

Article

경기도 식중독에서 분리된 *Clostridium perfringens*의 유전적 특성 분석

박성희* · 최옥경 · 정진아 · 김운호 · 이예은 · 박광희 · 윤미혜

경기도보건환경연구원 감염병조사팀

Genetic diversity of *Clostridium perfringens* from food-poisoning outbreak in Gyeonggi-do, 2013-2014

Sung-Hee Park*, Ok-Kyung Choi, Jin-A Jeong, Woon-Ho Kim, Yea-Eun Lee, Kwang-Hee Park, and Mi-Hye Yoon

Team of Infectious Disease Investigation, Gyeonggi Institute of Health and Environment, Suwon 16205, Republic of Korea

(Received July 7, 2016; Revised July 29, 2016; Accepted August 8, 2016)

ABSTRACT: *Clostridium perfringens* is both a ubiquitous environmental bacterium and a major cause of human gastrointestinal disease, and *C. perfringens* food poisoning ranks among the most common gastrointestinal diseases in developed countries. 120 isolates of *C. perfringens* were obtained from food-poisoning outbreaks in 2013-2014, Gyeonggi-do. Using PCR, all 120 isolates were identified as *C. perfringens* type A. Of the tested isolates, 49 isolates carried the *cpe* gene, 71 isolates carried the *cpb2* gene. The outbreak cases of *cpb2* and *cpe* / *cpb2* genes were 7 and 7, whereas the outbreak cases of *cpe*-gene were 2. The epidemiological relationship between *C. perfringens* isolates has previously been investigated chiefly by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multi-locus sequence typing (MLST). The genetics relatedness of the isolates ranged from 53.5-100% and 75 distinct PFGE type were observed. The PFGE results revealed a wide genetic diversity among the 64 *cpb2*-carrying isolates (except 7 isolates), while 46 *cpe*-carrying isolates (except 3 isolates) showed a high genetic similarity. The MLST analysis revealed that 14 *cpe* isolates (*cpe*-chromosomal isolates) belong to a distinct cluster that is significantly distant from all the other *cpb2* isolates (*cpe*-plasmid carrying and *cpe*-negative isolates). The isolates carrying a *cpb2* appear to be rarely related, and are more variable than chromosomal *cpe* isolates. The results suggest that the *cpe*-positive outbreak isolates showed close genetic relation, whereas the *cpb2*-positive isolates revealed a wide genetic diversity.

Key words: *Clostridium perfringens*, MLST, PFGE, toxinotype

*Clostridium perfringens*는 아포를 형성하는 혐기성 그람 양성 간균으로, 토양, 하수 및 사람과 동물의 장관계에 존재하며, 식중독뿐 아니라 가스괴저, 괴사성장염, 괴저성장염 등 다양한 질병을 유발한다(Rood and Cole, 1991). *C. perfringens*는 4개의 주요한 독소(Alpha, beta, epsilon, iota) 생산유무에 따라 A~E형으로 분류된다. Type A는 alpha 독소를 생산하며, 사람과 동물에서 가스괴저(clostridial myonecrosis)를 유발하고, 세계각지의 선진국에서 식중독 및 경미한 설사를 유발한다. Type C는 alpha, beta 독소를 동시에 생산하며, 사람과 동물에서 괴사성장염을 일으킨다(Brynstad and Granum, 2002). Type B, D, E는 주로 동물에서 괴사성장염, 출혈성장염, 장독

혈증 등을 일으킨다(Uzal et al., 2010).

*C. perfringens*는 독소형을 결정하는 위 4개의 독소를 포함한 최소 16개 이상의 독소를 생산하는 것으로 알려져 있으며, enterotoxin (CPE), beta2 toxin (CPB2), theta toxin (PFO) 등이 병변을 일으키는 주요 독소로 알려져 있다(Uzal et al., 2010). 그 중 CPE 독소는 claudin receptor에 작용하여 pore formation, cytotoxicity를 일으키는 독소로, 사람에서 식중독, 항생제 관련 설사(Antibiotic associated diarrhea/AAD) 및 산발적 설사(Sporadic diarrhea/SD)를 일으킨다. 또한 *cpe* 유전자는 chromosome 이나 plasmid 내에 존재하는데, type A *C. perfringens*에 의한 대부분의 식중독을 유발하는 중요한 원인균은 chromosome-*cpe* (C-*cpe*) carrying strain으로 알려져 있다. Plasmid-*cpe* (P-*cpe*) carrying strain들은 AAD/SD에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 간혹 식중독 유발에 관여하기도 한다(Deguchi et al., 2009).

*For correspondence. E-mail: babo107@gg.go.kr;
Tel.: +82-31-250-2548; Fax: +82-31-888-0427

CPB2 독소는 small G protein을 변경시키는 등 세포 내 pore-forming cytotoxic effect를 일으키며 plasmid에 존재한다(Harrison *et al.*, 2005). 사람의 AAD/SD나 드물게 식중독에서 보고되며, 동물에서 장염, 설사, 장독혈증, 맹결장염 등에 연관된다고 알려져 있다(Brynestad and Granum, 2002; McClane, 2005).

아포를 형성하는 *C. perfringens*의 특성상 대량의 음식을 다루는 식품산업에 문제를 유발하며, 부적절한 음식의 조리, 저장 및 유통으로 인해 음식점, 병원, 가정집 등에서 *C. perfringens*에 의한 식중독 발생이 보고되고 있다(Uzal *et al.*, 2010). 질병관리본부에서 2012년 이후 수인성식품매개 질환 실험실 진단 실무지침에 *cpb2* 유전자를 포함시킨 후, 전국의 *C. perfringens*에 의한 식중독이 2012년 11건(265명)에서, 2013, 2014년 30건(621명), 28건(1,707명)으로 증가하였고, 경기도 역시 2012년 발생보고가 없었으나, 2013, 2014년 11건(334명), 12건

(879명)으로 급격히 증가하였다(Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2012~2014). 본 연구는 경기도내 식중독에서 분리된 *C. perfringens* 균주를 대상으로 독소유전자 보유현황 및 PFGE, MLST 검사를 수행하여 분리 균주 간의 분자역학적인 관계를 규명하여 식중독 예방을 위한 기초 자료로 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

C. perfringens 분리 및 동정

2013년과 2014년 경기지역 식중독 발생 26건 중 5명 이상의 환자에서 *C. perfringens*가 분리된 건과 환자 이외 조리종사자나 보존식에서 *C. perfringens*가 분리된 건을 선택하여 16건

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in this study

Application	Gene	Nucleotide sequence (5' → 3')	Amplicon size (bp)	Analysed size (bp)	Reference
Toxinotyping	CPA (alpha)	GTTGATAGCGCAGGACATGTTAAG CATGTAGTCATCTGTTCCAGCATC	402		Yoo <i>et al.</i> (1997)
	CPB (beta)	ACTATACAGACAGATCATTCAACC TTAGGAGCAGTTAGAACTACAGAC	236		
	ETX (epsilon)	ACTGCAACTACTACTCATACTGTG CTGGTGCCTTAATAGAAAGACTCC	541		
	ITX (iota)	GCGATGAAAAGCCTACACCACTAC GGTATATCCTCCACGCATATAGTC	317		
Detecting	CPB2 (beta2)	Multiplex PCR Kit (Kogenebiotech)			
	CPE (enterotoxin)	Multiplex PCR Kit (Kogenebiotech)			
MLST	colA	ATTAGAAAAGTTTATGTACAATAGGTG AAGACATTCTATTATTCTATCGTAAGC	816	670	Deguchi <i>et al.</i> (2009)
	plc	AGGAACTCATGATTGTAAGTC GGATCATTACCCTCTGATACATCGTG	725	541	
	sigK	CAATACTTATTAGAATTAGTTGGTAG CTAGATACATATGATCTTGATATACC	643	589	
	sod	CAAAAAAAGTCCATTAATGTATCCAG TTATCTATTGTTATAATATTCTTCAC	663	502	
	nadA	ATTAGCACATTATTATCAAATTCCTG TTATATGCCTTTAATCTTAAATCCTC	821	689	
	gyrB	ATTGTTGATAACAGTATTGATGAAGC ATTTCCCTAATTTAGTTTGTGTTGCC	905	735	
	groEL	TACAAGATTTATTACCATTACTTGAG CATTTCTTTTCTGGAATATCTGC	901	685	
	pgk	GACTTTAACGTTCCATTAAGAGATGG CTAATCCCATGAATCCTTCAGCGATG	830	681	

120개의 균주를 선별하였다. 균주분리를 위해 Tryptose Sulphite Cycloserine (TSC) 배지에 접종하여 37°C에서 18-24시간 혐기배양 후, 흰색 띠를 형성하는 백색집락을 분리하였다. 분리된 집락은 Multiplex PCR Kit (Kogenebiotech)를 이용하여 *cpa*, *cpe*, *cpb2* 독소 유전자 유무를 확인하였고(Table 1), VITEK ANC CARD (bioMérieux)를 이용하여 최종 동정하였다.

Toxinotype 확인

120개 균주의 toxinotype을 확인하기 위해, CPA (alpha, *cpa*), CPB (beta, *cpb*), ETX (epsilon), ITX (iota) 독소 유전자에 대한 PCR을 실시하였다. 4개의 독소 유전자 증폭을 위한 primer 및 PCR 조건은 Yoo 등(1997)의 방법으로 수행하였다 (Table 1).

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

*C. perfringens*의 PFGE 분석은 질병관리본부에서 발행한 PFGE 표준실험법-그람 양성세균 protocol과 Jin 등(2013)의 방법을 참고하여 다음과 같이 실시하였다. 순수 분리된 균을 cell suspension TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 넣어 15-20%의 투명으로 현탁시켰다. 균 현탁액 170 µl에 lysostaphin 20 µl, lysozyme 10 µl를 섞고 37°C에서 20분간 반응시켰다. 1.2% agarose solution 200 µl를 추가하고 가법제 섞은 후 바로 plug mold에 넣어 굳혔다. 굳힌 plug를 1.5 ml ES

buffer (0.5 M EDTA, pH 8.0; 1% sodium lauroylsarcosine), 50 µl의 proteinase K (20 mg/ml)에 옮기고 55°C 진탕 항온 수조에서 1시간 동안 반응시킨 후, plug wash TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 20분간 5번 plug를 세척하였다. 세척이 끝난 plug를 1 mm 두께로 잘라 80 U/µl *Sma*I (Roche)를 이용하여 25°C에서 5시간 동안 반응시켰다. 제한효소를 처리한 plug gel을 전기영동 장치(CHEF DR3, Bio-Rad)를 사용해 initial time 4 sec, final time 38 sec, gradient 6 v/cm, included angle 120° 조건으로 14°C, 19시간 동안 전기영동하였다. 표준 균주로 *S. enterica* serotype Braenderup H9812 (ATCC #BAA-664)를 size marker로 사용하였으며, 실험은 분리균주와 동일하게 실시하였다. 전기영동이 완료되면 SYBR gold 염색시약 (Invitrogen)에 gel을 넣어 30분 염색 후, 탈색하여 UV로 확인하였다. 확인된 사진은 BioNumerics (Applied Maths)를 이용하여, 1.5% tolerance, 1.5% optimization Dice coefficient로 유사도를 계산하였으며, UPGMA 법으로 유전적 유연관계를 분석하였다.

MLST (Multi-locus Sequence Typing)

MLST 분석은 Deguchi 등(2009)과 Xiao 등(2012)의 방법을 참고하여 다음과 같이 수행하였다. 120개 균주 중 16개 *cpb2* strains, 15개 *cpe* strains의 31개의 균주를 선별하여 추출한 genomic DNA를 template로 사용하였다. 8개의 housekeeping

Table 2. *Clostridium perfringens* strains used in MLST

No.	Strain	Type	Isolation	Location of <i>cpe</i>	Accession number	Reference
1	BL-D1	A	sepsis	<i>cpe</i> negative, <i>cpb2</i>	AB477538 - AB477916	Deguchi <i>et al.</i> (2009)
2	F5603	A	Sporadic diarrhea	<i>cpe</i> in plasmid, <i>cpb2</i>	AB477484 - AB477866	
3	MR1-1	A	Healthy	<i>cpe</i> negative, <i>cpb2</i>	AB477554 - AB477932	
4	MR1-2	A	Healthy	<i>cpe</i> negative, <i>cpb2</i>	AB477555 - AB477933	
5	MR2-4	A	Healthy	<i>cpe</i> in plasmid, <i>cpb2</i>	AB477485 - AB477882	
6	MR2-9	A	Healthy	<i>cpe</i> negative, <i>cpb2</i>	AB477560 - AB477938	
7	NCTC8239	A	Food poisoning	<i>cpe</i> in chromosome	AB377486 - AB477892	
8	NCTC8798	A	Food poisoning	<i>cpe</i> in chromosome	AB477487 - AB477895	
9	No.2	A	Food poisoning	<i>cpe</i> in plasmid, <i>cpb2</i>	AB477488 - AB477896	
10	OSA1	A	Food	<i>cpe</i> in chromosome, <i>cpb2</i>	AB477575 - AB477953	
11	P-1/09/03	A	Food	<i>cpe</i> in chromosome	AB377490 - AB71985	Xiao <i>et al.</i> (2012)
12	TM138	A	Food	<i>cpe</i> in plasmid, <i>cpb2</i>	AB477495 - AB477908	
13	VWA001	A	Food	<i>cpe</i> in chromosome	JX307716 - JX307835	
14	VWA009	A	Food	<i>cpe</i> in chromosome	JX307718 - JX307837	
15	VWA326	A	Food	<i>cpe</i> in chromosome	JX307730 - JX307849	
16	W4232	A	Food poisoning	<i>cpe</i> in chromosome	AB477497 - AB477856	Deguchi <i>et al.</i> (2009)
17	W6205	A	Food poisoning	<i>cpe</i> in chromosome	AB477499 - AB477912	

genes은 toxin genes (*plc*, *colA*), stress response genes (*sodA*, *groEL*), sigma factor for sporulation (*sigK*), putative metabolism genes (*pgk*, *nadA*), DNA replication (*gyrB*)이고, 사용된 primer는 Table 1과 같다. Templates는 Gold multiplex PCR Premix (Bioneer)를 이용하여 증폭하였다. 모든 PCR products는 QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen)을 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA는 ABI PRISM 3730XL Analyzer (Applied Biosystem)로 염기서열을 분석하였다(Macrogen). 총 5,092 bp의 염기서열의 순서는 *plc*, *colA*, *nadA*, *sod*, *pgk*, *sigK*, *groEL*, *gyrB* 순으로 정렬하였으며, DNASTAR (Lasergene) software를 이용하여 Clustal W format으로 분석하였다. 참고한 17균주의 accession number는 Table 2에 기술하였다.

결 과

균주분리 및 독소현황

2013년과 2014년 경기도 식중독 발생 174건(3,308명) 중 *C.*

*perfringens*에 의한 식중독은 23건(1,223명)으로 전체의 13.2% (36.9%)에 해당되며 원인불명을 제외하고 가장 높은 발생률을 보였다(Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2012~2014). 계절별, 장소별 분리현황을 살펴보면, 계절과 상관없이 연중 발생하였고, 식품접객업소가 집단급식소보다 많았다. 2013년에는 식품접객업소와 집단급식소에서 고르게 발생하였고, 2014년에는 5건 모두 집단급식소에서 발생하였다(Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2012~2014). 이중 5명 이상의 환자에서 *C. perfringens*가 분리된 건과 환자 이외 조리종사자나 보존 식에서 *C. perfringens*가 분리된 식중독은 16건(120주)으로, *cpe* 보유균주는 49주, *cpb2* 보유균주는 71주였다.

발생건별로 살펴보면, *cpe* 단독발생건은 2건(10주), *cpb2* 단독발생건은 7건(45주), *cpe*, *cpb2* 혼합발생건은 7건(65주)로 *cpb2* 단독발생과 *cpe*, *cpb2* 혼합발생이 대부분을 차지하였다. 이중 환자에서 분리된 균주는 99주, 조리종사자 14주, 보존식 7주였다. 99주의 환자균주 중 *cpe* 보유균주는 44주, *cpb2* 보유균주는 55주였고, 조리종사자 14주 중 *cpe* 보유균주는 1주,

Table 3. Isolation and toxin genes of 120 *C. perfringens* isolated in Gyeonggi-do

No.	Isolate	Region (si/gu)	Occurrence	Isolation origin	Major toxin gene						PFGE profile	MLST cluster
					<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	<i>cpe</i>	<i>cpb2</i>		
1	2013-01-01	Yongin giheung	Restaurant	patient	+	-	-	-	-	+	71	1
2	2013-01-02			patient	+	-	-	-	-	+	50	
3	2013-01-03			Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	16	
4	2013-02-01	Siheung	Restaurant	patient	+	-	-	-	-	+	2	1
5	2013-02-02			patient	+	-	-	-	-	+	5	
6	2013-02-03			patient	+	-	-	-	-	+	32	
7	2013-02-04			patient	+	-	-	-	-	+	37	
8	2013-02-05			patient	+	-	-	-	-	+	10	
9	2013-02-06			patient	+	-	-	-	-	+	39	
10	2013-02-07			patient	+	-	-	-	-	+	17	
11	2013-02-08			patient	+	-	-	-	-	+	35	
12	2013-02-09			patient	+	-	-	-	-	+	42	
13	2013-02-10			patient	+	-	-	-	-	+	28	
14	2013-02-11			patient	+	-	-	-	-	+	16	5
15	2013-02-12			patient	+	-	-	-	-	+	72	
16	2013-02-13			patient	+	-	-	-	-	+	36	
17	2013-02-14			patient	+	-	-	-	-	+	8	1
18	2013-03-01	Ansan sangnok	School	patient	+	-	-	-	-	+	35	
19	2013-03-02			patient	+	-	-	-	-	+	18	
20	2013-03-03			patient	+	-	-	-	-	+	54	
21	2013-03-04			patient	+	-	-	-	-	+	5	4
22	2013-03-05			patient	+	-	-	-	-	+	15	2
23	2013-03-06			patient	+	-	-	-	-	+	70	

Table 3. Continued

No.	Isolate	Region (si/gu)	Occurrence	Isolation origin	Major toxin gene						PFGE profile	MLST cluster
					<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	<i>cpe</i>	<i>cph2</i>		
24	2013-04-01	Icheon	Restaurant	patient	+	-	-	-	-	+	30	1
25	2013-04-02			patient	+	-	-	-	-	+	51	
26	2013-04-03			patient	+	-	-	-	-	+	13	
27	2013-04-04			patient	+	-	-	-	-	+	43	
28	2013-04-05			patient	+	-	-	-	-	+	6	
29	2013-04-06			patient	+	-	-	-	-	+	20	
30	2013-05-01	Ansan danwon	Restaurant	patient	+	-	-	-	-	+	33	
31	2013-05-02			patient	+	-	-	-	-	+	39	
32	2013-05-03			patient	+	-	-	-	-	+	49	
33	2013-05-04			Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	35	
34	2013-05-05			Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	15	
35	2013-05-06			Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	52	
36	2013-05-07			Food	+	-	-	-	-	+	73	
37	2013-06-01	Bucheon wonmi	School	patient	+	-	-	-	+	-	57	8
38	2013-06-02			patient	+	-	-	-	+	-	56	
39	2013-06-03			patient	+	-	-	-	+	-	56	
40	2013-06-04			patient	+	-	-	-	+	-	56	
41	2013-06-05			patient	+	-	-	-	+	-	56	
42	2013-06-06			patient	+	-	-	-	+	-	56	
43	2013-06-07			patient	+	-	-	-	+	-	56	
44	2013-07-01	Seongnam bundang	Restaurant	patient	+	-	-	-	+	-	68	8
45	2013-07-02			patient	+	-	-	-	+	-	68	
46	2013-07-03			patient	+	-	-	-	-	+	1	
47	2013-07-04			Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	29	
48	2013-07-05			Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	75	5
49	2013-08-01	Suwon yeongtong	School	patient	+	-	-	-	+	-	67	8
50	2013-08-02			patient	+	-	-	-	+	-	59	
51	2013-08-03			patient	+	-	-	-	+	-	65	
52	2013-08-04			patient	+	-	-	-	+	-	66	
53	2013-08-05			patient	+	-	-	-	+	-	59	
54	2013-08-06			patient	+	-	-	-	+	-	59	
55	2013-08-07			patient	+	-	-	-	+	-	59	
56	2013-08-08			patient	+	-	-	-	+	-	67	
57	2013-08-09			patient	+	-	-	-	+	-	67	
58	2013-08-10			patient	+	-	-	-	+	-	67	
59	2013-08-11			patient	+	-	-	-	+	-	67	
60	2013-08-12			patient	+	-	-	-	+	-	67	
61	2013-08-13	Suwon yeongtong	School	patient	+	-	-	-	-	+	4	5
62	2013-08-14			patient	+	-	-	-	+	-	67	
63	2013-08-15			patient	+	-	-	-	+	-	67	
64	2013-09-01	Suwon paldal	Restaurant	Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	25	
65	2013-09-02			Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	19	
66	2013-09-03			Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	44	
67	2013-09-04			patient	+	-	-	-	-	+	23	

Table 3. Continued

No.	Isolate	Region (si/gu)	Occurrence	Isolation origin	Major toxin gene						PFGE profile	MLST cluster
					<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	<i>cpe</i>	<i>cpb2</i>		
68	2013-10-01	Seongnam bundang	Restaurant	Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	55	8
69	2013-10-02			patient	+	-	-	-	+	-	67	
70	2013-10-03			patient	+	-	-	-	-	+	1	
71	2013-10-04			patient	+	-	-	-	+	-	67	
72	2013-10-05			patient	+	-	-	-	+	-	67	
73	2014-01-01	Hwaseong	Restaurant	patient	+	-	-	-	-	+	46	8
74	2014-01-02			patient	+	-	-	-	+	-	61	
75	2014-01-03			patient	+	-	-	-	-	+	47	
76	2014-01-04			patient	+	-	-	-	+	-	68	
77	2014-01-05			patient	+	-	-	-	+	-	68	
78	2014-01-06			patient	+	-	-	-	+	-	68	
79	2014-02-01	Pyeongtaek	School	patient	+	-	-	-	-	+	45	10
80	2014-02-02			patient	+	-	-	-	+	-	62	
81	2014-02-03			patient	+	-	-	-	+	-	62	
82	2014-02-04			patient	+	-	-	-	+	-	62	
83	2014-02-05			patient	+	-	-	-	+	-	62	
84	2014-02-06			patient	+	-	-	-	+	-	62	
85	2014-02-07			patient	+	-	-	-	-	+	7	6
86	2014-02-08			patient	+	-	-	-	+	-	69	
87	2014-02-09			patient	+	-	-	-	+	-	63	
88	2014-02-10			patient	+	-	-	-	-	+	53	
89	2014-02-11			patient	+	-	-	-	+	-	62	
90	2014-02-12			patient	+	-	-	-	-	+	48	
91	2014-02-13			Foodservice employees	+	-	-	-	+	-	62	
92	2014-02-14			Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	11	1
93	2014-02-15			Food	+	-	-	-	+	-	62	
94	2014-02-16			Food	+	-	-	-	+	-	62	
95	2014-02-17			Food	+	-	-	-	+	-	62	9
96	2014-03-01	Suwon gwonseon	School	patient	+	-	-	-	-	+	21	8
97	2014-03-02			patient	+	-	-	-	-	+	74	
98	2014-03-03			patient	+	-	-	-	-	+	38	
99	2014-03-04			patient	+	-	-	-	-	+	38	
100	2014-03-05			patient	+	-	-	-	-	+	40	
101	2014-03-06			patient	+	-	-	-	+	-	58	
102	2014-03-07			patient	+	-	-	-	-	+	24	
103	2014-03-08			patient	+	-	-	-	-	+	38	
104	2014-03-09			Food	+	-	-	-	-	+	27	
105	2014-03-10			Food	+	-	-	-	-	+	12	
106	2014-04-01	Seongnam bundang	School	patient	+	-	-	-	-	+	34	1
107	2014-04-02			Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	26	
108	2014-04-03			Foodservice employees	+	-	-	-	-	+	3	
109	2014-04-04			patient	+	-	-	-	-	+	22	
110	2014-04-05			patient	+	-	-	-	-	+	9	

Table 3. Continued

No.	Isolate	Region (si/gu)	Occurrence	Isolation origin	Major toxin gene						PFGE profile	MLST cluster
					<i>cpa</i>	<i>cpb</i>	<i>etx</i>	<i>iap</i>	<i>cpe</i>	<i>cpb2</i>		
111	2014-05-01	Ansan sangnok	School	patient	+	-	-	-	+	-	60	8
112	2014-05-02			patient	+	-	-	-	+	-	60	
113	2014-05-03			patient	+	-	-	-	+	-	60	
114	2014-05-04			patient	+	-	-	-	-	+	14	
115	2014-05-05			patient	+	-	-	-	-	+	31	
116	2014-05-06			patient	+	-	-	-	-	+	31	
117	2014-05-07			patient	+	-	-	-	-	+	14	
118	2014-06-01	Gimpo	School	patient	+	-	-	-	+	-	64	11
119	2014-06-02			patient	+	-	-	-	+	-	64	9
120	2014-06-03			Food	+	-	-	-	+	-	41	3

cpb2 보유균주는 13주였다. 7주의 보존식 중 *cpe* 보유균주는 3주, *cpb2* 보유균주는 4주였다(Table 3).

A-E Toxinotype PCR 결과, 120 균주 모두 *cpa* 단독양성인 type A로 확인되었다(Table 3).

PFGE 분석

120주의 *C. perfringens*를 *Sma*I 제한효소로 처리한 PFGE 분석 결과는 Fig. 1과 같이 53.5-100%의 유사도와 75개의 profiles으로 나뉘었다. 65% 이상을 기준으로 했을 때 A-E 5가지 그룹으로 분류되었다. A, C, D, E 그룹은 2014-06-03주를 제외하고 모두 *cpb2* 보유균주로 이루어졌고, B 그룹은 2013-03-06주를 제외하고 모두 *cpe* 보유균주로 구성되었다. A 그룹은 67.8-100%의 유사도와 55 유형으로 나뉘며, 김포의 보존식에서 분리된 2014-06-03주를 제외하고 모두 *cpb2* 보유균주였다. *cpb2* 양성 식중독 중 2014년 안산상록구 식중독 4주(2014-05-04-07)와 2014년 수원권선구 식중독 3주(2014-03-03,04,08)는 동일한 패턴을 나타내었다. 이외 같은 유형을 보이는 균주들은 각각 다른 식중독으로 연관성이 없었고, 대부분 다른 유전자패턴을 보였다. B 그룹은 70.6-100%의 유사도와 15 유형으로 나뉘며, 안산상록구 환자에서 분리된 2013-03-06주를 제외하고 모두 *cpe* 보유균주였다. 2013년 부천원미구 식중독 6건, 2013년 2번의 성남분당구 식중독 2건, 3건은 각각 동일한 유전자패턴을 보였고, 2013년 수원영통구 식중독은 2가지 *cpe* 유전자패턴이 섞여 있음을 알 수 있었다. 2014년 안산상록구 식중독 3주, 평택 10주, 김포 2주, 화성 3주 역시 각각 동일한 유전자패턴을 보였다. C-E 그룹은 53.5-69.6%의 유사도를 보였고, 모두 *cpb2* 보유균주로 이루어졌으며, 그룹 중 가장 낮은 유사도를 보였다(Fig. 1).

식중독 건별로 살펴보면 2013년에 발생한 10건의 식중독 중 6건의 *cpb2* 양성 식중독은 모두 각각 다른 유전자패턴을 나타내었다. 3건의 *cpe*, *cpb2* 혼합양성 식중독은 각각 같은 *cpe* 유전자패턴을 보였고, *cpb2* 균주는 각각 다른 패턴을 나타내었다. 1건의 *cpe* 양성 식중독은 역시 같은 유전자패턴을 보였다. 2014년에 발생한 6건의 식중독 중 1건의 *cpb2* 양성 식중독은 유전자패턴 양상이 달랐고, 4건의 *cpe*, *cpb2* 혼합양성 식중독 중 화성, 평택, 안산상록구 식중독은 각각 같은 *cpe* 유전자패턴을 보였고, 수원권선구와 안산상록구 식중독도 각각 같은 *cpb2* 유전자패턴을 나타내었다. 1건의 *cpe*, 양성 식중독은 환자에서 분리된 2개의 균주는 동일한 양상을 보였으나, 보존식에서 분리된 균주는 *cpb2* 균주 그룹(A)에 속하며 전혀 다른 양상을 나타내었다.

MLST 분석

분리된 120주 중 PFGE 패턴 분석 후 *cpb2* 보유균주 16주, *cpe* 보유균주 15주를 선별하여, 8 housekeeping genes에 대해 분석하였다(Fig. 2). *C. perfringens*의 MLST 분석은 *Salmonella enterica*, *Moraxella catarrhalis*, *E. coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* 처럼 website (<http://mist.ucc.ie>)에 실험 및 분석이 완성되어 있지 않아, Dequchi 등(2009)과 Xiao 등(2012)의 방법을 참고하여 수행하였다. 분석에 사용된 표준균주는 Table 2에 기술하였다. 분석결과 크게 P-*cpe* (Plasmid-*cpe*) 및 *cpb2* 그룹과 C-*cpe* (Chromosome-*cpe*) 그룹으로 나뉘어졌고, 세분하여 11개의 cluster로 나뉘어졌다. 경기도에서 분리된 31개 균주 중, 16 *cpb2* 보유균주들과 2014-06-03 *cpe* 보유균주는 cluster 1-7에 속해있었고, 나머지 14 *cpe* 보유균주는 cluster 8-11에 속해있었다. Cluster 1에는 경기도에서 분리된 10 *cpb2* 보유균주들

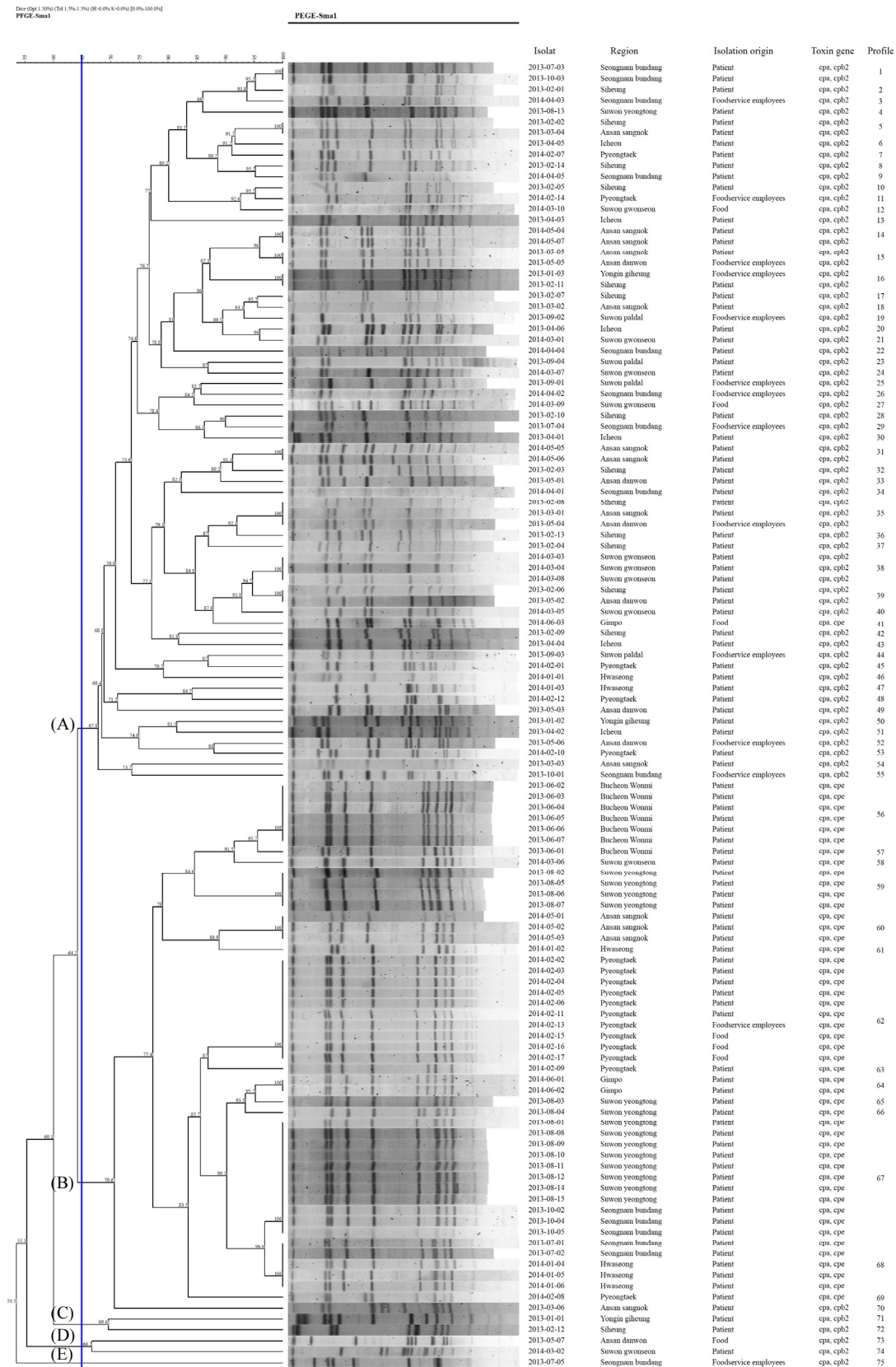


Fig. 1. Cluster analysis of *SmaI*-digested DNA from 120 strains of *C. perfringens* separated by PFGE.

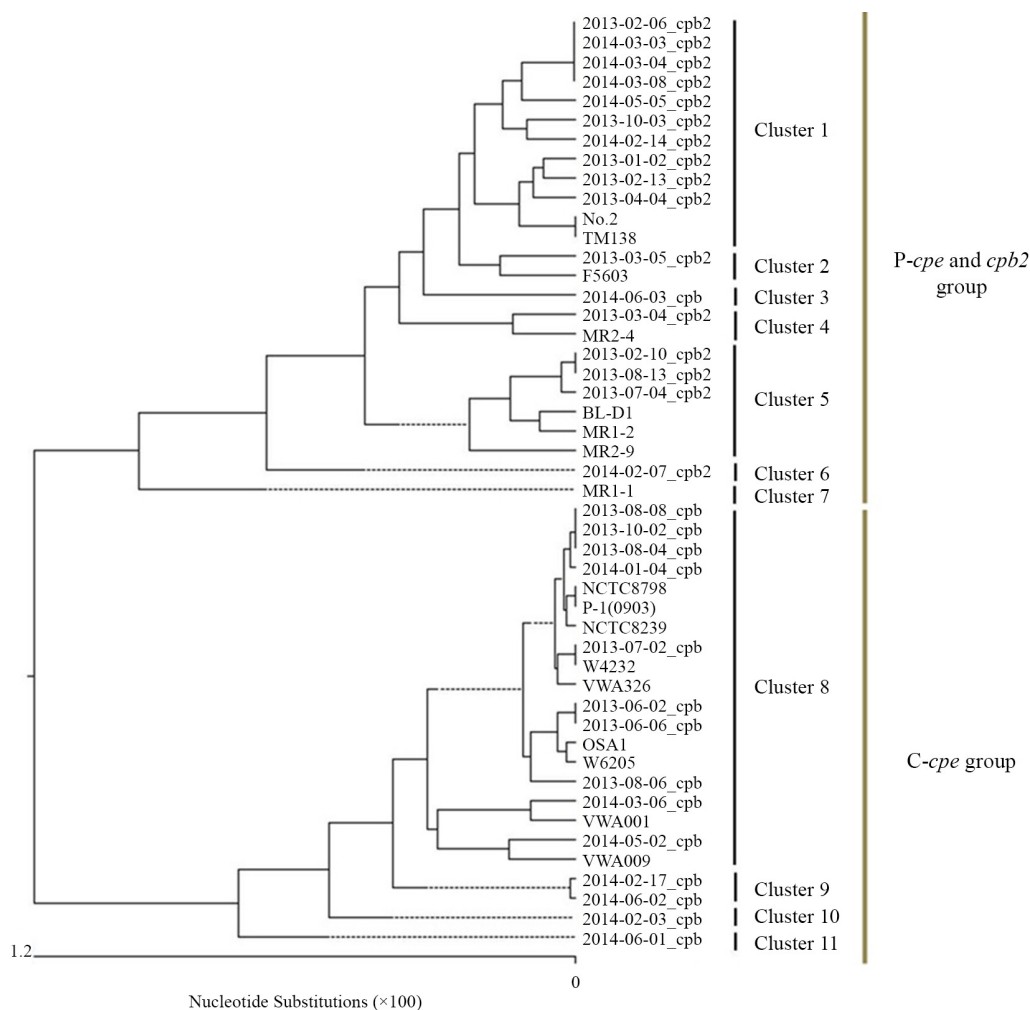


Fig. 2. Phylogenetic relationship of 48 *C. perfringens* strains.

이 P-*cpe* 및 *cpb2* 그룹(No.2, TM138)과 같이 분류되었다. PFGE 패턴과 유사하게, 2014년 수원권선구 식중독 3건(2014-03-03, 04, 08)과 2014년 시흥 1건(2013-02-06)이 일치하였다. 2013-01-02, 2013-02-13, 2013-04-04주는 PFGE 패턴과 다르게 그룹 지어졌다.

Cluster 2-4에도 P-*cpe* 및 *cpb2* 그룹과 같이 경기도에서 분리된 2 *cpb2* 보유균주들이 속해있었고, 이외 보존식에서 분리된 김포 2014-06-03 *cpe* 보유균주가 속해있었다. MLST 결과 이 균주의 *cpe*는 plasmid에 존재함을 추정할 수 있었다. Cluster 5-7에는 건강한 사람에서 유래된 *cpb2* 그룹(MR1-1, MR1-2, MR2-9)과 경기도에서 분리된 4 *cpb2* 보유균주가 속해있었다. 2013-02-10주와 2013-08-13주는 PFGE 패턴에서는 차이를 보였으나 MLST 결과 100% 일치하였다.

Cluster 8에는 C-*cpe* 그룹들과 함께 경기도에서 분리된 10 *cpe* 보유균주들이 속해있었다. 2013년 부천원미구 식중독 2

건(2013-06-02, 06)은 PFGE 패턴과 마찬가지로 일치함을 보였고, PFGE 패턴에서 조금 차이를 보인 수원영통구 식중독 2건(2013-08-04, 08)은 MLST에서 100% 일치함을 보였다. Cluster 9-11에는 경기도에서 분리된 4 *cpe* 보유균주들이 속해있었고, PFGE 패턴에서 다른 유형을 보인 2014-02-17주와 201-06-02주가 MLST에서 유사함을 알 수 있었다. PFGE 패턴에서 100% 일치율을 보인 2014년 김포 식중독 2건 2016-06-01, 2014-06-02주는 MLST에선 cluster 9와 11로 불일치함을 알 수 있었다. 경기도에서 분리된 *cpb2* 보유균주들이 P-*cpe* 그룹들과 건강한 사람에서 분리된 *cpb2* 그룹들 사이에 산재되어 그룹 지어졌고, *cpe* 보유균주는 C-*cpe* 그룹들과 그룹 지어졌다(Fig. 2, Table 2).

기존의 연구결과, type A *cpe* 균주가 음식이나 식중독에서 분리된 C-*cpe* 균주, IS-1470 like sequence와 근접한 P-*cpe* 균주, IS-1151 sequence와 근접한 P-*cpe* 균주 등 3가지로 분류되

며(Miyamoto *et al.*, 2004; Wen and McClane, 2004; Harrison *et al.*, 2005), IS-1151 sequence에 근접한 P-*cpe* 균주에 비해 IS-1470 like sequence에 근접한 P-*cpe* 균주가 유전적으로 더 다양성을 보인다고 보고하였다. IS-1470 like sequence에 근접한 P-*cpe* 균주인 No.2, TM138과 MR2-4주들은 cluster 1,4에 속해있었고, IS-1151 sequence에 근접한 P-*cpe* 균주인 F5603주는 cluster 2에 속해있었으며, 경기도의 *cpb2* 보유균주들과 같이 분류되었다. 기존 식중독에서 분리된 NCTC8239, NCTC8798, W4232, W6205주는 *cpe* 보유균주들과 같이 cluster 8에 속해있었다(Table 2). 건강한 조리종사자에서 분리된 2013-07-04, 2014-02-14주들은 cluster 5,1에 각각 속해있었다.

고 찰

*C. perfringens*의 식중독 진단에 *cpb2* 유전자가 포함된 이후, 2013, 2014년 국내 식중독 발생현황을 보면 발생건은 261건, 409건, 환자수는 6,045명, 8,043명이고, 이중 *C. perfringens*에 의한 식중독 발생건은 30 (11.4%), 28 (6.8%)건이며, 환자수는 621 (10.2%), 1,707 (21.2%)명으로 노로바이러스와 대장균을 제외하고 가장 높은 비율을 나타내었다. 경기도의 경우도 마찬가지로 *C. perfringens*에 의한 식중독 발생건은 11 (18.0%), 12 (11.1%)건, 환자수가 344 (25.2%), 879 (45.1%)명으로 노로바이러스를 제외하고 가장 높은 비율을 보였다. *C. perfringens*는 육류섭취량이 많은 외국의 경우 매우 흔한 식중독 원인균으로 보고되며(Uzal *et al.*, 2010), Jin 등(2013)의 연구결과와 비슷한 경향을 보였다. 계절에 상관없이 발생하는 경향과, 집단급식소에서의 높은 발생현황은 질병관리본부의 보고와 일치하였다(Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2012~2014).

*C. perfringens*의 5가지 Toxinotype 중 A, C가 식중독을 유발한다고 알려져 있다(Deguchi *et al.*, 2009; Uzal *et al.*, 2010). Yoo 등(1997)의 연구에서도 국내 소, 돼지, 닭에서 분리된 *C. perfringens*의 Toxinotype PCR 결과, 51개의 균주 중 49균주 (96.0%)가 type A로 밝혀졌으며, Type A *C. perfringens*의 식중독은 미국에서도 세균성 식중독의 2위로 연간 백만 명 이상 규모로 발생하는 식중독으로 알려져 있다(McClane *et al.*, 2013). 경기도내 *C. perfringens*의 식중독 중 5명 이상의 환자에서 *C. perfringens*가 분리된 건과 환자 이외 조리종사자나 보존식에서 *C. perfringens*가 분리된 식중독 120주를 가지고 Toxinotype PCR을 한 결과, 경기도내 유행하는 *C. perfringens*의 type이 모두 A로 위 연구와 유사함을 알 수 있었다.

경기도내 *C. perfringens*에 의한 식중독의 역학적 연관성을 알아보기 위해 PFGE, MLST를 수행하였다. PFGE 결과, 120주는 75개의 다양한 유형을 나타내었고, 유사도 65% 이상을 기준으로 5개의 그룹으로 나뉘었다. A, C, D, E 그룹은 1개의 균주를 제외하고 모두 *cpb2* 보유균주로 이루어졌고, B 그룹은 1개의 균주를 제외하고 모두 *cpe* 보유균주로 구성되었다. 7주를 제외하고 64 *cpb2* 보유균주들은 대부분 다양한 유전자 패턴을 보였다. 41 *cpe* 보유균주 중 3개의 균주를 제외하고, 식중독 건별로 모두 각각 동일한 유전자 패턴을 보였다. 2013년 서울지역의 *C. perfringens* PFGE 결과(Jin *et al.*, 2013)와 유사하게, *cpe* 보유균주에 비해 *cpb2* 보유균주가 훨씬 다양하고 복잡한 유전자패턴을 나타내었고, 역학적 연관성이 낮음을 확인할 수 있었다. 기존의 연구결과에서도 *cpe* 보유균주는 식중독의 원인별로 구분되고 유의한 결과를 보인다고 알려져 있으며, *cpb2* 보유균주의 경우 집단 식중독 보다 식중독과 관련 없는 항생제와 연관된 설사나 산발적인 설사에 더 많이 관여하는 것으로 보고되고 있다(Harrison *et al.*, 2005; Johansson *et al.*, 2006; Xiao *et al.*, 2012).

MLST 분석 결과, 경기도에서 분리된 31개 균주는 P-*cpe* 및 *cpb2* 그룹과 C-*cpe* 그룹으로 나뉘어 졌고, 세세하게 11개의 cluster로 나뉘어졌다. 16 *cpb2* 보유균주와 2014-06-03 *cpe* 보유균주는 1-7 cluster에 속해있었고, 14 *cpe* 보유균주는 모두 8-11 cluster에 속해있었다. 보존식에서 분리된 2014-06-03의 *cpe* 보유균주를 포함하여 *cpb2* 보유균주들은 P-*cpe* 그룹과 건강한 사람에서 분리된 *cpb2* 그룹들 사이에 산재되어 cluster되었고, *cpe* 보유균주는 모두 C-*cpe* 그룹에 속해있었다. Fig. 2와 같이 2014-06-03주의 *cpe* gene은 plasmid에 존재하고, 나머지 *cpe* 보유균주의 *cpe* gene은 모두 chromosome에 존재함을 추정할 수 있다. 이는 type A *cpe* 균주에 의한 식중독 중 75-80%가 *cpe* gene을 chromosome에 가지고 있다고 보고되는 것과 일치하였다(Rood and Cole, 1991; Grant *et al.*, 2008). 2014 김포시 식중독 사례 중 식품에서 유래된 P-*cpe* 균주와 환자에서 유래된 C-*cpe* 균주의 역학적 연관성이 적은 것은 PFGE의 결과와 같고, 식중독을 유발하는 C-*cpe* 균주들은 P-*cpe* 균주들과 유전적 상관성이 없다는 Deguchi 등(2009)의 보고와도 일치하였다. P-*cpe* 및 *cpb2* 그룹과 같이 산재된 경기도의 *cpb2* 보유균주의 2014 수원권선구 식중독을 제외하고 연관성이 낮은 결과는 PFGE 결과와 유사하였다.

기존연구에서 *C. perfringens*의 식중독의 역학관계를 분석하는 시도로 PFGE법을 선택하는 경우가 많다(Miyamoto *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2005). PFGE가 방법적으로 유용하나, 전체 genome의 여러 Loci의 sequence를 증폭하여 분석하

는 MLST에 비해 정확성이 부족하다고 알려져 있으며(Enright and Sporatt, 1999; Urwin and Maiden, 2003), *cpe* 보유균주 연구를 포함한 각지의 *C. perfringens* MLST에 대한 연구에서 C-*cpe* 균주와 P-*cpe* 균주들간의 확실한 cluster를 나타낸다고 보고되고 있다(Deguchi et al., 2009). PFGE와 MLST의 결과, 2014 김포 식중독처럼 다른 역학관계를 보이는 경우도 있었지만, 전반적으로 PFGE와 MLST 결과는 유사한 패턴으로 나뉘었고, *cpb2* 보유균주와 *cpe* 보유균주 사이 역학적 연관성 관계도 유사함을 알 수 있었다. PFGE와 MLST의 분석기법 간의 상세 비교를 위해서는 좀 더 많은 식중독에 대한 MLST의 분석이 필요하겠다.

적 요

질병관리본부에서 2012년 이후 수인성식품매개질환 실험실 진단실무지침에 *cpb2* 유전자를 포함시킨 후, 2013-2014년 경기도의 *C. perfringens*에 의한 식중독이 원인불명을 제외하고 가장 많이 발생되었으며, 그 발생률이 2011-2012년에 비해 큰 폭으로 증가하였다. 따라서 경기도내 유행하는 toxinotype을 파악하고, PFGE, MLST를 통해 이들의 분자역학적 연관성을 연구함으로써 *C. perfringens*에 의한 식중독 발생 시 역학조사 기초자료로 활용하고자 하였다. 2013-2014년 경기도에서 분리된 120주의 *C. perfringens* 중 *cpe* 보유균주는 49주, *cpb2* 보유균주는 71주였다. 발생건별로 살펴보면, *cpe* 단독발생건은 2건(10주), *cpb2* 단독발생건은 7건(45주), *cpe*, *cpb2* 혼합발생건은 7건(65주)로 *cpb2* 단독발생과 *cpe*, *cpb2* 혼합발생이 대부분을 차지하였다. Toxinotype PCR 결과, 120주 모두 *C. perfringens*에 의한 식중독의 주요 타입인 A로 밝혀졌다. PFGE 분석 결과, 53.5-100%의 유사도와 75 유형으로 나뉘었다. 65% 이상을 기준으로 했을 때 5가지 그룹으로 나뉘어졌다. A, C, D, E 그룹은 1개의 균주를 제외하고 모두 *cpb2* 보유균주로 이루어졌고, B 그룹은 1개의 균주를 제외하고 모두 *cpe* 보유균주로 구성되었다. 2014년 안산상록구 식중독 4주와 2014년 수원 권선구 식중독 3주를 제외하고, 64 *cpb2* 보유균주들은 대부분 다양한 유전자패턴을 보였다. 41 *cpe* 보유균주 중 3개의 균주를 제외하고, 2013년 부천원미구, 성남분당구, 2014년 안산상록구, 평택, 김포, 화성 식중독 모두 각각 동일한 유전자 패턴을 보였다. 2013 수원영통구 식중독은 2가지 *cpe* 유전형 패턴을 보였다. MLST 분석 결과, 크게 P-*cpe* 및 *cpb2* 그룹과 C-*cpe* 그룹으로 나뉘어 졌고, 세세하게 11개의 cluster로 나뉘어졌다. 경기도에서 분리된 31개 균주 중, 16 *cpb2* 보유균주와 2014-

06-03 *cpe* 보유균주는 1-7 cluster에 속해있었고, 14 *cpe* 보유균주는 모두 8-11 cluster에 속해있었다. 하나의 *cpe* 보유균주를 포함하여 *cpb2* 보유균주들은 P-*cpe* 그룹과 건강한 사람에서 분리된 *cpb2* 그룹들 사이에 산재되어 cluster되었고, *cpe* 보유균주는 C-*cpe* 그룹에 속해있었다. 2014-06-03주의 *cpe* gene은 plasmid에 존재하고, 나머지 *cpe* 보유균주의 *cpe* gene은 모두 chromosome에 존재함을 추정 할 수 있었다. PFGE 및 MLST 분석 결과, *cpe* 보유균주에 비해 *cpb2* 보유균주가 훨씬 다양하고 복잡한 유전자패턴을 나타내며, *cpe* 유전자 보유균주의 경우 단일 유전자형이거나 유사도가 높은 유전자형으로 이루어져 있음을 알 수 있었다. *cpe* 보유균주의 경우 집단식중독의 원인균 파악이 용이하였으나, *cpb2* 보유균주의 경우 2발생건을 제외하고 역학적인 연관성이 낮음을 확인 할 수 있었다.

References

- Brynstad, S. and Granum, P.E. 2002. *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *Int. J. Food Microbiol.* **74**, 195-202.
- Deguchi, A., Miyamoto, K., Kuwahara, T., Miki, Y., and Kaneko, I. 2009. Genetic characterization of type A enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains. *PLoS One* **4**, e5598.
- Enright, M.C. and Sporatt, B.G. 1999. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* **7**, 482-487.
- Grant, K., Kenyon, S., Nwafor, I., Plowman, J., Ohai, C., Halford-Maw, R., Peck, M., and McLauchlin, J. 2008. The identification and characterization of *Clostridium perfringens* by real-time PCR, location of enterotoxin gene, and heat resistance. *Foodborne Pathog. Dis.* **5**, 629-639.
- Harrison, B., Raju, D., Garmory, H.S., Brett, M.M., Titball, R.W., and Sarker, M.R. 2005. Molecular characterization of *Clostridium perfringens* isolates from humans with sporadic diarrhea: evidence for transcriptional regulation of the beta2-toxin encoding gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8362-8370.
- Jin, Y.H., Jung, J.H., Jeon, S.J., Choi, S.S., Kim, Y.G., Oh, Y.H., Choi, S.M., and Jung, K. 2013. Molecular epidemiology of *Clostridium perfringens* isolated from food poisoning in Seoul, 2013. *J. Bacteriol. Virol.* **44**, 170-176.
- Johansson, A., Aspan, A., Bagge, E., Baverud, V., and Engstrom, B. 2006. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. *BMC Microbiol.* **6**, 47.
- Korea Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiological Investigation of Infectious Diseases in Korea Annual Report 2012-2014. <http://www.cdc.go.kr/CDC/info/CdcKrInfo0520.jsp?menuIds=HOME001-MNU1132-MNU0072-MNU0074>.
- McClane, B.A. 2005. Clostridial enterotoxins. Handbook on Clostridia, pp. 375-406. In Durre, P. (ed.), CRC Press, Boca Raton, USA.

- McClane, B.A., Robertson, S.L., and Li, J. 2013. *Clostridium perfringens*, In Doyle, M.P. and Buchanan, R.L. (eds.), Food microbiology: fundamentals and frontiers, 4th ed., pp. 465-489. ASM Press, Washington, DC, USA.
- Miyamoto, K., Wen, Q., and McClane, B.A. 2004. Multiplex PCR genotyping assay that distinguishes between isolates of *Clostridium perfringens* type A carrying a chromosomal enterotoxin gene (*cpe*) locus, a plasmid *cpe* locus with an IS1470-like sequence, or a plasmid *cpe* locus with an IS1151 sequence. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1552-1558.
- Rood, J.I. and Cole, S.T. 1991. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Rev.* **55**, 621-648.
- Urwin, R. and Maiden, M.C. 2003. Multilocus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* **11**, 479-487.
- Uzal, F.A., Vidal, J.E., McClane, B.A., and Gurjar, A.A. 2010. *Clostridium perfringens* toxins involved in mammalian veterinary disease. *Open Toxinology J.* **3**, 24-42.
- Wen, Q. and McClane, B.A. 2004. Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolates in American retail foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2685-2691.
- Xiao, Y., Wagendorp, A., Moezelaar, R., Abec, T., and Wells-Bennik, M.H.J. 2012. A wide variety of *Clostridium perfringens* type A food-borne isolates that carry a chromosomal *cpe* gene belong to one multilocus sequence typing cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 7060-7068.
- Yoo, H.S., Lee, S.U., Park, K.Y., and Park, Y.H. 1997. Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of *Clostridium perfringens* types by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 228-232.