

국내 최초 보툴리누스 중독증 발생 1예

정경태, 강도현, 유천권, 최종현*, 성원근

국립보건원 세균부 병원체방어연구실, 대구광역시*

The First Outbreak of Botulism in Korea

Gyung Tae Chung, Do Hyun Kang, Cheon Kwon Yoo,
Jong Hyun Choi* and Won Keun Seong

Research Center for Pathogen Control, Department of Bacteriology, National Institute of Health, Seoul,
Daegu Metropolitan City*, Korea

Botulism is a rare neuroparalytic disease caused by neurotoxins of *Clostridium* species. A ten-year-old girl and her mother were admitted to a hospital with symptoms of progressive dizziness, blurred vision, slurred speech, constipation and difficulty in swallowing. These characteristic manifestations and clinical course prompted an examination of the possibility of botulism. Mouse bioassay performed with mother's stool demonstrated type A botulinum toxin and culture of the mother's stool was positive for *Clostridium botulinum* type A. This is the first case of botulism in Korea. (*Korean J Clin Microbiol* 2003;6(2):160-163)

Key words : Botulism, Neurotoxin, *Clostridium botulinum*

서 론

보툴리누스 중독증은 보툴리눔균(*Clostridium botulinum*)이 생산하는 신경독소에 의해 유발되는 치명적인 질환으로 법정전염병으로 지정되어 있으며 사람간에는 전파되지 않는다[1, 2]. 보툴리눔 독소는 혈청형에 따라 A~G의 7가지로 구분되고 사람에서는 대부분 A, B, E 혈청형의 독소가 중독증을 일으키며 매우 드물게 F형의 독소에 의한 중독사례가 보고되고 있다. 자연계에 존재하는 가장 강력한 독소로 0.05-0.1 µg의 적은 양으로 사람을 치사시킬 수 있어 사린가스 보다 15,000-100,000배 더 독성이 강한 것으로 알려져 있다[3]. A, B, F 혈청형의 보툴리눔균은 토양과 동물의 장관에서 주로 발견되고 E 혈청형은 해양 수서 환경에서 발견된다[4]. 보툴리눔 독소는 신경근 연결점에서 신경전달물질인 아세틸콜린의 방출을 억제하여 근육마비 및 신경장애를 일으키고 이중착

시, 흐릿한 시야, 눈꺼풀 처짐, 발음 및 발성장애, 연하곤란, 구강건조, 근육마비 등의 증상을 유발하고 호흡근, 흉근 등의 마비로 인한 호흡장애로 사망한다[1,5,6]. 보툴리누스 중독증은 3가지 주요 감염 형태로 구별되어 음식매개성 보툴리누스 중독증(foodborne botulism)은 이미 형성된 독소를 섭취한 사람이 6시간에서 2주 내(통상 12~36시간)에 증상을 유발하며, 영아 보툴리누스 중독증(infant botulism)은 감수성이 있는 영아의 장관에 보툴리눔균이 정착하여 생산한 독소를 흡수하여 유발된다. 마지막으로 창상 보툴리누스 중독증(wound botulism)은 상처에 독소를 분비하는 보툴리눔균이 감염되어 유발되며 잠복기가 4~14일로 길다. 음식매개성 보툴리누스 중독증은 부적절하게 식품을 보존하거나 준비하는 경우와 보툴리눔균이 발아, 증식하여 독소를 생산할 수 있는 혐기성 상태에서 보관할 경우에 음식을 섭취하여 모든 연령층에서 일어날 수 있다. 보툴리누스 중독증에 대한 치료제로는 미국 CDC (Centers for Disease Control and Prevention)와 프랑스 파스퇴르 연구소 등에서 말에 불활성화시킨 독소를 면역하여 생산한 다가 항독소와 미국 California Department of Health Services에서 공급하는 Human Botulism Immune Globulin이 있으며 이들 치료제는 독소가 presynaptic 신경말단에 결합하기전인 감염 초기에 투

접수번호: CM62-04

교신저자: 정경태

(122-701) 서울시 은평구 녹번동 5

국립보건원 세균부 병원체방어연구실

TEL : 02) 380-1466 FAX : 02) 380-1487

E-mail : gtchung@nih.go.kr

여된다면 증상을 악화시키는데 효과적이고 대부분의 환자들은 수주 내지 수개월의 관리 후에 회복된다[3]. 최근 저자 등은 국내에서 최초로 보툴리누스 중독증 의심 환자의 분변에서 보툴리눔 독소를 검출하고 보툴리눔균을 분리하여 보툴리누스 중독증으로 확진하였기에 간단한 문헌고찰과 함께 이를 보고하는 바이다.

증 례

환 자 : 구△△(36세), 진△△(10세), 진XX(42세)

주 소 : 대칭성마비, 연하곤란, 안검하수, 호흡곤란, 사력저하, 감각이상

과거력 : 특이사항 없음

가족력 : 특이사항 없음

현병력과 임상결과 : 환자들은 6월 12일(목) 23시경 한증막사우나에서 소세지를 구입하여 모녀관계인 구△△과 진△△가 나누어 먹고 아버지 진XX는 극히 소량만 섭취하였다. 14일 8시경 모녀 모두 전신무력감을 동반하여 마비 및 호흡곤란 증상 등이 진행되기 시작하였으며 14일과 15일에 △△의원과 △△병원에서 외래진료를 받은 후 16일 오후 ○○의료원에 입원하였다. 17일에 ○○의료원에서 보툴리누스 중독증으로 의심되어 보건소로 전염병 발생 신고를 하였으며 시보건과와 보건소에서 역학조사를 실시하였다. 18일에 구△△과 진△△는 중환자실로 이송되었으며 아버지 진XX는 21일에 호흡곤란으로 입원하였다가 증상이 경미하여 23일날 일반병실로 이송된 후 퇴원하였다. 7월 22일 현재 모녀 환자는 중환자실에서 전신마비 증상 및 호흡곤란 등으로 인공호흡기 치료를 받고 있는 상태이다.

검사소견 : 사지 근무력증, 연하곤란 및 역류, 발음 및 발성장애, 안검하수, 복시증, 호흡곤란 등의 증상이 순차적으로 발생하였다. 의식은 명료하며 감각신경은 보존되어 있었다. 구역, 구토, 복통, 설사 등의 소화기 증상은 없었고 Tensilon test, 근전도검사, 신경전도검사 등에서 정상으로 판정되어 Guillain-Barre 증후군은 배제할 수 있었으며 혈액검사 상에서는 특별한 이상소견이 없었다.

세균학적 검사 : 전형적인 보툴리누스 중독증 증세를 나타낸 환자들에서 채취한 검체와 보툴리누스 중독증을 유발시킨 것으로 의심되는 소세지 제품과 동일한 제조사와 동일 제조번호의 소세지를 대상으로 보툴리눔 독소 검출 및 보툴리눔균 분리를 시도하였다.

1. 보툴리눔 독소 검출

혈액 검체는 즉시 혈청을 분리하여 ICR 마우스(20-30g)의 복강에 0.5 mL을 주사한 후 보툴리누스 중독증세 유무 및 치사 여부를 확인한 바 환자 3인 혈청 접종 마우스에서 모두 중독증상이 나타나지 않았다. 분변 10 g을 젤라틴 인산 희석액(pH 6.2) 10 mL에 넣고 2-3분 동안

vortexing하여 혼합하고 4℃에서 2시간 동안 방치한 후 다시 vortexing하여 균질화시켰다. 그리고 15,000 ×g로 20분 동안 원심하여 분리된 상층액을 0.45 μm 주사기 필터로 여과한 후 2수의 마우스 복강에 0.5 mL씩 접종하였다. 진△△의 분변 희석액을 접종한 마우스에서는 증세가 관찰되지 않았으나, 구△△의 분변 희석액을 접종한 마우스에서는 접종 후 털이 서고 호흡곤란 및 마비증상이 일어나는 전형적인 증상을 나타냈으며 접종 후 20시간 경과 후에 모두 사망하였다. 그리고 분변 희석액 0.5 mL과 보툴리눔 독소에 대한 hexavalent (A-F) antitoxin (CDC, USA) 0.12 mL을 완전히 혼합하여 45분 동안 실온에서 반응시킨 후 2수의 마우스 복강에 0.55 mL을 접종하여 마우스 독소 중화시험을 실시한 결과 마우스 2수 모두 생존함으로써 보툴리눔 독소가 분변 내에 존재하고 있음을 입증하였다. 소세지의 경우에는 무균적으로 음식물과 동량의 젤라틴 인산 희석액을 첨가하고 마쇄하여 원심분리 및 여과 후 마우스 복강에 접종하였으나 마우스에서 중독증상을 관찰할 수 없었다.

2. 보툴리눔균 분리

보툴리눔균을 검체에서 분리하기 위하여 분변과 소세지를 각각 cooked meat 배지(Difco, Michigan, USA)에서 35℃에서 24시간 그리고 30℃에서 4일간 혐기성 배양기에서 증균 배양하고 분리배지(Clostridium botulinum isolation agar)에 접종한 후 배양하여 lipolysis에 의해 opaque zone을 주위에 형성하는 의심 집락들을 골라 혈액배지와 cooked meat 배지에 배양하였다. 혈액배지에 접종한 균으로 API 20 A (Biomerieux, France) 생화학 동정을, 액체배지에 접종한 균으로는 원심분리 후 상층액을 여과하여 마우스에 접종하는데 사용하였다. 소세지를 포함한 다른 검체에서는 보툴리눔균이 분리되지 않았으나, 구△△의 분변에서 분리된 균을 API 20 A로 생화학적 검사를 실시한 결과 보툴리눔균으로 동정되었으며 이 균을 배양하여 상층액을 접종한 마우스는 전형적인 중독증상을 나타낸 후 3시간 이내에 모두 사망함으로써 분리균의 독소 생성능력을 확인할 수 있었다.

3. 보툴리눔 독소 혈청형 결정

보툴리눔 독소 각 A, B, E 및 F 혈청형별로 특이적인 primer를 합성하여 분리균에 대해 Multiplex PCR을 실시하였다. PCR은 분리된 균 집락을 90℃에서 10분간 끓여 12,000 rpm에서 10분간 원심한 후 상층액을 멸균된 증류수로 100배 희석하여 사용하였으며 Lindstrom등이 보고한 primer를 (주)바이오니아에 의뢰하여 합성하였다[7]. PCR 조건은 95℃에서 30초간 denaturation, 60℃에서 25초간 annealing, 그리고 72℃에서 1분 25초간 polymerization을 1 cycle로 하여 27 cycle 반응시키고 마지막으로 72℃ 3

분 동안 반응시킨 후 2% agarose gel에서 전기영동하였다. 이 결과 혈청형 A 독소유전자 PCR 산물의 증폭밴드를 확인할 수 있었다. 또한 Takeshi 등[8] 보고한 특이적인 혈청형 A primer로 증폭시켜 얻은 283bp의 PCR 산물을 pCR 2.1-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, USA)에 ligation시킨 후 대장균 TOP10 competent cell에 형질전환하였고 이를 ampicillin (50 µg/mL), X-gal 및 IPTG가 들어 있는 LB 평판배지에 도말하여 PCR 산물이 삽입된 클론을 선별한 후 plasmid mini-kit (Qiagen, Germany)으로 정제하여 염기서열 분석을 실시한 결과 알려진 보툴리눔 독소 혈청형 A의 염기서열과 일치함을 확인할 수 있었다.

고 찰

보툴리누스 중독증은 모든 대륙에서 발생하고 있으며 발생률은 낮지만 치명률은 높다. 아르헨티나의 경우에는 1980년에서 1989년까지 16건이 발생하였으며 이 중 77%가 A 혈청형에 의한 보툴리누스 중독증으로 가장 높은 비율을 차지하였다[9]. 프랑스의 경우에는 B 혈청형에 의한 보툴리누스 중독증 발생이 많았지만 최근에는 식생활의 변화로 인해 E 혈청형에 의한 보툴리누스 중독증이 증가하고 있는 추세이며 덴마크 북유럽 국가에서도 E 혈청형에 의해 많이 발생하고 있다[10]. 외국에서 발생한 음식매개성 보툴리누스 중독증 사례를 보면 미국에서는 1980년부터 1996년까지 16년 동안 235건이 발생하였고 독소 혈청형을 보면 A 혈청형이 54.1%, B 혈청형이 14.8%, E 혈청형이 26.7%, F 혈청형이 1.5%로 A 혈청형에 의한 보툴리누스 중독증 발생이 가장 많았다. 국내에서는 아직 보툴리누스 중독증이 보고된 바 없었으나 중국과 일본에서는 음식매개성 및 영아 보툴리누스 중독증 환자 발생이 보고되고 있다[11, 12, 13].

미국에서 발생한 탄저균 포자에 의한 생물테러 이후 국내에서도 2002년 3월에 생물테러 가능 전염병의 발생을 조기에 감시하고 그 확산을 방지하기 위하여 보툴리누스 중독증이 제4군 전염병에 추가되었고 전염병 예방법 시행규칙 개정에 따라 분리시 신고대상 병원체에 보툴리눔균과 그 독소가 포함된 바 있다.

보툴리눔 독소 검출법으로서 마우스 bioassay법은 1 MLD50 (1 mouse 50% lethal dose)의 검출한계로 mL 당 10-20 pg의 독소까지 검출하는 정도로 매우 우수한 민감도를 가지고 있어, 동물 사용, 긴 검출기간 등의 단점에도 불구하고[12] 현재까지 국제적으로 공인을 받는 진단법으로 실험실 진단 기준이 된다. 우리나라의 음식매개성 보툴리누스 중독증의 진단기준(법정전염병 진단기준)은 임상적으로 보툴리누스 중독증에 부합하는 임상증상을 나타내야 하며 환자의 검체(분변, 혈청) 혹은 먹은 음식물에서 독소 검출이 되거나 보툴리눔균이 분리되어야 하는 것으로 정하고 있다.

보툴리누스 중독증 검사를 수행하는데 있어 검체의 양

과 운송방법은 매우 중요하여 가급적 빨리 냉장상태로 하여 혈액은 10 mL, 분변의 경우는 10g 정도가 운송되어야 한다. 이번 환자들의 검체는 채취 즉시 택배로 혐기성 용기에 보관하여 냉장상태를 유지하면서 운송되었다.

혐기성 세균을 동정할 수 있는 3 종류의 상품화된 생화학적 동정 키트(API 20 A, Rapid ID 32 A, Rapid ANA II)가 있다. 이러한 키트들의 보툴리눔균 동정 능력을 평가한 결과 모든 proteolytic *C. botulinum* 균들은 Rapid ID 32 A와 Rapid ANA II에 의해 동정되지 못하였고, 반대로 모든 non-proteolytic 보툴리눔균들은 API 20 A에 의해 동정되지 않아 이들 시험법들이 보툴리눔균을 동정하는데 있어 완전히 신뢰할 수 없음이 보고된 바 있다[14]. 그리고 독소유전자를 가지고 있어도 그 독소를 생산하지 않는 보툴리눔균들이 존재하기 때문에 보툴리눔균의 독소 생산 여부를 확인하는 것은 보툴리누스 중독증을 진단하는데 있어 매우 중요하다.

보툴리눔 독소 검출법에 대한 연구로 마우스 bioassay보다 경제적, 시간적으로 우수한 in vivo bioassay 및 in vitro assay법들이 연구 개발되어 보고되어 있으나[15,16] 현재까지는 보툴리누스 중독증 진단에 있어 추가적인 검사법으로만 사용되고 있다. 본 연구에서도 마우스 bioassay와 함께 분리된 보툴리눔균의 혈청형을 확인하고자 특이적인 보툴리눔 독소유전자를 검출할 수 있는 PCR을 수행하였다. 그리고 증폭된 PCR 최종 산물의 염기서열을 TA 클로닝을 한 후 정확히 분석하여 증폭된 유전자가 type A 보툴리눔 균주의 유전자임을 확인하였다.

역학조사를 실시한 결과 환자들은 Guillain-Barre 증후군 및 중증근무력증(Myasthenia Gravis)을 의심할만한 소견이 뚜렷하지 않았으며, 같은 시기에 증세의 발현이 시작되었고, 동일한 원인에 의해 발생한 마비성 신경증후군임을 고려할 경우 음식매개성 보툴리누스 중독증의 가능성이 매우 높았다. 증상 발생 3일전부터 완제품의 섭취가 없었으며, 자택 내 냉장고에도 김치, 고추장, 된장, 마른 멸치, 삶은 나물 등 의심할 만한 가공음식물은 없었다. 따라서 소세지가 원인음식으로 추정되며 이 소세지를 원인음식으로 추정할 경우 잠복기가 30여 시간으로 음식매개성 보툴리누스 중독증에 부합하였다. 또한 다른 환자들에 비해 아주 적은 양의 소세지를 먹은 진XX(42세)는 경미한 증상을 나타내었다.

요 약

보툴리누스 중독증은 클로스트리디움속이 생산하는 신경독소에 의해 일어나는 드문 신경마비 질환이다. 모녀가 사지 근무력증, 연하곤란 및 역류, 발음 및 발성장애, 안검하수, 복시증 등의 증상이 순차적으로 발생하여 병원에 입원하였다. 환자의 임상 증상과 병원 검사결과를 분석한 바 보툴리누스 중독증이 의심되어 환자들의 검체와 의심되는 식품이 국립보건원에 운송되어 실험실

검사가 수행되었다. 그 결과 환자의 분변에서 보툴리눔 독소가 검출되었으며 독소를 생산하는 혈청형 A 보툴리눔균도 분리 동정되어 보툴리누스 중독증으로 확진하였으며 이는 국내에서 보고된 최초의 보툴리누스 중독증 사례이다.

참 고 문 헌

1. Simpson LL. *Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin*. *Annu. Rev Pharmacol Toxicol* 1986; 26:427-53.
2. Sapiro RL, Hatheway C, Swerdlow D. *Botulism in the United States : a clinical and epidemiological review*. *Ann Intern Med* 1998;129:221-8.
3. Lamanna C. *The most poisonous poison*. *Science* 1959; 130:763-72.
4. Varnam AH, Evans MG. *Clostridium botulinum, Food-borne pathogens-an illustrated text*, St. Louis, London Brook House; Wolfe, 1991.
5. Haberman E and Dreyer F. *Clostridial neurotoxins: handling and action at the cellular and molecular level*. *Cur Top Microbiol Immunol* 1986;129:93-179.
6. Schiavo G, Benfebati F, Poulain B, Rossetto O, Montecucco C, et al. *Tetanus and botulinum B neurotoxin block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin*. *Nature* 1992;359:832-5.
7. Lindstrom M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S, Korkeala H, et al. *Multiplex PCR assay for detection and identification of Clostridium botulinum types A, B, E, and F in food and fecal samples*. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:5694-9.
8. Takeshi K, Fujinaga Y, Inoue K, Nakajima H, Oguma K, Ueno T, et al. *Simple method for detection of Clostridium botulinum type A to F neurotoxin genes by polymerase chain reaction*. *Microbiol Immunol* 1996;40:5-11.
9. Escartin EF. *Clostridium botulinum, Microbiologia e inocuidad de los alimentos Mexico Universidad Autonoma de Queretaro* 2000.
10. Boyer A, Girault C, Bauer F, Korach JM, Salomon J, Bonmarchand G, et al. *Two cases of foodborne botulism type E and review of epidemiology in France*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:192-5.
11. Meng X, Karasawa T, Zou K, Kuang X, Wang X, and Nakamura S, et al. *Characterization of a neurotoxicogenic Clostridium butyricum strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism*. *J Clin Microbiol* 1997;35:2160-2.
12. Kozaki S, Kamata Y, Nishiki T, Kakinuma H, Maruyama H, and Nakamura S, et al. *Characterization of Clostridium botulinum type B neurotoxin associated with infant botulism in Japan*. *Infect Immun* 1998;66:4811-6.
13. Kobayashi H, Fujisawa K, Saito Y, Kamijo M, Oshima S, and Kitamura M, et al. *A botulism case of a 12-year-old girl caused by intestinal colonization of Clostridium botulinum type Ab*. *Jpn J Infect Dis*. 2003;56:73-4.
14. Lindstrom MK, Jankola HM, Hielm S, Hyytia EK, Korkeala HJ. *Identification of Clostridium botulinum with API 20 A, Rapid ID 32 A and RapID ANA II*. *FEMES Immunol Med Microbiol* 1999;24:267-74.
15. Wictome M, Newton K, Jameson K, Hallis B, Dunnigan P, and Shone C, et al. *Development of an in vitro bioassay for Clostridium botulinum type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay*. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3787-92.
16. Fach P, Perelle S, Dilasser F, Grout J, Dargaignaratz C, and Broussolle V, et al. *Detection by PCR-enzyme-linked immunosorbent assay of Clostridium botulinum in fish and environmental samples from a coastal area in northern France*. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:5870-6.