

Multiplex PCR을 이용한 장출혈성 대장균 O157:H7의 검출

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과

엄 용 빈 · 김 종 배[†]

국문초록: 최근 전세계적으로 문제가 되고 있는 장출혈성 대장균 O157:H7을 분리배양 및 동정 없이 바로 시료를 분석하여 신속하게 검출하기 위한 다중 중합효소 연쇄반응 (multiplex PCR) 기법을 확립하고, 이 기법을 이용하여 국내 분리 균주 중에서 SLT-I·II, *eaeA*, 60-MDa plasmid gene을 가지고 있는 대장균을 유전자 수준에서 검출하고자 하였다.

장출혈성 대장균 O157:H7이 가진 SLT-I·II, *eaeA*, 60-MDa plasmid 유전자들에 대한 특이 oligonucleotide primers (MK1'-MK2', NAE19-NAE20, MFS1F-MFS1R)를 함께 동시에 반응 완충액에 넣어 다중 중합효소 연쇄반응을 시행한 결과 317bp (*eaeA*), 228bp (SLT-I·II), 167bp (60-MDa plasmid)의 PCR 증폭 DNA생성물을 표준균주 (*E. coli* ATCC 35150)에서는 확인할 수 있었지만, 기타 다른 병원성 장내세균 13균주에서는 band를 확인할 수 없었다.

한편 다중 중합효소 연쇄반응의 template DNA 추출 방법에 따른 PCR 결과를 비교하였다. 각각의 DNA 추출 방법 중 boiling lysis 방법이 신속하고 간편하여 장출혈성 대장균 O157:H7에 의한 식중독의 임상진단에 다중 중합효소 연쇄반응 (multiplex PCR) 적용하는 데에는 boiling lysis법을 이용하는 것이 가장 적합한 방법으로 확인되었다.

서 론

세균에 의한 설사유발 원인균으로는 *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp., *Yersinia* spp. 및 pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*) 등이 잘 알려져 있다. 이들 중 대장균은 사람과 동물의 장내에 정상세균총으로 존재하면서 장관계 질환 또는 비장관계통 질환을 일으키며, 특히 설사 유발 대장균은 O:H serogroup, 독소와 부착인자의 생산능력 및 감염기전에 따라 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), 및 enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC)의 5가지 유형으로 분류된다⁴⁶⁾. 대장균 O157:H7은 출혈성 장염

(hemorrhagic colitis)을 일으키는 세균으로 1982년 미국의 Oregon주와 Michigan주에서 햄버거를 매개체로 하여 발생한 집단 식중독을 일으킨 사건으로부터 알려지게 되었으며⁴¹⁾, 급성 신부전 (acute renal failure), 미 맥관성 용혈성 빈혈 (microangiopathic hemolytic anemia), 혈전성 혈소판감소성 자반증 (thrombotic thrombocytopenic purpura) 등을 주증상으로 하는 용혈성 뇨독 증후군 (hemolytic uremic syndrome, HUS)의 원인체로서 유아에서의 감염증이 특히 문제시되고 있다²⁷⁾. 이후 HUS의 원인체는 EHEC군에 속하는 Shiga-like toxin (SLT) 생산 대장균임이 밝혀져 많은 관심을 갖게 되었다³⁷⁾.

1977년 Konowalchuk 등³²⁾은 *Shigella dysenteriae* type I에 의해 생산되는 Shiga toxin의 항혈청에 중화되는 대장균의 독소가 Vero cell에 대하여 cytopathic effects를 나타내는 것을 발견하고, 이를 Shiga-like toxin I (SLT-I) 또는 Verotoxin (VT)이라 명명하였다. SLT-I의 발견 이래로 SLT-I과 유사하나 Shiga toxin의 항혈청에 중화되지 않는 새로운 독소들이 밝혀지게 되었고, Strockbine

* 논문접수 : 1998년 5월 1일,
수정재접수 : 1998년 6월 11일

[†] 별책요청저자: (우) 220-710 강원도 원주시 흥업면 매향리 234, Tel: (0371)760-2423 / Fax: 0371-760-2195,
E-mail : micro@dragon.yonsei.ac.kr

등⁴⁷⁾과 Marque 등³⁶⁾은 이 독소들을 Vero cell과 HeLa cell에 대한 세포독성의 차이에 따라 크게 SLT-II (VT2)와 SLT-IIv (VTe)로 구분하여 명명하였다. SLT-II (VT2)와 SLT-IIv (VTe)의 항혈청은 서로의 항혈청에 교차반응을 나타내기 때문에 생물학적 활성으로 이들을 구분하고 있다. 1987년 Jackson 등²⁴⁾이 처음으로 VT2 유전자를 cloning하여 그 염기서열을 보고하였고, Gyles 등²¹⁾과 Weinstein 등⁵¹⁾이 각각 부종 (edema)에 이환된 돼지 유래의 대장균으로부터 VTe 유전자를 cloning하였으며, 현재 VT2 family에 속하고, 상호간 높은 상동성을 보이는 변이주 (variant)들이 세계 각국에서 다양한 검체로부터 발견되고 있다^{16,39,44,45)}. 이외에도 장출혈성 대장균 O157:H7은 60-MDa plasmid를 가지고 있어 세포에 흡착하는 것을 돕는 fimbriae (adhesins)와 hemolysin을 생산한다고 Karch 등²⁸⁾이 보고하였으며, 1990년 Jerse 등²⁵⁾은 fluorescent actin staining에 의해 장세포의 microvilli에 부착되어 소멸 (attachment and effacement)하는데 필요한 유전자인 *eaeA* gene을 확인하였다.

1987년 Levine 등³³⁾은 EHEC plasmid의 3.4-kilobase segment로부터 준비된 DNA probe을 이용한 hybridization 방법을 실시하여 107주의 O157:H7중 106주 (99%)를 검출하였으며, 44주 O26:H11중 34주 (77%)를 검출함으로써 혈청형 O26:H11도 EHEC serotype에 속한다고 밝혔다. 1989년 Karch 등²⁹⁾은 Shiga-like toxin 유전자를 증폭시키기 위하여 single primer pair를 design하여 PCR을 실시하였고, 1989년 Frankel¹⁷⁾ 등이 *Shigella*와 장독소 생성 *E. coli*의 이열성 (heat labile)과 내열성 (heat stable) toxin을 위한 3쌍의 primer를 사용하는 multiplex PCR을 처음으로 시행하여 70명의 설사 어린이로부터 21건의 양성결과를 찾아내었다. 1991년 Toth 등⁴⁸⁾은 *E. coli* 혈청형 O157:H7의 60-MDa plasmid product를 검출하기 위한 ELISA를 시행하여 이 방법이 민감하고 특이성이 있다는 것을 확인하였다. 1993년 Gannon 등²⁰⁾은 PCR 방법을 이용하여 SLT-producing *E. coli*의 *eaeA* 유전자를 검출하고 특성화하였다.

한편 국내에서는 1995년 김 등²⁾이 대장균에서 verotoxin을 정제하여 VTE receptor 특이성을 확인하였으며, 차 등^{5,6)}은 소의 분변에서 분리한 *E. coli* O157:H7으로부터 파아지를 용원화하여 파아지의 형태, 온도에 대한 감수성, pH에 대한 안정성, UV irradiation 및 흡착률 등 파아지의 물리

적 특성을 규명하였고, Jackson 등²⁴⁾이 보고한 VT2 유전자와 매우 유사한 유전자를 cloning하여 그 특성을 보고하였다. 1996년 김 등³⁾은 VT2의 B subunit에 대한 단클론성 항체를 생산하여 VTs의 검출 및 진단을 보다 신속하고 정확하게 수행할 수 있는 receptor binding ELISA법을 실시한 바 있으며, 진 등⁴⁾은 verotoxin 생산 대장균 감염에 대한 역학 자료를 위해 설사환자의 분변재료로부터 verotoxin 생산 대장균의 분포를 조사하고 분리주의 혈청학적 분포, 독소의 형태 및 생물학적인 독성 정도를 조사하였다.

근년에 EHEC군에 속하는 Shiga-like toxin (SLT) 생산 대장균에 의한 환자가 속출하고, 이들 세균의 항원성 및 생리학적 성질 등이 밝혀짐에 따라 많은 관심을 갖게 되었다. 미국, 영국, 캐나다 등 유럽 지역과 일본, 남아프리카 등 전세계적인 문제가 되고 있으며, 특히 1994년 감염병 발생정보지¹⁾에 의하면 국내에서도 최초로 식중독 환자로 부터 장출혈성 대장균 O157이 분리된 바 있어 이들 균에 대한 국내의 분포조사와 신속하고 정확한 진단 방법 등의 연구가 필요하고, verotoxin의 높은 독성과 병원성에 관심을 갖고 지속적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 특히, 독소원성 대장균을 검출하기 위한 방법으로 PCR을 이용한 연구가 진행되어 식품, 물 또는 분변으로부터 직접 독소원성 대장균을 검출하려는 시도가 진행되고 있으며, 이러한 방법들은 모두 원인균의 분리·동정 없이 바로 시료를 분석하여 결과를 얻을 수 있기 때문에 빠른 진단과 아울러 조기 치료 및 예방대책 수립을 가능케 할 수 있을 것이다.

현재까지 장출혈성 대장균 O157:H7에 의한 식중독의 진단은 Vero cell과 HeLa cell에 대한 세포독성을 나타내거나 특이 항혈청에 의해 중화되는 독소 (cytotoxin)를 검출하는 방법³⁴⁾, oligonucleotide probe을 사용하는 hybridization방법^{9,10)}, SLT-I·II을 검출하는 ELISA 등의 면역학적 검출방법¹²⁾ 등이 있었으며, 분변으로부터 sorbitol-MacConkey 배지에서 sorbitol 비발효세균을 찾거나 혈청학적인 방법으로 항혈청에 대한 응집을 확인함으로써 가능하였다. 그러나 모든 분변검체를 sorbitol-MacConkey agar에 접종하여 확인하는 방법은 많은 양의 검체를 screening하기에는 어려움이 따르고, 세균의 분리배양 및 동정에 필요한 시간 또한 많이 소요되는 단점 때문에 비교

적 짧은 시간 내에 장출혈성 대장균 O157:H7에 의한 식중독을 신속하고 정확하게 진단할 필요가 제기되고 있다.

국내에서는 아직까지 장출혈성 대장균 O157:H7의 여러 종류의 병원성 인자인 SLT-I·II, *eaeA*, 60-MDa plasmid를 유전자 수준에서 동시에 신속하게 검출하는 분자 생물학적 기법을 이용한 연구가 미비한 상태이다. 따라서 본 실험은 장출혈성 대장균 O157:H7을 신속하게 검출하기 위한 multiplex PCR 기법을 확립하고, 이 기법을 이용하여 국내 분리 균주 중에서 SLT-I·II, *eaeA*, 60-MDa plasmid gene을 가지고 있는 장출혈성 대장균 O157:H7을 검출하고자 하였다.

재료 및 방법

1. pBH20 plasmid DNA의 추출, 정제 및 제한 효소 *HinI* 처리

Plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis 방법⁷⁾에 준하여 실시하였으며, 분리된 plasmid는 CsCl₄를 이용한 density gradient equilibrium centrifugation (vertical VTi65 rotor; Beckman, Palo Alto, CA, USA)을 실시한 다음 closed circular plasmid DNA band 층만을 회수하여 ethidium bromide를 제거하고 투석한 후 RNase (1µg/ml)가 들어있는 TE buffer 50µl로 부유하였다. 이렇게 얻은 pBH20 plasmid DNA용액을 제한효소 *HinI* 처리하여 37°C에서 2시간 digest시킨 후 본 실험에서 molecular weight marker로 이용하였다.

2. 장출혈성 대장균 O157:H7 target DNA의 추출, 정제

Template DNA는 전통적인 alkaline lysis⁷⁾, boiling lysis⁴²⁾방법과 DNA isolation kit (QIAamp[®]

Blood Kit and QIAamp Tissue Kit, QIAGEN Inc., Chatsworth CA, USA), DNAzol[™] Reagent (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., Grand Island, USA)를 사용하여 추출, 정제하였다. 즉, alkaline lysis 방법은 proteinase K (100mg/ml)와 1% SDS (sodium dodecyl sulfate)으로 bacterial cell를 lysis시키고, template DNA을 phenol/chloroform으로 추출한 다음 ethanol로 침전시켜, 50µg/ml의 DNase free RNase로 혼입된 RNA를 digest시킨 후 DNA의 농도를 A_{260/280}에서 흡광도를 측정하였다. Boiling lysis 방법은 bacterial colony를 집균한 후 증류수에 충분히 부유시킨 것을 100°C, 30분간 boiling하여 12,000 rpm, 10분간 원심한 후 상층액을 사용하였다. DNA isolation kit를 사용하는 경우, kit 제조업자의 protocol에 따라 DNA isolation 과정을 수행하였다.

3. Oligonucleotide primers의 제작

60-MDa plasmid 유전자 특이 primer는 Fratamico 등¹⁸⁾의 MFS1F (5'-ACGATGTGGTTTATTCTGGA-3')와 MFS1R (5'-CTTCACGTCACCATACATAT-3')를 사용하였다. SLT-I·II 유전자 특이 primer MK1' (5'-TTTACGATAGACTTTTCGAC-3')과 MK2' (5'-CACATATAAATTATTTTGCTC-3'), *eaeA* 유전자 특이 primer NAE19 (5'-GCCTATTATGCTGATGCTATG-3')와 NAE20 (5'-AGAAATAATTATGCCCGAC-3')은 Oligo software (National Biosciences, Plymouth, Minn.)를 이용하여 design하였다 (Table 1).

4. 중합효소 연쇄반응 (Polymerase chain reaction)

중합효소 연쇄반응은 50µl의 원층액을 1.25U Taq polymerase (POSCO-CHEM R&D Center,

Table 1. Oligonucleotide primers used in multiplex PCR for the detection of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7

Primers	Sequence (5' to 3')	Target (s)	Reference
MK1'	TTTACGATAGACTTTTCGAC	SLT-I and	37 (modified)
MK2'	CACATATAAATTATTTTGCTC	SLT-II	37 (modified)
NAE19	GCCTATTATGCTGATGCTATG	<i>eaeA</i>	This study
NAE20	AGAAATAATTATGCCCGAC		This study
MFS1F	ACGATGTGGTTTATTCTGGA	60-MDa	17
MFS1R	CTTCACGTCACCATACATAT	plasmid	17

KyoungKi-Do, Korea), 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 50mM KCl, 0.1% Triton X-100, 1.5mM MgCl₂, 최종농도가 각각 200μM이 되도록 희석한 dATP, dCTP, dTTP와 dGTP, 50pmol (SLT-I · II, 60-MDa plasmid gene)과 100pmol (*eeA* gene)의 forward 및 reverse primer, 그리고 대상으로 하는 표적 DNA가 100ng이 되도록 혼합 조정 후 thermal cycler (MJ Research, Inc., Watertown, Mass, USA)에서 표적 DNA의 증폭을 시도하였다.

이때 사용한 중합효소 연쇄반응의 시간과 온도 조건은 다음과 같다. 94℃에서 3분간 최초 denaturation 이후, MK 1'과 MK2' primers를 이용한 경우 94℃에서 1분간 denaturation, 48℃에서 2분간 annealing, NAE19와 NAE20 primers를 이용한 경우 94℃에서 1분간 denaturation, 45℃에서 2분간 annealing, MFS1F와 MFS1R primers를 사용하는 중합효소 연쇄반응의 경우 94℃에서 1분간 denaturation, 48℃에서 2분간 annealing, 그리고 72℃에서 1분간 extension하는 과정을 35회 반복하였으며, 마지막 extension은 72℃에서 15분간을 지속하여 유지함으로써 완전한 extension이 이루어지도록 하였다.

Oligonucleotide primers (MK1', MK2', NAE19, NAE20, MFS1F, MFS1R)를 함께 동시에 반응 완충액에 넣어 시행하는 다중 중합효소 연쇄반응의 반응조건으로는 94℃에서 5분간 최초 denaturation 이후, 94℃에서 1분간 denaturation, 41℃에서 3분간 annealing, 그리고 72℃에서 4분간 extension하는 과정을 35회 반복하였으며, 마지막 extension은 72℃에서 15분간을 지속하여 유지함으로써 완전한 extension이 이루어지도록 하였다. 중합효소 연쇄반응이 끝난 후 생성된 DNA product는 1.5% agarose gel를 이용하여 전기영동한 다음 ethidium bromide (0.5μg/ml)용액으로 염색한 후 ultraviolet transilluminator로 DNA band를 비교 관찰하였다.

5. 임상 환자 검체의 sorbitol 분해능 검사 및 혈청학적 동정

설사혈변 증상으로 내원한 환자를 대상으로 하여 배변 직후의 신선한 설사분변을 멸균면봉으로 채취하여 무균생리식염수가 첨가된 수송용기 (Culturette; Becton Dickinson Co.)에 넣어 저온을 유지하면서 실험실로 운반하여 공시하였다. Farmer 등¹⁵⁾의 방법에 따라 1% D-sorbitol을 첨가

한 MacConkey agar base (DIFCO Laboratories, Detroit MI 48232-7058, USA) 평판배지에 설사혈변을 직접 도말하여 37℃에서 18~24시간 배양한 후 sorbitol을 분해하지 않는 집락을 선별하였다. 그 sorbitol 비발효 집락을 MacConkey agar plate에 도말하여 유당을 분해하는 집락을 *E. coli* O157로 추정하고 이들 균주를 Edward와 Ewing¹³⁾의 방법에 따라 생화학적 성상검사를 실시한 후 *E. coli*로 동정된 세균을 혈청학적, multiplex PCR 방법에 사용하였다. 혈청학적 동정을 위하여 토끼에 장출혈성 대장균 O157:H7 표준균주 (ATCC 35150, ATCC 43894)의 사균체를 1×10^9 cells/ml로 조정하여 0.5ml, 1.0ml, 2.0ml, 2.0ml, 2.0ml을 각각 7일간격으로 정맥내에 접종하였다. 30일째 채혈하여 혈청을 모아 -70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 면역전·후의 항체역가는 tube agglutination test를 실시하여 확인하였으며, 항체역가가 1:640 이상인 것을 사용하였다. 임상 환자 설사혈변에서 얻은 sorbitol 비발효 *E. coli*의 혈청학적 동정은 *E. coli* O157 항혈청 항체역가 1:80에 대하여 평판응집반응으로 응집유무를 확인하는 한편, Farmer 등¹⁵⁾의 방법에 따라 *E. coli* H7 항혈청으로 H항원의 혈청형을 동정하였다.

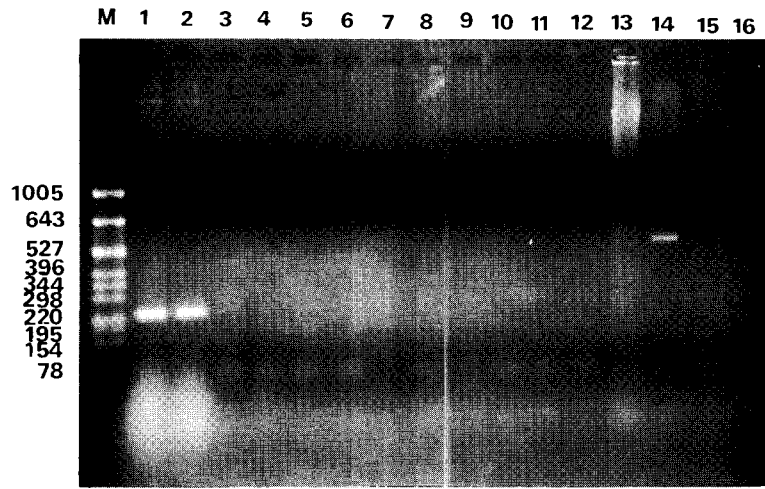
6. 정상 분변검체에 장출혈성 대장균 O157:H7 표준균주 첨가에 의한 가상검체 준비

장출혈성 대장균 O157:H7 표준균주 (ATCC 35150)를 10진 단계희석한 것을 멸균 생리식염수로 100배 희석한 정상성인의 분변검체와 섞고, 비교적 짧은 시간 내에 간단하게 DNA를 추출할 수 있는 boiling lysis⁴²⁾방법으로 DNA를 추출하여 다중 중합효소 연쇄반응에 사용하였다.

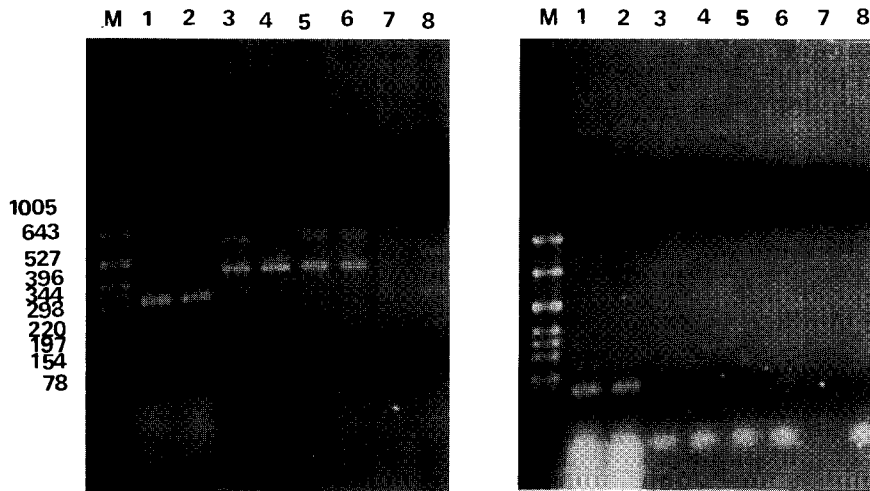
결 과

1. SLT-I · II, *eeA*, 60-MDa plasmid 각각의 중합효소 연쇄반응

장출혈성 대장균 O157:H7 표준균주 (ATCC 35150, ATCC 43894)와 대조세균으로 장관계 병원성 세균으로 알려진 13균주를 37℃에서 18시간 배양하여 alkaline lysis⁷⁾방법으로 추출한 DNA를 SLT-I · II 특이 primer인 MK1'과 MK2', *eeA* 유전자 특이 oligonucleotide primer인 NAE19와 NAE20, 60-MDa plasmid 특이 oligonucleotide primers인 MFS1F와 MFS1R를 각각을 이용하여 중합효소



A



B

C

Figure 1. Amplification of SLT-I · II, *eaeA*, 60-MDa plasmid gene sequences by PCR, respectively. PCR products were visualized by ethidium bromide staining after analysis on 1.5% agarose gel. A 228bp (SLT-I · II, plate A), 317bp (*eaeA*, plate B), 167bp (60-MDa plasmid, plate C) region of *E. coli* O157:H7 was amplified in single PCR reaction.

lane M: Molecular weight marker of *Hin*I digested pBH20, lane 1: Enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, lane 2: Enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 ATCC 43894, lane 3: *Escherichia coli* ATCC 25922, lane 4: Enterotoxigenic *E. coli* 424C1, lane 5: Urinary tract *E. coli* 7-0770, lane 6: Urinary tract *E. coli* 8-0917, lane 7: *Salmonella typhi*, lane 8: *Salmonella paratyphi A*, lane 9: *Salmonella typhimurium*, lane 10: *Salmonella choleraesuis*, lane 11: *Klebsiella pneumoniae*, lane 12: *Proteus vulgaris*, lane 13: *Pseudomonas aeruginosa*, lane 14: *Citrobacter freundii*, lane 15: *Enterobacter aerogenes*, lane 16: Negative control.

연쇄반응을 시행하였다. Primer design 과정에서 예상했던 228bp (SLT-I · II), 317bp (*eaeA*), 167bp (60-MDa plasmid)의 PCR 증폭 DNA 생성물을 표준균주에서는 Fig. 1의 lane 1, 2와 같이 증폭

DNA를 확인할 수 있었지만, 대조균으로 사용한 대장균 4균주 (ATCC25922, ETEC424C1, UTE7-0770, UTE8-0917)와 기타 다른 장관계 병원성 세균 9균주 모두에서 DNA 증폭물을 확인할 수 없

었다.

2. SLT-I · II, *eaeA*, 60-MDa plasmid의 다중 중합효소 연쇄반응

장출혈성 대장균 O157:H7 표준균주 (ATCC 35150)와 장관계 병원성 세균으로 알려진 13균주를 37°C에서 18시간 배양하여 alkaline lysis⁷⁾방법으로 추출한 DNA를 본 실험에서 사용한 3종의 oligonucleotide primers인 MK1'- MK2', NAE19-NAE20, MFS1F-MFS1R와 함께 동시에 반응 완충액에 넣어 다중 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. Primer design 과정에서 예상했던 317bp (*eaeA*), 228bp (SLT-I · II), 167bp (60-MDa plasmid)의 PCR 증폭 DNA 생성물 모두를 한 번의 반응을 통해 표준균주에서는 Fig. 2의 lane 1과 같이 증폭 DNA를 확인할 수 있었지만, 대조균으로 사용한 대장균 4균주와 기타 다른 장관계 병원성 세균 9균주 모두에서 DNA 증폭물을 확인할 수 없었다.

3. DNA 추출 방법에 따른 다중 중합효소 연쇄반응의 민감도

각각의 표적 DNA 추출 방법에 따른 3개의

bands 모두 검출 가능한 최소 세균수를 비교한 결과 Fig. 3에서와 같이 먼저 alkaline lysis⁷⁾방법은 2.5×10^8 까지 검출되었으며, boiling lysis⁴²⁾방법은 2.5×10^6 까지, QIAamp[®] DNA isolation kit방법은 2.5×10^8 까지, DNAzol[™] Reagent방법은 2.5×10^4 까지 검출되었다. DNAzol[™] Reagent방법의 검출강도가 2.5×10^4 까지로 가장 좋았으나 167bp (60-MDa plasmid) 증폭 생성물의 경우 DNA band가 확인되지 않았기 때문에, 그 다음으로 boiling lysis방법이 2.5×10^6 까지 3개의 bands 모두를 검출할 수 있고 비교적 짧은 시간 내에 간단하게 DNA를 추출할 수 있는 방법으로 나타났다.

4. 정상 분변검체에 장출혈성 대장균 O157:H7 첨가에 의한 모의실험

장출혈성 대장균 O157:H7 표준균주 (ATCC 35150)와 정상성인의 분변검체를 섞은 가상검체로부터 boiling lysis⁴²⁾방법으로 DNA를 추출하여 다중 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 생리식염수로만 부유된 세균에서는 2.5×10^6 까지 강한 3개의 bands 모두를 확인 할 수 있었지만, 분변을 첨가한 세균부유액에서는 2.5×10^6 에서 미약한

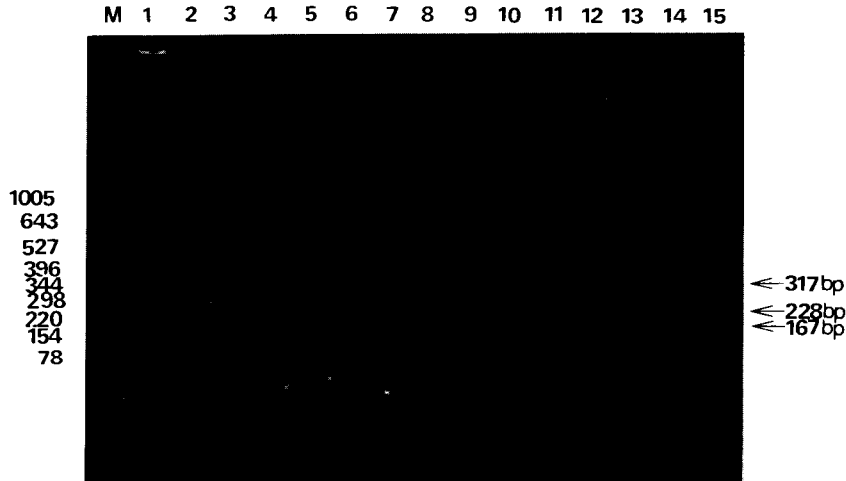


Figure 2. Amplification of SLT-I · II, *eaeA*, and 60-MDa plasmid gene sequences by multiplex PCR. Amplified sequences of target DNA obtained by multiplex PCR were visualized after 1.5% agarose gel electrophoresis by ethidium bromide staining. PCR products of 167bp (60-MDa plasmid), 228bp (SLT-I · II), and 317bp (*eaeA*) were successfully amplified simultaneously in a multiplex PCR reaction. lane M: Molecular weight marker of *Hin*I digested pBH20, lane 1: Enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 ATCC 35150, lane 2: *Escherichia coli* ATCC 25922, lane 3: Enterotoxigenic *E. coli* 424C1, lane 4: Urinary tract *E. coli* 7-0770, lane 5: Urinary tract *E. coli* 8-0917, lane 6: *Salmonella typhi*, lane 7: *Salmonella paratyphi* A, lane 8: *Salmonella typhimurium*, lane 9: *Salmonella choleraesuis*, lane 10: *Klebsiella pneumoniae*, lane 11: *Proteus vulgaris*, lane 12: *Pseudomonas aeruginosa*, lane 13: *Citrobacter freundii*, lane 14: *Enterobacter aerogenes*, lane 15: Negative control.

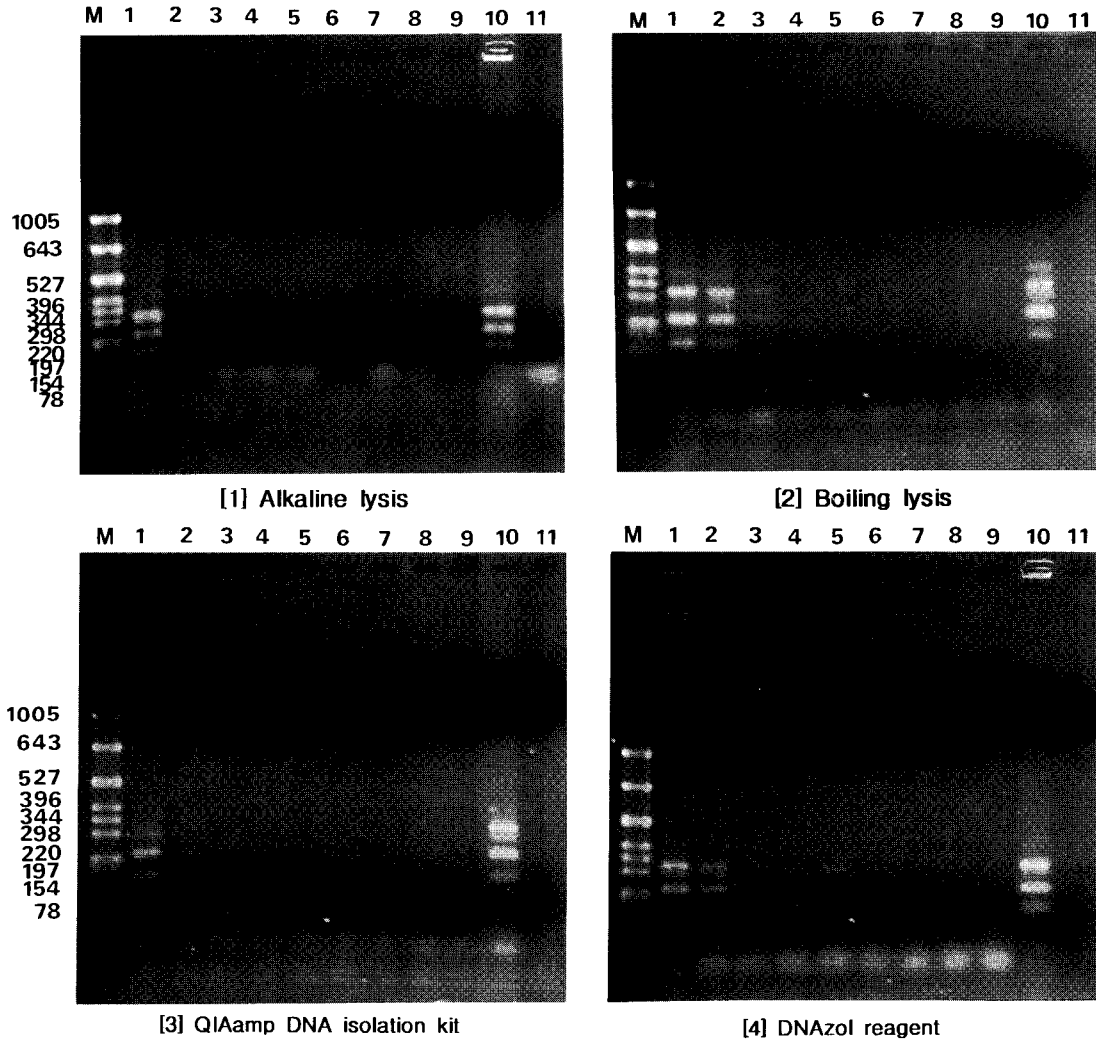


Figure 3. Sensitivity of multiplex PCR assay. Aliquots of a primary $100\times$ saline-diluted feces were seeded with serial 10-fold dilutions of *E. coli* O157:H7 strain ATCC 35150. DNA extracts were separately prepared by alkaline lysis, boiling lysis, QIAamp[®] DNA isolation kit, and DNAzol[™] reagent methods, and extracted DNAs were compared as templates for multiplex PCR of SLT-I · II, *eaeA*, and 60-MDa plasmid specific sequences. The 167bps (60-MDa plasmid), 228bps (SLT-I · II), and 317bps (*eaeA*) amplification products were analysed by electrophoresis through a 1.5% agarose gel followed by ethidium bromide staining. lane M: Molecular weight marker of *Hinf*I digested pBH20, lane 1: Feces spiked with 2.5×10^8 CFU EHEC O157:H7 ATCC 35150 per ml, lane 2: 2.5×10^7 CFU, lane 3: 2.5×10^6 CFU, lane 4: 2.5×10^5 CFU, lane 5: 2.5×10^4 CFU, lane 6: 2.5×10^3 CFU, lane 7: 2.5×10^2 CFU, lane 8: 2.5×10^1 CFU, lane 9: 2.5 CFU, lane 10: Positive control (EHEC O157:H7 ATCC 35150), lane 11: Negative control (no DNA template).

3개의 bands만을 확인할 수 있었다 (Fig. 4). 따라서 세균 부유액에서만 추출한 DNA의 검출 감도보다 분변이 포함된 검체가 대략 10배 정도 덜 민감한 것으로 나타나 분변내 중합효소 연쇄반응 억제물질이 존재함을 추측할 수 있었다.

5. 임상검체에서 sorbitol nonfermenting strains 의 다중 중합효소 연쇄반응

총 19건의 설사분변을 sorbitol-MacConkey 배지에 접종, 37°C에서 18시간 배양하고 난 후 3건의 sorbitol 비발효 집락을 선별하여 Rapid ID 32 E

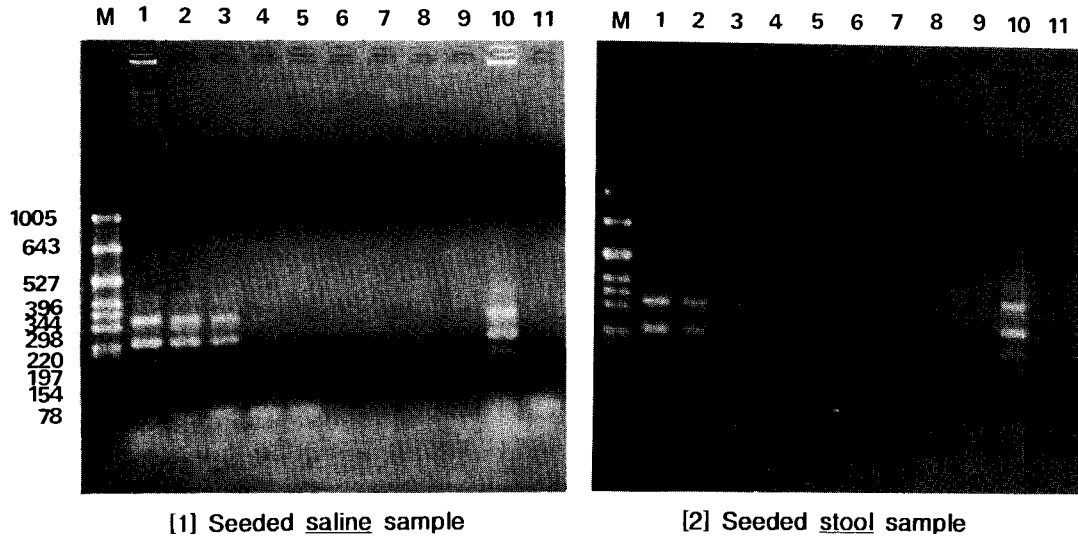


Figure 4. The effects of PCR inhibitors in fecal specimen. Aliquots of saline and a primary 100× saline-diluted feces were respectively seeded with serial 10-fold dilutions of *E. coli* O157:H7 strain ATCC 35150. DNA extracts were prepared by boiling lysis method. The 167bp (60-MDa plasmid), 228bp (SLT-I · II), and 317bp (*eaeA*) amplification products were analysed by electrophoresis through a 1.5% agarose gel followed by ethidium bromide staining. The legend for the lanes is same as in Figure 3.

(bioMerieux sa, RCS LYON B 69280 Marcy-l'Etoile, France) Kit와 생화학적 성상에 따라 *E. coli*로 분리 동정한 후, 특이 항혈청과 평판응집 반응을 시행한 결과 3건 모두 응집 반응을 보이지 않았다. 3건의 sorbitol 비발효 집락을 boiling lysis⁴²⁾방법으로 DNA를 추출하여 다중 중합효소 연쇄반응을 실시한 결과 양성반응의 band를 관찰할 수 없었다. 따라서 분리한 sorbitol 비발효 집락 3건 모두 장출혈성 대장균 O157:H7이 아니었다.

고 찰

본 연구에서는 장출혈성 대장균 O157:H7을 분리배양 및 동정과정 없이 바로 시료를 분석하여 신속하게 검출하기 위한 다중 중합효소 연쇄반응 (multiplex PCR) 기법을 확립하고, 이 기법을 이용하여 국내 분리 균주 중에서 SLT-I · II, *eaeA*, 60-MDa plasmid gene을 가진 대장균을 유전자 수준에서 한번의 multiplex PCR을 통해 여러 종류의 병원성 인자를 동시에 신속하게 검출하고자 하였다.

장출혈성 대장균 O157:H7을 검출하기 위하여 Fratamico 등¹⁸⁾의 oligonucleotide primers를 수정

보완한 SLT-I · II 특이 primer인 MK1' (5'-TTTAC-GATAGACTTTTCGAC-3')과 MK2' (5'-CACATA-TAAATTATTTTGCTC-3'), *eaeA* (*E. coli* attaching and effacing) 특이 primer를 Oligo software (National Biosciences, Plymouth, Minn.)를 이용하여 design 한 NAE19 (5'-GCCTATTATGCTGATGCTATG-3')와 NAE20 (5'-AGAAATAATTATGCCCCGAC-3'), 60-MDa plasmid (adhesin 또는 hemolysin) 특이 primer는 Fratamico 등¹⁸⁾의 oligonucleotide primers MFS1F (5'-ACGATGTGGTTTATTCTGGA-3')와 MFS1R (5'-CTTCACGTCACCATACATAT-3') 각각을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 실시한 결과 primer design시 예상되었던 228bp (SLT-I · II), 317bp (*eaeA*), 167bp (60-MDa plasmid)의 PCR 증폭 DNA를 표준균주 (*E. coli* ATCC 35150과 ATCC 43894)에서는 확인할 수 있었지만, 대조균으로 사용한 대장균 4균주 (ATCC25922, ETEC 424C1, UTE7-0770, UTE8-0917)와 기타 다른 장관계 병원성 세균 9균주 모두에서 DNA증폭물을 확인할 수 없었다. 이것은 1989년 Karch 등²⁹⁾이 합성 제작한 primer에 의해 20건의 임상검체 분리 *E. coli* 모두에서 SLT 특이 증폭 생성물을 확인한 결과와 1990년 Pollard 등⁴⁰⁾이 40건의 verotoxin 생성 대장균 모두에서 PCR 증폭 생성물을

확인하였지만 43건의 기타 다른 장내세균에서 증폭을 확인하지 못했다는 것과 유사한 결과를 보였고, 1993년 Victor 등⁵⁰⁾이 enteropathogenic *E. coli* O127:H6와 SLT생산 *E. coli* CL8 과 O157:H7 (EDL933) 균주로부터 합성한 oligonucleotide primer를 이용하여 환자 임상검체에서의 혈청형 O5, O26, O103, O111, O121, O128, O145, O157과 소에서 분리한 혈청형 O5, O26, O111과 돼지에서 분리한 혈청형 O107, O130에서 *eaeA* 유전자 특이 PCR 증폭 DNA 생성물을 확인할 수 있었고 다른 혈청형에서는 확인할 수 없었다는 비슷한 결과를 보였다. 또 1995년 Schmidt 등⁴³⁾이 특이 hemolysin gene을 검출하기 위한 PCR 시행 결과 모든 SLT생산 O157균주와 25개의 SLT생산 non-O157균주중 12균주가 양성반응을 보인 반면, 기타 다른 설사유발성 세균에서는 PCR 증폭 DNA를 검출할 수 없었다는 것과 유사한 결과를 보였다.

SLT-I · II, *eaeA*, 60-MDa plasmid 유전자를 가진 장출혈성 대장균 O157:H7을 검출하기 위해 oligonucleotide primers (MK1'-MK2', NAE19-NAE20, MFS1F-MFS1R)를 함께 동시에 반응 완충액에 넣어 다중 중합효소 연쇄반응을 시행한 결과 317bp (*eaeA*), 228bp (SLT-I · II), 167bp (60-MDa plasmid)의 PCR 증폭 DNA생성물을 표준균주 (*E. coli* ATCC 35150)에서는 확인할 수 있었지만, 대조균 13균주 모두에서 DNA증폭물을 확인할 수 없었다. 이것은 1997년 Gannon 등¹⁹⁾이 verotoxin (VT1, VT2 or Shiga-like toxin; SLT-I · II), *eaeA*, flagellar H7 유전자 각각에 대한 특이 oligonucleotide primer인 *vt*, *eaeA*, *fliC*를 이용하여 다중 중합효소 연쇄반응을 시행하여 *E. coli* O157:H7 또는 nonmotile과 EHEC 균주들을 검출하였다는 내용과 비슷한 결과를 보였다.

장출혈성 대장균 O157:H7 표준균주 (ATCC 35150)를 10진 단계희석한 것을 멸균 생리식염수로 100배 희석한 정상성인의 분변검체에 넣은 가상검체를 각각의 alkaline lysis⁷⁾, boiling lysis⁴²⁾, QIAamp[®] DNA isolation kit, DNAzol[™] Reagent 방법에 따라 표적 DNA를 추출하여 다중 중합효소 연쇄반응 시행한 후 결과를 비교하였다. 각각의 방법에 의한 3개의 bands 모두 검출 가능한 최소 세균수는 먼저 alkaline lysis⁷⁾ 방법은 2.5×10^8 까지 검출되었으며, boiling lysis⁴²⁾ 방법은 2.5×10^6 까지, QIAamp[®] DNA isolation kit 방법은 $2.5 \times$

10^8 까지, DNAzol[™] Reagent 방법은 2.5×10^4 까지 검출되었다. 그러나 QIAamp[®] DNA isolation Kit 방법의 경우 분변검체 혼합물들이 QIAamp spin column을 막아 추출된 DNA양이 적은 것으로 생각되며, DNAzol[™] Reagent 방법의 경우 검출감도는 가장 좋았으나 167bp (60-MDa plasmid) PCR 증폭 DNA band가 확인되지 않았다. 이와같은 현상은 60-MDa plasmid 유전자의 template DNA 일부가 DNAzol 시약에 의해 짧게 잘렸 (shearing)기 때문인 것으로 판단되며, 따라서 template DNA추출에는 boiling lysis 추출방법이 비교적 간단하고 검출감도가 좋아 다중 중합효소 연쇄반응을 위한 가장 적합한 DNA 추출방법인 것으로 사료되었다.

총 19건의 설사분변 중 sorbitol-MacConkey 배지에서 3건의 sorbitol 비발효 집락을 선발하여 Rapid ID 32 E Kit와 생화학적 성상에 따라 *E. coli* 로 분리 동정한 후, 특이 항혈청과 평판응집반응을 시행한 결과 3건 모두 응집 반응을 보이지 않았으며, 다중 중합효소 연쇄반응에서도 band를 확인할 수 없었다.

Boiling lysis⁴²⁾방법으로 DNA를 추출할 경우 생리식염수로만 부유된 세균에서 2.5×10^6 까지 강한 3개의 bands 모두를 확인할 수 있었지만, 분변을 첨가한 세균부유액에서는 2.5×10^6 에서 미약한 3개의 bands만을 확인할 수 있어, 세균 부유액에서만 추출한 DNA의 검출 감도보다 분변이 포함된 검체가 대략 10배정도 덜 민감한 것으로 나타나 분변내 중합효소 연쇄반응 억제물질이 존재한다는 Mapstone 등³⁵⁾과 Wilde 등⁵²⁾의 결과와 일치하였다. 이러한 위음성 결과를 일으키는 문제점을 해결하기 위해 1991년 Ho 등²²⁾과 1992년 Jiang 등²⁶⁾은 DNA 추출과정에 양온성 세제인 cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)를 첨가하였으며, 1990년 Boom 등⁹⁾과 1994년 Zwet 등⁴⁹⁾은 강한 nuclease 비활성 물질인 guanidinium thiocyanate (GuSCN)과 silica 소립자를 DNA 추출과정에 첨가하였고, 1995년 Enroth 등¹⁴⁾은 세균의 표면항원에 대한 항체가 coating된 paramagnetic beads (7×10^8 beads/ml)를 사용한 immunomagnetic separation 방법을 이용하여 분변내 PCR 억제물질을 제거하여 PCR 반응의 민감도를 높였다. 최근 이러한 PCR inhibitor가 분변내 음식물 특히 채소 유래 complex polysaccharides라는 것을 Monterio 등³⁸⁾이 *H. pylori* model에서 Ultrogel AcA44 column을

이용하여 분리, 정제하여 α, β -glucosidases로 가수 분해한 뒤 표적 DNA의 검출 감도가 증가됨을 확인하였다고 보고하였다. 따라서 장출혈성 대장균 O157:H7의 검출을 위한 PCR실험에 사용할 template DNA 추출을 분변검체에서 직접 다중 중합효소 연쇄반응으로 분석하기 전에 α, β -glucosidases를 처리하여 분변내 PCR 억제물질 (complex polysaccharides)를 제거함으로써 보다 안정화된 PCR 증폭 DNA 생성물을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

위와 같이 장출혈성 대장균 O157:H7을 분리 배양 및 동정 없이 바로 분변검체에서 추출한 DNA를 이용하여 본 실험에서 제작한 각각의 primer를 동시에 혼합한 다중 중합효소 연쇄반응 방법으로 직접 분석하여 PCR 증폭 DNA 생성물을 확인할 수 있었다. 하지만 기타 다른 병원성 장내세균 13균주에서도 서로 다른 위치에 비특이 bands가 나타나 증폭 DNA 생성물의 특이도를 확인하기 위한 각각의 primer 특이 oligonucleotide probes를 이용하여 hybridization시켜 확인하는 Southern blot analysis를 하거나 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 양상을 분석하여 확인하는 보다 진행된 연구가 필요하리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. 국립보건원 (1994): 감염병발생정보, 5: 133.
2. 김영일, 김용환, 차인호 (1995): 대장균에서 Verotoxin E 정제와 독소의 Receptor 특이성. 한국수의공중보건학회지, 19: 263-271.
3. 김용환, 차인호, 조현호, 김상현, 진형근, 김영일, 김도 (1996): Verotoxin 생성 대장균의 분포 및 Receptor를 이용한 RELISA법의 개발. 한국수의공중보건학회지, 20: 55-63.
4. 진형근, 차인호, 김용환 (1996): 설사환자로부터 Verotoxin 생산대장균의 분리 및 생물학적 독성. 한국수의공중보건학회지, 20: 89-96.
5. 차인호 (1995): 국내분리 *Escherichia coli* O157:H7 생성 Verotoxin-2의 생물화학적 및 분자 생물학적 특성과 검색방법에 관한 연구. 박사학위 논문. 경상대학교.
6. 차인호, 이영춘, 김용환 (1996): *Escherichia coli* O157:H7으로부터 분리한 Bacteriophage의 특성. 한국수의공중보건학회지, 20: 37-43.
7. Birnboim HC and Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7: 1513-1515.
8. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME and van der Noordaa J (1990): Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 28: 495-503.
9. Brown JE, Echeverria P, Taylor DN, Seriwanata J, Vanapruks V, Lexomboon U, Neill RN and Newland JW (1989): Determination by hybridization of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in children with diarrhea in Thailand. *J Clin Microbiol*, 27: 291-294.
10. Brown JE, Sethabutr O, Jackson MP, Lolekha S and Echeverria P (1989): Hybridization of *Escherichia coli* producing Shiga-like toxin I, Shiga-like toxin II, and a variant of Shiga-like toxin II with synthetic oligonucleotide probes. *Infect Immun*, 57: 2811-2814.
11. Downes FP, Barrett TJ and Green JH (1988): Affinity purification and characterization of Shiga-like toxin II and production of toxin specific monoclonal antibodies. *Infect Immun*, 56: 1926-1933.
12. Downes FP, Green JH, Greene K, Strockbine N, Wells JG and Wachsmuth IK (1989): Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II. *J Clin Microbiol*, 27: 1292-1297.
13. Edwards PR and Ewing WH: Identification of *Enterobacteriaceae*. 4th ed. p. 93-136, 1986. Elsevier Science publishing Co., New York.
14. Enroth H and Engstrand L (1995): Immunomagnetic separation and PCR for detection of *Helicobacter pylori* in water and stool specimens. *J Clin Microbiol*, 33: 2162-2165.
15. Farmer JJ and Davis BR (1985): H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol*, 22: 620-625.
16. Franke S, Harmsen D, Caprioli A, Pierard D,

- Wieler LH and Karch H (1995): Clonal relatedness of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* O101 strains of human and porcine origin. *J Clin Microbiol*, **33**: 3174-3178.
17. Frankel G, Giron JA, Valmassoi J and Schoolnik GK (1989): Multi-gene amplification: simultaneous detection of three virulence genes in diarrheal stool. *Mol Microbiol*, **3**: 1729-1734.
 18. Fratamico PM, Sackitey SK, Wiedmann M and Deng MY (1995): Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, **33**: 2188-2191.
 19. Gannon VPJ, D'Souza S, Graham T, King RK, Rahn K and Read S (1997): Use of the flagellar H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *J Clin Microbiol*, **35**: 656-662.
 20. Gannon VPJ, Rashed M, King RK and Thomas EJG (1993): Detection and characterization of the *eae* Gene of Shiga like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **31**: 1268-1274.
 21. Gyles CL, DeGrandis SA, Mackenzie C and Brunton JL (1988): Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining Verocytotoxin production in a porcine edema disease isolate of *Escherichia coli*. *Microb Pathog*, **5**: 419-426.
 22. Ho S, Hoyle JA, Lewis FA, Secker AD, Cross D, Mapstone NP, Dixon MF, Wyatt JI, Tompkins DS, Taylor GR and Quirke P (1991): Direct polymerase chain reaction test for detection of *Helicobacter pylori* in humans and animals. *J Clin Microbiol*, **29**: 2543-2549.
 23. Huang A, DeGrandis S and Friesen J (1986): Cloning and expression of the genes specifying Shiga-like toxin production in *Escherichia coli* H19. *Infect Immun*, **166**: 375-379.
 24. Jackson MP, Neill RJ, O'Brien AD, Holmes RK and Newland JW (1987): Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiol Letts*, **44**: 109-114.
 25. Jerse AE, Yu J, Tall BD and Kaper JB (1990): A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 7839-7843.
 26. Jiang X, Wang J, Graham DY and Estes MK (1992): Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **30**: 2529-2534.
 27. Kaplan BS, Cleary TG and Obrig TG (1990): Recent advances in understanding the pathogenesis of the hemolytic uremic syndromes. *Pediatr Nephrol*, **4**: 276-283.
 28. Karch H, Heeseman J, Laufs R, O'Brien AD, Tacket CO and Levine MM: A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. *Infect Immun*, (in press).
 29. Karch H and Meyer T (1989): Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **27**: 2751-2757.
 30. Karmali MA, Steele BT, Petric M and Lim C (1983): Sporadic cases haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet*, **1**: 619-620.
 31. Konowalchuk J, Dickie N and Stavric S (1978): Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. *Infect Immun*, **20**: 575-577.
 32. Konowalchuk J, Speirs JI and Stavric S (1977): Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **18**: 775-779.
 33. Levine MM, Xu JG, Kaper JB, Lior H, Prado V, Tall B, Nataro J, Karch H and Wachsmuth Käye (1987): A DNA Probe to identify Enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotype that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis*, **156**: 175-182.
 34. Lopez EL, Diaz M, Grinstein S, Devoto S, Mendilaharsu F, Murray BE, Ashkenazi S, Ruboglio E, Woloj M, Vasquez M, Turco M, Pickering LK and Cleary TG (1989): Hemolytic

- uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. *J Infect Dis*, **160**: 469-475.
35. Mapstone NP and Quirke P (1992): Molecular biology and infections of the gut. *Gut*, **33**: 1441-1443.
 36. Marques LRM, Peiris JSM, Cryz SJ and O'Brien AD (1987): *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol Letts*, **44**: 33-38.
 37. Milford DV, Taylor CM, Guttridge B, Hall SM, Rowe B and Kleanthous H (1990): Haemolytic uraemic syndromes in the British Isles, 1985 - 8: association with Verocytotoxin producing *Escherichia coli*. I. clinical and epidemiological aspects. *Arch Dis Child*, **65**: 716-721.
 38. Monterio L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J and Megraud F (1997): Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J Clin Microbiol*, **35**: 995-998.
 39. Paton AW and Paton JC (1996): *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic uremic syndrome. *J Clin Microbiol*, **34**: 463-465.
 40. Pollard DR, Johnson WM, Lior H, Tyler SD and Rozee KR (1990): Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **28**: 540-545.
 41. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA and Cohen ML (1982): Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med*, **308**: 681-685.
 42. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989): Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
 43. Schmidt H, Beutin L and Karch H (1995): Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun*, **63**: 1055-1061.
 44. Schmidt H, Montag M, Bockemuhl J, Heesemann J and Karch H (1993): Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun*, **61**: 534-543.
 45. Schmitt CK, McKee ML and O'Brien AD (1991): Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H-strain E32511. *Infect Immun*, **59**: 1065-1073.
 46. Sears CL and Kaper JB: Enteric bacterial toxins (1996): Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol Rev*, **60**: 167-215.
 47. Strockbine NA, Marques LRM, Newland JW, Smith HW, Holmes RK and O'Brien AD (1986): Two toxin converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. *Infect Immun*, **53**: 135-140.
 48. Toth I, Barrett TJ, Cohen ML, Rumschlag JG and Wachsmuth IK (1991): Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for products of the 60-Megadalton plasmid of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J Clin Microbiol*, **29**: 1016-1019.
 49. van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-smid AMD, Schirm J and Snijder J. AM (1994): Use of PCR with feces for detection of *Helicobacter pylori* infections in patients. *J Clin Microbiol*, **32**: 1346-1348.
 50. Victor PJG, Rashed M, King RK and Thomas EJG (1993): Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **31**: 1268-1274.
 51. Weinstein DL, Jackson MP, Samuel JE, Holmes RK and O'Brien AD (1988): Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from an *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol*, **170**: 4223-4230.
 52. Wilde J, Eiden J and Yolken R (1990): Removal of inhibitory substances from fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **28**: 1300-1307.

53. Yutsudo T, Honda T and Miwatami T (1986):
Characterization of purified Shiga toxin from

Shigella dysenteriae. *Microbiol Immunol*, **30**:
1115-1127.

=Abstract=

**Detection of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Strains
Using Multiplex Polymerase Chain Reaction**

Yong-Bin Eom and Jong-Bae Kim[†]

*Department of Medical Technology, College of Health Science, Yonsei University,
Wonju, 222-710, Republic of Korea*

A multiplex PCR method was designed by employing primers specific for the *eaeA* gene, conserved sequences of Shiga-like toxins (SLT-I · II), and the 60-MDa plasmid of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7 strain. A set of six synthetic oligonucleotide primers derived from sequences of the SLT-I · II, *eaeA*, and 60-MDa plasmid genes of *E. coli* O157:H7 were used in a multiplex PCR amplification procedure to detect these genes in the same enteric pathogens.

In two enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 (ATCC 35150, ATCC 43894) reference strains, PCR products of 317bps (*eaeA*), 228bps (SLT-I · II), and 167bps (60-MDa plasmid) were successfully amplified simultaneously in a single reaction. However, the specific PCR products were not amplified in control strains of other enteric bacteria.

The sensitivity of the multiplex PCR assay for detection of the SLT-I · II, *eaeA*, and 60-MDa plasmid genes of *E. coli* O157:H7 was found to be 2.5×10^6 of bacteria in diarrheal stool to amplify all three bands.

The multiplex PCR technology will allow large-scale screening of many clinical specimens or contaminated foods, and will be a very useful method for the detection of a wide range of microorganisms present in the environment, including EHEC O157:H7 in various types of specimens. The multiplex PCR assay has the potential to be used as a specific and rapid method for clinical diagnosis of disease caused by EHEC O157:H7.

Key Words: Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7, Multiplex PCR, Oligonucleotide primers, SLT-I · II, *eaeA*, 60-MDa plasmid

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 4(1): 43-56, June, 1998]

[†]Corresponding author