

A Case of Emetic Toxin Producing *Bacillus cereus* Strains Isolated from Outbreak

Jong Hyun Kim¹, Eun Gyoung Lim², Hyun Chul Jang¹, Ju Young Park²,
Sun Jin Lee¹, Mi Sun Park¹, Gil Bae Choi², Bok Kwon Lee¹

¹Division of Enteric Bacterial Infections, Center for Infectious Diseases, National Institute of Health, Seoul,

²Microbe Division, Ulsan Institute of Health and Environment, Ulsan, Korea

Bacillus cereus causes two types of gastrointestinal diseases: emesis and diarrhea. It produces one emetic toxin and nine different enterotoxins. In March 2008, eight of a family became sick after eating slices of raw fish. We isolated emetic toxin producing *B. cereus* from the stools of 6 patients and 2 sub-clinical humans. In this study, the presence of enterotoxin genes, such as those of haemolysin BL (Hbl), nonhemolytic enterotoxin (Nhe), *B. cereus* enterotoxin T (BceT), enterotoxin FM (EntFM), cytotoxin K (cytK) and cereulide were assayed by polymerase chain re-

action (PCR) methods. Their enterotoxin activities were assayed using the BCET-RPLA, Tecra ELISA kit and Hep-2 vacuole activity. Bacterial isolates were subtyped by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). This study demonstrates the emetic toxin-producing strains of *B. cereus* in clinical specimens, for the first time in the Republic of Korea. (Korean J Clin Microbiol 2009;12:48-52)

Key Words: Emetic toxin, Cereulide, *B. cereus*

서 론

독소를 생산하는 *Bacillus cereus*는 설사증후군과 구토증후군의 두 가지 식중독 증상을 보인다. 설사증후군의 경우 오염된 식품을 섭취 후 8~16시간 만에 증상을 보이며, 복통과 설사를 동반하는 경우가 빈번하나, 구토증후군의 경우에는 오염된 식품을 섭취한 후 30분~6시간의 잠복기를 거쳐 구토와 복통 등의 증상을 유발하는 것으로 보고되었다. 두 가지 형태의 증상은 *B. cereus*가 분비하는 독소에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다. 구토증후군은 cereulide로 불리는 열에 매우 안정적인 펩타이드에 의해 야기되며[1], 전격 간 기능 상실과 신장 손상 등과 같이 설사증후군보다 심각한 증상을 야기하는 것으로 보고되었다[2]. Cereulide는 유전자에 의해 발현되는 독소가 아닌 세포 내에서 불필요한 단백질을 용해시켜 생성된 아미노산들의 조합으로 구성된 단백질로 유전자 진단이 불가능한 것으로 알려져 있었다. 최근 들어, cereulide를 합성하는 펩타이드 합성 효소(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)의 특징이 밝혀지면서 유전학적 진단이 가능해졌다[3]. 국내의 경우 매년 *B.*

cereus 감염이 발생하고 있었으나, 구토증후군에 대한 보고가 없는 실정이다. 이에 2008년 3월에 발생한 집단 식중독에서 구토 독소를 생산하는 *B. cereus*를 분리 동정하였으며, 유전학적 독소 검사, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 그리고 구토 독소에 의한 Hep-2 세포에서의 공포현상을 확인하여 문헌고찰과 함께 보고하는 바이다.

증 례

1. 역학 및 대상

2008년 3월 15일 17:00~19:00 사이에 울산광역시 횃집에서 11명이 회를 섭취하였으며, 이 중 6명이 동일 22:00부터 설사, 복통, 메스꺼움, 구토 증상을 보여 3월 16일 병원에 내원하였다. 3월 17일 울산시 보건환경연구원에서 역학 조사 및 환자 검체를 채취하여 원인 병원체 검사를 실시하였다. 6명의 내원 환자 이외에 5명의 무증상자의 검체를 채취하여 동일한 검사를 하였다. 역학 조사 결과, 3명의 환자는 설사와 구토를 동반하는 증상을 보였으며, 나머지 3명의 환자는 복통만을 호소하였다.

2. 미생물 검사 및 독소 유전자 검사

환자로부터 채취한 대변 검체를 인산완충 희석액에 첨가하여 균질화한 후 Mannitol egg yolk polymyxin agar (MYP)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 깃털모양으로 퍼

Received 10 August, 2008, Revised 10 February, 2009

Accepted 25 February, 2009

Correspondence: Bok Kwon Lee, Division of Enteric Bacterial Infections, Center for Infectious Diseases, National Institute of Health, 194, Tongil-ro, Eunpyeong-gu, Seoul 122-701, Korea. (Tel) 82-2-380-2981, (Fax) 82-2-352-4767, (E-mail) bokrates@nih.go.kr

진 분홍색 집락을 선별하여 API 20E kit와 API 50 CHB kit (bioMerieux, Marcy-L'Etoile, France)를 이용하여 생화학적 검사를 시행하였다. 총 11명의 대변 검체 중 환자 6명과 무증상자

2명에게서 *B. cereus*를 분리하였다. *B. cereus*로 동정된 균주를 대상으로 게놈 유전자를 추출하여 10개의 독소유전자를 검출하는 primer와 i-Star Master mix PCR kit (iNtRON bio-

Table 1. Toxin gene profiles and toxin titer of *B. cereus* isolates obtained from outbreak case

No. case	<i>hbl</i> gene			<i>nhe</i> gene			Enterotoxin gene			NRPS gene	bceT RPLA	Tecra ELISA	Vacuolation titer
	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>cytK</i>	<i>entFM</i>	<i>bceT</i>	<i>ces</i>			
1	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	128
2	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	128
3	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	128
4	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	128
5	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	128
6	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	128
7	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	128
8	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	128

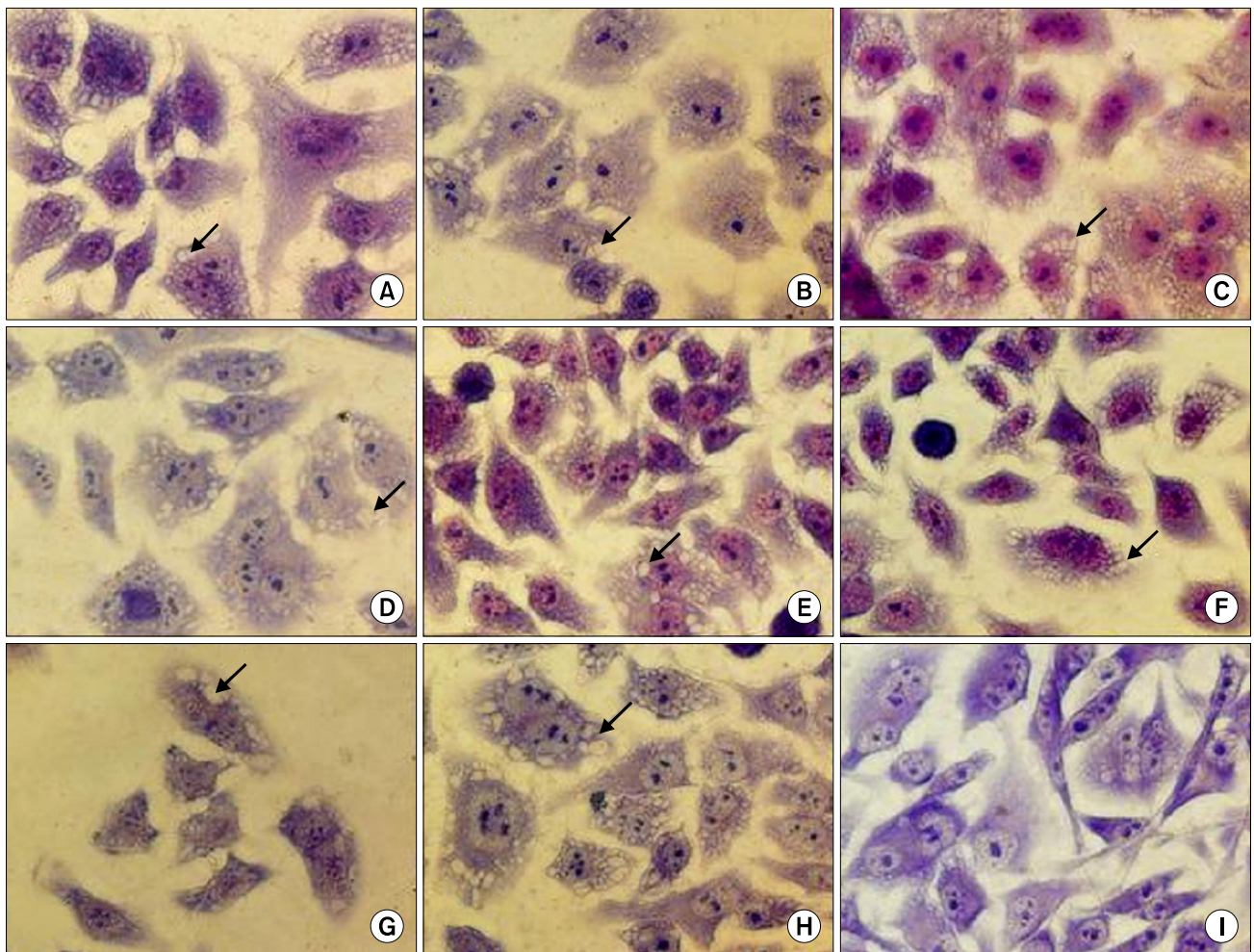


Fig. 1. Vacuolation responses in Hep-2 cells after treatment with isolated *B. cereus* supernatant. (A) Hep-2 cell treated with *B. cereus* (case 1) culture supernatant at 1/64 dilution, 8 h after treatment. Arrow indicate vacuolation of cell (200× magnification). (B) *B. cereus* (case 2). (C) *B. cereus* (case 3). (D) *B. cereus* (case 4). (E) *B. cereus* (case 5). (F) *B. cereus* (case 6). (G) *B. cereus* (case 7). (H) *B. cereus* (case 8). (I) Hep-2 cells control with no vacuolation present, 8 h after treatment (200× magnification).

technology, Seoul, Korea)를 사용하여 PCR을 시행하였다[4]. 분리된 균주 모두에서 동일한 독소 유전자 패턴 결과를 보였다 (Table 1). 특히 *hblA*, *hblC*, *hblD*, *bceT* 그리고 *cytK* 유전자는 검출되지 않았으며, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *entFM* 그리고 cereulide를 합성하는 효소 유전자인 *ces* 유전자가 검출되었다. HBL 독소와 NHE 독소의 발현 여부를 확인하기 위하여 BCET RPLA (Oxoid, Hampshire, UK)와 Tecra ELISA (Tecra International Pty Ltd., NSW, Australia) kit를 이용하여 독소 단백질 검사를 하였으나 모두 음성의 결과를 보였다(Table 1).

3. 구토 독소 검사

구토 독소의 발현 확인을 위하여 Hep-2 세포의 공포현상 역가를 측정하였다. 실험 방법은 Taylor 등[5]의 방법을 사용하였으나 70% 이상의 세포들이 용해되어 공포현상을 관찰하기에 어려움이 있어 수정하였으며, 방법을 간략하게 요약하면 다음과 같다. 분리된 병원체의 단일 집락을 Crossley milk medium (Oxoid, Hampshire, UK)에 18시간 배양 후 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 상층액을 가압 멸균 후 70% 정도 자란 Hep-2 세포에 원액부터 1 : 128까지 2배 계단 희석하여 첨가하였다. 상층액이 첨가된 Hep-2 세포는 5% CO₂, 37°C항온기에 넣고 8시간 배양 후 김자 염색 후 현미경으로 관찰하였다. 실험 결과 1 : 128의 희석액까지 첨가한 세포의 세포질 내에서 공포현상이 관찰되었다(Table 1). Fig. 1은 공포현상 결과를 명확히 관찰할 수 있는 1 : 64 희석액을 첨가한 실험 결과이다.

4. PFGE

분리된 8주의 *B. cereus*의 유전학적 근연관계를 확인하고자 PFGE를 실시하였다. *B. cereus*는 그람 음성균으로 아포를 형성

하므로 기존의 논문[6]들에 언급된 PFGE 방법으로 명확한 결과를 기대하기 힘들어 본 실험실에서 구축한 PFGE 실험법을 사용하여 실험하였다. 간략하게 실험방법을 소개하면, TSB에 *B. cereus*를 접종하여 18시간 배양 후 3 mL을 새로운 TSB 30 ml에 접종하여 4시간 동안 37°C에서 정치 배양하였다. 4,000 rpm으로 15분간 원심 분리 후 침전물 1 mL을 1 mg의 lysozme과 10 unit의 lysostaphin이 첨가된 예비용해완충액(10 mM Tris, 1 M NaCl, pH 7.6)으로 부유 후 Vitek 탁도계를 이용하여 탁도를 10으로 맞추었다. 이후 1.3%의 plug를 만든 후 용해완충액(6 mM Tris, 1 M NaCl, 100 nM EDTA, 0.5% Brij-58, 0.2% Sodium deoxycholate, 0.5% Sodium lauroylsarcosine, 20 µg/mL RNase, 1 mg/mL lysozyme, 5 u/mL lysostaphin, 20 u/mL mutanolysin)에 넣고 37°C에서 24시간 반응시켰다. 반응 후 plug를 단백질분해효소완충액(0.5 M EDTA, 10% Sodium lauroylsarcosine, 100 µg/mL proteinase K) 2 mL에 넣고 56°C에서 2시간 간격으로 3회 반응시킨다. 이후에 세척완충액으로 6회 세척 후 NotI 제한효소(Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)를 plug 절편당 40 unit을 넣고 37°C 항온수조에서 24시간 절단하였다. 전기영동은 CHEF Mapper[®] XA Pulsed Field Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)를 사용하였으며, 조건은 6 Volt, 2.9 sec initial switching time, 35.4 sec final switching time 그리고 14°C에서 19시간 전기영동 후 ethidium bromide로 30분간 염색 후 Gel Doc system (Bio-Rad Laboratories, CA, USA)을 이용하여 사진 촬영하였다. PFGE 밴드 패턴은 Bionumerics 5.1 program을 이용하여 분석하였다. 분석결과 NotI 제한 효소를 처리하였을 경우 13개의 밴드가 확인되었으며, 환자로부터 분리된 병원체 6주와 무증상자로부터 분리된 병원체 2주 모두가 100% 일치하는 패턴을 보였으나,

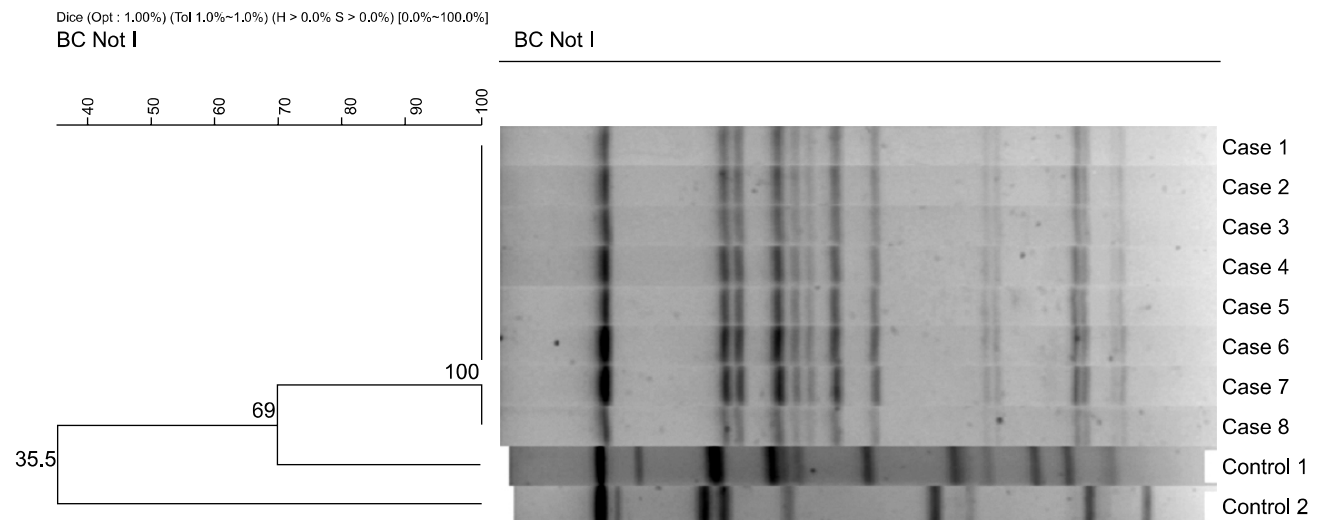


Fig. 2. PFGE patterns of emetic toxin producing *B. cereus* isolated from patients of the outbreak. Control 1 and control 2 strain isolates from human and food in 2007, respectively.

대조군으로 사용된 2007년 임상분리주와는 69%의 상동성을 보였으며, 환경 분리주와는 39.5%의 상동성을 보였다(Fig. 2). 대조군으로 사용된 2주는 모두 구토독소를 분비하는 *B. cereus* 를 사용하였다.

고 찰

Bacillus spp.는 자연계에 광범위하게 존재하며, 열악한 환경에서도 생존하는 능력을 가지고 있다. *B. cereus*의 경우 다양한 독소들을 생성하고 있으며, 이들 독소 종류에 의해 설사 및 구토를 야기한다. *B. cereus*에 의한 감염은 증상이 심하지 않으며, 수 일내로 자연 치유되는 경우가 많아 병원에 내원하는 경우가 드물어 실제 감염률에 비해 보고되지 않는 경우가 많다. 또한 *B. cereus*의 감염 증상별로 설사를 유발하는 경우에는 *Clostridium perfringens*와 잠복기 및 증상이 유사하며, 구토를 유발하는 경우에는 *Staphylococcus aureus* 독소 감염 증상과 유사하여 정확한 진단 및 원인 병원체 분리에 어려움이 있다. 국내에서 발생하는 *B. cereus*의 감염증에 대한 통계는 질병관리본부 국립보건연구원 급성 설사질환자 실험실 감시망 사업 2007년도 자료[7]에 의하면 전국적으로 5,345주의 설사 유발 세균이 분리되었으며, 이 중 337주의 *B. cereus*가 분리되어 전체 설사 유발 원인균의 6.3%를 보였다. 그러나 구토증후군을 유발하는 *B. cereus*에 관한 보고는 없는 실정이다. 1970년대 초반 영국의 중 국식 식당에서 조리된 쌀에 의해 감염된 것을 시작으로 1989년까지 11개 국가에서 200여 건의 구토형 집단발생이 보고되었다[8]. 구토형의 경우 전분이 있는 음식, 파스타, 유아 이유식 등에서 주로 분리가 되며, 특히 생쌀과 조리된 쌀에서 10~100% 구토형 *B. cereus*가 오염되었다[5]. 쌀을 많이 소비하는 국내 실정에서 잠재적인 환자의 발생 위험이 있다.

*B. cereus*에 *hbl* 유전자가 존재할 경우는 34~84% 정도이나, *nhe*와 *entFM* 유전자는 92~100% 존재하는 것으로 보고되었다[9]. 또한 구토형의 경우 *hbl* 유전자가 없으면서 *nhe* 유전자만이 존재하는 특징을 가진다. 본 연구 결과 8주의 병원체에서 *hbl* 유전자는 검출되지 않았으며, *nhe*와 *entFM* 유전자만이 검출된 것은 전형적인 구토형 *B. cereus*의 유전자 패턴을 보였다. 그러나 모든 병원체에서 *nhe* 유전자를 보유하고 있으나 NHE 독소는 발현하지 않았다.

구토를 유발하는 독소는 내열성으로(D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃의 구조를 이루는 1.2 kDa의 단백질이다. Cereulide는 세포의 미토콘드리아막에서 potassium ionophore와 유사한 작용을 하는 것으로 알려졌다. 단백질이 매우 작고 항원성이 낮은 이유로 인해 독소를 직접적으로 진단할 수 있는 방법이 없다. 가장 보편적으로 독소의 존재 여부를 확인하는 방법으로 cell cytotoxicity를 측정하는 방법과, Hep-2 cell에 공포현상을 확인하는 방법이 있다[10]. 이 방법 중에서 공포현상을 확인하

는 방법을 사용하여 독소의 존재를 확인한 결과 모든 병원체에서 1 : 128 이상의 역가에서 공포현상이 관찰되었다.

원인 균주의 유전학적 근연관계를 분석하기 위하여 PFGE 방법을 이용하여 확인하였다. 집단 감염 발생과 산발적으로 발생한 환자에게서 분리된 병원체를 대상으로 PFGE를 수행한 결과, 근연관계를 분석하는 데 있어 신뢰성 있는 방법으로 보고되었다[11]. 본 연구에서는 NotII 제한 효소를 사용한 PFGE 결과 100% 일치하는 밴드 패턴 결과를 얻었다. 이는 단일 병원체에 감염된 것을 입증하는 결과로 집단 발생의 중요한 근거자료이다.

감사의 글

본 연구는 질병관리본부의 수인성-식품매개성 질환 실험실 감시사업으로 수행한 결과임.

참 고 문 헌

1. Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. FEMS Microbiol Lett 1995;129:17-20.
2. Mahler H, Pasi A, Kramer JM, Schulte P, Scoging AC, Bär W, et al. Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. New Engl J Med 1997;336:1142-8.
3. Ehling-Schulz M, Vukov N, Schulz A, Shaheen R, Andersson M, Märklbauer E, et al. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. Appl Environ Microbiol 2005;71:105-13.
4. Yang IC, Shih DY, Huang TP, Huang YP, Wang JY, Pan TM. Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. J Food Prot 2005;68:2123-30.
5. Taylor JM, Sutherland AD, Aidoo KE, Logan NA. Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. FEMS Microbiol Lett 2005;242:313-7.
6. Liu PY, Ke SC, Chen SL. Use of pulsed-field gel electrophoresis to investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit. J Clin Microbiol 1997;35:1533-5.
7. Division of Enteric Bacterial Infections, Division of Enteric and Hepatitis viruses, Division of Malaria and Parasitic Diseases. Surveillance Network of Water-borne and Food-borne disease. 1th ed. Seoul; Center for Infectious Diseases, National Institute of Health, 2007:7-31.
8. Kramer JM and Gilbert RJ. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle MP, ed. Food Borne Bacterial Pathogens. New York; Marcel Dekker, 1989:21-70.
9. Rusul G and Yaacob NH. Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA. Int J Food Microbiol 1995;25:131-9.
10. Nishikawa Y, Kramer JM, Hanaoka M, Yasukawa A. Evaluation of serotyping, biotyping, plasmid banding pattern analysis, and HEP-2 vacuolation factor assay in the epidemiological investigation of

Bacillus cereus emetic-syndrome food poisoning. Int J Food Microbiol 1996;31:149-59.

11. Liu PY, Ke SC, Chen SL. Use of pulsed-field gel electrophoresis to

investigate a pseudo-outbreak of *Bacillus cereus* in a pediatric unit. J Clin Microbiol 1997;35:1533-5.

=국문초록=

구토독소를 분비하는 *Bacillus cereus*에 의한 집단 발병 1예

¹질병관리본부 국립보건연구원 감염병센터 장내세균팀, ²울산보건환경연구원 미생물과
김종현¹, 임은경², 장현철¹, 박주영², 이선진¹, 박미선¹, 최길배², 이복권¹

*Bacillus cereus*는 두 가지 형태의 증상을 유발하는 위장관계 질병을 야기한다. 이는 한 가지 구토 독소와 9개의 장독소를 생산한다. 2008년 3월, 8명의 한 가족이 생선회를 섭취 후 식중독 증상을 보였다. 복통과 구토 증상을 보이는 6명의 환자와 2명의 무증상자의 대변 검체에서 구토 독소를 생산하는 *B. cereus*를 분리하였다. 본 연구에서는 haemolysin BL (Hbl), nonhemolytic enterotoxin (Nhe), *B. cereus* enterotoxin T (BceT), enterotoxin FM (EntFM), cytotoxin K (cytK) 등의 장독소 유전자와 구토 독소를 PCR 방법을 사용하여 검출하였다. 또한 독소의 활성은 BCET-RPLA, Tecra ELISA kit 그리고 Hep-2 세포독성 실험을 통해 확인하였다. 분리된 병원체는 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 방법으로 유전자적 근연 관계를 확인하였다. 본 연구는 구토 독소를 분비하는 *B. cereus*로 인한 집단발생을 확인하였기에 문헌 고찰과 함께 보고하는 바이다. [대한임상미생물학회지 2009;12:48-52]

교신저자 : 이복권, 122-701, 서울시 은평구 통일로 194번지
국립보건연구원 감염병센터 장내세균팀
Tel: 02-380-2981, Fax: 02-352-4767
E-mail: bokrates@nih.go.kr