

광주지역에서 분리된 장병원성대장균의 표현형 및 유전자형 특성에 관한 연구

광주광역시보건환경연구원¹, 전라남도보건환경연구원²,
전남대학교의과대학 미생물학교실³, 전남대학교자연과학대학⁴

김선희^{1*} · 송현제² · 정재근¹ · 하동룡¹ · 류필열³ · 이종빈⁴

Genotypic and Phenotypic Characterization of Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Diarrheal Patients in Gwangju

Sun-Hee Kim^{1*}, Hyeon-Je Song², Jae-keun Chung¹, Dong-Rong Ha¹, Phil-Youl Ryu³ and Jong-Bin Lee⁴

¹Gwangju Institute of Health and Environment, Gwangju, 502-837, Korea,

²Jeollanam-do Institute of Health and Environment, Gwangju, 502-810, Korea,

³Department of Microbiology, Chonnam National University Medical school, Gwangju, 501-757, Korea,

⁴Department of Biological Science, Chonnam National University, Gwangju, 500-757, Korea

Received : August 21, 2006

Accepted : September 19, 2006

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) have been implicated in human diarrhea in several countries. Central to EPEC-mediated disease is its ability to cause intestinal lesions, known as attaching and effacing (A/E) lesion. We investigated 92 EPEC strains isolated from patients with diarrhea in Gwangju for their genotypic and phenotypic characteristics. Sixteen (17.4%) of all strains were found to be typical EPEC because they were *bfpA* gene positive by PCR. The most of typical EPEC isolates (87.5%) showed a localized adhesion (LA) pattern in Hep-2 cell adherence assay, whereas, only 11 atypical EPEC isolates (14.5%) were adhered to Hep-2 cells in a localized manner. Thirteen of the EPEC strains studied belonged to classical O-serogroups of EPEC and 7 isolates were classified as nonclassical EPEC serogroup and the other isolates could not be serotyped with our antisera. The subtypes of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes which are major virulence genes concerned of A/E lesion on chromosome were analyzed by multiplex PCR for finding the original resource. The results showed that the composition of these genes subtypes was homogenous and heterogenous in 12 and 26 isolates, respectively. The others were non-determined type in terms of the gene subtype because of genetic diversity of intimin-coding *eae* genes. Our findings indicated that EPEC isolates from patients with diarrhea were diverse genetically and phenotypically, which require further study in regard to their virulence and epidemiological significance.

Key Words: EPEC, Attaching and effacing lesion, *eae*, *bfpA*, Localized adhesion (LA) pattern

서 론

장병원성대장균 (Enteropathogenic *E. coli*, EPEC)은 전 세계

*교신저자: 김선희. 502-837, 광주광역시 서구 화정3동 898번지,
광주광역시보건환경연구원
Phone: 062-380-1833, Fax: 062-375-1835,
e-mail: sunny1989@hanmail.net

적으로 신생아 설사의 주된 원인 균으로서, 대변-구강의 경로 (fecal-oral route), 오염된 식품 또는 오염된 매개물에 의하여 주로 감염되는 것으로 알려져 있다 (16). 그러나 선진국의 탁아소나 소아병동에서 뿐만 아니라, 건강한 성인들에서도 장병원성대장균에 의한 집단설사환자의 발생사례가 보고되고 있으며 (19,25), 소, 돼지 등의 가축과 개나 고양이와 같은 애완동물에 있어서도 장병원성대장균의 병원성이 작용하

는 것으로 확인됨에 따라, 장병원성대장균 감염의 역학적 측면에서 이들 병원체의 연관성이 제기되고 있다 (4,15,26).

수년간 장병원성대장균은 혈청형군에 의해서만 정의되었다가 추가적인 혈청형이 신생아 설사와 관련이 있는 것으로 확인되면서, 1995년 장병원성대장균에 대한 제 2차 국제 심포지움에서는 조직병리학적 특성인 부착-소멸적 손상 (attaching and effacing, A/E)이 장병원성대장균을 결정짓는 중요 요소인 것으로 정의하였다 (12). 부착-소멸적 손상은 미세음모의 소멸과 세균-상피세포막 사이의 긴밀한 부착에 의해 특징지어진다. 또한, 부착된 세균의 바로 밑에서 조직화된 액틴의 축적을 포함한 세포골격의 현저한 변화가 보여 지며, 세균은 기둥다리 (pedestal-like) 구조를 형성한다 (21). 이러한 조직병변은 소화-흡수 효소체계에 영향을 주어 영양물의 흡수를 저해하게 되며, 장독소형 대장균 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC)이나 비브리오 콜레라균에서 보여지는 독소생산에 따른 조직병리학적 개념과는 상당한 차이가 있다. 부착-소멸적 손상은 감염된 환자나 동물들의 장조직 생검가검물로부터 전자현미경을 이용하여 직접 관찰되어질 수 있으며, Knutton 등에 의해 처음으로 고안된 Fluorescent-actin staining (FAS) test를 통하여 배양된 HEp-2나 HeLa 세포 상에서 섬유상의 액틴이 재현되는 것을 확인할 수 있다 (14).

부착-소멸적 손상의 결정인자는 염색체상의 LEE (the locus of enterocyte effacement)에 위치하며, 여기에는 intimin (부착소), type III secretion system, 여러 가지 EPEC secreted protein (Esp)과 intimin의 수용체 (Tir)를 암호화하는 유전자들을 포함한다. Intimin은 *eae* 유전자에 의해 암호화된 94-KDa 세포막 단백질로, 세균과 숙주세포막 사이의 부착을 긴밀하게 하는 역할을 하며, Esp (EspA, EspB, EspD) 분자들은 숙주세포로 effector 분자들을 전달하여 세포골격을 파괴해서 숙주세포의 기능을 없애는 전달체의 형성을 유발시키고 (7), Tir는 장병원성대장균을 전달하는 단백질의 하나로 숙주세포막으로 삽입되어 intimin에 대한 수용체로 작용한다 (13). 또한, 일부 장병원성대장균은 조직배양세포에서 국소적 부착 (localized adherence, LA)이라는 특성화된 부착패턴을 나타낸다. 이러한 현상은 EAF (EPEC adherence factor) plasmid의 존재와 관련이 있으며, EAF plasmid 안에 존재하는 BFP (bundle forming pili)를 암호화하는 유전자 집합이 세균들을 서로 연결하여 미세균집을 형성하고 이들의 안정화를 도모하는 것으로 여겨진다. 그러나 이러한 EAF plasmid의 존재가 부착-소멸적 손상을 유발시키는 효율을 강화시키기는 하지만, 부착-소멸적 손상의 형성에 필수적인 것은 아닌 것으로 보고되었다 (9).

본 연구는 광주지역에서 발생한 설사환자로부터 분리된 총 92주의 장병원성대장균을 대상으로, 이들의 병원성 혹은

잠재적인 병원체로서의 가능성을 보다 이해하기 위한 목적으로 각각의 분리균주에 대하여 균체항원 혈청군, HEp-2 세포 부착형태, *bfpA* 및 EAF 유전자의 존재를 확인하였다. 또한 부착-소멸적 손상에 관여하는 *eae*를 비롯한 *tir*, *espA* 및 *espB* 유전자에 대한 유형분석을 통하여 병원체의 근원 및 병원체 상호간의 유연관계를 분석함으로써 이 지역에 분포한 장병원성대장균의 역학적인 기초 자료를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시험균주

본 연구에서는 2002년 9월부터 2003년 8월까지 12개월 동안 광주지역 병·의원 소아과에 설사가 주 증상으로 입원 또는 내원한 환자 대변으로부터 분리된 병원성대장균 중, *eae* 유전자에 대한 PCR 시험결과 (F:5' TGA GCG GCT GGC ATG AGT CAT AC 3'/ R:5' TCG ATC CCC ATC GTC ACC AGA GG 3', EMBL X60439) 양성인 장병원성대장균 분리균주 총 92주를 대상으로 시험하였다.

2. O Serogroup 시험

Denka Seiken (Tokyo, Japan)사의 Pathogenic *E. coli* Immune Sera "SEIKEN"과 그 사용법에 의거하여 시험균주의 균체항원 혈청군 시험을 실시하였다.

3. HEp-2 세포 부착능 시험

Cravioto 등의 방법 (3)에 따라, 각각의 시험균주를 국립보건연구원에서 분양받은 HEp-2 (Human Epithelioma type 2 cell-line) 세포에 대한 부착형태를 조사하였다 (Fig. 1).

1) HEp-2 세포의 배양 및 처리

HEp-2 세포는 penicillin과 streptomycin (Cambrex, Baltimore, MD, USA), 그리고 10% fetal bovine serum (Cambrex)이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)으로 2×10^5 cell/ml가 되도록 희석하여 8 well Lab-Tek Chamber slides (Nalge nunc, Rochester, NY, USA)의 각 well에 400 μ l씩 접종하였다. 접종된 slides는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하여 단층을 형성하도록 하였다. 70% 정도의 단층이 이루어지면, PBS로 3회 세척하고, 항생제가 첨가되지 않은 1% D-mannose (Sigma, St. Louis, MO, USA)와 2% fetal bovine serum만이 첨가된 DMEM으로 배지를 교환하여 실험에 이용하였다.

2) HEp-2 세포 부착능 시험

분리동정된 대장균은 1% D-mannose (Difco, Sparks, MD, USA)가 포함된 Luria broth (Difco) 5 ml에 접종하여 37°C에서 16시간 동안 정치 배양하였다. 각 분리주의 배양액 8 μ l을

HEp-2 세포 단층이 형성된 slide의 각 well에 접종하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 동안 배양한 다음, PBS로 3회 세척하고, 70% methanol로 고정시킨 후, Giemsa 염색을 시행하여 1,000배 광학현미경 (Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다. 이때 각각의 균주에 대하여 2회씩 실시하였으며, HEp-2 세포의 40% 이상 부착 하에서 판정하였다.

4. *bfpA* 및 EAF 유전자 검출 시험

Gunzberg 등과 Franke 등의 방법 (6,11)에 의하여 (Table 1), 각각 *bfpA* 및 EAF 유전자에 대한 primer 10 pmole, 2.5 mM dNTP 1 µl, 5 mM MgCl₂가 포함된 10 × buffer 2.5 µl와 1 U의 *Taq* DNA polymerase (Bioneer, Daejeon, Korea)을 사용하여

제조된 반응액에 균체를 끓여서 얻어진 template DNA 5 µl를 가하였다. 이를 중합효소연쇄반응기 (Perkin Elmer 2400, Boston, USA)를 사용하여 94℃/30 sec, 56℃/1 min, 72℃/2 min을 30회 실시하고 마지막 cycle 후 72℃에서 5분간 반응시켰다. 이 후 10 µl의 PCR 산물을 2% agarose gel (Gibco, Gaithersburg, MD, USA)에 전기영동한 후 EtBr (Gibco)에 염색하여 DNA image analyzer (Vilber Lourmat, France)로 확인하였다.

5. *eae*–*tir*–*espA*–*espB* 유전자 유형분석

eae, *tir*, *espA* 그리고 *espB* 유전자에 대한 증폭 및 유형 결정을 위하여, China 등의 방법에 따라 multiplex PCR을 실시

Table 1. Primers used to detect for *bfpA* and EAF gene

Gene	Reference strain	Sequences of primers (5'→3')	Product size (bp)
<i>bfpA</i>	E2348/69	F: AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC R: GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	326
EAF	E2348/69	F: CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA R: TATGGGGACCATGTATTATCA	397

Table 2. Primers used to typing *eae*, *tir*, *espA* and *espB* gene

Primer	Sequence of primer (5' → 3')	Target sequence	Reference strain	Product size (bp)
B73	F: ACTGAGATTAAGGCTGATAA	conserved region of <i>eae</i>		
B138	R: GACCAGAAGAAGATCCA	<i>eae</i> α type	E2348/69	452
B74	R: AGGAAGAGGGTTTTGTGTT	<i>eae</i> γ type	EDL933	778
B137	R: TGTSGTCGCACTCTGATT	<i>eae</i> β type	193	520
B139	F: CR [*] CCK ^{**} CCAY ^{***} TACCTTCACA	conserved region of <i>tir</i>		
B152	R: CGCTAACCTCCAAACCAATT	<i>tir</i> α type	E2348/69	342
B141	R: GTCGGCAGTTTCAGTTTCAC	<i>tir</i> γ type	EDL933	781
B140	R: GATTTTTCCCTCGCCACTA	<i>tir</i> β type	95ZGI	560
B163	F: TGAGGCATCTAARGM ^{****} GTC	conserved region of <i>espA</i>		
B165	R: GCTGGCTATTATTGACCG	<i>espA</i> α type	E2348/69	269
B164	R: ATCACGAATACCAGTTACCA	<i>espA</i> γ type	EDL933	172
B166	R: GCCGTTTTTGAGAGCCA	<i>espA</i> β type	RDEC-1	101
B148	F: GCCGTTTTTGAGAGCCA	conserved region of <i>espB</i>		
B151	R: TCCCCAGGACAGCAGCAFT	<i>espB</i> α type	E2348/69	94
B150	R: GCACCAGCAGCCTTTGA	<i>espB</i> γ type	EDL933	188
B149	R: CTTTCCGTTGCCTTAGT	<i>espB</i> β type	RDEC-1	233

^{*}; R=A+G, ^{**}; K=T+G, ^{***}; Y=C+T, ^{****}; M=A+C

하였다 (2). PCR 반응액 조성은 template DNA 5 µl, 2.5 mM dNTP 5 µl, 5 mM MgCl₂가 포함된 10X buffer 5 µl와 각각의 primer 0.5 µl씩, 1 U의 *Taq* DNA polymerase와 멸균된 증류수로 최종 50 µl을 맞추었다. 사용된 primer는 Table 2와 같으며, 이들을 중합효소연쇄반응기 (Perkin Elmer 2400, Boston, MA, USA)를 사용하여 94°C/30 sec, 50°C/30 sec, 72°C/30 sec을 30회 실시하고 마지막 cycle 후 72°C에서 5분간 반응시켰다. 이 후 10 µl의 PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동한 후 EtBr에 염색하여 DNA image analyzer로 확인하였다.

결 과

1. O-Serogroup

장병원성대장균 분리균주 92주에 대한 균체항원 혈청군 응집반응 시험결과, 20주 (21.7%)만이 최종적으로 혈청군이 결정되었으며, 나머지 시험균주 (78.3%)는 시험에 사용된 항혈청에 대하여 응집반응을 관찰할 수 없었다. 응집반응을 보인 20주 중, 13주 (14.1%)는 EPEC O 혈청군으로 알려진 O114 (6주), O119 (1주), O125 (1주), O128 (2주), O142 (3주)에

Table 3. Genotypic and phenotypic characteristics of EPEC isolates

Genetic profile (number of isolates)	HEp-2 cell adherence pattern	Type of				Serogroup (number of isolates)
		<i>eae</i>	<i>tir</i>	<i>espA</i>	<i>espB</i>	
<i>eae, bfp, eaf</i> (1)	LA (1)	NT*	α	α	α	OUT** (1)
<i>eae, bfp</i> (15)	LA (13)	α	α	α	α	O157(1), O142(3)
		NT	α	α	α	O114(2), O125(1), O157(1), OUT(4)
		NT	α	NT	α	O157(1)
	AA (2)	NT	α	α	α	OUT(2)
<i>eae</i> (66)	LA (11)	α	α	α	α	OUT(1)
		β	α	α	α	OUT(2)
		NT	α	α	α	OUT(2)
		NT	β	β	β	OUT(2)
		NT	γ	α	α	O63(1), OUT(1)
		NT	γ	β	γ	OUT(1)
		NT	NT	α	α	OUT(1)
	AA (43)	β	α	α	α	OUT(9)
		β	β	β	β	OUT(3)
		γ	α	α	α	OUT(5)
		γ	γ	β	γ	OUT(1)
		NT	α	α	α	O114(4), OUT(8)
		NT	β	β	β	O63(1), O157(1), OUT(4)
		NT	β	β	NT	OUT(1)
		NT	α	NT	α	O20(1), OUT(4)
	DA (22)	NT	γ	β	γ	OUT(1)
		β	β	β	β	O119(1), O128(1), OUT(2)
		γ	α	α	α	O128(1), OUT(8)
		NT	α	α	α	OUT(7)
		NT	β	β	β	OUT(2)

* NT, not typable; ** OUT, O-untypable

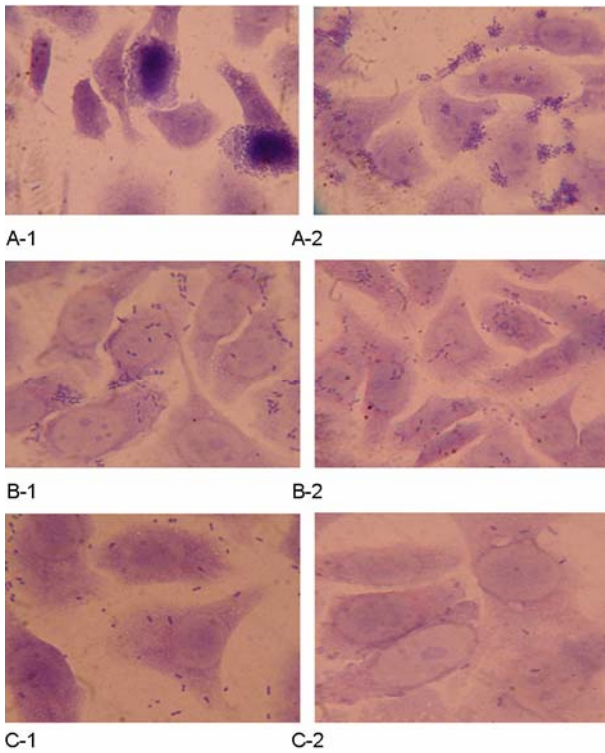


Figure 1. Adherence patterns in HEp-2 cells presented by EPEC isolates. A-1 and A-2, LA patterns (localized adherence). B-1 and B-2, AA patterns (aggregative adherence). C-1 and C-2, DA pattern (diffuse adherence). Original magnification, $\times 1000$.

각각 속하는 것으로 확인되었고, 나머지 7주는 장병원성대장균 O 혈청군에 속하지 않은 O157 (4주)와 O63 (2주), O20 (1주)에서 응집반응을 보였다 (Table 3).

2. HEp-2 세포 부착능

HEp-2 세포에 대한 부착능 시험결과, 장병원성대장균의 전형적인 국소적 부착 (localized adherence pattern, LA) 형태가 전체 시험균주의 27.2%인 25주에서 확인되었으며, LA에서 보여지는 조직적으로 밀집된 형태와는 달리 보다 느슨하게 형성된 군집과 산발적으로 흩어져 부착된 형태를 AA (aggregative adherence)로 표기할 때 45주 (48.9%)에서 이러한 양상이 관찰되었다. 나머지 22주 (23.9%)에서는 세균이 각자 독립적으로 부착하는 양상 (diffuse adherence, DA)을 보였다 (Fig. 1).

3. *bfpA* 및 EAF 유전자 PCR

bfpA 유전자에 대한 PCR 시험결과, 16주 (17.4%)에서 양성 반응을 보였으며, 이 중 1주 만이 EAF 유전자에 대한 PCR 시험결과에도 양성으로 확인되었다 (Fig. 2). 또한, *bfpA*⁺ 14주와 *bfpA*⁻ 11주는 HEp-2 세포 상에서 LA phenotype이 관찰

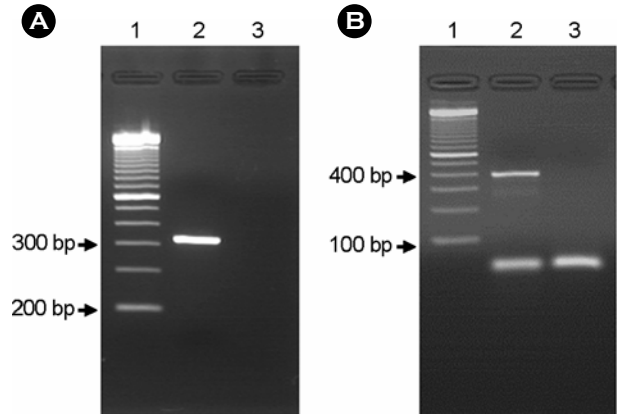


Figure 2. PCR result to detection of *bfpA* and EAF gene. A, lane 1: 100 bp ladder; lane 2: *bfpA*⁺ isolate; lane 3: *bfpA*⁻ isolate. B, lane 1: 100 bp ladder; lane 2: EAF⁺ isolate; lane 3: EAF⁻ isolate.

되었음을 확인할 수 있었다 (Table 3).

4. *eae-tir-espA-espB* 유전자 유형

eae 유전자 유형분석을 위한 multiplex PCR 결과, *eae*_β (18주, 19.6%) > *eae*_γ (15주, 16.3%) > *eae*_α (5주, 5.4%)으로 나타났으며, 나머지 54주 (58.7%)는 유형이 정해지지 않았다. *tir* 유전자에 대해서는 *tir*_α (68주, 73.9%) > *tir*_β (18주, 19.6%) > *tir*_γ (5주, 5.4%) 유전자형 순으로 나타났고, *espA* 유전자에서는 *espA*_α (65주, 70.7%) > *espA*_β (21주, 22.8%) 그리고 *espA*_γ 유전자형은 확인되지 않았으며, *espB* 유전자는 *espB*_α (71주, 77.2%) > *espB*_β (17주, 18.5%) > *espB*_γ (3주, 3.3%) 순으로 나타났다. 또한, *tir*와 *espB* 유전자에 대하여 각각 1주씩, *espA* 유전자에 대해서는 6주의 균주에서 α, γ 그리고 β type에 대한 multiplex PCR 결과, 어떠한 밴드도 확인할 수 없었다 (Fig. 3, Table 3).

eae, *tir*, *espA*와 *espB* 4가지 유전자에 대한 유형의 조합 중 각각의 유전자에 대하여 동종의 유형을 보인 균주는 12주 (13.1%)로, *eae*_α *tir*_α *espA*_α *espB*_α와 *eae*_β *tir*_β *espA*_β *espB*_β가 각각 5주와 7주로 확인되었다. 또한, *eae*_γ *tir*_α *espA*_α *espB*_α가 14주로 가장 많은 비율을 차지하였고, *eae*_β *tir*_α *espA*_α *espB*_α가 11주로 그 뒤를 이었으며 *eae*_γ *tir*_γ *espA*_β *espB*_γ도 1주에서 확인되었다 (Table 3).

고 찰

장병원성대장균을 비병원성 대장균이나 설사를 일으키는 다른 범주의 대장균들과 구별하기 위한 많은 방법들이 고안되어 왔다. 가장 고전적인 방법인 혈청학적 진단방법은 1944년 Kauffman에 의해 처음으로 제안되었으며, 1987년 WHO

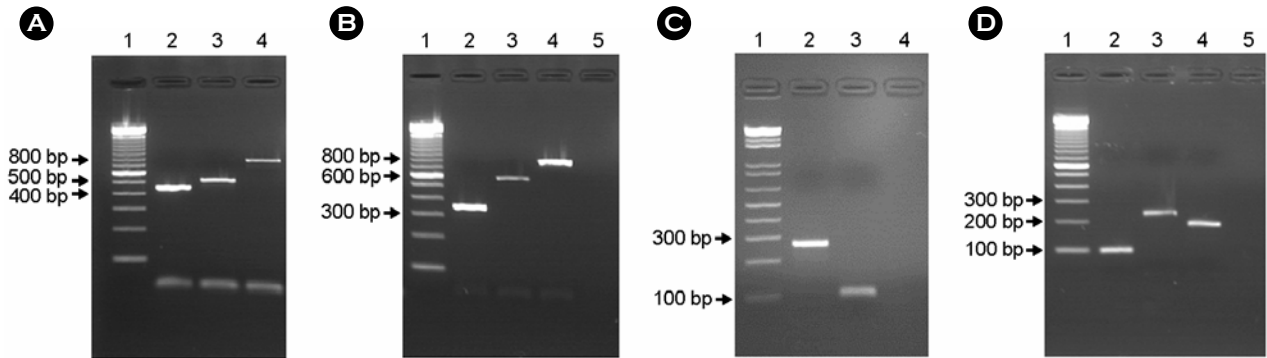


Figure 3. Result of multiplex PCR to analysis subtypes of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes. **A**, lane 1: 100 bp ladder; lane 2: *eae*_α; lane 3: *eae*_β; lane 4: *eae*_γ. **B**, lane 1: 100 bp ladder; lane 2: *tir*_α; lane 3: *tir*_β; lane 4: *tir*_γ; lane 5: negative control. **C**, lane 1: 100 bp ladder; lane 2: *espA*_α; lane 3: *espA*_β; lane 4: negative control. **D**, lane 1: 100 bp ladder; lane 2: *espB*_α; lane 3: *espB*_β; lane 4: *espB*_γ; lane 5: negative control.

(World Health Organization)에 의해 인정된 장병원성대장균 혈청군은 O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142와 O158로 총 12가지이다 (20). 그러나 이러한 장병원성대장균 혈청군에는 다른 범주의 병원성대장균 특히, 장응집성대장균 (Enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC) 등의 균주가 포함되기도 하며, 마찬가지로 장병원성대장균의 몇몇 균주들이 다른 범주의 대장균에 해당하는 혈청군에 속하는 연구결과가 잇따름에 따라, 혈청형만으로 이들을 동정하기는 충분하지가 않다는 보고가 대두되고 있다 (5,20). 본 연구에서도 혈청군이 결정된 총 20주의 장병원성대장균 분리균주 중 7주는 장독소원성대장균 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*)나 장출혈성대장균 (Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*) O serogroup에 속하며, 13주 만이 장병원성대장균 O serogroup에 속하는 것으로 확인되었다.

HEp-2 배양세포에 대한 장병원성대장균의 LA phenotype과 *bfpA* 및 EAF 유전자의 존재 사이에는 높은 상관관계를 갖는다고 알려져 있었으나, 본 연구에서 11주의 *bfpA*⁻ EAF⁻ 균주가 HEp-2 세포 상에서 LA phenotype을 형성하였다. 이러한 경향은 Scotland 등의 결과와 일치하며 (23), Gordillo 등은 이러한 균주들에 BFP와 유사한 다른 부착소가 존재하는지는 알려진 바 없으나 EAF plasmid가 결여된 균주들에서 염색체상의 intimin을 암호화하는 *eae* 유전자에 대한 증진된 발현이 HEp-2 세포 상에서 LA를 유도하는 것이라고 추정하였다 (10). 본 연구의 세포 부착능 시험에서 보여지는 다양한 강도의 부착패턴 역시, 균 배양시간이나 실험상의 오차를 배제한다면 *eae* 유전자의 발현정도의 차이로 설명될 수 있겠다.

또한, Levine 등은 사람의 장병원성대장균 균주인 E2348/69로부터 EAF plasmid를 제거시키면 그 병독성이 상당히 약해짐에도 불구하고 성인지원자에서 설사를 유발하였음을 보고하였다 (17). 실제로 영국의 어린이들 사이에서 발생한 집

단설사와 핀란드에서 발생한 6백 명 이상의 성인이 연관된 집단 식중독의 원인병원체로써, EAF 음성이면서 *eae* 양성인 균주들이 확인되기도 하였다 (25). 이러한 균주들의 출현은 실제로는 EAF 양성인 균주가 EAF plasmid를 소실한 결과이거나, vero toxin을 암호화하는 phage가 소실된 장출혈성대장균의 파생물일 가능성이 Levine 등에 의해 제시되었다 (18). 따라서, 1995년에 열린 장병원성대장균에 대한 제 2차 국제 심포지엄에서 부착-소멸적 손상을 형성하면서 배로독소를 생산하지 않은 균주가 EAF plasmid를 가지고 있으면 '전형적 장병원성대장균 (typical EPEC)'라 하고, EAF plasmid를 갖지 않으면 '비전형적 장병원성대장균 (atypical EPEC)'라 정의하였으며, 비전형적 장병원성대장균 역시 여전히 역학적인 관심의 대상이 되고 있다 (12).

장병원성대장균의 감염으로부터 보여지는 것과 유사한 부착-소멸적 손상이 장출혈성대장균과 일부 *Hafnia alvei*에 대하여 실시된 동물 및 배양세포에서 관찰되어졌다 (4,26). 또, 장병원성대장균과 장출혈성대장균 외에도 부착-소멸적 손상을 일으킬 수 있는 다양한 대장균들이 토끼와 송아지, 돼지 그리고 개와 고양이 등에서 분리됨에 따라, 이들 병원체 사이의 상관관계가 대두되었다 (4,15,26). Agin과 Wolf는 사람에서 분리된 장병원성대장균 (E2348/69, O127:H6)와 장출혈성대장균 (EDL933, O157:H7) 그리고 토끼로부터 분리된 장병원성대장균 (RDEC-1, O15)의 intimin이 면역학적으로 뚜렷하게 구분됨을 확인하고, 이들을 각각 α, γ 그리고 β형으로 명명하였다 (1). 또한, China 등은 *eae* 유전자뿐만 아니라 *tir*와 *esp* 유전자들에 대해서도 α, γ 그리고 β 유형분석을 위한 multiplex PCR법을 개발하여 소와 사람에서 분리된 장병원성대장균 및 장출혈성대장균에 각각 유전자에 대한 유형을 비교하였다 (2).

본 연구에서는 China 등의 방법 (2)에 따라, 광주지역에서 분리된 장병원성대장균에 대하여 부착-소멸적 손상에 관여

하는 *eae*, *tir*, *espA*와 *espB* 유전자들의 유형을 분석하여 $eae_{\gamma} tir_{\alpha} espA_{\alpha} espB_{\alpha}$ (14주) > $eae_{\beta} tir_{\alpha} espA_{\alpha} espB_{\alpha}$ (11주) > $eae_{\beta} tir_{\beta} espA_{\beta} espB_{\beta}$ (7주) > $eae_{\alpha} tir_{\alpha} espA_{\alpha} espB_{\alpha}$ (5주) > $eae_{\gamma} tir_{\gamma} espA_{\beta} espB_{\gamma}$ (1주)의 결과를 확인하였다. 이러한 결과는 China 등에 의한 설사증세가 있는 소와 사람에게서 분리된 장출혈성대장균 및 장병원성대장균을 대상으로 한 연구와 Goffaux 등이 개와 고양이에서 분리된 장병원성대장균에 대한 연구에서 $eae_{\beta} tir_{\beta} espA_{\beta} espB_{\beta}$ 와 $eae_{\gamma} tir_{\alpha} espA_{\alpha} espB_{\alpha}$ 의 유형에 대한 조합이 다수의 균주에서 확인된 결과와 크게 차이 나지 않으며 이들이 제시했던 사람의 장병원성대장균 감염에 대한 동물 병원소로서 가축과 애완동물의 가능성을 역학적 측면에서 고려할 수 있을 것으로 판단된다 (2,8). 또한, *eae* 유전자의 경우 전체 시험대상 균주의 58.7%인 54주가 α , γ 그리고 β 유형에 속하지 않은 본 연구의 결과와 관련하여, Vieira 등과 Nunes 등에 의해 실시된 *eae* 유전자의 유형에 대한 조사에서도 각각 83.1%와 71.6%의 대다수가 유형의 결정되지 않는 결과를 보였다 (22,24). 그리고, Intimin을 암호화하는 *eae* 유전자와 intimin receptor인 단백질을 암호화하는 *tir* 유전자 사이의 유형이 일치할 것으로 예상했던 것과는 달리, *eae* 유전자와 *tir* 유전자 사이에서 보여지는 동종의 조합이 단지 16주에서만 나타났다. 이러한 *eae*와 *tir* 유전자간의 상이한 조합은 China 등과 Goffaux 등의 연구에서도 보여졌으며, intimin과 receptor 사이의 상보적인 부분에 대한 의문이 제기된다 (2,8).

이상의 결과로, 광주지역에서 발생한 설사환자로부터 분리된 장병원성대장균의 유전적 다양성이 비교적 높은 것으로 판단되며, 이는 다양한 매개체를 통한 감염경로가 존재함을 보여주므로 이에 대한 광범위한 감시체계 즉, 식품으로 제공되거나 신체적인 접촉이 잦은 가축 등의 감염실태에 대한 연구로 이들 균주에 대한 감염원의 모니터링이 병행되어야 할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- 1) Agin TS, Wolf MK: Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans and swine. *Infect Immun* **65**: 320-326, 1997.
- 2) China B, Goffaux F, Pirson 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* **178**: 177-182, 1999.
- 3) 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* **3**: 95-99, 1979.
- 4) Drolet R, Fairbrother JM, Harel J, Helie P: Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. *Can J Vet Res* **58**: 87-92, 1994.
- 5) Eliane BN, Halha OS, Kinue L, Jacinta SP: Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from child with and without diarrhoea in Londria, Brazil. *J Med Microbiol* **52**: 499-504, 2003.
- 6) Franke J, Franke S, Schmidt H, Schwarzkopf A, Wieler H, 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* **32**: 2460-2463, 1994.
- 7) Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S: Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*; more subversive element. *Mol Microbiol* **30**: 911-921, 1998.
- 8) Goffaux F, China B, Janssen L, Mainil J: Genotypic characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. *Res Microbiol* **151**: 865-871, 2000.
- 9) Gomez-Duartz OG, Kaper JB: A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eae* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 1767-1776, 1995.
- 10) Gordillo ME, Reeve GR, Pappas J, Mathewson JJ, DuPont HL, Murray BE: Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. *J Clin Microbiol Rev* **30**: 889-893, 1992.
- 11) Gunzberg ST, Tornieporth NG, Riley LW: Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol* **33**: 1375-1377, 1995.
- 12) Kaper JB: Defining EPEC. *Rev Microbiol Sao Paulo* **27**: 130-133, 1996.
- 13) Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520, 1997.

- 14) **Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS:** Role of plasmid-encoded adherence factor in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to Hep-2 cells. *Infect Immun* **55**: 78-85, 1987.
- 15) **Kreuse G, Zimmermann S, Beutin L:** Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet Microbiol* **20**; **106(1-2)**: 87-95, 2005.
- 16) **Levine MM, Edelman R:** Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* **6**: 31-51, 1984.
- 17) **Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML, O'Brien AD:** The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* **152**: 550-559, 1985.
- 18) **Levine MM, Pardo V, Robins-Broene R, Lior H, Kaper JB, Moseley SL, Gicquelais K, Nataro JP, Vial P, Tall B:** Use of DNA probes and HEp-2 cell adherence assay to detect diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **158**: 224-228, 1988.
- 19) **Mani R, Udgaonkar U, Pawar S:** Study of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) diarrhoea in children. *Indian J Pathol Microbiol* **46(1)**: 118-20, 2003.
- 20) **Marilda CV, Renata KTK, Angela MGD:** Unidentified serogroup of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with diarrhoea in infants in London, Parana, Brazil. *J Med Microbiol* **49**: 823-826, 2000.
- 21) **Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Gianella RA:** Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* **41**: 1340-1351, 1983.
- 22) **Nunes EB, Saridakis HO, Lrino K, Pelayo JS:** Genotypic and phenotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from children with and without diarrhoea in Londrina, Brazil. *J Med Microbiol* **52**: 499-504, 2003.
- 23) **Scotland SM, Smith HR, Rowe B:** *Escherichia coli* O128 strains from infants with diarrhea commonly show localized adhesion and positivity in the fluorescent-actin straining test but do not hybridize with an enteropathogenic *E. coli* adherence factor probe. *Infect Immun* **59**: 1569-1571, 1991.
- 24) **Vieira MAM, Andrade JRC, Trabulsi LR, Rosa ACP, Dias AMG, Rames SRT, Frankel G, Gomes TAT:** 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* **183**: 762-772, 2001.
- 25) **Viljanen MK, Peltola T, Junnila OL, Jarvinen H, Kuistila M, Huovinen P:** Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity. *Lancet* **336**: 831-834, 1990.
- 26) **Zhu C, Harel J, Jacques M, Desautels C, Donnenberg MS, Beaudry M, Fairbrother JM:** Virulence properties and attaching and effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine post-weaning diarrhea. *Infect Immun* **62**: 4153-4159, 1994.