

纹带棒状杆菌多位点序列分型及应用

王成玲¹ 王嘉正² 刘志国³ 徐帅³ 朱雄⁴ 李欢⁴ 王晓霞⁴ 邱小彤³ 魏孔娇¹
范仕弘¹ 韩李超³ 李振军^{1,3}

¹西藏大学医学院,拉萨 850000;²山东第一医科大学第一附属医院(山东省千佛山医院)检验医学科,山东省医药卫生临床检验诊断学重点实验室,济南 250000;³中国疾病预防控制中心传染病预防控制所,传染病预防控制国家重点实验室,北京 102206;⁴海南省三亚市人民医院检验科,中心实验室 572000

王成玲和王嘉正对本文有同等贡献

通信作者:李振军,Email:lizhenjun@icdc.cn

【摘要】目的 建立纹带棒状杆菌的多位点序列分型(MLST)方法,探讨临床分离纹带棒状杆菌的种群结构和遗传进化关系。**方法** 筛选出 7 个管家基因(*gyrA*、*gyrB*、*hsp65*、*sodA*、*secA1*、*rpoB*、16S rRNA),设计引物并进行 PCR 扩增和测序,测序所得序列通过 SeqMan 软件进行拼接。采用 DnaSP 5.10.01 软件、Splits tree 4.14.2 软件对管家基因的多样性及基因重组特征进行评价;采用 MEGA 7.0.14 软件基于序列型别(ST)采用 M-L 法构建系统发育树,采用 BioNumerics 软件基于 ST 特征值构建最小生成树,并用 eBURST 软件分析 ST 间遗传进化关系。**结果** 所选的 7 个位点在所有试验菌株中均获得了预期的扩增产物;Splits tree 表明所有纹带棒状杆菌的聚类一致,提示基因重组是推动纹带棒状杆菌进化的潜在动力;MLST 将 344 株纹带棒状杆菌分成 72 个 STs,85.7% 的菌株形成克隆复合体(CC)结构,CC19 形成了优势克隆复合体,但包含菌株数最多的 ST 为该克隆复合体中的 ST16。ST 具有一定的地域聚集性且与分离年份具有一定的相关性。**结论** 我国纹带棒状杆菌呈现高度的遗传多样性,CC19 为优势克隆复合体。本研究建立的 MLST 分型方案可用于纹带棒状杆菌的分型,但尚需优化改进。

【关键词】 纹带棒状杆菌; 多位点序列分型; 管家基因; 序列型

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1200601,2019YFC1200705);国家自然科学基金(82073624);海南省自然科学基金(818QN326)

Establishment and application of a multilocus sequence typing assay for *Corynebacterium striatum*

Wang Chengling¹, Wang Jiazheng², Liu Zhiguo³, Xu Shuai³, Zhu Xiong⁴, Li Huan⁴, Wang Xiaoxia⁴, Qiu Xiaotong³, Wei Kongjiao¹, Fan Shihong¹, Han Lichao³, Li Zhenjun^{1,3}

¹Department of Medicine, Tibet University, Lhasa 850000, China; ²Department of Clinical Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital (Shandong Qianfoshan Hospital) of Shandong First Medical University, Shandong Medicine and Health Key Laboratory of Laboratory Medicine, Ji'nan 250000, China; ³State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; ⁴Central and Clinical Laboratory of Sanya People's Hospital of Hainan Province, Sanya 572000, China

Wang Chengling and Wang Jiazheng contributed equally to the article

Corresponding author: Li Zhenjun, Email: lizhenjun@icdc.cn

DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20210329-00255

收稿日期 2021-03-29 本文编辑 万玉立

引用本文:王成玲,王嘉正,刘志国,等.纹带棒状杆菌多位点序列分型及应用[J].中华流行病学杂志,2021,42(9):1628-1634. DOI: 10.3760/cma.j.cn112338-20210329-00255.



【Abstract】 Objective To establish a multilocus sequence typing (MLST) assay for *Corynebacterium (C.) striatum*, explore the population structure and evolution relationship of clinical isolates of *C. striatum*. **Methods** Seven housekeeping genes (*gyrA*, *gyrB*, *hsp65*, *sodA*, *secA1*, *rpoB*, 16S rRNA) were amplified with PCR by using self-designed specific primers and sequenced. Then, the sequences were assembled with software SeqMan. The gene diversity and gene recombination characteristics were evaluated by using software DnaSP 5.10.01 and Splits tree 4.14.2. The phylogenetic tree and the minimum spanning tree were constructed based on the sequence types (ST) characteristics by using software MEGA 7.0.14 and BioNumerics, respectively. In addition, the genetic evolutionary relationship among STs were analyzed by using software eBURST 3.0. **Results** The expected amplification products of seven sites selected in all the test strains were obtained. Splits tree showed that the clustering of all *C. striatum* strains was consistent, suggesting that gene recombination is the potential driving force for the evolution of *C. striatum*. All of the 344 *C. striatum* strains were divided into 72 STs by MLST and 85.7% of the strains formed clonal complexes. CC19 was the predominant clonal complex, whereas ST16 in the clonal complex was detected in the most strains. ST had a certain geographic clustering and a certain correlation with the isolation time. **Conclusions** *C. striatum* showed high genetic diversity in China and CC19 was the predominant clonal complex. The MLST assay established in this study can be used for the typing of *C. striatum*, but further improvement is needed.

【Key words】 *Corynebacterium striatum*; Multilocus sequence typing; Housekeeping gene; Sequence type

Fund programs: National Key Research and Development Program of China (2019YFC1200601, 2019YFC1200705); National Natural Science Foundation of China (82073624); Natural Science Foundation of Hainan Province (818QN326)

纹带棒状杆菌(*Corynebacterium striatum*)是临床微生物实验室中常见的条件致病菌^[1-2]。通常情况下纹带棒状杆菌是人体正常微生物群系的重要组成部分,可定植于人的皮肤和黏膜,而不产生致病性^[3-4]。近年来,随着临床微生物组学及宏基因组学研究的兴起,越来越多的研究表明纹带棒状杆菌是引发慢性阻塞性肺疾病患者院内呼吸道暴发感染的重要病原体^[5-7]。此外,由于现代化检查及治疗手段在临床中的应用和免疫抑制剂的频繁使用,导致纹带棒状杆菌引发院内感染事件频发,常见的报道有肺炎^[6]、败血症^[8]、骨髓炎^[9]等。基于分子手段开展纹带棒状杆菌的院内暴发感染分析,对完善纹带棒状杆菌院内感染监测和深入了解其院内传播途径有重要的临床流行病学意义。

多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是从多位点酶电泳(multilocus enzyme electrophoresis, MLEE)方法衍生出来的一种新的分子分型方法。在1988年由Maiden等^[10]运用于对自然变异的脑膜炎奈瑟菌的分型。随后,被广泛应用于细菌的微进化、群体生物学和流行病学等方面的研究^[11-12]。该方法具有操作简单、重复性好及分辨率高等特点,不仅能对不同实验室的结果数据进行共享比对,还可进行病原菌的种群结构及进化方面的研究^[13]。当前,我国纹带棒状杆菌 MLST 分析方

法尚未建立,本研究以2016-2020年自北京市、河北省、广东省、山东省4家医院分离的342株纹带棒状杆菌和2株参考菌株为研究对象,探讨以7个管家基因为靶点建立纹带棒状杆菌的MLST分型方法,并对不同来源纹带棒状杆菌分离株进行分析评价,解析其种群结构及进化关系,为纹带棒状杆菌的监测、防控提供科学参考依据。

材料与方法

1. 菌株来源:本研究所使用的纹带棒状杆菌共344株,包括342株临床分离株和2株参考菌株。342株临床纹带棒状杆菌来源于2016-2020年北京市、河北省、广东省、山东省4家医院检验科或临检中心。参考菌株为纹带棒状杆菌 ATCC 6940^T 和 ATCC 43751 均购自美国模式菌种收集中心。342株临床分离纹带棒状杆菌均保藏于中国 CDC 传染病预防控制所。所有菌株在本研究开展前均采用16S rRNA 基因测序方法进行复核。

2. 主要试剂与仪器:哥伦比亚血平板(英国 OXOID 公司)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]、2×TaqMasterMix(康为世纪生物科技有限公司)、5×TBE(中国北京睿博兴科生物技术有限公司),所有试剂均按说明书指定

条件保藏并在有效期内使用。B2 生物安全柜(中国北京东联公司)、基因扩增热循环仪(中国西安天隆科技有限公司)、电泳仪(美国伯乐公司)、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

3. 基因组 DNA 的制备:在生物安全二级实验室中按照标准的细菌操作规范对菌株进行复苏,随后挑取每个菌株的单菌落接种在哥伦比亚血琼脂平板于 37 °C 孵育 18~24 h 后,使用天根生化科技(北京)有限公司 DNA 提取试剂盒并严格按照说明书指定步骤提取菌株的 DNA,制备好的 DNA 用紫外线可见分光光度计 ND-2000 进行检测后-20 °C 保存备用。

4. 管家基因的选择及引物设计:对 342 株临床分离株及参考菌株 ATCC 43751 的管家基因进行扩增和测序,模式菌株 ATCC 6940^T 基因序列自 GenBank 数据库下载。根据文献中提供的引物合成 16S rRNA^[14]、*gyrA*^[15]、*rpoB*^[16] 及 *hsp65*^[17] 基因的引物,并根据 *sodA*、*gyrB* 及 *secA1* 3 个基因的保守区域应用 Primer 5.0 软件设计上、下游引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列和扩增长度见表 1。

5. MLST-PCR 扩增:PCR 扩增采用 25 μl 反应体系,PCR 反应条件:16S rRNA、*gyrA*、*rpoB* 及 *hsp65* 基因根据上述文献[14-17]提供的扩增条件进行扩增;*sodA*、*gyrB* 及 *secA1* 基因退火温度分别为 55、55、60 °C。扩增片段经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,将阳性扩增产物送交北京睿博兴科生物技术有限公司纯化并进行双向测序。

6. 序列分析:采用 BioEdit 软件分析测序峰图

并纠正位点误读,采用 SeqMan (DNASTAR, Lasergene.7.1)软件对序列进行拼接整理,弃除序列两端测序丰度较低的序列。采用 MEGA 7.0.14 软件载入拼接序列,采用 ClustalW 将实验菌株的序列与标准等位基因型序列进行比对分析,确定每个位点的等位基因型,将 7 个位点的等位基因组合从而确定菌株的 ST。测序得到的 *rpoB*、*gyrA* 及 16S rRNA 基因序列与已上传至 EMBL 数据库中的序列(登录号:HE586270~HE586300)进行比对和计算,相似性达到 100% 时赋予相同的等位基因号,否则按照数据库的相关规则分配新的等位基因号。*hsp65*、*sodA*、*gyrB* 及 *secA1* 基因的等位基因编号经比对分析后获得。

7. 管家基因的遗传多态性评价:采用 DnaSP 5.10.01 软件分析计算管家基因遗传多样性,并计算相关系数。采用 DnaSP 5.10.01 软件中的 Tajima's D、Fu and Li's D 和 Fu and Li's F 等统计学方法进行管家基因中性进化检验。通过 Splits tree 4.14.2 软件构建 7 个管家基因序列及相应 ST 的进化树以分析纹带棒状杆菌遗传特征。

8. ST 序列的系统进化分析:采用 MEGA 7.0.14 软件,获得所有菌株的等位基因谱。之后将 7 个等位基因按 *sodA-rpoB-gyrA-gyrB-hsp65-secA1-16S rRNA* 顺序串联,确定菌株的序列型别(sequence types, STs)。采用 MEGA 7.0.14 软件构建系统发育树,采用 BioNumerics 软件对纹带棒状杆菌菌株不同 ST 构建最小生成树(Minimum Spanning Tree),并用 eBURST 软件计算各菌株 ST 的克隆复合体(clone complex, CC),分析菌株间的

表 1 MLST 管家基因引物序列信息表

基因名称	引物名称	引物序列(5'~3')	产物大小(bp)	编码基因功能	来源
<i>sodA</i>	sodAF	TCCGCAGAGATCATGGAG	528	超氧化物歧化酶	本研究
	sodAR	AGTGAAGCGCTCTGCAAC			
<i>rpoB</i>	C2700F	CGWATGAACATYGGBCAGGT	446	RNA 聚合酶 β 亚基	文献[16]
	C3130R	TCCATYTCRCCRAARCCTG			
<i>gyrA</i>	gyrA1F	GCGGCTACGTAAAGTCC	337	DNA 促旋酶 A 亚单位	文献[15]
	gyrA2R	CCGCCGGAGCCGTTTCAT			
<i>gyrB</i>	gyrBF	CCGCCCTCATGGGTATTAATGG	569	DNA 促旋酶 B 亚单位	本研究
	gyrBR	ATCAAGCGCGATGGAAAAG			
<i>hsp65</i>	TB11	ACCAACGATGGTGTGCCAT	456	热休克蛋白	文献[17]
	TB12	CTTGTCGAACCGCATACCCCT			
<i>secA1</i>	secA1F	GATGACCATGCGCTCAGTGC	574	移位酶蛋白亚单位	本研究
	secA1R	CCGCTTCTACCTGTCCATGC			
16S rRNA	16SF27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1 481	16S rDNA	文献[14]
	16SR1492	TACGGYTACCTTGTACGACTT			

亲缘进化关系。

结 果

1. 管家基因多样性分析:各管家基因的等位基因数量范围为 12~18 个, *sodA* 位点的等位基因数量最多, 为 18 个, 其余依次为 *hsp65* 17 个, *gyrA*、*gyrB* 分别为 14 个, *rpoB*、16S rRNA 分别为 13 个, *secA1* 相对变化较小, 等位基因为 12 个。管家基因的多态性位点数共有 140 个, 以 *hsp65* 的数量最多, 为 26 个, 其次为 *gyrB* 基因, 包含有 25 个多态性位点, 最少的为 16S rRNA, 含有 13 个多态性位点。核苷酸多态性(pi)值在 0.001 9 (16S rRNA)~0.011 8 (*gyrB*)之间。见表 2。

2. 基因中性试验分析:7 个管家基因的 Tajima's D 值介于 -1.587 27~1.511 19 之间, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 在 Fu and Li's D 检验中, 只有 *sodA* 基因的差异有统计学意义 ($P<0.05$), 其余 6 个管家基因的差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 在 Fu and Li's F 检验中, 只有 16S rRNA 基因的差异有统计学意义 ($P<0.05$), 其余 6 个管家基因的差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 3。

3. 等位基因序列重组分析:分析表明序列呈复杂的网状结构, 提示纹带棒状杆菌分离株在其进化过程中存在重组事件。见图 1。

4. ST 分布特征:7 个管家基因将 344 株纹带棒状杆菌分为 72 个 STs, 其中菌株数量最多的 ST 为 ST16 (95 株), 占 27.6%; 其次含有菌株数较多的是

表 2 344 株纹带棒状杆菌 MLST 位点基因多态性特征

管家基因	扩增长度(bp)	截取长度(bp)	等位基因型数	多态性位点数	平均核苷酸差异数	核苷酸多态性(pi)值
<i>sodA</i>	528	500	18	21	3.9	0.007 9
<i>rpoB</i>	446	414	13	17	3.7	0.008 8
<i>gyrA</i>	337	312	14	24	1.6	0.005 2
<i>gyrB</i>	569	542	14	25	6.4	0.011 8
<i>hsp65</i>	456	433	17	26	4.4	0.010 3
<i>secA1</i>	574	551	12	14	2.7	0.004 8
16S rRNA	1 481	1 199	13	13	2.2	0.001 9

注:截取长度为实际比对分析长度

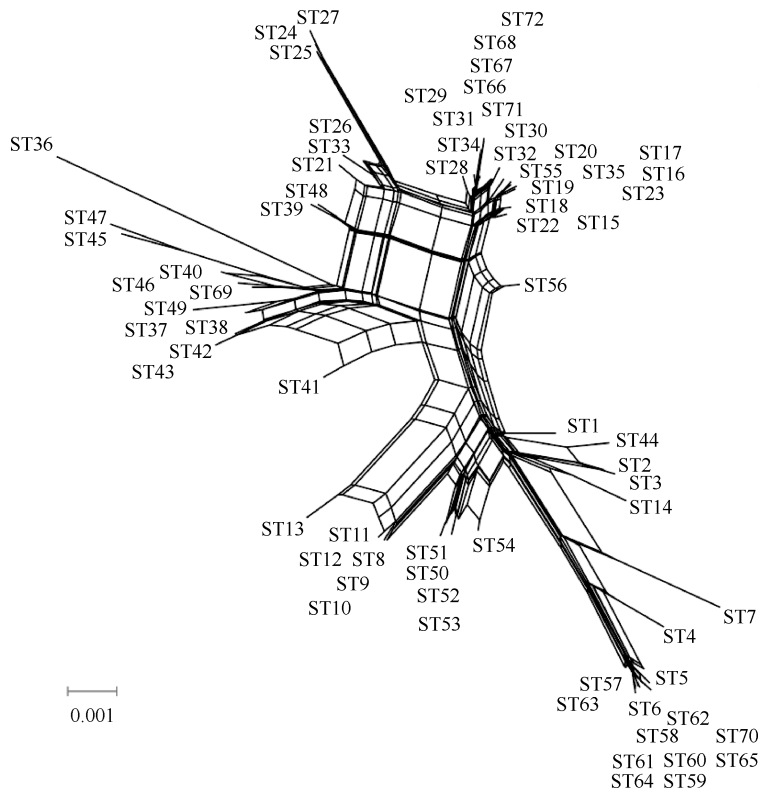


图 1 纹带棒状杆菌管家基因的重组分析图

ST8 (49 株), 占 14.2%; ST50 含 22 株菌, 占 6.4%; ST24 和 ST44 分别含 17 株菌, 各占 4.9%。有 41 个 ST 只含 1 株菌, 占 11.9%。不同分离地的菌株序列型较丰富, 不同分离地的菌株存在相同的序列型, 同一分离地的菌株存在不同的序列型。不同分离时间的菌株分型结果也存在显著差异, 不同分离时间的序列型之间存在交叉, 同一分离时间的菌株也有着不同的序列型。

5. ST 的 eBURST 分析:344 株纹带棒状杆菌的 72 个 STs 经 eBURST 3.0 软件分析, 共形成了 10 个 CCs 及 18 个独特性 (Singleton)。10 个 CCs 中 CC19 是含分离株数 (141 株) 最多的克隆复合体, 是优势克隆复合体, 且在 CC19 中, ST19 占据核心地位, 被认为是祖先序列型。ST19 共包含分离自 2019 年山东省的 4 株菌。344 株纹带棒状杆菌

表 3 建立 MLST 分型法的基因中性试验分析

管家基因	Tajima's D	Fu and Li's D	Fu and Li's F
<i>sodA</i>	0.384 89	-2.905 01 ^a	-1.880 21
<i>rpoB</i>	0.751 37	0.479 39	0.710 75
<i>gyrA</i>	-1.587 27	-1.854 85	-2.107 52
<i>gyrB</i>	1.511 19	-1.854 85	-0.533 80
<i>hsp65</i>	0.255 12	0.501 37	0.481 33
<i>secA1</i>	0.528 68	0.128 49	0.341 66
16S rRNA	0.235 15	-2.825 53	-1.996 71 ^a

注:^a差异有统计学意义($P<0.05$)

中形成克隆复合体的分离株共有 295 株, 占有菌株的 85.7%。见图 2。10 个 CCs 所包含的 ST、菌株数及其分离地、分离时间见表 4。

6. ST 序列系统发育分析: 采用 MEGA 7.0.14 最大似然法 (Maximum-Likelihood, M-L) 构建系统发育树揭示纹带棒状杆菌的进化关系。系统发育树的分析结果与 eBURST 分析结果基本一致, 处于同一克隆复合体的 ST 属于相同分支, 亲缘关系较近。见图 3。

7. MLST 最小生成树分析结果: 本研究分别以分离地区、分离时间为基准, 研究 344 株纹带棒状

杆菌之间的亲缘关系, 构建最小生成树图。最小生成树的结果与 eBURST 软件的分析结果基本吻合, 同一克隆系内的分离株之间均用黑实线相连, 亲缘关系最近; 不同克隆谱系之间用灰实线或虚线连接, 亲缘关系稍远; 342 株临床分离株与 2 株参考菌株之间均用虚线连接。见图 4。

由图 4A 可以看出, 342 株临床分离株存在一定的地域聚集性, 山东省的分离株与其余三地的菌株之间均有黑实线连接, 与北京市、河北省的分离株之间灰实线连接也较多; 且北京市、河北省及广东省的大部分分离株具有相同的 ST (ST16); 同一地区分离株之间也存在虚线连接如山东省的分离株 ST31 和 ST52、ST42 和 ST69。

由图 4B 可以看出, 不同分离时间的分离株的 ST 分布较松散。分离自 2016 年的菌株与分离自 2017、2018 年的菌株之间既有相同的 ST (ST8、ST16、ST24、ST44、ST50) 也有虚线的连接, 分离自 2017、2018、2019 及 2020 年的菌株之间也有相同的 ST (ST59); 大部分分离自同一年份的分离株之间用黑实线连接, 且相邻年份的分离株之间亲缘关系也较近。

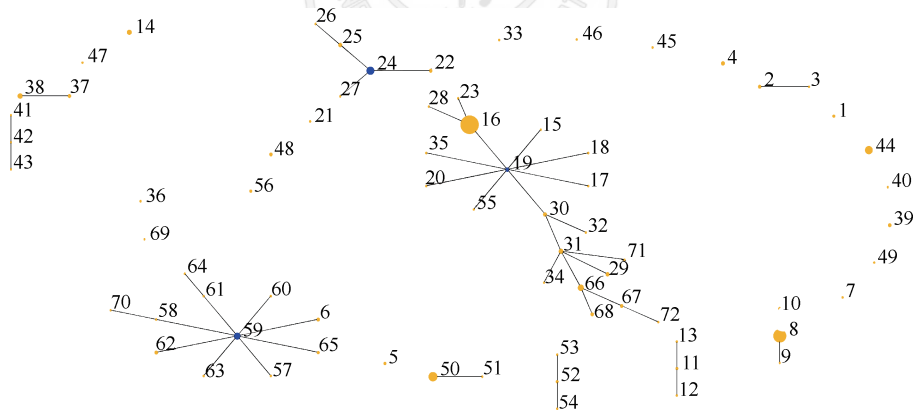


图 2 344 株纹带棒状杆菌分离株的 eBURST 分析

表 4 10 个克隆复合体中纹带棒状杆菌分离株的信息

克隆复合体	序列型	株数量(株)	地区(省/市)	时间(年)
CC2	2、3	4	北京、广东	2017、2018
CC8	8、9、10	53	北京、河北	2016、2017、2018
CC11	11、12、13	4	山东	2017、2018、2019
CC19	15、16、17、18、19、20、23、28、29、30、31、32、34、35、55、66、67、68、71、72	141	北京、广东、河北、山东	2016、2017、2018、2019、2020
CC24	22、24、25、26、27	26	北京、河北	2016、2017、2018
CC38	37、38	10	北京、广东	2017、2018
CC42	41、42、43	3	山东	2017、2018、2020
CC50	50、51	23	北京、河北	2016、2017、2018
CC52	52、53、54	4	山东	2017、2019
CC59	6、57、58、59、60、61、62、63、64、65、70	27	山东	2017、2018、2019、2020

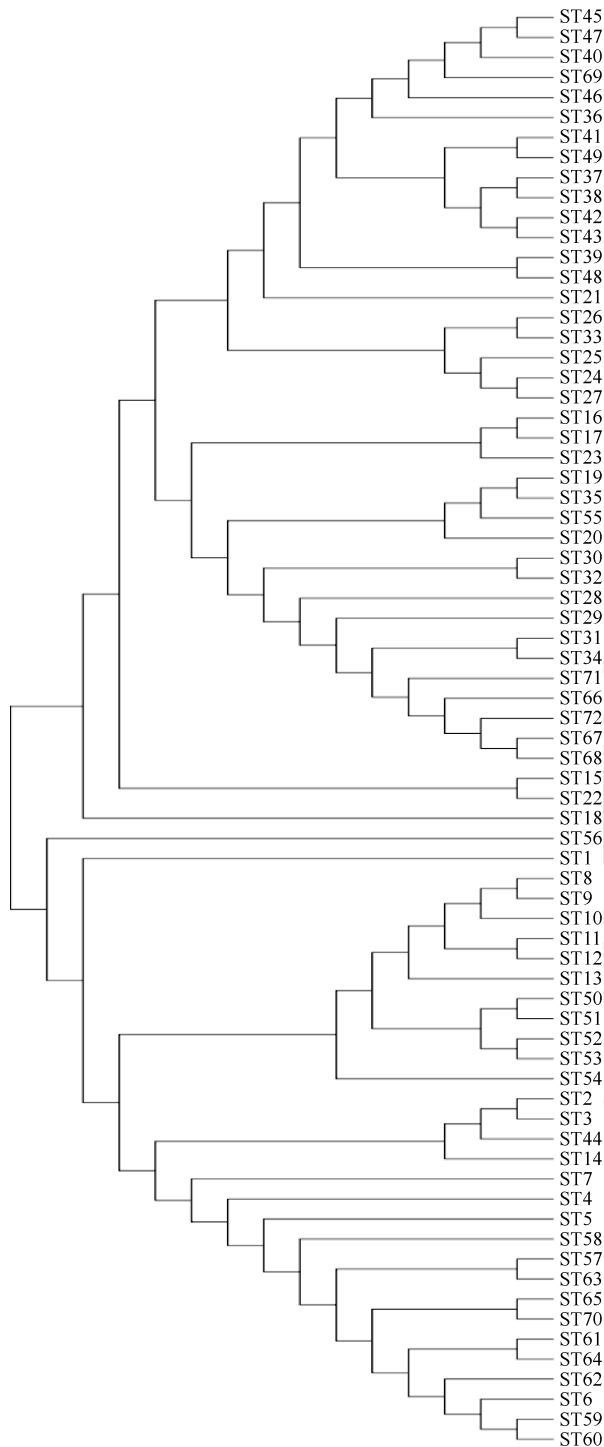


图3 344株纹带棒状杆菌分离株的最大似然法进化树

讨论

等位基因的数量反映管家基因的多样性,等位基因数量越多,其多样性越丰富。各管家基因的等位基因数量分布在12~18之间,*sodA*位点的等位基因数量最多,表明本研究菌株的多态性主要来自该位点,*secA1*位点的等位基因数量最少,表明中国菌

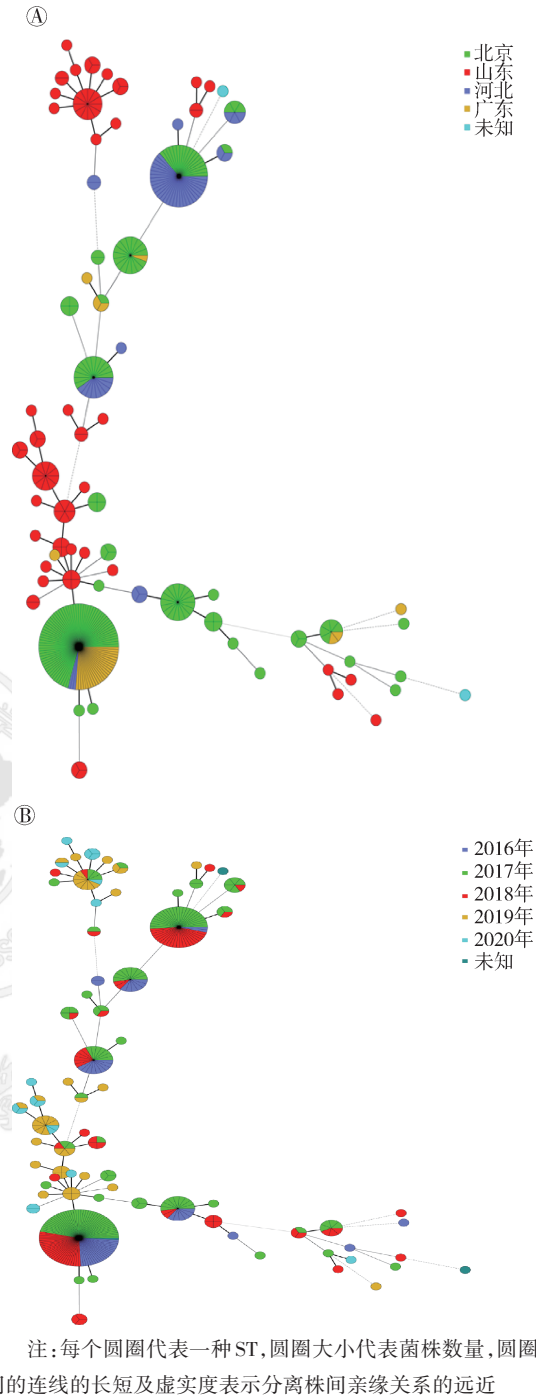


图4 344株纹带棒状杆菌最小生成树

株的*secA1*位点较为保守,但有待更多菌株的分析加以证实。来自国外的研究^[18-20]表明,*rpoB*位点多态性较高,与本研究结果不同,表明菌株的多态性存在差异。基因重组在细菌进化中起推动作用,本研究显示342株临床分离株间存在一定的重组事件,与Gomila等^[18]的研究一致,提示基因重组是纹带棒状杆菌遗传多样性的一个重要原因。管家基因的中性试验分析表明,纹带棒状杆菌通过等位基因产生同义替换而导致的同源重组确实存在,但大

多数在遗传进化过程中被淘汰,细菌发生基因重组可能是为了更好地适应环境。

ST与宿主的地域来源具有一定的相关性。来自中国4个省(市)(北京市、广东省、河北省和山东省)的分离株,在优势克隆复合体CC19中均有分布,提示上述4个省(市)分离的纹带棒状杆菌具有潜在的遗传相似性。此外,ST19包含4株分离自2019年山东省的菌株在该克隆系中占据核心地位,被认为是本研究菌株的祖先序列型,来自不同宿主的更多菌株的类似研究是必要的。值得一提的是在CC19中,包含菌株数最多的ST是ST16,分离自北京市、河北省和广东省且与山东省的大部分分离株亲缘关系较近,暗示该ST的菌株可能会发展成为优势菌群,应加强对这种ST菌株致病力的监测;来自河北省的大部分菌株与北京市的大部分菌株处于同一克隆谱系的同一分支,提示此两地区菌株型别相似,可能由于地理距离较近而导致菌株间的亲缘关系较近;来自广东省的大部分菌株与北京市的部分菌株也处于同一克隆谱系的同一分支,提示可能由于两地的人员流动较大而导致菌株遗传多样性的增加,但鉴于标本量少,仍需要大样本监测;来自山东省的部分纹带棒状杆菌自成4个克隆系:CC11、CC42、CC52、CC59,提示山东省的纹带棒状杆菌ST相对靠拢且相对其他省份独立,可能存在潜在的优势克隆群,该地区菌株具有较高的遗传多样性。

不同分离时间的序列型之间存在交叉,同一分离年份的菌株也有着不同的ST,可以推测同一年份收集的菌株ST分布相对松散;不同分离年份之间的菌株也有着相同的ST,且相邻分离年份的菌株之间亲缘关系较近,提示ST与分离时间有一定的相关关系。2016年分离株(全部来源于北京市)主要是ST16,2017-2018年分离株(来源于北京市、河北省、广东省及山东省)也主要是ST16,2019-2020年分离株(全部来源于山东省)主要ST分别是ST66和ST62,推测ST16所包含的纹带棒状杆菌分离株的进化时间较长。

目前国内外尚无标准的纹带棒状杆菌MLST分型方案,本研究建立了纹带棒状杆菌7个管家基因的多位点序列分型技术。但由于本研究所涉及各个地区菌株有限,所以研究该时间点的地区分布状况受到限制,为达到预期应用效果,仍需要更多数量及来源的纹带棒状杆菌进行进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- Mushtaq A, Chen DJ, Strand GJ, et al. Clinical significance of coryneform Gram-positive rods from blood identified by MALDI-TOF mass spectrometry and their susceptibility profiles—a retrospective chart review[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2016, 85(3):372-376. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.04.013.
- Martínez-Martínez L, Suárez AI, Winstanley J, et al. Phenotypic characteristics of 31 strains of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical samples [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9):2458-2461. DOI:10.1128/JCM.33.9.2458-2461.1995.
- Bernard K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(10): 3152-3158. DOI: 10.1128/JCM.00796-12.
- Alibi S, Ferjani A, Boukadida J, et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):9704. DOI:10.1038/s41598-017-10081-y.
- Verroken A, Bauraing C, Deplano A, et al. Epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* at one Belgian university hospital[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20(1): 44-50. DOI:10.1111/1469-0691.12197.
- Renom F, Garau M, Rubi M, et al. Nosocomial outbreak of *Corynebacterium striatum* infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(6): 2064-2067. DOI: 10.1128/JCM.00152-07.
- Iaria C, Stassi G, Costa GB, et al. Outbreak of multi-resistant *Corynebacterium striatum* infection in an Italian general intensive care unit[J]. *J Hosp Infect*, 2007, 67(1):102-104. DOI:10.1016/j.jhin.2007.07.002.
- Martín M, Melón O, Celada MM, et al. Septicaemia due to *Corynebacterium striatum*: molecular confirmation of entry via the skin[J]. *J Med Microbiol*, 2003, 52(7): 599-602. DOI:10.1099/jmm.0.05102-0.
- Fernández-Ayala M, Nan DN, Fariñas MC. Vertebral osteomyelitis due to *Corynebacterium striatum*[J]. *Am J Med*, 2001, 111(2): 167. DOI: 10.1016/s0002-9343(01)00739-2.
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(6):3140-3145. DOI:10.1073/pnas.95.6.3140.
- Boers SA, van der Reijden WA, Jansen R. High-throughput multilocus sequence typing: bringing molecular typing to the next level[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e39630. DOI: 10.1371/journal.pone.0039630.
- Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing[J]. *Trends Microbiol*, 1999, 7(12): 482-487. DOI: 10.1016/s0966-842x(99)01609-1.
- 廖亚玲, 邹全明. 病原微生物基因多位点序列分型的研究进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2007, 35(4): 65-68. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5673.2007.04.018.
- Liao YL, Zou QM. Research progress on gene multilocus sequence typing of Pathogenic microorganism[J]. *Prog Microbiol Immunol*, 2007, 35(4): 65-68. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5673.2007.04.018.
- Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing[M]//Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York: John Wiley and Sons, 1991: 115-175. DOI:10.4135/9781446279281.n7.
- Sierra JM, Martínez-Martínez L, Vázquez F, et al. Relationship between mutations in the *gyrA* gene and quinolone resistance in clinical isolates of *Corynebacterium striatum* and *Corynebacterium amycolatum*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(5): 1714-1719. DOI: 10.1128/AAC.49.5.1714-1719.2005.
- Khamis A, Raoult D, La Scola B. *rpoB* gene sequencing for identification of *Corynebacterium* species[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(9):3925-3931. DOI: 10.1128/JCM.42.9.3925-3931.2004.
- Gomila M, Ramirez A, Lalucat J. Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(12): 3787-3797. DOI: 10.1128/AEM.02934-06.
- Gomila M, Renom F, Gallegos MDC, et al. Identification and diversity of multiresistant *Corynebacterium striatum* clinical isolates by MALDI-TOF mass spectrometry and by a multigene sequencing approach[J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12(1):52. DOI:10.1186/1471-2180-12-52.
- Suh JW, Ju Y, Lee CK, et al. Molecular epidemiology and clinical significance of *Corynebacterium striatum* isolated from clinical specimens[J]. *Infect Drug Resist*, 2019, 12: 161-171. DOI:10.2147/IDR.S184518.
- Ji KS, Choi SM, Choi JA, et al. Factors affecting the clinical relevance of *Corynebacterium striatum* isolated from blood cultures[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6):e0199454. DOI: 10.1371/journal.pone.0199454.