

Implementation of Multiplex PCR for Species Identification and Toxin Typing in Toxigenic *Clostridium difficile* Culture

Yun Ha Jang, Jaewoo Chung, Seungmi Baek, Sookja Park, Heungsung Sung, Mi-Na Kim

Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul, Korea

Background: We evaluated multiplex PCR for species identification and toxin typing to improve the sensitivity and turnaround time of toxigenic *Clostridium difficile* culture (TCDC).

Methods: We performed multiplex PCR using primers targeting the species-specific gene, *tpi*, and the toxin genes, *tcdA* and *tcdB*. From January to March 2008, 528 stool specimens were tested with direct toxin assay (DT) using *C. difficile* Tox A/B II (Techlab, Blacksburg, USA) and TCDC. For 288 specimens from early study period, toxin production by *C. difficile* isolates of TCDC was measured by enzyme immunoassay with culture supernatants using VIDAS *C. difficile* Toxin A&B (CDAB; bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) and multiplex PCR with isolated colonies. For 240 specimens from late period, only multiplex PCR was used to test toxin production by the isolates.

Results: During the early period, 29 *C. difficile* were isolated and their toxin-positive rates were 65.5% by PCR and 44.8% by CDAB ($P < 0.05$). Among 528 stool specimens, the results of DT+/TCDC+, DT+/TCDC-, and DT-/TCDC+ were 32 (6.1%), 33 (6.3%), and 10 (1.9%), respectively, when tested with PCR. 13.3% of total 75 positive specimens was detected only by TCDC. Of the 42 toxigenic *C. difficile* isolates, all were positive for *tpi*, 30 (71.4%) were *tcdA*+/*tcdB*+, and 12 (28.6%) were *tcdA*-/*tcdB*+

Conclusion: TCDC using multiplex PCR for species identification and toxin typing is sensitive and rapid to be used as a routine diagnostic test. (Korean J Clin Microbiol 2009;12:11-16)

Key Words: *Clostridium difficile*, Toxin, Polymerase chain reaction

서 론

*Clostridium difficile*은 혐기성 아포형성 그람양성 간균으로 항생제 관련 대장염(antibiotics-associated colitis)의 20~30%를 차지하는 가장 중요한 원인균으로서 전형적으로 위막성 대장염(pseudomembranous colitis)을 일으킨다[1]. 독소생성 *C. difficile*만이 병원성이 있고 308 kDa 장독소인 독소 A (TcdA), 270 kDa의 강력한 세포독소인 독소 B (TcdB)가 중요한 병원성 인자이다. *C. difficile* 관련 감염(*C. difficile*-associated disease; CDAD)의 확진에는 이 독소를 대변 검체에서 직접 검출하는 법과 대변에서 *C. difficile*을 배양하여 독소 생성 여부를 검사하는 방법이 사용된다[2]. 직접독소검사에는 세포독성검사가 'gold standard'로서 사용되지만, 까다롭고 수기시간이 긴데다가 48시간까지 관독해야 하기 때문에 임상검사실에서 사용에 제한점이 있다[3,4]. 이에 비해 효소면역법은 자동화가 가능하고, 검사소요시

간이 1~2시간 정도로 당일에 결과를 얻을 수 있어서 CDAD의 신속진단에 필수적인 검사로 사용되고 있으나[2] 다른 검사법들과 비교했을 때 민감도와 특이도가 떨어지기 때문에[3,5] 단독으로 이용하기는 어렵다[6,7]. 분자생물학적 검사로 검체에서 독소유전자를 직접 검출하려는 시도가 있지만, 대변검체라는 특성상 민감도가 떨어지는 문제가 있는데 최근 실시간중합효소연쇄반응검사로 우수한 결과를 얻었다는 보고가 있다[2]. 독소생성 *C. difficile* 배양법은 직접독소검사에 비해 민감도가 높아서 직접독소검사와 상호보완적이기 때문에 직접독소검사와 독소생성 *C. difficile* 배양법을 병용하는 것이 권장된다[2,3].

본 검사실에서는 CDAD 진단검사로서 대변검체에 대해 효소면역법에 의한 직접독소검사와 독소생성 *C. difficile* 배양 검사를 실시하고 있고 *C. difficile* 분리주에 대한 독소 생성 확인 검사는 효소면역법으로 검사하여 왔으나, *C. difficile* 분리주에서 독소검출 민감도를 높이고 검사소요시간을 단축하기 위해 중합효소연쇄반응법으로 독소유전자를 검사하는 방법을 도입하고자 평가하였다.

Received 25 August, 2008, Revised 3 December, 2008

Accepted 20 January, 2009

Correspondence: Mi-Na Kim, Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, 388-1, Pungnap-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea. (Tel) 82-2-3010-4511, (Fax) 82-2-478-0884, (E-mail) mnkim@amc.seoul.kr

재료 및 방법

1. 대상

2008년 1월 14일부터 3월 8일까지 서울아산병원에서 *C. difficile* 직접독소검사 및 배양검사가 함께 의뢰된 변 검체 528개를 대상으로 하였다.

2. 직접독소검사

모든 검체는 *C. difficile* Tox A/B II (Techlab, Blacksburg, USA)를 이용하여 효소면역법으로 직접독소검사를 하였다.

3. 독소 생성 *C. difficile* 배양

대변검체와 알코올을 1 : 1로 혼합하여 1시간 동안 알코올 아포 선택 후 *Clostridium difficile* selective agar (CDSA, BBL, Cockeysville, USA)에 접종하였다. 이틀간 혐기성 조건에서 배양한 후 CDSA 배지에서 커다랗고 노란색인 집락을 선택하여 K1532B PROLINE 디스크(Key Scientific Products, Round Rock, USA)를 이용하여 proline aminopeptidase (PRO) 즉석 검사를 실시하였다. PRO 디스크에 균주를 희석해서 양성이면 *C. difficile* 로 예비동정하고 다음과 같이 독소생성 검사를 시행하였다. 전반기 288개 검체에서 배양된 분리주는 thioglycollate 액체배지에 하룻밤 증균하여 원심분리한 상층액에서 VIDAS *C. difficile* Toxin A&B (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)를 이용하여 독소를 검출하는 방법과 균주의 DNA를 추출하여 다중 PCR 검사로 독소유전자를 검사하는 방법을 실시하여 두 가지 독소생성 확인 검사의 수행능을 비교하였다. 후반기 240개 검체에서 배양된 분리주는 다중중합효소연쇄반응검사뿐만 독소 유전자를 검사하였다.

4. 종동정과 독소 검출을 위한 다중중합효소연쇄반응 검사

기준에 보고되었던 방법에 따라 다중중합효소연쇄반응검사로 독소 검출을 실시하였다[9]. 간략히 기술하면 중합효소연쇄반응에 사용한 시발체는 *C. difficile* 종특이적인 *tpi* gene을 목표로 한 *tpi*-F와 *tpi*-R 시발체 1쌍, *tcdA* 특이 시발체로 *tcdA*-F와 *tcdA*-R을, *tcdB* 특이 시발체로 *tcdB*-F와 *tcdB*-R을 사용하였다. PCR 반응 조건은 처음에 95°C에서 3분간 변성한 후, 각 사이클마다 변성 단계로 95°C, 30초, 결합 단계는 처음 1~11사이클까지는 65°C에서 30초로 시작하여 55°C까지 한 사이클에 1°C씩 낮추어 시행하였고 그 후 cycle은 55°C도로 유지하였으며, 연장단계는 72°C에서 30초로 하여 각 단계를 40사이클 반복하였다. 마지막 연장 반응은 72°C에서 10분간 실시하였다[9]. 증폭산물을 2% agarose gel (Promega, Madison, WI, USA)에 전기영동하여 *tpi*, *tcdA*, *tcdB* 및 *tcdA*의 결실된 산물에 각각 특이적인 230 bp, 369 bp, 160 bp 및 110 bp의 band를 확인하였

다. TCDC에서 독소생성 확인을 위한 효소면역법과 PCR법을 비교하기 위한 29균주는 DNA 추출 시 GenElute bacterial genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)와 InstaGene (Bio-Rad, Hercules, USA)에 풀어서 비등하는 방법 등 2가지 방법을 동시에 사용하여 비교하였다.

결 과

1. 독소 중합효소연쇄반응검사의 평가

전반부에 29주의 *C. difficile*이 분리되어 효소면역법과 PCR법을 비교평가하였다. PCR로 확인하였을 때 19주(65.5%)에서 독소 유전자가 양성되었고, *tcdA*+/*tcdB*+ 12주, *tcdA*-/*tcdB*+ 7주, *tcdA*-/*tcdB*- 10주였다. 효소면역법에서는 9주가 독소양성, 4주가 equivocal로 양성결과에 양성만을 포함시키면 31.0%, equivocal까지 포함시키면 44.8%만 양성으로 PCR로 확인할 때보다 양성률이 낮았다($P < 0.05$). *tcdA*+/*tcdB*+인 균주 중 5주가 양성, 2주가 equivocal, *tcdA*-/*tcdB*+ 중 4주가 양성, 2주가 equivocal이었으며, *tcdA*-/*tcdB*- 균주는 효소면역법에서 모두 음성이었다(Table 1).

모든 분리주에서 *C. difficile* 특이적인 230 bp *tpi* 유전자 산물이 양성으로 PRO 법으로 동정한 결과와 100% 일치하였다. *tcdA*+/*tcdB*+인 균주는 379 bp와 160 bp의 산물을 보이고, *tcdA*-/*tcdB*+인 균주는 379 bp의 *tcdA* 유전자 산물 대신 *tcdA*의 결손된 산물인 110 bp의 산물을 보였다(Fig. 1). GenElute법으로 추출한 DNA를 사용한 PCR 산물에 비해 비등법으로 추출한 DNA의 PCR 산물이 전기영동결과에서 약한 밴드를 보였으나 판독 결과는 모든 검체에서 일치하였다(Fig. 1).

2. 직접독소검사와 독소생성 *C. difficile* 배양 검사결과

직접독소검사 양성 검체는 총 65검체로 12.3%의 양성률을 보였고, 독소생성 *C. difficile*은 42주가 분리되어 8.0%의 양성률을 보였다. PCR법으로 독소생성 *C. difficile*을 확인한 전체

Table 1. Concordance between multiplex PCR and enzyme immunoassay using VIDAS *C. difficile* Toxin A&B (CDAB) for toxin production among 29 *C. difficile* isolates

CDAB	No. of isolates with toxin profile by multiplex PCR			
	A+B+	A-B+	A-B-	Total
Positive	5	4	0	9
Equivocal	2	2	0	4
Negative	5	1	10	16
Total	12	7	10	29

Abbreviations: A+B+, *tcdA*+/*tcdB*+; A-B+, *tcdA*-/*tcdB*+; A-B-, *tcdA*-/*tcdB*-.

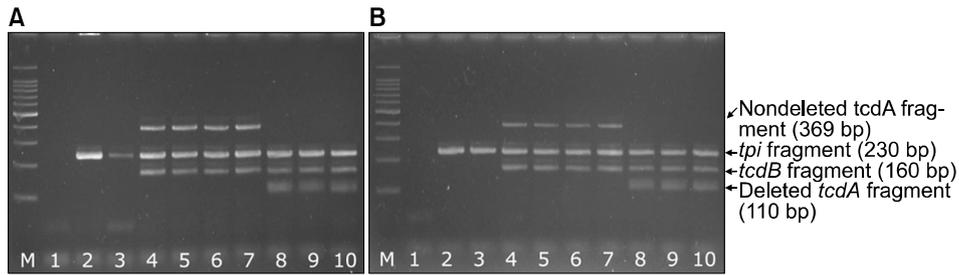


Fig. 1. Electrophoresis of the PCR products of nine isolates of *C. difficile* using DNA templates extracted with GenElute bacterial genomic DNA kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) (A) and boiling method (B) in parallel. The bands on all lanes of A are consistently denser than those of B except lane 3. Lane M; 100 bp DNA ladder, Lane 1; negative control, Lane 2 and 3; positive for species specific gene (*tpi*) but negative for toxin genes (*tcdA* and *tcdB*), indicating nontoxigenic strains, Lane 4-7; positive for *tpi*, *tcdA*, and *tcdB* genes, indicating A+B+ toxigenic strains, Lane 8-10; positive for *tpi*, and *tcdB*, but negative (deleted) for *tcdA* gene, indicating A-B+ toxigenic strains.

Table 2. Concordance between direct toxin assay and toxigenic *C. difficile* culture

	Number of isolates				
	Total	No growth	A+B+	A-B+	A-B-
DT+/TCDC+	32	-	22	10	-
DT-/TCDC+	10	-	8	2	-
DT+/TCDC-	33	28	-	-	5
DT-/TCDC-	453	443	-	-	10
Total	528	471	30	12	15

Abbreviations: A+B+, *tcdA*+/*tcdB*+, A-B+, *tcdA*-/*tcdB*+, A-B-, *tcdA*-/*tcdB*-; DT, direct toxin assay; TCDC, toxigenic *C. difficile* culture.

528개 검체 중 DT와 TCDC 검사의 일치율은 91.9%였고, DT+/TCDC+, DT+/TCDC-, DT-/TCDC+인 검체는 각각 32 (6.1%), 33 (6.3%), 10 (1.9%)개로 하나라도 양성인 총 75검체 중 10검체(13.3%)는 TCDC에서만 검출되었다(Table 2). 전반기에 *C. difficile* 배양에서 효소면역법으로 독소생성 확인검사를 실시한 288검체 중 DT+/TCDC+, DT+/TCDC-, DT-/TCDC+인 검체가 각각 11 (3.8%), 26 (9.0%), 2 (0.7%)개로 총 양성률이 13.5%였는데 PCR 확인검사를 할 때 각각 15 (5.2%), 22 (7.6%), 4 (1.4%)로 총 양성률이 14.2%로 증가하였다. 또한 양성검체 중 TCDC가 검출하는 경우가 33.3%에서 46.3%로 증가하고, TCDC로만 검출되는 검체도 5.1%에서 9.7%로 증가하였다.

3. *C. difficile* 배양 분리주의 독소 유전자 양성

C. difficile 분리주 57주 중 42주가 독소 생성을 하였다. 이들의 독소유전자형은 *tcdA*+/*tcdB*+, *tcdA*-/*tcdB*+가 각각 30 (71.4%), 12 (28.6%)주의 분포를 보였다. *C. difficile*이 분리된 검체의 직접독소검사 결과는 *tcdA*+/*tcdB*+ 균주가 분리될 때 73.3% (22/30), *tcdA*-/*tcdB*+ 균주가 분리될 때 83.3% (10/12)가

양성이었다.

고 찰

이번 연구의 목적은 기존의 효소면역법으로 검출했던 독소 생성 *C. difficile*의 배양 검사에 PCR법을 도입하여 독소생성 *C. difficile* 배양 검사의 민감도를 높이고 검사소요시간을 단축하는 것이었다. 전반기 29주에 대해 PCR법과 효소면역법의 독소 양성률은 각각 65.5%, 44.8%로 PCR법을 사용하였을 때 양성률이 높아져서 PCR법을 적용함으로써 독소생성 검출률을 높일 수 있었다. *C. difficile* 분리주의 독소생성검사에 사용한 VIDAS Toxin A&B 검사는 대변에서 직접 독소검사를 하는 목적으로 개발되었지만 제품설명서에 *C. difficile* 배양 분리주에 대해 독소생성 검출능을 평가한 결과가 있다. 이에 따르면 23 균주의 *tcdA*+/*tcdB*+인 23주는 모두 독소 양성으로 검출되었지만, *tcdA*-/*tcdB*+인 18주 중 15주만 양성으로[10] 따라서 *tcdA*-/*tcdB*+인 균주에 대해서는 민감도가 떨어졌다. 본 연구에서 *tcdA*-/*tcdB*+인 균주가 24%에 달하고, 국내 다른 연구에서도 병원에 따라 21.4%[6], 45.7%[7,8]이었다는 보고가 있어서 *C. difficile* 분리주의 독소생성 확인에 효소면역법을 사용하는 것이 문제가 될 수 있다. 하지만, 본 연구에서 *tcdA*+/*tcdB*+ 균주가 배양된 검체와 *tcdA*-/*tcdB*+ 균주가 배양된 검체에서 효소면역법에 의한 독소생성은 각각 83.3% (25/30), 91.7% (11/12)로 *tcdA*-/*tcdB*+에서 효소면역법의 민감도가 더 떨어지는 않았다. 따라서 효소면역법의 위음성결과에 다른 요인이 있을 것으로 추정하였다. 효소면역법으로 독소생성 균주를 확인할 때 제품설명서에는 yeast peptone broth에서 키웠다고 되어있으나, 본 연구에서는 thioglycollate broth에 하룻밤 배양한 상청액을 사용했기 때문에 균 농도나 배지성분이 효소면역법의 결과에 영향을 주었을 가능성이 있다. 따라서 효소면역법을 사용할 때는 균을 배양하는 배지종류 및 배양시간 등의 조건을 표준화할

필요가 있다. *C. difficile* 분리주의 독소생성 검사에 세포독성검사는 효소면역법보다 더 우수한 수행능을 보인다[3,11]. 하지만, 세포독성검사는 모든 검사실에서 사용하기는 어렵고, 검사에 48~72시간이 더 소요되는 점은 임상적 유용성을 떨어뜨린다.

본 연구에서 독소생성 *C. difficile* 배양에서 분리주의 독소생성 검사에 PCR법을 적용하였을 때 양성률을 높이고, 직접독소검사와 일치율 또한 증가하였다. PCR 검사는 분리주에서 독소생성검사를 할 때 민감도와 특이도를 평가하는 'gold standard' 법으로 액체배지에서 균성장 정도, 배지성분, 고체배지에서 집락수에 영향을 받지 않는다[11]. 또한 세포독성검사를 하지 않는 검사실에서 비교적 용이하게 적용할 수 있고 배양된 집락에서 바로 핵산을 추출할 수 있어서 효소면역법이나, 세포독성법을 적용할 때 액체배지 계대배양이 필요한 것과 비교하면 어느 검사보다도 신속하게 결과를 얻을 수 있는 장점이 있다[9]. 따라서 임상검사실에서 독소생성 *C. difficile* 배양 분리주의 독소생성 검사에 PCR법이 더 적합하다고 생각된다.

전반기 검체에서 직접독소법에서 양성률이 12.8%인데 비해 효소면역법으로 독소생성을 확인하는 배양법에서는 4.5%, PCR로 확인할 때에도 6.6%에 불과했다. 직접 독소검사가 배양법보다 민감한 것은 Kang 등[12]이 독소A를 검출하는 VIDAS CDAII를 이용한 직접독소검사와 *C. difficile* 배양결과를 비교했을 때 각각의 양성률 26.2%, 17.6%로 직접 독소검사가 배양법보다 양성률이 높았던 것과 유사하다. 이 연구에서는[12] *C. difficile* 분리주에 대해 독소생성 확인검사를 시행하지 않았기 때문에 독소생성 *C. difficile*의 배양 양성률은 더 떨어질 것이다. 외국의 보고에서는 직접독소법에 비해 배양법의 민감도가 높는데 이처럼 배양법의 민감도가 떨어지는 데는 배양의 민감도와 독소생성 확인검사의 민감도 둘 다가 요인이 될 수 있다. 배양의 민감도를 결정하는 요인으로는 혐기성배양에서 접종 전 환원된 배지를 사용하는 방법, CCFA 등 선별감별배지를 사용하는 방법, 아포의 발아를 촉진하기 위해 알코올 아포선택법, 열처리법, taurocholate 등을 이용하는 방법 등이 알려져 있다 [13,14]. 본 연구에서 알코올 아포선택법과 CDSA배지를 사용하였음에도 민감도가 낮아 향후 개선이 필요하였다. 그러나 본 연구에서도 독소생성 *C. difficile* 배양검사를 통해 13.3%의 *C. difficile* 독소 양성 검체를 더 검출하는 효과가 있었다. 미국 John's Hopkins 병원에서 439개의 대변 검체에 대한 연구에서는 세포독성검사를 이용한 직접독소검사 양성률은 25.5%, 배양검사의 양성률은 28.4%로 서로 비슷하였고, 직접독소검사에서는 20개를, 배양검사에서는 33개를 더 검출해낼 수 있었다 [3]. 이처럼 배양법은 직접독소검사를 보완할 수 있는 중요한 검사이며, 특히 직접독소 검사에 세포독성검사 대신 효소면역법을 사용하는 검사실은 독소생성 *C. difficile* 배양검사를 반드시 병용하도록 권장된다[2].

Lemee 등[9]은 독소생성 *C. difficile* 배양 검사에 독소생성화인에 PCR법을 적용했을 때 36~48시간 이내 결과를 보고할 수 있다고 하였다. 집락 판독 당일 PCR 검사를 하기 위해서는 핵산 추출방법이 신속, 간편할 필요가 있다. 비등법으로 *C. difficile* 분리주에서 핵산을 추출하여 PCR을 실시한 보고가 있어 [11] 본 연구에서 비등법과 GenElute법으로 추출한 DNA를 사용한 PCR 결과를 비교하였을 때 100% 판독결과가 일치하여 *C. difficile*의 핵산 추출에 비등법을 사용해도 될 것으로 판단하였다. Lemee 등이 개발한 특이적인 *tpi* 유전자 시발체를 이용한 다중 PCR은 *C. difficile* 종동정을 검하도록 구성되어 있는 것이 장점이다. 이 연구에서 CDSA 배지에 전형적인 집락을 골라 PRO 즉석 검사를 실시하여 *C. difficile*로 예비동정한 분리주는 PCR에서 모두 *C. difficile* 종특이 유전자가 관찰되어 PRO 예비동정의 정확도를 검증할 수 있었다. 이 연구에서 선택감별배지로 사용한 CDSA 배지는 CCFA보다 더 선택 효과가 뛰어나지만 *Clostridium* 중 *C. butyricum*, *C. sordellii* 등이 자랄 수 있어 동정검사가 필요하다[15]. *C. sordellii*를 제외하고는 PRO 디스크법에서 음성이기 때문에 감별해낼 수 있고[5,16], *C. sordellii*는 CCFA의 fructose는 분해하지만, CDSA배지의 mannitol은 발효하지 못하기 때문에 *C. difficile*과 감별할 수 있을 것으로 추정된다[5,17]. PRO 예비동정의 정확성이 높기 때문에 *tpi* 유전자의 산물은 독소 형별에 대한 시발체와 더불어 *C. difficile* 독소유전자 증폭에 대한 내부대조물질로서 역할을 할 수 있다.

TCDC 양성인 검체 중 *tcdA-tcdB*+인 검체는 28.6%로 이 비율은 서울의 3차 병원들에서 보고한 2006년 분리주 중 27.1%였다는 보고[6]와는 유사하고 2004년에서 2005년 사이 371명의 환자 검체에서 분리된 균주에서 보고된 54.5%[7]보다는 낮은 비율이었다. 국내 3차 병원에서 1980년에서 2006년까지의 검체들을 조사한 연구에서 2005년 이전 14.6%에서 2006년에는 27.1%로 크게 증가하는 등[6] *tcdA-tcdB*+인 균주는 계속적으로 증가하고 있는 것으로 보인다. 최근 세계적으로도 *tcdA-tcdB*+ 균주에 의한 대장염의 증례가 늘고 있고[3,18,19] 심각한 증상을 보이는 비율이 높아져[20] *tcdA-tcdB*+ 균주는 유행을 잘 일으키고 병원성이 더 높다고 알려져 있다. 독소생성 *C. difficile* 중 *tcdA*-인 균의 비율은 미국 0.2%[21], 유럽 2~3%[21,22], 일본 39%[24], 아르헨티나 97.9%[25] 등 큰 차이를 보이고 있어서 지역적인 차이가 크다. 또한 주로 병원 내 감염으로 전파되는 *C. difficile*의 특징을 고려해볼 때 병원별로 *tcdA-tcdB*+ 균주 비율은 큰 차이를 보일 수 있다. PCR법을 적용하여 독소 형별 검사를 하면, 이와 같은 병원 내 역학적 문제를 파악하는 자료로도 사용할 수 있을 것이다.

결론적으로 PCR 독소 확인법을 이용한 독소 생성 *C. difficile* 배양법은 직접독소검사의 민감도를 보완해줄 수 있고, 동시에 독소형별을 판정할 수 있으며, 세포독성검사에 비해 간편하고 신속하여 임상검사실에서 CDAD 진단법으로 적용하면 유용할

것으로 판단하였다.

참 고 문 헌

- Moncrief JS, Zheng L, Neville LM, Lyerly DM. Genetic characterization of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* isolates by PCR. *J Clin Microbiol* 2000;38:3072-5.
- Delmée M, Van Broeck J, Simon A, Janssens M, Avesani V. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea: a plea for culture. *J Med Microbiol* 2005;54:187-91.
- Reller ME, Lema CA, Perl TM, Cai M, Ross TL, Speck KA, et al. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2007;45:3601-5.
- Park HK, Lee YM, Jang HJ, Kim CM, Lee K, Jeong SH, et al. Direct detection of *Clostridium difficile* toxin B gene by nested PCR in human stool specimens. *Korean J Clin Microbiol* 2003; 6:63-8.
- Fedorco DP and Williams EC. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 1997;35:1258-9.
- Kim H, Riley TV, Kim M, Kim CK, Yong D, Lee K, et al. Increasing prevalence of toxin A-negative, toxin B-positive isolates of *Clostridium difficile* in Korea: impact on laboratory diagnosis. *J Clin Microbiol* 2008;46:1116-7.
- Shin BM, Kuak EY, Yoo SJ, Shin WC, Yoo HM. Emerging toxin A-B+ variant strain of *Clostridium difficile* responsible for pseudo-membranous colitis at a tertiary care hospital in Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60:333-7.
- Shin BM and Kuak EY. Characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive variant strain of *Clostridium difficile*. *Korean J Lab Med* 2006;26:27-31.
- Lemee L, Dhalluin A, Testelin S, Mattrat MA, Maillard K, Lemeland JF, et al. Multiplex PCR targeting *tpi* (triose phosphate isomerase), *tcdA* (Toxin A), and *tcdB* (Toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2004;42:5710-4.
- bioMérieux. VIDAS *C. difficile* Toxin A&B manual. Marcy-l'Etoile, France, 2007:7.
- Chouicha N and Marks SL. Evaluation of five enzyme immunoassays compared with the cytotoxicity assay for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in dogs. *J Vet Diagn Invest* 2006;18: 182-8.
- Kang JO, Chae JD, Eom JI, Han DS, Park PW, Park IK, et al. Comparison of *Clostridium difficile* toxin A immunoassay with cytotoxicity assay. *Korean J Clin Microbiol* 2000;3:43-7.
- Murray P. ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington; ASM Press, 2007:899.
- Kamiya S, Yamakawa K, Ogura H, Nakamura S. Effect of various sodium taurocholate preparations on the recovery of *Clostridium difficile* spores. *Microbiol Immunol* 1987;31:1117-20.
- BD Diagnostic Systems ed. *Difco & BBL Manual*. 1st ed. Sparks, MD USA, 2003:148.
- Garcia A, Garcia T, Pérez JL. Proline-aminopeptidase test for rapid screening of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 1997;35:3007.
- Elsayed S and Zhang K. Positive *Clostridium difficile* stool assay in a patient with fatal *C. sordellii* infection. *N Engl J Med* 2006; 355: 1284-5.
- Blake JE, Mitsikosta F, Metcalfe MA. Immunological detection and cytotoxic properties of toxins from toxin A-positive, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. *J Med Microbiol* 2004;53:197-205.
- van den Berg RJ, Claas EC, Oyib DH, Klaassen CH, Dijkshoorn L, Brazier JS, 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;42:1035-41.
- Ricciardi R, Rothenberger DA, Madoff RD, Baxter NN. Increasing prevalence and severity of *Clostridium difficile* colitis in hospitalized patients in the United States. *Arch Surg* 2007;142:624-31.
- 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.
- Brazier JS, Stubbs SL, Duerden BI. Prevalence of toxin A negative/B positive *Clostridium difficile* strains. *J Hosp Infect* 1999;42:248-9.
- Barbut F, Lalande V, Burghoffer B, Thien HV, Grimprel E, Petit JC. Prevalence and genetic characterization of toxin A variant strains of *Clostridium difficile* among adults and children with diarrhea in France. *J Clin Microbiol* 2002;40:2079-83.
- Komatsu M, Kato H, Aihara M, Shimakawa K, Iwasaki M, Nagasaka Y, et al. High frequency of antibiotic-associated diarrhea due to toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* in a hospital in Japan and risk factors for infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:525-9.
- Legaria MC, Lumelsky G, Rosetti S. *Clostridium difficile*-associated diarrhea from a general hospital in Argentina. *Anaerobe* 2003;9: 113-6.

=국문초록=

Toxigenic *Clostridium difficile* 배양에서 중동정과 독소확인 다중 PCR 검사의 적용

울산대학교 의과대학 서울아산병원 진단검사의학과

장윤하, 정재우, 백승미, 박숙자, 성홍섭, 김미나

배경: Toxigenic *C. difficile* 배양검사(TCDC)의 민감도를 높이고 검사소요시간을 단축하기 위해 중동정과 독소유전자형 검사를 하는 다중 PCR 검사를 평가하였다.

방법: *C. difficile* 특이 *tpiF* 유전자와 *tcdA*, *tcdB* 독소유전자에 특이적인 시발체를 사용하여 다중 PCR를 실시하였다. 2008년 1월 14일부터 3월 8일까지 검사실에 *C. difficile* 독소와 배양이 함께 의뢰된 528개 대변 검체에 대해 Tox A/B II로 직접독소검사(DT)와 TCDC 검사를 함께 실시하였다. TCDC 검사에서 전반부 288개 검체에서 배양된 분리주는 VIDAS *C. difficile* Toxin A/B (CDAB; bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France)를 이용한 효소면역검사법과 PCR법을 동시에 시행하여 비교하였고, 후반부 240개 검체는 PCR 검사로만 독소생성을 확인하였다.

결과: 전반부 검체에서 29주의 *C. difficile*이 분리되었고 독소 양성률은 PCR 검사에서 65.5%, CDAB 검사에서 44.8%였다 ($P < 0.05$). 전체 528검체 중 DT+/TCDC+, DT+/TCDC-, DT-/TCDC+ 결과를 보이는 검체가 PCR을 이용하여 독소확인을 했을 때 각 32 (6.1%), 33 (6.3%), 10 (1.9%)개였다. 총 75개의 양성 검체 중 13.3%를 TCDC에서만 검출하였다. 전체 42주의 독소양성 분리주 모두 *tpi* 양성으로 중동정을 확인하였고, 30주(71.4%)는 *tcdA*+/*tcdB*+, 12주(28.6%)는 *tcdA*-/*tcdB*+였다.

결론: TCDC에서 중동정과 독소형 확인에 다중 PCR법을 적용함으로써 민감도, 신속성을 향상시켜서 진단검사로서 수행능을 개선할 수 있을 것이다. [대한임상미생물학회지 2009;12:11-16]

교신저자 : 김미나, 138-736, 서울시 송파구 풍납2동
서울아산병원 진단검사의학과
Tel: 02-3010-4511, Fax: 02-478-0884
E-mail: mnkim@amc.seoul.kr