

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

Min Ji Kim^{1*}, Sun Hee Kim¹, Tae Sun Kim¹, Hye-young Kee¹, Jin-jong Seo¹, Eun-Sun Kim¹,
Jong-Tae Park¹, Jae Keun Chung¹, Bok Kwon Lee² and Jaeil Lee³

¹Health & Environment Institute of Gwangju, Gwangju, Korea

²Center for Infectious Diseases, National Institute of Health, Seoul, Korea

³Department of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju, Korea

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) can cause a broad spectrum of human illness ranging from symptom-free to hemolytic uremic syndrome (HUS). Associations between known or putative virulence factors of STEC and diseases in human were investigated. PCR analyses showed that 33 (78.6%) isolates carried an *ehxA* enterohemolysin gene and 6 (14.3%) isolates possessed an *saa* autoagglutinating adhesin gene, and 31 (73.8%) isolates carried an *eae* intimin gene (7 isolates with type β , 16 with type γ , and 3 with type ϵ). Twenty-nine (69%) isolates from patients carried *eae*+, *ehxA*+, *saa*- (genotype A) and 68 (86%) isolates from asymptomatic outbreaks and 4 (36%) isolates from bovine possessed *eae*-, *ehxA*+, *saa*+ (genotype C). Neither the bundle-forming pilus gene nor the enteropathogenic *E. coli* adherence factor plasmid was found. In HEp-2 cell adherence assay, isolates carrying *eae* gene exhibited a localized adherence phenotype, the other isolates carrying *saa* showed LC (loose clusters of bacteria) and IS (isolated bacteria). In conclusion, most STEC isolated from cattle feces in Gwangju, Korea showed characteristics different from those isolated from patients. But these results may be useful information for pathogenesis judgement of STEC.

Key Words: Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *saa*, *ehxA*, *eae*, HEp-2 cell adherence assay

서 론

시가 독소생성 대장균 (shiga toxin-producing *E. coli*, STEC)은 무증상에서 수양성설사, 혈성설사, 출혈성장염, 용혈성 요독증후군 (hemolytic uremic syndrome, HUS) 등에 이르기까지 다양한 임상증상을 나타낸다. HUS는 급성 신부전, 혈소판감소증, 미세혈관병성 용혈성빈혈이 특징인 증후군으로써 혈성설사를 시작한 지 1주일 후 특징

적인 증상이 나타나고 소아 급성신부전 등의 원인으로 사망률이 매우 높다. 또한 출혈성장염은 복통과 물설사 후에 하부 위장관 출혈과 유사한 혈변이 발생하는 질환으로 발열이 있지만 혈액내 백혈구수의 증가가 없는 것이 다른 염증성장염과 차이가 있다. 이러한 임상증상은 O157:H7에서 전형적으로 나타나며, non-O157:H7과는 정도의 차이가 있을 뿐이지 임상적으로 특별하게 구별되지는 않는다 (1).

병원성이 높은 STEC 균주는 enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)로 명명되고 있으며 (2), O157 이외에도 여러 가지 혈청형이 알려져 있지만, 시가 독소 유전자를 가진 STEC 균주가 모두 시가 독소를 생산하는 것은 아니기 때문에 독소 생산여부를 반드시 검사해야 한다. 또한 시가 독소를 생산하는 대장균에서도 Stx1만을 생산하는 것과 Stx2만을 생산하는 것 그리고 모두를 동시에 생산하는 것으로 분류하고 있는데, 실제로 어느 시가 독소를

Received: March 25, 2009/ Revised: April 7, 2009

Accepted: April 20, 2009

*Corresponding author: Min Ji Kim. Health & Environment Institute of Gwangju, 898 Hwajung-dong, Seo-gu, Gwangju 502-837, 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.

생산하느냐에 따라서 병원성의 정도에 차이가 있다 (3).

STEC는 시가 독소 외에 장관상피세포의 세포질막에 부착하여 장관의 미세융모를 소멸시키고, actin을 축적시켜 세포골격을 변화시키는 특징적인 장관병변 즉 "attaching and effacing lesion" (A/E lesion) 또한 STEC의 중요한 병소이다 (4). 이와 같은 A/E 병변에 필수적인 *eae* 유전자는 LEE (locus of enterocyte effacement)로 알려져 있는 35.5 kb 크기의 염색체상의 병원성섬 (pathogenicity island, PAI)에 위치하고 있으며, 94~97 kDa 크기의 외막 단백질인 intimin을 지령한다 (5). LEE는 intimin 이외에도 제3형 분비계 (type III secretion system, TTSS)와 그것에 의해 분비되는 Tir (translocated intimin receptor), Esp (EPEC-secreted protein) 등 병원성에 관련된 여러 종류의 단백질을 지령하고 있다. Intimin을 가진 STEC와 임상증상과의 연관관계는 이미 밝혀졌지만, 이것이 반드시 필수적인 병원성 인자는 아니다. Adhesin과 pili와 같은 부착인자들이 *eae* 음성인 균주에서도 확인되었고 (6, 7), 이들 균주와 특정 혈청형을 가진 STEC가 혈변 및 HUS와 관계가 있다고 보고되었다 (8). 하지만 이러한 intimin이 결여된 STEC들의 병원성 기작에 대한 연구는 아직 미비하다.

이 외에도 enterohemolysin 유전자인 *ehxA*, catalase peroxidase *katP*, 제2형 분비계와 관련있는 *etp* 유전자 그리고 secreted serine protease (EspP) 등이 EHEC의 병원성과 연관이 있다고 보고되었다 (9~12).

STEC는 미국, 영국, 캐나다 뿐 만 아니라 일본, 인도, 중국 등 아시아 지역에서도 보고되고 있지만, 일본 이외의 아시아 지역에서 분리된 균주들에 대한 특성은 잘 밝혀져 있지 않으며 (13). 이들에 대한 연구가 대부분 HUS와 같은 심각한 임상증상이 나타난 환자에서 분리된 균주를 대상으로 한 결과로, 실제 무증상이나 경미한 설사만을 일으키는 균주를 대상으로 한 병원성 기작에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 또한 국내에서 소 분리주 STEC 특성에 대한 연구도 전무한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 설사환자 분리주와 무증상 집단 감염주, 소 분변으로부터 분리된 STEC를 대상으로 병원성 유전자의 특징을 비교 검토하였다. 그리고 지역 내 유행하는 시가 독소생성 대장균의 유행과역 및 병인기작을 밝혀 이를 바탕으로 장출혈성대장균 감염증 제어를 위한 대책을 수립하는데 기초 자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

시가 독소생성 대장균 병원성관련 유전자 검출

설사환자 분리주와 무증상 집단감염 분리주 및 소 분변 유래 분리주간의 상관관계를 살펴보기 위해 PCR을 이용하여 병원성 유전자를 검출하였다.

saa, *ehxA*, *eae* 유전자 multiplex PCR

실험균주

설사환자 및 접촉자 그리고 식중독으로 의뢰된 검체에서 분리된 STEC 42주와 2004년 J 초등학교 무증상 집단감염으로부터 분리된 STEC 79주 및 소 분변 유래 STEC 11주를 실험에 사용하였다. 양성 대조균주로는 ATCC 43895 (EDL 933)를 사용하였다.

STEC 분리주는 TSA (Tryptic soy agar, Oxoid, Hampshire, UK)에 계대 배양한 다음, 미량의 균체를 멸균증류수 500 µl에 현탁시켜 10분간 끓는 물에서 중탕하고 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 DNA template로 이용하였다.

Premix 제조 및 PCR 조건

saa, *ehxA*, *eae* 유전자 검출에 사용된 primer는 Paton (14) 등에 의한 것으로 Table 1과 같다. PCR 반응액 조성은 200 mM dNTP, 각각의 primer 250 nM, 5 mM MgCl₂가 포함된 10 × buffer, 1 U의 Taq DNA polymerase (Bioneer, Daejeon, Korea) 그리고 멸균증류수로 50 µl의 반응 혼합액을 제조하였다.

PCR 조건은 1차 반응에서 95°C/5분간 denaturation 후, 95°C/1분, 65°C/2분, 72°C/1분 30초의 cycle을 10회 실시하였고, 2차 반응에서 95°C/1분, 60°C/2분, 72°C/1분 30초의 cycle을 15회 실시한 후, 95°C/1분, 60°C/2분, 72°C/2분 30초의 cycle을 10회로 3차 반응을 실시하였다. 마지막으로 72°C에서 2분 30초간 반응시켰다. PCR을 수행한 후 5 µl의 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 UV하에서 확인하였다.

LEE 관련 유전자 검출

실험균주

설사환자 및 접촉자 그리고 식중독으로 의뢰된 검체에서 분리된 STEC 42주와 2004년 J 초등학교 무증상 집단 발병으로부터 분리된 STEC 중 위의 *saa*, *ehxA*, *eae* 유형별로 분리한 14주 (식품 유래 분리주 2주 포함) 및 소 분변 유래 STEC 11주를 대상으로 PCR을 실시하였고 양성

대조군으로 ATCC 43895 (EDL 933)를 사용하였다.

STEC 분리주 각각을 TSA에 계대 배양한 다음, 미량의 균체를 멸균증류수 500 µl에 현탁시켜 10분간 끓는

물에서 중탕하고 14,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후

상층액을 DNA template로 이용하였다. 각각의 유형분석에 사용된 primer에 대한 목록은 Table 1과 같다.

Table 1. PCR primers to amplify specific fragments from the various pathogenic genes in STEC

PCR primer	Target gene (s)	Sequence (5'-3')	Size of product (bp)	Reference
SAADF	<i>saa</i>	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	14
SAADR		ATGGACATGCCTGTGGCAAC		
eaeAF	<i>eae</i>	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384	19
eaeAR		CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
hlyAF	<i>ehxA</i>	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	19
hlyAR		AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		
B73	<i>eae α</i>	TACTGAGATTAAGGCTGATAA	452	16
B138		GACCAGAAGAAGATCCA		
B73	<i>eae β</i>	TACTGAGATTAAGGCTGATAA	520	16
B137		TGTATGTCGCACTCTGATT		
B73	<i>eae γ</i>	TACTGAGATTAAGGCTGATAA	778	16
B74		AGGAAGAGGGTTTTGTGTT		
Intδ	<i>eae δ</i>	TACGGATTTTGGGGCAT	125	9
Int-Ru		TTTATTTGCAGCCCCCAT		
SK1	<i>eae ε</i>	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	2,069	9
LP5		AGCTCACTCGTAGATGACGGCAAGCG		
Tir-F	<i>tir</i>	CATTACCTTCACAAACCGAC	1,550	20
Tir-R		CCCCGTTAATCCTCCCAT		
ESPAa	<i>espA</i>	CACGTCTTGAGGAAGTTTGG	229	17
ESPAb		CCGTTGTTAATGTGAGTGCG		
ESPB-F	<i>espB</i>	GCCGTTTTTGAGAGCCAGAAT	633	20
ESPB-R		ATCATCCTGCGCTCTGCGAAC		
ESPD-F	<i>espD</i>	CGCTGGATTTACAACCTGGTTA	939	20
ESPD-R		CCAGCTCAACCTTCGCACTCT		
ESPPa	<i>espP</i>	AAACAGCAGGCACTTGAACG	301	17
ESPPb		AGACAGTTCCAGCGACAACC		
K260	Disrupted <i>selC</i>	GAGCGAATATTCCGATATACTGGTT	418	18
K255		GGTTGAGTCGATTGATCTCTGG		
K260	Intact <i>selC</i>	GAGCGAATATTCCGATATACTGGTT	527	18
K261		CCTGCAAATAAACACGGCGCAT		
BFP1	<i>bfp</i>	GATTGAATCTGCAATGGTGC	597	21
BFP2		GGATTACTGTCCTCACATAT		
EAF1	EAF plasmid	CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA	399	22
EAF25		TATGGGGACCATGTATTATCA		

eae 유전자의 유형분석을 위한 multiplex PCR

eae 유전자에 대하여 α , γ 그리고 β 유형 결정을 위한 multiplex PCR을 실시하였다 (15, 16).

PCR 반응액 조성은 template DNA 5 μ l, 2.5 mM dNTP 5 μ l, 5 mM MgCl₂가 포함된 10 \times buffer 5 μ l와 각각의 primer 0.5 μ l씩, 1 U의 Taq DNA polymerase와 멸균된 증류수로 최종 50 μ l로 맞추었다. α , γ 그리고 β 유형을 결정하기 위한 primer는 B73을 forward primer로, 각각의 유형에 따라 B138, B74 그리고 B137을 reverse primer로 사용하였다 (Table 1).

PCR 조건은 94°C에서 5분간의 cycle을 1회, 94°C/30초, 50°C/30초, 72°C/30초의 cycle을 30회 실시하고 72°C/5분간 반응시켰다.

δ 와 ϵ 유형을 결정하기 위한 PCR 방법은 Pradel 등 (9)에 의한 방법으로 δ 의 PCR 조건은 94°C/2분간의 cycle을 1회, 94°C/1분, 45°C/1분, 72°C/1분의 cycle을 30회 실시하고 72°C/5분간 반응시켰다. ϵ 는 94°C/2분간의 cycle을 1회, 94°C/1분, 55°C/1분, 72°C/2분의 cycle을 30회 실시하고 72°C에서 5분간 반응시켰다. PCR을 수행한 후 5 μ l의 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 UV하에서 확인하였다.

tir, *espA*, *espB*, *espD* 유전자 분석을 위한 PCR

PCR 반응액 조성은 template DNA 5 μ l, 2.5 mM dNTP 5 μ l, 5 mM MgCl₂가 포함된 10 \times buffer 5 μ l와 각각의 primer 0.5 μ l씩, 1 U의 Taq DNA polymerase와 멸균된 증류수로 최종 용량을 50 μ l로 맞추었다. 각각의 유전자 증폭을 위한 Primer는 Table 1과 같다.

tir 유전자 증폭을 위한 PCR 조건은 94°C/5분간의 cycle을 1회, 94°C/40초, 57°C/60초, 72°C/75초의 cycle을 30회 실시하고 마지막 cycle 후 72°C에서 5분간 반응시켰다. *espA* 유전자 증폭을 위한 PCR 조건은 94°C/5분간의 cycle을 1회, 94°C/45초, 57°C/45초, 72°C/90초의 cycle을 30회 실시하고 마지막 cycle 후 72°C/5분간 반응시켰다.

*espB*와 *espD* 유전자의 PCR 조건은 annealing 온도가 각각 63°C/45초, 60°C/45초이며 나머지 조건은 *espA* 유전자 PCR 조건과 동일하다. PCR을 수행한 후 5 μ l의 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 UV하에서 확인하였다.

espP 유전자 검출을 위한 PCR

PCR 반응액 조성은 template DNA 5 μ l, 2.5 mM dNTP 5 μ l, 5 mM MgCl₂가 포함된 10 \times buffer 5 μ l와 각각의

primer 1 μ l씩, 1 U의 Taq DNA polymerase와 멸균된 증류수로 최종 50 μ l를 맞추었다.

PCR 조건은 94°C/5분간의 cycle을 1회, 94°C/45초, 59°C/45초, 72°C/90초의 cycle을 30회 실시하고 마지막 cycle 후 72°C/10분간 반응시켰다 (17). PCR을 수행한 후 5 μ l의 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 UV하에서 확인하였다.

LEE 삽입여부 확인 PCR

STEC의 *selC* 유전자상에 LEE 삽입여부를 확인하기 위하여 McDaniel 등 (18)의 방법에 따라 multiplex PCR을 실시하였다.

PCR 반응액 조성은 template DNA 5 μ l, 2.5 mM dNTP 5 μ l, 5 mM MgCl₂가 포함된 10 \times buffer 5 μ l와 각각의 primer 0.5 μ l, 1 U의 Taq DNA polymerase와 멸균된 증류수로 최종 50 μ l 맞추었다. Primer는 K260을 forward로 그리고, 각각의 유형에 따라 K255과 K261을 reverse primer로 사용하였다 (Table 1).

PCR 조건은 94°C/5분간의 cycle을 1회, 92°C/2분, 50°C/2분, 72°C/3분의 cycle을 30회 실시하고 마지막 cycle 후 72°C/5분간 반응시켰다. PCR을 수행한 후 5 μ l PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 UV하에서 확인하였다. 이 때 LEE 말단에 위치한 K255와 *selC*의 downstream primer인 K260을 사용하여 418 bp에서 증폭되는 경우는 LEE가 *selC*의 ORF 394 region에 삽입된 것을 나타내며, *E. coli* K-12의 *selC* 부위의 upstream과 downstream primer인 K261과 K260 primer에 의하여 529 bp에서 증폭되는 경우는 LEE가 삽입되지 않은 온전한 *selC* 유전자를 가지는 것으로 분석하였다.

HEp-2 세포 부착능 시험

Cravioto 등 (23)의 방법에 따라, STEC 분리주에 대한 HEp-2 (Human epithelioma type 2 cell-line) 세포 부착형태를 조사하였다 (Fig. 1).

HEp-2 세포의 배양 및 처리

HEp-2 세포는 penicillin과 streptomycin, 그리고 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco, Gaithersburg, MD, USA)으로 37°C 5% CO₂ 배양기 (Forma, Marietta, OH, USA)에서 배양하였다. 24 well tissue culture plate (Nalge Nunc, Rochester, NY, USA)에 직경 13 mm Thermanox™ Coverslip (Nalge Nunc)을 깔고, HEp-2 세포를 2×10^6 cell/ml이 되도록 희

HEp-2 cell seeding on 24 well plate	
DMEM with penicillin/Streptomycin and 10% FBS	
	37°C, 5% CO ₂ / 24 hr
Media change with DMEM	
DMEM without penicillin/streptomycin and FBS	
Inoculation of bacteria suspension	
	37°C, 5% CO ₂ / 1.5 hr
Washing with PBS, 5 times	
	37°C, 5% CO ₂ / 2.5 hr
Washing with PBS, 3 times	
Fixing with 100% cold methanol, 6 min	
Staining with 10% Giemsa, 10 min	
Light microscopy (1,000X)	

Figure 1. The procedure of HEp-2 cell adherence assay.

석하여 1 ml 접종하였다. 접종된 plate는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하여 단층을 형성하도록 하였다. 70% 정도의 단층이 이루어지면, FBS가 첨가되지 않은 DMEM으로 배지를 교환하였다.

HEp-2 세포 부착능 시험

분리 동정된 STEC는 1% D-mannose가 포함된 Luria broth (Difco, Detroit, MI, USA) 5 ml 접종하여 37°C, 16시간 동안 배양한 후, 각각의 배양액 150 µl FBS가 첨가되지 않은 DMEM 3 ml 넣은 후 37°C, 2시간 동안 배양하였다. 배양액 각각의 균액 100 µl HEp-2 세포 단층이 형성된 plate의 2~3개 well씩 접종하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 30분 배양한 다음, PBS로 5회 세척한 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 2시간 30분 동안 배양하였다. 그 후 PBS로 3회 세척하고 100% cold methanol을 각 well에 1 ml 넣고 6분간 고정한 후, 10% Giemsa 염색액으로 20분간 염색을 시행하였다. 멸균증류수로 한번 세척하여 건조시킨 후, coverslip을 well로부터 분리하여 slide glass 위에 고정시키고 광학현미경 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

Table 2. Distribution of the virulence factor-encoding genes according to symptoms of the STEC isolates^a

Gene ^b	No. (%) of isolates		P value ^c
	Asymptomatic	Diarrhea patients	
<i>saa</i>	70 (88.6)	6 (14.3)	<0.0001
<i>eae</i>	4 (5.1)	31 (73.8)	<0.0001
<i>ehxA</i>	74 (93.7)	33 (78.6)	NS (0.7803)
<i>espP</i>	6 (50)	26 (62)	NS (0.5173)

^aThe *bfp* gene and EAF plasmid were absent from all strains tested.

^bThe presence of the genes was determined by PCR.

^cA *p* value of <0.05 was considered statistically significant. *p* values for the genes were determined by the Fisher exact test. NS, not significant.

bfpA 및 EAF 유전자에 대한 PCR 시험

bfpA 및 EAF 유전자 검출에 사용된 primer는 각각 Wieler 등 (21)과 Franke 등 (22)에 의한 것으로 Table 1과 같다.

PCR 반응 조성은 template DNA 5 µl, 2.5 mM dNTP 5 µl 5 mM MgCl₂가 포함된 10 X buffer 5 µl 각각의 primer 0.5 µl씩, 1 U의 Taq DNA polymerase와 멸균된 증류수로 최종 용량을 50 µl로 맞추었다.

bfpA 유전자 확인을 위한 PCR 조건은 94°C/5분간의 cycle을 1회, 94°C/1분, 57°C/45초, 72°C/1분의 cycle을 30회 실시하고 마지막 cycle 후 72°C/5분간 반응시켰다. EAF 유전자 검출을 위한 조건은 annealing 단계에서 60°C/2분이며 나머지는 *bfpA* 유전자 증폭조건과 같았다. PCR을 수행한 후 5 µl의 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 UV하에서 확인하였다.

통계분석

PCR 결과에 따라 GraphPad InStatversion 3.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 이용하여 Fisher exact test로 유전자 보유여부에 따른 통계학적 유의성을 검정하였으며 *p* 값이 0.05 미만인 경우 통계적 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

saa, *ehxA*, *eae* 유전자 multiplex PCR 결과

설사환자 분리주와 무증상 집단감염 분리주 및 소 분

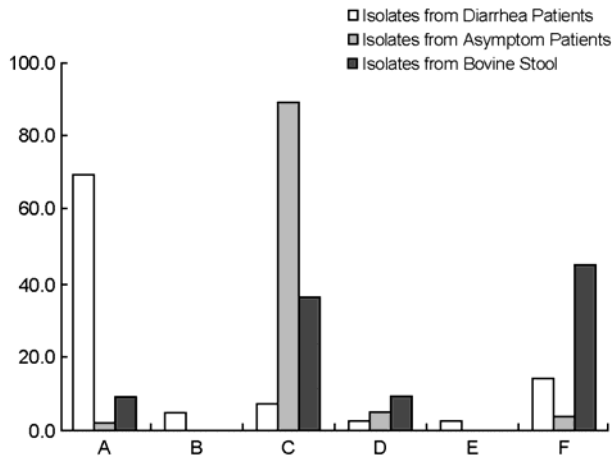


Figure 2. Distribution of the STEC genotype by multiplex PCR. A: *eaeA*+, *ehxA*+, *saa*-, B: *eaeA*+, *ehxA*-, *saa*-, C: *eaeA*-, *ehxA*+, *saa*+, D: *eaeA*-, *ehxA*+, *saa*-, E: *eaeA*-, *ehxA*-, *saa*+, F: *eaeA*-, *ehxA*-, *saa*- (+: gene present; -: gene absent).

변 유래 분리주간의 상관관계를 살펴보기 위해 PCR을 실시한 결과, *eae* 유전자는 설사 및 식중독환자 유래 STEC에서 31주 (73.8%), 무증상 집단감염 STEC에서 4주 (5.1%) ($p < 0.0001$), 소 분변 유래 STEC에서 1주 (9.1%) 가 확인되었고, *saa* 유전자는 설사 및 식중독환자 유래 STEC에서 6주 (14.3%), 무증상 집단감염 STEC에서 70주 (88.6%) ($p < 0.0001$), 소 분변 유래 STEC에서 4주 (36.4%) 가 확인되었다. *ehxA* 유전자는 설사 및 식중독환자 유래 STEC에서 33주 (78.6%), 무증상 집단감염 STEC에서 74주 (93.7%) ($p = \text{NS}$), 소 분변 유래 STEC에서 6주 (54.5%) 에서 관찰되었다 (Table 2).

이들 세 유전자의 조합으로 살펴보면 설사환자 분리주에서는 *eae*+, *ehxA*+, *saa*- (genotype A)인 group이 29명 (69%), 무증상 집단발병 분리주에서는 *eae*-, *ehxA*+, *saa*+ (genotype C)인 group이 68명 (86%)으로 가장 많은 비중을 차지하였다. 또한 소 분변 유래 분리주에서도 *eae*-, *ehxA*+, *saa*+ (genotype C)인 group이 4주 (36%)로 가장 우세하였다 (Fig. 2, 3).

STEC 분리주의 "attaching and effacing" 병변에 관여하는 유전자의 특성

eae 유전자의 유형을 결정하기 위하여 *eae* 유전자를 가진 소 분변 유래 STEC 분리주 1주, 설사 및 식중독환자 유래 STEC 분리주 31주, 무증상 집단감염 STEC 분리주 1주 및 양성대조군으로 ATCC 43895 (ELD 933)을 사용하였다.

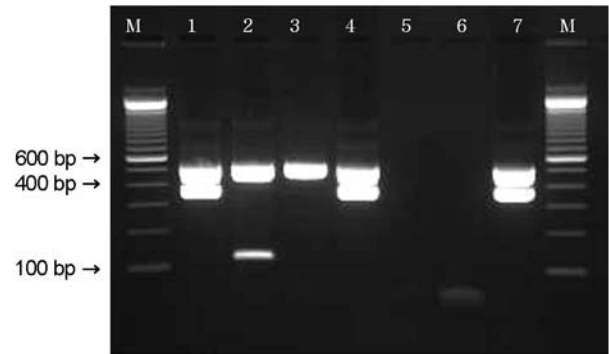


Figure 3. Multiplex PCR analysis of the *saa* (119 bp), *eae* (384 bp), the *ehxA* (534 bp) genes. M: 100 bp ladder, lane 1: genotype A (isolate GJ-04-08-23), lane 2: genotype C (isolate Jinwol-SBM), lane 3: genotype D (isolate bovine 20), lane 4: genotype A (isolate GJ-08-07-200), lane 5: genotype F (isolate bovine 31), lane 6: negative control, lane 7: positive control (EDL 933).

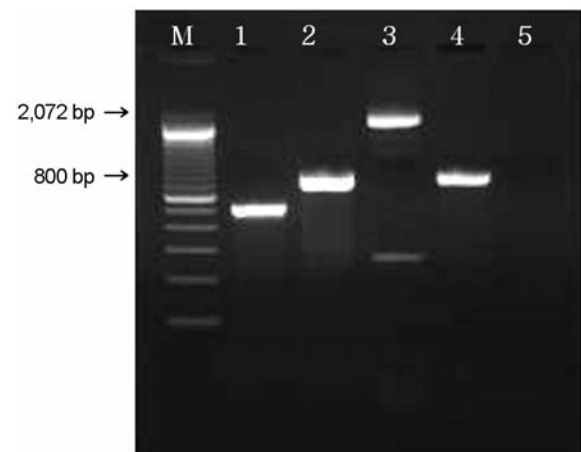


Figure 4. PCR result for the detection of *eae*_β (520 bp), *eae*_γ (778 bp) and *eae*_ε (2,069 bp) genes. M: 100 bp ladder, lane 1: *eae*_β + (isolate GJ-04-07-84), lane 2: *eae*_γ + (isolate GJ-05-06-290), lane 3: *eae*_ε + (isolate GJ-05-09-32), lane 4: positive control (EDL 933), lane 5: negative control.

eae 유전자의 α, β, γ, δ 그리고 ε 유형에 대한 PCR 결과, 설사 및 식중독환자 유래 STEC 에서 7주 (22.6%)는 *eae*_β 유전자형, 16주 (51.6%)는 *eae*_γ 유전자형, 그리고 3주 (9.7%)는 *eae*_ε 유전자형으로 나타났다. 그러나 설사 및 식중독환자 유래 STEC 5주, 소 분변 유래 STEC 1주, 그리고 무증상 집단감염 STEC 1주에서는 밴드를 확인할 수 없었다 (Fig. 4).

혈청형별로 살펴보면 *eae*_β 유전자형은 O26 4주, O157, O168, NT (non-typeable)가 각각 1주씩 확인되었고, *eae*_γ 유전자형은 O157과 O111이 각각 7주, O145, O166이 1주, *eae*_ε 유전자형은 O103이 2주, O145가 1주 확인되었다.

Table 3. Virulence factors of the 67 STEC strains tested

Strain	Origin	Age	Sex	Disease Association ^a	Sero Group ^b	Sorbitol	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	RPLA	<i>saa</i>	<i>ehxA</i>	<i>Eae</i> ^c	<i>tir</i>	<i>espA</i>	<i>espB</i>	<i>espD</i>	<i>espP</i>	<i>bfpA</i>	EAF	<i>SetC</i> ^d	Adherence pattern
27-1	Bovine	–	–	–	NT	–	+	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	I	AA
128	Bovine	–	–	–	NT	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	ND	IS
153	Bovine	–	–	–	O113	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	I	LC
126	Bovine	–	–	–	O117	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	ND	IS
20	Bovine	–	–	–	O168	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	I	NA
27	Bovine	–	–	–	O178	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	D	DA
174	Bovine	–	–	–	O2	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	D	IS
31	Bovine	–	–	–	O22	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	D	NA
171	Bovine	–	–	–	O46	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	I	IS
180	Bovine	–	–	–	O5	–	–	+	–	–	+	+(UT)	–	–	–	–	–	–	–	D	IS
189	Bovine	–	–	–	O6	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	–	D	NA
GJ-06-07-117	Human	1	M	D	NT	–	+	–	+	–	+	+(β)	–	–	+	+	+	–	–	ND	LA
GJ-05-06-150	Human	7	M	D	O103	–	+	–	+	–	+	+(UT)	–	–	–	–	–	–	–	D	LA
GJ-05-08-057	Human	2	M	D	O103	–	+	–	+	–	+	+(UT)	–	–	–	–	–	–	–	ND	LA
GJ-06-07-222	Human	2	F	D	O103	–	+	–	+	–	+	+(UT)	+	–	+	+	–	–	–	I	LA
GJ-05-06-290	Human	9	F	D	O111	–	+	+	+	–	–	+(γ)	+	–	+	+	+	–	–	I	LC
GJ-05-11-087	Human	1	M	D	O111	–	+	–	+	–	+	+(γ)	–	–	+	+	+	–	–	I	LA
GJ-07-07-066	Human	0	M	D	O111	–	+	+	+	–	+	+(γ)	–	–	–	–	+	–	–	I	LA
GJ-07-08-056	Human	1	M	D	O111	–	+	–	+	–	+	+(γ)	–	–	+	–	+	–	–	I	NA
GJ-08-07-200	Human	5	M	D	O111	–	+	+	+	–	+	+(γ)	–	–	+	+	+	–	–	I	IS
GJ-08-07-422	Human	1	M	D	O111	–	+	–	+	–	+	+(γ)	–	–	–	–	+	–	–	I	LA
GJ-08-08-147	Human	1	M	D	O111	–	+	–	+	–	+	+(γ)	–	–	–	–	+	–	–	I	LC
GJ-07-08-040	Human	0	F	D	O112ac	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	ND	IS

Table 3. Continued

Strain	Origin	Age	Sex	Disease Association ^a	Sero Group ^b	Sorbitol	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	RPLA	<i>saa</i>	<i>ehxA</i>	<i>Eae</i> ^c	<i>tir</i>	<i>espA</i>	<i>espB</i>	<i>espD</i>	<i>espP</i>	<i>bfpA</i>	EAF	<i>SelC</i> ^d	Adherence pattern
GJ-08-10-091	Human	1	F	D	O117	-	+	-	+	-	+	+(UT)	+	-	+	+	-	-	-	I	LA
GJ-08-07-100	Human	8	M	D	O120	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	IS
GJ-05-07-165	Human	2	M	D	O127	-	+	-	+	-	+	+(β)	+	-	+	+	-	-	-	ND	AA
GJ-08-07-205	Human	5	M	D	O128	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	NA
GJ-04-08-23	Human	2	F	D	O145	-	+	-	+	-	+	+(γ)	+	+	+	+	+	-	-	I	LA
GJ-05-09-032	Human	1	F	D	O145	-	+	-	+	-	+	+(ε)	+	+	+	+	+	-	-	I	IS
GJ-05-11-177	Human	1	F	D	O157	+	-	+	+	-	+	+(γ)	-	+	+	+	+	-	-	ND	IS
GJ-07-06-324	Human	1	M	D	O157	+	+	+	+	-	+	+(γ)	-	+	+	+	+	-	-	D	IS
GJ-07-07-088	Human	2	M	D	O157	+	+	+	+	-	+	+(γ)	-	+	+	+	+	-	-	ND	IS
GJ-07-07-216	Human	1	F	D	O157	+	+	+	+	-	+	+(γ)	+	+	+	+	+	-	-	I	LA
GJ-07-08-210	Human	1	F	D	O157	+	+	+	+	-	+	+(γ)	+	+	+	+	+	-	-	ND	NA
GJ-08-05-148	Human	67	M	D	O157	+	+	+	+	-	+	+(γ)	+	+	+	+	+	-	-	D	IS
GJ-05-09-110	Human	2	M	D	O166	-	+	-	+	-	+	+(γ)	+	-	+	+	-	-	-	ND	IS
GJ-05-07-078	Human	8	M	D	O168	-	-	+	-	-	+	+(β)	-	-	-	-	-	-	-	D	IS
GJ-04-07-84	Human	1	F	D	O26	-	+	+	+	-	+	+(β)	+	-	+	+	+	-	-	I	LA
GJ-05-07-037	Human	2	M	D	O26	-	+	+	+	-	-	+(β)	+	-	+	+	+	-	-	ND	LC
GJ-05-07-164	Human	4	F	D	O26	-	+	-	+	-	+	+(UT)	-	-	-	-	+	-	-	I	LA
GJ-05-10-167	Human	3	F	D	O26	-	+	-	+	-	+	+(β)	+	-	+	+	+	-	-	ND	LA
GJ-07-05-219	Human	44	F	D	O26	-	+	-	+	-	+	+(β)	+	-	+	+	+	-	-	ND	LA
GJ-08-07-438	Human	6	M	D	O55	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	I	IS
GJ-07-09-032	Human	11	M	D	O84	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	LC
Gwangsan 3	Human	-	F	SF	NT	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	ND	LC
Jinwol 1071	Human	-	-	SF	NT	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	IS

Table 3. Continued

Strain	Origin	Age	Sex	Disease Association ^a	Sero Group ^b	Sorbitol	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	RPLA	<i>saa</i>	<i>ehxA</i>	<i>Eae</i> ^c	<i>tir</i>	<i>espA</i>	<i>espB</i>	<i>espD</i>	<i>espP</i>	<i>bfpA</i>	EAF	<i>SetC</i> ^d	Adherence pattern
Yongdoo 29	Human	–	–	SF	O103	–	+	–	+	–	+	+(ε)	+	–	+	+	–	–	–	I	LA
KBM	Human	–	M	SF	O103	–	+	–	+	–	+	+(ε)	+	–	+	+	–	–	–	I	LC
Jinwol 1682	Human	–	–	SF	O115	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	I	LC
Yongdoo 26	Human	–	–	SF	O141	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	ND	NA
Jinwol 457	Human	–	–	SF	O146	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	–	I	IS
Jinwol 1692	Human	–	–	SF	O146	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	D	NA
KIW	Human	–	F	SF	O157	+	+	+	+	–	+	+(γ)	+	+	+	+	+	–	–	D	IS
Jinwol 242	Human	–	–	SF	O163	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	ND	NA
DG3	Human	–	F	SF	O168	–	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	I	NA
Gwangsan5	Human	–	F	SF	O174	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	–	I	IS
Jinwol 41	Human	–	–	SF	O26	–	+	–	+	–	+	+(UT)	+	–	+	+	+	–	–	ND	LA
Yongdoo 30	Human	–	–	SF	O84	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	ND	NA
Gwangsan3-2	Human	–	F	SF	O91	–	+	–	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	–	D	LC
Jinwol-SBM	Human	–	F	SF	O91	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	–	D	IS
Jinwol 9	Human	–	–	SF	O91	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	–	D	IS
Jinwol 13	Human	–	–	SF	O91	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	–	D	LC
Jinwol 1222	Human	–	–	SF	O91	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	D	IS
Jinwol 1269	Human	–	–	SF	O91	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	D	IS
Jinwol 1672	Human	–	–	SF	O91	–	+	–	+	–	+	–	–	–	–	–	+	–	–	ND	AA
pork	food	–	–	–	NT	–	–	+	–	–	+	–	–	–	–	–	+	–	–	I	IS
beef	food	–	–	–	O116	–	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–	+	–	–	ND	IS

^aD; Diarrhea, SF; symptom free, ^bNT; nontypeable, ^cUT; untypeable, ^dND; not detected

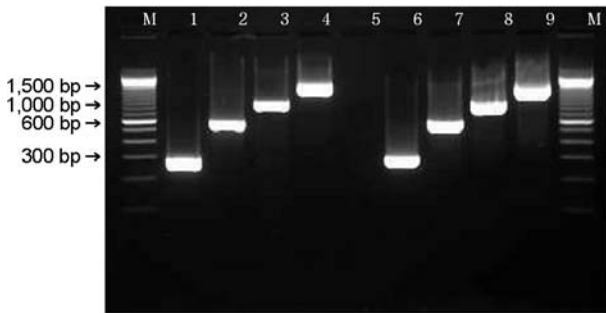


Figure 5. PCR result for the detection of *espA* (299 bp), *espB* (633 bp), *espD* (939 bp) and *tir* (1,550 bp) genes. M: 100 bp ladder, lane 1~4: *espA* +, *espB* +, *espD* +, *tir* + (isolate GJ-05-09-032), lane 5: negative control, lane 6~9: positive control (EDL 933).

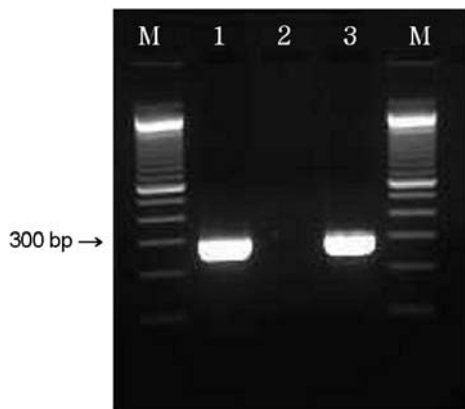


Figure 6. PCR analysis of the *espP* (301 bp) genes. M: 100 bp ladder, lane 1: *espP* + (isolate GJ-07-06-324), lane 2: negative control, lane 3: positive control (EDL 933).

tir 유전자는 소 분변 유래 STEC에서는 확인되지 않았으나, 설사 및 식중독환자 유래 STEC 분리주에서는 17주 (54.8%), 무증상 집단감염 STEC 분리주 1주 (100%)에서 확인되었다. *tir* 유전자를 가진 분리주는 모두 *eae* 유전자를 보유하고 있었으며 유형별로는 *eae*_β가 5주 (27.8%), *eae*_γ가 7주 (38.9%), *eae*_ε 3주 (16.7%), UT (untypeable)이 3주 (16.7%)였다.

espA, *espB*, *espD* 유전자를 모두 가지고 있는 균주는 9주 (29%)로 모두 설사 및 식중독환자 유래 분리주였다. *espB* 유전자는 설사 및 식중독환자 유래 STEC 24주 (77.4%)와 무증상 집단감염 STEC 1주 (100%)에서 확인되었고, *espD*는 *espB* 유전자를 가진 설사 및 식중독환자 유래 STEC 1주를 제외하고 동일하게 관찰되었다 (Fig. 5와 Table 3).

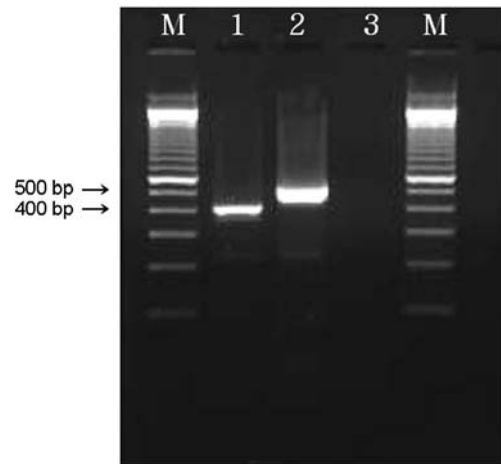


Figure 7. Multiplex PCR to distinguish an intact *selC* locus from one disrupted by LEE. M: 100 bp ladder, lane 1: disrupted *selC* (418 bp, isolate GJ-05-06-150), lane 2: Intact *selC* (527 bp, isolate GJ-05-06-290), lane 3: ND (not detected).

espP 유전자 PCR 결과

설사 및 식중독환자 유래 STEC에서 26주 (62%), 무증상 집단감염 STEC에서 6주 (50.1%) ($p = 0.339$), 소 분변 유래 STEC에서 3주 (18%)가 확인되었고, 식품 분리주 중 1건 (50%)에서 확인되었다 (Fig. 6).

LEE의 염색체상의 삽입여부 PCR 결과

Chromosome 내의 LEE 삽입위치를 결정하기 위해 PCR을 실시한 결과 설사 및 식중독환자 유래 STEC 31주 중 5주 (16%)만이 *selC* 염색체에 삽입되어 있었고, 16주 (52%)는 *selC* 이외의 염색체에 삽입되어 있었으며, 10주 (32%)는 밴드를 확인할 수 없었다. 또한 *selC*에 삽입되어 있는 STEC 중 O111이 7주로 가장 많이 차지하고 있었다 (Fig. 7).

HEp-2 세포 부착능 시험결과

각 분리주들의 부착에 관련된 유전자와 조직세포에서의 실제 부착유형과의 상관관계를 살펴보기 위하여 HEp-2 세포에 대한 부착능 시험을 실시하였다.

표기 방법은 세포에 세균이 매우 밀집되어 부착되어 있는 형태를 LA (localized adherence)로 표기하였고, LA에서 보여지는 밀집된 형태와는 달리 보다 느슨하게 형성된 군집과 산발적으로 흩어져 부착된 형태를 LC (loose clusters of bacteria)로 표기하였다. 또한 세균끼리의 군집을 형성하지 않고 독립적으로 세포에 부착하는 양상을

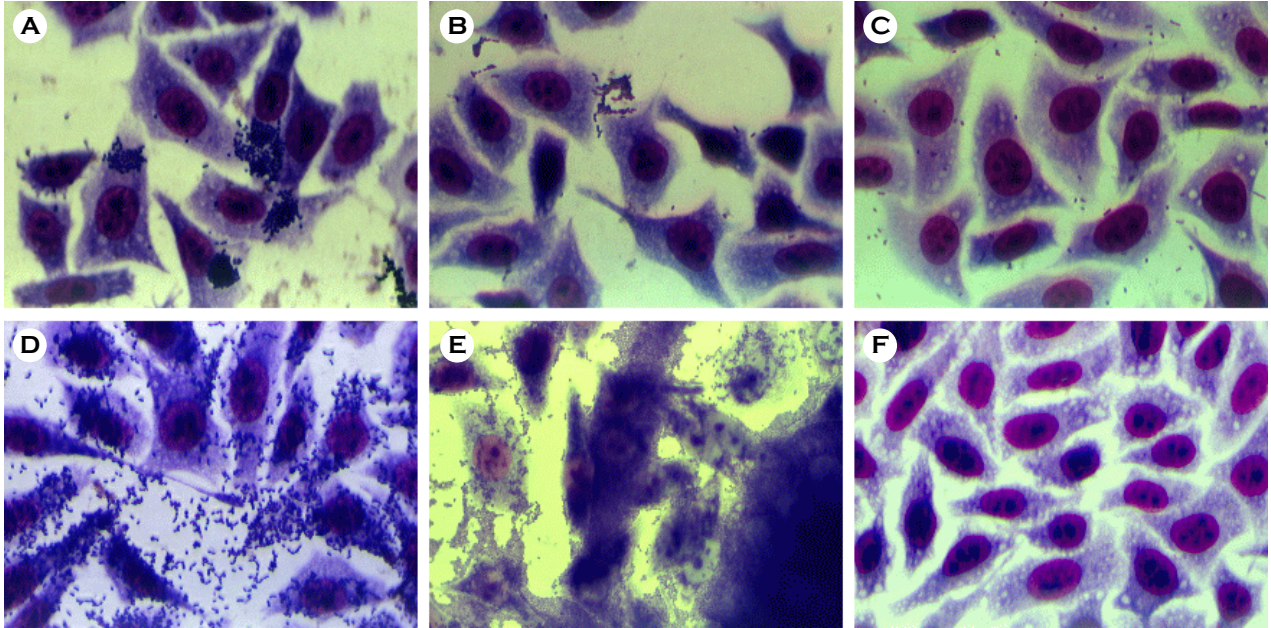


Figure 8. Adherence patterns of STEC in HEp-2 cell culture. **A:** LA pattern, isolate GJ-04-07-84, **B:** LC pattern, isolate Jinwol 9, **C:** IS pattern: isolate Jinwol SBM, **D:** DA pattern, isolate bovine 27, **E:** AA pattern, isolate GJ-08-07-54, **F:** Negative control.

IS (isolated bacteria), LA처럼 세포 한쪽에 밀집된 형태로 부착되는 것이 아니고 세포표면 전체에 부착되어 있는 모양을 DA (diffuse adherence), 세포가 아닌 곳에서도 세균끼리 뭉쳐서 막대모양을 형성하고 세포표면에도 동일한 모양을 형성하는 것을 AA (aggregative adherence)로 표현하였다. 마지막으로 세균의 부착이 관찰되지 않은 것을 NA (not adherent)로 표기하였다 (Fig. 8).

소 분변 유래 STEC 분리주 중 4주 (36.4%)에서 IS (isolated bacteria), AA, DA, LC가 각각 1주씩 관찰되었다. 설사 및 식중독환자 유래 STEC에서는 16주 (38.1%)에서 LA 표현형을, 13주 (31%)에서 IS 표현형, 7주 (16.7%)에서 LC 표현형 그리고 1주 (2.4%)에서는 AA 표현형을 확인하였다. 무증상 집단감염 STEC에서는 6주 (50%)에서 IS 표현형을, 2주 (16.7%)에서 LC 표현형, 각각 1주 (8.3%)에서 LA와 AA 표현형을 확인하였다.

고 찰

본 연구에서는 STEC의 병원성 및 임상증상과 관련된 병원성 인자를 밝히고자 광주지역에서 분리된 설사 환자, 무증상감염 그리고 소 분변으로부터 분리된 STEC를 대상으로 병원성과 관련된 유전자 발현의 차이를 관찰하였다.

eae, *ehxA*, *saa* 유전자에 대한 multiplex PCR을 실시한 결과, 설사환자 및 식중독환자 유래 STEC 40주 중에서 31주 (73.8%)가 *eae* 유전자를, 6주 (14.3%)가 *saa* 유전자를 보유하고 있으며, 무증상 집단감염 STEC는 *saa* 유전자를 4주 (5.1%)가 *eae* 유전자를, 70주 (88.6%)가 *saa* 유전자를 보유하고 있었다. 소 분변 유래 분리주에서도 *eae*는 1주 (9.1%)에서만 확인되었으며, *saa*는 4주 (36.4%)에서 확인되어 무증상 집단감염 분리주와 비슷한 유전자 패턴을 나타내었다. 따라서 STEC의 임상증상과 *eae* 유전자 및 *saa* 유전자 ($p < 0.0001$)의 통계학적 유의성을 확인할 수 있었다. 또한 *eae* 유전자를 가진 균주는 모두 *saa* 유전자를 보유하고 있지 않아 Paton 등 (14)의 결과와 일치함을 알 수 있었다. Schmidt 등 (11)이 *ehxA* 유전자가 STEC의 병원성 인자로서의 중요성을 언급하였지만, 그 이후 스위스 (8)와 프랑스 (9)의 연구결과에서는 병원성 균주와의 연관관계를 찾을 수 없었다. 본 연구에서도 hemolysin 유전자인 *ehxA*는 증상유무나 집단간에 유전자 보유여부가 통계적으로 유의성이 없었으며, *saa*나 *eae* 유전자 보유유무와 상관없이 50% 이상의 STEC에서 확인되었다.

또한 genotype A (*eaeA*⁺, *ehxA*⁺, *saa*⁻), genotype B (*eaeA*⁺, *ehxA*⁻, *saa*⁻), genotype C (*eaeA*⁻, *ehxA*⁺, *saa*⁺), genotype D (*eaeA*⁻, *ehxA*⁺, *saa*⁻), genotype E (*eaeA*⁻, *ehxA*⁻, *saa*⁺),

genotype F (*eaeA*-, *ehxA*-, *saa*-)로 유전형을 구분하였을 때, 설사 및 식중독환자 유래 STEC는 genotype A group이 29명 (69%), 무증상 집단발병 분리주에서는 genotype C인 group이 68명 (86%), 소 분변 유래 분리주에서도 genotype C인 group이 4주 (36%)로 가장 우세하였다. 또한 주요 혈청형인 O157 (7주), O26 (6주), O111 (7주)이 모두 genotype A에 포함되어 있었다. 이로써 환자 분리주와 무증상 집단감염 분리주와의 유전형의 차이를 확인하였고, 무증상 집단 감염주와 소 분리주와의 유전자형 분포는 비슷함을 알 수 있었다. *eae* 유전자와 *saa* 유전자 모두 병원성 STEC에서 서로 다른 기원으로 부착에 관여하는 중요한 유전인자로 알려져 있지만 (8), 본 연구에서는 *saa* 유전자와 병원성과의 상관관계는 규명하기 어려웠다.

LEE가 결여된 STEC의 plasmid에 존재하는 *saa* 유전자는 (24) 세포의 외막에 위치한 자가응집 부착 단백질이다. *E. coli* K-12에 *saa* 유전자를 형질변환한 결과 한국 소적 부착형태를 보였으며, 1998년 남호주 아델레이드 지역의 HUS 집단발병환자로부터 분리된 O113:H21 STEC (98NK2) 균주에서 최초로 분리되었다 (25). 그리고 최근 ToxB, Sfp (sorbitol fermentating enterohemorrhagic *E. coli* fimbriae) 및 Iha (adherence-conferring protein similar to *Vibrio cholerae* IrgA) 등과 같은 STEC 부착인자와 함께 중요성이 부각되고 있다 (26). 그러나 각 나라나 지역에 따라 분리주들 간의 유전자 보유여부가 상이하므로, 이러한 병원성 유전자에 의한 단백질 발현유무나 발현 정도의 차이를 통해, 실제 세포수준에서의 상호작용에 대한 추가연구가 필요할 것으로 생각된다.

STEC는 *eae* 유전자에 의해 장점막에 특징적인 A/E lesion을 형성하는데 이는 숙주세포의 미세융모 제거와 세균과 상피세포막 사이의 긴밀한 부착으로 특징지어지며, 부착된 세균의 바로 밑에는 세포 내 골격의 현저한 변화를 보이고 때때로 pedestal-like 구조를 형성한다. 이러한 조직병리학적부위를 "attaching and effacing" (A/E) lesion이라 명명하였다 (27). 최초로 EPEC의 감염에서 관찰되어졌으며 EHEC와 일부 *Hafnia alvei*에 대해 실시된 동물 및 배양세포에서도 이 모양이 관찰되어졌다. 그 이후 Adu-Bobie 등 (28)에 의해 분류된 intimin α , β , γ , δ 중 intimin δ 가 intimin β 의 아형임이 밝혀졌다 (29). Intimin의 N 말단 부위는 잘 보존된 반면, Tir과 결합하는 C 말단 부위는 매우 다양하며 숙주 조직세포의 친화성과 연관이 깊다 (30). 주요 유전자형은 α , β , ϵ , γ 이며 (29), Intimin α

는 EPEC에서 주로 확인되는 반면, γ , ϵ 은 EHEC, intimin β 는 EPEC와 EHEC 모두에서 관찰된다 (31). 따라서 STEC 병원성 인자에 대한 규명을 할 때 intimin 존재여부나 그들의 유전자형에 대한 분석은 이루어지고 있지만, STEC가 HUS나 HC와 같은 임상증상을 일으키는데 있어서 intimin의 역할에 대한 의견은 매우 다양하다 (31).

본 연구에서는 China 등 (15)과 Pradel 등 (9)의 방법에 따라, 광주지역 설사환자에서 분리된 STEC에서 *eae* 유전자형을 분석한 결과, *eae_γ*형이 16주 (51.6%)로 가장 우세하였으며, O157, O111, O26 혈청형이 모두 이 유전자형에 속하였다. 또한 3주에서 *eae_ε*형이 확인이 되었으며, 혈청형은 O103 2주, O145 1주였다. 이와 같은 결과는 프랑스에서 HUS 환자로부터 분리된 STEC의 *eae* 유전자형이 *eae_γ*, *eae_β*, *eae_ε* 순으로 검출되었으며 (29), 설사환자에서 분리된 STEC 균주에 대해 DNA hybridization과 PCR 방법을 이용하여 intimin 유전자의 유형을 분류한 결과에서는 *eae_{β1}*, *eae_ε*, *eae_γ* 순으로 검출됨이 보고되어 나라마다 차이가 있음을 확인하였다 (32).

숙주 및 특정 혈청형과 intimin type의 연관성에 대하여, intimin α 는 classical serotypes (O55:H6, O125:H6, O127:H6 그리고 O142:H34)에 속하는 STEC 균주에서 특이적으로 발현되는 반면에, intimin ϵ 는 사람에게서 드물게 분리되는 STEC O103과 O121 혈청형에서만 확인되었다. Intimin γ 역시 O157, O111, O145, O157:H40 그리고 I128:H8과 같은 nonclassical EPEC serotype과 연관이 있고 intimin β 는 가장 흔한 유형으로서, 사람뿐만 아니라 가축과 야생동물 등에서 분리된 EPEC와 EHEC 모두에서 확인된다 (29). 본 연구결과에서도 γ 형에 O157, O111, O26, ϵ 형에 O103, O145가 확인되어 intimin의 유형에 따라 혈청형과의 상관관계가 매우 높음을 알 수 있었지만, 소 분변 분리주에서는 intimin 유형이 결정되지 않아 분리 숙주에 따른 차이점은 확인할 수 없었다.

또한 A/E 병변의 기둥다리구조 (pedestal like structure) 형성을 유도하여 세포막 actin 구조의 붕괴를 일으키는데, 이때 Tir, EspB 그리고 EspD는 TTSS와 EspA에 의해 구조적 변형을 일으켜 숙주세포 안으로 이동한다. 숙주세포 안으로 이동한 EspB와 EspD 단백질은 숙주세포의 세포질막 안으로 삽입되어 세균과 숙주세포간에 통로를 형성한 후 다른 분자들을 숙주세포 내로 분비하여 숙주세포 손상을 유도하여 설사를 유발한다 (33). 이러한 단백질을 암호화 하고 있는 *tir*, *espA*, *espB*, *espD* 유전자 보유

여부를 검토한 결과, intimin과 결합하는 receptor를 지령하는 *tir* 유전자를 보유하고 있는 17주 모두 *eae*, *espB*, *espD* 유전자를 가지고 있었으며 *espA* 유전자를 보유하고 있는 9주에서는 모두 *espB*와 *espD*도 확인되었다. 이는 *espA*, *espB*, *espD*는 같은 promoter로부터 번역되는데 기인된 결과이다 (17). 하지만 *espA*가 존재하지 않고 *espB*, *espD*만을 가지고 있거나, 이러한 TTSS 단백질을 암호화하고 있는 유전자 없이 *eae*만 가지고 있는, 즉 LEE profile이 온전하지 않은 균주들도 확인할 수 있었다. 이는 스페인에서 사람과 동물로부터 분리된 STEC와 EPEC 균주를 가지고 microarray를 이용하여 *eae*, *tir*, *espA*, *espB*, *espD* 유전자의 유형을 분석한 결과와 유사하였고 (33), Yuste 등 (34)이 설사 또는 건강한 소, 양, 염소로부터 분리한 12개의 STEC에서 PCR을 통해 *eae*, *tir*, *espA*, *espB*, *espD* 유전자를 분석한 결과에서도 LEE profile이 온전하지 않은 균주들이 확인되어 본 연구와 일치함을 알 수 있었다. 또한 intimin, Tir, EspA, EspB, EspD 등의 단백질의 상호작용으로 A/E lesion을 형성하므로 하나 또는 두 개 이상의 단백질의 결여는 숙주세포에 불완전하게 부착하거나 A/E lesion이 형성되지 않아서, 이들 유전자를 모두 가진 균주보다는 병원성이 약할 것으로 추측된다.

다른 Esp 단백질 (EspA, EspB, EspD)과는 다르게 secreted serine protease인 EspP는 plasmid 유래이다. Schmidt 등 (35)은 *in vitro*에서 EspP가 human coagulation factor V를 파괴시키며, 실제 EHEC에 감염된 6명의 아이들 중 5명의 혈청에서 이 단백질이 분리하였다. 또한 Pradel 등 (9)이 프랑스 HUS 환자로부터 분리한 STEC에서는 Esp, KatP (catalase-peroxidase), intimin이 STEC 임상증상과 매우 관계가 깊음을 보고하였다. 하지만 sorbitol 분해능이 있는 O157 분리주에서는 *espP* 유전자가 결여되었다는 연구결과도 있다 (36). 이처럼 지역 분리주에 따라 이들이 병원성 인자로서의 역할은 아직 규명되지 않았다. 본 연구에서도 설사 및 식중독환자 유래 STEC 26주 (62%)와 무증상 집단감염 STEC 6주 (50.1%) ($p = 0.339$)에서 *espP* 유전자가 확인되었으나 임상증상의 차이에 따른 통계학적 유의성은 없었다.

STEC 균주간의 상관관계에 접근하기 위한 분자적 실험 중의 하나가 LEE 삽입 부위에 대한 결정이다. tRNA 유전자 부위의 많은 변형 때문에 이러한 유전자의 삽입 부위가 균주간의 유전자 전달 및 동일계통임을 확인하는데 사용되어진다. 하지만 PCR 방법은 분리균주간의 클

론성 상관관계에 대한 정보를 제공하지만 LEE가 삽입되어진 locus를 규명하는 데는 ribotyping과 같은 추가적인 방법이 필요하다 (9). Ribotyping도 다양한 혈청형사이에서 그들의 유전학적 거리를 측정하기는 유용하지만 동일 혈청형에서는 규명하기 어렵다. 하지만 plasmid profile 분석법은 같은 혈청형에 속해있는 STEC 분리주들의 분자역학적 상관관계를 확인하는데 사용되는 방법이다 (37). 본 실험에서도 LEE 삽입 부위에 대한 PCR 결과 그들의 계통학적 상관관계나 유전자 전달에 대한 정보를 파악하기는 어려웠다. 따라서 그것에 대한 정확한 정보를 알기 위해서는 PFGE (pulsed field gel electrophoresis)나 phage typing이 수행되어야 할 것이다.

설사를 일으키는 병원성 대장균의 진단에 있어서 가장 유용한 표현형적 진단 방법은 HEp-2 세포 부착능 시험이다. HEp-2 세포에 대한 부착은 주로 3가지의 형태, 즉 국소적 부착 (LA, localized adherence), 집합적 부착 (AA, aggregative adherence) 그리고 확산적 부착 (DA, diffuse adherence)으로 나뉜다. 그러나 Vieira 등 (38)은 부착형태를 보다 세분화하여, 세포의 표면에 다양한 크기로 느슨하게 뭉쳐서 세균덩어리와 개개의 세균이 산재된 부착형태가 함께 존재할 경우를 LC (loose clusters of bacteria)라 표기하고, 보다 느슨하게 뭉쳐진 것과 아주 밀집되어 뭉쳐진 채로 부착된 세균덩어리가 공존할 경우를 LCC (loose and compact bacterial clusters), 그리고 세균이 뭉쳐있지 않고 개별적으로 부착된 세포에 존재할 경우, 이를 IS (isolated bacteria)라고 명명하였다. 이러한 표기법은 단지 연구된 균주들의 부착형태의 차이를 나타내기 위한 목적으로, 세분화한 것으로 각각의 실험자마다 다를 수 있으며, 설사 등의 임상증상과 직접적인 상관관계는 없다.

EPEC에 있어서 HEp-2 세포에 대한 LA 표현형의 형성과 *bfpA* 유전자 및 EAF plasmid (EPEC adherence factor plasmid) 사이에는 높은 일치성을 갖는 것이 일반적인 경향이었으나, EAF plasmid가 없으면서 LA를 형성하는 EPEC 균주의 존재도 보고되었다 (39, 40). 이러한 균주들에 BFP (bundle forming pili)와 유사한 다른 부착소가 존재하는지는 알려진 바 없으나, EAF plasmid가 결여된 균주들에서 염색체상의 intimin을 암호화하는 *eae* 유전자의 증가된 발현이 HEp-2 세포상에서 LA를 유도할 수 있는 것으로 보여진다 (41). 이렇듯 EPEC의 부착유형이나 인자에 대한 연구는 그들 자체가 병원성을 나타낸다는 많은 보고가 있지만, STEC는 아직도 이들에 대한 논란이

많아 부착형태에 대한 연구가 미비하다. 또한 EPEC나 STEC 둘 다 LEE locus에 의해 A/E lesion을 형성하지만 조절기전이나 분비되는 단백질이 많이 다르다 (42). 즉 장 점막에 이들이 부착되어진 후 EPEC는 BFP나 flagella에 의해 집합을 형성하여 다른 세균들을 부착하게 하여 미세균락을 형성하지만 (43, 44), STEC 또한 BFP나 EPEC의 다른 부착인자들과 기능적으로 유사한 구조를 가진 단백질들의 존재로 장점막에 균락을 형성한다 (42). 본 연구에서 증상과 무증상 환자에서 분리된 STEC 균주간의 *eae*와 *saa* 유전자 발현의 차이가 뚜렷하여, *saa* 유전자를 가진 무증상 STEC 분리주의 세포 부착능이 미비하거나 없을 것이라는 가정 하에 실험을 실시하였지만, *eae* 유전자를 가진 STEC 대부분이 LA 형태를 보였으며 *saa* 유전자를 가진 STEC는 LC나 IS 형태가 확인되어 부착형태에 따른 차이만 관찰할 수 있었다. 따라서 *eae*나 *saa* 두 가지 유전자만으로 부착형태와 연관짓기는 어려우며 EPEC의 부착형태에 LEE locus에 위치한 유전자 이외에 BFP나 flagella가 작용하는 것처럼 ToxB, Sfp, Iha, Efa1 (EHEC factor for adherence) LPF (long polar fimbriae)와 같은 STEC와 관련있는 부착인자들에 대한 연구가 종합적으로 이루어져야 할 것이라고 판단된다 (45~50).

본 연구에서는 광주지역 설사환자 분리주와 무증상 감염주를 대상으로 시가 독소 이외에 병원성과 관련 있는 LEE 유전자, 용혈소 등의 병원성 인자 보유 및 변이체에 대한 유전학적 특징 (병원형)을 비교 검토하여 시가 독소 생성 대장균의 병원기작을 밝혀 이를 바탕으로 장출혈성 대장균 감염증 제어를 위한 대책을 수립하는데 기초 자료를 마련하고자 하였다. 그 결과 설사환자 분리주에서는 *eae* 유전자가, 무증상 집단 감염주에서는 *saa* 유전자가 우세한 것으로 확인되어, LEE가 결여된 STEC에서 *saa*가 용혈성 요독증후군과 같은 심각한 임상증상을 일으킨다는 연구결과 (6)와는 상이하였지만, 분리원에 따른 분리주의 유전자 보유여부에 차이가 있으므로 향후 STEC의 병원성 여부를 판단할 때 참고 자료로 유용할 것으로 생각된다. 또한 *eae* 유전자형을 관찰한 결과 *eae_γ*형이 가장 많았으나, *eae_β*형과 *eae_ε*형 및 유전자 유형이 결정되지 않은 균주들도 상당부분 있어서 이들 균주들간의 유전적 다양성이 높은 것으로 사료되어지며 ζ , η , θ , ι 와 같은 새로운 *eae* 유전자형 (51)에 대한 추가 검사도 요구되어진다. 더해서 병원성과 비병원균주를 비교함으로써 시가 독소 이외에 다른 핵심 병원성 인자의 확인을 시도하였으

나, 이는 지역이나 나라별 분리주들 간의 병원성 인자들에 대한 통계학적 유의수준 정도가 매우 다양하게 나타나 명확한 결론을 내리기는 어려웠다. STEC 인체감염의 가장 중요한 감염원인 소 분리주와의 비교연구에서도 혈청형, 독소형, 유전자형이 사람 분리주와는 많은 차이가 있었다. 따라서 소에서 분리된 STEC가 모두 사람에서 병원성을 나타내는 것이 아니며, 비록 병원성이 약하거나 없더라도 균주들 간의 유동성 DNA 전달을 통해 후천적으로 병원성을 획득할 가능성이 우려되므로 소 이외의 가축 등에서 STEC의 감염실태에 대한 연구와 지속적인 감시체계가 필요할 것으로 생각된다.

Acknowledgements

The authors give their best thanks to the staffs of the hospitals in Gwangju city for their kind contribution and help.

참 고 문 헌

- 1) Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*. and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991;13:60-98.
- 2) Levine MM, Xu JG, Kaper JB, Lior H, Prado V, Tall B, Nataro J, Karch H, Wachsmuth K. A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis* 1987;156:175-82.
- 3) Gyles CL. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can J Microbiol* 1992;38:734-46.
- 4) Finlay BB, Rosenshine I, Donnenberg MS, Kaper JB. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to Hela cells. *Infect Immun* 1992;60:2541-3.
- 5) Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:7839-43.
- 6) Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* 2001; 69:6999-7009.

- 7) Srimanote P, Paton AW, Paton JC. Characterization of a novel type IV pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* 2002; 70:3094-100.
- 8) Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* 1999;37:497-503.
- 9) Pradel N, Bertin Y, Martin C, Livrelli V. Molecular analysis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome patients and dairy samples in France. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:2118-28.
- 10) Brunder W, Schmidt H, Karch H. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 1996; 142: 3305-15.
- 11) Schmidt H, Henkel B, Karch H. A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. *FEMS Microbiol Lett* 1997;148: 265-72.
- 12) Brunder W, Schmidt H, Karch H. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* 1997; 24:767-78.
- 13) Kim Y-B. Studies on virulence factors and application of arbitrarily-primed polymerase chain reaction analysis to epidemiological of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol Virol* 2001;31:123-31.
- 14) Paton AW, Paton JC. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*. *J Clin Microbiol* 2002;40:271-4
- 15) China B, Goffaux F, Prison V, Mainil J. Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 1999;178:177-82.
- 16) Goffaux F, China B, Janssen L, Mainil J. Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. *Res Microbiol* 2001;151: 865-71.
- 17) McNally A, Roe AJ, Sompson S, Thomson-Carter FM, Hoey DE, Currie C, Chakraborty T, Smith DG, Gally DL. Differences in levels of secreted locus of enterocyte effacement proteins between human disease-associated and bovine *Escherichia coli* O157. *Infect Immun* 2001;69:5107-14.
- 18) McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:1664-8.
- 19) Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohaemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol* 1998;36:598-602.
- 20) Kobayashi H, Shimada J, Nakazawa M, Morozumi T, Pohjanvirta T, Pelkonen S, Yamamoto K. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:484 -9.
- 21) Wieler LH, Vieler E, Erpenstein C, Schlapp T, Steinruck H, Bauerfeind R, Byomi A, Baljer G. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from bovines: association of adhesion with carriage of *eae* and other genes. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2980-4.
- 22) Franke J, Franke S, Schmidt H, Schwarzkopf A, Wieler LH, Baljer G, Beutin L, Karch H. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J Clin Microbiol* 1994;32:2460 -3.
- 23) Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 1979;3:95-9.
- 24) Paton AW, Srimanote P, Woodrow MC, Paton JC. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* 2001;69:6999-7009.
- 25) Paton AW, Woodrow MC, Doyle RM, Lanser JA, Paton JC. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113:H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3357-61.
- 26) Toma C, Martinez Espinosa E, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, Iyoda S, Iwanaga M, Rivas M. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2004;42:4937-46.

- 27) Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* 1983;41:1340-51.
- 28) Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G, Knutton S, Dougan G. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol* 1998;36:662-8.
- 29) Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marche's O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* 2000;68:64-71.
- 30) Frankel G, Candy DC, Fabiani E, Adu-Bobie J, Gil S, Novakova M, Phillips AD, Dougan G. Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1995;63:4323-8.
- 31) Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci* 2007;85(13 Suppl.):E45-62.
- 32) 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.
- 33) Garrido P, Blanco M, Moreno-Paz M, Briones C, Dahbi G, Balnco J, Balnco J, Parro V. STEC-EPEC oligonucleotide microarray: A new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clin Chem* 2006;52:192-201.
- 34) Yuste M, Orden JA, De La Fuente R, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Cid D, Martinez-Pulgarin S, Dominguez-Bernal G. Polymerase chain reaction typing of genes of the locus of enterocyte effacement of ruminant attaching and effacing *Escehrichia coli*. *Can J Vet Res* 2008;72:444-8.
- 35) Schmidt H, Zhang WL, Hemmrich U, Jelacic S, Brunder W, Tarr PI, Dobrindt U, Hacker J, Karch H. Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2001;69:6863-73.
- 36) Karch H, Bielaszewska M. Sorbitol-fermenting shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis. *J Clin Microbiol* 2001;39:2043-9.
- 37) Pradel N, Boukhors K, Bertin Y, Forestier C, Martin C, Livrelli V. Heterogeneity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic-uremic syndrome patients, cattle, and food samples in central France. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:2460-8.
- 38) Vieira MA, Andrade JR, Trabulsi LR, Rosa AC, Dias AM, Rames SR, Frankel G, Gomes TA. Phenotypic and genotypic characteristics of *Escherichia coli* strains of non-enteropathogenic *E. coli* (EPEC) serogroups that carry EAE and lack the EPEC adherence factor and Shiga toxin DNA probe sequence. *J Infect Dis* 2001;183:762-72.
- 39) Bokete TN, Whittam TS, Wilson RA, Clausen CR, O'Callahan CM, Moseley SL, Fritsche TR, Tarr PI. Genetic and phenotypic analysis of *Escherichia coli* with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children. *J Infect Dis* 1997;175:1382-9.
- 40) Scotland SM, Smith HR, Rowe B. *Escherichia coli* O128 strains from infants with diarrhea commonly show localized adhesion and positivity in the fluorescent-actin staining test but do not hybridize with an enteropathogenic *E. coli* adherence factor probe. *Infect Immun* 1991;59:1569-71.
- 41) Gordillo ME, Reeve GR, Pappas J, Mathewson JJ, DuPunt HL, Murray BE. Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. *J Clin Microbiol* 1992;30:889-93.
- 42) Roe AJ, Hoey DE, Gally DL. Regulation, secretion and activity of type III-secreted proteins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157. *Biochem Soc Trans* 2003;31:98-103.
- 43) Tobe T, Sasakawa C. Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence and in microcolony development. *Cell Microbiol* 2001;3:579-85.
- 44) Knutton S, Shaw RK, Anantha RP, Donnenberg MS, Zorgani AA. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol Microbiol* 1999;33:499-509.
- 45) Tatsuno I, Horie M, Abe H, Miki T, Makino K, Shinagawa H, Taguchi H, Kamiya S, Hayashi T, Sasakawa C. toxB gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* 2001;69:6660-9.
- 46) Brunder W, Khan AS, Hacker J, Karch H. Novel type of

- fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H(-). *Infect Immun* 2001;69:4447-57.
- 47) Tarr PI, Bilge SS, Vary JC Jr, Jelacic S, Habeeb RL, Ward TR, Baylor MR, Besser TE. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* 2000;68:1400-7.
- 48) Nicholls L, Grant TH, Robins-Browne RM. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* 2000;35:275-88.
- 49) Dougherty S, Sloan J, Bennett-Wood V, Robertson M, Robins-Browne RM, Hartland EL. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2002;70:6761-9.
- 50) Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, Avelino-Flores F, Kaper JB. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 2002;70:5416-27.
- 51) Zhang WL, Kohler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, Caprioli A, Suerbaum S, Schmidt H. Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol* 2002;40:4486-92.
-