

· 综述 ·

艰难梭菌分子分型技术及其应用

严其容 程颖 卢金星

【关键词】 艰难梭菌; 分子分型

Molecular typing methods on *Clostridium difficile* and their application YAN Qi-rong, CHENG Ying, LU Jin-xing. State 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

Corresponding author: LU Jin-xing, Email: lujinxing@icdc.cn; CHENG Ying, Email: chengying@icdc.cn

This work was supported by grants from the National Science and Technology Mega-Projects of China (No. 2009ZX10004-203) and National Science Foundation for Young Scientists of Chinese Center for Disease Control and Prevention (No. 2011A101).

【Key words】 *Clostridium difficile*; Molecular typing

艰难梭菌是一种专性厌氧的革兰阳性杆菌,能够产生肠毒素 A 和细胞毒素 B,是导致假膜性结肠炎的主要致病菌,并能引起牛、猪等动物腹泻。2001 年以来,艰难梭菌感染在欧美各国广泛流行,住院患者感染率在英国占 15.0%、法国 1.7%~6.4%、西班牙 8.8%、加拿大 17.0%、印度 15.0%;在中国,由于开展厌氧菌培养鉴定的实验室很少,尚无确切的统计数据。轻型患者在临床常被忽视,发展为假膜性结肠炎则可有高热、血水样便、腹胀、中毒性巨结肠等表现,其病死率可高达 10.0%~40.0%,尤其是感染强毒株 NAP1/027 后病死率高达 65.0%。分子分型技术基于菌株间 DNA 的不同而应用于细菌鉴定、耐药基因的检测以及流行病学等方面的研究。在艰难梭菌感染暴发或流行中,借助于现代分子分型技术,可以对其进行流行病溯源研究和进化分析。本文对目前国际艰难梭菌分子分型的主要技术和应用进行综述。

1. 分子分型技术:艰难梭菌的分子分型技术主要分为三类:基于限制性酶切片电泳的技术,包括脉冲场凝胶电泳(PFGE)、限制性核酸内切酶分析(REA)、毒素基因分型(Toxinotyping)等;基于 PCR 扩增的技术,包括核糖体分型(PCR-ribotyping)、随机扩增多态性 DNA 分析(RAPD)又称任意引物 PCR(AP-PCR)、多位点可变数目串联重复序列分

析(MLVA)、扩增片段长度多态性分析(AFLP);基于序列分析的技术,包括多位点序列分析(MLST)、表层蛋白 A 基因序列分型(SlpA typing)。

2. 分子分型技术的应用:

(1)PFGE:超过一定大小的线状双链 DNA 在琼脂糖凝胶中以相同速率迁移,>40 Kb 的 DNA 不能在恒强水平琼脂糖凝胶电泳中分离,而 PFGE 可以分离长至 50 Mb 的 DNA。将细菌进行包埋后裂解释放出 DNA,采用内切酶酶切,不同的细菌产生不同大小以及不同数目的酶切片段,经 PFGE 分离形成不同的带型,采用软件(Bionumerics)对这些指纹图谱进行分析,从而研究其流行病学的特点。PFGE 在北美洲被认为是艰难梭菌分型的金标准,然而,由于操作过程中 DNA 的降解而引起很多菌株不能用这种方法进行分型^[1]。

PFGE 已经广泛用于全球艰难梭菌流行病学的研究。采用此方法,人们发现在北美洲流行一种型别为 NAP-1 的菌株^[2,3]。Songer 等^[4]从经烹煮或未经烹煮的在肉类产品中分离出了强毒株的艰难梭菌 NAP-1,提示食物类产品可能在艰难梭菌种间传播中起着一定的作用。Limbago 等^[5]、Mulvey 等^[6]从社区患者和住院患者中分离到 NAP-2、NAP-4、NAP-11、NAP-7 和 NAP-8 等一系列基因型的菌株。PFGE 还用于长期监测艰难梭菌的流行病学特点,Sue 等^[1]发现 PFGE J4 亚型自 2002 年一直在所研究的医院里存在,且 A⁺B⁺菌株构成了一个明显不同于 2 株 A⁺B⁺构成的群。另外,基于 PFGE 的 PulseNet 将分子流行病与网络技术有机结合,为实现疫情长期监测及溯源研究提供依据。而且,对来自不同宿主的艰难梭菌用 PFGE 分型,发现具有不同的基因型,这或许表明了其不同的进化来源^[7]。

(2)REA:不同的细菌基因组不同,选择合适的核酸内切酶对其酶切后用琼脂糖电泳分离则产生不同的带型,从而对细菌进行分型。通常采用 Hind III 作为内切酶来进行酶切。这个方法最初是由 Kuijper 等提出,但是后期由 Gerding 及其同事加以补充和改善。菌株间的条带差异在 6 个以下则归为一个群,并根据字母来命名,同一群内不同的型别则是用数字来命名,如 CF1、CF2。

2001 年在美国和加拿大发现的强毒株 NAP-1/027 型属于 B I 型,该型菌株最早于 1984 年发现^[8,9]。Adam 等^[9]发现 B I 型菌株在北美洲广泛传播,J 型(核糖体 001)菌株主要分布于欧洲,一些非特异的 REA 型别(历史上较少发生的型别)主要分布在澳洲。Belmares 等^[10]将 REA 用于艰难梭菌流行病学的分析时发现,1982—1991 年的临床菌株中,B I 型共分离出 6 次,分别是 1984、1988、1990 年各 2 次。REA 用于围产期妇女艰难梭菌的分型,发现 4 个不同的 REA 群,7

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.10.021

基金项目:国家科技重大专项(2009ZX10004-203);中国疾病预防控制中心青年科研基金(2011A101)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心传染病预防控制所医院感染室

通信作者:卢金星,Email: lujinxing@icdc.cn;程颖,Email: chengying@icdc.cn

个型别^[11]。

(3)毒素基因分型: Maja 及其同事于 1998 年建立了一个基于编码 A 毒素和 B 毒素基因的改变来对艰难梭菌进行毒素分型的技术。将致病位点 PaLoc 基因(19.6 kb)划分为 10 个互相叠加的片段,设计引物分别进行扩增后用凝胶电泳分离这些片段,得到片段的长度多态性,再将片段用不同的酶进行酶切,进而分析酶切后的带型。结合长度多态性和酶切位点多态性可以将细菌分为不同的毒素型别,不同的毒素型别用罗马字母来命名。将日本的参考菌株 VPI10463 定义为毒素型 0,所研究的 219 株菌的基因同 VPI10463 比较,被命名为 9 个型别(I~X)。除 I 和 II 型外的所有型别在 A、B 毒素基因均有改变,同时规定同属于一个毒素型别的菌株应该也同属于一个 PFGE 型别。

Kazakova 等^[12]发现在某医院流行的菌株属于毒素型 III,此菌株是二元毒素阳性,并有 tcDC 基因 18 碱基的缺失,对喹诺酮类耐药性更强。Rupnik 等^[13]对 22 株二元毒素阳性的菌株分型,可以分为 III、IV、V、VII、IX 和 XIII 6 个型别。新型别(XVI~XX)是 Maja 等对日本、韩国以及印度尼西亚健康儿童的 56 株菌分析后命名的。

(4)核糖体分型:艰难梭菌核糖体分型是基于 16S 和 23S rDNA 基因间隔区(ITS)的扩增来进行分型的。同其他多数细菌一样,艰难梭菌染色体内存在若干个拷贝的核糖体操纵子,这个拷贝数在不同的 ITS 是不一样的。因此扩增出来的不同带型就能将不同的细菌区分开来。一对引物扩增出来的条带在 200~700 bp 不等。目前,核糖体分型方法是欧洲艰难梭菌参比实验室标准分型方法^[14]。

Stubbs 于 1999 年对艰难梭菌菌株进行核糖体分型后,按照数字来命名为 001、027、106 等型别。078 型引起的暴发主要发生在比较年轻的人群,并且与社区获得相关。078 型与动物腹泻关系密切,078 型在分离自猪的菌株中占 83.0%,在小牛的分离株中达 94.0%,但是在其他种类动物中罕见^[15]。并且,从人类和猪分离的 078 型菌株具有高度的遗传相关性。核糖体分型广泛应用于艰难梭菌暴发的研究。Dumford 等^[16]对 CDI 患者的病房及医疗器械表面分离出来的 26 株菌株分型,发现 19 株与患者粪便标本中的细菌核糖体分型相符合,且 13 株是二元毒素阳性的菌株,说明患者周围密切接触的环境发生了污染。Sawabe 等^[17]将日本一家医院连续 5 年的 148 个分离株分为 26 个核糖体型,用英文字母来命名。发现在研究期间,分离株主要的型别发生了变化,2000 年以 a 型为主(15/33, 45%),2004 年以 f 型为主(18/28, 64%)。推测在 2000—2004 这 5 年中,菌株在患者之间传递时发生了基因的变化,并且 2004 年 f 型菌株是引起暴发的菌株。Spigaglia 等^[18]从 1987 年起在意大利多家医院收集菌株,采用 PFGE 和核糖体分型来分析其遗传相关性,发现其中一个菌株是引起三个地理位置和时间差距较大的暴发病原菌。

(5)RAPD 或 AP-PCR:该方法其基本原理是:用适当选择的一系列人工随机合成的寡聚核苷酸单链为引物,以所研究的基因组 DNA 为模板进行扩增,从而获得基因组指纹图

谱。退火时引物同时结合到基因组的多个位置,但是只有当引物分别结合在 DNA 的 2 条链上,它们的 3' 末端相互面对,其间隔不超过几个 kb 时,扩增反应才能进行。从本质上讲,是在低严谨性的条件下,对全基因组的小的反向重复序列进行扫描,并对不同长度的插入 DNA 序列进行扩增。

RAPD 分型常常同其他分型方法一起对艰难梭菌进行分型,对分型结果起到一定的补充作用。采用核糖体分型、RAPD、PFGE 对 56 株血清 C 型产毒株进行分型,分别分为 2、5 和 11 个型别。将 3 种方法结合起来则产生 13 个型,发现与暴发相关的血清 C 型菌株限于几个遗传稳定而又广泛分布的基因型。与 PFGE 相比,2 种方法的分型能力一致, RAPD 更省时,但是带型不如 PFGE 容易分析。在 Lemann 等^[19]的研究中有 5 例患者的菌株不能用血清进行分型,其中 3 株菌是血清 H 型。AP-PCR 能够对所有的菌株进行分型,并且呈现多种带型,这表明在患者之间不存在交叉传播。

(6)MLVA:聚合酶的滑链复制形成基因的可变数目重复序列(VNTR),通过软件寻找这些 VNTR,并设计相应的引物对其进行扩增后判定其串联重复序列可变重复数目,从而形成一定的数组。不同的细菌对应不同的数组,从而将不同的细菌区分开来。每一个 VNTR 的重复序列由重复单位和紧靠在一起的重复杂拷贝的数目确定,重复单位的 DNA 序列在单态性种属的细菌中具有高度保守性,因而对亚种的分类主要依靠结合多个独立的靶基因的差别,这种方法充分利用了重复单位的序列长度变化和拷贝数的不同产生的多样性,是迄今分辨能力最高的方法^[14]。

van den Berg 等^[20]利用艰难梭菌 630 的基因组序列,发明了用自动化的片段分析和多色毛细管电泳的 MLVA 技术来作为一个对艰难梭菌进行分型的方法;为了更快更容易的在艰难梭菌使用 MLVA 分型,使用 2~9 bp 的串联重复,这样易于用多色毛细管电泳进行自动化的片段分析来取代测序。采用这种分型方法,630 和血清型 C 的菌株(最接近的 2 种菌)其相似度仅为 43%,表明这种方法有很高的分型能力。并且他们发现来自 8 个不同国家的 29 个 A⁻B⁺(核糖体 017 型)菌株表现了 8 个具有地域特异性的群,MLVA 可以将核糖体 027 型分为多个型别^[20,21]。Abraham 等^[22]对 54 个人和 11 个猪的分离株进行 MLVA 分型,发现 4 个克隆复合物,这些克隆复合物包括人和猪的分离株,说明不同来源的菌株具有一定的遗传相关性。Best 等^[23]采用核糖体分型以及 MLVA 对 60% 患者的病房空气以及周围环境样本分离出的艰难梭菌进行分型,发现这些分离株与该患者的菌株是相关的。

(7)AFLP:细菌基因组 DNA 经过 2 种限制性内切酶(通常一种是普通频率的内切酶,另一种是高频率内切酶)消化后产生粘性末端,在特异的双链寡核苷酸接头的作用下连接形成模板 DNA,再利用高度特异的反应条件对所产生的经过修饰的片段进行 PCR 扩增,之后进行电泳分析,即形成 AFLP 图谱。这些图谱的多态性来自:①限制性酶切位点的突变;②与选择性引物结合的序列的突变;③扩增片段中发生的插入或缺失。

van den Berg 等^[24]用 AFLP 以及 2 种核糖体分型方法,对来源于加拿大、美国、波兰、英国、法国、日本、荷兰的 39 株 A⁻B⁺ 和其他菌株进行分型。在 AFLP 分型中,选择 Pst I 和 Mse I 作为酶切位点。代表 30 个血清型的参考菌株被 AFLP 分为 29 个型别;而被 2 种核糖体分型分成 25 和 26 个型别,表明 AFLP 是一种分型能力很强的技术。AFLP 将 39 个 A⁻B⁺ 的菌株分为 2 个型别,2 种核糖体方法分别分成 2 和 3 个型别。这 39 株菌中,37 株是 AFLP 的 20 型,核糖体 017/20 型。38 株菌在 *tcdA* 有 1.8 kb 的缺失,另外 1 株菌则在其上有 1.7 kb 的缺失。AFLP 是通过荧光标记的 PCR 引物得到的数据,并用 ABI PRISM 自动化 DNA 分析平台对其进行分析。

(8) MLST: MLST 是基于对多个管家基因的序列进行分析来对细菌进行分型的方法。通常选择 6~10 个管家基因进行扩增并测序,再分析这些基因中 400~600 bp 的片段,对每一个基因位点上的不同序列都指派一个不同的等位基因数值,从而生成一个用于菌株鉴定的等位基因图谱。每个等位基因图谱即为一个序列型(ST)。不管是在一个或多个核苷酸上存在差别,等位基因都被看做是有差别的。在分析 MLST 数据时,并不需要加权来反映等位基因之间核苷酸数值的差异,因为并不知道在多个核苷酸位点上的差异是由多个位点突变还是由于单个重组引入的多个改变所致。

MLST 由 Lemée 和 Pons^[25]于 1998 年首次提出并运用于脑膜炎奈瑟菌的分型,在 2010 年之前,MLST 分型应用于艰难梭菌是分析 *aroE*、*ddl*、*dutA*、*gmk*、*sodA*、*recA*、*tpi* 这 7 个管家基因,但无效位点 *ddl* 的存在和共享网络平台缺失。2010 年 David 等^[26]重新选取了广泛分布于基因组的 7 个管家基因(*adh*、*atpA*、*tpi*、*dxr*、*glyA*、*recA*、*sodA*),并首次建立了一个联网的数据库(<http://pubmlst.org/cdifficile/>)以有利于数据的传递以及实验室间 MLST 分型数据的比较。用 MLST 分型可研究艰难梭菌系统发育,Pons^[27]发现艰难梭菌具有基因的遗传稳定性、伴有突变的克隆演变以及系统发育谱系个体化的特点。艰难梭菌由点突变引起新等位基因的频率,是由重组交换引起的 8 倍^[25]。

(9) StpA-typing: StpA 分型是基于表层蛋白 A 编码基因可变区域序列多态性的基因分型方法,根据可变区域的序列设计引物进行扩增后得到大约 1 kb 的片段后用 Dra I、Hinf I、Pvu II 和 Rsa I 等限制性酶消化后,片段经测序分析其基因或经琼脂糖电泳后分析其带型,从而将不同的细菌分别开来。

用 Rsa I、Pvu II 酶切,能够将血清型 A 的菌株同其他菌株区分开来,但是用 Pvu II 则不能将血清 A 和 B、D、G 型菌株区分开来,Dra I 不能将血清 A 和 F、I 型菌株区分开来。一个特定的血清型,StpA 蛋白编码基因的可变区域是严格一致的,而在不同血清型则是不同的。StpA 分型可以通过对全球数据的比较,对艰难梭菌进行全面的了解。Joost 等^[28]收集莎尔、德国不同机构的 100 株艰难梭菌,采用 StpA 分型,发现之前在日本流行的菌株,smz。然而 S 层基因的分型对于血清亚型的区分是不够的,因为血清型 A1 和 A10 的 *slpA* 基因非

常相似。

3. 分型方法优缺点及展望:目前,在北美洲对艰难梭菌分型的“金标准”是 PFGE,在欧洲则是以核糖体分型为参比方法。这个分型方法有较好的分辨力和分型力,然而却存在着实验周期长、DNA 容易降解、实验数据不便于交流、需要参考菌株来分析结果等一系列的限制因素。核糖体分型分辨力和分型能力都很好,但是其操作较难,且由于存在电泳的步骤,也很难将实验方法标准化,实验室之间数据也不方便比较,同 PFGE 一样,也需要参考菌株。MLST 具有很高的可重复性,操作容易,实验周期较短,分型结果便于比较,然而这个方法的分型能力较其他方法差,对于 7 个或更多位点的测序使得试验费用较高。RAPD 具有很好的分型力、操作简单,但是其分辨力和可重复性一般。MLVA 是迄今为止分辨能力最强的分子分型方法,且具有重复性,已经成功用于很多细菌和真菌的分型研究,它也是对于新发的艰难梭菌变异株进行亚型分析的一个新的工具。REA 分析具有高分辨率,但是到现在为止还不能进行自动化的分析。因此,不同实验室之间的数据共享仍然存在很大的障碍。

近期,新建立的基于毛细管电泳的核糖体分型,由于有网络数据库的支持,使得不同实验室之间数据交流更为顺畅。而且,随着生物信息学的发展,将会开发出带有参考菌株分型数据的软件以及可供资源共享的平台,从而使得核糖体分型和 PFGE 分型的数据在实验室之间具有可比性。相信随着一些数据容易互换的分型方法,如 MLVA、基于序列分析的 PCR 核糖体分型,或基于位点测序分型方法的发展,将可以改善现在数据“不兼容”的局面。另外,在很多情况下,单用某一种分型方法不能达到很好的研究目的,一般将多种分型方法同时应用,以期获得更为全面的信息。例如 MLVA 和 MLST 的结合,可以为艰难梭菌的种群结构提供详尽的信息。在对艰难梭菌感染引起的暴发溯源时,首先推荐将核糖体分型和 PFGE 这两种分型方法结合使用,其次选用 MLVA;若是研究艰难梭菌的种群进化,则首选 MLST。

参 考 文 献

- [1] Sue JK, Heejung K, Younghee S, et al. Molecular characterization of toxin A-negative, toxin B-positive variant strains of *Clostridium difficile* isolated in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2010, 67(2):198-201.
- [2] Bruno H, Vivian GL, Anne MB, et al. A portrait of the geographic dissemination of the *Clostridium difficile* North American pulsed-field type 1 strain and the epidemiology of *C. difficile*-associated disease in Quebec. *Clin Infect Dis*, 2007, 44(2):238-244.
- [3] Dubberke ER, Reske KA, Noble-Wang J, et al. Prevalence of *Clostridium difficile* environmental contamination and strain variability in multiple health care facilities. *Am J Infect Control*, 2007, 35(5):315-318.
- [4] Songer JG, Hien TT, George EK, et al. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA. *Emerg Infect Dis*, 2009, 15(5): 819-821.

- [5] Limbago BM, Long CM, Thompson AD, et al. *Clostridium difficile* strains from community—associated infections. J Clin Microbiol, 2009, 47(9):3004–3007.
- [6] Mulvey MR, Boyd DA, Gravel D, et al. Hypervirulent *Clostridium difficile* strains in hospitalized patients, Canada. Emerg Infect Dis, 2010, 16(4):678–681.
- [7] Jana A, Sandra J, Mateja P. Diversity of *Clostridium difficile* in pigs and other animals in Slovenia. Anaerobe, 2009, 15: 252–255.
- [8] Citron DM, Babakhani F, Goldstein EJ. Typing and susceptibility of bacterial isolates from the fidaxomicin (OPT-80) phase II study for *C. difficile* infection. Anaerobe, 2009, 15(6):234–236.
- [9] Adam KC, Susan PS, David MD, et al. Distribution of *Clostridium difficile* strains from a North American, European and Australian trial of treatment for *C. difficile* infections: 2005–2007. Anaerobe, 2009, 15: 230–233.
- [10] Belmares J, Johnson S, Parada JP, et al. Molecular epidemiology of *Clostridium difficile* over the course of 10 years in a Tertiary Care Hospital. Clin Infect Dis, 2009, 49(8):1141–1147.
- [11] Venugopal AA, Gerding DN, Johnson S, et al. *Clostridium difficile* infection rates and spectrum of disease among peripartum women at one hospital from 2003 to 2007 with molecular typing analysis of recovered *Clostridium difficile* isolates. Am J Infect Control, 2011, 39(3):206–211.
- [12] Kazakova SV, Kim W, Brittany B, et al. A hospital outbreak of diarrhea due to an emerging epidemic strain of *Clostridium difficile*. Arch Intern Med, 2006, 166(22):2518–2524.
- [13] Rupnik M, Kato N, Grabnar M, et al. New types of toxin A-negative, toxin B-positive strains among *Clostridium difficile* isolates from Asia. Clin Microbiol, 2003, 41(3):1118–1125.
- [14] Kuijper EJ, van den Berg RJ, Brazier JS, et al. Comparison of molecular typing methods applied to *Clostridium difficile*. Methods Mol Biol, 2009, 551:159–171.
- [15] Kevin K, Brazier JS, Post KW, et al. Prevalence of PCR ribotypes among *Clostridium difficile* isolates from pigs, calves, and other species. J Clin Microbiol, 2007, 45(6):1963–1964.
- [16] Dumford DM, Nerandzic MM, Eckstein BC, et al. What is on that keyboard? Detecting hidden environmental reservoirs of *Clostridium difficile* during an outbreak associated with North American pulsed-field gel electrophoresis type 1 strains. Am J Infect Control, 2009, 37(1):15–19.
- [17] Sawabe E, Kato H, Osawa K, et al. Molecular analysis of *Clostridium difficile* at a university teaching hospital in Japan: a shift in the predominant type over a five-year period. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2007, 26(10):695–703.
- [18] Spigaglia P, Cardines R, Menozzi MG, et al. Molecular typing and long-term comparison of *Clostridium difficile* strains by pulsed-field gel electrophoresis and PCR-ribotyping. J Med Microbiol, 2001, 50:407–414.
- [19] Lemann F, Chambon C, Barbut F, et al. Arbitrary primed PCR rules out *Clostridium difficile* cross-infection among patients in a haematology unit. J Hosp Infect, 1997, 35(2):107–115.
- [20] van den Berg RJ, Schaap I, Templeton KE, et al. Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. J Clin Microbiol, 2007, 45(3):1024–1028.
- [21] Tanner HE, Hardy KJ, Hawkey PM, et al. Coexistence of multiple multilocus variable-number tandem-repeat analysis subtypes of *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 strains within fecal specimens. J Clin Microbiol, 2010, 48(3):985–987.
- [22] Abraham G, Bakker D, Corver J, et al. Emergence of *Clostridium difficile* infection due to a new hypervirulent strain, polymerase chain reaction ribotype 078. Clin Infect Dis, 2008, 47: 1162–1170.
- [23] Best EL, Fawley WN, Parnell P, et al. The potential for airborne dispersal of *Clostridium difficile* from symptomatic patients. Clin Infect Dis, 2010, 50(11):1450–1457.
- [24] van den Berg RJ, Claas ECJ, Ouyb 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 Clin Microbiol, 2004, 42(3):1035–1041.
- [25] Lemée L, Pons JL. Multilocus sequence typing for *Clostridium difficile*. Methods Mol Biol, 2010, 646:77–90.
- [26] David G, Warren F, Melina K, et al. Multilocus sequence typing of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol, 2010, 48(3):770–778.
- [27] Pons JL. *Clostridium difficile*, nosocomial enteropathogen: phylogeny and virulence. Ann Pharm Fr, 2004, 62(5):304–309.
- [28] Joost I, Speck K, Herrmann M. Characterisation of *Clostridium difficile* isolates by *slpA* and *tedC* gene sequencing. Int J Antimicrob Agents, 2009, 33 Suppl 1:S13–18.

(收稿日期:2011-05-09)

(本文编辑:尹廉)