

한국에서 분리된 장내세균(*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* 군속)의 병원적 역할에 관한 연구(II)*

—*Shigella flexneri*의 병원성에 관한 연구—

국립보건원 미생물부·단국대학교 미생물학과¹

김기상·유천권·손건영·이복권·이명원·이연태¹·정태화

= Abstract =

Studies on the Enterobacteriaceae(*Salmonella*, *Shigella* and *E. coli*) Isolated in Korea

—The Pathogenic Characters of *Shigella flexneri* in vivo and in vitro Isolated from Korea, 1986—

Ki-Sang Kim, Cheon-Kwon Yoo, Kun-Young Sohn, Bok-Kwon Lee, Myung-Won Lee,
Yun-Tai Lee¹ and Tae-Hwoa Jung

Department of Microbiology, NIH and Department of Microbiology, Dan-Kook University¹

In order to determine the virulence properties of eleven strains of *Sh. flexneri* isolated from diarrheal patients the congo red test, the Serény test, the HeLa cell invasion test and electrophoresis of plasmids were carried out.

The results were summarized as follows.

1. Virulent strains were not determined by the result of Congo red absorption test.
2. Virulent strains showed positive reaction by the Serény test and the HeLa cells invasion, but avirulent strains revealed negative reaction at those tests.
3. The temperature condition of bacterial growth was a factor of virulent expression.
4. Virulent strains were mostly possessed of a 130.3 Mdal plasmid, but avirulent strains were not.

Key Words: *Shigella flexneri*, Virulence, Korea.

서 론

진강한 성인에게서도 질병을 일으킬 수 있는 장내질환의 원인균은 약 10여종으로 알려져 있다. 이 들중 *Shigella*는 이질증을 일으키는 원인균으로서 특히 1~5세 사이의 소아에서 심한 설사를 일으킨다. 이질균이 장관 상피세포를 침투할 때 상피세포와 점막하 조직에서 생존, 증식할 경우 상피세포가 파괴되어 심한 점막염증을 일으키며, 점막이 파괴되면 궤양에 이어 출혈을 하게 된다^{13, 16}.

이와 같은 질환을 일으키는 *Shigella*의 병원성은

* 본 연구는 1986년도 재단법인 목암생명공학연구원소에서 지급된 연구비로 기록된 것임.

생화학적 및 혈청학적인 특성만으로는 구분할 수 없기때문에 Serény¹⁶는 이질균을 guinea pig의 결막에 감염시켜 각결막염을 나타내는 균주를, Sargalla 및 Beesely¹⁷는 Congo red의 색소로 착색되는 균주를, Watkins¹⁸는 조직배양세포를 이용하여 세포의 세포질을 침투하는 균주를 각각 병원성균으로 인정하였다. Sansonetti 등¹⁵과 Okamura 등¹²은 이균주의 병원성은 140Mdal의 Plasmid 및 주염색체상의 arginine, lactose 및 galactose의 유전자 locus와 관련이 있다고 하였다.

우리나라에서 분리된 이질균중의 대다수가 *Sh. flexneri*이다¹⁻³. 본 실험은 1986년 전국보건 및 의료기관에서 일차 분리된 균을 본 연구원에서 최종 확인동정한 이질균속을 사용하여 국내에 유행하는

*Sh. flexneri*의 병원성을 *in vivo* 및 *in vitro* test를 통하여 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

생화학 및 혈청학적 방법으로 최종 확인동정한 이질균은 모두 188주로 표 1과 같다. 이중 175주의 *Sh. flexneri*에서 11주를 임의 선발하였다. 즉 *Sh. flexneri* 1b 642, 4-7, 801, 802, 2a 3-3, 162, 164, 189, 650, 783, 3a 462와 표준균주로 *Sh. flexneri* 2a ATCC 9473을 함께 사용하였다.

2. Congo red 흡착시험

Table 1. *Shigella* cultures isolated in Korea 1986

Genere and species	Number of isolates
<i>Sh. dysenteriae</i>	1 (0.53)
<i>Sh. flexneri</i>	175 (94.60)
<i>Sh. boydii</i>	5 (2.66)
<i>Sh. sonnei</i>	7 (3.72)
Total	188

Numbers in parenthesis represent percent of total.

균주를 tryptic soy agar(TSA) 상에 평판분리하여 잘 분리된 한개의 집락을 취하여 0.01%의 Congo red가 함유되어 있는 TSA 평판배지위에 식균하였다. 이를 37°C항온기에서 72시간 배양하여 나타난 집락의 색깔을 관찰하였다. 집락중 Congo red를 흡착하여 그림 1과 같이 적색으로 착색된 집락을 양성, 황색으로 나타나는 집락을 음성으로 정하였다¹⁾.

Fig. 1. CR⁺ and CR⁻ colonies of *Sh. flexneri* on Congo red agar. The upper is CR⁺ and the lower is CR⁻ colonies.

Fig. 2. Keratoconjunctivitis are shown in the eyes of guinea pigs after inoculation with *Sh. flexneri*. A) Negative control of avirulent strain B) Beginning of the infection of virulent strain after 1st day C) 2nd days and D) 6th days.

Fig. 3. Photomicrographs of HeLa cells invaded by *Sh. flexneri* grown at 37°C. **A)** ×200; negative control of avirulent strain **B)** ×400; beginning of the attachment and invasion of virulent strain **C)** ×400; enormous bacteria attached and **D)** ×400; spread into the cytoplasm of HeLa cells.

접종한다음 눈을 가볍게 문질러 주었다. 72시간 이내에 각결막염을 일으키는 균주를 양성, 그동안 반응이 없는 균주를 음성으로 판정하였다¹⁹⁾.

4. 세포배양

HeLa 세포는 본 연구소의 병독부에서 분양받아서 Earle's MEM(GIBCO) 용액에 5% fetal bovine serum(GIBCO), 100unit/ml의 penicillin G와 100 μg/ml의 streptomycin을 각각 첨가시켜서 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 실험에 사용하였다.

5. 세포침투시험

세포침투 시험은 Watkins¹⁸⁾가 보고한 방법을 참고하였다. HeLa세포를 trypsin으로 처리후 cover slide가 부착된 직경 60mm의 petri dish에 세포수가 3×10⁵ cells/ml이 되도록 MEM으로 조정하여 24시간 배양하였다.

단층이 형성된 세포에 항생제가 없는 신선한 MEM(이하 AF-MEM)으로 배지를 교환한다음 다시 24시간 배양하였으며, 이것을 세균으로 감염시키기 직전 다시 새로운 AF-MEM으로 2회 세척하였

Fig. 4. HeLa cell invasion by *Sh. flexneri*. Virulent strain invade in the cytoplasm of HeLa cell (×1,000) and multiply by binary fission.

3. Serény 시험

Tryptic soy broth(TSB)에 균을 접종하여 37°C에서 110rpm으로 18시간 진탕배양하였다. 이를 3,000 rpm으로 15분간 원침시켜 얻은 침전물을 PBS(pH 7.2)로 희석하여 생균수가 6×10⁹ cells/ml이 되도록 하였다. 준비된 균액을 guinea pig한쪽 눈에 25μl씩

Table 2. Summary of virulence properties of *Shigella flexneri*

Strain	Serotype	ACR*	Serény test	Tissue culture invasion
3-3	2a	+	+	+
162	2a	+	+	+
164	2a	+	+	+
189	2a	+	+	+
462	3a	+	+	+
642	1b	+	+	+
650	2a	+	+	+
783	2a	-	+	+
4-7	1b	+	-	-
801	1b	+	-	-
802	1b	+	-	-
9473	2a	-	-	-

*ACR; indicates absorption of Congo red.

Fig. 5. The photomicrograph of monolayer He-La cells inoculated with bacteria grown at 37°C (a) and 30°C (b).

다. 단층세포에 세균을 감염시키기 위하여 penassay broth에서 37°C, 110rpm으로 18~20시간 진탕배양하여 얻은 균액을 새로운 penassay broth에서 4시간 재배양하여 3,000rpm으로 20분간 원침시켜 얻은 균을 동량의 PBS(pH 7.2)로 재원침시킨 다음 AF-MEM으로 2×10^8 cells/ml이 되게 희석하여 세포

Fig. 6. Agarose gel electrophoretic profiles of plasmid DNA obtained from virulent and avirulent *Sh. flexneri*. Lane; A, strain 642, serotype 1b; B, strain 3-3, serotype 2a; C, strain 162, serotype 2a; D, strain 164, serotype 2a; E, strain 189, serotype 2a; F, strain 650, serotype 2a; G, strain 783, serotype 2a; H, strain 462, serotype 3a; I, reference plasmid from *E. coli* KE327 of 3.5, 3.8, 4.9, 46.2 and 79.8Mdal; J, reference plasmid from *E. coli* V517; K, *E. coli* KE327; L, strain 801, serotype 1b; M, strain 802, serotype 1b; N, strain 4-7, serotype 1b; O, strain 9473, serotype 2a.

에 감염시켰다. 이를 즉시 3,000rpm으로 10분간 원침시켜 2시간 배양 후 20 μ g/ml의 gentamicin이 함유되어 있는 MEM으로 갈아준 다음 3시간 동안 배양하였다. 배양된 세포를 Earle's balanced salt solution(GIBCO)으로 3회 세척하고, 이어 생리식염수로 3회 세척한 후 특급의 methanol과 acetic acid를 3:1로 혼합하여 5분간 cover slide위에 부착되어 있는 세포층을 탈수시킨 다음 Giemsa solution으로 1시간 염색시켰다. 이를 95% ethanol

Table 3. Summary of virulence properties of *Shigella flexneri* grown at 30°C and 37°C

Strain	Serotype	ACR		Sereny test		HeLa cell invasion	
		30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
642	1b	-	+	-	+	-	+
3-3	2a	+	+	-	+	-	+
462	3a	+	+	+	+	-	+

로 탈색시켜 현미경으로 관찰하여 세균이 세포에 침투한 균주를 양성, 침투하지 못한 균주를 음성으로 판정하였다.

6. 온도의 변화에 따른 병원성 소실시험

Sh. flexneri 2a 3-3, 3a 462, 1b 462, 2a 9473을 30°C에서 배양하여 Congo red 흡착시험, Sereny 시험, 세포침투 시험을 각각 수행하였다¹¹⁾.

7. Plasmid 분리 및 전기영동

Kado 및 Liu⁹⁾의 방법으로 분리하여 0.7% agarose slab gel(140×115×5mm)을 사용하여 Tris-borate buffer(89mM Tris base, 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH 8.0)에서 100V, 3시간 전기영동하였다. DNA band는 0.5µg/ml의 ethidium bromide로 염색하여 중과자의선하에서 관찰하였다.

성 적

시험균주중 *Sh. flexneri* 3-3, 162, 164, 189, 462, 642, 650, 4-7, 801, 802 등 10주는 Congo red 흡착시험에서 양성반응을 *Sh. flexneri* 783, 9473은 음성 반응을 나타내었다. Sereny 시험에서 *Sh. flexneri* 3-3, 162, 164, 189, 462, 642, 650, 783 등의 8주는 그림 2에서와 같이 균집중후 24시간후 눈주위에 염증이 나타나기 시작하여 결막염을 일으키며 점액농이 생겨 눈주위로 흘러나왔다. 염증이 발진됨에 따라 백회색의 농으로 눈꺼풀이 달라붙고, 그러나 각막에도 염증을 형성하며, 각막이 점점 불분명한 색채를 띄며 두꺼워졌다. 그러나 *Sh. flexneri* 4-7, 801, 802, 9473 등 4주는 3일후에도 아무런 변화가 없었다(그림 2).

Sereny 시험에서 음성반응을 나타낸 *Sh. flexneri* 4-7, 801, 802, 9473 등 4주는 HeLa 세포에 감염시키면 세포표면에 부착하였던 세균들이 항생제처리후 깨끗이 떨어져 나가지만(그림 3, 4), 양성반응을 나타낸 *Sh. flexneri* 3-3, 162, 164, 189, 462, 642, 650, 782, 783 등 8주는 그림 3-B, C, D와 같이 처음에는 세포표면에 일정방향으로 달라붙기 시작하여 시간이 경과함에 따라서 그림에서와

같이 세포내로 침투해 들어간다. 그후 그림 4와 같이 세균은 2분열로 증식하여 점점 세균수가 많아지면서 세포질내 전체로 확산되어 나간다. 중국에는 핵부위까지 세균이 침투하여 세포를 죽이게 된다(표 2).

균배양온도에 따른 병원성 소실시험에서 *Sh. flexneri* 642, 3-3, 462는 37°C에서 모두 병원성을 나타낸 균주로 30°C배양조건에서 Congo red 흡착시험을 한결과 642만이 음성으로 나타났다. Sereny 시험에서는 642, 3-3이 음성, HeLa 세포침투시험에서는 그림 5와 같이 3균주 모두 음성반응이어서 온도변화에 따라 병원성이 비병원성으로 바뀌었다(표 3).

Sh. flexneri 1b 642, 801, 802, 4-7, 3-3, 162, 164, 189, 462, 650, 783, 9473 등 12주의 plasmid를 전기영동한 결과 그림 6과 같다. Lane A-H의 8주는 병원성, Lane L-O의 4주는 비병원성 균주이었다. *Sh. flexneri* 1b 642를 제외하고 병원성을 가진 7주는 모두 130.3Mdal의 Plasmid를 갖고 있었으며, 혈청형 2a는 표준균주인 *Sh. flexneri* ATCC 9473을 제외하고 국내에서 분리된 6주의 병원성균주가 모두 3.0, 3.2, 59.2, 130.3Mdal의 같은 패턴의 Plasmid를 갖고 있었다. 비병원성 균주인 *Sh. flexneri* 801은 분자량이 큰 plasmid로 179.4Mdal, *Sh. flexneri* 802는 145.8Mdal, *Sh. flexneri* 9473은 145.8Mdal을 갖고 있었으나, *Sh. flexneri* 4-7은 큰 분자량의 plasmid가 없었다.

고 찰

설사질환의 주원인균인 이질균은 자연계에서의 환경전염원과 동물숙주에 대하여는 아직 잘 알려져 있지 않지만 일차적으로 위생시설이 빈약할 때 대인접촉, 오염된 음식이나 식수를 통하여 감염되며 이차적으로는 감염된 가족사이에서의 이환율이 30~50%에 달한다. 현재도 중앙아프리카나 인도대륙의 많은 지역에서 *Sh. dysenteriae*가 계속 만연되고 있다¹⁰⁾.

우리나라에서는 방역당국의 관리와 국민교육수준 향상 및 주거환경의 개선과 같은 노력에 의해서 과

거보다 전염병 발생율이 현저하게 감소하였으나, 아직도 도처에서 대, 소규모의 전염병이 유행하는 실정이다. 이와 같이 분리된 유행이질균종 85% 이상을 *Sh. flexneri*가 차지하고 있다¹⁻³⁾.

이들의 병원성을 알아보는 방법으로는 guinea pig의 각결막을 이용하는 실험이 행하여졌다¹⁴⁾. 그러나 Manolov¹⁰⁾는 고양이, 개, 닭, 흰쥐, rhesus monkey를 이용한 실험에서는 좋은 결과를 얻지 못하였으나 guinea pig과 토끼의 결막의 접종법은 민감하였으며, 그중 Albino guinea pig이 가장 적합하다고 하였다. 본 실험에서는 Hartley guinea pig을 사용하여 설사환자에서 분리된 총 11주중 8주에서 양성반응이 나타났다. Mackel등⁵⁾은 이질균의 농도를 3×10^8 cells/ml로 guinea pig의 결막에 접종시킨 바 12시간내에 초기증상이 나타난다고 하였으나, 본 실험에서는 6×10^8 cells/ml를 접종하여 양성반응을 보인 8주중 *Sh. flexneri* 3-3, 642등 2균주만이 24시간내에 초기증상이 확인되었고, 나머지 6주는 48시간내에 증상을 나타내어 균간의 차이를 보였다. Okamura 등¹²⁾도 10^8 cells/ml를 접종한 것으로 보아 guinea pig의 증에 따라 차이가 있는 것으로 생각된다.

Jackson 및 Burrows⁴⁾와 Surgalla 등¹⁸⁾에 의한 Congo red 흡착시험에서는 병원성 균주는 배지로부터 hemin을 흡수하여 착색되면서 배지속의 Congo red도 흡수하여 집락이 붉게 착색된다고 하였다. Payne 과 Finkelstein¹⁴⁾도 이와 비슷한 돌연변이 유도체를 이용한 실험에서 Congo red양성균인 집락이 착색되는데 요구되는 시간은 균중에 따라서 다르다고 했다. 즉 *Shigella*가 24시간 *E. coli*, *V. cholerae*, *N. meningitidis*등 48시간이 소요된다고 하였으나, 본 실험에서는 *Sh. flexneri* 2a 3-3은 72시간 계속 약한 양성반응을 나타내었으며, *Sh. flexneri* 2a 783은 72시간 계속 음성반응을 나타내었으나, 동물 및 세포침투시험에서 병원성으로 확인되었다. 또한 *Sh. flexneri* 2a 164는 24시간이 지난 후에도 음성이었으나, 48시간내에 강한 양성반응을 나타냈으며, *Sh. flexneri* 1b 642는 24시간 후에도 음성이었으나 48시간내에 아주 약한 양성반응을 나타내었고, *Sh. flexneri* 1b 802는 12시간 계속 강한 양성반응을 나타내었다. 그러나 동물 및 세포침투 시험에서 *Sh. flexneri* 164, 642는 병원성을 *Sh. flexneri* 802는 비병원성으로 각각 나타나 균주의 혈청형, Congo red 흡착정도 및 흡착시간과 병원성과는 상관관계가 없음을 알 수 있었다. 본 실험결과로는 Congo red 흡착여부로 병원성 균주를 구분하기에는 무리가 있는 것으로 여겨지나, 앞선 연구

들로 보아 더 많은 균주의 종 및 속에 대하여 검토되어야 하겠다고 생각된다.

이와 같은 병원성 이질균의 제대세포주에 대한 세포침투능력이 Watkin¹⁶⁾에 의하여 수행된 이래로 많은 실험이 행하여져서 근래에 *Sh. flexneri*의 병원성에는 140Mdal의 plasmid가 관여하며, 이 plasmid가 없는 균주는 guinea pig의 결막에 염증을 일으키지 못하고, HeLa 세포에도 침투하지 못하는 것으로 알려졌다. 이와 같은 현상은 plasmid가 상피세포를 침투하는데 필요한 기능을 조절하거나 결정하기 때문인 것으로 알려져 있고¹⁷⁾ 주염색체상의 lactose, galactose, arginine locas등도 병원성 발취에 관여한다는¹²⁾ 연구결과가 보고된 바 있다. Laporta 등⁷⁾은 병원성 *E. coli*가 세포에 부착할 때 일정한 부위로 달라붙는 형과 전체부위에 달라붙는 형이 있음을 보고하였다.

본 실험에서는 HeLa 세포에 세균을 감염시킨 즉 시 3,000rpm으로 10분간 원심분리시켜 세균이 세포표면에 잘 부착되도록 하였다. 또한 감염후 세포질내에 침투하여 들어간 세균의 증식은 저해하지 않고, 아직 침투하지 못한 세포간에 잔류하여 있는 세균만 죽일 목적으로 gentamicin을 사용하였다. 항생제를 사용할 때 정등²⁾의 보고와 같이 항생제 처리후 3시간후면 세균이 완전히 사멸됨으로 gentamicin 처리를 한후 3시간 후에 세포를 세척하였다. 세포의 표면에 세균이 부착할 때 그림 4와 같이 일정한 방향으로 부착된 다음 침투하여 증식하는 것을 관찰할 수 있어서 Laporta 등⁷⁾의 보고와 같은 결과를 얻었다. 또한 균배양온도를 37°C에서 30°C로 변화시켰을 때 병원성인 *Sh. flexneri* 642, 3-3, 462주가 모두 Congo red 흡착시험 결과 별다른 차이가 없었음을 알 수 있었다. Serény 시험에서는 30°C에서 *Sh. flexneri* 462만이 24시간 이후에 초기변화를 나타내었으며, HeLa 세포침투시험에서는 3균주 모두 세포침투를 하지 못하여서 Maurelli 등¹¹⁾의 보고와 비슷한 결과를 얻었다.

그리고 *in vivo* 및 *in vitro*의 실험결과 12주의 plasmid패턴중 *Sh. flexneri* 1b 642를 제외하고는 병원성균주 모두가 130.3Mdal의 plasmid를 갖고 있었다. Kopecko 등⁶⁾과 Sansonetti 등¹⁵⁾은 140.1Mdal의 plasmid를 갖고 있다고 하였다. 이들의 결과와 비교하여 볼 때 10Mdal 정도의 차이가 있으나, 높은 분자량을 가진 plasmid일수록 약간의 Mobility의 차이가 분자량측정에 큰 영향을 미치는 것을^{6,15)} 감안할 경우 비슷한 분자량을 갖고 있다고 볼 수 있다.

본 실험에 사용한 분리균주 11주중 Congo red 흡착시험 양성주는 10주였으며, 이중 Sereny시험과 He-

La세포침투시험 양성주는 8주로 *Sh. flexneri* 3-3, 162, 164, 189, 462, 642, 650, 783이었다. 온도변화에 따른 병원성 소실시험은 Congo red 흡착시험에서 *Sh. flexneri* 642만이, Serény 시험에서는 *Sh. flexneri* 644와 3-3이, HeLa세포침투 시험은 *Sh. flexneri* 642, 3-3, 462 모두 음성이었다. 전기영동에 의하여 확인된 병원성 균주는 *Sh. flexneri* 3-3, 162, 164, 189, 650, 783, 462으로 130.3Mdal의 plasmid를 공통으로 소유하고 있었음을 알 수 있었다.

결 론

환자에서 분리된 *Sh. flexneri*의 병원성 여부를 검토하기 위하여 Congo red 흡착시험, Serény 시험, 세포침투시험, 온도변화에 따른 병원성 소실시험, plasmid의 전기영동을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Congo red 흡착시험 결과만으로는 *Sh. flexneri*의 병원성 여부를 결정하기에는 부적합했다.

2. 병원성 *Sh. flexneri*은 Serény 시험 및 HeLa 세포침투시험에서 양성반응을, 비병원성 세균은 음성반응을 각각 나타내었다.

3. 균배양온도 조건이 30°C와 37°C에서 배양한 결과 세균의 병원성 발현에 있어 차이가 있었음을 알 수 있었다.

4. 대부분의 병원성균주는 130.3Mdal의 plasmid가 있었으나 비병원성균주는 없었다.

참 고 문 헌

- 1) 이명원, 윤승기, 이복권, 최재두, 김병훈, 정태화: 한국에서 분리된 *Shigella* 균속에 관한 세균학적 역학조사연구. 국립보건원보, **19**: 69-78, 1982.
- 2) 정태화, 이명원, 이복권, 김기상, 이훈구, 이연태, 홍성노: 한국에서 분리된 *Salmonella*, *Shigella* 균속의 R-plasmid 내성 전달에 관한 연구. (1) *Shigella* 균속의 R-plasmid 내성에 관해서. 국립보건원보, **21**: 79-96, 1984.
- 3) 정태화, 이연태, 이명원, 이복권, 김기상: 한국에서 분리된 장내세균의 병원적 역할에 관한 연구. 대한미생물학회지, **21**(1): 73-96, 1986.
- 4) Jackson S and Burrows TW: The pigmentation of *Pasteurella pestis* on a defined medium containing haemin, *Br. J. Exp. Pathol.*, **37**: 570-576, 1956.
- 5) Kado CI and Liu ST: Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, *J. Bacteriol.*, **145**: 1365-1373, 1981.
- 6) Kopecko DJ, Holcombe J and Formal SB: Molecular characterization of plasmids from virulent and spontaneously occurring avirulent colonial variants of *Shigella flexneri*, *Infect. Immun.*, **24**(2): 580-582, 1979.
- 7) Laporta MZ, Silva MLM, Scaletsky ICA and Trabulsi LR: Plasmids coding for drug resistance and localized adherence to HeLa cell in enteropathogenic *Escherichia coli* 055:H⁻ and 055:H₆, *Infect. Immun.*, **51**(2): 715-717, 1986.
- 8) Mackel DC, Langley LF and Venice LA: The use of the guinea-pig conjunctivae as an experimental model for the study of virulence of *Shigella* organism, *Am. J. Hyg.*, **73**: 219-223, 1961.
- 9) Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DJ and MaCowen SM: A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: Convenient source of size reference plasmid molecules, *Plasmid* **1**: 417-420, 1978.
- 10) Manolov DG: A study of some questions of pathogenicity and immunity in dysentery using experimental models of *Shigella* keratoconjunctivitis in guinea pigs, *J. Hyg., Epidem., Microbiol. and Immunol.*, **1**: 322-328, 1957.
- 11) Maurelli AT, Blackmon B and Curtiss III R: Temperature-dependent expression of virulence genes in *Shigella*, *Infect. Immun.*, **43**(1): 195-201, 1984.
- 12) Okamura AT, Nagai T, Nakaya R, Kondo S, Murakami M and Hisatsune K: HeLa cell invasiveness and O antigen of *Shigella flexneri* as separate and prerequisite attribute of virulence to evoke keratoconjunctivitis in guinea pigs, *Infect. Immun.*, **39**(2): 505-513, 1983.
- 13) Paul DH, ed.: *Infectious Diseases* 3rd, 1: 649-654, Harper and Row. Publisher, 1983.
- 14) Payne SM and Finkelstein RA: Detection and differentiation of iron responsive avirulent mutants on Congo-red agar, *Infect. Immun.*, **18**: 94-98, 1977.
- 15) Sansonetti PJ, Kopeck DJ and Formal SB: Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*, *Infect. Immun.*, **35**: 852-

860, 1982.

- 16) Serény B: Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis, *Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, **2**:293-296, 1955.
- 17) Surgalla MJ and Beesley ED: Congo-red agar plating medium for detecting pigmentation in *Pasteurella pestis*, *Appl. Microbiol.* **18** : 834-

1969.

- 18) Watkins HMS: Some attributes of virulence in *Shigella*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **88** :1167-1186, 1960.
- 19) WHO: Development of vaccines against shigellosis, 1-12, 1986.