

Multiplex PCR을 이용한 *Campylobacter jejuni*의 검출 및 분리균주의 Pulsed-Field Gel Electrophoresis 양상

이재규^{*,**}, 김광엽^{**}, 구명숙^{***}, 용동은^{****}, 김의종^{*,*****}

서울대학교병원 임상의학연구소^{*}, 충북대학교 대학원 식품공학과^{**}, 지방공사 강남병원 임상병리과^{***}, 연세대학교 의과대학 임상병리학교실^{****}, 서울대학교 의과대학 임상병리학교실^{*****}

Detection of *Campylobacter jejuni* by Multiplex PCR and Patterns of Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Jae-Kyoo Lee^{***}, Kwang-Yup Kim^{**}, Myoung-Sook Koo^{***}, Dong-Eun Yong^{****}, and Eui-Chong Kim^{*****}

Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul^{*}; Department of Food Science and Technology, Graduate School of Chungbuk National University, Cheongju^{**}; Department of Clinical Pathology, Kangnam General Hospital Public Corporation^{***}; Department of Clinical Pathology, Yonsei University College of Medicine^{****}; Department of Clinical Pathology, Seoul National University College of Medicine^{*****}, Seoul Korea

Background: *Campylobacter* is the most common bacterial cause of food-borne infection in developed countries, and handling or eating of contaminated poultry products was reported as the major cause of human campylobacteriosis in sporadic cases. This study was performed to investigate the prevalence of *Campylobacter* in patients with diarrhea and raw chickens of grocery, and identify the species by multiplex PCR and determine the genotypes of isolates by *SmaI* pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) profiles.

Methods: Eight hundred and fifty six stool specimens obtained from 773 hospitalized patients with diarrhea and 16 raw chickens purchased from grocery were tested. Karmali's charcoal based selective medium and *Campylobacter* enrichment broth were used for isolation of *Campylobacter* from patients and chicken, respectively. And membrane filter method with sheep blood agar was also used in both two cases. Isolates were identified with PCR, PCR-RFLP, and biochemical test. And genotypes were determined with *SmaI* PFGE profile analysis.

Results: A total of 13 *Campylobacter* strains(1.7%) were isolated from 856 stool specimens of 773 patients with diarrhea, nine isolates were *C. jejuni* and four were *C. coli*. All of 16 raw chickens were contaminated with *Campylobacter* spp., and both of *C. jejuni* and *C. coli* were detected from eight chickens. From the *SmaI*-digested PFGE profile analysis of nine *C. jejuni* strains and four *C. coli* strains isolated from patients, eight types and four types of PFGE profile were obtained, respectively. And 15 types and seven types of PFGE profile were obtained from 23 of *C. jejuni* and 11 of *C. coli* which strains were isolated from chicken samples, respectively. The several isolates

서론

접수번호 : CM 5-01-03

교신저자 : 김의종

(110-744)서울시 종로구 연건동 28

서울대학교 의과대학 임상병리학교실

Tel : (02) 760-3500 Fax : (02) 764-3698

E-mail : euichong@plaza.snu.ac.kr

* 이 논문은 서울대학교병원 일반연구비 지원에 의해 이루어진 것임.

*Campylobacter*가 사람의 질병과 관련이 있다는 사실이 밝혀진 것은 1970년대 들어서이지만, 현재는 전세계적으로 세균성 식중독의 가장 빈번한 원인균으로 주목을 받고 있다. 1998년 미국 FoodNet의 조사에 따르

showing the different PFGE patterns were detected in the same chicken. Three PFGE patterns of *C. jejuni* isolated from patients were observed in the chickens. One type of *C. coli* PFGE profiles of the patient's isolates were the same as that of chicken.

Conclusions: The prevalence of *Campylobacter* infection is not high compared to the other countries, but most of raw chickens are contaminated with *Campylobacter* spp. Several genotypes of *C. jejuni* and *C. coli* are contaminated in the single chicken. The PFGE patterns of some human isolates are the same as those of chicken so that human infection may be originated from the chicken. But the reason of low infection rate in human in spite of the very high contamination rate of chicken should be clarified in the near future (*Korean J Clin Microbiol* 2002;5(1):35-41)

Key words: *Campylobacter*, Diarrhea, Chicken, Multiplex PCR, PCR-RFLP, Pulsed-field Gel Electrophoresis

면 세균성 식중독의 원인균에 따른 분리율을 볼 때 *Campylobacter* 21.7(10만명당 발생 건수), *Salmonella* 12.4, *Shigella* 8.5, *E. coli* O157:H7 2.8의 순이었다[1]. *Campylobacter* 감염증은 주로 장염으로, *C. jejuni*와 *C. coli*가 주된 원인균종이다. 500-800개 정도의 균수로도 감염을 일으킬 수 있으며, 유아, 어린이 및 면역이 저하된 사람들의 감염률이 높다[1-3]. 잠복기는 1-8일로 다양하나, 주로 3일 내외에서 발병한다. 설사가 주된 증상이며, 붉은 변, 점액 또는 혈변을 보이기도 하고, 복통, 열, 메스꺼움, 구토 등도 나타난다. 증상은 3-5일간 지속된다. 또한, 감염 후유증으로 급성 신경근 마비증인 Guillain Barre syndrome과 관절염증인 Reiter syndrome이 알려져 있다[3-5].

대부분의 *Campylobacter* 감염증은 개별적이며 산발적으로 일어난다. 이렇게 산발적인 경우는 여름철에 가장 많이 발생하며, 원인으로는 가금류의 취급이나 섭취와 관련된 것이 약 50% 정도로 추정되고 있다. 또한 최근 미국의 집단적 발생은 한 레스토랑에서 생닭고기 오염된 야채샐러드가 원인으로 밝혀졌으며, 이로 인하여 40명의 환자가 발생한 것으로 조사되었다[3,6].

*Campylobacter*의 형별분류에는 ribotyping과 pulsed-field gel electrophoresis(PFGE), flagellin typing 등이 일반적으로 사용되며, 여러 subtyping 방법 중 PFGE가 특히 우수한 감별력을 나타내는 것으로 보고되었다. PFGE에 사용되는 제한효소로는 *SmaI*가 가장 보편적으로 사용되며, 추가적인 감별을 위하여 *KpnI*이나 *SalI*, *SacII*, *BssHII* 등이 이용되고 있다[7-9].

본 연구에서는 설사증상으로 내원한 환자의 분변검체와 시판 생닭으로부터 *Campylobacter* spp.를 검출하여 그 감염 및 오염 실태를 파악하고, multiplex PCR 또는 PCR-restriction fragment length polymorphism(RFLP)를 통하여 균종을 규명함과 동시에 PFGE를 이용하여 분리된 균주의 유전형질을 분석하여 보았다.

재료 및 방법

검체 : 2000년 7월부터 2001년 7월 사이에 서울대학교병원, 지방공사 강남병원 및 영동세브란스병원에 설사증으로 내원한 환자 773명에서 채취한 856개의 분변 또는 직장면봉과, 2001년 7월부터 9월 사이에 서울시 소재 백화점 및 재래시장에서 구입한 생닭 16마리를 대상으로 하였다. 환자의 분변 또는 직장도말은 Cary-Blair transport medium(BBL)에 넣어 냉장보관한 상태로 운반하였다.

Cary-Blair Transport medium : Cary-Blair Transport medium 12.6 g을 991 mL에 녹이고 121°C, 15분간 고압멸균한 다음, 1% calcium chloride 9 mL을 첨가하고, 멸균된 15 mL cap-tube에 7 mL씩 분주하여 냉장보관하여 사용하였다.

FBP solution : Ferrous sulfate 2.5 g, sodium bisulfite(Sigma) 2.5 g 및 sodium pyruvate(Sigma) 2.5 g을 100 mL의 증류수에 녹이고 여과멸균하여 10 mL씩 분주하여 냉장보관하여 사용하였다.

Karmali's antibiotic supplements stock solution : Sodium pyruvate(Sigma) 1000 mg, vancomycin(Sigma) 200 mg, cefoperazone(Sigma) 320 mg 및 cycloheximide(Sigma) 1000 mg을 100ml의 증류수에 녹이고 여과멸균하여 10 mL씩 분주하여 -70°C에 보관하며 사용하였다.

CSM(Charcoal-based selective medium, Karmali's formula) : Columbia agar base(BBL) 21.25 g과 activated charcoal powder(Sigma) 2 g을 485 mL의 증류수에 녹인 다음, 0.5% hemin solution 3.2 mL을 가하고 121°C, 15분간 고압멸균하였다. 50°C로 온도를 낮춘 다음, FBP solution 5 mL와 Karmali's antibiotic supplements stock solution 10 mL을 첨가하고 Petri dish에 분주하여 냉장보관하며 사용하였다.

BAP(Blood agar plate) : Korea Media LTD의 제품(Brain-Heart Infusion agar base, 5% defibrinated sheep blood)을 구입하여 사용하였다.

CEB(Campylobacter enrichment broth with Karmali's antibiotic supplements) : Brucella broth base(BBL) 14 g을 485 mL의 증류수에 녹인 다음, 0.5% hemin solution 3.2 mL을 가하고 121℃, 15분간 고압멸균하였다. 50℃로 온도를 낮춘 다음, FBP solution 5 mL와 antibiotic supplements stock solution 10 mL을 첨가하고 250 mL의 media-bottle에 100 mL씩 분주하여 냉장보관하며 사용하였다.

여과 배양법(Membrane filter method) : 미리 약 4시간 동안 BAP를 37℃ 배양기에 넣어 표면을 적당히 건조시켰다. Membrane filter(Millipore, 0.65 μm pore size, 47 mm diameter, mixed cellulose ester)를 BAP에 올려놓고 분변희석액, 또는 증균배양액의 희석액 300 μL를 취하여 membrane filter위에 떨어뜨리고 37℃에서 1시간동안 통과시킨 다음, 멸균된 핀셋으로 filter를 조심스럽게 걷어내고 candle jar에 넣어 배양하였다.

환자 분변에서 Campylobacter의 분리 : Cary-Blair transport medium에 보관된 분변 또는 직장면봉을 BHI broth 2 mL이 든 tube에 넣고 vortex한 다음 1백금이를 취하여 CSM에 도말하고, 300 μL를 취하여 BAP에 여과 배양법으로 접종하였다. 접종한 CSM과 BAP를 Candle-jar에 넣고 37℃에서 5일간 배양하면서 2일째부터 의심되는 집락을 선발하였다.

시판 생닭에서 Campylobacter의 분리 : 구입한 생닭의 표피를 잘라 25 g을 정량하여 100 mL의 CEB에 접종한 후, 뚜껑을 느슨하게 닫은 상태로 candle jar에 넣고 37℃ shaking incubator에서 50 rpm으로 10분간 교반하였다. 이 검체희석액 중 10 mL을 취하여 다시 100 mL의 CEB에 접종하고 37℃, 50 rpm으로 4시간 예비증균한 다음 온도를 42℃로 올리고 23-24시간 증균하였다. 증균액 200 μL를 취하여 1,800 μL의 0.45% saline으로 10배씩 단계별로 희석한 후, 이 중 10배와 1,000배(또는 10,000배) 희석액을 취하여 BAP에 filter법으로 접종하였다. 42℃에서 3일간 배양한 후 의심되는 집락을 선발하였으며, 하나의 BAP에 모양, 크기, 용혈양상 등이 서로 다른 집락이 혼재할 경우 각각 1개씩의 집락을 선발하였다.

Multiplex PCR : *C. jejuni*와 *C. coli*를 동정하기 위하여 multiplex PCR을 시행하였다. 사용된 primer는 Linton 등[10]이 제안한 것으로, *C. jejuni*의 hippuricase gene에 특이적인 HIP400F (5' -GAA GAG GGT TTG GGT GGT G-3')와 HIP1134R (5' -AGC TAG CTT CGC ATA ATA ACT TG-3'), *C. coli*의 aspartokinase gene 일부와 downstream open reading frame을 포함하는 CC18F (5' -GGT ATG ATT TCT ACA AAG CGA G-3')와 CC519R (5' -ATA AAA GAC TAT CGT CGC GTG-3'), 그리고 *C. jejuni*와 *C. coli*의 rRNA gene에 특이적인 CCCJ609F (5' -AAT CTA ATG GCT TAA CCA TTA-3')와 CCCJ1442R (5' -GTA ACT AGT TTA GTA TTC CGG-3')로 총 3쌍이며, 예상되는 증폭산물의 크기는 각각 735 bp, 500 bp 및 854 bp이다.

Gram 염색상 *Campylobacter*로 의심되는 균종을 BAP에 도말하여 증식한 균집락을 100 μL의 증류수에 부유시킨 후, 동량의 CBT lysis buffer(15% Chelex-100, 1% Brij 58, 1% Tween 20)를 가하고 15분간 끓는 물에 증탕한 후 13,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 상층액을 DNA template로 사용하였다. PCR 반응액은 Tris-Cl (pH8.3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP (Roche) 0.2 mM, Taq polymerase 2.5 U(Roche), primer 각 0.2 pmol이 되도록 하여 45 μL로 만들고, 여기에 DNA template 5 μL를 가하여 총부피를 50 μL로 하였다. 반응조건은 94℃ 30초, 52℃ 30초, 72℃ 60초를 35 cycle 반복하였으며, 반응 전 denaturation은 94℃ 3분, 반응 후 extension은 72℃ 10분으로 하였다. 증폭산물은 1~2% agarose (50 μg EtBr/mL)에 전기영동하여 자외선 조사하에서 확인하였다.

PCR-RFLP : Multiplex-PCR에서 *C. jejuni*나 *C. coli*로 동정되지 않은 균주는 PCR-RFLP로 동정하였다. PCR primer는 Marshall 등[11]이 제안한 CAH16S 1a (5' -AAT ACT TGC AAG TCG AAC GA-3')와 CAH16S 1b (5' -TTA ACC CAA CAT CTC ACG AC-3')로 *Campylobacter* spp.의 16S rRNA gene을 target으로 하며, 예상되는 증폭산물의 크기는 1004 bp이다. DNA template의 제조와 PCR 반응액의 성분비는 앞의 multiplex-PCR과 동일하고, 반응조건은 94℃ 30초, 52℃ 30초, 72℃ 90초를 35 cycle 반복하였으며, 반응 전 denaturation은 94℃ 3분, 반응 후 extension은 72℃ 10분으로 하였다. 증폭산물을 2% agarose에 전기영동하여 QIAEX II Gel Extraction kit (QIAGEN)으로 정제 후 제한효소로 절단하였다. 제한효소는 일차감별에 *DdeI* (New England Biolabs)을, 추가감별이 필요할 경우 *BsrI* (New England Biolabs)을 사용하였다. 절단된 최종산물을 3% agarose에 전기영동하여 UV로 확인, Marshall 등의 결과와 비교하여 동정하였다.

PFGE : PulseNet (CDC, USA)의 rapid PFGE protocol[12]에 준하여 시행하였다. 즉, BAP에서 42℃, 24-48시간 배양한 균집락을 phosphate buffered saline (PBS, 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4, 0.85% NaCl)에 풀어 McFarland 탁도 No. 3.0으로 맞추었다. 이 중 1 mL를 원심분리한 후 침사를 200 μL의 PBS로 풀어 proteinase K 50 μL (10 mg/mL stock solution)가 들어있는 1.5 mL microcentrifuge tube에 넣고 잘 섞은 다음 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹인 동량 (200 μL)의 1% SKG agarose (SeaKem Gold agarose, FMC)와 섞어 plug mold에 분주하였다. 굳어진 plug를 5 mL의 cell lysis buffer (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0, 1% N-lauroylsarcosine, 0.1 mg proteinase K/mL)가 담긴 50 mL tube에 넣고 54℃ 항온수조에서 교반하면서 15분간 lysis하였다. Lysis가 끝난 plug를 각각 20분간 증류수로 1회, TE buffer로 3회 세척하였다. 세척이 끝난 plug를 *SmaI* buffer에 넣고 10분간 dialysis한 다음 40 U의 *SmaI* (Takara)이 포함된 *SmaI* buffer 100 μL에 넣어 25℃에서 3시간동안 digestion하였다. 처리를 마

Table 1. Incidence of *Campylobacter* spp. from patients by sex of patients and species of isolates

Species (no. of isolates)	% Incidence (no. of isolates)		
	Male (n=440)	Female (n=333)	Total (n=773)
<i>C. jejuni</i> (9)	0.9 (4)	1.5 (5)	1.2 (9)
<i>C. coli</i> (4)	0.7 (3)	0.3 (1)	0.5 (4)
Total(13)	1.6 (7)	1.8 (6)	1.7 (13)

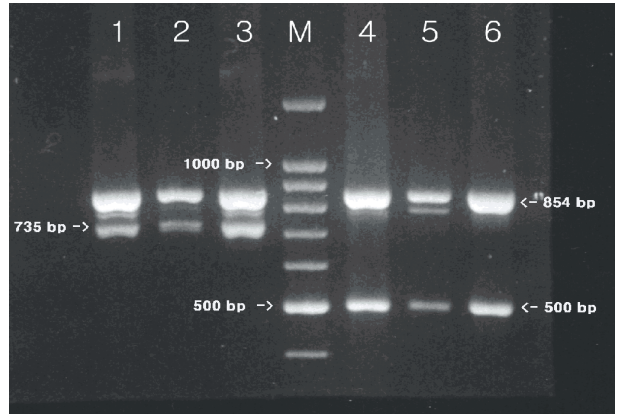


Fig. 2. Multiplex-PCR for identification of *C. jejuni* and *C. coli*. M : 100 bp ladder ; lanes 1,2, and 3 : *C. jejuni* ATCC 33291, H775BC, and C20-S, respectively ; lanes 4, 5, and 6 : *C. coli* ATCC 33559, H480C, and C20-M, respectively. Both *C. jejuni* and *C. coli* could be amplified with primers CCCJ609F and CCCJ1442R showing 854 bp PCR product. *C. jejuni*, showing 735 bp band amplified with hippuricase gene-specific primers HIP400F and HIP1134R, could be differentiated with *C. coli* showing 500 bp band amplified with primers CC18F and CC519R.

다. 촬영된 agarose gel 사진을 scanning하여, Molecular Analyst 1.0(Bio-rad) program으로 분석하였다. Similarity는 band based similarity coefficient 중 dice coefficient로 계산하였고, clustering에는 Ward algorithm을 사용하였다.

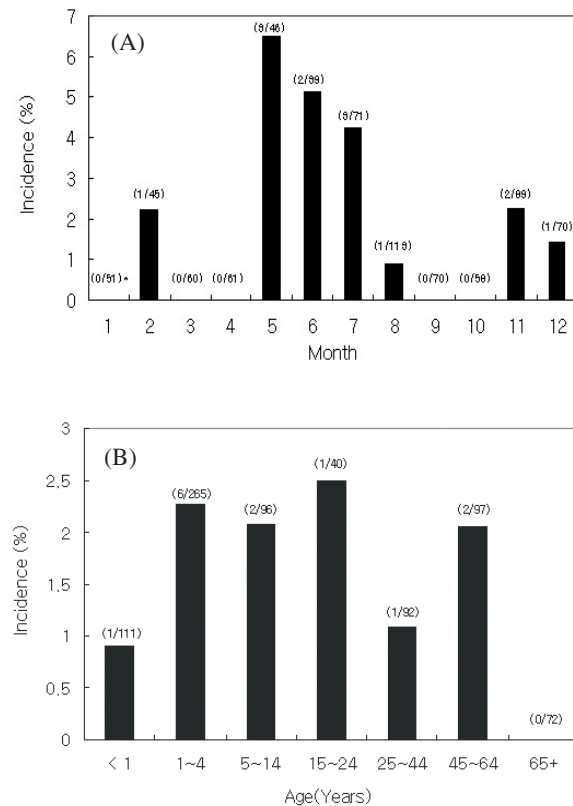


Fig. 1. Incidence of *Campylobacter* infection from patients with diarrhea. (A) By month ; (B) By age group.

친 plug와 size marker (lambda ladder PFG marker 또는 low range PFG marker, New England Biolabs)를 0.5X TBE에 녹인 1% SKG agarose gel의 well에 끼우고, 1% low melting agarose (Sea Plaque GTG, FMC)로 빈틈을 채운 다음 agarose판을 CHEF mapper™ (Bio-Rad)에 장착하고, auto algorithm으로 14℃, initial switch time 6.75s, final switch time 38.35s, gradient 6V/cm, included angle 120, running time 18h로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 agarose판을 EtBr 용액(3 µg/mL)에 침지하여 15분간 염색하고, 증류수로 30분간 세척한 다음 자외선 조사하에서 확인하였

결 과

773명의 설사증 환자로부터 채취한 총 856개의 검체 중 13명에서 *Campylobacter* spp.가 분리되어, 약 1.7%의 분리율을 나타내었다. Multiplex PCR-RFLP 및 hippurate 가수분해 검사로 동정한 결과 이 중 9균주가 *C. jejuni*이었으며, 4균주는 *C. coli*이었다. Table 1에서는 균종별 및 성별에 따른 분리율을 표시하였고, Fig. 1에서는 월별 및 연령에 따른 분리율을 도시하였다.

시판 생닭은 16마리의 검체 모두에서 *Campylobacter*가 분리되었다. 그 중 *C. jejuni*만 분리된 것이 6마리, *C. coli*만 분리된 것이 2마리, *C. jejuni*와 *C. coli*가 함께 분리된 것이 8마리이었다.

분리된 *Campylobacter* 대부분은 *C. jejuni* 혹은 *C. coli* 검출을 위한 multiplex PCR에 양성반응을 보였다(Fig. 2). 그러나, 환자에서 분리된 균주 1주 (H812C)와 생닭에서 분리된 균주 1주(C16-S)는 두 균종 모두에 해당하는 PCR band (854 bp)만 보였을 뿐, 각 균종에 특이적인 band (735 bp 혹은 500 bp)를 보이지 않은 바, PCR-RFLP 로 *C. jejuni*와 *C. coli* 중에 하나임을 확인하고, hippurate를 가수분해 하였기에 *C. jejuni*로 동정하였다.

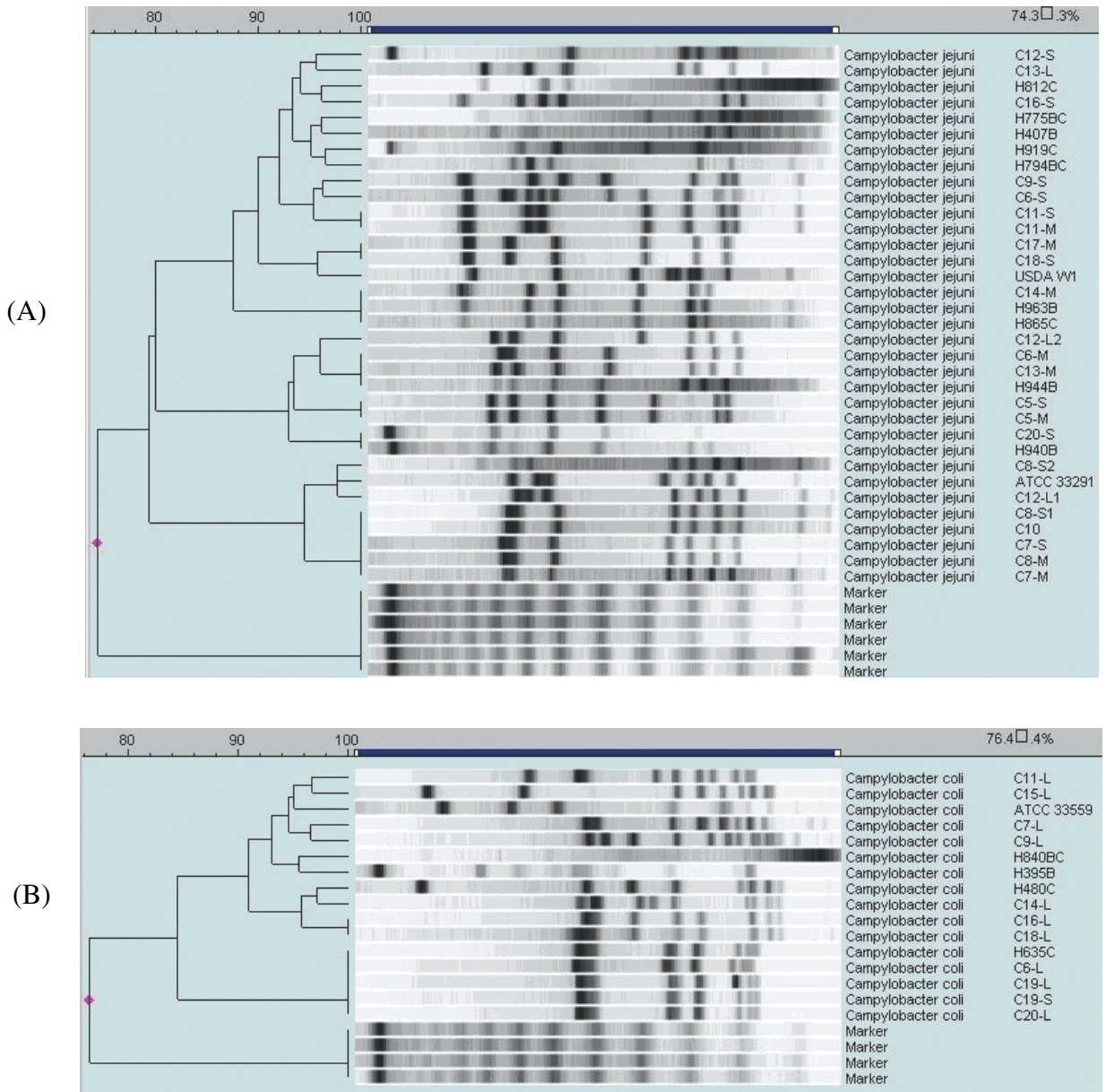


Fig. 3. *Sma*I-digested PFGE restriction profile of isolates. (A) *C. jejuni* ; (B) *C. coli*. Dendrograms were constructed with band based similarity coefficient (dice coefficient) analysis and Ward clustering.

PFGE 양상을 분석한 결과는 Fig. 3에 도시하였다. 설사 증 환자에서 분리한 *C. jejuni* 9균주와 *C. coli* 4균주로부터 각각 8가지와 4가지, 그리고 시판생닭에서 분리한 *C. jejuni* 23균주와 *C. coli* 11균주로부터 각각 15가지와 7가지의 다양한 *Sma*I 절단 양상이 관찰되었다. C6-S와 C6-M, C8-S1과 C8-S1, C12-S와 C12-L1, C12-L2, C13-L과 C13-M은 각각 동일한 생닭에서 분리된 *C. jejuni*이면서도 다른 절단 양상을 나타내었다. 또한 C7-S와 C8-M, C17-M

과 C18-S, 그리고 C19-S, L과 C20-L은 각각 다른 검체에서 분리된 균종이면서도 동일한 절단 양상을 보였다. 또한 C6-M과 C13-M, C7-M과 C10, 그리고 C6-L과 C19-L 등은 각각 서로 다른 상점에서 구입한 생닭에서 분리된 균종이나 같은 절단 양상이 관찰되었다. 설사증 환자에서 분리된 H963B, H865C는 생닭에서 분리된 C14-M, H940B는 C20-S, H944B는 C13-M, H635C는 C6-L, C19-L 및 C20-L과 각각 동일한 절단 양상을 보였다.

고 찰

설사증 환자에서의 *C. jejuni*의 분리율은 1.2%로 조사되어 정 등[13]이 0.8%, 김 등[2]이 0.5%를 보고한 것과 비슷하였고, 균종별로 차지하는 비율은 *C. jejuni*와 *C. coli*가 각각 69%와 31%로 이 두 균종이 *Campylobacter*에 의한 설사증의 대부분을 차지하고 있음을 확인할 수 있었다. 성별로는 남자에서 1.6%, 여자에서 1.8%가 분리되어 큰 차이를 보이지 않았다(Table 1). 계절별로는 5-8월 사이에 9건이 분리되어 전체의 69%를 차지하였다. 이는 산발적인 *Campylobacter* 감염증이 여름철에 비교적 많이 발생한다는 보고와 일치하는 것이다.

시판 생닭은 재래시장 수준에서 유통되는 것 뿐만 아니라 대규모 육가공업체에서 공급하는 백화점 수준의 검체도 모두 *Campylobacter*에 오염되어 있었다. 국내의 경우 일반소매점에서 판매되는 닭고기에 대한 보고는 많지 않으나, 강 등[14]이 계육에서 33.7%의 분리율을 보고하였으며, 오 등[15]은 도계공정 중 냉각 후 계육의 55%에서 *C. jejuni*의 분리율을 보고한 바 있다. 외부환경에 비교적 민감한 *Campylobacter*가 이 같은 수준으로 오염되어 있음은 *Salmonella* 등 가금류의 장관내에 널리 분포하는 기타 병원성 세균 또한 오염되어 있을 가능성을 시사하는 것으로, 도계공정상 병원균에 대한 적극적인 통제방법이 시급히 도입되어야 할 것이다.

생닭의 *Campylobacter* 분리에 사용한 증균배지(CEB)는 CSM (Karmali's charcoal-based selective medium)을 응용하여 자체 제작한 액체배지로 좋은 효과를 나타내었다. 특히 생닭 표피를 증균액체배지에 일단 행구고, 이 행균 용액을 다시 증균액체배지에 10배 희석하여 배양한 결과 높은 선택성을 나타내었다. 이 증균배양액을 선택배지(CSM)와 여과 배양법으로 접종한 결과 여과 배양법의 경우 *Campylobacter*만이 증식하여 검출이 더 용이하였다. 또한 23-24시간 배양한 증균배양액을 1,000~10,000배로 희석하여 여과 배양법으로 접종할 경우 혼재하는 여러 균종의 *Campylobacter*를 보다 효과적으로 구분할 수 있었으며, 특히 *C. coli*의 경우 *C. jejuni*에 비해 빨리 증식하여 큰 집락을 형성하였다.

SmaI PFGE profile 분석결과 C6-S와 C6-M, C8-S1과 C8-S1, C12-S와 C12-L1, C12-L2, C13-L과 C13-M은 각각 동일한 생닭에서 분리된 *C. jejuni*이면서도 다른 절단 양상을 나타내었다. 이로부터 하나의 시판 생닭 중에도 여러 가지 유전형의 *C. jejuni*가 복합적으로 오염되어 있음을 확인할 수 있었다. C7-S와 C8-M, C17-M과 C18-S, 그리고 C19-S, L과 C20-L은 각각 다른 검체에서 분리된 균종이면서도 동일한 PFGE pattern을 보였다. 구입상점을 살펴본 결과 각각 동일한 상점에서 구입한 것이 확인되었다. 이는 PFGE 기법이 식중독의 원인균에 대한 역학조사에 유용하게 사용될 수 있음을 보여주는 것이다. 또한 C6-M과 C13-M, C7-M과 C10, 그리고 C6-L과 C19-L 등

은 각각 서로 다른 상점에서 구입한 생닭에서 분리된 균종이나 같은 절단 양상이 관찰되었다. 이로부터 해당 상점들이 동일한 양계장이나 도계장으로부터 공급받은 생닭을 판매했을 가능성을 생각해 볼 수 있으며, 앞으로 양계장으로 부터 소매상까지의 전파경로를 규명해야 할 것이다. 설사증 환자에서 분리된 H963B, H865C는 생닭에서 분리된 C14-M과 절단 양상이 서로 일치하였다. 또한 환자에서 분리한 H940B와 생닭에서 분리한 C20-S, H944B와 C13-M, H635C와 C6-L, C19-L, C20-L도 각각 동일한 절단 양상을 나타내었다. 이 사실은 설사증의 원인균종이 닭으로부터 오염되었을 가능성을 의미하는 것으로서, 가금류 식품의 부주의한 취급이나 섭취가 *Campylobacter* 감염증의 주요 원인이라고 알려진 것을 뒷받침하는 자료가 될 것이다.

요 약

배 경 : *Campylobacter*는 선진국에서 세균성 식중독의 가장 흔한 원인균으로 알려져 있으며, 가금류 식품의 부주의한 취급과 오염된 식품의 섭취가 주된 감염경로로 알려져 있다. 본 연구에서는 설사증상으로 병원에 내원한 환자의 분변검체와 시판 생닭으로부터 해당 균종을 분리하여 그 감염 및 오염 실태를 파악하고, multiplex PCR로 균동정을 실시하였으며, PFGE를 통하여 분리된 균종의 유전형을 분석하였다.

방 법 : 773명의 설사증 환자로부터 채취한 856개의 분변 또는 직장면봉과 시판 생닭 16마리를 대상으로 하였다. Charcoal-based selective medium과 *Campylobacter* enrichment broth, 그리고 여과배양법을 이용하여 배양하였으며, 분리된 균종은 multiplex PCR과 PCR-RFLP, 기타 생화학 검사법으로 동정하였다. 그리고 분리균종의 *SmaI* PFGE 양상을 분석하였다.

결 과 : 773명의 설사증 환자로부터 채취한 856개의 분변검체에서 총 13주의 *Campylobacter*가 분리되어 1.7%의 분리율을 나타내었으며, 그 중 *C. jejuni*가 9주, *C. coli*가 4주이었다. 16마리의 시판 생닭 모두에서 *Campylobacter*가 분리되었으며, 그 중 8마리에서는 *C. jejuni*와 *C. coli*가 동시에 검출되었다. *SmaI* 절단 양상을 분석한 결과 환자에서 분리한 *C. jejuni* 9균주와 *C. coli* 4균주로부터 각각 8가지와 4가지, 그리고 시판생닭에서 분리한 *C. jejuni* 23균주와 *C. coli* 11균주로부터 각각 15가지와 7가지의 절단 양상이 관찰되었다. 동일한 생닭에서 서로 다른 절단 양상을 나타낸 균주가 검출되었다. 환자에서 분리된 *C. jejuni*의 절단 양상 중 3가지의 유형이 시판 생닭으로부터 분리된 균주에서도 관찰되었다. 또한 *C. coli*는 한가지 절단 양상이 생닭에서 분리된 유형과 일치하였다.

결 론 : 우리나라에서 *Campylobacter*의 감염률이 외국

에 비해 높지 않지만, 시판하는 생닭의 오염률은 매우 높았다. 한 마리의 생닭 중에도 여러 유전형의 *C. jejuni*와 *C. coli*가 복합적으로 오염되어 있음이 확인되었다. 또한 일부 균주의 경우 환자에서 분리된 *Campylobacter*의 절단 양상이 생닭에서 분리된 균주의 유형과 일치하였다. 이는 닭으로부터 오염되어 설사증을 일으켰을 가능성을 시사한다. 그러나 닭의 오염률이 매우 높지만 사람에서 감염률이 낮은 이유에 대하여 앞으로 규명해야 할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Nachamkin I and Blaser MJ. *Campylobacter*. 2nd ed. pp. 3-535, ASM press, Washington, D.C., 2000
- 김성희, 박선희, 박영식, 김창민. *Campylobacter* 감염증과 그 예방. 식품과학과 산업. 1998;31(3):56-67.
- Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI, Serdlow DL. *Campylobacter jejuni* - An emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases* 1999;5(1):28-35.
- Blaser MJ, Allos BM, Lang D. Development of Guillian-Barre syndrome following *Campylobacter* infection. *The Journal of Infectious Diseases* 1997;176(Supple 2):S91.
- Peterson MC. Rheumatic manifestations of *Campylobacter jejuni* and *C. fetus* infections in adults. *Scand JRheumatol* 1994;23(4):167-70.
- Meng J, and Doyle MP. Emerging and evolving microbial foodborne pathogens. *Bull Inst. Pasteur* 1998;96:151-64.
- Fitzgerald C, Helsel LO, Nicholson MA, Olsen SJ, Swerdlow DL, Flahart R, et al. Evaluation of methods for subtyping *Campylobacter jejuni* during an outbreak involving a food handler. *J Clin Microbiol* 2001;39(7):2386-90.
- Nielsen EM, Engberg J, Fussing V, Petersen L, Brogren CH, On SLW. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for subtyping *Campylobacter jejuni* isolates from humans, poultry, and cattle. *J Clin Microbiol* 2000;38(10):3800-10.
- Steele M, Mcnab B, Fruhner L, Degrandis S, Woodward D, Odumeru JA. Epidemiological typing of *Campylobacter* isolates from meat processing plants by pulsed-field gel electrophoresis, fatty acid profile typing, serotyping, and biotyping. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(7):2346-9.
- Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J Clin Microbiol* 1997;35(10):2568-72.
- Marshall SM, Melito PL, Woodward DL, Johnson WM, Rodgers FG, Mulvey MR. Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 1999;37(12):4158-60.
- Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 2001;39(5):1889-94.
- 정운섭, 이귀녕, 이삼열. 장염 환자에서의 *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* 분리율. 대한미생물학회지 1982;17(1):43-7.
- Kang HJ, Kim YH, Chung BG, Park CE. Epidemiological Studies on the *Campylobacter* Enteritis in Korea - 1. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in Human, Animals, Food and Water and Serotypes Isolated, *Korean J Veterinary public Health* 1989; 13(1):95.
- 오정선, 신광순, 윤용덕, 박정문. 육계 및 도계장에서 *Campylobacter jejuni*의 오염에 관한 연구. 대한식품위생학회지 1988;3(1):27-36.