

Detection of the Causative Agents of Traveler's Diarrhea Using a Real-Time PCR Screening Method

Semi Jeon¹, Junyoung Kim¹, Harim Lee², Minyoung Son², Misun Park¹, Bokkwon Lee¹, Seonghan Kim¹

¹Division of Enteric Bacterial Infections, National Institute of Health, Seoul,

²Gimhae National Quarantine Station, Gimhae, Korea

Background: The incidence of infectious diarrheal disease in Korea has decreased over the past decade, but traveler's diarrhea (TD) is increasing in frequency. We therefore investigated the distribution of the causative agents of TD.

Methods: A total of 132 rectal swab specimens were acquired from TD patients who entered the country via Gimhae International Airport. The specimens were screened for 12 bacterial pathogens by real-time PCR, and target pathogens were isolated from the PCR positive specimens using conventional microbiological isolation methods.

Results: A total of 93 specimens (70.5%) showed positive PCR screening results, and of these specimens, nine species and 50 isolates (37.9%), including *Vibrio parahaemolyticus* (18 isolates) and ETEC (17 isolates), were isolated. No specimens were PCR

positive for *Listeria monocytogenes* or *Campylobacter jejuni*, and no pathogenic *Bacillus cereus* were isolated.

Conclusion: Even though viruses and EAEC were not included as target pathogens, the high isolation rate of these pathogens in this study provides indirect evidence that most cases of pathogen-negative TD are caused by undetected bacterial agents. Furthermore, our study results confirm the effectiveness of real-time PCR-based screening methods. This study is the first report in Korea to demonstrate that ETEC and *V. parahaemolyticus* are the major causative pathogens of TD, and this knowledge can be used to help treat and prevent TD. (Korean J Clin Microbiol 2009;12:186-192)

Key Words: Traveler's diarrhea, PCR, ETEC

서 론

동남아시아, 아프리카 지역의 개발 도상 국가를 여행하게 되면서 얻게 되는 질병으로는 설사가 가장 흔한 것으로 알려져 있다[1,2]. 흔히 여행자 설사로 알려진 이 해외유입 설사질환은 병증이 대부분 가볍고 제한적이기는 하지만 일시적 불능상태, 여행 계획의 변경, 의료비 등의 추가적인 비용지출을 초래하므로 여행객들에게 불편을 준다[3]. 이런 해외 유입 설사질환은 주로 세균 감염에 의해 초래되고 있으며, 여러 연구결과를 통해 그 중에서도 장독소성 대장균(enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)과 장집적성 대장균(enteroaggregative *E. coli*, EAEC)이 주요 원인 병원체로 알려져 있다[1,4-6]. 최근의 한 연구에 의하면, 중남미 지역 여행자 설사의 37%가 ETEC, 13%가 EAEC가 원인이었으며, 인디아 지역을 여행한 여행자 설사의

원인 병원체로는 19%가 ETEC, 16%가 EAEC로 보고된 바 있다[1]. 또, 인디아 같은 남부 아시아에서는 *Campylobacter jejuni*와 *Vibrio* spp.도 주요 원인 병원체로 보고되고 있다[1]. 이에 반하여 바이러스성 설사질환은 해외유입 설사질환의 20%를 넘지 못하는 것으로 알려져 있으며, 대부분 Norovirus가 그 원인으로 알려져 있다[1,4].

최근 들어 우리나라에서는 해마다 해외 여행자수의 증가와 더불어 해외 여행자의 설사사례는 지속적으로 증가되고 있는 추세를 보이고 있다[7]. 그러나 국내에서는 아직까지 해외 유입 설사질환에 본격적인 연구가 없었기 때문에 해외유입 설사질환의 원인병원체에 대한 자세한 분포 정도가 알려져 있지 않은 실정이다. 다만 국립검역소를 통해 신고된 해외여행객들에 대한 검사 결과가 꾸준히 보고되고 있으나 국립검역소의 해외 유입 설사질환에 대한 진단 및 감시체제는 주로 콜레라 등 법정 전염병을 중심으로 운영되고 있으므로 그 결과가 해외유입 설사질환 원인병원체의 분포를 정확하게 설명할 수는 없을 것이다[7].

본 연구에서는 해외 유입 설사질환의 증가와 더불어 국내에 유입되는 여행자 설사 중 세균성 원인 병원체의 정확한 분포를 조사하고, 이 과정을 통하여 분리된 해외 유입 병원체들의 항

Received 28 August, 2009, Revised 9 October, 2009

Accepted 20 November, 2009

Correspondence: Seonghan Kim, Division of Enteric Bacterial Infections, Center for Infectious Diseases, National Institute of Health, Korea Centers for Disease Control and Prevention, 194, Tongil-ro, Nokbeon-dong, Eunpyeong-gu, Seoul 122-701, Korea. (Tel) 82-2-380-2976, (Fax) 82-2-352-4767, (E-mail) kkingsh@chol.com

균체 내성 경향 등의 특성을 확인함으로써 해외 유입 감염질환을 방지하기 위한 여행 지역별 예방 백신 선택 등의 관리 지침 개발과 검역소 감시체계 보완 등에 필요한 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

1. 검체

2007년 9월부터 2008년 3월까지 국립 김해검역소를 통해 입국한 여행자 중 설사환자 검체 132건을 채취하여 조사하였다. 여행국가별로는 필리핀 47건, 태국 32건, 베트남 28건, 중국 19건, 캄보디아 5건, 일본 1건으로 모두 7개국이었다. 검체는 모두 swab의 형태로 채취되었다.

2. 원인 병원체의 탐색

채취된 검체에 대해 총 12종의 설사원인 세균성 병원체인 *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), ETEC, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campy. jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*의 존재 여부를 real time PCR을 이용하여 탐색하였다.

채취된 검체를 5 mL의 Tryptic soy broth (TSB)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 다음, 이 배양액 중 200 uL를 따로 micro centrifuge tube에 덜어내어 원심 분리하여 균체를 수거하였다. 수거된 균체는 1 mL의 10 mM Tris (pH7.4)로 현탁하여 세척한 다음, 재원심분리하여 균체를 수거하였다. 여기에 200 uL의 Tris (pH7.4)로 다시 현탁한 다음, 중탕으로 5분간 끓여서 균체를 파괴하고, 이를 13,000 rpm에서 5분간 원심분리한 다음, 상등액을 PCR의 주형으로 사용하였다.

TaqMan probe를 이용한 real time PCR은 각 병원체별로

Powercheck real time PCR kit (Kogenbiotech, Seoul, Korea)를 사용하여 제조사의 방법대로 PCR반응을 준비하였고(Table 1), ABI 7000 system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 결과 Ct 값이 30 이하일 경우 해당 병원체에 대한 양성으로 추정하고, 양성으로 추정되는 검체로부터 해당되는 종의 균주 분리를 시도하였다.

3. 원인 병원체의 분리 동정

PCR 탐색 결과에 따라 병원체의 존재가 추정될 경우, 각 병원체의 종류에 따라 다음과 같이 분리를 수행하였다.

*V. cholerae*나 *V. parahaemolyticus*의 분리를 위해서는, TSB에 배양된 검체 배양액을 한 loop 만큼 덜어내어 thiosulfate citrate bile salts sucrose (TCBS)배지에 접종하여, 37°C에서 16~18시간 배양한 다음, 의심되는 집락을 선택하여, tryptic soy agar (TSA)에 계대하여 자란 집락을 API 20E kit (bioMerieux, Marcy l'Etoile France)를 이용하여 동정하였다. *V. cholerae*로 동정되었을 경우, 슬라이드응집방법으로 O1 또는 O139 혈청 균인지를 확인하였다.

Salmonella spp.와 *Shigella* spp.가 의심될 경우, 검체 배양액을 MacConkey배지에 접종, 배양한 다음, 의심되는 집락을 TSA에 계대하여 자란 집락을 API 20E kit를 이용하여 *Salmonella* spp. 또는 *Shigella* spp.가 맞는지 확인하였다. *Salmonella* spp.는 생화학 동정이 완료된 후, Kauffman-White scheme[8]에 따라 O항원과 H항원에 대해 슬라이드 및 시험관 응집반응을 수행한 후, 혈청형을 판정하였다.

EHEC와 ETEC의 분리를 위해서는 검체 배양액을 MacConkey 배지에 접종, 배양하여 분홍색 집락을 10개씩 pooling하여 병원체 탐색 시와 같은 방법으로 *stx*유전자를 검출하기 위한 PCR을 수행하여 존재를 확인하였고, 양성인 결과가 나올 경우, 이들 집락을 각각 하나씩 다시 PCR을 수행하여 양성인 집락이 확인

Table 1. Real time PCR kit used in this study

Kit	Pathogens	Target gene
PowerChek™ <i>V. cholerae</i> Real-time PCR Kit	<i>V. cholerae</i>	<i>hlyA</i>
PowerChek™ <i>V. parahaemolyticus</i> Real-time PCR Kit	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>toxR</i>
PowerChek™ ETEC Real-time PCR Kit*	ETEC	LT ST <i>stx1</i>
PowerChek™ EHEC Real-time PCR Kit*	EHEC	<i>stx2</i>
PowerChek™ <i>Salmonella</i> PCR Kit	<i>Salmonella</i> spp.	<i>invE</i>
PowerChek™ <i>Shigella</i> spp. PCR Kit	<i>Shigella</i> spp.	<i>ipaH</i>
PowerChek™ <i>Staphylococcus aureus</i> PCR Kit	<i>S. aureus</i>	<i>femA</i>
PowerChek™ <i>Yersinia enterocolitica</i> PCR Kit	<i>Y. enterocolitica</i>	16s rRNA
PowerChek™ <i>Listeria monocytogenes</i> PCR Kit	<i>L. monocytogenes</i>	<i>iap</i>
PowerChek™ <i>Bacillus cereus</i> PCR Kit	<i>B. cereus</i>	<i>groEL</i>
PowerChek™ <i>Campylobacter jejuni</i> PCR Kit	<i>C. jejuni</i>	<i>hip</i>
PowerChek™ <i>Clostridium perfringens</i> PCR Kit*	<i>C. perfringens</i>	<i>cpa</i> , <i>cpe</i>

*PCR was performed as duplex reaction.

되면 이 집락을 TSA에 계대한 후, API 20 E kit를 이용하여 *E. coli*가 맞는지 확인하였다.

*S. aureus*가 의심될 경우, mannitol salt agar에 도말, 37°C, 18~24시간 배양한 후, 황색 집락을 선별하여 TSA에 계대한 후, API Staph kit (bioMerieux, Marcy l'Etoile France)를 이용하여 동정하였다. 동정된 균주들에 대해 병원성 장독소 생산을 확인하기 위하여 Løvselth 등[9]의 방법으로 PCR을 이용하여 *sea*, *seb*, *sec*, *see* 유전자들의 보유 여부를 확인하였다.

*Y. enterocolitica*는 검체배양액을 CIN 선택배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양, 전형적인 형태의 집락을 선별하여 TSA에 계대한 후, API 20 E kit를 이용하여 동정하였다.

*B. cereus*는 mannitol egg yolk polymyxin (MYP) 배지에 접종, 30°C에서 24시간 배양, 전형적인 형태의 집락을 선별하여 TSA에 계대한 후, API 50 CHB kit (bioMerieux)를 이용하여 생화학적으로 동정하였다. 동정된 균의 병원성을 확인하기 위하여 PCR방법으로 *hblC*, *nheA*, *entFM* 유전자를 확인하였다. *hblC* (*hblC*-F cctactcaactctcgcaacaccaat, *hblC*-R ttttcttgatcgtagccattct), *nheA* (*nheA*-F attacaggggtattggttacagcagt, *nheA*-R aatctgtcctactctctggatgc), *entFM* (*entFM*-F caaagactctgtaacaaaagggtgt, *entFM*-R tgtttactccgcttttacaact)의 primer set를 사용하여 multiplex유형으로 증폭한 후, 각각 386 bp, 475 bp, 290 bp 위치를 확인하였다.

*C. perfringens*는 검체배양액을 TSC배지에 접종하여 37°C에

서 24시간 혐기조건으로 배양한 다음 자라난 전형적 집락을 선택하여 API 20 A kit (bioMerieux)로 최종 동정하였다.

4. 항균제 감수성 검사

분리된 *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. 균주들에 대하여 항균제 감수성 검사를 실시하였다. 항균제 감수성 검사는 VITEK AST N041 card (bioMerieux VITEK, Hazelwood, MO, USA)를 사용하여 제조사의 방법대로 측정하였고 결과는 CLSI 지침[10]에 따라 분석하였다. 이 실험에 대한 대조균주는 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

5. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

ETEC 분리주들을 대상으로 분리주들간의 유전학적 연관관계의 확인을 위하여 Gutom[11]의 방법을 일부 변형하여 시행하였다. Plug 준비는 순수 배양된 균을 Cell Suspension TE buffer (100 mM Tris and 100 mM EDTA, pH 7.5)에 넣어 현탁시키고 같은 양의 1.2% SeaKem Gold Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, Me., USA)를 섞었다. 만들어진 plug는 proteinase K가 들어있는 ES buffer (0.5 M EDTA, pH 9.0; 1% sodium-lauroyl-sarcosin)에 넣어 균을 용균시킨 후 세척하였다. 용균 처리된 plug는 *XbaI* (New England Biolabs, Boston, Ma, UK)에서 반응시킨 후에 CHEF mapper apparatus (Bio-Rad, Richmond, Ca., USA)에서 1.0% agarose gel에 넣어 0.5x

Table 2. PCR positive rate and isolation rate of pathogenic bacteria

Pathogens	Philippines		Thailand		Vietnam		China		Cambodias		Total	
	No. of isolate (%)	No. of PCR (%)	No. of isolate (%)	No. of PCR (%)	No. of isolate (%)	No. of PCR (%)	No. of isolate (%)	No. of PCR (%)	No. of isolate (%)	No. of PCR (%)	No. of isolate (%)	No. of PCR (%)
<i>V. cholerae</i>	1 (2.1)	2 (4.3)	1 (3.1)	1 (3.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.5)	3 (2.3)
<i>V. parahae-molyticus</i>	8 (17.0)	8 (17.0)	7 (21.9)	7 (21.9)	2 (7.1)	2 (7.1)	1 (5.3)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	18 (13.6)	18 (13.6)
ETEC	0 (0.0)	3 (6.4)	1 (3.1)	4 (12.5)	12 (42.9)	14 (50.0)	4 (21.1)	4 (21.1)	0 (0.0)	1 (20.0)	17 (12.9)	26 (19.7)
EHEC	0 (0.0)	1 (2.1)	0 (0.0)	1 (3.1)	1 (3.6)	5 (17.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)	7 (5.3)
<i>Salmonella</i> spp.	0 (0.0)	1 (2.1)	2 (6.3)	2 (6.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.5)	3 (2.3)
<i>Shigella</i> spp.	1 (2.1)	3 (6.4)	2 (6.3)	3 (9.4)	0 (0.0)	3 (10.7)	1 (5.3)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (3.0)	10 (7.6)
<i>Staph. aureus</i>	0 (0.0)	2 (4.3)	0 (0.0)	1 (3.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	1 (20.0)	1 (20.0)	1 (0.8)	5 (3.8)
<i>Y. enterocolitica</i>	0 (0.0)	6 (12.8)	0 (0.0)	5 (15.6)	0 (0.0)	2 (7.1)	2 (10.5)	3 (15.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (1.5)	16 (12.1)
<i>L. monocytogens</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>B. cereus</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (3.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)
<i>Campy. jejuni</i>	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Cl. perfringens</i>	2 (4.3)	2 (4.3)	1 (3.1)	1 (3.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (2.3)	4 (3.0)
Total	12 (25.5)	28 (59.6)	14 (43.8)	25 (78.1)	15 (53.6)	27 (96.4)	8 (42.1)	11 (57.9)	1 (20.0)	2 (40.0)	50 (37.9)	93 (70.5)

Tris-borate-EDTA buffer, 6 V/cm, 14°C의 조건으로 각 병원체의 종류에 맞추어 pulse time을 조절, 전기영동 하였다.

PFGE 결과 및 연관관계 분석은 BioNumerics V5.1 (Applied Math, austin, TX, USA)을 사용하여 분석하였다. Banding pattern의 분석은 Dice coefficient와 1.5% tolerance를 적용하였다. dendrogram은 unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) 방법으로 작성하여 90% 이상일 때 기본적인 역학조사 내용을 참조하여 연관성을 판단하였다.

결 과

1. PCR 결과 및 원인병원체의 분리

총 132개의 검체에 대한 PCR 결과, 93건(70.5%)의 검체에서 *V. cholerae* non-O1 등 총 10종의 병원체에 대한 양성 결과를 보였다. 또 이들 93건의 양성 검체들로부터 해당 병원체들을 분리하여 API 20 E kit 등을 이용하여 생화학적으로 동정한 결과, *V. cholerae* non-O1 등 총 10종의 병원체 50주가 분리되어 37.9%의 분리율을 보였다(Table 2).

PCR 반응 결과 양성을 보인 대상 병원체는 ETEC가 26건으로 가장 많았으며 *V. parahaemolyticus* 18건, *Shigella* spp. 10건의 순서였지만 균주 분리는 *V. parahaemolyticus*가 18주로 가장 많이 분리되었으며, ETEC 17주, *S. sonnei* 4주의 순으로 분리가 되었다. 그러나, *C. jejuni*와 *L. monocytogenes*는 PCR 양성 검체가 없었으며 따라서 한 주도 분리되지 않았다. *V. cholerae* 2주는 non-O1, non-O139였으며 *S. aureus*는 sea와 see유전자를 보유하고 있었다.

병원체별로 PCR 양성률과 균주 분리율을 비교해보면 *Vibrio* 속 균과 *C. perfringens*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella* spp.들은 PCR 양성률과 균주 분리율이 동일하거나 유사하였지만, ETEC, EHEC, *Shigella* spp. *Y. enterocolitica*들은 PCR 양성률과 균주 분리율이 1.6배에서 8배까지 차이가 있었다.

여행 국가별로는 채취 검체수가 필리핀이 47건으로 가장 많았으며, 태국 32건, 베트남 28건, 중국 19건, 캄보디아 5건, 일본 1건의 순이었다. PCR 양성률 및 원인 병원체 분리율 모두에서 베트남이 각각 96.4%와 53.6%로 가장 높았는데, 이 가운데 9건은 단체 여행객에서의 ETEC 집단발생으로 확인되었다. 그 다음은 태국으로 78.1%의 PCR 양성률과 43.8%의 분리율을 보였다.

분리율이 가장 높았던 두 종의 병원체 가운데 *V. parahaemolyticus*는 필리핀과 태국 유래 검체로부터의 PCR 양성률과 분리율이 상대적으로 높았으며, ETEC는 베트남과 중국 유래 검체들에서 분리율이 상대적으로 높게 나타났다(Table 2).

분리된 *Salmonella*균의 혈청형은 각각 Chailey, Corvallis로 확인되었는데 이들 혈청형은 모두 국내에선 거의 분리되지 않

는 혈청형들이었다. 또 1주가 분리된 EHEC는 SLT1과 2를 모두 생산하였으며, O22형으로 확인되었는데, 이 혈청형은 아직 국내에서는 국내발생 및 해외유입 사례 모두에서 보고된 적이 없는 혈청형이었다. ETEC의 경우는 20주가 이열성 장독소(heat-labile enterotoxin, LT)를 생산하였고, 태국 유래 1주와 필리핀 유래 1주가 내열성 장독소(heat-stable enterotoxin, ST)를 생산하는 것으로 확인되었다.

2. 항균제 감수성

ETEC 17주 중 13주가 ampicillin (AM)과 trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)에 대하여 동시에 내성을 가지고 있었다. 이들 가운데 12주는 베트남 유래 분리주들로 2주를 제외한 10주는 단일한 집단발생 사례에 속하는 균주들이었다. 나머지 한 주는 태국 유래 분리주들로 tetracycline (TE)에 대한 내성도 함께 가지고 있었다.

*Salmonella*의 경우, *S. Chailey*는 시험된 모든 항생제에 대해 감수성을 보였으며, *S. Corvallis*는 TE에 대해 내성을 나타내었다. *S. sonnei*는 경우, 4주의 감수성 경향이 모두 다르게 나타났는데, AM, SXT 내성주 1주와 gentamicin (GM), AM, SXT, TE의 다제 내성주 1주, TE, SXT 내성 1주, TE 내성 1주로 최근 국내에서 분리된 *S. sonnei*들에 비교하면 오히려 내성정도가 낮은 균주들이었다.

3. PFGE

본 연구를 통해 분리된 ETEC 균주들이 여행지역이나 여행 시기에 따른 연관성이 있는지를 확인하기 위하여 PFGE를 실시한 결과, 베트남 단체 동반 여행객 분리주들이 두 개의 PFGE 유형으로 나뉘기는 했지만 양 집단 간 유사도가 94.1%로 높게 나타나 유전학적 연관성이 깊음을 확인하였다(Fig. 1). 중국 유래 4주들은 유사도가 75.4% 이하로 균주들 상호간에 연관성이 존재하지 않았다. 베트남 단체 여행객에서의 단일 집단발생 사례와 이에 해당하지 않는 환자 분리주 2주 사이의 유사도는 58% 이하로 유입국에 따른 연관성을 찾아볼 수 없었다.

고 찰

국내에서의 여행자 설사 환자의 주요 여행대상국은 태국 등 주로 동남아시아 지역으로, 이전의 조사에 따르면 원인 병원체는 *V. parahaemolyticus*가 대부분인 것으로 보고되었다[7]. 그러나 본 연구에서의 병원체 분리결과에 따르면 ETEC가 12.9%로 13.6%를 차지한 *V. parahaemolyticus*와 분포비율이 거의 유사한 주요 원인병원체임이 확인되었다. 두 조사연구 사이의 결과 차이는 이전 조사연구에서는 조사 대상 원인병원체에 ETEC가 포함되어있지 않았던 것이 원인으로 판단된다. 또, 본 연구 결과는 동남아시아 지역 여행자 설사의 원인으로 ETEC가 약

Dice (Opt 1.00%) (Tol 1.0%~10%) (H>0.0% S>0.0%)
[0.0%~98.3%] PFGE-XbaI

PFGE-XbaI

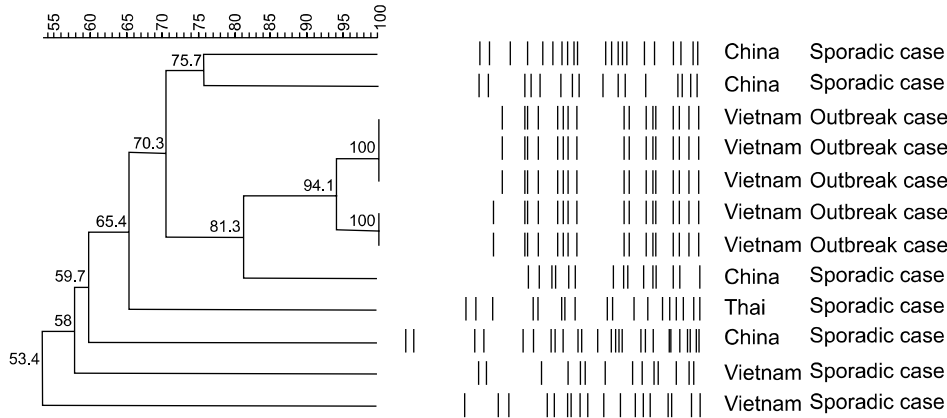


Fig. 1. Clustering of XbaI digested PFGE patterns of ETEC isolates.

10%를 차지한다는 다른 연구결과와 일치하고 있다[12]. 그러나 또 다른 주요 원인 병원체로 알려져 있는 *Campylobacter*는 분리되지 않았는데 *Campylobacter*가 주로 남아아시아 지역 여행객에서의 원인 비율이 높다는 보고를 참고한다면[1], 이번 조사연구에 인디아 등 남아아시아가 제외되어 있는 것도 한 원인으로 볼 수 있을 것이다.

한편, 몇몇 연구들에서 주요 원인 병원체로 보고된 EAEC가 본 연구에 대상 병원체에서 제외된 것은 본 연구의 연구 방법이 real time PCR을 이용한 병원체 탐색 후, 탐색된 병원체를 분리하는 방법으로 설계되었으나, EAEC에 대한 개발 또는 상용화된 kit가 없어 같은 조건으로 실험할 수가 없었을 뿐 아니라 법정전염병에 해당되지 않아 공인된 진단 기준이 없었기 때문이었다.

본 연구의 대상 병원체들은 법정전염병에 해당하는 세균성 설사질환 원인 병원체들로 이들에 대한 실험실적 진단 기준은 병원체가 분리되었을 때로 정해져 있다[13]. 때문에 본 연구에서의 real time PCR 이용은 진단보다 탐색에 사용되었다. 또, 일부 병원체에서는 중 특이 유전자의 존재가 병원성을 의미하는 것이 아니기 때문에 PCR 양성 결과가 원인 병원체의 존재를 모두 반영하는 것은 아니었다.

PCR 탐색 결과는 전체 병원체의 70.5%가 양성으로 분리비율인 37.9%에 비해 상당히 높은 결과를 보였는데, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, ETEC, *Salmonella*, *C. perfringens*에서는 PCR 탐색결과가 병원체 분리결과와 매우 유사하게 나타났으나 *Shigella* spp, *S. aureus*, EHEC, *Y. enterocolitica*에서는 PCR 탐색결과에 비하여 분리결과가 매우 낮게 나타났다.

PCR 탐색결과와 분리결과와의 차이는 병원체별로 다르게 설명될 수 있는데, *Shigella*는 탐색 대상 유전자인 *ipaH* 유전자가 장침입성 대장균과 공유되는 병원성 요소이어서 분리율과 차이가 있었다고 판단되며, *S. aureus*와 *B. cereus*는 PCR 탐색

양성이 이 균들의 존재만 확인하는 것이고, 균주 분리 후에 추가적으로 병원성 요소의 보유를 확인한 후 원인병원체로 진단되어야 하는데, 분리된 균주 중 상당수가 병원성 요소를 보유하지 않았던 이유로 *S. aureus*에서의 차이를 설명할 수 있을 것이다.

EHEC에서의 PCR 양성률과 균주 분리율의 격차는 정확한 요인의 추정이 어려우나, 본 연구에서 ETEC와 EHEC의 PCR 결과 중 양성인 검체로부터 200개까지의 의심 집락을 확인하여 분리를 시도하였지만 Ct 값이 25 이상인 검체들에서는 ETEC 두 균주만이 분리되었던 결과로 미루어 검체 내 해당 병원체의 수가 워낙 적어서 분리가 안 되었던 것으로 추정된다. *Y. enterocolitica*는 양성 검체에서 분리한 의심 집락의 대부분이 *Citrobacter freundii*로 동정되었던 것으로 미루어 보아 비특이적 PCR 반응이 의심되므로 관련 PCR kit의 개선이 필요하다고 생각된다.

본 연구에서는 대상병원체로 바이러스, 원충 및 EAEC가 제외되었지만, 다른 여러 연구들에서 바이러스와 원충이 차지하는 비율인 15~20%와 EAEC의 분포 비율인 10% 내외를 고려하면[1,12] 다른 조사연구에서의 원인 규명률보다 10% 이상 높은 결과를 보이고 있다. 본 연구에서의 높은 규명률은 우선 real time PCR 기법을 이용하여 대상 병원체를 탐색하고, 그 결과에 따라 표적이 되는 병원체에 대한 분리를 시도한 방법의 효과라고 생각된다. 또 이런 연구결과는 해외유입 설사질환의 원인 중 세균이 차지하는 비율이 80%로 추정되며[2], 따라서 원인 불명 여행자 설사사례의 상당수가 세균성 원인으로, 이는 항균제 치료에 따른 병원체의 사멸이나 수의 감소에 따라 진단이 안 되었던 것이라는 가설[4]을 뒷받침해주는 결과라고 할 수 있다.

ETEC의 경우, 다른 병원성 대장균과 같이 고전적인 분리방법으로는 분리가 어려운 것으로 알려져 있다. 한 연구에 따라

면 발병 초기 검체가 아닐 경우, 5개 미만의 집락을 선택하여 진단하게 되면 50% 정도만 진단되는 것으로 보고된 바 있다 [14]. 또, PCR을 이용하면 ETEC 분리율을 높일 수 있다는 보고도 있으므로 [15] 본 연구에서의 PCR의 이용은 적절한 시도였다고 판단된다.

분리된 ETEC는 두 주만 ST를 생산하였고, 나머지 20주는 모두 LT를 생산하였다. LT는 콜레라 독소와 구조가 유사하므로 콜레라 백신으로 동반 방어효과를 기대할 수 있다 [3]. 하지만 다른 연구에서는 조사된 ETEC의 약 60%가 LT를 생산한다는 보고가 있었는데 [16], 여행자 설사에 있어서 ETEC가 생산하는 LT와 ST가 지역별로 일정한 분포비율을 보이지는 않는다고 판단된다. PFGE를 이용한 ETEC 분리주들간의 연관관계 조사에서도 집단발생 관련주들로 확인된 경우를 제외하고는 지역이나 분리 시기와의 관련성이 발견되지 않았다.

*V. parahaemolyticus*의 분리비율도 ETEC와 거의 유사하였다. 그러나 필리핀과 태국을 여행한 환자들의 경우에는 *V. parahaemolyticus*의 분리비율이 ETEC의 분리비율보다 더 높았으며, 베트남과 중국 여행객들의 경우에는 ETEC의 분리비율이 더 높게 나타났기 때문에 원인병원체에 대한 지역적 차이가 존재함을 알 수 있다.

태국 등 동남아시아 지역에서 분리된 균주들이 quinolone 계 항균제에 대해 높은 내성을 가지고 있다고 알려져 있으므로 [17], 분리된 ETEC, *Salmonella* spp. 및 *S. sonnei*에 대해 항균제 감수성을 확인한 결과 ETEC의 경우 66.7%가 AM과 SXT에 대한 내성을 동시에 가지고 있었으나 quinolone 계 항균제에 대한 내성을 가지고 있는 것은 없었다. *S. sonnei* 분리주들도 비슷한 양상을 보였으나, *Salmonella* spp. 분리주들은 거의 감수성을 보였다. AM과 SXT에 대해서는 다른 연구에서는 ETEC나 *Salmonella* spp., *Shigella* spp.에서 50% 이상의 내성률을 보인 것으로 보고된 바와 비교하면 [1], *Salmonella* 분리주들의 내성이 예상보다 매우 낮게 나타났다고 볼 수 있다. 그러나 해외 유입 균주들에 대한 항균제 내성의 확인은 반드시 필요하다고 판단된다.

우리나라의 해외유행 형태의 특징 중 하나가 한 국가 내에서 여러 도시를 돌거나, 동남아시아 여러 국가들을 동시에 방문하는 패키지 형태로 진행됨에 따라 본 연구에서는 유입 지역을 정확히 한정하여 지역적인 원인 분포를 알아보는 데 제한이 있었고, EAEC가 연구 대상에 제외되었었다는 제한점이 있었지만 본 연구를 통하여 국내에서 해외유입 설사질환의 주요 원인 병원체 역시 국외의 연구들과 동일하게 ETEC였음을 확인하였으며, 또한 규명이 안 된 경우에도 세균성 원인병원체에 의한 설사질환이라는 예상을 간접적으로 증명한 성과를 거두었다고 판단된다. 또 이 결과는 여행자 설사의 예방 및 국내 전파를 막을 수 있는 해외유입 감염질환 관리에 중요한 기초자료가 되리라 기대한다.

감사의 글

본 연구는 질병관리본부의 수인성·식품매개성 감염병 감시망의 비브리오팀 사업과 식품의약품안전청 용역과제 ‘설사질환 원인병원체 항균제 내성 능동적 감시연구(07052 항생제 171)’의 지원으로 수행되었음.

참 고 문 헌

- DuPont HL. Systematic review: the epidemiology and clinical features of travelers' diarrhea. *Alimen Pharmacol Ther* 2009;30:187-96.
- Adachi JA, Jiang ZD, Mathewson JJ, Verenkar MP, Thompson S, Martinez-Sandoval F, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a major etiologic agent in traveler's diarrhea in 3 regions of the world. *Clin Infect Dis* 2001;32:1706-9.
- Flores J, DuPont HL, Jiang ZD, Belkind-Gerson J, Mohamed JA, Carlin LG, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin seroconversion in US travelers to Mexico. *J Travel Med* 2008;15:156-61.
- Meraz IM, Jiang ZD, Ericsson CD, Bourgeois AL, Steffen R, Taylor DN, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and diffusely adherent *E. coli* as likely causes of a proportion of pathogen-negative travelers' diarrhea--a PCR-based study. *J Travel Med* 2008;15:412-8.
- Black RE. Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens. *Rev Infect Dis* 1990;12(Suppl 1):S73-9.
- Steffen R, Collard F, Tornieporth N, Campbell-Forrester S, Ashley D, Thompson S, et al. Epidemiology, etiology, and impact of traveler's diarrhea in Jamaica. *JAMA* 1999;281:811-7.
- Korea Centers for Disease Control and Prevention. Trends in imported cases of infectious diseases in Korea. *Public Health Weekly Report*. 2008;1:633-7.
- Korea Centers for Disease Control and Prevention. Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars. 2007.
- Løvsæth A, Loocareric S, Berdal KG. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in Staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol* 2004;42:3869-72.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. Document M100-S19. Wayne, PA; CLSI, 2009.
- Gutum RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organism in 1 day. *J Clin Microbiol* 1997;35:2977-80.
- Jiang ZD, Lowe B, Verenkar MP, Ashley D, Steffen R, Tornieporth N, et al. Prevalence of enteric pathogens among international travelers with diarrhea acquired in Kenya (Mombasa), India (Goa), of Jamaica (Montego Bay). *J Infect Dis* 2002;185:497-502.
- Korea Centers for Disease Control and Prevention. Diagnostic and reporting criteria for nationally notifiable communicable diseases. 2009.
- Iijima Y, Tanaka S, Miki K, Kanamori S, Toyokawa M, Asari S. Evaluation of colony-based examinations of diarrheagenic *Escherichia coli* in stool specimens: low probability of detection because of low concentrations, particularly during the early stage of

- gastroenteritis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58:303-8.
15. Murray BE, Mathewson JJ, Dupont Hill WE. Utility of oligodeoxy-ribonucleotide probes for detection enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1987;155:809-11.
16. Ko GP, Garcia C, Jiang ZD, Okhuysen PC, Belkind-Gerson J, Glass RI, et al. Noroviruses as a cause of travelers' diarrhea among students from the United States visiting Mexico. *J Clin Microbiol* 2005;43:6126-9.
17. Navaneethan U, Giannella RA. Mechanism of infectious diarrhea. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008;5:637-47.

=국문초록=

Real-Time PCR을 이용한 해외 유입 설사질환 원인 세균성 병원체의 분포 및 특성 연구

¹국립보건연구원 장내세균과, ²국립김해검역소

전세미¹, 김준영¹, 이하림², 손민영², 박미선¹, 이복권¹, 김성한¹

배경: 최근 들어 감염성 설사질환의 국내발생은 증가가 둔화된 추세를 보이는데 비하여 해외여행을 통해 유입되는 설사 환자의 수는 계속 증가하고 있다. 본 연구에서는 이처럼 증가추세에 있는 해외유입 설사질환의 원인병원체 중 세균성 원인병원체의 분포를 알아보고자 하였다.

방법: 2007년 9월부터 2008년 3월까지 김해국제공항을 통해 입국한 여행객 중 설사환자 검체 132건을 채취한 후, 이들 검체에 대해 Real time PCR을 이용하여 ETEC 등 12종의 세균성 병원체의 존재를 먼저 탐색하였다. PCR 양성일 경우 해당 병원체 분리를 시도하였고, 분리된 경우 필요에 따라 병원성 요소의 보유 여부를 확인하였다.

결과: PCR 탐색결과는 총 93개의 검체에서 양성을 보여 70.5%의 양성률을 보였으며, 이들로부터 *V. parahaemolyticus*가 18주, ETEC 17주, *S. sonnei* 4주 등 총 9종의 병원체 50주가 분리되어 37.9%의 원인 규명률을 보였다. 그러나 *L. monocytogens*와 *C. jejuni*는 PCR 양성인 검체도 없었고, *B. cereus*는 병원성 요소를 가진 균이 분리되지 않았다.

결론: 대상병원체에서 바이러스와 EAEC가 배제되었음에도 불구하고 본 연구에서의 높은 규명률은 다른 연구에서 불규명된 것들이 세균성 원인병원체일 것이라는 가설을 간접적으로 증명하였으며, 또한 PCR을 이용한 탐색방법의 사용이 규명률 향상에 도움이 됨을 밝혔다고 판단된다. 또 본 연구는 국내 여행자설사의 주요 원인병원체가 ETEC와 *V. parahaemolyticus*임을 밝혀내어 해외유입 설사질환에 대한 예방 및 관리대책 수립에 중요한 자료를 제공하였다고 생각된다.

[대한임상미생물학회지 2009;12:186-192]

교신저자 : 김성한, 122-701, 서울시 은평구 녹번동 통일로 194번지
질병관리본부 국립보건연구원 감염병센터 장내세균과
Tel: 02-380-2976, Fax: 02-352-4767
E-mail: kkingsh@chol.com