

신생아에서 발생한 *Salmonella london* 집단감염의 Pulsed-Field Gel Electrophoresis 분석

순천향대학교 의과대학 천안병원 소아과학교실, 아주대학교 의과대학 임상병리학교실*

김광렬 · 이혜경 · 조성란*

= Abstract =

Pulsed-Field Gel Electrophoresis Analysis of a *Salmonella london* Outbreak in Neonates

Kwang Yeol Kim, M.D., Hye Kyung Lee, M.D. and Sung Ran Cho, M.D.*

Department of Pediatrics, College of medicine Soonchunhyang University, Chunan, Department of Clinical Pathology, College of Medicine, Ajou University*, Suwon, Korea

Purpose : *Salmonella* species is one of the most common causative organisms of acute gastroenteritis in neonates. There have been some reports of outbreaks of *Salmonella* species in neonates, but none was caused by *Salmonella london*. Pulsed-Filed Gel Electrophoresis (PFGE) was used to compare and analyze 6 isolates of *S. london* from the formula-fed neonates in Chunan city from late June through early July in the year of 2000.

Methods : In June and July 2000, we performed culture from blood and stool of 5 patients who admitted in Soonchunhyang Chunan Hospital. We performed a molecular analysis based on plasmid profile and pulsed-filed gel electrophoresis (PFGE). We reviewed their hospital records retrospectively. The affected babies were isolated during hospitalization and discharged home as soon as possible. In addition, hand washing, cleaning, and disinfection were intensified to prevent the spread to other babies.

Results : We isolated 6 strains of *S. london* from stool or blood samples of five patients, who were 9 to 14 days old and had fever, diarrhea, poor feeding or weight loss. The specimens for culture of *Salmonella* species were obtained on the admission day of every patient. All *Salmonella* species showed the same biochemical reactions as slant/butt on KIA -/+ , H2S +, gas +, motility +, indole -, ornithine decarboxylase +, lysine decarboxylase +, and citrate utilization +. They also showed agglutininations by *Salmonella* serogroup E antisera. They were susceptible to all antimicrobial agents tested by NCCLS disk diffusion method. The clonality of isolates was confirmed by PFGE after digestion with Xba I and revealed the similar band patterns of *S. london*.

Conclusion : We have reported the outbreak of *S. london* of the formula-fed neonates in Chunan city from late June through early July in the year of 2000. Pulsed-Filed Gel Electrophoresis (PFGE) would be essential for the molecular and epidemiologic studies for the outbreaks caused by *Salmonella* species. (J Korean Soc Neonatal 2001;8:222-228)

Key Words : Pulsed-Filed Gel Electrophoresis (PFGE), *Salmonella london*

책임저자: 이혜경, 충남 천안시 봉명동 23-20
순천향대학교 의과대학 천안병원 소아과학교실
Tel : 041)570-2160, Fax : 041)572-4996
E-mail : hyekyung@sparc.schch.co.kr

서 론

최근에 *Salmonella* 감염증은 경제수준의 향상과 의료의 발달로 *S. typhi*에 의한 발생은 현저히 감소하였으나, 식생활의 변화, 식품유통구조의 변화, 외국과의 교역증대 등으로 비장티푸스성 *Salmonella*에 의한 감염증이 증가하는 경향을 보이고 있다.¹⁾ 신생아의 *Salmonella* 감염증은 소아에 비해 bacteremia가 흔하고 뇌막염과 같은 신경계 합병증으로 진행되기 쉽다. 최근 거대 DNA를 물리적 조작에 의해 유전자 지도를 작성하는데 사용되는 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)를 이용하여 세균들의 정확한 분류 및 규명에 폭넓게 사용되고 있다. 저자들은 2000년 6월에서 7월까지 신생아에 발생한 *S. london*의 집단 감염을 경험하였으며 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)를 이용하여 그 역학적 조사를 시행하였기에 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

대상 및 방법

1. 대 상

2000년 6월 25일에서 7월 8일까지 순천향대학교 천안병원 신생아실에 입원한 환자 중 임상 검체에서 *Salmonella*가 배양된 6균주와, 환자 5례를 대상으로 하였다. 같은 시기에 소아과 병동에 입원하여 *S. london*으로 진단된 균주 1례도 포함하였다.

2. 방 법

1) 세균 배양 및 항균제 감수성 검사

배양 검사가 의뢰된 검체는 입원 당일 채취한 검체이며 MacConkey 배지와 *Salmonella-Shigella* 배지에 접종한 후 35°C에서 하룻밤 배양하여 균 집락을 관찰하였다. *Salmonella*의 동정은 고식적인 생화학적 방법을 시행하였다. 혈청군은 *Salmonella* 항혈청에 의한 응집반응 검사로 Murex, UK 를 포함시켜서 시행하였다(정남 보건환경 연구원에서 시행). 항균제 감수성 검사는 NCCLS 디스크 확산법²⁾에 준하여 ampicillin, cephalothin, cefoxitin, cefotaxime, amikacin,

gentamicin, imipenem, ciprofloxacin에 대하여 시험하였다. 감염원 조사는 신생아실 근무자 및 의료진, 수유시 사용되는 식수, 분유 등에서 배양검사를 시행하였다.

2) Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)를 이용한 분자생물학적 역학 분석

일반적인 전기영동 방법에 의해서 분리될 수 있는 DNA의 크기는 약 20kb 정도이며, 이 이상의 크기를 갖는 DNA 분자들은 같은 이동성(mobility)을 갖기 때문에 일반적인 전기영동 방법으로는 분리되지 않는다. 전기장의 방향을 조절하면서 분자량이 큰 DNA들을 분리하기 위해 개발된 방법이 PFGE 방법이다.

(1) DNA 준비

환아의 혈액과 대변으로부터 *Salmonella*를 분리한 후에 균 세포로부터 DNA를 추출하기 위하여 PBS buffer에 세포들을 모은다. 차가운 PBS buffer로 세포를 2회 세척후 hemocytometer를 이용하여 2 x 10⁷ cells/ml이 되게 PBS에 부유시킨후 37°C로 배워준다. PBS에 녹인 low melting agarose와 동량을 섞고 0.5M EDTA, 1% Sarcosyl, 0.5mg/ml Proteinase K 용액으로 옹긴 후 50°C에서 1-2일 동안 digestion 시킨다.

(2) Agarose 상에서 DNA 절단

검체를 세척한 후에 restriction endonuclease *Xba*-I (5'-TCTAGA-3')을 이용 DNA 1 µg 당 2-10 U 제한효소를 이용하여 적절한 온도에서 DNA를 자른후 0.5 M EDTA 1 ml을 첨가하여 반응을 종료시키고 실온에서 5분간 방치한다. Agarose gel의 wells에 agarose slice을 넣고 전기영동을 시작하기 전에 gel을 chamber에 넣어 30분 정도 영동 온도로 equilibration 시킨다.

(3) 전기영동

CHEF-DRII system(Bio-rad) 이용하여 ramped pulse time 0.5 s/60 at 6V for 20 h로 Pulsed-Field Gel Electrophoresis(PFGE) 시행하여 DNA fragmentation patterns 분석하였다.

Table 1. Patients profiles

Patient No.	Sex/Age	Ward	Specimen	Hosp. Day of culture taken	Clinical manifestations
1	F/ 1month	nursery	Blood	1	Fever, Diarrhea
2	F/ 5day	nursery	Stool	1	Fever, Diarrhea
3	F/ 13day	nursery	Blood	1	Fever, Diarrhea, Poor feeding
4	M/ 9day	nursery	Stool	1	Diarrhea, Poor feeding
			Blood	1	
5	M/ 7day	nursery	Stool	1	Poor feeding

결 과

1. 환아들의 임상적 특징

총 5례 중 4례에서 설사, 3례에서 발열, 1례에서는 식욕부진의 임상증상을 나타내었으며, 총 5명중 4명은 천안시, 1명은 아산시에 거주하였고, 모두 천안지역 개인병원에서 각각 출생하였다. 총 5례중 5례 모두 조제 분유를 수유하였으며 수유시 수돗물을 끓여서 사용하였다(Table 1). 사망한 례는 1례도 없었지만 1례에서 범발성 혈관내 응고증이 발생하였다.

2. 분리된 *Salmonella*의 미생물학적 특징

혈액배양에서 3균주, 대변배양에서 3균주 총 6균주가 MacConkey 배지와 Salmonella-Shigella 배지에서 무색의 균집락을 보였으며 모든 균주에서 생화학 반응검사서 KIA -/+, H2S +, gas +, motility +, indole -, ornitine decarboxylase +, lysine decarboxylase +, citrate utilization + 반응을 보였다(Table 2). 항균제 감수성검사는 NCCL 디스크 확산법에 준하여 ampicillin, cephalothin, cefoxitin, cefotaxime, amikacin, gentamicin, imipenem, ciprofloxacin에 대해 감수성을 나타냈다. 혈청군은 모두 salmonella E군, 혈청형은 *S. london* 이었다.

감염원 조사를 위하여 시행한 신생아실 근무자 및 의료진, 수유시 사용되는 식수, 분유 등에서의 배양검사 결과는 모든 검체에서 음성반응을 보였다.

3. Pulsed-Field Gel Electrophoresis(PFGE) 분석결과

PFGE 이용한 분자생물학적 분석 결과 신생아실에

Table 2. All isolates showed the same biochemical reactions as shown below

Test	Result
Slant/butt on KIA	K/A
H2S	+
Motility	+
Indole	-
Ornitine decarboxylase	+
Lysine decarboxylase	+
Citrate utilization	+

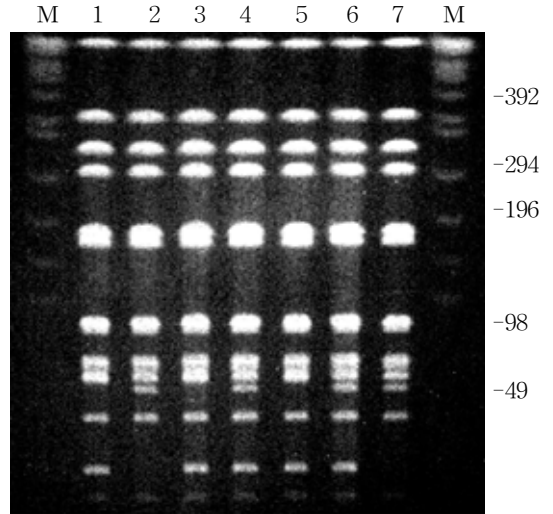


Fig. 1. Agarose gel showing the *Xba* I digestion patterns of *S. london* isolates involved in outbreaks of salmonellosis in chunan. Which could be grouped into 3 subtypes. Values on the right (in kilobase pairs) refer to the positions of marker band.

서 분리된 6균주 간에 *S. london*과 유사한 띠 양상을 보여주었고 3개의 subgroup이 분리되었다. 또한 소아과 병동에 입원한 환아에서 분리된 균주와 유사한 밴

Area	STR	SXT	TIC	TET	Tested number	Year of isolation	PFGE type (No.)
Busan	1				1	1999	A0 (1)
Incheon	1				1	2000	A0 (1)
Gwangju					2	2000	A0 (2)
Daejeon					1	2000	A0 (1)
Gangwon	17				26	2000	A0 (25)
Gyeonggi	1				1	1999	A0 (1)
Chungnam	3			3	10	2000	A0 (7), A1 (3)
Jeollanam	3		1	1	10	1999.2, 1999.1, 2000.8	B0 (1), C0 (1), D0 (1), A0 (6)
Gyeongbuk	2	2			2	1998	A0 (2)

STR, Streptomycin; SXT, Trimethoprim/Sulfamethoxazole; TIC, Ticarcillin; TET, Tetracycline.

Fig. 2. 1998-2000년에 우리나라에서 검출된 *S. london*의 antibiogram. 총 54군 주 검출 4개의 subgroup typing 확인, 대부분 Streptomycin에 감수성을 보였다.

드 양상을 나타내었다(Fig. 1).

고 찰

*Salmonella*는 운동성을 가진 그람음성 호기성 간균으로 O 항원형에 따라 A군에서 F2군까지 나누어지며 다시 균체 항원과 표면 항원에 따라 1,400종 이상의 혈청형으로 세분화된다.³⁾ 국내에서는 1990년대 이후 장티푸스를 일으키는 D군의 *S. typhi*에 의한 감염은 현저히 감소하고 있으나 비장티푸스 성 *Salmonella* 감염은 오히려 증가하는 추세를 보이고 있다.⁴⁾ 국립보건원의 보고⁵⁾에 의하면 1999년에 국내에서 확인된 *Salmonella* 균주는 총 2,342주, 8종의 혈청군, 40종의 혈청형으로 구분되는데 이중 *S. enteritidis*균은 전체의 58.9%를 차지하며 또한 최근 *S. Panama* 등 새로운 혈청형이 확인되고 있다. 국내에서 *Salmonella* E군에 속하는 *S. london*은 과거의 문헌에서는 거의 보고되지 않던 혈청형으로 최근에 유아에서 많이 분리되는 경향을 보였고 2000년도에 발생한 *S. london*의 연령별 분리 현황을 보면 1-5세에서 71주(85.5%)의 높은 분리율을 보였다.⁶⁾ 그러나 신생아에서 *S. london* 집단 감염에 대한 문헌 보고가 아직 없는 상태이다.

*Salmonella*의 감염은 대부분 오염된 물이나 음식을 통하여 이루어지는데 Lantos 등⁷⁾은 닭고기 와 고기 가공품을 통하여 *S. london*의 집단감염을, Djuretic

등⁸⁾은 분말 분유를 통하여, Rushidy 등⁹⁾은 영아식품 (baby cereal)을 통한 *S. senftenberg*의 집단 감염을 보고하였다. 유럽과 미국에서도 분말 분유를 통한 *S. virchow*의 집단 감염 보고가 있었다.¹⁰⁾ 신생아와 영유아의 *Salmonella* 감염증은 식이를 분유에 의존하므로 분유와의 연관성이 중요한 원인으로 생각되어지고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 또한 신생아실 간호사, 신생아실, 조리사, 병원의 원내 감염으로도 감염될 수 있다.¹⁴⁻¹⁹⁾ 본 연구의 경우 내원 당일 검체에서 균주가 배양되어 원내 감염은 배제되었으며 모두 조제 분유를 수유한 점과 동일 지역의 공동 상수도 시설이라는 점으로 감염원을 생각할 수 있으나, 당시 먹던 분유 캔이나 수돗물에서 균이 규명되지 않았다. 2000년도 국립보건원의 보고⁶⁾에 따르면 본 연구와 동일한 시기에 강원도에서도 *S. london*에 의한 집단 감염이 보고되었고 PFGE 분석상 같은 형의 균으로 판명되었으며 대부분 1개월에서 5개월까지 영아에서 발생한 점으로 영아의 식이 특성상 상수도보다는 우유 매개성일 가능성이 높다(Fig. 2). 감염의 전파를 막기 위하여 가능한 조기 퇴원을 권하였으며 손을 통한 전파를 막기 위하여 손씻기를 권장하여 더 이상의 이차적인 원내 감염을 막을 수 있었다.

요 약

목 적 : *Salmonella*는 신생아에서 급성 위장관염

을 일으키는 흔한 균주이며 이중 *S. london*에 대한 집단 감염에 대한 보고는 없다. 저자들은 천안지역에서 같은 시기에 *S. london*이 배양된 감염례에 대하여 Pulsed-Field Gel Electrophoresis 분석을 이용하여 역학조사를 시행하였다.

방 법 : 2000년 6월에서 7월 사이에 천안 순천향대 학병원에 입원한 출생 9일에서 14일 사이의 신생아 5명의 임상검체에서 *Salmonella*가 배양된 6균주를 대상으로 생화학반응검사를 시행하여 혈청군을 확인하고 Pulsed-Field Gel Electrophoresis 분석을 시행하였다.

결 과 : 5례의 신생아 모두에서 세균 배양 검사 상 *Salmonella E*군 양성이었다. 생화학반응검사에서 KIA -/+ , H₂S + , gas + , motility + , indole - , ornithine decarboxylase + , lysine decarboxylase + , citrate utilization + 소견을 보였다. Pulsed-Field Gel Electrophoresis에서 같은 양상의 띠양상을 보였으며 *S. london*으로 확인되었다.

결 론 : Pulsed-Field Gel Electrophoresis 이용한 분자생물학적 역학분석에 의하여 천안지역에서 2000년 6월에서 7월 사이에 조제분유를 수유한 신생아에서 *S. london*의 집단감염을 확인하였다. PFGE 분자역학 검사가 집단감염의 증명에 유용할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 나송이, 박진영, 이환중, 서정기. 10년간(1986-1995) 소아 살모넬라 감염증의 발생양상 및 임상상. *감염* 1999;31:129-35.
- 2) Keihlbauch J.A, Hannett G.E, Salfinger M, Archinal W, Monserrat C, Carlyn C. Use of the National Committee for Clinical Laboratory Standards guideline for disk diffusion susceptibility testing in New York state laboratories. *J Clin Microbiol* 2000;38:3341-8.
- 3) 진홍신, 홍영진, 이명익, 송근찬. 소아기 *Salmonellosis*의 임상적 관찰. *소아과* 1994;37:199-204.
- 4) 박난미, 최명재, 정미진, 김희섭, 김길현, 이학수. 신생아에서 발생한 유행성 비장티푸스성 살모넬라증에 대한 임상적 관찰. *소아과* 1995;38:20-6.
- 5) 국내 살모넬라 감염현황. *감염병 발생정보지* 2000;2: 68-9.

- 6) 국내 유아에서의 *Salmonella london* 분리. *감염병 발생정보지* 2001;12:74-6.
- 7) Lantos C, Rushdy AA, Wall R, Seng C, Wall PG, Stuart JM, et al. Application of molecular methods to a nosocomial outbreak of *Salmonella enteritis* phage type 4. *J Hosp Infect* 1997;36: 123-31.
- 8) Djuretic T, Wall PG, Ryan MJ, Evans HS, Adak G, Cowden JM. General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales 1992 to 1994. *Common Dis Rep CDR Rev* 1996;6:57-63.
- 9) Rushdy AA, Stuart JM, Ward LR, Bruce J, Threlfall EJ, Punia P, Bailey JR. National outbreak of *Salmonella senftenberg* associated with infant food. *Epidemiol Infect* 1998;120:125-8.
- 10) Usera MA, Echeita A, Aladuena A, Blanco MC, Reymundo R, Pioto MI, et al. Interregional foodborne salmonellosis outbreak due to powdered infant formula contaminated with lactose-fermenting *Salmonella virchow*. *Euro J Epidemiol* 1996;12:377-81.
- 11) Rowe B, Begg NT, Hutchinson DN, Dawkins HC, Gilbert RJ, Jacob M, et al. *Salmonella ealing* infections associated with consumption of infant dried milk. *Lancet* 1987;17:900-3.
- 12) Threlfall EJ, Ward LR, Hampton MD, Ridley AM, Rowe B, Roberts D, et al. Molecular fingerprinting defines a strain of *Salmonella enterica* serotype Anatum responsible for an international outbreak associated with formula-dried milk. *Epidemiol Infect* 1998;121:289-93.
- 13) Usera MA, Rodriguez A, Echeita A, Cano R. Multiple analysis of a foodborne outbreak caused by infant formula contaminated by an Atypical *Salmonella virchow* strain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:551-5.
- 14) Piyush Gupta, Ramachandran VG, Sharma PP, Faridi MMA, Talwar V, Mathur M. *Salmonella senftenberg* Septicemia: A Nursery Outbreak. *Indian Pediatr* 1993;30:514-6.
- 15) Kumarasinghe G, Hamilton WJ, Gould JDM, Palmer SR, Dudgeon JA, Marshall WC. An outbreak of *Salmonella muenchen* infection in a specialist pediatric hospital. *J Hosp Infect* 1982; 3:341-4.
- 16) Chaturvedi P, Narang P, Dubey AP, Mathur NB. *Salmonella senftenberg* epidemic in a neonatal nursery. *Indian Pediatr* 1987;24:199-202.
- 17) Joseph AT, Rammurty DV, Srivastava L, Gupta R, Man Mohan, Anand NK. *Salmonella senftenberg* outbreak in a neonatal unit. *Indian*

- Pediatr 1990;27:157-60.
- 18) Maguire H, Pharoah P, Walsh B, Davison C, Barrie D, Threfall EJ, et al. Hospital outbreak of *Salmonella virchow* possibly associated with a food handler. J Hosp Infect 2000;44:261-6.
- 19) Mehta G, Malik A, Singh S, Kumari S. Asymptomatic *Salmonella senftenberg* carriage in a neonatal ward. J Hosp Infect 1992;22:317-22.
- 20) Kwai-Lin T, Yuet-Meng C, Savithry Puthucheary, Chong-Lee K, Tikki P. Epidemiologic Analysis of Sporadic *Salmonella typhi* Isolates and Those from outbreak by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. J Clin Microbiol 1994;32:1135-41.