

A Case of Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 with Hemorrhagic Colitis in an Infant, Diagnosed by Multiplex PCR

Hae-Sun Cho¹, Min-Chul Cho¹, Shinae Noh¹, Mi-Na Kim¹, Kyoung-Mo Kim²

Departments of ¹Laboratory Medicine and ²Pediatrics, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, Seoul, Korea

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is an important cause of bloody diarrhea in children, but is considered to be rare in infants. Herein, a case of infant hemorrhagic colitis of verotoxin-producing *E. coli* O157:H7 diagnosed by multiplex PCR is reported. A nine-month-old boy was admitted to our hospital with bloody diarrhea for the previous two days. Multiplex PCR using Seeplex[®] Diarrhea ACE Detection Kit (Seegene, Seoul, Korea) was directly applied to the stool specimens. Amplified bands specific for verotoxin, O157, and H7 indicated the presence of O157:H7 EHEC. The stool specimens were inoculated on sorbitol-MacConkey agar (SMA) and tryptic soy broth containing mitomycin C (TSB-M). Colorless colonies on sorbitol-MacConkey agar were O157-positive. TSB-M enrichment cultures of the stool specimen and the isolates were positive for verotoxin according to an enzyme immunoassay

(EIA). The prepared ingredients of baby foods for the patient including ground meat, chopped carrot, chopped cabbage, and white rice porridge showed no EHEC on TSB-M and SMA. The patient's parents and three-year-old sister did not recently have any gastrointestinal symptoms. Cefdinir was administered for one day and was ceased after diagnosis of EHEC colitis. The stool culture and verotoxin assay were negative on the second day of hospitalization. Application of multiplex PCR and verotoxin EIA directly to diarrheal stool warrants the rapid diagnosis and appropriate treatment of EHEC colitis. (Korean J Clin Microbiol 2010;13:85-89)

Key Words: *Escherichia coli* O157:H7, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, Verotoxin, Multiplex PCR

서 론

대장균은 정상적인 인체의 대장에 존재하는 정상균무리 중 하나지만, 일부 병원성 대장균은 장염을 유발한다[1,2]. 1982년 미국에서 *Escherichia coli* O157:H7에 의해 출혈성 설사의 집단 발병이 발생하여 처음 보고된 이래[3] 이 균은 세계 여러 나라에서 집단발병과 산발적인 감염을 일으키는 원인으로 보고되고 있다[4-6]. 이 대장균은 *Shigella* spp.의 출혈성 독소(Shiga toxin 또는 verotoxin)를 가지고 있어서[7] 전형적인 출혈성 설사를 일으키는 기전이 규명됨으로써 Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) 또는 Verotoxin-producing *E. coli* (VTEC)라고 명명하였다. 한국에서는 EHEC 감염이 1994년 최초로 보고된 이후[8] 2000년 제1군 법정전염병으로 지정되어 관리하고 있으며,

2003년과 2004년 집단감염이 발생하였고, 최근 매년 40~50건씩 보고되고 있다[9,10]. 국내 문헌 고찰상 설사환자의 대변배양에서 Sorbitol MacConkey agar로 EHEC를 1년간 검사한 논문에서는 한 주도 검출하지 못해서 통상적으로 검사할 필요가 없다고 하였고[11], 이후 통상적으로 배양검사를 실시하여 빈도를 보고한 연구는 더 이상 없어서 EHEC 장염에 대한 정확한 빈도와 역학에 대한 자료는 부족한 실정이다. 또한 EHEC 장염의 호발연령이 소아이지만 영아에서는 드물다[5,6].

저자들은 지역사회획득성 설사를 주소로 내원한 9개월 된 영아의 대변검체를 다중 PCR로 검사하여 verotoxin 양성 *E. coli* O157:H7에 의한 출혈성 장염을 진단하여 임상적, 미생물학적, 역학적 특성을 조사하였다.

증 례

이전까지 건강하였던 9개월 된 남아가 혈변을 주소로 소아과 외래를 통해 입원하였다. 환아는 입원 일주일 전부터 기침과 콧물이 있었고, 입원 이틀 전부터 섭씨 38도 이상의 열과 구토,

Received 15 October, 2009, Revised 23 February, 2010

Accepted 25 March, 2010

Correspondence: Mi-Na Kim, Department of Laboratory Medicine, University of Ulsan College of Medicine and Asan Medical Center, 86, Asanbyeongwon-gil, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea. (Tel) 82-2-3010-4511, (Fax) 82-2-478-0884, (E-mail) mnkim@amc.seoul.kr

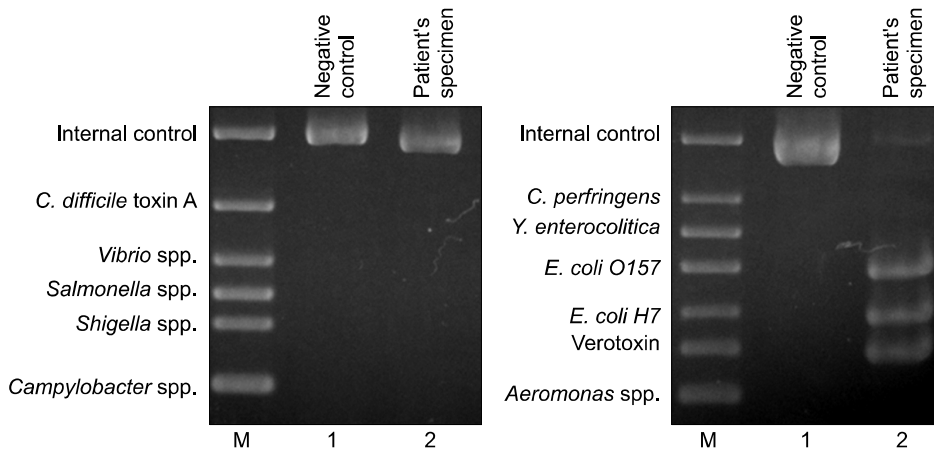


Fig. 1. Two sets of multiplex PCR assay using Seeplex[®] Diarrhea ACE Detection Kit revealed amplicons specific for O157, H7, and verotoxin. Lane M: Synthetic size markers tailored for this kit. Lane 1: Negative control showed internal control band. Lane 2: PCR of patient's specimen revealed amplicons specific for O157, H7, and verotoxin.

하루 2차례의 점액성 혈변이 있었다. 입원 하루 전 외래에서 cefdinir를 처방받고 귀가하였으나 호전이 없었다. 그 후 묽은 변에 피가 섞인 양상으로 하루 5차례 혈변을 보았고 온몸에 발진이 발생하여 입원하였다. 입원 당시 급성 병색을 보였으며, 활력징후는 혈압 97/76 mmHg, 맥박 160회/분, 호흡 36회/분, 체온 38.6°C이었다. 이학적 소견상 탈수 징후는 관찰되지 않았으며 복부청진상 장음은 정상이었다. 말초혈액 총혈구계수검사는 백혈구 $8.8 \times 10^3/\text{mm}^3$, 헤모글로빈 11.6 g/dL, 혈소판 $147 \times 10^3/\text{mm}^3$ 이었다. CRP는 1.16 mg/dL로 약간 증가되어 있었으며, BUN/Cr은 10/0.3 mg/dL로 참고치 이내였다. 대변 로타바이러스 항원검사와 기생충 총란검사는 음성이었다. 입원 1일째 대변 배양이 의뢰되었다. 설사변에 대해 Seeplex[®] Diarrhea ACE Detection Kit (Seegene, Seoul, Korea)로 세균성 설사의 원인균을 찾기 위해 다중 PCR 검사를 실시하여 *E. coli* O157 특이밴드, *E. coli* H7 특이밴드와 verotoxin 특이밴드에 양성 결과를 얻었다(Fig. 1). *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Clostridium* spp. 등에는 음성이었다. 대변검체를 sorbitol-MacConkey 한천배지에 접종하여 35°C에서 하룻밤 배양하였을 때 분홍색 집락과 투명한 집락이 섞여 자라났다(Fig. 2). 투명한 집락을 MacConkey 한천배지에 계대배양했을 때 대장균속의 전형적인 분홍색 집락으로 자랐고, oxidase 음성이었으며, 도말염색에서 그람 음성의 통통한 막대균이 관찰되었다. 이 균은 MicroScan NegCombo 44 패널(Siemens, West Sacramento, CA)에서 *E. coli*로 동정되었고, amikacin, aztreonam, ceftriaxone, ceftazidime, cefazolin, ciprofloxacin, cefepime, cefuroxime, cefotetan, imipenem, levofloxacin, meropenem, moxifloxacin, piperacillin/tazobactam, tobramycin 등에 감수성, ampicillin, ampicillin/sulbactam, trimethoprim/sulfamethoxazole 등에 내성이었다. 이 균을 질병관리본부에서 공급하는 O157, O26, O111 항혈청(중검, 안산, 한국)으로 검사하였을 때 O157 항혈청에만 응집반응이 일어났다. Verotoxin 검사를 위해 대변 검체를 tryptic soy broth (TSB)와 mitomycin C를 첨가한 tryptic



Fig. 2. Mixtures of colorless (arrow) and pink colonies grown on sorbitol-MacConkey agar after overnight incubation at 35°C.

soy broth (TSB-M)에 접종한 후 35°C에서 증균하였다. TSB와 TSB-M에서 얻은 균액으로 RIDASCREEN[®] verotoxin enzyme immunoassay (R-Biopharm, Darmstadt, Germany)를 시행한 결과, TSB-M에서 얻은 균액만 verotoxin이 양성이었다. 이상의 검사결과를 종합하여 *E. coli* O157:H7에 의한 출혈성 장염으로 최종 진단하였다. 환아는 입원 당일 *E. coli* O157:H7 장염으로 진단하여 항균제 치료를 하루 만에 중단하고 대증요법을 시행하였으며, 입원 2일째부터 열이 떨어지고 설사 등의 증상은 호전되었다. 입원 2일째와 4일째 동일한 방법으로 대변배양과 독소검사를 실시하였으나 더 이상 균이 배양되지 않고 verotoxin 효소면역검사에서 음성이었다. 환아의 가족으로 부모와 3세 된 누나가 있었으며 모두 장염증상은 없었다. 냉장고에 보관되어 있었던 환아의 이유식 재료인 흰 쌀죽, 양배추, 당근, 소고기 간 것을 수거하여 재료를 분쇄한 후 TSB-M에 증균하고, sorbitol-MacConkey agar에 접종하여 배양하였으나 모두 음성이었다.

고 찰

본 증례는 9개월 된 남아로 우유와 이유식으로만 식이를 하고 있었다. 연령별 분리율이 5~9세는 0.9%인데 비해 영아의 경우 0.06%으로 5~9세 소아연령이 EHEC의 호발 연령임에 비해 영아에서의 발병은 매우 드물다[5]. 국내에서는 30일된 영아에서 감염된 증례가 유일하다[12]. 본 증례에서 EHEC가 발생한 역학적 원인을 찾고자 이유식 재료를 검사하였으나, 모두 음성으로 이유식이 전파원이라는 증거는 찾지 못했다. EHEC는 소나 양 같은 반추동물의 장에 서식하며 사람에서는 덜 익힌 고기, 멸균하지 않은 우유나 유제품, 군에 오염된 과일이나 채소, 물을 섭취함으로써 감염이 발생할 수 있다[13,14]. 그러나 EHEC는 10~100개의 균만 있어도 감염이 가능하기 때문에 사람 대 사람 전파도 가능하여 단기간에 확산되어 유행을 일으킬 수도 있다[1,15]. 따라서 본 증례에서 음식 외의 전파원으로 환자의 가족들을 생각해볼 수 있다. 증상이 있었던 가족은 없었으나, 군 배양을 실시하지는 못했기 때문에 가족들 중 무증상 감염자를 통해서 전파되었을 가능성은 배제할 수 없다. 소아연령, 특히 4세 이하에서는 무증상일 때도 53%에서 3주 이상 균이 배출된다는 보고가 있다[16]. 영아들처럼 식이가 제한되어 있는 경우에는 가족들로부터의 전파가 중요한 역할을 할 것으로 추측할 수 있다. 국내에서 2004년 광주에서 EHEC의 집단 감염이 발생했을 때 최초발현자 2명을 제외하고는 나머지 72명 모두 무증상 감염이었던 사례가 있어서[10] 무증상 감염이 의외로 흔함을 알 수 있다. 국내에서 산발적으로 보고된 EHEC 장염 증례들 중 전파 원인이 규명된 경우는 없었으며, 유일하게 영아에서 발생한 EHEC 설사 환자 1명 또한 원인을 밝히지 못했다[12,17].

본 증례는 설사변에서 직접 핵산을 추출한 후 여러 가지 세균성 설사의 원인균을 검출하기 위한 다중 PCR 검사를 적용함으로써 발견되었다. 국내 한 대학병원에서 1990년에서 1996년 사이 설사환자에서 분리된 대장균 7주에 대해 *stx1*과 *stx2*를 다중 PCR로 검사하여 모두 *stx1*만 양성이고 혈청형도 다양하여 국내에서 EHEC를 진단하려면 verotoxin을 세포독성검사나 유전자를 검출하는 검사가 필요함을 보여주었다[18]. 혈성 설사변에서 직접 *stx1*과 *stx2*를 검출하는 PCR 검사를 실시해서 진단한 방법은 1998년 처음 소개되었고[19], 국내에서도 1999년 소아환자의 설사변을 증균한 다음 적용하여 O157:H7 EHEC를 처음 검출하였다[20]. *E. coli* O157:H7은 sorbitol 발효 음성인 특성이 있어서 선택적으로 분리 배양할 수 있지만[20] 그외의 EHEC는 배양에서 검출하기가 어렵다. 특히 국내에서는 O26, O91, O111 등 다른 혈청형이 더 우세해서 배양으로 검출하기 힘들다[9,10,18]. *E. coli* O157:H7이 EHEC의 대부분을 차지하는 미국에서 EHEC 감염이 매년 인구 10만 명당 8명 정

도로 보고되는데[14] 비해 국내에서 EHEC가 드문 것은 진단율이 낮는데 기인할 수 있다. 초반에 EHEC 감염임에도 비혈성 설사가 있는 경우에는 다른 감염성 설사와 구분하기 어려워 EHEC가 감염진단에 포함되지 않을 수 있다. 따라서 직접 검체에서 여러가지 설사 원인균을 감별할 수 있는 다중 PCR 검사를 사용하면 EHEC 진단율을 높일 수 있을 것이다[21].

EHEC의 증상이 호전된 뒤에도 대변을 통해 *E. coli* O157:H7이 배출될 수 있다고 하지만[22], 급성 설사가 일어나는 동안 균의 전파력이 가장 크다고 알려져 있다[7]. *E. coli* O157은 증상 발현 후 2일 이내에 배양을 할 경우에 대부분 검출할 수 있었지만, 1주일이 경과한 후에는 약 1/3에서만 검출되었다는 보고가 있다[23]. 본 증례에서도 환아가 입원한 첫날 접수된 대변 검체에서 *E. coli* O157:H7이 검출되었지만, 증상이 호전되기 시작한 그 다음날부터 더 이상 검출되지 않았다. 이처럼 균이 검출될 수 있는 기간이 짧을 수 있어서 출혈성 장염 환자에서 EHEC를 검출하는 면역학적 또는 분자생물학적 독소 검사나 배양을 증상 발현 초기에 실시하는 것이 진단율을 높일 것이다[14]. 본 증례에서 환자의 검체를 TSB-M 배지에 증균한데서 verotoxin이 검출되었다. TSB 증균에서는 독소 검출에 실패하고, TSB-M 증균한 것에서만 독소가 검출된 것은 mitomycin C가 EHEC의 toxin 생성을 촉진시키기 때문이다. 이에 대한 명확한 기전은 알려져 있지 않지만 mitomycin C가 박테리오파지 증식을 촉진해서 세포당 독소유전자 수를 증가시키기 때문으로 추정한다[24]. 본 증례는 multiplex PCR을 사용하여 처음 진단하였기 때문에 다른 확인검사가 필요하였다. 또한 O157:H7 형이 아닌 EHEC 감염에서 *stx*만 검출한다면 *Shigella* 감염과 감별이 안되기 때문에 확진을 위해 분리주에서 독소를 검출하는 것이 필요할 것이다. Mitomycin C가 첨가된 배지에서 증균하여 verotoxin을 효소면역법으로 검출하는 방법은 EHEC 장염을 진단하는 데 민감도를 높일 수 있는 방법으로 생각되었다[25].

EHEC 감염증의 5~15% 정도에서 HUS가 발생한다고 알려져 있다. *E. coli* O157:H7 감염, 5세 미만의 영아에서 EHEC가 발병한 경우, 백혈구수의 증가, 항균제와 장운동 억제제의 사용 등이 HUS의 발생 위험을 높인다[7]. 본 증례는 입원 당일 대변 검사에서 EHEC를 진단함으로써 항균제 사용을 하루 만에 중단하고 대증요법으로만 치료하였고, HUS가 발병하지 않았다. 이처럼 조기에 감염성 설사의 원인균을 규명하는 것이 설사 환자의 치료와 예후에 결정적인 역할을 한다. 소아의 급성신부전의 가장 중요한 원인 중 하나는 HUS이며, 국내 연구에서 HUS의 71.8%가 5세 미만에서 발병하고, 설사가 선행되는 경우가 70.2%로 가장 흔한 전구증상이었다[26]. 따라서 소아 연령에서 혈성설사가 발생했을 때 EHEC에 의한 설사를 감별해주는 것이 필요하다.

본 증례는 국내에서 최초로 영아의 설사변에 직접 다중 PCR

를 적용하여 verotoxin 양성 *E. coli* O157:H7에 의한 EHEC 감염을 진단하였다. 효소면역법으로 verotoxin을 검출하였고, *E. coli* O157:H7을 배양에서 분리함으로써 EHEC 감염으로 확진할 수 있었다. 향후 감염성 설사의 다양한 원인균을 한 번에 선별할 수 있는 분자생물학적 검사법이 설사 원인의 감별진단과 치료에 유용할 것이다.

참 고 문 헌

- Nataro JP and Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998;11:142-201.
- Nataro JP and Kaper JB. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004;2:123-40.
- Riley LW, Remis RS, Helgeson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med 1983;308:681.
- Marjut Eklund. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Findings from Humans in Finland. Publications of the National Public Health Institute; A23/2005.
- Slutsker L, Ries AA, Greene KD, Wells JG, Hutwagner L, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in the United States: clinical and epidemiologic features. Ann Intern Med 1997;126:505-13.
- Espié E, Grimont F, Mariani-Kurkdjian P, Bouvet P, Haeghebaert S, Filliol I, et al. Surveillance of hemolytic uremic syndrome in children less than 15 years of age, a system to monitor O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in France, 1996-2006. Pediatr Infect Dis J 2008;27:595-601.
- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet 2005;365:1073-86.
- Korea Center For Disease Control and Prevention. Communicable disease monthly report. 1994;5(12).
- Korea Center For Disease Control and Prevention Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in early 2003. Communicable Disease Monthly Report. 2003;14:389-94.
- Korea Center For Disease Control and Prevention Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in early 2004 Communicable Disease Monthly Report. 2004;15:163-64.
- Song WK, Kim HT, Lee KM, Cha JK, Lee KH. Isolation of *Escherichia coli* O157 in children with diarrhea. Korean J Pediatr Infect Dis 1997;4:73-7.
- Hong SY, Hwang JH, Lee HA, Kim YS, Yang DH, Kim HK, et al. A case of *Escherichia coli* O157:H7 infection in the South of Choongnam province, in Korea. Korean J Nephrol 1997;16:558-562.
- Coia JE. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. FEMS Immunol Med Microbiol 1998;20:1-9.
- Mead PS and Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. Lancet 1998;352:1207-12.
- Tilden J Jr, Young W, McNamara AM, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair MA, et al. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. Am J Public Health 1996;86:1142-5.
- Pai CH, Ahmed N, Lior H, Johnson WM, Sims HV, Woods DE. Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli*: a two-year prospective study. J Infect Dis 1988;157:1054-7.
- Yoon SH, Park IJ, Lee WG. A case of *Escherichia coli* O157 hemorrhagic colitis. Korean J Clin Microbiol 2008;11:66-8.
- Kim YB and Oh YH. Use of polymerase chain reaction and serum antibodies for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Korean Soc Microbiol 1998;33:99-110.
- Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. J Clin Microbiol 1998;36:598-602.
- Kim EC, Oh JH, Lee HJ. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from stool by polymerase chain reaction. Korean J Infect Dis 1999;31:420-4.
- Gómez-Duarte OG, Bai J, Newell E. Detection of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by 3-reaction multiplex polymerase chain reaction. Diagn Microbiol Infect Dis 2009;63:1-9.
- Belongia EA, Osterholm MT, Soler JT, Ammend DA, Braun JE, MacDonald KL. Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. JAMA 1993;269:883-8.
- Tarr PI, Neill MA, Clausen CR, Watkins SL, Christie DL, Hickman RO. *Escherichia coli* O157:H7 and the hemolytic uremic syndrome: importance of early cultures in establishing the etiology. J Infect Dis 1990;162:553-6.
- Law D, Ganguli LA, Donohue-Rolfe A, Acheson DW. Detection by ELISA of low numbers of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures after growth in the presence of mitomycin C. J Med Microbiol 1992;36:198-202.
- Beutin L, Steinrück H, Krause G, Steege K, Haby S, Hultsch G, et al. Comparative evaluation of the Ridascreen Verotoxin enzyme immunoassay for detection of Shiga-toxin producing strains of *Escherichia coli* (STEC) from food and other sources. J Appl Microbiol 2007;102:630-9.
- Hong IH and Koo JH. Clinical Characteristics and prognostic factors of hemolytic uremic syndrome in Korean children. Korean J Nephrol 2001;20:486-92.

=국문초록=

다중 PCR법으로 진단한 Verotoxin 생성 *Escherichia coli* O157:H7 출혈성 장염인 영아 1예

울산대학교 의과대학 서울아산병원 ¹진단검사의학과, ²소아과조해선¹, 조민철¹, 노신애¹, 김미나¹, 김경모²

장출혈성 대장균(EHEC)은 소아연령에서 혈성설사를 일으키는 중요한 원인균이지만, 1세 미만 영아에서는 드물다. 저자들은 지역사회 획득성 장염의 원인균을 진단하는 다중 PCR로 verotoxin 양성 *E. coli* O157:H7에 의한 출혈성 장염을 진단하여 보고하고자 한다. 환자는 9개월 된 남아로 이틀간의 혈변을 주소로 내원하였다. 설사변에 다중 PCR을 실시하여 verotoxin, O157, H7 등에 특이적인 증폭산물을 얻어서 verotoxin 생성 *E. coli* O157:H7 감염이 추정되었다. Sorbitol-MacConkey 한천배지에 무색의 *E. coli*가 배양되었고, O157 항체와 반응시켰을 때 양성이었다. 대변검체를 mitomycin C가 첨가된 배지에 증균하여 실시한 verotoxin 효소면역법에서 양성이었으며 분리된 균주 또한 verotoxin 양성으로 verotoxin 생성 *E. coli* O157:H7에 의한 EHEC로 최종진단하였다. 환자의 이유식 재료인 흰 쌀죽, 당근, 양배추, 소고기 간 것 등 모두 배양 음성이었고, 환자의 가족인 부모와 3살된 누나는 장염 증상이 없었다. 환아는 입원 당일 *E. coli* O157:H7 장염으로 진단하여 cefdinir 투여를 하루 만에 중단하였으며, 입원 2일째부터 배양과 독소 검사는 음성으로 전환되었다. 향후 직접검체에서 다양한 설사 원인균을 신속하게 검출할 수 있는 다중 PCR 검사가 EHEC의 조기 진단과 적절한 치료에 유용할 것이다. [대한임상미생물학회지 2010;13:85-89]

교신저자 : 김미나, 138-736, 서울시 송파구 아산병원길 86
울산대학교 의과대학 서울아산병원 진단검사의학과
Tel: 02-3010-4511, Fax: 02-478-0884
E-mail: mnkim@amc.seoul.kr