

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.06.020

· 综述 ·

艰难梭菌毒力与芽孢研究进展

Research advance in virulence and spore of *Clostridium difficile*

刘思娣(LIU Si-di) 综述, 吴安华(WU An-hua) 审校

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

(Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[关键词] 艰难梭菌; 艰难梭菌感染; 毒力; 毒素; 芽孢

[中图分类号] R378.8 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2016)06-0436-05

艰难梭菌(*Clostridium difficile*, CD)是梭菌属中的一种专性厌氧、有芽孢、产毒素的革兰阳性粗大杆菌,因其生长营养要求较高,分离培养困难,故得此名。一般栖生在人或动物肠道内,通过粪-口途径引起外源性感染,也可以在使用大量抗菌药物后由肠道栖生的艰难梭菌引起内源性感染。目前,艰难梭菌是唯一能引起医院感染的厌氧菌,也是引起医院感染病原体中唯一能形成芽孢的细菌。约 25% 的抗生素相关性腹泻(antibiotic-associated diarrhea, AAD), 75% 的抗生素相关性肠炎(antibiotic-associated colitis, AAC)和近 100% 的假膜性肠炎(pseudomembranous colitis, PMC)均由此菌引起,统称为艰难梭菌相关性疾病(*Clostridium difficile*-associated disease, CDAD)。近年来,随着抗菌药物的广泛应用,艰难梭菌耐药性增强,以及高致病菌株出现,导致 CDAD 发病率及致死率不断增高。目前,国内外已有诸多文献详细介绍了艰难梭菌生物学特性、实验室检测及耐药机制,故本文就艰难梭菌毒力与芽孢予以简要综述。

1 毒力

艰难梭菌可引起不同程度的肠道炎症,包括无症状的艰难梭菌携带者,轻度、中度、重度腹泻,甚至假膜性肠炎,严重者可致死^[1]。艰难梭菌可感染不同年龄阶段的人群,≥65 岁的老龄人感染率最高,

婴幼儿感染率最低,大部分婴幼儿存在艰难梭菌肠道定植,但无感染症状,可能是婴幼儿本身缺少艰难梭菌毒素结合受体^[2-3]。艰难梭菌繁殖体离开肠道通常 24 h 之内死亡,而艰难梭菌芽孢能长时间生存在有氧环境中,经过胃时不被胃酸杀死,进而在肠道产生毒素引起疾病。

细菌对宿主感染致病的能力称为致病性,致病性的强弱与毒力有关。构成毒力的物质基础主要包括侵袭力和毒素。细菌的侵袭力包括黏附、定植和产生侵袭性相关物质的能力。艰难梭菌的侵袭力主要包括黏附素、生物被膜、菌毛与侵袭性酶等。艰难梭菌致病主要通过毒素介导,主要致病因子为毒素 A(TcdA)及毒素 B(TcdB),此外还产生一种二元毒素^[4]。之前人们认为艰难梭菌的毒力只由毒素决定,但随着艰难梭菌致死率的增高及高毒素菌株的暴发,促进了人们对其他毒力成分的研究^[5]。

1.1 毒素 毒素是艰难梭菌产生毒力的主要因素,也是引起艰难梭菌感染(*Clostridium difficile* infection, CDI)的主要致病因子。艰难梭菌主要产生 TcdA 和 TcdB 两种毒素,都是单糖基转移酶,分别由 *tcdA* 和 *tcdB* 基因编码。TcdA 能引起兔肠襻黏膜分泌增多和出血,故又称为肠毒素,分子质量为 308 kDa,对白细胞有趋化作用,可以与肠黏膜刷状缘细胞上毒素受体结合,改变细胞肌动蛋白骨架,介导黏膜上皮细胞的 cAMP 系统,使水和钠分泌增加,导致分泌性腹泻,致使肠壁出现炎症、渗出、甚至

[收稿日期] 2016-03-08

[基金项目] 中南大学湘雅医院青年基金项目(2014Q05)

[作者简介] 刘思娣(1989-),女(汉族),湖南省永州市人,硕士研究生,主要从事感染性疾病研究。

[通信作者] 吴安华 E-mail: dr_wuanhua@sina.com

黏膜出血坏死,也有一定的细胞毒性作用,但毒力小于 TcdB。TcdB 为细胞毒素,分子质量为 269 kDa,可刺激单核细胞释放炎症因子,直接破坏肠壁细胞,引起炎症反应而引发肠黏膜细胞凋亡、变性、坏死和脱落,甚至形成假膜性炎症。既往一般认为,TcdA 为肠毒素,引起腹泻和肠炎;TcdB 仅在 TcdA 损伤肠黏膜细胞基础上致病。但近十年来,临床上出现由于 *tcdA* 基因缺失导致只产 TcdB 不产 TcdA(A-B+型)艰难梭菌菌株感染的暴发性流行。尤其在韩国,A-B+型 CDI 发病率从 1995 年的 4.2% 上升至 2008 年的 25.7%。A-B+型艰难梭菌最初认为是无致病性,而如今认为 A-B+ 可导致假膜性肠炎,严重者致死,TcdB 无需 TcdA 的预先作用可以直接致病,引起肠道局部性炎症。目前认为两种毒素的作用是协同的,先由 TcdA 引起肠黏膜损伤,破坏细胞间的紧密连接,并激活上皮细胞内的鸟苷酸环化酶,导致 cAMP 增加而引起钠分泌增多;在 TcdA 作用的基础上,TcdB 发挥细胞毒作用,增加上皮细胞的通透性,引起肠液和电解质分泌增加,严重者坏死、脱落的细胞与渗出的纤维素,以及炎性细胞等形成假膜。

艰难梭菌除可以产生 TcdA 和 TcdB,还能产生一种更强毒素,即为二元毒素。二元毒素是一种腺苷二磷酸核糖转移酶,在真核细胞中修饰肌动蛋白,导致细胞骨架破坏,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^[6]。许多产毒株中二元毒素均不表达^[7],而高毒力 027 和 078 艰难梭菌通常均表达二元毒素^[8],典型代表菌株为 BI/NAP1/027(PCR 核糖体分型为 027,脉冲场凝胶电泳分型为 NAP1,限制性内切酶分型为 BI)。近年来,027 艰难梭菌菌株的全球流行导致 CDI 发病率快速增长,其可引起严重腹泻,高致死率,高复发率以及对喹诺酮高耐药率。相关研究^[9]对流行的 BI/NAP1/027 菌株 *cdt* 基因座进行分析,发现 *cdt* 具有增加 TcdA 和 TcdB 毒性的作用。Warny 等^[10]体外培养发现,高毒力 RT027 TcdA、TcdB 产量的高峰中位值分别是其他核糖体型的 16、23 倍。艰难梭菌的二元毒素能产生肠毒性作用,并且在 CDI 中有潜在辅助作用^[11]。

致病决定区(pathogenicity locus, PaLoc)是艰难梭菌致病菌染色体片段的一部分,艰难梭菌致病决定区除毒力编码基因(*tcdA* 和 *tcdB* 基因)外,还有毒力调控基因,包括负向调节基因 *tcdC*、正向调节基因 *tcdR* 及膜孔蛋白基因 *tcdE*。以上基因共同

构成了一个大小为 19.6 kb 的致病决定区。*tcdC* 是一个具有 26 个碱基的膜相关蛋白,*tcdC* 有反 σ 因子的作用,可以阻止 *tcdR* 与核心 RNA 聚合酶的结合^[12],从转录水平抑制毒素基因的表达,是毒素表达的负向调节因子。*tcdC* 基因的部分碱基缺失,基因序列发生突变,负调节机制受损,可导致 TcdA 和 TcdB 产量急剧增加,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,使得 *tcdC* 的负调节作用大大减弱,从而使 TcdA 和 TcdB 的产量增高^[13];另一高毒力型 RT078,*tcdC* 上有一段 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^[8]。*tcdR* 编码正性调控因子 *tcdR*,*tcdR* 为蛋白质,为 σ 因子(转录起始因子)家族的一部分,可以结合 RNA 聚合酶全酶促进基因 *tcdR*、*tcdA*、*tcdB* 的表达^[14]; *tcdE* 基因编码一种类似穿孔素的蛋白质,这种物质能够促进 TcdA 和 TcdB 的释放。在艰难梭菌动力学对数生长期 *tcdC* 基因的表达增强,而 *tcdA*、*tcdB*、*tcdD*、*tcdE* 的表达减弱,而在稳定期则相反^[6, 8, 15-16]。

因艰难梭菌 PaLoc 位置的不同,可将艰难梭菌分为 31 种毒素型细菌,通过检测 PaLoc 序列的变化可确定艰难梭菌毒素型。艰难梭菌毒素型研究^[17]分析显示,78%~88%艰难梭菌为毒素型 0,2%~3%为毒素型 III,核糖核酸型 027 是毒素型 III 中的一种。因艰难梭菌产的不同毒素,可将其分为 4 种类型:A-B-(*tcdA*-*tcdB*-)、A-B+ (*tcdA*-*tcdB*+)、A+B+ (*tcdA*+*tcdB*+)、A+B+ 二元毒素(*tcdA*+*tcdB*+*cdtA*+*cdtB*+)。A-B-型艰难梭菌不产毒素,无致病性,一般存在于无症状 CDI 的成年人和婴儿中。A-B+型艰难梭菌 *tcdA3'* 末端一般有 1.8 kb 的基因缺失,有些甚至有 6kb 的基因缺失,因 PaLoc 区域 *tcdA* 基因存在不同程度的缺失,所以要短很多,A-B+型艰难梭菌只产 *tcdB*,但仍可引起假膜性肠炎,最典型的为核糖核酸型的 017。A+B+型艰难梭菌的 PaLoc 区域是一个 19.6 kb 的编码区域。A+B+二元毒素典型代表是 2003 年英国首次暴发的 027 高毒素和 2008 年暴发的 078 高毒素。目前,尚未检出 A+B-型艰难梭菌。

1.2 侵袭力

1.2.1 黏附素 艰难梭菌定植是引起感染的首要

条件。研究^[1]表明,艰难梭菌表面蛋白与肠组织相互作用,使艰难梭菌黏附于肠道壁,进而引起 CDI,所以艰难梭菌表面蛋白是引起定植的重要原因之一。有学者认为,胶原蛋白结合蛋白 A(collagen binding protein A, CbpA)是表达于艰难梭菌表面上的一种重要的细胞表面结合蛋白,在艰难梭菌定植过程中发挥重要作用。CbpA 是识别黏连基质分子的微生物表面成分(microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule, MSCRAMM)家族中的新成员之一。实验表明,CbpA 携带 LPXTG 细胞壁锚定结构区域,以高亲和力结合人类胶原蛋白 I 和 V,可促进艰难梭菌结合到人类肠道壁上。Hennequin 等^[18]2001 年研究发现,GroEL 是指热休克蛋白 60,其具有细胞黏附作用,GroEL 在热休克后细胞外释放。GroEL 的特异性抗体、纯化该蛋白、细胞接触诱导等实验方法均证明了艰难梭菌 GroEL 的黏附作用。该作者在 2003 年研究中还发现 Fbp68 可能是艰难梭菌黏附素之一^[19],Fbp68 是一种可结合纤维连接蛋白、68 kDa 大小的细胞表面结合蛋白,可促进艰难梭菌与肠道中纤维基质连接、定植;免疫印迹法、间接免疫荧光法、ELISA 3 种方法均表明艰难梭菌可结合纤维连接蛋白。CDI 期艰难梭菌表面上的高分子及低分子的表面层蛋白(SLPS)有黏附宿主细胞能力^[20-21];细胞壁蛋白 CWP66 和 CWP84 均具有黏附及可降解细胞外基质的作用^[22-23]。

抑制艰难梭菌的黏附是控制感染的有效手段。鞭毛黏附作用可使细菌致病性增强^[24]。Baban 等^[25]研究认为,鞭毛运动性可促进艰难梭菌黏附于肠道,鞭毛本身的结构也可促进黏附,并且鞭毛结构本身才是艰难梭菌黏附的重要因素。目前研究显示,鞭毛蛋白 FliC,鞭毛帽蛋白 FliD 是鞭毛中重要的黏附蛋白。Tasteyre 等^[26]体外实验证明,FliC、FliD 能黏附在无菌小鼠盲肠黏膜。Dingle 等^[27]采用诱导突变菌株的方法证明了 FliD 的黏附功能,认为 FliD 在不同艰难梭菌菌株中的黏附能力不同,使细菌的毒力发生了变化。

1.2.2 生物被膜 艰难梭菌能在肠道不利环境中生长,除芽孢以外,生物被膜可能是另一重要原因。一些致病菌反复感染与该致病菌形成微生物群落/生物膜的能力有关。艰难梭菌生物被膜的形成是一个复杂、多因素参与的过程。艰难梭菌形成生物被膜后受到保护,可以抵御高浓度的万古霉素。研究^[28]认为,spoA 不仅是一种产芽孢调节因子,也参

与生物被膜的形成,但 spoA 参与生物被膜形成的机制尚不明确,有待于进一步研究。

1.2.3 菌毛 菌毛与宿主细胞表面的相应受体结合而黏附、定居于黏膜表面,有助于细菌侵入,与细菌的侵袭力密切相关。IV 型菌毛(T4Ps)具有黏附、定植、DNA 转移等作用^[29];T4Ps 也可促进艰难梭菌聚集,作用机制可能与单磷酸鸟苷环二聚体(C-di-GMP)作为核糖开关调控有关。Bordeleau 等^[30]使 T4Ps 两个基因(pliA1 CD3513 和 pliB1 CD3512)失活,结果导致菌毛结构形成受阻,减少了艰难梭菌的聚集。

1.2.4 侵袭性酶 侵袭性酶与细菌毒力相关,如透明质酸酶能水解动物机体内的透明质酸,使机体对异物的通透性增强,致病微生物能在组织中随意活动,进而促进其在组织中扩散蔓延。艰难梭菌拥有多种侵袭性酶,包括透明质酸酶、软骨素-4-硫酸酯酶、胶原酶和蛋白酶等,尤其是强毒菌株,皆有透明质酸酶、软骨素-4-硫酸酯酶和胶原酶。但目前尚不清楚艰难梭菌毒力与侵袭性酶之间的关系,有可能是上述侵袭性酶释放了一些基本的必需营养物,从而促进了艰难梭菌在肠道的定植^[31]。

2 芽孢

艰难梭菌为严格的专性厌氧菌,不能长时间在有氧环境中存活^[32],而芽孢具有非常强的抵抗力,在宿主体外的有氧环境中可存活数周至数月^[33]。芽孢耐热,100℃ 1 h 才能死亡,耐干燥、耐强酸强碱,对抗菌药物高度耐药,甚至对某些抗菌药物固有耐药^[34];一旦污染环境,医院中许多消毒剂(如常用的无漂白消毒剂)也不能将其杀死^[35],是 CDI 及传播的主要原因,也是引起 CDI 疾病难治性及复发的重要原因。艰难梭菌芽孢通过粪-口途径进入易感人群消化道,在肠道中出芽,形成艰难梭菌菌株,进而可发展为 CDI。艰难梭菌芽孢的总体结构与其他内生孢子类似,但最外层结构稍有不同,艰难梭菌最外层结构为芽孢外壳和外壁,目前其发病机制还不明确。感染期间艰难梭菌可进一步诱发芽孢形成通路,产生更多的芽孢。

芽孢出芽是 CDI 最重要的一步。当特定出芽受体(specific germinant receptors,SGRs)感受到特异小分子物质时,芽孢出芽。特异小分子包括核苷、糖类、氨基酸,以及一些离子^[36],尤其是特定的胆酸盐及其衍生物(牛黄胆酸盐、甘胆酸盐、脱氧胆酸

盐)。特定出芽受体与 L-甘氨酸结合作为出芽开始的第一步^[37-38]。

许多杆菌及梭菌属芽孢的形成是由几种孤立组氨酸激酶决定的,能使主转录调节因子 spoA 磷酸化^[39-40]。艰难梭菌菌株 630 基因编码 5 种孤立组氨酸激酶 (CD1352、CD1492、CD1579、CD1949 和 CD2492),CD2492 失活可降低芽孢形成率,spoA 突变则完全阻断芽孢的形成^[41]。

近年来,随着抗菌药物广泛应用,艰难梭菌感染率及致死率日益上升,已成为全世界关注的问题。虽然国内外对艰难梭菌的研究已有几十年,但随着艰难梭菌高耐药菌株及强毒力菌株的出现,艰难梭菌感染复发率及致死率增高,给艰难梭菌的诊断、预防及治疗带来了许多新的问题。因此,建议继续加强对艰难梭菌的基础及临床研究,及时开发艰难梭菌检测方法,为艰难梭菌的防治提供帮助。

[参 考 文 献]

[1] Rupnik M, Wilcox MH, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis [J]. Nat Rev Microbiol, 2009, 7(7): 526 - 536.

[2] Jangi S, Lamont JT. Asymptomatic colonization by *Clostridium difficile* in infants: implications for disease in later life [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2010, 51(1): 2 - 7.

[3] Rousseau C, Poilane I, De Pontual L, et al. *Clostridium difficile* carriage in healthy infants in the community: a potential reservoir for pathogenic strains[J]. Clin Infect Dis, 2012, 55(9): 1209 - 1215.

[4] McFarland LV. Renewed interest in a difficult disease: *Clostridium difficile* infections-epidemiology and current treatment strategies[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2009, 25(1): 24 - 35.

[5] Vedantam G, Clark A, Chu M, et al. *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response[J]. Gut Microbes, 2012, 3(2): 121 - 134.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

[9] McDonald LC, Killgore GE, Thompson A, et al. An epidemic, toxin gene-variant strain of *Clostridium difficile* [J]. N Engl J Med, 2005, 353(23): 2433 - 2441.

[10] 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.

[11] Geric B, Carman RJ, Rupnik M, et al. Binary toxin-producing, large clostridial toxin-negative *Clostridium difficile* strains are enterotoxic but do not cause disease in hamsters [J]. J Infect Dis, 2006, 193(8): 1143 - 1150.

[12] Carter GP, Douce GR, Govind R, et al. The anti-sigma factor TcdC modulates hypervirulence in an epidemic BI/NAP1/027 clinical isolate of *Clostridium difficile* [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(10): e1002317.

[13] 肖克林,金萍,黄丽清,等. 高毒力艰难梭菌的基因型和毒力相关基因检测[J]. 国际检验医学杂志. 2015(8): 1021 - 1025.

[14] O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain [J]. Gastroenterology, 2009, 136(6): 1913 - 1924.

[15] Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease [J]. Clin Microbiol Rev, 2005, 18(2): 247 - 263.

[16] Hundsberger T, Braun V, Weidmann M, et al. Transcription analysis of the genes tcdA-E of the pathogenicity locus of *Clostridium difficile* [J]. Eur J Biochem, 1997, 244(3): 735 - 742.

[17] Geric B, Rupnik M, Gerding DN, et al. Distribution of *Clostridium difficile* variant toxinotypes and strains with binary toxin genes among clinical isolates in an American hospital [J]. J Med Microbiol, 2004, 53(Pt 9): 887 - 894.

[18] Hennequin C, Porcheray F, Waligora-Dupriet A, et al. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence [J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 1): 87 - 96.

[19] Hennequin C, Janoir C, Barc MC, et al. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Clostridium difficile* [J]. Microbiology, 2003, 149(Pt10): 2779 - 2787.

[20] Karjalainen T, Waligora-Dupriet AJ, Cerquetti M, et al. Molecular and genomic analysis of genes encoding surface-anchored proteins from *Clostridium difficile* [J]. Infect Immun, 2001, 69(5): 3442 - 3446.

[21] Calabi E, Calabi F, Phillips AD, et al. Binding of *Clostridium difficile* surface layer proteins to gastrointestinal tissues [J]. Infect Immun, 2002, 70(10): 5770 - 5778.

[22] Waligora AJ, Hennequin C, Mullany P, et al. Characterization of a cell surface protein of *Clostridium difficile* with adhesive properties [J]. Infect Immun, 2001, 69(4): 2144 - 2153.

[23] Janoir C, Pechiné S, Grosdidier C, et al. Cwp84, a surface-associated protein of *Clostridium difficile*, is a cysteine protease with degrading activity on extracellular matrix proteins [J].

- J Bacteriol, 2007, 189(20): 7174 - 7180.
- [24] Duan Q, Zhou M, Zhu L, et al. Flagella and bacterial pathogenicity[J]. J Basic Microbiol, 2013, 53(1): 1 - 8.
- [25] Baban ST, Kuehne SA, Barketi-Klai A, et al. The role of flagella in *Clostridium difficile* pathogenesis: comparison between a non-epidemic and an epidemic strain[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e73026.
- [26] Tasteyre A, Barc M, Collignon A. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization[J]. Infect Immun, 69(12): 7937 - 7940.
- [27] Dingle TC, Mulvey GL, Armstrong GD. Mutagenic analysis of the *Clostridium difficile* flagellar proteins, FliC and FliD, and their contribution to virulence in hamsters[J]. Infect Immun, 2011, 79(10): 4061 - 4067.
- [28] Dapa T, Unnikrishnan M. Biofilm formation by *Clostridium difficile* [J]. Gut Microbes, 2013, 4(5): 397 - 402.
- [29] Maldarelli GA, De Masi L, von Rosenvinge EC, et al. Identification, immunogenicity, and cross-reactivity of type IV pilin and pilin-like proteins from *Clostridium difficile* [J]. Pathog Dis, 2014, 71(3): 302 - 314.
- [30] Bordeleau E, Purcell EB, Lafontaine DA, et al. Cyclic di-GMP riboswitch-regulated type IV pili contribute to aggregation of *Clostridium difficile* [J]. J Bacteriol, 2015, 197(5): 819 - 832.
- [31] 许方方, 胡玉苗, 冉珊珊, 等. 艰难梭菌毒素及致病基因的研究进展[J]. 动物医学进展, 2013, 34(7): 100 - 103.
- [32] Jump RL, Pultz MJ, Donskey CJ. Vegetative *Clostridium difficile* survives in room air on moist surfaces and in gastric contents with reduced acidity: a potential mechanism to explain the association between proton pump inhibitors and *C. difficile*-associated diarrhea? [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(8): 2883 - 2887.
- [33] Buckley AM, Spencer J, Candlish D, et al. Infection of hamsters with the UK *Clostridium difficile* ribotype 027 outbreak strain R20291[J]. J Med Microbiol, 2011, 60(8): 1174 - 1180.
- [34] Baines SD, O'Connor R, Saxton K, et al. Activity of vancomycin against epidemic *Clostridium difficile* strains in a human gut model[J]. J Antimicrob Chemother, 2009, 63(3): 520 - 525.
- [35] Ali S, Moore G, Wilson AP. Spread and persistence of *Clostridium difficile* spores during and after cleaning with sporicidal disinfectants[J]. J Hosp Infect, 2011, 79(1): 97 - 98.
- [36] Paredes-Sabja D, Setlow P, Sarker MR. Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: mechanisms and proteins involved[J]. Trends Microbiol, 2011, 19(2): 85 - 94.
- [37] Howerton A, Ramirez N, Abel-Santos E. Mapping interactions between germinants and *Clostridium difficile* spores [J]. J Bacteriol, 2011, 193(1): 274 - 282.
- [38] Wheeldon LJ, Worthington T, Lambert PA. Histidine acts as a co-germinant with glycine and taurocholate for *Clostridium difficile* spores[J]. J Appl Microbiol, 2011, 110(4): 987 - 994.
- [39] Higgins D, Dworkin J. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation[J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(1): 131 - 148.
- [40] Steiner E, Dago AE, Young DI, et al. Multiple orphan histidine kinases interact directly with Spo0A to control the initiation of endospore formation in *Clostridium acetobutylicum*[J]. Mol Microbiol, 2011, 80(3): 641 - 654.
- [41] Underwood S, Guan S, Vijayasubhash V, et al. Characterization of the sporulation initiation pathway of *Clostridium difficile* and its role in toxin production[J]. J Bacteriol, 2009, 191(23): 7296 - 7305.

(本文编辑:左双燕)