

독소 A 음성, 독소 B 양성  
*Clostridium difficile* 변이주의  
분자유전학적 특성

연세대학교 대학원  
의 학 과  
김 수 정

독소 A 음성, 독소 B 양성  
*Clostridium difficile* 변이주의  
분자유전학적 특성

연세대학교 대학원  
의 학 과  
김 수 정

독소 A 음성, 독소 B 양성  
*Clostridium difficile* 변이주의  
분자유전학적 특성

지도교수 이 경 원

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008 년 12 월

연세대학교 대학원

의 학 과

김 수 정

# 김수정의 석사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2008 년 12 월

## 감사의 글

본 논문을 완성함에 있어 부족한 본인을 끊임없이 지도편달해 주신 이경원 교수님과 바쁘신 중에도 교열의 노고를 아끼지 않으시고 아낌없는 조언으로 논문의 완성을 격려해주신 이봉기 교수님, 김희정 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 또한, 실험에 도움을 주신 서영희 연구원과 세브란스병원 미생물파트 직원들에게도 깊이 감사드립니다.

마지막으로 이 논문이 사랑과 관심으로 저를 이끌어 주신 부모님께 조그만 효도가 되었으면 하는 마음입니다.

저자 씀

## <차례>

국문요약	1
I. 서론	2
II. 재료 및 방법	5
1. 대상	5
2. 방법	5
가. <i>Clostridium difficile</i> 의 배양 및 동정	5
나. <i>C. difficile</i> 의 독소유전자 PCR	6
다. <i>C. difficile</i> 의 PCR-ribotyping	6
라. <i>C. difficile</i> 의 toxinotyping	7
마. <i>C. difficile</i> 염색체 DNA의 pulsed-field gel electro- phoresis	7
III. 결과	9
1. <i>C. difficile</i> 의 PCR-ribotyping 결과	9
2. <i>C. difficile</i> 의 toxinotyping 결과	9
3. <i>C. difficile</i> 염색체 DNA의 pulsed-field gel electro- phoresis 결과	10
4. <i>C. difficile</i> 분리 환자의 진료과와 pulsed-field gel electrophoresis 성상	12
IV. 고찰	14
V. 결론	17
참고문헌	18
영문요약	24

## 그림 차례

Figure 1. PCR-ribotyping of <i>Clostridium difficile</i> .....	9
Figure 2. Toxinotyping of A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> <i>Clostridium difficile</i> .....	10
Figure 3. Pulsed-field gel electrophoresis and dendrogram of chromosomal DNA of <i>Clostridium difficile</i> .....	11
Figure 4. Admission departments at Severance Hospital of patients from whom A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> <i>Clostridium difficile</i> were isolated in 2007 .....	13

## 표 차례

Table 1. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of A <sup>-</sup> B <sup>+</sup> <i>Clostridium difficile</i> .....	11
Table 2. Pulsed-field gel electrophoresis analysis and PCR-ribotyping of A <sup>+</sup> B <sup>+</sup> <i>Clostridium difficile</i> .....	12

<국문요약>

독소 A 음성, 독소 B 양성 *Clostridium difficile* 변이주의  
분자유전학적 특성

*Clostridium difficile*은 항균제 연관 설사의 주된 원인균이고, 대표적인 원내 감염균의 하나로 알려져있다. *C. difficile*은 독소 A와 독소 B를 함께 생성하여 사람에게 병을 일으키는 것으로 알려졌으나, 근래에 독소 B만을 생성하는 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주가 증가하고 있음이 보고되었다. 본 연구에서는 국내 6개 병원에서 분리된 *C. difficile* A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주의 분자유전학적 특성을 규명하고자 하였다. 1995-2007년 세브란스병원에서 분리된 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주 68주와 2007-2008년 다른 5개 병원에서 분리된 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주 15주를 대상으로 PCR-ribotyping, toxinotyping, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)를 시행하였다. PFGE 대조군주로 *C. difficile* A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 균주 20주를 시험하였다. A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 균주는 ribotype 10개 형 및 PFGE 13개 형, 15개 아형으로 다양하였으며, A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주는 모두 동일한 ribotype 017, toxinotype VIII이었으나, PFGE에서만 39.8%의 균주만이 동일한 밴드 형태를 보였다. 즉, 가장 흔한 A1형과 1-6개의 밴드 차이를 보이는 6개 형, 13개 아형으로 세분할 수 있었다. 일부 PFGE 성상을 보이는 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 균주가 특정 진료과 환자에 흔하여 병원 환경에 의한 전파 가능성을 시사하는 것으로 생각되었다.

-----  
핵심되는 말 : *Clostridium difficile*, A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주, pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, toxinotyping



# 독소 A 음성, 독소 B 양성 *Clostridium difficile* 변이주의 분자유전학적 특성

<지도교수 이경원>

연세대학교 대학원 의학과

김 수 정

## I. 서론

*Clostridium difficile*은 아포를 형성하는 혐기성 그람양성 간균으로 대표적인 원내 감염균 중 하나이다<sup>1</sup>. *C. difficile*은 1978년 clindamycin 치료를 받은 환자에서 분리되어 위막성 대장염을 유발하는 원인균임이 처음 밝혀졌고, 이후 항균제 연관 설사의 가장 흔한 원인균으로 보고되고 있다<sup>2</sup>. 정상인에서는 장내 상재균이 *C. difficile*의 증식을 억제하지만, 항균제 투여 등으로 정상 장내 상재균이 억제되면 *C. difficile*이 증식하여 *C. difficile* 연관 질환(*Clostridium difficile*-associated disease, CDAD)의 여러가지 임상적 증상을 유발하게 된다<sup>3, 4</sup>. 많은 항균제가 CDAD를 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있으며, 항암치료, 장수술 등도 CDAD의 위험인자로 보고되어 있다<sup>5-7</sup>. CDAD를 일으키는 주된 독성인자는 *C. difficile*이 생성하는 장독소인 독소 A와 세포독소인 독소 B로서, 두 독소 모두 당전이효소(glucosyltransferase) 활성을 가져, 세포 내에서 GTP 결합 단백질(GTP-binding protein)에 작용하여 독성을

나타낸다<sup>8</sup>. 두 독소 모두 사람의 결장에서 점막 손상 및 전기생리적 변화를 유발하며, 특히 독소 B가 10배 적은 양으로도 독소 A와 동일한 변화를 일으켜 *C. difficile* 감염증에서 독소 B가 더 중요한 역할을 할 것이라는 보고도 있다<sup>9</sup>. 독소 A와 B는 각각 *tcdA*와 *tcdB* 유전자에 의해 생성되는데, 이들 유전자는 19.6 kb의 Pathogenicity Locus (PaLoc)에 위치한다<sup>10</sup>.

과거에는 독소 B를 생성하는 균주가 독소 A도 함께 생성하는 것으로 생각되었으나 1990년대 초, 독소 A는 생성하지 않으면서 독소 B만을 생성하는 변이주가 보고되었다<sup>11, 12</sup>. A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주가 A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 균주와 유사한 임상 질환을 유발하는 지에 대해서 논란이 되었다. 그러나 동물실험에서 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주가 장내 출혈 및 염증 반응을 일으키는 것이 관찰되었고, 몇차례의 집단 감염 사례 등을 통해 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주가 위막성 대장염에 이르기까지 다양한 질병을 유발할 수 있음이 밝혀졌다<sup>13-15</sup>. 현재까지 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주는 toxinotype VIII, X, XVI, XVII의 4 종류가 보고되었으나, 사람에서 분리되는 변이주는 대부분 toxinotype VIII이다<sup>16</sup>. A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주는 *tcdA* 유전자의 반복 서열에 결손이 있어 독소 A를 생성하지 못하는 것으로 밝혀졌다<sup>17</sup>. Toxinotype VIII 균주의 경우, *tcdB*에서도 변이가 관찰된다. 즉, A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 균주인 VPI10463이 생성하는 독소 B가 GTP 결합 단백질 중 RhoA, Rac1, Cdc42를 당화(glucosylation)하는 반면, A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주의 독소 B는 Rac1과 R-Ras는 당화하지만 RhoA와 Cdc42는 당화하지 못하는 것으로 보고되어 있다<sup>18, 19</sup>. 이로 인해 세포독성검사시 다른 형태의 결과를 나타내지만, 이것이 어떤 임상적 의미를 갖는지는 아직 알려져 있지 않다.

A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주의 분리율은 지역과 시기에 따라 다르게 보고되고 있다. 1998-1999년 프랑스에서 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주의 비율이 2.7%이었던 반면,

아르헨티나는 2000년에 12.5%였으나 2001년에 58.1%, 2002년 87.9%, 2003년 96%로 급격히 증가하였다고 보고하였다<sup>20, 21</sup>. 또한, 캐나다, 네델란드, 일본에서 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주에 의한 집단감염이 보고되기도 하였다<sup>14-16</sup>. 한국은 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주가 1995년 처음 보고되었으며, 당시 분리율은 4.2%이었으나, 2002년 13.0%, 2003년 15.2%, 2006년 27.1%로 증가추세에 있다<sup>22</sup>.

A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주의 분자역학적 연구는 PCR-ribotyping, PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)를 이용한 toxinotyping, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), amplified fragment length polymorphism (AFLP), restriction endonuclease analysis (REA), random amplification of polymorphic DNA (RAPD), multilocus sequence typing (MLST) 등의 여러가지 방법에 의해 이루어졌다<sup>23-26</sup>. 기존 연구에서 서로 다른 지역에서 분리된 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 균주들이 유사한 분자역학적 결과를 보여 이들 변이주가 유전적 다양성이 적다고 보고되었다<sup>16, 24, 26</sup>. 그러나 일부 연구에서 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주의 PFGE 성상이 다양할 수 있음이 보고된 바 있다<sup>25, 27</sup>. 본 연구에서는 국내 6개 기관에서 분리된 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주를 대상으로 PCR-ribotyping, RFLP를 이용한 toxinotyping 및 PFGE를 시행하고, 외국의 연구 결과와 비교하여 그 분자유전학적 특성을 규명하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 대상

*C. difficile* A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주는 2007년 1월부터 12월까지 세브란스병원 환자에서 분리된 46주, 1995-2006년에 세브란스병원에서 분리된 *C. difficile* A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 중 임의로 선택한 22주, 2007-2008년에 다른 병원에서 분리된 15주를 대상으로 하였다. 다른 병원 분리주는 서울, 경기도, 강원도, 대전, 부산의 대학병원에서 분리된 균주를 각각 3주씩 임의로 선택하였다. *C. difficile* A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 20주는 2007년 세브란스병원 분리주 중 임의로 선택하였으며, PFGE와 PCR-ribotyping의 대조군으로서 시험하였다.

### 2. 방법

#### 가. *Clostridium difficile*의 배양 및 동정

*C. difficile* 배양은 설사변 또는 무른변만을 검사하였으며, 면봉으로 채취한 검체는 양이 불충분하여 검사를 시행하지 않았다. 검체 접종은 혐기성 상자(Forma Scientific, Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA) 안에서 시행하였다. 즉, 충분한 양의 설사변을 0.01 mL 일회용 loop을 이용하여 *Clostridium difficile* selective agar (CDSA, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 접종하였다. 항온기에서 35°C에 48시간 배양한 후 특징적인 냄새, 집락, 도말염색 형태, 또는 API rapid ID 32A system (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France)을 이용하여 동정하였다. 분리한 균주는 20%

skim milk 배지에 넣어 -70℃에 냉동 보관하였다.

#### 나. *C. difficile*의 독소유전자 PCR

CDSA에서 증식한 집락을 이용하여 *C. difficile* 독소유전자 PCR을 시행하였다<sup>28</sup>. 집락부유액을 10분간 가열하여 DNA를 추출하였다. 시발체는 *tcdA* PCR에 NK2 (5'-CCCAATAGAAGATTCAATATTAA GCTT-3')와 NK3 (5'-GGAAGAAAAGA ACTTCTGGCTCACTCAGG T-3')를, *tcdA*의 반복서열에 대해서는 NK9 (5'-CCACCAGCTGCAG CCATA-3')와 NK11(5'-TGATGCTAATAATGAATCTAAAATGGT AAC-3')을, *tcdB* PCR은 NK104 (5'-GTGTAGCAATGAAAGTCCAA GTTTACGC-3')와 NK105 (5'-CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCA CCT-3')를 사용하였다.

#### 다. *C. difficile*의 PCR-ribotyping

PCR-ribotyping은 Stubbs 등<sup>29</sup>의 방법을 변형하여 시행하였다. 집락부유액을 가열하여 DNA를 추출 후, *C. difficile*의 16S ribosomal RNA의 1445-1466 염기에 상응하는 시발체인 CD-1 (5'-CTGGGGT GAAGTCGTAACAAGG-3')과 CD-1445 (5'-GCGCCCTTTGTAGCT TGACC-3')를 이용하여 PCR을 시행한 후, 75℃에서 40분간 농축하였다. 농축한 PCR 산물을 8℃에서 100 V로 100분간 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 한 개의 밴드라도 차이가 있으면 다른 형으로 판정하였다<sup>30</sup>.

라. *C. difficile*의 toxinotyping

PCR-RFLP법을 이용하여 toxinotyping을 시행하였다<sup>31</sup>. 집락부유액을 가열하여 DNA를 추출하고, *tcdB*의 5' 끝에 위치한 B1과 *tcdA*의 3' 끝에 위치한 A3 절편을 시발체 B1C (5'-AGAAAATTTTATGAGTTTAGTTAATAGAAA-3')와 B2N (5'-CAGATAATGTAGGAAGTAAGTCTATAG-3'), A3C (5'-TATTGATAGCACCTGATTTATATACAAG-3')와 A4N (5'-TTATCAAACATATATTTTAGCCATATATC-3')을 각각 이용하여 증폭시켰다. PCR 산물을 확인한 후, B1 PCR 산물에 *HincII*와 *AccI*을 각각 처리하고, A3 PCR 산물에 *EcoRI*을 처리한 후, 전기영동하였다. 제한효소반응에 의한 절편의 크기를 기존에 보고된 형태와 비교하여 toxinotype을 결정하였다<sup>31</sup>.

마. *C. difficile* 염색체 DNA의 pulsed-field gel electrophoresis

Alonso 등<sup>32</sup>의 방법을 변형하여 시험하였다. 냉동보관하였던 균주를 2번 계대배양한 후 brain heart infusion 배지로 부유액을 만들었다. 부유액을 원심분리한 후 상층액을 버리고 침전물을 다시 lysozyme 용액에 부유시켰다. 50°C까지 가온한 한천과 부유액을 섞고, plug 틀에 부은 후 냉장하여 plug를 만들었다. Plug를 lysozyme 용액에 넣고 배양한 후 세척하고 다시 proteinase K 용액에 넣고 배양한 후 세척하였다. Plug를 *Sma I* 제한효소 완충용액에 넣고 하룻밤 배양한 후, 세척하고 thiourea를 넣은 전기영동 완충용액에 넣었다. Thiourea가 200 µM 농도로 포함된 gel을 제작하고 plug를 넣어 전기영동하였다. 전기영동은 6 V에서 20시간동안 시행하였으며, pulse는 4초에 시작하여 30초에

종료하였다. Gel을 ethidium bromide로 30분간 염색하고 자외선을 투과하여 관찰하였다. 전기영동 결과 육안으로 밴드형태가 동일한 경우, 그 중 대표균주 1주씩만을 선별하여 FPQuest version 4.5 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. Dendrogram은 arithmetic averages를 이용한 unweighted-pair group method와 Dice coefficients를 설정하여 구하였고, 최적화(optimization)와 위치허용(band position tolerance)은 각각 0.5%와 1.0%로 설정하였다. 상동계수(similarity coefficient)가 80% 이상인 균주들을 같은 형으로 분류하였고, 같은 형이지만 한 개의 밴드라도 차이가 있으면 다른 아형으로 판정하였다<sup>33, 34</sup>.

### III. 결과

#### 1. *C. difficile*의 PCR-ribotyping 결과

모든 *C. difficile* A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주는 동일한 밴드 형태를 보였고, 이는 기존에 보고된 ribotype 017과 동일하였다(Figure 1)<sup>35</sup>. 반면, 대조균주인 A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 균주는 10가지 다른 밴드 형태를 나타내었다 (Table 2).

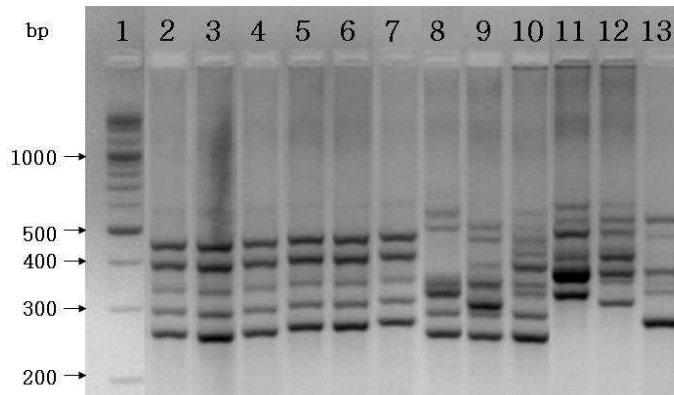


Figure 1. PCR-ribotyping of *Clostridium difficile*. Lane 1, molecular size marker; lanes 2-7, A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> strains; lanes 8-13, A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> strains

#### 2. *C. difficile*의 toxinotyping 결과

*C. difficile* A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주의 *tcdA*의 A3 절편에 대한 PCR 결과 A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 균주와는 약 1.8 kb 정도의 크기 차이를 보여 결손이 있음을 알 수 있었다. RFLP 결과 모든 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주가 toxinotype VIII임을 확인할 수 있었다(Figure 2).



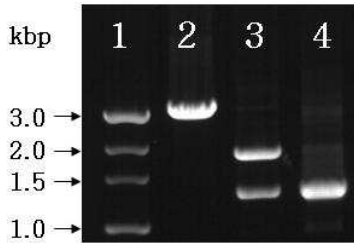


Figure 2. Toxinotyping of A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> *Clostridium difficile*. Lane 1, molecular size marker; Lane 2, *Hinc*II restriction pattern of B1-PCR fragment; Lane 3, *Acc*I restriction pattern of B1-PCR fragment; Lane 4, *Eco*R I restriction pattern of A3-PCR fragment

### 3. *C. difficile* 염색체 DNA의 pulsed-field gel electrophoresis 결과

*C. difficile* A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주 83주는 6개 형, 13개 아형으로 분류할 수 있었다(Figure 3). 이 중에서 33주(39.8%)가 동일한 밴드 형태를 보였고(A1형), 나머지 49주는 A1형과 1-6개의 밴드 차이를 보였다. 2007년 세브란스병원에서 분리된 46주는 A, B 및 C의 3개 형(7개 아형)으로, 1995-2006년 세브란스병원 분리주 21주는 A, B, C 및 E의 4개 형(8개 아형)으로 분류되었으며, 다른 병원 분리주 15주는 A, B, D 및 F의 4개 형(7개 아형)으로 분류되었다(Table 1). 반면에 2007년 세브란스병원에서 분리된 A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 균주 20주는 G-S의 13개 형(15개 아형)으로 다양하였다(Table 2). 1995년 세브란스병원 분리주와 A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 균주 각 1주는 DNA 손상으로 인해 결과를 해석할 수 없었다.

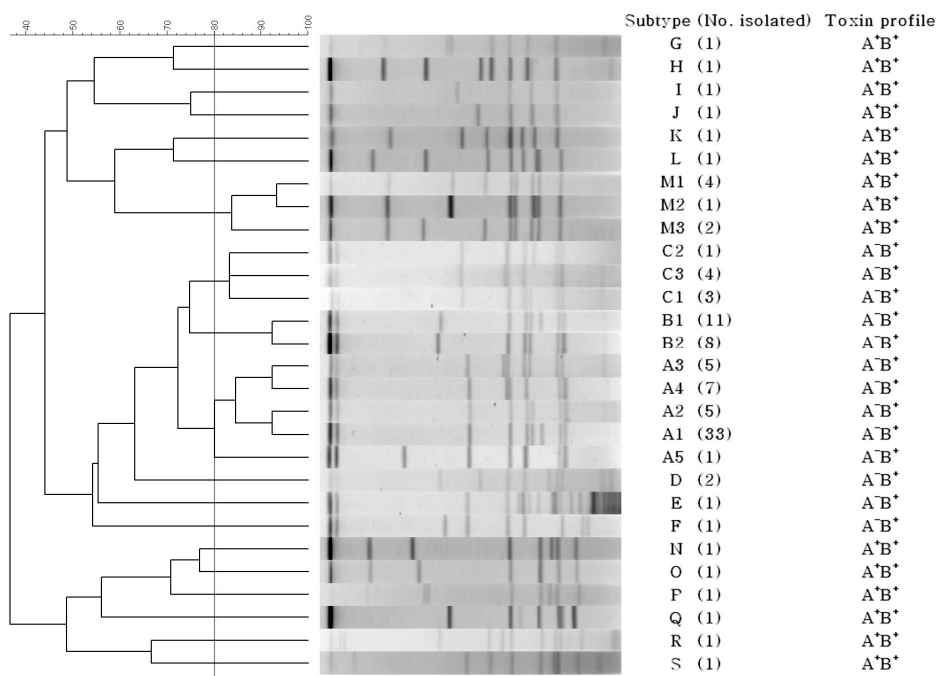


Figure 3. Pulsed-field gel electrophoresis and dendrogram of chromosomal DNA of *Clostridium difficile*.

Table 1. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> *Clostridium difficile*

Strains		PFGE subtype														NT	Total	
		A1	A2	A3	A4	A5	B1	B2	C1	C2	C3	D	E	F				
Isolates from Severance Hospital	1995	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2
	2002	2	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	4
	2003	-	-	-	-	-	1	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	4
	2004	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	4
	2005	-	-	1	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4
	2006	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	4
	2007	23	3	-	5	1	5	8	1	-	-	-	-	-	-	-	-	46
Isolates from other institutes	Seoul	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	3
	Gyeonggi	-	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	Kangwon	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
	Daejon	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	3
	Busan	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<b>Total</b>		<b>33</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>11</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>83</b>	

Abbreviation: NT, nontypable due to DNA degradation.

Table 2. Pulsed-field gel electrophoresis analysis and PCR-ribotyping of A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> *Clostridium difficile*

Ribotype	PFGE subtype															NT	Total	
	G	H	I	J	K	L	M1	M2	M3	N	O	P	Q	R	S			
B9	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
B8	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
B2	-	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
AB19	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
AB6	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
AB2	-	-	-	-	-	-	4	1	2	-	-	-	-	-	-	-	1	8
AB3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	3
AB16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1
AB5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
AB9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
Total	1	1	1	1	1	1	4	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	20

Abbreviation: See Table 1.

#### 4. *C. difficile* 분리 환자의 진료과와 pulsed-field gel electrophoresis 성상

2007년에 세브란스병원에서 *C. difficile* A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주가 분리된 환자의 진료과별 입원기록을 PFGE 결과와 비교하였다(Figure 4). PFGE 결과 A1형이었던 23주 중 19주가 혈액내과 입원환자에서, 3주가 중앙내과 환자에서 각각 분리되었다. B2형 8주 중 4주가 중앙내과 입원환자에서 분리되었고, 3주가 혈액내과 환자에서 분리되었다.

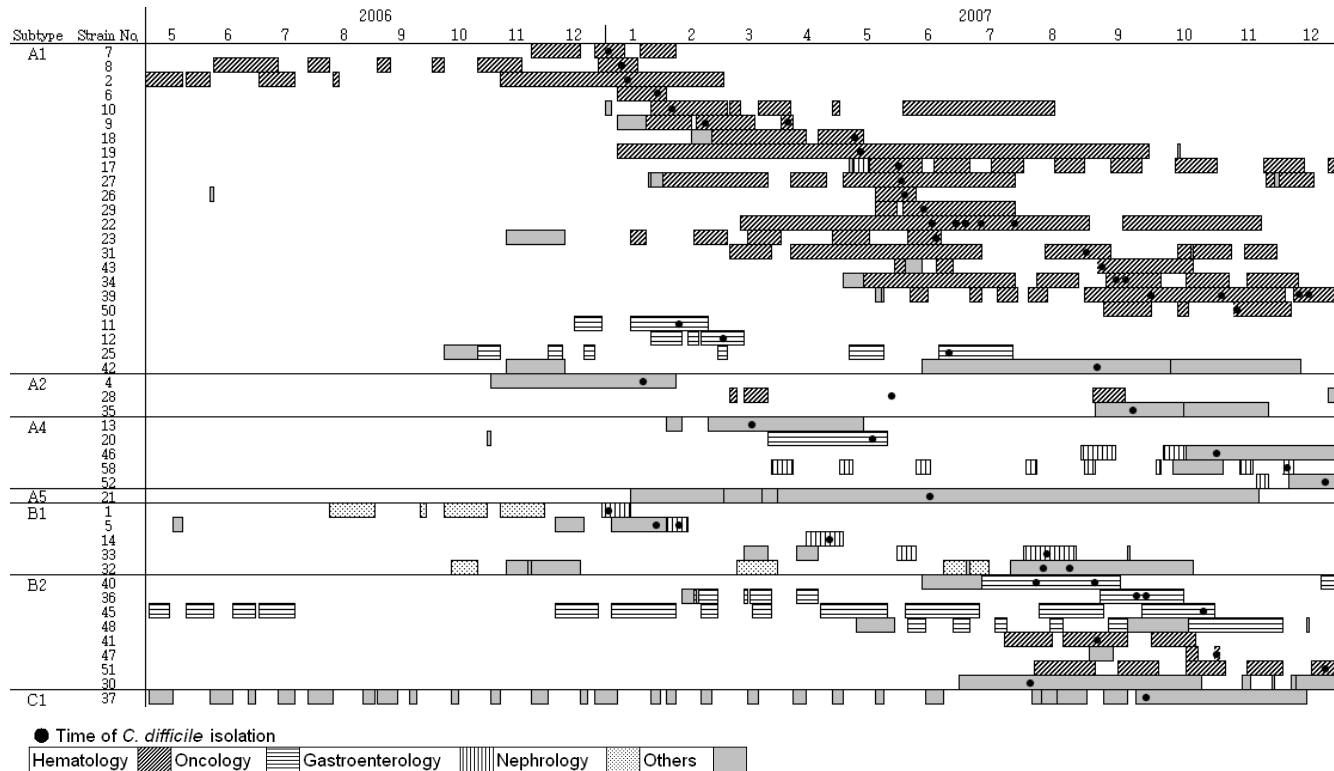


Figure 4. Admission departments at Severance Hospital of patients from whom *A*<sup>-</sup>*B*<sup>+</sup> *Clostridium difficile* were isolated in 2007. The period before May 2006 is omitted. The pattern of the bars indicates the admission department. The dots indicate the time of isolation of *A*<sup>-</sup>*B*<sup>+</sup> *C. difficile*.

#### IV. 고찰

*C. difficile* A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주는 국내 및 일부 국가에서 증가 추세에 있다<sup>21, 22</sup>. 본 연구에서는 PCR-ribotyping, toxinotyping, PFGE를 통하여 국내 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주의 분자유전학적 특성을 규명하고자 하였다. 외국의 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주에 대해 여러가지 분자역학적 방법을 이용한 연구가 이루어졌는데, 몇몇 연구에서 서로 다른 지역에서 분리된 균주임에도 불구하고 동일하거나 유사한 결과를 보여 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주가 유전적 다양성이 적다고 보고하였다<sup>16, 24, 26</sup>.

van den Berg 등<sup>23</sup>은 캐나다, 미국, 폴란드, 영국, 프랑스, 일본, 네델란드에서 분리된 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주 39주에 대해 PCR-ribotyping 및 AFLP를 시행하였을 때 37주가 ribotype 017이면서 동일한 AFLP 결과를 보여 세계적으로 단일 클론의 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주가 전파되어 있다고 보고하기도 하였다. 또한, 다른 다국적 연구들에서 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주를 대상으로 REA, MLST 또는 DNA microarray를 시행하였을 때 모두 동일하거나 유사한 결과를 나타내어 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주가 유전적 다양성이 적다는 주장을 뒷받침하였다<sup>24, 26, 36</sup>.

반면, 폴란드의 여러 병원과 일본에서 분리된 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주에 대해 RAPD, PCR-ribotyping, PFGE를 시행한 연구에서 폴란드 균주 4주와 일본 균주 1주가 동일한 결과를 보였으나, 10주는 서로 다른 결과를 보여 다른 유전형질을 갖는 균주도 존재함을 확인할 수 있었다<sup>25</sup>. 또한, 일본에서 분리된 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 10주를 대상으로 PFGE를 시행한 연구에서도 병원에 따라 다른 PFGE 결과를 보였고, 함께 시험한 집단감염 균주와도 구별되는 결과를 나타내어 PFGE가 유전적 아형을 세분할 수 있음을 알 수 있었다<sup>27</sup>.

과거에는 *C. difficile*의 분자역학적 분석에 있어서 PFGE가

재현성은 높으나 DNA 손상으로 인해 결과 해석이 어려운 경우가 많아, 이와 동일한 재현성을 가지면서 결과를 명확히 확인할 수 있는 PCR-ribotyping이 가장 우수한 검사로 여겨졌다<sup>37</sup>. 실제로 폴란드 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 균주를 대상으로 한 연구에서 17주 중 8주는 DNA 손상으로 인해 PFGE 결과를 해석할 수 없었다고 하였다<sup>25</sup>. 본 연구에 앞서, 기존의 방법으로 *C. difficile*에 대해 PFGE를 시행하였는데, 당시에는 DNA 손상으로 인해 해석 가능한 결과를 얻지 못하였다. 그러나 Alonso 등<sup>32</sup>의 방법을 변형하여 사용함으로써 본 연구에서 2주를 제외하고는 DNA 손상없이 해석 가능한 결과를 얻을 수 있었다. 즉, 신선한 집락을 이용하여 아포 형성을 억제하였고, 고농도 proteinase K 및 thiourea를 사용하여 DNA의 손상을 억제하여 PFGE 분석의 유용성을 높일 수 있었다<sup>32</sup>.

본 연구에서 A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> 균주의 다양한 결과와는 대조적으로, 모든 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주는 ribotype 017, toxinotype VIII이었으나, PFGE에서는 39.8%의 균주만이 동일한 밴드 형태를 보였다. 즉, 가장 흔한 A1형과 1-6개의 밴드 차이를 보이는 6개 형, 13개 아형으로 분류되었다. PCR-ribotyping과 toxinotyping을 통해서는 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 균주를 분류할 수 없었으나 PFGE를 통해 다양한 밴드 형태를 구별할 수 있었으므로, A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 균주의 분자역학적 분석에 있어서 위의 3가지 방법 중 PFGE가 가장 뛰어난 감별능을 가지는 방법으로 생각되었다. 다른 지역 병원에서도 세브란스병원과 동일한 PFGE 결과를 보이는 균주가 분리되었는데, 이는 동일한 클론이 전파되었을 가능성이 있으나 본 연구는 다른 지역 균주의 일부만을 포함하였기 때문에 정확한 역학적 분포를 분석할 수는 없었다.

2007년 세브란스병원에서 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주가 분리된 환자의 진료과별 입원기록과 PFGE 결과를 분석하였을 때 특정 진료과에서 특정

PFGE 아형이 주로 분리되는 것을 관찰할 수 있었는데, 특히 혈액내과와 중양내과 환자에서 A1형 균주의 분리가 많았다. 혈액내과와 중양내과의 경우, 항암 치료 및 이에 수반되는 항균제 사용으로 인해 *C. difficile* 감염의 위험도가 높기 때문에 타과에 비해 더욱 많은 환자가 있었던 것으로 생각되나, 동일한 아형의 균주가 집단적으로 분리된 것은 해당 진료과의 병동 환경에 의한 전파 가능성을 시사하는 것일 수도 있다.

미국 대학병원의 한 병동에서 연속적으로 시행한 환경 배양에서 동일한 arbitrarily primed PCR 결과를 보이는 *C. difficile* 균주가 2년간 분리되었다는 연구결과가 있으며, 이를 통해 특정 클론의 *C. difficile*이 아포 형성을 통해 장기간 병원 환경에 존재하면서 감염을 일으킬 수 있음을 추정할 수 있었다<sup>38</sup>. PFGE A1형 균주의 경우, 세브란스병원에서 2002년부터 분리되었는데, 이 균주가 과거부터 계속 분리되어 왔고, 2007년에 혈액내과와 중양내과 환자에서 주로 분리된 것은, 국내 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 균주의 유전적 다양성이 적어서 나타난 결과일 수도 있다. 또한, 진료과별로 유사한 질환의 환자가 입원하여 질환별로 비슷한 약제를 사용하는 점이 특정 균주의 감염에 영향을 주었을 가능성을 배제할 수는 없다. 그러나, PFGE를 통해 13가지 다양한 아형을 감별할 수 있었는데도 한가지 아형이 주로 분리된 점이나 병원 환경에서 같은 *C. difficile*이 지속적으로 분리될 수 있다는 연구결과를 고려할 때, 이 균주가 세브란스병원의 병원 환경, 특히 혈액내과와 중양내과 병동에 계속 존재하면서 감염을 일으켰을 가능성을 시사하는 것으로 생각되었다.

## V. 결론

본 연구에서 국내 *C. difficile* A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 변이주를 대상으로 시행한 PCR-ribotyping, toxinotyping 결과는 시험 균주 모두가 동일하였으나 PFGE 결과 가장 흔한 A1형과 1-6개 밴드 차이를 보이는 6개 형, 13개 아형으로 세분할 수 있었다. 일부 PFGE 성상을 보이는 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> 균주가 특정 진료과 환자에 흔하여 병원 환경에 의한 전파 가능성을 시사하는 것으로 생각되었다.



## 참고문헌

1. Aslam S, Hamill RJ, Musher DM. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease: old therapies and new strategies. *Lancet Infect Dis* 2005;5:549-57.
2. Bartlett JG, Moon N, Chang TW, Taylor N, Onderdonk AB. Role of *Clostridium difficile* in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology* 1978;75:778-82.
3. Wilson KH, Freter R. Interaction of *Clostridium difficile* and *Escherichia coli* with microfloras in continuous-flow cultures and gnotobiotic mice. *Infect Immun* 1986;54:354-8.
4. McFarland LV. Epidemiology, risk factors and treatments for antibiotic-associated diarrhea. *Dig Dis* 1998;16:292-307.
5. Kelly CP, Pothoulakis C, LaMont JT. *Clostridium difficile* colitis. *N Engl J Med* 1994;330:257-62.
6. Kamthan AG, Bruckner HW, Hirschman SZ, Agus SG. *Clostridium difficile* diarrhea induced by cancer chemotherapy. *Arch Intern Med* 1992;152:1715-7.
7. Silva J, Fekety R, Werk C, Ebright J, Cudmore M, Batts D, et al. Inciting and etiologic agents of colitis. *Rev Infect Dis* 1984;6 Suppl 1:214-21.
8. Voth DE, Ballard JD. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:247-63.
9. Riegler M, Sedivy R, Pothoulakis C, Hamilton G, Zacherl J,

- Bischof G, et al. *Clostridium difficile* toxin B is more potent than toxin A in damaging human colonic epithelium in vitro. J Clin Invest 1995;95:2004-11.
10. Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Streiber C. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. Gene 1996;181:29-38.
  11. Haslam SC, Ketley JM, Mitchell TJ, Stephen J, Burdon DW, Candy DC. Growth of *Clostridium difficile* and production of toxins A and B in complex and defined media. J Med Microbiol 1986;21:293-7.
  12. Torres JF. Purification and characterisation of toxin B from a strain of *Clostridium difficile* that does not produce toxin A. J Med Microbiol 1991;35:40-4.
  13. Borriello SP, Wren BW, Hyde S, Seddon SV, Sibbons P, Krishna MM, et al. Molecular, immunological, and biological characterization of a toxin A-negative, toxin B-positive strain of *Clostridium difficile*. Infect Immun 1992;60:4192-9.
  14. al-Barrak A, Embil J, Dyck B, Olekson K, Nicoll D, Alfa M, et al. An outbreak of toxin A negative, toxin B positive *Clostridium difficile*-associated diarrhea in a Canadian tertiary-care hospital. Can Commun Dis Rep 1999;25:65-9.
  15. Kuijper EJ, de Weerd J, Kato H, Kato N, van Dam AP, van der Vorm ER, et al. Nosocomial outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhoea due to a clindamycin-resistant enterotoxin A-negative strain. Eur J Clin Microbiol

- Infect Dis 2001;20:528-34.
16. Drudy D, Fanning S, Kyne L. Toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile*. Int J Infect Dis 2007;11:5-10.
  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. Just I, Hofmann F, Genth H, Gerhard R. Bacterial protein toxins inhibiting low-molecular-mass GTP-binding proteins. Int J Med Microbiol 2001;291:243-50.
  19. Chaves-Olarte E, Freer E, Parra A, Guzmán-Verri C, Moreno E, Thelestam M. R-Ras glucosylation and transient RhoA activation determine the cytopathic effect produced by toxin B variants from toxin A-negative strains of *Clostridium difficile*. J Biol Chem 2003;278:7956-63.
  20. 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.
  21. van den Berg RJ, Legaria MC, de Breij A, van der Vorm ER, Brazier JS, Kuijper EJ. Introduction of TcdA-negative, TcdB-positive *Clostridium difficile* in a general hospital in Argentina. Clin Microbiol Infect 2005;11 Suppl 2:488.
  22. 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.
23. 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.
  24. Johnson S, Sambol SP, Brazier JS, Delmée M, Avesani V, Merrigan MM, et al. International typing study of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* variants. J Clin Microbiol 2003;41:1543-7.
  25. Pituch H, van den Braak N, van Leeuwen W, van Belkum A, Martirosian G, Obuch-Woszczatyński P, et al. Clonal dissemination of a toxin-A-negative/toxin-B-positive *Clostridium difficile* strain from patients with antibiotic-associated diarrhea in Poland. Clin Microbiol Infect 2001;7:442-6.
  26. Lemee L, Dhalluin A, Pestel-Caron M, Lemeland JF, Pons JL. Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. J Clin Microbiol 2004;42:2609-17.
  27. Kikkawa H, Hitomi S, Watanabe M. Prevalence of toxin A-nonproducing/toxin-B-producing *Clostridium difficile* in the Tsukuba-Tsuchiura district, Japan. J Infect Chemother 2007;13:35-8.

28. 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.
29. Stubbs SL, Brazier JS, O'Neill GL, Duerden BI. PCR targeted to the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region of *Clostridium difficile* and construction of a library consisting of 116 different PCR ribotypes. J Clin Microbiol 1999;37: 461-3.
30. Killgore G, Thompson A, Johnson S, Brazier J, Kuijper E, Pepin J, et al. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. J Clin Microbiol 2008;46:431-7.
31. Rupnik M, Avesani V, Janc M, von Eichel-Streiber C, Delmée M. A novel toxinotyping scheme and correlation of toxinotypes with serogroups of *Clostridium difficile* isolates. J Clin Microbiol 1998;36:2240-7.
32. Alonso R, Martín A, Peláez T, Marín M, Rodríguez-Creixéms M, Bouza E. An improved protocol for pulsed-field gel electrophoresis typing of *Clostridium difficile*. J Med Microbiol 2005;54:155-7.

33. Sawabe E, Kato H, Osawa K, Chida T, Tojo N, Arakawa Y, et al. Molecular analysis of *Clostridium difficile* at a university teaching hospital in Japan: a shift in the predominant type over a five-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:695-703.
34. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:512-30.
35. Rupnik M, Brazier JS, Duerden BI, Grabnar M, Stubbs SL. Comparison of toxinotyping and PCR ribotyping of *Clostridium difficile* strains and description of novel toxinotypes. *Microbiology* 2001;147:439-47.
36. Stabler RA, Gerding DN, Songer JG, Drudy D, Brazier JS, Trinh HT, et al. Comparative phylogenomics of *Clostridium difficile* reveals clade specificity and microevolution of hypervirulent strains. *J Bacteriol* 2006;188:7297-305.
37. Bidet P, Lalande V, Salauze B, Burghoffer B, Avesani V, Delmée M, et al. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 2000;38:2484-7.
38. Cohen SH, Tang YJ, Rahmani D, Silva J, Jr. Persistence of an endemic (toxigenic) isolate of *Clostridium difficile* in the environment of a general medicine ward. *Clin Infect Dis* 2000;30:952-4.

## Abstract

Molecular characterization of toxin A-negative, toxin B-positive variant strain of *Clostridium difficile*

Sue Jung Kim

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kyungwon Lee)

*Clostridium difficile* is a major cause of antibiotic-associated diarrhea and one of the most common nosocomial pathogen. Recently, A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> variants, producing only toxin B, have been increasingly isolated. The aim of the study is molecular characterization of A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> variants isolated from six university hospitals in Korea. We performed PCR-ribotyping, toxinotyping, and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with 68 A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> strains isolated from Severance Hospital in 1995-2007 and 15 strains from other five hospitals in 2007-2008. Twenty clinical isolates of A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> *C. difficile* strains were included as a control group of PFGE. A<sup>+</sup>B<sup>+</sup> strains showed diverse results of 10 ribotypes and 13 PFGE types (15 subtypes). While all A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> strains were ribotype 017 and toxinotype VIII, only 39.8% of strains showed the same PFGE pattern, A1 type. Six types and thirteen subtypes of A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> strains which have 1-6 band differences from the major A1 type, could be discriminated by PFGE. The clustering of some PFGE patterns in certain admission departments imply the possibility of transmission of *C. difficile* by hospital environment.

---

Key Words : *Clostridium difficile*, A<sup>-</sup>B<sup>+</sup> variant, pulsed-field gel electrophoresis, ribotyping, toxinotyping