

[原 著]

整形外科患者を中心にアウトブレイクを認めた toxin A 陰性 toxin B 陽性
Clostridium difficile 株の分子疫学的解析

安藤 隆¹⁾・河野 緑²⁾・佐々木十能³⁾・永野裕子³⁾・兼本園美¹⁾
平田龍三¹⁾・杉本健一¹⁾・長谷部恵子⁴⁾・吉川晃司⁴⁾・清田 浩⁴⁾

¹⁾ 東京慈恵会医科大学葛飾医療センター中央検査部

²⁾ 東京慈恵会医科大学臨床検査医学講座

³⁾ 東京慈恵会医科大学附属病院

⁴⁾ 東京慈恵会医科大学葛飾医療センター感染制御チーム

(平成 25 年 1 月 30 日受付, 平成 25 年 6 月 20 日受理)

当院(病床数 353 床, 全 9 病棟)の A 病棟で *Clostridium difficile* 感染症(CDI)の集団発生を認めた。このため流行時期を含めた 6 ヶ月間に糞便中 *C. difficile* 毒素検査が陽性であった 20 症例のうち, *C. difficile* 菌株が分離できた 15 症例について臨床背景の調査と分離菌株のタイプング解析を行った。15 症例中 4 症例から toxin A 陽性 toxin B 陽性(A⁺B⁺)株が分離され, パルスフィールドゲル電気泳動法と PCR リボタイプング法による型別で 2 タイプに分けられた。残る 11 症例からは toxin A 陰性 toxin B 陽性(A⁻B⁺)株が分離され, 両タイプング結果よりすべて同一株であることが示唆された。toxin A⁺B⁺株はいずれも検出された患者間に病棟の重複はなかった。toxin A⁻B⁺株は半年間にわたって異なる病棟で検出されており, 院内の環境が本菌株により汚染されている可能性が考えられた。集団発生があった A 病棟では短期間に整形外科患者 6 症例が CDI を発症し, 6 症例から分離された菌株がすべて同一タイプであったことから交差感染が疑われた。6 症例中 5 症例では術後感染の予防に複数の抗菌薬が長期間使用されており, 標準予防策や接触感染予防策の徹底と抗菌薬使用の適正化を行った。当院で流行した *C. difficile* 分離菌株のタイプング解析を行うことで伝播状況が把握でき, その後の対応に有用であった。

Key words: *Clostridium difficile*, PFGE, PCR リボタイプング, 毒素遺伝子, 医療関連感染

1. 序文

Clostridium difficile は芽胞を形成する偏性嫌気性のグラム陽性桿菌であり, 抗菌薬関連下痢症/腸炎の主要な原因菌である。また, 芽胞を有することから, 病室の床や便器などの病院環境中に長期にわたって存在し, 医療従事者や患者の手指を介して院内伝播する

ことが知られている¹⁾。

東京慈恵会医科大学附属青戸病院(現東京慈恵会医科大学葛飾医療センター)は 9 病棟からなる全病床数 353 床の地域中核病院であり, 2009 年 1 月から 2010 年 2 月に糞便中 *C. difficile* 毒素が検出された症例数は平均 2.1±1.7 例/月であった。2010 年 3 月に糞便中 *C. difficile* 毒素検査が陽性で *C. difficile* 感染症(CDI)と診断された症例が 8 例連続して認められ, そのうちの 6 症例が A 病棟に入院中の整形外科患者であったことから, CDI のアウトブレイクであると判断した。

本研究では, 集団発生時期を含めた 6 ヶ月間に分離された菌株をパルスフィールドゲル電気泳動法(PFGE 法)と PCR リボタイプング法により型別し分子疫学的解析を行った。さらに各症例の臨床的な背景

著者連絡先: (〒125-8506) 東京都葛飾区青戸 6-41-2
東京慈恵会医科大学葛飾医療センター中央検査部
安藤 隆
TEL: 03-3603-2111 (代) 内線 5268
FAX: 03-3601-9600
E-mail: takashi-andoon@jikei.ac.jp

を調査したので報告する。

II. 対象および方法

対象

東京慈恵会医科大学附属青戸病院（現東京慈恵会医科大学葛飾医療センター）中央検査部では、2009年11月から2010年4月までの6カ月間に187件の糞便中 *C. difficile* 毒素検査の依頼があり、このうち毒素検出検査陽性であった20症例中菌株を分離培養することができた15症例を対象とした。

方法

1. 臨床背景の検索

対象となった症例について、診療録から臨床症状、基礎疾患および抗菌薬の使用状況を調査した。

2. 菌株の分離および分子疫学的解析

(1) *C. difficile* 毒素検査

患者糞便を検体とし、毒素検出キットには TOX A/B QUICK CHECK「ニッスイ」（日水製薬）を使用した。使用方法および判定方法は添付文書に従った。

(2) 菌株の分離培養および保存方法

毒素検出キットで陽性を示した糞便検体について、アルコールで前処理した後、その混合液を CCFA 培地（日本 BD）に接種し、48時間嫌気培養を行った。培養後、発育したコロニーの性状およびグラム染色像を確認し、TOX A/B QUICK CHECK にて陽性となったコロニーを toxin B 産生性 *C. difficile* と判定した。分離培養した *C. difficile* の菌株は、HK 半流動生培地（極東製薬工業株式会社）で増菌した後、分子疫学的検査を行うまで冷暗所で保存した。

(3) パルスフィールドゲル電気泳動法（PFGE 法）

2×YT broth（Difco）で一夜嫌気培養を行った培養液 1 mL を 9.5 mL の 2×YT broth に継代し、4～5時間嫌気培養を行ったものをサンプルとして用いた。前処理は Gal らの方法²⁾を参考にし、終濃度 5 mM EDTA になるように 0.5 M EDTA 溶液を加え遠心分離（2,500 rpm, 5 min）により集菌を行い、4% formaldehyde TEN（10 mM Tris-cl, 5 mM EDTA, 1 M NaCl）溶液を 2 mL 加えて氷上で 1 時間放置した。TEN 溶液で洗浄を行った後、450 μL の TEN 溶液で溶解した。溶解液 180 μL を用いて、サンプル調整用キット CHEF Bacterial Genomic DNA Plug Kits（Bio-Rad）の Instruction Manual に従いゲルブロックを作成した。

溶菌酵素にはキットに含まれている Lysozyme の代わりに Labiase（生化学工業）10 mg/mL を用い、pH 4 条件下で 56°C、10 分間反応を行った。制限酵素は Sma I（Takara）を 40 Units/Plug の濃度で使用し

た。

電気泳動は奈田らの方法³⁾を一部改変して行った。泳動装置（CHEF-DR II：BIO-RAD）を用いて、泳動バッファーには 200 μM チオ尿素を添加した 0.5×TBE（0.089 M Tris-borate, 2 mM EDTA）溶液を 4°C で冷却しながら使用し、泳動条件はパルスタイム 4～20 秒、21 時間で実施した。泳動終了後は Ethidium bromide 染色（1 μg/mL）を行い、UV（302 nm）を照射して写真撮影した。サイズマーカーには Lambda Ladder（BIO-RAD）を使用し、PFGE 法のバンドパターン解析には Tenover らの評価基準⁴⁾を用いた。

(4) PCR リボタイピング法

Stubbs らの方法⁵⁾を一部改変して行った。10 mL の 2×YT broth（Difco）で一夜嫌気培養を行った培養液 1.8 mL に、終濃度が 5 mM EDTA となるように 18 μL の 0.5 M EDTA 溶液を加え、遠心分離（2,500 rpm, 5 min）により集菌を行い、150 μL の Lysis buffer（pH 4）で溶解した。Labiase（生化学工業）を終濃度 10 mg/mL となるように添加し、50°C、10 分間作用させた。遠心分離（12,000 rpm, 30 sec）により集菌を行い、Genomic DNA Purification kit（Qiagen）を用い、蛋白質分解および DNA 抽出を行った。抽出した DNA は 10 ng/μL に濃度調整を行いサンプル DNA として使用した。PCR 反応液の組成は 1×PCR 緩衝液、1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs 混合液、プライマー⁵⁾各 25 pmol, 1.25 U Ex Taq（Takara）で 10 ng のサンプル DNA を加え全量を 50 μL とした。このプライマーは 16S rRNA 遺伝子と 23S rRNA 遺伝子間のスパーサー領域を増幅するために設計されており、増幅後の PCR 産物は 3% の Metaphor agarose（Takara）を使用して電気泳動（120 V, 40 mA, 6 時間）を実施した。泳動終了後、Ethidium bromide 染色（1 μg/mL）を行い、UV（302 nm）を照射して写真撮影した。DNA サイズマーカーには 100 bp DNA Step Ladder（WAKO）および Maker 4（WAKO）を使用した。

(5) 毒素遺伝子の検出

PCR による toxin A 遺伝子、toxin B 遺伝子の検出は加藤らの方法⁶⁾を一部改変し、サンプル DNA はリボタイピング解析で用いた DNA を 10 ng 使用した。PCR 反応液の組成は 1×Taq buffer（Takara）、2.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 6 pM の各プライマー、0.75 U Taq Polymerase（Takara）で全量を 25 μL とした。プライマーは toxin A 遺伝子については NK11 と NK9 のプライマーセット、toxin B 遺伝子については NK104 と NK105 のプライマーセットを用いた。また、toxin A 遺伝子の repeating sequences の検出を

行うために、NKV011とNK9のプライマーセット⁷⁾を用いた。

binary toxin 遺伝子 (*cdtA*, *cdtB*) の検出は Stubbs らの方法⁸⁾を一部改変し、サンプル DNA は PCR リボタイピング法で用いた DNA を 10 ng 使用した。PCR 反応液の組成は 10×PCR buffer (Takara), 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 10 μM の各プライマー, 5 U Takara Taq (Takara) で全量を 50 μL とした。プライマーには *cdtApos*, *cdtArev* および *cdtBpos*, *cdtBrev* のプライマーセットを用いた。

増幅後の PCR 産物に、15% の DNA agar (Marine Bio Products Inc.) を使用して Mupid-2plus (ADVANCE) を用い 50 V で電気泳動を実施した。泳動終了後、Ethidium bromide 染色 (1 μg/mL) を行い、UV (302 nm) を照射して写真撮影した。DNA サイズマーカーには 100 bp DNA Step Ladder (WAKO) を使用した。

III. 結果

1. 臨床背景

15 症例の臨床背景を表 1 に示す。15 症例のうち男性が 11 例、平均年齢は 75.6 歳 (55~96 歳) であった。基礎疾患は、糖尿病性壊疽が 2 例 (13%)、大腿骨頸部骨折が 2 例 (13%)、急性胆嚢炎、微小変化型ネフローゼ症候群、急性虫垂炎、気管支肺炎、抗好中球細胞質抗体関連腎炎、腎不全、頸椎症性脊髄症、肺炎球菌性肺炎、右大腿ヘルニア嵌頓、両変形性関節症、敗血症がそれぞれ 1 例ずつ (7%) であった。臨床症状としては全例が下痢症を発症し、CDI と診断された。発熱は 4 例、腹痛は 1 例に認められた。入院から *C. difficile* 毒素が検出されるまでの期間は平均 21.1 日 (4~44 日) で、全例が入院期間中に抗菌薬を投与されており、多く使用されていた抗菌薬の種類はセフェム系薬とカルバペネム系薬であった。当院には A~I まで 9 病棟あるが、*C. difficile* 毒素の検出件数が最も多かった A 病棟で発症した 6 症例すべてが整形外科患者で、全例 2010 年 3 月に認められた。また、A 病棟では、両足糖尿病壊疽の悪化により入院となった症例 (No. 14) 以外に対し術後の感染予防目的として抗菌薬を投与しており、cefazolin (CEZ) を 4~8 日間静注した後に cefdinir (CFDN) を 6~8 日間経口投与し、各症例とも抗菌薬投与中に CDI を発症した。

2. 菌株の分子疫学的解析

15 症例より分離された *C. difficile* の PFGE 法、PCR リボタイピング法による型別および毒素産生性の結果を表 1 に示す。PFGE 法による型別ではバンドパター

ンが 3 種類の型 (A~C) に分けられた (図 1)。同様に PCR リボタイピング法においてもバンドパターンは 3 種類の型 (a~c) に分けられ (図 2)、PFGE 法による分類と一致し、不一致の株は見られなかった。両法を組み合わせると、A-a タイプの 11 株すべては toxin A 陰性 toxin B 陽性 (A⁻B⁺) 株であり、B-b タイプおよび C-c タイプのそれぞれ 2 株は toxin A 陽性 toxin B 陽性 (A⁺B⁺) 株であった。いずれの株においても binary toxin 遺伝子の *cdtA*, *cdtB* は検出されなかった。多数株を占めた A-a 型 toxin A⁻B⁺ は調査期間すべての時期に分離され、CDI を発症した症例が入院する 6 病棟のうち 5 病棟の患者から分離された。

3. Infection Control Team (ICT) による感染対策の対応

当院の ICT は、整形外科の医師に対して CEZ の投与期間を 2~3 日に短縮し CFDN の投与中止を推奨した。また、標準予防策と接触感染予防策を徹底させ、すべての下痢症患者の病室において周辺環境の次亜塩素酸ナトリウムによる清拭消毒を実施した。さらに CDI 症例に対しては患者の個室管理を徹底した。

IV. 考察

2000 年の Limaye らによる偽膜性大腸炎の報告⁹⁾以降、世界各地で toxin A⁻B⁺ 株の分離報告がなされている。わが国においても院内集団発生事例が報告¹⁰⁾¹¹⁾され、toxin A⁻B⁺ 株の院内伝播に対する注目が高まっている。今回の調査により、当院においても toxin A⁻B⁺ 株が流行株であると考えられた。また、約半年にわたって同一遺伝子型の *C. difficile* が異なる病棟で検出されており、本菌株が院内環境を広く汚染していることが示唆された。一方、toxin A⁺B⁺ 株では 2 種類のバンドパターンが存在したが、いずれも発生病棟に重複はなく大きな流行には至っていない。

本事例まで当院では同時期に同一病棟で CDI 症例が多発することはなく、全病棟における糞便中毒素検査の陽性症例数は 2.1±1.7 症例/月であった。2010 年 3 月に同一病棟 (A 病棟) で CDI 症例が多発したため、アウトブレイクであると判断し ICT による介入調査を開始した。A 病棟の CDI 発症例のうち、菌株を分離することができた 6 症例ではタイピング結果が一致した。いずれの症例も特定の 2 病室に入院しており、患者の日常生活動作が低く排泄ケアには医療従事者による介助を必要とした。このため、今回のアウトブレイクは医療従事者を介して感染が広がったと推測された。当院では医療従事者の本疾患に対する危険性

表 1. 15 症例の臨床背景と分子疫学的解析結果

症例 No.	発症年月	病棟	診療科	使用抗菌薬* (使用期間)	分離された <i>C. difficile</i> 菌株における解析結果		
					毒素産生性**	PFGE type	PCR ribotype
1	11-2009	H	消化器内科	SBT/CPZ (2日間)	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	A	a
2	11-2009	D	腎臓内科	CTM (2日間) SBT/ABPC (5日間) TAZ/PIPC (9日間)	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	A	a
3	11-2009	F	外科	CTRX (1日間) DRPM (9日間)	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	B	b
4	12-2009	D	総合内科	SBT/ABPC (3日間) DRPM (14日間)	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	A	a
5	12-2009	D	腎臓内科	TAZ/PIPC (15日間) TAZ/PIPC (4日間)	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	C	c
6	1-2010	B	糖尿病内科	TAZ/PIPC (5日間) DRPM (11日間)	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	B	b
7	3-2010	A	整形外科	CEZ (4日間) CFDN (7日間)	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	A	a
8	3-2010	A	整形外科	CEZ (4日間) CFDN (8日間)	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	A	a
9	3-2010	I	循環器内科	MEPM (12日間) CTRX (2日間)	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	A	a
10	3-2010	A	整形外科	CEZ (8日間) CFDN (6日間)	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	A	a
11	3-2010	A	整形外科	CEZ (5日間) CFDN (6日間)	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	A	a
12	3-2010	H	外科	CFPN-PI (3日間) DRPM (5日間) SBT/ABPC (1日間)	A ⁺ B ⁺ CDT ⁻	C	c
13	3-2010	A	整形外科	CEZ (5日間) CFDN (7日間)	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	A	a
14	3-2010	A	整形外科	MEPM (6日間) IPM/CS (22日間) VCM (15日間:隔日)	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	A	a
15	4-2010	B	消化器内科	CTM (2日間) DRPM (11日間) MEPM (9日間)	A ⁻ B ⁺ CDT ⁻	A	a

*SBT/CPZ : sulbactam/cefoperazone CTM : cefotiam SBT/ABPC : sulbactam/ampicillin

TAZ/PIPC : tazobactam/piperacillin CTRX : ceftriaxone DRPM : doripenem CEZ : cefazolin

CFDN : cefdinir MEPM : meropenem CFPN-PI : cefcapene pivoxil IPM/CS : imipenem/cilastatin

**A⁻B⁺CDT⁻ : toxin A 陰性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性 A⁺B⁺CDT⁻ : toxin A 陽性 toxin B 陽性 binary toxin 陰性

の認識が薄く、患者の糞便に対する処置や使い捨て手袋の使用が不適切であった可能性が考えられる。さらに整形外科患者における術後の抗菌薬予防投与方法が今回の CDI 流行の一因となったと示唆される。

近年欧米を中心に多数の院内集団発生の原因となっ

ている BI/NAP1/027 株は, *in vitro* で toxin A および toxin B の産生量が高く, さらに binary toxin を産生することが知られている¹²⁾。今回分離された 15 株はいずれも *cdt* 陰性株であったが, わが国においても *cdt* 陽性株の検出が報告されており¹³⁾ 今後も注視す

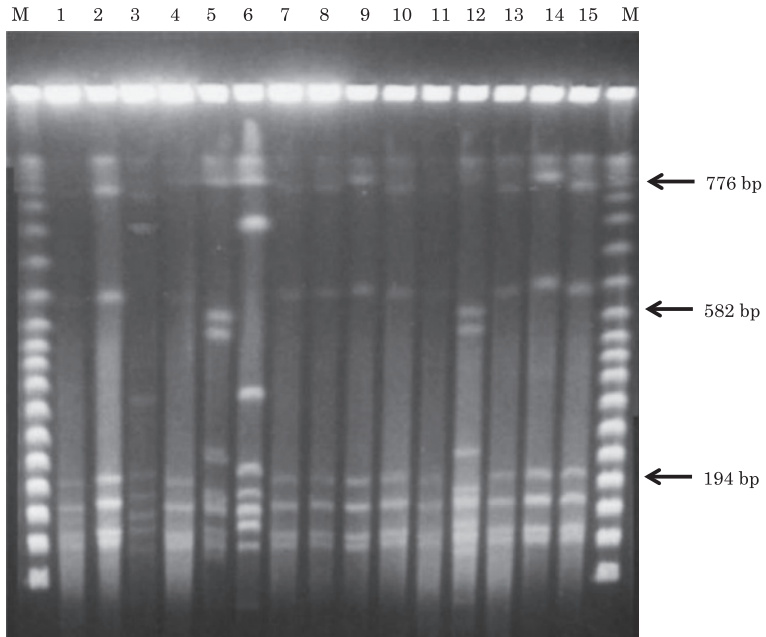


図1. PFGE 法によるバンドパターン
 レーン1～15：症例 No. 1～15 の分離菌株 レーン M：Lambda Ladder
 レーン1, 2, 4, 7～11, 13～15：A型 レーン3, 6：B型 レーン5, 12：C型

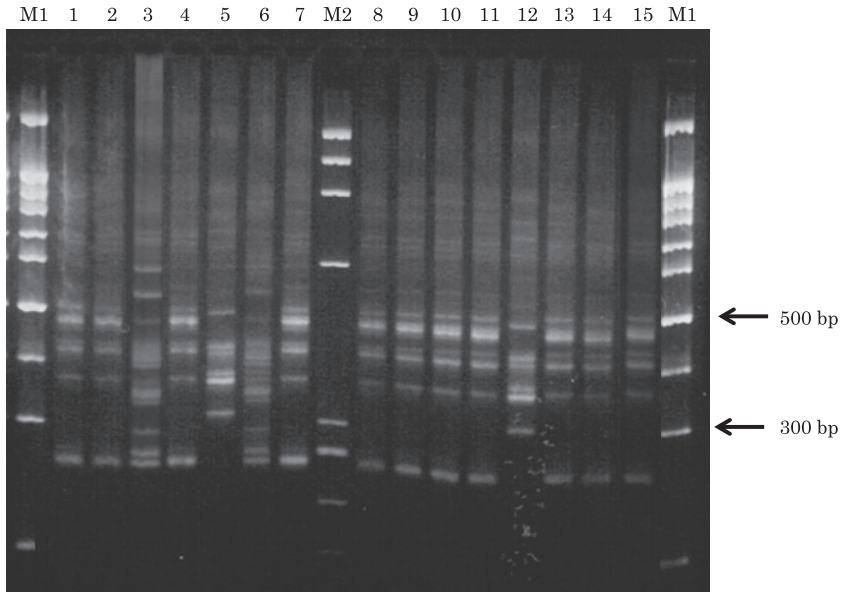


図2. PCR リボタイピング法によるバンドパターン
 レーン1～15：症例 No. 1～15 の分離菌株
 レーン M1：100 bp DNA step ladder レーン M2： $\phi 174 \times \text{HaeIII}$ digest
 レーン1, 2, 4, 7～11, 13～15：a型 レーン3, 6：b型 レーン5, 12：c型

る必要がある。

C. difficile 毒素の検出には酵素抗体法による診断キットを用いることが一般的である。杉浦らは本検討で用いた *C. difficile* 毒素の診断キット TOX A/B QUICK CHECK の検討を行い、糞便検体中から *C. difficile* 毒素が検出された 42 検体中、培養で *C. difficile* が分離されなかったのは 1 検体のみであったと報告している¹⁴⁾。われわれの検討では 20 検体のうち 5 検体が分離されず、糞便中 *C. difficile* の分離培養について、検体採取を含めた培養手技の過程を検証する必要性が示唆された。培養手技については、杉浦らと同様¹⁴⁾に糞便検体を 30 分間アルコール処理した後 CCFA 寒天培地を用いて嫌気培養を行った。一方、検体採取については、*C. difficile* 毒素検査用に採取された糞便検体が少ないため、毒素検査を実施した後に培養検査を行う糞便量が十分に残っていなかった例が見られた。今回 *C. difficile* が分離されなかった 5 例についても糞便量が極めて少なく、分離培養が適切に実施されなかった可能性が考えられた。当院における *C. difficile* 毒素検査オーダー時の糞便採取量指示について、今後見直す必要がある。

当検査室では菌株保存を目的として、糞便中毒素陽性検体のみ *C. difficile* の培養検査を実施していた。しかし、酵素抗体法の診断キットによる毒素検出は検査試薬の感度が十分ではなく¹⁵⁾、CDI 流行時に提出された検体の中にも *C. difficile* が見過ごされていた症例があったと推測される。わが国では 2011 年から *C. difficile* の抗原であるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ (GDH) と toxin A と toxin B を同時に検出できる診断キット C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE (アリアメディカル) が発売されており、澤辺らは同診断キットによる GDH の検出と分離培養法を比較検討し、高い検出感度 (93.3%) と特異度 (100%) が得られたと報告している¹⁶⁾。また、米国医療疫学学会 (SHEA) や米国感染症学会 (IDSA) の CDI に関するガイドラインでも、CDI の一次スクリーニング検査として GDH の検出を用いることが推奨されている¹⁷⁾。2011 年 7 月より当検査室でも同診断キットに変更し、糞便中 GDH の検出結果を臨床報告および *C. difficile* 分離培養の実施に活用している。

医療関連感染の疫学調査において PFGE 法はその優れた菌株識別能から種々の菌種のタイプング解析に用いられているが、*C. difficile* の解析では DNA 分解により一部の菌株で型別判定が不能となる^{18)~20)}。奈田らは *C. difficile* に対する PFGE 法の実施に際し、チオ尿素を添加することで DNA 分解を抑制すると報告

している³⁾。われわれが検討に用いた菌株の中にも PFGE 法で型別不能株が存在したが、チオ尿素を泳動バッファーに添加することにより全ての菌株の型別分類が可能であった。

今回、*C. difficile* の分子疫学的解析には PFGE 法と PCR リボタイピング法を併用して分離株の型別を決定し、両法において全例で同一の型別成績が得られた。PFGE 法に比べ比較的短時間で解析ができ、操作が簡便な PCR リボタイピング法は有用性が高い解析方法であると考えられた。

われわれは、一定期間に分離された *C. difficile* の菌株に対してタイプング解析を実施し、院内の環境に分布していることが示唆される菌株を特定し、同一病棟で多発した *C. difficile* の伝播状況を把握した。さらに ICT が介入することによってアウトブレイクの要因を推定し、医師や医療従事者に適切な対応を指示し感染の拡大を抑制することができた。

文 献

- 1) Kim, KH, R Fekety, DH Batts, et al. 1981. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. *J. Infect. Dis.* 143: 42-50.
- 2) Gal, M., G. Northey, J.S. Brazier, et al. 2005. A modified pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) protocol for subtyping previously non-PFGE typeable isolates of *Clostridium difficile* polymerase chain reaction ribotype 001. *J. Hosp. Infect.* 61: 231-236.
- 3) 奈田 俊, 鈴木匡広, 大蔵照子, 他. 2009. パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) 型別法の改善後における *Clostridium difficile* の院内分布の解析. *日臨徴誌* 19: 205-212.
- 4) Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2233-2239.
- 5) Stubbs, S.L., J.S. Brazier, G.L. O'Neill, et al. 1999. 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.* 37: 461-463.
- 6) Kato, H., N. Kato, K. Watanabe, et al. 1998. Identification of toxin A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2178-2182.
- 7) Kato, H., N. Kato, S. Katow, et al. 1999. Deletions in the repeating sequences of the toxin A gene of toxin

- A-negative, toxin B-positive *Clostridium difficile* strains. FEMS. Microbiol. Lett. 175: 197-203.
- 8) Stubbs, S., M. Rupnik, M. Gibert, et al. 2000. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. FEMS. Microbiol. Lett. 186: 307-312.
 - 9) Limaye, A.P., D.K. Turgeon, B.T. Cookson, et al. 2000. Pseudomembranous colitis caused by a toxin A⁻B⁺ strain of *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. 38: 1696-1697.
 - 10) Komatsu, M., H. Kato, M. Aihara, et al. 2003. 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. 22: 525-529.
 - 11) 佐藤洋子, 加藤はる, 小岩井健司, 他. 2004. がんセンターにおける toxin A 陰性 toxin B 陽性 *Clostridium difficile* による下痢症の院内集団発生. 感染症学雑誌 78: 312-319.
 - 12) Cairns, M.D., R.A. Stabler, N. Shetty, et al. 2012. The continually evolving *Clostridium difficile* species. Future Microbiol. 7: 945-957.
 - 13) Kato, H., Y. Ito, R.J. van den Berg, et al. 2007. First isolation of *Clostridium difficile* 027 in Japan. Euro Surveill. 12: E07011133.
 - 14) 杉浦秀子, 金子孝昌, 住田めぐみ, 他. 2009. *Clostridium difficile* toxin A および toxin B 市販検出キットの評価. 感染症学雑誌 83: 513-518.
 - 15) 加藤はる. 2008. *Clostridium difficile* 関連疾患について. *Clostridium difficile* 関連疾患 (CDAD) vs ICT. 感染対策 ICT ジャーナル 3: 11-18.
 - 16) 澤辺悦子, 北村優佳, 古畑紀子, 他. 2011. *Clostridium difficile* 感染症の迅速診断における糞便中の *C. difficile* 抗原およびトキシシン A/B 同時検出キット: C. DIFF QUIK CHEK COMPLETE の有用性に関する検討. 日臨微誌 21: 253-259.
 - 17) Cohen, S.H., D.N. Gerding, S. Johnson, et al. 2010. Clinical practice guidelines for *Clostridium difficile* infection in adults: 2010 Update by the Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA) and the Infectious Diseases Society of America (IDSA). Infect. Control. Hosp. Epidemiol. 31: 431-455.
 - 18) Kato, H., N. Kato, K. Watanabe, et al. 2001. Analysis of *Clostridium difficile* isolates from nosocomial outbreaks at three hospitals in diverse areas of Japan. J. Clin. Microbiol. 39: 1391-1395.
 - 19) Sawabe, E., H. Kato, K. Osawa, et al. 2007. 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. 26: 695-703.
 - 20) Bidet, P., V. Lalande, B. Salauze, et al. 2000. Comparison of PCR-ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for typing *Clostridium difficile*. J. Clin. Microbiol. 38: 2484-2487.

Molecular epidemiological analysis on toxin A-negative, toxin B-positive type *Clostridium difficile* which mainly broken out among orthopedic patients

Takashi Ando¹⁾, Midori Kono²⁾, Mitsutaka Sasaki³⁾, Yuko Nagano³⁾, Sonomi Kanemoto¹⁾, Ryuzo Hirata¹⁾, Kenichi Sugimoto¹⁾, Keiko Hasebe⁴⁾, Koji Yoshikawa⁴⁾, Hiroshi Kiyota⁴⁾

¹⁾Department of Central Clinical Laboratory, The Jikei University Katsushika Medical Center

²⁾Department of Laboratory Medicine, The Jikei University School of Medicine

³⁾Department of Central Clinical Laboratory, The Jikei University Hospital

⁴⁾Infection Control Team, The Jikei University Katsushika Medical Center

We encountered outbreak of *Clostridium difficile* infection (CDI) at the A ward of our hospital in March 2010. 20 cases have tested positive for *C. difficile* toxin in feces during past 6 months including the period of the outbreak. We conducted investigation of clinical settings and bacteria typing on 15 cases from which we succeeded in isolating *C. difficile* in feces out of the 20 cases. We identified toxin A-positive, toxin B-positive (A⁺B⁺) strains from 4 out of the 15 cases. They were classified into 2 subtypes using pulsed-field gel electrophoresis and PCR ribotyping. Toxin A-negative, toxin B-positive (A⁻B⁺) type strains were isolated from the other 11 cases. Results of the two different typing analyses suggested that all the A⁻B⁺ type strains were identical. The A⁻B⁺ type strain had been detected at several wards of our hospital for 6 months, suggesting that the hospital environment had been contaminated with this strain. At the A ward, 6 orthopedic patients developed CDI in a short period of time. Strains isolated from feces of those cases were identical, suggesting that the outbreak was caused by cross-infection. Hence, we familiarized medical staffs with standard precautions and contact transmission based precautions. And we conducted appropriate antibiotic use since more than one antimicrobial agent had been administered for a long period of time to prevent post-operative infection. As a result, we had succeeded in preventing nosocomial outbreak of CDI.