

Salmonella othmarschen에 의한 집단식중독사례의 분자역학적 분석

방선재[†] · 박광희 · 박명기 · 권연옥 · 고환옥

경기도보건환경연구원북부지원
(2008. 3. 10. 접수/2008. 4. 20. 채택)

Molecular Epidemiological Analysis of Outbreaks to Pathogenic Salmonella othmarschen Using PFGE

Seon-Jae Bang[†] · Kwang-Hee Park · Ki-Myung Park · Yeon-Ok Kwon · Hoan-Uck Ko

North Branch Gyeonggido Institute of Health & Environment

(Received March 10, 2008/Accepted April 20, 2008)

ABSTRACT

The strains of *Salmonella othmarschen* and *Norovirus* isolated from outbreak A, the funeral ceremonies incidents in Guri-shi of Gyeonggido in, 2007, were subjected to genotyping by using PFGE and extraction of RNA by using RT-PCR. 24 *Salmonella othmarschen* were isolated from 37 cases (patients 12 cases, cooks 4 cases, foods 7cases, knife, kitchen board, dish towel 4 cases, etc) and PFGE patterns showed that 22 strains isolated from the same incident were almost of the same pattern and 2 strains exhibited 50% of the pattern. Antimicrobial susceptibility patterns were such that there were 22 case susceptibility patterns and 2 case resistance patterns (strain 4: AM,CF, CIP, NA, TE TIC and strain 13: CF,CZ). *Norovirus* G1 (1case), *Norovirus* G2 (7cases), *Norovirus* G1,G2 (1case) were detected by using RT-PCR. The fine typing ability and reliability of PFGE and BioNumerics are helpful for establishing out the foodborne pathogens of outbreaks.

Keywords: *Salmonella othmarschen*, *Norovirus*, PFGE, antimicrobial susceptibility RT-PCR

I. 서 론

최근 들어 학교를 비롯한 회사, 대형병원, 장례예식장 등에서 단체로 이루어지는 음식관리와 조리과정에서 병원체 오염이 되어 집단식중독이 발병하는 사례가 증가하고 있다. 2005년 CJ푸드사건 이후 노로바이러스 등이 감염원으로 발병하는 식중독 사례가 급격히 증가하는 추세이다. 이에 따라 분자생물학적인 기법을 이용하면 보다 합리적이고 과학적으로 원인과 결과를 파악할 수 있는 근거를 제공할 수 있다.¹⁾

세균검사의 경우는 PFGE를 이용한 역학분야에서는 병원성 세균간의 유연관계를 확인하여 원인적 연관성을 추적하는데 활용되고 있다. 이 방법은 전기장의 각도를

다양하게 지정함으로써 큰 size의 DNA를 분리할 수 있다. 세균의 chromosomal DNA를 제한효소로 절단하여 전기영동을 수행한 후 나타나는 band 양상을 비교해 봄으로써 분리균주의 유사성을 밝힐 수 있었다.^{2,4)}

본 연구는 2007년에 경기도 구리시 A 장례예식장에서 발생한 집단식중독에 대한 세균 및 바이러스를 검사한 결과, 국내에서 처음으로 환자 및 음식물에서 *Salmonella othmarschen*이란 분리균주를 획득하여 이를 근거로 PFGE를 수행하였다. 동시에 *Norovirus*에 중복 감염되어 있어 질병의 원인을 다각도로 추적해야 하는 연구과제를 가졌던 사례였다.⁵⁾

II. 재료 및 방법

1. 연구대상

2007년 경기도 구리시 A 장례예식장 대한 집단식중독 검사에서 분리한 *Salmonella othmarschen* 24주

[†]Corresponding author : North branch Gyeonggido Institute of Health & Environment
Tel: 82-31-852-7812, Fax: 82-31-852-7826
E-mail : bangsj68@yahoo.co.kr

Table 1. Antimicrobial disks used for the resistance rate test of the *Salmonella othmarschen*

Antimicrobial agent	Disk content	Zone Diameter		
		R	I	S
Ampicillin(AM)	10 ug	≤13	14-16	≥17
Amikacin(AN)	30 ug	14≤	15-16	≥17
Ampicillin/Sulbactam(SAM)	10/10 ug	11≤	12-14	≥15
Cephalothin(CF)	30 ug	14≤	15-17	≥18
Cefazolin(CZ)	30 ug	14≤	15-17	≥18
Cefepime(FEP)	30 ug	14≤	15-17	≥18
Cefotetan(CTT)	30 ug	12≤	13-15	≥16
Cefotaxime(CTX)	30 ug	14≤	15-22	≥23
Ciprofloxacin(CIP)	5 ug	15≤	16-20	≥21
Chloramphenicol(C)	30 ug	12≤	13-17	≥18
Gentamicin(GM)	10 ug	12≤	13-14	≥15
Imipenem(IPM)	10 ug	13≤	14-15	≥16
Nalidixic acid(NA)	30 ug	13≤	14-18	≥19
Tetracycline(TE)	30 ug	14≤	15-18	≥19
Ticarcillin(TIC)	10 ug	14≤	15-19	≥20
Trimthoprim/ Sulfamethoxazole(SXT)	1.25/ 23.75 ug	13≤	14-16	≥17

와 중복감염인 *Norovirus* 9건을 연구대상으로 사용하였다.

2. 항생제감수성 시험

분리균들의 항생제감수성을 파악하고자 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 disk 확산법으로 시험하였다.

사용된 항생제는 총 16종으로 Table 1과 같다.⁶⁾

3. PFGE 실험

집단식중독의 세균검사에서 분리동정된 *Salmonella othmarschen* 24건을 대상으로 크기 비교를 위한 표준균주는 *Salmonella braenderup* H9812를 사용하였다. 분리균주와 표준균주는 Nutrient agar 배지에 37°C 18시간 배양 후 실험하였다.

1) PFGE plug 준비

면봉을 이용하여 평판배지로부터 적당량의 균을 묻혀낸 다음, 2 ml의 Cell Suspension TE(100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 7.5, Bioneer)에 넣고 15%의 투명도로 현탁시켰다. 이렇게 만들어진 현탁액 200 µl와 Proteinase K(20 mg/ml) 10 µl를 1.5 ml 튜브에 넣고 50°C로 맞춘 1.2% Seakem gold agarose(Cambrex 50152) 200 µl를 넣고 잘 섞은 후 Plug mold(Bio-Rad, 1703706)에 넣고 4°C에서 5분간 굳혔다.

2) PFGE plug 세척

ES buffer(0.5M EDTA, 1% sodiumlauroyl-sarcosine, pH9.0, Bioneer) 1.5 ml에 Proteinase K(20 mg/ml) 40 µl를 섞은 후, 굳은 plug를 넣고 55°C 진탕 항온수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 plug를 PVC tube에 옮기고 미리 55°C로 데운 멸균증류수를 넣고 진탕항온수조에서 15분 동안 1회 세척을 하였다. 동일한 방법으로 plug wash TE buffer를 3회 더 세척한 후 새로운 plug wash TE buffer로 옮겨 다음 단계를 수행하였다.

3) 제한효소

슬라이드글라스 위에 plug를 올려 놓은 후 면도날을 이용하여 1 mm 두께로 plug를 자른 후 실험균주는 2개의 절편을 잘라내고, 표준균주는 6개의 절편을 잘랐다. 자른 절편을 XBa I(BioLabs, R0145L) 30 unit를 처리하여 1시간 30분간 반응하였다.

4) 시료배열 및 전기영동

제한효소처리가 끝난 plug 절편을 comb의 끝부위에 맞춰 배열하고 여과지로 주변의 물기를 제거한 다음 절편을 고정하기 위해 상온에서 5분간 건조시켰다. 건조가 끝난 후 comb을 gel 성형틀 안의 제자리에 위치시킨후 50°C의 1% Seakem gold agarose를 gel 성형틀에 붓고 상온에서 30분간 굳혔다. gel이 굳은 후 comb을 빼고 나서 생긴 빈 well에 agarose를 채우는데 사용하였다. 굳은 gel을 전기영동장치(Bio-Rad, CHEF-DRIII System)에 넣고 0.5XTBE buffer로 채운 후 6 V/cm, 2.16~63.8 sec, 전기영동시간은 18시간동안 수행하였다. 완충용액의 온도는 14°C를 맞추어 주었다.

5) gel 염색 및 결과 분석

전기영동이 완료되면 gel을 Etidium bromide 염색용액(0.5 µg/ml)에 넣어 30분간 염색한 후 염색이 끝나면 증류수를 이용하여 30분 이상씩 2회 탈색하였다. Gel Doc system(Bio-Rad)를 사용하여 band의 양상을 확인 후 TIFF형의 이미지 파일로 저장한 후 BioNumerics 4.0 program을 이용하여 분석을 하였다.

4. 노로바이러스 분석

집단식중독에서 노로바이러스 검사법은 국립보건연구원 설사바이러스 진단프로토콜 방법으로 RNA를 추출하였으며, RT-PCR법을 사용하여 검사하였다. 검사과정은 Fig. 1과 같다.

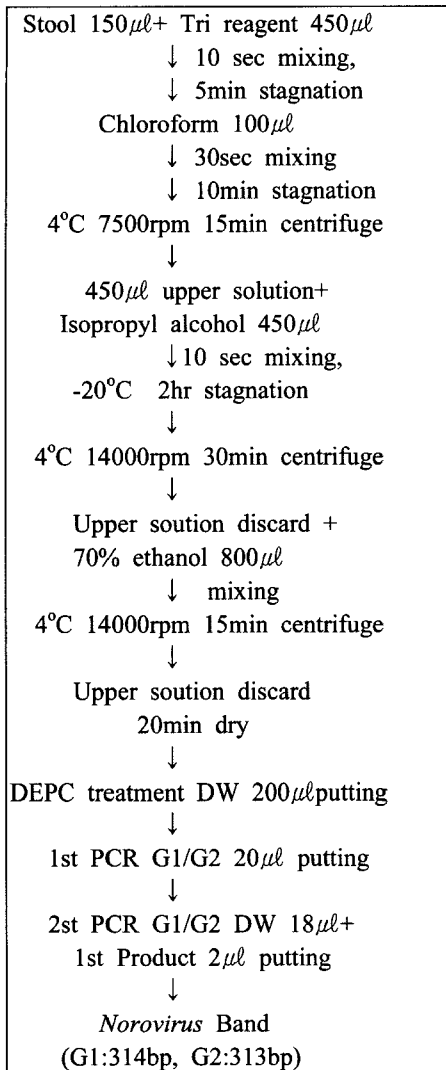


Fig. 1. RT-PCR for the *Norovirus* protocol.

5. 결과

1) 항생제 내성 및 PFGE 결과

이 사례는 2007년 3월 18일(일) 저녁에 경기도 구리시 A 장례식장에 조문객이 약 300여명이 다녀갔는데, 3월 20일 오전에 12명의 환자가 구토, 복통, 설사 등의 증세로 G 보건소에 신고되면서 검사가 시작되었다. 의심이 된 음식물은 해물경단 등 5건이었다.

역학조사는 3월 20일 진행되었으며, 조문객이 다른 지역에서 가서 발생시킨 사례로 심한설사, 복통, 발열, 오한을 동반한 환자 72명(24%)이었다.

우리 연구원에서는 설사증상을 보이는 환자대변 12건, 조리종사자 대변 4건, 음식물 7건, 칼, 도마, 행주

등 4건 등 총 37건의 검체와 N 보건소의 동일균 2건에 대해 세균 및 바이러스 검사를 수행하였다.

검사결과는 *Salmonella othmarschen* 18건(음식물 3건 포함), *Norovirus* 3건, *Salmonella othmarschen*과 *Norovirus*의 중복 감염 6건이 검출되었다. *Salmonella othmarschen* 3건은 음식물로 해물경단전, 동태전, 호박전으로 달걀을 사용한 것이 공통적이다. *Salmonella othmarschen* 24건의 항생제 감수성검사는 Strain 4에서 AM, CF, CIP, NA, TE, TIC에서 항생제 내성을, Strain 13에서 CF, CZ에서 항생제 내성을 나타내었고, 그 외는 모두 항생제 감수성을 보였다(Table 2).

동시에 PFGE를 수행하여 분리균의 DNA 지문 유형을 비교한 바 Strain 1,2,3,5,6,7,8,9,10,11,12,14,15,16,17, 18,19,20,21,22,23,24가 동일한 유전자 pattern을 보여, 균의 기원이 같은 것으로 추정할 수 있고, Strain 4, 13은 서로 다른 pattern을 보여 균의 기원이 다른 것으로 사려된다(Fig. 2).

Table 2. Antibiotic resistance patterns of *Salmonella othmarschen* strains isolated in outbreak cases

No. of strains	Resistant patterns	Remarks	
strain 1		lane 1	food 1
strain 2		lane 2	food 2
strain 3		lane 3	food 3
strain 4	AM, CF, CIP, NA, TE, TIC	lane 4	stool 1
strain 5		lane 5	stool 2
strain 6		lane 6	stool 3
strain 7		lane 7	stool 4
strain 8		lane 8	stool 5
strain 9		lane 9	stool 6
strain 10		lane 10	stool 7
strain 11		lane 11	stool 8
strain 12		lane 12	stool 9
strain 13	CF, CZ	lane 13	stool10
strain 14		lane 14	stool11
strain 15		lane 15	stool12
strain 16		lane 16	stool13
strain 17		lane 17	stool14
strain 18		lane 18	stool15
strain 19		lane 19	stool16
strain 20		lane 20	stool17
strain 21		lane 21	stool18
strain 22		lane 22	stool19
strain 23		lane 23	stool20
strain 24		lane 24	stool21

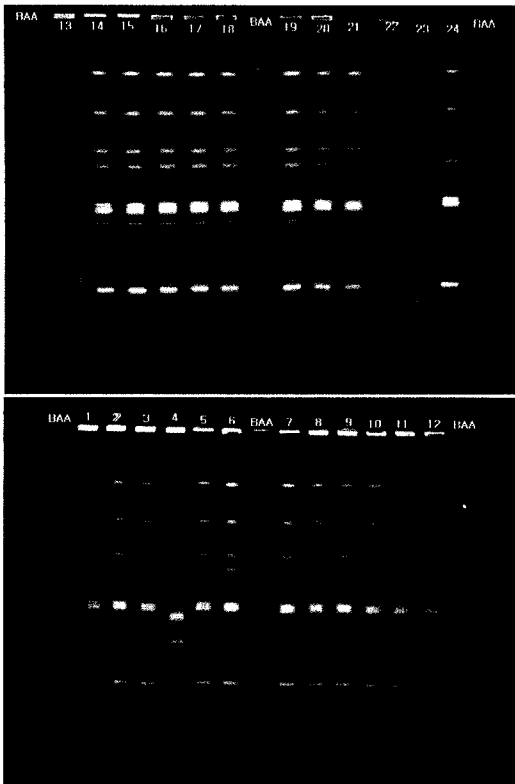


Fig. 2 PFGE image of *Salmonella othmarschen* isolated from stool.

BAA: Standard strain (*Salmonella branderup*)

Lane 1~3 : Strain from foods.

Lane 4~24: Strain from patients.

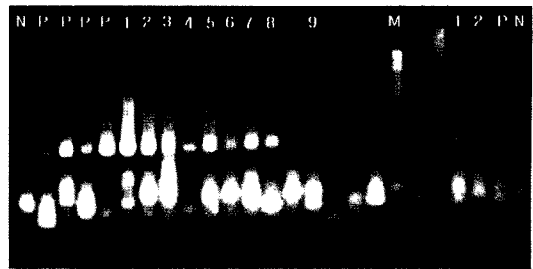


Fig. 3. *Norovirus* of the patients stool.

1~9 : *Norovirus* G2 (Left), 1~2: *Norovirus* G1(Right)

2) *Norovirus* 결과

집단식중독 검사에서 *Norovirus* G1 1건, *Norovirus* G2 7건, *Norovirus* G1, G2 1건으로 총 9건이 검출되었다. 여기에는 장례예식장 업주 1건이 포함되어 있다 (Fig. 3).

*Norovirus*의 경우는 G1 314 bp, G2 313 bp의 band를 기준으로 검출을 판정했다.⁹⁾

III. 고 찰

집단식중독은 매년 증가추세에 있는데 원인균에 대한 연관성을 추적하는 세균검사는 PFGE 방법을 이용하고 있다. PFGE는 질병예방통제센터(CDC)의 표준화된 실험방법으로 Pulse-Net이라는 분자역학적시스템을 운영하면서 정보를 공유, 분석하고 있다.

우리나라는 Pulse-Net 사업은 2005년부터 질병관리

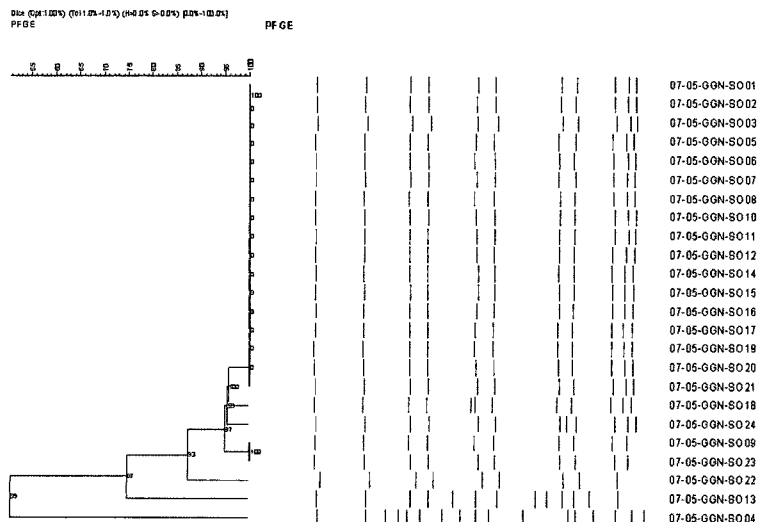


Fig. 4. BioNumerics analysis data of *Salmonella othmarschen*.

본부를 주축으로 시·도 보건환경연구원 등에서 활용하고 있다. 집단식중독의 경우는 *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, EHEC 등에 활용하고 있다.^{2,4,7,8)}

이번 경기도 구리시 A 장례예식장의 사례는 *Salmonella othmarschen*이 24주(N보건소 동일균 2건 포함)가 검출되었고, 여기서 22주는 PFGE 유형이 동일하게 나왔으며, 2주는 50% 수준으로 다른 양상을 보였는데 이는 PFGE 및 BioNumerics 분석에서 동일균에 대한 역학적 연관성을 분석해 주는 프로그램이다(Fig. 4). 여기에 가검물중 음식물 3주는 환자변과 동일한 PFGE 양상을 보여주어 이 음식물에서 기인된 것으로 추정된다.

집단식중독에서 PFGE 검사는 병원체의 원인을 파악하는 데 결정적인 결과를 제공하고 있다. 한편, *Salmonella othmarschen*과 동시에 검출된 *Norovirus*는 중복 감염 사례로 6건이 검출되었다.

이는 통상 병원균이 세균과 바이러스중 한가지만 검출되었지만 RT-PCR의 도입과 PFGE 방법 및 BioNumerics 분석에 의한 집단식중독의 원인균 파악으로 *Salmonella othmarschen*과 *Norovirus*가 동시에 검출된 사례이며, 앞으로 집단식중독 검사시 중복 감염에 의한 원인적 연관성 파악에 신중을 기해야 함을 보여주는 사례이다.

IV. 결 론

2007년 경기도 구리시 A장례식장에서 발생한 *Salmonella othmarschen* 18건, *Norovirus* 3건, *Salmonella othmarschen*과 *Norovirus*의 중복감염 6건이 발생한 사례로 PFGE 및 RT-PCR을 사용하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PFGE 방법 및 BioNumerics 분석으로 *Salmonella othmarschen* 24주의 원인적 연관성을 파악하였다.

여기서 22주는 PFGE 유형이 동일하게 나왔으며, 2주는 50%로 다른 양상을 보였다

2. RT-PCR분석에 의해 *Norovirus* G1 1건, *Norovirus* G2 7건, *Norovirus* G1,G2 1건으로 총 9건이 검출되었다. 여기에는 예식장 업주 1건이 포함되어 있다.

*Norovirus*의 경우는 G1 314 bp, G2 313 bp의 band를 검출로 판정했다.

참고문헌

1. Terajima, J., Izumiya, H., Iyoda, S., Mitobe, J., Miura, M. and Watanabe, H.: Effectiveness of pulsed-field gel electrophoresis for the early detection of diffuse outbreaks due to shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Japan. *Foodborne Pathogenes and Disease*, 3(1), 68-73, 2006.
2. Kim, S. H., Lee, S. W., Kim, S. H., Kim, J. Y., Lee, H. Y., Kang, Y. H., Park, M. S. and Lee, B. K. : National Early Warning System Construction for Timely Surveillance of Foodborne Disease Outbreaks-PulseNet Korea, Division of Enteric Bacterial Infections, Center for Infectious Diseases, National Institute of Health, Seoul, Korea. *Infection and Chemotherapy*, 38(6), 309-315, 2006.
3. De Lappe, N., Dorna, G., Connor, J. O., Mamina, C. and Cormican, M. : Use of pulsed-field gel electrophoresis of comparison of similar but distinguishable isolates of *shigella sonnei* collected in Ireland and Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3808-3810, 2006.
4. Chung, K. S. : The genetic correlations among Serotypes and PFGE patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Korea. *Korean Society of Environmental Health*, 30(1), 15-21, 2004.
5. Park, J. K., Seok, W. S., Choi, B. J., Kim, H. M., Lim, B. K., Yoon, S. S., Kim, S. H., Kim, Y. S. and Park, J. Y. : *Salmonella enterica* Serovar London infections associated with consumption of infant Formula. *Yonsei Medical Journal*, 45(1), 43-48, 2004.
6. Son, J. C., Park, S. W. and Min, K. J. : Environmental and Antimicrobial Characteristics of *Vibrio* spp. Isolated from Fish, Shellfish, Seawater and Brackish water samples in Gyeongbuk Eastern coast. *Korean Society of Environmental Health*, 29(2), 94-102, 2003.
7. Kim, S., Kim, J. Y., Kang, Y. H., Park, Y. H. and Lee, B. K. : Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the genus *Shigella* in the Republic of Korea. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5264-5269, 2004.
8. Ko, E. M., Seok, W. S., Lee, T. J., Lim, E. J. and Son, S. Y. : Molecular epidemiological analysis of outbreaks due to pathogenic *E. coli* by using PFGE. *Institute of Health and Environment*, 18, 22-27, 2007.
9. Kim, S. H., Cheon, D. S., Kim, J. H., Jee, Y. M. and Lee, J. S. : Outbreaks of gastroenteritis that occurred during school excursions in Korea were associated with several waterborne strains of *Norovirus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4836-4839, 2005.