

## Identification of Shiga Toxin-producing *E. coli* Isolated from Diarrhea Patients and Cattle in Gwangju Area, Korea

Min Ji Kim<sup>1\*</sup>, Sun Hee Kim<sup>1</sup>, Tae Sun Kim<sup>1</sup>, Hye-young Kee<sup>1</sup>, Jin-jong Seo<sup>1</sup>, Eun-Sun Kim<sup>1</sup>, Jong-Tae Park<sup>1</sup>, Jae Keun Chung<sup>1</sup> and Jaeil Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Health & Environment Institute of Gwangju, Gwangju, Korea

<sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju, Korea

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains are commensal bacteria in cattle and cause food borne disease in human. We analyzed the isolation rate of STEC in stool specimens of patients with diarrhea and in fecal samples of cattle in Gwangju, Korea. STEC strains were detected from 33 (0.19%) out of 17,148 patients with diarrhea while there has been a progressive increase in the incidence rate from 0.07% in 2004 to 0.33% in 2008. We investigated serotypes, shiga toxin genes, and antimicrobial resistance patterns of the 44 STEC isolates from human and cattle sources. The 33 STEC isolates from human belonged to 14 O serotypes including O157, O26 and O111. The 11 isolates from cattle belonged to 11 O serotypes. PCR detection for *stx* genes showed that 12 (27.3%) isolates carried *stx*<sub>1</sub> genes, 20 (45.5%) possessed *stx*<sub>2</sub> genes, and 12 (27.3%) carried both *stx*<sub>1</sub> and *stx*<sub>2</sub>. Of the 33 STEC isolates from human, 25 strains (76%) were resistant to one or more antibiotics. High level of resistance to tetracycline (73%) was most common, followed by ticarcillin and ampicillin (64%). But none of the 33 isolates from human were resistant to amikacin, cefazolin, cefepime, cefotetan, cefotaxime, ciprofloxacin, or imipenem. The 5 strains (45%) of the 11 isolates from cattle were resistant to at least one or three antibiotics but most of the isolates were sensitive to the 16 antibiotics employed in this survey. In conclusion, toxin types and serotypes of STEC isolated from human and cattle were diverse, and non-O157 STEC was also observed to be a greater proportion of STEC isolates. According to a specific comparison solely based on the toxin types and serotypes, most of the STEC strains isolated from cattle feces in Gwangju, Korea showed characteristics different from those isolated from patients. Therefore, laboratory surveillance is required to detect and carefully monitor the potentially hypervirulent STEC not only in human and cattle but also in other animals.

**Key Words:** Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *stx*, Serotype, Antimicrobial resistance

### 서 론

시가 독소생성 대장균 (shiga toxin-producing *E. coli*, STEC)은 다른 식중독 원인균과는 달리 100~200개의 균

수로도 사람에 감염이 가능하며 특히 STEC O157은 1~100개의 균으로도 감염을 일으킬 수 있다 (1, 2). 따라서 감염력이 높고 식중독에 의한 집단발병의 위험이 있어 공중보건학적으로 매우 중요한 세균이다.

인체감염과의 연관관계는 1979년에 최초로 기술되었으며 (3), 1982년 햄버거로 인한 집단 식중독 사건에서 대장균 O157:H7이 분리된 후, 구미를 중심으로 집단발병 사례가 자주 보고되었고, 1996년 일본에서는 1만 여명의 환자가 발생하여 세계적으로 큰 관심을 불러일으켰다 (4).

STEC는 많은 동물들의 장관에서 발견되지만 그 중 반추류, 특히 소에서 분리된 균이 인체감염에서 높은 병원성을 가지고 있다. 소는 STEC의 자연 숙주로서 소의 분

Received: February 13, 2009/ Revised: March 6, 2009

Accepted: March 12, 2009

\*Corresponding author: Minji Kim. Health & Environment Institute of Gwangju, 898 Hwajung-dong, Seo-gu, Gwangju 502-837, Republic of Korea.

Phone: +82-62-380-1833, Fax: +82-62-380-1836

e-mail: vetmj@korea.kr

\*\*This research was performed as a part of the laboratory surveillance of acute diarrhea, managed by the National Institute of Health, Republic of Korea. The author gives her best thanks to the staffs of the hospitals in Gwangju city for their kind contribution and help.

변에 오염되거나 부적절하게 요리된 소고기를 섭취함으로써 감염이 이루어진다. 또한 사람간 전파도 중요한 감염 경로로 여겨지고 있다 (5).

다른 병원성 세균과는 다르게 STEC를 포함한 병원성 대장균들은 선택배지 상에서 일반 비병원성 대장균과 구별이 쉽지 않으며 STEC O157을 제외하고는 생화학적 성상으로도 전혀 병원성과 비병원성을 구별할 수 없다. 최근에는 STEC O157 중에도 sorbitol을 분해하는 혈청형들이 보고됨에 따라 민감성이 높고 정확한 검사법이 요구된다. 초기에는 O157 혈청형 및 이들의 생화학적 특징에 의한 고전적인 균 분리 방법이 진단법으로 사용되어져 왔지만, 최근에 분변에서 STEC를 검출하기 위한 많은 방법들이 개발되어져 왔다 (6). 시가독소 (shiga toxin: Stx) 검출을 위한 주요 방법들로는 세포배양방법 (7), 항체를 이용한 면역학적 방법 (8), PCR 방법 (9) 등이 있다. 이들 중 세포배양방법은 세포접종 전에 검체 전처리 등 시간과 노동력이 많이 걸리며, 면역학적 방법은 다양한 시가독소의 다양한 변이주에 대한 검출이 어렵다는 단점이 있다. 이에 반해 PCR 방법은 민감도가 좋고 빠른 시간 안에 검출이 가능하지만, free VT phage나 불완전한 Stx 유전자 검출 등 위양성율이 높다 (6).

동물 및 식품에서 분리된 STEC의 혈청형은 현재 약 200여종 이상으로 알려져 있지만 (10), 그 중 O26, O103, O111, O145 그리고 O157이 사람에게 주로 출혈성대장염과 hemolytic uremic syndrome (HUS)을 일으킨다고 보고되고 있는 것처럼 (11) 인체감염을 일으키는 혈청형은 매우 제한적이다. 또한 최근 10년 동안에는 non-O157 STEC에 의한 감염이 증가하고 있어 (12) 이들에 대한 감시체계의 중요성이 높아지고 있다.

STEC의 핵심적인 병원성 인자는 Stx1 독소 유전자 *stx1*과 Stx2 독소 유전자 *stx2*이며 병원균은 이들 유전자 모두 또는 어느 하나를 보유하고 있다 (13). *In vivo*와 *in vitro* 실험에서 모두 Stx1 보다는 Stx2가 심각한 인체 감염을 유발하는 가장 보편적인 병원성 인자라고 밝혀졌으며, *stx1*<sub>933j</sub>, *stx1*<sub>c</sub> 그리고 *stx1*<sub>d</sub>를 포함한 세 개의 *stx1*과 *stx2*<sub>EDL933</sub>, *stx2*<sub>c</sub> (*stx2*<sub>vh-a</sub>, *stx2*<sub>vh-b</sub>), *stx2*<sub>d</sub> (*stx2*<sub>d-Ount</sub>, *stx2*<sub>d-OX3a</sub>), *stx2*<sub>e</sub>, *stx2*<sub>f</sub> 그리고 *stx2*<sub>NV206</sub>를 포함한 최소 12개의 *stx2* 유전자 변이가 있다 (14~18). 이러한 변이 중 양 (*stx2*<sub>d</sub>)과 돼지 (*stx2*<sub>e</sub>)처럼 특정 숙주로부터 분리된 STEC는 인체감염에서 병원성이 약할 것으로 추측되었다 (19, 20). 따라서 이러한 변이주의 유형은 그들의 병원성 뿐 아니라 STEC

의 유래 및 동질성을 확인할 때 좋은 역학적 인자이다 (13, 19).

우리나라에서는 1998년 1명 발생 이후 해마다 10명 이내로 산발적인 발생이 있음에 따라 2000년 장출혈성대장균 감염증이 1군 법정전염병으로 지정되었으며, 사망 환자는 2000년 22개월의 영아에서 HUS 증상을 동반한 것이 처음이며, 지금까지 산발적인 발생양상을 보이고 있지만 매년 분리건수가 점차적으로 증가하는 경향이 있다. 더욱이 광주지역에서는 2004년 J초등학교에서 무증상 집단감염을 시작으로 매년 STEC 감염자가 증가하고 있는 실정이다. 따라서 이 연구에서는 광주지역 관내 병원을 대상으로 설사환자로부터 시가 독소생성 대장균을 분리하고, 분리 확인된 균주에 대하여 생화학적, 혈청학적 특성 및 분자생물학적 분석을 통한, 지역 내 유행하는 시가 독소생성 대장균의 유형을 파악하여 예방대책 수립 및 백신개발을 위한 기초 자료로 제공하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험균주

#### 설사환자 검체 수집

2004년 1월부터 2008년 10월까지 광주지역 10여 개 종합 병·의원 진단검사의학과 및 소아과를 선정하여 설사가 주 증상인 입원 또는 내원 환자의 대변 검체를 환자 인적사항과 함께 매주 1회 수집하여 시가 독소생성 대장균을 포함한 설사원성대장균 분리에 사용하였다.

#### 사육소의 분변 수집

2007년 10월부터 12월까지 3개월 동안 관내에서 사육되는 소를 대상으로 채취한 분변을 4℃에 보관하였다가 시가 독소생성 대장균 분리에 사용하였다.

#### 시가 독소생성 대장균 검출

##### 가검물 전처리 및 DNA 추출

대변 1 g을 4~5개의 bead가 들어있는 인산완충용액 (phosphate-buffered saline, PBS) 9 ml에 10분간 진탕하여 vancomycin (40 mg/l, Sigma Steinheim, Germany)이 첨가된 5 ml의 tryptic soy broth (Oxoid, Hampshire, England)에 500 µl 첨가하여, 37℃, 16~18시간 정치배양하였다.

중균 배양된 가검물 1 ml을 microcentrifuge tube에 옮겨 14,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, 상층액을 버리고 0.5 ml의 멸균증류수를 첨가하여 완전히 현탁시켰다. 이

**Table 1.** Sequence of PCR primers used to detect the diarrheagenic *Escherichia coli*

Strain	Gene	Sequence of primers (5'→3')	Product size (bp)	Reference
STEC	<i>stx1</i>	CGTACGGGGATGCAGATAAATCGC	210	22
		CAGTCATTACATAAGAACGCCAC		
	<i>stx2</i>	GTTCTGCGTTTTGTCACTGTCAC	326	23
		GTCGCCAGTTATCTGACATTCTGG		
EPEC	<i>eaeA</i>	ATGCTGGCATTGCGTCAGGTCGG	233	24
		TGACTCATGCCAGCCGCTCATGCG		
ETEC	<i>lt</i>	GATCACGCGAGAGGAACACAAACC	366	25
		ATCTGTAACCATCCTCTGCCGGAG		
	<i>st</i>	CTTTCCCCTCTTTTAGTCAGTC	167	25
		CACAGGCAGGATTACAACAAAGT		
EAEC	<i>eae1</i>	ATGCCATCAACACAGTATATCCG	119	26
		TCAGGTCGCGAGTGACGGCTTTG		
EIEC	<i>inv</i>	TTTCCCTCTTGCCTGCATATGCGC	356	27
		CTCACCATAACCATCCAGAAAGAAG		

를 15분간 끓는 물에서 중탕하여 세포를 완전히 파쇄하고 14,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 그 상층액을 template DNA로 사용하였다.

병원성 대장균 검출을 위한 multiplex PCR

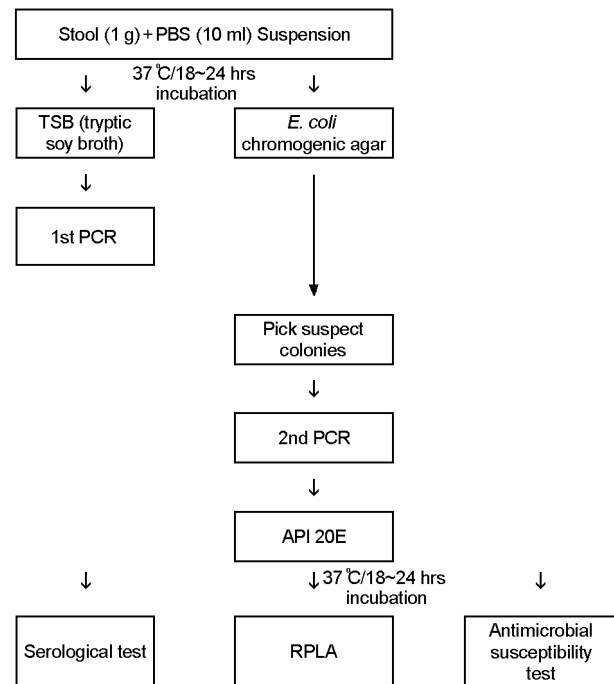
Pass 등 (21)의 방법에 따라, 병원성 대장균의 각각의 병독성 인자를 암호화한 유전자를 검출하기 위해 사용한 primer는 Table 1과 같다 (22~27).

PCR 기기는 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Boston, MA, USA)을 사용하여 94℃에서 10분간 denaturation 후 94℃/30초, 62℃/20초, 72℃/40초의 cycle을 35회 실시하고, 72℃에서 5분간 반응시켰다. PCR을 수행한 후 5 µl의 PCR 산물을 2.5% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 UV하에서 확인하였다.

전기영동에서 *stx1*과 *stx2* 유전자가 확인이 되면 Takara사의 EVT-1, 2와 EVS-1, 2 (TaKaRa, Otsu, Japan)의 primer를 사용하여 *stx1*과 *stx2* 유전자 재확인시험을 실시하였다.

시가 독소생성 대장균 분리 동정

시가독소 유전자가 확인된 검체에 대하여, 증균된 배양액을 MacConkey나 *E. coli* chromogenic agar (Oxoid)에 도말하여 37℃, 18~24시간 배양하였다. MacConkey 배지에서는 lactose를 발효한 분홍색 집락을, *E. coli* chromogenic agar에서는 β-glucuronidase와 β-galactosidase를 분해하여 자주색을 나타낸 집락을 tryptic soy agar (Oxoid) 배지에

**Figure 1.** Scheme of the identification for STEC.

접종 37℃, 18~24시간 배양하였다. 배양된 균주 각각에 대하여 PCR 방법으로 시가독소 유전자의 존재 유무를 재확인한 다음 API 20E (BioMeriux, Marcy l'Etoile, France)로 생화학적 동정시험을 실시하였다 (Fig. 1).

**Table 2.** The composition of pathogenic *E. coli* immune-sera used to detect for O-antigen

Polyvalent	Monovalent
1	O1, O26, O86a, O111, O119, O127a, O128
2	O44, O55, O125, O126, O146, O166
3	O18, O114, O142, O151, O157, O158
4	O6, O27, O78, O148, O159, O168
5	O20, O25, O63, O153, O167
6	O8, O15, O115, O169
7	O28a, O112ac, O124, O136, O144
8	O29, O143, O152, O164

VTEC-RPLA (vero-toxin producing *E. coli* reversed passive latex agglutination) 시험

RPLA kit (Oxoid)를 사용하여 독소생성시험을 하였다. tryptic soy broth에서 37°C, 18~24시간 130 rpm으로 교반배양한 후 1 ml을 취하여, 3,000 rpm, 20분간 원심분리하여 상층액을 시료로 사용하였다. 한 검체 당 V자형 96 well microplate에 25 µl의 dilution buffer를 분주한 후 첫 번째 열에 각 시료를 25 µl씩 넣고 2배씩 계단 희석하였다. 감작 latex 25 µl를 모든 well에 첨가하였다.

한 균주당 VT1, VT2, control의 3개열씩 시험을 하였고, 양성대조균으로 control verotoxin type 1과 감작 latex VT1을 혼합하고 control verotoxin type 2와 감작 latex VT2를 혼합하여 humidity chamber에 넣고 실온에서 24시간 정치시킨 후 결과를 판독하였다.

#### Somatic (O) 항원 응집시험

시가독소를 가지고 있으며 생화학적으로 대장균임이 확인된 균주에 대하여 O항원 응집시험을 실시하였다. Denka Seiken사 (Tokyo, Japan)의 pathogenic *E. coli* Immuni Sera "SEIKEN"과 그 사용법에 의거하여, 먼저 다가 항혈청 8가지 (1~8)에 대하여 슬라이드 응집법으로 검색하여 응집을 보인 검체에 한하여 각각에 해당하는 단일 항혈청에 대한 응집시험을 실시하였다 (Table 2).

#### 항생제 감수성시험

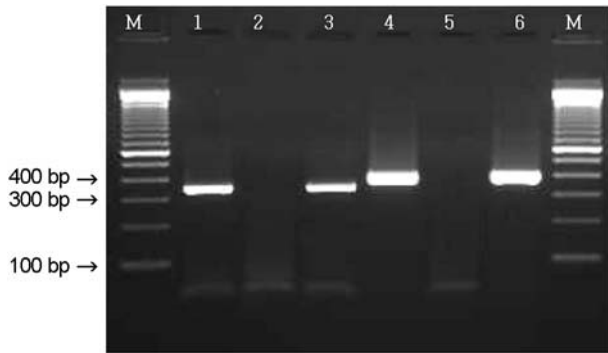
본 실험은 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard, 28) 지침을 근거로 수행하였으며, *E. coli* ATCC 25922 표준균주로 매 시험마다 항생제 역가를

**Table 3.** Characterization of 33 STEC strains isolated from diarrheagenic patients during 2004~2008

Strain	Age	Sex	Toxin type	RPLA	O-serogroup
GJ-04-08-023	2	F	<i>stx1</i>	+	O145
GJ-04-07-084	1	F	<i>stx1</i> &2	+	O26
GJ-05-06-150	7	M	<i>stx1</i>	+	O103
GJ-05-06-290	9	F	<i>stx1</i> &2	+	O111
GJ-05-07-037	2	M	<i>stx1</i> &2	+	O26
GJ-05-07-164	4	F	<i>stx1</i>	+	O26
GJ-05-07-165	2	M	<i>stx1</i>	+	O127
GJ-05-08-057	2	M	<i>stx1</i>	+	O103
GJ-05-09-032	1	F	<i>stx1</i>	+	O145
GJ-05-09-110	2	M	<i>stx1</i>	+	O166
GJ-05-07-078	8	M	<i>stx2</i>	-	O168
GJ-05-10-167	3	F	<i>stx</i>	+	O26
GJ-05-11-087	1	M	<i>stx1</i>	+	O111
GJ-05-11-177	1	F	<i>stx2</i>	+	O157
GJ-06-07-117	1	M	<i>stx1</i>	+	OUT
GJ-06-07-222	2	F	<i>stx1</i>	+	O103
GJ-07-05-219	44	F	<i>stx1</i>	+	O26
GJ-07-06-324	1	M	<i>stx1</i> &2	+	O157
GJ-07-07-066	0	M	<i>stx1</i> &2	+	O111
GJ-07-07-088	2	M	<i>stx1</i> &2	+	O157
GJ-07-07-216	1	F	<i>stx1</i> &2	+	O157
GJ-07-08-040	0	F	<i>stx2</i>	+	O112ac
GJ-07-08-056	1	M	<i>stx1</i>	+	O111
GJ-07-08-210	1	F	<i>stx1</i> &2	+	O157
GJ-07-09-032	11	M	<i>stx1</i>	-	O84
GJ-08-05-148	67	M	<i>stx1</i> &2	+	O157
GJ-08-07-100	8	M	<i>stx2</i>	+	O120
GJ-08-07-200	5	M	<i>stx1</i> &2	+	O111
GJ-08-07-205	5	M	<i>stx1</i>	+	O128
GJ-08-07-422	1	M	<i>stx1</i>	+	O111
GJ-08-08-147	1	M	<i>stx1</i>	+	O111
GJ-08-10-091	1	F	<i>stx1</i>	+	O117
GJ-08-07-438	6	M	<i>stx1</i>	-	O55

확인하여 사용하였다.

사용한 항생제는 ampicillin (AM), amikacin (AN),



**Figure 2.** PCR analysis of *stx1* (398 bp) and *stx2* (404 bp) genes. M: 100 bp ladder, lane 1, 4: *stx1* & 2 + (isolate GJ-04-07-84), lane 2, 5: negative control, lane 3, 6: positive control (EDL 933)

ampicillin/sulbactam (SAM), cephalothin (CF), cefazolin (CZ), cefepime (FEP), cefotetan (CTT), cefotaxime (CTX), ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (C), gentamicin (GM), imipenem (IPM), nalidixic acid (NA), tetracycline (TE), ticarcillin (TIC), trimethoprim/sulphamethoxazole (SXT)로 총 16종이었다.

## 결 과

### 설사환자로부터 시가 독소생성 대장균 분리

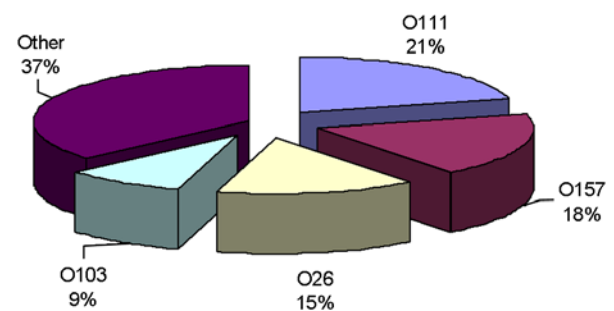
2004년부터 2008 10월까지 수집된 총 17,148건의 설사 환자 대변에서 33건 (0.19%)의 시가 독소생성 대장균을 분리하였다. 이들 모두 시가독소 유전자를 하나 또는 두 개를 가지고 있었으며 생화학적 검사 결과 모두 *E. coli*로 동정되었다. 연도별로는 2004년에 2,630건 중 2건 (0.07%), 2005년에 3,415건 중 2건 (0.35%), 2006년에 4,001건 중 9건 (0.05%), 2007년에 4,623건 중 8건 (0.19%), 그리고 2008년에는 2,429건에서 8건 (0.33%)을 분리하여 분리율이 증가함을 알 수 있었다. 월별 분리건수를 살펴보면 7월에 15건 (44%)으로 가장 많았고, 8월에 6건 (18%), 6월과 9월에 3건 (8.8%), 5월, 10월과 12월에 2건 (5.9%) 순으로 주로 하절기에 집중 분리되었다.

연령별로는 2세 이하가 20명 (63.64%), 5세 이하가 4명 (12.12%)으로 주로 2세 이하의 어린이에서 높은 분리율을 보였다. 또한 남자가 20건 (60.6%)으로 여자 (13건)보다 약 1.5배 정도 높게 나타났다 (Table 3).

분리된 33주의 시가 독소생성 대장균을 보유한 사람들은 경미한 설사 증상자가 대부분이었고 혈변이나 출혈 성장염, HUS와 같은 임상증상을 가진 사람은 없었다. 또한 환자들의 가족 및 접촉자를 검사했을 때 총 3명의

**Table 4.** Characterization of 11 STEC strains isolated from cattle

Strain	Toxin type	RPLA	O-serogroup
B27	<i>stx1</i> & 2	+	O178
B31	<i>stx2</i>	-	O22
B20	<i>stx2</i>	-	O168
B27-1	<i>stx1</i>	+	OUT
B126	<i>stx1</i> & 2	+	O117
B128	<i>stx2</i>	-	OUT
B153	<i>stx2</i>	+	O113
B171	<i>stx2</i>	-	O46
B174	<i>stx2</i>	-	O2
B180	<i>stx2</i>	-	O5
B189	<i>stx2</i>	+	O6



**Figure 3.** Distribution of serotypes for STEC strains (n=33) isolated from diarrheagenic patients.

환자의 접촉자로부터 5건의 STEC를 분리하였지만 이 중 환자 1명의 부모(모)에서는 동일한 혈청형과 독소형을 가진 균이 검출되었으나, 나머지 2명 환자들의 접촉자에서는 다른 혈청형 및 독소형의 STEC가 검출되었다.

### 사육소로부터 시가 독소생성 대장균 분리

2007년 10월부터 12월까지 3개월간 관내에서 사육된 건강한 소의 분변 175건에서 11건 (6.2%)의 시가 독소생성 대장균을 분리하였다.

### 시가 독소생성 대장균의 독소형 및 독소생성능 (RPLA) 실험

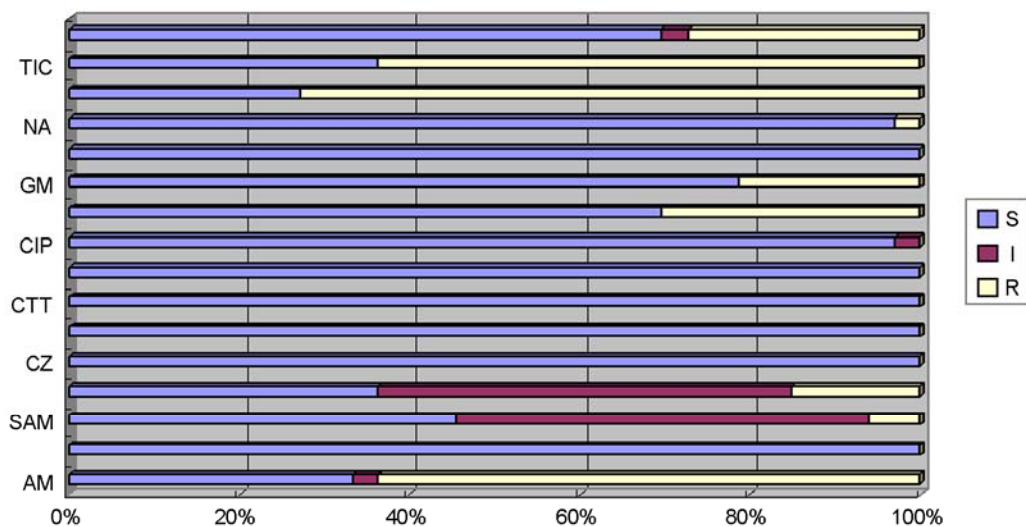
설사환자에서 분리한 33건 중 *stx1*과 *stx2* 유전자를 모두 보유하고 있는 것이 10건 (30.3%), *stx1* 유전자 보유균주가 19건 (57.6%), *stx2* 유전자 보유균주가 4건 (12.1%) 분리되었다 (Fig. 2). 이들 중 *stx1*을 가진 2주와 *stx2*를 가

진 1주에서 독소생성능이 없었으며 30주에서는 모두 독소생성능 양성이었다 (Table 3).

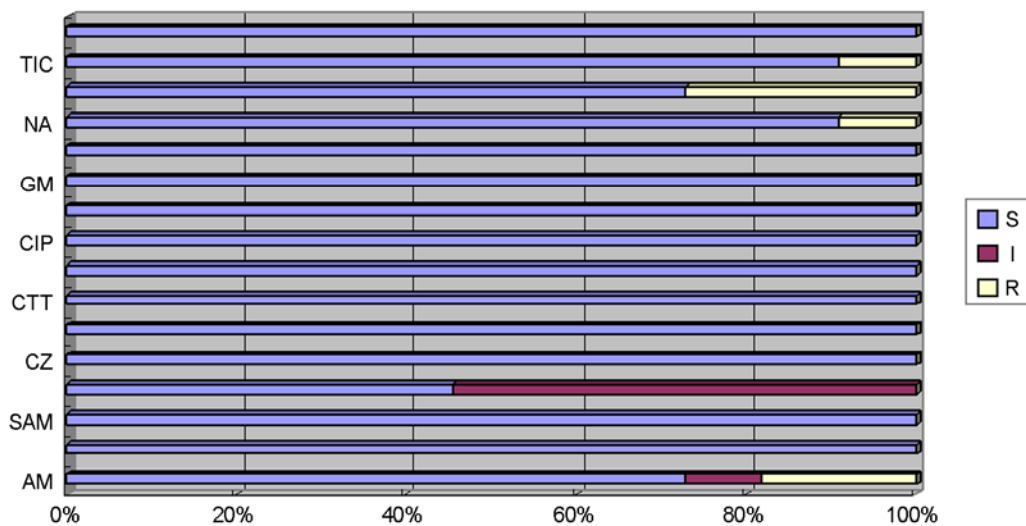
소에서 분리된 11건 중 *stx1*과 *stx2* 유전자를 모두 보유하고 있는 것이 2건 (18.2%), *stx1* 유전자 보유균주가 1건 (9.1%), *stx2* 유전자 보유균주가 8건 (72.7%) 분리되었다. 이들 중 *stx2*을 가진 6주에서는 독소생성능이 없었다 (Table 4).

시가 독소생성 대장균의 sorbitol 분해능 및 혈청형

설사환자에서 분리된 시가 독소생성 대장균의 혈청형은 14가지로, 그 중 O111 7건, O157 6건, O26 5건, O103 3건, O145 2건, O112ac, O117, O120, O127, O128, O166, O168, O55, O84, OUT이 각각 1건씩으로 매우 다양하였다 (Fig. 3).



(A) STEC Isolated from Diarrheagenic Patients (n=33)



(B) STEC Isolated from Bovine (n=11)

**Figure 4.** Antimicrobial susceptibility of STEC isolated from human and cattle (S; sensitive, I; intermediate, R; resistant). AM; ampicillin, AN; amikacin, SAM; ampicillin/sulbactam, CF; cephalothin, CZ; cefazolin, FEP; cefepime, CTT; cefotetan, CTX; cefotaxime, CIP; ciprofloxacin, C; chloramphenicol, GM; gentamycin, IPM; imipenem, NA; nalidixic acid, TE; tetracycline, TIC; ticarcillin, SXT; trimethoprim/sulphamethoxazole.

**Table 5.** Antimicrobial resistance pattern of STEC isolated from diarrheagenic patients

Multiplicity of resistance	Antimicrobial resistance pattern	No. of isolates (%)
0	All susceptible	8 (24.2)
1	CF	1 ( 3.0)
1	TE	1 ( 3.0)
2	C-TE	1 ( 3.0)
3	AM-TE-TIC	11 (33.3)
3	C-TE-SXT	1 ( 3.0)
4	AM-CF-TE-TIC	1 ( 3.0)
5	AM-CF-C-TE-TIC	1 ( 3.0)
5	AM-NA-TE-TIC-SXT	1 ( 3.0)
6	AM-C-GM-TE-TIC-SXT	5 (15.2)
8	AM-SAM-CF-C-GM-TE-TIC-SXT	2 ( 6.1)

AM; ampicillin, AN; amikacin, SAM; ampicillin/sulbactam, CF; cephalothin, CZ; cefazolin, FEP; cefepime, CTT; cefotetan, CTX; cefotaxime, CIP; ciprofloxacin, C; chloramphenicol, GM; gentamycin, IPM; imipenem, NA; nalidixic acid, TE; tetracycline, TIC; ticarcillin, SXT; trimethoprim/sulphamethoxazole.

소에서 분리된 11주 모두 다른 혈청형으로 확인되었으며 확인된 혈청형은 O2, O5, O6, O22, O46, O113, O117, O168, O178, OUT이었다.

분리주에 대한 sorbitol 분해능을 검사한 결과 설사환자에서 분리된 STEC O157 6주는 모두 sorbitol 분해 음성이었고 나머지 38주는 sorbitol 분해 양성으로 확인되었다.

#### 항생제 감수성검사

설사환자에서 분리된 33주 중 76% (25주)는 적어도 하나 이상의 항생제에 내성이었으며, tetracycline (73%), ticarcillin, ampicillin (64%)에 대하여 높은 내성을 나타냈으나 ciprofloxacin과 imipenem 등 7종의 항생제에 대해서 내성을 갖는 균주는 없었다 (Fig. 4).

소에서 분리된 11주 중 45% (5주)에서 적어도 하나 또는 세 개의 항생제에 내성이었으며, 설사환자 분리주와는 다르게 16종의 항생제에 대해 대부분 감수성이었다.

설사환자에서 분리된 균주들은 1제에서 9제까지 내성 패턴을 보였지만 소에서 분리된 균주에서는 4주가 1제에, 1주가 3제에 내성을 나타냈다 (Table 5 & 6).

**Table 6.** Antimicrobial resistance pattern of STEC isolated from cattle

Multiplicity of resistance	Antimicrobial resistance pattern	No. of isolates (%)
0	All susceptible	6 (54.5)
1	AM	1 ( 9.1)
1	TE	3 (27.3)
3	AM-NA-TIC	1 ( 9.1)

AM; ampicillin, AN; amikacin, SAM; ampicillin/sulbactam, CF; cephalothin, CZ; cefazolin, FEP; cefepime, CTT; cefotetan, CTX; cefotaxime, CIP; ciprofloxacin, C; chloramphenicol, GM; gentamycin, IPM; imipenem, NA; nalidixic acid, TE; tetracycline, TIC; ticarcillin, SXT; trimethoprim/sulphamethoxazole.

#### 고 찰

STEC는 소, 양, 돼지 등의 장관에 존재하는데, 정상적인 소의 대변에서 10~20%, 많게는 70%까지 관찰되기 때문에 (29), 도축과정에서 식육이 오염되어 이를 섭취한 경우, 혹은 배설물에 오염된 야채나 물을 섭취한 경우 인체감염을 일으키게 된다. 1996년 일본에서 발생한 집단발병에서는 무순 (raddish sprout) (30)이, 미국이나 유럽지역에서는 상추 (lettuce)가 감염원인 적도 있었다.

이질과 비슷한 수준인 100~200개의 균수로도 전염이 가능하며 사람간의 접촉으로 인한 감염도 쉽게 일어날 수 있다. 잠복기는 3~8일 정도이고, 성인은 1주일 정도, 감염된 소아의 3분의 1정도는 3주까지 균을 배설할 수 있다. 유증상자의 10%까지 HUS나 혈전성혈소판감소성 자반증이 합병될 수 있고, 이들 중 2~7%가 사망할 수 있다 (31).

이러한 STEC가 생성하는 시가독소는 *stx* 유전자를 갖고 있는 용원세균파지 (lysogenic bacteriophage)의 감염에 의해 그 유전자가 전달된다 (32). 특히 Stx2가 Stx1의 독소보다 강하다고 보고되고 있고, 대부분의 사람에서 일으키는 중증 질병의 증상들은 Stx2만을 생성하거나 Stx1과 동시에 생성하는 균주의 감염에 의한 것으로 나타난다 (33).

본 연구에서는 2004년부터 2008년까지 설사환자의 대변 17,148건을 대상으로 STEC 33건 (0.19%)을 분리하였다. 질병관리본부 통계에 따르면 전국 STEC 분리건수가 2004년 38건, 2005년 43건, 2006년 37건, 2007년 41건, 2008년 10월까지 44건으로 16개 시·도 중 광주지역에서

분리된 STEC 분리건수가 매년 5.56~19.5%를 차지하여 분리건수가 매우 높음을 알 수 있었다. 또한 6~8월에 62%의 분리율을 보여 살모넬라 등 다른 장내세균 감염 시기와 비슷한 하절기에 집중 분리되었다. 일반적으로 STEC는 오염된 소고기 및 그 부산물의 섭취에 의한 감염이 대부분인데 광주지역에서는 STEC의 63.6% 정도가 2세 이하의 어린이로부터 분리된 점이 특이하였다. 또한 가족을 포함한 접촉자 검사 결과 3명의 환자 가족 및 접촉자로부터 STEC가 5건 검출되었으며, 이 중 1건에서는 혈청형과 독소형이 동일하였고, 나머지 4주는 환자로부터 분리된 STEC와 혈청형 및 독소형이 모두 서로 달랐다. 이렇듯 산발적인 발생이 대부분이었으며 접촉자 검사만으로 역학적 상관관계를 찾기는 어려웠다.

소의 STEC에 대한 유병율 조사는 주로 농장이나 도축장에서 소의 분변을 대상으로 수행된 연구가 많았으며, 유병율은 0~70%로 나타났다 (34, 35). 또한 육우 분변에서 STEC의 배출율을 조사한 결과 5.8%에서 70%로 매우 다양하였다 (29, 36). 인체감염과의 연관성을 알아보기 위해 2007년 10월부터 12월까지 3개월간 광주지역 한우 및 젓소 사육농장을 방문하여 분변을 채취하여 검사한 결과 175건에서 11건 (6.2%)의 STEC를 분리하였다. 이는 국내 한우 및 젓소에서 조사한 결과에 (36%) (37) 비해 훨씬 낮은 결과였지만, 소의 STEC에 대한 유병율은 검체채취 시기, 방법, 축종별로 매우 다양하게 나타나므로, 유병율이 높다고 반드시 인체감염의 확률이 높을 것이라고 판단하기는 어려웠다. 따라서 이러한 분리주들을 대상으로 혈청형, 독소형 등의 분석을 통해 인체감염과의 상관관계 및 병원성 정도를 파악하는 것이 더 중요하다고 생각된다.

대장균의 분류에는 혈청학적 분류를 포함한 다양한 방법이 있다 (38, 39). 혈청형은 세포벽의 당지질에 의해 결정되는 O (*Ohne*)항원과 편모에 의해 결정되는 H (*Hauch*)항원의 조합에 의해 이루어진다. 현재까지 174개의 O항원과 53개의 H항원이 알려져 있으며, 특정 혈청형들은 숙주 동물의 종과 연관이 깊고 사람과 동물에서 분리된 같은 혈청형의 STEC는 그들의 병원성 인자가 유사하다고 보고되었다 (11).

또한 혈청형 및 임상증상과 관련하여 Karmali 등은 5개의 seropathotype으로 구별하였다 (40). 즉 seropathotype A는 O157:H7과 O157:NM으로 병원성이 가장 높은 혈청형으로 구성되어졌으며 seropathotype B는 O26:H11,

O103:H2, O111:NM, O121:H19 그리고 O145:NM으로 O157 STEC와 병원성은 유사하지만 발생빈도는 더 적다. 그리고 seropathotype C는 산발적인 HUS와 연관이 있으며 집단발병을 일으키지 않은 O91:H21과 O111:H21 등으로 구성되어졌고, seropathotype D는 산발적인 설사의 대부분을 차지하는 O4:H4, O69:H11 등이 여기에 포함되며 마지막으로 seropathotype E는 인체감염을 일으키지 않는 혈청형으로 구성되어져 있다. 현재까지 사람에서 분리된 시가 독소생성 대장균의 혈청형은 나라마다 차이가 있다. STEC 분리빈도는 덴마크는 O157, O103, O146, O26, O117, O145, O128, O111 순으로 (41), 미국은 O157:H7/H-, O26:H11, O121:H19, O103:H2 순이었으며 (42), Brooks 등이 1983년부터 2002년까지 분리된 non-O157 STEC의 혈청형을 조사한 결과 O26, O111, O103, O121, O45, O145순으로 나타났다 (43). 이렇듯 STEC의 혈청형은 유래 숙주 및 임상증상 등 매우 많은 역학적 정보를 제공함으로써 STEC 특징을 분류하고 파악하는데 이용된다.

광주지역 설사환자에서 분리된 시가 독소생성 대장균의 혈청형은 14가지이고 그 분리빈도는 O111, O157, O26, O103, O145 순이었으며 untypeable이 1건으로 주로 seropathotype B에 속하는 혈청형이었다. 소에서 분리된 시가 독소생성 대장균의 혈청형은 O2, O5, O6, O22, O46 등으로 11주 모두 혈청형이 달랐으며, 이는 Karmali 등에 의한 분류에서 seropathotype A와 B에는 속하지 않는 비교적 인체감염에 대한 병원성이 약한 그룹에 속함을 확인하였다 (40). 또한 분리된 O157 6주 중 5주는 Stx 1과 2를, 1주는 Stx2만을 생성하였고 sorbitol 분해능 음성으로 전형적인 O157 STEC를 나타냈으나 실제 설사환자들의 임상증상은 경미한 설사증상만 있었을 뿐 HUS나 혈변은 없었다. 이러한 혈청형은 다양한 항원구조의 차이를 통하여 질병발생에 따른 역학조사에 유용하게 사용되지만 혈청형만으로 설사를 유발시키는 대장균을 동정하고, 병원성을 구분하기는 충분하지가 않았다. 따라서 부착에 관여하는 LEE locus에 있는 병원성 인자인 intimin, Tir, Esp A, B 그리고 D, hemolysin과 같은 인자에 대한 추가적인 검사가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

항생제 감수성시험결과 설사환자 분리주의 70% 정도에서 하나 이상의 약제에 내성을 나타냈으며, 2007년 분리주 중 SXT (trimethoprim/sulphamethoxazole)에 내성을 보인 균주에 대해 integrase PCR을 실시한 결과 integrase type 1으로 확인되었다 (data not shown).



이 연구를 통하여 광주지역에서 분리된 시가 독소생성 대장균의 혈청형 및 독소형은 매우 다양하며, non-O157의 감염도 많은 비중을 차지함을 알 수 있었다. 혈청형과 독소형만을 비교했을 때 소 분리주와의 상관관계도 매우 낮은 것으로 사료된다. 또한 설사환자에서 분리했을 당시 장출혈성대장균환자라고 하여 독소생산능 음성인 환자를 제외하고는 모두 격리조치를 실시하였으나, 가족 내 2차 감염자가 없었다는 것은 병원성과 전염력이 매우 약함을 의미한다. STEC는 단순히 시가독소를 생성하는 대장균을 지칭하는 용어이고, 장출혈성대장균이라 함은 독소를 생산하면서 임상적인 증상까지 동반하여 나타나는 병원성 대장균을 말하고 있다 (33). 결국 추가적인 병원성 인자를 검사를 통하여 병원성 여부를 결정한 후 장출혈성대장균환자에 대한 명확한 기준을 세워야 할 것으로 생각되어진다.

### 참 고 문 헌

- 1) Griffin PM. Epidemiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in humans in the United States In: Kaper, J. B., and O'Brien, A. D. (eds.) *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. ASM Press, Washington D.C., 1998, pp. 15-22.
- 2) Jaeger JL, Acheson DW. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Curr Infect Dis Rep* 2000;2:61-7.
- 3) Wade WG, Thom BT, Evans N. Cytotoxic enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet* 1979;2:1235-6.
- 4) 국립예방위생연구소. 장관출혈성대장균 O157:H7의 집단발생. *병원미생물검출정보* 1996;17:180-90
- 5) Bell C. Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *Int J Food Microbiol* 2002;78:197-216.
- 6) Bettelheim KA, Beutin L. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxigenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VETC/STEC). *J Appl Microbiol* 2003;95: 205-17.
- 7) Konowalchuk J, Speirs JL, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1977;18:775-9.
- 8) Scheutz F, Beutin L, Pierard D, Smith HR. Appendix: Nomenclature of verocytotoxins. In: Duffy G, Garvey P, McDowell D. (eds) *Verocytotoxigenic E. coli*. Food and Nutrition Press, Inc. Connecticut 2001.
- 9) Ziebell KA, Read SC, Johnson RP, Gyles CL. Evaluation of PCR and PCR-RFLP protocols for identifying Shiga toxins. *Res Microbiol* 2002;153:289-300.
- 10) WHO. Zoonotic non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): report of a W.H.O. Scientific Working Group Meeting, Berlin, Germany, 22 to 23 June 1998. World Health Organization, Geneva, Switzerland 1999;p.1-30.
- 11) Bertin Y, Boukhors K, Livrelli V, Martin C. Localization of the insertion site and pathotype determination of the locus of enterocyte effacement of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:61-8.
- 12) Scheutz F, Cheasty T, Woodward D, Smith HR. Designation of O174 and O175 to temporary O groups OX3 and OX7, and six new *E. coli* O groups that include Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC): O176, O177, O178, O179, O180 and O181. *APMIS* 2004;112:569-84.
- 13) Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *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.
- 14) Bertin Y, Boukhors K, Pradel N, Livrelli V, Martin C. Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors. *J Clin Microbiol* 2001;39:3060-5.
- 15) Bürk C, Dietrich R, Acar G, Moravek M, Bu'lte M, Ma'rtlbauer E. Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* ONT:H19 of bovine origin. *J Clin Microbiol* 2003;41:2106-12.
- 16) Johnson WM, Pollard DR, Lior H, Tyler SD, Rozee KR. Differentiation of genes coding for *Escherichia coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTe) by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1990;28:2351-3.
- 17) Pie'rard D, Muyldermans G, Moriau L, Stevens D, Lauwers S. Identification of new verocytotoxin type 2 variant B-subunit genes in human and animal *Escherichia coli* isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36:3317-22.
- 18) Unkmeir A, Schmidt H. Structural analysis of phage-borne *stx* genes and their flanking sequences in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect Immun* 2000;68:4856-64.
- 19) Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H. *Escherichia coli* harboring Shiga

- toxin 2 gene variants: Frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis* 2002;185:74-84.
- 20) Ramachandran V, Hornitzky MA, Bettelheim KA, Walker MJ, Djordjevic SP. The common ovine Shiga toxin 2-containing *Escherichia coli* serotypes and human isolates of the same serotypes possess a Stx2d toxin type. *J Clin Microbiol* 2001; 39:1932-7.
  - 21) Pass MA, Odedra R, Batt RM. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J Clin Microbiol* 2000;38:2001-4.
  - 22) Suzuki M, Kondo F, Ito Y, Matsumoto M, Hata M, Oka H, Takahashi M, Sakae K. Identification of a Shiga-toxin type I variant containing an IS1203-like element, from Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2004;234: 63-7.
  - 23) Pan TM, Chen LM, Su YC. Identification of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR with primer specific to the *hlyA*, *eaeA*, *stx1*, *stx2*, *fliC*, and *rfb* genes. *J Formos Med Assoc* 2002;101:661-4.
  - 24) Deibel C, Kramer S, Chakraborty T, Ebel F. EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. *Mol Microbiol* 1998; 28:463-74.
  - 25) Aranda KR, Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *J Clin Microbiol* 2004;42: 5849-53.
  - 26) Yamamoto T, Echeverria P. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect Immun* 1996;64:1441-5.
  - 27) Wood PK, Morris JG Jr, Small PL, Sethabutr O, Toledo MR, Trabulsi L, Kaper JB. Comparison of DNA probes and the sereny test for identification of invasive *Shigella* and *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 1986;24:498-500.
  - 28) NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 10th ed. 2008;29:M02-A10
  - 29) Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheutz F, Sirot J, Joly B, Forestier C. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J Clin Microbiol* 2000;38:1023-31.
  - 30) Welinder-Olsson C, Stenqvist K, Badenfors M, Branberg A, Floren K, Holm M, Holmberg L, Kjellin E, Marild S, Studahl A, Kaijser B. EHEC outbreak among staff at a children's hospital-use of PCR for verocytotoxin detection and PFGE for epidemiological investigation. *Epidemiol Infect* 2004;132: 43-9.
  - 31) 오명돈, 최강원. 감염질환. 도서출판 한의학, 제1판 2000; p.195-8.
  - 32) Zweifel C, Blanco JE, Blanco M, Balnco J, Stephan R. Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Switzerland. *Int J Food Microbiol* 2004;95:19-27.
  - 33) Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11 :142-201.
  - 34) Wilson JB, McEwen SA, Clarke RC, Leslie KE, Waltner-Toews D, Gyles CL. A case-control study of selected pathogens including verocytotoxigenic *Escherichia coli* in calf diarrhea on an Ontario veal farm. *Can J Vet Res* 1992;56:184-8.
  - 35) Cerqueira AM, Guth BE, Joaquim RM, Andrade JR. High occurrence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. *Vet Microbiol* 1999;70:111-21.
  - 36) Thran BH, Hussein HS, Hall MR, Khaiboullina SF. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef heifers grazing an irrigated pasture. *J Food Prot* 2001;64:1613-6.
  - 37) Lee H-S. Serotype distribution and genetic characteristics of VTEC in Korean animal. 104th ASM general meeting. poster 2004.
  - 38) Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, Gonzalez EA, Bernardez MI, Blanco J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-xi*). *J Clin Microbiol* 2004;42:645-51.
  - 39) Prager R, Annemuller S, Tschape H. Diversity of virulence patterns among shiga toxin-producing *Escherichia coli* from human clinical cases-need for more detailed diagnostics. *Int J Med Microbiol* 2005;295:29-38.
  - 40) Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol* 2003;41:4930-40.
  - 41) Nielsen EM, Scheutz F, Torpdahl M. Continuous surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by

- pulsed-field gel electrophoresis shows that most infections are sporadic. Foodborne Pathog Dis 2006;3:81-7.
- 42) Jelacic JK, Damrow T, Chen GS, Jelacic S, Bielaszewska M, Ciol M, Carvalho HM, Melton-Celsa AR, O'Brien AD, Tarr PI. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. J Infect Dis 2003;188:719-29.
- 43) Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, Strockbine NA. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. J Infect Dis 2005;192:1422-9.
-