

식육제품에서 병원균으로 *Clostridium difficile*의 출현

The Emergence of *Clostridium difficile* as a Pathogen of Food Animals

조용선 | 식품분석센터
Yongsun Cho | Food Analysis Center

기술소개

*Clostridium difficile*이란?

Clostridium difficile (*C. difficile*)은 그람 양성, 혐기성, 포자생성 간균으로 포자는 난원형으로 편재성 내지는 단재성이며 포자 부위는 팽윤되지 않는다. 주모성 편모를 가지며 운동성이 있고 협막은 없다 (Fig. 1). 입원 환자에서 발생하는 설사의 주요한 원인 균주로 기회 감염균이며 1978년 항생제와 연관된 *C. difficile* 대장염(*Clostridium difficile colitis*, CDC)의 원인으로 처음 기술되었다. 그 후 25년 동안 사람의 설사 치료 항생제와 관련되어 연관되어 왔으며 *C. difficile*의 자연적인 생성 과정이나 병원성 메커니즘 등에 대해서 연구가 빠르게 진행되어 왔다. 오늘날 인간의 *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD)는 5~25%가 항생제와 관련 설사와 항생물질 투여 후에 일어나는 위막성 장염의 두 증후군과 관련이 있다. 이 밖에 균혈증, 복강 내 감염증 등을 일으킨다. 병원 환자의 3.5% 정도 외래환자의 100,000당 6.7% 경우로 항생제에 의해 CDAD가 발생한다. Clindamycin,

ampicillin, amoxicillin과 cephalosporin은 CDAD 발생에 자주 연관되고 있으나 일반적인 치료에 사용되는 항생제이다. 주로 vancomycin과 metronidazole이 발생 원인으로 간주하여진다. CDAD는 사람의 장에서의 정상 균총의 균형의 파괴에 의해서 일어난다. 항생제 사용으로 장내 상재균 분포가 변화되면 상재균에 억제되어 있던 *C. difficile*이 과성장 되어 생성된 균체 내독소(enterotoxin)에 의하여 감염을 일으킨다. *C. difficile*에 의한 설사 및 위막성 장염은 항생제뿐만 아니라 azidothymidine과 methotrexate 등의 항균 작용이 있는 약제에 의해서도 발생한다. 설사, 복통, 발열 등을 수반하며 탈수증이 일어날 때도 있다.

내용 요약

발병률 및 심각성

CDAD 발병률이 증가되고 있다는 보고는 미국, 캐나다, 유럽 등지에서 이미 보고한 바 있다. 미국의 경우 1988년에서 1990년까지 보스톤에서는 10만 명

당 77명에서 1993년부터 1997년까지 뉴멕시코에서는 10만 명당 14.8명으로 증가하였으며, 특히 고령에서의 발병률이 높아 75세 이상의 환자에서 10만 명당 98.9명으로 증가하였다. 스웨덴에서는 1995년 10만 명당 58명, 60세 이상 고령의 경우 10만 명당 121명으로 보고하였다. 캐나다 퀘벡주의 경우 1991년 10만 명당 35.6명에서 2003년 10만 명당 156.3명으로 4배가량 발생률이 증가하였다. 특히 65세 이상 고령의 경우 10만 명당 102.0명에서 866.5명으로 8배가량 증가하였다. CDAD의 임상 경과 중에 치명적인 합병증도 증가하였다. 30일 이내의 합병증은 1991년 4.7%에서 2003년 13.8%로 증가하였다.

*C. difficile*은 대변으로 배설된 후 포자를 형성하게 되면 체외에서도 수개월까지 생존 할 수 있으며, 특히 병원에서는 이 세균을 배출하는 환자들에 의해서 침구, 변기, 문손잡이 같은 병원환경에 *C. difficile*이 오염될 가능성이 크고, 환자 또는 의료 종사자의 손을 통해서 새로운 환자가 이 균에 감염될 위험성도 높다(Fig. 2).

일반적인 증상은 경한 설사(77%), 발열(37.7%), 빈맥(25%), 복통(53.8%), 식욕 부진(59.2%), 오심(37%)으로부터 생명을 위협하는 장염까지 다양한 증상으로 발현되며 환자의 1~3%는 전격성 장염으

로 발생하고 독성 거대결장이 동반되는 경우 사망률이 25~40%에 달한다. 항생제 사용에 관한 규제가 미흡하였던 우리나라에서는 항생제의 오남용으로 인하여 많은 수의 환자들이 *C. difficile*에 의한 설사 증을 경험하고 있을 것으로 추측된다. 외국의 보고에 의한 *C. difficile* 관련 설사 또는 질환의 빈도는 최근 들어 증가하고 있으며 중독성도 높아지고 있다. CDAD의 발병 양상도 변화하여 최근 캐나다 퀘벡주와 미국 서부 유럽을 중심으로 CDAD의 집단 발생이 보고되고 있으며 높은 중증도, 높은 재발률, 유의한 사망률을 보이는 CDAD의 급증이 보고되었다.

Pathogenesis(병인론)

병원성과 관련된 *C. difficile*은 두 종류의 독소 A, 독소 B를 생산한다. 이 두 독소는 45%의 amino acid가 유사하다. 세포 안에 *tcdA*는 enterotoxin(내독소), *tcdB*는 potent cytotoxin(세포독소)이다. CDAD는 *tcdA*, *tcdB*에 의한 원인이고 한 가지 독소만 있는 *C. difficile*은 없다. 전형적인 경우는 두 가지 독소가 작용한다. 이들 독소는 장내 단백을 불활성화 시켜 장관세포의 cytoskeleton을 파괴, 세포

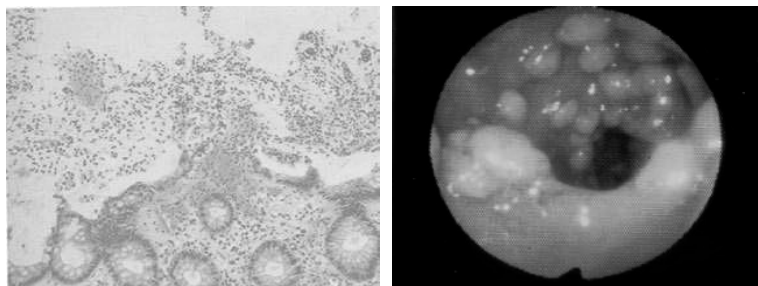


Fig. 1. The clinical outcome of *Clostridium difficile* infection, The local inflammatory effects of *C. difficile* infection result in the formation of 'volcano-like' lesions (left); later, pseudomembranes are formed that are composed of the destroyed intestinal cells and leukocytes (right). (Maja R *et al.*, Nat Rev Microbiol, 7, 526-536, 2009)

손상을 유발하여 체액을 분비하고 염증 및 apoptosis를 유도한다. 대부분 균주는 19.6 kb 크기의 pathogenicity locus를 가지며 여기에 5개의 유전자를 포함하고 있다. 균주의 독소 발현은 조절 인자인 *tcdR* 과 길항제인 *tcdC*, *codY* 유전자의 상호작용에 의해 좌우된다. *tcdC*는 독소를 분비하는 유전자를 조절하는 *tcdR*에 영향을 미쳐 독소 발현을 억제한다 (Fig. 3). 현재 유행 균주로 문제되고 있는 BI/NAP1/027 균주는 fluoroquinolone에 내성이 있으며 기존 균주에 비해 독소 A, B를 16~23배 더 분비하고 binary 독소를 분비한다. 이들 균주는 *tcdC*를 인식하는 유전자에 18 base pair 결손 돌연변이가 있거나, 염기서열 117번 7번째에 있는 1 base pair 결손이 있다. 최근 fluoroquinolone을 많이 사용하면서 문제가 더 심각해지고 있는데 집단 유행을 한 경우 약 반 정도에서 돌연변이종이 관찰되고 있으며 이들은 moxifloxacin, gatifloxacin 등의 퀴놀론계 항생제에도 내성을 보인다. 대부분 균주는 독소 A, B를 동시에 분비하지만 소수에서는 독소 A 분비 없이 독

소 B만 분비하기도 하며 아형 역시 증상을 유발한다. *C. difficile*에 의한 위막성 장염의 임상적 진단 기준은 항균제 사용 후 설사가 있으며, 다른 원인균은 분리되지 않고 적절한 항균제 치료에 반응이 있고 내시경 검사로 위막이나 미소 농양이 확인되었을 경우이다. *C. difficile* 관련성 설사의 검사실 표준 진단 방법은 조직배양에서 독소 B를 검출하는 것이다. 그러나 이 방법은 일반 검사로 이용하기가 어렵기 때문에 배양검사로 *C. difficile*을 분리하거나 상품화된 장내 독소 시험법을 많이 사용한다. 모든 *C. difficile*이 독소를 생성하지는 않으며, 정상인의 3%, 입원환자의 약 20%에서 상재한다고 알려져 있다.

치 료

항생제 자극 중지

항생제 자극을 중지하는 것이 초기 CDAD 치료에 가장 중요한 단계이다. 1974년부터 CDAD 환자

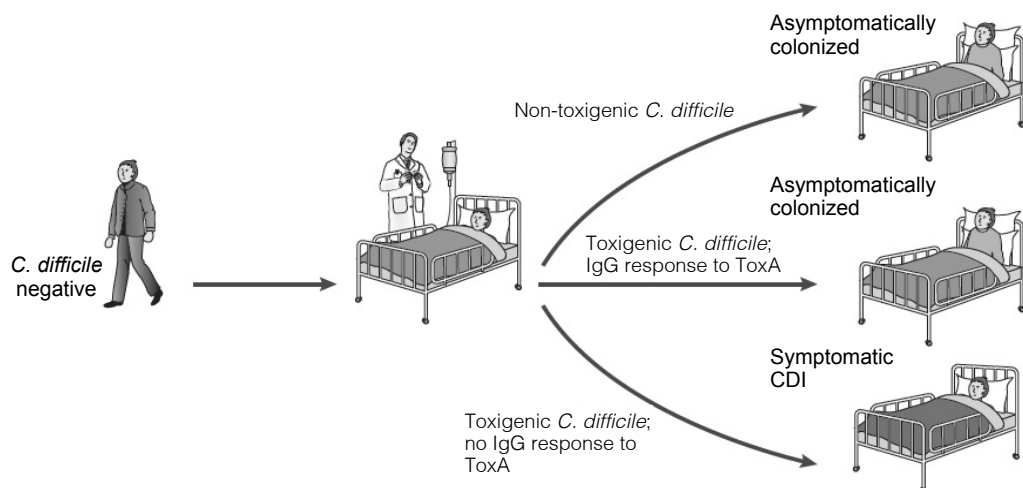


Fig. 2. Model for the acquisition of *Clostridium difficile* infection(CDI). (Maja R et al., Nat Rev Microbiol, 7, 526-536, 2009)

의 25% 이상은 항생제 자극을 중지하는 것으로 회복되었다. CDAD를 위한 치료 방법을 알기 전에는 20명의 위막성 장염 환자는 clindamycin의 치료를 중지한 후에 회복되었다.

경미한 경우 경구 metronidazole : 심한 경우
경구 vancomycin

CDAD의 치료는 metronidazole 또는 vancomycin으로 치료를 하며 초기 반응률은 90% 이상이지만 치료 후 15~30% 환자들에서는 재발하며, 초기 치료에 실패하는 빈도가 점차 증가하고 있어 새로운 치료제에 대한 요구가 증가하고 있다. 일단 C.

difficile 감염이 의심되면 유발 가능한 항생제 사용을 중단하고 metronidazole 또는 vancomycin 경구 투여를 고려한다. 임상에서는 metronidazole이 vancomycin에 비해 가격이 낮고, vancomycin resistance enterococci(VRE) 발생가능성 때문에 일차치료제로 metronidazole을 선호한다. 경구 vancomycin은 metronidazole 일차 치료에 실패했거나 투여금지 일 때 사용한다. 그러나 일차 치료제로 metronidazole을 투여하면 96%에서 호전된다고 알려진 초기 연구와는 달리 2000년 이후 metronidazole 투여 후 치료 실패 및 재발의 빈도가 증가하고 있고, 증상 호전 반응이 느리며 metronidazole 투여군도 vancomycin 투여군과 유사한 VRE 동정률을 보이

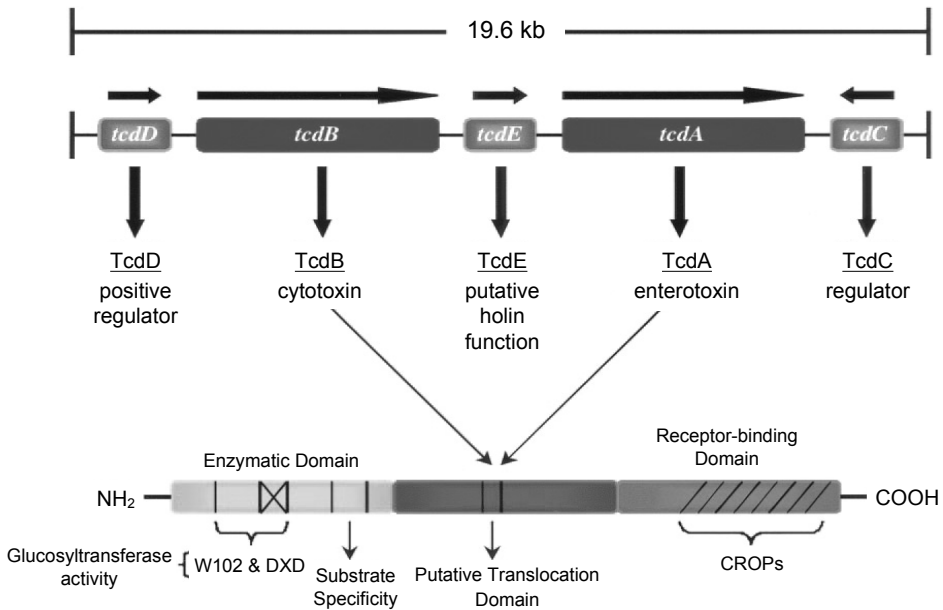


Fig. 3. Genetic arrangement of the *C. difficile* pathogenicity locus and proposed protein domain structures of *tcdA* and *tcdB*. Both *tcdA* and *tcdB* are encoded on the 19.6-kb pathogenicity locus. In addition to the two toxin genes *tcdA* and *tcdB*, three additional regulatory open reading frames are located on this island. *tcdD* is a proposed positive regulator, *tcdE* is a putative holin protein, and *tcdC* is a proposed negative regulator of toxin gene expression. (Daniel EV, Jimmy DB, American Society for Microbiology, 18(2), 247-263, 2005)

는 점 등으로 미루어 일차 치료제로 어떤 항생제를 선택해야 하는지는 아직 논란의 여지가 있다. 특히 2003년부터 유행하기 시작한 BI/NAP/027 균주는 이전과 달리 치명적이다. 이 균주의 유행은 미국과 유럽뿐만 아니라 전 세계적으로 퍼지고 있어 유사한 여건에 놓인 우리나라 역시 안전지대는 아니다(Fig. 4).

다양한 치료 방법

항균제 치료

Metronidazole이나 vancomycin이 가장 많이 사

용되지만 *C. difficile*은 내성 균주로 발현 될 여지가 있으므로 항생제 사용이 제한적이다. Rifaximin은 세균의 RNA 합성을 억제하는 비흡수 항균제로써 체내로 흡수되지 않아 장기간 항생제 치료가 필요한 경우 안전하게 사용할 수 있다.

Toxin Binding Agent

Cholestyramine과 같은 toxin binding agent는 *C. difficile* 독소와 결합하여 체외로 배출시키면서 장내 정상 세균총의 불균형은 회복시키고 항생제 내성은 발현하지 않는다. 따라서 항생제 치료와 동

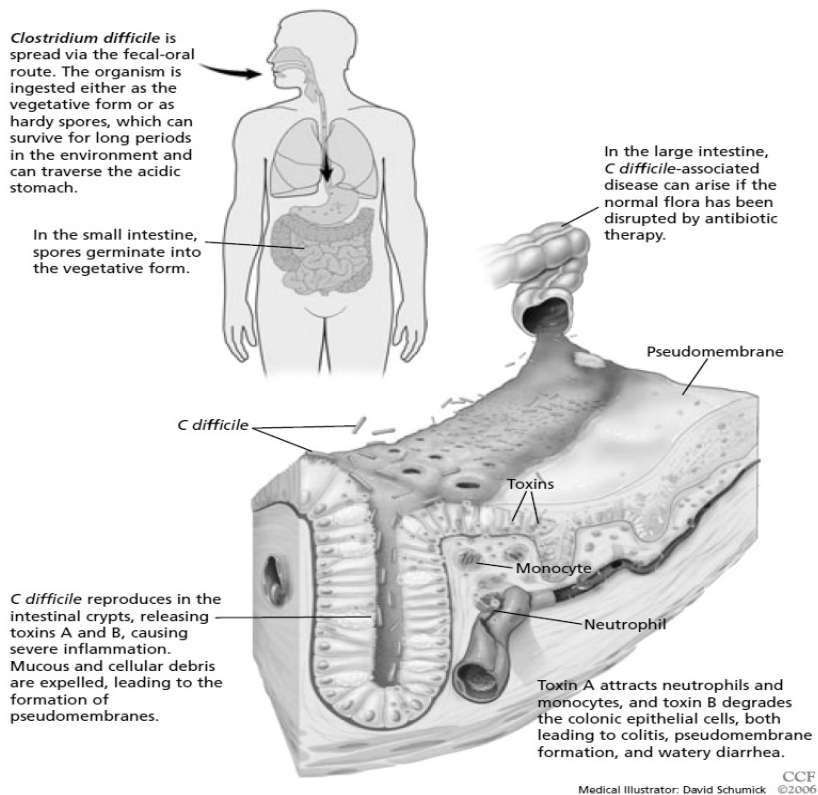


Fig. 4. pathogenesis of *Clostridium difficile*-associated disease (CDAD). (Rebecca HS, L Clifford M, Cleveland clinic J of medicine, 73(2), 187-197, 2006)

등한 치료효과가 있는 것으로 알려져 있다.

Probiotics

Probiotics는 파괴된 장내 정상 세균총을 회복시키고 면역 반응을 증가시키며 병원균과 병원균의 독소를 제거한다. 최근 연구에서 probiotics 예방 투여는 CDAD 빈도를 감소시킨다고 보고하고 있다.

면역요법(Immunotherapy)

독소 A에 대한 면역글로불린 생성이 적을수록 CDAD의 임상경과가 심해지고 재발률이 높아지나 동물실험에서 면역글로불린을 주입했을 때 임상결과가 호전하며 *C. difficile*의 장내 집락 형성이 감소한다고 보고되어 있다.

Fecal Bacteriotherapy

정상인의 건강한 장내 상재균을 이식하여 정상 세균총을 회복시키면 *C. difficile*을 제거할 수 있을 것이라는 개념을 바탕으로 항생제에 잘 반응하지 않는 재발 CDAD 환자에게 건강한 성인의 변을 관장 또는 비위관을 통해 주입하는 방법이다. 아직까지 대상수가 많지 않아 결론을 내리기 어려우나 장내 항상성을 유지하는 측면에서 난치 CDAD의 치료로 기대할 수 있다.

배양법

배지 배양법

CCFA 선택배지

*C. difficile*은 산소에 매우 예민하므로 혐기성 상태에서 GAM 한천 배지에서는 37°C, 24~48시간

배양하면 원형, 다소 불투명, 광택이 없는 집락을 만들며 비용혈성이다. 선택배지로는 cycloserine-cefoxition-fructose egg yolk agar(CCFA) 평판을 사용한다. 집락이 크고 유백색의 광택이 나는 황색 집락을 이룬다. 이 배지에 발육한 균은 균체가 길어 지기도 하고 아포 형성을 볼 수 없는 경우도 있다.

동 정

자외선에서 황녹색 형광을 띠는 집락을 선택하여 그람 염색에서 특징적인 형태가 있는지 관찰한 후 생화학적 검사를 실시한다. Lecithine 음성, lipase 음성이며 포도당, 과당, mannitol을 분해한다.

독소 확인

샘플(stool)에서 *C. difficile*의 분리는 간단하나 원인을 분석하기 위한 독소의 검출과 참고방법은 tissue culture cytotoxicity 방법으로 *tcdB*를 10 pg 이하 검출한다. ELISA는 일반적으로 *tcdA/B*를 샘플(stool)에서 검출하는데 사용한다.

라텍스 응집 시험

독소 A를 검출하는 방법으로 시험 균을 latex와 반응시키는 방법이다. 이 방법은 간단하며 신속하게 진단할 수 있다. *C. difficile*, *C. botulinum*, *C. sporogenes*, *Peptostreptococcus anaerobius* 및 *Bacteroides asaccharolyticus* 균종은 위양성 결과를 초래한다. 결과 보고는 음성이면 *C. difficile* 연관성 항원 음성(No *C. difficile*-associated antigen detected)으로, 양성이면 *C. difficile* 연관성 항원 양성(*C. difficile*-associated antigen detected)으로 보고하

고 양성 결과는 조직 배양으로 확진한다.

독소 A 검출

Dot Immunobinding 법

C. difficile 연관성 설사의 신속한 선별 진단법으로 이용된다. 일반적인 시험 방법은 시험 용액을 membrane cassette에 넣은 후 filter를 제거하고 단클론 항체를 막 표면에 첨가한다. 배양 후에 horse-radish peroxidase와 결합된 anti-mouse IgG를 막 표면에 첨가한 후, 세척액을 막 표면에 넣고 기질 시약을 첨가한 후 판정한다.

효소 면역법

효소 면역법은 항독소 A 항체가 흡착되어 있는 micro well에 효소가 결합된 항독소 A의 단클론 항체와 희석된 검체를 well에 넣고 배양 한 후 기질을 넣고 배양 후에 반응 정지 시약을 넣고 흡광도를 관찰한다.

독소 B 검출

조직배양 세포 독소 시험은 *C. difficile* 관련성 설사의 표준 진단 방법이다. 조직 내양 세포독소 시험은 조직 배양에 24~48시간이 소요되고 검사 방법이 복잡하다.

표준 조직 배양법에 의한 효소의 증명

세포 제거 샘플과 세포 제거 샘플에 *C. difficile* 또는 *C. sordellii*의 항독소를 함께 cell line(Hela 세포, 태아의 폐섬유 세포, rhesus monkey의 신세포)에 접종한 후 세포변성효과(cytopathic effect)를 본

다. 여러 가지 cell line이 사용되나 일반적으로 사람의 diploid fibroblast cell line을 주로 사용한다. 샘플에 *C. difficile* 세포독소가 있으면 세포를 제거한 샘플에서만 세포변성 효과가 나타난다.

Microtiter Cytotoxicity 법

Bartel의 cytotoxicity 법은 조직배양 세포가 붙어 있는 microtiter tray를 이용하는 키트화된 시험법이다. 원리는 표준 배양법과 동일하면 48시간까지 4~6 시간 간격으로 세포변성 효과를 관찰한다(Table 1).

이용분야

식품에서의 *C. difficile*에 대한 연구

Clostridium difficile in Retail Ground Meat, Canada

*C. difficile*의 포자는 소의 배설물에서 시작하여 최종적으로는 판매되는 식육 제품으로 오염 경로가 유추된다. 이러한 오염이 직접적으로 식중독을 유발하는 것은 아니지만, *C. difficile*이 식중독을 일으킬 가능성에 대한 연구가 진행되고 있다. CDC 발표에 2005년 10달 동안 캐나다의 소매 시장에서 구매한 쇠고기 60건 중 12건(20%)에서 *C. difficile*이 분리되었다고 보고되고 있다. PCR ribotyping 결과 12건 중 8건에서 공통적인 ribotype을 나타냈다. 모든 분리주는 metronidazole과 vancomycin에 감수성이 있었으며 levofloxacin과 clindamycin에도 내성이 있었다. 소나 개 내장에서 분리된 *C. difficile*은 사람에서 분리되는 *C. difficile*과 다른

ribotype 양상이나 만일 살아 있는 포자를 섭취했을 경우 종들 간의 교차 전이의 위험이 있을 수 있다. 물론 가열을 해서 요리를 할 때는 식중독의 위험에서 감소될 수는 있으나 원재료에서 포자 형태로 있을 경우 71℃ 정도로 요리를 한다면 포자가 살아할 가능성이 있다. *C. difficile*에 대해서는 현재 병인학적이거나 역학적인 관련성이 알려져 있지 않다. 또한 현재까지는 식육에서의 *C. difficile*의 분리가 식중독과 연관되지는 않지만 향후에는 *C. difficile*에 대한 식품에서의 오염률이나 병인학적 연관성에 대한 연구가 필요하다.

Clostridium difficile in Retail Meat Products, USA, 2007

2007년 미국에서 비가열 식육 제품과 즉석섭취 식육제품 88건에 대해서 *C. difficile*을 검출하였다. 각 시료는 D-cysteine이 들어 있는 배지에서 배양

하거나 80℃ 에서 포자를 발아시켜 taurocholate cycloserine cefoxitin fructose agar(TCCFA)에서 배양하여 분리 동정을 한 후 PCR ribotyping과 toxinotyping, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)를 하였다. 전체적으로 88건 중 37건(42.0%)에서 양성을 보였으며 식육 제품 중 돈육 소시지가 62.5%, 간 쇠고기에서 50.0%로 높은 비율로 분리되었다. 모든 분리주는 *cdtB*, *tcdA*, *tcdB* 양성이며 식육의 종류나 판매 장소, 판매시기에 특이성은 없었다. PFGE 결과 078/toxinotype V(73%) 또는 027/toxinotype III(NAP1나 NAP1-related(27%))으로 사람에서 분리되는 *C. difficile*과 유사한 type이 분리되었다. 결론적으로 *C. difficile*은 분변이나 환경오염을 통해서 유통되는 과정 중에 포자 형태로 근육이나 조직에 존재해 있을 가능성이 높다. 이렇게 오염된 식품은 사람에게 CDAD로까지 전이될 가능성이 있고 CDAD는 사람에서 사람으로 전이되기 때문에 식품에서의 분리된 *C. difficile*에 대한 꾸

Table 1. Advantage and disadvantage of diagnostic testing methods for *Clostridium difficile*

검출 방법	검출시간	감도	장점	단점
Endoscopy	2 hours	51%	<i>Pseudomembranous colitis</i> 의 진단	낮은 감도
Anaerobic culture	72 hours	89%~100%	분자적 유형의 결과로 사용	독소를 생성하는 균주를 구별 불가
Tissue cytotoxic assay	48 hours	94%~100%	독소A/B 확인 - gold standard	위양성 결과
Common antigen	15~45 min.	58%~92%	독소A/B 확인 가능, 사용 용이	다른 혐기 균주의 교차로 독소 구별 불가
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) - toxin A	2 hours	80%~95%	사용 용이	독소A/B 생성 균주 확인 불가
Immunochromatographic toxin A	< 1 hour	60%~85%	빠르게 사용하기 간단	독소A/B확인 과 균주 확인 불가

(Rebecca HS, L Clifford M, Cleveland clinic J of medicine, 73(2), 187-197, 2006)

준한 연구의 필요성이 있다.

결론

세계적으로 항생제 남용으로 인해 생기는 항생제 내성균의 증가로 이에 관한 관심이 급증하고 있으며 꾸준한 연구를 진행하고 있다. *C. difficile* 은 항생제 사용, 이로 인해서 발생하는 내성과 관련이 있는 균이다. 외국에서는 식육제품에서 *C. difficile*의 오염에 대한 연구를 진행하고 있으며 병원이나 지역사회에서는 이미 *C. difficile*에 대한 감염이 높은 수준이다. 우리나라는 병원에서 감염되는 *C. difficile*에 대한 연구는 진행되고 있으나, 식육제품의 *C. difficile*에 대한 기초 연구는 미흡하다. 그 이유는 식육제품에서의 *C. difficile*의 검출이 어렵고 혐기성 균으로 다루기가 어렵기 때문이다. 따라서 식육제품에서 *C. difficile*을 쉽게 분리 할 수 있는 방법을 확립하여야 하며 식육제품에서 *C. difficile*의 오염에 따른 식중독 발생 연구, 식품 섭취로 인한 CDAD의 발생 메커니즘 등에 관한 연구가 필요하다고 생각된다.

● 참고문헌 ●

1. Alexander RP, Henry RS, Todd DJ, Scott W, *Clostridium difficile* in Retail Ground Meat, Canada, Emerg Infect Dis, **13**(3), 485-487, 2007
2. Daniel EV, Jimmy DB, *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Di-

sease, American Society for Microbiology, **18**(2), 247-263, 2005

3. Songer JG, The emergence of *Clostridium difficile* as a pathogen of food animals, Anim Health Res Rev, **5**(2), 321-326, 2004
4. Songer JG, Trinh HT, Killgore GE, Thompson AD, McDonald LC, Limbago BM, *Clostridium difficile* in Retail Meat Products, USA, 2007, Emerg Infect Dis, **15**(5), 819-821, 2009
5. Songer JG, Anderson MA, *Clostridium difficile*: An important pathogen of food animals, Anaerobe, **12**, 1-4, 2006
6. Maja R, Mark HW, Dale NG, *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis, Nat Rev Microbiol, **7**, 526-536, 2009
7. Park HS, Han DS, Management of Antibiotics-Associated Diarrhea, The Korean J of Gastroenterology, **54**(1), 5-12, 2009
8. Rebecca HS, L Clifford M, *Clostridium difficile*-associated disease: new challenges from an established pathogen, Cleveland clinic J of medicine, **73**(2), 187-197, 2006

조용선 이학박사

소 속 : 한국식품연구원 식품분석센터
 전문분야 : 병원성 미생물 분리 동정 및 위생관리
 E-mail : 031-780-9242
 T E L : yscho@kfri.re.kr