

## 한국어린이 설사증에 있어 *Clostridium difficile*의 분포 및 그의 병원적 의의

한양대학교 의과대학 미생물학교실

김 경 희 · 조 양 자 · 서 인 수

=Abstract=

### *Clostridium difficile* as an Important Etiological Agent in Korean Children with Diarrheal Disease

Kyung-Hee Kim, M.D., Yang-Ja Cho, M.D., and Inn Soo Suh, M.D.

Department of Microbiology, Hanyang University College of Medicine, Seoul, Korea

Although recent reports from western countries suggest that *Clostridium difficile* has been implicated as an important agent in diarrheal disease of children, the frequency with which *C. difficile* occurs in Korean children with diarrhea has not been established. We, therefore, conducted a 12 month evaluation of *C. difficile* in 214 diarrheal children less than 2 years old and 52 age-matched controls in Korea. Toxigenic *C. difficile* plus free fecal *C. difficile* toxin or free fecal *C. difficile* toxin only was detected in stools of 33(15.4%) children hospitalized due to diarrhea and in stools of 2(3.8%) of 52 asymptomatic controls ( $p < 0.05$ ). Colonization of infants with *C. difficile* seems to occur during weaning probably from other carriers, e.g., food or their surroundings. The babies in turn may be an exogenous source of *C. difficile* for adults who are receiving antibiotics. These results suggest the importance of searching for *C. difficile* toxin in children who develop diarrhea in Korea.

## 서 론

최근 서구 여러나라에서 발표된 보고들<sup>1~4)</sup>에 의하면 *Clostridium difficile*은 소아의 급성 또는 만성설사증의 중요한 원인균으로 밝혀지고 있으나 아직까지 우리나라에서는 이에 대한 보고가 없다.

*C. difficile*은 항원성이 다른 두가지의 독소 A와 B를 산생하여 장질환을 일으키며 이들은 모두 세포독성을 나타낸다<sup>5)</sup>. *C. difficile*에 의한 질환은 항균제투약 후 빈번히 유발되므로<sup>1,3)</sup> 의사의 처방없이도 항균

이 연구는 1984~1985년도 복암생명연구소 연구비로 수행되었음.

제비용이 가능한 우리나라 현실에서의 *C. difficile* 감염은 높을 것으로 추측된다.

최근 보고된 한국소아질환의 변천양상을 살펴보면 설사증은 20년전이나 지금이나 총입원환자의 10%를 차지함으로써 호흡기감염증과 함께 소아과영역의 2대 질환중의 하나로 나타나 있다. 과거 10년동안 위생적인 식수공급과 사회적, 경제적 환경의 개선에도 불구하고 설사증이 입원환자의 제 2위를 차지하는 이유는 설사증의 원인이 그때와 지금 현저하게 다르기 때문일 것이다. 예전에는 더운 여름철 호기성 장내세균들에 의한 설사증이 많았으나<sup>6~8)</sup> 근래에는 rotavirus<sup>9,10)</sup> adenovirus 등의 바이러스성 감염에 의한 것들과 항균물질의 분별없는 사용으로 인한 endogenous fecal

flora의 불균형으로 출현하는 *C. difficile*에 의한 설사증이 많을 것으로 예상된다.

저자들은 우리나라 소아설사증에 있어 *C. difficile*의 병원적 역할을 규명하기 위해 1년간 설사증으로 입원한 만 2세미만의 소아 214명과 같은 연령층의 건강한 소아 52명을 대상으로 독소산생 *C. difficile*의 분포를 관찰하였다.

## 연구대상 및 방법

### 1. 대 상

1984년 2월부터 12개월간 한양대학교병원에 입원한 만 2세미만의 소아설사환자 214명으로부터 입원당일 세균검사를 위해 의뢰된 대변을 검사직전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하여 검사물로 사용하였으며 설사증 이외의 질환을 동반한 소아검사는 제외하였다. 같은 방법으로 설사환자군과 나이 및 성별의 분포가 유사한 건강대조군 52명으로부터도 검사물을 채취하였다.

### 2. 균주분리

*C. difficile*의 분리는 George 등<sup>11)</sup>에 의해 고안된 선택배지(cycloserine cefoxitin fucose agar, CCFA)에 대변액 1 ml(또는 1 g)을 도말하여 anaerobic chamber(Forma Scientific, Marietta, U.S.A.) 안에서 72시간 배양하고 *C. difficile*로 추정되는 노란집락을 prerduced sheep blood agar에 순수배양 후 API 20 A(API System, S.A., France) 및 시험관내 세포독소 중화반응으로 동정하였다.

### 3. 대변상청액에서의 *C. difficile* free fecal cytotoxin의 검출

김 등<sup>12)</sup>의 방법에 따라 대변액을 PBS(pH 7.2)로 1:1희석하여 원심분리하고 그 상청액을 0.45  $\mu$  filter로 여과한 다음 10배희석제액을 만들어 walker 단층세포(American Type Culture Collection, Rockville, U.S.A.)에 접종, 18시간 배양하여 50%이상의 단층세포파괴가 관찰되는 경우 이를 *C. difficile* 항독소(Virginia Polytechnic Institute, Blacksburg, U.S.A.)로 중화시도해 보았고 중화되면 free fecal cytotoxin 양성으로 판정하였다.

### 4. *C. difficile*의 시험관내 독소산생능검사

*C. difficile*로 동정된 균주를 cooked meat glucose broth(Difco, Detroit, U.S.A.)에서 72시간 배양후 앞

Table 1. Isolation of *C. difficile* and Its Toxin from Stool Specimens from 366 Children with and without Diarrheal Diseases

Diarrhea	Children studied(n)	Toxigenic <i>C. difficile</i> positive and/or free fecal <i>C. difficile</i> toxin positive cultures(%)
Yes	214	33(15.4)*
No	52	2(3.8)*

\*p<0.05

Table 2. Toxigenic *C. difficile* Recovery Rates in Diarrheal Infants and Children by Sex, Stratified by Age

Age(month)	No. positive/no. observed(% positive)	
	Male	Female
<3	0/8(0)	0/2(0)
3~6	1/11(9.1)	2/11(18.2)
>6~12	13/61(21.3)	8/44(18.2)
>12~24	5/49(10.2)	4/28(14.3)
Total	19/129(14.7)	14/85(16.5)
Grand total	33/214(15.4)	

에서와 같이 그 여과액의 세포독소를 측정하고 중화시도해 보았다.

### 5. 통계분석

설사증환자와 건강소아대조군의 *C. difficile*의 분포 비교는 chi-square 분석으로 이루어졌다.

## 결 과

*C. difficile*의 장관내 존재와 설사증발현과의 관계.

설사증으로 입원한 소아환자 214명중 검사물에서 독소산생 *C. difficile*과 free fecal cytotoxin이 함께 검출되거나 또는 free fecal cytotoxin만 검출된 경우가 15.4%에 해당하는 33명이었다(Table 1). 반면 무증상 대조군에서는 3.8%에 해당하는 2명의 소아에게서만이 독소산생 *C. difficile* 및 free fecal cytotoxin이 검출되었다. 이들 환자군과 건강대조군에서의 독소산생 *C. difficile* 및 free fecal cytotoxin의 검출율은 chi square 분석에 의해 통계학적인 차이가 있었다(p<0.05). Free fecal cytotoxin이 검출된 환자군에서

Table 3. Characteristics of Patients with Diarrhea

Patients with diarrhea	No.	Mean age (month)	Antibiotic exposure (% patients)
Toxigenic <i>C. difficile</i> isolated	30	11	24(80)
No toxigenic <i>C. difficile</i> isolated	71	12	46(65)
Total	101	11.7	70(70)

의 cytotoxin titer는 1:10~1:5,000이었으나 건강대조군에서는 1:50이하였다. 분리된 *C. difficile*의 세포독소 분비능력이 있어서는 환자군 군주의 경우와 정상대조 군주에서 각각 1:10~1:1000, 1:10~1:100이었다.

설사증을 유발한 소아군에서의 독소산생 *C. difficile*에 의한 감염과 성별, 나이와의 관계. Table 2에서 보는 바와 같이 남아에 있어서는 14.7%, 여아에 있어서는 16.5%의 감염율을 보였고, 남녀모두 3~6개월 사이에 감염이 시작되었으나 여아들의 경우 초기부터 높은 감염율을 보인 반면 남아들의 경우 6~12개월 사이에 가장 높은 감염율을 나타내었다.

Table 3에서는 설사증을 일으킨 소아환자들을 독소산생 *C. difficile*에 의한 감염여부에 따라 분류하여 그들의 평균 나이와 설사전 6주동안의 항균제 복용여부를 살펴보았다. 조사가 가능했던 101명 중 독소산생 *C. difficile*이 분리된 예들과 분리되지 않은 예들은 각각 30명과 71명이었다. 두 비교군의 평균 연령에는 특징할만한 차이가 없었고 설사증이 유발되기전 6주동안의 항균제 복용률은 독소산생군주 분리군에서 80%, 그 비교군에서 65%였다. 항균제 복용 이유로는 호흡기 감염증이나 설사증 때문이 대부분이었다.

## 고 찰

*C. difficile*은 아포를 형성하는 혐기성 그람 양성균이며 분자량이 각각 다른 두가지의 독소 A(440,000 mw)와 B(360,000~470,000 mw)를 산생하며<sup>5)</sup> 불현성 감염에서부터 self-limiting diarrhea, cryptitis, 또는 치명적인 pseudomembranous colitis까지의 다양한 장내문제를 일으킨다.<sup>1~4)</sup>

Vancomycin을 제외한 거의 모든 항균제 투여후 6~8주 이내에 이들 문제들이 야기된다.<sup>11,12)</sup> 우리나라에서도 항균제사용과 관련된 설사증 및 pseudomembranous colitis의 발현이 성인에서 보고<sup>13,14)</sup>되었고 이에 틀에서 독소산생 *C. difficile*과 free fecal cytotoxin이 검출됨으로써 antibiotic-associated *C. difficile*

diarrhea/colitis임이 확인되었다. 그러나 소아에서는 이 질환들이 전혀 보고된 바가 없다.

이 연구에서는 우리나라 소아군에서 *C. difficile*의 설사원인균으로서의 병원적 역할을 규명하려는 의도로 설사환자군과 건강대조군에서의 독소산생 *C. difficile* 및 free fecal cytotoxin의 빈도를 비교하여 보았더니 각각 33예(15.4%)와 2예(3.8%)였다. 이는 독소산생 *C. difficile*의 설사원인균으로서의 병원적역활의 중요성을 제시한다. 감염에 의한 설사일 경우 일반적으로 호기성 장내 세균들과 rotavirus분리가 의뢰되나 앞으로는 *C. difficile*독소의 검출도 세균학적 검사외에 포함되어야 할 것으로 생각된다.

Table 2에 나타난 바와 같이 독소산생 *C. difficile*에 의한 감염율은 이유기인 생후 6개월 전후에 가장 높았다. 이는 이유기동안 장내의 microbial ecology의 변동으로 외부세균에 의한 colonization이 용이하기 때문일 것으로 생각된다. 또한 이 시기는 모유에서 고정식으로 바뀌어지는 때이므로 모유에 의한 감염방어가 줄어들어는 시기이다. 최근 김 등<sup>15)</sup>은 미국 Houston에 거주하는 산모들의 초유와 모유에서 *C. difficile*이 산생하는 두가지독소 A와 B를 중화하는 anti-secretory IgA와 non-specific components를 발견하였다.

항생제사용과 독소산생 *C. difficile*의 장내존재와의 연관관계(Table 3)를 살펴보았더니 설사증 유발전 5주동안의 항생제 사용율이 *C. difficile*보균자군에서 15% 정도 많았다. 그러나 일반적으로 항생제 남용이 많은 우리나라에서는 이들 상관관계 규명이 가능하지 않았다. 항생제사용은 대부분이 호흡기감염증과 만성설사증의 치료 때문이었는데 이는 호흡기감염증 치료를 위한 항생제복용이 *C. difficile*에 의한 장내감염을 유발했을 가능성을 제시한다.

앞으로 다양한 여러 소아집단에서의 보균율과 *C. difficile*에 대한 serum antibody 또는 secretory antibody의 빈도가 밝혀진다면 *C. difficile*에 의한 소아감염증의 진정한 이해가 가능할 것으로 기대된다.

감사의 말씀: 본 연구에 검사물을 제공하여 주신 본 대학 임상병리과 김춘원교수 및 여러 선생님들, anaerobic chamber를 대여해 주신 서울의대 미생물학교실 장우현교수께 사의를 표하며 끝으로 이 논문이 나올 수 있도록 열심히 도와주신 김정목조교에게 진심으로 감사드립니다.

## REFERENCES

- 1) Kim KH, Fekety R, Batts DH, et al.: *Isolation of Clostridium difficile from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. J. Infect. Dis.*, 143:42, 1981
- 2) Viscidi RP, and Bartlett JG: *Antibiotic-associated pseudomembranous colitis in children. Pediatrics* 67:381-386, 1981
- 3) Kim KH, Dupont HL, and Pickering LK: *Outbreaks of diarrhea associated with C. difficile and its toxin in day care centers: evidence of person-to-person spread. J. Pediatr.*, 102:376, 1983
- 4) Sutphen JL, Grand RJ, Flores A, et al.: *Chronic diarrhea associated with C. difficile in children. Am. J. Dis. Child.* 137:275, 1983
- 5) Sullivan NM, Pellett S, and Wilkins TD: *Purification and characterization of toxins A and B of C. difficile. Infect. Immun.*, 35: 1032, 1982
- 6) 홍창의: 소아 질병의 변천 양상. 대한의학협회지, 28:130, 1985
- 7) 정윤섭, 송경순, 이귀병 외: 최근 5년간 분리된 enteropathogenic bacteria. 대한미생물학회지, 14:17, 1979
- 8) 고광옥, 서정기, 장우현 외: 장독성 대장균에 의한 소아 설사의 빈도에 관한 연구. 소아과, 26: 949, 1983
- 9) 강정옥, 박승함, 김각홍 외: Rotavirus 성 위장염. 대한미생물학회지, 17:15, 1982
- 10) 김병길, 김덕희, 윤덕진 외: Human rotavirus에 의한 소아의 위장염 및 그 합병증에 관한 역학적 연구. 대한의학협회지, 28:901, 1985
- 11) George WL, Sutter VL, Citron D, et al.: *Selection and differential medium for isolation of C. difficile. J. Clin. Microbiol.*, 9:214, 1979
- 12) Fekety R: *Recent advances in management of bacterial diarrhea. Rev. Infect. Dis.*, 5:246, 1983
- 13) 정윤섭, 김정호, 이삼열 외: C. difficile의 독소 생성주 분리 2예보고. 감염, 16:47, 1984
- 14) 조성민, 이창돈, 김경희 외: C. difficile에 의한 위막성 장염 1예. 대한소화기내시경학회잡지, 5: 67, 1985
- 15) Kim KH, Pickering LK, Dupont HL, et. al.: *In vitro and in vivo neutralizing activity of human colostrum and milk against purified toxins A and B of C. difficile. J. Infect. Dis.*, 150:57, 1984