

1999년 광주지역 식품매개감염증의 유행적 발생에서 분리된 *Salmonella enterica* serotype Enteritidis 균주의 Plasmid DNA 및 Random Amplified Polymorphic DNA 분석

전남대학교 의과대학 미생물학교실*, 전남대학교 의학연구소†

광주광역시 보건환경연구원 미생물과‡, 광주지방식품의약품안전청§

양성천*, 배미옥*, 김선희†, 정재근‡, 하동룡‡, 원영준§, 정선식*†, 류필열*†

A Molecular Epidemiologic Study by Plasmid DNA and Random Amplified Polymorphic DNA Analyses of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis Isolated in Food Borne Outbreaks in Gwangju, 1997

Sung Chun Yang, M.D.*, Miok Bae, M.S.*†, Sun Hee Kim†, Jae Keun Chung, Ph.D.†, Dong Ryong Ha, M.S.†, Young Jun Won§, Sun Sik Chung, M.D.*† and Phil Youl Ryu, M.D.*†

Department of Microbiology*, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Research Institute of Medical Science†, Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea

Division of Microbiology‡, Kwangju City Health and Environment Institute, Gwangju, Korea

Gwangju Administration§, Korea Food and Drug Administration, Gwangju, Korea

Background : During the past 10 years, there has been an increased incidence of gastrointestinal infections caused by salmonellae in Korea. In 1999, there were several outbreaks and sporadic occurrences of food borne infections due to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Gwangju. Thus, there is a need for careful monitoring of its occurrence.

Methods : *Salmonella Enteritidis* were isolated from feces samples of patients with foodborne diarrhea in Gwangju, 1999. We performed antigen typing, examination of biochemical properties, antibiotic susceptibility test, plasmid typing and RAPD analysis to characterize of *S. Enteritidis* isolates.

Results : There were three *Salmonella* outbreaks (April, July, October), and 203 isolates of *S. Enteritidis* were isolated from the 286 patients. Eighteen isolates were obtained from the patients of sporadic occurrences. Antigenic types of the isolates were O antigen: D1 (1, 9, 12), H antigen phase 1; (g, m), serotype: Enteritidis. The isolates were susceptible to most of the antibiotics. We performed plasmid DNA analysis of the isolates, and the results showed 3 plasmids (8, 6, 3.8 kb) in 14 of 14 strains from outbreaks; 3 plasmids (8, 6, 3.8 kb) in 2 isolates from sporadic cases; 4 plasmids (8, 6, 3.8, 2 kb) in 10 isolates from sporadic occurrences, and 2 isolates from food specimens. However, 1 isolate from patients and 2 isolates from Ham-Yang, Kyung Nam, did not contain plasmids. RAPD analysis showed that all isolates from Gwangju in 1999 showed relatively uniform characteristics which were different from those derived from Ham-Yang, Kyung-Nam.

Conclusion : The present data demonstrated that most food poisoning cases by *S. Enteritidis* in Gwangju, 1999, were originated from the same *Salmonella* Enteritidis strains.

Key Words : *Salmonella* Enteritidis, Plasmid, RAPD

서 론

*Salmonella typhi*를 제외한 다른 salmonellae에 의해 발생되는 비장티프스형 salmonellosis는 전세계적으로 발생하는

접수: 2003년 5월 7일, 승인: 2003년 10월 17일

이 연구는 보건과학기술연구개발사업(HMP-99-M-04-0002)의 지원에 의해 이루어졌음

교신저자: 류필열, 광주시 동구 학1동

전남대학교 의과대학 미생물학교실

Tel: 062)220-4135, Fax: 062-228-7294

E-mail: pyryu@chonnam.ac.kr

매우 중요한 식품 매개성 감염질환이다(1, 2). 비장티프스성 salmonellosis의 주요 원인균은 *S. Typhimurium*과 *S. Enteritidis*이다. 과거 10년간 *S. Enteritidis*에 의한 위장관 감염의 빈도가 꾸준히 증가하여 많은 나라에서 가장 빈번히 검출되는 혈청학적 형별이 되었다(2, 3). 최근의 많은 보고에서 *S. Enteritidis*의 분리율의 증가가 부적절한 요리, 오염된 달걀이나 식품의 섭취와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다(4-7).

최근 *S. Enteritidis*에 의한 감염이 현저히 증가하고 있어, 식중독에 의한 감염의 동정과 혈청정보보다 더 자세히 분류하기 위하여 분자생물학적인 분류방법이 많이 사용되고 있다. 혈청형, biotyping, 파지형과 같은 표준적인 분류동정법은 집단 발생한 경우 분리된 균의 75% 이상이 동일한 파지형이기 때문에 이들 균을 충분히 구별할 수가 없다(8). 최근에는 plasmid 분석(9, 10), ribotyping (4, 7, 11-13), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (13-15), random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석법(16)과 같은 분자생물학적인 방법이 가검물로부터 분리된 salmonellae를 구별하는데 유용하게 이용되고 있다.

1999년도에 전국적으로 식품매개 *S. Enteritidis*감염증이 집단적 발생하였으며 특히 광주지역에서는 식당이나 학교 급식소를 통해 3회에 걸쳐 폭발적으로 총 286명이 집단 발병하였으며, 산발인 발생도 지속되고 있다. 따라서 본 연구에서는 이들 환자로부터 분리한 균주의 특성을 밝히고자 plasmid DNA의 분석과 RAPD를 이용한 typing을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 시료채취

1999년 광주지역에서 집단적 또는 산발적으로 발생한 식중독환자의 분변가검물 및 (추정)원인식품 등을 대상으로 균을 분리하였다. 환자들의 주증상은 복통, 구토, 두통 및 설사로 동일하였으며, 가검물은 culturette (BBLTM, USA)를 이용하여 직장도말을 하였고, 식품 등의 가검물은 멸균된 용기에 채취하여 얼음 상자에 넣은 후, 실험실로 운반하여 즉시 실험하였다.

2. *Salmonella* Enteritidis균의 분리동정

1) *Salmonella* spp.의 분리

환자의 rectal swab 가검물은 실험실에 운반된 즉시 *Salmonella*-*Shigella* (SS) 한천(Difco, Detroit, MI) 평판배지에

에 희석도말하여 37℃에서 18시간 배양하는 직접도말법과 Selenite F broth (Difco)에 37℃에서 18시간 배양한 후 배양액을 SS 한천 평판배지에 희석도말하여 배양하는 증균배양법을 동시에 사용하였다. 배양된 평판배지에서 lactose를 분해하지 않은 무색집락을 선택하여 KIA agar (Difco) 사면배지에 접종하여 37℃에서 18시간 배양한 후, Alkaline slant/Acid butt, H₂S 양성, gas 양성의 특성을 나타내는 균주를 *Salmonella* 균으로 추정하였다.

추정식품가검물 등에 대한 균 분리는, 각각의 가검물 25 g에 Selenite F broth 225 ml를 가하여 stomacher (IUL Instruments, Spain)를 이용 균질화시킨 후, 37℃에서 18시간 증균배양하였다. 이후 과정은 환자가검물의 증균배양법과 동일하게 실시하였다.

2) 생화학적 동정

Salmonella 균으로 추정된 균주에 대하여, Bergey's manual에 따라 IMViC시험, 당분해능 시험, 아미노산 탈탄산 시험 등을 실시하고 최종적으로 API 20E kit (BioMerieux, France)를 사용하여 *Salmonella* spp.를 확인하였다.

3) 혈청학적 동정

생화학적으로 *Salmonella* spp.로 확인에 균주에 대하여 균체항원 및 편모항원 시험을 실시하였다.

(1) 균체항원(somatic, O항원) 시험

분리된 균주를 Brain Heart infusion(BHI) agar(Difco)에서 순수배양한 후, *Salmonella* O Antisera (Difco)와 슬라이드 응집시험을 실시하였다.

(2) 편모항원(flagella, H항원) 시험

Motility GI medium (Difco)에 분리된 균주를 접종하여 37℃에서 18시간 배양한 후, 시험관하부의 운동성이 강한 균을 취하여 Veal infusion broth (Difco)에 다시 37℃에서 18시간 배양한 후, 동량의 0.6% formalin-saline을 가하여 실온에 1시간 정치시켜 균을 고정하였다. *Salmonella* H Antisera (Difco)은 멸균된 0.85% NaCl saline을 이용하여 각각 1:250의 비율로 희석하여 준비하였다. 고정된 균액 500 µl와 희석된 각각의 항혈청을 동량 가하여 혼합한 후, 50℃ 항온수조에서 1시간이상 반응시켜 응집여부를 확인하는 tube method를 실시하였다.

2) 항균제 감수성 시험

분리균주에 대한 항균제 감수성 시험은 디스크 확산법에 의하여 실시하였다. 대조균주로는 *Escherichia coli* ATCC 25922를 사용하였으며, 사용된 항균제 디스크는 ampicillin (AM 10 µg), cefotaxime (CTX 30 µg), ceftriaxon (CRO 30

μg), amikacin (AN 30 μg), gentamicin (GM 10 μg), kanamycin (K 30 μg), nalidixic acid (NA 30 μg), chloramphenicol (C 30 μg), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXY 1.25 μg /23.75 μg), ciprofloxacin (CIP 5 μg)로서 총 10종을 사용하였다. BHI 배지에서 배양된 균을 Muller Hinton broth (Difco)에 접종하여 37°C에서 6시간 배양 후, 균액의 농도를 MacFarland scale No. 0.5가 되도록 0.85% NaCl saline으로 희석하여 Muller Hinton medium (Difco)에 고루 도말한 다음, 항균제 disc를 30 mm간격으로 위치시키고 37°C에서 18시간 배양하여, zone reader로 발육억제대를 측정하였으며, 감수성은 National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) (22)의 기준에 의하여 판정하였다.

(1) Plasmid 분리 및 분석

Plasmid의 분리는 Kado와 Liu (17)의 방법에 준하여 실시하였는데 그 방법은 다음과 같다. 균을 5 ml trypticase soy broth (Difco)에 접종하여 37°C에서 18시간 진탕 배양한 후 원심하여 세균 침사를 모은다. 세균을 200 μl 의 TE buffer (10 mM Tris base, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 부유하고 400 μl 의 lysis mixture (3% SDS, 50 mM Tris base, pH 12.0)를 가하고 56°C에서 용해시킨 후, phenol/chloroform/isoamyl alcohol 혼합액(25:24:1)을 가한 후 원심하여 plasmid가 함유된 상층액을 회수하였다. Plasmid 분석을 위하여 1% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide로 염색하여 분석하였다.

(2) RAPD 분석

① DNA 분리

Chromosomal DNA의 분리는 Wilson (18)의 방법에 의하여 실시하였는데 그 방법은 다음과 같다. LB broth에 배양한 균액 1.5 ml를 원심하여 균침사를 567 μl 의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0)로 부유하고 30 μl 의 10% SDS와 3 μl 의 proteinase K (20 mg/ml)를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 여기에 100 μl 의 5 M NaCl를 첨가하여 잘 혼합하고 80 μl 의 CTAB (10%)/NaCl (4.1%) 혼합액을 첨가하여 65°C에서 10분간 반응시킨다. 동량의 chloroform/isoamyl alcohol 혼합액을 첨가하여 원심하여 상층액을 새로운 tube에 옮긴 후 동량의 phenol/chloroform/isoamyl alcohol 혼합액을 넣은 후 잘 혼합한 뒤 원심하여 상층액을 새로운 tube로 옮긴다. 여기에 0.6 volume의 isopropanol를 첨가한 뒤 DNA를 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하였다. DNA를 건조시킨 후 TE buffer로 부유하여 다음 실험에 사용하였다.

② 중합효소연쇄반응

본 실험에서 사용한 primer는 Table 1과 같이 Lin등 (16)이 사용한 것과 동일하게 Bioneer (대전)에서 제조하여 사용하였다. 중합효소연쇄반응은 40 ng의 DNA, 50 pM의 primer, PCR buffer (Gibco BRL), 35 mM의 MgCl_2 , 각각의 10 mM dNTP mix (Gibco BRL)와 2 U의 Taq polymerase (Gibco BRL)를 포함하여 총 20 μl 의 반응액을 thermal cycler (Eppendorf)에서 시행하였다. 증폭 프로그램은 94°C에서 5분, 40°C에서 5분, 72°C에서 5분간 1회 증폭한 후, 94°C에서 30초, 48°C에서 1분, 72°C에서 1분간 33회 증폭하고 마지막으로 72°C에서 7분간 post-extension을 시행하였다. PCR product는 0.5×TBE buffer와 2% agarose gel로 전기영동한 후 ethidium bromide염색으로 확인하였다.

결 과

1. S. Enteritidis의 분리동정

1) S. Enteritidis의 분리

광주지역에서 3번에 걸쳐 집단적으로 복통, 구토, 두통 및 설사들을 동반한 식중독 환자 286명과 산발적으로 발생한 211명 환자가 보건소에 신고되었고 검사 의뢰된 대변가검물 497건 및 식품가검물 등 330건, 총 827건중 221건(환자 가검물 219건, 식품가검물 2건)에서 S. Enteritidis균을 분리하였다(Table 2). S. Enteritidis의 집단발생의 추정요인은 결혼식 피로연 음식, 음식점 음식, 급식 도시락제조업체 등과 같이 주로 많은 양의 음식을 조리하는 장소에서 발생하였다.

Table 1. Primers Used in the RAPD Fingerprinting of S. Enteritidis Strains

Primer	Sequence	G+C Content (%)
23L	5'-CCGAAGCTGC	70
OPB-17	5'-AGGGAACGAG	60
OPA-4	5'-AATCGGGCTG	60
OPB-6	5'-TGCTCTGCC	70

Table 2. Isolation of Salmonella Enteritidis from Patients and Implicated Food in Gwangju during 1999

	Month of isolation	No. of patient	No. of isolate
Outbreak 1		128	84
Outbreak 2	April	14	14
Outbreak 3	July	144	105
Sporadic	October	211	16
Food	Jan-DEC	330	2
Total	Jan-DEC	827	221

2) 분리된 *S. Enteritidis*의 생화학적 성상 및 혈청형

1999년에 발생한 식중독 환자 및 식품에서 분리한 221주의 *S. Enteritidis*에 대한 생화학적 성상은 Table 3과 같다. 즉, 특징적인 생화학적 성상으로 catalase, hydrogen sulfide, methyl red, motility, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase 및 당분해시험중 glucose (gas, acid), mannitol, dulcitol, sorbitol, arabinose, rhamnose는 전체 균주가 100% 양성반응을 보인 반면, oxidase, indole, Voges-Proskauer, urease 및 당분해시험으로 lactose, sucrose, salicin, adonitol, inositol, raffinose, cellobiose는 전체균주가 100% 음성반응을 보였다. 또한 citrate, arginine dihydrolase 등의 시험에서도 각각 99.5%, 95.4%의 양성율을 나타내었다.

*S. Enteritidis*는 Table 4와 같이 O 항원은 D1 (1,9,12)이

Table 3. Biochemical Characteristics of *S. Enteritidis* Isolates

Test or substrate	No. of positive	%
Oxidase	0	0
Catalase	221	100
Hydrogen Sulfide	221	100
Indole	0	0
Methyl Red	221	100
Voges-Proskauer	0	0
Citrate	220	99.5
Urease	0	0
Motility	220	100
Lysine decarboxylase	221	100
Arginine dihydrolase	211	95.4
Ornithine decarboxylase	221	100
Glucose		
Acid	221	100
Gas	221	100
Lactose	0	0
Sucrose	0	0
Mannitol	221	100
Dulcitol	221	100
Salicin	0	0
Adonitol	0	0
Inositol	0	0
Sorbitol	221	100
Arabinose	221	100
Raffinose	0	0
Rhamnose	221	100
Cellobiose	0	0

Table 4. Antigenic Serotype of *S. Enteritidis* Isolates

Serotype	Antigenic formula		
	O antigen	H antigen	
		phase I	phase II
Enteritidis	D1(1, 9, 12)	g. m	-

고, H 항원은 phase I이 g와 m으로 혈청형 Enteritidis이었다.

Table 5. Antibiotic Susceptibilities of *S. Enteritidis* Isolates in Gwangju

Antibiotics	Susceptibility (%)		
	Resistant	Intermediate	Susceptible
Ampicillin	0	0	100
Cefotaxim	0	0	100
Ceftriaxone	0	0	100
Amikacin	0	0	100
Gentamicin	0	0	100
Kanamycin	0	0	100
Nalidixic acid	6.8	0	93.2
Chloramphenicol	0	0	100
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	0	0	100
Ciprofloxacin	0	0	100

Table 6. Strains used in Plasmid DNA and RAPD Analysis

Isolates	Date of isolation (day/month)	Source	Geographic origin
D1	1/5	patient	Namgu (O1)*
D2	1/5	patient	Namgu (O1)
D3	1/5	patient	Namgu (O1)
D4	1/5	patient	Namgu (O1)
D5	1/5	patient	Namgu (O1)
J1	19/7	patient	Bukgu (O2)
J2	19/7	patient	Bukgu (O2)
J3	19/7	patient	Bukgu (O2)
J4	19/7	patient	Namgu (O2)
J5	19/7	patient	Namgu (O2)
M1	4/11	patient	Namgu (O3)
M2	2/11	patient	Bukgu (O3)
M3	3/11	patient	Donggu (O3)
M4	6/11	patient	Seugu (O3)
N1	16/4	patient	Namgu
N2	24/5	patient	Namgu
S1	4/6	patient	Seugu
S2	26/5	patient	Seugu
S3	24/5	patient	Seugu
N3	28/6	patient	Namgu
B1	28/6	patient	Bukgu
N4	28/6	patient	Namgu
N5	13/7	patient	Namgu
G1	17/8	patient	Kwangsangu
S4	4/9	patient	Seugu
N6	8/10	patient	Namgu
B2	8/10	patient	Bukgu
F1	27/4	food	Donggu
F2	6/11	food	Namgu
K1	4/5	patient	Hamyang (O)
K2	4/5	patient	Hamyang (O)
ATCC 13076			

* O indicates patient's isolates from food borne outbreaks

2. 항균제 감수성 시험

분리된 *S. Enteritidis*에 대한 항균제 감수성 시험결과는 Table 5와 같다. 즉, nalidixic acid에 대해서는 6.8%가 내성을 나타냈다. 이들 2종을 제외한 amikacin, cefotaxim, ampicillin, ceftriaxone, gentamicin, kanamycin, chloramphenicol, trimethoprim, ciprofloxacin 등 9종의 항생제에 대해서는 100% 감수성을 나타냈다.

3. Plasmid DNA의 특성

광주지역에서 집단발생과 산발적으로 발생한 식중독 환자로부터 분리된 균주의 특성을 비교하기 위하여 Table 6와 같이 임의적으로 집단 식중독환자로 부터 분리된 균주 14주, 산발적으로 발생한 환자로부터 분리된 균주 13주, 식품으로부터 분리된 2주 등 29주의 균주와 대조균주로 경남 함양에

서 집단 식중독 환자로부터 분리된 2주와 표준균주 ATCC 13076등 총 32주의 균주로부터 plasmid DNA를 분리하여 전기영동을 실시하여 비교하였던 바 Table 7과 Figure 1에서와

Table 7. Results of Plasmid DNA and RAPD Fingerprinting of *S. Enteritidis* Isolates

Strains	Plasmid (kb)	RAPD type by using primer			
		23L	OPB-17	OPA-4	OPB-6
D1	8, 6, 3.8	A	A	A	A
D2	8, 6, 3.8	A	A	A	A
D3	8, 6, 3.8	A	A	A	A
D4	8, 6, 3.8	A	A	A	A
D5	8, 6, 3.8	A	A	A	A
J1	8, 6, 3.8	A	A	A	A
J2	8, 6, 3.8	A	A	A	A
J3	8, 6, 3.8	A	A	A	A
J4	8, 6, 3.8	A	A	A	A
J5	8, 6, 3.8	B	B	A	B
M1	8, 6, 3.8	A	A	A	A
M2	8, 6, 3.8	A	A	A	A
M3	8, 6, 3.8	A	A	A	A
M4	8, 6, 3.8	B	B	A	B
N1	8, 6, 3.8, 2	A	A	A	A
N2	8, 6, 3.8, 2	A	A	A	A
S1	8, 6, 3.8, 2	A	A	A	A
S2	8, 6, 3.8, 2	A	A	A	A
S3	8, 6, 3.8, 2	A	A	A	A
B1	8, 6, 3.8, 2	A	A	A	A
N4	8, 6, 3.8, 2	B	E	A	D
N5	8, 6, 3.8, 2	A	A	A	A
G1	8, 6, 3.8	A	A	A	A
S4	8, 6, 3.8, 2	A	A	B	A
N6	-	A	A	A	A
B2	8, 6, 3.8	A	A	A	A
F1	8, 6, 3.8, 2	A	A	A	A
F2	8, 6, 3.8	A	A	A	A
K1	-	C	C	C	C
K2	-	C	C	C	C
ATCC13076	-	D	D	D	E

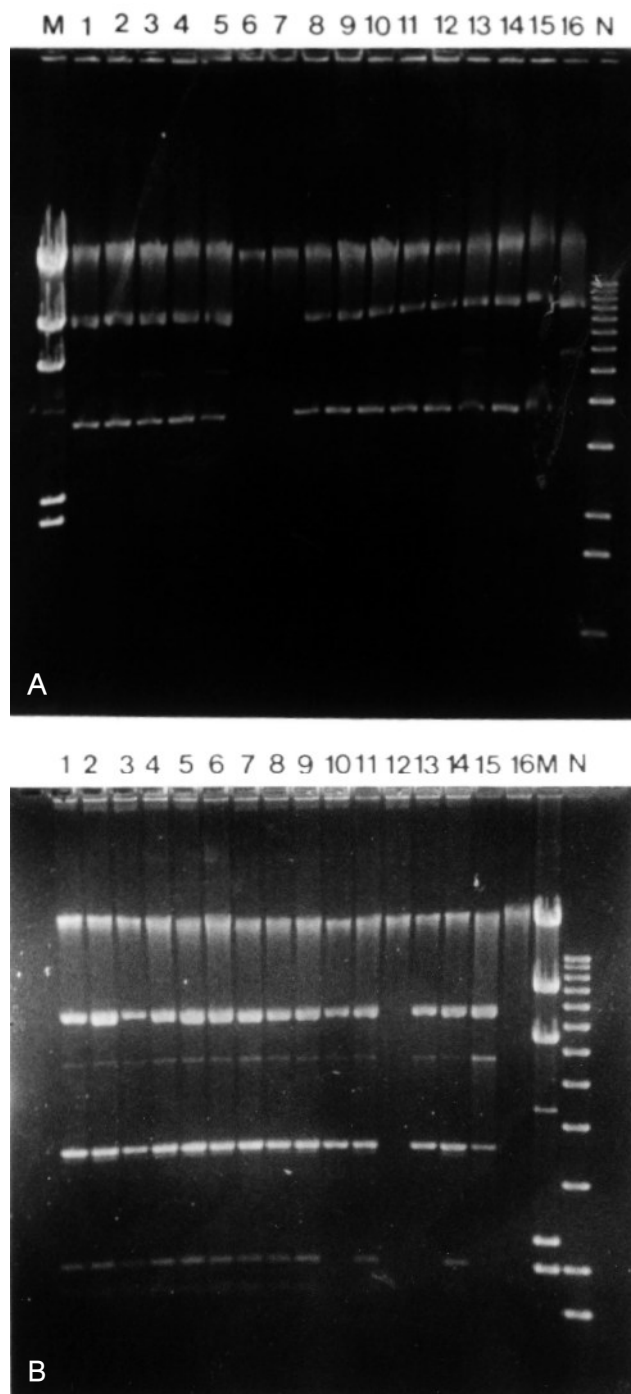


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA of *S. Enteritidis* isolates. (A) lane M, lambda DNA/Hind III marker; lane N, 1 kb ladder; lanes 1 to 16, D1-5, K1-2, J1-5, and M1-4. (B) lane M, lambda DNA/Hind III marker; lane N, 1 kb ladder; lanes 1 to 16, N1-2, S1-3, B1, N4-5, G1, S4, N6, B1, F1-2, and *S. Enteritidis* ATCC 13076.

같이, 집단발생환자에서 분리된 균주는 모두 8, 6, 3.8 kb의 plasmid를 보유하고 있었으나 산발적으로 발생한 환자와 음식물로부터 분리된 균주 15주중 12주는 8, 6, 3.8 및 2 kb의 plasmid를 보유하고 있었다. 2주에서는 8, 6, 3.8 kb의 3개의 plasmid를 보유하고 있으며, 1주는 plasmid를 보유하지 않았다. 광주지역에서 분리된 균주와 타지역에서 집단 식중독을 일으킨 균주와 비교해 보기 위하여 경남함양에서 분리된 균주의 plasmid를 조사하였던 바 전혀 plasmid를 관찰할 수 없었다 (Figure 1A).

4. RAPD fingerprinting

환자로부터 분리된 균주의 분자 역학적 형별을 조사하기 위하여 RAPD fingerprinting을 실시하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다. Primer 23L, OPB-17, OPA-4 및 OPB-6를 이용하여 PCR를 실시하였던 바 Figure 2-4와 Table 7과 같이 집단 발병과 산발적인 식중독을 일으킨 균주에서 일부 균

주를 제외한 대부분의 균주에서 같은 결과를 보여 동일한 균주로 추정할 수 있었다. 그러나 경남 함양에서 집단 발병을 일으킨 균주에서는 다른 양상을 보여 광주지역에서 식중독을 일으킨 균주와는 서로 다른 균주임을 알 수 있었다.

고 찰

세균성 식중독은 *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, 대장균(특히 O157/H7)과 기타 세균에 의한 위장염과 황색포도구균의 장독소에 의해 자주 발생되고 있다. 최근 *S. Enteritidis*는 식중독을 유발하는 주요 원인균의 하나로서 전세계적으로 급성 위장염을 많이 일으키는 세균으로 대두되고 있다 (2). *S. Enteritidis*에 의한 식중독은 주로 오염된 계란 등을 통하여 모든 사람에게 감염될 수 있으며, 감염 후 12 내지 72시간 이후에 열, 심한 복통, 구토 또는 오심과 설사를 일으킨다(2, 3, 19). 최근 *S. Enteritidis*에 의한 집단 식중독이 현저히 증가하고 있어, 이 병원체의 역학적인 전파를 효과적으로

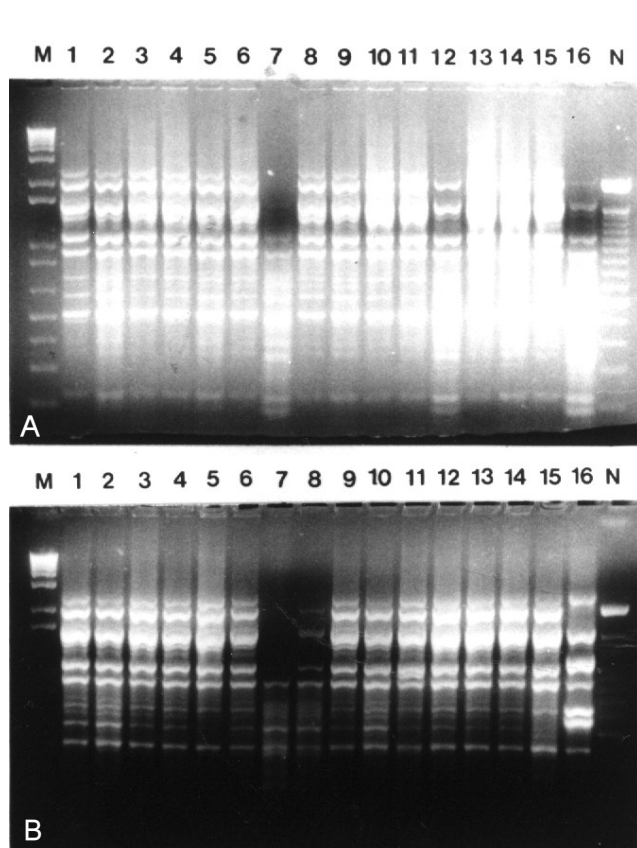


Figure 2. DNA fingerprint analysis of *S. Enteritidis* isolates by RAPD with the 23L primer. (A) lane M, 1 kb ladder; lane N, 100 bp ladder; lanes 1 to 16, D1-5, B1, K2, J1-5, and M1-4. (B) lane M, 1 kb ladder; lane N, 100 bp ladder; lanes 1 to 16, N1-2, S1-3, K1, N4-5, G1, S4, N6, B1, F1-2, and *S. Enteritidis* ATCC 13076.

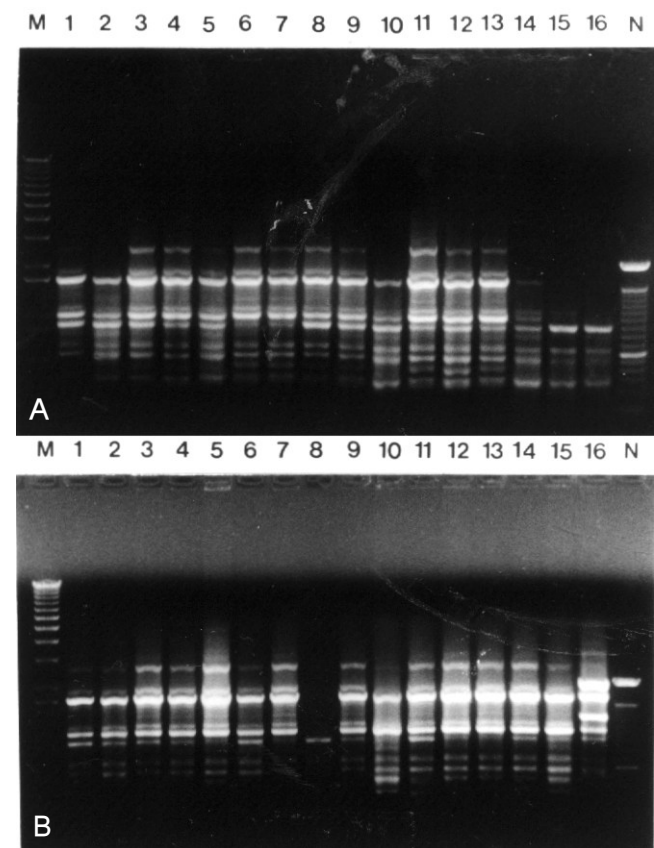


Figure 3. DNA fingerprint analysis of *S. Enteritidis* isolates by RAPD with the OPB-17 primer. (A) lane M, 1 kb ladder; lane N, 100 bp ladder; lanes 1 to 16, D1-5, J1-5, M1-4 and K1-2. (B) lane M, 1 kb ladder; lane N, 100 bp ladder; lanes 1 to 16, N1-2, S1-3, B1, N4-5, G1, S4, N6, B1, F1-2, and *S. Enteritidis* ATCC 13076.

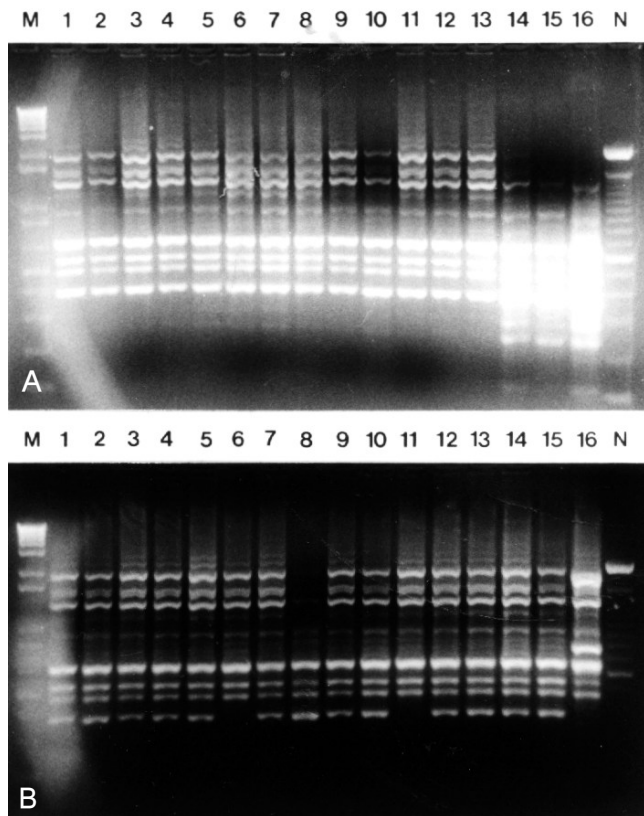


Figure 4. DNA fingerprint analysis of *S. Enteritidis* isolates by RAPD with the OPA-4 primer. (A) lanes M, 1 kb ladder; lanes N, 100 bp ladder; lanes 1 to 16, D1-5, J1-5, M1-4 and K1-2. (B) lane M, 1 kb ladder; lane N, 100 bp ladder; lanes 1 to 16, N1-2, S1-3, B1, N4-5, G1, S4, N6, B1, F1-2, and *S. Enteritidis* ATCC 13076.

감시할 필요가 있다.

최근 *S. Enteritidis* 혈청정보보다 더 자세히 분류하기 위하여 분자생물학적인 분류방법이 많이 사용되고 있다. 혈청형, biotyping, 파지형과 같은 표준적인 분류동정법은 집단 발생한 경우 분리된 균의 75% 이상이 동일한 파지형이기 때문에 이들 균을 충분히 구별할 수가 없다(8). 본 실험에서도 분리된 *S. Enteritidis*의 혈청형은 모두 동일한 D1에 속하여 혈청형에 의한 분류는 매우 제한적이었다. Plasmid의 특성을 역학적인 조사방법으로 사용하기에는 많은 제한점이 있다(20). Vatopoulos 등(21)의 보고에서는 plasmid의 특성에 따라 21주의 *S. Enteritidis*를 5개의 군으로 구별하였다. 그러나 Martinetti와 Altwegg(9)는 *S. Enteritidis*에서는 plasmid의 보유빈도가 낮기 때문에 매우 제한적이라고 보고한 바 있다. 본 실험에서는 광주지역에서 집단 식중독 환자로부터 분리된 균주에서는 모두 8, 6, 3.8 kb의 plasmid를 가지고 있었으나, 산발적으로 발생한 식중독환자로부터 분리된 균주는 대부분이 8, 6, 3.8, 2 kb의 plasmid 4개를 보유하고 있었다. 그

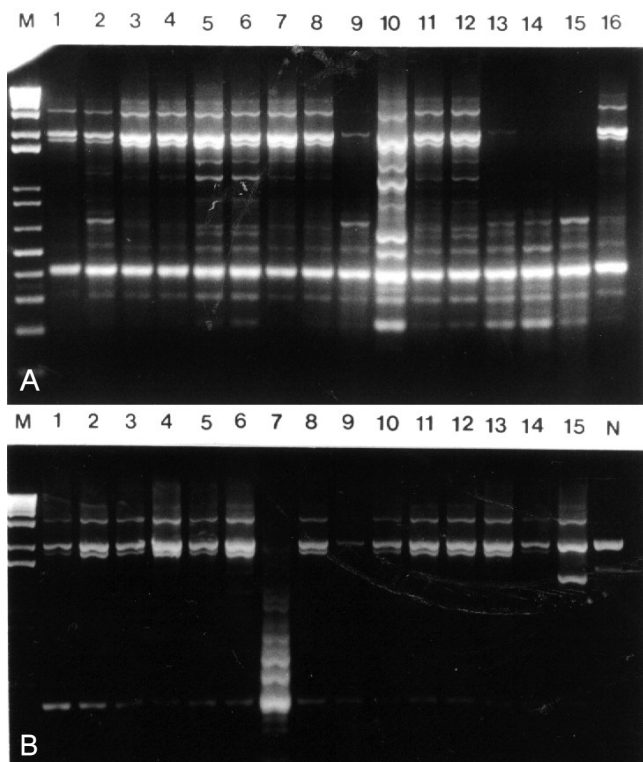


Figure 5. DNA fingerprint analysis of *S. Enteritidis* isolates by RAPD with the OPB-6 primer. (A) lanes M, 1 kb ladder; lanes N, 100 bp ladder; lanes 1 to 16, D1-5, J1-5, M1-4, K1-2 and N1. (B) lane M, 1 kb ladder; lane N, 100 bp ladder; lanes 1 to 15, N2, S1-3, B1, N4-5, G1, S4, N6, B1, F1-2, and *S. enteritidis* ATCC 13076.

려나 경남 함양에서 분리된 2주는 plasmid를 전혀 가지고 있지 않았다. 따라서 광주에서 분리된 균주와 경남 함양에서 분리된 균주는 역학적으로 서로 다른 균주로 생각되었다. 그러나 광주에서 분리된 균들은 2 kb의 plasmid 1개만이 차이가 있어 동일 혹은 유사한 균주클론에서 유래했을 가능성이 있었다.

최근 집단 식중독 환자로부터 분리된 *S. Enteritidis*의 역학적인 특성을 조사하기 위한 방법으로서 ribotyping (4, 7, 11-13), PFGE (13-15), RAPD 분석법(16)과 같은 분자생물학적인 방법이 유용하게 이용되고 있다. 그러나 ribotyping과 PFGE와 같은 방법은 균주간의 차이를 상세히 조사할 수 있다는 장점이 있으나, 실험조작이 매우 까다롭고 어려우며, 비싼 장비가 필요로 하는 단점이 있다. 본 연구에서 균주간의 특성 차이를 조사하기 위하여 비교적 실험 방법이 간단한 RAPD 분석법을 이용하였다. 실험에 사용한 primer는 비교적 균주간의 차이를 잘 관찰할 수 있다고 보고된 23L, OPB-17, OPA-4 및 OPB-6을 사용하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다(16). RAPD 분석 결과 광주지역에서 분리된 균주와 경

남 함양에서 분리 균주간의 차이가 뚜렷하였다. 광주지역에서 집단 식중독을 일으킨 균주와 산발적으로 식중독을 일으킨 균주간의 차이는 없었다. 일부 균주에서 RAPD의 결과가 약간 상이하였으나 이는 PCR 반응액에 사용되었던 DNA의 양에 의해 그러한 결과가 나온 것으로 생각된다.

본 연구의 결과 광주지역에서 *S. Enteritidis*에 의해 발생한 집단 또는 산발적인 식중독은 동일한 균주에 의해 발생한 것으로 생각된다. 앞으로 보다 더 자세한 균주간의 특성 차이를 조사하기 위해서는 ribotyping과 PFGE와 같은 방법을 이용해야 할 것으로 생각된다.

요 약

목 적 : 최근 *Salmonella*는 세균성 식중독의 주 원인균으로 매년 환자의 발생이 증가되고 있어 국가적인 감시가 필요한 전염성 세균이다. 특히 1999년도에는 *S. Enteritidis*에 의한 식중독이 전국적으로 크고 작은 집단발생이 있었으며 또한 꾸준히 산발적으로 발생하였다. 본 연구에서는 1999년도에 광주지역에서 발생한 식중독 환자로부터 분리된 *S. Enteritidis*의 분자역학적 특성을 밝히고자 하였다.

방 법 : 1999년도 광주지역에서 발생한 식중독환자의 분변 가검물과 의심되는 식품으로부터 *S. Enteritidis*를 분리하였으며, 분리된 균주의 분자생물학적 특성을 조사하기 위하여 plasmid DNA의 분석과 random amplified polymorphic DNA (RAPD)를 실시하였다.

결 과 : 광주지역에서 4월, 7월과 10월에 3건의 집단 발생하여 286명의 환자로부터 203주의 *S. Enteritidis*가 분리되었으며 산발적으로 발생한 환자에서 16주, 음식으로부터 2주가 분리되었다. 분리된 모든 균주의 O 항원은 D1(1, 9, 12), 편모(H)항원의 phase I은 g, m으로 *Enteritidis* 혈청형이었다. 항균제 감수성 검사에서 vancomycin을 제외한 대부분의 약제에 대해 감수성을 보였다. 분리된 균주의 plasmid를 분리하여 분석하였던 바 집단 식중독 환자로부터 분리된 균주는 동일하게 8, 6, 3.8 kb의 3개의 plasmid를 보유하고 있었으며, 산발적으로 발생한 환자로부터 분리된 균주에서는 2주에서는 8, 6, 3.8 kb의 plasmid를, 10주에서는 8, 6, 3.8, 2 kb의 4개의 plasmid를 보유하고 있었다. 또한 음식물로부터 분리된 2균주에서는 4개의 plasmid를 보유하고 있었다. 그러나 환자로부터 분리된 1주와 경상남도 함양에서 집단 식중독을 일으킨 균주에서는 plasmid를 보유하고 있지 않았다. 이들 분리균주를 보다 더 자세히 구별하기 위해 RAPD를 분석하였던 바 광주지역에서 분리된 균주는 동일한 특성을 보였으며 경남에서 분

리된 균주와는 다른 특성을 보였다.

결 론 : 이상의 성적으로 보아 1999년 광주에서 발생한 3건의 집단감염과 산발감염 환자에서 분리된 균주 대부분은 동일한 plasmid DNA와 RAPD 양상을 보여, 모두 동일 클론에 의한 감염으로 추정되었다.

참 고 문 헌

- 1) Chalker RB and Blaser MJ: A review of human salmonellosis. III. Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. *Rev Infect Dis* 10:111-124, 1988
- 2) Philips CA and George JT: Guess what's lurking in the lunch? *Biologist* 41:76-80, 1994
- 3) Rodrigue DC, Tauxe RV, and Rowe B: International increase in *S. Enteritidis*: a new pandemic? *Epidemiol Infect* 105:21-27, 1990
- 4) Esteban E, Snipes K, Hiird D, Kasten R, and Kinde H: Use of ribotyping for characterization of *Salmonella* serotypes. *J Clin Microbiol* 31:233-237, 1993
- 5) Hedberg CW, David MJ, White KE, MacDonald KL, and Osterholm MT: Role of egg consumption in sporadic *Salmonella* *Enteritidis* and *Salmonella* *typhimurium* in Minnesota. *J Infect Dis* 167:107-111, 1993
- 6) St. Louis ME, Morse DL, Potter ME, Demelfi TM, Guzewish JJ, Tauxe RV, and Blake PA: The *Salmonella* *Enteritidis* Working Group. The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella* *Enteritidis* infection-new implication for the control of salmonellosis. *JAMA* 259:2103-2107, 1988
- 7) Usera MA, Popovic T, Bopp CA, and Stockbine NA: Molecular subtyping of *Salmonella* *Enteritidis* phage type 8 strain from the United States. *J Clin Microbiol* 32:194-198, 1994
- 8) Hickman-Brebber FW, Stubbs AD, and Farmer JJ III: Phage typing of *Salmonella* *Enteritidis* in the United States. *J Clin Microbiol* 29:2817-2823, 1991
- 9) Martinetti G and Altwegg M: rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing *Salmonella* *Enteritidis*. *Res Microbiol* 141:1151-1162, 1990
- 10) Stubbs AD, Hickman-Brenner FW, Cameron DN, and Farmer JJ III: Differentiation of *Salmonella* *Enteritidis* phage type 8 strains: evaluation of three additional phage typing systems, plasmid profiles, antibiotic susceptibility patterns, and biotyping. *J Clin Microbiol* 32:199-201, 1994
- 11) Altwegg M, Hickman-Brenner FW, and Farmer JJ III: Ribosomal RNA gene patterns provide increased sensitivity for typing *Salmonella* *typhi* strains. *J Infect Dis* 160:145-149, 1989
- 12) Nastasi A, Mammina C, and Villafrate MR: rDNA fingerprinting as a tool in epidemiological analysis of

- Salmonella typhi* infections. *Epidemiol Infect* 107:565-576, 1991
- 13) Thong KL, Ngeow YF, Altwegg M, Navaratnam P, and Pang T: *Molecular analysis of Salmonella Enteritidis by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. J Clin Microbiol* 33:1070-1074, 1995
 - 14) Olsen JE, Skov MN, Threlfall EJ, and Brown DJ: *Clonal lines of Salmonella enteritica serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. J Med Microbiol* 40:15-22, 1994
 - 15) Thong KL, Cheong YM, Puthucheary S, Koh CL, and Pang T: *Epidemiological analysis of sporadic Salmonella typhi isolates and those from outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol* 32:1135-1141, 1994
 - 16) Lin AW, Usera MA, Barrett TJ, and Goldsby RA: *Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of Salmonella Enteritidis. J Clin Microbiol* 34:870-876, 1996
 - 17) Kado CI and Liu ST: *Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol* 143:1365-1373, 1981
 - 18) Kate Wilson: *Preparation of Genomic DNA from bacteria, In Ausubel FM, Seidman JG (eds), Current Protocols In Molecular Biology, 1st ed. John Wiley & Sons, New York, p2.4.1-5, 1987*
 - 19) Hedberg CW, David MJ, White KE, MacDonald KL, Osterholm MT: *Role of egg consumption in sporadic Salmonella Enteritidis and Salmonella typhimurium infections in Minnesota. J Infect Dis* 167:107-111, 1993
 - 20) Maslow JW, Mulligan ME, and Arbeit RD: *Molecular epidemiology: the application of contemporary techniques to typing bacteria. Clin Infect Dis* 17:153-164, 1993
 - 21) Vatopoulos AC, Maines E, Balis E, Threlfall EJ, Kanelopou M, Kalaputhaki V, Malamou-Lada H, and Legakis NJ: *Molecular epidemiology of ampicillin-resistant clinical isolates of Salmonella Enteritidis. J Clin Microbiol* 32:1322-1325, 1994
 - 22) Barry AL and Thornsberrry C: *Susceptibility tests: Diffusion test procedures, In Balows A, Hausler WJ Jr., Herrmann KL, Isenberg HD, and Shadomy HJ (eds), Manual of Clinical Microbiology, 5th ed, ASM, Washington, D.C. p1117-1125, 1991*