

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.03.001

广州腹泻与健康非腹泻人群产气荚膜梭菌检出率及 MLST 分型^{*}

姚淑雯¹, 邹 洁², 钟华敏¹, 杨 敏³, 龙 燕¹, 梁秉绍^{1△}

1. 广州医科大学附属妇女儿童医疗中心检验科, 广东广州 510623; 2. 广州医科大学金城检验学院, 广东广州 510000; 3. 广州医科大学附属妇女儿童医疗中心消化科, 广东广州 510623

摘 要:目的 比较广州地区腹泻和健康非腹泻人群粪便中产气荚膜梭菌的检出率和序列分型的差异。方法 此项前瞻性研究共收集了广州医科大学附属妇女儿童医疗中心 2021 年 10—12 月诊断为腹泻和健康非腹泻人群的粪便标本和腹泻患者大便肛管保存液标本 296 例, 按照标本类型与人群的不同, 分为腹泻儿童粪便组(104 例)、腹泻儿童肛管组(68 例)、非腹泻儿童粪便组(30 例)和非腹泻成人粪便组(94 例)。采用庖肉培养基增菌并转血平板厌氧培养, 分离并鉴定产气荚膜梭菌。从各组中随机选取部分产气荚膜梭菌进行多位点序列分型(MLST)。结果 腹泻儿童粪便组产气荚膜梭菌检出率为 36.5%(38/104); 腹泻儿童肛管组产气荚膜梭菌检出率为 16.2%(11/68); 非腹泻儿童粪便组产气荚膜梭菌检出率为 46.7%(14/30); 非腹泻成人粪便组产气荚膜梭菌检出率为 53.2%(50/94)。非腹泻人群(包括成人和儿童)产气荚膜梭菌检出率[51.6%(64/124)]比腹泻人群高[23.8%(41/172)], 差异有统计学意义($P=0.02$)。34 株产气荚膜梭菌共分为 31 种序列(ST)型, 以 ST210 最多, 占 8.82%, 共发现 18 种新 ST 型, 占 52.92%。结论 广州地区产气荚膜梭菌在腹泻和非腹泻人群粪便的检出率较高, 且检测出不溶血型菌株。MLST 分型为产气荚膜梭菌病原学溯源提供可靠依据。

关键词:产气荚膜梭菌; 腹泻; 食物中毒; 检出率; 多位点序列分型; 全基因组测序

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)03-0289-05

Detection and multi-locus sequence typing of *Clostridium perfringens* isolated from feces from population with or without diarrhea in Guangzhou^{*}

YAO Shuwen¹, ZOU Jie², ZHONG Huamin¹, YANG Min³, LONG Yan¹, LIANG Bingshao^{1△}

1. Department of Laboratory Medicine, Guangzhou Women and Children's Medical Center Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510623, China; 2. Kingmed School of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 3. Department of Gastroenterology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou, Guangdong 510623, China

Abstract: **Objective** To compare the differences of detection rate of *Clostridium perfringens* isolated from feces from population with or without diarrhea in Guangzhou and the composition of ST types. **Methods** This prospective study collected feces specimens from 296 subjects with diarrhea and without diarrhea diagnosed in Guangzhou Women and Children's Medical Center Affiliated to Guangzhou Medical University from October to December in 2021, which were divided into children with diarrhea feces group with 104 cases, children with diarrhea rectal swab group with 68 case, children without diarrhea feces group with 30 cases and adult without diarrhea feces group with 94 cases. *Clostridium perfringens* was isolated and characterized after anaerobic incubation by cooked meat medium for bacterial enrichment and transferred to blood plates. Some strains of *Clostridium perfringens* were randomly selected from each group and submitted for multi-locus sequence typing (MLST). **Results** The positive rate of *Clostridium perfringens* was 36.5%(38/104) in the children with diarrhea feces group, 16.2%(11/68) in children with diarrhea rectal swab group, 46.7%(14/30) in the children without diarrhea feces group and 53.2%(50/94) in the adult without diarrhea feces group. The detection rate

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82002202); 广州市卫生健康科技一般引导项目(20171A010267)。

作者简介: 姚淑雯, 女, 副主任技师, 主要从事临床检验诊断方向的研究。△ 通信作者, E-mail: liangb_8543@163.com。

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1167.R.20240111.1646.002\(2024-01-12\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1167.R.20240111.1646.002(2024-01-12))

of *Clostridium perfringens* in feces population including adults and children without diarrhea[51.6%(64/124)] was higher than that in the population with diarrhea[23.8%(41/172)], and the difference was statistically significant($P=0.02$). 34 isolates were divided into 31 ST types, the most of which was ST210, accounting for 8.82%. 18 new ST types were found, accounting for 52.92%. **Conclusion** Both detection rates of *Clostridium perfringens* in feces of people with and without diarrhea are high in Guangzhou, and nonhemolytic strains are detected. MLST typing can provide reliable basis for the etiological diagnosis and traceability of the source of a food poisoning investigation.

Key words: *Clostridium perfringens*; diarrhea; food poisoning; detection rate; multi-locus sequence typing; whole genome sequencing

产气荚膜梭菌又称魏氏梭菌,是一种革兰阳性厌氧的粗大芽孢杆菌,广泛存在于自然界中,是创伤性气性坏疽和食物中毒的主要病原菌^[1];产气荚膜梭菌食物中毒是美国、日本第二大常见的细菌性食源性疾病,在美国每年病例近 100 万人^[2-3]。近年来,我国已有关于产气荚膜梭菌食物中毒的病例报道^[4-6]。产气荚膜梭菌是人体肠道内的条件致病菌,一般情况下不致病,当抗菌药物的使用破坏了正常菌群,使它在肠道过度繁殖并产生外毒素时,会导致腹泻等症状^[1]。

产气荚膜梭菌多位点序列分型(MLST)是 2012 年由 XIAO 等^[7]建立的一种基于 8 个管家基因核酸序列的分型方法。到目前为止 PubMLST 数据库^[8]已经包括了 571 种序列型,而且数据库查询不到的分型结果可以通过上传数据到数据库得到新的序列型,这有利于不同实验室分型数据的比较。我国同时比较腹泻和健康人群粪便产气荚膜梭菌检出率和分子特征的前瞻性研究少见报道,因此本研究对腹泻和健康非腹泻人群的粪便标本进行产气荚膜梭菌的分离培养及鉴定,并进行 MLST 分型,以期对产气荚膜梭菌所致食源性疾病病原学判断和溯源提供依据。现报道如下。

1 资料和方法

1.1 一般资料 收集 2021 年 10—12 月在广州医科大学附属妇女儿童医疗中心(以下简称本中心)诊断为腹泻患者和行健康体检的健康非腹泻人群的新鲜粪便标本和腹泻患者大便肛管保存液标本 296 例,排除同一人先后多次或同时送 2 种类型样本的情况。按照标本类型与人群的不同,分为腹泻儿童粪便组(104 例)、腹泻儿童肛管组(68 例)、非腹泻儿童粪便组(30 例)和非腹泻成人粪便组(94 例)。腹泻人群的纳入标准:24 h 排便 3 次以上,且粪便性状有明显改变^[9]。健康体检人群纳入标准:粪便标本性状和检验结果均正常。所有研究对象均知情同意。本研究经本中心医学伦理委员会审批通过(审批号:[2020]第 44501 号)。

1.2 方法

1.2.1 产气荚膜梭菌的分离培养 取绿豆大小的新鲜粪便或 200 μL 大便肛管保存液于庖肉培养基中,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴箱中水热 15 min。置于二氧化碳培养箱 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24~48 h。于“汹涌发酵”的庖肉培养基中吸取 20 μL 培养液定量接种于血平板,置于厌氧袋,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h。

1.2.2 产气荚膜梭菌的鉴定 使用美国布鲁克·道尔顿 MALDI-TOF 质谱仪进行菌株鉴定。取血平板上可疑的单个菌落,均匀涂抹于 MALDI 靶板的标本孔位上,记录标本位置和编号。加入 1 μL 甲酸溶液于相应标本孔位上,自然干燥。标本干燥后加 1 μL 基质溶液,自然干燥。按质谱仪的控制面板上绿色 IN/OUT 键,待 ACCESS 绿灯亮后打开靶板舱盖子。靶板放入靶板仓,放平,轻轻盖上盖子,按绿色 IN/OUT 将靶板送入仪器内,启动 IVD MALDI Biotyper 软件进行鉴定。

1.2.3 随机抽样和菌株复苏 从腹泻儿童粪便组、腹泻儿童肛管组、非腹泻儿童粪便组和非腹泻成人粪便组随机抽取若干例阳性菌株,将甘油和 LB 培养基冻存的产气荚膜梭菌菌株室温平衡 10 min,取 10 μL 菌液接种于血平板上,放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下厌氧培养 24 h。

1.2.4 DNA 模板制备 基于前期研究中使用的煮沸裂解法制备 DNA 用于聚合酶链反应(PCR)检测,挑取 2~3 个菌落置于 200 μL 的 Tris-EDTA 缓冲液中,置 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水中煮沸 10 min,在冰上冷却 5 min 后 12 000 r/min 离心 2 min,取上清液作为模板^[10]。

1.2.5 引物设计和 PCR 扩增 根据参考文献^[7]合成 8 个管家基因的引物,引物名称和序列见表 1。使用艾科瑞生物 Accurate Taq DNA 聚合酶进行扩增。每个反应的最终体积为 50 μL ,包含 DNA 模板 1 μL ,2 $\times$ Taq PCR Star Mix 预混液 25 μL ,上下游引物各 1 μL ,RNase Free 水 22 μL 。使用 Biometra PCR 仪进行扩增,循环条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,在 52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,然后进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 min。PCR 产物送华大基因进

行双向测序。

1.2.6 MLST 分型 将序列提交到 PubMLST 数据库 (<https://pubmlst.org/organisms/clostridiumpe-rfringens>) 进行分析, 得到每个管家基因的等位点序

号, 然后依据每株细菌 8 个管家基因的等位点序号得出其 MLST 型别。新的管家基因等位点号和 ST 型都上传至数据库中, 得到新的序列型。

表 1 引物名称和序列

引物名称	碱基序列(5'—3')	产物长度(bp)
gyrB-F	ATTGTTGATAACAGTATTGATGAAGC	735
gyrB-R	ATTTCTAATTTAGTTTGTAGTTTGCC	
sigK-F	CAATACTTATTAGAATTAGTTGGTAG	
sigK-R	CTAGATACATATGATCTTGATATACC	
sod-F	CAAAAAAGTCCATTAATGTATCCAG	554
sod-R	TTATCTATTGTTATAATATTCTTCAC	
groEL-F	TACAAGATTTATTACCATTACTTGAG	685
groEL-R	CATTTCTTTTTCTGGAATATCTGC	
pgk-F	GACTTTAACGTTCCATTAAAAGATGG	681
pgk-R	CTAATCCCATGAATCCTTCAGCGATG	
nadA-F	ATTAGCACATTATTATCAAATTCCTG	689
nadA-R	TTATATGCCTTTAATCTTAAATCCTC	
colA-F	ATTAGAAAGTTTATGTACAATAGGTG	670
colA-R	AAGACATTCTATTATTTCTATCGTAAGC	
plc-F	AGGAACTCATGATTGTAAGTC	671
plc-R	GGATCATTACCCTCTGATACATCGTG	

1.2.7 不溶血型产气荚膜梭菌的全基因组测序和验证 使用艾瑞科细菌基因组提取试剂盒提取相应菌株全基因组, 送华大基因进行全基因组测序。使用 Species Finder-2.0 在线分析工具 (<https://cge.food.dtu.dk/services/SpeciesFinder/>) 对病原菌进行验证。使用在线微生物基因组注释工具 (Rapid Annotation using Subsystem Technology, RAST) 对基因组序列进行注释, 运用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 对 16S rRNA 基因进行比对分析。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 25.0 统计软件进行数据分析。计数资料以例数或率表示, 组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 概率检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组人群的临床特征分析 腹泻儿童粪便组年龄 19 d 至 10 岁, 中位年龄为 9 个月; 男 59 例 (56.7%), 女 45 例 (43.3%); 主要来自门诊内科 (50.0%) 和消化专科 (30.8%)。腹泻儿童肛管组年龄 21 d 至 13 岁, 中位年龄为 1 岁; 男 49 例 (72.1%), 女 19 例 (27.9%); 主要来自消化专科 (47.1%) 和急诊科 (23.5%)。非腹泻儿童粪便组年龄 8 个月至 8 岁, 中位年龄为 3 岁 6 个月; 男 14 例 (46.7%), 女 16

例 (53.3%); 主要来自耳鼻喉外科 (46.7%) 和口腔科 (16.7%)。非腹泻成人粪便组年龄 21~80 岁, 中位年龄为 59 岁; 男 10 例 (10.6%), 女 84 例 (89.4%)。

2.2 产气荚膜梭菌检出率 腹泻儿童粪便组的 104 份标本经肉培养基增菌并转血平板厌氧培养后, 使用质谱鉴定为产气荚膜梭菌标本有 38 份, 检出率为 36.5%; 其中血平板上没有典型双层溶血环的菌株有 9 株, 占阳性菌株的 23.7% (9/38)。腹泻儿童肛管组的 68 份标本中, 检出产气荚膜梭菌标本 11 份, 检出率为 16.2%, 其中血平板上没有典型双层溶血环的菌株有 2 株, 占阳性菌株的 18.2% (2/11)。非腹泻儿童粪便组的 30 份标本中, 检出产气荚膜梭菌阳标本 14 份, 检出率为 46.7%, 所有菌株均具有典型的双层溶血环。非腹泻成人粪便组的 94 份标本中, 检出产气荚膜梭菌标本 50 份, 检出率为 53.2%, 其中血平板上没有典型双层溶血环的菌株有 4 株, 占检出菌株的 8.0% (4/50)。以入组人群是否腹泻进行比较, 结果显示非腹泻人群 (包括非腹泻儿童粪便组和非腹泻成人粪便组) 产气荚膜梭菌的检出率为 51.6% (64/124), 高于腹泻人群 (包括腹泻儿童粪便组和腹泻儿童肛管组) 的 23.8% (41/172), 差异有统计学意义 ($P = 0.02$)。以入组人群的年龄进行比较, 结果显示

非腹泻儿童粪便组和非腹泻成人粪便组产气荚膜梭菌的检出率(46.7% vs. 53.2%)比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。以入组人群标本的采集方法进行比较,结果显示腹泻儿童肛管组产气荚膜梭菌的检出率最低(16.2%),与腹泻儿童粪便组检出率(36.5%)比较,差异有统计学意义($P=0.04$)。

2.3 产气荚膜梭菌 MLST 分型 随机抽取 4 组共 34 株产气荚膜梭菌,以产气荚膜梭菌的 DNA 为模板,使用 PCR 方法得到扩增产物,共检测 8 个管家基因,包括毒素基因(plc,colA)、应激反应基因(groEL,sod)、代谢基因(pgk,nadA)、DNA 复制基因(gyrB)和 sigma 因子(sigK)基因。对 PCR 产物进行测序和拼接后通过 PubMLST 数据库进行分型。34 株产气荚膜梭菌共分为 31 种序列(ST)型,以 ST210 最多,分别为腹泻儿童肛管组 2 株和非腹泻儿童粪便组 1 株,占有菌株的 8.82%(3/34)。ST400 有 2 株,腹泻儿童粪便组和非腹泻成人粪便组各分布 1 株,其余已知序列型包括 ST82,ST170,ST1184,ST214,ST324,ST344,ST387,ST397,ST430,ST472,ST515。由于数据库开放使用的时间不长,数据库的等位基因不多,因此本研究的部分菌株并不能直接在数据库找到相同的序列,新的等位基因位点序列和新 ST 型已经上传至 PubMLST 网站,共发现 18 种新 ST 型菌株,占 52.92%(18/34),分别为 ST546~ST560 和 ST574~ST576,4 组均有新 ST 的菌株。

2.4 不溶血型产气荚膜梭菌的全基因组测序和验证 随机选取不溶血型产气荚膜梭菌 1 株,使用 Species Finder-2.0 在线分析工具对基因组序列进行分析,结果显示该不溶血菌株确实为产气荚膜梭菌,匹配的菌株为 ABDX01000038。对基因组进行注释后,使用其 16S rRNA 基因进行 BLAST 比对分析,结果亦显示与公布的产气荚膜梭菌基因组 FORC_003(CP009557.1)的同源性达 100.00%。

3 讨论

产气荚膜梭菌是气性坏疽、食物中毒和抗生素相关腹泻的主要病原菌,同时是人体肠道内的正常菌群。据李红新等^[11]研究报道,北京顺义区的健康人群粪便中产气荚膜梭菌的检出率为 64.37%。本次前瞻性研究发现广州地区非腹泻人群(包括了儿童和成人)粪便中产气荚膜梭菌检出率为 51.6%,且非腹泻儿童粪便组和非腹泻成人粪便组产气荚膜梭菌的检出率(46.7% vs. 53.2%)比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。表明健康人粪便中普遍携带产气荚膜梭菌,且年龄对其检出率的影响比较有限。

本研究中,腹泻儿童粪便组产气荚膜梭菌检出率为 36.5%,明显高于腹泻儿童肛管组的检出率(16.

2%),差异有统计学意义($P=0.04$),说明粪便采集方法对产气荚膜梭菌检出率有较大影响,使用肛管采样后置于营养肉汤中对产气荚膜梭菌并没有起到增菌效果,反而有可能因为采集的粪便量不足而影响检出率。本研究腹泻儿童肛管组的检出率(16.2%)与 WANG 等^[12]研究中成人腹泻患者粪便标本产气荚膜梭菌 13.8%的分离率比较接近。本研究发现,腹泻儿童粪便产气荚膜梭菌检出率比非腹泻人群粪便的低,说明腹泻儿童的病原体可能有较多种,而且仅仅粪便中产气荚膜梭菌阳性不意味着它一定致病。因为产气荚膜梭菌食物中毒一般是由于患者食用了含有大量产气荚膜梭菌污染的肉制品和其他菜肴与汤汁导致,这些食物通常是煮熟后在较高温度下长时间缓慢冷却时导致细菌大量繁殖并产生外毒素^[13],所以还与摄入产气荚膜梭菌的数量和产生毒素的多少密切相关。因此在产气荚膜梭菌食物中毒事件中,需要增加细菌的定量分析,一般认为可疑食品里细菌的数量 >105 CFU/g 或病例的粪便中细菌的数量 >106 CFU/g^[14]即可确诊。

一般食物中毒的调查分析过程中会通过毒素基因分型或者脉冲场凝胶电泳(PFGE)方法分析比较患者粪便与残留食物标本中检出菌株的一致性来判断相关的病原体^[15]。但是笔者前期试验结果显示广州地区腹泻人群大部分为 A 型产气荚膜梭菌^[16],因此毒素基因分型方法难以区分产气荚膜梭菌分型,PFGE 方法难以进行实验室间比较。MLST 是 2012 年由 XIAO 等^[7]建立的一种基于 8 个管家基因核酸序列的分型方法,该方法重复性好,而且有利于不同实验室菌株的比较,是一种非常有效的分子分型方法。但由于建立时公共数据库包括的序列型有限,新的序列型亦没有更新上传到数据库,因此新序列型查询不到相应的 ST 型,从而限制了该分型方法的应用。很多研究人员因此根据不同的管家基因或者引物序列重新建立起其他 MLST 分型方案,但是不同的分型方案并不利于地区间菌株的比较,甚至会导致混淆^[17-19]。截至目前,该数据库已经包括了 571 种序列型,新序列型也可以得到相应的分型结果。本研究随机抽取 4 组 34 株产气荚膜梭菌共分为 31 种 ST 型,以 ST210 最多,占 8.82%,共发现 18 种新 ST 型菌株,占 52.92%,说明该方法可以从基因水平对菌株进行区分。由于食物被产气荚膜梭菌污染及粪便产气荚膜梭菌携带均较为常见,因此进一步在基因水平上对菌株进行分型有助于甄别真正的病原菌^[20]。WANG 等^[12]对 153 例粪便标本产气荚膜梭菌以同样的方法进行 MLST 分型,与本研究中相同的 ST 分型有 ST324、ST387、ST397、ST400。在本研究中 ST400

有 2 株, 分布于腹泻儿童粪便组和非腹泻成人粪便组。

不溶血型产气荚膜梭菌因为菌落形态不典型, 所以往往容易漏检。以往文献对该类不典型菌株的报道甚少。笔者在使用质谱对其鉴定的基础上进一步运用全基因组测序方法对其进行验证, 结果显示该不溶血型菌株可分离自 3 组人群的粪便, 而且在腹泻儿童粪便中的检出率更高。临床检验技术人员在日常工作中需要密切关注该类型产气荚膜梭菌检测。

总之, 广州地区腹泻和健康人群粪便产气荚膜梭菌的检出率较高, 且检测出不溶血型菌株。MLST 分型是一种非常有效的分子分型方法, 可以从基因水平对菌株进行区分, 并且能够追踪到菌株遗传上的亲缘关系, 为产气荚膜梭菌食物中毒的诊断和溯源提供可靠依据。

参考文献

[1] 周庭银, 章强强. 临床微生物学诊断与图解[M]. 4 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2017: 544-546.

[2] 于颖慧, 滕臣刚, 刘丽华, 等. 外送餐引起产气荚膜梭菌食物中毒流行病学调查分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(5): 570-575.

[3] LI X L, SAPP A C, SINGH N, et al. Detecting foodborne disease outbreaks in Florida through consumer complaints [J] J Food Prot, 2020, 83(11): 1877-1888.

[4] 张晓媛, 刘玉竹, 张鹏航, 等. 一起疑似产气荚膜梭菌食物中毒事件的病原学分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 6022-6026.

[5] 郑艳敏, 滕臣刚, 韩迪, 等. 一起产气荚膜梭菌引发校园食物中毒的流行病学调查[J]. 中国校医, 2022, 36(8): 568-570.

[6] 黄晓平, 翁奕敏, 史煜曼. 广东省揭阳市 2018—2020 年细菌性食物中毒的病原学检测结果分析[J]. 河南医学研究, 2021, 30(18): 3319-3322.

[7] XIAO Y H, WAGENDORP A, MOEZELAAR R, et al. A wide variety of Clostridium perfringens type A food-borne isolates that carry a chromosomal cpe gene belong to one multilocus sequence typing cluster[J]. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(19): 7060-7068.

[8] JOLLEY KA, BRAY JE, MAIDEN MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications[J]. Wellcome Open Res, 2018, 3: 124.

[9] 何艳明, 梁秉绍, 姚淑雯, 等. 2171 例腹泻患儿轮状病毒和腺病毒检出率及流行特征[J]. 实用医学杂志, 2017, 33

(11): 1872-1875.

[10] LIANG B S, HUANG Y M, CHEN Y S, et al. Antimicrobial resistance and prevalence of CvfB, SEK and SEQ genes among Staphylococcus aureus isolates from paediatric patients with bloodstream infections[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5): 5143-5148.

[11] 李红新, 卢迎瑞, 张爽, 等. 北京市顺义区 87 名健康人中产气荚膜梭菌携带特征研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(1): 13-16.

[12] WANG B, DONG W J, MA L Y, et al. Prevalence and genetic diversity of Clostridium perfringens isolates in hospitalized diarrheal patients from central China[J]. Infect Drug Resist, 2021, 14: 4783-4793.

[13] 程春荣, 周鹏, 戴蕾, 等. 一起疑似产气荚膜梭菌食物中毒事件的实验室检测分析[J]. 疾病监测, 2022, 37(8): 1124-1127.

[14] MASLANKA S E, KERR J G, WILLIAMS G, et al. Molecular subtyping of Clostridium perfringens by pulsed-field gel electrophoresis to facilitate food-borne-disease outbreak investigations[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(7): 2209-2214.

[15] 钟佳鑫, 王媛媛, 白璐璐, 等. 山东某地区产气荚膜梭菌的分子型别与耐药特征[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(9): 1057-1063.

[16] HUANG K Y, LIANG B S, ZHANG X Y, et al. Molecular characterization of Clostridium perfringens isolates from a tertiary children's hospital in Guangzhou, China, establishing an association between bacterial colonization and food allergies in infants[J]. Gut Pathog, 2023, 15(1): 47.

[17] 刘煜. 山东省泰安市零售鸭产品中产气荚膜梭菌的分离鉴定、基因分型及耐药性研究[D]. 济南: 山东农业大学, 2019.

[18] 修丽. 山东省部分地区鸭养殖屠宰链中产气荚膜梭菌的分离鉴定及基因分型[D]. 济南: 山东农业大学, 2020.

[19] REN Y Y, LV X Y, XV W P, et al. Characterization and multilocus sequence typing of Clostridium perfringens isolated from patients with diarrhea and food poisoning in Taian region, China[J]. J Glob Antimicrob Resist, [2023-11-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38157936/>.

[20] XIU L, ZHU C G, ZHONG Z B, et al. Prevalence and multilocus sequence typing of Clostridium perfringens isolated from different stages of a duck production chain [J]. Food Microbiologist, 2022, 102: 103901.