

*Shigella flexneri*에 의한 집단발병의 역학적 양상

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 감염내과¹, 광주광역시 보건환경연구원², 국립보건원 장내세균과³

기현균¹ · 김선희² · 기혜영² · 서진중² · 하동룡² · 김은선² · 정재근² · 김성한³ · 이복권³

Investigation of Outbreak caused by *Shigella flexneri*

Hyun Kyun Ki, M.D.¹, Sun Hee Kim, Ph.D.², Hye Young Kee, M.S.², Jin-Jong Seo, M.S.², Eun-Sun Kim, Ph.D.², Dong Ryong Ha, M.S.², Jae Keun Chung, Ph.D.², Seong Han Kim, Ph.D.³, and Bok Kwon Lee, Ph.D.¹

Division of Infectious Diseases¹, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Sungkyunkwan University
Institute of Health and Environment², Gwang Ju, Laboratory of Enteric Infections³, National Institute of Health, Korea

Background : Most of the shigellosis outbreak in Korea was caused by *Shigella sonnei* since late 1990's. In contrast, outbreak by *Shigella flexneri* were rare since late 1990's. Currently, we experienced the shigellosis outbreak by *S. flexneri* and described the results of investigation.

Methods : We recruited employees from company "A" who had a meal at least once at the company's cafeteria from Dec 23th, 2002 to Dec 26th, 2002. We surveyed the symptoms, food items, and history of travel of eligible persons and their family members. For the microbiological examination, we collected specimen from eligible persons and their family. Collected specimens were cultured for bacteriologic agents and viruses. Epidemiological relationship among the isolates were analyzed by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

Results : Among the eligible persons, one hundred ten were symptomatic (110/258, 42.6%). Eighty-two were confirmed bacteriologically. Day of symptom onset showed a unipolar pattern. Diarrhea was the most common symptom among the symptomatic patients (110/110, 100%). The other symptoms included abdominal pain (81.8%), tenesmus (70.0%), headache (63.6%), nausea (61.8%), febrile sense (59.1%), and vomiting (24.5%). Lunch on 24th Dec was the most significant risk factor of the outbreak (RR=6.46, 3.56≤95% CI≤11.75). All isolates of the outbreak has the same pattern on PFGE analysis and the PFGE pattern was not similar compared with other *S. flexneri* isolates from Korea.

Conclusion : This is the largest and unique outbreak by *S. flexneri* since 2000 in Korea. The outbreak has the same origin according to the PFGE pattern and epidemic characteristics. Considering rarity of *S. flexneri* among shigellosis in Korea, surveillance for *S. flexneri* should be enhanced.

Key Word : *Shigella flexneri*, Outbreak, PFGE

서 론

전세계적으로 세균성 이질은 1억 6천만명 정도의 환자가 발생하며 선진국에서도 연간 150만명 정도의 환자가 발생하는 것으로 추정된다. 특히 세균성 이질로 인한 사망자 수는 110만 명 정도로 추정되는데 이중 2/3가 5세 이하의 소아이다(1). 원인 병원체인 *Shigella species*는

전염성이 강하여 감염에 필요한 균의 양이 적으며(2) 주로 소아 및 집단생활을 하는 사람들을 중심으로 하여 발병하는 특성을 가지고 있다. 세균성 이질을 유발하는 *Shigella* 속에는 4개의 혈청형이 존재하는데 국내에서 1990년대 이후 현재까지 가장 많이 발견되는 병원체는 *Shigella sonnei* (Group D)이다. 그렇지만 1970년대부터 1980년대의 경우 국내에서 주로 발견되는 원인 병원체는 *Shigella flexneri* (Group B)였다. 이후 생활수준 및 경제적인 성장으로 인하여 *S. flexneri*에 의한 세균성 이질은 점차 감소하여 1990년대 이후 shigellosis에서 차지하는 비율은 5% 내외로 감소하였으며 2000년대 이후에는 shigellosis로 인한 집단발병 중 *S. flexneri*에 의한 집단발

접수 : 2004년 2월 7일, 승인 : 2004년 4월 10일
교신저자 : 기현균, 서울시 강남구 일원동 50번지
삼성서울병원 감염내과
Tel : 02)3410-0329, Fax : 02)3410-0041
E-mail : kihkdr@ansorp.org

병은 없었다(3-4). 그러나 저자 등은 2002년 12월 말부터 2003년 1월까지 일개 회사 구내식당의 취식자들을 중심으로 집단 발병한 *S.flexneri*에 의한 감염증을 경험하였기에 이에 대한 역학적, 미생물학적 양상에 대하여 기술하고자 한다.

재료 및 방법

1. 인지 경위

2002년 12월 28일 이후 OO회사의 직원 10여명이 설사 및 복통 등의 증상으로 인근 의원에서 치료를 받았다는 사실이 광주광역시 서구 보건소로 신고 되었으며 집단설사의 원인을 규명하기 위하여 역학조사에 착수하였다.

2. 환례 정의

환자에 대한 정의는 2002년 12월 23일 이후 OO회사 직원 및 구내식당에서 식사를 한 사람 중 1) 2회 이상의 묽은 대변을 본 사람 2) 혈변, 묽은변 등의 대변의 양상 변화 3) 복통, 발열, 구토 등의 증상 등의 3가지 중 1가지 이상을 동반한 경우로 정의하였다. 이중 대변 및 직장채변 검사결과 *S. flexneri*가 분리된 경우를 확진 환자로 정의하였다.

3. 조사 방법

1) 설문조사 및 실험실 검사

OO회사의 직원 및 구내식당을 이용한 사람 및 가족들을 대상으로 증상여부에 대한 설문조사를 실시하였고 OO회사 직원 및 구내식당을 이용한 사람들을 대상으로 12월 23일 이후 식당이용 여부와 취식음식에 대하여 설문조사를 실시하였다. 설사 환자의 추가 발병여부를 확인하기 위하여 인근 병의원의 설사환자 발생 및 방문여부를 확인하였다.

확진을 위하여 OO회사의 직원 및 구내식당에서 식사를 한 사람들과 증상자 및 확진자들의 가족에서 채취한 대변 및 직장채변에 대한 배양검사를 시행하였다. 배양검사는 *Shigella*속 이외에도 *Salmonella*속, *Vibrio cholera*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) 등의 세균과 calicivirus, astrovirus, adenovirus, rotavirus 등의 설사를 유발하는 바이러스에 대한 배양검사를 시행하였다.

2) *Shigella species*의 분리 및 동정

대변 및 직장채변은 Bead를 넣은 시험관에 0.01 M phosphate buffered saline (PBS : pH 7.2)으로 10%가 되게 균질화를 시킨 후 감염병 실험실진단지침에 준하여 직접도말 배양법과 증균배양법을 병행하여 실시하였다(5). 즉 직접도말 배양법은 SS agar (*Salmonella-Shigella*, Difco, Detroit, USA)에 획선 도말하여 37°C에서 18-24시간 배양한 후, SS agar상에서 세균성 이질의 전형적인 무색의 집락을 선택하였다. 선택된 무색 집락은 감별배지인 KIA (Kligler Iron agar, Difco, Detroit, USA)에 접종하여 37°C에서 18-24시간 배양한 후, KIA 성상이 K/A, Gas가 없는 균주를 국립보건원으로부터 분양 받은 세균성 이질 항혈청으로 슬라이드 응집법을 실시하였다. 4종의 항혈청 중 B group (*S. flexneri*)에 응집한 균주는 생화학적 양상을 확인하기 위하여 API 20E kit (Biomérieux, Marcy, l'Etoile, France)를 이용하였다.

3) 항생제 감수성 시험

항균제에 대한 감수성 검사를 위하여 배양된 균주를 MacFarland 탁도 0.6에 맞추어 Muller-Hinton agar에 접종한 후 24시간 배양하였으며 agar에 6 mm 크기로 제조된 항균제 disc(BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial susceptibility test disc, BECTON DICKINSON, Meylan, France)를 이용하여 디스크 확산법(Bauer-Kirby, 1996)을 시행하였다(6). *E.coli* ATCC 25922주를 감수성 표준균주로 사용하여 시험할 때마다 디스크의 역가를 확인하였고, 시험조건 및 판독 결과는 The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)법에 준하였다(NCCLS, 1993) (7).

항균제 감수성 검사의 대상 항균제는 ampicillin, amikacin, ampicillin/sulbactam, cephalothin, chloramphenicol, ciprofloxacin, ceftriaxone, ceftiofur, gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, streptomycin, ticarcillin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole, amoxicillin/clavulanic acid 등 16종의 항생제에 대해 실시하였다.

4) 세균성 이질의 증합연쇄반응법(PCR : polymerase chain reaction)

*S. flexneri*의 분리 및 동정을 기존의 방법보다 신속하게 처리하기 위해 PCR을 시행하였다. *S. flexneri* 균주의 Template DNA의 추출을 위하여 수집된 대변 약 1 g에 9 mL 정도의 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)를 넣은 후 4-5개의 bead를 넣고 5분간 진탕하여, 균질화 시

킨 부유액 500 μ L을 5 mL의 vancomycin (40 mg/L, Sigma, Steinheim, Germany)이 첨가된 TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, Detroit, USA)에 접종하여 37°C 에서 16-18시간 동안 증균배양 하였다.

DNA template는 Cole (1991)의 방법에 준하여 획득하였다(8). 증균배양된 가검물 1 mL을 microcentrifuge tube에 옮겨 14,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상층액을 버리고 0.6 mL의 증류수를 첨가하여 완전히 현탁시킨 다음, 이를 15분간 끓는 물에서 중탕하고 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액 0.5 mL를 새로운 tube에 옮기고 0.3 mL의 PEG (20% Polyethylenglycol 8000, 2.5 M NaCl)용액을 추가한 다음 vortex 하여 37°C 배양기에 넣고 10분간 정치한 후, 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. DNA 침전물을 1 mL의 70% alcohol로 세척하고, kimwipes로 잔여 알콜을 깨끗이 제거한 후, DNA를 완전히 말린 다음 0.1 mL의 멸균 증류수를 넣고 vortex하고 60 °C 에서 10분간 녹인 후, 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다.

상기 과정으로 얻은 산물로 Pass 등의 방법을 참조하여(9) pINV gene에 대한 primer (F:5'-TGGAAAACTCAGTGCCTCTGCGG-3'/R:5'-TCTGATGCCTGATGGACCAGGAG-3', M32063) 20 pmole과 template DNA 5 μ L, 2.5 mM dNTP 1 μ L, 15 mM MgCl₂ 가 포함된 10X buffer 5 μ L와 2.5 U의 Taq DNA polymerase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였다. PCR 기기는 Perkin Elmer 2400 (Boston, USA)을 사용하여 다음의 반응을 (95°C 30sec, 72°C 1min, 5 cycle; 95°C 30sec, 63°C 30sec, 72°C 30sec, 20 cycle) 20회 반복하고 마지막 cycle 후 72°C 에서 5분간 반응시켰다. 이후 10 μ L의 PCR 산물을 2% agarose gel (Gibco, Gaithersburg, USA)에 전기영동한 후 EtBr (Ethidium bromide, Gibco, Gaithersburg, USA)에 염색하여 UV 로 확인하였다.

5) *S. flexneri*의 Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

S. flexneri 분리주들 사이의 유전학적인 연관 관계를 비교하기 위하여 PFGE를 수행하였으며 Gautom의 방법을 변형하여 실험하였다(10). 균주는 *S. flexneri*가 확인된 부서에서 6균주, 조리에서 참여한 종사자에서 분리된 1균주, 비슷한 시기에 인접한 지역에서 분리된 2균주, 유사한 시기에 외국 여행 후 확진된 3균주를 선택하였다. 균을 Tryptic soy 평판배지에서 밤새 배양시킨 후 배양된 균을 2-3 mL의 Cell Suspension TE (100 mM Tris pH 7.5

and 100 mM EDTA, pH 7.5)에 넣어 VITEK colorimeter를 이용하여 15-20%의 투명도로 조정하여 현탁시켰다. 이 균 현탁액 200 μ L에 Proteinase K (20 mg/mL) 10 μ L를 넣고 1.2% Seakem Gold agarose (Biowhittaker, Me) 200 μ L와 섞은 후, plug mold에 넣어 굳힌 plug를 Proteinase K 40 μ L (20 mg/mL)가 들어있는 ES buffer (0.5 M EDTA, pH 9.0; 1% sodium-lauroyl-sarcosine) 1.5 mL에 넣어 55°C에서 1시간 동안 처리하여 균을 용균시켰다. 용균 처리된 plug를 멸균된 증류수에서 55°C, 15분 동안 세척한 다음, 다시 TE buffer (10 mM Tris pH 7.5 and 1 mM EDTA, pH 7.5)에 넣어 55°C에서 15분 동안 3회 세척하였다. 세척이 끝난 plug를 1 mm 두께로 자른 다음, 자른 절편을 100 μ L의 *Not* I 반응액 (30unit)에 넣어 37°C에서 2시간 동안 반응시킨다. 이후 CHEF Mapper system (Bio-Rad, CA, USA)에서 1.0% Seakem Gold agarose gel에 넣어 0.5x TBE, 6 V/cm, 14°C, 1.0-50.2초 switch time의 조건으로 15시간 동안 전기영동을 하였으며 결과는 Tenover 등이 제시한 방법으로 분석하였다(11).

4. 통계적 방법

환자의 취식 여부와 증상여부와와의 관련성은 SPSS program으로 chi-square test와 각각의 요인에 대한 상대 위험도 및 상대위험도의 신뢰구간을 산출하였으며 통계학적 유의성은 $P < 0.05$ 수준으로 결정하였다.

결 과

1. 임상양상

조사대상은 총 258명으로 ○○회사의 정규 직원이 186명, 비정규직원이 48명, 식당을 이용한 외부인이 14명 이

Table 1. General Characteristics of Enrolled Subjects

Characteristics	No. of the person
Total no. of the enrolled person	258
Full-time employee of the company	186 (72.1%)
Part-time employee of the company	48 (18.6%)
Others (restaurant user)	14 (5.4%)
Gender (Male:Female)	150:108 (1.38:1)
Age	40.9 \pm 7.7 years
Symptomatic patients	110
Bacteriologically confirmed patients	82
Symptomatic	66
Asymptomatic	16
Not confirmed bacteriologically but symptomatic	28

었다(Table 1). 조사대상의 가족 659명에 대해서도 2차 증상자의 발생여부를 확인하기 위하여 증상여부에 대하여 설문을 실시하였다. 조사대상 중 110명이 증상이 있었으며(110/258, 42.6%) 조사대상의 가족 중 증상이 발생한 경우는 1명이었다(1/659, 0.1%).

증상자의 증상발생일의 분포는 단일정점을 보였으며 최초 증상자는 12월 24일부터 발생하였고 마지막 증상자는 12월 30일에 발생하였다(Figure 1). 주요 증상으로는 설사 110명(100.0%), 복통 90명(81.8%), 후증기 77명(70.0%), 두통 70명(63.6%), 오한 68명(61.8%), 발열 65명(59.1%), 구토 27명(24.5%)의 순으로 나타났다. 증상 중 설사의 지속기간에 대해서는 75명이 답변을 하였는데 24시간 이내가 22명(29.3%), 24-48시간 동안 지속된 경우가 29명(38.7%), 48-72시간 동안 지속된 경우가 18명(24.0%), 3일 이상 지속된 경우가 6명이었다(8.0%).

식사여부에 대하여 설문조사를 실시하여 식사여부와 증상여부의 관계를 분석한 결과, 23일(RR=1.88, 1.34≤

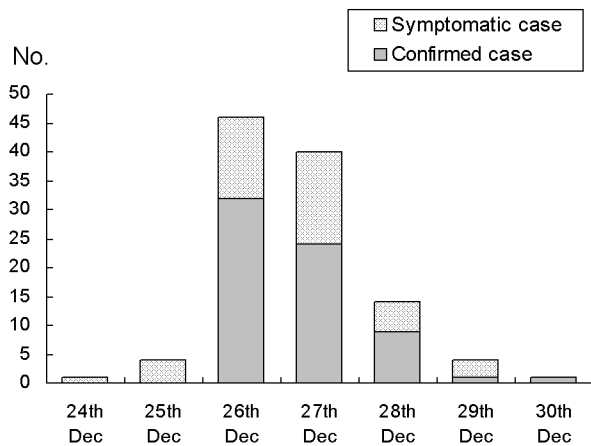


Figure 1. Time table of *S. flexneri* outbreak.

Table 2. Relative Risk and Its Confidential Interval of Dining at the Restaurant

Date	Symptomatic		Relative Risk (95% CI)
	Eat*	Not eat*	
23th Dec	68/122	30/101	1.88 (1.34-2.63)
24th Dec	88/128	10/94	6.46 (3.56-11.75)
26th Dec	89/146	19/100	3.21 (2.10-4.97)
23th Dec [†]	68/122	42/136	1.69 (1.31-2.19)
24th Dec [†]	88/128	22/130	2.96 (2.24-3.92)
26th Dec [†]	89/146	21/112	2.10 (1.68-2.63)

*Symptomatic person / Person who dined(or did not dine)

[†]Those who didn't answer the question were presumed not to have dined at the cafeteria (23th Dec: 35 cases, 24th Dec: 36 cases, 26th Dec: 12 cases)

95% CI≤2.63), 24일(RR=6.46, 3.56≤95% CI≤11.75), 26일(RR=3.21, 2.10≤95% CI≤4.97)의 취식여부의 상대위험도가 모두 통계학적으로 유의한 차이를 보였으며 특히 24일의 취식여부의 상대위험도가 가장 높았다(RR= 6.46, 3.56≤95% CI≤11.75) (Table 2). 24일의 섭취음식(배추김치, 동치미, 호박나물, 삼치찌개, 자반, 오징어젓, 콩나물국)의 상대위험도는 모두 통계학적으로 유의한 차이를 보였다(Table 3).

2. 미생물 검사결과

총 82명에서 *S. flexneri*가 확인되었으며 이중 66명은 유증상자였고(66/82, 80.5%) 16명은 무증상 보균자였다(16/82, 19.5%). 확진자에 의한 가족 내 2차 감염의 전파는 관찰되지 않았다. 확진자 82명 중 81명은 OO의 식당을 이용한 사람이었고(98.8%) 1명은 환자의 가족으로 OO 식당에서 음식을 가져다 먹은 후 발병하여 직접적으로 OO 식당의 음식 취식과 관련이 있었다. 확진자 중 1명은 OO 식당에서 직접 조리과정에 참여한 조리 종사자였으며 증상은 없었다. 확진된 조리 종사자는 12월 23일부터 26일까지 모두 조리에 참여하였다.

분리된 균주의 항균제 내성 양상을 분석한 결과 ampicillin 내성균주가 82균주 모두에서 관찰되었고 ampicillin-sulbactam 내성균주가 55균주(중등도 내성균주 40균주, 고도 내성균주 15균주)(67.1%), amoxicillin-clavulanic acid에 대한 내성균주가 61균주(중등도 내성균주 57주, 고도 내성균주 4주)(74.4%), trimethoprim-sulfamethoxazole 내성균주가 81균주로 나타났다(98.8%). 그러나 ciprofloxacin과 ceftriaxone에 대한 내성균주는 발견되지 않았다(Table 4).

배양검사 결과 분리된 *S. flexneri* 82균주에 대하여 pINV gene에 대한 primer를 이용하여 중합효소 연쇄반

Table 3. Items of 24th Dec lunch and Its Relative Risk Items

Date	Symptomatic		Relative Risk (95% CI)
	Eat*	Not eat*	
Kimchi	80/113	17/107	4.45(2.84-7.00)
Watery radish kimchi	75/107	22/112	3.56(2.41-5.29)
Seasoned pumpkin	64/89	33/130	2.83(2.05-3.91)
Meckred pot-stew	78/107	19/113	4.33(2.83-6.64)
Salted dry fish	76/104	21/115	4.00(2.67-5.99)
Pickled squid	49/70	48/149	2.17(1.64-2.87)
bean sprouts soup	82/116	15/103	4.85(3.00-7.86)

*Symptomatic person / Person who had eaten (or had not eaten)

Table 4. Results of Antimicrobial Susceptibility Test (Total=83 isolates)

Antimicrobial agents	Susceptible	Intermediate susceptible	Resistant
Ampicillin	0 (0.0%)	0 (0.0%)	82 (100.0%)
Amikacin	81 (98.8%)	1 (1.2%)	0 (0.0%)
Ampicillin/sulbactam	27 (32.9%)	40 (48.8%)	15 (18.3%)
Cephalothin	77 (93.9%)	5 (6.1%)	0 (0.0%)
Chloramphenicol	0 (0.0%)	24 (29.3%)	58 (70.7%)
Ciprofloxacin	82 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Ceftriaxone	82 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Cefoxitin	82 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Gentamycin	82 (100.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
Kanamycin	79 (96.3%)	3 (3.7%)	0 (0.0%)
Nalidixic acid	81 (98.8%)	1 (1.2%)	0 (0.0%)
Streptomycin	0 (0.0%)	0 (0.0%)	82 (100.0%)
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	1 (1.2%)	0 (0.0%)	81 (98.8%)
Ticarcillin	0 (0.0%)	2 (2.4%)	80 (97.6%)
Tetracycline	0 (0.0%)	0 (0.0%)	82 (100.0%)
Amoxicillin/ clavulanic acid	21 (25.6%)	57 (69.5%)	4 (4.9%)

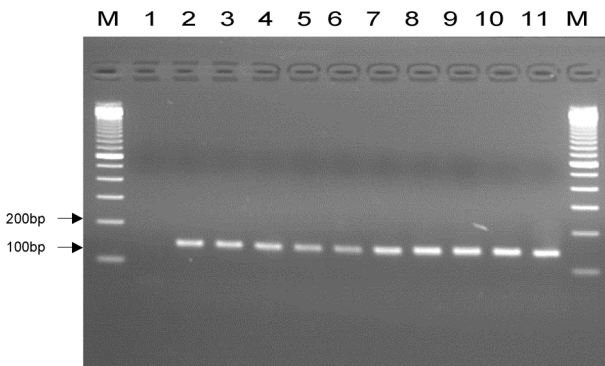


Figure 2. PCR of pINV gene for *S. flexneri* isolates. M: 100bp ladder, lane 1: negative control, lane 2-10: *Shigella flexneri* clinical isolates, lane 11: *Shigella flexneri* ATCC 9403

응을 실시한 결과 배양검사 상 분리된 균주 모두에서 양성으로 확인되었다. 그러나 배양 검사 상 균주가 분리되지 않은 검체 중 PCR에서 양성을 보인 경우는 없었다.

분리된 균주간의 연관성을 보기 위하여 실시한 PFGE 결과, 집단발병에서 분리된 균주의 경우 모두 동일한 PFGE band 양상을 보였다. 기존의 균주와의 band 양상을 비교하기 위하여 국립보건원 장내세균과에 구축되어 있는 *S. flexneri*의 PFGE data base와 비교한 결과, 국내에서는 처음으로 확인되는 유형이었다. 이 유형은 기존에 국내에서 분리된 균주들과 6개 이상의 band 차이를 보이고 있었다. 한편, 비슷한 시기에 전남 지역에서 분리된 균주와의 비교결과 동일한 PFGE band 유형을 보이는 분리주도 확인되었다. 그러나 역시 비슷한 시기에 해외 여행

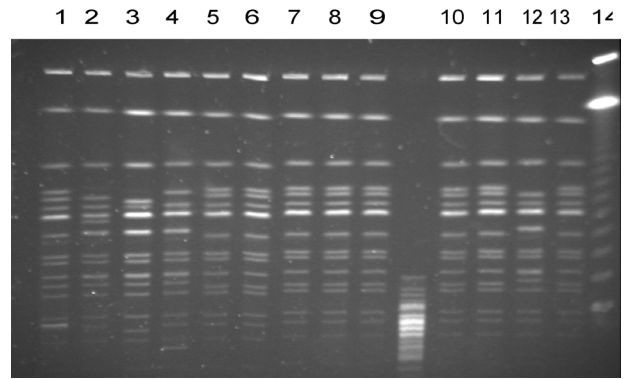


Figure 3. PFGE pattern of the *Shigella flexneri* isolates. Lane 1: type A1, Lane 2-4: Isolates from other countries, Lane 5-9 and Lane 10-11: isolates from the outbreak, Lane 12-13: Isolates from other province (Chonnam), Lane 14: Lambda ladder

객으로부터 분리된 *S. flexneri* 균주와는 7개 이상의 band 차이를 보였다(Figure 3).

고 찰

국내에서 발생한 세균성 이질의 원인 병원체는 1970년대 이후 1980년대 까지 *S. flexneri*가 주로 발생한 것에 비하여 1990년대 이후 주로 *S. sonnei*가 발생하였다. 특히 2000년도 이후 국내에서 발생한 Shigella 속 균주에 의한 집단 발병은 전남지역에서 *S. flexneri*에 의한 집단발병을 제외하고는 모두 *S. sonnei*에 의한 감염증이었다(4). 그러나 저자 등이 경험한 *S. flexneri* 감염증은 2000년도 이후 국내에서 발생한 *S. flexneri*에 의한 집단발병 중 가장 대규모의 집단발병이었다. 최근에 국내에서 분리되는 *S. flexneri*에 대한 보고 중 유행이나 집단발병에 대한 보고는 없으나 국립보건원(현 질병관리본부)에서 보고한 자료에 따르면 1998년과 1999년에 분리된 *S. flexneri* 총 289균주를 대상으로 조사한 결과 주로 혈청형은 2a가 90% 이상을 차지하였으며 주로 전남, 전북, 경남, 부산 등의 남부지역을 중심으로 발생하였음을 제시한 바 있다(12). 또한 분리된 균주의 PFGE 양상은 크게 5가지로 대별되며(group A, B, C, D, E) 이들 간에는 각각 3개 이상의 band의 차이가 보이는 부류가 없어 유전학적으로 연관성이 있는 균주로 제시하였다(12).

세균성 이질의 집단발병의 증폭요인으로는 오염된 물이나 음식이 중요한 역할을 한다(13, 14). 또한 사람이 밀집된 지역을 중심으로 2차 발병하는 특성이 있다. 본 집단발병의 경우 조리업에 직접적으로 참여한 사람 중 1명이 확진 되었으며 OO회사의 직원 중 구내 식당에서 식사를

한 사람들의 증상발생률이 식사를 하지 않은 사람에 비하여 높았다. 특히 12월 24일의 식사여부와 증상여부가 통계적으로 유의한 차이를 보였다($RR=6.46$, $3.56 \leq 95\% CI \leq 11.75$). 따라서 OO 회사의 구내식당에서의 취식여부가 집단발병에 중요한 역할을 하였다고 할 수 있다. 이러한 근거외에도 확진자 중 1명은 OO식당에서 직접 조리 과정에 참여한 조리 종사자였으며 12월 23일부터 26일까지 모두 조리에 참여하였다. 또한 미생물학적으로 확진되지 않았지만 다른 1명의 조리 종사자도 집단발병이 있었던 12월 25일 당시에 설사 증상이 있었다. 따라서 이러한 측면을 감안하면 조리 종사자들이 집단발병에 중요한 역할을 하였음을 추정할 수 있다. 그렇지만 음식이나 물에서 *S. flexneri*가 동정되지는 않아 조리과정 중 어느 경로에 의하여 감염되었는지는 명확하지 않았다.

조사결과 특징으로 첫 번째, 23일 이후 26일까지 3일 간의 취식여부는 증상여부와 통계적인 연관성을 보였다. 통상적인 유행 역학조사에서 이러한 경향을 보이는 경우는 드물다. 그렇지만 가능성이 있는 설명으로는 조리자 중 유증상자와 확진자가 있었으며 조리에 참여한 3일 동안 지속적으로 음식을 오염시켰을 가능성이 있다. 이러한 근거로는 *S. flexneri*의 균 배출기간이 4.5일 정도로 길어 증상이 없는 경우라도 지속적으로 균을 배출할 가능성이 높다는 점을 들 수 있다(15). 다른 가능성으로는 음식에 대한 설문 조사를 최초로 시행한 시점이 12월 28일 이후로 조사에 참여한 사람의 기억의 오류 및 비풀림으로 인한 가능성도 있다. 또한 조사 대상 중 취식 여부에 대하여 응답을 하지 않은 사람의 수가 23일 35명(14.9%), 24일의 경우 36명(13.6%), 26일의 경우 12명으로(4.6%) 조사대상 중 14% 정도에서 취식여부 및 음식에 대하여 정확한 답변을 하지 못한 것도 요인이 될 수 있다. 그렇지만 취식 여부에 대하여 답변을 하지 않은 사람들이 모두 음식을 먹지 않았다고 가정하여 분석을 시도한 경우에도 3일 간의 급식은 모두 통계적으로 유의한 결과를 보였다(Table 2).

두 번째 특징으로 가족 내에서의 2차 환자의 발생은 관찰되지 않았다는 점을 들 수 있다. *Shigella*속 감염으로 인한 가족과 같은 밀접한 접촉자의 경우 2차 발병율은 일부 후진국에서의 보고에 의하면 27% 정도로 보고되고 있다(15). 그러나 2차 발병율은 고정적인 것이 아니라 증상자의 조기발견 및 치료, 조리자와 같이 감염증을 전파할 수 있는 위험요인을 가진 사람들의 보균 여부 확인 등으로 감염증의 확산을 방지하려는 시도가 적절한 시기에 시행되는 경우에 감소시킬 수 있다. 본 집단발병의 경

우 2차 발병율이 낮은 이유로 증상자의 발생양상이 식중독과 같은 단일폭로에 의한 집단발병 양상을 보여 증상자의 가족이나 접촉자에 대한 역학조사가 조기에 이루어졌으며 회사 내의 무증상 보균자를 비교적 용이하게 발견 가능한 데서 기인한 것으로 추정된다. 그렇지만 1차 검사를 시행한 후 1주 간격으로 시행한 미생물학적 검사 결과 2회 이상 양성을 보인 경우가 2명에서 발견되었다. 또한 조사가 시작된 시점에서 1주 이상 경과한 후 확진된 11명의 경우 모두 증상이 있었음에도 불구하고 최초 배양 검사에서 음성을 보여 확진 시기만으로도 본다면 가족 내에서는 2차 감염의 가능성이 없었지만 직장 내에서의 2차 감염의 가능성은 완전히 배제하기는 어려울 것으로 생각된다.

Shigella 속 세균의 항균제 내성은 보고자 마다 차이가 있으나 1990년대 들어 내성률이 증가하는 양상을 보이고 있다(16-18). 아프리카의 한 국가에서 보고된 자료에 의하면 1990년대 이후 발견된 *shigella*속 세균의 ampicillin에 대한 내성률은 90%, co-trimoxazole에 대한 내성률은 85%, quinolone계열 항균제인 nalidixic acid에 대한 내성률도 11.3% 정도로 보고하였다(16). 특히 *S. sonnei*와 *S. flexneri*를 비교하였을 때 *S. flexneri*가 더 내성 발현이 잘 되는 것으로 보고하고 있다(17, 18). 또한 일부 보고에 의하면 분리된 *S. flexneri* 중 82%가 4제 이상의 약제에 내성인 것으로 보고하여 *S. flexneri*에 의한 다제 내성 문제가 됨을 제시한 바 있다(19). 본 연구에서 분리된 균주도 기존의 결과들과 유사한 양상을 보여 분리된 균주 중 ampicillin에 감수성인 균주는 한 균주도 없었으며 amoxicillin-clavulanate에 대한 내성균주는 74%, trimethoprim-sulfamethoxazole에 대한 내성균주는 98%에서 발견되었다. 따라서 1990년대 이후 *S. flexneri*에 의한 발병이 국내에서 발생한 세균성 이질에서 차지하는 비율이 낮은 상황을 감안한다면 향후 비슷한 집단발병이 있는 경우에 초기의 약제 선택에 다제 내성을 가진 균주에 의한 발병 가능성을 반드시 염두에 두어야 할 것으로 생각된다. 특히 국내의 경우 국내에서 분리된 *S. sonnei*의 경우도 다른 나라와 달리 항균제 내성율이 높으며 동일한 integron을 가지고 있어 균주간에 항균제 내성이 전파될 가능성이 높다는 점과(20, 21) 다른 나라에서 발견되지 않는 형태의 CTX-M-14 형의 ESBL이 발견된 균주도 보고된 바 있었다. 따라서 향후 세균성 이질과 관련된 역학조사 및 환자관리에 이러한 측면들을 반드시 감안해야 할 것으로 생각된다(22).

pINV는 Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)에서

발견되는 plasmid형태의 유전자이다. 이는 EIEC뿐만 아니라 *Shigella*속 세균에서 공통적으로 발견되는 230 kb 크기의 plasmid (pINV)로 침습성 감염을 유발하는데 중요한 역할을 한다(9, 23). pINV는 같은 *Shigella*속 뿐만 아니라 *S. flexneri* 군종 내에서도 pINV A와 pINV B로 대별되는 두 가지의 유형이 존재하며 pINV A의 경우 같은 plasmid내의 유전자 중에서도 ipg D와 주로 재조합이 발생하며 pINV B의 경우 mix A, mxi C 등의 유전자와 주로 재조합이 발생하는 특성을 보인다(24). 이러한 양자간의 기능적, 유전적인 재조합 양상의 차이로 인하여 발병기전의 차이를 유발하는 것으로 추정하고 있다(23, 24). 본 연구결과 pINV에 대한 primer를 이용하여 배양검사상 군주가 분리된 82군주에 대하여 PCR을 시행하였는데 모두 양성을 보였으며 배양검사 음성을 보인 경우는 PCR에서 모두 음성을 보였다. 그렇지만 이러한 결과는 집단발병 상황에서 동일한 군주에 대해서만 확인된 것으로 다른 군주와의 교차반응 여부에 대해서는 다른 군주를 포함하는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 특히, 본 연구의 경우 배양검사 및 동정, 혈청형 검사 등을 통하여 *S. flexneri*가 확인되어 감별이 가능하였지만 비슷한 임상양상을 보이면서 pINV를 가지고 있는 EIEC의 경우 교차반응이 발생할 가능성이 있으므로 pINV에 대한 PCR뿐만 아니라 반드시 배양 검사를 통하여 확인하는 작업이 필수적일 것으로 생각된다.

분리된 군주의 역학적 연관성을 확인하기 위한 방법의 하나로 PFGE는 band간의 분별능력이 높아 *Shigella*속 세균의 typing 방법으로 사용되어 왔다(25). PFGE결과 해석의 기준으로 Tenover 등이 제시한 자료에 의하면 PFGE의 band가 3개 이하로 차이가 나는 경우 군주간의 관련성이 밀접한(closed related) 것으로 정의하였고 4-5개의 차이를 보이는 경우에 군주간의 관련성이 있을 가능성이 있는(possibly related) 것으로 정의하였다(11). 분리주들에 대한 PFGE 실험결과 *Not I* 절단 PFGE band pattern이 모두 동일하였으므로 이들이 같은 clone에서 유래된 것으로 쉽게 판단할 수 있다. 또 인근 지역에서 분리된 분리주의 경우 역시 같은 band 양상을 보이는 분리주의 경우에는 같은 clone에서 유래했을 가능성이 있으나 비슷한 시기에 해외에서 유입된 군주와 비교하면 다른 양상을 보였다. 따라서 역학적으로 연관성이 의심되는 경우에 PFGE가 감별에 중요한 도구로 사용될 수 있다.

이러한 유용성에도 불구하고 PFGE결과의 해석에는 주의를 요한다. PFGE결과의 판정을 위하여 Tenover 등이 제시한 기준은 제한효소 1가지 만으로 결과해석을 하는

데 비하여 일부 보고에 의하면 제한효소 2가지 이상을 사용하여 시행한 PFGE 결과상 band pattern이 3개 이내의 차이를 보이는 경우에 연관성이 있는 것으로 더 엄격한 기준을 제시하고 있다(26-28). 또한 역학적으로 무관하지만 비슷한 시기에 발생한 *S. flexneri* 군주를 대상으로 한 일부 보고에서는 PFGE와 ribotyping, enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR 등의 방법을 모두 사용하였으나 역학적인 연관성이 없음에도 불구하고 유사한 band pattern을 보여 집단발병을 유발한 군주와 집단발병과 무관한 군주 간의 차이를 구분하지 못할 수 있음을 제시한 바 있다(29). 따라서 이러한 PFGE와 관련된 검사결과의 해석에 대한 문제점 및 제한점들을 감안한다면 첫 번째로 본 연구 결과에서와 같이 한 가지 종류의 제한효소만을 사용한 경우, *S. flexneri*가 분리된 사례와 집단발병에서 분리된 군주의 PFGE 양상만을 가지고 역학적인 연관성을 판단하기는 어렵다고 생각된다. 두 번째로, 본 연구결과 비슷한 시기에 해외에서 유입된 군주와의 PFGE상 유사성을 찾기 어려우며 본 집단발병에서 분리된 군주들이 해외 유입군주인지 혹은 국내에서 기존의 *S. flexneri* 감염증에서 드물게 분리되던 군주인지 여부는 판단이 어렵다.

본 연구의 제한점으로는 첫째로, 구내식당에서의 취식 여부가 증상발현에 중요한 역할을 하였음을 확인할 수 있었지만 구체적인 *S. flexneri*의 오염경로를 판단하는데 실패하였다는 점을 들 수 있다. 통상적인 세균배양으로는 군주를 직접적으로 증명하기 어려우므로 향후 환경 가검물에서 군주를 증명할 수 있는 민감도가 높은 방법을 고안해야 할 것으로 생각된다. 두 번째로, 단일 제한효소(*Not I*)만을 이용하여 PFGE를 시행하여 최근에 제시된 두 가지 이상의 제한효소를 사용한 PFGE를 통한 역학적인 연관성의 판정 기준에 어느 정도 부합하는지 판단하기 어렵다는 단점이 있다. 특히 본 집단발병과 무관하게, 발생 시기나 지역이 근접한 경우 분리주를 대상으로 하여 한 가지 제한 효소만으로 PFGE를 하는 경우 band 양상은 해석상 주의를 요한다는 점을 감안해야 할 것이다.

이러한 단점에도 불구하고 본 연구가 가지는 의의로는 국내에서 1990년대 이후 *S. sonnei*에 비하여 빈도가 낮은 *S. flexneri*에 의한 집단발병을 기술하였다는 점과 동시에 *S. flexneri*에 대한 항균제 내성의 분포를 제시하였다는 점에서 의의가 있으리라 생각된다. 또한 제한적이기는 하지만 PFGE를 통하여 본 집단발병에서 분리된 군주 간의 역학적 연관성을 확인하였다는 점이 의의가 있다. 또한 본 집단발병에서 분리된 *S. flexneri* 군주의 PFGE 양상이

국내에서 기존 분리주들의 PFGE 양상과 다르다는 점과 국내에서 *S. flexneri*의 발생빈도가 상대적으로 낮다는 점 등을 감안한다면 향후 해외에서 유입되는 균주 및 국내에서 분리된 균주들과의 유전적, 역학적 연관성에 대한 지속적인 감시가 필요하겠다.

요 약

배 경: 국내에서 *Shigella flexneri*에 의한 감염으로 인한 집단발병은 2000년도에 국립보건원에 집단발병례가 보고된 이후 보고되지 않았으나 최근 저자 등은 *S. flexneri*에 의한 대규모 집단발병을 경험하여 역학적인 양상을 기술하였다.

방 법: OO회사의 직원 및 구내식당을 이용한 사람 및 가족들을 대상으로 증상여부 및 2002년 12월 23일 이후 식당이용 여부와 취식음식에 대하여 설문조사를 실시하였으며 검체를 확보하여 미생물학적 검사를 실시하였다.

결 과: 조사대상 총 258명 중 총 110명에서 증상이 발생하였으며 증상발생일의 분포는 단일정점을 보였다. 확진자는 82명으로 이중 81명은 OO의 식당을 이용한 사람이었고 1명은 식당에서 직접 조리과정에 참여한 사람이었다. 식사여부와 증상여부의 관계를 분석한 결과 특히 24일의 취식여부의 상대위험도가 가장 높았다(RR=6.46, $3.56 \leq 95\% \text{ CI} \leq 11.75$). 항균제 내성 양상은 ampicillin 내성균주가 82균주(100.0%) ampicillin-sulbactam 내성균주가 55균주(67.1%), amoxicillin-clavulanic acid에 대한 내성균주가 62균주 (74.4%), trimethoprim-sulfamethoxazole 내성균주가 82균주로 나타났다(98.8%). 분리된 균주간의 연관성을 보기 위하여 실시한 PFGE 결과 본 집단발병에서 확인된 균주는 동일한 양상을 보였으나 비슷한 시기에 분리된 균주와는 서로 다른 양상을 보였다.

결 론: 본 집단발병은 국내에서 발생한 *S. flexneri*에 의한 집단발병 중 가장 대규모 집단발병이었다. 본 집단발병에서 확인된 균주간의 PFGE양상이 동일하였으나 기존에 국내에서 분리된 균주의 PFGE양상과는 다른 양상을 보였다. 따라서 이러한 상황을 감안한다면 *S. flexneri* 및 설사환자에 대한 감시체계를 강화해야 할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Kotloff KL, Winickoff JP, Ivanoff B, Clemens JD, Swerdlow DL, Sansonetti PJ, Adak GK, Levine MM : *Global burden of Shigella infections: implications for vaccine development and implementation of*

- control strategies. Bull World Health Organ* 77: 651-666, 1999
- 2) DuPont HL, Levine MM, Hornick RB, Formal SB : *Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission. J Infect Dis* 159: 1126-1128, 1989
- 3) 국립보건원 : 2001 전염병 통계연보 p 18-20, 2002
- 4) 국립보건원 : 1999년-2002년, 전염병 역학조사 보고서
- 5) 국립보건원 : 감염병 실험실 진단지침, 1996
- 6) Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M : *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol* 45:493-496, 1996
- 7) The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) : *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, 5th ed.* 13(24): M2-M5, 1993
- 8) Cole ND : *Purification of plasmid and high molecular mass DNA using PEG-salt two-phase extraction. Biotechniques* 11:18-20, 1991
- 9) Pass MA, Odedra R, Batt RM : *Multiplex PCRs for identification of Escherichia coli virulence genes. J Clin Microbiol* 38:2001-2004, 2000
- 10) Gautam R : *Rapid PFGE protocol for typing of E. coli O157:H7 and other gram-negative organism in 1 day. J Clin Microbiol* 35:2977-2980, 1997
- 11) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B : *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol* 33:2233-2239, 1995
- 12) Chun JH, Kim SH, Jeon HG, Kim JY, Kang YH, Shin KH, Lee BK : *Epidemiological Characterization of Shigella flexneri Isolates in Korea and the Analysis of Pulsed - Field Gel Electrophoresis Patterns(Korean). J Bacteriol Virol* 32:11-22, 2002
- 13) Martin DL, Gustafson TL, Pelosi JW, Suarez L, Pierce GV : *Contaminated produce--a common source for two outbreaks of Shigella gastroenteritis. Am J Epidemiol* 124:299-305, 1986
- 14) Samonis G, Elting L, Skoulika E, Maraki S, Tselentis Y : *An outbreak of diarrhoeal disease attributed to Shigella sonnei. Epidemiol Infect* 112: 235-245, 1994
- 15) Khan MU, Shahidullah M, Ahmed WU, Barua DK, Begum T, Purification D, Rahman N : *Changes in the trend of shigellosis in Dhaka: family study on secondary infection, clinical manifestation and sensitivity pattern: 1980. Trans R Soc Trop Med Hyg* 78:151-156, 1984
- 16) Iwalokun BA, Gbenle GO, Smith SI, Ogunledun A, Akinsinde KA, Omonigbehin EA : *Epidemiology of*

- shigellosis in Lagos, Nigeria: trends in antimicrobial resistance. J Health Popul Nutr* 19:183-190, 2001
- 17) Chu YW, Houang ET, Lyon DJ, Ling JM, Ng TK, Cheng AF: *Antimicrobial resistance in Shigella flexneri and Shigella sonnei in Hong Kong, 1986 to 1995. Antimicrob Agents Chemother* 42:440-443, 1998
 - 18) Bogaerts J, Verhaegen J, Munyabikali JP, Mukantabana B, Lemmens P, Vandeven J, Vandepitte J: *Antimicrobial resistance and serotypes of Shigella isolates in Kigali, Rwanda (1983 to 1993): increasing frequency of multiple resistance. Diagn Microbiol Infect Dis* 28:165-171, 1997
 - 19) Maraki S, Georgiladakis A, Christidou A, Scoullica E, Tselentis Y: *Antimicrobial susceptibilities and beta-lactamase production of Shigella isolates in Crete, Greece, during the period 1991-1995. APMIS* 106:879-883, 1998
 - 20) Lee JC, Oh JY, Kim KS, Jeong YW, Cho JW, Park JC, Seol SY, Cho DT: *Antimicrobial resistance of Shigella sonnei in Korea during the last two decades. APMIS* 109:228-234, 2001
 - 21) Oh JY, Yu HS, Kim SK, Seol SY, Cho DT, Lee JC: *Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among Shigella sonnei isolates from southwestern Korea during epidemic periods. J Clin Microbiol* 41:421-423, 2003
 - 22) Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA: *Identification of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of Shigella sonnei, Escherichia coli, and Klebsiella pneumoniae in Korea. J Clin Microbiol* 39:3747-3749, 2001
 - 23) Lan R, Stevenson G, Reeves PR: *Comparison of two major forms of the Shigella virulence plasmid pINV: positive selection is a major force driving the divergence. Infect Immun* 71:6298-6306, 2003
 - 24) Lan R, Lumb B, Ryan D, Reeves PR: *Molecular evolution of large virulence plasmid in Shigella clones and enteroinvasive Escherichia coli. Infect Immun* 69:6303-6309, 2001
 - 25) Soldati L, Piffaretti JC: *Molecular typing of Shigella strains using pulsed field gel electrophoresis and genome hybridization with insertion sequences. Res Microbiol* 142:489-498, 1991
 - 26) Luna VA, Jernigan DB, Tice A, Kellner JD, Roberts MC: *A novel multiresistant Streptococcus pneumoniae serogroup 19 clone from Washington State identified by pulsed-field gel electrophoresis and restriction fragment length patterns. J Clin Microbiol* 38:1575-1580, 2000
 - 27) Rudolph KM, Parkinson AJ, Roberts MC: *Molecular analysis by pulsed-field gel electrophoresis and antibiogram of Streptococcus pneumoniae serotype 6B isolates from selected areas within the United States. J Clin Microbiol* 36:2703-2707, 1998
 - 28) Chiou CS, Hsu WB, Wei HL, Chen JH: *Molecular epidemiology of a Shigella flexneri outbreak in a mountainous township in Taiwan, Republic of China. J Clin Microbiol* 39:1048-1056, 2001
 - 29) Surdeanu M, Ciudin L, Pencu E, Straut M: *Comparative study of three different DNA fingerprint techniques for molecular typing of Shigella flexneri strains isolated in Romania. Eur J Epidemiol* 18: 703-710, 2003