

Evaluation of a ChromID *C. difficile* Agar for the Isolation of *Clostridium difficile*

Ji-Sook Yim, Seock-Mi Hwang, Myungsook Kim, Hee-Joung Lim, Saeam Shin,
Hae-Sun Chung, Heejung Kim, Kyungwon Lee

Department of Laboratory Medicine and Research Institute of Bacterial Resistance,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: *Clostridium difficile* is the main etiologic agent of antibiotic-associated diarrhea and the most common cause of hospital-acquired diarrhea. Recently, the incidence of *C. difficile* infections (CDI) has increased and new highly virulent *C. difficile* strains have emerged. Therefore, accurate and rapid diagnosis is needed. We compared the results of using chromID *C. difficile* (chromID CD, bioMérieux, France) with the conventional *C. difficile* Selective Agar (CDSA; BD, USA) for the isolation of *C. difficile*.

Methods: A total of 738 stool specimens of suspected CDI patients at the Severance Hospital from July to August 2011 were inoculated onto CDSA. Among them, 104 stool specimens revealed colonies on CDSA that were then re-inoculated onto chromID CD. The stool samples were stored at -20°C until the time of the re-inoculation. Cultured agars were interpreted after 24 hrs and 48 hrs, respectively. Species

identification was performed on the basis of colony characteristics on agar plates as well as the ATB 32A system (API System SA, France).

Results: The recovery rates of CDSA and chromID CD were 30.1% and 77.5% after 24 hrs, and 77.5% and 98.6% after 48 hrs, respectively. All of the *C. difficile* isolates were recovered as typical gray/black colonies on chromID CD.

Conclusion: The performance of chromID CD for the isolation of *C. difficile* was better than that of conventional CDSA. The chromID CD could provide easy and sensitive detection of *C. difficile* even after 24hrs of incubation. (Korean J Clin Microbiol 2012; 15:88-91)

Key Words: ChromID *C. difficile*, Chromogenic agar, *Clostridium difficile* culture

서 론

*Clostridium difficile*은 절대 무산소성, 그람 양성, 아포 생성 막대균으로 항생제 관련 설사(antibiotic-associated diarrhea, AAD)와 위막성 대장염(pseudomembranous colitis, PMC)의 주요한 원인 균주이며, 입원 환자에서 발생하는 설사의 가장 흔한 원인균이다[1]. *C. difficile* 감염(*C. difficile* infection, CDI)은 무증상에서부터 사망에 이르기까지 임상양상이 다양하다[2]. 2003년 이후 미국과 캐나다, 유럽을 중심으로 재발률과 사망률이 높은 BI/NAP1/027 (Restriction Endonuclease Analysis Group BI/North American Pulsed-field Gel Electrophoresis Type 1, PCR ribotype 027)형에 의한 중증 CDI의 빈도가 증가함에 따라[3], CDI 진단에 대한 관심도 증가하고 있다.

CDI의 진단을 위해 국내에서 흔히 사용되는 *C. difficile* 독소 검사는 특이도는 높으나 민감도가 낮아 독소 검사에 음성인 경

우 민감도가 높은 검사법을 순차적으로 시행하는 알고리즘이 소개되기도 하였다[4-6].

CDI 진단의 표준법은 세포독성시험 혹은 toxigenic culture (*C. difficile* 배양과 독소생성 증명)인데[7], 두 방법 모두 검사 시간이 길고, 술기가 복잡한 단점이 있다. 또한 *C. difficile* 배양은 국내의 경우 신선 배지를 이용한 적합한 배양이 이루어지지 않아 배양률이 낮은 편이기 때문에[8], CDI의 정확하고 빠른 검사법이 필요하다.

Chromogenic enzyme 성분을 이용한 다양한 감별 배지는 미생물 검사에서 흔히 사용되고 있으며[9], 최근 *C. difficile*의 배양과 동정을 위한 chromogenic 배지가 소개되었다. 이에 본 연구에서는 기존의 선택배지와 chromogenic 배지의 *C. difficile* 배양률을 비교하여 chromogenic 배지가 기존의 선택배지를 대체할 수 있는지 평가해 보고자 하였다.

재료 및 방법

2011년 7월부터 8월까지 세브란스병원 입원 환자 중 CDI가

Received 6 February, 2012, Revised 20 March, 2012

Accepted 8 April, 2012

Correspondence: Heejung Kim, Department of Laboratory Medicine, Yonsei Severance Hospital, 255 Geumhak-ro, Cheoin-gu, Yonsei 449-930, Korea. (Tel) 82-31-331-8755, (Fax) 82-31-335-5551, (E-mail) hjkim12@yuhs.ac

의심되어 *C. difficile* 배양이 의뢰된 738개의 실사변 검체를 알코올 처리하여[10,11], *C. difficile* selective agar (CDSA; BD, Sparks, MD, USA)에 접종한 후, 혐기성 조건(Forma Scientific, Marietta, OH, USA)으로 37°C에서 48시간동안 배양 하였다. 배양 24시간, 48시간 후에 각각 판독하였고, CDSA에 균이 자란 경우 -20°C에 냉동 보관된 검체를 찾아서 일주일에 1회 chromID *C. difficile* agar (chromID CD, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)에 재접종하였다. 총 104검체를 재접종하였고, 같은 조건으로 배양하여 배양 24시간, 48시간 후에 각각 판독하였다. 동정은 집락의 전형적인 색과 형태를 기초(CDSA agar에서 2-4 mm 크기의 황색 또는 회백색의 불규칙한 모양의 집락, chromID CD agar에서 검정 또는 회색의 별모양 집락)로 특징적인 냄새와 그람 염색법 그리고 ATB 32A system (API System SA, La Balme les Grottes, Montalieu-Vercieu, France)을 이용하였다.

결 과

집락이 관찰된 104개의 검체 중 71개(9.6%, 71/738)의 검체에서 *C. difficile*이 분리되었다. 두 선택 배지의 분리 일치율은 83.7% (87/104)였고, 각각의 분리율은 CDSA가 77.5% (55/71), chromID CD가 98.6% (70/71)로 chromID CD의 배양률이 CDSA에 비해서 높았다.

배양에 필요한 시간을 비교해 보았을 때, 24시간 후에 배양된 경우가 CDSA 배지에서 30.1% (22/71), chromID CD에서 77.5% (55/71)로 chromID CD에서 배양 시간이 짧았다(Table 1). 배양 양성인 검체 중에서 chromID CD에서만 배양된 것이 22.5% (16/71), CDSA에서만 배양된 것이 1.4% (1/71)였다 (Table 1).

*C. difficile*의 전형적인 집락의 형태는 CDSA 배지에서 2-4 mm 크기의 황색 혹은 회백색의 불규칙한 모양이고, chromID CD 배지에서는 검은색 혹은 회색의 별모양이었다(Fig. 1). ChromID CD 배지에서 Non-*C. difficile* 군주가 분리된 검체수는 전체 104검체 중 33검체로 이 중 그람 음성 막대균이 가장 많았고, 그 외에 *Clostridium clostridioforme* 6검체, *Clostridium*

spp. 2검체, *Clostridium beijerinckii* 2검체였다(Table 2, Fig. 1).

고 찰

CDI의 진단을 위한 여러 가지 검사가 소개되었으나 아직도 많은 제한점이 있다. 세포독성 검사법은 1978년 소개된 이래 지금까지 CDI 진단의 표준 검사법으로 알려져 왔지만 [7,12,13], 시간이 오래 걸리고, 노동 집약적이며 세포 배양이 가능해야 한다는 문제가 있어, 검사실에서 사용이 제한적이다 [13,14]. 선택 배지를 이용한 배양법은 민감도는 높으나 독소를 생성하지 않는 균주로 인해 특이도가 낮고 검사 소요 시간이 길다는 것이 단점이다[15,16]. 하지만 균주의 분류와 항생제 내성의 확인, 새로운 균주의 발생 또는 집단 감염의 추이 관찰과 동정[14,17], 또 조직 세포독소 분석법에서 음성이나, 임상적으로 CDI가 강력히 의심될 경우, 새로운 *C. difficile* 검사법을 평가할 때 그리고 민감도가 낮은 효소 면역법의 보완에도 여전히 배양이 필요하다[12].



Fig. 1. Typical colonies of *Clostridium difficile* on chromID CD.

Table 1. Recovery rate (%) of *Clostridium difficile* on CDSA and chromID CD

	CDSA	ChromID CD
24 hr	30.1% (22/71)*	77.5% (55/71)
48 hr	46.5% (33/71)	21.1% (15/71)
Total	77.5% (55/71)	98.6% (70/71)

**C. difficile* recovered from 71 specimens.

Abbreviations: CDSA, *Clostridium difficile* Selective Agar; ChromID CD, chromID *C. difficile* agar.

Table 2. Non-*Clostridium difficile* isolates recovered on chromID CD from 104 stool samples

Organism	N of isolates recovered on chromID CD
Unidentified gram negative rod	23
<i>Clostridium clostridioforme</i>	6
<i>Clostridium</i> spp.	2
<i>Clostridium beijerinckii</i>	2
Total	33

Abbreviation: chromID CD, chromID *C. difficile* agar.

본 연구에서는 CDSA와 chromID CD 배지를 이용하여 *C. difficile* 배양을 한 결과, CDSA와 chromID CD 배양 양성률은 77.5% (55/71), 98.6% (70/71)로 chromID CD가 CDSA에 비해 높았다. 또한 CDSA에서는 분리되지 않고 chromID CD 배지에 서만 분리된 경우는 22.5%인 반면, CDSA에서만 분리된 경우는 1.4%에 불과하였다.

CDSA의 배양 양성률은 보고자에 따라 42.6%, 62%로 낮게 보고하기도 하나[14,18] 본 연구에서는 48시간 배양 후 CDSA의 배양 양성률은 77.5%로 chromID CD의 98.1%보다 낮으나 보고된 결과보다는 높았다. Perry 등[17]의 연구에서도 검체를 알코올 처리하여 CDSA 이외의 다른 *C. difficile* 선택배지와 chromogenic 배지의 배양률을 비교하였는데 48시간 배양 후 chromogenic 배지의 배양 양성률은 100%로 다른 선택배지의 96-98%보다 약간 높았다.

이번 연구에서 chromID CD의 가장 주목할 만한 특징은 배양 24시간 후에 77.5%에서 *C. difficile* 집락을 보여, CDSA의 30.1%에 비하여 좀더 빠른 판독이 가능하다는 것이었다. Perry 등[17]의 연구에서도 배양 24시간 후에 chromogenic 배지의 배양 양성률은 68%로 다른 선택배지의 26-63% (중간값 37%)에 비해 높은 양성률을 나타내 본 연구와 비슷한 결과를 나타냈다.

집락의 색과 모양을 보았을 때 chromID CD 배지의 경우 *C. difficile* 집락이 전형적인 검정 또는 회색의 테두리가 불규칙한 모양으로 나타나 감별이 쉬운 장점이 있었다(Fig. 1). *C. difficile*이 아닌 다른 균주가 자란 검체는 CDSA에서의 47.1% (49/104), chromID CD에서 31.7% (33/104)로 chromID CD가 선택 배지로서 다른 균주를 억제하는 능력이 더 높았다. ChromID CD에서 자란 총 33검체 중 69.7%는 그람 음성 막대균이었고, 그 외 *C. clostridioforme*, *C. beijer*, *C. butyricum* 등이 동정되었다. 그람 음성인 경우 집락의 모양이 *C. difficile*의 전형적인 집락과 달라서 쉽게 구별이 가능하나 다른 *Clostridium* spp. 중 일부에서 *C. difficile*의 전형적인 집락을 보이는 경우가 있어 CDSA와 마찬가지로 동정검사가 필요할 것으로 생각된다 [19].

결론적으로, CDSA와 chromID CD 배지에서 *C. difficile* 배양률을 비교했을 때, 배양 양성률과 *C. difficile* 이외 균주의 성장을 억제하는 측면, 그리고 신속성의 측면에서 chromID CD가 더 우수한 것으로 나타나 CDI 진단을 위한 배양에 더 유용하고, 또한 기존의 CDSA를 대체할 수 있는 배지로 판단되었다.

참 고 문 헌

1. Kyne L, Hamel MB, Polavaram R, Kelly CP. Health care costs and mortality associated with nosocomial diarrhea due to *Clostridium difficile*. Clin Infect Dis 2002;34:346-53.
2. Gerding DN and Brazier JS. Optimal methods for identifying *Clostridium difficile* infections. Clin Infect Dis 1993;16 Suppl 4: S439-42.
3. Fabbro-Peray P, Sotto A, Defez C, Cazaban M, Molinari L, Pinede M, et al. Mortality attributable to nosocomial infection: a cohort of patients with and without nosocomial infection in a French university hospital. Infect Control Hosp Epidemiol 2007;28:265-72.
4. Fenner L, Widmer AF, Goy G, Rudin S, Frei R. Rapid and reliable diagnostic algorithm for detection of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2008;46:328-30.
5. Shin BM, Kuak EY, Lee EJ, Songer JG. Algorithm combining toxin immunoassay and stool culture for diagnosis of *Clostridium difficile* infection. J Clin Microbiol 2009;47:2952-6.
6. National *Clostridium difficile* Standards Group: Report to the Department of Health. J Hosp Infect 2004;56 Suppl 1:1-38.
7. Barbut F, Monot M, Rousseau A, Cavelot S, Simon T, Burghoffer B, et al. Rapid diagnosis of *Clostridium difficile* infection by multiplex real-time PCR. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011;30: 1279-85.
8. Pai H. Current epidemiology and treatment of *Clostridium difficile* infection. Infect Chemother 2010;42:362-8.
9. Perry JD and Freydiere AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology. J Appl Microbiol 2007;103:2046-55.
10. Marler LM, Siders JA, Wolters LC, Pettigrew Y, Skitt BL, Allen SD. Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. J Clin Microbiol 1992;30:514-6.
11. Kamiya S, Yamakawa K, Ogura H, Nakamura S. Recovery of spores of *Clostridium difficile* altered by heat or alkali. J Med Microbiol 1989;28:217-21.
12. 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.
13. Crobach MJ, Dekkers OM, Wilcox MH, Kuijper EJ. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID): data review and recommendations for diagnosing *Clostridium difficile*-infection (CDI). Clin Microbiol Infect 2009;15:1053-66.
14. Bloedt K, Riecker M, Poppert S, Wellinghausen N. Evaluation of new selective culture media and a rapid fluorescence in situ hybridization assay for identification of *Clostridium difficile* from stool samples. J Med Microbiol 2009;58:874-7.
15. Delmee 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.
16. Lee H, Kim YA, Park KI, Lee K, Chong Y. Detection of toxin B gene of *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction from clinical isolates. Korean J Clin Microbiol 1999;2:77-81.
17. Perry JD, Asir K, Halimi D, Orenge S, Dale J, Payne M, et al. Evaluation of a chromogenic culture medium for isolation of *Clostridium difficile* within 24 hours. J Clin Microbiol 2010;48: 3852-8.
18. Nerandzic MM and Donskey CJ. Effective and reduced-cost modified selective medium for isolation of *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2009;47:397-400.
19. Jang YH, Chung J, Baek S, Park S, Sung H, Kim MN. Implementation of multiplex PCR for species identification and toxin typing in toxigenic *Clostridium difficile* culture. Korean J Clin Microbiol 2009;12:11-6.

=국문초록=

ChromID *C. difficile* Agar의 *Clostridium difficile* 배양 평가

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실, 세균내성연구소

임지숙, 황석미, 김명숙, 임희정, 신새암, 정혜선, 김희정, 이경원

배경: *Clostridium difficile*는 항생제 관련 설사의 주요한 병원균이며 가장 흔한 원내 감염성 설사의 가장 흔한 원인이다. 최근 *C. difficile* 감염이 증가하는 추세이며 새로운 고병원성 균주가 나타나고 있어 정확하고 빠른 진단이 필요하다. 본 연구에서는 기존의 선택배지인 *C. difficile* Selective Agar (CDSA; BD, USA)와 chromID *C. difficile* (chromID CD, bio-Mérieux, France) 배지의 배양률을 비교하였다.

방법: 2011년 7월부터 8월까지 세브란스병원 입원 환자 중 CDI가 의심되어 *C. difficile* 배양이 의뢰된 738 검체를 알코올 처리하여 *C. difficile* selective agar에 접종한 후, 혐기성 조건(Forma Scientific, USA)으로 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 24시간, 48시간 후에 각각 판독하였고, CDSA에 자란 균이 있는 경우 -20°C에 냉동 보관된 검체를 찾아서 일주일에 1회 chromID *C. difficile* agar에 재접종하였다. 총 104검체를 재접종하였고, 같은 조건으로 배양하여 배양 24시간, 48시간 후에 각각 판독하였다. 동정은 집락의 전형적인 색과 형태 그리고 ATB 32A (API System SA, France)를 이용하였다.

결과: *C. difficile* 분리율은 chromID CD와 CDSA에서 24시간 배양 후 각각 77.5%와 30.1%, 48시간 배양 후 98.6%와 77.5%로 나타났다. ChromID CD의 경우 *C. difficile* 집락이 전형적인 검정 또는 회색의 테두리가 불규칙한 모양으로 나타나 감별이 쉬운 장점이 있었다.

결론: *C. difficile* 배양률은 CDSA보다 chromID CD 배지가 우수하였고, 배양 24시간에 *C. difficile*을 쉽고 빠르게 배양할 수 있어 CDSA를 대체할 수 있는 배지로 생각되었다. [대한임상미생물학회지 2012;15:88-91]

교신저자 : 김희정, 449-930, 용인시 처인구 금학로 225
용인세브란스병원 진단검사의학과
Tel: 031-331-8755, Fax: 031-335-5551
E-mail: hjkim12@yuhs.ac