

하수와 가축분변에서 분리된 대장균 O157:H7 박테리오파지의 병원성인자 프로파일

서지나 · 서동주 · 이민화 · 전주빈 · 오혜진 · 오미화¹ · 최창순*

중앙대학교 식품공학부, ¹농촌진흥청 국립축산과학원

Virulence Factor Profiles of *Escherichia coli* O157:H7 Bacteriophage Isolates from Sewage and Livestock Stools

Jina Seo, Dong Joo Seo, Min Hwa Lee, Su Been Jeon, Hyejin Oh, Mi Hwa Oh¹, and Changsun Choi*

School of Food Science and Technology, Chung-Ang University, 4726, Seodong-daero,
Daedeok, Ansong, Gyeonggi 456-756, Korea

¹National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Suwon, Gyeonggi 441-706, Korea

(Received September 27, 2014/Revised October 24, 2014/Accepted November 21, 2014)

ABSTRACT - The aim of study was to investigate the virulence profile of *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophages isolated from sewage and livestock stools. Among 23 *E. coli* O157:H7 bacteriophages, 14 strains were isolated from sewage and 9 were from animal stools collected from 10 livestock farms in Korea. For each bacteriophage DNA sample, the presence of *stx1*, *stx2*, *eae*, *aafII*, *ial*, *elt*, *estI*, *estIII*, *astA*, *afa*, and *cnf* was examined by polymerase chain reaction. The detection rate of *eae*, *stx2*, *estI*, *astA*, and *ial* was 100%, 69.6%, 13.0%, 13.0%, 8.7%, respectively. While all *E. coli* O157:H7 bacteriophages isolated from stools carried *eae+stx2*, *stx2+eae*, *eae+astA*, *eae*, *stx2+eae+estI*, *eae+estI*, *stx2+eae+ial*, and *eae+ial* were observed in bacteriophages isolated from sewage. As several plasmid-carrying virulence factors (*estI*, *astA*, and *ial*) were found in *E. coli* O157:H7 bacteriophages obtained from sewage and stools, the microbial safety of bacteriophages should be investigated in further study.

Key words : *Escherichia coli* O157:H7, Bacteriophage, virulence factors, *eae*, *stx2*

Twort (1915)와 d'Herelle (1917)에 의해서 알려지게 된 박테리오파지는 세균만을 감염시키는 세균성 바이러스로 특정 세균의 용균을 일으키는 특징을 가지고 있다¹⁾. 박테리오파지는 자연계에 널리 분포하고 있으며, 흙, 분변, 상·하수 및 식품 등 숙주 세균이 존재하는 다양한 분리원로부터 박테리오파지가 분리된다²⁾. 박테리오파지는 100여 년 전부터 알려져 왔으나, 치즈 발효과정을 저해하는 오염 미생물 정도로 식품분야에서 인지되었을 뿐 적극적으로 활용되지는 못 하였다¹⁾.

미국 식품의약국(Food and Drug Administration: FDA)에서는 식품 또는 기기의 표면에 사용할 수 있는 박테리오파지의 상업화를 허용하였다¹⁾. Microes Food Safety사에서 개발한 Listex P100는 *Listeria monocytogenes*를 제어하

는 단일 박테리오파지로서 미국 식품의약국으로부터 Generally recognized as safe (GRAS)로 인정을 받았으며, Intralytix Inc.에서 개발한 ListShield, EcoShield는 박테리오파지 혼합물(cocktail)로서 식품에 사용할 수 있도록 허가되었다¹⁻²⁾. 리스테리아 박테리오파지 Listex P100는 우유 공장의 하수로부터 분리되었으며, 병원성 대장균 박테리오파지 EcoShield (ECP-100)는 세 가지 박테리오파지 균주의 혼합물로서 각각 바닷물로부터 분리되었다³⁻⁴⁾. 일부 연구자들은 닭고기, 돼지고기, 소고기, 버섯, 상추와 같은 식품으로부터 *E. coli* 박테리오파지를 분리하기도 하였다⁵⁾. 그러나 분변, 오물 그리고 하수 등에서 분리된 박테리오파지가 미지의 병원성인자를 보유할 수 있다는 염려 때문에 식품산업에 활용하는데 제한이 되고 있다.

박테리오파지 관련 연구는 항생제 내성 세균에 대한 치료제로서의 활용 가능성을 주목하면서부터 식품분야보다 의학분야에서 다양한 연구가 수행되고 있으며, 특히 병원성 미생물의 치료제로 이용되는 phage therapy, 특정 단백질 또는 항체를 만들어내는 phage display, 병원성 미생물

*Correspondence to: Changsun Choi, School of Food Science and Technology, Chung-Ang University, 4726, Seodongdaero, Deaduck, Anseong, Gyeonggi 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-4589
E-mail: cchoi@cau.ac.kr

typing과 검출, 백신개발 관련 연구 및 박테리오파지 유전자를 이용한 유용 효소의 생산 등에 광범위한 분야에서 수행되고 있다²⁾. 그러나 몇몇 선행연구들은 박테리오파지가 병원성 대장균의 병원성인자를 운반한다는 사실을 보고하면서 대장균 박테리오파지의 안전성 문제를 제기하였다^{6,7)}. 특히 일부 toxin-converting 박테리오파지가 *E. coli* K-12에서 10,000배가 넘는 많은 양의 shiga toxin을 생성하도록 변환시킴을 보임으로써, 박테리오파지가 질병의 발생 가능성을 높인다고 보고하였다⁷⁾. 이러한 선행연구에도 불구하고 박테리오파지의 안전성과 관련한 연구는 제한적이다³⁻⁹⁾.

따라서 본 연구에서는 다양한 분리원에서 분리된 *E. coli* O157:H7 박테리오파지를 확보하고, 각각의 박테리오파지가 보유하고 있는 병원성 인자의 종류와 보유 특성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 박테리오파지 분리 가검물

현재까지 알려진 대장균의 병원성인자 *stx1*, *stx2*, *eae*, *aafII*, *ial*, *elt*, *estI*, *estII*, *astA*, *afa*, *cnf* 를 검출하기 위한 양성대조 균주는 선행연구에서 사용한 대장균 표준균주와 분리주를 사용하였다¹⁰⁻¹¹⁾. 한국의 하수에서 분리된 *Escherichia coli* O157:H7 용균성 박테리오파지 14개 주는 한국의국외대학교 박테리오파지 은행으로부터 구입하여 사용하였다. 박테리오파지 분리에 사용한 숙주 균주인 *E. coli* O157:H7 ATCC 43889와 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890, *E. coli* O157:H7 ATCC 35150은 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하였다. 박테리오파지 분리에 사용될 축분은 경기도 지역의 10개 농장으로부터 수집하였다.

E. coli O157:H7 박테리오파지 분리

E. coli O157:H7 ATCC 43889는 선행연구와 같이 Tryptone Soya Broth (TSB)에 접종시켜 37°C에서 18시간 배양시켜 사용하였다¹²⁻¹⁴⁾. 각 분리원에서 얻은 샘플 20 g, Luria Bertani broth including 0.1% CaCl₂ (LBC) 100 ml, 숙주 균주 1 ml을 혼합하고, shaking incubator (Jeiotech, Daejeon, Korea)에서 150 rpm, 37°C 조건으로 18시간 진탕배양 하였다. 박테리오파지는 8000 rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 배양액의 상층액을 0.2 um syringe filter (Sartorius Stedim Biotech A.G., Gottingen, Germany)로 여과하여 분리하였다. 분리된 박테리오파지는 선행연구에서 보고된 plaque assay법을 이용하여 용균활성을 확인하였다. 숙주 균주 100 ul와 SM buffer (0.05 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.008 M MgSO₄, 0.01% gelatin, pH 7.5)로 10배 단계 희석하여 준비한 박테리오파지 샘플 100 ul를 혼합하여 shaking incubator에서 150 rpm, 37°C 조건으로 1시간 배

양시켰다. 반응액 200 ul는 LBC soft agar (LB broth, 0.1% CaCl₂, 0.6% agar, TSBC soft agar; TSB, 0.1% CaCl₂, 0.6% agar)와 혼합하고, 이미 준비된 LBC agar (LB agar, 0.1% CaCl₂, TSAC; TSA, 0.1% CaCl₂)에 조심스럽게 부어 오버레이(overlay)를 형성하였다. 이렇게 준비된 배지는 37°C에서 18시간 배양시킨 후 plaque의 크기와 수를 확인하였다.

박테리오파지 plaque가 확인된 배지에 5 ml SM buffer를 넣고 Orbital shaker (Optima, Tokyo, Japan)에서 3시간 동안 교반하여 박테리오파지를 buffer에 용해시켰다. 교반 단계가 끝난 buffer는 다시 회수하여 0.2 um filter로 여과시켰다. 박테리오파지의 증균을 위하여 LBC broth 100 ml에 30% glucose 1.5 ml과 *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 500 ul를 첨가하고 37°C 1시간 배양하여 얻어진 배양액에 박테리오파지 분리주를 3~5 ml 첨가하여 5시간 추가 배양하였다. 증균된 박테리오파지 분리주는 0.2 um filter로 여과하여 숙주균주를 제거하고 냉장보관하였다.

E. coli O157:H7 박테리오파지의 병원성인자 검출

대장균의 병원성인자 검출을 위한 양성대조균은 선행연구에서 사용된 표준균주 또는 분리균주를 TSA에 배양하고, 여기서 얻어진 단일 집락을 TSB에 접종하고 24시간 배양한 배양액을 사용하여 AccuPrep Genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Daejeon, Korea)로 genomic DNA를 추출하였다¹⁰⁻¹¹⁾. 박테리오파지 배양액은 0.2 um syringe filter로 여과하여 숙주세균의 오염을 배제하였으며, bacteriophage DNA는 Phage DNA isolation kit (Norgen Biotek, Ontario, Canada)로 표준 추출법에 따라서 DNase I (20 U)을 처리한 뒤 phage DNA를 추출하였다.

E. coli 병원성인자 *stx1*, *stx2*, *eae*, *aafII*, *ial*, *elt*, *estI*, *estII*, *astA*, *afa*, *cnf*에 대한 중합효소연쇄반응은 선행연구에서 사용된 방법에 따라서 수행되었다¹⁰⁻¹¹⁾. 중합효소연쇄반응을 위한 primer는 모두 Bioneer에 의뢰하여 제작되었다(Table 1). 중합효소연쇄반응액의 조성은 3차 멸균수 12 ul, dNTP 2.5 ul, 10X reaction buffer 2.5 ul, 20 pmol forward, reverse primer 각 1 ul, 1U *Taq* polymerase 1 ul (Bioneer, Daejeon, Korea), DNA template 5 ul로 준비하였다. 반응액은 Denaturation (94°C, 5 min), 35 main cycles (94°C, 45 sec; Tm 45 sec; 72°C, 45 sec), Final extension (72°C, 10 min) 조건으로 MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, Mexico)에서 반응하였다. 전기영동은 0.1 ul/ml Ethidium bromide가 포함된 1x Tris acetate EDTA (TAE buffer) 1% gel agarose상에서 100 V, 45 min 조건으로 수행하였다. 전기영동 결과는 UV illuminator (SL-20 25W Transilluminator, Seoulin BioScience, USA)로 관찰하였으며, Launch DocIT LS program (UVP Advanced Bio-Imaging Software version. 5.5.5a, cambridge, UK)로 분석하였다.

결과 및 고찰

본 연구에서는 분변으로부터 분리한 *E. coli* O157:H7 박테리오파지 9주와 박테리오파지은행에서 구입한 하천수, 오수, 해수 유래의 박테리오파지 14주의 병원성인자 보유 여부를 조사하였다. 23개 박테리오파지 분리주에서 *eae*, *stx2*, *ial*, *estI*, *astA*가 검출되었으며, 각각의 병원성인자 검출율은 *eae* (23/23; 100%), *stx2* (16/23; 69.6%), *estI* (3/23; 13.0%), *astA* (3/23; 13.0%), *ial* (2/23; 8.7%) 순으로 높았다 (Table 2). 박테리오파지가 보유하고 있는 병원성인자의 프로파일은 *stx2+eae* (13/23; 56.5%), *eae+astA* (3/23; 13.0%), *eae* (2/23; 8.7%), *stx2+eae+estI* (2/23; 8.7%), *eae+estI* (1/23; 4.3%), *stx2+eae+ial* (1/23; 4.3%), *eae+ial* (1/23; 4.3%)과 같이 조사되었다. 박테리오파지에 1개의 병원성인자를 보유한 경우는 21.7%, 2개와 3개의 병원성인자를 보유한 경우는 각각 69.6%와 13.0%로 다양한 병원성인자를 보유하는 것으로 조사되었다.

장병원성대장균(Enteropathogenic *Escherichia coli*: EPEC)의 'attaching and effacing' 병변과 관련이 깊은 intimin (*eae*) gene은 locus of enterocyte effacement 유전자에 위치하고 있는 것으로 알려져 있다¹⁰⁻¹¹). 기존의 연구된 대장균 박테리오파지에서는 *eae*가 검출 보고된 바 없음에도 불구하고, 본 연구에 사용된 박테리오파지는 모두 *eae* 양성반응 보였다. 따라서 숙주세균의 genomic DNA오염을 배제하기 위하여 *E. coli* O157:H7 ATCC 43889, *E. coli* O157:H7 ATCC 43890, *E. coli* O157:H7 ATCC 35150의 배양액과 0.2 um syringe filter 여과액을 Phage DNA isolation kit로 추출하여 얻은 DNA에 대하여 *eae*의 존재여부를 조사하였다. 세 대장균 모두 배양액에서 추출된 DNA는 *eae* 양성 반응을 보였으나, 제공한 여과액을 phage DNA isolation kit으로 추출한 경우 *E. coli* O157:H7 ATCC 43890과 *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 여과액에서는 *eae*가 검출되지 않았다. 흥미롭게도 박테리오파지 분리 숙주인 *E. coli* O157:H7 ATCC 43889 여과액은 DNase I처리함에도 불구하고 *eae*가 검출되어, 본 연구에 사용된 박테리오파지 분리주에서 *eae*가 공통적으로 검출된 것은 *E. coli* O157:H7 ATCC 43889에서 기인한 오염 DNA 또는 숙주세균 내에 존재하는 prophage에 의한 것으로 추측된다. 따라서 향후 연구에서는 *E. coli* O157:H7 ATCC 43889를 이용한 박테리오파지 분리시 *eae* gene의 오염을 고려하거나, 다른 숙주세균을 사용할 필요가 있을 것이다.

본 연구에서 분리된 가축분변 유래 박테리오파지 분리주들은 모두 *stx2+eae* 보유하고 있음을 확인하였다. *stx2*와 *eae* 이외의 병원성인자는 검출되지 않았다(Table 2). 선행연구에서는 *stx2* 유전자를 보유하고 있는 장출혈성대장균(Enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC) 박테리오파지 관련 보고는 많았지만¹⁵⁻²⁰), 본 연구와 같이 장병원성대장균(EPEC)

의 병원성인자인 *eae*검출은 언급되지 않았다. *eae*가 숙주 세균의 여과액에서도 검출되는 점을 감안했을 때 *stx2*만이 가축 분변 유래 박테리오파지에서 공통적으로 존재하는 병원성인자로 사료된다. Martinez-Castillo & Muniesa는 분변 유래 박테리오파지는 *stx2* 유전자에 대하여 모두 양성반응 보인다고 보고한 바 있는데, 본 연구 결과와 일치하였다¹⁵).

하수 유래 박테리오파지 분리주에서는 *stx2+eae*, *eae+astA*, *eae*, *stx2+eae+estI*, *eae+estI*, *stx2+eae+ial*, *eae+ial*와 같이 다양한 병원성인자 프로파일이 조사되었다. 하수유래 박테리오파지 6개 분리주가 장독소형대장균(Enterotoxigenic *E. coli*: ETEC)이 주로 보유하고 있는 내열성 장독소인 *estI* 또는 *astA*를 보유하고 있었다. 내열성 독소(heat-stable enterotoxin; ST)는 이열성 독소(heat-labile enterotoxin; LT)와 함께 대장균이 보유하는 Ent plasmid에 위치하는 것으로 알려져 있다. ST 또는 LT와 같은 ETEC 장독소는 플라스미드 상에 위치하면서 prophage P1 또는 접합(conjugation)에 의하여 장독소를 보유하지 않는 대장균으로 병원성인자를 전달된다고 하였다¹⁶). Enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST-1)을 생성하는 *astA* gene은 장응집성대장균(Enteroaggregative *E. coli*: EAEC)뿐만 아니라 ETEC, EPEC에서도 검출되는 병원성인자이다. *astA*는 Transposon으로 알려져 있기 때문에¹⁰), 하수와 같이 다양한 세균이 혼재하는 환경에 존재하는 박테리오파지는 *astA*와 같은 장독소를 획득 및 전이하기 용이할 수 있다. 따라서 식품산업에 활용하기 위한 박테리오파지는 이러한 병원성인자를 보유하지 않아야 할 것이다.

흥미롭게도 하수에서 분리된 2개의 박테리오파지에서 장침투성대장균(Enteroinvasive *E. coli*: EIEC)의 병원성인자인 *ial* (invasion-associated locus)이 확인되었다. 그러나 태국, 베트남, 미얀마 등에서는 발생하는 병원성 대장균에서는 검출율이 낮거나 없으며¹⁷), 국내에서도 EIEC에 의한 대장균 감염 사례는 보고된 바 없다. 다만 최 등이 축산물에서 분리한 대장균에서 EIEC분리주 1개 균주를 확인한 바 있다¹⁰). EIEC는 *IpaA*, *IpaB*, *IpaC*와 *IpaD*를 포함하는 140-Md invasion plasmid, *VirG*를 합성하는 병원성 플라스미드와 superoxide dismutase를 포함한 Chromosomal virulence factors를 특징적으로 보유하고 있다¹⁸). 따라서 *ial*을 보유하고 있는 박테리오파지가 식품 또는 환경에서 비병원성 대장균으로 병원성인자를 전달할 수 있는지 여부 등을 후속연구에서 평가할 필요가 있을 것이다.

숙주 세균과 박테리오파지의 유전체 클러스터 부분이 비슷할 경우 병원성 인자의 이전이 가능하며 주로 접합 부위에서 일어난다고 보고하였다⁸). 또한 O'Brien (1984)등은 숙주 세균의 독소와 박테리오파지의 독소 관련 유전자가 비슷한 구조를 가지고 있다는 사실을 바탕으로 converting phage의 위험성을 제기하였다⁶). Toxin-converting 박테리오파지

파지가 *E. coli* K-12에서 10,000배가 넘는 많은 양의 shiga toxin을 생성하도록 변환시킴을 보임으로써 질병의 잠재적 발생 가능성을 높일 수 있음을 보고하였다⁷⁾. 숙주 세균의 병원성인자를 보유하게 된 converting 박테리오파지에 대한 선행연구는 외국에서 많이 보고되었다¹⁶⁻²⁰⁾. 특히 *stx2*-encoding 박테리오파지 분리주는 host range와 독소 생성물이 각각 다르게 나타나며, Hemolytic-uremic syndrome (HUS)와 같은 증상을 유발 시킬 가능성이 있다고 하였다²⁰⁾. Muniesa등은 *stx2*-carrying 박테리오파지에 의한 질병을 확인하고, 환자마다 다른 증상이 나타났다고 보고하였다¹⁸⁾. 또한 converting 박테리오파지에 의해 non-O157 *E. coli*에 *stx2*의 병원성인자가 전이된 경우도 보고되었다²⁴⁾.

그러나 다른 측면의 연구에서는 박테리오파지가 보유하고 있는 *stx2*가 세포막에 스트레스인자로 작용하여 용균 작용시 촉매 역할을 함으로써 *E. coli* O157:H7을 효율적으로 제어할 수 있으며, 더 넓은 host range를 가지는 특징이 있다고 보고하였다²⁵⁾. 또한 MacGannon등은 *E. coli* O157:H7에 대한 항생제 치료는 독소를 제어하지 못한다는 단점을 보완하기 위하여 *stx2*를 보유한 박테리오파지를 복합적으로 사용하였는데, 이 박테리오파지가 *E. coli* O157:H7의 독소 생산을 효과적으로 저해하였다고 하였다²⁶⁾. 본 연구에서 사용된 박테리오파지 분리주에 *stx2*의 보유율이 69.6%로 높았으므로, 각각의 박테리오파지에 존재하는 *stx2*의 안전성과 숙주 세균 제어와 관련한 활성평가가 필요할 것이다.

최근 의학분야에서는 박테리오파지를 이용한 다양한 질병치료 연구가 수행되고 있으며, 이와 더불어 임상치료를 위한 대장균 박테리오파지 T4의 안전성관련 연구가 보고되었다²⁷⁻²⁸⁾. Bruttin & Brussow는 15명의 임상시험 자원자를 대상으로 박테리오파지 T4 경구 투여에 대한 안전성을 조사하였는데, 박테리오파지 T4는 전체 시퀀스를 분석해 본 결과 병원성인자를 보유하지 않았기 때문에 안전성이 확보되었다고 보고하였다²⁷⁾. 반면에 lamda-like 박테리오파지의 경우 숙주 세균의 병원성인자를 옮기기 때문에 잠재적으로 더 많은 위험요소를 가지고 있다고 보고하였다²⁹⁾.

본 연구에서는 분변유래 박테리오파지는 모두 *stx2*+*eae*를 보유하고 있었으나, 하수유래 박테리오파지 분리주에서는 다양한 병원성인자와 병원성 프로파일을 확인할 수 있었다. 따라서 향후 연구에서는 다양한 종류의 식품 또는 상수와 같이 위생적인 분리원으로부터 박테리오파지를 분리할 필요가 있을 것이다. 식품 및 환경 분야 응용을 위해서는 실용화 이전에 병원성인자의 보유 여부를 확인하고, 박테리오파지 분리주의 안전성 평가를 반드시 병행해야 할 것으로 판단된다. 또한 식품에 활용할 수 있는 박테리오파지의 안전성 검사기술 개발 및 안전 기준을 확보해야 할 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 2014년도 농촌진흥청 국립축산과학원의 연구개발비(PJ00922104)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Summers, W.C.: Bacteriophages: Biology and application, (Kutter, E., Sulakvelidze, A. eds.) CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 5-27 (2000).
2. Brovko, L.Y., Anany, H., and Griffiths, M.W.: Bacteriophages for detection and control of bacterial pathogens in food and food-processing environment., *Adv. Food Nutr. Res.*, **67**, 241-288 (2012).
3. Abuladze, T., Li, M., Menetrez, M.Y., Dean, T., Senecal, A., and Sulakvelidze, A.: Bacteriophages reduce experimental contamination of hard surfaces, tomato, spinach, broccoli, and ground beef by *Escherichia coli* O157:H7, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 6230-6238 (2008).
4. Carlton, R.M., Noordman, W.H., Biswas, B., de Meester, E.D., and Loessner, M.J.: Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **43**, 301-312 (2005).
5. Hudson, J.A., Billington, C., Carey-Smith, G., and Greening, G.: Bacteriophages as biocontrol agents in food, *J. Food Prot.*, **68**, 426-437 (2005)
6. O'Brien, A.D., Newland, J.W., Miller, S.F., Holmes, R.K., Smith, H.W., and Formal, S.B.: Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea, *Science*, **266**, 694-696 (1984).
7. Cheetham, B.F., and Katz, M.E.: A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol. Microbiol.*, **18**, 201-208 (1995).
8. Waldor, M.K., and Mekalanos, J.J.: Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin, *Science*, **272**, 1910-1914 (1996).
9. Figueroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D., and Bossi, L.: Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol. Microbiol.*, **39**, 261-271 (2001).
10. Choi, S.K., Lee, M.H., Lee, B.H., Jung, J.Y., and Choi, C.: Virulence factor profiles of *Escherichia coli* isolated from pork and chicken meats obtained from retail markets, *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.*, **30**, 148-153 (2010).
11. Lee, G.Y., Jang, H.I., Hwang, I.G., and Rhee, M.S.: Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea, *Int. J. Food Microbiol.*, **134**, 196-200 (2009)
12. O'Flynn, G., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., and Coffey, A.: Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 3417-3424 (2004).
13. Hudson, J.A., Billington, C., Cornelius, A.J., Wilson, T., On,

- S.L., Premaratne, A., and King, N.J.: Use of a bacteriophage to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 on beef. *Food Microbiol.*, **36**, 14-21 (2013).
14. Hudson, J., Billington, C., Wilson, T., and On, S.: Effect of phage and host concentration on the inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 on cooked and raw beef. *Food Sci. Technol. Int.*, 1-6 (2013).
 15. Martínez-Castillo, A., and Muniesa, M.: Implications of free Shiga toxin-converting bacteriophages occurring outside bacteria for the evolution and the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **4**, 46 (2014).
 16. Johansen, B.K., Wasteson, Y., Granum, P.E., and Brynstad, S.: Mosaic structure of Shiga-toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157:H7 indicates frequent gene exchange between lambdoid phage genomes, *Microbiology*, **147**, 1929-1936 (2001).
 17. Miyamoto, H., Nakai, W., Yajima, N., Fujibayashi, A., Higuruchi, T., Sato, K., and Matsushiro, A.: Sequence analysis of Stx2-converting phage VT2-Sa shows a great divergence in early regulation and replication regions, *DNA Res.* **31**, 235-240 (1999).
 18. Muniesa, M., de Simon, M., Prats, G., Ferrer, D., Pañella, H., and Jofre, J.: Shiga toxin 2-converting bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak, *Infect. Immun.*, **71**, 4554-4562 (2003)
 19. Unkmeir, A., and Schmidt, H.: Structural analysis of phage-borne stx genes and their flanking sequences in shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains, *Infect. Immun.*, **68**, 4856-4864 (2000).
 20. Wagner, P.L., Acheson, D.W., and Waldor, M.K.: Isogenic lysogens of diverse shiga toxin 2-encoding bacteriophages produce markedly different amounts of shiga toxin, *Infect. Immun.*, **67**, 6710-6714 (1999).
 21. Gyles, C.L., Palchadhuri, S., and Maas, W.K.: Naturally occurring plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. *Science.* **198**,198-199 (1977).
 22. Takahashi, E., Sultan, Z., Shimada, S., Aung, W.W., Nyein, M.M., Oo, K.N., Nair, G.B., Takeda, Y., and Okamoto, K.: Studies on diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Myanmar, *Microbiol. Immunol.*, **52**, 2-8 (2008).
 23. Noguera-Obenza, M., and Cleary, T.G.: Diarrheogenic *Escherichia coli*, *Curr. Probl. Pediatr.* **29**, 208-216 (1999).
 24. Gamage, S.D., Strasser, J.E., Chalk, C.L., and Weiss, A.A.: Nonpathogenic *Escherichia coli* can contribute to the production of Shiga toxin, *Infect. Immun.*, **71**, 3107-3115 (2003).
 25. Gamage, S.D., Patton, A.K., Hanson, J.F., and Weiss, A.A.: Diversity and host range of Shiga toxin-encoding phage, *Infect. Immun.*, **72**, 7131-7139 (2004).
 26. McGannon, C.M., Fuller, C.A., and Weiss, A.A.: Different classes of antibiotics differentially influence shiga toxin production, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **54**, 3790-3798 (2010).
 27. Bruttin, A., Brüßow, H.: Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**, 2874-2878 (2005).
 28. Kutter, E., De Vos, D., Gvasalia, G., Alavidze, Z., Gogokhia, L., Kuhl, S., and Abedon, S.T.: Phage therapy in clinical practice: treatment of human infections, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **11**, 69-86 (2010).
 29. Strauch, E., Lurz, R., and Beutin, L.: Characterization of a Shiga toxin-encoding temperate bacteriophage of *Shigella sonnei*, *Infect. Immun.*, **69**, 7588-7595 (2001).