

경북지역 장출혈성대장균의 유전적 특성 및 항생제 내성 분석

백지은 · 황광립 · 전예원 · 이교린 · 제갈민 · 조재준 · 이지형

수인성질환과

Genetic characteristics and antibiotic resistance of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains isolated in Gyeongbuk

J. E. Baek, G. R. Hwang, Y. W. Jeon, K. R. Lee, M. Jegal, J. J. Cho and J. H. Lee

Waterborne disease Division

Abstract

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is a major foodborne pathogen causing diarrhea, hemorrhagic colitis (HC), and hemolytic uremic syndrome (HUS). It is transmitted through contaminated food, water, and person-to-person contact, with a low infectious dose (1–100 CFU). EHEC pathogenicity is mainly driven by Shiga toxin (*stx1*, *stx2*) and the formation of attaching and effacing (A/E) lesions via the *eae* and *tir* genes.

This study analyzed key virulence genes (*saa*, *ehxA*, *eae*, *tir*, *espA*, *espB*, *espD*, *espP*) in 54 EHEC isolates from diarrheal patients and environmental sources in the Gyeongbuk region (2019–2023). PCR results showed that *stx1* and *stx2* were detected in 22 and 25 strains, respectively, while 7 strains carried both. Patient-derived strains had a higher prevalence of A/E-associated genes, and 46.3% exhibited *selC* site disruption, indicating LEE island insertion. Whole-genome sequencing (WGS) revealed genetic diversity and antibiotic resistance, highlighting the need for continuous surveillance and preventive strategies against EHEC infections.

Key words: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), Shiga toxin, virulence genes, whole-genome sequencing (WGS), antibiotic resistance

I. 연구사업

1. 서론

장출혈성대장균(Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC)은 설사, 출혈성 대장염(Hemorrhagic colitis, HC), 용혈성 요독 증후군(Hemolytic uremic syndrome, HUS) 등 다양한 임상 증상을 유발하는 병원균으로 특히 어린이와 면역 저하 환자에게 심각한 건강 문제를 초래한다.¹⁾

EHEC의 주요 감염 경로는 감염된 가축(특히 소)의 분변 오염, 오염된 식품과 물, 그리고 사람 간 접촉을 포함하며, 낮은 최소 감염량(1~100 CFU)으로 인해 쉽게 확산될 수 있다.¹⁾ 1982년 미국에서 발생한 최초의 대규모 O157:H7 감염 사례 이후, 전 세계적으로 EHEC 감염이 보고되고 있으며, 이에 대한 지속적인 연구와 감염 관리가 필수적이다.¹⁾

EHEC의 병원성은 크게 Shiga toxin(Stx) 생성과 attaching and effacing(A/E) 병변 형성의 두 가지 주요 기전에 의해 결정된다.^{1,2)} Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC)의 일종인 EHEC는 *stx1*과 *stx2* 유전자에 의해 Shiga toxin을 생성하며, 이는 숙주 세포의 단백질을 합성을 방해하고 세포 사멸을 유도하여 심각한 장 점막 손상과 전신 감염을 초래한다.¹⁾ 특히 *stx2*는 HUS 발생과 높은 연관성을 가지며, 신장과 중추신경계에 영향을 미쳐 높은 치사율을 나타낸다는 연구결과가 있다.³⁾

병원성대장균은 장 상피세포에 부착하여 미세융모를 소실하는 A/E (attaching and effacing) 병

변을 형성하는데, 이 과정은 LEE (locus of enterocyte effacement) 병원성섬에 있는 여러 유전자에 의해 조절된다. LEE 병원성섬은 세균이 장 세포에 붙은 후 세포 구조를 변화시키는 중요한 역할을 한다.

그 중 *eae* 유전자는 intimin 단백질을 만들어 세균이 장 세포에 단단히 부착하도록 돕는다. 하지만 장 세포에는 원래 intimin과 결합할 수 있는 수용체가 없기 때문에 *tir* 유전자는 Tir 단백질을 만들어내고, 세균은 T3SS (Type III Secretion System)를 이용해 Tir 단백질을 숙주 세포에 주입한다. 주입된 Tir 단백질은 숙주 세포막에서 세균의 intimin 단백질과 결합하여 강한 부착성을 가진다. 이 과정에서 장 세포의 미세융모가 사라지고 세균이 부착할 수 있는 공간이 만들어져 A/E 병변이 형성되는 핵심과정을 만들어낸다.^{2,3)}

EHEC는 다양한 혈청형을 포함하며, 가장 대표적인 혈청형은 O157:H7이다. 그러나 최근 연구에서는 O26:H11, O55:H6, O103, O145 등의 non-O157 균주도 공중보건에서 중요한 병원균으로 인식되고 있다.¹⁾

EHEC의 병원성 기작을 분석하기 위해 주로 중합효소연쇄반응(PCR)이 활용되며, LEE 유전자의 변이를 기반으로 세 가지 병원형(pathotype)으로 구분할 수 있다.³⁾ 세 가지 분류는 O157:H4를 제외한 대부분의 O157 균주에서 *eae* γ -*tir* γ -*espA* γ -*espB* γ -*espD* γ 의 유전형, O26:H11과 O55:H6 균주에서 각각 *eae* β -*tir* β -*espA* β -*espB* β -*espD* β 과 *eae* α -*tir* α -*espA* α

-*espB* α -*espD* α 의 유전형으로 구분된다. 이러한 분류는 균주의 감염력과 병원성을 평가하는데 중요한 기준이 된다.³⁾

소는 EHEC의 주요 숙주이며, 인체 감염의 주요 감염원으로 작용할 수 있다.²⁾ 연구에 따르면 소에서 분리된 EHEC 균주는 인체 감염 균주에 비해 병원성이 상대적으로 낮으며, 일부 유전적 변이가 존재하는 것으로 보고되었다.¹⁾ 소에서 분리된 일부 EHEC 균주는 *eae* 유전자가 결핍된 경우가 많아 장 상피세포 부착 능력이 상대적으로 낮을 가능성이 있다.^{1,2)} 그러나 소는 EHEC를 사람에게 전파할 수 있는 중요한 감염원이며, 소에서 분리된 균주가 반드시 낮은 병원성을 가진다고 볼 수는 없기 때문에 주의가 필요하다.

최근 연구에서는 플라스미드를 통한 유전자 수평 이동이 EHEC의 병원성 확산에 중요한 역할을 한다고 밝혔다.⁴⁾ EHEC는 고농도의 Ca^{2+} , Mg^{2+} , 열 등의 환경적 요인에 의해 플라스미드 또는 플라스미드내 일부 유전정보를 전달받아 항생제 내성 및 병원성 유전자를 획득할 수 있다.⁴⁾ 특히 pO157 플라스미드는 EHEC의 병원성에 중요한 역할을 하며, 여러 독성 유전자를 포함하고 있다. 그 중 EHEC-haemolysin (*ehxA*)은 적혈구를 용해해 장 점막을 손상시키고, serine protease EspP (*espP*)는 숙주의 단백질을 분해하며, catalase-peroxidase KatP (*katP*)는 세균이 산화 스트레스에 저장하도록 돕는다. 이러한 유전자들은 EHEC의 독성을 높이고 감염력을 강화한다.¹⁾

EHEC의 생존과 감염력은 다양한 환경적 요인의 영향을 받는데, 오염된 식품이나 물 등에서 발견되며 냉동과 해동의 과정에서도 생존할 수 있다.¹⁾ 또한 바이오필름(Biofilm) 형성은 EHEC가 환경에서 장기간 생존하도록 돕는 중요한 기작이며, 감염 확산의 주요 요인으로 작용할 수 있다.⁴⁾

본 연구에서는 경북 지역에서 분리된 EHEC 균주의 주요 병원성 유전자(*saa*, *ehxA*, *eae*, *tir*, *espA* 등)의 존재 여부를 확인하고, 인체와 동물 유래 균주의 병원형을 비교하여 병원성 발현 기전을 알아보고자 하였다. 또한, 유전자 수평 이동(horizontal gene transfer)이 병원성 유전자 확산에 미치는 영향을 평가하고, NGS 기반 전장유전체 시퀀싱(WGS; Whole Genome Sequencing) 분석을 통해 EHEC의 유전적 특성을 규명하고자 한다. 이를 통해 향후 EHEC 감염병 예방 전략 수립을 위한 기초 자료를 제공하는 것을 연구의 최종 목표로 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험균주

2019년 ~ 2023년까지 경북지역에서 검사한 설사질환 환자검체와 환경검체(소)에서 분리된 장출혈성대장균(EHEC) 54주를 대상으로 선정하였다.

I. 연구사업

2.2. 분리 및 동정

각 검체는 Tryptic soy broth (TSB)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 선택배지인 MacConkey agar에 도말하여 전형적인 대장균의 집락 형성 여부를 확인하였다. 선택배지에서 성장한 집락을 선택하여 Tryptic soy agar (TSA)에 도말하고 37°C에서 24시간 배양하였다. TSA에 배양된 균주를 취하여 VITEK2 compact(Biomerieux, France)로 동정하였다.

2.3. 병원성 관련 유전자

분리된 병원성 대장균의 DNA는 boiling method를 사용하여 추출하였다. 추출된 DNA는 병원성 관련 유전자의 검출을 위한 PCR (Polymerase Chain Reaction) 분석의 템플릿으로 사용하였다. 병원성 관련 유전자는 *saa* (Shiga toxin-producing *E. coli* autogaalutinating adhesin), *eae* (*E. coli* attaching and effacing), *ehxA* (enterohemolysin), *tir* (translocated intimin receptor), *espA* · *espB* · *espD* (T3SS effector proteins), *espP* (plasmid-encoded serine protease), Disrupted *selC* 및 Intact *selC*를 대상으로 하였다.

2.4. PCR Primer 및 조건

PCR 반응액 조성은 병원성 유전자를 확인할 수 있는 각각의 primer 2.5 µl (10 pmole), DNA template 3 µl, DEPC-treated water를 PCR Premix(Maxime PCR Premix i-StarTaq, iNtRON)에 첨가하여 최종 20 µl가 되도록 제작하였다.

saa, *ehxA*, *eae* 유전자 검출에 사용된 primer는 paton 등^{5,6)}에 의한 것으로 Table 1과 같다. PCR 조건은 1차 반응으로 95°C/5분간 denaturation 후, 95°C/1분, 65°C/2분, 72°C/1분 30초 cycle을 10회 실시하고, 2차 반응으로 95°C/1분, 60°C/2분, 72°C/1분 30초의 cycle을 15회 실시한 후, 3차 반응으로 95°C/1분, 60°C/2분, 72°C/2분 30초의 cycle을 10회 실시한 후 마지막으로 72°C에서 2분30초 동안 반응시켰다. PCR을 수행한 후 증폭된 산물은 자동전기영동장치(QIAxcel, Germany)에서 확인하였다.

tir, *espB*, *espD* 유전자 검출에 사용된 primer는 Kobayashi 등⁷⁾에 의한 것으로 Table 1과 같다. *tir* 유전자 증폭을 위한 PCR 조건은 94°C/5분 1 cycle 후 94°C/40초, 57°C/60초, 72°C/75초 cycle을 30회 실시하고, 72°C/5분 반응시켰다. *espB* 유전자의 PCR 조건은 94°C/5분 1 cycle 후 94°C/45초, 63°C/45초, 72°C/90초 cycle을 30회 실시하고, 72°C/5분 반응시켰다. *epsD* 유전자의 PCR 조건은 annealing 온도를 60°C/45초로 변경하며 나머지 조건은 *espB* 유전자 PCR 조건과 동일하다. PCR을 수행한 후 증폭된 산물은 자동전기영동장치(QIAxcel, Germany)에서 확인하였다.

*espA*와 *espP* 유전자 검출에 사용된 primer는 McNally 등⁸⁾에 의한 것으로 Table 1과 같다. *espA* 유전자 증폭을 위한 PCR 조건은 94°C/5분 1 cycle 후 94°C/45초, 57°C/45초, 72°C/90초 cycle을 30회 실시하고, 72°C/5분 반응시켰다. *espP* 유전자 증폭을 위한 PCR 조건은 94°C/5분 1 cycle, 94°C/45초, 59°C/45초, 72°C/90초의 cycle 30회 실시 후 72°C/10분 동안 반응시켰다. PCR을 수행한 후 증폭된 산물은 자동전기영동장치(QIAxcel, Germany)에서 확인하였다.

Table 1. PCR primers for the amplification of specific fragments from various pathogenic genes in EHEC

Target gene	Primer	Sequences	Size of product(bp)
<i>saa</i>	SAADF	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119
	SAADR	ATGGACATGCCTGTGGCAAC	
<i>eae</i>	eaeAF	GACCCGGCACAAGCATAAGC	384
	eaeAR	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	
<i>ehxA</i>	hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534
	hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	
<i>tir</i>	TirF	CATTACCTTCACAAACCGAC	1,550
	TirR	CCCCGTTAATCCTCCCAT	
<i>espA</i>	ESPAa	CACGTCTTGAGGAAGTTTGG	229
	ESPAb	CCGTTGTTAATGTGAGTGCG	
<i>espB</i>	ESPB-F	GCCGTTTTTGAGAGCCAGAAT	633
	ESPB-R	ATCATCCTGCGCTCTGCGAAC	
<i>espD</i>	ESPD-F	CGCTGGATTTACAACCTGGTTA	939
	ESPD-R	CCAGCTCAACCTTCGCACTCT	
<i>espP</i>	ESPPa	AAACAGCAGGCACTTGAACG	301
	ESPPb	AGACAGTTCAGCGACAACC	
Disrupted <i>selC</i>	K260	GAGCGAATATTCCGATATACTGGTT	418
	K255	GGTTGAGTCGATTGATCTCTGG	
Intact <i>selC</i>	K260	GAGCGAATATTCCGATATACTGGTT	527
	K261	CCTGCAAATAAACACGGCGCAT	

selC 유전자에 LEE 삽입여부를 확인하기 위하여 McDaniel 등⁹⁾의 방법에 따라 PCR을 실시하였다. Primer는 K260을 forward로 사용하고, 각 유형에 따라 K255와 K261을 reverse primer로 사용하였다(Table 1). PCR 조건은 94°C/5분 1 cycle, 92°C/2분, 50°C/2분, 72°C/3분의 cycle 30회, 마지막으로 72°C/5분 반응시켜 증폭된 산물을 자동전기영동장치(QIAxcel, Germany)에서 확인하였다.

2.5. 항생제 내성 검사(VITEK)

EHEC의 항생제 내성 검사는 VITEK 2 compact(BioMerieux, France)에서 AST-N415 card를 사용하여 수행하였다. 순수분리 및 동정된 균을 Tryptic soy agar (TSA)에 37°C, 18~24시간 배양한 후 0.45% NaCl 용액에 희석하여 적절한 탁도의 현탁액으로 제조하여 분석하였다. 항생제의 종류는 Ampicillin (AMP), Gentamicin (GM), Trimethoprim/Sulfamethoxazole (TMP/SXT) 등 베타락탐계를 비롯한 항생제에 대한 감수성을 조사하였다.

I. 연구사업

2.6. 전장유전체 분석(Whole genome sequencing, WGS)

Tryptic soy agar (TSA)에서 37°C, 18~24시간 배양한 균에서 cell pellet을 확보하였다. gDNA 추출은 Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 수행하였다. 추출된 gDNA는 Qubit Fluorometer(Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 농도를 측정하였다. DNA library preparation은 illumina Library Preparation Kit(illumina, USA)를 사용하여 제작하였다. Library 준비 후 전장유전체 시퀀싱(WGS)은 Miseq(illumina, USA)을 이용하여 Reagent kit v2 (300 cycle)(illumina, USA)로 paired-end 방식으로 시퀀싱을 수행하였다.

시퀀싱된 FASTQ 형식의 데이터는 Galaxy 플랫폼(<https://usegalaxy.org>)에서 제공하는 FastQC v0.12.1(Babraham Bioinformatics, UK)¹⁰⁾의 FastQC : Read Quality Reports 도구를 이용하여 수행하였으며, 염기별 품질점수(Q-score), GC함량, N 비율, 서열 중복 비율 등을 분석하였다.

또한 FASTQ 데이터를 이용하여 항생제 내성 유전자 및 혈청형을 예측하였다. Center for Genomic Epidemiology(CGE) 플랫폼(<https://www.genomicepidemiology.org/>)에서 ResFinder v4.1¹¹⁾을 통해 β -lactam, aminoglycoside, quinolone, tetracycline, sulfonamide 계열 내성 유전자의 유무를 확인하였으며, ID threshold 90%, coverage 60%의 임계값을 적용하였다. SeroFinder v2.0¹²⁾을 활용하여 혈청형을 예측하여 대장균을 분류하였으며, O-group과 H-type을 포함하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. PCR 분석을 통한 Shiga toxin 유전자 검출

본 연구에서는 2019~2023년까지 경북지역에서 검사한 설사질환 환자검체와 환경검체(소)에서 분리된 장출혈성대장균(EHEC) 54주를 대상으로 Shiga toxin 유전자(*stx1*, *stx2*) 분석을 수행하였다. PCR 분석 결과 54개의 EHEC 균주 중 *stx1*만을 보유한 균주는 22주, *stx2*만을 보유한 균주는 25주로 확인되었으며, *stx1*과 *stx2* 유전자를 모두 보유한 균주는 7주로 확인되었다(Table2).

설사질환 환자검체와 환경검체(소)에서 Shiga toxin 유전자의 검출 패턴을 비교한 결과 설사질환 환자검체에서 *stx2* 검출률이 상대적으로 높았으며 특히 2021년 이후 증가하는 경향이 확인되었다. 반면 환경검체(소)는 Shiga toxin 유전자 검출이 불규칙적으로 나타났으며, 2020년에는 검출되지 않았다. 이러한 차이는 환경 및 유통식품에서 EHEC 분포가 일정하지 않으며, 오염원과 유행주기에 따라 변화할 가능성이 있음을 나타낸다.

2021년 이후부터 설사질환 환자검체에서 *stx2* 검출 빈도가 증가하는 추세를 보여 임상감염에서 *stx2* 유전자를 보유한 균주의 비율이 높아지는 것을 알 수 있다. 이는 주변 환경에서 EHEC 오염이 지속적으로 유지되고 있음을 보여준다.

Table 2. Detection of *stx1* and *stx2* genes in EHEC isolates by sample type and year

Year	Sample type	<i>stx1</i> (n=22)	<i>stx2</i> (n=25)	<i>stx1</i> and <i>stx2</i> (n=7)	Total (n=54)
2019	Diarrheic Patients	2	1	0	3
	Environmental(Beef)	1	2	0	3
2020	Diarrheic Patients	8	2	1	11
	Environmental(Beef)				None*
2021	Diarrheic Patients	1	2	2	5
	Environmental(Beef)	0	3	1	4
2022	Diarrheic Patients	5	2	3	10
	Environmental(Beef)	0	3	0	3
2023	Diarrheic Patients	5	7	0	12
	Environmental(Beef)	0	3	0	3

* None indicates that no sample was available

3.2. 병원성 유전자 검출 및 Shiga toxin 유전자와의 상관성

설사질환 환자와 환경검체(소)에서 분리된 EHEC 균주의 병원성 유전자(*saa*, *eae*, *ehxA*, *tir*, *espA*, *espB*, *espD*, *espP*) 검출 결과를 비교하였다(Table 3). 설사질환 환자검체에서 분리된 균주에서, *eae*(85.4%), *tir*(82.9%), *espB*(85.4%), *espD*(80.5%), *espP*(78%) 유전자 검출률이 높았으나, 환경검체(소)에서는 *saa*와 *ehxA* 유전자가 각각 1주(7.7%), *espP* 유전자는 3주(23.1%)에서 검출되었을 뿐 다른 병원성 유전자는 전혀 검출되지 않았다.

이러한 결과는 설사질환 환자검체에서 분리된 균주가 임상적으로 병원성이 강하며, Shiga

toxin 유전자 외에 다른 병원성 유전자를 동시에 보유하는 것이 설사 증상을 유발하는데 밀접한 관련이 있음을 보여준다. 기존 연구에서도 *eae*와 *tir* 유전자가 설사 증상과 강한 연관성을 가지며, 이들 유전자가 발현될 경우 대장의 상피세포에 부착하여 attaching and effacing (A/E) 병변을 형성하여 병원성을 강화할 가능성이 높다고 보고된 바 있다.^{13,14)}

특히 기존 연구에 따르면 *espA*, *espB*, *espD* 유전자는 T3SS (Type III Secretion System) 관련 인자로서 EHEC 및 EPEC의 병원성 발현에 중요한 역할을 하며¹⁵⁾, 본 연구에서도 설사환자 검체에서 해당 유전자들의 높은 검출률이 확인되었다. 이러한 결과는 설사환자 검체에서 분리된 EHEC 균주가 유전자 발현을 통해 병원성이 강화됨을 보여준다.

I. 연구사업

Table 3. Detection of Virulence Genes in EHEC Isolates by Sample Type

Sample type	Target genes							
	<i>saa</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	<i>tir</i>	<i>espA</i>	<i>espB</i>	<i>espD</i>	<i>espP</i>
Diarrheic Patients (n=41)	2	35	31	34	15	35	33	32
Environmental(Beef) (n=13)	1	0	1	0	0	0	0	3
Total (n=54)	3	35	32	34	15	35	33	35

Shiga toxin 유전자 유형에 따라 설사질환 환자 및 환경검체(소)에서 분리된 EHEC 균주의 주요 병원성 유전자 분포를 분석하였다(Table 4).

stx1 단독 보유 균주에서 설사질환 환자검체는 *eae*(90.5%), *ehxA*(76.2%), *tir*(85.7%) 등의 유전자 검출율이 높았으며, *espA*, *espB*, *espD* 유전자도 85% 이상 검출되었다. 반면, 환경검체(소)에서는 병원성 유전자가 검출되지 않았다.

stx2 단독 보유 균주에서 설사질환 환자검체는 *eae*(71.4%), *ehxA*(71.4%), *tir*(64.3%) 유전자 검출율이 높게 나타났으며, *espA*, *espB*, *espD* 역시 64~71%의 검출율을 나타내었다. 환경검체(소)에서 분리된 균주에서는 *eae*, *ehxA*, *espP* 유전자가 검출되었으나, 각각 9.1%, 9.1%, 27.3%의 낮은 검출율을 보였다.

*stx1*과 *stx2* 동시 보유 균주에서는 설사질환 환자검체 모두 *eae*, *ehxA*, *tir*, *espB*, *espD* 유전자를 보유하는 것으로 확인되었으며, *espA*, *espP* 유전

자도 대부분의 균주에서 높은 검출률로 확인되었다. 그러나 *stx1*과 *stx2*를 모두 보유한 환경검체(소)에서 분리한 균주에서는 모든 병원성 유전자가 검출되지 않았다.

위 결과는 병원성 유전자는 Shiga toxin 유전자의 유형과는 직접적인 상관성이 낮으며, 오히려 설사질환 환자검인지, 환경검체(소)인지에 따라 차이가 크게 나타나는 것을 보여준다. 또한, *stx2* 단독 보유 균주가 *stx1* 단독 보유 균주보다 병원성 유전자의 보유율이 다소 낮은 경향을 보였는데, 이는 기존 연구에서 *stx2*가 *stx1* 유전자보다 높은 독성 및 병원성을 가진다는 보고^{16,17)}와 다소 차이를 보인다. 물론 병원성 유전자의 확인과 독성 및 병원성을 나타내는 임상적인 지표가 상이할 수 있으며, 이에 추가적인 연구를 통해 LEE 삽입 및 병원성 인자 간 관계를 추가 분석할 필요가 있을 것으로 생각된다.

Table 4. Association Between Shiga Toxin (*stx*) Genes and Virulence Factors in EHEC Isolates

Shiga toxin genes	Sample type	Target genes							
		<i>saa</i>	<i>eae</i>	<i>ehxA</i>	<i>tir</i>	<i>espA</i>	<i>espB</i>	<i>espD</i>	<i>espP</i>
<i>stx1</i>	Diarrheic Patients (n=21)	2	19	16	18	2	19	18	17
	Environmental(Beef) (n=1)	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>stx2</i>	Diarrheic Patients (n=14)	0	10	9	10	8	10	9	10
	Environmental(Beef) (n=11)	1	0	1	0	0	0	0	3
<i>stx1</i> + <i>stx2</i>	Diarrheic Patients (n=6)	0	6	6	6	5	6	6	5
	Environmental(Beef) (n=1)	0	0	0	0	0	0	0	0

3.3 *selC* 부위의 disruption과 LEE 유전자 삽입 여부

EHEC 균주의 *selC* 부위의 disruption 여부를 분석하여 LEE 유전자 삽입을 확인하였다. 기존 연구에 따르면 LEE 병원성 섬은 주로 *selC* 부위에 삽입되며^{8,9)}, 이는 EHEC 장 세포 부착 및 병원성 발현과 밀접한 관련이 있는 인자로 알려져 있다.

54주의 EHEC 균주를 대상으로 disrupted *selC* 및 intact *selC*의 분포를 확인한 결과, 25주(46.3%)의 균주에서 disrupted *selC*가 확인되어 해당 균주에서 LEE 유전자 삽입이 발생하였음을 알 수 있었다. 반면, 29주(53.7%)의 균주에서는 intact *selC*를 확인하여, LEE 유전자 삽입이 발생하지 않은 것으로 판단된다(Table 5).

연도별 *selC* disruption 변화를 살펴보면, 2021년 이후 disrupted *selC* 균주의 비율이 50% 이상 증

가하는 경향을 보였다. 특히 설사질환 환자검체에서 disrupted *selC*가 증가하는 경향이 나타났다.

환경검체(소)에서는 대체로 intact *selC* 비율이 높았으며, 전체 균주(13주) 중 38.5%(5주)에서 disrupted *selC*를 확인하였다. 환경검체(소)에서는 또한 병원성 유전자 검출율도 낮아서 환경에서 분리된 EHEC 균주가 LEE 유전자를 보유할 가능성이 낮아, 상대적으로 병원성이 낮은 균주일 가능성이 높다.

EHEC 균주의 Shiga toxin 유전자 유형에 따른 *selC* disruption 결과는 fig. 1에 나타내었다. *stx1*과 *stx2* 동시 보유 균주(7주) 중 85.7%(6주)에서 disrupted *selC*가 확인되었으며, *stx2* 단독 보유 균주(25주)에서는 60%(15주)의 disrupted *selC*를 확인하였다. *stx1* 단독 보유 균주(22주)에서는 disrupted *selC*가 18%(4주)로 가장 낮은 비율을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

I. 연구사업

이 결과 *stx2*를 보유한 균주에서 *stx1*을 보유한 균주보다 상대적으로 LEE 삽입이 더 높은 빈도로 발생하였으며, 이는 EHEC 감염 사례에서 *stx2* 유전자가 LEE 검출 빈도가 증가하는 경향⁵⁾이 있다는 연구와 유사하였다.

향후 *selC* 부위의 disruption 여부를 지속적으로 모니터링하는 것이 LEE 유전자 보유 균주의 조기 검출 및 병원성 평가에 중요한 역할을 할 것으로 판단된다.

Table 5. Distribution of disrupted and intact *selC* in EHEC isolates by year

Year	Sample type	disrupted <i>selC</i>	Intact <i>selC</i>
2019	Diarrheic Patients (n=3)	1	2
	Environmental(Beef) (n=3)	1	2
2020	Diarrheic Patients (n=11)	5	6
	Environmental(Beef)	None*	
2021	Diarrheic Patients (n=5)	4	1
	Environmental(Beef) (n=4)	2	2
2022	Diarrheic Patients (n=10)	3	7
	Environmental(Beef) (n=3)	0	3
2023	Diarrheic Patients (n=12)	7	5
	Environmental(Beef) (n=3)	2	1

*None indicates that no sample was available

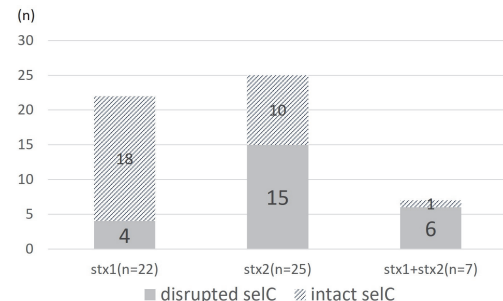


Fig. 1 Correlation between LEE insertion (disrupted *selC*) and Shiga toxin (*stx1*, *stx2*) genotypes in EHEC isolates

3.4 연도별 항생제 내성률 비교

2019년부터 2023년까지 설사질환 환자검체와 환경검체(소)에서 분리된 균주의 항생제 내성률을 VITEK 시스템과 NGS 기반 ResFinder를 이용하여 분석하였다(Fig. 2).

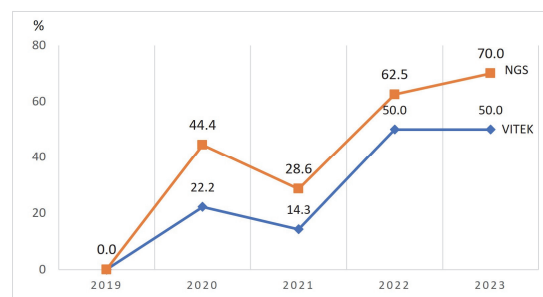


Fig. 2 Temporal Trends in Antibiotic Resistance

연도별 분석 결과, 2019년에는 두 방법 모두 항생제 내성이 확인되지 않았으나, 2020년 이후 항생제 내성을 가진 균주가 확인되었다. 2020년에는 2019년 대비 VITEK 분석에서 22.2%, NGS 분석에서 44.4%로 내성률이 크게 증가한 것으로 확인되었으며, 이후 2021년에 소폭 감소하였으나 2022년

부터 다시 증가하여 2023년에 최고치를 기록하였다. 이러한 결과는 항생제 내성을 가진 균주가 시간이 지남에 따라 증가하고 있음을 확인할 수 있다.

항생제 내성 분석방법에 따른 비교결과 VITEK 분석에서 항생제 내성이 검출되지 않은 균주를 NGS로 분석하였을 때 항생제 내성이 검출되는 등 두 방법 간의 내성 분석 시 차이를 나타내었다.(Table 6)

VITEK을 이용한 분석에서는 항생제 내성이 확인되지 않는 균주가 27주(69.2%), NGS 분석에서는 21주(53.8%)로 확인되었다. 동일한 샘플(Patient 6)을 VITEK으로 분석한 경우 Ampicillin 내성만 검출되었으나 NGS로 분석에서는 Ampicillin, Sulfamethoxazole, Chloramphenicol 3가지 내성이 확인되어 다제내성(multi-drug resistance, MDR)특성을 보였다.

NGS(ResFinder) 분석에서는 다제내성균(MDR)이 보다 높은 빈도로 확인되었다. 이러한 결과는 NGS 분석이 다제내성균의 조기발견에 유용할 수 있음을 알 수 있다.

VITEK과 NGS는 분석 원리에 따라 결과에 차이를 보였으며, 각 방법이 가지는 한계점을 고려할 필요가 있다. VITEK은 미생물의 생리학적 특성을 기반으로 내성을 판별하는 방법이며, NGS는 유전체 수준에서 내성 유전자의 존재 여부를 확인한다. 따라서 특정한 내성 유전자가 존재하더라도 발현이 되지 않거나 임상적으로 의미가 없을 경우, 실제 내성 발현 여부와 차이가 발생할 수 있다.

따라서 VITEK과 NGS는 각각의 강점과 한계점을 가지지만 다제내성균의 검출에서는 NGS 활용이 좀 더 민감한 모니터링이 가능한 것으로 판단된다.

Table 6. Antibiotic Resistance Patterns of Diarrheic Patients and Beef : VITEK and NGS (ResFinder)

Year	Sample	VITEK	NGS(ResFinder)
2019	Beef 1	No resistance	No resistance
2019	Patient 1	No resistance	No resistance
2019	Patient 2	No resistance	No resistance
2019	Patient 3	No resistance	No resistance
2019	Beef 2	No resistance	No resistance
2020	Patient 4	No resistance	No resistance
2020	Patient 5	No resistance	Tetracycline
2020	Patient 6	Ampicillin	Ampicillin, Sulfamethoxazole, Chloramphenicol
2020	Patient 7	No resistance	Tetracycline
2020	Patient 8	No resistance	No resistance
2020	Patient 9	No resistance	No resistance
2020	Patient 10	No resistance	No resistance

I. 연구사업

Year	Sample	VITEK	NGS(ResFinder)
2020	Patient 11	No resistance	No resistance
2020	Patient 12	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	Trimethoprim/Sulfamethoxazole, Tetracycline, Chloramphenicol
2021	Patient 13	No resistance	No resistance
2021	Patient 14	No resistance	No resistance
2021	Patient 15	No resistance	Sulfamethoxazole, Tetracycline
2021	Patient 16	No resistance	No resistance
2021	Beef 3	Ampicillin	Ampicillin, Ampicillin+clavulanic acid, Ceftazidime, Tetracycline
2021	Beef 4	No resistance	No resistance
2021	Beef 5	No resistance	No resistance
2022	Patient 17	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	Sulfamethoxazole, Trimethoprim, Tetracycline, Chloramphenicol
2022	Patient 18	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	Sulfamethoxazole, Trimethoprim, Tetracycline, Chloramphenicol
2022	Patient 19	Ampicillin, Trimethoprim/Sulfamethoxazole	Ampicillin, Sulfamethoxazole, Trimethoprim, Tetracycline
2022	Patient 20	No resistance	No resistance
2022	Patient 21	Ampicillin, Trimethoprim/Sulfamethoxazole	Ampicillin, Sulfamethoxazole, Trimethoprim, Tetracycline, Chloramphenicol, Ciprofloxacin
2022	Beef 6	No resistance	Sulfamethoxazole
2022	Beef 7	No resistance	No resistance
2022	Beef 8	No resistance	No resistance
2023	Patient 22	Ampicillin, Gentamicin, Tobramycin	Ampicillin, Gentamicin, Tobramycin
2023	Patient 23	Ampicillin, Amikacin, Ceftazidime, Ertapenem	Azithromycin
2023	Patient 24	No resistance	No resistance
2023	Patient 25	Ampicillin	Ampicillin, Azithromycin
2023	Patient 26	No resistance	No resistance
2023	Patient 27	Ampicillin	Ampicillin, Sulfamethoxazole, Tetracycline
2023	Patient 28	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	Sulfamethoxazole, Trimethoprim, Tetracycline
2023	Beef 9	No resistance	Sulfamethoxazole, Tetracycline
2023	Beef 10	No resistance	Sulfamethoxazole, Tetracycline
2023	Beef 11	No resistance	No resistance

4. 결론

본 연구에서는 2019~2023년 경북지역 설사질환 환자 및 환경검체(소)에서 분리된 EHEC 54주를 대상으로 Shiga toxin 유전자 확인, 병원성 유전자 분석, *se/C* 부위 disruption 여부, 항생제 내성 비교분석을 수행하였다.

연구결과 설사질환 환자검체에서 *stx2* 유전자 검출률이 높았으며, 2021년 이후 증가하는 경향이 확인되었다. 환경검체(소)에서는 Shiga toxin 유전자 검출이 불규칙적으로 나타났다. 병원성 유전자 결과는 설사질환 환자검체가 환경검체(소)보다 *eae*, *tir*, *espB*, *espD* 등의 유전자를 다수 보유하고 있어 병원성이 더 강할 가능성이 높았다. *se/C* 부위 disruption 분석 결과, EHEC 균주 전체 중 46.3%에서 disrupted *se/C*가 확인되었으며, 특히 *stx2* 보유 균주에서 LEE 유전자 삽입이 더 빈번하게 발생하는 경향을 보였다.

항생제 내성 분석 결과에서는 2020년 이후 내성을 가진 균주의 비율이 증가하였으며, 2023년 가장 높은 내성률을 나타내었다. VITEK과 NGS의 항생제 내성 분석 비교 결과, NGS 분석이 다제내성균 검출에 더욱 민감한 것으로 나타났으며, VITEK에서 내성이 검출되지 않은 일부 균주도 NGS를 통해 내성 유전자가 확인되는 등 기존 배양을 기반한 내성분석법의 한계를 보완할 필요성이 있음을 확인하였다.

본 연구결과는 경북지역 장출혈성대장균에서 *stx2* 유전자를 보유한 균주의 증가, 병원성 유전자 분포 차이, 항생제 내성 증가가 주요 특징으로 나타났다. NGS를 기반으로 한 정밀분석이 다제내성균 감시 및 감염관리에 필수적이며, 향후 국

내 EHEC 감염 역학을 이해하는 데 중요한 자료로 활용될 수 있으며, 효과적인 감염 예방 및 통제를 위해 지속적인 감시와 연구가 요구된다.

참고문헌

1. C. Welinder-Olsson and B. Kaijser, "Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC)", *Scand. J. Infect. Dis.*, 37, 405-416 (2005).
2. B. China, F. Goffaux, V. Pirson, J. Mainil, "Comparison of *eae*, *tir*, *espA* and *espB* genes of bovine and human attaching and effacing Escherichia coli by multiplex polymerase chain reaction", *Vet. Microbiol.*, 71, 113-125 (1999).
3. D. H. Park, J. Y. Moon, Y. B. Kim, "Pathotypic characterization of enterocyte effacement-related LEE genes in EHEC and EPEC isolated from diarrheal patients", *J. Bacteriol. Virol.*, 37, 69-78 (2007).
4. H. Hasegawa, E. Suzuki, S. Maeda, "Horizontal plasmid transfer by transformation in Escherichia coli: environmental factors and possible mechanisms", *Front. Microbiol.*, 9, 2365 (2018).
5. A. W. Paton and J. C. Paton, "Direct detection and characterization of Shiga toxigenic Escherichia coli by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*, and *saa*", *J. Clin. Microbiol.*, 40, 271-274 (2002).
6. A. W. Paton, J. C. Paton, "Detection and characterization of Shiga toxigenic Escherichia coli by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic E. coli *hlyA*, *rfbO111*, and

I . 연구사업

- rfbO157", J. Clin. Microbiol., 36, 598-602 (1998).
7. H. Kobayashi, J. Shimada, M. Nakazawa, T. Morozumi, T. Pohjanvirta, S. Pelkonen, K. Yamamoto, "Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan", Appl. Environ. Microbiol., 67, 484-489 (2001).
8. A. McNally, A. J. Roe, S. Sompson, F. M. Thomson-Carter, D. E. Hoey, C. Currie, T. Chakraborty, D. G. Smith, D. L. Gally, "Differences in levels of secreted locus of enterocyte effacement proteins between human disease-associated and bovine *Escherichia coli* O157", Infect. Immun., 69, 5107-5114 (2001).
9. T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg, J. B. Kaper, "A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1664-1668 (1995).
10. Andrews, "FastQC: A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data," Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, 2010. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
11. V. Bortolaia, R. S. Kaas, E. Ruppe, M. C. Roberts, S. Schwarz, V. Cattoir, ... & F. M. Aarestrup, "ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes," J. Antimicrob. Chemother., 75, 3491-3500 (2020).
12. K. G. Joensen, F. Scheut, O. Lund, H. Hasman, R. S. Kaas, E. M. Nielsen, & F. M. Aarestrup, "Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*", J. Clin. Microbiol., 52, 1501-1510 (2015).
13. L. R. Trabulsi, R. Keller, T. A. T. Gomes, "Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*", Emerg. Infect. Dis., 8, 508-513 (2002).
14. J. G. Mainil, G. Daube, "Verotoxigenic *Escherichia coli*: Detection and perspective", Vet. Res., 32, 311-322 (2003).
15. P. Dean, M. Maresca, B. Kenny, "EPEC's weapons of mass subversion", Curr. Opin. Microbiol., 8, 28-34 (2005).
16. M. E. Wickham, N. F. Brown, E. C. Boyle, B. K. Coombes, B. B. Finlay, "Orchestration of virulence factors by *Escherichia coli*", Gut Microbes, 3, 77-87 (2006).
17. M. Bielaszewska, A. W. Friedrich, T. Aldick, R. Schurk-Bulgrin, H. Karch, "Shiga toxin, an emerging microbial virulence factor", Gut Pathog., 9, 1-9 (2007).