

Detection of 13 Enteric Bacteria and 5 Viruses Causing Acute Infectious Diarrhea Using Multiplex PCR from Direct Stool Specimens

Seungok Lee¹, Yeon-Joon Park², Hae Kyung Lee³, Soo-Young Kim⁴,
Ja-Young Kim⁵, So-Young Lee⁶, Jin-Kyung Yoo²

¹Department of Laboratory Medicine, Incheon St. Mary's Hospital, The Catholic University School of Medicine, Incheon, ²Department of Laboratory Medicine, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University School of Medicine, Seoul, ³Department of Laboratory Medicine, Uijeongbu St. Mary's Hospital, The Catholic University School of Medicine, Uijeongbu, ⁴Department of Laboratory Medicine, St. Vincent's Hospital, The Catholic University School of Medicine, Suwon, ⁵Department of Laboratory Medicine, Daejeon St. Mary's Hospital, The Catholic University School of Medicine, Daejeon, ⁶Department of Laboratory Medicine, Yeouido St. Mary's Hospital, The Catholic University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: We investigated the prevalence of various pathogens (13 enteric bacteria and 5 viruses) which cause diarrhea using multiplex PCR of stool specimens and compared two multiplex PCR methods for detecting diarrheagenic *Escherichia coli*.

Methods: A total of 405 stool specimens submitted between November 2010 to February 2011 for routine culture of enteric pathogens were included and screened for five viruses (astrovirus, Group A rotavirus, enteric adenovirus, norovirus G1/G2) and eight bacteria (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., *C. difficile* Toxin B, *C. perfringens*, *Y. enterocolitica*, *Aeromonas* spp.) using the Seeplex[®] Diarrhea ACE detection kit (Seegene). In addition, virulence-associated genes of enteropathogenic *E. coli*, (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteroinvasive *E. coli*, (EIEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), and enteroaggressive *E. coli* (EAEC) were detected using 16-plex PCR and a commercial diarrheagenic

E. coli detection (DEC) PCR kit (SSI Diagnostica).

Results: Overall, 138 (34.1%) of 405 samples was positive for pathogen. The positive rate for virus was 18.5%. norovirus G2, Group A rotavirus, enteric adenovirus, astrovirus and norovirus G1 were detected in 40, 23, 8, 3 and 1 samples, respectively. The positive rate for bacteria was 24.4% (99/405). *C. difficile* toxin B was the most frequently detected, followed by *C. perfringens*, EPEC, and EAEC. The agreements of the two multiplex PCR methods for detecting EPEC and EHEC were 99.3% and 100%, respectively.

Conclusion: The detection rate was high (34.1%) including various diarrheagenic *E. coli* (6.2%) and *C. perfringens* (5.2%). Multiplex PCR is thus useful for detecting various pathogens. (**Ann Clin Microbiol 2013; 16:33-38**)

Key Words: Agreement, Diarrheagenic *Escherichia coli*, Norovirus, Rotavirus

서 론

급성 감염성 설사는 세계적으로 흔한 위장관계 질환으로 그 원인은 세균, 바이러스, 원충 등 다양하다. 국내에서는 질병관리본부 국립보건연구원 주관으로 2003년부터 급성설사질환 실험실 감시사업(EnterNet-Korea)을 해오고 있으며, 2008년도 감시사업 통계 보고에 따르면 세균의 양성률은 3.6% (1,169/32,748)였으며, 조사 대상 병원체였던 enterohemorrhagic *E.*

coli (EHEC 또는 Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni* 중 병원성 대장균인 EHEC와 ETEC의 분리율(44%)이 *Salmonella* 분리율(34%)을 초과하였다[1]. 최근 핀란드의 연구에서도 외국 여행 과거력이 있는 환자의 경우 병원성 대장균의 양성률이 39.6%에 달해 선두(leading) 검사실에서라도 설사 질환의 진단의 일부로서 이들 병원성 대장균에 대한 선별 검사가 포함되어야 한다고 하였다[2]. 그러나 우리나라를 포함한 대부분의 병원 검사실에서 일상적으로 시행되는 변 배양에서는 비교적 동정이 용이한 *Salmonella*와 *Shigella* 균주에 대해서만 선택배지를 사용하여 검출하고, 실제 감염성 설사의 더 흔한 원인인 병원성 대장균과 바이러스

Received 1 August, 2012, Revised 23 October, 2012

Accepted 23 October, 2012

Correspondence: Yeon-Joon Park, Department of Laboratory Medicine, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, 505, Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-040, Korea. (Tel) 82-2-2258-1640, (Fax) 82-2-2258-1719, (E-mail) yjpk@catholic.ac.kr

에 대한 충분한 정보를 제공하지 못하고 있다.

설사를 일으키는 병원성 대장균은 EHEC와 ETEC를 포함하여 enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) 의 5가지로 분류된다[3]. EHEC O157을 제외한 다른 병원성 대장균들은 생화학적 성상으로 병원성과 비병원성을 구별할 수 없으므로 최근 병원성 대장균에 대한 다중 중합효소연쇄반응(multiplex PCR)을 이용한 핵산증폭법이 시도되고 있다[4-9].

이 연구에서는 배양 검사가 의뢰된 설사변 검체를 대상으로 5종의 설사 바이러스(Group A rotavirus, norovirus G1, norovirus G2, enteric adenovirus 및 astrovirus), 5종의 병원성 대장균(EHEC, ETEC, EPEC, EAEC 및 EIEC)을 포함한 배양과 동정이 어려운 설사원인균의 검출 빈도를 다중 중합효소연쇄반응을 이용하여 조사하였다. 또한, 병원성 대장균의 검출 빈도를 두 가지 다중 중합효소연쇄반응법을 이용하여 검사하고 그 일치율을 조사하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2010년 11월부터 2011년 2월까지 6개 대학부속병원(서울(2), 인천(1), 경기도(2) 및 대전(1)) 설사 환자의 변 검체 405개(서울, 159; 인천, 66; 경기도, 84; 대전, 96)를 대상으로 하였다. 성별은 남자 235명과 여자 170명이었으며, 평균 나이는 남자 39세(0-96세), 여자는 38세(0-92세)였다. 연령별 분포는 0-5세 118명(29.1%), 6-18세 36명(8.9%), 19-64세 140명(34.6%), 65세 이상 111명(27.4%)이었다.

Table 1. Primer sets and target genes for the detection of 5 viral and 8 enteric bacterial pathogens in the Seeplex[®] Diarrhea ACE detection kits [4,5]

Primer set	Pathogen	Target gene
Diarrhea-V ACE Detection	Astrovirus	<i>ORF1a</i>
	Group A rotavirus	<i>VP4</i>
	Enteric adenovirus	<i>Hexon</i>
	Norovirus-G1	<i>ORF2</i>
	Norovirus-G2	<i>ORF2</i>
Diarrhea-B1 ACE Detection	<i>Vibrio</i> spp.	<i>hly, tlh, wh</i>
	<i>Clostridium difficile</i> toxin B	<i>tdcB</i>
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>sopB</i>
	<i>Shigella</i> spp.	<i>vif, ipaH</i>
Diarrhea-B2 ACE Detection*	<i>Campylobacter</i> spp.	<i>hip, asp</i>
	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpa</i>
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>inv</i>
	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>hly, ela</i>

*Evaluation for *E. coli* O157, *E. coli* H7 and VTEC in the Diarrhea-B2 ACE Detection kit was excluded in this study.

2. 변 검체 배양

각 단위 병원 진단검사의학과에 배양이 의뢰된 설사변 검체 일부를 MacConkey 배지, *Salmonella-Shigella* (S-S) 선택 배지 및 5 mL tryptic soy broth (TSB)에 접종하고 37°C 대기조건에서 배양을 시행하였다. 하룻밤 배양한 TSB와 잔여 검체는 DNA/RNA 분리 및 중합효소연쇄반응 검사를 위해 가톨릭대학교 서울성모병원으로 의뢰되었다.

3. 병원성 바이러스 5종 및 장내세균 8종 검출

변 검체를 PBS에 잘 풀어서 10% 변 희석액을 만든 후 100°C에서 10분간 끓인 다음 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 Viral gene-spin[™] viral DNA/RNA gene extraction kit (iNtRON biotechnology, Seongnam, Korea)로 DNA/RNA를 추출한 다음 Seeplex[®] Diarrhea ACE detection kits (Seegene, Seoul, Korea)를 이용하여 제조사의 권고 방법에 따라 다중 중합효소연쇄반응을 시행하였다. Kit 내에 포함된 양성 및 음성 대조를 확인하고 결과를 해석하였다. 5종의 RNA 바이러스 및 8종의 장내세균 확인을 위해 사용된 시발체 조합과 표적유전자는 Table 1에 요약하였다[4,5].

4. 병원성 대장균 5종 검출

200 µL의 TSB 검체를 vortex 후 100°C에서 15분간 끓인 다음 실온에서 식힌 후 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. Antikainen 등[2]이 보고한 방법에 따라 5종의 병원성 대장균(EPEC, EHEC, EIEC, ETEC 및 EAEC)에 대하여 각 pathotype에 따라 특이적인 병독유전자(virulence gene) 검출을 표적(target)으로 16쌍의 시발체(primers)를 이용한 다중 중합효소연쇄반응을 시행하였다(16-plex PCR). 또한, 동시에 Diarrheagenic *E. coli* PCR kit (SSI Diagnostica, Hillerød, Denmark)를 이용하여 EAEC를 제외한 4종의 병원성 대장균(EPEC, EHEC, EIEC 및 ETEC)에 대하여 제조사의 프로토콜에 따라 8쌍의 시발체를 이용한 다중 중합효소연쇄반응을 시행하였다[6]. 대조 균주와 시험 균주를 동시에 시행하였고 그 결과를 해석하였다.

Table 2. Comparison of the target genes of diarrheagenic *E. coli* between 16-plex PCR [2] and DEC PCR kit [6]

Pathotype	16-plex PCR	DEC PCR kit
EPEC	<i>[eaeA, escV, ent]*, bfp</i>	<i>eae</i>
EHEC	<i>hly, stx1, stx2</i>	<i>vtx1 (stx1), vtx2 (stx2)</i>
EIEC	<i>ipaH, invE</i>	<i>ipaH</i>
ETEC	<i>elt, est1a, est1b</i>	<i>eltA, estA-human, estA-porcine</i>
EAEC	<i>astA, aggR, pic</i>	Not available
Internal control	<i>uidA</i>	<i>16sDNA</i>

**eaeA, escV* and *ent* can be found in both EPEC and EHEC.

Table 3. Characteristics of 174 acute diarrheagenic pathogens detected by multiplex PCR assay from 405 stool specimens in six university hospitals between October 2010 and February 2011

Classification	Pathogens	No. (%) positive isolates	Age of patients				Laboratory tests*		No. (%) co-infection	
			0-5	6-18	19-64	>65	Stool OB [†]	Stool WBC		
Viruses	Norovirus-G2	40 (9.9)	29	4	4	3	3/39 (7.7)	1/38 (2.6)	11/40 (27.5)	
	Group A rotavirus	23 (5.7)	19	2	0	2	2/22 (9.1)	1/22 (4.5)	9/23 (39.1)	
	Enteric adenovirus	8 (2.0)	6	0	1	1	2/8 (25.0)	1/8 (1.3)	4/8 (50.0)	
	Astrovirus	3 (0.7)	1	1	1	0	1/3 (33.3)	0/3 (0)	3/3 (100)	
	Norovirus-G1	1 (0.2)	1	0	0	0	0/1 (0)	0/1 (0)	1/1 (100)	
Bacteria	<i>C. difficile</i> toxin B	33 (8.1)	9	6	4	14	13/32 (40.1)	8/29 (27.6)	10/33 (41.7)	
	<i>C. perfringens</i>	21 (5.2)	6	5	3	7	6/20 (30.0)	1/20 (0.5)	11/21 (52.4)	
	<i>Aeromonas</i> spp.	10 (2.5)	3	2	1	4	0/10 (0)	1/9 (11.1)	5/10 (50.0)	
	<i>Campylobacter</i> spp.	5 (1.2)	2	0	2	1	3/5 (60.0)	2/5 (40.0)	2/5 (40.0)	
	<i>Salmonella</i> spp.	3 (0.7)	1	1	1	0	2/3 (66.6)	2/3 (66.6)	0/3 (0)	
	<i>Vibrio</i> spp.	1 (0.2)	0	1	0	0	1/1 (100)	1/1 (100)	0/1 (0)	
	<i>Y. enterocolitica</i>	1 (0.2)	1	0	0	0	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	
	Pathogenic <i>E. coli</i>	EPEC	11 (2.7)	5	1	4	1	5/9 (55.5)	0/11 (0)	6/11 (54.5)
		EAEC	11 (2.7)	4	1	3	3	3/11 (27.3)	0/10 (0)	5/11 (45.5)
EHEC		1 (0.2)	0	0	1	0	0/1 (0)	0/1 (0)	0/0 (0)	
Mixed [‡]		2 (0.5)	0	0	1	1	1/2 (50.0)	0/2 (0)	0/0 (0)	

*No. positive/no. tested (%); [†]Stool occult blood; [‡]The isolate showed mixed type of EPEC and EAEC.

16-plex PCR과 DEC PCR kit 방법에 사용된 시발체의 표적유전자(target gene)는 Table 2에 요약하였다.

5. 임상적 특징 조사

전체 대상 환자에 대하여 연령별 발생빈도, 변 백혈구(stool WBC) 및 혈변(stool occult blood) 검사 결과를 함께 비교하였다.

결 과

1. 양성률

병원성 장내세균 13종에 대한 다중 중합효소연쇄반응 결과 전체 405 검체 중 138개의 검체(138/405, 34.1%)에서 174개의 세균이 검출되었다(174/405, 43.0%, 중복 감염 포함) (Table 3). 다섯 종의 장염바이러스 검사 결과 18.5% (75/405)에서 양성을 보였다(norovirus-G2, 40; Group A rotavirus, 23; enteric adenovirus, 8; astrovirus, 3; norovirus-G1, 1). 병원성 대장균을 포함한 전체 대상 세균의 양성률은 24.4% (99/405)였다. 병원성 대장균을 제외한 장내세균은 7종의 병원체에 대하여 16.3% (74/405)에서 양성을 보였다(*C. difficile* toxin B, 33; *C. perfringens*, 21; *Aeromonas* spp., 10; *Campylobacter* spp., 5; *Salmonella* spp., 3; *Vibrio* spp., 1; *Y. enterocolitica*, 1). *Salmonella*균과 *Shigella*균에 대한 일상적인 변 배양 결과 모두 3개의 *Salmonella* spp., non-typhi로 분리되었으며, 이는 중합효소연쇄반응 결과와 100% 일치하였다. 병원성 대장균의 분리빈도는 6.2% (25/405)였다(EPEC, 11; EAEC, 11; mixed pathotype of EPEC and EAEC, 2; EHEC, 1).

연령별 발생 빈도를 보면, 바이러스의 경우 5세 이하 아동의 검출률이 높았으며(75%, 56/75), 세균의 경우는 5세 이하 아동과 65세 이상의 노인에서의 검출률이 동일하게 높았으며(31.3%, 31/99), 특히, *C. difficile* Toxin B는 65세 이상 노인에서 높게 검출되었다(42.4%, 14/33).

변 잠혈(Stool occult blood) 검사와 변 백혈구(stool WBC) 검사 결과는 *C. difficile* toxin B, *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. 및 *Vibrio* spp.에 의한 세균 감염에서는 2가지 모두 25% 이상 양성 빈도를 보였다.

2. 중복감염

양성 검체 중의 23.2% (32/138)에서 2종 또는 3종의 중복 감염을 보였다. 바이러스 중복 감염은 6예(모두, 2중 감염), 박테리아 중복 감염은 10예(2중 감염, 8예; 3중 감염, 2예) 바이러스/박테리아 중복감염은 16예(2중 감염, 14예; 3중 감염, 2예)였다 (Table 4). 각 균종별 중복 감염률을 살펴보면 병원성이 높고 흔히 선택배지를 사용하여 배양하는 *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Y. enterocolitica* 및 EHEC 균주를 제외한 대부분의 바이러스 및 박테리아가 27.5-100%의 빈도로 중복 감염을 일으키는 것으로 조사되었다(Table 3).

3. 병원성 대장균 검사 방법 비교

5가지 병원성 대장균(EPEC, EHEC, EIEC, ETEC 및 EAEC)에 대하여 16-plex PCR 결과를 기준으로 해석하였고, EAEC를 제외한 4가지 병원성 대장균에 대하여 DEC PCR kit 결과와 비교하였다(Table 5). EPEC는 16-plex PCR에서 11개 검출되었으

Table 4. Pattern of co-infecting diarrheagenic pathogens in 32 stool specimens detected by multiplex PCR assay

Classification	Co-infecting pathogens (n)
Viral (n=6)	Norovirus-G2 & Astrovirus (1)
	Norovirus-G2 & Enteric adenovirus (1)
	Norovirus & Group A rotavirus (1)
	Norovirus-G2 & Norovirus-G1 (1)
	Group A rotavirus & Enteric adenovirus (1)
Bacterial (n=10)	Enteric adenovirus & Astrovirus (1)
	<i>C. difficile</i> toxin B & <i>Aeromonas</i> spp. (1)
	<i>C. difficile</i> toxin B & <i>C. perfringens</i> (1)
	<i>C. difficile</i> toxin B & EAEC (1)
	<i>C. difficile</i> toxin B & EPEC (1)
	<i>C. perfringens</i> & <i>Aeromonas</i> spp. (1)
	<i>C. perfringens</i> , <i>Aeromonas</i> spp. & <i>Campylobacter</i> spp. (1)
	<i>C. perfringens</i> , <i>Aeromonas</i> spp. & EAEC (1)
	<i>C. perfringens</i> & <i>Campylobacter</i> spp. (1)
	<i>C. perfringens</i> & EAEC (1)
<i>C. perfringens</i> & EPEC (1)	
Viral and bacterial (n=16)	Norovirus-G2 & <i>C. difficile</i> toxin B (3)
	Norovirus-G2 & <i>C. perfringens</i> (1)
	Norovirus-G2, <i>C. perfringens</i> & <i>C. difficile</i> toxin B (1)
	Norovirus-G2, <i>C. perfringens</i> & EAEC (1)
	Norovirus-G2 & EPEC (1)
	Rotavirus & <i>Aeromonas</i> spp. (2)
	Rotavirus & <i>C. difficile</i> toxin B (1)
	Rotavirus & <i>C. perfringens</i> (1)
	Rotavirus & EAEC (1)
	Rotavirus & EPEC (2)
Adenovirus & <i>C. difficile</i> toxin B (1)	
Astrovirus & EPEC (1)	

며, 이 중 8개 검체가 DEC PCR kit로도 검출되었다. 따라서, EPEC 검출에 있어서의 두 방법 간의 일치율은 99.3% (402/405) 였다. 다만, 16-plex PCR에서 2 균주가 EPEC와 EAEC 병독유전자(*ent*, *escV*, *aggR* 및 *astA*)가 동시에 검출되어 혼합형(mixed type)으로 분류되었으나 DEC PCR kit에는 EAEC 검출을 위한 시발체가 포함되어 있지 않아서 EPEC 유전자인 *eae*만 검출되었다. EHEC는 두 kit 모두 동일한 1 검체에서 검출되어 100% 일치하였다. EIEC와 ETEC는 두 kit에서 모두 검출되지 않았으며 100% 일치하였다. EAEC는 11개 양성이었고 16-plex PCR에서만 검출할 수 있어 두 kit 간의 비교가 불가능하였다. 한편, 32 균주에서 *astA* 유전자만 검출되었는데(*astA* gene-positive *E. coli*), *astA* 유전자는 enteroaggressive heat-stable toxin (EAST1)을 encoding 하지만, 다른 모든 pathotype의 *E. coli*에서도 발견될 수 있으며 병원성(pathogenicity)에 대한 견해 차이가 있어 전체 병원성 대장균의 양성률에서는 제외하였다[7-9].

고찰

급성 감염성 설사는 흔한 질병으로, 감염원에 따라 항균제

Table 5. Detection of virulence genes of diarrheagenic *E. coli* by 16-plex PCR [6] and DEC PCR kit [7] from 405 stool specimens in six university hospitals between October 2010 and February 2011

Pathotype	16-plex PCR		DEC PCR kit		Agreement (%)
	Positive gene(s)	No. isolates	Positive gene(s)	No. isolates	
EPEC	<i>bfpB</i> , <i>escV</i>	1	-	-	99.3%
	<i>eaeA</i>	2	-	-	
	<i>escV</i> , <i>eaeA</i>	4	<i>eae</i>	4	
	<i>escV</i> , <i>eaeA</i> , <i>astA</i>	3	<i>eae</i>	3	
Mixed*	<i>escV</i> , <i>eaeA</i> , <i>astA</i> , <i>hly</i>	1	<i>eae</i>	1	100%
	<i>ent</i> , <i>escV/aggR</i> , <i>astA</i>	2	<i>eae</i>	2	
EHEC	<i>escV</i> , <i>hly</i> , <i>stx2</i>	1	<i>vtx2</i>	1	100%
EAEC	<i>pic</i> , <i>aggR</i>	5	-	-	Not available
	<i>aggR</i>	2	-	-	
	<i>astA</i> , <i>aggR</i>	1	-	-	
	<i>pic</i> , <i>astA</i>	1	-	-	
<i>astA</i> †	<i>pic</i> , <i>aggR</i> , <i>astA</i>	2	-	-	Not available
	<i>astA</i>	32	-	-	

*Mixed pathotype of EPEC and EAEC; †*astA* gene-positive *E. coli*.

치료 여부가 달라지므로 정확한 원인 규명을 검사가 필요하다 [10]. 그러나, 원인균이 매우 다양하고 검사 방법 및 비용의 제한점 때문에, 실제 검사실에서는 *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *E. coli* O157 등 병독력이 높은 몇 가지 원인 세균만을 선별적으로 배양하고, 일부 바이러스에 대해서만 면역학적 방법으로 검사하여 보고하고 있다.

이 연구에서는 Seeplex® Diarrhea ACE detection kits를 이용하여 다중 중합효소연쇄반응을 시행하였고, 핵산증폭법과 결과가 함께 시행되었던 *Salmonella* spp. 및 *Vibrio* spp. 배양 결과와 우수한 일치율을 보였는데, 이는 Cho 등[5]이 동일한 방법으로 *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. 및 *Shigella* spp.에 대하여 2010년도 조사 발표한 내용과 일치하였다. *C. difficile* toxin B에 대하여는 다중 중합효소연쇄반응 결과와 배양 결과와의 일치율이 보고자에 따라 다소 차이가 있었다[5,11]. 또한, 5종 바이러스의 경우 동일한 다중 중합효소연쇄반응 시약을 이용한 다른 연구자의 보고에서 배양 결과와 비교하였을 때 우수한 민감도를 보여 주었다[4]. 다중 중합효소연쇄반응법은, 균종의 동정은 배양 검사법이 기본이 되므로 이를 대체할 수는 없지만, 직접 검체에 적용하여 한 번 검사로서 여러 설사원인균 감염에 대한 선별할 수 있는 장점이 있다[5].

검사실에서 원인균에 대한 신뢰성있는 정보를 빠른 시간 내에 제공할 수 있다면 적합한 항균제의 사용 등 적절한 치료가 이루어 질 수 있고 환자의 예후를 좋게 할 수 있다. 이 연구 결과에서도 일상적 배양만 이루어 졌다면 단지 4명의 환자에서만 원인균을 알 수 있었을 것이다(*Salmonella* spp., 3; *Vibrio* spp., 1). 그러나, 최근 개발된 다중 중합효소연쇄반응법을 이용하여 배양이 까다로운 바이러스 및 박테리아에 대한 적극적인 검사를

시행한 결과 138명의 환자에서 원인균을 규명할 수 있었다.

원인균의 분포를 보면 norovirus와 rotavirus의 검출률이 높으며 *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Campylobacter* spp., 병원성 대장균 등의 검출률이 상대적으로 낮았는데, 이는 연구기간의 계절적 요인(11-2월)에 의한 영향으로 해석되었다[12-14]. 또한, norovirus의 양성률이 rotavirus보다 높았는데, 이는 2005년 이후부터 norovirus의 분리율이 점차 증가되어 최근 급성 설사 바이러스의 중요 원인으로 대두되고 있는 국내 동향을 반영하고 있다[13,14].

특히, norovirus 감염은 다른 위장관염 원인 바이러스와 같이 5세 이하 아동에서 감염률이 높지만, 전 연령층에서 감염을 일으킬 수 있으며, 감염의 증상은 갑작스런 구토와 설사가 특징으로 rotavirus와 유사하지만 비교적 경한 경과를 보이며 둘 다 겨울철에 유행한다[14]. 하지만, 현재까지 norovirus 감염을 진단하기 위한 방법은 주로 대변 검체를 이용하여 ELISA 검사와 real-time PCR 검사법이 있어왔는데[14], 새로 개발된 다중 중합효소연쇄반응은 두 바이러스의 감별을 보다 쉽게 하는데 도움이 될 것이다.

한편, 이 연구 결과에서는 *C. difficile* toxin B와 *C. perfringens* 양성률이 높았고(8.1%, 5.1%), *C. difficile* Toxin B는 65세 이상 노인에서 높게 검출되었다. 이는 실험실 감시 사업 대상 군주에 포함되어 있지 않아 전체적인 비교가 어려웠다. Cho 등[5]이 2010년 6-9월 기간 동안 조사한 결과(*C. difficile* toxin B, 2.3%; *C. perfringens*, 2.9%)와 비교해 볼 때 이 연구 결과가 더 높았다.

또한, 중복감염의 빈도가 높았는데 양성 검체 중의 23.2%에서 2종 또는 3종의 중복 감염을 보였는데, 각 군주별 중복 감염률을 살펴보면 병원성이 높은 *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., *Y. enterocolitica* 및 EHEC 군주를 제외한 나머지 바이러스 및 박테리아가 다양한 빈도로 중복 감염을 일으키는 것으로 조사되었다. 이러한 중복감염은 개발도상국가들에서 흔하고, 감염된 군주 간의 생물학적 상호작용에 대해서는 알려진 바가 적다[15,16]. 최근, rotavirus와 *E. coli* 중복 감염의 경우 동반상승 효과(synergic effect)로 질환이 더 악화됨이 보고되기도 하였으나[15], 중복감염에 대한 임상적 연관성은 향후 더 연구되어야 할 것이다.

질병관리본부 국내 급성설사질환 실험실 감시사업(EnterNet-Korea) 2010년도 통계 자료에 의하면, 병원성 대장균(ETEC와 EHEC)의 분리율이 0.5% (165/30,758)로 *Salmonella* (1.9%), *Campylobacter* spp. (0.9%) 다음으로 분리되었다[13].

이 연구에서는 5가지 대상 병원성 대장균 중 EPEC, EAEC, EHEC 3가지 및 혼합형(mixed)이 6.2%로, 이는 2010년도 국내 급성설사질환 질병관리본부 감시사업 보고보다 높았다(6.2% vs. 0.5%)[11]. 이러한 차이는 계절적 요인 뿐만 아니라, 이 연구에서는 16쌍의 시발체를 이용하여 5가지 병원성 대장균을

조사하였고 질병관리본부 감시사업에서는 4쌍의 시발체를 가지고 2가지 병원성 대장균만을 조사한 것이어서, 표적 시발체(target primer)의 종류와 수의 차이 등에 의한 것으로 생각한다. 또한, 이 연구에서는 16-plex PCR 방법과 DEC PCR kit 2가지 방법으로 병원성 대장균 검출률을 비교하였는데, EAEC를 제외한 4가지 병원성 대장균(EPEC, EHEC, EIEC 및 ETEC)에 대하여 두 방법 간에 우수한 일치율을 보였다.

결론적으로, 일상 배양 검사로 검출이 어려운 급성 감염성 설사의 원인 바이러스와 대장균의 검출을 위해 다중 중합효소연쇄반응법과 같은 분자진단적 방법의 도입이 고려되어야 할 것으로 생각한다.

감사의 글

이 연구는 2010년도 대한임상미생물학회 연구비 지원을 받아 수행되었음. 일부 검사 키트와 자료를 제공해주신 (주)젠과 (주)비메디텍 관계자 및 연구에 도움을 주신 많은 분들께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Korea Centers for Disease Control and Prevention. The prevalence and characteristics of bacteria causing acute diarrhea in Korea, 2008. Public Health Weekly Report. <http://www.cdc.go.kr/CDC/notice/CdcKrInfo0301.jsp?menuIds=HOME001-MNU0004-MNU0036-MNU0037&cid=12298/> [Online] (last visited on 25 July 2012).
2. Antikainen J, Tarkka E, Haukka K, Siitonen A, Vaara M, Kirveskari J. New 16-plex PCR method for rapid detection of diarrheagenic *Escherichia coli* directly from stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:899-908.
3. Nataro JP, Bopp CA, et al. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Murray PR, Baron EJ, et al, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed, Washington; American Society for Microbiology, 2007: 670-87.
4. Higgins RR, Beniprashad M, Cardona M, Masney S, Low DE, Gubbay JB. Evaluation and verification of the Seeplex Diarrhea-V ACE assay for simultaneous detection of adenovirus, rotavirus, and norovirus genogroups I and II in clinical stool specimens. *J Clin Microbiol* 2011;49:3154-62.
5. Cho MC, Noh SA, Kim MN, Kim KM. Direct application of multiplex PCR on stool specimens for detection of enteropathogenic bacteria. *Korean J Clin Microbiol* 2010;13:162-8.
6. Persson S, Olsen KE, Scheutz F, Krogfelt KA, Gerner-Smidt P. A method for fast and simple detection of major diarrhoeagenic *Escherichia coli* in the routine diagnostic laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2007;13:516-24.
7. Fujioka M, Kasai K, Miura T, Sato T, Otomo Y. Rapid diagnostic method for the detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Jpn J Infect Dis* 2009;62:476-80.
8. Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, Okhuysen PC, Chiang T. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* 2006;55:1303-11.
9. Müller D, Greune L, Heusipp G, Karch H, Fruth A, Tschäpe H, et

al. Identification of unconventional intestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates expressing intermediate virulence factor profiles by using a novel single-step multiplex PCR. Appl Environ Microbiol 2007;73:3380-90.

10. Seo GS and Choi SC. Diarrhea (Based on acute infectious diarrhea). Korean J Med 2010;78:49-53.

11. Bessède E, Delcamp A, Sifré E, Buissonnière A, Mégraud F. New methods for detection of campylobacters in stool samples in comparison to culture. J Clin Microbiol 2011;49:941-4.

12. Kang JO, Kim MN, Kim J, Suh HS, Yoon Y, Jang S, et al. Epidemiologic trends of rotavirus infection in the Republic of Korea, July 1999 through June 2002. Korean J Lab Med 2003;23:382-7.

13. Korea Centers for Disease Control and Prevention. The prevalence and characteristics of bacteria causing acute diarrhea in Korea, 2010. Public Health Weekly Report. <http://www.cdc.go.kr/CDC/notice/CdcKrInfo0301.jsp?menuIds=HOME001-MNU0004-MNU0036-MNU0037&cid=12669/> [Online] (last visited on 25 July 2012).

14. Park DJ, Kim JS, Park JY, Kim HS, Song W, Kim HS, et al. Epidemiological analysis of norovirus infection between March 2007 and February 2010. Korean J Lab Med 2010;30:647-53.

15. Lindsay B, Ramamurthy T, Sen Gupta S, Takeda Y, Rajendran K, Nair GB, et al. Diarrheagenic pathogens in polymicrobial infections. Emerg Infect Dis 2011;17:606-11.

16. Bhavnani D, Goldstick JE, Cevallos W, Trueba G, Eisenberg JN. Synergistic effects between rotavirus and coinfecting pathogens on diarrheal disease: evidence from a community-based study in northwestern Ecuador. Am J Epidemiol 2012;176:387-95.

=국문초록=

다중 중합효소연쇄반응법을 이용한 급성 감염성 설사의 원인세균 13종 및 바이러스 5종 검출

¹가톨릭대학교 의과대학 인천성모병원 진단검사의학교실, ²가톨릭대학교 의과대학 서울성모병원 진단검사의학교실, ³가톨릭대학교 의과대학 의정부성모병원 진단검사의학교실, ⁴가톨릭대학교 의과대학 성빈센트병원 진단검사의학교실, ⁵가톨릭대학교 의과대학 대전성모병원 진단검사의학교실, ⁶가톨릭대학교 의과대학 여의도성모병원 진단검사의학교실

이승욱¹, 박연준², 이혜경³, 김수영⁴, 김자영⁵, 이소영⁶, 유진경²

배경: 급성 감염성 설사는 전세계적으로 감염과 사망의 주요 원인이다. 하지만, 대부분의 국내 검사실에서는 몇 가지 설사 원인균에 대해서만 검사가 시행되고 있다. 이 연구에서는 다양한 설사 유발균(바이러스 5종과 세균 13종)의 분리 빈도를 다중 중합효소연쇄반응법을 이용하여 조사하고, 또한 설사 유발 *Escherichia coli* 검출을 위한 2가지 다중 중합효소연쇄반응법을 비교하였다.

방법: 2010년 11월부터 2011년 2월까지 6개 대학부속병원에서 설사 환자의 변검체 405개를 대상으로 Seeplex[®] Diarrhea ACE detection kit (Seegene, Korea)를 이용하여 바이러스 5종(astrovirus, Group A rotavirus, enteric adenovirus norovirus G1/G2) 및 세균 8종(*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Vibrio* spp., *C. difficile* Toxin B, *C. perfringens*, *Y. enterocolitica*, *Aeromonas* spp.)을 조사하였다. 또한, 16쌍의 시발체를 이용한 다중 중합효소연쇄반응법(16-plex PCR)과 diarrheagenic *E. coli* detection (DEC) PCR kit (SSI Diagnostica, Denmark)를 이용하여 설사 유발 *E. coli* (enteropathogenic *E. coli*, EPEC; enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC; enteroinvasive *E. coli*, EIEC; enterotoxigenic *E. coli*, ETEC; enteroaggressive *E. coli*, EAEC)의 병독유전자를 조사하였다.

결과: 전체 양성률은 34.1% (138/405)였고, 32검체에서 중복 감염을 보였다. 바이러스는 18.5% (75/405) 양성을 보였고, norovirus G2, Group A rotavirus, enteric adenovirus, astrovirus 및 norovirus G1)가 각각 40, 23, 8, 3, 및 1개 분리되었다. 세균 양성률은 24.4% (99/405)였고, *C. difficile* toxin B, *C. perfringens*, EPEC, EAEC, *Aeromonas* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., EPEC와 EAEC의 혼합형, *Vibrio* spp. 및 *Y. enterocolitica*가 각각 33, 21, 11, 11, 10, 5, 3, 2, 1, 1 및 1개 분리되었다. EPEC와 EHEC에 대한 두 가지 다중 중합효소연쇄반응법과의 일치율은 각각 99.3%와 100%였다.

결론: 변 검체의 34.1%에서 다양한 설사 유발 원인균이 검출되었고, 일상 검사로 검출이 어려운 설사 유발 *E. coli*와 *C. perfringens*도 각각 6.2%와 5.2%로 검출되었다. 따라서, 다중 중합효소연쇄반응법은 다양한 설사의 원인균들을 검출하는데 유용하였다. [Ann Clin Microbiol 2013;16:33-38]

교신저자 : 박연준, 137-040, 서울시 서초구 반포동 505
가톨릭대학교 서울성모병원 진단검사의학과
Tel: 02-2258-1640, Fax: 02-2258-1719
E-mail: yjpk@catholic.ac.kr