

Direct Application of Multiplex PCR on Stool Specimens for Detection of Enteropathogenic Bacteria

Min-Chul Cho¹, Sin-Ae Noh¹, Mi-Na Kim¹, Kyoung-Mo Kim²

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

Background: Causative bacterial agents of infectious diarrheal disease were traditionally diagnosed by stool cultures. Stool culture, however, has a problem because of relatively low sensitivity and long turnaround time. In this study, we evaluated multiplex PCR applied on stool specimens directly to diagnose enteropathogenic bacteria.

Methods: From June to September 2009, 173 diarrheal stools submitted for stool cultures were tested by Seeplex[®] Diarrhea ACE Detection kit (Seegene, Korea) to detect 10 enteropathogenic bacteria. Specimens were cultured for *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, and *Yersinia*. Late 50 specimens were also cultured for *Campylobacter*. The specimens positive for verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) were further subcultured for detecting enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Electronic medical records were reviewed for clinical and laboratory findings.

Results: Of 173 specimens, multiplex PCR and cultures identified enteropathogens in 36 (20.8%) and

8 specimens (4.6%), respectively. While multiplex PCR detected 5 *Salmonella*, 15 *Campylobacter*, 1 *Vibrio*, 4 *Clostridium difficile* toxin B, 5 *Clostridium perfringens*, 1 *Yersinia enterocolitica*, 5 *Aeromonas*, and 2 VTEC, cultures detected 5 *Salmonella*, 1 *Vibrio*, 1 *Y. enterocolitica*, 1 *Aeromonas*, and 2 *E. coli* O157:H7.

Conclusion: Multiplex PCR would be useful to detect *Campylobacter*, VTEC and *C. perfringens*, as well as have equivalent sensitivity to conventional culture for ordinary enteropathogens such as *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Y. enterocolitica*. Direct application of multiplex PCR combined with conventional cultures on stool warrants remarkable improvement of sensitivity to diagnose enteropathogenic bacteria. (Korean J Clin Microbiol 2010;13:162-168)

Key Words: Multiplex PCR, Infectious diarrheal disease, Enteropathogen

서 론

설사는 아직도 전 세계적으로 5세 이하 소아 사망원인의 두 번째 흔한 원인으로 매년 2백만 명의 소아환자들이 설사로 인해 목숨을 잃고 있다[1,2]. 이 중 감염성 설사가 전체 설사로 인한 사망원인 중 가장 흔한 원인이다[3]. 설사 원인균의 신속한 진단은 항균제 사용 여부 등의 치료 방법을 결정하는 데 필수적일 뿐 아니라 감염성 설사의 전파를 방지하는 데 중요한 역할을 한다[4-6].

세균성 설사는 주로 설사 원인균에 오염된 음식물이나 물을 통해 감염되는데, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*와 *Escherichia coli* 등이 주요 원인균이다[1,7-9]. 설사 원인균의 빈도는 국가의 경제수준과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 개발도상국가에서는 *Shigella*가 많고, 다음으로 *Vibrio cholera*,

Yersinia, *Salmonella* 균종들이 주요 장병원성균인데 비해 경제수준이 높은 국가에서는 *Campylobacter*, *Salmonella*가 가장 높은 빈도를 나타내며 *Shigella*, *E. coli* O157:H7, *Vibrio*, *Yersinia* 등이 다음으로 높은 빈도를 보인다고 한다[7,8]. 국내 대학병원에서 30년간 조사한 자료[10]에서도 국내 설사 원인균은 60, 70년대에는 *Shigella*가 가장 다빈도 원인균이었던 것이 80년대 후반부터는 *Salmonella*가 가장 빈도가 높아졌고 *Campylobacter*가 2번째로 많이 분리되는 균종이었다. 질병관리 본부의 2008년 전국 규모 실험실 감시사업 통계[11]에서는 *Shigella*가 0.1%로 매우 낮은 빈도를 보이는 것은 이전 보고와 유사하다. 하지만 이 통계보고에서는 새로이 분자 생물학적 기법을 사용하여 설사 원인균 중 가장 흔한 것이 전체 양성 검체의 45%를 차지한 장병원성 *E. coli*임을 규명하였고, 이어서 *Salmonella*, *Campylobacter*를 각각 2, 3위로 보고하였다. 배양검사만을 사용했던 이전 논문에 비해 이번 통계보고에서는 *E. coli*와 *Campylobacter*의 빈도가 훨씬 높아져서, 검사 기법에 따라 장병원성균의 빈도 분포는 큰 영향을 받는다는 것을 알 수 있다.

통상적으로 설사 원인균 동정에 세균배양방법을 사용한다.

Received 17 May, 2010, Revised 5 August, 2010

Accepted 10 September, 2010

Correspondence: Mi-Na Kim, Department of Laboratory Medicine, Asan Medical Center and University of Ulsan College of Medicine, 388-1 Pungnap 2-dong, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea. (Tel) 82-2-3010-4511, (Fax) 82-2-478-0884, (E-mail) mnkim@amc.seoul.kr

하지만 이들 방법은 균동정까지 3~5일이라는 긴 시간이 필요하며 검체의 종류, 채취 및 운송방법에 따라 민감도가 떨어지기도 한다[12]. 또한 원인균의 동정보다는 세균독소를 검출하는 것이 임상적으로 더 중요한 콜레라, verotoxin 생산 *E. coli* (verotoxin-producing *E. coli*, VTEC), *Clostridium difficile* 등의 경우 통상배양보다는 효소면역검사법이나 직접독소검사법 등이 사용된다. 하지만 효소면역검사는 다른 검사법들과 비교했을 때 민감도와 특이도가 떨어지고, 직접독소검사에는 세포독성검사가 'gold standard'로서 사용되지만, 까다롭고 수기시간이 긴 단점을 가진다[13]. 따라서 최근 분자 생물학적 방법을 사용하여 다양한 원인균들을 신속하고 민감하게 검출할 수 있고, 독소생성 유무도 함께 진단하는 시도가 이루어지고 있다 [12,14-19].

이번 연구에서는 세균성 원인균의 신속 검출을 위해 다중 중합효소연쇄반응 검사법을 설사 환자의 대변 검체에 직접 적용하여 그 임상적 유용성을 점검하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상과 배양 검사

2009년 6월에서 9월 사이에 대변배양이 의뢰된 검체 중 설사변 검체를 골라서 통상적인 배양을 위해 혈액한천배지(BAP), MacConkey 배지, xylose-lysine-deoxycholate 배지에 접종하였다. 후반부 50개의 검체는 *Campylobacter* 배양을 위해 Campy BAP (Hanil-Komed, Sungnam, Korea)에 접종하여 Anaero-Pack® • MicroAeroa (Mitsubishi Gas Chemical, Japan)를 이용한 미호기성 조건에서 3일간 배양하였다. 검체 접종 시 대조균(*Campylobacter fetus*)을 함께 배양하여 배양과정의 문제가 없음을 확인하였다. 다중 중합효소연쇄반응 검사에서 VTEC, *E. coli* O157:H7이 검출되고 임상적으로 감염이 의심되는 경우 균을 검출하기 위해 대변 검체를 sorbitol-MacConkey 배지에 접종하였다.

2. 다중 중합효소연쇄반응

접종 후 남은 대변 검체에서 배양이 의뢰된 당일 핵산추출을 하였다. 핵산추출은 iNtRON Viral Gene-Spin™ viral DNA/RNA Extraction kit (iNtRON biotechnology, Korea)를 이용하여 시행하였으며, 핵산추출액은 -20°C 냉동고에 보관하였다가 검사할 때 해동하여 사용하였다. Seeplex® Diarrhea ACE Detection kit (Seegene, Seoul, Korea)를 이용하여 다중 중합효소연쇄반응을 실시하였다.

키트는 각 목표 균종과 독소 유전자 특이적인 시발체 조합들로 이루어진 두 개의 패널인 diarrhea-B1 (DB-1), diarrhea-B2 (DB-2)로 구성되어 있다. DB-1는 *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* 속 특이적인 시발체와, *C. difficile* toxin B (CDB) 시발체를 포함하는 패널이며, DB-2는 *Clostridium perfringens*, *Yersinia en-*

Table 1. Target genes and their product size of multiplex PCR

Primer set	Pathogens	Target gene	Product size (bp)
Diarrhea-B1 ACE	<i>Campylobacter</i> spp.		227
	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>hip</i>	
	<i>Campylobacter coli</i>	<i>asp</i>	
	<i>Shigella</i> spp.	<i>vif</i> , <i>ipaH</i>	330
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>sopB</i>	395
	<i>Clostridium difficile</i> Toxin B	<i>tcdB</i>	476
	<i>Vibrio</i> spp.		651
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>hly</i>	
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>tlh</i>	
	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>vvh</i>	
Diarrhea-B2 ACE	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>hly</i> , <i>ela</i>	217
	VTEC	<i>VT1</i> , <i>VT2</i>	291
	<i>Escherichia</i> O157	<i>rfb</i>	476
	<i>Escherichia</i> H7	<i>fliC</i>	370
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>inv</i>	580
	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>cpa</i>	700

terocolitica, *E. coli* O157, *E. coli* H7, verotoxin-producing *E. coli* (VTEC), *Aeromonas* 속 특이적인 시발체로 이루어진 패널로 구성되어 있다(Table 1). 각각의 시발체에 의해 증폭되었을 때 기대하는 다중 중합효소연쇄반응 산물의 크기와 비교하여 상기 균종들을 동정하였다. 단, *E. coli* O157, *E. coli* H7, VTEC가 양성일 때 장출혈성 *E. coli* O157:H7으로 해석하였다. 5 µL의 핵산 추출액을 사용하여 증폭한 후 2% agarose gel에 전기영동하여 증폭산물의 크기에 따라 판독하였다.

3. 환자의 임상양상 조사

다중 중합효소연쇄반응 양성인 환자의 의무기록을 조사하여 환자의 성별, 나이, 대변배양이 의뢰된 당시의 발열과 복통의 유무, 입원일, 설사발병일, 대변검체에서의 잠혈과 백혈구 존재 유무, 말초혈액 백혈구수, C-반응단백(C-reactive protein, CRP) 결과를 확인하였다.

결 과

전체 173건의 대변 검체 중 다중 중합효소연쇄반응 검사에서 36검체(20.8%)에서 38건의 의미 있는 장병원성세균이 검출되었다. *Salmonella* 5건, *Campylobacter* 15건, *Vibrio* 1건, CDB 4건, *C. perfringens* 5건, *Y. enterocolitica* 1건, *Aeromonas* 5건, *E. coli* O157과 VTEC 둘 다 양성인 2건 등이 검출되었고 이중 *Aeromonas* 2건은 각각 *Campylobacter* 양성 검체와 *Vibrio* 양성 검체에서 동시에 검출되었다. *E. coli* H7만 검출된 25건의 검체는 다중 중합효소연쇄반응에서 장병원성 세균 음성으로 간주하였다.

다중 중합효소연쇄반응에서 *Salmonella*가 검출된 5건과 *Vibrio*가 검출된 1건은 배양에서도 양성으로 균이 동정되어 다중 중

합효소연쇄반응 결과와 배양 결과가 모두 일치하였다. 반면 후반에 *Campylobacter* 배양을 실시했던 50검체 중 4개가 *Campylobacter* 다중 중합효소연쇄반응 양성이었지만 배양은 모두 음성이었다. 다중 중합효소연쇄반응에서 *Aeromonas* 양성 5건 중 1건만 배양에서 균이 분리되었다. *E. coli* O157, H7, VTEC이 양성인 2건은 sorbitol-MacConkey 배지에서 선택한 무색 *E. coli* 집락이 O157 항혈청에 응집하였고 verotoxin 효소면역검사에서 verotoxin 양성임을 확인하였다(Table 2).

다중 중합효소연쇄반응에서 *Campylobacter*가 검출된 15명 중 복통이 13명(86.7%) 있었고 이 중 12명(80.0%)은 발열도 있었다. 2명(13.3%)은 설사만 있었다. 혈액배양검사에서는 모두

균이 검출되지 않았다. 대변 잠혈검사를 실시한 13명 중 5명이 양성하였고, 대변 백혈구검사를 실시한 6명 모두 양성이었다. CRP를 검사한 13명은 모두 CRP가 상승하였다. 설사만 있던 환자 2명은 대변 잠혈검사에서 1명이 양성하였고, 말초혈액 백혈구 검사는 하지 않았으며, CRP는 상승되어 있었다. *Campylobacter*가 검출된 환자는 모두 설사를 주사로 내원한 환자였으며, 1명의 환자가 간농양으로 진단받은 외에는 모두 특별한 기저질환 없는 환자들로 감염성 설사로 진단 받았고 이중 12명은 항생제 치료를 받았다. 66.7% 환자가 성인 환자였으며 남녀의 비율은 2.8 : 1로 남자가 더 많았다. *Salmonella* 양성 환자 5명은 모두 발열과 복통이 있었고 대변 백혈구는 없었으나, 2명은 혈액배양에서 동일한 균이 검출되었다. *Aeromonas*가 단독으로 검출된 3명의 환자는 발열이 없었고 2명은 복통이 있으면서 CRP가 상승하였다. 이중 1명은 골수이식을 받은 급성골수성 백혈병 환자로서 급성 이식편대숙주병으로 입원하였으며, 1명은 간이식 환자로서 장염 증상으로 입원하였다. 다른 1명은 조기위암으로 내시경 수술을 받기 위해 입원하였는데 입원당일 2차례의 설사가 있었으나, 복통, 발열, CRP 증가는 없었다. *C. perfringens* 양성인 5명은 모두 복통과 설사만 있었고, 발열, 대변 잠혈, 대변 백혈구, CRP는 음성이었다. 4명은 소아였다. CDB가 검출된 환자는 전체 4명 중 3명은 원내감염에 의한 것이었고 나머지 장병원성균들은 모두 지역사회 획득 감염이었다(Table 3).

고 찰

대변 검체에 다중 중합효소연쇄반응을 직접 적용했을 때 20.8%에서 장병원성 세균을 검출한 것에 비해 통상적인 배양

Table 2. Distribution of diarrhea pathogens confirmed by multiplex PCR and culture results

Pathogenic organism	No. (%) of positive specimens	
	Multiplex PCR	Conventional culture
<i>Salmonella</i>	5 (13.2)	5, <i>Salmonella</i> B, C, D, E
<i>Campylobacter</i>	15 (39.5)	0*
<i>Vibrio</i>	1 (2.6)	1, <i>V. parahaemolyticus</i>
CDB	4 (10.5)	Not tested
<i>Clostridium perfringens</i>	5 (13.2)	Not tested
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1 (2.6)	1
<i>Aeromonas</i>	5 (13.2) [†]	1, <i>A. sobria</i>
<i>E. coli</i> O157:H7, VTEC	2 (5.2)	Not tested
Total	36 (100) [†]	8

*Only 50 specimens of late period were cultured; [†]No. of specimen was corrected, since two *Aeromonas* were detected together with *Campylobacter* or *Vibrio*.

Abbreviations: CDB, *Clostridium difficile* Toxin B; VTEC, verotoxin-producing *E. coli*.

Table 3. Clinical characteristics of PCR-positive patients

Pathogenic organism	No. of patients	Age		Sex	No. of NI	Fever	Abdominal pain	No. positive/No. tested			
		≤15	>15	M : F				Stool		Periphearl blood	
								OB	WBC	↑ WBC*	↑ CRP [†]
<i>Campylobacter</i>	15	5	10	2.8 : 1	0	12	13	5/13	6/6	5/15	13/13
<i>Salmonella</i>	5	3	2	2: : 3	0	5	5	0/5	0/5	1/5	5/5
<i>Aeromonas</i>	5 [‡]	0	5	4 : 1	0	4	4	1/2	1/5	2/5	4/5
VTEC	2	1	1	1 : 1	0	2	2	1/2	1/2	1/2	2/2
CDB	4	2	2	1 : 1	3	2	2	1/4	0/3	0/4	2/4
<i>C. perfringens</i>	5	4	1	1 : 4	0	0	5	0/4	0/4	0/5	0/5
<i>Vibro</i>	1	0	1	0 : 1	0	0	1	0/1	0/1	1/1	1/1
<i>Y. enterocolitica</i>	1	1	0	0 : 1	0	1	1	0/1	0/1	0/1	0/1
Total	36 [‡]	16	22	1.2 : 1	3	25	33	8/32	8/27	11/38	29/38

* $>10 \times 10^3/\text{mm}^3$; [†] $>0.6 \text{ mg/dL}$; [†]No. of patient was corrected, since *Aeromonas* was detected together in each one patient of *Campylobacter* and *Vibrio*, total 2 patients.

Abbreviations: NI, nosocomial infection; OB, occult blood; WBC, white blood cell; CRP, C-reactive protein; VTEC, verotoxin-producing *E. coli*; CDB, *C. difficile* Toxin B.

검사는 4.6%에서만 검출할 수 있었다. 통상 배양법에 의한 장병원성 세균 검출률은 국내나 국외보고에서 3.6~5.4%인 것 [10,11,20]과 비슷한데 비해 다중 중합효소연쇄반응법에 의한 검출률은 매우 높은 편이다. 이는 다중 중합효소연쇄반응방법이 10종의 다양한 장병원성균을 목표로 하여 통상배양에서 검출하지 못하는 균을 동정할 수 있었기 때문이다. *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *E. coli* O157을 대상으로 하는 다중 중합효소연쇄반응과 통상배양법을 비교한 논문[20]에서는 각각 7.6%, 5.4%의 양성률을 보여서 다중 중합효소연쇄반응에서 더 높은 검출률을 보였다. 이번 연구에서도 배양 양성일 때 다중 중합효소연쇄반응에서 놓친 경우는 없었으며, 배양검사를 실시한 모든 균종에 대하여 배양보다 높은 검출률을 나타내었다. 다중 중합효소연쇄반응 검사법의 더 높은 양성률은 *Campylobacter*, VTEC, *C. perfringens*의 배양검사서 목표로 하지 않은 다양한 장병원성균이 검출된 데 기인하였다. 따라서, 직접 검체에 다중 중합효소연쇄반응을 적용함으로써 장병원성 세균에 의한 설사의 원인균 검출률을 높일 수 있을 것으로 판단하였다. 이번 연구에서 다중 중합효소연쇄반응 검사와 배양 검사의 양성률이 4.5배 정도 차이가 나는 가장 중요한 원인은 *Campylobacter*가 다중 중합효소연쇄반응 검사에서 전체 양성 병원균의 39.5%를 차지하는 가장 빈번한 원인균인데 비해 배양검사는 후기 50 검체에서만 이루어졌고 배양을 실시했던 50 검체에서도 배양되지 않았기 때문이다. 운송과정에서 *Campylobacter* 균이 사멸하여 배양에서는 음성결과를 보이나 균의 DNA는 존재하기 때문에 다중 중합효소연쇄반응에서 양성을 보였을 수도 있고, 민감도가 낮은 배양법을 사용하고 있을 가능성도 존재한다. 실제로 *Campylobacter* 양성 환자는 대부분 발열, 복통, CRP 상승 등 전형적인 세균성 장염소견을 보였으며, 모두 임상적으로 지역사회 획득 세균성 장염으로 진단받았던 환자들로 *Campylobacter* 장염에 해당하였다[21]. 배양검사를 하였던 50검체 중 *Campylobacter* 다중 중합효소연쇄반응 양성이었던 4주를 배양에서 모두 검출하지 못하였는데 임상적으로 *Campylobacter* 감염에 해당했던 환자들로 중합효소연쇄반응 검사의 위양성이기보다는 배양 민감도가 떨어진 데 기인한 것으로 추정하였다. 이전에 보고된 논문[20]에서 *Campylobacter* 중합효소연쇄반응의 위양성 문제를 해결하기 위해 다른 시발체 세트를 이용한 중합효소연쇄반응으로 재검했을 때 첫 번째 다중 중합효소연쇄반응 양성 12검체 중 10검체는 두 번째 중합효소연쇄반응에서도 양성으로 검출되어 진양성임을 확인하여, 배양법에 비해 중합효소연쇄반응 검사가 훨씬 민감함을 보여주었다. 따라서, 대변검체에 직접 다중 중합효소연쇄반응으로 병원균을 검출하는 방법이 배양조건이 까다롭거나 보관하면 생존력이 떨어지는 균에 대하여 특히 유용할 것으로 보인다. 하지만, 이번 연구에서 *Campylobacter*에 대한 통상배양이 모든 검체에서 이루어지지 않은 것과 배양음성인 다중 중합효

소연쇄반응 양성인 균주의 위양성 결과에 대한 평가가 부족하고, 이 경우 다른 검사법으로 검증하지 못한 것은 이번 연구의 제한점이다.

다중 중합효소연쇄반응 검사에서 *Campylobacter*가 39.5%를 차지하여 가장 높은 빈도를 나타내었고, *Salmonella*, *Aeromonas*, *C. perfringens*, CDB, *E. coli* H7:O157, *Vibrio*, *Y. enterocolitica* 순이었다. 이는 선진국에서는 *Campylobacter*, *Salmonella*가 주요 원인균이었다는 보고[7,8]를 고려할 때 우리나라는 장병원성 균종들이 선진국형 분포를 보였다. 질병관리본부 자료에서 지역사회 설사환자의 원인균으로서 *Salmonella*가 *Campylobacter*의 2.3배의 빈도를 보였던 것[11]에 비해 이번 연구에서는 *Campylobacter*가 *Salmonella*의 3배를 차지하였다. 이는 연구에 포함된 검체들이 입원이 필요할 만큼 복통과 발열 등 증상이 심했던 환자였기 때문에 통상적인 지역사회기반 검사실의 설사 원인균 분포와는 다를 수 있다. VTEC는 국내 설사환자의 0.1%에 불과하다고 보고되는데 비해[11] 1.2%를 차지하였고, 이들은 감염성 장염으로 입원한 환자에서 분리된 것으로 역시 증상이 심한 환자들에서 VTEC 빈도가 더 높았을 것으로 추정된다. 다중 중합효소연쇄반응법을 *Campylobacter*, *E. coli* O157: H7, *C. perfringens* 등에 적용하면 검출률을 획기적으로 개선할 수 있으며, 본 연구처럼 이들 균의 빈도가 훨씬 증가하는 쪽으로 국내 설사 원인균 분포가 바뀔 것으로 생각된다.

Salmonella, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio* 등 통상 배양검사가 이루어진 균종들은 다중 중합효소연쇄반응과 배양법의 결과가 높은 일치율을 보인다. 한 주도 분리되지 않은 *Shigella*를 제외하고 모두 일치하였다. 이전 논문들에서도 이들 균종들에 대해서는 통상배양법과 중합효소연쇄반응의 민감도가 유사하였다 [14,20]. 따라서, 다중 중합효소연쇄반응은 이들 균종들의 검출 민감도를 높이지는 못하지만 직접 검체에 적용함으로써 신속한 진단을 할 수 있다는 장점이 있다. 하지만, 균종의 동정은 배양검사서 균의 분리가 필수적이기 때문에 다중 중합효소연쇄반응 단독으로 사용하기보다는 배양검사와 함께 사용하여 선별검사로서 역할을 할 수 있을 것으로 보인다.

*Aeromonas*는 다중 중합효소연쇄반응 검사에서 유일하게 장병원성세균이 중복되어 나오는 균종으로, *Campylobacter*, *Vibrio*와 함께 검출되었던 2명에서는 병원균으로 의의를 판단할 수 없다. 단독 분리되었던 3명 중 1명은 이식편대숙주병의 기저질환으로 인한 설사를 배제할 수 없었으나, 2명은 입원 시 지역사회 획득성 설사가 있었으며, 다른 원인균이 밝혀지지 않아서 *Aeromonas*가 설사 원인균일 가능성이 있다. *Aeromonas* 장염은 다양한 정도의 임상증상을 보일 수 있고[22] 기저질환이 있는 군혈증 환자에서 여름철에 설사가 동반되는 것으로 알려져 있다[23]. 우리나라에서는 생선회나 익히지 않은 해산물의 섭취가 많아 성인에서 *Aeromonas*의 장내 집락률이 높은 것으로 추정하고 있다[24]. 이러한 이유로 설사환자의 대변 검체

뿐만 아니라 건강한 정상인의 대변에서도 0.4~2.1% 분리되는 것으로 알려져 있다[22]. 다중 중합효소연쇄반응의 결과와 배양 결과가 불일치 하는 원인으로 *Aeromonas*의 중합효소연쇄반응 위양성 가능성을 배제할 수 없다. 하지만, 장염을 일으키지 않고 집락화된 상태라면 균 밀도가 낮아서 중합효소연쇄반응에서 양성이지만 배양에서는 음성일 수 있을 것이다. *Aeromonas*가 양성인 두 검체가 진정한 원인균인 *Campylobacter*나 *Vibrio*와 함께 검출된 것은 이를 지지한다. *Aeromonas*는 배양에서 1주만 분리되어 배양법에 비해 다중 중합효소연쇄반응 검사법이 더 민감했지만, *Aeromonas*를 민감하게 검출하는 것이 임상적으로 유용한지는 판단하기 어렵다. 따라서, 대변 검체의 다중 중합효소연쇄반응 검사에서 *Aeromonas* 양성인 경우 장염의 원인균으로서의 가능성에 대한 추후 연구가 더 필요할 것으로 생각하였다.

VTEC, *C. difficile*, *C. perfringens*는 독소가 장병원성의 주요 원인이고, 장에 정상세균으로 존재하며[25] 일부의 세균만이 독소를 만들기 때문에[16,26] 배양하는 경우 독소생성 균주임을 증명해야 장염의 원인균으로 해석할 수 있으나, 독소생성 균주 집락을 찾아내기는 어려워 통상적으로 권장되지는 않는다. 독소를 직접 검출하는 효소면역법이나 유전자 검사가 표준검사로 사용된다[14,16,17,26-28]. 이번 연구에서는 *E. coli* O157:H7, VTEC 양성인 2 검체는 sorbitol-MacConkey 배지를 이용한 배양에서도 균을 분리하여 다중 중합효소연쇄반응 결과를 확인할 수 있었다. VTEC 양성인 2명에서 모두 *E. coli* O157:H7이 검출된 것은 그 동안 국내 VTEC는 O157 이외의 다른 혈청형이 더 중요한 원인이었을 것이라는 보고들과 상반된다[27]. 대변 검체에 다중 중합효소연쇄반응검사를 직접 적용했던 이전 논문[20]에서 *E. coli* O157을 검출한 것 중 일부도 toxin 음성이거나 위양성이었음이 밝혀졌다. 이와 비교하여 이번에 사용한 다중 중합효소연쇄반응 법은 O157, H7, verotoxin을 한번에 검출할 수 있어 특이도가 높은 검사법이다. 따라서, 다중 중합효소연쇄반응 검사를 대변 검체에 직접 적용하는 것이 *E. coli* O157:H7 장염환자의 조기 감별진단과 국내 VTEC 역학을 규명하는데 유용할 것이다.

결론적으로 다중 중합효소연쇄반응은 통상배양에서 검출하기 어려운 *Campylobacter*, VTEC, *C. perfringens*를 진단하는데 유용하였고, *Salmonella*, *Vibrio*, *Y. enterocolitica*는 배양법과 유사한 민감도를 보였다. 따라서 통상 배양검사와 더불어 다중 중합효소연쇄반응을 대변 검체에 직접 적용하는 것은 세균성 장염 원인균 진단의 민감도를 크게 향상시킬 수 있을 것으로 판단하였다.

참 고 문 헌

- Baldi F, Bianco MA, Nardone G, Pilotto A, Zamparo E. Focus on acute diarrhoeal disease. World J Gastroenterol 2009;15:3341-8.
- Vernacchio L, Vezina RM, Mitchell AA, Lesko SM, Plaut AG, Acheson DW. Diarrhea in American infants and young children in the community setting: incidence, clinical presentation and microbiology. Pediatr Infect Dis J 2006;25:2-7.
- Farthing MJ. Diarrhoea: a significant worldwide problem. Int J Antimicrob Agents 2000;14:65-9.
- Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. Lancet 2005;365:1073-86.
- Thielman NM and Guerrant RL. Clinical practice. Acute infectious diarrhea. N Engl J Med 2004;350:38-47.
- Guerrant RL, Van Gilder T, Steiner TS, Thielman NM, Slutsker L, Tauxe RV, et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis 2001;32:331-51.
- Cheng AC, McDonald JR, Thielman NM. Infectious diarrhea in developed and developing countries. J Clin Gastroenterol 2005;39:757-73.
- Thapar N and Sanderson IR. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. Lancet 2004;363:641-53.
- Gadewar S and Fasano A. Current concepts in the evaluation, diagnosis and management of acute infectious diarrhea. Curr Opin Pharmacol 2005;5:559-65.
- Shin HB, Jeong SH, Kim M, Kim WH, Lee K, Chong Y. Isolation trend of enteropathogenic bacteria in 1969-1998. Korean J Clin Microbiol 2001;4:87-95.
- Korea Center for Disease Control & Prevention. The prevalence and characteristics of bacteria causing acute diarrhea in Korea, 2008. http://www.cdc.go.kr/contents/information/had/b/9918_view.html
- Iijima Y, Asako NT, Aihara M, Hayashi K. Improvement in the detection rate of diarrhoeagenic bacteria in human stool specimens by a rapid real-time PCR assay. J Med Microbiol 2004;53:617-22.
- Reller ME, Lema CA, Perl TM, Cai M, Ross TL, Speck KA, et al. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. J Clin Microbiol 2007;45:3601-5.
- Chapela MJ, Fajardo P, Garrido A, Cabado AG, Ferreira M, Lago J, et al. Comparison between a TaqMan polymerase chain reaction assay and a culture method for *ctx*-positive *Vibrio cholerae* detection. J Agric Food Chem 2010;58:4051-5.
- Nhung PH, Ohkusu K, Miyasaka J, Sun XS, Ezaki T. Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to *dnaJ* gene. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;59:271-5.
- Daube G, Simon P, Limbourg B, Manteca C, Mainil J, Kaeckenbeeck A. Hybridization of 2,659 *Clostridium perfringens* isolates with gene probes for seven toxins (alpha, beta, epsilon, iota, theta, mu, and enterotoxin) and for sialidase. Am J Vet Res 1996;57:496-501.
- Jang YH, Chung J, Baek S, Park S, Sung H, Kim MN. Implementation of multiplex PCR for species identification and toxin typing in toxigenic *Clostridium difficile* culture. Korean J Clin Microbiol 2009;12:11-6.
- Paton AW and Paton JC. Multiplex PCR for direct detection of Shiga toxigenic *Escherichia coli* strains producing the novel subtilase cytotoxin. J Clin Microbiol 2005;43:2944-7.

19. Kim JS, Lee GG, Park JS, Jung YH, Kwak HS, Kim SB, et al. A novel multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of five pathogenic bacteria: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Vibrio parahaemolyticus*. J Food Prot 2007;70:1656-62.
20. O'Leary J, Corcoran D, Lucey B. Comparison of the EntericBio multiplex PCR system with routine culture for detection of bacterial enteric pathogens. J Clin Microbiol 2009;47:3449-53.
21. Butzler JP. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. Clin Microbiol Infect 2004;10:868-76.
22. Thorney JP, Shaw JG, Gryllos IA, Eley A. Virulence properties of clinically significant *Aeromonas* species: evidence for pathogenicity. Rev Med Microbiol 1997;8:61-72.
23. Choi JP, Lee SO, Kwon HH, Kwak YG, Choi SH, Lim SK, et al. Clinical significance of spontaneous *Aeromonas* bacterial peritonitis in cirrhotic patients: a matched case-control study. Clin Infect Dis 2008;47:66-72.
24. Kang JM, Kim BN, Choi SH, Kim NJ, Woo JH, Ryu J, et al. Clinical features and prognostic factors of *Aeromonas* bacteremia. Infect Chemother 2005;37:161-6.
25. Labbe R. *Clostridium perfringens*. In: Doyle MP, ed. Foodborne Bacterial Pathogens. New York; Marcel Dekker, Inc., 1989:191-234.
26. Kokai-Kun JF, Songer JG, Czeczulin JR, Chen F, McClane BA. Comparison of western immunoblots and gene detection assays for identification of potentially enterotoxigenic isolates of *Clostridium perfringens*. J Clin Microbiol 1994;32:2533-9.
27. Lee SW, Lee BK, Lee YJ, Lee HS, Jung SC, Sun KH, et al. A study on epidemiological characteristics and control methods of EHEC infection in Korea. Korean J Epidemiol 2005;27:37-52.
28. Oh YH and Kim YB. Use of polymerase chain reaction and serum antibodies for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Korean Soc Microbiol 1998;33:99-110.

=국문초록=

세균성 설사 원인균의 신속검출을 위한 다중 중합효소연쇄반응 검사의 대변검체에 대한 직접 적용

울산대학교 의과대학 서울아산병원 ¹진단검사의학교실, ²소아과학교실

조민철¹, 노신애¹, 김미나¹, 김경모²

배경: 감염성 설사 원인균의 진단은 주로 배양에 의해 이루어졌으나 이러한 방법은 민감도가 상대적으로 낮고 시간이 오래 걸리는 단점을 가진다. 본 연구에서는 다양한 설사 원인균의 신속 동정을 위해 다중 중합효소연쇄반응을 환자의 대변 검체에 직접 적용하여 평가하였다.

방법: 2009년 6월부터 9월까지 대변배양이 의뢰된 173건의 설사 검체에 Seeplex[®] Diarrhea ACE Detection kit (Seegene, Seoul, Korea)를 이용하여 다중 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 모든 검체에 대하여 다중 중합효소연쇄반응 결과와 *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*를 검출하기 위한 통상적인 배양법 결과를 비교하였다. 후반부의 50 검체에 대하여는 *Campylobacter* 배양이 이루어졌다. 다중 중합효소연쇄반응에서 verotoxin 생산 *Escherichia coli* (VTEC)가 양성인 검체는 장출혈성 *E. coli* O157:H7 진단을 위해 계대배양을 실시하였다. 또한 환자의 의무기록을 후향적으로 조사하여 임상 증상과 검사결과를 확인하였다.

결과: 총 173건의 검체 중 다중 중합효소연쇄반응과 배양방법에 의해 각각 36검체(20.8%)와 8검체(4.6%)에서 설사원인균이 동정되었다. 다중 중합효소연쇄반응에서는 *Salmonella* 5건, *Campylobacter* 15건, *Vibrio* 1건, *Clostridium difficile* toxin B 4건, *Clostridium perfringens* 5건, *Yersinia enterocolitica* 1건, *Aeromonas* 5건, VTEC 2건으로 검출되었고, 배양검사법으로는 *Salmonella* 5건, *Vibrio* 1건, *Y. enterocolitica* 1건, *Aeromonas* 1건, *E. coli* O157:H7 2건이 진단되었다.

결론: 다중 중합효소연쇄반응 방법은 *Campylobacter*, VTEC and *C. perfringens* 등과 같은 배양이 어려운 장병원성 균의 검출에 매우 유용하였을 뿐만 아니라, 일반적인 장병원성균인 *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Y. enterocolitica*에 대해서는 통상배양법과 유사한 민감도를 나타냈다. 통상 배양검사와 더불어 다중 중합효소연쇄반응을 대변 검체에 직접 적용하는 것은 세균성 장염 원인균 진단의 민감도를 크게 향상시킬 수 있을 것이다. [대한임상미생물학회지 2010;13:162-168]

교신저자 : 김미나, 138-736, 서울시 송파구 풍납 2동 388-1
서울아산병원 진단검사의학과
Tel: 02-3010-4511, Fax: 02-478-0884
E-mail: mnkim@amc.seoul.kr