

국내에서 분리된 *Shigella sonnei*의 병원성 유전자 및 분자역학적 분석

박진홍¹, 문지영¹, 장철훈², 김영부^{1*}

부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학교실¹, 진단검사의학교실²

배 경 : *Shigella sonnei*는 1990년대 후반 이후 국내 세균성 이질의 가장 흔한 원인균으로 주목받고 있다. 본 연구에서는 유행 균주의 유전적 관계를 살펴보기 위하여 국내 여러 지역에서 분리한 *S. sonnei* 36 균주에 대하여 병원성 유전자를 검출하고 분자역학적 분석을 실시하였다.

방 법 : 1998년에서 2001년에 분리한 *S. sonnei*를 대상으로 polymerase chain reaction법으로 병원성 유전자(*ial*, *ipaH*, *stx*, *set1A*, *set1B* 및 *sen*)를 검출하고, *stx* 유전자의 발현유무에 대하여 라텍스응집법으로 확인하였다. 분자역학적인 해석을 위하여 plasmid profile과 pulsed-field gel electrophoresis법으로 분석하였다.

결 과 : PCR법으로 검출한 병원성 유전자의 보유상태는 실험균주 36주 모두(100%) *ipaH* 유전자를 보유하고 있었고, *set1B*와 *ial* 유전자는 각각 15 균주(41.7%), 16 균주(44.4%)로 나타났으며 *set1A* 유전자를 보유한 균주는 없었다. *stx* 유전자가 양성으로 나타난 4 균주(11.1%)를 대상으로 라텍스응집법으로 재검토한 결과 모두 음성으로 확인되었다. Plasmid profile은 P1형에서 P11형으로 분류할 수 있었으며, PFGE법을 이용한 DNA의 절단양식은 DNA절편 양식에서 유사성이 높아서 세 가지 아형(A-1, A-2, A-3)으로 임의로 분류할 수 있었다.

결 론 : 국내에서 분리된 대부분의 *S. sonnei* 균주들은 약간의 차이를 보이고 있지만 대체로 연도별, 지역별로 유사한 염색체 DNA 양상을 보이며, 병원성 유전인자의 양성률은 다양한 결과로 나타났다. PFGE 결과에서 절편의 수와 크기는 유전적 상관성을 가지고 있어서 국내에서 분리된 균주는 3가지 아형(subtype)으로 단일한 clone주가 전파되어 발생한 것으로 생각된다.

서 론

WHO의 보고에 의하면 개발도상국에서는 매년 5백만 명 이상의 어린이들이 설사병으로 사망하며 사망자 중에서 약 10%정도는 세균성 이질이 그 원인이다[1]. 세균성 이질은 방글라데시[2], 남미 및 아프리카 지역[3]에서 산발적으로 유행하며 많은 개발도상국에서는 풍토적으로 유행한다. 1980년대 중반이후 낮은 분리빈도를 보이던 *Shigella sonnei*는 1998년부터 집단 발병이나 산발적으로 발생하는 세균성 이질의 가장 흔한 원인균으로 주목받고 있다[4, 5].

*S. sonnei*가 장관 및 장점막에 정착하여 침입하는데 관여하는 병원성 인자로는 120-140MDa plasmid에 존재하여 장세포 침습성에 관련하는 유전자(*ial*)와 염색체와 plasmids에 존재하는 침입성 plasmid antigen H (invasion

plasmid antigen;*ipaH*) 유전자가 알려져 있다[6]. *S. dysenteriae*에 관련된 다른 병원성 인자로 Shiga 독소(*stx*)라고 부르는 외독소는 독소생산성이 명확함에도 불구하고 용균할 때만 유리되고[7], 침입성 혹은 세포 용해에 필수적인 것이 아니기 때문에 세균성 이질에서의 작용기전은 명확하지 않으며, *S. flexneri*에서 두 가지 새로운 enterotoxin이 밝혀졌다. 첫째는 *Shigella enterotoxin 1* (ShET-1)으로 염색체성 *set1* 유전자에 코딩된 것으로 활성형은 한 개의 A subunit와 몇 개의 B subunit (A₁-B_n)으로 구성된다[8]. 두 번째의 장관독소인 *Shigella enterotoxin 2* (ShET-2)는 *sen* 유전자에 코딩되어 있고, 140MDa의 plasmid에 존재하며 침입성과 관련이 있다[9].

본 연구에서는 1998년에서 2001년에 국내에서 집단적 혹은 산발적으로 발생한 세균성 이질 환자에서 분리된 *S. sonnei* 균주를 대상으로 병원성인자인 *ial*, *ipaH*, *stx*, *set1A*, *set1B* 및 *sen* 유전자에 대하여 polymerase chain reaction (PCR)법으로 검출을 시도하였고, 특히 PCR법에서 *stx* 유전자 양성균주의 경우 라텍스응집법으로 Shiga 독소 생성여부를 재확인하였다. *S. sonnei* 균주의 역학적 특성과 각 집단 발생간의 연관성을 비교 분석하기 위하여 혈청형별, plasmid profile 등을 실시하고, pulsed-field gel

접 수 일: 04/8/3 게재승인일: 05/9/26

교신저자: 김영부

(602-739) 부산광역시 서구 아미동 1가 10

부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학교실

TEL: (051)240-7712 FAX: (051)243-2259

E-mail: ybkim@pusan.ac.kr

electrophoresis (PFGE)법으로 유전자형별을 조사하였다.

였다[12].

재료 및 방법

1. 사용균주

1998년에서 2001년에 걸쳐서 한국에서 집단적 혹은 산발적으로 발생한 세균성 이질 환자의 대변에서 분리한 *S. sonnei* 36균주를 사용하였다. 각 균주는 Dorset egg 배지에 보존하고 Luria 한천배지에서 배양하여 실험에 사용하였다. 혈청형별은 이질균 면역혈청(Denka Seiken Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였다. O항원군의 형별은 생균 및 열처리한 균(100℃, 1시간 또는 121℃, 15분)을 사용하여 슬라이드글라스 응집반응을 실시하였다. 가열균과 생균의 동일한 응집유무를 확인하였다[10].

2. Plasmid DNA분리

Birnboim 과 Doly[11]의 방법에 준하여 실시하였다. 전기영동은 0.8% agarose gel에서 수평형 영동장치 Mupid-2 (Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 100V에서 40분간 실시하였으며 DNA의 단편은 자외선 하에서 ethidium bromide (EtBr)로 염색한 후 확인하였다. 분자량 표지자는 *Hind* III -digested phage λ DNA (TaKaRa Biomedicals, Tokyo, Japan)을 사용하였다.

3. PCR법에 의한 병원성 유전자 검출

시발체는 표 1과 같이 제작하였다. 반응조건은 Thermal cycler PTC-100 (MJ Reserch Inc., Waltham, MA, USA)에서 95℃ 50초, 55℃ 1분 30초, 72℃ 2분이었으며 30 cycles를 실시하였으며, 최종 신장과정은 72℃에서 7분간 실시하였다. 증폭 DNA의 확인은 2% agarose gel 전기영동을 실시하여 자외선 하에서 EtBr로 염색한 후 확인하

4. Shiga 독소(*stx*) 검출 라텍스 응집법

PCR법으로 병원성 유전자의 검출을 실시하여 *stx* 유전자가 양성으로 나온 균주들을 대상으로 VTEC-RPLA kit (Denka Seiken Co.)을 사용하여 Evans 등[13]의 방법에 따라 라텍스응집법으로 Shiga 독소 생성 여부를 검토하였다. 결과 판정은 시료가 미감작한 라텍스에서는 응집을 일으키지 않고 감작한 라텍스에만 응집한 경우를 양성으로 하였다.

5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

염색체 DNA의 분리는 GenePath Universal Module (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)와 GenePath Kit (Bio-Rad)를 이용하였다. PFGE 장치는 CHEF-DR III system (Bio-Rad)을 사용하여 Vial 등[14]의 방법에 준하여 실시하였다. 분자량 표지자로는 Lambda ladder (Bio-Rad)를 사용하여 initial pulse 5초, final pulse 45초, 6V/cm의 조건으로 14℃에서 22시간 전기영동한 다음 촬영하였다.

결 과

1. PCR법에 의한 병원성 유전자 검출

전체 36 균주(100%)에서 *ipaH* 유전자가 PCR 양성이었으며, *set1A*와 *set1B* 유전자의 증폭 반응에서 A subunit은 검출되지 않았으나, 1999년 이전 분리된 모든 균주에서 B subunit이 관찰되었다(Fig. 1). *sen* 유전자와 *ial* 유전자는 각각 16균주(44.4%)와 21균주(58.3%)에서 양성을 나타냈다. *stx* 유전자는 4 균주(11.1%)에서 양성으로 나타났으나 라텍스응집법으로 Shiga 독소의 생성여부를 재검토한 결과, 모두 음성이었다(Table 2).

Table 1. Sequence of primer pairs for polymerase chain reaction for detection of the target DNA fragments

Gene encoding virulence factor	Oligonucleotides sequence (5' to 3')	Size of amplified product (bp)
<i>set1A</i>	TCACGCTACCATCAAAGA TATCCCCCTTTGGTGGTA	309
<i>set1B</i>	GTGAACCTGCTGCCGATATC ATTTGTGGATAAAAAATGACG	147
<i>sen</i>	ATGTGCCTGCTATTATTTAT CATAATAATAAGCGGTCAGC	799
<i>ipaH</i>	TGGAAAAACTCAGTGCCTCT CCAGTCCGTAAATTCATTCT	423
<i>ial</i>	CTGGATGGTATGGTGAGG GGAGGCCAACAATTATTTCC	320
<i>stx</i>	CAGTTAATGTGGTTGCGAAC CTGCTAATAGTTCTGCGCATC	895

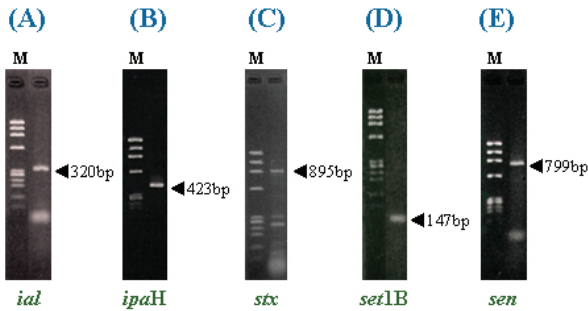


Fig. 1. Results of PCR assay for detection of virulence factors in *S. sonnei* strains from the patients. A: *ial* gene (320 bp), B: *ipaH* (423 bp), C: *stx* gene (895 bp), D: *set1B* gene (147 bp), E: *sen* gene (799 bp). Lane M: phage ϕ X174 DNA digested with *Hae* III (molecular size marker).

2. Plasmid DNA profile

Plasmid profile은 P1형에서 P11형의 11가지 형으로 분류할 수 있었으며, P2형이 10 균주로 가장 많았다. P1과 P2는 2000년에서 2001년에 분리된 균주들이 대부분이며 특히 P3은 2001년 마산에서 분리된 5균주에서만 나타났다(Table 2). 또한 1999년에 분리된 균주들은 P5형에서 P10형을 나타냈으며 대부분의 균주가 약 140kb 이외에 약 120kb, 7.74kb, 6.22kb 및 1.88kb의 plasmid를 보유하고 있었다.

3. PFGE 양상 분석

제한효소 *Xba*I에 의한 DNA절편 양식을 이용하여 시간 및 장소에 따른 *S. sonnei*의 특성을 살펴본 결과, 40kb에서 680kb의 DNA 절편이 관찰되었으며, 유사성이 높아 3가지 아형(A-1, A-2, A-3)으로 분류할 수 있었다(Fig. 2, Table 2).

고 찰

해외여행자의 증가와 식품의 해외 의존도가 높고 외식 산업 식생활의 비중이 높아짐에 따라 1990년대 이후 세균성 이질 환자의 산발적 및 집단적 발생이 많아지고 있으며, 최근에 국내에서는 물론 다른 나라에서 집단적으로 발생한 세균성 이질 환자의 감염원이나 감염경로들이 불분명하다[3]. 개발도상국에서 가장 흔한 이질균 혈청형은 *S. sonnei*이며, 일본의 경우는 약 60%를 차지하고 있다. 한국에서는 과거에 *S. flexneri*에 의한 발병이 많았으나 1990년대에 들어서면서 *S. sonnei*에 의한 감염증이 많아졌다. 1999년에는 전국적으로 연간 발생한 환자 920명 중 92%가 *S. sonnei*에 의한 것이었다[15].

세균성 이질은 *Shigella* spp.나 enteroinvasive *E. coli* (EIEC)에 의한 상피세포로의 균 침입, 세포내 증식 그리고

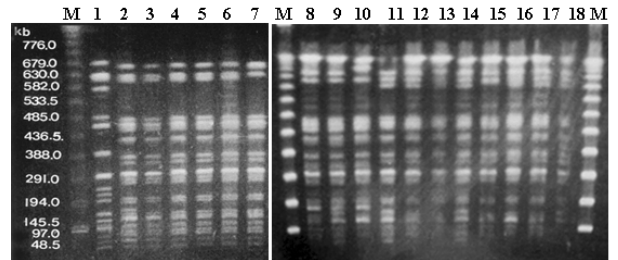


Fig. 2. PFGE of *Xba*I-digested genomic DNAs from *S. sonnei*. Lane M, Lambda ladder (molecular size marker).

인접 세포로 침입과 확산으로 인하여 발생한다. 이 과정은 수많은 인자들이 동시에 발현하며 이러한 과정이 반복되어 세포의 박리와 출혈을 일으킨다. 독성관련인자 유전자들은 3.2-3.8kb plasmid 상에 존재하며 모든 *Shigella* spp.와 EIEC에서 발견된다[1]. 180-210kb의 큰 plasmid에 존재하는 몇 종류의 유전적인 결정인자는 장관점막세포의 침입 즉 endocytosis에 관여한다. 침입성 plasmid 항원(*ipa*) 유전자인 *ipaB*, *ipaC*, *ipaD*는 *Shigella* spp.와 EIEC를 동정하는데 특이적인 핵산 탐식자로 이용되고 있고 *IpaB* 단백질과 크기가 유사한 60kb 항원을 코딩하는 *ipaH*는 *Shigella* spp.의 염색체와 plasmid상에 다수로 존재하며 유전학적으로나 면역학적으로 보다 민감하게 진단할 수 있다. 장 상피세포내로의 *Shigella* spp.의 침입은 세포 표면 구조와 숙주세포간의 밀접한 상호작용을 요구한다. 이러한 침입기전을 밝히고 침입에 대항하는 숙주면역 체계에 의해 인지되는 epitope를 규명하기 위해 *Shigella* spp.의 침입성 plasmid 항원을 분리하였고 이를 *ipaH*라고 하였다[16-18]. 본 연구에서는 침입성 plasmid 항원 *ipaH*를 비롯하여 *ial*, *stx*, *set1A*, *set1B* 및 *sen* 등 *S. sonnei*의 여러 가지 병원성인자에 대하여 조사하였다. 그 결과 전체 36 균주에서 *ial*(58.3%), *ipaH*(100%), *set1B*(41.7%), *sen*(44.4%)의 유전자들이 높은 비율을 나타냈으며, *set1A* 유전자는 전혀 보유하지 않았다. 세균성 이질 환자에서 수양성 설사는 ShET-1과 ShET-2의 두 종류의 enterotoxin 합성에 의한 것으로 최근에 밝혀졌다. 특히 이질균 중에서는 유일하게 *S. dysenteriae* 균주만 생성하는 것으로 알려져 있는 *stx* 유전자가 PCR 결과 4 균주(11.1%)에서 양성으로 나타났으나, 라텍스응집법으로 재확인한 결과 모두 음성으로 확인하였다. 최근 이 등[19]의 연구에서는 *S. flexneri*와 *S. sonnei*의 모든 실험균주에서 *stx* 유전자가 발견되었다고 보고된 바가 있다. 이와 같은 사실은 병원성인자의 유무에 따라 균종간 혈청형별로 병원성이 다양한 양상을 나타내는 것으로 생각되어진다. 앞으로 *stx* 유전자의 작용기전에 대한 활발한 연구활동과 더불어 좀 더 신속하고 정확한 연구결과를 위하여 재현성이 높고 특이적인 primer의 설계가 절실히 요구된다. 본 연구에서는 ShET-1과 ShET-2 생성을 관찰한 결과 ShET-2만을 생성하였다. Noriega 등[8]의 보고에서는 ShET-1은 *S. flexneri* 2a

Table 2. Distribution of *S. sonnei* isolates by geographical origin, plasmid profile, PFGE types and genes of virulence factor

Isolated		Strain No.	Plasmid profile	PFGE types	Genes of virulence factor					
Origin	Year				<i>ial</i>	<i>ipaH</i>	<i>stx</i>	<i>set1A</i>	<i>set1B</i>	<i>sen</i>
Seoul	2001	KSH43	P1	A-1	+	+	-	-	-	+
		KSH47	P1	NT ^b	-	+	-	-	-	-
		KSH53	P1	A-1	-	+	± ^c	-	-	+
		KSH58	P2	NT	+	+	-	-	-	+
		KSH59	P2	A-1	+	+	-	-	-	-
Masan	2001	KSH2703	P3	A-2	-	+	-	-	-	-
		KSH2705	P3	NT	-	+	-	-	-	-
		KSH2707	P3	NT	-	+	±	-	-	-
		KSH2709	P3	NT	+	+	-	-	-	-
		KSH2711	P3	NT	-	+	-	-	-	-
Jeju	2000	KSH2012	P4	A-1	-	+	-	-	-	-
		KSH2014	P1	A-1	+	+	-	-	-	+
		KSH2015	P4	B	+	+	-	-	-	+
Yeoju	2000	KSH211	P2	A-3	+	+	±	-	-	+
		KSH212	P2	NT	+	+	±	-	-	+
		KSH213	P2	A-3	+	+	-	-	-	+
NO ^a	2000	KSH221	P2	NT	+	+	-	-	-	+
		KSH241	P2	A-1	+	+	-	-	-	+
		KSH247	P2	A-3	-	+	-	-	-	-
		KSH252	P2	NT	-	+	-	-	-	-
		KSH265	P2	NT	+	+	-	-	-	+
Busan	1999	KSH532	P5	C-1	-	+	-	-	+	-
		KSH548	P6	NT	+	+	-	-	+	+
		KSH562	P7	C-1	-	+	-	-	+	-
		KSH590	P6	C-2	-	+	-	-	+	-
		KSH591	P8	NT	-	+	-	-	+	-
		KSH592	P8	NT	+	+	-	-	+	+
		KSH593	P9	NT	+	+	-	-	+	-
		KSH594	P9	NT	+	+	-	-	+	-
		KSH595	P10	NT	+	+	-	-	+	-
		KSH596	P6	C-1	-	+	-	-	+	-
		KSH597	P9	NT	-	+	-	-	+	-
		KSH598	P6	NT	+	+	-	-	+	-
		KSH599	P6	NT	+	+	-	-	+	+
		KSH610	P11	C-1	+	+	-	-	+	+
	1998	KSH447	P6	C-3	+	+	-	-	+	+

^a NO, no outbreak (sporadic isolation)^b NT, not tested^c ±; false positive. The strain was proved not to produce Shiga-toxin by latex agglutination.

에서 대부분이 발견되었다고 하였으며, Nataro 등[9]은 DNA probe를 사용하여 *S. flexneri*의 73%에서 *sen*유전자를 검출하였으나 본 연구에서는 사용균주 36 균주 중에서 16 균주(44.4%)에서 검출되었다. 더구나 이러한 실험 결과의 차이는 이 유전자가 plasmid에 코딩되어 있으므로 장기간 보존하거나 계대배양으로 plasmid가 소실될

가능성이 있기 때문이다. Luscher 등[20]은 1993년에서 1995년에 분리된 이질균 25 균주 중에서 3 균주(12%)만이 plasmid 유래의 *sen* 유전자와 *ial* 유전자가 양성이었으나, 1996년에서 1998년에 분리된 이질균은 두 유전자가 100% 양성이었다.

*S. sonnei*균은 *S. flexneri*균 등의 다른 이질균과 달리 단

일한 혈청형으로 구성되어 있다. 그 때문에 *S. sonnei*에 의한 집단발생시에 있어서 colicine형, 항균제 감수성 양상, 생화학적 성상의 차이 등의 전통적인 형별 방법 등이 역학적 지표로서 이용되고 있으나 변별력에 한계가 있다. 최근에는 plasmid profile의 분석, ribotyping, PFGE 혹은 random amplified polymorphic DNA (RAPD)법 등의 분자 유전학적인 해석법이 개발되어 *S. sonnei* 감염의 집단 발생시 역학조사에 응용 연구되고 있다[21,22]. Liu 등[22]은 PFGE와 RAPD 등에 의한 염색체 DNA 분석을 *S. sonnei*에 적용하고 plasmid profile과 PFGE 형이 다른 2개의 clone에 의한 집단감염발생을 규명하여 PFGE의 역학적 유용성을 보고하였다. 본 실험에서 *Xba*I으로 시행한 PFGE의 결과는 임의로 A-1, A-2, A-3형으로 구별할 수 있었다. Genomic DNA의 단편들은 대부분 1-2 band 차이를 보였다. 이는 국내에서 산발적 혹은 집단적으로 발생한 세균성 이질의 병원균은 동일한 clone이며, 이들이 계속적으로 전파되고 있음을 짐작할 수 있었다(Fig. 2). 한편 plasmid profile은 11형으로 P4와 P6을 제외한 대부분이 각기 하나의 큰 plasmid의 차이가 있었지만 대체로 작은 plasmid는 5-6가지의 동일한 크기로 나타내어 유사성이 높게 나타났다(Table 2). *S. sonnei*에 특이적인 120-140 MDa의 virulence plasmid는 매우 불안정하며 계대배양에서 쉽게 소실될 우려가 있는 것으로 plasmid의 획득과 소실에 영향을 받을 수 있으므로 100kb 이하의 plasmid만을 대상으로 분석하거나 수차례의 반복실험을 요구한다[23].

결론적으로 우리나라에서 유행하고 있는 *S. sonnei* 균주들은 유전적으로는 대체로 유사하나 사회적인 환경 또는 환자 사이를 통과하며 전달성인 plasmid의 유입과 삭제로 인한 다양한 유전적인 변화를 통하여 지속적으로 항균제 내성 및 유전적 특성의 변화를 가져온 것으로 보인다. 또한 이러한 병원성 인자를 지배하는 유전자의 일 부분은 plasmid profile이나 PFGE의 분석 결과와는 다른 별개의 유전적인 변화로 사료되며 이러한 유전적인 변화를 확인할 수 있는 결정적인 증거를 찾기 위해서는 계속적인 연구가 요구된다. 특히 PFGE법을 이용한 염색체 DNA의 양상은 균주 사이의 감염원, 감염경로를 조사하는 수단으로 우수한 방법이지만 세균성 이질의 PFGE 형별을 각 지역 집단환자 발생과 연관지어 분석하기 위해서는 장기간의 데이터가 축적된 후 군중에 따라 적절하게 분석되어야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- Hale TL. Genetic basis of virulence in *Shigella* species. Microbiol Rev 1991;55:206-24.
- Rahaman MM, Huq I, Dey CR, Kibriya AKMG, Curlin G. Ampicillin-resistant shiga bacillus in Bangladesh. Lancet 1974;i:406-7.
- Mata LJ, Gangarosa EJ, Caceres A, Perera BR, Mejicanos ML. Epidemic shiga bacillus dysentery in Central America. 1. Etiologic investigation in Guatemala. J Infect Dis 1969;122:170-80.
- Tauxer R, Puhf ND, Well JG. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in the USA : The importance of international travelers. J Infect Dis 1990;162:1107-11.
- Institute of Medicine of National Academies. The burden of disease resulting from various diarrhea. In: New vaccine development: Establishing priorities; Volume II, Diseases of importance in developing countries. Washington, D.C., National Academy Press, 1986:159-69.
- Frankel G, Giron JA, Valmassoi J, Schoolnik GK. Multi-gene amplification simultaneous detection of three virulence genes in diarrheal stool. Mol Microbiol 1989;3: 1729-34.
- Cantey JR. Shiga toxin-an expanding role in the pathogenesis of infectious diseases. J Infect Dis 1985;151:766-71.
- 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: 1408-10.
- Nataro JP, Seriwatana J, Fasano A, Maneval DR, Guers LD, Noriega F, et al. Identification and cloning of a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. Infect Immun 1995; 63:4721-28.
- Ewing WH and Lindberg AA. Serology of *Shigella*. Methods Microbiol. 1984;14:113-42.
- Birnboim HC and Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979;7:1513-23.
- Kim YB and Oh YH. Use of polymerase chain reaction and serum antibodies for diagnosis of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Kor Soc Microbiol 1998;33:99-110.
- Evans DG, Evans DJ Jr, Tjor WS, Dupont HL. Detection and characterization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adult with diarrhea. Infect Immun 1978;19:727-36.
- Vail ML, Kreig DP, Kuhns JS, Ogle JW, Shortridge VD, Ostroff RM, et al. Molecular analysis of hemolytic and phospholipase C activities of *Pseudomonas cepacia*. Infect Immun 1990;58:4020-9.
- Jung HJ, Kim SJ, Maeng KY, Chang CH. Analysis of chromosomal DNA of *Shigella* isolates using pulse-field gel electrophoresis. Korean J Clin Microbiol 2000;3:23-9.
- Sasakawa C, Kamata K, Sakai T, Makino S, Yamada M, Okada N, et al. Virulence-associated genetic regions

- comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in *Shigella flexneri* 2a. J Bacteriol 1988;170:2480-4.
17. Venkatesan M, Buysse JM, Vandendries EV, Kopecko DJ. Characterization of *ipaBCD* genes from *Shigella flexneri*. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:9317-21.
18. Buysse JM, Stover 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: 2561-9.
19. Lee KM, Kim SW, Park SG. Virulence and antimicrobial characteristics of *S. flexneri* and *sonnei* isolated from patients in Seoul. J Korean Public Health Assoc 2001;27: 144-51.
20. Luscher D and Athwegg M. Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries. Mol Cell Probes 1994;8:285-90.
21. Brian MJ, Van R, Townsend I, Murray BE, Cleary TG, Pickering LK. Evaluation of the molecular epidemiology of an outbreak of multiply resistant *Shigella sonnei* in a day-care center by using pulsed-field gel electrophoresis and plasmid DNA analysis. J Clin Microbiol 1993;31: 2152-6.
22. Liu PY, Lau Y, Hu B. Analysis of clonal relationships among isolation of *Shigella sonnei* by different typing methods. J Clin Microbiol 1995;33:1779-83.
23. Kapperud G, Rorvik LM, Hasseltvedt V, Hoiby EA, Iversen BG, Staveland K, et al. Outbreak of *Shigella* infection traced to imported iceberg lettuce. J Clin Microbiol 1995;33:609-14.

Molecular Epidemiology and Virulence Factors of *Shigella sonnei* Isolated in Korea

Jin Hong Park¹, Ji Young Moon¹, Chulhun L. Chang², and Yung Bu Kim^{1*}

¹Department of Microbiology and Immunology, and ²Laboratory Medicine, College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

Background: Most of the shigellosis outbreaks in Korea have been caused by *Shigella sonnei* since late 1990's. We analyzed 36 strains of *S. sonnei* isolated in South Korea from 1998 to 2001 by molecular epidemiologic tools to understand genetic relationship of the outbreaks.

Methods: The 36 strains of *S. sonnei* were tested for the presence of virulence genes (*ial*, *ipaH*, *stx*, *set1A*, *set1B* and *sen*) using polymerase chain reaction (PCR) method and for the production of Shiga-toxin using latex agglutination test. Seventeen representative strains were selected and their genetic relevance was analyzed by plasmid profile and pulsed-field gel electrophoresis(PFGE).

Results: By PCR, *ipaH* gene was detected in all 36 strains, *set1B* gene in 15 strains (41.7%), and *sen* gene in 16 strains (44.4%); all strains were negative for *set1A* gene. Although *stx* gene was positive in four strains by PCR method, the toxin was negative by latex agglutination test. The strains were differentiated into 11 groups by plasmid profile and 1 type with 3 subtypes (A-1, A-2 and A-3) by PFGE.

Conclusion: There was a wide range of diverse virulence genes present in the outbreak strains of *S. sonnei*. PFGE analysis indicated that all the strains tested were related with each other despite minor genotypic and phenotypic differences. A genetically identical clone of *S. sonnei* was estimated to be the cause of the outbreaks. (*Korean J Clin Microbiol* 2005;8(2):172-178)

Keywords: *Shigella sonnei*, Genotype, PCR, PFGE

Address reprint requests to : Yung Bu Kim, Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University, 1-10 Ami-Dong, Seo-gu, Busan, 602-739, Korea.
Tel. +82-51-240-7710 Fax. +82-51-243-2259 E-mail: ybkim@pusan.ac.kr