外,不同实验室可将自己的测序数据提交至

MLST 数据库。截至 2016 年 1 月 11 日,数据库中已有可明确的 331 个 ST 型。MLST 存在的比较现实的缺陷是其测序的成本相对较高,这可能是在许多欧洲实验室并未用 MLST 取代传统的 PCR RT 的原因之一。

2.4 MLVA MLVA 是一种具有高分辨力的分子分型方法,通常被应用于研究细菌暴发流行和追踪病原体传播途径^[5, 23-24]。其分型原理是通过软件寻找散在分布于细菌基因组中的大小不等的短串联重复序列(VNTR),并设计相应引物对其扩增,用毛细管电泳自动分析扩增产物。根据其串联重复序列可变重复数目,分配给不同菌株一定的数组,据此判定为不同的 MLVA 型别。通过计算汇总串联重复序列的差异(summed tandem repeat difference, STRD)可构建最小生成树(minimum spanning tree, MST)。STRD ≤ 2 的菌株定义为一个克隆群,STRD ≤ 10 的菌种认为是一个基因相关群^[5, 25]。Broukhanski 等^[25]研究发现艰难梭菌 MLVA 方案中有两个位点(F3 和 H9)在不同菌株间没有差异,表明这两个位点在 CD 分型上无任何作用。此外, Bakker 等^[26]报道, MLVA 的 A6 位点对于 PCR RT078 是无效位点。因此,对 PCR RT078 型菌株的分析,需要进一步优化其他几个位点的 PCR 设置。目前, MLVA 被认为是 CD 流行病学研究最有效的分型方法,并应用于荷兰、法国和英国的 027 型暴发流行研究。还有英国学者采用 MLVA 方法探讨了 CDI 病例的潜在联系^[27]。值得注意的是,该研究结果显示,原本被认为是属于同一种群的菌株,几乎有一半是由无关菌株组成,或者是由相关和无关的菌株混合组成。

3 艰难梭菌分型方法的新进展

3.1 MLVA 进展 有学者提出一个改进的 MLVA(modified MLVA, mMLVA)方案,将 MLVA 与 PCR 检测艰难梭菌毒素基因相结合(*tcdA*, *tcdB*, *cdtB* 和 *tcdC*)^[24]。该方案将 MLVA 位点数量限定为 5 个,去除 F3 和 H9 位点。尽管结合毒素基因检测后的分型方案信息量更大,但目前还无法将这些数据与 PCR RT027/ NAP01 等特定型别相关联。其原因可能是因为二元毒素基因与 *tcdC* 基因缺失的并存现象并不只存于 PCR RT027 菌株^[24, 28]。而在 Manzoor 等^[29]的研究中将 MLVA 方案所用的基因位点数目增加至 15 个,扩展后的

MLVA(extended MLVA, eMLVA)方案可区分临床上的主要集群,与 PCR RT 具有良好的一致性。而仅含有 7 个位点的 MLVA 方案^[25-26]与 PCR RT 相关性较差,7 个位点 MLVA 只能结合 PCR RT 方法作为亚型分型方法使用,而 eMLVA 则可同时取代两者。但是,随着位点数目的增加,该方法也更费力,而且增加了数据的解释难度。

为创建一个可提供满意分析的数据,并与 PCR RT 保持良好的一致性 MLVA 方案,Wei 等^[30]筛选了 40 个 MLVA 位点用于研究 CD 暴发流行。研究结果表明,由多样性较低的等位基因位点组成的 MLVA 方案与 PCR RT 相关性高,而多样性较高的位点组成的分型方案则可用于 CD 暴发流行研究。这两个分型方案,分别包括 10 个多样性有限的等位基因位点和 4 个高度多样性的等位基因位点。

3.2 高分辨毛细管凝胶电泳核糖体分型(capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping, CE-PCR RT) 虽然 PCR RT 已经被许多欧洲实验室广泛应用于 CD 监测,但是由于指纹图谱的不易解释和缺乏标准化数据库等问题,这一方法的应用传播仍有较大局限。而 CE-PCR RT 的应用大大提高了其重复性和可解释性。例如,传统的基于琼脂糖凝胶电泳的 PCR RT 很难区分 014 型和 020 型 CD。而 CE-PCR RT 则不仅可以区分 014 型和 020 型,还能将 014 型进一步分出亚型^[31]。美国疾病控制与预防中心(CDC)、加拿大卫生公署、荷兰莱顿大学医学中心和英国利兹教学医院的 CD 监测,探讨了 CE-PCR RT 的 DNA 提取、引物设计、PCR 循环条件及参考标准等操作流程,并采用标准一致的操作流程对 70 个不同的 RT 型进行了检测^[24]。初步结果表明分型结果在不同实验室之间较为一致。

3.3 基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-light mass, MALDI-TOF MS)分型 MALDI-TOF MS 以其在微生物的鉴定、耐药性和毒力监测中快速、准确、重复性好、高通量等特点,近年来越来越受到人们的关注。它不仅能够鉴定病原体种/亚种水平,还具有良好的分型能力,逐渐被应用到细菌、真菌和病毒的分型中^[32]。其分型原理是建立在 MALDI-TOF MS 鉴定微生物的基础上,利用核心图谱(the main spectra, MSP)建造标准蛋白指纹图谱库,采用主成分分析(principal component analysis, PCA)进行数据处理。MALDI-TOF MS 质谱图是以检测到的离子质荷比(m/z)为横坐标,离子

峰强度为纵坐标构建而成,通过将检测到的病原体鉴定质谱图与标准数据库图谱比对,从而实现目标微生物种或菌株的区分和鉴定^[33]。图谱中主要的分子离子峰为菌体内高丰度、表达稳定、进化保守的核糖体蛋白,所以,可以通过聚类分析获得微生物间的进化和亲缘关系。Rettinger 等^[34]采用 MAL-TOF MS 质谱指纹图谱分型方法、16S rRNA 测序方法和 MLST 方法对 28 株钩端螺旋体进行进化分析,发现质谱指纹图谱能很好地区分高致病性(21 株)、中间型(3 株)和非致病性(4 株)的钩端螺旋体。与 16S rRNA 测序方法得到的进化树结果相同,同一型内各菌株之间相似性很高,但 MLST 方法却只能区分中间型钩端螺旋体,高致病性和非致病性的菌株都归于一类。目前有研究人员正在探讨 MAL-TOF MS 在 CD 分型中的应用^[35]。

3.4 二元基因分型 二元基因分型是近年来用于微生物分型的一种新兴的分子分型方法,已经成功应用于金黄色葡萄球菌和空肠弯曲杆菌的流行病学研究^[36-37]。其分型原理是根据某一个基因在细菌 DNA 的存在与否,都能将一组细菌分成 2 个类型,当结合多个这样的基因位点进行分析时就可将一组细菌进行有效的分型,这样的基因位点又被称为二元基因。如果选择的基因位点是与毒力和耐药等功能相关的基因时,二元基因分型方法不仅可追踪流行菌株的传播途径,还可让临床医生直观地了解从患者样本中分离到菌株的功能基因,以便采取进一步的治疗措施。近期,我实验室成功创建了 CD 二元基因分型方法,通过方法学对比研究发现,10 位点二元基因分型不仅具有操作简便、费用低、易于分析和数据共享等优点,而且其分辨力也优于核糖体分型和 MLST,显示了良好的应用前景。

3.5 WGS 分型 高通量、全基因组测序技术应用的范围和可靠性已足以准确调查病原体的毒力、流行路径和菌群结构分布^[38]。通过对成百上千的基因组系统发育学和比较基因组学分析,可准确地确定细菌的遗传学变化,而且容易发现遗传学与毒力和耐药性表型的关系,因此,可快速地了解病原体的生物学特征^[39]。通过比较单个核苷酸的多态性,WGS 可区分菌株间单个核苷酸水平的差别,因此具有极高的分辨力。另外,通过预测病原体出现的选择性压力和追踪病原体流行传播,WGS 在临床微生物学和公共卫生流行病学领域也有很高的实用价值。

尽管 WGS 的应用仍然受到设备、数据分析等

条件的限制,但该方法代表了病原体分型的终极方法。在未来几年,WGS 将会成为一种常用 CDI 监测及流行病学工具。虽然与传统的分型方法相比 WGS 成本相对较高,但是随着 CD 基因组数据质量控制和后期的信息学、系统发育和谱系地理学分析等标准计算程序^[40]的发展,WGS 数据处理的成本正在迅速下降^[12, 41]。此外,1 次 WGS 检测得出的信息量可同时推断 MLST、PFGE、耐药基因、毒素基因序列和其他数据,从这个角度来讲,它可以平衡成本效益,也预示着它可能是一种终极的分型方法。

首次应用高通量 WGS 测序技术对 PCR RT027 系统进化树研究结果显示,通过 SNP 分析可将采集自美国和欧洲的 25 个 PCR RT027 菌株进一步分成 25 不同的基因型。此外,该研究还发现美国和欧洲不同地区的菌株拥有独特的进化谱系和抗菌药物耐药基因。有证据表明^[42],PCR RT027 型菌株获得相同的耐药突变后出现了两条不同的流行谱系,这两谱系在全球传播时呈现了不同的流行模式。Köser 等^[43]的研究将 WGS 测序在诊断学和流行病学研究中的应用显示了很好的效果。这项研究指出,基因组 SNP 分型主要可用于监测暴发和病原菌传播途径的识别。当前用于监测 CD 医院相关感染暴发的方法,比如 PCR RT 方法的分辨力有限,不能识别暴发流行的菌株是否来自同一克隆株,而全基因组测序则有很好的分辨力,可以追踪病原菌在医院,医院病房和同一个病房的患者之间的传播路径。

Eyre 等^[44]研究表明,WGS 可产生实用的、与临床直接相关的数据,在一定时间内研究结果有助于患者管理,从而在疾病暴发初期实现感染控制。这项研究中通过 WGS 检测发现,由相同 ST 型 CD 造成的医院相关性艰难梭菌感染,实际上可能是一组相互间没有进化关系的 CD 所导致,因此可排除其在患者之间传播的可能。而且,与比较基因组学相结合,WGS 是发现与潜在毒力相关的新的遗传标志的有效方法。这是一个超越传统分型方法的重要优点,因为传统方法只能利用现有的菌株特性标记进行分析。

5 未来展望

在过去的 15 年中,由于基于测序的分子分型方法具有较好的分辨力,以及分型结果的易于解释和相互交流,使其取代了一些更为传统的分型方法。

而 WGS 则有可能主导未来十年的分子分型领域。然而,在 WGS 可作为分子分型的常规方法之前仍需要有更多的研究数据支持。首先,WGS 需要在 48 h 内快速、有效地完成。其次,数据分析等技术流程仍需要进一步简化。最后,WGS 技术的运行和组织平台成本必须降低。如果满足这些要求将大大增加 WGS 在全球的使用,这可能只是一个时间的问题。

[参考文献]

- [1] Bartlett JG. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis [J]. Hosp Pract (Off Ed), 1981, 16(12): 85-98, 93-95.
- [2] Jacob J, Wu J, Han J, et al. *Clostridium difficile* in an urban, university-affiliated long-term acute-care hospital[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2017, 38(3): 294-299.
- [3] Schwan C, Stecher B, Tzivelekidis T, et al. *Clostridium difficile* toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria[J]. PLoS Pathog, 2009, 5(10): e1000626.
- [4] Rupnik M, Tambic Andrasevic A, Trajkovska Dokic E, et al. Distribution of *Clostridium difficile* PCR ribotypes and high proportion of 027 and 176 in some hospitals in four South Eastern European countries[J]. Anaerobe, 2016, 42: 142-144.
- [5] Goorhuis A, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078[J]. Clin Infect Dis, 2008, 47(9): 1162-1170.
- [6] Delmee M, Homel M, Wauters G. Serogrouping of *Clostridium difficile* strains by slide agglutination[J]. J Clin Microbiol, 1985, 21(3): 323-327.
- [7] Tabaqchali S, Holland D, O'Farrell S, et al. Typing scheme for *Clostridium difficile*: its application in clinical and epidemiological studies[J]. Lancet, 1984, 1(8383): 935-938.
- [8] Mulligan ME, Peterson LR, Kwok RY, et al. Immunoblots and plasmid fingerprints compared with serotyping and polyacrylamide gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*[J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(1): 41-46.
- [9] Sell TL, Schaberg DR, Fekety FR. Bacteriophage and bacteriocin typing scheme for *Clostridium difficile*[J]. J Clin Microbiol, 1983, 17(6): 1148-1152.
- [10] Cartmill TD, Orr K, Freeman R, et al. Nosocomial infection with *Clostridium difficile* investigated by pyrolysis mass spectrometry[J]. J Med Microbiol, 1992, 37(5): 352-356.
- [11] Cohen SH, Tang YJ, Silva J Jr. Molecular typing methods for the epidemiological identification of *Clostridium difficile* strains[J]. Expert Rev Mol Diagn, 2001, 1(1): 61-70.
- [12] Gürtler V. Typing of *Clostridium difficile* strains by PCR-amplification of variable length 16S-23S rDNA spacer regions[J]. J Gen Microbiol, 1993, 139(12): 3089-3097.
- [13] van den Berg RJ, Claas EC, Oyib DH, et al. Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates from outbreaks in different countries by amplified fragment length polymorphism and PCR ribotyping[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(3): 1035-1041.
- [14] Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, et al. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(2): 461-463.
- [15] Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity[J]. J Clin Microbiol, 1988, 26(11): 2465-2466.
- [16] Tian TT, Zhao JH, Yang J, et al. Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates from human subjects and the environment[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151964.
- [17] Centers for Disease Control and Prevention. 20 yeays of PulseNet[EB/OL]. (2016-10-03) [2016-11-01]. <http://www.cdc.gov/pulsenet/>.
- [18] Killgore G, Thompson A, Johnson S, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(2): 431-437.
- [19] Bauer MP, Notermans DW, van Benthem BH, et al. *Clostridium difficile* infection in Europe: a hospital-based survey [J]. Lancet, 2011, 377(9759): 63-73.
- [20] Lemee L, Dhalluin A, Pestel-Caron M, et al. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(6): 2609-2617.
- [21] Griffiths D, Fawley W, Kachrimanidou M, et al. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile* [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(3): 770-778.
- [22] Knetsch CW, Terveer EM, Lauber C, et al. Comparative analysis of an expanded *Clostridium difficile* reference strain collection reveals genetic diversity and evolution through six lineages[J]. Infect Genet Evol, 2012, 12(7): 1577-1585.
- [23] Eckert C, Vromman F, Halkovich A, et al. Multilocus variable-number tandem repeat analysis: a helpful tool for subtyping French *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 isolates[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(Pt 8): 1088-1094.
- [24] Fawley WN, Freeman J, Smith C, et al. Use of highly discriminatory fingerprinting to analyze clusters of *Clostridium difficile* infection cases due to epidemic ribotype 027 strains [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(3): 954-960.
- [25] Broukhanski G, Low DE, Pillai DR. Modified multiple locus variable-number tandem-repeat analysis for rapid identification

and typing of *Clostridium difficile* during institutional outbreaks[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(5): 1983–1986.

- [26] Bakker D, Corver J, Harmanus C, et al. Relatedness of human and animal *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 isolates based on multilocus variable-number tandem-repeat analysis and tetracycline resistance [J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(10): 3744–3749.
- [27] Fawley WN, Wilcox MH. An enhanced DNA fingerprinting service to investigate potential *Clostridium difficile* infection case clusters sharing the same PCR ribotype[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(12): 4333–4337.
- [28] Janvilisri T, Scaria J, Thompson AD, et al. Microarray identification of *Clostridium difficile* core components and divergent regions associated with host origin[J]. J Bacteriol, 2009, 191(12): 3881–3891.
- [29] Manzoor SE, Tanner HE, Marriott CL, et al. Extended multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Clostridium difficile* correlates exactly with ribotyping and enables identification of hospital transmission[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(10): 3523–3530.
- [30] Wei HL, Kao CW, Wei SH, et al. Comparison of PCR ribotyping and multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) for improved detection of *Clostridium difficile*[J]. BMC Microbiol, 2011, 11: 217.
- [31] Indra A, Huhulescu S, Schneeweis M, et al. Characterization of *Clostridium difficile* isolates using capillary gel electrophoresis-based PCR ribotyping[J]. J Med Microbiol, 2008, 57(Pt 11): 1377–1182.
- [32] 靳颖, 王俊妨, 崔云涛, 等. 基质辅助激光解析飞行时间质谱在临床病原菌检测中的应用进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 12(3): 238~240.
- [33] Fenselau C, Demirev PA. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry [J]. Mass Spectrom Rev, 2001, 20(4): 157–171.
- [34] Rettinger A, Krupkal, Grünwald K, et al. *Leptospira spp.* strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST)[J]. BMC Microbiol, 2012, 12: 185.
- [35] Rizzardi K, Åkerlund T. High molecular weight typing with MALDI-TOF MS-A novel method for rapid typing of *Clostridium difficile* [J]. PLoS One, 2015, 10 (4): e0122457.
- [36] Zadoks R, van Leeuwen W, Barkema H, et al. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(5): 1931–1939.
- [37] Huang B, Zhao D, Fang NX, et al. An optimized binary typing panel improves the typing capability for *Campylobacter jejuni*[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 77(4): 312–315.
- [38] Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, et al. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions [J]. Science, 2011, 331(6016): 430–434.
- [39] Harris SR, Clarke IN, Seth-Smith HM, et al. Whole-genome analysis of diverse *Chlamydia trachomatis* strains identifies phylogenetic relationships masked by current clinical typing [J]. Nat Genet, 2012, 44(4): 413–419.
- [40] Dannheim H, Riedel T, Neumann-Schaal M, et al. Manual curation and reannotation of the genomes of *Clostridium difficile* 630Δerm and *C. difficile* 630[J]. J Med Microbiol, 2017, 66(3): 286–293.
- [41] Metzker ML. Sequencing technologies-the next generation[J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(1): 31–46.
- [42] He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile* [J]. Nat Genet, 2012, 45(1): 109–113.
- [43] Köser CU, Ellington MJ, Cartwright EJ, et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology [J]. PLoS Pathog, 2012, 8 (8): e1002824.
- [44] Eyre DW, Golubchik T, Gordon NC, et al. A pilot study of rapid benchtop sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* for outbreak detection and surveillance[J]. BMJ Open, 2012, 2(3), pii: e001124.

(本文编辑:熊辛睿)

(上接第 374 页)

- [15] Panikkath R, Konala V, Panikkath D, et al. Fatal *Clostridium septicum* infection in a patient with a hematological malignancy[J]. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2014, 27(2): 111–112.
- [16] Abella BS, Kuchinic P, Hiraoka T, et al. Atraumatic Clostridial myonecrosis; case report and literature review[J]. J Emerg Med, 2003, 24(4): 401–405.
- [17] Mirza NN, McCloud JM, Cheetham MJ. *Clostridium septicum* sepsis and colorectal cancer – a reminder[J]. World J Surg Oncol, 2009, 7: 73.
- [18] 马丽珍, 詹宇红, 张楚. 糖尿病继发阴囊非创伤性气性坏疽 1 例并文献复习[J]. 全科医学临床与教育, 2008, 6(3): 248–249, 251.

(本文编辑:左双燕)