대한임상미생물학회지 : 제3권 제1호 2000
Korean J Clin Microbiol 2000 ; 3 : 43-47

Clostridium difficile 독소 A 면역검사와 세포독성검사의 비교

강정옥, 채정돈, 엄정인, 한동수*, 박필환**, 박일규, 최태열

한양의대 임상병리학교실, 내과학교실*, 가천의대 임상병리학교실**

Comparison of *Clostridium difficile* Toxin A Immunoassay with Cytotoxicity Assay

Jung Oak Kang, M.D., Jeong Don Chae, M.D., Jeong In Eom, M.D., Dongsoo Han*, M.D., Pil Whan Park, M.D., Ile Kyu Park, M.D. and Tae Yeal Choi, M.D.**

Department of Clinical Pathology and Internal Medicine*, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea, Department of Clinical Pathology, Gachon Medical College*

Background : The most reliable and accurate diagnostic method of *Clostridium difficile*-associated disease (CAD) is considered the detection of toxin B in stool using the cell culture cytotoxicity assay. But cytotoxicity assay needs cell culture facilities and labor intensive. We evaluated an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay for the detection of *Clostridium difficile (C. difficile)* toxin A in stool specimens.

Methods : Two hundred sixty-seven stool specimens were cultured anaerobically on cycloserine-cefoxitin-fructose-egg yolk (CCFA) media and tested for toxin A with the VIDAS *C. difficile* toxin A II (CDA 2, bioMerieux sa, France) according to the manufacturer's instruction. Cytotoxicity assay for toxin B (*C. difficile* Tox-B test, TechLab, Blacksburg, USA) was performed with 42 toxin A positive and 40 toxin A negative specimens using HEp-2 cell monolayers grown in the 96-well microplates.

Results : Toxin A positive rate (26.2%) was significantly higher (P=0.013) than the culture positive (17.6%) and the agreement was 82.4%. The agreement between the toxin A test and the cytotoxicity assay was 92.7%. The sensitivity and specificity of toxin A test were 89.4% and 100%, respectively. All the 42 toxin A positives showed cytotoxicity, but among the 40 toxin A negatives, 5 showed cytotoxicity in cell monolayers.

Conclusion : There was no significant difference between the automated, rapid toxin A test and cytotoxicity assay (P=0.07>0.05), so rapid toxin A test could be used as a routine method. However, toxin A negative and toxin B positive *C. difficile* would be not detected by the toxin A test only.

Key words : *Clostridium difficile*, toxin A immunoassay, CDA 2, cytotoxicity assay

서 론

항균제 투여 후 발생하는 설사나 위막성 대장염은 독소를 생성하는 *Clostridium difficile (C. difficile)*이 주 원인으로 밝혀져 있으며 이의 신속한 검사실적 진단은 환자의 치료 및 병원감염예방을 위해서 매우 중요하다. *C. difficile*이 생성하는 대표적인 독소에는 독소 A와 독소 B가 있으며 이 균종은 사람의 장내에 정상 세균총으로 존재하기도 한다. 건강한 성인의 보균율은 3% 정도이나 항균제를 사용할 경우에는 무증상 보균율이 증가한다고 한다. 또한 신생아나 영유아의 보균율은 15-70%로 다양하며 독소 생성 *C. difficile*을 보유하고 있어도 증상이 없는 것이 특징이다[1].

독소 A는 enterotoxin이라고도 하며 rabbit ileal loop 모델에서 fluid accumulation과 enterocyte의 손상을 일으킨

원 본 접 수 : 2000년 1월 15일 접수번호 : CM 3-1-6
수정본접수 : 2000년 2월 28일
교 신 저 자 : 강 정 옥
(471-701) 경기도 구리시 교문동 249-1
한양대학교 구리병원 임상병리과
TEL : 0346) 560-2572 FAX : 0346) 560-2585
E-mail : jokang@email.hanyang.ac.kr

다[2, 3]. 독소 B는 cytotoxin이라고도 하며 배양시킨 세포단층에 세포변성(cell rounding)을 일으키고 독소 A의 작용에 협동작용을 하는 것으로 알려져 있다. 사람에게 임상 증상을 일으키는데는 일반적으로 독소 A 농도가 더 연관성이 많다고 알려져 있다[4]. 그러나 햄스터를 이용한 백신 투여 실험에서 독소 A에 대한 백신만으로는 병을 예방할 수 없었고 독소 B에 대한 백신도 동시에 투여해야 예방이 가능하였으므로 병의 발생에는 두 독소의 공동작용이 필요함을 추정할 수 있겠다[5].

항생제 관련 설사나 위막성 대장염의 진단에는 라텍스응집법, 효소면역검사법 등의 신속한 검사법으로 독소 A 또는 독소 B를 검출하며 *C. difficile* 배양은 균주 확보를 위하여 실시하는 것이 일반적이다. 그러나 상품화된 독소검사의 민감도나 특이도는 제품마다 상당히 다양하므로[6-8] 새로운 제품을 도입하여 사용하기 이전에 이에 대한 평가가 필요하다. 상품화된 독소검사를 평가할 때는 일반적으로 세포독성검사가 표준법으로 사용되나 국내에서는 아직까지 상품화된 효소면역검사와 세포독성검사를 비교 연구한 보고는 없다. 이에 연구자들은 세포독성검사를 표준법으로 하여 bioMerieux사의 VIDAS *C. difficile* Toxin A II (CDA 2) 검사 키트를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1998년 1월부터 1999년 12월까지 2년간 *C. difficile* 독소 A 검사가 의뢰되었던 환자의 변검체 267개로 *C. difficile* 배양과 독소 A검사를 실시하였다. 이 중 독소 A 양성 42검체와 독소 A 음성이었던 40검체로 세포단층을 이용한 세포독성검사(독소 B검사)도 실시하였다.

***C. difficile* 배양** : 배양을 위한 변검체를 잘 섞은 후 24시간 prereduced cycloserine-cefoxitin-fructose-egg yolk (CCFA, 메디랩코리아, 한국) 배지에 접종한 다음 혐기성 상자(Anaerobic System, Forma Scientific, Marietta, OH, USA)에서 48시간 배양시켰다. 의심되는 균집락이 자라면 혐기성 조건과 호기성 조건으로 이중 계대배양하여 혐기성 조건에서만 자라는 균집락을 혐기성 세균 동정 키트인 rapid ID 32A(bioMerieux Vitek, Hazelwood, USA)를 사용하여 동정하였다.

독소 A 면역검사 : 액체변이나 무른 변 300 uL를 검체 희석액 900 uL와 섞은 후(1:4 희석) vortex하여 균질액을 만든다. 균질액을 12,000×g에서 5분 이상 원심시켜 상층액을 취하였다. 상층액 300 uL를 VIDAS *C. difficile* Toxin A II (CDA 2) Reagent Strip의 검체 well에 넣은 후 Solid Phase Receptacle (SPR)과 함께 자동검사 장비(VIDAS instrument, bioMerieux sa, France)에 장착시켰다. 매 검사 시마다 standard (data를 저장시켜 2주간 사용 가능), 양성 대조, 음성 대조도 검체와 같이 처리하였다. VIDAS의 검사원리는 enzyme-linked fluorescent immunoassay (ELFA)이며 기계가 자동으로 측정하여 약 한시간 후 결과(양성 또는 음성)가 나왔다.

독소 A 차단검사(Blocking test) : 독소 A 양성이나 배양에서 음성인 검체를 대상으로 검사하였다. 냉동 보관된 변검체를 독소 A 검사 시와 같은 방법으로 처리하여 상층액(최소 0.6 mL 필요)을 사용하였다. CDA 2 Reagent Strip 두개를 준비하여 한 개는 "block" 다른 한 개는 "reference"라고 표시하였다. Block strip에는 blocking 시약(goat anti-*C. difficile* toxin A) 10 μL를 reference strip에는 reference 시약(normal goat serum) 10 μL를 가하였다. 상층액 300 μL를 각각 두 strip에다 가한 후 SPR과 함께 장비에 장착시키면 결과(blocking 양성 또는 음성)는 자동으로 출력되었다.

세포독소검사 : 1) HEp-2 세포단층 준비; 96-well plate의 각 well에 HEp-2 세포 부유액(1.0×10^5/mL)을 200 μL 씩 분주한 다음 37℃, CO_2 배양기에서 하룻밤 배양하여 세포단층을 만들었다. 2) 세포독성검사를 위한 검체 처리; 냉동 보관(-20℃)된 변검체를 녹인 후 0.2 mL를 취하여 희석액 1.8 mL에 가한 다음 잘 섞었다(1:10 희석). 12,000×g에서 5분 간 원심 시킨 후 상층액을 0.45 μm 막으로 여과시켰다. 3) 검체 당 두개의 세포단층 well을 사용하였으며 한 well에는 phosphate buffered saline (PBS) 25 μL, 다른 well에는 항독소(*C. difficile* Tox-B test, TechLab, Blacksburg, USA) 25 μL를 가하였다. 여과액 25 μL를 두 well에 가한 후 37℃, CO_2 배양기에서 배양하였으며 24시간 및 48시간 배양 후에 판독하였다. 양성대조도 동시에 검사하였다. 세포단층의 50% 이상이 둥글게 변하면 독소 B 양성으로 판단하였다.

통계처리 : 배양검사와 독소 A 면역검사의 비교에는 McNemar test를 사용하여 *P*값을 구하여 평가하였고(유의한 차이: $P<0.05$), 세포독소검사와 독소 A 면역검사의 비교에는 세포독소검사를 표준으로 독소 A 면역검사의 민감도와 특이도 및 *P*값을 구하여 평가하였다.

결 과

1. 검사가 의뢰되었던 총 267 변검체 중 독소 A 양성은 70예(26.2%)였으며 배양 양성은 47예(17.6%)로 독소 A 양성률이 유의하게 높았으며($P=0.013$), 독소 A검사와 배양검사의 일치율은 82.4%이었다(Table 1).

2. 독소 A 양성이나 *C. difficile*이 배양되지 않았던 35예 중, 23예로 독소 A 차단검사를 실시한 결과 20예

Table 1. Results of toxin A immunoassay and culture of *Clostridium difficile*

Culture (N)	Toxin A immunoassay (N)		Total(%)
	Positive	Negative	
Growth	35	12	47 (17.6)
No growth	35	185	220 (82.4)
Total (%)	70 (26.2)	197 (73.8)	267 (100.0)

Table 2. Comparison of Clostridium difficile toxin A immunoassay with cytotoxicity assay

Cytotoxicity assay (N)	Toxin A immunoassay (N)		Total (%)
	Positive	Negative	
Positive	42	5	47 (57.3)
Negative	0	35	35 (42.7)
Total (%)	42 (51.2)	40 (48.8)	82 (100.0)

는 blocking이 되어 독소 A 양성임을 확인하였으나, 3예(13.0%)에서는 blocking이 되지 않았다. 그러나 blocking이 안된 세 검체 모두 세포독성검사에서 독소 B 양성으로 나와, 항원과다로 인한 차단 실패가 원인으로 추정되었으나, 세 검체들을 희석하여 재검사하지 못하였으므로 이를 증명하지는 못하였다.

3. 독소 A 면역검사와 세포독성검사(독소 B검사)를 동시에 시행하였던 82예 중, 독소 A 양성이었던 42검체 모두 독소 B 양성으로 나와 100% 일치하였다. 그러나 5예에서는 검체 well과 항독소 중화 well 모두에서 100% 세포독성을 나타내어, 필터한 상층액을 100배 희석시켜 재검사한 결과 모두 뚜렷한 양성결과를 나타내었다. 독소 A 음성이었던 40검체 중 독소 B 양성인 검체가 5예 있었다. 세포독성검사를 표준법으로 간주하였을 때, 독소 A검사(VIDAS CDA II)의 민감도는 89.4%, 특이도는 100%이었으나, 두 방법간에 통계적으로 유의한 차이는 없었다(P=0.0736)(Table 2).

고 찰

Fan 등[9]은 입원한지 3일이 지난 환자에게서 장내 병원균을 동정하기 위하여 일반 변배양검사를 의뢰하면 부적합 검사로 거절해야 한다고 주장하면서 이렇게 거절된 변검체의 8%에서 *C. difficile* 독소 A가 양성이었다고 보고하였다. 이는 입원 후 4일째부터는 설사나 장염이 의심되는 환자의 경우 변배양검사 대신 *C. difficile* 독소 A검사를 시행하는 것이 효율적임을 시사한다. 한국과 같이 항균제가 자유로이 판매되는 나라에서는 입원 3일 이내라 할지라도 *C. difficile*로 인한 위막성 대장염이나 항균제 유발 설사증이 더욱 높은 빈도로 발생하리라 예상된다.

본 연구에서 독소 A 양성률은 26.2%로서, 이 등[10]의 세포독소(독소 B) 양성률 23%와 유사하였으나 이 등[11]의 독소 A 양성률 9.8%보다는 매우 높았다. 이 등[11]은 bioMerieux사의 VIDAS *C. difficile* 독소 A검사 키트를 사용하였는데, 이 제품의 낮은 민감도와 높은 미판정(equivocal)률 때문에[6, 12] 본 연구에서는 개량된 제품인 VIDAS *C. difficile* Toxin A II (CDA 2)를 사용하였으므로 차이가 날 수도 있고 병원의 특성이나 환자군에 따른 차이일 수도 있을 것이다.

효소면역검사원리를 이용하여 독소 A를 검출하는 상품화된 제품들의 민감도는 개발 초기에는 50%-60%로 낮았으나[6] 최근에 개량된 제품의 경우 90% 이상으로 높아졌으며, 특이도도 개선되고 있다[7, 8]. 본 연구에서는 세포독성검사를 표준법으로 간주하였을 때, 독소 A검사(VIDAS CDA 2)의 민감도는 89.4%, 특이도는 100%이었으며, 두 방법간에 통계적으로 유의한 차이는 없었으므로 이 제품을 독소 A의 일상검사로 채택하여도 되겠다고 판단하였다. 이는 같은 제품을 평가한 Butler 등[13]의 민감도 90.7%, 특이도 98.6%와 유사하였으며 De Girolami 등[14]의 민감도 85%, 특이도 99%와도 유사하였다.

C. difficile 배양검사는 검체의 질, 운반, 혐기성 배양 조건의 정도관리 등에 따라서 검사실마다 검사의 수준에 상당한 차이가 날 수 있으며 또한 독소 생성여부를 다시 검사해야 하므로 *C. difficile* 연관 질환의 진단법으로 이용되기 어렵다. 그러나 균주의 확보나 독소검사의 도입 초기에 비교 연구 등의 목적으로 사용될 수는 있을 것이다. 이번 실험에서, 독소 A 양성이나 *C. difficile*이 배양되지 않았던 예가 많았는데(35/267, 13%) 그 중 23예로 독소 A 차단검사를 실시한 결과 20예는 blocking이 되어 독소 A 양성임이 확인되어 배양검사보다는 독소 A검사가 민감함을 알 수 있었고, 3예에서는 항독소로 blocking이 되지 않았으므로 위양성으로 판정할 수도 있다. 그러나 차단검사에서 위양성이었던 세 검체 모두 세포독성검사에서 독소 B 양성으로 나와, 독소 A의 역가가 매우 높아서 항독소로 중화되지 못한 것으로 추정할 수 있으나 더 희석시킨 검체로 재검사를 하지 못하여 그 원인을 명확하게 밝히지는 못하였다. 이번 연구에서 독소 A 또는 B 양성이었으나 배양에서 음성이었던 검체들이 1999년 10월 이후에 많이 관찰되었는데 이는 혐기성 상자의 잦은 문제 발생이 원인으로 작용할 수도 있었음을 시사하였다.

일반적으로 독소생성 *C. difficile*은 독소 A와 독소 B를 동시에 만드는 것으로 알려져 있으나[1, 5] 1992년 경부터 독소 A 음성, 독소 B 양성인 균주들이 보고되고 있다[15-17]. Kato 등[18]은 소아 환자의 경우 설사증 환자 및 무증상군 모두에서 독소 A 음성, 독소 B 양성인 균주들이 6.7% 분리되었다고 보고하면서, 이

러한 균주들이 성인의 경우에는 어떤 임상적인 의의가 있는지는 밝히지 못하였다. Kader 등[19]은 소아과 설사증 환자의 변검체 1,061개로 독소 A, 독소 B, 독소 A와 독소 B 세 군으로 나누어서 검사한 결과, 독소 양성 276검체 중 독소 A(효소면역검사)만 양성인 검체가 18.5%, 세포독성검사에 의한 독소 B만 양성인 검체가 48.2%, 두 독소가 동시에 양성인 검체가 33.3%이었다고 보고하면서 독소 A와 독소 B검사를 동시에 실시할 것을 주장하였다. 본 연구에서 독소 A검사와 독소 B검사를 동시에 시행하였던 82예 중, 독소 A 양성이었던 42검체는 모두 독소 B 양성으로 나와 100% 일치하였다. 독소 A (CDA 2)는 음성이었으나 세포독성검사에서 독소 B 양성이었던 5예(12.5%)는 독소 A 음성, 독소 B 양성인 드문 균주일 가능성이 있으나 배양검사로 *C. difficile*을 분리하지 못하여 이를 증명하지는 못하였으며, 이는 Kader 등의 결론 즉 *C. difficile* 독소 A검사와 독소 B검사를 동시에 실시해야 한다는 결론을 뒷받침해주는 결과이나, Kader 등과는 달리 독소 A만 양성이었던 경우는 없었다. 국내에서 *C. difficile* 독소 A와 독소 B를 각각 검사하여 비교한 연구로는, 중합효소 연쇄반응법을 이용한 *C. difficile* 독소 A 유전자 및 독소 B 유전자 검출에 관한 보고가 있는데[20] 이 논문에서는 독소 A 유전자가 검출되었던 균주 모두에서 독소 B 유전자가 검출되었으며 독소 A 유전자가 검출되지 않았던 22균주 모두 독소 B 유전자도 검출되지 않았다고 보고하였다.

향후 CDA 2를 이용한 독소 A검사와 세포독성검사 및 배양검사 등을 계속하여 독소 A 음성, 독소 B 양성인 균주의 임상적인 의의를 밝힐 필요가 있겠고, 이러한 검사법들과 중합효소 연쇄반응법을 이용한 *C. difficile* 독소 A 유전자 및 독소 B 유전자 검출법과의 비교 연구가 필요하리라 생각된다.

결 론

항균제 유발 설사증이나 위막성 대장염을 진단하기 위하여 *C. difficile* 독소 A 검사가 의뢰되었던 267개의 변검체로, 자동화 시스템을 사용하는 *C. difficile* 독소 A 형광효소면역검사(VIDAS *C. difficile* Toxin A II, CDA 2)와 *C. difficile* 배양검사를 실시하였으며, 이중 82검체로 세포독성검사를 실시하여 CDA 2의 민감도와 특이도를 측정하고자 하였다.

1. 독소 A 양성률은 26.2%, 배양 양성은 17.6%로 독소 A 양성률이 유의하게 높았으며, 독소 A검사와 배양검사의 일치율은 82.4%이었다.

2. 세포독성검사를 표준법으로 간주하였을 때, 독소 A검사(CDA 2)의 민감도는 89.4%, 특이도는 100%이었으며, 두 방법간에 통계적으로 유의한 차이는 없었으므로, CDA 2검사를 *C. difficile* 독소 A의 일상검사로 사용할 수 있다고 판단되었다.

3. 독소 A는 음성이었으나 세포독성검사에서 독소 B 양성이었던 5예는 독소 A 음성, 독소 B 양성인 드문 균주일 가능성이 있으나 *C. difficile*을 분리하지 못하여 이를 증명하지는 못하였다.

참 고 문 헌

1. Griffin GE. *Clostridium difficile. In: Farthing MJG and Keusch GT eds. Enteric infection. 1st ed. London: Chapman and Hall Ltd, 1989:327-36.*
2. Lyerly DM, Lockwood DE, Richardson SH, Wilkins TD. *Biological activities of toxins A and B of Clostridium difficile. Infect Immun 1982;35:1147-50.*
3. Mitchell TJ, Ketley JM, Haslam SC, Stephen J, Burdon DW, Cancy DCA, et al. *Effect of toxin A and B of Clostridium difficile on rabbit ileum and colon. Gut 1986;27:78-85.*
4. Borriello SP. *Pathogenesis of Clostridium difficile infection of the gut. J Med Microbiol 1990;33:207-15.*
5. Lyerly DM, Krivan HC, Wilkins TD. *Clostridium difficile: Its disease and toxins. Clin Microbiol Rev 1988;1:1-18.*
6. Shanholtzer CJ, Willard KE, HolterJJ, Olson MM, Gerding DN, Peterson LR. *Comparison of the VIDAS Clostridium difficile toxin A immunoassay with C. difficile culture and cytotoxin and latex tests. 1992;30:1837-40.*
7. Whittier S, Shapiro DS, Kelly WF, Walden TP, Wait KJ, McMillon LT, et al. *Evaluation of four commercially available enzyme immunoassays for laboratory diagnosis of Clostridium difficile-associated diseases. J Clin Microbiol 1993;31:2861-5.*
8. Lyerly DM, Neville LM, Evans DT, Fill J, Allen S, Greene W, et al. *Multicenter evaluation of the Clostridium difficile TOX A/B TEST. J Clin Microbiol 1998;36:184-90.*
9. Fan K, Morris AJ, Reller LB. *Application of rejection criteria for stool cultures for bacterial enteric pathogens. J Clin Microbiol 1993;31:2233-5.*
10. 이희주, 정윤섭. *Clostridium difficile* 질환 진단을 위한 세포독소시험과 정량배양의 비교. 대한임상병리학회지 *1993;13:461-6.*
11. 이성희, 배직현. VIDAS를 이용한 *Clostridium difficile* Toxin A 검사의 임상적 고찰. 대한임상병리학회지 *1996;16:563-9.*
12. Mattia AR, Doern GV, Clark J, Holden J, Wu L, Ferraro MJ. *Comparison of four methods in the diagnosis of Clostridium difficile disease. Eur J Clin Microbiol*

Infect Dis 1993;12:882-6.

13. Butler RC. *Performance of a new VIDAS C. difficile Toxin A II assay (CDA 2) compared to cytotoxicity and Meridian Premier. American Society for Microbiology. 97th general meeting. Abstracts. 1997;166 (C-262).*
14. De Girolami PC, Longhi L, Carlson J, Werner K, Amato S. *Evaluation of VIDAS C. difficile Toxin A II Assay. American Society for Microbiology. 97th general meeting. Abstracts. 1997;166 (C-263).*
15. Borriello SP, Wren BW, Hyde S, Seddon SV, Sibbons P, Krishna MM, et al. *Molecular, immunological, and biological characterization of toxin A-negative, toxin B-positive strain of Clostridium difficile. Infect Immun 1992;60:4192-9.*
16. Lyerly DM, Barroso LA, Wilkins TD, Depitre C, Corthier G. *Characterization of toxin A-negative, toxin B-positive strain of Clostridium difficile. Infect Immun 1992;60:4633-9.*
17. Depitre C, Delmee M, Avesani V, L' Haridon R, Roels A, Popoff M, et al. *Serogroup F strains of Clostridium difficile produce toxin B but not toxin A. J Med Microbiol 1993;38:434-41.*
18. Kato H, Kato N, Watanabe K, Iwai N, Nakamura H, Yamamoto T, et al. *Identification of toxin A-negative, toxin B-positive Clostridium difficile by PCR. J Clin Microbiol 1998;36:2178-82.*
19. Kader HA, Piccoli DA, Jawad AF, McGowan KL. *Single toxin detection inadequate to diagnose Clostridium difficile diarrhea in pediatric patients. Gastroenterology 1998;115:1329-34.*
20. 이혁민, 김영아, 박광일, 이경원, 정윤섭. *Clostridium difficile* 분리주에서의 중합효소 연쇄반응법을 이용한 B 독소 유전자의 검출. 대한임상미생물학회지 *1999;2:77-81.*