

· 论 著 ·

高毒力艰难梭菌的基因型和毒力相关基因检测*

肖克林¹, 金 萍², 黄丽清³, 梁 霞⁴, 周天祥³, 王中兴³, 王秦宁⁵, 孔繁荣⁵

(深圳市宝安区妇幼保健院: 1. 中心实验室; 2. 儿科 ICU; 3. 检验科; 4. 药剂科, 广东深圳 518133; 5. 悉尼大学韦德特米德医院感染性疾病和微生物中心, 澳大利亚悉尼 2145)

摘要:目的 鉴定莫西沙星耐药的艰难梭菌临床菌株的基因型和毒素相关基因的携带情况。方法 22 株莫西沙星耐药的艰难梭菌临床菌株收集自澳大利亚悉尼地区, 利用基于荧光毛细管电泳的聚合酶链反应(PCR)-核糖体分型技术对其进行基因分型; 利用 PCR 方法检测其毒素 A、B 编码基因 *tcdA*、*tcdB* 和二元毒素编码基因 *cdtA*、*cdtB*; 利用 PCR-基因测序方法检测毒素调节基因 *tcdC* 的基因序列, 通过与参考菌株 VPI 10463 (Genbank 收录号: X92982) 比对了解其基因突变情况, 通过与 Genbank 中的序列比对确定其序列型。结果 21 株菌株为高毒力核糖体型 027(RT027), 另 1 株为 RT078; 22 株菌株毒力编码基因均为 *tcdA*+*tcdB*+*cdtA*+*cdtB*+; 21 株 RT027 *tcdC* 序列型为 sc1, 另 1 株 RT078 序列型为 WA39, 与参考株 VPI 10463 比较, RT027 菌株 *tcdC* 序列均出现连续 18 个核苷酸(nt330-347)的缺失和第 117 位单核苷酸的缺失, RT078 菌株则出现连续 39 个核苷酸(nt341-379)的缺失和第 184 位(C>T)的突变。结论 高毒力 RT027 是最常见的莫西沙星耐药的艰难梭菌基因型; 高毒力 RT027 和 RT078 均携带毒素 A、B 和二元毒素编码基因, 且毒素调节基因 *tcdC* 均存在基因突变。

关键词:艰难梭菌; 基于荧光毛细管电泳的 PCR-核糖体分型; 毒素 A、B; 二元毒素; 毒素调节基因

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.08.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)08-1021-05

Detection of genotype and toxin associated gene of hypervirulent *Clostridium difficile* clinical isolates*

Xiao Kelin¹, Jin Ping², Huang Liqing³, Liang Xia⁴, Zhou Tianxiang³,

Wang Zhongxing³, Wang Qinning⁵, Kong Fanrong⁵

(1. Central lab; 2. PICU; 3. Clinical Lab; 4. Pharmacy department, Shenzhen Bao'an Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133 China; 5. Centre for Infectious Diseases and Microbiology, Westmead Hospital, the University of Sydney, Sydney, NSW, 2145 Australia)

Abstract: **Objective** To investigate the genotype and variance of toxin associated genes of moxifloxacin-resistant *Clostridium difficile* clinical isolates in Sydney. **Methods** Twenty-two moxifloxacin-resistant *Clostridium difficile* clinical isolates were collected from Sydney, which were genotyped by using sequencer capillary gel electrophoresis based PCR-ribotyping, and toxin A and B coding gene *tcdA* and *tcdB*, and binary toxin coding gene *cdtA* and *cdtB* were detected by using PCR method. Toxin regulator gene *tcdC* was analyzed by using PCR-sequencing, and was aligned with reference sequence of VPI 10463 (Genbank accession number: X92982), and the *tcdC* sequence types of all 22 isolates were identified by using blast tool in NCBI. **Results** Twenty-one isolates were genotyped as hypervirulent PCR-ribotypes 027 (RT027), and one isolate as RT078; all 22 isolates contained *tcdA* and *tcdB* for toxin A and B and *cdtA* and *cdtB* for binary toxin (*tcdA*+*tcdB*+*cdtA*+*cdtB*+). The *tcdC* sequence types of the 21 RT027 isolates belong to sc1, and that of the one RT078 isolate belongs to WA39. Compared with *tcdC* reference sequence of VPI 10463, a consecutive 18 bp deletion (nt341 to 379) and one nucleotide deletion at position 117 were found in the 21 RT027 isolates, and a consecutive 39 bp deletion (nt330 to 368) and one nucleotide mutation at position 184(C>T) were found in the one RT078 isolate. **Conclusion** *Clostridium difficile* hypervirulent RT027 was the common moxifloxacin resistant genotype; *Clostridium difficile* hypervirulent RT027 and RT078 clinical isolates contained genes for toxin A and B and binary toxin, and contained gene sequence mutation in toxin regulator gene *tcdC*.

Key words: *Clostridium difficile*; sequencer capillary gel electrophoresis based PCR-ribotyping; toxin A and B; binary toxin; toxin regulator gene

艰难梭菌相关性腹泻(CDAD)是一种常见的抗菌药物相关性腹泻(AAD)^[1]。21 世纪初, CDAD 在北美和欧洲出现了暴发流行, 患者死亡率高, 后研究证实为艰难梭菌高毒力核糖体型 027(RT027)导致^[2-3]。与其他的基因型比较, RT027 更容易导致患者出现严重的症状^[4], 是目前临床监测的重点。

高毒力 RT027 艰难梭菌对喹诺酮类抗菌药物有耐药性。因此, 在临床监测中, 可将艰难梭菌对喹诺酮类抗菌药物(莫西

沙星等)的敏感性作为高毒力株的初筛试验^[5]。然而, 其他一些基因型, 如 RT001、RT017、RT078 等, 也可出现喹诺酮类抗菌药物耐药情况。因此, 对于莫西沙星耐药的菌株, 需进行基因分型以鉴定是否为高毒力 RT027。

在本研究中, 笔者对 22 例澳大利亚悉尼地区分离到的莫西沙星耐药的艰难梭菌临床菌株进行基因分型, 并对其毒力相关基因进行检测, 以鉴定这些菌株的基因型和毒力基因携带

* 基金项目: 深圳市宝安区科技计划项目(2013071, 2014083)。 作者简介: 肖克林, 男, 副主任技师, 主要从事临床分子诊断和相关研究。

情况。

1 材料与方法

1.1 材料 22 株莫西沙星耐药[最小抑菌浓度(MIC)大于 32 mg/L]的艰难梭菌临床菌株收集自澳大利亚悉尼地区,均从临床送检的粪便标本中培养所得。粪便标本采集时间从 2009 年 3 月到 2010 年 11 月,22 例患者中 7 例为结肠炎病例,1 例为毒巨结肠病例。艰难梭菌鉴定采用 RapIDTM ANA II System 厌氧菌鉴定板条。

1.2 仪器与试剂 Eppendorf 5331 梯度聚合酶链反应(PCR)仪(德国 Eppendorf 公司),Microfuge 22R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司),MH-2800D 多功能恒温箱(天津奥特赛斯公司),DYY-6C 水平电泳槽(北京六一仪器厂),ABI 3730xl 测序仪(美国 Applied Biosystems 公司),RapIDTM ANA II System(美国 Remel 公司),BigDye Terminator (version 3.1) cycle sequencing 试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 提取 将菌株接种于哥伦比亚血平板上厌氧培养 48~72 h,然后挑 1~5 个菌落溶于 200 μL 去离子水,100 ℃煮沸 10 min。将悬浮液以 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液用于 PCR。

1.3.2 基于荧光毛细管电泳的 PCR-核糖体分型 参照文献[6]报道的方法:PCR 反应体积为 50 μL,包含 10×PCR 缓冲液(Roche) 5.0 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 8.0 μL、脱氧核苷三磷酸(dNTP, 25 mmol/L) 0.8 μL、16S-FAM 和 23S 引物(50 μmol/L) 各 0.25 μL、AmpliTaq GoldTM polymerase (5 U/μL) (Roche) 0.75 μL、DNA 模板 10 μL,最后加分子生物学级水(Eppendorf) 24.95 μL。PCR 程序:95 ℃ 15 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。基于测序仪的荧光毛细管电泳在 ABI 3730xl 测序仪上运行,电泳条件:50 cm 长毛细管灌注 pop7 胶,1.6 kV 加样 15 s,15 kV 运行 6 200 s 电泳,采用 LIZ 1200 ladder(Chimex)作为分子量内标。

1.3.3 毒素编码基因检测 毒素 A、B 编码基因 *tcdA*、*tcdB*,二元毒素编码基因 *cdtA*、*cdtB* 均利用 PCR 方法进行检测。*tcdA* 选用 Lemee 等^[7]报道的引物,*tcdB* 选用 Kato 等^[8]报道的引物,*cdtA* 和 *cdtB* 选用 Mutlu 等^[9]报道的引物,见表 1。PCR 引物由 Sigma-Aldrich 公司合成。PCR 反应体积为 25 μL,包含 10×PCR 缓冲液(Qiagen) 2.5 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 1.0 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 1.0 μL、上(下)游引物(50 μmol/L) 各 0.25 μL、HotStar Taq DNA 聚合酶 (5 U/μL) (Qiagen) 0.1 μL、DNA 模板 2 μL,最后加分子生物学级水(Eppendorf) 17.9 μL。PCR 程序:95 ℃ 15 min;95 ℃ 1 min,58 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。电泳条件如下:2%琼脂糖凝胶,5 μL PCR 产物 100 V 电泳 30 min,分子量标识选用 100~1 500 bp DNA ladder (Invitrogen)。

1.3.4 毒素调节基因检测 毒素调节基因 *tcdC* 全长序列利用 PCR 结合基因测序的方法进行检测^[10]。PCR 引物见表 1,由 Sigma-Aldrich 公司合成。PCR 程序如下:95 ℃ 15 min;95 ℃ 1 min,47 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。5 μL PCR 产物加入 2%琼脂糖凝胶电泳 30 min 检测。*tcdC* PCR 产物利用 ExoSAP-IT (美国 Affymetrix 公司)纯化然后测序。测序试剂为 BigDye Terminator (version 3.1) cycle sequencing 试剂盒,测序仪为 ABI 3730xl 测序仪。所得序列用 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对获得相应 *tcdC* 序列型。

1.3.5 毒力调节基因 *tcdC* 序列分析 22 株艰难梭菌临床菌株和毒力型参考株 VPI10463 *tcdC* 序列(Genbank 收录号: X92982)的序列比对运用 Bioedit7.0 软件。

2 结 果

2.1 基因分型结果 基因分型采用基于荧光毛细管电泳的 PCR-核糖体分型方法,荧光毛细管电泳示意图见图 1。22 株莫西沙星耐药的艰难梭菌中,21 株为高毒力 RT027,另一株则为 RT078,见表 2。

表 1 艰难梭菌毒力相关基因 <i>tcdA</i> 、 <i>tcdB</i> 、 <i>cdtA</i> 、 <i>cdtB</i> 和调节基因 <i>tcdC</i> 的 PCR 引物						
靶基因	引物	GenBank 收录号	引物序列(5'-3')	Tm (℃)	产物长度 (bp)	
<i>tcdA</i>	tcdA-F	X92982	19953-CGT TAT CAA AAT AGA TTC CTA TAT TTA CAT GAC AAT AT-19990	65.5	380	
	tcdA-R		20352-CCA TAG CA G TAT CAG GCA TAA AGT AAT AIA CTT T-20319	65.3		
<i>tcdB</i>	NK104	X53138	3343-GTG TAG CAA TGA AAG TCC AAG TTT ACG C-3370	68.7	204	
	NK105		3546-CAC TTA GCT CTT TGA TTG CTG CAC CT-3521	69.1		
<i>cdtA</i>	CDTA-F	AF271719	576-T GAA CCT GGA AAA GGT GAT-G595	62.5	376	
	cdtA-R		951-A GGA TTA TTT ACT GGA CCA TTT-G929	59.6		
<i>cdtB</i>	CDTB-F	L76081	1917-CTT AAT GCA AGT AAA TAC TGA G-1938	52.7	510	
	cdtB-R		2426-AAC GGA TCT CTT GCT TCA GTC-2406	62.3		
<i>tcdC</i>	tcdCpr-R	X92982	20703-TTG CAA TTA TAA AAA CAT CTT-20723	53.3	1097	
	tcdCpr-F		21799-TAT CAA TTT ATT TAT GCT CTT TC-21777	53.7		

2.2 毒素编码基因携带情况 22 株菌株毒素 A、B 编码基因 *tcdA*、*tcdB*,二元毒素编码基因 *cdtA*、*cdtB* 均显示为阳性,见表 2。电泳结果示例图见图 2a。

2.3 毒力调节基因 *tcdC* 检测情况 电泳结果示例图见图 2b。22 株菌株毒力调节基因 *tcdC* 序列与 Genbank 中序列比对,结果显示 21 株 RT027 *tcdC* 序列型均为 sc1,另 1 株 RT078

序列型为 WA39 (HQ596349),见表 2。与参考株 VPI 10463 (Genbank 收录号:X92982)比较,21 株 RT027 菌株 *tcdC* 序列均出现连续 18 个核苷酸(nt330-347)的缺失和第 117 位单核苷酸的缺失,另外 1 株 RT078 菌株 *tcdC* 序列出现连续 39 个核苷酸(nt341-379)的缺失和第 184 位(A>T)的突变,见图 3。

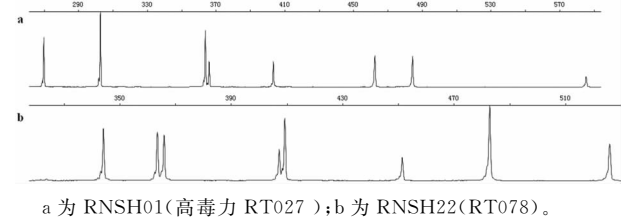


图 1 艰难梭菌基于荧光毛细管电泳的 PCR-核糖体分型的毛细管电泳示意图

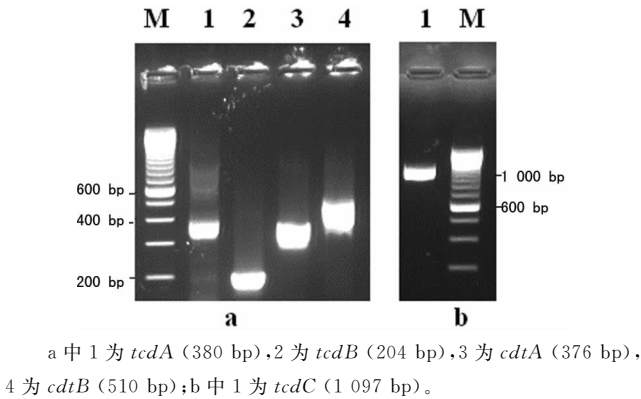


图 2 艰难梭菌毒力相关基因 PCR 检测电泳示意图

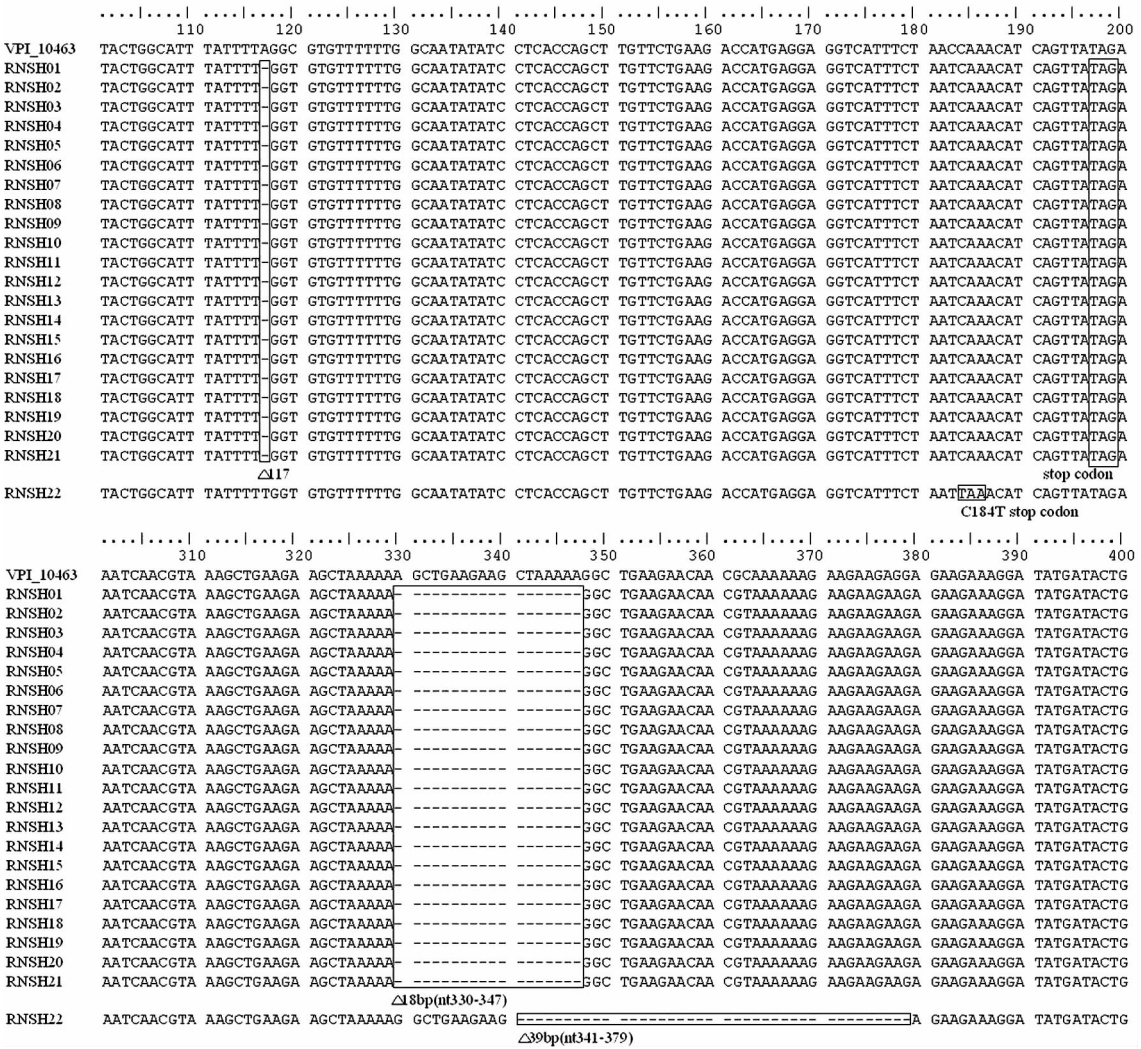


图 3 22 株莫西沙星耐药的艰难梭菌 *tcdC* 序列与参考菌株 VPI10463 (X92982)的比较示意图

表 2 22 株莫西沙星耐药的艰难梭菌基因型和毒力相关基因检测结果

菌株号	基于荧光毛细管电泳的 PCR-核糖体分型的数字化图谱	PCR-核糖体型	毒素 A、B 编码基因		二元毒素编码基因		毒力调节基因	毒力调节基因
			<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>tcdC</i> 序列变化	<i>tcdC</i> 序列型
RNSH01	265, 7-298, 5-359, 4-361, 6-398, 8-458, 1-480, 0-580, 8	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH02	265, 7-298, 5-359, 4-361, 7-398, 9-458, 1-480, 0-580, 8	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1

续表 222 株莫西沙星耐药的艰难梭菌基因型和毒力相关基因检测结果

菌株号	基于荧光毛细管电泳的 PCR-核糖体分型的数字化图谱	PCR-核糖体型	毒素 A、B 编码基因		二元毒素编码基因		毒力调节基因	毒力调节基因
			<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>tcdA</i>	<i>tcdB</i>	<i>tcdC</i> 序列变化	<i>tcdC</i> 序列型
RNSH03	265, 6-298, 5-359, 5-361, 7-398, 8-458, 1-480, 0-580, 7	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH04	265, 7-298, 5-359, 4-361, 6-398, 8-458, 0-480, 0-580, 7	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH05	265, 6-298, 5-359, 4-361, 6-398, 7-458, 0-480, 0-580, 6	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH06	265, 6-298, 4-359, 3-361, 6-398, 8-458, 0-479, 9-580, 7	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH07	265, 6-298, 4-359, 3-361, 6-398, 6-458, 0-479, 8-580, 5	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH08	265, 7-298, 5-359, 6-361, 8-399, 0-458, 2-480, 1-580, 9	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH09	265, 8-298, 6-359, 6-361, 8-399, 0-458, 2-480, 1-581, 0	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH10	265, 7-298, 5-359, 6-361, 8-399, 0-458, 3-480, 1-581, 0	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH11	265, 8-298, 5-359, 6-361, 8-399, 0-458, 2-480, 1-581, 0	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH12	265, 7-298, 5-359, 6-361, 8-399, 0-458, 3-480, 1-581, 1	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH13	265, 8-298, 6-359, 6-361, 8-399, 1-458, 2-480, 1-580, 9	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH14	265, 7-298, 5-359, 5-361, 7-399, 0-458, 2-480, 1-580, 9	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH15	265, 7-298, 5-359, 5-361, 8-398, 9-458, 2-480, 0-580, 8	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH16	265, 8-298, 5-359, 6-361, 8-399, 0-458, 3-480, 0-581, 1	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH17	265, 7-398, 5-359, 4-365, 6-398, 7-458, 1-480, 0-580, 7	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH18	265, 7-298, 5-359, 7-361, 9-399, 1-458, 2-480, 2-581, 1	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH19	265, 8-298, 5-359, 6-361, 8-399, 1-458, 3-480, 1-581, 0	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH20	265, 8-298, 6-359, 8-362, 0-399, 3-458, 4-480, 3-581, 4	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH21	265, 7-298, 5-359, 5-361, 7-398, 9-458, 2-480, 1-581, 0	027	+	+	+	+	△18 bp, △117	sc1
RNSH22	340, 2-359, 4-361, 9-403, 1-405, 2-447, 3-478, 7-521, 8	078	+	+	+	+	△39 bp, C184T	WA39

3 讨 论

基于荧光毛细管电泳的 PCR-核糖体分型方法是近年用于艰难梭菌基因分型的一种新方法,该方法利用基于测序仪的荧光毛细管电泳代替传统的琼脂糖电泳,分型更加精准客观,相较于传统的 PCR-核糖体分型,这一方法具有非常高的分辨性,以往的研究显示其可以准确地区分出艰难梭菌高毒力 RT027 和其他核糖体型^[6]。本研究中,笔者利用这一方法对 22 株莫西沙星耐药的艰难梭菌进行基因分型,发现其中 21 株为高毒力 RT027 菌株,另一株为 RT078。

对喹诺酮类抗菌药物耐药是艰难梭菌高毒力 RT027 流行株的一大特征,正是由于对喹诺酮类等药物的高耐药性导致其在全球多地暴发流行^[11-12]。2003 年,艰难梭菌高毒力 RT027 在加拿大魁北克地区出现暴发性感染^[2],之后在美国、欧洲和中非等地区流行^[13-14],近年来韩国^[15]和智利^[16]也相继检测该类耐药菌。2008 年,澳大利亚第 1 例 RT027 感染患者在西澳大利亚帕斯出现^[17],2010 年在墨尔本出现另一例病例^[18],同年在维多利亚出现小规模暴发病例。本文报道的 21 例高毒力 RT027 病例则来自悉尼地区。这些数据表明,高毒力 RT027 在澳大利亚已开始逐渐流行,虽然还不是主要的流行菌株。RT078 是近年新发现的又一种新的高毒力型艰难梭菌,其早先被发现是小牛和猪中最常见的基因型。与 RT027 比较,RT078 感染者的年龄相对较轻,并且有不少的患者为社区获得性感染,而其所导致的重症腹泻和致死率与 RT027 则相差无几,与其他的非 RT027 菌株感染者比较,更多的 RT078 患者曾使用过喹诺酮类药物治^[19]。

毒素 A 和 B 是产毒型艰难梭菌最主要的致病因子。毒素 A 为一种肠毒素,由 *tcdA* 基因编码;毒素 B 为一种很强的细胞毒素,由 *tcdB* 基因编码^[20]。至今,只发现有 2 种毒素 A、B 表达方式,大部分产毒型艰难梭菌均同时产毒素 A 和 B(*tcdA*+*tcdB*+),小部分由于 *tcdA* 基因缺失只产毒素 B 而不产毒素 A (*tcdA*-*tcdB*+)。二元毒素是毒素 A、B 外的另一类毒素,为一

类肌动蛋白特异的腺苷二磷酸(ADP)-核糖基转移酶,其编码基因由负责编码具有酶活性毒素的 *cdtA* 和编码受体结合的 *cdtB* 两部分组成^[21]。在许多产毒株中,二元毒素均不表达^[22],而在高毒力 RT027 和 RT078 艰难梭菌菌株中,通常都表达二元毒素^[19]。本研究对毒素编码基因的检测结果显示,21 株高毒力 RT027 和 1 株 RT078 均携带毒素 A、B 和二元毒素编码基因(*cdtA*+*cdtB*+*tcdA*+*tcdB*+),和以前的报道一致^[14,19]。

tcdC 为毒素表达的负向调节因子,对毒素 A、B 的生成有很大的影响,如其基因序列发生突变,负调节机制受损,毒素 A、B 的产量会急剧增高,进而使艰难梭菌致病性增强。高毒力 RT027 毒力调节基因 *tcdC* 上有一段 18 个核苷酸区域的缺失,且 117 位出现一个单核苷酸的缺失,从而出现移码突变,这些改变使得 *tcdC* 的负调节作用大大减弱,从而使毒素 A 和 B 的产量增高。Warny 等^[14]发现,在体外培养中,高毒力 RT027 毒素 A、B 产量的高峰中位值分别是其他核糖体型(均为毒力型 0,*cdtA*+*cdtB*+)的 16 倍和 23 倍。另一高毒力型 RT078, *tcdC* 上则有一段 39 个核苷酸区域(从 341 位到 379 位)的缺失,且 184 位出现一个单核苷酸的突变(C184T),从而导致产生终止密码子^[19]。本文中 21 株高毒力 RT027 和 1 株 RT078 *tcdC* 基因序列的变化与之前的报道完全一致,进一步验证了 RT027 和 RT078 两种高毒力基因型的毒力负调节基因 *tcdC* 基因存在突变,导致其毒力增强。此外,通过基因序列比对,21 株高毒力 RT027 临床菌株 *tcdC* 序列型属于 sc1,另 1 株 RT078 则属于 WA39。总之,本文利用基于荧光毛细管电泳的 PCR-核糖体分型方法对 22 株莫西沙星耐药的艰难梭菌临床菌株进行基因分型,显示 21 株为高毒力 RT027,1 株为 RT078;毒力基因检测显示 22 株菌株均为 *tcdA*+*tcdB*+*cdtA*+*cdtB*+;毒力调节基因 *tcdC* 序列型分属于 sc1(高毒力 RT027 临床菌株)和 WA39(RT078 临床菌株)。

参考文献

- [1] McEllistrem MC, Carman RJ, Gerding DN, et al. A hospital outbreak of *Clostridium difficile* disease associated with isolates carrying binary toxin genes[J]. *Clin Infect Dis*, 2005, 40(2): 265-272.
- [2] Pepin J, Valiquette L, Alary ME, et al. *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity[J]. *CMAJ*, 2004, 171(5): 466-472.
- [3] Kuijper EJ, Coignard B, Tull P. Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2006, 12(Suppl 6): 2-18.
- [4] Barbut F, Mastrantonio P, Delmee M, et al. Prospective study of *Clostridium difficile* infections in Europe with phenotypic and genotypic characterisation of the isolates[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2007, 13(11): 1048-1057.
- [5] Cheng AC, Ferguson JK, Richards MJ, et al. Australasian Society for Infectious Diseases guidelines for the diagnosis and treatment of *Clostridium difficile* infection[J]. *Med J Aust*, 2011, 194(7): 353-358.
- [6] Xiao M, Kong F, Jin P, et al. Comparison of two capillary gel electrophoresis systems for *Clostridium difficile* ribotyping, using a panel of ribotype 027 isolates and whole-genome sequences as a reference standard[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(8): 2755-2760.
- [7] Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, et al. Multiplex PCR targeting *tpi*(triose phosphate isomerase), *tcdA*(Toxin A), and *tcdB*(Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(12): 5710-5714.
- [8] Kato H, Kato N, Watanabe K, et al. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(8): 2178-2182.
- [9] Mutlu E, Wroe AJ, Sanchez-Hurtado K, et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility patterns of *Clostridium difficile* strains isolated from hospitals in south-east Scotland[J]. *J Med Microbiol*, 2007, 56(Pt 7): 921-929.
- [10] Curry SR, Marsh JW, Muto CA, et al. *tcdC* genotypes associated with severe *TcdC* truncation in an epidemic clone and other strains of *Clostridium difficile*[J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(1): 215-221.
- [11] He M, Miyajima F, Roberts P, et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(1): 109-113.
- [12] Rasko DA. *Clostridium difficile* healthcare-associated epidemics[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(1): 6-7.
- [13] Clements AC, Magalhaes RJ, Tatem AJ, et al. *Clostridium difficile* PCR ribotype 027: assessing the risks of further worldwide spread[J]. *Lancet Infect Dis*, 2010, 10(6): 395-404.
- [14] Warny M, Pepin J, Fang A, et al. Toxin production by an emerging strain of *Clostridium difficile* associated with outbreaks of severe disease in North America and Europe[J]. *Lancet*, 2005, 366(9491): 1079-1084.
- [15] Kim H, Lee Y, Moon HW, et al. Emergence of *Clostridium difficile* ribotype 027 in Korea[J]. *Korean J Lab Med*, 2011, 31(3): 191-196.
- [16] Hernandez-Rocha C, Barra-Carrasco J, Pizarro-Guajardo M, et al. Epidemic *Clostridium difficile* ribotype 027 in Chile[J]. *Emerg Infect Dis*, 2012, 18(8): 1370-1372.
- [17] Riley TV, Thean S, Hool G, et al. First Australian isolation of epidemic *Clostridium difficile* PCR ribotype 027[J]. *Med J Aust*, 2009, 190(12): 706-708.
- [18] Richards M, Knox J, Elliott B, et al. Severe infection with *Clostridium difficile* PCR ribotype 027 acquired in Melbourne, Australia[J]. *Med J Aust*, 2011, 194(7): 369-371.
- [19] 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.
- [20] Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(2): 247-263.
- [21] Stubbs S, Rupnik M, Gibert M, et al. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 186(2): 307-312.
- [22] Liao CH, Ko WC, Lu JJ, et al. Characterizations of clinical isolates of *clostridium difficile* by toxin genotypes and by susceptibility to 12 antimicrobial agents, including fidaxomicin (OPT-80) and rifaximin: a multicenter study in Taiwan[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(7): 3943-3949.
- (收稿日期: 2015-02-01)
- (上接第 1020 页)
- of human papillomavirus infection among female sex workers in Bulgaria[J]. *Int J STD AIDS*, 2011, 22(5): 278-280.
- [6] Smith JS, Van Damme K, Randrianjafisamindrakotroka N, et al. Human papillomavirus and cervical neoplasia among female sex workers in Madagascar[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2010, 20(9): 1593-1596.
- [7] Matsushita K, Sasagawa T, Miyashita M, et al. Oral and cervical human papillomavirus infection among female sex workers in Japan[J]. *Jpn J Infect Dis*, 2011, 64(1): 34-39.
- [8] Montano SM, Hsieh EJ, Calderón M, et al. Human papillomavirus infection in female sex workers in Lima, Peru[J]. *Sex Transm Infect*, 2011, 87(1): 81-82.
- [9] 付凤环, 王建炳, 姜勇, 等. 北京社区妇女宫颈癌认知情况调查[J]. *中国肿瘤*, 2010, 19(10): 643-646.
- [10] 马小静, 孟祥菊, 董洁云, 等. 成年女性 HPV 认知及影响因素研究[J]. *现代妇产科进展*, 2013, 22(6): 491-493.
- [11] Ersan G, Kose S, Gunes H, et al. Knowledge and awareness of female sex workers towards human papillomavirus infection in Turkey[J]. *Cent Eur J Public Health*, 2012, 20(3): 219-222.
- [12] 邵淑娟, 岳天孚, 张丽琴. 女性 HPV 感染情况及对 HPV 和 HPV 疫苗的认知[J]. *天津医科大学学报*, 2013, 19(2): 127-130.
- [13] 尤志学. HPV16、18 高危亚型的风险分层管理作用更加有效的宫颈癌筛查举措[J]. *国际检验医学杂志*, 2014, 35(3): 257-260.
- (收稿日期: 2014-12-15)