

有毒Clostridium  
difficileの凝集反応並びにソルビトール分解性について

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 三川, 正人 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8880">http://hdl.handle.net/2297/8880</a>

## 有毒 *Clostridium difficile* の凝集反応並びに ソルビトール分解性について

金沢大学医学部微生物学講座 (主任: 西田尚紀教授)

三 川 正 人

(昭和55年12月17日受付)

**Key words** *Clostridium difficile*, Antibiotic-associated pseudomembranous colitis, Agglutination of *C. difficile*, Pathogenicity of *C. difficile*, Sorbitol fermentation of *C. difficile*

有毒 *Clostridium difficile* が抗生剤投与による偽膜性大腸炎 Pseudomembranous colitis (PMC), あるいは下痢症の主な原因菌の1つであることは、今日広く認められている<sup>1)-6)7)</sup>。抗生剤投与による本疾患が老人に発症しやすいと述べられている<sup>7)8)</sup>が、その理由については明らかにされていない。著者は、前報<sup>9)</sup>で抗生剤非投与若年者、老人の糞便中から *C. difficile* の分離を試み、本菌の分離率に関しては若年者と老人の間に差を認めなかったが、糞便 1g あたりの *C. difficile* 菌数が若年者に比べて老人に多いこと、並びに *C. difficile* 毒素に対する抗体が若年者血清中には存在するが、老人の血清中には存在しないことを明らかにし、このことが老人に本疾患が発症し易いことに関与している可能性を示唆した。*C. difficile* による PMC の発症を Host-Parasite relationship において考える際、Host 側の要因としては上述の如く抗体産生能が重要な因子の1つと考えられるが、Parasite 側の因子としては従来述べられている *C. difficile* の毒素原性の他に、著者は、*C. difficile* の菌体表面抗原の性質が関与していないかどうかを検討すべく、PMC 及び下痢症患者並びに健康成人糞便由来 *C. difficile* 菌株を用いて凝集反応による群別を試みた。また、*C. difficile* の同定における凝集反応の有用性についても併せ検討した。

### 材料及び方法

#### 1. 使用菌株

以下に記した合計 79 株の *C. difficile* を用いた。

ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, U. S. A.) 由来; ATCC 9689, 17857, 17859 の3株、健康成人糞便由来; 50株、抗生剤服用者で腹部症状のない患者由来; 13株、抗生剤投与による下痢症患者糞便由来; 8株、抗生剤投与による PMC 患者糞便由来; 5株。

また、凝集反応の対照として以下に記した Clostridia 45 菌種 69 株を用いた。*C. bifermentans* と *C. sordellii* 以外は 1 菌種につき 1 株ずつ用いた。

#### 1. 金沢大学医学部微生物学教室保存菌株

*C. acetobutyricum* KZ 586, *C. bifermentans* 10 株, *C. butyricum* KZ 589, *C. botulinum* type B KZ 533, type E KZ 582, *C. chauvoei* KZ 382, *C. novyi* type A KZ 671, *C. perfringens* type A KZ 211, type B KZ 263, type C KZ 265, type D KZ 267, type E KZ 275, *C. septicum* KZ 993, *C. sordellii* 10 株。

#### 2. ATCC 菌株

*C. absonum* 27555, *C. aminovalericum* 13725, *C. botulinum* type A 15763, *C. barkeri* 25849, *C. carnis* 25777, *C. cadaveris* 26783, *C. cochlearium* 17787, *C. ghoni* 25757, *C. glycolicum* 14880, *C. histolyticum* 25779, *C. indolis* 25771, *C. innocuum* 14501, *C. limosum* 25760, *C. lituseburense* 25759, *C. malenominatum* 25776, *C. mangenotii* 25761, *C.*

Characterization of Toxigenic *Clostridium difficile* by Agglutination and Sorbitol Fermentation. Masato Mikawa, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University.

oceanicum 25647, *C. oroticum* 25650, *C. paraperfringens* 25753, *C. paraputrificum* 25780, *C. pasteurianum* 6013, *C. perenne* 25782, *C. plagarum* 25768, *C. propionicum* 25522, *C. pseudoteticum* 25779, *C. putrificum* 25784, *C. rubrum* 14949, *C. sartagoformum* 25778, *C. scatologenes* 25775, *C. sphenoides* 19403, *C. sporogenes* 25762, *C. sporosphenoides* 25781, *C. sticklandii* 12662, *C. subterminale* 25774, *C. tertium* 14573, *C. tetani* 8033, *C. tyrobutyricum* 25755.

## II. 抗原の作製

PYG 培地 (Proteose peptone No.2 (Difco) ; 3 % (W/V), Yeast extract (Difco) ; 0.5 % (W/V), Glucose ; 1 % (W/V), NaCl ; 0.5 % (W/V), L-cysteine · HCl ; 0.05 % (W/V), pH 7.2) 10 ml に肝片加肝ブイオンで前培養した菌液 0.2 ml を植菌し, 37 °C, 7 時間培養後 8000rpm 5 分間遠心集菌し, 生理食塩水で洗滌した後, 0.4 % ホルマリン加生理食塩水に, 元の培養液の 10 倍の濃度になるよう再浮遊した菌液をホルマリン抗原<sup>10)</sup>とした。また, 培養液を 100 °C, 60 分間加熱処理後遠心集菌し, 生理食塩水で洗滌した後, 元の培養液の 10 倍の濃度になるよう生理食塩水に再浮遊した菌液を加熱抗原とした。

## III. 抗菌血清の作製

上記の抗原を家兔の耳静脈へ 3 日間隔で 7 回注射した。注射量は, 1 回目 0.5 ml, 2, 3 回目 1.0 ml, 4, 5 回目 2.0 ml, 6, 7 回目 3.0 ml とした。最終回の注射から 7 日目に採血して血清を得た。

## IV. 交叉凝集反応

Henderson<sup>11)</sup>の方法に従った。2 倍段階希釈した抗菌血清 1 ml と適当な濃度の抗原 1 滴を混合し, 56 °C, 2 時間静置後判定し, 明瞭な凝集を示す最高希釈の逆数をもって凝集価とした。

## V. 凝集素吸収試験

使用時作製した濃厚な抗原と等量の抗菌血清を混合し, 時々振盪させながら 56 °C, 2 時間反応させた。遠心 (8000rpm, 5 分間) によって抗原を除き, 上清液を吸収血清とした。吸収血清について吸収に供した抗原に対する凝集反応を行ない, 抗体が残っている場合は, 全く凝集しなくなるまで吸収を繰り返した。なお, 56 °C, 2 時間処理による抗菌血清の凝集価への影響がないことを確認するため, 対照として等量の生理食塩水を加えた抗菌血清を同様に加温処理した後, 凝集価の変動を調べた。

## VI. 細胞毒性試験

前報<sup>9)</sup>に記した方法に従った。

## VII. 糖分解試験

Sterne ら<sup>12)</sup>の方法に従った。

## 成 績

### I. 抗原及び抗菌血清の検討

本実験に先だち, 強毒株 ATCC 17859 株, 無毒株 No. 78 株 (健康老人糞便由来菌株) について加熱抗原, ホルマリン抗原に対する抗菌血清を作製し, その凝集特異性を検討した。上記の 2 種類の菌株の加熱抗原によって作製した抗菌血清の場合, 加熱 No.78 株抗菌血清は両株の加熱抗原に対して 等しい凝集価 (2560) を示した。ホルマリン抗原に対しては いくらか低い値であったが, 両者とも等しい凝集価 (640) を示した。加熱 ATCC 17859 株抗菌血清の場合, 加熱, ホルマリン両抗原に対する十分な抗体価が得られなかった (表 1)。しかしながら, ホルマリン抗原によって作製した ATCC 17859 株及び No.78 株抗菌血清は, 当該ホルマリン抗原に対してそれぞれ 10240, 5120 という高い凝集価を示した (表 2)。しかし, 加熱した時, この抗原性は殆ど失われた。強毒株 ATCC 17859 株と無毒株 No.78 株のこの易熱性抗原性はそれぞれに特異性を示し, 抗原的に異なると思われた。

Table 1. Cross-agglutinability to antisera prepared against heated cells of strains ATCC 17859 and No. 78

Antisera prepared against heated cells	Agglutination titer to			
	Formal-treated cells of strains		Heated cells* of strains	
	ATCC 17859	No. 78	ATCC 17859	No. 78
ATCC 17859	160	320	160	80
No. 78	640	640	2560	2560

\* : Cells heated at 100°C for 60 min.

## II. 交叉凝集反応

上述の結果よりホルマリン抗原によって作製した抗菌血清及び同抗原を用いて凝集反応による群別を行った。

最初、最も強い毒性 (16384 CU/50 $\mu$ l) を示した ATCC 17859 株、及び無毒株 No.78 株抗菌血清を用いて被験 79 株全株に対し凝集反応を行った。その結果、79 株中 58 株 (74.4%) がいずれかの抗菌血清に対し特異的に凝集した。次に、残りの 21 株から無作為に選んだ 13 株に対する抗菌血清を作製して、被験 79 株全株について凝集反応を行なった。その結果、前記 21 株のうち 7 株が、13 種類の抗菌血清の 1 つである無毒株 T-70 株 (抗生剤投与、非下痢患者糞便由来菌株) 抗菌血清に対して特異的に凝集した。しかし、残りの 12 種類の抗菌血清は自己の抗原に対しても低い凝集価 (160 - 320) を示したにすぎず、被験全株に対しても低い凝集価しか示さなかった。

以上の結果から、被験 79 株は、強毒株 ATCC 17859 株抗菌血清に対して特異的に高い凝集価 (10240 - 5120) を示す菌株群 (I 群, 39 株)、無毒株 T-70 株抗菌血清に対して特異的に高い凝集価 (10240 - 2560) を示す菌株群 (II 群, 7 株)、無毒株 No.78 株抗菌血清に対して特異的に高い凝集価 (5120 - 1280) を示す菌株群 (III 群, 19 株)、またこれら 3 種類のいずれの抗菌血清に対しても低い凝集価 (320 以下) しか

示さない菌株群 (IV 群, 14 株) の 4 群に分けることができた (表 3)。ATCC 由来 3 株は I 群に属した。

## III. 凝集素吸収試験

凝集反応によって分けられた 4 つの各群の菌株が、群特異抗原を有するか否かを検討するため、吸収試験を行なった。I 群の ATCC 17859 株抗菌血清は、自己の抗原では完全に吸収され、吸収血清はいずれの菌株も全く凝集しなかった。しかしながら、II 群の T-70 株抗原あるいは III 群の No.78 株抗原で吸収した ATCC 17859 株抗菌血清は、II、III、IV 群の菌株を全く凝集しなかったが、I 群の菌株に対しては、吸収前と同様特異的凝集性 (凝集価; 10240 - 5120) を示した。これに反し、T-70 株抗菌血清及び No.78 株抗菌血清は、I 群の ATCC 17859 株、II 群の T-70 株あるいは III 群の No.78 株のいずれの抗原でも完全に吸収され、これら吸収血清に対してはいずれの菌株も全く凝集しなかった (表 4)。以上の結果、I 群に属した菌株は、群特異抗原を有することが判明した。

## IV. 凝集反応による群別と毒素原性

I 群に属した 39 株は、1 株を除いて全株が 1024 - 8192 CU/50 $\mu$ l の毒素を産生する強毒株で、II 群に属した 7 株全株が無毒株であった (表 5)。III、IV 群には無毒株、有毒株のいずれもが属したが、III、IV 群の 33 株のうち 17 株 (52%) が有毒株で、その 17 株の有毒株のうち 14 株 (82%) が 512 CU/50 $\mu$ l 以下の毒素を

Table 2. Cross-agglutinability to antisera prepared against formol-treated cells of strains ATCC 17859 and No. 78

Antisera prepared against formol-treated cells	Agglutination titer to			
	Formol-treated cells of strains		Heated cells* of strains	
	ATCC 17859	No. 78	ATCC 17859	No. 78
ATCC 17859	10240	80	40	40
No. 78	160	5120	320	320

\* : Cells heated at 100°C for 60 min.

Table 3. Grouping of *C. difficile* strains by cross-agglutination

Group	Number of strains	Agglutination titer against sera to strains of		
		ATCC 17859	T-70	No. 78
I	39	10240-5120	<160	<320
II	7	<160	10240-2560	<320
III	19	<320	<320	5120-1280
IV	14	<320	<160	<320

産生する弱毒株であった。即ち、Ⅲ、Ⅳ群に属した有毒株はほとんどが弱毒株であった。

#### V. 凝集反応による群別、毒素原性及び分離菌株の由来

表5によって示された結果を分離菌株由来に基づいて、凝集反応による群別と毒素原性との関係について検討した。

健康成人糞便由来50株に関しては、19株(38%)がⅠ群に属し、強毒株であった(表6)。Ⅱ群に属した菌株はわずか2株(4%)にすぎなかった。また、Ⅲ、Ⅳ群に属した29株(58%)のうち16株(55.2%)が有毒株で、そのうち14株(87.5%)が弱毒株であった。抗生剤服用者で腹部症状のない患者糞便由来の13株に関しては、4株(30.8%)がⅠ群に属し、5株(38.5

Table 4. Agglutinin-absorption studies with sera prepared against strains of *C. difficile*

Antiserum	Strains used for absorption	Agglutination titer against strains belonging to groups			
		I (39*)	II (7)	III (19)	IV (14)
ATCC 17859	None	10240-5120	<160	<320	<320
	ATCC 17859	-**	-	-	-
	T-70	10240-5120	-	-	-
	No. 78	10240-5120	-	-	-
T-70	None	<160	10240-2560	<320	<160
	ATCC 17859, T-70, No. 78	-	-	-	-
No. 78	None	<320	<320	5120-1280	<320
	ATCC 17859, T-70, No. 78	-	-	-	-

\* : Number of strains tested.

\*\* : Less than 40.

Table 5. Relationship between agglutination and toxigenicity of *C. difficile* strains

Group	Number of strains	Number of strains showing cytotoxicity of				
		0	64-128	256-512	1024-2048	4096-8192
I	39	0	0	1	20	18
II	7	7	0	0	0	0
III	19	11	3	5	0	0
IV	14	5	2	4	3	0

Table 6. Relationship between agglutination and toxigenicity of *C. difficile* strains from healthy adults

Group	Number of strains	Number of strains showing cytotoxicity of				
		0	64-128	256-512	1024-2048	4096-8192
I	19	0	0	1	8	10
II	2	2	0	0	0	0
III	16	9	2	5	0	0
IV	13	4	2	4	3	0

Table 7. Relationship between agglutination and toxigenicity of *C. difficile* strains from antibiotic-administered patients without diarrhea

Group	Number of strains	Number of strains showing cytotoxicity of				
		0	64-128	256-512	1024-2048	4096-8192
I	4	0	0	0	2	2
II	5	5	0	0	0	0
III	3	2	1	0	0	0
IV	1	1	0	0	0	0

Table 8. Relationship between agglutination and toxigenicity of *C. difficile* strains from antibiotic-associated diarrhea or PMC patients

Group	Number of strains	Number of strains showing cytotoxicity of		
		0-512	1024-2048	4096-8192
I	13	0	9	4
II, III, VI	0	0	0	0

%)がII群に属した。III, IV群に属した4株(30.8%)中1株(25%)のみが有毒株であった(表7)。抗生剤投与によるPMC及び下痢症患者糞便由来の13株に関しては、全株が強毒株でI群に属することが判明した(表8)。

#### VI. 抗菌血清の特異性

ATCC 17859, T-70, No.78株の3種類の抗菌血清に対し、対照として用いた他のClostridia 45菌種69株すべてが全く凝集せず、これら抗菌血清は*C. difficile*に特異的であることが判明した。

#### VII. ソルビトール分解性と毒素原性

糖分解試験の成績と毒素原性の関係を検討した結果、ソルビトール分解性と毒素原性の間に密接な関係が認められた。即ち、ソルビトール分解陽性60株中51株(85%)が有毒株であったが、ソルビトール分解陰性19株中有毒株は5株(26.3%)に過ぎず、ソルビトール分解陽性株に有毒株の多いことが判った。

### 考 察

*C. difficile*の凝集反応による抗原分析については、Snyder<sup>13)</sup>が最初に報告し、有毒株の非加熱抗原を用いて作製した抗菌血清が、有毒株、無毒株のいずれをも凝集し、凝集反応が無毒株の同定に有効であると述べるとともに、*C. difficile*には少なくとも2種類の表面抗原があることを述べた。また最近、Hafizら<sup>14)</sup>は、加熱抗原を用いて凝集反応を行ない、*C. difficile*が共

通抗原の他に菌株特異抗原を有すると報告した。

今回、先ず凝集反応に用いる抗原及び抗菌血清を検討した結果、凝集反応による群別に際しては、ホルマリン抗原が有用であることが判った。同抗原を用いて凝集反応を行なった結果、被験79株は有毒株ATCC 17859株、無毒株T-70(抗生剤投与、非下痢症患者糞便由来菌株)、無毒株No.78株(健康老人糞便由来菌株)抗菌血清に対し、それぞれ高い凝集価で凝集する群(I, II, III群)と、これら抗菌血清にほとんど凝集しない群(IV群)の4群に分けることができた。さらに吸収試験の結果、ATCC 17859株抗菌血清に特異的凝集性を示すI群に属するすべての菌株が群特異表面抗原を有することが判明し、被験*C. difficile*はI群特異表面抗原の有無により、血清学的に大きく2つの群に分けることができた。またさらに、群特異表面抗原を有したI群のほとんど全株が強毒毒であり、抗生剤投与によるPMC及び下痢症患者糞便由来菌株すべてが、I群に属することが判った。即ち、I群特異表面抗原が病原性と密接に関連し、ことに抗生剤投与によるPMC及び下痢症の発症に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

有毒Clostridia菌種の、ことに無毒株の同定に際しては、血清学的手法もまた有効な方法であることは、芹川ら<sup>15)</sup>が*C. botulinum* type C及び山岸ら<sup>16)</sup>が*C. perfringens* types C, Dにおいて示した。本研究で用いた3種類のホルマリン抗原に対する抗菌血清を併用

すれば、被験 79 株全株が凝集反応陽性となることが判った。これに対し、これらの 3 種類の抗菌血清はいずれも他の Clostridia 菌種を全く凝集しなかったことから、本抗菌血清が C. difficile 同定用抗菌血清として実用に供し得るものであると考える。さらに、抗生剤投与による PMC 及び下痢症患者糞便由来のすべての菌株及びほとんどの強毒株が、一標準株 ATCC 17859 株抗菌血清と特異的に凝集した事実に鑑み、PMC を疑う患者糞便からの分離菌株の毒素原性については、この標準株抗菌血清を用いた凝集反応が極めて有効、且、簡便で実用的な方法であると考えられる。

C. difficile のソルビトール分解性に関しては、陽性あるいは陰性とされ、研究者によって一致していない<sup>14) 17) 18)</sup>。本研究においてもソルビトール分解性は、陽性あるいは陰性と様々であったが、ソルビトール分解性と毒素原性の間に密接な関係が認められ、分解陽性株の大多数が有毒株で分解陰性株の大多数が無毒株であった。

### 結 論

抗生剤投与による偽膜性大腸炎や下痢症患者、さらに健康人など、各種由来の C. difficile 79 株について凝集反応による群別を試み、毒素原性、病原性との関係を検討した。その結果、4 群に分けることができたが、さらに吸収試験の結果、第 I 群 (39 株) のみが群特異抗原を有することが判った。毒素原性に関しては、第 I 群のほとんど全株が強毒株であり、第 III, IV 群合計 33 株はその 52% が有毒株であったが、その大多数は弱毒株であった。また、第 II 群の 7 株は全株が無毒株であった。これらの菌群を由来別に検討し、健康人あるいは抗生剤服用者で腹部症状のない患者由来 63 株の 36.5% は第 I 群に属したが、PMC 及び下痢症患者の場合、13 株全株が第 I 群に属することが判り、I 群特異抗原の臨床的な重要性が示唆された。また、ソルビトール分解陽性株の大多数が有毒株であった。

稿を終るに臨み、懇篤な御校閲を戴きました恩師西田尚紀教授に心から謝意を捧げます。また、実験の遂行にあたり終始直接御指導御助言を戴きました中村信一助教授はじめ、多大な御協力を戴きました微生物学教室員各位に深く感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) Bartlett, J. B., Chang, T. W., Gurwith, M., Gorbach, S. L. & Onderdonk, A. B. : Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. *New Eng. J. Med.*, **298**, 531-534 (1978).
- 2) Bartlett, J. G., Moon, N., Chang, T. W., Taylor, N. & Onderdonk, A. B. : Role of Clostridium difficile in antibiotic-associated pseudomembranous colitis. *Gastroenterology*, **75**, 778-782 (1978).
- 3) George, W. L., Sutter, V. L., Goldstein, E. J., Ludwig, S. L. & Finegold, S. M. : Aetiology of antimicrobial agent-associated colitis. *Lancet*, **1**, 802-803 (1978).
- 4) George, R. H., Symonds, J. M., Dimock, F., Brown, J. D., Arabi, Y., Shinagawa, N., Keighley, M. R. B., Alexander-Williams, J. & Burdon, D. W. : Identification of Clostridium difficile as a cause of pseudomembranous colitis. *Br. Med. J.*, **1**, 695 (1978).
- 5) Keighley, M. R. B., Burdon, D. W., Arabi, Y., Alexander-Williams, J., Thompson, H., Young, D., Johnson, M., Bentley, S., George, R. H. & Mogg, G. A. G. : Randomised controlled trial of vancomycin for pseudomembranous colitis and postoperative diarrhea. *Br. Med. J.*, **2**, 1667-1669 (1978).
- 6) Larson, H. E., Price, A. B., Honour, P. & Borriello, S. P. : Clostridium difficile and the aetiology of pseudomembranous colitis. *Lancet*, **1**, 1063-1066 (1978).
- 7) Tedesco, F. J., Barton, R. W. & Alpers, D. H. : Clindamycin-associated colitis. *Intern. Med.*, **81**, 429-433 (1974).
- 8) Gurwith, M. J., Rabin, H. R. & Love, K. : Diarrhea associated with clindamycin and ampicillin therapy : preliminary results of a cooperative study. *J. Infect. Dis.* **135**, S104-S110 (1977).
- 9) 三川正人 : 成人からの Clostridium difficile の分離及び毒素原性並びに抗毒素抗体について。十全会誌, 第 90 巻 1 号, (1981).
- 10) Mandia, J. W. : The position of Clostridium tetani within the serological schema for the proteolytic clostridia. *J. Infect. Dis.*, **97**, 66-72 (1955).
- 11) Henderson, D. W. : The somatic antigens for the Clostridium welchii group organisms. *J. Hyg.*, **40**, 501-502 (1940).

1) Bartlett, J. B., Chang, T. W., Gurwith, M., Gorbach, S. L. & Onderdonk, A. B. : Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to

- 12) Sterne, M. E. & van Heyningen, W. E. : Clostridia, p545 - 575. In R. J. Dubos & J. G. Hirsh (ed), Bacterial and mycotic infections of man, 4th ed. Lippincott Co., Philadelphia, 1965
- 13) Snyder, M. L. : Further studies on Bacillus difficilis (Hall and O'Tool). J. Infec. Dis., 60, 223 - 231 (1937).
- 14) Hafiz, S. & Oakley, C. L. : Clostridium difficile : isolation and characteristics. J. Med. Microbiol., 9, 129 - 136 (1976).
- 15) Serikawa, T., Nakamura, S. & Nishida, S. : Distribution of Clostridium botulinum type C in Ishikawa Prefecture, and applicability of agglutination to identification of nontoxigenic isolates of C. botulinum type C. Microbiol. Immunol., 21, 127 - 136 (1977).
- 16) Yamagishi, T., Yoshizawa, J., Kawai, M., Seo, N. & Nishida, S. : Identification of isolates of Clostridium perfringens type C and by agglutination and florescent-antibody methods. Appl. Microbiol., 21, 787 - 793 (1971).
- 17) Holdman, L. V., Cato, E. & Moore, W. E. C. : Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed., p82, Anaerobe Laboratory Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.
- 18) Smith, L. DS. & Hobbs, G. : Clostridium, p558. In R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (ed.), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.

**Characterization of Toxigenic *Clostridium difficile* by Agglutination and Sorbitol Fermentation.** Masato Mikawa, Department of Bacteriology (Director: Prof. S. Nishida), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920. — J. Juzen Med. Soc., **90**, 21–28 (1981).

**Key words:** *Clostridium difficile*, Antibiotic-associated pseudomembranous colitis, Agglutination of *C. difficile*, Pathogenicity of *C. difficile*, Sorbitol fermentation of *C. difficile*.

#### Abstract

A total of 79 *Clostridium difficile* strains from different sources (50 strains from healthy adults, 13 from antibiotic-administered patients without diarrhea, 13 from antibiotic-associated pseudomembranous colitis (PMC) or diarrhea patients, and 3 ATCC strains) were investigated for agglutinability, by using formol-treated cells as antigen, in relation to toxigenicity. *C. difficile* strains tested were divided into four groups, I, II, III, and IV by cross-agglutination test. Agglutinin-absorption test revealed that the strains of group I, agglutinable with high titer (10240-5120) to antiserum prepared against a highly toxigenic *C. difficile* strain ATCC 17859, possessed group-specific antigen. All of the strains of group I were highly toxigenic, and all of 13 strains from antibiotic-associated PMC or diarrhea patients belonged to this group, whereas only 19 (38%) of 50 strains from healthy adults and only 4 (30.8%) of 13 strains from antibiotic-administered patients without diarrhea possessed this antigen. This indicated that toxigenic *C. difficile* with a particular surface structure might cause antibiotic-associated PMC or diarrhea, and also that the serological method with the antiserum against a strain ATCC 17859 would be practically useful for the identification of toxigenic *C. difficile* from the feces of antibiotic-associated PMC or diarrhea patients. Antisera used agglutinated, to some extent, all of the strains of *C. difficile* but none of the strains of other clostridial species, showing that serological method with these antisera would be practically applicable to the identification of *C. difficile*. The results of carbohydrate fermentation test disclosed a close relationship between toxigenicity and sorbitol fermentation of *C. difficile*; sorbitol was fermented by most of the toxigenic strains of *C. difficile* but only by a few nontoxigenic strains.