

艰难梭菌感染诊断(T/CPMA 008-2020)

中华预防医学会

通信作者:吴媛,Email:wuyuan@icdc.cn

Diagnosis of *Clostridioides difficile* infection (T/CPMA 008-2020)

Chinese Preventive Medicine Association

Corresponding author: Wu Yuan, Email: wuyuan@icdc.cn

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由中华预防医学会归口。

本标准起草单位:中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、中国人民解放军总医院、云南省疾病预防控制中心、中国医学科学院北京协和医院、中南大学湘雅医院、复旦大学附属华山医院、四川大学华西医院、杭州医学院、河北医科大学第二医院、南方医科大学南方医院、内蒙古自治区人民医院、山东省立医院。

本标准主要起草人:吴媛、卢金星、闫中强、刘运喜、古文鹏、伏晓庆、徐英春、吴安华、黄海辉、宗志勇、金大智、赵建宏、陈焯、刘卫平、李卫光。

引 言

艰难梭菌,即难辨梭状芽孢杆菌,是引起抗生素相关性腹泻的重要病原,艰难梭菌感染成为医院获得性腹泻的主要病因,已在欧美国家引起多起暴发流行。美国疾病预防控制中心 2017 年数据显示,美国每年艰难梭菌感染患者近 23 万,其中死亡人数超 1.2 万,产生超 10 亿美元的疾病负担,因此被列为紧迫的公共卫生威胁之一。近 10 年来调查研究显示,我国艰难梭菌感染呈快速增长趋势。然而,由于缺乏统一的诊断原则和检测技术规范,我

国艰难梭菌感染率和疾病负担尚不明确。为了规范艰难梭菌感染流行病学调查,提高艰难梭菌诊断的准确性,本标准遵循科学性和实用性原则,对艰难梭菌感染诊断所需的诊断依据、诊断原则、诊断和鉴别诊断进行明确规定。

艰难梭菌感染诊断

1 范围

本标准规定了艰难梭菌感染的诊断依据、诊断原则、诊断及鉴别诊断。

本标准适用于医疗卫生机构开展艰难梭菌感染的诊断和流行病学调查。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1 腹泻 diarrhea

24 h 内排便次数在 3 次或以上,不成形便,且伴有粪便性状异常。

2.2 伪膜性肠炎 pseudomembranous colitis

主要发生在结肠和小肠的急性纤维素渗出性炎症,多是在应用抗菌药物后导致正常肠道菌群失调,艰难梭菌大量繁殖,产生毒素而致。

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

BHI: 脑心浸液 (Brain heart infusion)

CDI: 艰难梭菌感染 (*Clostridioides difficile*)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20201026-01273

收稿日期 2020-10-26 本文编辑 万玉立

引用本文:中华预防医学会.艰难梭菌感染诊断(T/CPMA 008-2020)[J].中华流行病学杂志,2021,42(1):

58-63. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20201026-01273.



infection)

CCTA: 细胞毒性试验 (Cell cytotoxicity assay)

CCFA: 环丝氨酸-头孢西丁-果糖琼脂 (Cycloserine-cefoxitin-fructose agar)

CDMN: 艰难梭菌拉氧头孢诺氟沙星琼脂 (*Clostridium difficile* Moxalactam Norfloxacin agar)

EIA: 酶免疫分析 (Enzyme immunoassay)

GDH: 谷氨酸脱氢酶 (Glutamate dehydrogenase)

MLST: 多位点序列分型 (Multi-locus sequencing typing)

NAAT: 核酸扩增检测 (Nucleic acid amplification testing)

TCD: 产毒艰难梭菌 (*Toxigenic Clostridioides difficile*)

RT: 核糖体分型 (Ribo-typing)

4 诊断依据

4.1 危险因素

使用抗菌药物、住院史、老年 (大于 65 岁)、使用质子泵抑制剂、化疗、患有慢性肾脏疾病、管饲或其他免疫功能缺陷等。

4.2 临床表现

症状可由单一腹泻到发热、腹痛、腹胀、恶心和呕吐等全身性感染症状,重症患者出现伪膜性肠炎,严重的并发症有中毒性巨结肠、肠梗阻、肠穿孔和休克等。

分为轻中度、重度和重度伴并发症:

a) 轻中度: 腹泻无全身感染表现 (白细胞计数 $< 15 \times 10^9/L$, 血肌酐 $<$ 基线 1.5 倍);

b) 重度: 腹泻合并全身感染表现 (白细胞计数 $\geq 15 \times 10^9/L$, 血肌酐 \geq 基线 1.5 倍), 出现伪膜性肠炎;

c) 重度伴并发症: 腹泻合并全身性感染症状, 同时出现并发症包括中毒性巨结肠、低血压或肠梗阻。

4.3 内镜检查

下消化道内镜检查提示伪膜性肠炎, 主要表现为直肠和乙状结肠黏膜表面多发性、隆起的灰绿色或黄褐色斑片。

4.4 实验室检查

4.4.1 生物安全要求

根据原卫生部《人间传染的病原微生物名录》(卫科教发[2006]15号), 艰难梭菌的危害程度属于第三类, 涉及样本检测和活菌的实验操作在 BSL-2 级实验室中进行, 采用 B 类 (UN3373) 包装运输。

4.4.2 粪便样本采集、运输

患者在干燥清洁便盆内自然排便 (避免使用坐式或蹲式马桶), 用无菌采便管/盒挑取粪便中异常的部分 (有黏液、脓液或血液的部分) 4 g~6 g; 液体粪便 ≥ 5 ml。

采集的样本需尽快送检培养; 4 °C 保存, 24 h 内完成免疫学检测。

4.4.3 样本的快速检测

腹泻样本无须培养, 可直接采用商品化的试剂盒对样本中的谷氨酸脱氢酶 (GDH) 抗原和毒素 A/B 同时进行检测, 如果二者结果不一致, 需结合 PCR 检测 *tcdB* 基因, 判断样本中是否有产毒艰难梭菌。结果判读:

a) GDH+/毒素+: 样本中存在产毒艰难梭菌;

b) GDH+/毒素-: PCR 检测 *tcdB* 基因, *tcdB*+ 则样本中存在产毒艰难梭菌, *tcdB*- 则样本中无产毒艰难梭菌;

c) GDH-/毒素+: PCR 检测 *tcdB* 基因, *tcdB*+ 则样本中存在产毒艰难梭菌, *tcdB*- 则样本中无产毒艰难梭菌;

d) GDH-/毒素-: 样本中无艰难梭菌。

4.4.4 样本的核酸检测

疑似 CDI 的腹泻样本, 无须培养, 提取样本 DNA 进行艰难梭菌特异的细胞毒素基因 *tcdB* 核酸片段检测, 如果阳性, 说明样本中存在产毒艰难梭菌。详细的试验流程参见附录 A。

或采用商品化的试剂盒进行 *tcdB* 基因的荧光定量 PCR 检测。

4.4.5 细胞毒性试验 (CCTA)

将不成形粪便样本, 1 500 g 离心 5 min~10 min, 上清液经 0.45 μ m 滤膜过滤, 将粪便滤液与 Vero 细胞共孵育, 分别加入抗 A 和抗 B 毒素的中和抗体, 同时设置阴性对照组 (即不加入抗体), 37 °C 5% CO₂ 培养, 24 h、48 h 显微镜下观察细胞病变效应 (CPE), 加入特异性抗体的能阻止该细胞病变, 说明样本中存在产毒艰难梭菌。

4.4.6 样本中艰难梭菌的分离培养鉴定

腹泻样本中分离培养鉴定获得产毒艰难梭菌。

详细的试验操作规范见附录 B。

4.4.7 高毒株 RT027 型和 RT078 型艰难梭菌的鉴定

高毒株 RT027 型是引起全球暴发感染的重要型别, 具有较高致死率和氟喹诺酮耐药的特征; RT078 型是近年来被广泛报道的型别, 主要来源于

养殖经济类动物,与社区获得性艰难梭菌感染相关。

样本中分离获得的艰难梭菌毒素 A、B 以及二元毒素(CDT)均阳性,MLST 分别为 ST1 和 ST11,RT 分别为 027 型和 078 型。

详细的试验操作流程见附录 C。

5 诊断原则

根据危险因素、临床表现、内镜检查和实验室检查进行诊断。

注:2 岁以下婴幼儿出现腹泻,不推荐进行艰难梭菌感染的相关检查。

6 诊断

6.1 临床诊断病例

符合 4.1 和 4.2 的病例。

注:排除有腹泻症状的其他常见肠道疾病,如肠易激综合征、炎症性肠病等。

6.2 确诊病例

符合临床诊断病例,同时 4.3 和 4.4.3~4.4.7 任一结果阳性的病例。

7 鉴别诊断

艰难梭菌感染应与细菌性痢疾、肠侵袭性大肠埃希菌腹泻、沙门菌腹泻、轮状病毒腹泻和诺如病毒感染腹泻等相鉴别。

附录 A (资料性附录) 样本的核酸检测

A.1 核酸提取

取体积约 1 ml 的粪便样本,试剂盒提取基因组 DNA,具体流程参照产品说明书,考虑到艰难梭菌为革兰阳性菌,需溶菌酶前处理 30~60 min。

A.2 艰难梭菌毒素编码基因的核酸检测

A.2.1 检测靶标:*tcdB* 基因

A.2.2 检测方案

A.2.2.1 普通 PCR

产物大小 203 bp

引物序列:

NK104: GTG TAG CAA TGA AAG TCC AAG TTT ACG C

NK105: CAC TTA GCT CTT TGA TTG CTG CAC CT

反应条件:95 °C 5 min; 95 °C 20 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35 个循环; 延伸 72 °C 5 min

反应体系(50 μl):

成分	体积(μl)
Premix Ex Taq™ (2×)	25
NK104 (25 pmol/μl)	1
NK105 (25 pmol/μl)	1
DNA 模板	3
ddH ₂ O	20

结果判读:1.5% 琼脂糖凝胶电泳,203 bp 处出现条带,为阳性;否则为阴性。

A.2.2.2 实时荧光定量 PCR

产物大小 103 bp

引物和探针序列见表 A.1

表 A.1 *tcdB* 基因 real-time PCR 扩增的引物探针序列

引物名称	序列 5'-3'
stcdB-f	ATA TCA GAG ACT GAT GAG
stcdB-r	TAG CAT ATT CAG AGA ATA TTG T
stcdB-p	FAM-C TGG AGA ATC TAT ATT TGT AGA AAC TG-BHQ

反应体系(25 μl):

成分	体积(μl)
Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time)	12.5
Forward Primer (10 μmol/L)	2.5
Reverse Primer (10 μmol/L)	2.5
Taqman Probe (10 μmol/L)	2.5
DNA 模板	2.0
ddH ₂ O	3.0

反应条件:采用两步法 PCR 扩增标准程序:预变性 95 °C 30 s 1 个循环;PCR 反应 95 °C 3 s, 50 °C 30 s, 40 个循环。

结果判读: $Ct \leq 33$ 为阳性, $Ct > 35$ 为阴性, $33 < Ct \leq 35$ 为可疑阳性,需重新采集样本重复试验一次。

注:此处列的引物和探针分别为日本 kato 和加拿大 Simon 学者报道,国内外多家实验室都在应用,开展流行病学调查和检测。如为临床诊断,可使用批准的商品化试剂盒进行 *tcdB* 荧光定量 PCR 检测。

附录 B

(规范性附录)

艰难梭菌的分离培养和鉴定

B.1 培养基的配制

B.1.1 环丝氨酸-头孢西丁-果糖琼脂(CCFA):

500 ml 水加入 34.5 g 艰难梭菌培养基,121 °C 15 min 高压灭菌。取 1 支艰难梭菌选择性添加剂

(环丝氨酸-头孢西丁),加入 2 ml 0.85% 的生理盐水,充分混匀。将混合液加入已冷却至约 50 °C 的培养基中,同时加入 5%~8% (体积比)的卵黄乳液,轻轻摇匀。倾倒至直径为 90 mm 平板。4 °C 可保存 1 个月左右,但推荐使用新鲜配制的培养基进行分离培养。使用前,应先在厌氧环境预还原过夜。

B.1.2 艰难梭菌拉氧头孢诺氟沙星(CDMN)培养基:

同上,添加比例按照产品说明书。

B.1.3 血平板:

脑心浸液(BHI),121 °C 15 min 高压灭菌,添加 5%~8% 的脱纤维羊血,倾倒至直径为 90 mm 平板。

B.2 样本的预处理和厌氧培养

取腹泻粪便样本直接接种,或 80 °C 加热 10 min 后,又或者先与无水乙醇等体积混合,室温放置 30 min~60 min 后,3 000 r/min 离心 10 min,取沉淀再接种于预还原的 CCFA/CDMN、CHROMID®C. difficile 或 CHROMagar™ C. difficile 等其他选择性平板上,厌氧环境,37 °C 培养 24 h~48 h,观察有无可疑菌落。

厌氧环境(任选其一):自封塑料袋/盒+厌氧产气袋+厌氧指示剂;

厌氧罐+催化剂(80% N₂,10% H₂和 10% CO₂);

厌氧箱(80%N₂,10%H₂和 10%CO₂)。

可疑菌落:粪便样本中艰难梭菌在 CCFA 上菌落呈扁平状,白色或淡黄色不透明的“摊鸡蛋样”,见图 B.1(a)。在 CHROMID®C. difficile 上,艰难梭菌呈黑色,不规则克隆,见图 B.1(b)。

B.3 可疑菌落的鉴定

B.3.1 产毒艰难梭菌(TCD)培养

将可疑菌落接种于 BHI 血平板上进行纯化,纯化的典型菌落接种于 BHI 中,厌氧培养 48 h,0.45 μm 滤膜过滤培养液,进行 CCTA。

B.3.2 生化鉴定

艰难梭菌能发酵葡萄糖、果糖和甘露醇产酸,不发酵乳糖、麦芽糖和蔗糖,水解七叶苷,液化明胶。不产生吲哚和硫化氢,不产生卵磷脂酶及脂酶,不凝固牛奶。亦可用商品化的试剂来检测,如 API20A、Vitek2 Compact 或脯氨酸纸片法等商品化检测试剂盒等。

B.3.3 酶免疫分析(EIA)鉴定

针对艰难梭菌的 GDH 抗原和毒素 A/B 进行检测,有多种商品化的试剂盒可供选择,结果判读同正文 4.4.3 部分。

B.3.4 核酸检测鉴定

B.3.4.1 针对 16S rDNA,扩增产物测序比对

将可疑艰难梭菌的单个菌落接种于 BHI 培养基上,37 °C 厌氧培养 24 h,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的说明书操作,提取细菌 DNA。

16S rDNA 基因的扩增:目的条带大小为 1 465 bp。

引物序列:27F:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'

1492R:5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'

反应体系(50 μl)

成分	体积(μl)
Premix Ex Taq™ (2×)	25
27F(25 μmol/L)	1
1492R(25 μmol/L)	1
DNA 模板(20 ~ 80 ng/μl)	3
ddH ₂ O	20

PCR 循环参数:95 °C 3 min;94 °C 30 s,50 °C 30 s,72 °C 40 s,30 个循环;72 °C 6 min。

扩增产物由 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

序列比对:扩增产物纯化后,进行 DNA 序列测定,将测序结果进行拼接,并输入 NCBI(<https://>

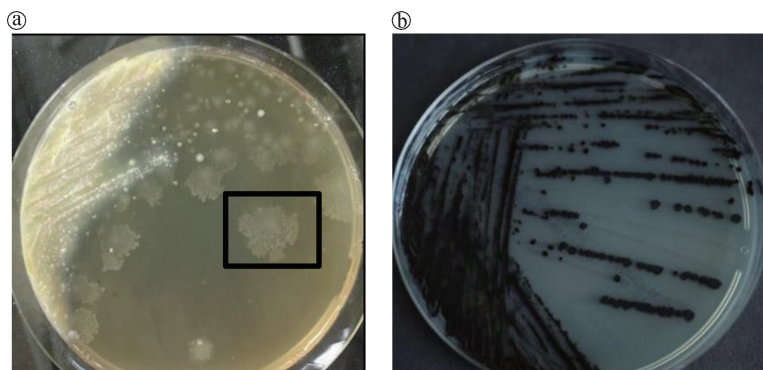


图 B.1 粪便样本中艰难梭菌在 CCFA(a)和 CHROMID®C. difficile(b)上可疑菌落形态

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)进行比对,确定是否为艰难梭菌。

B.3.4.2 针对 *tpi* 基因进行普通 PCR, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测

引物序列: *tpi*-F: AAA GAA GCT ACT AAG GGT ACA AA

tpi-R: CAT AAT ATT GGG TCT ATT CCT AC

产物大小 230 bp;

反应体系 (25 μl):

成分	体积(μl)
Premix Ex TaqTM (2×)	12.5
上游引物 (20 pmol/μl)	2
下游引物 (20 pmol/μl)	2
DNA 模板	2
ddH ₂ O	6.5

反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环; 72 °C 5 min。

结果判读: 230 bp 处有唯一一条带。

B.3.4.3 艰难梭菌细胞毒素编码基因 (*tcdB*) 的核酸检测

应用细菌 DNA 提取试剂盒, 提取纯培养艰难梭菌基因组 DNA 后, 其余操作详见附录 A。

或采用商品化的试剂盒进行检测。

B.3.5 质谱鉴定

应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS), 通过获得菌株的蛋白谱图, 并与标准数据库进行比对, 完成种属鉴定。

附录 C

(规范性附录)

高毒株 RT027 型和 RT078 型艰难梭菌的鉴定

C.1 多位点序列分型 (MLST)

C.1.1 DNA 提取

同 (附录 B) 中的核酸检测, 针对艰难梭菌的 7 个管家基因位点 (*adk*, *atpA*, *dxr*, *glyA*, *recA*, *sodA* 和 *tpi*) 进行扩增, 引物序列见表 C.1。

反应体系 (50 μl): Premix Taq 酶 (TAKARA) 25 μl, ddH₂O 20 μl, 上/下游引物 (25 pmol/μl) 1/1 μl, DNA 模板 (20~80 ng/μl) 3 μl。

PCR 循环参数: 95 °C 15 min; 94 °C 30 s, 50 °C 40 s, 72 °C 70 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。

C.1.2 测序比对

进行双向测序, 拼接 DNA 序列, 与数据库

表 C.1 7 个 MLST 管家基因扩增引物序列

基因	引物名称	序列 (5'-3')
<i>adk</i>	<i>adk</i> F	TTA CTT GGA CCT CCA GGT GC
	<i>adk</i> R	TTT CCA CTT CCT AAG GCT GC
<i>atpA</i>	<i>atp</i> AF	TGA TGA TTT AAG TAA ACA AGC TG
	<i>atp</i> AR	AAT CAT GAG TGA AGT CTT CTC C
<i>dxr</i>	<i>dxr</i> F	GCT ACT TTC CAT TCT ATC TG
	<i>dxr</i> R	CCA ACT CTT TGT GCT ATA AA
<i>glyA</i>	<i>gly</i> AF	ATA GCT GAT GAG GTT GGA GC
	<i>gly</i> AR	TTC TAG CCT TAG ATT CTT CAT C
<i>recA</i>	<i>rec</i> AF	CAG TAA TGA AAT TGG GAG AAG C
	<i>rec</i> AR	ATF CAG CTT GCT TAA ATG GTG
<i>sodA</i>	<i>sod</i> AF	CCA GTT GTC AAT GTA TTC ATT TC
	<i>sod</i> AR	ATA ACT TCA TTT GCT TTT ACA CC
<i>tpi</i>	<i>tpi</i> F	ATG AGA AAA CCT ATA ATT GCA G
	<i>tpi</i> R	TTG AAG GTT TAA CAC TTC CAC C

(<http://pubmlst.org/edifficile/>) 进行比对, 得到所得基因位点的特定等位基因值, 并形成相应的由 7 个基因值组成的等位基因谱, 判断其序列型 (ST) 以及 clade 群。

C.1.3 RT027 型和 RT078 型的基因组合及 clade 群具体基因组合见表 C.2。

表 C.2 RT027 和 RT078 的 MLST 基因组合

型别	<i>adk</i>	<i>atpA</i>	<i>dxr</i>	<i>glyA</i>	<i>recA</i>	<i>sodA</i>	<i>tpi</i>	ST	clade
RT027	1	1	1	10	1	3	5	1	2
RT078	5	8	5	11	9	11	8	11	5

C.2 毒力基因检测

DNA 提取同附录 B.3.3, 针对艰难梭菌的 *tcdA*、*tcdB*、*cdtA*、*cdtB* 进行 PCR 扩增检测。

其中 *tcdB* 基因的引物, 扩增条件和体系见附录 A。*tcdA*、*cdtA* 和 *cdtB* 的扩增引物和条件如下 (表 C.3 ~ C.6)。

表 C.3 *tcdA* 基因扩增引物、产物大小和反应条件

基因	引物	产物大小(bp)	循环参数
<i>tcdA</i>	<i>tcdA</i> -F	369(A+B+)	95 °C 15 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 40 s, 35 个循环; 72 °C 5 min
	<i>tcdA</i> -R	110(A-B+)	

表 C.4 *tcdA* 基因扩增的引物序列

基因	引物	序列 (5'-3')	参考文献
<i>tcdA</i>	<i>tcdA</i> -F	AGA TTC CTA TAT TTA CAT GAC AAT AT	Lemee <i>et al.</i> (2004)
	<i>tcdA</i> -R	GTA TCA GGC ATA AAG TAA TAT ACT TT	

表 C.5 *cdtA* 和 *cdtB* 基因扩增引物、产物大小和反应条件

基因	引物	产物大小(bp)	循环参数
<i>cdtA</i>	<i>cdt</i> Apos	375	94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min
	<i>cdt</i> Arev		
<i>cdtB</i>	<i>cdt</i> Bpos	510	94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min
	<i>cdt</i> Brev		

表 C.6 *cdtA* 和 *cdtB* 基因扩增的引物序列

基因	引物	序列 (5'-3')	参考文献
<i>cdtA</i>	cdt Apos	TGA ACC TGG AAA AGG TGA TG	Stubbs <i>et al.</i> (2000)
	cdt Arev	AGG ATT ATT TAC TGG ACC ATT TG	
<i>cdtB</i>	cdt Bpos	CTT AAT GCA AGT AAA TAC TGA G	Stubbs <i>et al.</i> (2000)
	cdt Brev	AAC GGA TCT CTT GCT TCA GTC	

扩增产物由 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

C.3 核糖体分型

C.3.1 核酸提取

5% chelex-100 提取 DNA, 步骤如下:

a) 5% chelex-100 (4 °C 保存) 制备: 取 2.5 g chelex-100 溶于 50 ml 已高压的超纯水; 磁力搅拌, 至树脂均匀分布; 使用宽口枪头吸取 100 μl chelex 溶液移至 1.5 ml 离心管。

b) 用小接种环 (1 μl) 收集 1 平环的细菌转移至上述 100 μl chelex 溶液中, 金属浴 100 °C, 12 min; 14 000 r/min。离心 12 min, 吸取 50 μl 上清液存于 1.5 ml EP 管。

c) 用 NanoDrop 测 DNA 浓度, 可存于 -20 °C, 备用。

C.3.2 PCR 扩增

针对 16 s~23 s rDNA 基因间隔区 (Intergenic Spacer, ITS) 进行 PCR 扩增, 根据其产物 DNA 片段的数量以及大小不同从而进行分型。

PCR 引物: Cd16 s: 5'-CTG GGG TGA AGT CGT AAC AAG G-3'

Cd23 s: 5'-GCG CCC TTT GTA GCT TGA CC-3'

PCR 反应体系 (50 μl):

成分	体积 (μl)
Buffer II (1×)	5
MgCl ₂ (2 mol/L)	8
dNTP mix (200 μmol/L)	8
牛血清蛋白 BSA 0.1% (w/v)	0.6
Taq 聚合酶	0.75
上游引物 Cd16 s (0.2 μmol/L)	0.2
下游引物 Cd23 s (0.2 μmol/L)	0.2
DNA 模板 (100 ng/μl)	10
ddH ₂ O	17.25

注: Buffer II (1×): 10 mol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mol/L KCl 配制成 Buffer II (10×)

每次试验需设置阴性和阳性对照。

PCR 循环参数: 95 °C 10 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 25 个循环; 72 °C 7 min。

PCR 产物纯化: 使用 MinElute PCR 试剂盒进行纯化, 操作步骤遵产品说明书。测 PCR 纯化产物浓

度, 稀释至终浓度为 10 ng/μl~100 ng/μl (推荐 30 ng/μl)。PCR 纯化产物可存于 -20 °C, 备用。

C.3.3 毛细管电泳

全自动 DNA/RNA 分析系统, 进行毛细管电泳检测。

参数: 选择 DNA high resolution 卡夹、alignment marker (15 bp~1 kb)、DNA size marker (50 bp~800 bp), 选择方法 OM500, 自动运行, 反应终止后, 导出结果, 使用 BioNumerics 7.6 的 QIAxcel 模块, 结合已建立的核糖体型别库 (含 ATCC 和欧洲艰难梭菌参比实验室的 RT027 和 RT078 标准株), 通过对比分析是否含有暴发流行株 RT027 和 RT078。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] McDonald LC, Gerding DN, Johnson S, et al. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults and children: 2017 update by the infectious disease society of American (IDSA) and society for healthcare epidemiology of American (SHEA) [J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(7): e1-48. DOI: 10.1093/cid/cix1085.
- [2] European surveillance of *Clostridium difficile* infections-Surveillance protocol version 2.3. ECDC, 2018.
- [3] Laboratory procedures for diagnosis and typing of human *Clostridium difficile* infection. ECDC, 2018.
- [4] Crobach MJ, Planche T, Eckert C, et al. European society of clinical microbiology and infectious diseases (ESCMID): update of the diagnostic guidance document for *Clostridium difficile* infection [J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22 Suppl 4: S63-81. DOI: 10.1016/j.cmi.2016.03.010.
- [5] Bagdasarian N, Rao K, Malani PN. Diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* in adults a systematic review [J]. JAMA, 2015, 313(4): 398-408. DOI: 10.1001/jama.2014.17103.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. WS/T 498-2017 细菌性腹泻临床实验室诊断操作指南 [EB/OL]. (2017-01-15) [2020-06-25]. <http://www.nhc.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2017/02/20170209182821983.pdf>. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. WS/T 498-2017 Performance guideline for clinical laboratory diagnosis of bacterial diarrhea [EB/OL]. (2017-01-15) [2020-06-25]. <http://www.nhc.gov.cn/ewebeditor/uploadfile/2017/02/20170209182821983.pdf>.
- [7] Wu Y, Liu C, Li WG, et al. Independent microevolution mediated by mobile genetic elements of individual *Clostridium difficile* from clade 4 revealed by whole-genome sequencing [J]. mSystems, 2019, 4(2): e00252-18. DOI: 10.1128/mSystems.00252-18.
- [8] Liu XS, Li WG, Zhang WZ, et al. Molecular characterization of *Clostridium difficile* isolates in China from 2010 to 2015 [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 845. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00845.