

## *Clostridium difficile* 독소 A 검출을 위한 효소면역법의 비교

유수진<sup>1</sup> · 강정욱<sup>2</sup> · 오혜전<sup>1</sup> · 신보문<sup>1</sup>

인제의대 상계백병원 진단검사의학과, 한양대학교 구리병원 진단검사의학과<sup>2</sup>

### Comparison of Two Enzyme Immunoassays for *Clostridium difficile* Toxin A

Soo-Jin Yoo, M.D.<sup>1</sup>, Jung-Oak Kang, M.D.<sup>2</sup>, HyeJun Oh, M.T.<sup>1</sup>, and Bo-Moon Shin, M.D.<sup>1</sup>

Departments of Laboratory Medicine, Sanggye Paik Hospital<sup>1</sup>, Inje University, Seoul; Kuri Hospital<sup>2</sup>, Hanyang University, Guri, Korea

**Background :** *Clostridium difficile* is one of the most important pathogens responsible for nosocomial diarrhea. The disease is mediated by two toxins, designated as A and B; therefore, identification of the toxins is important for diagnosis. However, culture or cytotoxin assay are not easily done because of tedious procedures. Instead, toxin A immunoassay is widely used. We evaluated two different enzyme immunoassays (EIA) for *C. difficile* toxin A and compared them with culture and PCR results.

**Methods :** A total of 65 stool specimens were examined for toxin A using enzyme linked fluorescent immunoassay (ELFA, VIDAS CD II, Bio-Merieux, France) and enzyme linked immunosolvent assay (ELISA, C.DIFFICILE TOX A II, TECHLAB, USA) and were also cultured for *C. difficile* using cycloserine cefoxitine fructose agar. We amplified toxin A and B genes using primers NK9-NK 11 and NK104-NK105, respectively, in 23 *C. difficile* isolates.

**Results :** The concordance rate between ELFA and ELISA was 76.9%. The sensitivity and specificity of the ELFA and ELISA based on the culture and PCR results for toxin A gene were 84.6%/98.1% and 84.6%/67.3%. Positive and negative predictive values were 91%/96.2% in VIDAS and 78.0%/94.6% in TECHLAB. The positive rates of toxin B genes were 100%, 83.3% and 50% in toxin A positive, variant and negative strains, respectively.

**Conclusions :** The sensitivities of the ELFA and ELISA for toxin A were the same, but specificity and positive predictive value of the ELFA were higher than those of the ELISA. PCR or EIA method detecting both toxin A and toxin B is strongly recommended, because the variant strains (toxin A negative and toxin B positive) of *C. difficile* may be more prevalent than were anticipated in Korea. (*Korean J Lab Med* 2006;26:408-11)

**Key Words :** *Clostridium difficile*, toxin A, enzyme immunoassay, PCR

## 서론

*Clostridium difficile* (*C. difficile*)은 위막성 대장염(Pseudo-

membranous colitis, PMC)이나 항생제 유발 설사(antibiotic associated diarrhea, AAD) 등 병원 감염을 일으키는 원인균 중의 하나로 정확한 진단이 중요하다[1, 2]. 신속한 진단을 위해 일반적으로 라텍스 응집법을 이용한 항원 검사를 시행하거나 효소면역법을 이용한 독소(독소 A 혹은 독소 B) 검사를 시행하게 되는데 변검체에서 효소면역법으로 독소 A를 검출한 연구에 따르면 9.8-26.2%의 검출률 및 임상상 혹은 세균배양을 기준으로 80% 정도의 일치율을 나타내었다[3-11] 그러나 최근 국내에서 변이주의 출현 등에 의해[12, 13], 효소면역법을 사용한 독소 A의 검출률

접 수 : 2006년 8월 3일      접수번호 : KJLM1974  
수정본접수 : 2006년 9월 28일  
게재승인일 : 2006년 9월 28일  
교신저자 : 신보문  
우 139-707 서울시 노원구 상계 7동 761-1  
인제대학교 상계백병원 진단검사의학과  
전화 : 02-950-1227, Fax : 02-950-1224  
E-mail : bmsshin@unitel.co.kr

이 낮아지는 문제점이 대두되어[11, 12] 일선의 임상미생물 검사실에서 사용하는 *C. difficile*의 독소 검출법의 적절성에 대한 평가가 필요하게 되었다. 본 연구에서는 현재 국내에서 흔히 사용되고 있는 독소 A 검출용 enzyme linked fluorescent immunoassay (ELFA)와 enzyme linked immunosolvent assay (ELISA) 효소면역법을 비교하여 이들 검사의 유용성을 평가해 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

항생제 유발 설사 및 기타 원인에 의한 설사를 주소로 내원하여 2004년 7월부터 9월 사이에 *C. difficile* 배양 검사가 의뢰되었던 65예의 설사변을 대상으로 하여 cycloserine cefoxitine fructose agar (CCFA) 배지에 접종하여 72시간 혐기성 배양을 시행하였다. 의심되는 균주를 분리하여 아포염색(spore stain) 및 Vitek ANA 혐기성세균 동정카드(Bio Merieux, France)를 이용하여 동정을 하였다. 같은 검체를 냉장보관 후 4시간 이내 ELFA를 원리로 하는 VIDAS *C. difficile* 독소 A II assay (Bio Merieux, Marcy-l'Etoile, France; 이하 VIDAS)와 C.DIFFICILE TOX A II (TECHLAB, Blacksburg, Virginia, USA; 이하 TECHLAB)를 사용하여 독소 A 검사를 시행하였다. VIDAS는 relative fluorescence value (RFV)가 1.0 이상이면 양성, 0.4 이상-1.0 미만이면 equivocal, 0.4 미만이면 음성으로 판정하였다. TECHLAB은 흡광도가 2.0 이상이면 양성, 1.0 이하이면 음성, 그 사이 값이면 equivocal로 판정하였다. Equivocal 결과는 각 시약의 지

Table 1. Comparison of two enzyme immunoassays for toxin A

	VIDAS (ELFA)			Total
	(+)	Equivocal	(-)	
TECHLAB (ELISA)				
(+)	8 (12.3%)	4 (6.2%)	6 (9.2%)	18 (27.7%)
Equivocal	0	0	9 (13.8%)	9 (13.8%)
(-)	0	0	38 (58.5%)	38 (58.5%)
Total	8 (12.3%)	4 (6.2%)	53 (81.5%)	65 (100%)

Abbreviations: ELFA, enzyme linked fluorescent assay; ELISA, enzyme linked immunosolvent assay.

Table 2. Comparison of ELFA and ELISA tests with *C. difficile* culture and toxin A and toxin B PCR results

	PCR results		VIDAS			TECHLAB			Total
	Toxin A	Toxin B (+)	(+)	Equivocal	(-)	(+)	Equivocal	(-)	
Culture (+)	(+)	13 (100%)	7 (10.8%)	4 (6.2%)	2 (3.1%)	11 (16.9%)	0	2 (3.1%)	13 (20%)
	Variant*	5 (83.3%)	1 (1.5%)	0	5 (7.6%)	1 (1.5%)	0	5 (7.6%)	6 (9.2%)
	(-)	2 (50%)	0	0	4 (6.2%)	1 (1.5%)	1 (1.5%)	2 (3.1%)	4 (6.2%)
Culture (-)	ND	ND	0	0	42 (64.6%)	6 (9.3%)	8 (12.4%)	28 (43.1%)	42 (64.6%)
Total		20 (87.0%)	8 (12.3%)	4 (6.2%)	53 (81.5%)	19 (29.2%)	9 (13.9%)	37 (56.9%)	65 (100%)

\**C. difficile* toxin A, variant was toxin A gene, showing atypical 700 bp in PCR using NK9-NK11 primers.

Abbreviations: ELFA, enzyme linked fluorescent assay; ELISA, enzyme linked immunosolvent assay; ND, not done.

침서대로 VIDAS의 경우 CDB 검사로 확인하였고, TECHLAB은 같은 검사를 다시 한번 시행하였다.

균이 배양된 경우 Kato 등[14]의 방법을 참조하여 NK9 (CC-ACCAGCTGCAGCCATA)-NK11 (TGATGCTAATAATG-AATCAAAAATGGTAAC) 시발체를 사용하여 독소 A 유전자에 대한 PCR을 시행하였다. 증폭산물의 전기영동 후 1,200 bp 밴드가 관찰된 경우 독소 A 양성으로, 700 bp 밴드가 관찰되면 독소 A 유전자 변이주, 밴드가 관찰되지 않으면 독소 A 음성으로 판정하였다. PCR 결과의 변이주는 효소면역법의 민감도, 특이도, 양성 및 음성 예측률 산정시 모두 음성으로 간주하여 처리하였다. 독소 B 유전자에 대한 PCR은 NK104 (GTGTAGCAATGAA-AGTCCAAGTTTACGC)-NK105 (CACTTAGCTCTTTGATTGCTGCACC) 시발체를 사용하여 시행하였다[14]. 증폭산물은 전기영동 후 270 bp의 밴드가 관찰되면 양성으로 판정하였다.

## 결 과

두 효소면역법간의 일치율은 70.8% (46/65)였다(Table 1). 불일치를 보인 19예는 TECHLAB 양성/VIDAS equivocal 4예(6.2%), TECHLAB 양성/VIDAS 음성 6예(9.2%), TECHLAB equivocal/VIDAS 음성 9예(13.8%)였다. VIDAS에서 equivocal 결과를 보인 4예는 CDB 검사상 모두 양성이었으며, TECHLAB에서 equivocal 결과를 보인 9예는 재검 결과 그대로 equivocal 결과로 나와, 재검 후 두 방법간의 일치율은 76.9% (50/65)였다.

*C. difficile* 배양과 VIDAS와 TECHLAB 결과의 일치율은 각각 83.1% (54/65) 및 64.6% (42/65)이었다. *C. difficile*이 분리된 23예를 대상으로 한 독소 A PCR 결과는 독소 A 양성 13예(56.5%), 변이주 6예(26.1%), 음성 4예(17.4%)이었으며 독소 B PCR 양성률은 독소 A PCR 양성 균주, 변이주 및 음성 균주에서 100% (13/13), 83.3% (5/6), 50% (2/4)였다(Table 2).

두 방법 모두에서 양성을 보인 8예는 모두 배양 양성이었으며, 독소 A PCR 검사상 7예가 양성이었고 1예는 변이주였다. TECHLAB 양성/VIDAS equivocal이었던 4예도 모두 배양 및 독소 A PCR 검사 양성이었다. VIDAS 음성/TECHLAB 양성인 6예는 5예가 배양 음성이었고, 1예는 배양 양성이었으나 PCR 결과와

독소 A 음성이었다. VIDAS 음성/TECHLAB equivocal 결과를 보인 9예는 8예가 배양 음성이었고, 1예는 배양은 양성이었으나 PCR 독소 A는 음성이었다. TECHLAB과 VIDAS에서 모두 음성을 나타낸 38예 중 9예는 배양에서 *C. difficile*이 분리되었으나, 이중 2예만 PCR 독소 A 양성이고 5예는 변이주, 2예는 독소 A 음성이었다.

따라서 민감도는 독소 A PCR 양성을 기준으로 하고, 특이도는 배양 음성인 42예와 배양은 양성이지만 실지 독소 A가 없거나 변이주인 10예를 합하여 산정하였다. 이를 근거로 한 VIDAS의 민감도는 84.6% (11/13), 특이도는 98.1% (51/52)였으며, TECHLAB의 민감도는 84.6% (11/13), 특이도는 67.3% (35/52)였다. 양성 및 음성 예측률은 VIDAS 91% (11/12)/96.2% (51/53), TECHLAB 78% (11/14)/94.6% (35/37)였다.

## 고 찰

효소면역법으로 PMC 및 AAD 환자의 *C. difficile* 독소 A를 검출하는 방법은 비교적 용이하며 독소 양성 및 독소 음성인 경우를 바로 변 검체에서 신속하게 판별하는 장점이 있다. 따라서 일반적으로 배양이나 세포독성검사보다는 효소면역법으로 *C. difficile* 독소 A를 검출하는 기관이 많은데[3-11] 같은 효소면역법일지라도 민감도, 특이도가 다를 수 있고 각 국가간 균주의 성상이 달라 검출률에 차이를 보일 수 있다. 또한 배양이나 PCR을 시행하지 않고 효소면역법만으로 독소 A 검출 유무를 임상에 보고 할 경우 변이주의 빈도가 증가하는 우리나라의 경우[12, 13] 이들 검사가 실질적으로 환자의 진단에 얼마나 도움이 될 수 있는지에 대한 보고가 많지 않다[9-12].

본 연구에서 두 효소면역법의 일치율은 70.8%로, VIDAS의 equivocal 결과가 CDB 검사로 모두 양성으로 판정되어 일치율이 76.9%로 향상되었지만 그다지 높은 편은 아니었다. 불일치를 보인 예가 주로 TECHLAB에서 양성이었으나 VIDAS에서는 equivocal (4예) 혹은 음성(6예)이었고 TECHLAB에서 equivocal이었으나 VIDAS에서는 모두 음성(9예)이었던 결과 및 배양 양성 검체에서 TECHLAB의 양성률이 60.9%로 VIDAS의 52.2%보다 높았고 배양 음성 검체의 33.3%는 TECHLAB에서만 양성을 보였다는 점은 TECHLAB 시약의 감도가 높다고 볼 수 있는 측면과 위양성률이 높을 수 있다는 두 가지 가능성이 있다. 배양과의 일치율에서 VIDAS는 83.1%, TECHLAB은 64.6%로 VIDAS가 TECHLAB에 비해 배양과 일치하는 경향을 보였지만 배양만으로는 독소 A의 분비를 명확히 판정하기 어렵기 때문에 PCR 독소 A검사를 추가하여 불일치 사례를 비교해 보았다. VIDAS 음성이면서 TECHLAB 양성 혹은 equivocal인 경우는 배양 음성인 경우가 대부분이고 배양 양성인 경우도 PCR에서 독소 A가 음성이었던 것은 TECHLAB의 ELISA법은 감도는 높지만 상대적으로 위양성의 빈도가 높다고 판단된다. 본 연구가 변 검체에서

직접 독소 A PCR을 시행한 것이 아니므로 배양 음성인 경우라도 독소 A의 존재 여부를 완전 배제하기는 어렵지만 두 효소면역법에서 독소 A가 모두 음성인 38예 중 9예(23.7%)에서도 *C. difficile* 균주가 배양되었고 이중 2예가 독소 A PCR 양성이었으므로 검출률은 *C. difficile* 독소 A 효소면역법보다 배양법이 더 높다고 여겨진다. 배양이나 PCR 검사가 뒷받침 되지 않은 효소면역법의 위양성 결과는 환자에게 불필요한 항생제가 투여되거나, vancomycin 내성균주의 출현[15] 및 진단이 지연되는 경우를 초래할 가능성이 있다.

VIDAS에서 equivocal 결과가 나올 때, 시약 지침서에는 CDB 검사를 시행하여 재검할 것을 권장하지만 strip을 추가로 2개 더 사용해야 하는 비용 문제가 발생하므로 검사실에서 일반적으로 시행하기에는 현실적인 문제가 있다. 본 연구의 결과로는 VIDAS의 equivocal 4예는 VIDAS CDB 검사 및 PCR 독소 A검사에서 모두 양성으로 확인되어, VIDAS equivocal 결과는 CDB 재검을 시행하지 못하여도 독소 A 양성일 가능성이 높다고 사료된다. 독소 B는 PCR 검사상 독소 A PCR 양성 균주에서 100%, 변이주에서 83.3%, 음성 균주에서 50%로 관찰되어 독소 A의 변이가 있거나 독소 A가 없더라도 독소 B는 존재하여 세포 독성을 나타낼 가능성이 있으므로 효소면역법으로 독소 A 검사만을 시행하는 것보다는 독소 B검사를 추가하는 것이 바람직할 것으로 여겨진다.

결론적으로 독소 A에 대한 검출 민감도는 두 효소면역법이 같았고 특이도 및 양성 예측률은 VIDAS법이 상대적으로 우수하였다. 현재 국내의 독소 A 음성/독소 B 양성 *C. difficile* 변이주의 분리 빈도가 높을 것으로 추정되므로[12, 15] 향후 *C. difficile* 독소 검사는 독소 A와 독소 B를 모두 포함한 효소면역법을 시행하거나, PCR 검사로 독소 A와 독소 B 검사를 시행할 필요가 있다고 사료된다[12, 16].

## 요 약

**서론 :** *Clostridium difficile* (*C. difficile*)은 병원 감염을 일으키는 원인균 중의 하나로 독소 생성 여부에 관한 정확한 진단이 중요하다. *C. difficile* 배양 및 세포독성검사 대신 일반적으로 용이하게 사용되는 독소 A 효소면역법 중 ELFA법과 ELISA법을 *C. difficile* 배양 및 독소 A PCR와 상호 비교하여 진단적 의의를 평가하고자하였다.

**재료 및 방법 :** *C. difficile* 배양 검사가 의뢰되었던 65예의 설사변을 대상으로 혐기성 배양을 시행하였으며, 같은 검체로 ELFA (VIDAS *C. difficile* Toxin A II assay, France)법과 ELISA법 (C.DIFFICILE TOX A II, TECHLAB, USA)을 이용한 독소 A 검사를 시행하였다. 독소 A PCR 검사는 배양에서 분리된 *C. difficile* 23균주를 대상으로 시행하였다.

**결과 :** 독소 A 효소면역검사간의 결과 일치율은 76.9% (50/65)였다. 배양 일치율은 VIDAS 83.1% (54/65), TECHLAB

64.6% (42/65)였다. 독소 A PCR 결과는 양성 13예(56.5%), 변이주 6예(26.1%), 음성 4예(17.4%)였다. PCR 및 배양 기준의 VIDAS 독소 A 검사의 민감도는 84.6% (11/13), 특이도는 98.1% (51/52)였고 TECHLAB법은 민감도는 84.6% (11/13), 특이도는 67.3% (35/52)였다. 양성 및 음성 예측률은 VIDAS 91% (11/12)/96.2% (51/53), TECHLAB 78% (11/14)/94.6% (35/37)이었다. 독소 B PCR은 독소 A 양성, 변이주, 음성 균주의 100%, 83.3% 및 50%에서 양성으로 나타났다.

**결론 :** 독소 A에 대한 검출 민감도는 두 효소면역법이 같았고 특이도 및 양성 예측률은 VIDAS법이 상대적으로 우수하였다. 현재 국내의 독소 A 음성/독소 B 양성 *C. difficile* 변이주의 빈도가 예상보다 높을 것으로 추정되므로 향후 *C. difficile* 독소 검사는 독소 A와 독소 B를 모두 포함한 효소면역법을 시행하거나, PCR 검사로 독소 A와 독소 B 검사를 시행할 필요가 있다고 사료된다.

## 참고문헌

- Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002;346:334-9.
- Wilkins TD and Lysterly DM. *Clostridium difficile* testing: after 20 years, still challenging. *J Clin Microbiol* 2003;41:531-4.
- Shanholtzer CJ, Willard KE, Holter JJ, Olson MM, Gerding DN, Peterson LR. Comparison of the VIDAS *Clostridium difficile* toxin A immunoassay with *C. difficile* culture and cytotoxin and latex tests. *J Clin Microbiol* 1992;30:1837-40.
- Staneck JL, Weckbach LS, Allen SD, Siders JA, Gilligan PH, Coppitt G, et al. Multicenter evaluation of four methods for *Clostridium difficile* detection: ImmunoCard *C. difficile*, cytotoxin assay, culture and latex agglutination. *J Clin Microbiol* 1996;34:2718-21.
- Fedorko DP, Engler HD, O'Shaughnessy EM, Williams EC, Reichelderfer CJ, Smith WI Jr. Evaluation of two rapid assays for detection of *Clostridium difficile* toxin A in stool specimens. *J Clin Microbiol* 1999;37:3044-7.
- Peterson LR, Olson MM, Shanholtzer CJ, Gerding DN. Results of a prospective, 18-month clinical evaluation of culture, cytotoxin testing, and culture- and toxin- (CDT) latex testing in the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1988;10:85-91.
- Kelly MT, Champagne SG, Sherlock CH, Noble MA, Freeman HJ, Smith JA. Commercial latex agglutination test for detection of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *J Clin Microbiol* 1987;25:1244-7.
- Lysterly 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.
- Kang JO, Chae JD, Eom JI, Han D, Park PW, Park IK, et al. Comparison of *Clostridium difficile* toxin A immunoassay with cytotoxicity assay. *Korean J Clin Microbiol* 2000;3:43-7. (강정옥, 채정돈, 엄정인, 한동수, 박필환, 박일규 등. *Clostridium difficile* 독소 A 면역검사와 세포독성 검사의 비교. 대한임상미생물학회지 2000;3:43-7.)
- Lee SH and Pai CH. Clinical significance of VIDAS *Clostridium difficile* Toxin A immunoassay. *Korean J Clin Pathol* 1996;16:563-9. (이성희 및 배지현. VIDAS를 이용한 *Clostridium difficile* Toxin A 검사의 임상적 고찰. 대한임상미생물학회지 1996;16:563-9.)
- Shin BM and Lee EJ. Comparison of Toxin A enzyme linked fluorescence assay and latex agglutination based on *Clostridium difficile* culture and Toxin A and B PCR assay. *Korean J Clin Microbiol* 2005;8:130-5. (신보문 및 이은주. *Clostridium difficile* 배양 및 Toxin A, B PCR 검사를 기준으로 한 Toxin A 면역검사 및 라텍스 응집검사의 비교 분석 및 의의. 대한임상미생물학회지 2005;8:130-5.)
- 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. (신보문 및 콰은영. 독소 A 음성, 독소 B 양성 *Clostridium difficile* 변이주에 관한 연구. 대한진단검사의학회지 2006;26:27-31.)
- Shin BM, Kim EC, Lee K, Kuak EY. Emergence of toxin A(-)/toxin B(+) variant *Clostridium difficile*. 16th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2006;135.
- 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.
- Harris AD, Samore MH, Lipsitch M, Kaye KS, Perencevich E, Carmeli Y. Control-group selection importance in studies of antimicrobial resistance: examples applied to *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococci*, and *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* 2002;15:1558-63.
- Lee H, Kim YA, Park KI, Lee K, Chung Y. Detection of toxin B gene of *Clostridium difficile* by polymerase chain reaction from clinical isolates. *Korean J Clin Microbiol* 1999;2:77-81. (이혁민, 김영아, 박광일, 이경원, 정윤섭. *Clostridium difficile* 분리주에서의 중합효소 연쇄반응법을 이용한 B 독소 유전자의 검출. 대한임상미생물학회지 1999;2:77-81.)