

Clostridium difficile 아포에 대한 소독제의 살균효과

김효식 · 김희정

연세대학교 의과대학 진단검사의학교실

Sporicidal Activity of Selected Disinfectants against *Clostridium difficile*

Hyo-Sik Kim Kim and Heejung Kim

Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: *Clostridium difficile* infection (CDI) is the predominant cause of hospital-acquired diarrhea. This study evaluated the sporicidal activities of several disinfectants against *C. difficile* spores.

Methods: We used toxigenic *C. difficile* strains with different ribotypes for our study. We compared the sporicidal activities of Cavicide (Metrex Research Corporation, USA), Cidex OPA (Advanced Sterilization Products, USA), 1% Rely+On Virkon (Dupont, UK), 0.25% Surfanios (Laboratoires Anios, France), sodium hypochlorite (Yuhan Clorox, Korea), and 70% ethyl alcohol (Duksan, Korea) by using dilution-neutralization method. The sporicidal activity of the disinfecting agents was considered to be the inactivation factor (IF). The IF was calculated as the log₁₀ colony forming unit (CFU) reduction of the viable count from the initial inoculums. Disinfectants were considered to be sporicidal if they showed an IF ≥ 4.

Results: Cavicide, 70% ethyl alcohol, Rely+On Virkon, and Surfanios showed no reduction in spore counts at all exposure time. Solutions of sodium hypochlorite diluted 1 : 100 (≥400 ppm available chlorine), 1 : 50, and 1 : 20 were sporicidal after 5 min, 2 min, and 30 s, respectively. Cidex OPA showed sporicidal activity after 30 min.

Conclusion: To prevent the transmission of CDI, at least 1,000 ppm sodium hypochlorite solution should be used to disinfect the hospital environment. Contaminated endoscopes should be disinfected with Cidex OPA for more than 30 min.

Keywords: *Clostridium difficile*, Disinfectant, Spore

서 론

*Clostridium difficile*은 혐기성 그람양성 간균으로 자연계에 널리 분포하며 주로 토양과, 사람을

포함한 여러 동물들의 변에서 분리된다. *C. difficile*은 치료 목적으로 항생제를 복용한 환자의 10-25%에서 설사 질환을 일으키며, 단순한 설사에서 높은 치사율을 보이는 위막성 대장염까지 다양한 임상 양상을 나타낸다[1].

C. difficile 감염(*C. difficile* infection, CDI)은 대변-구강 경로를 통해 사람 간에 전파될 수 있으며, 병원 내에서는 주로 의료 종사자의 손을 통하여 전파되어 병원획득 설사의 가장 흔한 원인균으로 알려져 있다[2]. 입원 당시 *C. difficile* 배양에 음성이었던 환자 399명 중 83명(20.8%)에서 입원 기간 동안 *C. difficile*을 획득하였고, 이중 31명(7.8%)에서 CDI가 발생하였다는 보고가 있다[3].

접수일: 2011년 3월 22일

수정일: 2011년 4월 22일

게재승인일: 2011년 4월 25일

교신저자: 김희정

449-930 경기도 용인시 처인구 금학로 225

연세대학교 용인세브란스병원 진단검사의학과

Tel: 031-331-8755, Fax: 031-335-5551

E-mail: hjkim12@yuhs.ac

*이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임(2010-0017322).

*C. difficile*의 영양형(vegetative form)은 공기에 노출되면 사멸하지만 아포(spore)는 여러 종류의 소독제에 내성을 나타내고 병원 환경에서 수개월 혹은 수년간 살아남는다[2]. 특히 *C. difficile*의 아포는 알코올에 내성이 있으며[4], 병원 감염을 줄이기 위해 알코올계 손 소독제의 사용 후에 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*나 vancomycin-resistant enterococci 감염은 감소하였으나 CDI 발생률은 변화가 없었다는 보고도 있다[5].

이 연구의 목적은 병원에서 흔히 사용하는 소독제와 상품화된 병원 환경 소독제를 대상으로 *C. difficile* 아포에 대한 살균력을 시험하여, 적절한 소독법을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 균주 및 아포 선택

병원성이 높은 것으로 알려진 *C. difficile* NCTC 11204 (ribotype 001), *C. difficile* R10725 (ribotype 078), *C. difficile* ATCC 43598 (ribotype 017)과 최근 외국에서 유행하는 Ribotype 027과 같은 특성을 가진 국내 분리주를 대상으로 하였다. 아포 선택은 Wullt 등[6]의 방법을 이용하였다. 즉, -70°C 에 보관된 균주를 혈액한천에 37°C , 48시간 동안 혐기성 배양한 후, 5 mL brain heart infusion broth (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD USA)에 접종하여 37°C , 48시간 동안 혐기성 배양하였다. 네 균주의 brain heart infusion 균액을 섞은 후 95% 에탄올을 같은 양 넣어 30분간 방치한 후 3,000 g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 침전물에 0.3 mL의 증류수를 넣어 부유시킨 후 gram 염색하여 아포가 80% 이상 되는지 확인하였다. 균 부유액을 계단희석하여 아포수를 측정하였고, 아포수는 $10^6/\text{mL}$ 이 되도록 하였다.

2. 소독제

Cavicide (Metrex research Corporation, Orange, CA, USA), Cidex OPA (Advanced Sterilization Products, Irvine, CA, USA), 1% Rely+On Virkon (Dupont, Suffolk, UK), 0.25% Surfanios (Laboratoires Anios, Lille-Hellemmes, France) 등의 상품화

된 소독제와 락스(유한-크로락스, 서울, 대한민국) 1 : 100, 1 : 50 그리고 1 : 20 희석액, 70% 알코올(덕산, 안산, 대한민국)에 대해 시험하였고, 소독제는 제조사가 권장하는 지침대로 시험 직전에 준비하여 사용하였다.

3. 방법

Wullt 등[6]이 사용한 희석-중화 방법(dilution-neutralization method)을 이용하였다. 즉, 각각의 소독제 800 μL 에 균 부유액 200 μL 를 넣은 후 30초, 1분, 2분, 5분, 15분 그리고 30분 후에 각각 100 μL 를 취해 중화제(D/E neutralizing Broth, BD, Sparks, MD, USA) 100 μL 에 넣었다. 5분간 중화한 후 증류수 100 μL 를 넣었고, 계단 희석하여 100 μL 씩 혈액한천에 접종하였다. 37°C , 48시간 동안 혐기성 배양하여 아포수를 계산하였다. 실험 전과 후에 균 부유액의 집락수를 비교하여 실험하는 동안에 변화가 없었는지 확인하였고, 중화제에 의한 아포의 억제 효과 여부도 확인하였다. 소독제의 아포 살균 효과는 inactivation factor (IF)로 표시하였고, IF는 초기 접종 아포수의 \log_{10} colony forming unit (CFU) 감소로 계산하였다. 소독제의 아포 살균 효과를 판정하는 기준은 부유액의 아포수가 $10^6/\text{mL}$ 일 때 소독제로 처리하여 IF가 4 이상인 것을 기준으로 하였다[6].

결 과

소독제의 노출 시간에 따른 IF는 Table 1과 같다. 70% ethyl alcohol, Cavicide, Rely+On Virkon 그리고 Surfanios는 노출 30분까지 아포에 대한 살균력을 나타내지 못하였다. 락스 1 : 100 희석액은 노출 5분, 1 : 50은 2분에, 그리고 1 : 20은 30초부터 살균력을 보였고, Cidex OPA는 30분에 IF가 4 이상으로 살균력을 나타냈다. 실험 전과 후, 그리고 중화제에 의한 아포수의 변화는 관찰되지 않았다.

고 찰

*C. difficile*이 병원에서 전파되는 주요 경로는 CDI 환자와 무증상 보균자이고 증상이 있는 환

Table 1. Inactivation factor of indicating disinfectants against *Clostridium difficile* spores

Exposure time	70% ethyl alcohol	Cavicide	Rely+On Virkon	Surfanios	Sodium hypochlorite			Cidex OPA
					1 : 100	1 : 50	1 : 20	
30 sec	0.10	0.22	0.14	0.28	0.31	1.91	>4.32	2.24
1 min	0.25	0.30	0.15	0.53	1.71	3.14	>4.32	2.56
2 min	0.39	0.62	0.09	0.55	3.84	4.32	>4.32	2.84
5 min	0.39	0.52	0.05	0.52	>4.32	>4.32	>4.32	2.73
15 min	0.61	0.48	0.21	0.27	>4.32	>4.32	>4.32	3.36
30 min	0.18	0.39	0.24	0.82	>4.32	>4.32	>4.32	>4.32

자에 의해 오염이 더 많이 되는 것으로 보고된다 [3,7]. 변기, 혈압계, 구강 혹은 직장용 체온계 등을 통해 *C. difficile*이 전파되는 것으로 알려져 있으며 전자식 온도계를 일회용으로 대체하여 CDI의 유행률이 의미 있게 감소하였다는 보고가 있다[2].

차아염소산 나트륨(sodium hypochlorite, NaClO)은 hypochlorous acid를 유리하여 세포 내 효소의 작용을 억제하고 단백질을 변성시켜 살균효과를 나타낸다. Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA)와 the Infectious Diseases Society of America (IDSA)의 지침[2]에 의하면 *C. difficile*의 전파를 막기 위한 환경소독으로 0.1% NaClO (1,000 ppm 유효 염소)를 권장한다. 시험에 사용한 상품화된 락스는 4% 이상의 유효염소를 함유하고 있고, 병원에서는 병원 환경과 미생물 검사실 소독에 1 : 100 희석액(유효 염소 400 ppm 이상)을 사용하고 있다. 이번 연구 결과에 의하면 락스 1 : 100 희석액은 노출 5분에 *C. difficile* 아포에 대한 살균력을 나타내므로 CDI 전파를 예방하기 위한 환경 소독에 적합하지 않다. 락스 1 : 50 희석액은 2분에, 그리고 1 : 20은 30초부터 살균력을 나타내므로 락스의 희석배수를 낮추어 최소한 1,000 ppm 이상의 농도를 사용하는 것이 필요하다. 또한 상품화된 락스는 회사에 따라 유효 염소 농도가 다를 수 있으므로 사용할 때 유효염소의 농도를 확인해야 한다.

Virkon (peroxygen 화합물), CaviCide (알콜과 사급 암모니움 화합물), Surfanios (사급 암모니움과 암포테릭 화합물), 70% 에탄올은 세균, 바이러스, 진균과 결핵균은 제거하지만 아포는 제거하지 못하는 중간수준의 소독제로 이번 연구에서도 노출 30분까지 *C. difficile* 아포에 대한 살균

력이 없었다. Oughton 등[8]의 보고에 의하면 *C. difficile*의 제거 효과는 온수와 비누를 이용한 손 씻기가 가장 좋았고, 알코올 손 소독제는 전혀 효과가 없다고 하였다. McFarland 등[3]은 4% chlorhexidine 항균제를 사용한 손 씻기가 비누보다 효과가 있다고 하였지만 Bettin 등[9]은 차이가 없고, Oughton 등[8]은 비누가 더 효과가 있다고 하여 보고자에 따라 다른 결과를 나타냈다.

의료기관 사용 기구 및 물품 소독 지침(보건복지부 고시 제 2010-61호, 2010. 8. 13. 제정)에 의하면 준위험기구, 즉 점막이나 손상이 있는 피부에 접촉하는 기구로 호흡치료기구, 마취기구, 내시경 등은 세균의 아포를 제외한 모든 형태의 미생물을 파괴시키는 ‘높은 수준’의 소독을 하도록 요구한다. Cidex OPA (0.55% ortho-phthalaldehyde)는 높은 수준 소독제로 의료 기기 소독에 흔히 사용되며 소독시간은 5분이다. 그러나 소독 시간은 나라에 따라 미국 12분, 캐나다 10분, 유럽, 아시아, 라틴 아메리카 지역은 5분으로 다르다[10]. 이번 시험 결과에 의하면 Cidex OPA에 5분간 노출하면 *C. difficile* 아포의 99% 이상이 제거되지만 완전히 살균되는 것은 아니어서 병원 감염의 원인이 될 수 있다. Cidex OPA는 소독 30분에 IF가 4 이상($\geq 10^4$ log CFU 감소)으로 살균력을 나타내었으므로, 일반적인 내시경의 경우는 5분간 소독하면 충분하나 CDI 환자에 사용한 내시경은 아포를 제거하기 위하여 30분 이상 소독하는 것이 바람직하다. American College of Gastroenterology의 권장사항[11]에 의하면 CDI를 진단하기 위해서 내시경을 사용하는 것은 특별한 경우, 예를 들면 즉각적인 진단이 필요하거나 대변을 받을 수 없을 때로 제한하고 있다.

결론적으로 CDI의 유행이 의심되거나 발병이

증가하여 환경 소독이 필요할 때에는 병원 환경 소독에 락스 1 : 100 희석액에 5분 이상 노출하거나, 희석 배수를 낮추어 최소한 1,000 ppm 이상의 농도를 사용하는 것이 필요하다. 알코올계 손 소독제의 사용은 *C. difficile* 아포의 살균에 전혀 효과가 없으므로 비누를 사용한 손 씻기를 병행해야 한다. Cidex OPA를 사용하여 내시경을 소독할 때는 *C. difficile* 아포의 살균을 위해 30분 이상 소독해야 하므로 CDI 진단을 위해서는 제한적으로 사용하는 것이 권장된다.

요 약

배경: *Clostridium difficile* 감염(CDI)은 병원 획득 설사의 가장 흔한 원인이다. 이 연구에서는 몇 가지 소독제를 대상으로 *C. difficile* 아포에 대한 살균력을 시험하였다.

방법: 독소를 생성하는 *C. difficile*을 대상으로 시험하였다. Cavicide (Metrex research Corporation, USA), Cidex OPA (Advanced Sterilization Products, USA), 1% Rely+On Virkon (Dupont, UK), 0.25% Surfanios (Laboratoires Anios, France) 등의 상품화된 소독제와 락스(유한-크로락스, 대한민국) 1 : 100, 1 : 50 그리고 1 : 20 희석액, 70% 알코올(덕산, 대한민국)에 대해 희석-중화 방법을 이용하여 아포 살균력을 시험하였다. 소독제의 아포 살균 효과는 inactivation factor (IF)로 표시하였고, IF는 초기 접종 아포수의 log₁₀ CFU 감소로 계산하였다. 소독제의 아포 살균 효과를 판정하는 기준은 IF가 4 이상으로 하였다.

결과: 70% ethyl alcohol, Cavicide, Rely+On Virkon 그리고 Surfanios는 노출 30분까지 아포에 대한 살균력을 나타내지 못하였다. 락스 1 : 100 희석액(유효염소 400 ppm 이상)은 노출 5분, 1 : 50은 2분, 그리고 1 : 20은 3초부터 살균력을 보였고, Cidex OPA는 30분에 살균력을 나타냈다.

결론: CDI의 전파를 막기 위한 병원 환경 소독시 락스는 희석 배수를 낮추어 최소한 1,000 ppm 이상의 농도를 사용하여야 하고, CDI 진단을 위한 목적으로 사용한 내시경은 Cidex OPA에 30분 이상 소독해야 한다.

참 고 문 헌

1. Bartlett JG. *Clostridium difficile*: history of its role as an enteric pathogen and the current state of knowledge about the organism. Clin Infect Dis 1994;18(Suppl 4):S265-72.
2. Cohen SH, Gerding DN, Johnson S, Kelly CP, Loo VG, McDonald LC, et al. 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 2010; 31:431-55.
3. McFarland LV, Mulligan ME, Kwok RY, Stamm WE. Nosocomial acquisition of *Clostridium difficile* infection. N Engl J Med 1989;320:204-10.
4. Clabots CR, Gerding SJ, Olson MM, Peterson LR, Gerding DN. Detection of asymptomatic *Clostridium difficile* carriage by an alcohol shock procedure. J Clin Microbiol 1989;27: 2386-7.
5. Gordin FM, Schultz ME, Huber RA, Gill JA. Reduction in nosocomial transmission of drug-resistant bacteria after introduction of an alcohol-based handrub. Infect Control Hosp Epidemiol 2005;26:650-3.
6. Wullt M, Odenholt I, Walder M. Activity of three disinfectants and acidified nitrite against *Clostridium difficile* spores. Infect Control Hosp Epidemiol 2003;24:765-8.
7. Riggs MM, Sethi AK, Zabarsky TF, Eckstein EC, Jump RL, Donskey CJ. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridium difficile* strains among longterm care facility residents. Clin Infect Dis. 2007;45:992-8.
8. Oughton MT, Loo VG, Dendukuri N, Fenn S, Libman MD. Hand hygiene with soap and water is superior to alcohol rub and antiseptic wipes for removal of *Clostridium difficile*.

- Infect Control Hosp Epidemiol 2009;30:939-44.
9. Bettin K, Clabots C, Mathie P, Willard K, Gerding DN. Effectiveness of liquid soap vs. chlorhexidine gluconate for the removal of *Clostridium difficile* from bare hands and gloved hands. Infect Control Hosp Epidemiol 1994;15: 697-702.
 10. Widmer AF and Frei R. Decontamination, disinfection, and sterilization. In: Murray PR, ed. Manual of clinical microbiology. 9th ed, NW, Washington DC; American society for microbiology press, 2007:65-96.
 11. Fekety R. Guidelines for the diagnosis and management of *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis. Am J Gastroenterol 1997; 92:739-50