

소아 설사환자에서 분리된 장병원성 대장균의 분자생물학적 특성

전남대학교 의과대학 소아과학교실¹, 비브리오패혈증 연구소, 장관계 감염 세균 유전체 연구센터 및 미생물학교실²
 김선영¹ · 조태형¹ · 최정화² · 황란희² · 최영륜¹ · 류필열²

Phenotypic and Genotypic Characteristics of Enteropathogenic *E. coli* Isolated from Children with Diarrhea in Gwangju City

Sun Young Kim, M.D.¹, Tae Hyung Cho, M.D.¹, Jinghua Cui, M.D.², Lanji Huang, M.D.², Young Youn Choi, M.D.¹ and Phil Youl Ryu, M.D.²

Department of Pediatrics¹, Research Institute of Vibrio Infection and Genome Research Center for Enteropathogenic Bacteria, Department of Microbiology², Chonnam National University Medical School, Gwangju, Korea.

Background : Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) commonly causes infantile diarrhea in the developing countries. This study aims to find out the phenotypic and genotypic characteristics of EPEC in children with diarrhea in Gwangju city.

Methods : We isolated 35 strains from the stool obtained from diarrheal patients and investigated the presence of various virulence genes, adherence patterns, hemolysis, and antibiotic resistance patterns.

Results : All isolates were negative for the EPEC adherence factor (EAF) plasmid, and 14 isolates were *bfpA*-positive by PCR. The *eae*, *tir*, *espA*, and *espB* genes were analyzed by multiplex PCR. When the results of the four multiplex PCRs were analysed, we observed that the rate of the presence of *eae_v-tir_α-espA_α-espB_α* was highest. The incidence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin (east) was 17.1%. Analysis of Hep-2 cell adherence showed three adherence patterns: the localized adherence pattern, the diffuse adherence pattern, the localized adherence-like pattern. In hemolysin assay, four isolates produced enterohemolysin. The resistance rate of isolates against tetracycline, streptomycin, ampicillin, and rifampin was 56%, 39%, 34%, and 34%, respectively. All isolates were susceptible to ciprofloxacin and colistin.

Conclusion : In our study, the rate of the presence of *eae_v-tir_α-espA_α-espB_α* was the highest. Analysis of Hep-2 cell adherence showed various adherence patterns. Seventy-five percent of isolates were resistant to at least one antibiotic and 28% were resistant to four or more antibiotics.

Key Words : EPEC, Childhood diarrhea

서 론

대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*)은 Enterobacteriaceae에 속하는 그람음성간균으로서 통성 혐기성이고 아포를 형성하지 않는다. 대장균은 온혈동물의 대장 부위에 상재

하는 세균으로 대부분 비병원성이지만 일부는 사람과 어린 동물에서 다양한 장 질병과 설사 증상을 유발하는 것으로 밝혀져 있다. 설사를 유발시키는 대장균은 장독소생성 대장균(enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), 개발도상국에서 유아설사의 주요 원인으로 소장의 점막세포에 부착하고 미세용모의 탈락을 일으키는 장병원성 대장균(enteropathogenic *E. coli*, EPEC), Shigella 군속처럼 장상피세포 내로 침투, 증식하여 세포를 파괴하는 장침투성 대장균(enteroinvasive *E. coli*, EIEC), 급성 및 만성 설사를 일으키는 장응집성 대장균(enteroaggregative *E. coli*, EAEC) 및 verotoxin (VT)을 생산하여 출혈성 장염이나

Submitted 17 October, 2005, accepted 2 November, 2005

Correspondence : Phil Youl Ryu, M.D.

Department of Microbiology, Chonnam National University Medical School, 8 Hack-dong, Dong-gu, Gwangju, 501-746, Korea

Tel : +82-62-220-4135, Fax : +82-62-228-7294

E-mail : pyryu@chonnam.ac.kr

용혈요독증후군을 일으키는 장출혈성 대장균(*enterohemorrhagic E. coli*, EHEC) 등 5개 주요 균으로 나누어진 다(1). 이들 병원성 대장균은 대개 감염증이 진행되는 과정에 관찰되는 임상증상이나 염색체 또는 plasmid에 존재하는 병원성 유전자(virulence gene)의 유무로 분류하고 있다.

EPEC는 개발도상국에서 유아 설사의 주된 원인균으로 알려져 있다(1). 이 균은 O항원에 의해 12개의 혈청형으로 나뉘며(2) 조직배양세포에 부착하는데 국부적 부착(localized adherence, LA)을 하는 특성이 있다(3). LA 형태의 부착은 세포와 세균을 3시간 배양하면 나타나며 세포 표면의 한 쪽 부위에 부착하며 세균이 compact한 cluster를 형성한다(3). 이러한 현상은 EPEC adherence factor (EAF)라는 plasmid에 의해 형성된다(4). 또한 이 EAF plasmid에는 세균간에 microcolonies를 형성하고 안정시키는데 관여하는 bundle-forming pili (BFP)를 형성하는 유전자가 있다(5).

EPEC가 설사를 일으키는 중요한 기전은 attaching and effacing (A/E)의 병소를 형성하는데 이것은 미세용모의 손상, 장관 상피세포에 세균의 부착, pedestal 형성과 세균이 부착한 부위에 actin과 다른 cytoskeleton의 응집이 형성되며, 이 A/E 병소는 EHEC와 다른 종의 세균에서도 관찰된다(1).

A/E 병소의 형성에 관여하는 유전자는 35.5 kb의 pathogenicity island인 locus of enterocyte effacement (LEE)에 존재한다(6). LEE 유전자 부위에는 type III secretion system, Esps, intimin, Tir에 대한 유전자가 위치한다. Intimin은 94-kDa의 외막단백으로서 세균이 숙주의 장관 상피와 긴밀한 부착에 관여하는 세균외막 부착소로 작용하며 EPEC 및 EHEC의 혈청형에 따라 다르고 최소한 5개 이상의 변이가 알려져 있으며, *E. coli* attachment effacement (*eae*)유전자에 의해 조절된다. Esp 분자(EspA, EspB 및 EspD)는 숙주세포 내로 세균 단백질의 translocation과 signal transduction과 관련이 있는 분비성 단백질이다. Tir은 숙주세포의 세포막으로 translocation되어 intimin에 대한 receptor로 작용한다.

최근 여러 연구자에 의해 EAF plasmid와 Shiga toxin에 대한 유전자 없이 *eae* 유전자만을 가지고 있으면서 대부분 EPEC 혈청형에 속하지 않는 균주가 급성 유아 설사환자로부터 분리 보고되고 있다. EPEC에 대한 분자생물학적 특성의 규명이 EPEC 감염증의 역학적 연구에 중요하다. 따라서 본 연구에서는 최근 광주지역의 소아 설사환자에서 분리된 대장균 중 *eae* 유전자를 가진 균주

의 특성을 조사하고자 LEE 유전자의 특성과 HEp-2 세포주에 대한 부착능을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 대상환자 및 가검물 채취

2003년 5월부터 8월 까지 광주시내에 소재한 3개의 소아과 병원에 내원한 설사 환자를 대상으로 대변이나 rectal swab으로 검체를 채취하였다. 환자의 임상 특성을 파악하기 위해 나이, 성별, 설사기간, 항생제 투여여부, 특징적인 임상증상(혈변, 점액성 또는 수액성, 오심, 복통, 기간)을 조사하였다.

2. 검체로부터 병원성 대장균의 분리 및 동정

환자로부터 채취한 검체를 MacConkey agar plates (Difco Laboratories, Detroit, MI)에 접종하고 37°C에서 18시간 배양하였다. MacConkey agar plates에서 자란 대장균으로 의심되는 균집락 10개 이상을 골라 멸균된 증류수 1 mL에 현탁시켜 원심하고 상청액을 버린 후, 0.2 mL의 증류수에 다시 부유시키고 100°C에서 10분간 처치하였다. 균액을 원심하여 상청액 3 μ L를 중합효소연쇄반응(PCR)을 위한 DNA template로 사용하였다. 병원성 유전자에 대한 PCR 반응이 양성으로 나온 검체에서 각각의 균 집락을 채취하여 다시 중합효소 연쇄반응을 실시하여 병원성 유전자를 확인하고, 최종적인 동정은 API 20E test (Biomeriex, La Balme les Grottes, France)를 실시하였다.

3. 중합효소 연쇄반응(PCR)

네가지 종류의 병원성 대장균을 검출하기 위해 PCR 반응에 이용하는 primer는 여러 종류의 병원성 유전자를 검출할 수 있도록 하였으며, 염기서열은 Lopez-Saucedo 등(7)이 보고한 multiplex PCR에 적합한 primer set (Table 1)를 사용하였다. PCR 반응은 Eppendorf thermal cycler로 증폭하였다. 반응액은 20 μ L가 되도록 하며 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 μ M의 primers, 1 U의 polymerase에 2 μ L의 DNA template를 첨가하였다. PCR 반응은 94°C에서 먼저 5분간 denaturation 시킨 후 94°C, 50°C, 72°C에서 각각 45초간 30회 반응시키고 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 실시하여 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 증폭여부를 확인하였다.

Table 1. Target Genes, Sequences of PCR Primers, and Product Sizes

Pathotype	Genes	Primers	Product size (nucleotides)
EPEC	<i>eae</i>	5'-GACCCGGCACAAGCATAAGC-3'	384
		5'-CCACCTGCAGCAACAAGAGG-3'	
	<i>bfpA</i>	5'-AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC-3'	324
		5'-GCCGCTTTATCCAACCTGGTA-3'	
	EAF plasmid	5'-CAGGGTAAAAGAAAGATGATAA-3'	397
		5'-TATGGGGACCATGTATTATCA-3'	
EIEC	<i>ial</i>	5'-GGTATGATGATGATGAGTCCA-3'	650
		5'-GGAGGCCAACAAATTATTTCC-3'	
ETEC	LT	5'-GGCGACAGATTATACCGTGC-3'	450
		5'-CGGTCTCTATATTCCTGTT-3'	
	ST	5'-ATTTTCTTTCTGTATTGTCTT-3'	190
		5'-CACCCGGTACAAGCAGGATT-3'	
<i>eaeC</i>	<i>aggC</i>	5'-GCCAAGATCCGAGATTGA-3'	528
		5'-TATTAAACCATGGTAGCG-3'	
	<i>east-1</i>	5'-CCATCAACACAGTATATCCGA-3'	111
		5'-GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT-3'	

4. 항균제 감수성 검사

분리균주에 대한 항균제 감수성 시험은 디스크 확산법에 의하여 실시하였다. 대조균주로는 *Escherichia coli* ATCC 25922를 사용하였으며, 사용된 항균제 디스크는 ampicillin (Am 10 µg), cephalothin (Cf 30 µg), gentamicin (Gm 10 µg), kanamycin (Km 30 µg), streptomycin (Sm 10 µg), tetracycline (Te 30 µg), nalidixic acid (Na 30 µg), sulfamethoxazol (Sxt 30 µg), ciprofloxacin (Cip 5 µg), rifampin (Ra 5 µg), colistin (Cl 10 µg) 등 총 11종을 사용하였다. Brain Heart Infusion medium에서 배양된 균을 Müller Hinton broth (Difco)에 접종하여 37℃에서 6시간 배양 후, 균액의 농도를 MacFarland scale No. 0.5가 되도록 0.85% NaCl saline으로 희석하여 Müller Hinton medium (Difco)에 고루 도말한 다음, 항균제 디스크를 30 mm간격으로 위치시키고 37℃에서 18시간 배양하여, zone reader로 발육억제대를 측정하였으며, 감수성은 National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)의 기준에 의하여 판정하였다.

5. HEp-2 세포 부착능 시험

HEp-2 세포는 penicillin과 streptomycin 그리고 10% fetal bovine serum이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco BRL, Gaithersburg, Md)으로 2×10^5 cell/mL가 되도록 희석하여 8-well chamber slides (Labtek, Scotts Valley, Calif)의 각 well에 400 µL씩 접종

하였다. 접종된 slides는 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하여 단층을 형성하도록 하였다. 70% 정도의 단층이 이루어지면, PBS로 3회 세척하고, 항균제가 첨가되지 않고 1% D-mannose와 2% fetal bovine serum만이 첨가된 DMEM으로 배지를 교환하였다. 여기에 배양된 세균을 각 well에 8 µL (1:50) 씩 접종하여 6시간동안 배양한 다음, PBS로 3회 세척하고 Giemsa 염색을 시행하여 1,000배 광학현미경으로 관찰하여 부착능을 판정하였다.

6. Hemolysin 생성능 시험

분리균주의 hemolysin 생성능을 검사하기 위해서 배양된 세균을 5% sheep blood가 함유된 한천배지에 일직선으로 접종한 후 24시간 37℃에서 배양하여 세균집락 주변에 투명대가 형성되면 양성으로 판정하였다.

7. EPEC의 *eae*, *tir*, *espA* 및 *espB* 유전자의 유형분석을 위한 multiplex PCR

분리된 EPEC의 유전자의 다양성을 조사하기 위해 multiplex PCR를 실시하였다. PCR 반응은 Eppendorf thermal cycler로 증폭하였다. 반응액은 20 µL가 되도록 하며 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1 µM의 primers, 1 U의 polymerase에 5 µL의 DNA template를 첨가하였다. 각각의 유전자형 분석에 사용된 primer는 Table 2와 같다(8). 또한 *espD* 유전자의 보유 유무를 관찰하기 위해 Goffaux 등 (9)의 방법에 의해 primer를 Table 2와 같이 합성하여

Table 2. Primers Used in Typing *eae*, *tir*, *espA*, and *espB* gene

Genes	Subtypes	Primers	Sequences of the deduced primers	Annealing temp.	Amplicon size (bp)
<i>eae</i>	Type α	B73	TACTGAGATTAAGGCTGATAA	50.4	452
		B138	GACCAGAAGAAGATCCA		
	Type γ	B73	TACTGAGATTAAGGCTGATAA	50.2	778
		B74	AGGAAGAGGGTTTTGTGTT		
	Type β	B73	TACTGAGATTAAGGCTGATAA	50.8	520
		B137	TGTSTGTCGCACTCTGATT		
<i>tir</i>	Type α	B139	CRCKCCAYTACCTTCACA	54.2	342
		B152	CGCTAACCTCCAAACCATT		
	Type γ	B139	CRCKCCAYTACCTTCACA	54.7	781
		B141	GTCGGCAGTTTCAGTTTCAC		
	Type β	B139	CRCKCCAYTACCTTCACA	53.4	560
		B140	GATTTTTCCCTCGCCACTA		
<i>espA</i>	Type α	B163	TGAGGCATCTAARGMGTC	48.9	269
		B165	GCTGGCTATTATTGACCG		
	Type γ	B163	TGAGGCATCTAARGMGTC	47.9	172
		B164	ATCACGAATACCAGTTACCA		
	Type β	B163	TGAGGCATCTAARGMGTC	46.4	101
		B166	TGCCTTTCTTATTCTTGCA		
<i>espB</i>	Type α	B148	GCCGTTTTTGAGAGCCA	50.6	94
		B151	TCCCCAGGACAGATGAGAT		
	Type γ	B148	GCCGTTTTTGAGAGCCA	53.1	188
		B150	GCACCAGCAGCCTTTGA		
	Type β	B148	GCCGTTTTTGAGAGCCA	50.9	233
		B149	CTTTCGTTGCCTTAGT		

R=A+G, K=T+G, Y=C+T, M=A+C

PCR를 실시하였다. PCR 반응은 94℃에서 먼저 5분간 denaturation을 시킨 후 Table 2와 같은 조건으로 25-30 회 반응시키고 마지막으로 72℃에서 5분간 extension을 실시하고 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 증폭 여부를 확인하였다.

8. 성적

1) 조사 대상자의 연령 및 성별 분포

2003년 5월부터 8월까지 가검물의 채취가 가능하였던 환아는 310명였으며 남아는 192명으로 61.9%였으며 여아는 118명으로 38.1%였다. 1세 이하의 영아환자는 104명(33.6%)로 가장 많았으며 다음으로는 1-2세가 67명(21.6%)으로 많았다(Table 3).

2) 분리된 균주의 빈도 및 연령별 장내세균 감염 실태

환아의 가검물로부터 분리 동정된 병원체는 Table 4와 같다. 310개의 검체로부터 병원성 유전자를 보유하고 있어 설사의 원인균으로 의심되는 균은 76개의 검체에서 분리되어 24.5%의 분리율을 보였다. 가장 많이 분리된 균주는 EPEC로 37개(11.9%)의 검체에서 분리되었으며, 다음으로는 ETEC가 16주(5.2%), EAEC가 11주(3.6%) 순이

Table 3. Age and Sex Distribution of Childhood Diarrhea

Age group (month)	Male		Female		Total	
	N	%	N	%	N	%
0-12	62	20.0	42	13.5	104	33.6
13-24	38	12.3	29	9.4	67	21.6
25-36	25	8.1	12	3.9	37	11.9
37-48	17	5.5	7	2.3	24	7.7
49-60	10	3.2	5	1.6	15	4.8
>60	17	5.5	13	4.2	30	9.7
Unkown	23	7.4	10	3.2	33	10.7
Total	192	61.9	118	38.1	310	100.0

Table 4. Age Distribution (%) of 76 Diarrheal Patients Infected with Enteropathogenic Bacteria

Pathogen identified	Age (year)							Total no. (%)
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	>6	
EPEC	10.3	17.9	14.1	2.6	1.3	0	2.6	38 (50.0)
ETEC	16.7	3.8	0	0	0	0	0	11 (14.5)
eaeC	6.4	2.6	1.3	2.6	0	0	1.3	16 (21.1)
Salmonella	3.8	7.7	0	0	1.3	1.3	0	1 (1.3)
EIEC	1.3	0	0	0	0	0	0	10 (13.2)
Total	38.5	32.0	15.4	5.2	2.6	1.3	3.9	38

었으며 EIEC는 1개의 검체에서만 분리되었다(Table 4). 전체적으로 1세 이하가 38.5%로 가장 많았으며 다음으로는 1-2세에서 32.0%, 2-3세 15.4%였으며 3세 이후의 소아에서는 분리율이 낮았다. EPEC는 3세 이하의 유아에서 주로 분리되었으며, ETEC는 주로 2세 이하에 국한되었다. EAEC는 빈도는 낮았지만 주로 4세 이하의 소아에서, *Salmonella*는 주로 2세 이하에서 분리되는 경향을 보였다.

3) 분리된 장병원성 대장균의 병원성 유전자 및 HEp-2 세포에의 부착능

병원성 유전자 중 *eae* 유전자를 보유한 35주의 대장균에 있어 다른 종류의 병원성 유전자의 보유 유무를 PCR로 확인한 결과 EAF plasmid를 보유한 균주는 한주도 없었으며, *bfp* 유전자의 PCR 반응이 양성으로 나온 균주가 14주로 40.0%였다. EAEC 균주에서 생성되는 것으로 알려진 내열성 장독소와 관련이 있는 enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (*east-1*) 유전자를 보유한 균주가 6주로 17.1%였다. 또한 hemolysin을 생성할 수 있는 균주를 조사한 결과 4주(11.4%)에서 양성으로 나왔다(Table 5). EPEC의 표현형적 특징의 하나인 부착능을 HEp-2세포에 대해 실시한 결과 Figure 1과 같이 3가지 형태의 부착능을 보였다. EPEC의 전형적인 부착형태

인 LA pattern을 보인 균주는 2주(5.7%)에서만 관찰되고 비전형적인(atypical) EPEC 균주에서 보이는 부착능인 localized adherence-like (LAL) pattern을 보인 균주는 13주(37.1%)였다. 나머지 20주(57.1%)는 diffuse adherence (DA) pattern을 보였다(Table 5). *bfp* 유전자의 보유 유무와 HEp-2세포에 대한 부착형태 간의 상관관계는 관찰할 수 없었다.

4) 항생제에 대한 내성양상

분리된 장병원성 대장균의 각종 항생제에 대한 내성 빈도는 Figure 2와 같은 결과를 보였다. Ciprofloxacin 및 colistin에 대해서는 모든 균주가 감수성을 보인 반면 tetracycline에 대한 내성빈도가 56%로 가장 높았으며, 다음으로는 streptomycin에 대한 내성이 39%, ampicillin 및 rifampin에 대한 내성이 각각 33%, kanamycin에 대한 내성은 25%였다. 나머지 항생제에 대해서는 20% 미만의 내성빈도를 나타내었다. 분리균주 중 한 가지 이상의 항생제에 내성을 갖는 균주는 26주(70.2%)였다. 특히 8가지의 항생제에 대한 다제내성을 보인 균주는 2주, 6가지 및 5가지 항생제에 대한 다제내성을 보인 균주는 각각 1주, 4가지 항생제에 대한 내성을 보인 균주는 5주였으며, 3가지 항생제에 다제내성을 보인 균주는 7주였다(Table 6).

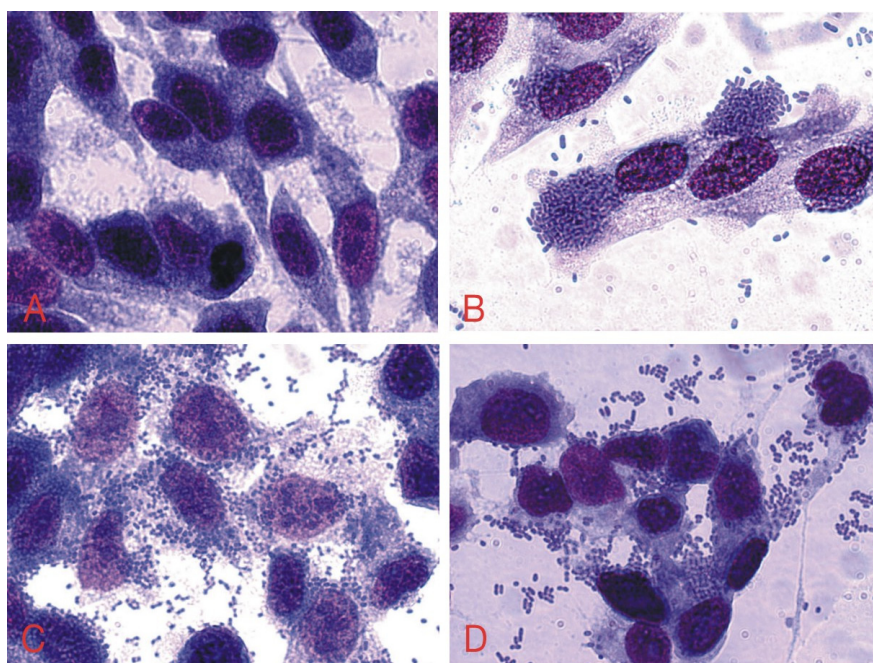


Figure 1. Adherence patterns in HEp-2 cells presented by enteropathogenic *Escherichia coli* isolates carrying *eae* gene. A, Negative control; B, LA pattern of typical EPEC; C, DA pattern; D, LAL pattern.

Table 5. Virulence Gene Profile, HEp-2 Cells Adherent Patterns and Hemolysis of EPEC Isolates

Strain No	Virulence genes				HEp-2 cell Adherence	Hemolysis
	<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>	EAf	<i>eaeA</i> -1		
30M51	+	-	-	+	DA	-
30M53	+	-	-	-	DA	+
30609	+	-	-	-	DA	-
30619	+	+	-	-	LAL	-
30620	+	+	-	-	DA	-
30625	+	-	-	-	DA	-
30628	+	-	-	-	LAL	-
30630	+	+	-	-	LA	-
30632	+	-	-	-	LA	-
30633	+	-	-	-	DA	-
30643	+	+	-	-	DA	-
30656	+	+	-	+	DA	-
30669	+	-	-	-	LAL	-
30673	+	-	-	-	DA	-
30674	+	-	-	-	DA	-
30675	+	+	-	-	DA	+
30677	+	-	-	-	DA	+
30681	+	-	-	-	DA	-
30691	+	+	-	-	LAL	-
30696	+	-	-	-	DA	-
306109	+	-	-	-	DA	-
306120	+	-	-	-	DA	-
30701	+	+	-	-	LAL	-
30703	+	-	-	-	LAL	-
30707	+	+	-	-	DA	-
30712	+	+	-	-	LAL	-
30714	+	+	-	-	DA	-
30715	+	+	-	-	LAL	-
30727	+	-	-	+	LAL	-
30752	+	-	-	+	LAL	-
30761	+	-	-	-	LAL	-
30762	+	+	-	+	LAL	-
30772	+	-	-	+	DA	+
30793	+	+	-	-	DA	-
307112	+	-	-	-	LAL	-
positive strain No. (%)	35 (100.0)	14 (40.0)	0 (0.0)	6 (17.1)	LA : 2 (5.7) DA : 20 (57.2) LAL : 13 (37.1)	4 (11.4)

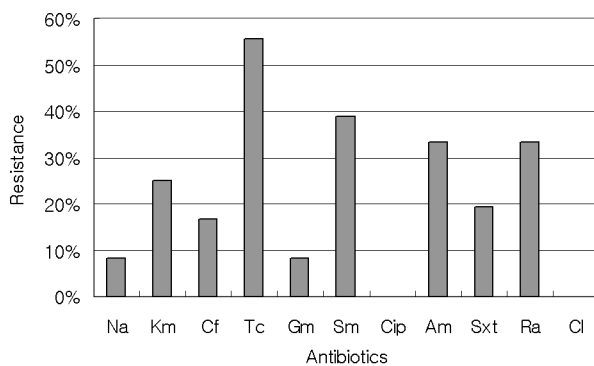


Figure 2. Antimicrobial resistant frequency of enteropathogenic *E. coli* isolates. Abbreviations : see Table 6.

Table 6. Multiple Antibiotic Resistant Patterns of EPEC Isolates

No. of antibiotics	Resistance patterns	No. of strains
8	AmGmKmSmTeNaRaSxt	1
	AmCfGmKmSmTeRaSxt	1
6	AmGmSmTeNaSxt	1
5	ApKmSmTeRa	1
4	AmKmSmTe	1
	AmSmTeSxt	2
	AmTeNaSxt	1
	KmSmTeRa	1
3	AmCfSm	2
	AmCfRa	1
	AmSmTe	1
	KmSmTe	1
	KmTeRa	2
	GmKmSm	1
	SmTeRa	1
2	SmTe	1
	TeRa	1
1	Cf	2
	Te	3
	Ra	1

Am : ampicillin, Cf : cephalothin, Gm : gentamicin, Km : kanamycin, Sm : streptomycin, Te : tetracycline, Na : nalidixic acid, Sxt : sulfamethoxazol, Cip : ciprofloxacin, Ra : rifampin, Cl : colistin

5) *eae*, *tir*, *easA* 및 *easB* 유전자의 형별 및 *espD* 유전자 분포

분리된 EPEC 유전자의 다양성을 조사하기 위해 각각의 type (α , β 및 γ)에 특이적인 primer를 사용하여 multiplex PCR을 시행한 결과 각 type의 분포는 Table 7과 같았다. *eae* 유전자형은 *eae β* 형이 11주(31.4%)로 가장 많았으며, *eae γ* 형은 9주(25.7%), *eae α* 형은 2주(5.7%)였다. 그리고 *eae* 유전자형이 확인되지 않은 균주가 13주 (37.1%)나 되었다. *tir* 유전자에 대한 type은 *tir α* 유전자형이 18주(51.4%)였으며 *tir β* 은 10주(28.6%)였다. *espA*는 대부분이 α type으로 21주(60%)였으며 β type은 10주(28.6%)였다. *espB*유전자도 *espA*와 비슷하게 대부분이 α type으로 19주(54.3%), β type은 13주(37.1%)였다. 특히 이들 세 가지 유전자에 있어 *tir α espA α espB α* 의 조합을 보인 균주가 17주(48.6%)였다. *eae*, *tir*, *easA* 및 *easB* 4가지 유전자의 형별을 정리하였던 바 광주지역에서 분리된 EPEC의 균주는 *eae α tir α espA α espB α* 의 유전자형을 가진 균주가 7주(20%)로 가장 많았으며, 다음으로는 *eae β tir β espA β espB β* 형이 6주(17.1%), *eae β tir α espA α espB α* 이 5주(14.3%)로 많았다 (Table 8).

Table 7. Genotypic Characteristics of *E. coli* Strains Carrying the *eae* Gene

Strains	Type of intimin alleles			
	<i>eae</i>	<i>tir</i>	<i>espA</i>	<i>espB</i>
30M51	β	α	α	α
30M53	β	α	α	α
30609	NT	NT	NT	β
30619	NT	α	α	α
30620	γ	α	α	α
30625	NT	γ	α	α
30628	γ	α	α	α
30630	NT	α	α	α
30632	β	β	β	β
30633	β	β	β	β
30643	NT	β	NT	β
30656	β	β	β	β
30669	β	β	β	β
30673	α	α	α	α
30674	β	α	α	α
30675	NT	NT	NT	NT
30677	NT	β	α	β
30681	β	α	α	α
30691	γ	α	α	α
30696	β	β	β	β
306109	NT	γ	α	α
306120	NT	α	β	NT
30701	γ	γ	β	β
30703	NT	NT	NT	NT
30707	NT	α	α	α
30712	γ	γ	β	β
30714	NT	β	α	β
30715	γ	α	α	α
30727	β	α	α	α
30752	γ	α	α	α
30761	γ	α	α	α
30762	γ	α	α	α
30772	NT	β	β	β
30793	α	α	α	α
307112	β	β	β	β
No. (%) of typable strains	22 (62.9) α : 2 (5.7) β : 11 (31.4) γ : 9 (25.7) NT : 13 (37.1)	32 (91.4) α : 18 (51.4) β : 10 (28.6) γ : 4 (11.4) NT : 3 (8.6)	31 (88.6) α : 21 (60.0) β : 10 (28.6) NT : 4 (11.4)	32 (91.4) α : 19 (54.3) β : 13 (37.1) NT : 3 (8.6)

고 찰

장병원성 대장균은 개발도상국에서 뿐만 아니라 미국, 영국 등과 같은 선진국에서도 신생아에 있어서 흔하게 설사질환을 일으키는 것으로 보고되고 있다(10). 특히, 병원이나 탁아소와 같은 집단 보육시설에서의 발생은 종종 폭발적이고 치명적이다(11-13). 또한 많은 case-control 연구에서 EPEC가 건강한 대조군에 비해 설사증세가 있는 신생아로부터 훨씬 높은 분리율을 보이는 것으로 보

Table 8. Genotypic Frequency of Intimin of EPEC Isolates

Type of intimin	No. of strains	%
<i>eae</i> _{α} <i>tir</i> _{α} <i>espA</i> _{α} <i>espB</i> _{α}	2	5.7
<i>eae</i> _{β} <i>tir</i> _{β} <i>espA</i> _{β} <i>espB</i> _{β}	6	17.1
<i>eae</i> _{β} <i>tir</i> _{α} <i>espA</i> _{α} <i>espB</i> _{α}	5	14.3
<i>eaer</i> <i>tir</i> _{α} <i>espA</i> _{α} <i>espB</i> _{α}	7	20.0
<i>eaer</i> <i>tirr</i> <i>espA</i> _{β} <i>espB</i> _{β}	2	5.7
<i>eaenT</i> <i>tir</i> _{α} <i>espA</i> _{α} <i>espB</i> _{α}	3	8.6
<i>eaenT</i> <i>tir</i> _{β} <i>espA</i> _{β} <i>espB</i> _{β}	1	2.9
<i>eaenT</i> <i>tir</i> _{β} <i>espA</i> _{α} <i>espB</i> _{β}	2	5.7
all NT	2	5.7

고되고 있으며(13, 14), 특히 6개월 미만에서 설사를 유발하는 세균성 병원체중 분리율이 가장 높다고 한다. 서아프리카(15)와 멕시코(16) 및 브라질(17, 18)에서의 연구에 의하면 신생아 설사의 30-40%가 EPEC에 의해 유발되며, 일부 연구에서는 EPEC에 의한 감염이 rotavirus의 감염을 능가한 것으로 보고되고 있다(16, 17, 19). 본 연구에서도 EPEC의 분리율이 가장 높았는데, 전체 310명의 환자에서 38명의 환자로부터 분리되어 12.3%의 분리율을 보였고 병원체가 분리된 전체 76검체의 절반을 차지하여 분리율이 가장 높았다.

EPEC 진단에 가장 유용한 phenotypic assay는 HEp-2 세포 부착능 시험이다. EPEC는 밀접하게 숙주세포와 부착하는 부착소를 생산한다. 이러한 부착소에 의해 일단 숙주세포에 부착되면 EPEC는 숙주세포의 구조 변화를 유도하고 세포 투과성에 변화를 주어 설사를 유발하는 것으로 추측되어진다. 이러한 부착소의 유전정보는 plasmid를 통해 이루어진다. HEp-2 세포에 대한 부착은 주로 세 가지 형태, 즉 LA와 LAL 및 DA으로 구분할 수 있다(20). 본 연구에서 전형적인 LA 부착형태를 보인 균주는 2주뿐이었고 LAL은 13주, DA는 20주였다. 일부 EPEC는 조직 배양세포에서 LA를 나타내는데, 이는 EAF plasmid의 존재와 연관이 있다(21). 일반적으로 HEp-2 세포에 있어서 LA의 형성과 *bfpA* 유전자의 존재 및 EAF probe에 대한 양성반응 사이에는 높은 일치성을 갖는다. 그러나 EAF probe에 대해 음성반응을 보이면서 LA를 형성하는 EPEC 균주가 보고되고 있다(22, 23). 이러한 균주들에 BFP와 유사한 다른 부착소가 존재하는지 알려진 바 없으나, EAF plasmid가 결여된 균주들에서 염색체상의 intimin을 암호화하는 *eae* 유전자에 대한 증진된 발현이 HEp-2 세포상에서 LA를 유도할 수 있다고 보고되고 있다(24). 본 연구에서 PCR로 *bfpA* 유전자와 EAF plasmid를 검출하였던 바, 소아 설사환자로부터 검출된 35주의 EPEC 중 14주(40.0%)만이 *bfpA* 유전자가

증폭되었으며, EAF 유전자는 증폭되지 않았다. Levine 등(25)과 Echeverria 등(26)의 보고에 의하면 *eae* 유전자 양성인 균주는 EAF probe 양성 여부와 관계없이 설사와 밀접한 관계가 있다고 하였다. 이것은 실제로는 EAF 양성인 균주가 EAF plasmid를 소실한 결과일 수 있다. 또한, 설사환자에서 분리된 EPEC 균주인 E2348/69로부터 EAF plasmid를 제거시키면 그 병독성이 상당히 약해졌으나, 9명의 성인 지원자 중에서 2명에서 심하지 않은 설사를 일으켰음이 Levine 등(27)에 의해 보고된 바 있다. EAF 음성이면서 *eae* 양성인 균주들은 영국의 소아에서 발생한 집단 설사와 핀란드에서 600명 이상의 성인이 연관된 집단 식중독의 원인 병원체로 검출되기도 하였다(28). 또한 Scotland 등(29)은 영국의 설사환자에서 분리된 EPEC 혈청형에 속하는 925주의 대장균 중에서, *eae* 유전자를 갖는 균주의 10% 미만에서 EAF probe에 반응하였음을 보고한 바 있다. 따라서 1995년에 열린 EPEC에 대한 제2차 국제 심포지움에서는 A/E 병소를 형성하면서 EAF plasmid를 가지고 있으면 'typical EPEC', 가지고 있지 않으면 'atypical EPEC'라고 명명하자는 일치된 정의를 내렸다.

EAF plasmid의 존재가 EPEC의 감염에 의한 A/E 병소를 유발시키는 효율을 강화시키기는 하나, A/E 병소의 형성에 필수적인 것은 아니다. A/E 병소의 형성에 결정적인 유전자의 대다수는 염색체 상에 존재하는 35.5 kb의 pathogenicity island인 LEE에 밀집되어 있다(6). 특히 LEE의 C-말단 부분에 intimin의 binding activity가 위치하고 있다. Schmidt 등(30)은 EPEC와 EHEC의 *eae* 유전자를 구별할 수 있는 두쌍의 primer를 보고하였으며, Agin과 Wolf (31)는 사람의 EPEC E2348/69와 EHEC EDL933 그리고 토끼의 RDEC-1 균주에서 혈청학적으로 뚜렷하게 구분되는 최소한 α , β 및 γ 의 세가지 intimin type이 존재함을 보고하였다. Adu-Bobie 등(32)은 A/E 병소를 형성하는 병원체들의 intimin에 대하여 PCR 방법과 항혈청을 이용하여 intimin α , β , γ 및 \square 로 분류하였으며, Oswald 등(33)은 Adu-Bobie 등(32)에 의해 분류된 intimin \square 를 intimin β 의 아형임을 입증하고, 사람과 송아지에서 분리된 EHEC 균주로부터 ϵ 이라는 새로운 intimin type을 보고하였다. China 등(8)은 *eae* 유전자 뿐만 아니라 *tir*와 *esp* 유전자들에 대해서도 α , β , γ type의 분석을 위한 multiplex PCR법을 개발하여 소와 사람에서 분리된 A/E 병소를 형성하는 대장균 분리주에 대해 각각 유전자의 유형을 보고한 바 있다. 본 연구에서도 China 등(8)의 방법에 따라 소아 설사 환자에서 분리

된 EPEC의 각 유전자의 형을 조사하였다. *eae* 유전자형은 *eae β* 형이 11주(31.4%)로 가장 많았으며, *eae γ* 형은 9주(25.7%), *eae α* 형은 2주(5.7%)였다. Vieira 등(34)과 Nunes 등(35)은 브라질에서 발생한 설사환자에서 분리된 EPEC의 *eae* 유전자형을 분석한 결과 *eae β* 가 가장 많은 유형을 차지하였으며, Jenkins 등(36)은 영국에서 발생한 집단발생과 산발적인 발생에서 분리된 균주에서도 *eae β* 가 가장 많은 유형으로 발표되어 본 연구와 비슷하였다. Aidar 등(37)은 소에서 분리된 EPEC에 있어서도 *eae β* 가 가장 흔한 유형임을 보고하였는데, 이는 사람의 EPEC 감염에 대한 주된 감염원이 소와 그 부산물인 것으로 추정되었던 역학조사 결과를 뒷받침한다고 생각된다. 본 연구에서 *eae* 유전자형이 확인되지 않은 균주가 13주(37.1%)나 되었는데, Vieira 등(34)과 Nunes 등(35)의 보고에서도 유전자형이 결정되지 균주의 비율이 83% 및 71.6%나 되었다고 한다.

*tir*과 *espA*, *espB* 유전자의 type은 *eae* 유전자형과 달리 α 유전자형이 각각 18주(51.4%), 21주(60.0%), 19주(54.3%)로 높게 나타났으며, 특히 이들 세 가지 유전자에 있어 *tir α* *espA α* *espB α* 의 조합을 보인 균주가 17주(48.6%)였다. *eae*, *tir*, *easpA* 및 *easpB* 4가지 유전자의 형별을 정리하였던바 광주지역에서 분리된 EPEC의 균주는 *eae β* *tir α* *espA α* *espB α* 의 유전자형을 가진 균주가 7주(20.0%)로 가장 많았으며, 다음으로는 *eae β* *tir β* *espA β* *espB β* 형이 6주(17.1%), *eae β* *tir α* *espA α* *espB α* , *eae β* *tir α* *espA α* *espB α* 이 5주(14.3%)로 많았다. Intimin을 암호화하는 *eae* 유전자와 intimin receptor인 Tir 단백질을 암호화하는 *tir* 유전자 사이의 유형이 일치할 것과는 달리, 동종의 조합을 보인 균주는 10주(28.6%)에서만 나타났다. 이러한 *eae* 유전자와 *tir* 유전자간의 상이한 조합은 China 등(8)과 Goffaux 등(9)의 연구에서도 비슷한 결과를 보였다.

최근 미국 Minnesota 지역에서 100명 이상의 환자가 발생한 집단 식중독 환자가 발생하여 여기에서 대장균이 분리되었는데, 혈청학적으로 O39:NM으로 LEE에 존재하는 *eaeA* 및 다른 유전자에 대한 probes에는 양성이었으나 EAF probe에는 음성이었다. 또한 이 균주는 EAST-1에 대한 유전자 *eastA*에 대한 DNA probe에 양성이었다. EAST-1은 장독성 대장균에서 생성되는 heat-stable enterotoxin I (ST I)와는 구조적으로 유사하나 유전학적으로는 분명히 다른 특성을 보이는 독소로 *eaeC*의 병원성 인자로서의 역할에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. Hedberg 등(38)은 이 *E. coli* O39:NM 균주를 *eastA* 유

전자를 보유한 atypical EPEC로 분류하였다. 본 연구에서 EPEC로 분류된 35주 중 6주(17.1%)가 *eastA* 유전자를 보유하고 있었다. Paiva de Sousa와 Dubreuil (39)의 보고에 의하면 *eae* 유전자를 보유한 atypical EPEC의 58%에서 *eastA* 유전자가 검출되었으며 *Salmonella*에서도 검출되었다고 한다. 이는 *eastA* 유전자가 transposon에 있어 쉽게 다른 세균으로 유전자 재조합이 일어날 수 있다고 보고된 바 있다(40).

본 연구에서는 광주지역의 소아 설사환자에서 분리된 *eae* 유전자를 보유한 EPEC의 분자생물학적 특성을 분석하여, 국내에서 발생하는 EPEC에 의한 감염증에 대한 역학적인 기초자료를 제공하고자 하였다. 앞으로 가축과 같은 감염원으로 의심되는 동물이나 식품으로 분리된 균주와 비교분석이 필요하다고 생각되며, 아직 확인되지 않은 *eae* 유전자의 새로운 형에 대해서도 분석이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

목 적 : 대장균은 대부분 비병원성이지만 일부는 사람과 어린 동물에서 다양한 장 질병과 설사 증상을 유발하는데, 특히 장병원성대장균(EPEC)은 영유아의 설사의 주된 원인균이다. 본 연구에서는 광주지역에서 분리되는 EPEC의 분자생물학적 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법 : 2003년 5월부터 8월까지 310명의 소아 설사환자로부터 설사의 원인균으로 의심되는 EPEC 균주를 37개 검체에서 분리하여 병원성 유전자의 특성과 HEp-2 세포주에 대한 부착능 및 항균제내성양상을 조사하였다.

결 과 : 병원성 유전자 중 *eae* 유전자를 보유한 35주의 대장균에서 *bfp* 유전자의 PCR 반응이 양성으로 나온 균주가 14주, *east-1* 유전자를 보유한 균주가 6주였다. 또한 4개의 균주는 hemolysin를 생성하였다. EPEC의 전형적인 부착형태인 LA pattern을 보인 균주는 2주에서만 관찰되고 LAL pattern을 보인 균주는 13주(37.1%)이었으며 20주(57.1%)는 DA pattern을 보였다. 분리된 EPEC의 균주는 *eae* γ *tir* α *espA* α *espB* α 의 유전자형을 가진 균주가 7주(20.0%)로 가장 많았으며, 다음으로는 *eae* β *tir* β *espA* β *espB* β 형이 6주(17.1%), *eae* β *tir* α *espA* α *espB* α 및 *eae* β *tir* α *espA* α *espB* α 이 5주(14.3%)로 많았다. 분리균주 중 1가지 이상의 항생제에 대해 내성을 갖는 균주는 27주(70.2%)였다. 특히 8가지의 항생제에 대한 다제내성을 보인 균주는 2주, 6가지 및 5가지 항생제에 대한

다제내성을 보인 균주는 각각 1주, 4가지 항생제에 대한 내성을 보인 균주는 5주였으며, 3가지 항생제에 다제내성을 보인 균주는 7주였다.

결 론 : 광주지역에서 분리된 EPEC는 분자역학적 특성에서는 *eae* γ -*tir* α -*espA* α -*espB* α 이 가장 많았으며, HEp-2 세포에 대한 부착양상은 다양하였다. 분리균주 75%에서 한가지 이상의 항생제에 내성을 가지고 있었으며 4가지 이상의 약제에 다제내성을 보인 균주는 28%였다.

감사의 글

본 연구를 위해 환자의 검체를 수집하여 주신 광주미래아동병원 김병희 병원장 및 중앙소아과 민혜란 원장님께 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- 1) Nataro JP, Kaper JB: *Diarrheagenic Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:142-201, 1998
- 2) World Health Organization Programme for Control of Diarrhoeal Diseases: *Manual for laboratory investigations for acute enteric infections*. Geneva: World Health Organization, 1997
- 3) Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR: *Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells*. *Infect Immun* 45:534-6, 1984
- 4) Baldini MM, Kaper JB, Levine MM, Candy DC, Moon HW: *Plasmid mediated adhesion of enteropathogenic Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2:534-53, 1983
- 5) Girón JA, Ho ASY, Schoolnick GK: *An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli*. *Science* 254:710-3, 1991
- 6) Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S: *Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli: more subversive elements*. *Mol Microbiol* 30:911-921, 1998
- 7) Lopez-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, Tarr PI, Estrada-Garcia T: *Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 9:127-31, 2003
- 8) 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* 178:177-82, 1999

- 9) Goffaux F, China B, Janssen L, and Mainil J: *Genotypic characterization of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) isolated in Belgium from dogs and cats. Res. Microbiol* 151:865-71, 2000
- 10) Robins-Browne RM: *Traditional enteropathogenic Escherichia coli of infantile diarrhea. Rev Infect Dis* 9:28-53, 1987
- 11) Giles C, Sangster G, Smith J: *Epidemic gastroenteritis of infant in Aberdeen during 1947. Arch Dis Child* 24:45-53, 1949
- 12) Willshaw GA, Scotland SM, Smith HR, Rowe B: *Properties of vero cytotoxin-producing Escherichia coli of human origin of O serogroups other than O157. J Infect Dis* 166:797-802, 1992
- 13) Levine MM and Edelman R: *Enteropathogenic Escherichia coli of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. Epidemiol Rev* 6:31-51, 1984
- 14) Donnenberg MS: *Enteropathogenic Escherichia coli. pp.709-26. In Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, and Gueffant RL (eds), Infections of the gastrointestinal tract. Raven Press, New York, NY. 1995*
- 15) Robins-Browne RM, Levine MM, Rowe B, Gabriel M: *Failure to detect conventional enterotoxins in classical enteropathogenic (serotyped) Escherichia coli strains of proven pathogenicity. Infect Immun* 38:798-801, 1982
- 16) Cravioto A, Reyes RE, Trujillo F, Uribe F, Navarro A, de la Roca JM, Hernandez JM, Perez G, and Vazquez V: *Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. Am J Epidemiol* 131:886-904, 1990
- 17) Gomes TA, Blake PA, Trabulsi LR: *Prevalence of Escherichia coli strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. J Clin Microbiol* 27:266-9, 1989
- 18) Gomes TA, Rassi V, MacDonald KL, Ramos SRTS, Trabulsi LR, Viera MAM, Guth BEC, Candeias JAN, Ivey C, Toledo MRF, Blake PA: *Enteropathogenic associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo, Brazil. J Infect Dis* 164:331-7, 1991
- 19) Robins-Browne RM, Still CS, Miliotis MD, Richardson NJ, Koornhof HJ, Frieman I, Schoub BD, Lecatsas G, Hartman E: *Summer diarrhoea in African infants and children. Arch Dis Child* 55: 923-8, 1980
- 20) Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA: *Typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli. Emerg Infect Dis* 8:508-13, 2002
- 21) Gomez-Duartz OG, Kaper JB: *A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal eaeA expression in enteropathogenic Escherichia coli. Infect Immun* 63:1767-76, 1995
- 22) 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* 59:1569-71, 1991
- 23) Bokete TN, Whittam TS, Wilson RA, Clausen CR, O'Callahan CM, Moseley SL, Fritsche TR, and Tarr PI: *Genetic and phenotypic analysis of Escherichia coli with enteropathogenic characteristics isolated from Seattle children. J Infect Dis* 175: 1382-9, 1997
- 24) 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* 30:889-93, 1992
- 25) Levine MM, Pardo V, Robins-Browne 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* 158:224-28, 1988
- 26) Echeverria P, Orskov F, Orskov I, Knutton S, Scheutz F, Brown JE, Lecomboon U: *Attaching and effacing enteropathogenic Escherichia coli as a cause of infantile diarrhea in Bangkok. J Infect Dis* 164:550-4, 1991
- 27) 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 enteroadherence factor. J Infect Dis* 152:550-9, 1985
- 28) Viljanen MK, Peltola T, Junnila, Olkkonen L, Jarvinen H, Kuistila M, Houvinen P: *Outbreak of diarrhoea due to Escherichia coli O111:B4 in school children and adults: association of Vi antigen-like reactivity. Lancet* 336:831-4, 1990
- 29) Scotland SM, Smith HR, Cheasty T, Said B, Willshaw GA, Stokes N, Rowe B: *Use of gene probes and adhesion tests to characterize Escherichia coli belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. J Med Microbiol* 44:438-43, 1996
- 30) Schmidt H, Russmann H, Karch H: *Virulence determinants in nontoxigenic Escherichia coli O157 strains that cause infantile diarrhea. Infect Immun* 61:4894-8, 1993
- 31) 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* 65:320-6, 1997
- 32) Adu-Bobie J, Frankel G, Bain C, Goncalves AG, Trabulsi LR, Douce G, Knutton S, and Dougan G: Detection of intimins α , β , γ , and δ , four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol* 36:662-8, 1998
 - 33) Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marchès O, Caprioli A: Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* 68:64-71, 2000
 - 34) Vieira MA, Andrade JR, Trabulsi LR, Rosa AC, Dias AM, Ramos 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 sequences. *J Infect Dis* 183:762-72, 2001
 - 35) Nunes EB, Saridakis HO, Irino 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(Pt 6):499-504, 2003
 - 36) Jenkins C, Lawson AJ, Cheasty T, Willshaw GA, Wright P, Dougan G, Frankel G, Smith HR: Subtyping intimin genes from enteropathogenic *Escherichia coli* associated with outbreaks and sporadic cases in the United Kingdom and Eire. *Mol Cell Probes* 17:149-156, 2003
 - 37) Aidar L, Penteado AS, Trabulsi LR, Blanco JE, Blanco M, Blanco J, Pestana de Castro AF: Subtypes of intimin among non-toxigenic *Escherichia coli* from diarrheic calves in Brazil. *Can J Vet Res* 64:15-20, 2000
 - 38) Hedberg CW, Savarino SJ, Besser JM, Paulus CJ, Thelen VM, Myers LJ, Cameron DN, Barrett TJ, Kaper JB, Osterholm MT: An outbreak of food-borne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. *J Infect Dis* 176:1625-8, 1997
 - 39) Paiva de Sousa C, Dubreuil JD: Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int J Med Microbiol* 291:15-20, 2001
 - 40) McVeigh A, Fasano A, Scott DA, Jelacic S, Moseley SL, Robertson DC, Savarino SJ: IS1414, an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embedded in a transposase-like gene. *Infect Immun* 68:5710-5, 2000