

## 등온증폭법을 이용한 *Clostridium difficile* 검출

- 연구노트 -

인에원 · 하수정 · 양승국 · 오세욱<sup>†</sup>

국민대학교 식품영양학과

### Detection of *Clostridium difficile* by Loop-Mediated Isothermal Amplification

Ye-Won In, Su-Jeong Ha, Seung-Kuk Yang, and Se-Wook Oh<sup>†</sup>

Dept. of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

#### Abstract

This study was conducted to develop a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the detection of *Clostridium difficile*. The tested target gene was 16S ribosomal RNA. Five different LAMP primer sets were designed, and LAMP was performed. All primer sets targeting the 16S rRNA gene (BIP, FIP, B3, F3, LF, PF) were determined as positive in *tcdA*-positive, *tcdB*-positive (A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>) and *tcdA*-negative, *tcdB*-negative (A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>) *Clostridium difficile* strains. As the LAMP reaction took less than 80 min and did not require expensive machine such as thermocycler, it can be used as a rapid and simple detection method for foodborne pathogens.

**Key words:** *Clostridium difficile*, LAMP, rapid detection, 16S rRNA gene

#### 서 론

*Clostridium difficile*은 혐기성 그람 양성 간균으로 아포를 생성하며 설사 입원 환자의 주요한 원인균이다. 1978년 항생제와 연관된 *C. difficile* 대장염(*Clostridium difficile* colitis, CDC)의 원인으로 처음 기술되었고 위막성 대장염이나 항생제 관련 설사의 주 원인균으로 보고되었다(1). 항생제 사용이 빈번해짐에 따라 최근 *C. difficile*에 의한 설사(*Clostridium difficile*-associated diarrhea, CDAD)의 발생 빈도 역시 증가하고 있으며 항생제와 연관된 설사의 15~25%를 차지하고 있다(2). 미국과 캐나다, 유럽을 중심으로 2003년 이후 BI/NAP1/027형이 유행하여 재발률과 사망률이 높은 중증 *C. difficile* 감염이 증가하였으며 국내에서도 2009년 고병원성 BI/NAP1/027형 환자가 최초 보고되었다(3-5). 고병원성인 BI/NAP1/027형은 endonuclease analysis group(BI), pulse-field gel electrophoresis type(NAP1), 그리고 polymerase chain reaction ribotype(027)로써 binary toxin을 생산하며 *tcdC* 유전자의 18염기의 결실이 있고 *in vitro* 결과에서, control 균주보다 16~23배 많은 독소를 생산한다고 알려져 있다(2,6).

한편, 소매점 분쇄육에서 분리한 12균주 중 8균주가 환자에게 발견되는 ribotype 027과 80%의 유사성이 있다고 하였으며, 또한 소고기에서 분리한 31균주는 8개의 ribotype을 가지고 있었는데 7종은 사람에게 발견되는 것이었다고 하였

다(7). 또한 애리조나 주에서 식육에 대한 조사 결과 88 시료 중 37개 시료에서 *C. difficile*이 검출되었다고 하였으며 분리 균주 중 25균주는 ribotype 078에 속하였으며 ribotype 027에 속하는 것도 4균주라고 하였다(8). 이와 같이 *C. difficile*이 식품을 통한 감염이 가능한 식중독 균이라는 증거들이 계속적으로 제시되고 있다. 원인 식품으로는 고기, 야채, 즉석식품 등 다양한 식품이 제시되고 있다(9,10). 또한 *C. difficile*은 열 저항을 가지는 포자를 형성하기 때문에 햄버거 패티 등을 조리 시 일반적인 조리시간이나 온도에 사멸되지 않고 존재할 가능성이 있으며 조리된 즉석편의 식품이나 냉장 식품, 샐러드에서도 포자 상태로 존재하고 있다가 germinate 되어 CDAD 식중독의 원인이 될 수 있다(11,12).

염기서열 분석은 미생물 동정의 최종적인 방법이 되며 이때 이용되는 유전자는 16S rRNA, 16S-23S rRNA ITS(internally transcribed spacer), 65 kDa heat-shock protein gene(*hsp65*), RNA polymerase-subunit gene(*rpoB*)이다(13). 이 중 16S rRNA 유전자는 모든 박테리아에 존재하며 보존부위 및 변이부위를 가지고 있어 미생물 계통분류에 이상적인 유전자로 미생물 동정에도 많이 연구되었다(14).

*C. difficile*의 검출에 이용되고 있는 유전자는 house-keeping 유전자인 *tpi* 유전자와 병원성을 나타내는 주요 독소 유전자인 toxin A(enterotoxin, *tcdA*)와 toxin B(cytotoxin, *tcdB*)이다(15). 일부 균주에 대하여 binary toxin (CDT, actin-specific ADP-ribosyltransferase)이 생성되고

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: swoh@kookmin.ac.kr  
Phone: 82-2-910-5778, Fax: 82-2-910-5249

pathogenic locus(PaLoc)에는 주요 독소 유전자인 *tcdA*, *tcdB* 외에 accessory 유전자로 *tcdR*, *tcdE*, *tcdC*이 함께 존재하고 있어 이 독소 유전자를 타깃으로 한 검출방법 등도 연구되고 있다(16-18).

*C. difficile* 검출방법으로 전 세계적으로 공인된 시험법은 없으며 식품에서 *C. difficile*에 대한 분리법도 현재 몇 종류의 배지와 polymerase chain reaction(PCR)과 ribotyping, loop-mediated amplification 방법 등이 제시될 뿐 최적화된 방법은 없다.

최근 loop-mediated isothermal amplification(LAMP)이 식중독 균 분리기술로서 이용되고 있는데 기존 polymerase chain reaction(PCR) 방법과 유사하나 기존의 PCR 방법이 변성(denaturation), 접합(annealing), 신장(extension) 세 가지 단계를 거치면서 온도의 변화를 주어야 하는 반면, 일정한 온도에서 접합 및 신장이 가능하다는 특징이 있다(19). 별도의 온도변화를 주지 않고 63~65°C 조건에서 주형 DNA의 증폭이 가능하게 됨에 따라 PCR 방법보다 소요시간을 줄일 수 있으며 고가의 PCR 장비가 아닌 항온 수조나 오븐, 온상고 등 저가의 장비에서도 증폭이 가능하며 증폭산물을 전기영동 과정 없이 눈으로 확인할 수 있다(20).

본 연구에서는 최근 식중독 균으로 인정되고 있는 *C. difficile*에 대하여 LAMP에 의한 검출가능성을 타진하고자 16S rRNA 유전자를 타깃으로 하는 서로 다른 primer set를 구성하여 검출실험을 실시하였으며 이에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

*Clostridium difficile*(KCTC 5009, NCCP 10868, NCCP

10898)와 *C. difficile* 32(isolation from beef)를 Brain Heart Infusion(BHI; Oxoid, Hampshire, England)을 이용하여 37 °C에서 48시간 혐기적으로 배양한 후 CCFA(Cefoxitin-Cycloserine-Fructose Agar; Oxoid)에 도말하여 형성된 단일 콜로니를 실험에 사용하였다.

DNA 분리

DNA는 BHI에 배양한 *C. difficile* 배양액을 AccuPrep® Genomic DNA Extraction kit(Bioneer Co., Daejeon, Korea)를 이용하여 추출하였다. 공급자가 제시한 방법에 따라 DNA를 분리하였다.

LAMP primer set 구성

*C. difficile*의 16S rRNA를 target region으로 하는 염기서열을 National center for biotechnology information(NCBI)에서 검색하였다. 이 염기서열을 이용하여 LAMP primer set(BIP, FIP, B3, F3, LF, and PF)를 구성하기 위하여 Primer Explorer V4 software program and Primer3 Input(version 0.4.0, DNA STAR, Inc., Madison, WI, USA) program을 이용하였으며 설계한 primer set를 Bioneer사(Bioneer Co.)에 의뢰하여 합성하였다(Table 1, Fig 1).

LAMP 반응 조건

Loopamp DNA amplification kit(Eiken Chemical, Tokyo, Japan)를 사용하여 수행하였으며 총 반응용액은 반응튜브당 2×reaction mix.(Tris-HCl; pH 8.8 40 mM, KCl 20 mM, MgSO<sub>4</sub> 16 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM, Tween 20 0.2%, betaine 1.6 M, dNTPs 2.8 mM each) 12.5 μL, FIP 40 μmol, BIP 40 μmol, F3 5 μmol, B3 5 μmol, 1 μL의 *Bst* DNA polymerase와 distilled water를 포함하여 23 μL가 되도록 혼합하였으며 한 번에 제조하여 분주하였다. 여기에 sample DNA



Fig. 1. Oligonucleotide primers used for amplification of 16S rRNA gene, single-underlined and double-underlined letter indicate the sequences of primers for LAMP, respectively.

Table 1. Primer sequence sets LAMP detection of *Clostridium difficile*

Target	ID	Primer	Sequence (5'-3')
16S rRNA	1	F3	CGACCTGAGAGGGTGATCG
		B3	CTGCTGGCACGTAGTTAGC
		FIP	TGCAATATTCCCCTGCTGCC-GCCACATTGGAAGTGAACA
		BIP	AACGCCGCGTGAGTGATGAAG-GCTTCCTCCTCAAGTACCGT
		LF	CCCGTAGGAGTTTGGACCG
		LB	GCCTTCGGGTCGTAAAACCTCT
	2	F3	GTGGGGAGCAAACAGGATT
		B3	TCTTCGCGTTGCTTCGAATT
		FIP	CGTTAGCTGCGGCACCGAAG-AGTCCACGCTGTAAACGATG
		BIP	CCTGGGAAGTACGCTCGCAA-ACATGCTCCGCTACTTGTG
		LF	GTAACCCCGACACCTAGTAG
		LB	GAGTGAACTCAAAGGAATTGACG
	3	F3	CGATCAGTAGCCGACCTGA
		B3	CTGCTGGCACGTAGTTAGC
		FIP	CACTGCTGCCTCCCGTAGGA-AGGGTGATCGGCCACATT
BIP		AACGCCGCGTGAGTGATGAAG-GCTTCCTCCTCAAGTACCGT	
LF		TGGACCGTGCTCAGTTCC	
LB		GCCTTCGGGTCGTAAAACCTC	
4	F3	GCCGCGTAATACGTAGG	
	B3	AGTTACAGTCCAGAGAGCCG	
	FIP	GGTTGAGCCGTAGCCTTTCCT-ATCCGGATTTACTGGGCGTA	
	BIP	AGTGCAGGAGAGAGAGTGGA-CTTCGCAACTGGTGTTCCT	
	LF	CTGACTTGAAAGACCGCCTAC	
	LB	ATTCTAGTGTAGCGGTGAAATG	
5	F3	AACACCAGTTGCGAAGGC	
	B3	TGAGTTTCACTCTTGCGAGC	
	FIP	ACAGCGTGGACTACCAGGGTAT-GGACTGTAAGTACGCTGAG	
	BIP	ATGAGTACTAGGTGTCGGGGT-CCAGGCGGAGTACTTAATGC	
	LF	TCCCCACGCTTTCGTGC	
	LB	CCTTCGGTGCCGACGCTAA	

2 µL를 첨가하여 최종 volume이 25 µL가 되도록 하고 62°C에서 1시간, 80°C에서 5분 thermal cycle로 반응시켰다.

#### 검출 한계치 산출

*C. difficile*를 사용하여 BHI에 혐기적 조건으로 37°C에서 24시간 배양한 배양액을 연속적으로 희석하여  $10^1 \sim 10^5$  cfu/mL의 농도로 조정하였다. 각 배양액과 희석액에서 1 mL를 취하여 DNA를 분리하고 LAMP를 수행하여 검출 한계 값을 구하였다. 또한 시간 별로 CCFA에 분주하여 성장시킨 후 균수를 측정하여 검출 한계 값을 보정하였다.

#### 증폭 산물 확인

1.5%(w/v) agarose gel로 Mupid-one(Advance Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 이용하여 전기영동 하여 증폭산물을 분석

하였다. UV transilluminator 위에 agarose gel을 올려 Gel print system(Core Bio Corp., Seoul, Korea)으로 최종 확인하였다.

## 결과 및 고찰

#### LAMP를 이용한 *C. difficile* 검출

*C. difficile* 3종과 고기에서 분리한 분리균주 *C. difficile* 1종에서 추출한 genomic DNA를 16S rRNA 유전자 sequence를 이용하여 구성한 5종의 primer set의 LAMP 수행 결과를 Table 2에 나타내었다. 실험에 사용된 primer set 중 16S rRNA를 타겟으로 하여 구성된 primer set 5개 중 5종 모두에 대해서 *C. difficile* 4종이 증폭되었다(Fig. 2). 증폭된

Table 2. Results of LAMP assays for detection of the 16S rRNA gene

Species	Genotype <sup>1)</sup>	LAMP-positive strains using a primer set (s)				
		16S rRNA				
		1 <sup>2)</sup>	2	3	4	5
<i>C. difficile</i> KCTC 5009	<i>tcdA+</i> , <i>tcdB+</i>	+	+	+	+	+
<i>C. difficile</i> NCCP 10868	<i>tcdA-</i> , <i>tcdB-</i>	+	+	+	+	+
<i>C. difficile</i> NCCP 10898	<i>tcdA-</i> , <i>tcdB-</i>	+	+	+	+	+
<i>C. difficile</i> 32 <sup>3)</sup>	<i>tcdA-</i> , <i>tcdB-</i>	+	+	+	+	+

<sup>1)</sup>+: toxin positive, -: toxin negative. <sup>2)</sup>ID of primer sets tested. <sup>3)</sup>Strain was isolated from beef.

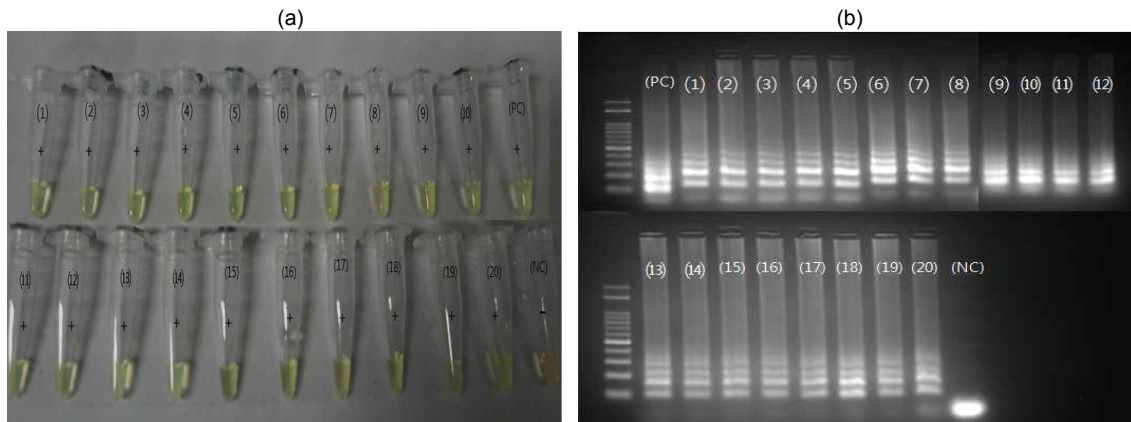


Fig. 2. The results of LAMP reactions detected by naked eye (a) and gel electrophoresis (b). Primer set 1: 1~4, primer set 2: 5~8, primer set 3: 9~12, primer set 4: 13~16, primer set 5: 17~20. 1, 5, 9, 13, 17: *Clostridium difficile* KCTC 5009, 2, 6, 10, 14, 18: *Clostridium difficile* NCCP 10868, 3, 7, 11, 15, 19: *Clostridium difficile* NCCP 10898, 4, 8, 12, 16, 20: *Clostridium difficile* 32 (isolated from beef), PC: positive control, NC: negative control.

*C. difficile*은 TcdA positive, TcdB positive genotype과 TcdA negative, TcdB negative genotype을 가지는 균주였다. 그리고 detection limit를 관찰하기 위하여 균주를 대상으로  $10^{1-5}$  cfu/mL 수준으로 심진 희석하여 각각 분리한 DNA를 대상으로 16S rRNA primer set로 LAMP를 수행하였다. 그 결과, detection limit는  $6.0 \times 10^1$  cfu/mL로 측정되었으며 tube 상으로 관찰하였을 때도 증폭산물을 확인할 수 있었다. Kato 등(21)은 toxin B 유전자를 타겟으로 하여 대변검체에서 toxin A(TcdA) positive, toxin B(TcdB) positive *C. difficile*과 toxin A(TcdA) negative, toxin B(TcdB) positive *C. difficile*을 검출하였다고 하였으며, Norén 등(22)은 *tcdA* 유전자를 타겟으로 구성하여 대변 검체로부터 *C. difficile*을 검출하였다고 보고하였다. 그러나 아직까지 16S rRNA 유전자를 타겟으로 하여 LAMP를 수행한 보고는 없는 실정으로 16S rRNA 유전자는 모든 미생물에 존재하고 미생물 계통분류에 이상적인 유전자로 미생물 동정에도 많이 연구되고 있다(14).

본 연구에서 16S rRNA 유전자를 바탕으로 구성된 5개의 target sequence에서 *C. difficile*의 TcdA-positive, TcdB-positive(A<sup>+</sup>B<sup>+</sup>)와 TcdA-negative, TcdB-negative(A<sup>-</sup>B<sup>-</sup>)의 genotype 균주와 분리 균주 모두에서 양성으로 나타났으며 detection limit는  $10^1$  cfu/mL로 매우 낮게 측정되었다. 따라서 16S rRNA를 타겟으로 하는 LAMP는 toxin 생성 여부에 상관없이 모든 *C. difficile*을 분리할 수 있을 것으로 생각되며, 검출한계도 realtime PCR 수준으로 매우 낮으므로 신속 검출 기술로 활용이 가능할 것으로 생각되었다. 또한 분석 시 고가의 장비를 필요로 하지 않으며 검출 결과를 눈으로 직접 확인할 수 있으며 고도의 분석기술을 요구하지 않기 때문에 식품 생산 현장에서 활용될 수 있을 것이라고 생각되었다.

## 요 약

본 연구는 loop-mediated isothermal amplification(LAMP)을 이용하여 *Clostridium difficile*을 검출하고자 하였다. LAMP 수행을 위하여 선택적인 타겟 유전자로 *C. difficile*의 16S ribosomal RNA를 타겟으로 하여 primer set를 구성하였다. 5개의 primer set(BIP, FIP, B3, F3, LF, PF)를 이용하여 TcdA와 TcdB toxin이 모두 양성인 균주, TcdA와 TcdB toxin이 모두 음성인 균주와 식품 분리균주를 효과적으로 검출할 수 있었다. LAMP는 80분 이내의 시간이 필요하며 thermocycler와 같은 장비를 필요로 하지 않고 또한 결과를 직접 눈으로 확인할 수 있기 때문에 식품 생산 현장에서 활용될 수 있을 것이라고 생각되었다.

## 감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2012-0005363).

## 문 헌

- Larson HE, Price AB, Honour P, Borriello SP. 1978. *Clostridium difficile* and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet* 1: 1063-1066.
- Lee YJ, Choi MG, Lim CH, Jung WR, Cho HS, Sung HY, Nam KW, Chang JH, Cho YK, Park JM, Kim SW, Chung IS. 2010. Change of *Clostridium difficile* colitis during recent 10 years in Korea. *Korean J Gastroenterol* 55: 169-174.
- Ricciardi R, Rothenberger DA, Mandoff RD, Baxter NN. 2007. Increasing prevalence and severity of *Clostridium difficile* colitis in hospitalized patients in the United States. *Arch Surg* 142: 624-631.
- Pepin J, Valiquette L, Cossette B. 2005. Mortality attributable to nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease during an epidemic caused by hyper virulent strain in Quebec. *CMAJ* 173: 1037-1042.

5. Tae CH, Jung SA, Song HJ, Kim SE, Choi HJ, Lee M, Hwang Y, Kim H, Lee K. 2009. The first case of anti-biotic-associated colitis by *Clostridium difficile* PCR ribo-type 027 in Korea. *J Korean Med Sci* 24: 520-524.
6. O'Connor JR, Johnson S, Gerding DN. 2009. *Clostridium difficile* infection caused by the epidemic BI/NAP1/027 strain. *Gastroenterology* 136: 1913-1924.
7. Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. 2007. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis* 13: 485-487.
8. Songer JG. 2004. The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals. *Anim Health Res Rev* 5: 321-326.
9. McDonald LC. 2009. Surveillance for Disease and Sources of Infection: Initiatives at the Federal Level and International. Division of Healthcare Quality Promotion, Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA, USA.
10. FDA. 2010. *Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff—Establishing the Performance Characteristics of In Vitro Diagnostic Devices for the Detection of Clostridium difficile*. November 29, 2010. Food and Drug Administration, New Hampshire, MD, USA.
11. Gould LH, Limbago B. 2010. *Clostridium difficile* in food and domestic animals: a new foodborne pathogen? *Clin Infect Dis* 51: 577-582.
12. Lawley R. *Clostridium difficile*—a food safety hazard? <http://www.foodsafetywatch.com/public/617.cfm>
13. Patel JB, Leonard DG, Pan X, Musser JM, Berman RE, Nachamkin I. 2000. Sequence-based identification of *Mycobacterium* species using the MicroSeq 500 16S rDNA bacterial identification system. *J Clin Microbiol* 38: 246-251.
14. Harmsen D, Rothgänger J, Frosch M, Albert J. 2002. RIDOM: Ribosomal differentiation of medical micro-organisms database. *Nucleic Acids Res* 30: 416-417.
15. Lemee L, Dhalluim A, Testelin S, Mattrat MA, Maillard K, Lemeland JF, Pons JL. 2004. Multiplex PCR targeting tpi (triose phosphate isomerase), tcdA (toxinA), and tcdB (toxin B) genes for toxigenic culture of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol* 42: 5710-5714.
16. Matamouros S, England P, Dupuy B. 2007. *Clostridium difficile* toxin expression is inhibited by the novel regulator TcdC. *Mol Microbiol* 64: 1274-1288.
17. Braun V, Hundsberger T, Leukel P, Sauerborn M, von Eichel-Steiber C. 1996. Definition of the single integration site of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile*. *Gene* 181: 29-38.
18. Cohen SH, Tang YJ, Silva J Jr. 2000. Analysis of the pathogenicity locus in *Clostridium difficile* strains. *J Infect Dis* 181: 659-663.
19. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. 2001. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 289: 150-154.
20. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucl Acid Res* 28: e63.
21. Kato H, Yokoyama T, Kato H, Arakawa Y. 2005. Rapid and simple method for detecting the toxin B gene of *Clostridium difficile* in stool specimens by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 43: 6108-6112.
22. Norén T, Alriksson I, Andersson J, Åkerlund T, Unemo M. 2011. Rapid and sensitive loop-mediated isothermal amplification test for *Clostridium difficile* detection challenges cytotoxin B cell test and culture as gold standard. *J Clin Microbiol* 49: 710-711.

(2012년 5월 18일 접수; 2012년 7월 10일 채택)