

설사환자에서 분리한 장출혈성 대장균과 장병원성 대장균의 Enterocyte Effacement 관련 LEE 유전자의 병원형 특성

부산대학교 의과대학 미생물학교실

박도훈 · 문지영 · 김영부*

Pathotypic Characterization of Enterocyte Effacement-related LEE Genes in EHEC and EPEC Isolated from Diarrheal Patients

Do-Hun Park, Ji-Young Moon and Yung-Bu Kim*

Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine,
Pusan National University, Pusan 602-739, Korea

Received : December 12, 2006

Accepted : April 5, 2007

Attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) cause enteric infections in humans and animals. Attaching indicates the intimate attachment of bacteria to the enterocyte, and effacing relates to the localized effacement of brush border microvilli. Enteropathogenic (EPEC) and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections are characterized by the formation of attaching and effacing (AE) lesion on the intestinal epithelial cells. Therefore, they are often grouped together as AEEC. Development of multiplex PCR allowed us to type five of the most important genes implicated in the formation of the AE lesion. A total of 60 AEEC strains isolated from diarrheal patients were investigated by multiplex PCR for the presence of the insertion site of locus of enterocyte effacement (LEE) and LEE-related (*eae*, *tir*, *espA*, *espB*, and *espD*) genes. Associating the results of LEE genes typing in the AEEC strains, three different pathotypes are determined: *eae_γ-tir_γ-espA_γ-espB_γ-espD_γ* (O157:H7), *eae_β-tir_β-espA_β-espB_β-espD_β* (O26:H11), and *eae_α-tir_α-espA_α-espB_α-espD_α* (O55:H6). These results indicate that AEEC are a heterogenous groups of organisms.

Key Words: AEEC, LEE, Attaching and effacing, Multiplex PCR

서 론

대장균은 정상장관세균무리를 형성하는 중요한 균종이며 대부분은 비병원성이지만 특수한 병원인자를 획득한 대장균은 사람의 장관이나 요로에서 감염증을 일으킨다. 이와 같은 병원성 대장균은 광의로 장관병원성 대장균과 요로병원성 대장균 (uropathogenic *E. coli*)으로 구분된다. 장관병원성 대장균은 감염과 병리학적 기전에 의해 장병원성 대장균 (enteropathogenic *E. coli*, EPEC), 장침투성 대장균 (enteroin-

vasive *E. coli*, EIEC), 장독소생성 대장균 (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), 장출혈성 대장균 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC), 장응집성 대장균 (enteroaggregative *E. coli*, EAEC)으로 분류하고 있다. EHEC는 설사와 출혈성 대장염 그리고 용혈요독증후군 (hemolytic uremic syndrome; HUS)의 주요한 병원체로 부착-소멸적 손상 (attaching and effacing, A/E) 병변으로 숙주의 장관 점막에 부착하여 병변을 일으키는 것 외에 베로 독소 (verotoxin, VT) 혹은 시가 독소 (shigatoxin, Stx)를 생성한다 (37). EHEC의 혈청형에는 O157 이외에도 여러 가지 혈청형이 알려져 있지만, 모든 EHEC 균주가 독성이 강한 시가 독소를 생산하는 것은 아니기 때문에 균의 시가 독소 생산 여부를 검사해야 한다. 또한 시가 독소를 생산하는 대장균에서도 Stx1만을 생산하는 것과 Stx2만을 생산하는 것 그리고 모두를 동시에 생산하는 것으로 분류하고 있

*교신저자: 김영부. 602-739, 부산광역시 서구 아미동 1가 10번지, 부산대학교 의과대학 미생물학교실
Phone: +82-51-240-7712, Fax: +81-51-243-2423,
e-mail: ybkim@pusan.ac.kr

는데, 실제로 어느 시가 독소를 생산하느냐에 따라서 병원성의 정도에 차이가 있다 (21). 이처럼 병원성은 다르지만 장관상피세포의 세포질막에 부착하여 장관의 미세융모를 소멸시키고, actin을 세균정착부위 아래에 축적시켜 세포골격을 변화시키는 A/E의 특징적인 장관병변 현상을 나타내므로 (16,19), 이들을 "attaching and effacing *E. coli* (AEEC)"라 부르며 EHEC에 속하는 일부의 혈청형군과 EPEC의 혈청형들에서 볼 수 있다 (27,32).

이와 같은 A/E 병변에 필수적인 유전자인 *eae* 유전자는 LEE (locus of enterocyte effacement)로 알려져 있는 35.5 kb의 염색체상의 병원성섬 (pathogenicity island, PAI)에 위치하고 있으며, 94~97 kDa 크기의 외막 단백질인 intimin을 지령한다 (26). LEE는 intimin 외에도 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 있으며, 사람에서 분리된 EPEC 균주인 E2348/69 O127:H6에서 *selC* (selenocystyl tRNA locus) 유전자에 삽입되어 클론된 염기서열이 처음으로 보고되었다 (11,15,35). 이러한 LEE는 41 open reading frame을 가지고 5가지 주요한 operon 즉, LEE 1, LEE 2, LEE 3, LEE 4 및 LEE 5로 구성되어 있으며 (36), 기능적으로 3가지 영역으로 나눌 수 있다 (32). LEE의 왼쪽 부분인 LEE 1~3은 TTSS를 지령하고 있으며, 단백질 EspA (24~25 kDa), EspB (37 kDa), EspD (39~40 kDa) (24,25) 그리고 Tir 단백질의 분비에 관여하는 유전자 (*esc*와 *sep*)를 보유하며 (29), Esp 단백질의 정상적인 분비에 필수적인 *SepL*는 EHEC 균주 EDL933에 특징적이다 (33). 또한 LEE의 중간 부분인 LEE 5는 adhesin intimin, Tir chaperone, Tir를 지령하는 *tir-cesT-eae* operon을 가지며, 94 kDa 외막 단백질 즉, intimin을 지령하는 *eae* 유전자와 숙주세포막으로 이동되어 숙주세포막에 결합하는 intimin 수용체인 Tir를 지령하는 *tir* 유전자로 인하여 숙주세포에 세균의 견고한 부착을 촉진시킨다 (40). LEE의 오른쪽 부분인 LEE 4는 A/E 병변에 필요한 단백질 *SepL*, *EspA*, *EspD*, *EspB*, *CesD2*, *EseF*, *EspF* 그리고 기능이 확실하

지 않은 *Orf19*를 지령하는 *espA*, *espD*, *espB* 등의 유전자로 구성된다 (34). LEE는 EHEC O157에 잘 보존되어 있으며, 현재 LEE 염기배열에 type III 분비 유전자가 잘 보존되어 있는 대장균의 혈청형 O127:H6 (15), O157:H7 (40), O26:H⁻ (GenBank accession No. AJ277443)와 O15:H⁻ (43)에 대한 LEE 영역의 뉴클레오타이드 염기배열의 전체가 밝혀졌으나, LEE 4와 LEE 5 유전자에서 변이가 보고되고 있으며, LEE 4 영역의 유전적 변이는 EPEC와 EHEC의 몇 가지의 혈청형에서만 조사되고 있다.

이에 본 연구에서는 LEE 관련 유전자에 대해 환자에서 분리된 AEEC 균주를 대상으로 혈청형을 살펴보고, 각각의 특이적인 multiplex PCR을 실시하여 *Stx1*, *Stx2*의 검출 및 *Stx2*의 유전자형을 확인하였다. 또한 *selC*에서의 LEE 삽입여부와 LEE 관련 유전자인 *eae*, *tir*, *espA*, *espB*와 *espD*의 보유 현황 및 변이체에 대한 유전학적 특징 (병원형)을 비교 검토하였다. 따라서 병원성 대장균의 신속하고 정확한 분리 동정을 가능하게 하고 이를 바탕으로 사람이나 동물에서 분리된 병원성 대장균의 분자 역학적 조사나 AEEC 감염증 제어를 위한 대책을 수립하는데 기초적 자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균 주

1996년 부산대학교병원 소아과의 HUS 환자대변과 임상가 검물에서 분리된 EHEC 2균주와 Kyoto 대학 동남아시아 연구센터의 Mitsuki Nishibuchi 교수로부터 분양받은 일본에서 유행한 EHEC 20균주, 그리고 일본 Kyushu 의과대학 세균학교실에서 분양받은 대장균 중 병원성대장균면역혈청의 O군 혈청으로 확인이 가능한 EHEC 22균주와 EPEC 14균주를 대상으로 실험에 이용하였다 (3). *Stx* (*stx1*, *stx2*) 양성 대조 균주로 EDL933을 사용하였다 (Table 1).

2. O 및 H 혈청형 검사

O 및 H 혈청형 검사를 위하여 병원성 대장균에 대한 면

Table 1. *E. coli* strains tested in this study and their sources

No. of strains	Sources (Reference)	Characteristics
2	PNUH	EHEC, isolated from stools of HUS patients in PNUH
20	CSEAS	EHEC, provided by Dr. Nishibuchi
22	KUH	EHEC, provided by Dr. Yoshida
14	KUH	EPEC, provided by Dr. Yoshida
1	(33)	EDL933, positive control of <i>Stx</i>

Abbreviations. PNUH, Pusan National University Hospital; CSEAS, Center for Southeast Asian Studies Kyoto University; KUH, Kyushu University Hospital; *Stx*, shigatoxin

Table 2. PCR primers used in the study

Primer set	Primer name	Sequences (5' → 3')	Target gene	Location within gene	Amplicon (bp)	Reference (GenBank accession no.)
A	LP30	CAGTTAATGTCGTGGCGAAGG	<i>stx1</i>	213~232	347	8 (JM19473)
	LP31	CACCAGACAATGTAACCGCTG		559~538		
	LP43	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG	<i>stx2</i>	295~316	587	8 (X07865)
	LP44	GCGTCATCGTATACACAGGAGC		881~859		
B	Stx2c-a	GCGGTTTTATTTGCATTAGT	<i>stx2c</i>	1186~1205	124	42 (M59432)
	Stx2c-b	AGTACTCTTTTCCGGCCACT		1309~1290		
	SLT2vB1	ATGAAGAAGATGTTTATAGCG	<i>stx2e</i>	1176~1196	264	23 (M36727)
	SLT2vB2	TCAGTTAAACTTCACCTGGGC		1439~1419		
C	Stx2d-a	GGTAAATTGAGTTCTCTAAGTAT	<i>stx2d</i>	1221~1244	175	42 (AF043627)
	Stx2d-b	CAGCAAATCCTGAACCTGACG		1395~1375		
	128-1	AGATTGGGCGTCATTCACCTGGTTG	<i>stx2f</i>	519~543	428	41 (AJ010730)
	128-2	TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC		946~923		

역혈청 (Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였다. O 항원군의 형별은 생균 및 가열한 균 (100℃, 1시간 또는 121℃, 15분)을 사용하여 슬라이드글라스 응집반응을 이용하여 검사하였고, H 형별은 시험 균주를 반유동우무배지에서 2~3회 통과시킨 후, H 항원군 혈청을 사용하여 시험관내 응집법으로 실시하였다 (30).

3. 환자유래 AEEC의 *stx* 유전자의 검출 및 아형 (sub-type) 검사

Multiplex PCR법에 이용한 *stx* 독소 유전자형별 실험은 Table 2의 primers와 조건에 따라 Osek (38)의 방법으로 실시하였으며, 3가지 primer set을 사용하여 PCR을 시행하였다. A set는 Stx 변이체인 *stx1*과 *stx2* 유전자를 사용하였고, B set는 Stx2의 변이유전자들인 *stx2c*와 *stx2e*, 그리고 C set는 다른 Stx 2 변이유전자인 *stx2d*와 *stx2f*가 동시에 확인되도록 구성하였다. DNA 추출은 가열법으로 실시하였으며, 유전자 증폭은 Thermal cycler PTC-100 (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA)에서 94℃에서 5분간 반응시킨 후 94℃/1분, 53℃/1분, 72℃/1분의 과정을 30회 실시하고 마지막으로 53℃에서 5분간 반응시켰다. PCR 증폭산물은 molecular weight marker (100 bp ladder: TaKaRa Biomedicals, Otsu, Japan)와 함께 2% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide (EtBr)로 염색한 후 자외선 하에서 위치를 확인하였다.

4. 환자유래 AEEC의 LEE 존재 확인

환자유래 AEEC의 *selC* 유전자상에 LEE의 삽입여부를 확

인하기 위하여 Table 3의 K255, K260 및 K261 primers를 사용하여 McDaniel 등 (35)의 방법에 따라 multiplex PCR을 실시하였다. 실험 균주에서 위와 같이 가열하여 DNA를 추출하였다. Thermal cycler (MJ Research Inc.)에서 94℃에서 5분간 반응시킨 후 92℃/2분, 50℃/2분, 72℃/3분의 과정을 30회 실시한 후 72℃에서 5분간 반응시켰다. PCR 증폭산물은 molecular weight marker (100 bp plus ladder: Bioneer Co., Seoul, Korea)와 함께 2% agarose gel에서 전기영동한 후, EtBr로 염색하여 자외선 하에서 DNA 단편의 위치를 확인하였다. 이 때 LEE 말단에 위치한 K255와 LEE의 downstream primer인 K260을 사용하여 418 bp에서 증폭되는 경우는 LEE가 *selC*에 삽입된 것을 나타내며, K260과 LEE의 삽입으로 절단된 ORF O394에 위치한 K261 primer에 의하여 527 bp에서 증폭되는 경우는 LEE가 삽입되지 않은 온전한 *selC* 유전자를 가지는 것으로 분석하였다.

5. 환자유래 AEEC의 LEE 관련 유전자의 검출

환자유래 AEEC의 LEE 관련 유전자인 *eeae*, *tir*, *espA*, *espB* 및 *espD* 유전자들 확인하여 pathotype을 확인하기 위하여 Goffaux 등 (19)과 China 등 (10)의 방법에 따라 Table 3의 primers를 사용하여 multiplex PCR을 실시하였다. 유전자 증폭은 Thermal cycler PTC-100 (MJ Research Inc.)에서 *espA* 유전자의 경우 94℃에서 5분간 반응시킨 후 94℃/30초, 48℃/30초, 72℃/30초의 과정을 30회 실시하였고, *espB*, *espD*, *eeae* 그리고 *tir* 유전자의 경우 94℃에서 5분간 예비가열한 후 94℃/30초, 50℃/30초, 72℃/30초의 과정을 30회 실시하였다.

Table 3. PCR primers for the detection of LEE-related genes in AEEC

Genes and subtypes	Strains (accession number)	Sequences of the deduced primers ^a (5'-3')	Annealing temperature (°C)	Amplicon (bp)
Disrupted <i>selC</i>	E2348/69 (GenBank AF031372)	K260: GAGCGAATATTCGATATACTGGTT K255: GGTTGAGTCGATTGATCTCTGG	50.0	418
Intact <i>selC</i>	E2348/69 (GenBank AF031372)	K260: GAGCGAATATTCGATATACTGGTT K261: CCTGCAAATAAACACGGCGCAT	50.0	527
<i>eae</i> type α	E2348/69 (EMBL X60439)	B73: TACTGAGATTAAGGCTGATAG B138: GACCAGAAGAAGATCCG	50.4	452
<i>eae</i> type β	EDL933 (EMBL Z11541)	B73: TACTGAGATTAAGGCTGATAG B74: AGGAAGAGGGTTTTGTGT	50.2	778
<i>eae</i> type γ	193 (GenBank AF043226)	B73: TACTGAGATTAAGGCTGATAG B137: TGTATGTCGCACTCTGAT	50.8	520
<i>tir</i> type α	E2348/69 (GenBank AF022236)	B139: CRCKCCAYTACCTTCACG B152: CGCTAACCTCCAAACCAT	54.2	342
<i>tir</i> type β	EDL933 (GenBank AF07134)	B139: CRCKCCAYTACCTTCACG B141: GTCGGCAGTTTCAGTTTCAT	54.7	781
<i>tir</i> type γ	95ZG1 (GenBank AF070068)	B139: CRCKCCAYTACCTTCACG B140: GATTTTCCCTCGCCACTG	53.4	560
<i>espA</i> type α	E2348/69 (GenBank Z54352)	B163: TGAGGCATCTAARGMGTT B165: GCTGGCTATTATTGACC	48.9	269
<i>espA</i> type β	EDL933 (GenBank Y13068)	B163: TGAGGCATCTAARGMGTT B164: ATCACGAATACCAGTTACCG	47.9	172
<i>espA</i> type γ	RDEC-1 (GenBank U80908)	B163: TGAGGCATCTAARGMGTT B166: TGCCTTTCTTATTCTTGTCG	46.4	101
<i>espB</i> type α	E2348/69 (GenBank AF022236)	B148: GCCGTTTTTGAGAGCCG B151: TCCCCAGGACAGATGAGA	50.6	94
<i>espB</i> type β	EDL933 (GenBank Y13068)	B148: GCCGTTTTTGAGAGCCG B150: GCACCAGCAGCCTTTGG	53.1	188
<i>espB</i> type γ	RDEC-1 (GenBank U80796)	B148: GCCGTTTTTGAGAGCCG B149: CTTTCCGTTGCCTTAG	50.9	233
<i>espD</i> type α	E2348/69 (GenBank AF022236)	B186: CGAAGAACAACAAAAAGCC B188: ACAGCAAAAGCAGAAACCT	52.8	492
<i>espD</i> type β	E22 (GenBank AF054421)	B186: CGAAGAACAACAAAAAGCC B187: GCAGAGGTCGTAAATCCAT	53.4	414
<i>espD</i> type γ	EDL933 (GenBank AF071034)	B186: CGAAGAACAACAAAAAGCC B189: CTGCCGCTTTCTCAACGAC	53.8	350

^aR = A+G, K = T+G, Y = C+T, M = A+C

Table 4. Serotypes of AEEC used in this study

Strains	Sources	No. of isolates	Serotypes
EHEC	PNUH	2	O157:H7
	CSEAS	20	O157:H7
	KUH	13	O157:H7
		3	O157:H ⁻
		2	O157:H45
		2	O26:H11
		2	O111:H ⁻
EPEC	KUH	6	O55:H7
		3	O55:H10
		2	O55:H6
		1	O55:H ⁻
		2	O111:H12
EHEC (EDL933)	Control strain	1	O157:H7

PCR 증폭산물 10 µl를 molecular weight marker (100 bp plus ladder: Bioneer)와 함께 2% agarose gel에서 전기영동하여 자외선 하에서 확인하였다.

결 과

1. 환자유래 AEEC의 혈청형

국내의 HUS 환자와 임상가검물에서 분리된 2균주는 모두 O157:H7이었으며, Kyoto 대학에서 분양받은 20균주도 모두 O157:H7로 확인되었다. 또한 일본 Kyushu 대학에서 분리된 EHEC 균주 22균주와 EPEC 14균주를 대상으로 하여 혈청형별을 실시한 결과, EHEC의 경우 O157:H7이 13균주로 가장 많았고, O157:H⁻와 O157:H45는 각각 3균주와 2균주로서 대부분이 O157로 형별되었으며, 이외에 O26:H11과 O111:H⁻도 각각 2균주씩 확인되었다. 반면 EPEC는 12균주가 O55로 가장 많았으며 O55:H7 (6균주), O55:H10 (3균주), O55:H6 (2균주), O55:H⁻ (1균주)의 순으로 나타났고, 나머지 2균주는 O111:H12로 형별되었다 (Table 4).

2. 환자유래 EHEC의 시가 독소 (Stx)의 검출 및 유전자형 검사

환자유래 AEEC 균주를 대상으로 하여 Stx의 생성능 및 변이체를 확인한 결과, 한국의 HUS 환자와 임상가검물에서 분리된 O157:H7 균주는 모두 Stx1만 검출되었고, 일본 Kyoto 대학에서 분양받은 O157:H7 20균주의 경우 13균주는

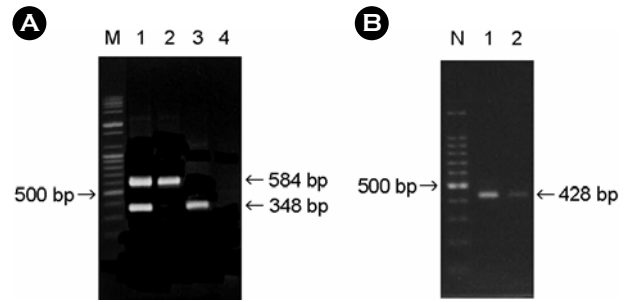


Figure 1. *stx* genes obtained from AEEC strains by multiplex PCR A~C. A: lane M, 100 bp plus ladder (molecular weight markers); lane 1, control strains EDL933 (*stx1*⁺, *stx2*⁺); lane 2, EHEC O1157:H⁻ strain (*stx1*⁻, *stx2*⁺); lane 3, EHEC O111:H⁻ strain (*stx1*⁺, *stx2*⁻); lane 4, EPEC O55:H⁻ strain (*stx1*⁻, *stx2*⁻). B: lane N, 100 bp ladder (molecular weight markers); lane 1, *E. coli* EDL933 (*stx2e*⁻, *stx2f*⁺); lane 2, EHEC O1157:H⁻ strain (*stx2e*⁻, *stx2f*⁺).

Stx1과 Stx2를 모두 보유하는 반면, 나머지 7균주는 Stx2만 보유하였으며, Stx2 유전자의 아형은 모두 Stx2f로 확인되었다. 또한 Kyushu 대학의 EHEC 22균주 중 O157:H7과 O157:H⁻ 14균주가 Stx2를 보유하였고 아형은 Stx2f로 나타났으며, 이 중 6균주는 Stx1과 동시에 확인되었다. 나머지 8균주에서는 O26:H11과 O111:H⁻ 4균주가 Stx1만을 보유하였으며, 특히 O157:H7과 O157:H45 각각 2균주에서 Stx를 보유하지 않는 것으로 나타났다. 이처럼 EHEC 균주의 Stx 검출과 Stx2 아형을 살펴본 결과, Stx2 유전자만 보유하거나 Stx1과 동시에 모두 보유하는 균주들은 대부분 O157:H7 균주로 높은 병원성을 나타내고 있음을 보여주었다 (Fig. 1).

3. LEE 관련 염기배열의 존재

AEEC의 LEE 관련 염기배열의 존재를 조사하기 위하여 PCR법으로 LEE의 insertion site를 결정하여 확인한 결과, 국내와 Kyoto 대학의 O157:H7 균주는 모두 *selC*에 LEE의 삽입을 나타내는 418 bp에서 양성이었으며, Kyushu 대학의 경우 30주가 418 bp에서 양성이었고, 나머지 6균주는 LEE가 *selC* 이외의 염색체에 삽입된 것을 나타내는 527 bp에 양성을 나타내었다 (Fig. 2).

4. LEE 관련 유전자의 검출 및 병원형 검사

Multiplex PCR을 사용하여 환자유래 AEEC의 *eae*, *tir*, *espA*, *espB* 그리고 *espD* 유전자를 검출하고 각각의 변이체들을 확인한 결과, 대부분의 AEEC 균주에서 LEE 관련 유전자들이 검출되었으나, EPEC 4균주 (O55:H⁻, O55:H10)에서는 전혀 검출되지 않았다. 특히 Stx를 보유하지 않는 EHEC의 경우에는 O157:H45에서 *espA*와 *espD* 유전자가 관찰되지 않았으며, *espB* 유전자의 경우 EHEC에서는 모두 관찰되는 반면,

EPEC 균주에서는 O55:H6 균주를 제외하고는 전혀 나타나지 않았고, *espD* 유전자의 경우 O111:H12와 O111:H⁻에서도 나타나지 않았다. 또한 각 LEE 관련 유전자들의 변이체를 확인해 본 결과, 한국의 HUS 환자와 일본의 Tokyo 대학에서 분리한 EHEC O157:H7의 경우 모두 γ 형으로 나타난 반면, Kyushu 대학의 경우도 대부분이 γ 형으로 가장 많았으나, O157:H45와 O55:H6의 경우는 모두 α 형으로 확인되었다. O111:H⁻의 경우도 *eae* 유전자만 γ 형이고 나머지는 α 형으로

나타났으며, O26:H11은 모두 β 형으로 확인되었다 (Table 5).

또한 병원형은 크게 3가지로 분류되었으며, 특히 EHEC O157:H7 및 O157:H⁻는 모두 *eae_γ-tir_γ-espA_γ-espB_γ-espD_γ*의 유전자형으로 가장 많이 나타났다. 그리고 EHEC O26:H11의 경우는 *eae_β-tir_β-espA_β-espB_β-espD_β*의 유전자형이었고, EPEC O55:H6에서는 모두 *eae_α-tir_α-espA_α-espB_α-espD_α*의 유전자형을 나타내었다. 또한 시가 독소를 보유하지 않는 O157:H45의 경우 *eae_α-tir_α-espA⁻-espB_α-espD⁻*의 유전자형을 보였고, EPEC O55:H7은 모두 *eae_γ-tir_γ-espA_γ-espB⁻-espD_γ*를 EPEC O111:H12의 경우는 *eae_γ-tir_γ-espA_γ-espB⁻-espD⁻*의 유전자형을 나타내었다. 이처럼 대부분의 균주가 *eae*와 *tir*, 그리고 *espA*와 *espB* 유전자에서 동종의 조합을 보여주었으나, 특이하게 EHEC O111:H⁻ 균주의 *eae_γ-tir_α-espA_α-espB_α-espD⁻*의 유전자형에서는 상이한 연관성을 나타내기도 하였다 (Table 5).

고 찰

개발도상국에서 EPEC는 유아 설사증의 주요한 원인균으로, 소장 점막의 상피세포에 부착 증식함으로써 장염을 일으키며 주요한 혈청형은 O55, O86, O111, O126 등이다. EHEC은 주로 혈청형 O157, O26, O111, O113, O146 등이 보고되고 있으며, 특히 어린이와 노인에게 있어서 HUS를 일으키고 장관에 장착 후 Stx를 생산하여 장관상피세포와 신장상피세포에 장애를 일으킨다 (22). 이러한 EHEC는 배로독소생성대장균 혹은 시가독소생성대장균 (verotoxin or shigatoxin-producing *E. coli*, VTEC or STEC)으로 명명되기도 하며, Stx

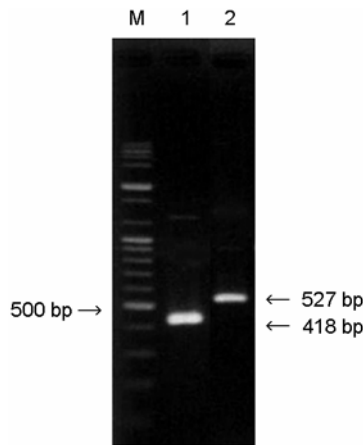


Figure 2. Multiplex PCR to distinguish an intact *selC* locus from one disrupted by LEE. Primers K255 and K260 are predicted to produce a 418 bp amplicon in strains containing a LEE-disrupted locus. Primers K261 and K260 produced the 527 bp amplicon in strains indicating an intact *selC* locus. Lane M, 100 bp plus ladder (molecular weight markers); lane 1, *E. coli* EDL933 (*stxI*⁺, *stx2*⁺, control strains); lane 2, EHEC strain (O111:H⁻).

Table 5. Presence and typing of LEE-related genes in AEEC strains

Strains	Sources	<i>selC</i> disrupted by LEE	Pathotype ^a	No. of strains	Serotype
EHEC	PNUH CSEAS KUH	yes	<i>eae_γ-tir_γ-espA_γ-espB_γ-espD_γ</i>	2	O157:H7
		yes	<i>eae_γ-tir_γ-espA_γ-espB_γ-espD_γ</i>	20	O157:H7
		yes	<i>eae_γ-tir_γ-espA_γ-espB_γ-espD_γ</i>	16	O157:H7, O157:H ⁻
		yes	<i>eae_α-tir_α-espA⁻-espB_α-espD⁻</i>	2	O157:H45
		yes	<i>eae_β-tir_β-espA_β-espB_β-espD_β</i>	2	O26:H11
		no	<i>eae_γ-tir_α-espA_α-espB_α-espD⁻</i>	2	O111:H ⁻
EPEC	KUH	yes	<i>eae_γ-tir_γ-espA_γ-espB⁻-espD_γ</i>	6	O55:H7
		no	ND	3	O55:H10
		yes	<i>eae_α-tir_α-espA_α-espB_α-espD_α</i>	2	O55:H6
		no	ND	1	O55:H ⁻
		yes	<i>eae_γ-tir_γ-espA_γ-espB⁻-espD⁻</i>	2	O111:H12
EHEC (EDL933)	Control strain	yes	<i>eae_γ-tir_γ-espA_γ-espB_γ-espD_γ</i>	1	O157:H7

^aND, not detected; no amplification in PCR with primers used in this study

의 생성은 *stx* 유전자를 갖고 있는 용원세균과지 (lysogenic bacteriophage)의 감염으로 전달된다 (44). 특히 Stx2가 Stx1의 독소보다 강하다고 보고되고 있고, 대부분의 사람에서 일으키는 중증 질병의 증상들은 Stx2만을 생성하거나 동시에 생성되는 것으로 나타난다 (37). 본 연구에서는 일본 Kyushu 대학병원에서 분리된 AEEC 36균주를 대상으로 혈청형과 Stx의 생성능을 확인한 결과, 22균주의 EHEC에서는 혈청형 O157이 18균주로 가장 많이 나타났고, O26과 O111 등도 각각 2균주씩 확인되었으며, 14균주의 EPEC에서는 대부분이 O55 (12균주)로 나타났고 나머지 2균주는 O111로 확인되었다. 이들의 Stx의 생성능은 EPEC를 제외한 EHEC에서만 특징적으로 나타나는 결과를 보여주었으나, 이 중 O157:H7 2균주와 O157:H45 2균주에서는 Stx를 생성하지 않았다. 또한 국내의 O157:H7과 일본의 Kyoto 대학에서 분양받은 O157:H7에서는 모두 양성으로 나타났으며, 병원성이 강한 O157의 경우 대부분의 균주들이 Stx1과 Stx2를 동시에 검출되거나 병원성이 강한 Stx2가 주로 나타났고, Stx2의 경우 주로 Stx2f의 아형을 가지는 것으로 나타났다.

AEEC의 병원성 기전은 최근의 연구에 의하면 장관조직에 A/E lesion이라고 부르는 특징적인 장애를 일으키는 것과 A/E lesion의 형성에 *eae*라고 부르는 염색체상 유전자가 관여한다고 보고되었다 (22). EPEC가 보유하는 *eae* 유전자는 국제성 부착에 관련하는 BFP를 지령하는 EAF (*E. coli* adherence factor) plasmid와 더불어 A/E 병변에 관계하는 유전자의 하나이며, EPEC나 대부분의 EHEC가 보유하지만 혈청형에 따라서 *eae* 유전자의 상동성이 다르고 (18) ETEC나 EIEC에서는 검출되지 않는 것으로 알려져 있다 (26). 이는 McDaniel 등 (35)과 Perna 등 (40)에 의하여 사람에서 분리된 EPEC 균주 E2348/69와 EHEC 균주 EDL933에서 A/E 병변의 형성에 관여하는 약 40개의 유전자들이 염색체상의 LEE에 존재하고 있음이 밝혀졌고, EPEC, EHEC 외에도 *Hafnia alvei*, *Citrobacter rodentium*을 비롯하여 A/E 병변을 야기하는 모든 장관 병원체에 보존된 PAI로 부착소 (intimin), TTSS, Tir 및 Esp 등 병원성에 관련된 여러 가지 effector를 지령하는 유전자를 포함하고 있다 (35). 경구 감염된 AEEC가 소장 에 도달한 후 BFP를 매개로 장관상피세포 (enterocyte)에 부착하는 초기 부착 (initial adherence)을 시작으로 TTSS와 그것에서 분비되는 단백질에 의해 세균과 숙주세포 사이에 교교구조 또는 숙주세포막상에 작은 pore를 형성하여 균체내의 effector들을 숙주세포내로 이동시킨다. 이러한 미세구조 장치는 흡사 주사바늘로 주입하는 것과 같다고 하여 needle 복합체 (needle complex)라고 묘사되기도 한다. 따라서 세균 부착부위에서 미세융모 (microvilli)의 소멸이 일어나는 A/E 병변과 함께 세균이 부착된 하부는 세포골격형성에 관여하

는 여러 가지 인자 즉, actin, α -actinin, myosin light chain, ezrin 및 talin의 축적으로 상피세포가 기둥다리구조 (pedestal-like structure)의 형성을 유도하여 세포막 actin 구조의 붕괴를 일으킨다 (16,31). 이 시기에 견고한 후기 부착 (intimate adherence)이 성립되며 A/E 병변의 형성에 직접 관여하는 effector는 Tir인 것으로 밝혀졌다 (11).

이처럼 A/E 병변의 작용기전이나 관련 인자들이 밝혀지면서 LEE에 관련된 병원성 단백질들의 구조와 특징들에 대한 연구들도 활발히 진행되었다 (7,17). 비록 사람에서 분리된 EHEC 혈청형 O157:H7 (35,40)과 토끼에서 분리된 EPEC 균주 RDEC-1 혈청형 O15 (28)와 몇 종류의 소에서 분리된 AEEC (20)에서 삽입 위치 (insertion site)와 길이의 차이가 보고되고 있지만, 모두 사람에서 분리된 EPEC 균주 E2348/69와 관련 있는 LEE를 보유하고 있으며, 사람에서 분리된 EPEC, EHEC 그리고 토끼에서 분리된 EPEC 균주로부터 *eae*, *tir*와 *esp* 유전자의 변이체의 염기서열이 보고되었다 (15, 39,40). 또한 개에서 분리된 EPEC (6)와 소에서 분리된 EHEC (9)의 *eae*도 밝혀졌으며, 토끼와 소에서 분리된 균주의 *eae* 유전자는 δ 형, 사람에서 분리된 균주의 *eae* 유전자 변이체는 α , β , γ 그리고 δ 형으로 PCR과 유전자 probe으로 분류되고 있다 (5). 이와 같은 intimin의 다양성은 혈청형에 따른 연관성을 나타내기 때문에 계통발생학적으로 형성되며, China 등 (10)과 Goffaux 등 (19)의 연구에서는 *eae* 뿐만 아니라 *tir*와 *esp* 유전자들에 대해서도 α , β 그리고 γ 의 유형분석을 위한 multiplex PCR법을 개발하여 소와 사람에서 분리된 AEEC에 대한 병원형을 비교하였다.

본 연구는 환자에서 분리된 AEEC 균주에서 PCR법을 통하여 LEE 염기배열의 존재를 확인하고 LEE 관련 유전자들의 보유 현황과 변이체에 대한 검토를 실시하였다. 그 결과 국내 및 Kyoto 대학의 모든 O157:H7 균주와 Kyushu 대학의 대부분 균주에서 LEE가 염색체상의 *selC* 유전자에 위치하고 있음이 확인되었으나, EHEC O111:H⁻와 EPEC O55:H⁻ 및 O55:H10 균주의 경우 LEE가 *selC* 유전자 이외의 염색체상에 위치하고 있음을 알 수 있었다. 또한 multiplex PCR법에 의하여 LEE에 위치한 여러 가지 유전자 (*eae*, *tir*, *espA*, *espB* 및 *espD*)의 변이체를 검출하여 혈청형에 따른 병원형도 확인할 수 있었다. 먼저 LEE 관련 유전자들이 대부분의 AEEC 균주에서 검출되었으며 특히 O157:H7을 비롯하여 O26:H11과 O55:H6에서 모든 유전자들을 보유하는 것으로 나타났다. 또한 O55:H7의 경우 *espB* 유전자를 제외한 나머지 유전자를 보유하며, *espD* 유전자의 경우 O111에서는 전혀 나타나지 않았다. 또한 LEE 관련 유전자들의 변이체를 확인해 본 결과 *eae*와 *tir* 유전자는 *eae_γ*와 *tir_γ*형이 가장 많았으며, *esp* 유전자의 경우, *espA_γ*와 *espB_γ*형이 주로 관찰되었다. 이처럼

intimin을 지령하는 *eae* 유전자와 intimin 수용체를 지령하는 *tir* 유전자 사이의 연관성은 주로 동종의 조합 (homologous combination)으로 나타났으나 간혹 H항원이 형별되지 않은 O111 균주의 경우 상이한 *eae_γ*와 *tir_α*의 결과를 보여주었고, *espA*와 *espB* 유전자 사이의 유형들이 확실하게 일치하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 유전자간의 조합은 China 등 (10)과 Goffaux 등 (19)의 연구에서도 보고되었으며, 최근 국내의 김 등 (2)의 연구에서도 확인되었다. 더불어 LEE 관련 유전자들의 변이체에 대한 병원형은 크게 3가지 즉, O157:H45를 제외한 대부분의 O157 균주에서 *eae_γ-tir_γ-espA_γ-espB_γ-espD_γ*의 유형을 보여주었고, O26:H11과 O55:H6의 경우는 각각 *eae_β-tir_β-espA_β-espB_β-espD_β* 및 *eae_α-tir_α-espA_α-espB_α-espD_α*의 유전자형을 나타내었다. 이러한 결과는 Goffaux 등 (19)의 결과와 알려진 개와 고양이에 존재하는 3가지 병원형과 사람에서 분리된 AEEC 분리주에서 역시 발견된 병원형의 결과와 일치하며, China 등 (10)의 연구에서 보고한 소에서 분리된 AEEC 분리 균주에서 얻어진 결과와도 일치하였다. 이는 사람에서 분리된 균주의 LEE의 여러 가지 구성요소가 소에서 분리된 AEEC에서도 같이 구성되어 있는 것으로 사료되며, LEE에 관련된 다른 병원성 단백질 유전자의 다양성들이 계통발생학적인 연관성을 가지고 있음을 보여주고 있다 (39). 한편 O111:H⁻ 균주에서 *eae_γ-tir_α-espA_α-espB_α-espD⁻*의 유형을 나타내었으나, O111:H12의 경우는 *eae_γ-tir_γ-espA_γ-espB⁻-espD⁻*의 유전자형을 보여주어 혈청형과의 상관관계에 대한 연구의 필요성도 제기되고 있다.

최근 세균감염증은 항생제의 발달로 일시적으로 극복되었으나, 면역력이 저하된 숙주에서 야기되는 기회감염증이나 항생제 다제내성균에 의한 감염증의 증가로 인하여 항생제에 의존하지 않고 병원세균을 제압하는 방법의 개발이 주목되고 있다. 특히 살모넬라, *Yersinia*, EHEC O157을 포함한 병원성 대장균 등 많은 그람음성 병원균 이외에 기도감염균, 백일해균을 포함한 *Erwinia*속 세균 등 식물병원균에서도 TTSS의 구조물을 이용하여 사람을 비롯한 동물, 식물 등 고등진핵생물에 병원인자를 효율적으로 이동시키는 것이 밝혀졌으며, 자연환경과 같은 숙주외 환경에서는 TTSS가 균체 표층에는 발현하지 않으나 설혹 발현되어도 분비활성이 정지된다 (12). 더불어 대장균에 의해 생성된 표면 단백질에 대한 숙주의 면역성에 대한 연구들이 진행되면서 최근 김 등 (1) 및 손과 Gannon (4)의 보고에 의하면 숙주에 대한 intimin의 면역성이 상당히 높음을 알 수 있으며, Donnenberg 등 (12~14)의 일련의 연구결과에서처럼 intimin을 이용한 대장균 O157:H7의 백신 개발 가능성을 제시하고 있다. 실제로 병원세균의 TTSS를 유전적으로 결손시켜 불활성화 시키면 병원성은 극히 약해져 잃게 되며, 이 분비장치를 갖는 병원세균

은 병원성을 발휘할 수 없으므로 예방이 가능할 것이다. 이러한 감염증 제어를 위한 TTSS의 구조나 기능의 해석은 병원세균에 특이적으로 작용하는 약제의 개발을 위하여 TTSS나 effector에 대한 항체의 이용이나 약제 및 백신의 개발 등과 같은 연구가 세계적으로 매우 활발하게 수행되고 있으며 세균의 TTSS 발현에 관여하는 quorum sensing의 매개체인 자가유도인자 (autoinducer) 효소를 저해하는 약제의 개발도 TTSS의 발현을 특이적으로 제어하는 하나의 방법일 것이다.

따라서 여러 가지 병원세균에 보존되어 있는 TTSS의 구성 단백질의 구조나 사람과 동물유래의 병원성 단백질 유전자의 다양성들을 연구함으로써 TTSS를 표적으로 하는 병원세균의 예방법이나 치료법을 개발하여 다른 병원세균의 제어에도 다양하게 응용될 수 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 김도균, 이상래, 김정우: 장출혈성 대장균 O157:H7 유래 재조합 intimin의 발현과 그의 면역반응 효과. 동물자원지 **46**: 495-502, 2004.
- 2) 김선희, 송현제, 정재근, 하동룡, 류필열, 이종빈: 광주 지역에서 분리된 장병원성 대장균의 표현형 및 유전자형 특성에 관한 연구. *J Bac Virol* **36**: 167-174, 2006.
- 3) 김영부: 설사환자에 분리한 장관출혈성 대장균 O157:H7의 병원인자와 Arbitrarily-primed polymerase chain reaction의 형별. *J Bac Virol* **31**: 123-131, 2001.
- 4) 손원근, Gannon VP: *Escherichia coli* O157:H7 intimin의 expression 및 C-terminal 부위의 특징. *Kor J Vet Publ Hlth* **25**: 133-140, 2001.
- 5) 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* **36**: 662-668, 1998.
- 6) An H, Fairbrother JM, Dubreuil D, Harel J: Cloning and characterization of the *eae* gene from a dog attaching and effacing *Escherichia coli* strain 4221. *FEMS Microbiol Lett* **148**: 239-245, 1997.
- 7) Boerlin P, Chen S, Colbourne JK, Johnson R, De Grandis S, Gyles C: Evolution of enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin plasmids and the locus for enterocyte effacement in shiga toxin-producing *E. coli*. *Infect Immun* **66**: 2553-2561, 1998.
- 8) Cebula TA, Payne WL, Feng P: Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their

- shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **33**: 248-250, 1995.
- 9) **China B, Devrin AC, Jacquemin E, Pirson V, Mainil J:** Heterogeneity of the eae genes in attaching/effacing *Escherichia coli* from cattle: comparison with human strains. *Res Microbiol* **150**: 323-332, 1999.
 - 10) **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.
 - 11) **Donnenberg MS, Lai LC, Taylor KA:** The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes secretion functions and remnants of transposons at its extreme right end. *Gene* **184**: 107-114, 1997.
 - 12) **Donnenberg MS, Tacket CO, James SP, Losonsky G, Nataro JP, Wasserman SS, Kaper JB, Levine MM:** Role of the eaeA gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest* **92**: 1412-1417, 1993.
 - 13) **Donnenberg MS, Tacket CO, Losonsky G, Frankel G, Nataro JP, Dougan G, Levine MM:** Effect of prior experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection on illness following homologous and heterologous rechallenge. *Infect Immun* **66**: 52-58, 1998.
 - 14) **Donnenberg MS, Tzipori S, McKee ML, O'Brien AD, Alroy J, Kaper JB:** The role of the eae gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *J Clin Invest* **92**: 1418-1424, 1993.
 - 15) **Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Donnenberg MS, Kaper JB:** The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**: 1-4, 1998.
 - 16) **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* **60**: 2541-2543, 1992.
 - 17) **Gannon VP, Rashed M, King RK, Thomas EJ:** Detection and characterization of the eae gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **31**: 1268-1274, 1993.
 - 18) **Giron JA, Donnenberg MS, Martin WC, Jarvis KG, Kaper JP:** Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **168**: 1037-1041, 1993.
 - 19) **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.
 - 20) **Goffaux F, Mainil J, Pirson V, Charlier G, Pohl P, Jacquemin E, China B:** Bovine attaching and effacing *Escherichia coli* possess a pathogenesis island related to the LEE of the human enteropathogenic *E. coli* strain E2348/69. *FEMS Microbiol Lett* **154**: 415-421, 1997.
 - 21) **Gyles CL:** *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can J Microbiol* **38**: 734-746, 1992.
 - 22) **Honda T:** Factors influencing the development of hemolytic uremic syndrome caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection: from a questionnaire survey to in vitro experiment. *Pediatr Int* **41**: 209-212, 1999.
 - 23) **Imberechts H, De Greve H, Lintermans P:** The pathogenesis of edema disease in swine. *Vet Microbiol* **31**: 221-233, 1992.
 - 24) **Jarvis KG, Giron JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS, Kaper JB:** Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7996-8000, 1995.
 - 25) **Jarvis KG, Kaper JB:** Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* **64**: 4826-4829, 1996.
 - 26) **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* **87**: 7839-7843, 1990.
 - 27) **Kaper JB, Elliott S, Sperandio V, Perna NT, Mayhew GF, Blattner FR:** Attaching and effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. In: Kaper JB, O'Brien AD (Eds.): *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains. American Society for Microbiology, Washington, DC 163-182, 1998.
 - 28) **Karaolis DKR, McDaniel TK, Kaper JB, Boedeker EC:** Cloning of the RDEC-1 locus of enterocyte effacement (LEE) and functional analysis of the phenotype on Hep-2 cells. *Adv Exp Med Biol* **412**: 241-245, 1997.
 - 29) **Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB:** Enteropathogenic (EPEC) *E. coli* transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520, 1997.

- 30) **Kim YB, Okuda J, Matsumoto C, Morigaki T, Asai N, Watanabe H, Nishibuchi M:** Isolation of an *Escherichia coli* O157:H7 strain producing Shiga toxin 1 but not Shiga toxin 2 from a patient with hemolytic uremic syndrome in Korea. *FEMS Microbiol Lett* **166**: 43-48, 1998.
- 31) **Knutton S:** Attaching and effacing *E. coli*. In: Gyles CL. (Ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford 567-591, 1994.
- 32) **Knutton S:** Cellular responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Biosci Rep* **15**: 469-479, 1995.
- 33) **Kresse AU, Beltrametti F, Muller A, Ebel F, Guzman CA:** Characterization of SepL of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**: 6490-6498, 2000.
- 34) **Lai LC, Wainwright LA, Stone KD, Donnenberg MS:** A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infect Immun* **65**: 2211-2217, 1997.
- 35) **McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB:** A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1664-1668, 1995.
- 36) **Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, Donnenberg MS, Kaper JB:** The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* **33**: 296-306, 1999.
- 37) **Nataro JP, Kaper JB:** Diarrhoeagic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201, 1998.
- 38) **Osek J:** Development of a multiplex PCR approach for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *J Appl Microbiol* **95**: 1217-1225, 2003.
- 39) **Paton AW, Mannig PA, Woodrow MC, Paton JC:** Translocated intimin receptor (Tir) of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates belonging to serogroups, O26, O111, and O157 react with sera from patients with hemolytic-Uremic syndrome and exhibit marked sequence heterogeneity. *Infect Immun* **66**: 5580-5586, 1998.
- 40) **Perna N, Mayhew GF, Posfai G, Elliott S, Donnenberg MS, Kaper JB, Blattner FR:** Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **66**: 3810-3817, 1998.
- 41) **Schmidt H, Scheff J, Morabito S, Caprioli A, Wieler LH, Karch H:** A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1205-1208, 2000.
- 42) **Wang G, Clark CG, Rodgers FG:** Detection of *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* **40**: 3613-3619, 2002.
- 43) **Zhu C, Agin TS, Elliott SJ, Johnson LA, Thate TE, Kaper JB, Boedeker EC:** Complete nucleotide sequence and analysis of the locus of enterocyte effacement from rabbit diarrheagenic *Escherichia coli* RDEC-1. *Infect Immun* **69**: 2107-2115, 2001.
- 44) **Zweifel C, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Stephan R:** Serotypes and virulence genes of ovine non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Switzerland. *Int J Food Microbiol* **95**: 19-27, 2004.