

## 서울지역 설사환자로 부터 분리된 *Shigella flexneri*의 성상과 유전적 특성

승현정 · 김무상 · 오영희 · 최병현 · 채희선 · 초가기<sup>1</sup> · 전무형<sup>1,\*</sup>

서울특별시보건환경연구원, <sup>1</sup>충남대학교 수의과대학  
(게재승인: 2006년 10월 25일)

### Genetic characterization of *Shigella flexneri* isolated from the diarrheic patients in Seoul region

Hyun-Jung Seung, Moo-Sang Kim, Young-Hee Oh, Byung-Hyun Choi,  
Hee-Sun Chae, Jiaqi Chu<sup>1</sup>, Moo-Hyung Jun<sup>1,\*</sup>

Seoul Metropolitan City Research Institute of Public Health & Environment, Seoul 137-734, Korea

<sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Accepted: October 25, 2006)

**Abstract :** The shigellae are common etiological agents of bacillary dysentery in humans and primates. During four years from 2002 to 2005, 22 strains of *Shigella* spp. were isolated from the diarrheic patients in Seoul region. All of them were identified as *S. flexneri* by biochemical tests and serotyping. The prevalence of serotypes were variable by year, but the major serotypes were 2a and 3a. In an antimicrobial susceptibility test, all of the isolates were resistant to streptomycin and tetracycline, and susceptible to amikacin, kanamycin, cefoxitin, and gentamicin. All of the isolates showed the multi-resistant patterns over 3 drugs. By analysis of the plasmid profile the isolates were classified into 7 groups (P1~P7). Serotypes 2a and 2b were distributed to P1, P2, P3, and P4. Serotype 3a was differentiated to P5 and serotype 3b, to P6 and serotype 4a, to P7. PCR results showed that all isolates were positive for two virulence genes, *ipaH* and *ial*, but none of the strains had *stx* gene. The *setIA* and *setIB* genes were detected from 12 isolates (54.5%) that belonged to serotype 2a and 2b. The *sen* gene was detected from 19 isolates (86.4%). The 22 isolates showed 12 to 17 DNA fragments in the sizes ranging from 20.5 kb to 1135 kb, resulting in 13 patterns by the PFGE with *Not* I digestion. The PFGE patterns of the isolates showed the close relation with the serotypes, but no relations with year of isolation and antimicrobial resistance.

**Key words :** genetic analysis, Korean isolates, PFGE, *S. flexneri*, virulence

## 서 론

세균성 이질(shigellosis, bacillary dysentery)의 원인체인 *Shigella* 균은 1896년 Kiyoshi Shiga에 의해 처음 발견되었으며, 항원 특성에 따라 *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*의 4종류로 구분된다 [9]. *Shigella*는 *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Campylobacter* 및 *Listeria* 균과 함께 장관계 감염의 중요한 원인균이다 [9,

23]. *Shigella* 균 감염에 의한 세균성 이질은 사람과 영장류에서 일어나고 일반 가축에서는 발병하지 않는다. 이 균은 감염된 사람의 분변에 오염된 식수나 음식물을 매개로 전파되거나 환자나 보균자와의 직·간접적인 접촉에 의해 전염된다 [4, 9]. *Shigella* 균은 위장 내의 강한 산성 조건에서도 살아남아 장에 도달하고 증식하기 때문에 적은 수의 균으로도 감염되어 발병할 수 있다. 세균성 이질에 감염되면 2일 내지 5일의 잠복기를 거쳐

\*Corresponding author: Moo-Hyung Jun

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea  
[Tel: +82-42-821-6753, Fax: +82-42-821-6753, E-mail: mhjun@cnu.ac.kr]

대장점막에 염증과 출혈성 장염으로 인해 점혈변 증상이 관찰되고, 발열, 구토 및 경련성 복통을 동반한 설사가 일어난다 [6]. *S. dysenteriae*에 감염시 중증 감염을 일으키고, *S. sonnei*의 경우에는 가벼운 증세를 보이거나 무증상 감염으로 경과하기도 한다.

세균성 이질은 위생 정도가 낮은 개발도상국에서 다발하지만, 최근 선진국에서도 아열대지방으로 여행한 사람에서 발병빈도가 높아서 여행자 설사의 중요한 임상형으로 지적되고 있다 [9, 14, 24]. *Shigella* 균의 혈청형 중 *S. flexneri*와 *S. dysenteriae*는 개발도상국에서 분리빈도가 높은 반면 *S. sonnei*는 미국을 비롯한 선진국에서 흔히 발생하는 여행자 설사의 원인균이다 [9, 24]. *Shigella* 균의 병원성은 장관 및 장점막에 정착하여 침입하는 장세포 침습성과 전이성 그리고 증식능을 통하여 나타나며, 이런 특성은 120-140 MDa plasmid가 갖고 있는 침습성에 관련하는 유전자(*ial*)와 염색체와 plasmids에 multiple copies로 존재하는 invasion plasmid 항원 H(*ipaH*) 유전자에 의해 기인된다고 알려져 있다 [7, 10].

*S. dysenteriae*에 존재하는 병원성 인자로는 균체가 용해되면서 유리되는 Shiga 독소가 알려져 있으며, 장관독성, 세포독성 및 신경독성을 나타낸다 [8, 19]. 이 독소는 염색체의 *stx* 유전자에 암호되어 있으며 병원성 대장균에서도 주요한 병원성인자로 작용한다. 그러나 이 독소는 *Shigella* 균의 장관 내 침습성이나 세포 용해에 반드시 필요한 것이 아니라고 지적되고 있다 [8]. 최근 *S. flexneri* 2a에서 두 가지 새로운 장관독소(enterotoxin)가 밝혀졌다. *Shigella* enterotoxin 1(ShET-1)은 *set1* 염색체 유전자에 암호된 것으로 하나의 A subunit와 여러 개의 B subunit으로 구성되어 있으며, *S. flexneri* 2a에는 모두 존재 한다 [19]. 또한 *Shigella* enterotoxin 2(ShET-2)는 *sen* 유전자에 암호 되어 있고, 140 MDa의 plasmid에 존재 하며 침습성과 관련이 있다고 알려져 있다 [16, 19]. *Shigella* 균의 장관 상피세포내 침습성, 증식성, 인접세포로의 전이성과 전파성에는 여러 가지 병인성 인자들이 동시 발현하여 작용하기 때문에 병원성 유전자의 동정과 분석은 중요하다 [8, 10, 19].

최근 국내에서 *S. flexneri*와 *S. sonnei*에 대한 역학적 특성, 항균제에 대한 감수성, 유전적 성상에 대한 연구가 수행된 바 있었으며, 조사 시기와 지역에 따라 분리된 균주의 성상에 다양한 변화가 있음이 보고되었다 [1-3]. 역학적으로 1980년대에는 *S. flexneri*가 *S. sonnei*보다 많이 발생하였으나 1991년 이후에는 *S. sonnei*의 발생이 증가되었다. 그러나 1998년 이후 2000년대 초반 사이 *S. flexneri*의 발생 빈도는 현저히 증가하고 있다 [3].

본 연구에서는 2002년부터 2005년까지 4년 동안 서울지역에서 발병한 설사환자로 부터 분리된 *S. flexneri*

22주를 대상으로 생화학적 성상, 혈청형, 항생제 감수성 및 plasmid profile 분석을 실시하였다. 또한 병원성 유전자 *set1A*, *set1B*, *sen*, *ipaH*, *ial* 및 *stx*를 PCR법으로 검출하였으며, *S. flexneri* 분리주의 유전적 특성을 밝히기 위하여 pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)를 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균분리

2002년 1월에서 2005년 12월 사이에 서울지역에서 집단 혹은 산발적으로 발생한 세균성 이질 환자에서 채취한 분변 가검물을 25개 보건소로부터 의뢰 받아 공시하였다. 모든 가검재료는 MacConkey agar(Difco, USA)에 배양하였고, 무색 투명하게 자란 유당 비분해 집락을 채취하여 Kligler's iron agar(Difco, USA)에 접종한 다음 37°C에서 24시간 배양 후 전형적인 *Shigella* 균의 증식 반응(K/A)을 나타내는 집락을 채취하였다. 분리균주는 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

### 생화학적 성상 검사

분리균을 Tryptic soy agar(Difco, USA)에 배양 후 단독집락을 채취하여 멸균 식염수에 부유시키고 McFarland No. 0.5 탁도로 조정하고 API 20E 키트(BioMerieux, France)에 접종하여 제조사의 술식에 따라 37°C에서 18~24 시간 배양하여 분리균의 당분해능과 효소활성능, 그리고 기질생산능에 대한 생화학적 성상을 시험하였다.

### 혈청형 검사

분리균주의 혈청형은 *Shigella* 항혈청 검사키트(Denka-Seiken, Japan)를 이용하여 제조사의 술식에 따라 시험하였다. Tryptic soy agar에서 37°C에서 24시간 배양한 후 얻어진 집락을 채취하여 슬라이드 응집시험을 실시하였다. 1분 이내에 응집이 관찰되면 양성, 응집이 1분 이후에 일어나거나 미약하게 일어나면 음성으로 판정하였다.

### 항생제 감수성 검사

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)에서 추천된 디스크 확산법(Disc diffusion method)을 이용하여 분리균주의 항생제 감수성 시험을 실시하였다 [17]. BBL sensi-disc(Becton Dickinson, USA)를 사용하여 16종의 항균제에 대한 감수성을 검사하였다(Table 4). Tryptic soy agar에 자란 균 집락을 Mueller Hinton broth(Difco, USA)에 부유하고 McFarland No. 0.5가 되도록 조정된 다음 균액을 Mueller Hinton agar(Difco,

USA)에 도달하고 3~5분간 건조시켰다. 그 후 Disc dispenser (Becton Dickinson, USA)를 이용하여 디스크를 설치하고 37°C에서 24시간 배양한 후 발육 억제대의 직경을 측정하였다.

#### Plasmid profile

분리 동정된 *S. flexneri* 22주를 Tryptic soy broth에 배양하고, 그 균액에 대해 QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, USA)를 사용하여 제조사의 순서에 따라 DNA를 추출하였다 [21]. 균액을 buffer P1(resuspension buffer), buffer P2(lysis buffer) 및 buffer N3(neutralization buffer)로 처리하여 얻어진 상층액을 QIAprep spin column에 옮기고 원침 한 후, buffer PB(binding buffer) 및 buffer PE(wash buffer)로 처리하였다. QIAprep spin column을 buffer EB(elution buffer)로 처리하여 얻어진 추출물을 plasmid profile에 사용하였다. Molecular weight marker로는 phage  $\lambda$  DNA *Hind* digest(TaKaRa Biochemicals, Japan)를 사용하였다. Agarose gel(1%)과 수평형 영동장치(Mupid-21, Cosmo Bio, Japan)를 이용하여 100 V에서 40분간 영동하였으며, DNA의 분절은 ethidium bromide(EtBr)로 염색한 후 관찰하였다. BioNumerics software(Core-Bio, 한국)를 이용하여 DNA 분절패턴에 대한 dendrogram을 작성하여 균주간의 차이를 분석하였다.

#### PCR법에 의한 병원성 유전자 검출

Tryptic soy broth에서 18~24시간 배양된 균액을 Accu-Prep Genomic DNA Extraction Kit(Bioneer, 한국)를 사

용하여 제조사의 순서에 따라 DNA template를 제조하였다. *Set1A*(enterotoxin 1 A subunit), *set1B*(enterotoxin 1 B subunit), *sen*(enterotoxin 2), *ipaH*(invasive plasmid antigen H), *ial*(invasive associated locus) 및 *stx*(shiga toxin) 유전자에 대한 primer를 고안하여, Bioneer회사에 제작 의뢰하여 사용하였다(Table 1).

준비된 template DNA에 대해 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, 한국)로 처리하고 T-Gradient Thermocycler (Whatman, Germany)를 이용하여 PCR을 시행하였다. 유전자 증폭 반응조건은 denaturing, 95°C에서 50초, annealing, 55°C에서 90초, extension, 72°C에서 2분 과정을 30회 반복하였으며, 최종 extension은 72°C에서 7분간 실시하였다. PCR 반응산물은 3% agarose gel상에서 100 V에서 25분간 전기영동한 후 EtBr(0.5  $\mu$ g/ml)로 염색하여 관찰하였다 [11].

#### Pulsed-field gel electrophoresis(PFGE)

Matsushek 등 [15]의 방법을 응용하여 PFGE를 수행하였다. Tryptic soy agar에 24시간 배양된 균을 cell suspension TE(Tris-EDTA) buffer(100 mM Tris pH 7.5 and 100 mM EDTA, pH 7.5)에 넣고 Vitek 탁도계를 이용하여 12~15%로 조정하였다. 여기에 Proteinase K (20 mg/ml) 10  $\mu$ l를 넣고, 미리 준비된 1.2% plug용 agarose mix 200  $\mu$ l와 혼합 후 plug mold(Bio-Rad, USA)에 넣고 굳혔다. Agar plug를 screen cap(Bio-Rad, USA)에 각 검체별로 넣고, cap을 column형태로 조립한 다음 PVC 파이프를 만든 튜브에 넣었다. 그 후 plug를 TE

**Table 1.** PCR primers used in this study to detect the virulence genes associated with *Shigella flexneri*

Gene encoding virulence factor	Primer	Oligonucleotide sequence (5' to 3')	Size of amplified product (bp)	Reference
<i>set1A</i>	ShET1A-U	TCACGCTACCATCAAAGA	309	16
	ShET1A-L	TATCCCCCTTTGGTGGTA		
<i>set1B</i>	ShET1B-U	GTGAACCTGCTGCCGATATC	147	16
	ShET1B-L	ATTTGTGGATAAAAATGACG		
<i>sen</i>	ShET2-U	ATGTGCCTGCTATTATTTAT	799	11
	ShET2-L	CATAATAATAAGCGGTCAGC		
<i>ipaH</i>	Shig-1	TGGAAAACTCAGTGCCCTCT	423	17
	Shig-2	CCAGTCCGTAAATTCATTCT		
<i>ial</i>	ial-U	CTGGATGGIATGGTGAGG	320	7
	ial-L	GGAGGCCAACAATTATTTCC		
<i>stx</i>	stx-U	CAGTTAATGTGGTTGCGAAG	895	18, 19
	stx-L	CTGCTAATAGTTCTGCGCATC		

*set1A*: enterotoxin 1 A subunit, *set1B*: enterotoxin 1 B subunit, *sen*: enterotoxin 2, *ipaH*: invasive plasmid antigen, *ial*: invasive associated locus, *stx*: shiga toxin.

buffer로 잘 세척하고 세절한 후 제한효소용 완충용액 (TaKaRa, Biochemicals, Japen) 10 µl, 제한효소 *Not* I (10 U/µl; TaKaRa, Biochemicals, Japen) 3 µl, BSA (TaKaRa, Biochemicals, Japen) 1 µl, 멸균 증류수 86 µl를 넣고 37°C에서 1시간 30분 반응시켰다. Molecular weight marker로 사용한 *Salmonella* serovar Braenderup ATCC BAA-664는 제한효소 *Not* I 대신 *Xba*(15 U/µl; TaKaRa, Biochemicals, Japen) 2 µl를 넣어 처리하였다. 제한효소 반응이 끝나면 반응용액을 제거한 plug에 세척용 TE buffer를 가하였으며, agar plug 절편을 겔 성형용 콤의 끝 부위에 올려놓은 다음 건조시켰다. 절편의 건조가 끝나면 콤을 설치하고, 1% agarose 용액을 겔에 붓고 굳으면, 콤을 뽑아내고 생긴 well에는 agarose 용액을 부어서 채웠다. 겔을 전기영동셀에 넣고 CHEF II Mapper PFGE (Bio-Rad, USA)를 이용하여 적정조건(gradient 6.0 V/cm, included angle 120°, initial time 2.16초, final time 54.17 초)에 맞추고 14°C에서 18시간 전기영동 하였으며, EtBr(0.5 µg/ml)로 염색하였다. PFGE 결과 위치가 다른 DNA 절편의 수에 따라 균을 결정하였고 [18], BioNumerics software(Core-Bio, 한국)를 이용하여 dendrogram을 작성하여 균주간의 유연관계를 비교분석 하였다.

## 결 과

### 분리균의 생화학적 성상

분리된 22주의 균주에 대해 당분해능, 효소활성능 및

기질생산성을 검사한 결과, D-glucose, D-mannitol에서는 22주 모두 양성반응을 보였으며, D-sorbitol은 8주(36.4%), L-rhamnose는 3주(13.6%), indole은 2주(9.1%), L-arabinose는 1주(4.5%)에서 양성반응을 나타내어 *Shigella* 균의 특성을 나타내었다.

### 분리균의 혈청형 검사

분리된 22주의 *Shigella* 균에 대한 혈청형을 시험한 바, 22주 모두 *S. flexneri*로 동정되었으며, 연도별로는 2002년에 분리된 6주는 2a가 5주(83.3%), 그리고 2b가 1주(16.7%)로 2a 혈청형이 현저히 많았다. 2003년에 분리된 5주의 혈청형은 2b가 2주(40.0%), 2a, 3b, 및 4a가 각각 1주(20.0%)로 다양하였다. 2004년에 분리된 8주는 3a가 7주(87.5%)이고 2a가 1주(12.5%)로 3a 혈청형이 주로 유행하였으며, 2005년에는 2a가 2주(66.7%) 그리고 3a가 1주(33.3%)로 2a형이 많았다. 혈청형별로는 2a는 9주(40.9%), 3a는 8주(36.4%), 2b는 3주(13.6%)이며, 3b와 4a는 각각 1주(4.5%)이었다.

### 항생제 감수성

분리된 *S. flexneri* 22주에 대하여 amikacin 외 15종의 항생제 감수성 검사를 실시한 결과, 모든 분리주는 streptomycin과 tetracycline에 대해 내성을 나타냈으며, 반면에 amikacin, kanamycin, cefoxitin 및 gentamicin에 대해서는 100%의 감수성을 나타냈다. 세균성 이질 치료에 주로 이용되는 trimethoprim/sulfamethoxazole과 ampicillin

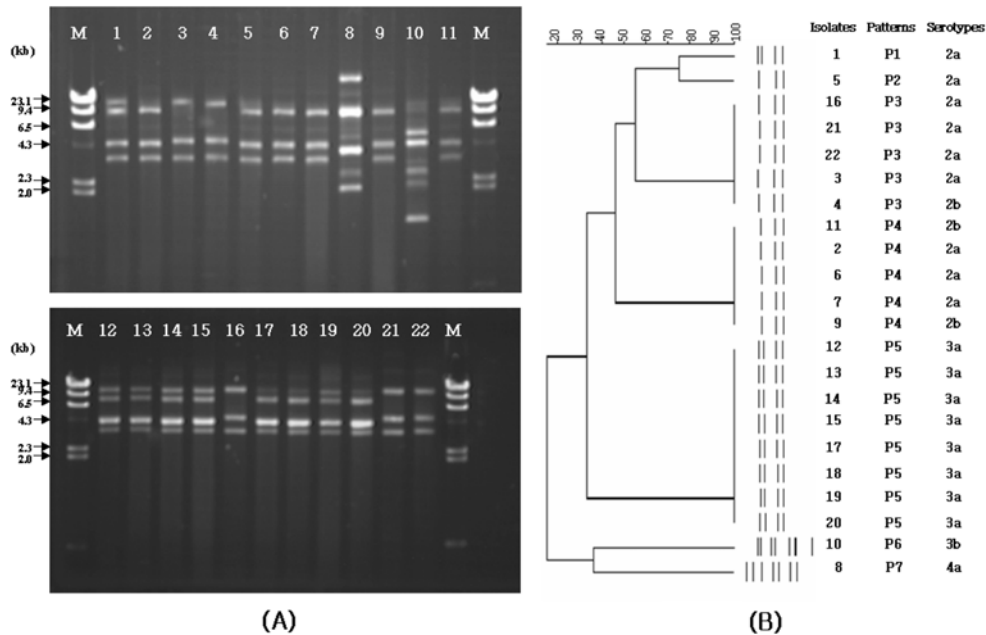
**Table 2.** Antimicrobial susceptibilities of 22 strains of *Shigella flexneri* isolated from patients with diarrhea in Seoul region

Antimicrobial agents	Disc potency (µg)	No. of isolates (%)		
		Resistant	Intermediate	Susceptible
Amikacin	30	0 (0)	0 (0)	22 (100)
Amoxicillin/Clavulanic acid	20/10	6 (27.3)	3 (13.6)	13 (59.1)
Ampicillin	10	14 (63.6)	0 (0)	8 (36.4)
Ampicillin/Sulbatam	10/10	7 (31.8)	4 (18.2)	11 (50.0)
Cefoxitin	30	0 (0)	0 (0)	22 (100)
Ceftriaxone	30	0 (0)	1 (4.5)	21 (95.5)
Cephalothin	30	1 (4.5)	8 (36.4)	13 (59.1)
Chloramphenicol	30	15 (68.2)	5 (22.7)	2 (9.1)
Ciprofloxacin	5	1 (4.5)	1 (4.5)	20 (90.9)
Gentamicin	10	0 (0)	0 (0)	22 (100)
Kanamycin	30	0 (0)	0 (0)	22 (100)
Nalidixic acid	30	3 (13.6)	0 (0)	19 (86.4)
Streptomycin	10	22 (100)	0 (0)	0 (0)
Tetracycline	30	22 (100)	0 (0)	0 (0)
Ticarcillin	75	14 (63.6)	0 (0)	8 (36.4)
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	1.25/23.75	17 (77.3)	0 (0)	5 (22.7)

**Table 3.** Multiple-drug resistance patterns of *Shigella flexneri* isolated from patients with diarrhea in Seoul region

Years	Serotypes	Multiple-drug resistance patterns*	No. of isolates
2002	2a	AM-SAM-S-C-Te-TIC-SXT	1
		AM-SAM-S-C-AmC-NA-Te-TIC-SXT	1
		AM-S-C-Te-TIC-SXT	1
		AM-SAM-S-C-AmC-Te-TIC	1
		AM-SAM-S-C-AmC-Te-TIC-SXT	1
	2b	AM-SAM-CF-S-C-AmC-Te-TIC-SXT	1
2003	2a	AM-S-C-Te-TIC-SXT	1
	2b	AM-S-C-NA-Te-TIC-SXT	1
		AM-S-CIP-C-AmC-NA-Te-TIC-SXT	1
	3b	AM-SAM-S-Te-TIC	1
	4a	AM-S-C-Te-TIC-SXT	1
2004	2a	AM-S-Te-TIC-SXT	1
	3a	S-Te-SXT	4
		S-C-Te	3
2005	2a	AM-SAM-S-C-Te-TIC-SXT	1
		AM-S-C-AmC-Te-TIC-SXT	1
	3a	S-Te-SXT	1

\*AM: ampicillin, AN: amikacin, SAM: ampicillin/sulbatam, CF: cephalothin, S: streptomycin, K: kanamycin, CRO: ceftriaxone, FOX: cefoxitin, CIP: ciprofloxacin, C: chloramphenicol, GM: gentamicin, AmC: amoxicillin/clavulanic acid, NA: nalidixic acid, Te: tetracycline, TIC: ticarcillin, SXT: trimthoprim/sulfamethoxazole



**Fig. 1.** Plasmid profiles (A) and dendrogram showing the clusters of plasmid profile pattern (B) for 22 strains of *S. flexneri* from patients with diarrhea in Seoul region. Lane M; Lambda DNA/*Hind* digest, Lanes 1 to 22; *S. flexneri* isolates.

은 각 각 77.3%(17/22)와 63.6%(14/22)의 내성을 나타내었다(Table 2). 분리주 22주에 대한 항생제 다제 내성을 분석한 바, 모두 3가지 이상의 항생제에 대해 다제 내성을 나타냈다(Table 3).

**Plasmid 패턴 분석**

*S. flexneri* 22주의 plasmid profile을 분석한 결과 3~7개의 밴드가 모든 균주에서 관찰되었으며, plasmid의 수와 크기를 기준으로 dendrogram을 작성한 바, 7종(P1~P7)의 plasmid 유형으로 분류되었다(Fig. 1). P1, P2, P6, P7에는 각 각 1주(4.5%)씩 포함이 되어 있고, P3와 P4는

각 각 5주(22.7%), P5에는 8주(36.4%)가 포함되었다. 혈청형 별로는 3a는 모두 P5에 속하였으며, 3b와 4a는 P6와 P7의 특이한 유형을 각 각 나타내었다. 혈청형 2a는 P1, P2, P3 및 P4, 그리고 2b는 P3, P4의 다양한 유형을 나타내었다(Fig. 1).

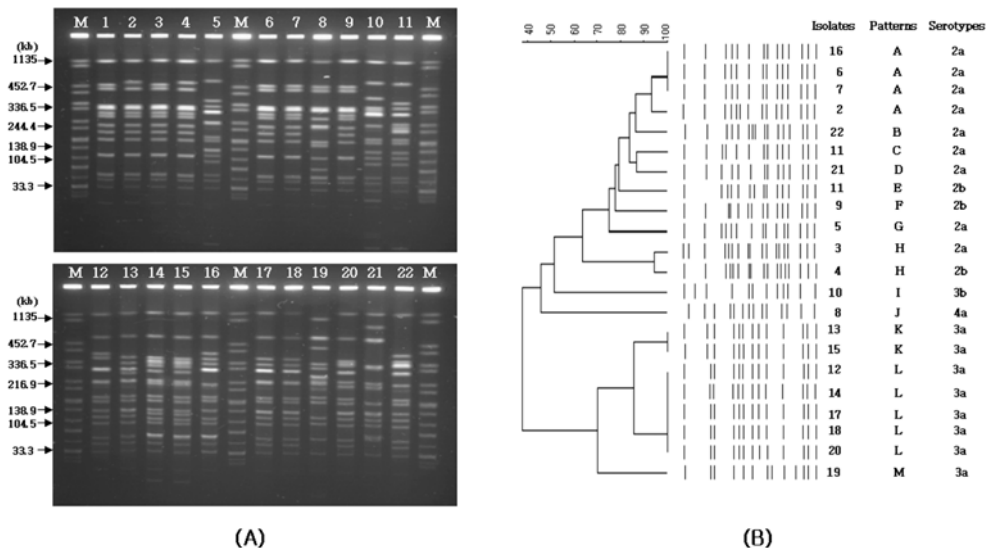
**PCR법에 의한 병원성 유전자 검출**

분리된 *S. flexneri* 22주의 혈청형과 병원성 유전자 검출빈도를 조사하였다. 그 결과 장침습성 관련 유전자 *ial*과 *ipaH*는 22주 모두에서 검출되었으며, *S. dysenteriae*에 존재하는 것으로 알려진 [7, 12] *stx*는 모든 분리주에

**Table 4.** Prevalence of the six virulence genes in *Shigella flexneri* isolates of various serotypes from patients with diarrhea in Seoul region

<i>S. flexneri</i> serotype	No. of isolates	No. of isolates that possessed					
		<i>set1A</i>	<i>set1B</i>	<i>sen</i>	<i>ipaH</i>	<i>ial</i>	<i>stx</i>
2a	9	9	9	9	9	9	0
2b	3	3	3	3	3	3	0
3a	8	0	0	6	8	8	0
3b	1	0	0	1	1	1	0
4a	1	0	0	0	1	1	0
Total (%)	22	12 (54.5)	12 (54.5)	19 (86.4)	22 (100)	22 (100)	0 (0)

*set1A*: enterotoxin 1 A subunit, *set1B*: enterotoxin 1 B subunit, *sen*: enterotoxin 2, *ipaH*: invasive plasmid antigen, *ial*: invasive associated locus, *stx*: shiga toxin.



**Fig. 2.** PFGE patterns (A) and dendrogram showing the clusters of PFGE pattern (B) for 22 strains of *S. flexneri* from patients with diarrhea in Seoul region. Lane M; *Salmonella* serovar Braendrup H9812 Reference (Global) Standards treated with *Xba*, Lanes 1 to 22; *S. flexneri* isolates.

서 검출되지 않았다. *set1A*, *set1B* 및 *sen* 유전자는 혈청형 2a와 2b에서 모두 검출되었다. 혈청형 3a는 모두 *set1A* 및 *set1B* 음성이었으며, *sen*은 8주 중 6주에서 검출되었다. 혈청형 3b는 *set1A* 및 *set1B* 가 검출되지 않았으나, *sen* 유전자는 검출되었다(Table 4).

#### PFGE에 의한 분석

분리된 22주를 *Not I* 제한효소로 처리하여 PFGE를 실시한 바, 20.5~1135 kb 사이에서 12~17개의 DNA 분절이 관찰되었으며, 이 결과를 dendrogram으로 분석하였다(Fig. 2). 90% 이상의 상동성을 기준으로 PFGE pattern을 분류한 바 모두 13개의 유형(A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M)으로 분리되었다. 혈청형 3a는 PFGE 상에서 다른 혈청형과는 다른 특이한 형태로 나타났으며 plasmid profile에서는 한가지의 형태로 나타났으나, PFGE에서는 3개(K, L, M)의 유형으로 분류되었다. 혈청형 3b와 4a는 각각 특이한 유형(I, J)을 나타내었으며, 혈청형 2a와 2b는 8가지의 유형을 나타내었다(Fig. 2).

## 고 찰

세균성 이질의 원인체인 *Shigella* spp.의 특성은 분리 연도, 분리 지역, 역학적 조건 등에 따라 다양하게 나타난다. 본 연구에서는 2002년부터 2005년까지 4년간 서울지역에서 발병한 설사환자로부터 분리된 22주의 *S. flexneri*에 대해 생화학적 성장, 혈청형, 항생제 감수성 그리고 plasmid profile과 PFGE를 실시하여 성장을 시험하였다. *S. flexneri*의 혈청형은 모두 13가지(1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, variant X, variant Y)로 구분되며, 연도별로 유행한 혈청형에 다양한 차이가 있음이 보고되었다 [5, 9]. 본 연구에 의하면 2002년에서 2005년 기간 중 서울지역에서 분리된 *S. flexneri*의 혈청형은 2a와 3a가 주종을 이루고 있음을 알 수 있었다.

세균성 이질 치료에서 원인균체의 제거, 2차 감염과 균의 전파를 막기 위해 항균제 요법이 권장되고 있다. 본 연구에서 분리주들은 streptomycin이나 tetracycline에 대해 100% 내성을 보였으며, trimethoprim/sulfamethoxazole에 대해 77.3%(17주)가 내성을 보여, 1990~1994년 사이에 국내에서 분리된 *S. flexneri*에 비해 내성율이 더 높아 졌음을 암시하였다 [1, 3]. 또한 chloramphenicol은 58.2%(15주), ampicillin과 ticarcillin은 각각 63.6%(14주)가 내성을 나타내어, 일반적으로 세균성 이질 치료에 많이 사용되는 ampicillin, tetracycline 그리고 trimethoprim/sulfamethoxazole에 대한 내성빈도가 높아져, *S. flexneri* 감염증 치료에 문제로 대두되고 있음을 알 수 있었다. 한편 amikacin, cefoxitin, gentamicin, kanamycin은 100%

의 감수성을 나타냈으며, ceftriaxone, ciprofloxacin 및 nalidixic acid은 86.4% 내지 95.5%의 감수성을 나타내어, 2001년에 국내에서 보고된 성적과 일치함을 알 수 있었다 [2]. 그러나 1세대 및 2세대 cephalosporins과 aminoglycosides계 항균제는 *Salmonella* spp. 와 *Shigella* spp.에 대해 시험관내에서는 항균력을 보이지만 임상적으로는 효과가 없는 경우가 있으며, 감수성을 평가할 때 유의해야 할 요소로 지적된 바 있다 [17]. 분리된 *S. flexneri* 22주에 대한 항균제의 다제내성 패턴을 분석한 결과, 모두 3가지 이상의 제제에 내성을 보여, 1998~1999년 사이 국내 분리된 균들 중 한 종류의 항균제에 대해서만 내성을 나타내는 균주들이 다수 있었다는 보고 [3]와는 차이가 있으며, 시간이 갈수록 다제내성 양상이 심각해져 가고 있음을 알 수 있었다.

*Shigella* spp.는 2~10개의 다양한 plasmid를 가지고 있으며, 장침입 병원성, 항생제 내성 관련 특성을 밝히기 위해서 plasmid에 대한 연구는 필수적이다 [16, 22]. Plasmid 가운데 약 220 kb의 큰 plasmid는 병원성과 연관성이 있으나, 이 plasmid는 유실되거나 유전적 변이가 잘 일어나는 것으로 알려져 있다 [11, 22]. Buysse 등 [7]은 plasmid의 소실과 *ipa* 유전자의 소실은 비교적 높은 비율 ( $1/10^3$ - $10^4$ )로 일어나며, 그 결과로 침입성과 병원성의 변화가 쉽게 오기 때문에 *ipa* 유전자의 유무가 병원성의 절대적 지표는 아님을 보고 한 바 있다. 본 연구에서는 22개의 모든 분리주에 큰 plasmid에 속하는 *ipaH* 유전자가 존재함을 확인하였으나, 이 유전자의 병원성 관련성에 대해서는 입증할 자료가 없으며, 이에 대한 추가 시험이 요구된다. 본 시험에 공시한 *S. flexneri*의 plasmid profile을 분석한 결과 7개의 pattern으로 구분되었으며, 혈청형과 plasmid profile 간에 다소 연관성이 있음이 관찰되었으나, 균 분리 연도와 항생제 내성 patterns과는 상관성이 없었다. 혈청형 3a는 8주 모두 4개의 plasmid를 가지는 P5형으로 분류되었으며, 3b와 4a는 다른 균주와는 다른 특이한 plasmid type을 나타냈다. 1998~1999년 사이에는 전국적으로 3개의 plasmid를 가지는 *S. flexneri*가 유형되었다고 보고된 바 있었으나 [3], 본 연구에서는 주로 4개의 plasmids를 가지는 P5 유형의 분리빈도가 높아 역학적으로 plasmid pattern에 변화가 있었던 것으로 추정되었다.

세균성 이질 환자의 수양성 설사는 *set1*과 *sen* 유전자에서 합성되는 장관독소에 의해 발병되며, 이 중 *set1*은 2a 청형에서 주로 발견된다고 보고된 바 있었다 [19, 20]. 본 연구에서도 *set1*이 9주의 *S. flexneri* 2a에서 모두 검출되어 Noriega 등 [20]의 성적과 일치하였다. 그러나 2b 혈청형을 갖는 3주 모두 *set1* 유전자가 검출되어 2a와 2b 혈청형은 유전학적으로 유사한 구조를 가지는 것

로 추정되었다. 또한 *ial* 유전자는 모든 분리주에서 검출되었으며, *sen*은 19주(86.4%)에서 검출되었다. PCR 보다 감수성이 높은 DNA probe 시험법으로 수행한 연구에서 *sen*의 검출 빈도가 50% [25] 또는 83% [16]이었다고 보고된 바 있어, 외국에 비해 국내 분리주에서 *sen* 유전자의 검출빈도가 높은 것으로 나타났다. 또한 *Shigella* 균 중에 *S. dysenteriae*에서만 검출되는 것으로 알려진 *stx* 유전자는 PCR 결과 22주 모두 음성으로 나타났다. 그러나 최근 국내 연구 [2]에서 *S. flexneri*와 *S. sonnei*의 분리 균주에서 *stx* 유전자가 발견되었다고 보고된 바가 있다. *Shigella* 균의 병원성은 다양한 유전자가 복합적으로 관련되어 발현되며 그 기전에 대한 연구가 여러 연구자들에 의해 진행 중에 있다 [8, 10, 19, 20]. 세균성 이질에 대한 역학적 기초를 구축하기 위해 국내 분리주에 대한 병원성인자의 분포와 병원성과 혈청형 간 상호 작용기전에 대한 보다 광범위한 연구가 요구된다.

분리된 균주를 Not I 효소로 처리한 다음 PFGE를 실시한 결과, 12~17개의 DNA 분획이 관찰되었으며, PFGE dendrogram으로 얻어진 13개의 유형을 비교한 바, 혈청형 간에는 상관성이 관찰되었으나, 분리연도나 항생제 내성 간에는 상관성이 인정되지 않았다. 혈청형 3a는 plasmid profile에서 한가지의 형으로 나타났으나 PFGE에서는 3가지의 유형으로 세분되었으며, 2a, 2b, 3b 및 4a의 다른 혈청형과는 다른 군에 분류되어 plasmid profile의 결과와 일치하였다. 혈청형 4a와 3b는 plasmid profile에서는 3a, 2a 및 2b와는 다른 군에 속하였으나, PFGE에서는 2a와 2b에 가까운 것으로 나타났다. 혈청형 2a와 2b는 plasmid profile에서 4가지의 형으로 구분되었으나 PFGE에서는 8가지 형으로 분류되었다. 2a와 2b는 plasmid profile이나 PFGE에서 높은 유사성을 보여 유전학적 상동성이 높은 것으로 추정되었다.

본 시험에서 분리균주에 대한 분자역학적 분석 목적으로 수행한 plasmid profile과 PFGE pattern 분석 결과, 7개의 유형이 확인되었고, PFGE 패턴에서는 13개의 유형이 확인되어 *S. flexneri*의 유전자 유형을 분류하기 위해서는 PFGE법이 특이성이 높음을 확인할 수 있었다. 그러나 PFGE에서 동일한 군에 속하면서도 plasmid profile이 다르게 나타나기도 하고, 같은 항생제 내성 양상을 가지면서도 plasmid profile이 다른 균주들이 빈번히 관찰된다고 지적된 바 있다 [13, 18]. 본 실험에서도 유전형과 표현형 간에 plasmid profile과 PFGE pattern에 의한 분류상 일치하지 않는 균주가 관찰되었다. 이 시험법들은 유전적 유사성에 따라 균주들을 구분하는 방법으로 이용되고 있지만, *S. flexneri* 균주의 역학적 분석 목적으로 이용하기에는 아직 문제점이 있다고 지적되고

있다 [3, 13]. 따라서 *Shigella* spp.의 분자역학적 분석과 진단법의 효능을 높이기 위해 유전자 검출 방법의 술식과 시험 결과 해석에 대한 표준화가 요구되며, 여러 가지 시험법과의 상호 비교시험이 선행되어야 한다고 생각된다.

## 결론

2002년에서 2005년까지 4년간 서울지역에서 발병한 세균성 이질 환자의 분변 가검물로부터 22주의 *S. flexneri*를 분리하였다. 분리균주 들은 생화학적 검사와 혈청학적 검사에서 *S. flexneri*의 특이한 성상을 나타내었으며, 혈청형별로는 2004년에는 3a(87.5%) 그리고 2005년에는 2a(66.7%)가 주로 유행한 것으로 나타났다. 항생제 감수성 시험 결과, 분리주들은 streptomycin, tetracycline 및 trimethoprim/sulfamethoxazole에 대해 높은 내성을 나타내었으며, amikacin, kanamycin, cefoxitin, ceftriaxone, ciprofloxacin, nalidixic acid 및 gentamicin에는 높은 감수성을 나타내었고, 22주 모두 3가지 이상의 약제에 대해 다제 내성을 보였다. Plasmid profile 분석에서 분리주들은 7가지의 패턴으로 분류되었다. PCR법을 이용하여 *set1A*, *set1B*, *sen*, *ipaH*, *ial* 및 *stx* 유전자 검색을 실시한 바, 22주 모두 *ipaH*와 *ial* 유전자를 가지고 있었으며, *set1A*와 *set1B*를 가지고 있는 주는 12주(54.5%)였으며, *stx* 유전자는 모든 분리주에서 검출되지 않았다. PFGE를 시행한 결과, 12~17개의 DNA 분획이 관찰되었고, 13개의 pattern으로 분류되었다. PFGE pattern은 균분리연도와 항생제 감수성 간에는 상관성이 없었으나, 혈청형에 대해서는 연관성이 인정되었다.

## 참고문헌

1. 김호훈, 신영학, 강연호, 유천권, 김미순, 하윤문, 염근. 최근 한국에서 분리된 *Shigella* 균속의 혈청군 및 역학적 특성에 관한 연구(1991~1995). 국립연구원보 1995, **32**, 33-41.
2. 이강문, 김성원, 박석기. 환자에서 분리된 *S. flexneri* 및 *S. sonnei*의 병원성 및 항균제 특성. 대한보건협회 학술지 2001, **27**, 144-151.
3. 전정훈, 김성한, 전형근, 김준영, 강연호, 신광훈, 이복권. 국내에서 분리된 *Shigella flexneri*에 대한 역학적 특징과 PFGE 양상. JBV 2002, **32**, 11-21.
4. Abigail AS, Dixie DW. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. 2nd ed. pp. 169-179, ASM Press, Washington D C, 1994.
5. Bennish ML. Potentially lethal complications of shigellosis. Rev Infect Dis 1991, **13**, 319-324.
6. Bennish ML, Azad AK, Yousefzadeh D. Intestinal



- obstruction during shigellosis: incidence, clinical features, risk factors and outcome. *Gastroenterol* 1991, **101**, 626-634.
7. **Buyse JM, Sotver CK, Oaks EV, Venkatesan M, Kopecko DJ.** Molecular cloning of invasion plasmid antigen (*ipa*) genes from *Shigella flexneri* : analysis of *ipa* gene products and genetic mapping. *J Bacteriol* 1987, **169**, 2561-2569.
  8. **Cantey JR.** Shiga toxin-an expanding role in the pathogenesis of infectious diseases. *J Infect Dis* 1985, **151**, 766-771.
  9. **Formal SB, Levine MM.** Shigellosis. In: Germaier R (ed.). *Bacterial Vaccines*. pp. 167-186, Academic Press Inc, New York, 1984.
  10. **Frankel G, Giron JA, Valmassoi J, Schoolnik GK.** Multigene amplification simultaneous detection of three virulence genes in diarrheal stool. *Mol Microbiol* 1989, **3**, 1729-1734.
  11. **Frankel G, Riley L, Giron JA, Valmassoi J, Friedmann A, Strockbine N, Falkow S, Schoolnik GK.** Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification. *J Infect Dis* 1990, **161**, 1252-1256.
  12. **Hale TL.** Genetic basis of virulence in *Shigella* species. *Microb Rev* 1991, **55**, 206-224.
  13. **Lima AAM, Sidrim JJC, Lima NL, Titlow W, Evans ME, Greenberg RN.** Molecular epidemiology of multiply antibiotic-resistant *Shigella flexneri* in Fortaleza, Brazil. *J Clin Microbiol* 1997, **35**, 1061-1065.
  14. **Matsumoto M, Suzuki Y, Saito M, Ishikawa N, Ohta M.** Epidemiological study of *Shigella sonnei* from sequential outbreaks and sporadic cases using different typing techniques. *Microbiol Immunol* 1998, **42**, 259-264.
  15. **Matushek MG, Bonten MJM, Hayden MK.** Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1996, **34**, 2598-2600.
  16. **Nataro JP, Seriwatana J, Fasano A, Maneval DR, Guers LD, Noriega F.** Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infect Immun* 1995, **63**, 4721-4728.
  17. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. 9th ed. 20, M100-S16, Peninsula Pharmaceuticals, Pennsylvania, USA, 2006.
  18. **Navia MM, Capitano L, Ruiz J, Vagas M, Urassa H, Schelleberg D, Gascon J, Vila J.** Typing and characterization of mechanism of resistance of *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. *J Clin Microbiol* 1999, **37**, 3113-3117.
  19. **Niyogi SK, Vargas M, Vila J.** Prevalence of the *sat*, *set* and *sen* genes among diverse serotypes of *Shigella flexneri* strains isolated from patients with acute diarrhoea. *Clin Microbiol Infect* 2004, **10**, 574-576.
  20. **Noriega FR, Liao FM, Formal SB, Fassano A, Levine M.** Prevalence of *Shigella* enterotoxin 1 among *Shigella* clinical isolates of diverse serotypes. *J Infect Dis* 1995, **172**, 1408-1410.
  21. **Sambrook J, Russel DW.** *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 3rd ed. pp. 31-38, Cold Spring Harbor Press, New York, 2001.
  22. **Sansonetti PJ, Kopecko DJ, Formal SB.** Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 1982, **35**, 852-860.
  23. **Swanminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV. the CDC PulseNet Task Force.** PulseNet: The molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001, **7**, 382-389.
  24. **Tauxer R, Puhr ND, Well JG.** Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in the USA: The importance of international travelers. *J Infect Dis* 1990, **162**, 1107-1111.
  25. **Vargas M, Gascon J, de Abta MTJ, Vila J.** Prevalence of *Shigella* enterotoxins 1 and 2 among *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. *J Clin Microbiol* 1999, **37**, 3608-3611.