



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

보건학석사학위논문

서울시 설사환자에서 분리한  
EPEC의 병원성 유전자에 대한  
Pathogenicity평가 및 Typing

Pathogenicity Evaluation of  
Pathogenic Genes and Typing of EPEC  
isolated from Patients With Diarrhea  
in Seoul Metropolitan City

2012년 8월

서울대학교 보건대학원

환경보건학과 환경보건학 전공

김진아

서울시 설사환자에서 분리한  
EPEC의 병원성 유전자에 대한  
Pathogenicity평가 및 Typing

지도교수 고 광 표  
이 논문을 보건학 석사 학위 논문으로 제출함  
2012년 4월

서울대학교 보건대학원  
환경보건학과 환경보건학 전공  
김진아

김진아의 석사학위논문을 인준함  
2012년 6월

<u>위원장</u>	<u>백도명</u>	<u>(인)</u>
<u>부위원장</u>	<u>조성일</u>	<u>(인)</u>
<u>위원</u>	<u>고광표</u>	<u>(인)</u>

## 요 약 (국문초록)

병원성이 없는 대부분의 *Escherichia coli*와는 다르게 몇몇 *E. coli* strains은 사람으로부터 설사를 일으키는 병원성을 가진다. 그 중 enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)는 주로 유아에게 설사를 일으키는 균이지만 성인에게도 간헐적으로 감염되는 것으로 알려져 있으며, 2007년부터 2009년에 걸쳐 서울시 지역에서 발생한 집단 식중독 사건의 원인균으로서 종종 출현하였다. 본 연구는 현재 EPEC를 검출하는데 이용되고 있는 대표적인 병원성 유전자인 *eaeA* (intimin) gene를 갖는 isolates 및 control *E.coli* strains을 대상으로 *bfpA*, *espA*, *espB*, *espD*, *escN*, *astA*, *Tir* 등 다른 여러 병원성 유전자들의 존재 여부를 PCR (polymerase chain reaction)을 통하여 확인하였으며, 카이스퀘어 테스트, 오즈비 분석, Cohen's kappa coefficient 분석 등 통계적인 방법을 이용하여 언급된 유전자들이 EPEC의 병원성에 기여하는 영향 및 유전자 상호 관련성을 평가하였다. 대다수의 EPEC isolates가 다수의 병원성 유전자를 가지고 있었으며, 병원성 유전자들의 상호 관계가 EPEC의 병원성에 기여를 하는 것으로 확인되었다. *bfpA* 유전자를 가진 typical EPEC strains보다 *bfpA* 유전자를 가지지 않는 atypical EPEC strains이 서울지역에서 압도적으로 많이 검출되었으며, O혈청 21가지, H혈청 9가지 등 아주 다양하고 많은 수의 serotypes이 확인되었다. 또한 병원성 유전자 types 및 pulsed field gel electrophoresis (PFGE)로 확인된 pulsotypes의 분류 결과 역시 서울지역 EPEC strains의 diversity와 상호 낮은 유전적 유연관계를 보여줌으로써 서울시 지역사회에 존재하는 EPEC strains이 아주 다양한 유래와 분화의 과정을 겪었음을 추측할 수 있었다. 또한 여러 통계적 분석 결과 언급된 유전자들 중 *escN*이 *eaeA*의 검출과 가장 가까운 일치성 및 통계값을 가지고 있음이 확인됨으로써, EPEC의 검출 보완 유전자로서 가장 적합한 것으로 나타났다.

주요어 : EPEC, 병원성 유전자, statistics, PFGE

학 번 : 2010-22050

## 목 차

I. 서 론 . . . . .	1
II. 연구 재료 및 연구 방법	
1. Strains . . . . .	5
2. Serotype 동정 . . . . .	5
3. PCR을 이용한 병원성 유전자 검출 . . . . .	5
4. Pulsed Field Gel Electrophoresis . . . . .	8
5. 병원성 유전자의 기여도 분석 및 유전자 간 상호 관계 분석 . . . . .	8
III. 연구 결과	
1. Diverse serotypes . . . . .	9
2. 병원성 유전자 검출과 유형 분류 . . . . .	10
3. Genetic diversity of EPEC : PFGE 분석 . . . . .	16
4. 병원성 유전자 간 cooperative relationship . . . . .	19
5. 병원성에 대한 병원성 유전자의 기여도 평가 . . . . .	21
IV. 고 찰 . . . . .	23
V. 참고 문헌 . . . . .	26
Abstract . . . . .	31

## 표 목 차

1. Table 1. Primer sequences used in this study . . .	7
2. Table 2. Classification of pathogenic gene types .	11
3. Table 3. Distribution of pathogenic genes . . .	13
4. Table 4. Distribution of EPEC serotypes and pathogenic gene types observed in this study . . . . .	15
5. Table 5. Kappa coefficient showing inter-pathogenic genes-agreement . . . . .	20
6. Table 6. Summary of chi-square independence test results and odds ratio of each gene in this study .	22

## 그림 목차

1. Figure 1. Infection model of EPEC . . . . . 4
2. Figure 2. Example of PCR amplification of targeted pathogenic genes . . . . . 12
3. Figure 3. Bar graph and table showing distribution of each pathogenic gene types in pulsotypes . . . . . 17
4. Figure 4. Dendrogram showing the clustering of PFGE patterns after *Xba* I digestion for EPEC . . . . . 18

# I. 서 론

*Escherichia coli*(대장균)는 포유류의 장내에 상재하며 장관계의 정상적인 microflora를 이루는 bacteria로서, 병원성이 없는 것이 대부분이다. 하지만 1945년 영국에서 Bray에 의해 유아에게 설사를 일으키는 *E. coli*가 보고된 것을 시작으로 병원성을 가지는 다른 여러 균주들이 발견되었다.<sup>(29,31)</sup> 현재 서울시에서 설사 환자가 발생할 경우, 환자에게서 채취된 검체는 보건소를 통하여 서울시 보건환경연구원에 원인균 검사가 의뢰된다. 의뢰된 설사 검체는 10종류의 설사성 세균, 4종류의 설사성 바이러스, 2종류의 원충 동물에 대한 검출 시험을 하게 된다. 많은 종류의 원인 병원체에 대한 검사를 동시 다발적으로 시행한 결과, 이 중 한 가지도 검출이 되지 않는 원인체 불검출의 경우와, 두 가지 이상의 원인 병원체가 복수로 검출되는 경우가 존재한다. 현재 전국시도보건환경연구원의 원인균 검출률은 30~60%로, 원인체 불검출의 경우는, 검체 채취의 시기와 방법, 의뢰, 시험 등 일련의 과정 중에서 발생한 오류에 기인하거나, 또는 현재 미검사 원인 병원체에 의한 설사인 것으로 판단된다. 복수 검출의 경우, 개별 감염의 경우에는 검출된 병원체들 간의 중복 감염에 의한 증상의 발현으로 잠정 결론짓게 되지만, 집단 감염의 경우에는 집단 감염을 일으킨 원인체 검출 검사에 좀 더 집중을 하게 된다. 예를 들어 집단 식중독 50명이 감염된 사건에서, 그 중 표현형 및 유전형이 각기 다른 살모넬라가 3건 검출되었고, 표현형과 유전형이 동일한 장병원성대장균이 25건 검출된 경우, 비록 살모넬라가 더 큰 병원성을 가지고 있지만 집단 식중독의 원인균은 장병원성대장균으로 결론짓게 된다. 이 과정에서 유전형 분석이 아주 유용하게 사용되고 있으며, 좀 더 정확한 원인체의 규명을 위해 이 분야가 많은 발전을 하고 있다. 10종류의 설사 원인세균 중 병원성 대장균으로 검출되는 균의 종류에는, 제 1군 법정 전염병으로 분류되어있는 장출혈성 대장균(EHEC (enterohemorrhagic *E. coli*))을 비롯한, 장침입성 대장균(EIEC (enteroinvasive *E. coli*)), 장응집성 대장균(EAEC (enteroaggregative *E. coli*)), 장독소형 대장균(ETEC (enterotoxigenic *E. coli*)) 그리고 장병원성 대장균(EPEC (enteropathogenic *E. coli*))이 있다.<sup>(32,33,34)</sup> 그 중 EPEC는 개발도상국에서 중요한 유아 설사 균으로 알려져 있다.<sup>(1)</sup>

현재 EPEC를 비롯한 병원성 대장균은 증균배지 및 선택배지의 사용과 생화학적 방법을 이용하는 conventional methods뿐만 아니라 PCR과 같은 genetic methods를 혼용함으로써 검출하는데, conventional methods에 의해 동정된 대장균



중 병원성 대장균 균주임을 확인하기 위해서는 각각의 독특한 병원성 유전자의 검출 과정이 필요하다.

질병관리본부(KCDC)의 검사 지침에 따라, EPEC의 경우는 *eaeA*라는 병원성 유전자를 검출 유전자로 사용하여 왔으나, *eaeA* 유전자가 무증상 및 정상인의 대장균에서도 검출되는 불완전성을 보여,<sup>(22)</sup> 이 후 보완하고자 *bfpA*를 함께 검출하도록 하였다. 그럼으로 인해 *eaeA* 단독 검출과 *eaeA*와 *bfpA*의 동반 검출 등 경우에 따라 원인균 판단에 혼선을 빚게 되었다.

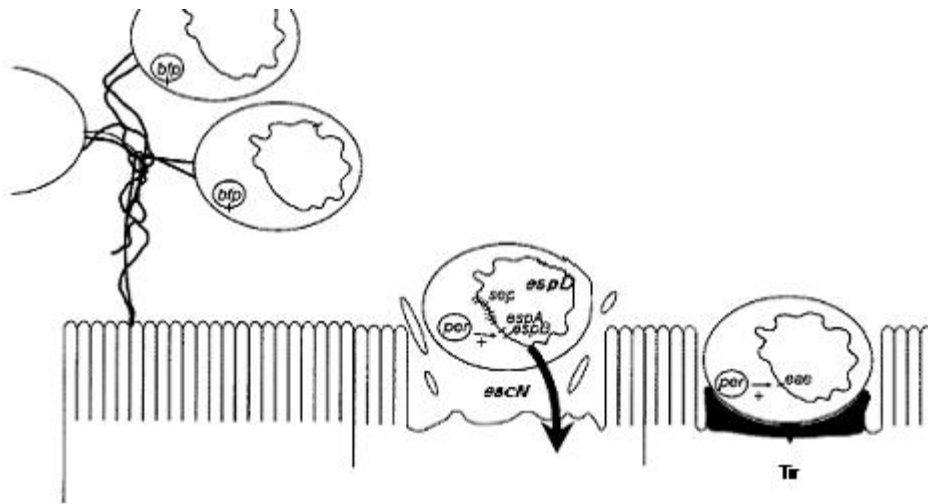
그러던 중 2007년부터 2009년까지 구로구, 중구, 용산구 등에서 성인 및 청소년을 중심으로 대형 집단 식중독사건이 발발하였다. 각 집단 식중독사건의 원인균으로서 EPEC가 의심이 되는 가운데, 동정된 EPEC를 분석한 결과, *eaeA*만을 단독으로 지닌 EPEC에 의해 집단 식중독이 발생되었음을 확인할 수 있었으며, 이 결과로 인해 현재 사용되고 있는 검사 방법의 허점을 인식하게 되었다. 그러므로 지속적으로 EPEC가 검출되고 있는 상황 속에서, EPEC의 병원성에 대한 이해와 검사 방법의 개선이 필요하다 판단하여 이와 같은 연구를 실시하였다.

EPEC는 소장점막의 상피세포에 부착하는 것을 시작으로 그 곳에서 증식하여 장염증상을 일으키는데, 이때 장관 세포에 밀착하도록 하는 것이 attaching and effacing (A/E) lesions으로, bacteria가 장관 상피세포에 근접한 후 actin으로 된 pedestal을 형성하여 접근한 세포로 efface하게 한다.<sup>(2,3)</sup> 이러한 A/E lesion을 형성하게끔 하는 genetic determinants는 LEE(locus of enterocyte effacement)라고 불리는 pathogenicity island에 위치하고 있으며,<sup>(4)</sup> 이 pathogenicity island에는 outer membrane protein으로서 intimin을 지정하는 유전자인 *eae*(*E. coli* attaching and effacing)와 intimin receptor인 Tir(translocated intimin receptor)을 지정하는 유전자, 그리고 많은 secreted protein(Esp)으로 구성되어 있는 type III secretion system(TTSS)을 지정하는 유전자를 지니고 있다.<sup>(1,21)</sup>

현재 EPEC를 검출하는데 병원성 유전자로서 사용하고 있는 *eae* 유전자는 bacteria가 숙주 세포에 부착하는데 역할을 하는 intimin을 지정하는데,<sup>(26,27)</sup> 설사 증상이 없는 control group에서도 *eae* 유전자를 지닌 EPEC가 검출되는 경우가 존재하므로,<sup>(22)</sup> 정확한 질병 원인균 확인을 위해서는 다른 병원성 유전자의 동반 검출이 필요하다 하겠다. 그 중 type III secretion system(TTSS)에 속하며 *espA*와 *espB*에 의해 발현되는 EspA와 EspB는 in vivo 및 human infection에 있어서 virulence factors로 규정되어 있는 요소로서<sup>(7,8)</sup> EspA는 EAF(EPEC adherence factor)

plasmid가 없는 EPEC의 경우에 초기 attachment factor로 작용하고,<sup>(6)</sup> EspB를 host cell로 이동시키는데 필요한 novel needle complex(NC)를 형성하는데 주로 관여한다.<sup>(9,10)</sup> *espD*에 의해 발현되는 EspD는 EspB와 함께 target cell로 들어가서 숙주 세포내로 effector proteins을 이동시키는 molecular syringe를 구성하는 것으로 보인다.<sup>(11,17)</sup> 그러므로 *espA*, *espB*, *espD* gene의 돌연변이는 A/E histopathology에 의해 진행되는 signal transduction을 막게 된다. *escN* 유전자 역시 type III secretion system(TTSS)을 지정하는 유전자 중 하나로서 여기에 돌연변이가 일어나게 되면 EspA, EspB, EspD의 secretion이 이루어지지 않는다.<sup>(14,1)</sup> *astA*는 EAEC(enteroaggregative *E.coli*)에서 EAST1이라 불리는 ST(heat-stable toxin)를 생산하는 유전자인데, 일부 EPEC도 ST를 생산하는 것으로 알려져 있으며, EAST1을 생산하는 EPEC에 의한 집단 감염의 예가 보고된 바 있다.<sup>(15,1)</sup> EAF plasmid내에 포함되어 있는 *bfp*(bundle forming pili) 유전자는 non-LEE encoded proteins인 type IV pilus를 지정함으로써 A/E legion의 형성에 도움을 주는 역할을 하는 요소로서,<sup>(5)</sup> *eaeA*를 보완하여 설사환자에게서 EPEC 균주를 검출하는데 사용되고 있다. EPEC 균주들은 크게 EAF(EPEC adherence factor) plasmid를 가지고 있는 typical EPEC 균주와 가지지 않는 atypical EPEC 균주로 나눌 수 있는데, typical EPEC 균주는 개발도상국에서 설사의 주 원인균인데 비하여 atypical EPEC 균주는 industrialized 국가에서 많이 검출되는 것으로 알려져 있다.<sup>(5)</sup> 현재의 검사 지침에 의하게 되면, 원인균으로서의 EPEC의 판정은 원칙적으로는 *eaeA*와 *bfpA*의 동반 검출에 의한다.

본 연구는 서울시 지역에서 검출된 EPEC 균주들을 대상으로, 여러 문헌상에서 EPEC의 병원성에 기여하는 것으로 보이는(Figure 1) 유전자들의 존재 여부를 PCR로 확인하였고, 통계학적 방법을 이용하여 각 유전자들의 병원성에 대한 기여도 및 유전자들 간의 상호 관련성을 분석하였다. 그리하여 현재 사용되고 있는 검출 유전자의 한계점을 검증하고, 검출에 도움이 되는 새로운 병원성 유전자를 발굴함으로써 검사 업무에 정확성과 신뢰성을 부여하고자 하였다. 또한 serotypes 동정과 병원성 유전자 typing, PFGE(pulsed field gel electrophoresis)를 통하여 EPEC의 유형 및 분포를 분석함으로써, 서울시 지역에서 검출되는 EPEC 균주들의 분포와 분자생물학적 특성을 파악하고자 하였다.



**Figure 1. Infection model of EPEC**

The *bfpA* mediates the initial attachment by the bundle-forming pilus. EspA, EspB and EspD by *espA*, *espB*, *espD* enter the target cell by the *escN* and seem to construct the molecular syringe. The bacterium binds closely to the target cell by interaction between intimin and Tir.

## II. 연구 재료 및 연구 방법

### 1. Strains

서울시 보건환경연구원에 검사 의뢰된 설사 환자의 가검물을 증균 배지(TSB)에서 4시간동안 증균한 다음 열처리한 증균액을 template로 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 결과 *E. coli* internal control(1.2kb)과 *eaeA* 유전자(260bp)가 확인되면, 증균 배지에서 선택 배지(Mackonkey)로 계대 배양하였다. 선택 배지에서 의심되는 집락을 Tryptic soy agar (TSA) 영양 배지에 계대 배양한 후, 각각의 집락에 대한 PCR을 실시하여 *eaeA* 유전자를 가진 EPEC를 검출하였으며, API 20E Kit(BioMerieux Co., France)를 사용하여, *E. coli*임을 확인하였다. 그리고 검출된 지역의 이니셜에 검출 순서를 조합하여 균주를 명명하였다.(예: GR1-1(구로 지역에서 첫 번째 집단 식중독 사건에서 검출된 첫 번째 균주, SP2(송파 지역에서 두 번째로 검출된 균주)) 본 연구는 2007년도부터 2009년도까지 서울시 지역에서 집단 감염 및 산발적으로 발생한 설사 환자 중 *eaeA* 유전자를 가지고 있는 대장균에 의하여 증상을 보이는 환자로부터 분리된 EPEC 균주 84건을 대상으로 시험하였으며 병원성 유전자 시험을 위한 대조균은 설사 증상이 없는 강남지역 한얼 검도관의 건강한 남녀노소로부터 분리한 normal microflora인 대장균을 사용하였다.

### 2. Serotype 동정

검출된 EPEC는 대장균 면역혈청(Denka Seiken Co., Tokyo, Japan) O antisera 및 H antisera를 이용하여 Slide 응집반응 시험법을 통해 O 혈청형을, 시험관 응집 시험법으로 H 혈청형을 동정하였다.

### 3. PCR을 이용한 병원성 유전자의 검출

*eaeA* 유전자를 가지고 있는 EPEC 분리균주들에 대하여 *bfpA*, *espA*, *espB*, *espD*, *escN*, *astA*, *Tir* 유전자(Table 1)의 존재여부를 PCR을 이용하여 확인하였다. 가열법으로 균주의 DNA를 추출한 후 이것을 template로 하여 PCR을 실시하였으며, PCR 반응조건은 94°C에서 10분간 Pre-denaturation한 후, 94°C에서 30초간 denaturation, 58°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 40초간 extension의 조건으로 30cycle 반복하였고, 72°C에서 5분간 extension하였다. PCR products는 1.5%

agarose gel에서 전기영동으로 확인하였다(Figure 2).

**Table 1. Primer sequences used in this study**

Primer	Sequence(5' → 3')	Product size
<i>eaeA</i>	F: ATGCTGGCATTGTTGGTCAGGTCGG	260bp
	R: TGACTIONCATGCCAGCCGCTCATGCG	
<i>bfpA</i>	F: TGCCACCGTTACCGCAGGTG	450bp
	R: AGTTGCCGCTTCAGCAGGAGT	
<i>espA</i>	F: CCGTTTGCAAATCACCAGCGCC	391bp
	R: TCAGTTGCTAGTGCGAATGCGA	
<i>espB</i>	F: GGCCGCTTTTGCAGCTGTCG	258bp
	R: GGTGCGACAGCCGCTGTGAT	
<i>espD</i>	F: CGCCAATGCCGGCTGTCAGA	598bp
	R: GCTTTACCAACGCCACCGGC	
<i>escN</i>	F: CGCGACCACGTTCCGCCGATA	307bp
	R: GACGCACTACTTGGGCGGCT	
<i>astA</i>	F: AGGCAGGCCGGAAAATCGCC	606bp
	R: TCGTGTCGGCACGCTGGTTC	
<i>Tir</i>	F: GCTGCTGCGCCTGTGCATTG	557bp
	R: TGGCGGTAGTGGGCATCCGA	

#### 4. Pulsed field gel electrophoresis(PFGE)

TSA배지에 18~24시간 배양한 균주를 cell suspension TE buffer(100mM Tris, 100mM EDTA, pH 7.5)에 현탁하여 탁도를 12~15%가 되게 조정 한 후, 균 현탁액 200 $\mu$ L에 1.2% agarose solution을 동량 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 5분 간 균힌 plug을 proteinase K(20mg/mL) 40 $\mu$ L, ES buffer(0.5M EDTA, 1% sodium lauroyl sarcosine) 1.5mL에 옮겨 55 $^{\circ}$ C 진탕 항온수조에서 1시간동안 처리한 후, plug wash TE buffer(100mM Tris, 1mM EDTA)로 20분간 4차례 세척하였다. 세척이 끝난 plug는 1mm두께로 자른 다음, *Xba* I(Roche)이 들어있는 반응 혼합액에 넣어 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 2시간동안 반응시켰다. 반응 후 반응용액을 제거하고 plug을 gel 성형용 comb끝 부위에 위치시킨 다음 1% agarose gel을 성형틀에 부어 균힌 다음 전기영동을 실시하였다. CHEF Mapper PFGE system(Biorad, USA)을 이용하여 gradient 6.0V/cm, included angle 120 $^{\circ}$ , Int. Tm 2.16 sec, Fin. Tm 54.17 sec의 조건으로 14 $^{\circ}$ C, 18시간동안 전기영동을 진행시킨 후 ethidium bromide(0.5 $\mu$ g/mL)용액으로 gel을 10분간 염색한 후 증류수로 탈색하여 Gel doc(Biorad, USA)으로 밴드를 확인하였다. PFGE 결과 분석은 BioNumerics software(Applied Maths, Belgium)을 이용하여 1.5% tolerance Dice coefficient로 dendrogram을 작성하여 분석하였다.

#### 5. 병원성 유전자의 기여도 분석 및 유전자 간 상호 관계 분석

환자균 및 대조균의 균주를 대상으로 실시한 병원성 유전자 검출 시험 결과를 정리하고, 분석 결과의 뒤틀림을 방지하기 위해 집단 식중독의 여러 cases를 1 case로 산정하여 각각의 유전자와 질병발생 간의 2 $\times$ 2 table을 작성하였다.(예: YS지역 집단 식중독 건수 31 cases 중 혈청형, 병원성 유전자 type, pulsotype이 같은 29 cases를 1 case로 산정함. 그러므로 YS 지역의 건수는 총 3건이 됨) 질병 비 발생 및 유전자의 부재를 “0”으로, 질병발생 및 유전자의 존재를 “1”로 코딩한 후 PASW SPSS version 17을 이용하여 통계 분석을 하였다. chi-square independence test를 통하여 병원성 유전자의 존재와 질병 발생간의 관련성을 확인하였으며 odds ratio를 산출하여 병원성 유전자들의 질병 발생에 대한 기여도를 분석하였다. 또한 Cohen' kappa coefficient를 계산하여 각 병원성 유전자 간 상호 연관성을 분석함으로써 병원성과 관련지었다.

### Ⅲ. 연구 결과

#### 1. Diverse serotypes

집단 식중독이 발생하였던 GR지역의 13균주 중 GR1-2, GR1-3, GR1-10, GR1-12를 제외한 나머지 균주는 모두 O27:H21였으며, J지역의 7균주 중 J1-4, J1-6를 제외한 나머지는 O169:H19, YS지역의 31균주 중 YS1-20, YS1-31를 제외한 나머지 균주는 모두 O111:H9으로 확인되었으며, 병원성 유전자 types 및 PFGE 결과와 함께 분석해 볼 때 집단 식중독이 EPEC에 의한 것임이 판명되었다 (Table 3). 또한 이들 집단 식중독의 원인균은 모두 *bfpA*를 가지지 않은 atypical EPEC에 의한 것이었다. 그 외 집단식중독 의심 지역의 경우는 다양한 Serotypes이 동정됨으로써 EPEC가 우연 감염에 의한 이중 감염균이었을 뿐 집단 식중독의 원인균이 아님이 밝혀졌다. 검출된 EPEC의 Serotypes의 종류는 O1, O6, O8, O25, O27, O29, O55, O78, O111, O115, O124, O125, O126, O127a, O142, O146, O148, O158, O167, O168, O169으로서 21종류의 O혈청형이 관찰되었으며, H혈청형은 H4, H6, H7, H9, H16, H19, H21, H28, N(nonmotile)의 9종류가 관찰되었다.(Table 4) 다양하고 많은 종류의 serotypes을 가진 EPEC 균주들이 서울 지역에서 검출되었으며, 다른 지역에서 검출된 양상과 다른 분포를 보이는 것으로 확인되었다.<sup>(23,24,25)</sup>



## 2. 병원성 유전자 검출과 유형 분류

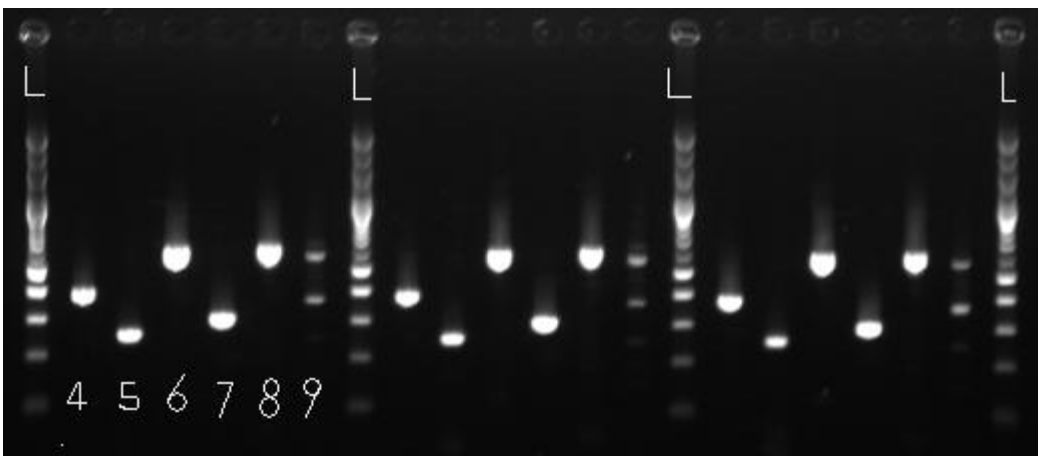
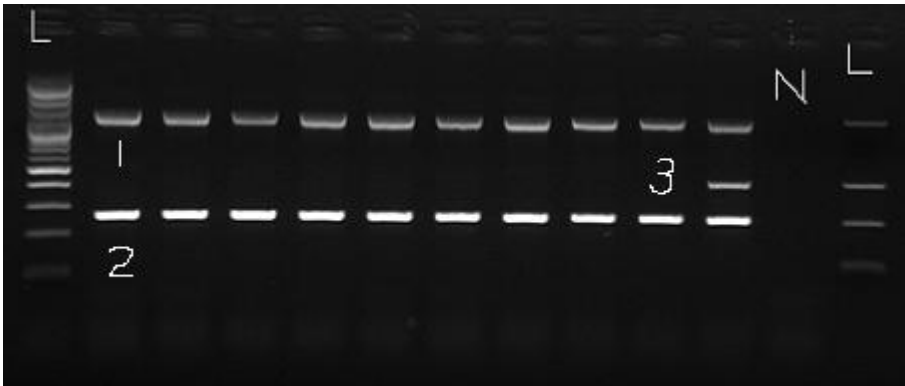
PCR을 이용하여 환자균 및 대조균 균주로부터 병원성 유전자를 검출하였으며 (Figure 2), 검출결과는 Table 3에서 보여준다. *eaeA*를 제외하고 검출된 병원성 유전자들의 조합 type에 따라 Table 2와 같이 모두 12종류로 분류되었다. 결과의 뒤를림을 예방하기 위해 집단 식중독에서 나타난 똑같은 유전자조합을 하나의 경우로 산정하여 그 빈도를 파악한 결과, YS지역 집단식중독의 원인균이기도 한 J형이 13cases로 가장 많았다. 그 다음으로 E형이 7case로 나타났으며, E형은 GR지역의 집단식중독의 원인균이었다. 계속해서 F형 6case, D형 4case, K형 3case, H형 2case의 순으로 많았으며, 그 외 A형, B형, C형, G형, I형, L형은 각각 1case씩 나타났다. Plasmid 유전자인 *bfpA*를 비롯하여 앞에서 언급된 병원성 유전자를 모두 가진 A형과 chromosomal 병원성 유전자(*bfpA*를 제외한 언급된 모든 유전자)를 모두 가진 E형 이외의 다른 유전자 조합 type들은 유전자 면에서 결실을 가지고 있다고 말할 수 있으며, 이로 인해 아주 다양한 유전자 조합 types이 확인되었다. 검출 시험 대상 병원성 유전자들 가운데 몇 개가 결손되더라도 EPEC 균주가 여전히 병원성을 가지고 있다는 사실은, 우리가 알고 있는 것 외의 다른 virulence factors의 존재나 그들의 상호 관련에 의한 병원성의 발현을 예측할 수 있게 하는 방증을 제시한다.

**Table 2. Classification of pathogenic gene types**

pathogenic gene types	composition of detected pathogenic genes
A	<i>espA-espB-espD-escN-astA-Tir-bfpA</i>
B	<i>espA-/-espD-escN-astA-Tir-bfpA</i>
C	<i>espA-espB-espD-escN-astA-/-bfpA</i>
D	<i>/-espB-/-escN-astA-Tir-bfpA</i>
E	<i>espA-espB-espD-escN-astA-Tir-/-</i>
F	<i>espA-/-espD-escN-astA-/-/-</i>
G	<i>espA-espB-espD-escN-astA-/-/-</i>
H	<i>espA-/-espD-escN-astA-Tir-/-</i>
I	<i>espA-/-espD-/-astA-/-/-</i>
J	<i>/-espB-/-escN-astA-Tir-/-</i>
K	<i>/-espB-espD-escN-astA-Tir-/-</i>
L	<i>/-/-/-/-astA-Tir-/-</i>

*espA*, *espB*, *espD*, *escN*, *astA*, *Tir*, *bfpA* are placed in the order.

'/' indicates the pathogenic gene's lack of that place.



**Figure 2. Examples of PCR amplification of targeted pathogenic genes**

L. 100bp ladder N. negative control 1. internal control 2. *eaeA* 3. *bfpA* 4. *espA*  
 5. *espB* 6. *espD* 7. *escN* 8. *astA* 9. *Tir*

**Table 3. Distribution of pathogenic genes**

Gene Isolate	<i>espA</i>	<i>espB</i>	<i>espD</i>	<i>escN</i>	<i>astA</i>	<i>Tir</i>	<i>bfpA</i>	note
DD1-1		+		+	+	+		J
DD1-2		+		+	+	+		J
DJ1		+		+	+	+		J
KD1		+		+	+	+		J
KD2	+		+	+	+			F
KD3		+		+	+	+		J
KD4		+		+	+	+	+	D
KD5		+		+	+	+		J
KD6		+		+	+	+		J
KD7		+	+	+	+	+		K
KJ1		+	+	+	+	+		K
KN1	+		+	+	+			F
GR1-1	+	+	+	+	+	+		E(MI)
GR1-2		+		+	+	+		J(MI)
GR1-3	+	+	+	+	+	+	+	A(MI)
GR1-4	+	+	+	+	+	+		E(MI)
GR1-5	+	+	+	+	+	+		E(MI)
GR1-6	+	+	+	+	+	+		E(MI)
GR1-7	+	+	+	+	+	+		E(MI)
GR1-8	+	+	+	+	+	+		E(MI)
GR1-9	+	+	+	+	+	+		E(MI)
GR1-10	+		+	+	+			F(MI)
GR1-11	+	+	+	+	+	+		E(MI)
GR1-12	+	+	+	+	+	+		E(MI)
GR1-13	+	+	+	+	+	+		E(MI)
GR2-1	+		+	+	+			F
GR2-2		+		+	+	+		J
J1-1	+	+	+	+	+	+		E(MI)
J1-2	+	+	+	+	+	+		E(MI)
J1-3	+	+	+	+	+	+		E(MI)
J1-4					+	+		L(MI)
J1-5	+	+	+	+	+	+		E(MI)
J1-6	+		+	+	+	+		H(MI)
J1-7	+	+	+	+	+	+		E(MI)
KS1-1	+	+	+	+	+		+	C
KS1-2	+	+	+	+	+	+		E
KS1-3	+		+	+	+			F
KS1-4	+	+	+	+	+	+		E(MI)
SP1		+	+	+	+	+		K
SP2	+		+	+	+	+		H

YC1	+		+	+	+	+	+	B
YC2-1	+	+	+	+	+	+		E
YC2-2	+		+		+			I
YC2-3	+		+	+	+			F
YC2-4		+		+	+	+	+	D
YC2-5		+		+	+	+	+	D
YC3		+		+	+	+		J
YD1	+	+	+	+	+	+		E
YD2	+	+	+	+	+	+		E
YP1		+		+	+	+		J
YP2		+		+	+	+		J
YP3		+		+	+	+	+	D
YS1-1		+		+	+	+		J(MI)
YS1-2		+		+	+	+		J(MI)
YS1-3		+		+	+	+		J(MI)
YS1-4		+		+	+	+		J(MI)
YS1-5		+		+	+	+		J(MI)
YS1-6		+		+	+	+		J(MI)
YS1-7		+		+	+	+		J(MI)
YS1-8		+		+	+	+		J(MI)
YS1-9		+		+	+	+		J(MI)
YS1-10		+		+	+	+		J(MI)
YS1-11		+		+	+	+		J(MI)
YS1-12		+		+	+	+		J(MI)
YS1-13		+		+	+	+		J(MI)
YS1-14		+		+	+	+		J(MI)
YS1-15		+		+	+	+		J(MI)
YS1-16		+		+	+	+		J(MI)
YS1-17		+		+	+	+		J(MI)
YS1-18		+		+	+	+		J(MI)
YS1-19		+		+	+	+		J(MI)
YS1-20		+		+	+	+		J(MI)
YS1-21		+		+	+	+		J(MI)
YS1-22		+		+	+	+		J(MI)
YS1-23		+		+	+	+		J(MI)
YS1-24		+		+	+	+		J(MI)
YS1-25		+		+	+	+		J(MI)
YS1-26		+		+	+	+		J(MI)
YS1-27		+		+	+	+		J(MI)
YS1-28		+		+	+	+		J(MI)
YS1-29		+		+	+	+		J(MI)
YS1-30		+		+	+	+		J(MI)
YS1-31	+	+	+	+	+			G(MI)

+ : deletion of target gene

Note : pathogenic gene type(MI means mass infection)

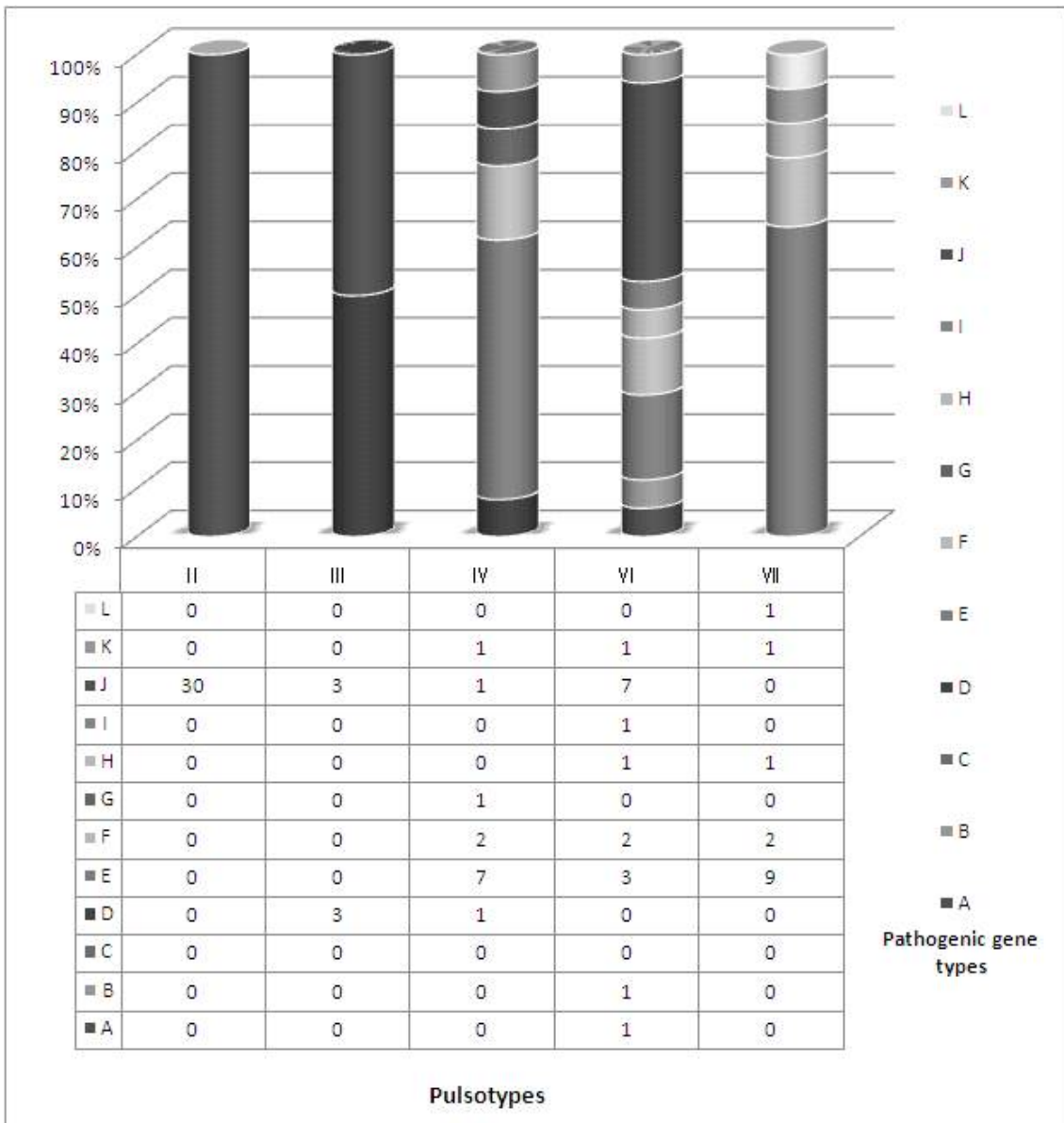
**Table 4. Distribution of EPEC serotypes and pathogenic gene types observed in this study**

Serotype(no. of strains)		Pathogenic gene type
O	H	
O1(2)	H21(2)	J(2)
O6(3)	H16(3)	F(1), K(1), L(1)
O8(1)	H9(1)	F(1)
O25(1)	H4(1)	H(1)
<b>O27(16)</b>	H6(2),H7(2), <b>H21(10)</b> ,H28(1),N(1)	J(H6-2,N-1), B(1), <b>E(H21-9,H7-1)</b> , <b>K(1)</b> , F(1)
O29(1)	N(1)	J(1)
O55(1)	H19(1)	J(1)
O78(2)	H21(2)	E(2)
<b>O111(29)</b>	<b>H9(29)</b>	<b>J(29)</b>
O115(3)	H4(1),H19(1),N(1)	D(H4-1,N-1), E(1)
O124(1)	H21(1)	F(1)
O125(3)	H19(3)	J(3)
O126(1)	H4(1)	D(1)
O127a(1)	H21(1)	F(1)
O142(2)	H6(2)	C(1), J(1)
O146(1)	H19(1)	J(1)
O148(1)	N(1)	H(1)
O158(3)	H7(1),N(2)	I(1), J(1), K(1)
O167(1)	H9(1)	F(1)
O168(1)	N(1)	D(1)
<b>O169(9)</b>	<b>H19(6)</b> ,H21(1),N(2)	<b>E(H19-5,N-1)</b> , A(1), G(1)

Isolates are sorted by O antigen of EPEC in this table. The highlights contain mass infection cases.

### 3. Genetic diversity of EPEC : PFGE 분석

J지역, GR지역, YS지역에서 검출된 EPEC 균주들은 우연감염에 의한 일부를 제외하고, 나머지 균주들의 pulsotype이 100% 동일한 것으로 확인되어 집단식중독의 원인균임이 판명되었다. 그 외 서울지역에서 산발적으로 발생한 개별 EPEC 균주들은 대체로 낮은 homology와 다양하고 많은 pulsotypes을 보이며 역동적으로 분화되어감을 보여주었다(Figure 4). Homology 80%를 기준으로 통상적으로 분류해 본 결과 34종류의 pulsotypes을 확인할 수 있었으며 전체 pulsotypes이 43종류인 점(분석 결과의 뒤트림을 예방하기 위하여 집단 식중독 균주 중 homology가 100% 동일한 균주들을 하나의 균주로 산정함으로써 총 84건이 43건으로 계산됨)을 감안할 때, 9 균주만이 분자생물학적으로 동일한 origin으로부터 분화한 가까운 유연관계를 가지고 있는 것으로 확인되었다. Homology 60%를 기준(편의상 III group 54.7% 제외)으로 크게 I, II, III, 3 group으로 나누었고, 분지가 많이 이루어진 I group을 다시 4 groups로 세분하였다. Grouping을 한 결과, 특히 V node로부터 분지가 많이 이루어져서 IV group(7종류) 또는 II group(3종류)보다 다양한 종류의 pulsotypes(16종류)을 나타내었으며, 그 중 VI group(12종류)이 75%를 차지하고 있었다. 이 사실은 VI group이 격심한 분화를 겪었음을 말해주는 것이며, Figure 3 역시 VI group이 다른 group에 비해 다양한 유전자 조합으로 이루어져 있음을 보여준다. 전체 개별 감염 43개의 균주 중 homology 80%를 초과하는 9 균주 외에는 확연히 낮은 homology를 보여줌으로써 균주 간 유연관계가 많이 떨어져 있음을 알 수 있었다. 이것은 서울지역에서 검출되는 EPEC 균주들이 서로 다른 origins로부터 왔으며, 다각도로 진화되어왔음을 알 수 있게 해주었다. 또한 다른 종류의 *E. coli* 균주들과 함께 감안한다면, 훨씬 더 다양한 분화의 결과를 예측할 수 있다.



**Figure 3. Bar graph and table showing distribution of each pathogenic gene types in pulsotypes**

Pulsotype VI consist of more diverse pathogenic gene types than others and it also shows in dendrogram.



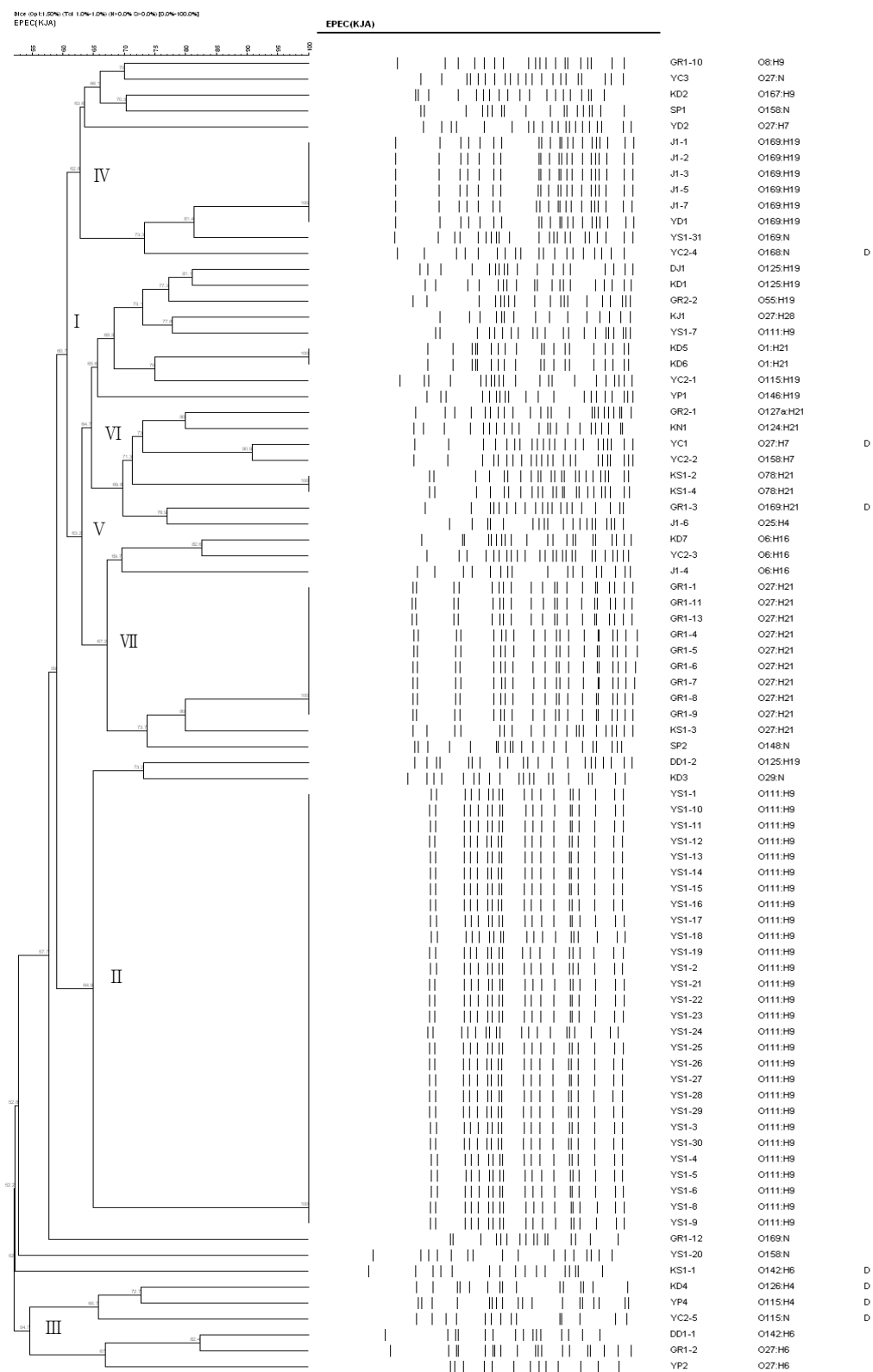


Figure 4. Dendrogram showing the clustering of PFGE patterns after *Xba* I digestion for EPEC. D means *bfpA* detection.

#### 4. 병원성 유전자 간 cooperative relationship

Cohen의 kappa coefficient를 이용하여 병원성 유전자들 간의 inter-agreement를 분석한 결과값이, 0.0~0.20은 slight agreement, 0.21~0.40은 fair agreement, 0.41~0.60은 moderate agreement, 0.61~0.80은 substantial agreement, 0.81이상의 값은 almost perfect agreement의 의미를 가지게 된다. 유의수준 0.05를 기준으로 분석한 결과, 이론상 짝으로 역할을 하는 유전자인 intimin을 생산하는 *eaeA* 유전자와 intimin receptor를 생산하는 *Tir* 유전자는 kappa coefficient가 0.680로써 substantial agreement를 간주할 수 있었다( $p=0.001$ ). *espB*는 *espA*나 *espD*와의 일치도가 떨어졌으나 *espA*와 *espD*간의 coefficient는 0.835로 거의 완벽한 일치율을 보임으로써( $p=0.001$ ), EPEC의 병원성에 상호 관련되어 영향을 미치는 것을 알 수 있었다(Table 5). *eaeA* 유전자는 *astA*를 제외한 나머지 chromosomal 병원성 유전자와 fair 이상의 일치율을 보였는데, *escN* 유전자도 *eaeA* 유전자와 마찬가지로 다른 병원성 유전자들과 높은 상호 관련성을 가지고 있었다. 그 중 *escN* 유전자와 *eaeA* 유전자의 kappa coefficient는 0.929로서 거의 일치하였는데, 이는 *eaeA* 유전자의 검출과 거의 일치되게 *escN* 유전자가 함께 검출되는 것을 의미한다.

**Table 5. Kappa coefficient showing inter-pathogenic genes-agreement**

	<i>eaeA</i>	<i>bfpA</i>	<i>espA</i>	<i>espB</i>	<i>espD</i>	<i>escN</i>	<i>Tir</i>
<i>eaeA</i>		.106*	.350	.652	.416	<b>.929</b>	.680
<i>bfpA</i>	.106*		.039*	.146*	.011*	.121	.136*
<i>espA</i>	.350	.039*		.009*	.835	.339	-.013*
<i>espB</i>	.652	.146*	.009*		.099*	.716	.781
<i>espD</i>	.416	.011*	.835	.099*		.410	.073*
<i>escN</i>	<b>.929</b>	.121	.339	.716	.410		.681
<i>Tir</i>	.680	.136*	-.013*	.781	.073*	.681	

\*. Higher p-value than significance level of 0.05

Kappa coefficient <0.200 slight agreement, 0.201~0.400 fair agreement, 0.401~0.600 moderate agreement, 0.601~0.800 substantial agreement, >0.801 almost perfect agreement

## 5. 병원성에 대한 병원성 유전자의 기여도 평가

Table 5에서 보듯이 질병 발생 여부에 상관없이 모든 균주에서 검출된 *astA*는 상수로 취급되어 통계량을 구할 수 없었으며, 이는 *astA* 유전자를 검출 유전자로 사용할 수 없음을 나타낸다. Chi-square 독립성 검정의 결과, *eaeA*, *espB*, *espD*, *escN*, *Tir*은  $p < 0.001$ 으로 유전자의 존재와 질병 발생이 관련이 없다는 귀무가설을 기각함으로써 통계적으로 유의하게 질병 발생에 영향을 끼치고 있음이 증명되었으며, *espA* 유전자도 역시  $p = 0.001$ 로  $\alpha = 0.05$ 수준에서 유의하게 질병 발생과 관련되어 있었다. *BfpA*는 Fisher의 정확검정에 의한  $p$ 값이 0.088로 계산되었는데, 이는 *bfpA* 유전자가 유의수준 0.05를 기준으로 통계적으로 질병 발생과 관련성이 약한 것을 의미하였다. Odds ratio와 함께 분석해 볼 때, *espA*가 있는 대장균은 없는 대장균에 비해 19배, *espD*를 가진 대장균은 가지지 않은 대장균보다 25배의 질병 유발 가능성을 나타내었고, *eaeA*, *espB*, *escN*, *Tir*은 본 실험에서는 무한대의 수치로 계산되었으며, 이는 유전자가 존재함으로써 질병 유발 가능성이 월등하게 높아짐을 알 수 있게 하였다(Table 5). 그 중 *escN* 유전자는 현재 검출 유전자로 이용되고 있는 *eaeA* 유전자와 비슷한 chi-square 수치를 나타냄으로써, 검출 유전자로서 유용할 수 있음을 보여주었다.

**Table 6. Summary of chi-square independence test results and odds ratio of each gene in this study**

	disease present	disease absent	Pearson Chi- Square	p-value (2-sided)	odds ratio
<i>eaeA</i> present	44	0	64.000 <sup>a</sup>	.000	∞
<i>eaeA</i> absent	0	20	(6.25 <sup>b</sup> )		
<i>bfpA</i> present	7	0	3.573	.088 <sup>c</sup>	∞
<i>bfpA</i> absent	37	20	(2.19 <sup>b</sup> )		
<i>espA</i> present	22	1	12.094 <sup>a</sup>	.001	19
<i>espA</i> absent	22	19	(7.19 <sup>b</sup> )		
<i>espB</i> present	33	0	30.968 <sup>a</sup>	.000	∞
<i>espB</i> absent	11	20	(9.69 <sup>b</sup> )		
<i>espD</i> present	25	1	15.306 <sup>a</sup>	.000	25
<i>espD</i> absent	19	19	(8.13 <sup>b</sup> )		
<i>escN</i> present	42	0	55.537 <sup>a</sup>	.000	∞
<i>escN</i> absent	2	20	(6.88 <sup>b</sup> )		
<i>astA</i> present	44	20	* <sup>d</sup>	*	*
<i>astA</i> absent	0	0			
<i>Tir</i> present	34	0	32.970 <sup>a</sup>	.000	∞
<i>Tir</i> absent	10	20	(9.38 <sup>b</sup> )		

a. 0 cells(0%) have expected count less than 5.

b. The minimum expected count.

c. 2 cells(50%) have expected count less than 5, fisher's exact significance.

d. No statistics are computed because *astA* is a constant.

## IV. 고찰

현재까지 설사 유발 균으로 알려져 있는 병원성 대장균들은 각각의 독특한 virulence factors와 기작을 가지고 있다.<sup>(1)</sup> 현재 병원성 대장균으로 확인되어 분류되고 있는 균주들에는, 여러 차례의 큰 이슈를 통하여 대중에게 많이 알려져 있는 장출혈성 대장균을 비롯하여 장독소형 대장균, 장응집성 대장균, 장침입성 대장균 그리고 장병원성 대장균이 있다.<sup>(31, 32, 33)</sup> 장출혈성 대장균은 미국을 비롯한 일본, 유럽 지역 등지에서 많은 이슈가 되었던 균주이다. 그리고 우리나라에서도 제 1군 법정 전염병으로 지정되어 있을 만큼 그 위험도가 커서, 발생 시에는 즉시 방역 대책을 수립해야 하는 균주이며,<sup>(34)</sup> 현재도 심심치 않게 등장하기 때문에 이 균주에 대한 지속적인 감시 활동과 연구가 가장 활발하게 진행되고 있다. EPEC를 비롯한 그 외 병원성 대장균 균주들은 장출혈성 대장균만큼 연구가 이루어지고 있지는 않지만, 현재 많은 부분이 밝혀지고, 범주화되고, 확인되었다. 그러나 여전히 대장균의 병원성에 대하여 연구가 필요한 이유로는, 아직 밝혀지지 않은 대장균의 virulence factors에 대한 규명과 그들 사이의 combination에 의한 질병의 발생 가능성이 상재하고 있기 때문이다. 대표적인 경우가 ETEC(장독소형 대장균) toxin인 EAST1 (*astA*)과 EPEC(장병원성 대장균)의 virulence factor인 intimin (*eaeA*)의 combination에 의한 outbreak이다.<sup>(15)</sup>

이 연구는 지난 2007년부터 2009년까지, 집단 식중독의 원인균으로서 EPEC가 자주 출현하였음에 착안을 하여, 서울지역에서 검출되는 EPEC의 분포 특성의 파악과 더불어, EPEC의 검출에 있어서 서울 지역의 현황에 맞는 신뢰성있는 검사가 이루어지길 바라는 목적으로 이루어졌다.

먼저 서울시에서 검출된 EPEC 균주들은 아주 다양한 serotypes으로 이루어져 있었으며(Table 4), 다른 국가에서 검출된 EPEC의 양상과는 다른 독특한 결과를 보여주었다.<sup>(23,24,25)</sup> 또한 병원성 유전자 types의 다양한 결과(Table 2, Table 3) 및 확연히 떨어지는 homology를 보여주는 PFGE의 결과는(Figure 4) 서울시에 존재하는 EPEC 균주들이 다양한 유래에서 시작되었으며, 또한 역동적인 분화의 과정을 거쳤음을 간접적으로 시사하고 있었다.

*EaeA* 유전자는 질병관리본부의 검사지침에 의하여 EPEC의 진단 기준으로 사용되고 있는 유전자이다. 민감도와 특이도는 진단 검사에 있어서 중요한 요소로서, 이번 연구에서 *eaeA* 유전자의 민감도와 특이도는 Table 6에서 미루어 확인할 수 있

다. 하지만 애초에 *eaeA* 유전자가 검출된 균주를 시험대상으로 했으므로, 이 수치를 그대로 인용하기에는 무리가 있기 때문에 다른 문헌을 살펴보았다. Donnenberg 등의 임상 연구<sup>(40)</sup>를 보면 *eaeA* 유전자를 지닌 wild type EPEC를 주입시킨 11명의 지원자 전원에게서 설사가 유발되었으며, *eaeA* 유전자가 제거된 돌연변이 EPEC에 의해서는 11명 중 4명에게서 설사가 유발된 결과를 볼 수 있다( $p=0.002$ ). 이 결과는 민감도 100% (11/11), 위양성률 36% (4/11)로 분석될 수 있음과 동시에, 위양성률을 나타내는 수치의 다른 의미를 추론해 볼 수 있다. EPEC의 병원성에 *eaeA* 유전자 뿐 만 아니라 다른 virulence factors의 존재를 충분히 증명하고 있으며, 이는 지속적으로 검출 유전자 발굴의 필요성을 보여주고 있는 것이다. 위 결과를 통해, 적어도 *eaeA* 유전자가 설사 유발에 확실한 기여를 하고 있음을 확인할 수 있으며, *eaeA* 유전자를 검출 유전자로 쓰는 것에 대한 근거를 제시해 준다. 반면 특이도 부분에 대하여, 이번 연구에서는 정상인에게서 *eaeA* 유전자가 한 건도 검출되지 않으므로써 특이도 100%를 보여주었으나, 시료수( $n=20$ )가 다소 적음으로써 다른 문헌<sup>(22)</sup>에서 보여지는 무증상 EPEC 보유자를 발견해내지 못하였다. 또한 Ochoa 등의 연구<sup>(22)</sup>에서 나타나듯이, EPEC의 감염은 나이에 따라 susceptibility가 달라지기 때문에 이러한 점들을 대조군 선택 시 고려하고, 또한 설사 환자 전체에서 *eaeA*를 가진 EPEC가 차지하는 비율 및 설사균이 가진 비병원성 대장균의 특성과 비교 분석해 본다면, EPEC의 역학적 분석에 좀 더 내실을 기할 수 있을 것이라 기대한다. 그리고 앞으로 다른 병원성 유전자들의 병원성 평가와 관련된 조사 및 분석에 있어서도 중요한 point들을 제공할 것이라 생각한다.

검출 초기에는 EPEC를 검출하는데 *eaeA* 유전자를 단독으로 사용하였지만 먼저 언급한 *eaeA* 유전자의 불완전성으로 인해 보충적인 검출 유전자를 필요로 하게 되었다. Levine 등의 실험을 통하여 EPEC의 병원성에 중요한 영향을 미치는 EAF(EPEC Adherence Factor) plasmid의 존재와 *bfp* 유전자가 확인되었는데,<sup>(36,37,38)</sup> Bundle forming pili의 형성에 관여하는 *bfp* 유전자뿐만 아니라, EAF plasmid내에 존재하는 *per*(plasmid-encoded regulator) 유전자에 의하여 EPEC의 병원성이 증가하는 사실이 밝혀짐으로써<sup>(39)</sup> EAF plasmid의 검출은 EPEC의 확인에 결정적이었다.

그 결과 서울시에서 검출된 EPEC에 있어서, *bfpA* 유전자가 동반 검출 되지 않고 *eaeA* 유전자가 단독으로 검출된 경우에는, 식중독 원인균으로서 인정을 하지 않게 되었다.<sup>(35)</sup> 하지만 2007년부터 2009년까지 집단 식중독이 여러 차례 발생하였고, 그 중 EPEC가 원인균으로 규명된 사례가 3차례 있었으며, 3차례의 원인균으로 작용하

있던 각각의 EPEC는 *bfpA* 유전자가 없는, *eaeA* 유전자만을 가진 atypical EPEC이었다. 그러므로 원인균의 확인, 규명을 위해서 phenotyping과 PCR뿐만 아니라 PFGE같은 genotyping의 과정을 거친 후에야 그 결과를 종합하여 원인균이라는 결론을 도출할 수 있었다. *bfpA* 유전자가 검출되면 EPEC가 원인균이라는 확실한 증거가 될 수 있지만, 언급한 3차례의 집단 식중독의 경우를 감안한다면, *bfpA* 유전자를 검출 유전자로 삼는 것이 서울 지역의 경우에는 타당치 않다는 문제의식을 가질 수 있다.

연구의 결과 *astA* gene은 EPEC뿐만 아니라 정상인 microflora의 대장균에서도 존재함이 밝혀짐으로써, *astA* 유전자는 유전자의 존재 유무에 의하여 병원성이 결정되는 것이 아니라, 유전자의 발현 여부에 따라 병원성이 나타나는 것으로 파악되었다. 그리고 *astA* 유전자의 발현과 맞물려서 다른 병원성 유전자와의 상호작용에 의한 질병 발생의 가능성을 보여줌과 동시에<sup>(15)</sup> *astA* 유전자를 검출 유전자로써 사용할 수 없다는 결론을 내릴 수 있었다. *BfpA* 유전자는 odds ratio로부터 질병 발생에 유의한 영향을 미침을 알 수 있었지만, typical EPEC의 검출 자체가 서울시 지역에서는 확연하게 적은 현황으로 인해(Table 3, Figure 4) chi-square independence test의 p-value(0.088)가 높게 나타남으로써, 원인균 검출에 큰 도움이 되지 않는다는 결론에 도달하였다. 하지만 *bfpA* 유전자의 존재(EAF plasmid의 존재)는 확실하게 EPEC에 의한 발병을 뜻하므로 여전히 그 가치는 존재한다. 현재 검출 유전자로 활용되고 있는 *eaeA*, *bfpA*를 제외한 그 외 *espA*, *espB*, *espD*, *escN*, *Tir* 등 연구 대상 병원성 유전자들이 서로 상호 관련되어 모두 질병 발생에 큰 영향을 미치는 가운데 이번 연구에서의 통계적 분석 결과, 연구 대상 유전자들 중 *escN* 유전자가 가장 효율성과 신뢰성을 가진 보완 검출 유전자라는 결론을 내리게 되었다.

여전히 많은 부분이 규명되지 않은 상태에서, 지속적으로 발병하고 있는 diarrheic *E. coli*에 대하여, 앞으로도 여러 경로를 통하여 그 병원성을 연구하고 이를 활용하는 것이 공중 보건의 이해와 향상에 기여하는 한 방법이라 생각한다.



## V. 참고 문헌

1. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews, 1998, **11**, 142-201.
2. Knutton S, Baldwin T, Williams PH, McNeish AS. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infection and Immunity, 1989, **57**, 1290-1298.
3. Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA. Attaching and effacing of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. Infection and Immunity, 1983, **41**, 1340-1351.
4. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America, 1995, **92**, 1664-1668.
5. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerging Infectious Diseases, 2002, **8**, 508-513.
6. Kaper JB. Defining EPEC. Revista de Microbiologia, 1996, **27**, 130-133.
7. Li Y, Frey E, Mackenzie AM, Finlay BB. Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. Infection and Immunity, 2000, **68**, 5090-5095.
8. Parissi Crivelli A, Parissi Crivelli JM, Giron JA. Recognition of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants by human colostrum and serum antibodies. Journal of Clinical Microbiology, 2000, **38**, 2696-2700.
9. Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, et al. A novel Esp-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. EMBO, 1998, **17**, 2166-2176.
10. Shaw KR, Daniell S, Ebel F, Frankel G, Knutton S. EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. Cell Microbiology, 2001, **3**, 213-222.
11. Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S.

Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Molecular Microbiology*, 1998, **30**, 911-21.

12. Kaper JB, McDaniel TK, Jarvis KG, Gomez Duarte O. Genetics of virulence of enteropathogenic *E. coli*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1997, **412**, 279-287.

13. Kenny B, Devinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell*, 1997, **91**, 511-20.

14. Jarvis KG, Giron JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS, Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a specialized secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America*, 1995, **92**, 7996-8000.

15. Hedberg CW, Savarino SJ, Besser JM, Paulus CJ, Thelen VM, Meyers LJ, Cameron DN, Barrett TJ, Kaper JB, Oosterholm MT. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM: an agent that does not fit into the existing scheme for classifying diarrheagenic *E. coli*. *Journal of Infectious Diseases*, 1997, **Dec 176(6)**, 1625-1628.

16. Fivaz M, van der Goot FG. The tip of a molecular syringe. *Trends in Microbiology*, 1999, **7**, 341-343.

17. Ide T, Laarmann S, Greune L, Schillers H, Oberleithner H, Schmidt MA. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 2001, **3(10)**, 669-679.

18. Hartland EL, Daniell SJ, Delahay RM, Neves BC, Wallis T, Shaw RK, Hale C, Knutton S, Frankel G. The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. *Molecular Microbiology*, 2000, **35(6)**, 1483-1492.

19. Ogino T, Ohno R, Sekiya K, Kuwae A, Matsizawa T, Nonaka T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Abe A. Assembly of the Type III Secretion Apparatus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2006, **Apr**, 2801-2811.

20. Hernandez RT, Elias WP, Vieira MAM, Gomes TAT. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters, 2009, **297**, 137-149.
21. Elliott SJ, Sperandio V, Giron JA, Shin S, Mellies JL, Wainwright L, Hutcheson SW, McDaniel TK, Kaper JB. The Locus of Enterocyte Effacement(LEE)-Encoded Regulator Controls Expression of Both LEE- and Non-LEE-Encoded Virulence Factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infection and Immunity, 2000, **Nov**, 6115-6126.
22. Ochoa TJ, Barletta F, Contreras C, Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2008, September, **102(9)**, 852-856.
23. Arbeloa A, Blanco M, Moreira FC, Richard B, Lopez C, Dahbi G, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, Mamani C, Gomes TAT, Blanco J, Frankel G. Distribution of *espM* and *espT* among enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Journal of Medical Microbiology, 2009, **58**, 988-995.
24. Campos LC, Franzolin MR, Trabulsi LR. Diarrheagenic *Escherichia coli* Categories among the Traditional Enteropathogenic *E. coli* O Serogroups - A Review. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 2004, **99(6)**, 545-552.
25. Kozub-Witkowski E, Krause G, Frankel G, Kramer D, Appel B, Beutin L. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhea in Germany. Journal of Applied Microbiology, 2008, **104**, 403-410.
26. Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. FEMS Microbiology Reviews, 2005, **29**, 83-98.
27. Vallance BA, Finlay BB. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. Proceedings of the National academy of Sciences of the United States of America. 2000, **97**, 8799-8806.
28. Ruchman I, Dodd K. The Isolation of a strain of *Escherichia coli* Pathogenic for the Rabbit's Eye from a Patient with Diarrhea. Journal of Bacteriology, 1947, May, **53(5)**, 653-656.

29. Cooper ML, Walters EW, Keller HM. Detection of a New Serotype of *Escherichia coli*, *E. coli* O127:B8, Associated with Acute Diarrhea in Infants. *Journal of Bacteriology*, 1955, June, **69(6)**, 689-694.
30. Ewing WH, Tanner KE, Tatum HW. A New Serotype of *Escherichia coli* associated with Infantile Diarrhea. *Public Health Reports*, 1955, February, **70(2)**, 107-114.
31. Centers for Disease Control (CDC). Isolation of *E. coli* O157:H7 from Sporadic cases of Hemorrhagic colitis-United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1982, Nov5, **31(43)**, 580-585.
32. Centers for Disease Control(CDC). Foodborne outbreaks of enterotoxigenic *Escherichia coli*-Rhode Island and New Hampshire, 1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 1994, Feb11, **43(5)**, 81, 87-89.
33. Centers for Disease Control(CDC). Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111 infections associated with a correctional facility dairy - Colorado, 2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2012, Mar9, **61(9)**, 149-152.
34. 대한민국 법률 제7588호. 전염병 예방법. 제 2조 제 1항. 일부개정 2005.7.13.
35. Korea Centers for Disease & Prevention (KCDC). 감염병 실험실 진단 시험법 제 10장 장출혈성 대장균 및 병원성 대장균 감염증.
36. 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 enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *Journal of Infectious Diseases*, 1985, **152**, 550-559.
37. Girón JA, Ho ASY, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 1991, **254**, 710-713.
38. Donnenberg MS, Girón JA, Nataro JP, Kaper JB. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Molecular Microbiology*, 1992a, **6**, 3427-3437.

39. Jerse AE, Kaper JB. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encoded a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infection and Immunity*, 1991, **59**, 4302-4309.
40. Donnenberg MS, Tacket CO, Jamis SP, Losonsky G, Nataro JP, Wasserman SS, Kaper JB, Levine MM. Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Journal of Clinical Investigation*, 1993a, **92**, 1412-1417.

Abstract

Pathogenicity Evaluation of  
Pathogenic Genes and Typing of EPEC  
isolated from Patients With Diarrhea  
in Seoul Metropolitan City

JIN-AH KIM

Department of Environmental Health  
The Graduate School  
Seoul National University

The purposes of this study were to confirm characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) distribution in Seoul city and to identify valid complementary pathogenic genes to detect EPEC. EPEC is a leading diarrhea-causing bacterium in infants; however, EPEC infected adults and juveniles intermittently and played a role as diarrhea-causing bacteria in mass food poisonings in Seoul city occasionally during 2007 - 2009. We investigated isolates with the *eaeA* (intimin) gene, which is a representative pathogenic gene of EPEC, to determine whether there are other pathogenic genes- such as *bfpA*, *espA*, *espB*, *espD*, *escN*, *astA*, and *Tir*. by PCR. We evaluated the contribution of each gene to pathogenicity of EPEC and the cooperative relationship among them using statistical methods. We found most of isolates had several pathogenic genes and their genetic relationship contributed to EPEC pathogenicity. Atypical EPEC strains, which did not have the *bfpA* gene, were detected much more than typical EPEC with *bfpA* in Seoul city, and their serotypes consisted of various O and H types. The results of serotyping, pathogenic gene typing, and PFGE in our study showed that the distribution of EPEC strains in Seoul city was very diverse and that their genetic homology was generally low. We also found that the *escN* gene was the most valid complementary gene that could be used for detecting EPEC among genes tested in this study.

Keywords : EPEC, pathogenic genes, statistics, PFGE

Student's Number : 2010-22050