

임상 검체에서 분리된 *Bacillus cereus* 의 성장, 장독소 생성 및 항균제 감수성

원광보건대학 임상병리과¹, 순천대학교 대학원 생물학과², 전주대학교 대학원 생물학과³

김신무¹ · 김은철² · 소향아³ · 이규식³

Bacillus cereus Clinical Isolates : Characteristics, Enterotoxin Production and Antimicrobial Susceptibility

Shin-Moo Kim¹, Eun-Cheol Kim², Hyang-Ah So³, and Gyu-Sik Lee³

Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health College, Iksan 570-750, Korea¹

Department of Biology, Graduate School, Sunchon University, Sunchon 540-742, Korea²

Department of Biology, Graduate School, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea³

Biochemical characteristics, enterotoxin production and antimicrobial susceptibility were determined for 30 strains of *Bacillus cereus* isolated from stool specimens of diarrhea patients at an university hospital in Chulabuk-do province. Positive rate for VP reaction and citrate utilization were lower, (33 % and 40 % respectively) while the rates of acid production from mannitol, arabinose, and xylose were higher (17 %, 13 % and 3 % respectively) than those obtained by other investigators. The enterotoxin gene was detected in 18 of 30 isolates (60 %) by PCR, and the toxin was detected from all of the toxin gene-positive isolates by RPLA test. The agar dilution test showed that all isolates were resistant to penicillin G and 73 % were to cephalothin, but all were susceptible to ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, fusidic acid, gentamicin, rifampin, tetracycline and vancomycin. We conclude that *B. cereus* isolates producing acid from mannitol, arabinose and xylose exist, that PCR can be used to detect enterotoxin genes rapidly and accurately, and that this organism is susceptible to various antimicrobial agents though not penicillin G and cephalothin.

Key Words : *Bacillus cereus*, Enterotoxin, Antimicrobial susceptibility

I. 서 론

*Bacillus cereus*는 그람양성 간균으로 토양, 물, 먼지 또는 동물과 식물 표면 등 자연계에 널리 분포하고 있고,

식품을 오염시켜서 식중독 (Lund, 1990)뿐만 아니라 패혈증, 심내막염, 수막염 및 안염 등을 일으키는 기회감염 세균이다 (Drobniewski, 1993). *B. cereus*에 의한 식중독은 1950년 Hauge (1955)가 처음 보고하였으며, 잠복기는 10~13시간으로, 복통, 물과 같은 설사가 주 증상이었다. Hauge 자신도 환자에서 분리한 이 세균을 (균수 9.2×10^7 /ml)을 먹고 13시간 후에 심한 복통과 설사를 일으켰다고 하였다. 그 이후 여러 나라에서 설사와 복통이 주 증

교신저자: 김신무, (우)570-750 전북 익산시 신용동 344-2,
원광보건대학 임상병리과
Tel : 063-840-1211
E-mail : smkim@wkhc.ac.kr

상인 이 세균에 의한 설사형 식중독이 많이 보고되었다. 이러한 식중독의 원인 식품으로는 육류, 야채, 주스 등이 알려지고 있다.

한편 1971년 영국에서 설사와 복통이 거의 없고, 잠복기가 1-5시간으로 짧으며, 오심, 구토를 주 증상으로 하는 구토형 식중독환자가 보고되었고 (Public, 1972), 그 후 여러 나라에서 발생되었다. 구토형 식중독의 원인 식품은 거의 볶은 쌀 요리 (fried rice) 등이다. 이와 같이 *B. cereus*에 의한 식중독은 구토형 (emetic type)과 설사형 (diarrheal type) 2가지가 있다 (Kramer와 Gilbert, 1989). 여러 양념이나 우유제품 및 육류 중의 약 50 %가 *B. cereus*에 오염될 수 있으나 버섯과 같은 식품은 이 세균에 오염이 안 되는 것으로 알려졌다 (te Giffel 등, 1996; van Netten 등, 1990; Wong 등, 1988). *B. cereus* 균주의 약 반 정도는 설사형 장독소 (diarrheal enterotoxin)가 생성되며, 이 세균은 4-37 °C에서 증식할 수 있다. 저온균인 *B. cereus*는 장독소를 생성할 수 있고 (Christiansson 등, 1989; Griffiths, 1990; Granum 등, 1993), 또한 호기성과 혐기성 어느 환경에서도 생성된다 (Granum 등, 1993). 더구나 이 세균의 아포는 지방이 많이 들어있는 식품 중 에서 열처리 후에도 살아남을 수 있고 (Kramer와 Gilbert, 1989), 우유나 다른 식품을 부패시킬 수 있다 (Overcast와 Atmaram 등, 1974; Christiansson, 1993).

*B. cereus*를 검출하기 위한 몇 가지 선택배양법 (selective plating method)이 알려지고 있는데 (Mossel 등, 1967; Kim과 Goepfert, 1971; Holbrook와 Andersson, 1980; Szabo 등, 1984; Meira de Vasconcellose 등, 1995), 그 선택성은 polymyxin B에 대한 내성과 lecithinase 반응을 이용한 것이다 (Holbrook와 Andersson, 1980). *B. cereus*의 대표적인 선택배지로서는 Mossel 등 (1967)이 개발한 mannitol-egg polymyxin (MYP) 한천배지가 있으며 이외에도 여러 가지가 있다. 이러한 방법으로 확인 동정까지는 4일 정도로 긴 시간이 소요된다. 또한 *B. cereus*의 동정을 위해서는 API 50 CHB 키트를 이용할 수 있다 (Gilbert, 1989; te Giffel 등, 1996). 그러나 이러한 상품화된 키트로도 동정이 안 되는 경우는 전통적인 생화학적 방법으로 확인할 필요가 있다. 그러나 우리나라에서 분리된 *B. cereus*의 생화학적 성상이나 항균제 감수성이 보고된 바 없다.

식중독 환자에서 *B. cereus*가 검출되면 이 균주는 독소를 생성함을 시사한다. *B. cereus* 장독소에 대한 생화학적 성상은 아직 확실히 규명되지 않았고, 또한 장독소의

분자생물학적인 수준에서도 잘 확립되지 않았으며 (Granum 등, 1993), 장분비액, Na⁺ 및 Cl⁻ 이온의 흡수가 반대이고, 포도당과 아미노산 역시 흡수가 안되어 신경증과 점막손상을 일으킬 수 있다 (Kramer와 Gilbert, 1989). 장독소는 토끼의 ileal loop에서 분비액을 축적시키고, 배양세포에 세포독성을 나타내며, 쥐에게 혈관 내 주사할 때 치명적이다 (Thompson 등, 1984; Beecher와 MacMillan, 1990). 또한 장내에서 생성된 장독소는 pH와 장의 단백질 분해 효소에 의해서 소화 후 파괴된다. 그러므로 설사형 식중독은 장내에서 발육하는 세균 때문인 것으로 제안되고 있다. 소화장애에서도 살아있는 이 세균의 아포는 장내에서 독소를 생성한다 (Lund, 1990; Shinagawa 등, 1991; Drobniowski, 1993; Granum 등, 1993). 용혈소 BL (*hbla*)이 나타나는 것은 *B. cereus* 장독소 생성의 지표가 되고 있다 (Heinrichs 등, 1993). Beecher와 MacMillan (1990)에 의하면 용혈소 BL은 B성분과 결합하여 세포를 변형시키며, L성분과 함께 세포를 용해시킨다고 하였다. 또한 *bceT* 유전자 역시 장독소 출현의 지표가 되고 있다. 세균 균주나 식품에서 *hbla*와 *bceT* 유전자의 검출법은 동물시험이나 면역학적 시험의 2가지가 제안되었다. 장독소 생성 *B. cereus* 균주의 검출을 위해서는 상품화된 면역학적 검출 키트가 개발되었다. 흔히 사용되는 2가지 면역법은 서로 다른 항원을 검출하는 것이다 (Christiansson, 1993; Buchanan과 Schultz, 1994; Day 등, 1994). *Bacillus* 설사형 장독소의 면역법 (BDE kit; Tecra, Japan)은 비독소 단백질인 (Beecher와 Wong, 1994) 40과 41 kDa을 검출하는 것이고, 다른 한 가지는 *B. cereus* 장독소 시험 (설사형) 키트 (RPLA kit; Oxoid, UK)로 용혈소 BL복합체 중 L성분과 특이적으로 반응하는 것이다. 또 다른 한 가지는 *B. cereus*를 검출하기 위해서 특이적인 DNA를 증폭시키는 것이다.

*B. cereus*는 penicillin과 cephalosporin에 내성이며, vancomycin, ciprofloxacin 및 gentamicin에 감수성으로 알려져 있다. 그러나 우리나라 장염환자에서 분리되는 *B. cereus* 균주에 대한 항균제 감수성 성상에 대한 보고는 드물다.

본 연구에서는 환자 검체에서 분리된 *B. cereus* 균주에 대해서 생화학적 성상과 용혈소 *hbla* 유전자를 이용하여 신속하고 정확하게 장독소 생성 *B. cereus*를 검출할 수 있는지와 이 세균의 항균제 감수성을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용 균주 및 동정 시험

2003년 9월부터 2004년 6월까지 전북지역 대학병원 설사환자의 변을 MacConkey agar, mannitol-egg yolk- polymyxin (MYP) agar에 면봉으로 1구역만 접종 후 2구역부터는 loop로 희석하여 접종하고 공기 항온기 환경에 넣어 37 °C로 하룻밤 배양하였다. 분리된 세균의 생화학적 동정을 위해서는 혈액천배지에서 용혈성, Mueller-Hinton agar (Difco, Mich., USA)에서 혐기성 증식과 50 °C에서 증식 여부, 3% H₂O₂로 catalase 시험, motility-indole-ornithine 배지 (MIO, Difco, Mich., USA)에서의 운동성과 indole생성, MR-VP medium (Difco, Mich., USA)에서 Voges-Proskauer (VP) 시험, penicillin 10 unit 디스크로 penicillin 감수성, egg yolk 배지에서 lecithinase, Simmon's citrate medium (Difco, Mich., USA)에서 citrate 이용능, phenol red dextrose broth (Durham 관 포함, Difco, Mich., USA)에서 가스생성, cystine tryptic agar (Difco, Mich., USA)를 기초배지로 사용한 탄수화물 (glucose, arabinose, mannitol, xylose)에서의 산생성 시험의 전통적 방법과 API 50CH (Biomérieux, Lyon, France) 키트로 시험하였다. 분리된 균주는 15% glycerol-brain heart infusion 배지에 넣어 -70 °C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

2. 장독소 생성 *B. cereus*의 동정

장독소 생성 *B. cereus*의 동정은 hemolysin BL (hblA) 유전자를 이용하여 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)과 면역학적 장독소 검출법인 reversed passive latex agglutination (RPLA kit, Oxoid)법으로 시험하였다. hblA 유전자 동정을 위해 이들의 유전자 부위만을 특이하게 증폭시킬 수 있는 primer (Mantynen과 Lindstrom, 1998)를 사용하였으며, 이 primer는 제노텍 회

사 (Genotek Co, Daejeon, Korea)에 의뢰하여 합성하였다 (Table 1).

시험세균을 Mueller-Hinton agar (Difco)에 접종하여 37 °C에서 하룻밤 배양한 집락을 증류수 50 µL에 부유시키고 98 °C에서 20분간 가열하여 DNA를 추출하였다. DNA 추출액 2 µL, 혼합 primer 2 µL, PCR 혼합액 (deoxy-nucleotide triphosphate, dNTP; Taq polymerase, 10 x buffer) 4 µL, 8-methoxypsoralene (MOP) 12 µL 즉, 총 20 µL를 혼합하여 반응 혼합액 (premix)를 만들었다. 이를 GeneAmp PCR system 9600 (Perkin-Elmer Cetus Corp., Norwalk, CT, USA)으로 HblA1 primer 쌍을 사용한 반응은 94 °C에서 5분간 predenaturation, 94 °C로 45초간 denaturation, 65 °C로 45초간 annealing, 72 °C에서 45초간 extension, 72 °C로 5분간 마지막 extension하는 30 cycle의 PCR을 시행하였다. 한편 HblA2 primer쌍을 사용한 반응은 94 °C에서 5분간 predenaturation, 94 °C로 45초간 denaturation, 65 °C로 30초간 annealing, 72 °C에서 60초간 extension, 72 °C로 5분간 마지막 extension하는 30 cycle의 PCR을 시행하였다.

PCR에 의한 증폭산물 5 µL를 2% agarose gel (Promega, Madison, WI, USA)의 홈에 넣고 20분간 전기영동하여 band가 있는지를 확인하였다.

RPLA법은 먼저 *B. cereus* 균주를 brain heart infusion broth에 접종 후 32 °C에서 6-18시간 배양하여 증균 배양한 후 여과하여 독소를 추출하였다. 키트에 들어있는 각각의 시약을 세게 흔든 후 V형 microwell plate를 준비하였다. 8개의 well을 한 줄로 하며, 각 검체는 8 well 2줄이 필요하다. 2줄의 각 well에 25 µL의 희석액을 첨가하는데 첫 번째 well에는 첨가하지 않았다. 각 줄의 첫 번째와 두 번째 well에 25 µL의 검체를 첨가하였다. 두 번째 well에서 25 µL를 취하고 각각의 줄에 두 배수 희석을 하였다. 7번째 well까지만 희석하고, 8번째 well은 희석액만 첨가하였다. 첫 번째 줄의 각 well에 sensitized latex 25 µL를 첨가하고, 두 번째 줄의 각 well에 control latex 25 µL를 첨가하였다. 각 well의 내용물이 잘 섞이도록 plate를 손

Table 1. The oligonucleotide sequence of primer used in this study

Gene	Primer	Oligonucleotide sequence	Products size (bp)
<i>hblA</i>	HblA1-F	5'-CGG GCG TTC TAG GGC ATA TTG AG-3'	586
	HblA1-R	5'-GCG AGT AGT TTA TTA GGG ATT TTT TTC A-3'	
	HblA2-F	5'-GCT AAT GTA GTT TCA CCT GRA GCA AC-3'	
	HblA2-R	5'-AAT CAT GCC ACT GCG TGG ACA TAT AA-3'	

이나 micromixer로 흔들었다. Plate를 덮고, 상온에서 20-24시간 배양하여 검은 배경판에서 각 well을 관찰하였다.

3. 항균제 감수성 시험

최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 항균제 감수성 시험은 NCCLS 한천희석법으로 하였다 (NCCLS, 2002). 한천희석법에는 cephalothin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, penicillin G, rifampin, tetracycline, vancomycin (이상 Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA), ciprofloxacin (Miles Pharmaceuticals West Haven, Conn., USA) 및 fusidic acid (동화약품, Anyang, Korea)를 사용하였다. 항균제를 규정된 용제로 녹이고 Mueller-Hinton 한천배지에 0.25-128 µg/ml 농도로 만들었다. 시험세균은 tryptic soy broth (TSB, Difco, Mich., USA)에 접종하여 35 °C, 2시간 배양 후 densitometer로 McFarland 0.5관 탁도에 맞추고 이어서 식염수로 1:10이 되도록 희석하였다. 시험세균을 steers replicator를 써서 접종하였으며, 35 °C 공기환경에서 18시간 배양 후에 관찰하고, 세균의 증식을 완전히 억제시킨 최소의 항균제 농도를 MIC로 판정하였다. 감수성 시험의 정도관리를 하기 위하여 *E. coli* ATCC 25922와 *Staphylococcus aureus* ATCC 33591을 동시에 대조 균주 시험을 하였다.

III. 결 과

1. 설사 환자에서 분리된 *B. cereus*의 생화학적 특성

설사 변에서 분리된 *B. cereus*의 1일 배양 후 생화학적

Table 2. Characteristics of *B. cereus* isolates from diarrheal patients

Test	<i>B. cereus</i> *	% of positive isolates
Growth at anaerobic	100	100
Growth at 5 % CO ₂	100	100
Growth at 50 °C	100	100
Catalase	100	100
Motility	97.9	100
Hemolysis	100	100
Penicillin susceptibility	0	0
Lecithinase	100	100
Indole	0	0
Voges-Proskauer	98.6	33
Citrate utilization	93.1	40
Gas from glucose	0	0
Acid from glucose	100	100
arabinose	0	13
mannitol	0	17
xylose	0	3

* From Gordon et al (1981).

성상의 결과는 Table 2와 같다. 1일 배양 후에 모든 균주가 양성을 보인 시험은 혐기성과 CO₂환경 및 50 °C에서 증식, 운동성, 용혈, lecithinase, glucose에서 산 생성시험이었고, 모든 균주가 음성을 보인 시험은 penicillin 감수성 및 가스 생성이었으며, arabinose와 mannitol에서 산생성은 각각 13 %, 17 %의 균주에서 양성하였고, VP와 citrate 이용능은 각각 33 %와 40 %가 양성이었다.

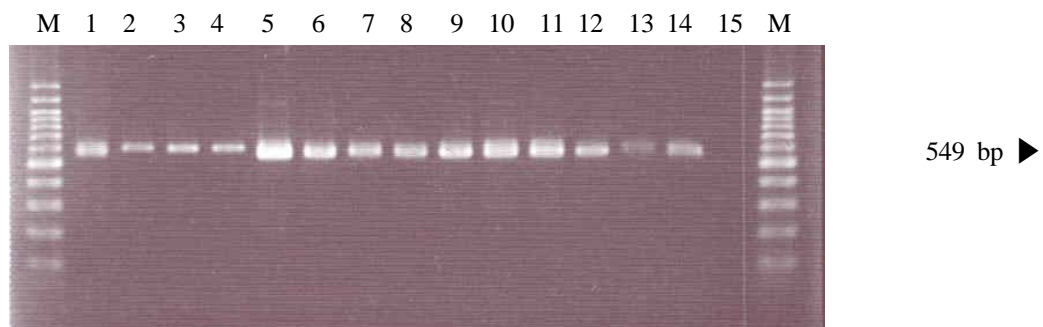


Fig. 1. PCR amplification of the *Bacillus cereus* *hblA* gene segments. Lane 1-13: strains isolated from patients, lane 14: enterotoxin-positive control, lane 15: enterotoxin-negative control, M: molecular size marker.

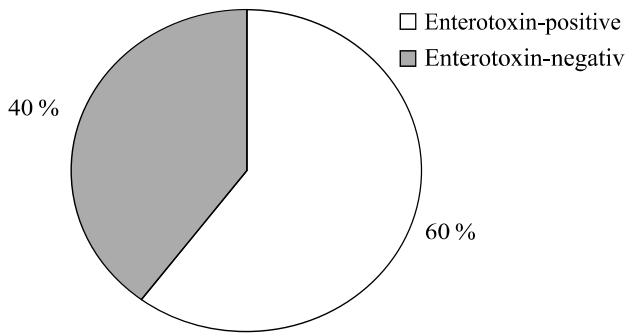


Fig. 2. Proportion of isolates with enterotoxin gene-positive *B. cereus* strains detected by PCR.

2. 장독소 생성 *B. cereus*의 동정을 위한 PCR법과 RPLA법의 비교

PCR법으로 장독소 생성 *B. cereus*의 동정을 위해서 hemolysin BL (*hbla*) 유전자를 검출한 바 *B. cereus* 30균주 중 18균주 (60%)가 양성이었다고, 12균주 (40%)는 음성이었다고, RPLA법에 의한 장독소 동정시험에서도 동일한 결과를 보였다 (Fig. 1-2, Table 3).

3. *B. cereus*의 항균제 감수성

NCCLS 한천 희석법에 의해서 항균제 감수성 시험의 결과는 Table 4와 같으며, breakpoint를 적용하여 해석한 바 ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, fusidic acid, gentamicin rifampin, tetracycline 및 vancomycin에는 모든 균주가 감수성이었고, 이들 항균제의 MIC50와 MIC90는 fusidic acid를 제외하고 모두 1 $\mu\text{g/ml}$ 이하였다. 한편 cephalothin의 MIC범위는 8-32 $\mu\text{g/ml}$ 로 내성률은 73%이며, penicillin G의 MIC 범위는 8 - 128 $\mu\text{g/ml}$ 로 모든 균주가 내성을 보였다 (Table 3).

IV. 고 찰

*B. cereus*는 그람양성인 큰 간균으로 편모를 가지고 있고, 아포는 중앙이나 편재되어 있는 통성혐기성균으로 증식온도는 10-48 $^{\circ}\text{C}$ (지적온도 28-35 $^{\circ}\text{C}$)이며, 증식 가능한 pH는 4.9-9.3이고, penicillin에 내성이 있으며, 가장 흔한 감염은 식중독이나 전신성 감염을 비롯하여 드물게 창상, 화상, 혈액투석, 수혈, 척수 마취할 때 및 면역이 약한 사

Table 3. Comparison of the PCR and RPLA methods for detecting enterotoxin-producing *B. cereus*

Strain	Enterotoxin or the gene detection by:	
	PCR	RPLA
<i>B. cereus</i> ATCC 11778	-	-
<i>B. cereus</i> W1	+	+
<i>B. cereus</i> W2	+	+
<i>B. cereus</i> W3	+	+
<i>B. cereus</i> W4	+	+
<i>B. cereus</i> W5	+	+
<i>B. cereus</i> W6	+	+
<i>B. cereus</i> W7	+	+
<i>B. cereus</i> W8	+	+
<i>B. cereus</i> W9	+	+
<i>B. cereus</i> W10	+	+
<i>B. cereus</i> W11	+	+
<i>B. cereus</i> W12	+	+
<i>B. cereus</i> W13	+	+
<i>B. cereus</i> J14	+	+
<i>B. cereus</i> J15	+	+
<i>B. cereus</i> W16	-	-
<i>B. cereus</i> W17	-	-
<i>B. cereus</i> W18	-	-
<i>B. cereus</i> J19	+	+
<i>B. cereus</i> J20	+	+
<i>B. cereus</i> W21	+	+
<i>B. cereus</i> J22	-	-
<i>B. cereus</i> W23	-	-
<i>B. cereus</i> W24	-	-
<i>B. cereus</i> W25	-	-
<i>B. cereus</i> W26	-	-
<i>B. cereus</i> W27	-	-
<i>B. cereus</i> W28	-	-
<i>B. cereus</i> W29	-	-
<i>B. cereus</i> W30	-	-

람에게 감염을 일으킬 수도 있다 (Lund, 1990; Drobniewski, 1993). *B. cereus*는 많은 단백분해효소를 생성하여, 사람과 동물에게 독성을 보이기 때문에 이 세균의 생화학적 동정 시험을 비롯한 독소생성 등의 진단적 시험은 매우 중요하다. 본 연구에서 생화학적 성상은 Gilbert 등 (1981)과의 결과와는 일반적으로 비슷하였으나 VP시험과 citrate 이용능 시험은 Gilbert 등 (1981)이 각각 98.6%

Table 4. *In vitro* activities of ten antimicrobial agents against *Bacillus cereus* strains isolated from patients

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			% resistant
	Range	50 %	90 %	
Cephalothin	8-32	32	32	73
Ciprofloxacin	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	0
Clindamycin	≤ 0.25 -1	1	1	0
Erythromycin	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	0
Fusidic acid	1-4	4	4	0
Gentamicin	≤ 0.25 -2	0.5	1	0
Penicillin G	8- ≥ 128	64	128	100
Rifampin	≤ 0.25 -0.5	≤ 0.25	≤ 0.25	0
Tetracycline	≤ 0.25 -2	1	1	0
Vancomycin	≤ 0.25 -1	0.5	1	0

와 93.1 % 의 양성률을 보고한 반면, 저자들의 경우는 각각 33 %와 40 %로 매우 낮았다. 한편, arabinose, mannitol 및 xylose 발효시 산 생성 결과에서는 Gilbert 등 (1981)은 모두 음성으로 보고하였으나 본 연구에서는 각각 13 %, 17 % 및 3 %가 양성을 보여 설사환자에서 분리되는 균주 중에는 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

*B. cereus*가 생성하는 균체의 독소로써는 장독소 (설사형 독소, 이열성), 용혈독소 I (cereolysin I, 이열성 용혈소), 용혈독소 II (내열성 용혈소), 장독소 (구토형 독소, 내열성), phospholipase C (lecithinase), 괴사독소 (necrotic toxin), 장관괴사독소 등이 알려졌다 (Turnbull, 1981; Drobniewski, 1993).

*B. cereus*는 자연계에 널리 분포되어있고 각종 식품에서 흔히 검출될 뿐만 아니라 환자검체 중 구토물이나 변에서도 분리되기 때문에 식중독의 원인균으로 동정하기란 쉽지 않다. 식중독의 원인균을 검출하려면 환자검체에서 분리율이 높아야 하며, 또한 추정식품에서 *B. cereus*균이 $10^6/\text{g}$ 이상 검출되는 것이 필수조건이다. 환자 발병 초기에는 구토물이나 설사변에서 10^4 - $10^6/\text{g}$ 이상의 균이 검출되는 경우가 많다. 그러나 구토물 중의 세균은 위산의 작용으로 사멸되기 때문에 검출이 안되는 경우도 있다. 각 검체에서 분리되는 *B. cereus* 균이 동일한 H형형이나, 생화학적 성상을 보이는 것도 중요하나 확인 동정하는 시간이 많이 소요되기 때문에 독소유전자를 이용한 장독소 생성 *B. cereus*의 검출을 위한 신속하고 검출하기

쉬운 방법이 필요하다. 본 연구에서는 용혈소 hblA DNA를 증폭하는 PCR과 면역학적 방법인 RPLA법을 사용하여 *B. cereus* 30균주를 시험하여 60 %의 양성률을 보였으나, Mantynen과 Lindstrom (1998)이 보고한 PCR과 RPLA 키트법에 의한 장독소 생성 *B. cereus*의 양성률은 45 %로, 저자들의 결과가 다소 높았다. 장독소 생성은 *B. cereus* 균주 뿐만 아니라, *B. mycoides*, *B. pasteurii*, *B. smithii*, *B. thuringensis* 및 다른 *Bacillus* 균종에서도 분리되고 있다 (Mantynen와 Lindstrom, 1998). 이러한 균종에서도 설사를 유발하는 장독소가 검출되는지를 앞으로 시도해야 하겠다. 장독소를 검출하기 위한 신속하고 쉬운 방법은 식품의 안전성을 보증하기 위해서 매우 중요하다. hblA sequence로 장독소 생성균주를 검출하는 PCR법은 신속하고 감도가 높은 방법이다. 그러나 RPLA법은 장독소생성 *B. cereus*를 검출하는 데 PCR법과 큰 차이가 없고, 간단하고 예민도가 높은 면역학적 방법이나, 실험하는 데 2일간이 필요하여 PCR법보다 많은 시간을 소요하는 단점이 있다.

*B. cereus*에 대한 항균제 감수성 시험에서 Andrews와 Wise (2002)는 시험한 5균주가 ciprofloxacin에 감수성, penicillin에 내성, tetracycline에는 2균주는 감수성, 1균주는 내성, 2균주는 방법에 따라 차이가 있다고 하였으며, Turnbull 등 (2004)은 *B. cereus* 67균주에서 penicillin, ampicillin, cephalosporin 및 trimethoprim에 1균주 (1.5 %)가 내성을, clindamycin, ciprofloxacin, erythromycin, chloramphenicol, tetracycline, vancomycin 및 aminoglycoside에 모두 감수성을 보고하였다. 한편 Kemmerly와 Pankey (1993)은 *B. cereus*에 의한 창상 감염 치료에 ciprofloxacin을 성공적으로 사용하였다고 보고하였다. 본 연구에서 *B. cereus* 30균주 중 penicillin과 cephalothin에는 각각 100 %, 73 %가 내성을 보였으나, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, fusidic acid, gentamicin, rifampin, tetracycline 및 vancomycin에는 감수성을 보여 외국의 다른 보고와는 큰 차이는 없었다.

V. 결 론

전북 지역 대학병원 설사환자에서 분리된 *B. cereus* 30균주에 대한 생화학적 성상, 장독소생성 및 항균제 감수성에 관한 연구에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생화학적 성상은 VP반응과 citrate 이용능이 33 %,

40 %로 양성율이 낮았고, mannitol, arabinose 및 xylose는 전형적인 균주는 모두 음성이었으나, 본 연구에서는 각각 17 %, 13 % 및 3 %가 양성을 보였다.

2. PCR법에 의한 장독소 유전자 검출 시험에서 *B. cereus* 30균주 중 18균주 (60 %)가 양성을 보였고, RPLA 법에 의한 장독소 검출시험도 동일한 결과를 보였다.

3. 항균제 감수성 시험에서 penicillin G와 cephalothin 은 각각 100 %, 73 %의 균주가 내성을 보였으나, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, fusidic acid, gentamicin, rifampin, teracycline 및 vancomycin에는 모든 균주가 감수성이었다.

이상의 결과를 분석해보면 설사환자에서 분리되는 *B. cereus* 균주 중에는 mannitol, arabinose 및 xylose 발효 시 산을 생성하는 균주도 분리될 수 있었으며, PCR법으로 신속하고 정확하게 장독소 생성주를 감별할 수 있으며, penicillin G와 cephalothin 이외의 항균제에 내성인 균주는 드물다는 결론을 얻었다.

참 고 문 헌

- Andrews JM, Wise R. Susceptibility testing of *Bacillus* species. *J Antimicrob Chemother* 49:1040-1042, 2002
- Beecher DJ, MacMillan JD. A novel biocomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 58:2220-2227, 1990
- Beecher DJ, Wong ACL. Identification and analysis of the antigens detected by two commercial *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin immunoassay kits. *Appl Environ Microbiol* 60:4614-4616, 1994
- Buchanan RL, Schultz FJ. Comparison of the Tecra VIA kit, Oxoid BCET-RPLA kit and CHO cell culture assay for the detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *Lett Appl Microbiol* 19:353-356, 1994
- Christiansson A. Enterotoxin production in milk by *Bacillus cereus* a comparison of methods for toxin detection. *Neth Milk Dairy J* 47:79-87, 1993
- Christiansson A, Naidu AS, Nilsson I, Wadstrom T, Pettersson HE. Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 55:2295-2600, 1989
- Day TL, Tatini SR, Notermans S, Bennett RW. A comparison of ELISA and RPLA for detection of *Bacillus cereus* diarrhoeal enterotoxin. *J Appl Bacteriol* 77:9-13, 1994
- Drobniewski FA. *Bacillus cereus* and related species. *Clin Microbiol Rev* 6:324-338, 1993
- te Giffel MC, Beumer RR, Leijendekkers S, Rombouts FM. Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. *Food Microbiol* 13:53-58, 1996
- Gilbert RJ et al. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. Their part in food poisoning and other clinical infections. In Berkeley RCW, Goodfellow M (eds.). *The aerobic endospore-forming bacteria classification and identification*. p297, Academic Press London, 1981
- Granum PE, Brynstad S, Kramer JM. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int J Food Microbiol* 17:2669-2279, 1993
- Granum PE, Brynstad S, O'Sullivan K, Nissen H. Enterotoxin from *Bacillus cereus* : production and biochemical characterization. *Neth Milk Dairy J* 47:63-70, 1993
- Griffiths MW. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp present in milk. *J Food Prot* 53:790-792, 1990
- Hauge S. Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. *J Appl Bacteriol* 18:591, 1955
- Heinrichs JH, Beecher DJ, MacMillan JD, Zilinskas BA. Molecular cloning and characterization of the *hbla* gene encoding the B component of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 175:6760-6766, 1993
- Holbrook R, Andersson JM. An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Can J Microbiol* 26:753-759, 1980
- Kramer JM, Gilbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In Doyle MP (ed.). *Foodborne bacterial pathogens*. p796. Marcel Dekker Inc., New

- York, 1989
18. Kemmerly SA, Pankey GA. Oral ciprofloxacin therapy for *Bacillus cereus* wound infection and bacteremia. *Clin Infect Dis* 16:189, 1993
 19. Kim HU, Goepfert JM. Enumeration and identification of *Bacillus cereus* in foods. 24-hours presumptive test medium. *Appl Microbiol* 22:581-587, 1971
 20. Lund BM. Foodborne disease due to *Bacillus* and *Clostridium* species. *Lancet* 336:982-986, 1990
 21. Mantynen V, Lindstrom K. A rapid PCR-Based DNA test for Enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 64:1634-1639, 1998
 22. Meira de Vasconcellos FJ, Rabinovitch L. A new formula for an alternative culture medium without antibiotics, for isolation and presumptive quantification of *Bacillus cereus* in foods. *J Food Prot* 58:235-238, 1995
 23. Mossel DAA, Koopman MJ, Jongerius E. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl Microbiol* 15:650-653, 1967
 24. van Netten P, van de Moosdijk, van Hoensel P, Mosses DAA, Perales I. Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J Appl Bacteriol* 69:73-79, 1990
 25. Overcast WW, Atmaram K. The role of *Bacillus cereus* in sweet curdling of fluid milk. *J Milk Food Technol* 37:233-236, 1974
 26. Public Health Laboratory Service. Food poisoning associated with *Bacillus cereus*. *Brit Med J* 1 22:189-200, 1972
 27. Shinagawa K, Ichikawa K, Matsusaka N, Sugii S. Purification and some properties of a *Bacillus cereus* mouse lethal toxin. *J Vet Med Sci* 53:469-474, 1991
 28. Szabo RA, Todd ECD, Rayman MK. Twenty-four hour isolation and confirmation of *Bacillus cereus* in foods. *J Food Prot* 47:856-860, 1984
 29. Thompson NE, Ketterhagen MJ, Bergdoll MS, Schantz EJ. Isolation and some properties of an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Infect Immun* 43:53-58, 1984
 30. Turnbull PCB. *Bacillus cereus* toxin. *Pharmac Ther* 13:453, 1981
 31. Turnbull PCB, Sirianni NM, LeBron CI, Samaan MN, Sutton FN, Reyes AE, Peruski Jr LF. MICs of selected antibiotics for *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, and *Bacillus mycoides* from a range of clinical and environmental sources as determined by the Etest. *J Clin Microbiol* 42:3626-3634, 2004
 32. Wong HC, Chang MH, Fan JY. Incidence and characterization of *Bacillus cereus* isolates contaminating dairy products. *Appl Environ Microbiol* 54:699-702, 1988