泄瀉患者로부터 分離한 泄瀉誘發原因菌의 分離 및 分布度에 대한 調査研究

(副題 : Verotoxin을 生産하는 病原性 大腸菌의 分離 및 分布調査)

疫學調査科

車仁鎬 · 權赫東 · 李采南 · 賓在薰 · 李秉圭

Survey on Distribution and Isolation of Verotoxin-Producing *Escherichia coli*

Epidemiology division

I. H. Cha, H. D. Kwon, C. N. Lee, J. H. Bin and B. G. Lee

Abstract

The biological characteristics, isolation and/or distribution ratio, cytotoxicity, serological factors and antimicrobial drug resistance were studied for verotoxin-producing *Escherichia coli*(VTEC) from 145 diarrheal patients in Pusan area.

The isolation ratio of VTEC was 8.5%(15 strains of 177 strains), and 5.6% of diarrheal patients were harbouring VTEC.

Cytotoxicity for culture supernatants of isolated strains was assayed to Vero cell and HeLa cell monolayers. One strain indicated CD_{50} at a 10^6 dilution, uncommonly. A total of 15 isolates were produced cytotoxic activity to Vero cell and HeLa cell. This result suggests that the isolates-producing toxins were VT1 or VT2.

The serotypes of 15 VTEC were classified by 7 serotypes(O2, O4, O111, O113, O114,

O115 and O118).

In the susceptibility test of 15 VTEC to 15 antibiotics, all of the isolates were resistant to ampicillin, erythromycin and methicillin but sensitive to amikacin. The most common isolates were considerably sensitive to streptomycin, cephalothin, neomycin, chloramphenicol, kanamycin, cephalexin, nalidixic acid, oxytetracycline, spectinomycin and gentamicin.

Nine kinds of resistant patterns were detected and all isolates were multiple resistance. The most common multiple resistant pattern was ampicillin-erythromycin-methicillin-penicillin G(46.7%).

Ⅰ. 緖　　論

細菌에 의한 泄瀉誘發 原因菌으로는 *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp., *Clostridium* spp., *Yersinia* spp. 및 pathogenic *E. coli*등이 잘 알려져 있다. 이들중 *E. coli*는 사람과 動物의 腸內에 正常細菌總으로 存在하면서 腸管系疾患 또는 非腸管系統疾患의 중요한 原因體로 作用하며, 여러가지 疾病을 誘發시킨다.[1,2,3,4,5,19,22,23,24,25,26,27,28,29]

病原性 *E. coli*의 分類는 感染의 機轉에따라 enteropathogenic *E. coli*(EPEC), enterotoxigenic *E. coli*(ETEC), enteroinvasive *E. coli*(EIEC) 및 enterohemorrhagic *E. coli*(EHEC)의 4가지 型으로 分類되며,[20] 近年에 EHEC에 屬하는 Shiga-like toxin producing *E. coli*의 抗原性 및 生理化學的 성질 등이 밝혀짐에 따라 이에 대한 많은 關心을 갖게 되었다.

1977년 Konowalchuk등[17]은 Shiga toxin의 抗血淸에 中和되는 大腸菌의 毒素를 발견하고 이를 Shiga-like toxin 1(SLT 1)이라하였고, Strockbine등[15]과 Marques등[16]은 Shiga toxin의 抗血淸에 中和되지 않는 SLT를 SLT 2와 SLT_{sw}로 分類하였으며, Strockbine등[30]과 Karmali등[10]에 의해 이들 SLT가 verotoxin(VT)과 同一하다는 것이 밝혀졌다.

또한 Konowalchuk등[17,30,31]은 *E. coli*의 heat-labile enterotoxin(LT)에 대한 Vero(African green monkey kidney) cells의 有用性을 調査하던 중 몇몇 *E. coli* 菌株가 Vero cell에 대한 LT의 cytotonic effect와는 대조적으로 cytopathic effect를 나타내는 것을 發見하고 이를 verotoxin(VT)이라고 命名하였다.

Verotoxin은 분자량 32Kd의 A subunit와 분자량 7.7Kd인 5개의 B subunit로 構成되어 있고,[30] A subunit는 細胞內에서 enlongation factor I을 抑制하므로써 protein 合成을 遮斷하며, B subunit는 receptor와의 特異的인 結合에 關與하는 것으로 알려져 있다.[21,32]

한편, 1955년 Gasser등[37]은 3가지 症狀, 즉 acute renal failure, thrombocytopenia, microangiopathic hemolytic anemia으로 hemolytic uremic syndrome (HUS)을 正義하였고, 다른

여러 연구자들은 약물, 화학물질, 독소 및 미생물 등이 有力한 原因體라고 報告하였으며, 그 중에서 미생물에 의한 HUS는 *Shigella dysenteriae* type1[39,55] *Salmonella typhi*,[40] *Campylobacter jejuni*,[42] *Yersinia pseudotuberculosis*,[42] *Streptococcus pneumonia*,[42] microtatibiotes로 불리는 Rickettsia-like organisms[44] 및 여러 virus[45]등이 關與한다고 알려져 있다. 그러나 1983년 Karmali등[46]에 의해 verotoxin 생산 대장균이 HUS의 原因體로 關與한다는 것이 最初로 밝혀졌다.

현재까지 verotoxin 生產 大腸菌은 57種의 血淸型으로 알려져 있으며,[38] 외국의 경우 이들 血淸型중 O157 : H7이 verotoxin 생산대장균으로 인한 감염患者에서 分離菌의 절반以上으로 檢出된다고 報告된 바 있으며,[10,11] verotoxin 生產大腸菌은 사람에서 hemorrhagic colitis,[8,9] hemolytic uremic syndrome[7,8,10] 및 thrombotic thrombocytopenic purpura[30,31]등을 일으키고, 動物에서 泄瀉와 edema disease를 誘發시키는 것으로 알려져 있다.[12,13,14] 뿐만아니라 이들 VT生產大腸菌은 소의 糞便材料에서 11~84%, raw milk에서 10%, 豚肉에서 1.5~3.8% 및 鷄肉에서 0~1.5%가 分離 報告[50,52]된 바 있어 이들 食肉을 材料로한 食品으로의 汚染度 看過할 수 없다.

캐나다, 미국, 일본 등을 비롯한 외국의 많은 나라에서는 verotoxin 生產大腸菌에 대한 疫學的인 調査 뿐만이라, toxin 자체에 대한 연구, 이들 毒素의 特異的인 receptor로 作用하는 globotriosylceramide(Gb3)와 galabiosylceramide같은 glyco-sphingolipid에 대하여 많은 關心을 보이고 있으며, 最近에는 遺傳學的 技法을 利用한 monoclonal antibody를 生產하여 微量의 toxin 檢出 및 診斷에 利用하고 있다. 그러나 국내에서 이들 verotoxin 生產 大腸菌에 대한 報告는 김등[51]이 보고한 것 외에는 거의 없으며, 疫學的인 調査조차, 이루어져 있지 않은 실정이다.

따라서 泄瀉患者의 糞便材料로부터 verotoxin 生產大腸菌의 檢出을 위한 보다 效率的인 實驗室內 診斷法을 摸索하고자, 一次的으로 泄瀉患者 糞便由來의 分離株에 대한 血淸學的 分布, 細胞毒性試驗 및 抗生劑耐性의 樣相을 調査하여 verotoxin 生產大腸菌 感染에 대한 疫學의 基礎資料를 提示코자 본 實驗을 실시하였다.

II. 材料 및 試驗方法

1. 公試 材料

1992년 4월부터 1993년 3월까지 指定病院(釜山市醫療院 및 保健所)을 來院한 泄瀉患者 145名으로부터 滅菌된 면봉으로 直腸採便하여 無菌生理食鹽水가 添加된 輸送容器(Culturette)에 넣어 低溫을 維持하면서 實驗室로 運搬하였다.

2. 菌分離 方法

菌 分離는 Sandra와 Samuel의[17] 方法에 따라 MacConkey agar 평판배지에 직접 塗抹하여 37℃에서 18~24시간 培養한 후, *E. coli*로 의심되는 colony를 가검물당 1개이상 選別하였고 *E. coli* O157 : H7의 分離를 위하여 1% sorbitol이 添加된 MacConkey agar base 評判培地에 繼代하여 sorbitol 分解與否를 觀察하였으며, Edwards와 Ewing[18]의 方法에 準하여 16種의 生化學的 性狀試驗 및 Karmali[20]의 方法에 따라 Table 1에서와 같이 verotoxin 生産大腸菌으로 밝혀진 O-group serotype 23種에 대하여 (慶尙大學校 醫科大學 微生物學 敎室로부터 分讓) 凝集有無를 觀察하였다.

Table 1. Antiserum used for identification of verotoxin-producing *Escherichia coli*

Used antiserum			
O1	O25	O115	O145
O2	O26	O118	O153
O4	O103	O121	O157
O5	O111	O125	O163
O6	O113	O26	O165
O18	O114	O128	

3. Cells, 培養條件 및 cytotoxicity assay

Cytotoxicity assay를 위한 cells은 國立保健院 呼吸器 바이러스科로부터 分讓받은 Vero cell(African Green monkey kidney) 및 HeLa cell을 使用하였고, 5% fetal bovine serum과 ml당 100μg의 gentamicin이 添加된 minimal essential medium(MEM ; SIGMA)에 繼代培養하면서 公試하였다. *E. coli* 細胞毒性 시험은 Karmali등[19,21]의 方法에 다라 分離菌을 Penassay broth (antibiotic medium no.3 : DIFCO)에 接種한 후 37℃에서 18시간 培養하고, 培養層液을 0.22μm의 pore size membrane filter로 濾過한 뒤, 培養濾液 50μl를 2배 段階稀釋하여 Vero cells이 單層培養되어 있는 96-well microplate에 接種하였다. 接種한 plate는 37℃, 5% CO_2 조건으로 3일간 培養하면서 매일 cytopathic effects를 顯微鏡으로 觀察하였고, 培養 3일후 Vero cell을 50%死滅(CD_{50} ; cell detachment 50) 시키는 sample의 가장 높은 稀釋倍數를 endpoint로 하여, VT活性의 力價를 決定하였다.

4. CD_{50} 判定

CD_{50} 判定方法은 Mary등[40]의 方法에 따라 培養된 plate를 조심스럽게 진탕하여, 死滅된 cells과 old medium을 除去하고 2% formalin이 添加된 0.067M phosphate-buffered saline (PBS) (pH7.2)으로 1분간 固定시킨 뒤, 0.13% crystal violet in 5% ethanol-2% formalin-PBS로 20분간 染色하였다. 染色된 cells를 50% ethanol 200μℓ로 溶出시키고 溶出液 100μℓ를 0.9mℓ PBS에 稀釋하여 spectrophotometer 595mm에서 吸光度를 測定하였다.

5. 抗菌劑 感受性 檢査

分離한 大腸菌의 抗菌劑 耐性상태를 調査하기 위하여 Steers 등[49]의 寒天平板稀釋法에 따라 amikacin을 비롯한 15種의 抗菌劑에 대하여 感受性 檢査를 실시하였다. 公試한 抗菌劑의 種類 및 濃度는 Table 2와 같으며, 耐性判定 限界濃度는 先行 연구자들의 基準에 準하였다.[31,33,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64]

公試菌을 nutrient broth에 接種하여 37℃에서 24시간동안 培養한 菌液을 $BaSO_4$ 標準濁度液의 濃度(1×10^8 CFU/ml)로 조정하였다. 이 菌液을 각 抗菌劑가 含有된 Mueller Hinton agar에 multiple inoculator로써 接種하고 37℃에서 24시간 培養하여 發育한 菌을 그 藥劑에 대한 耐性菌으로 判定하였다.

Table 2. Drugs used for antimicrobial susceptibility test

Drugs	Concentrations(μg/mℓ)	Drugs	Concentrations(μg/mℓ)
Amikacin(AK)	32	Methicillin(MT)	0.25
Ampicillin(AM)	25	Nalidixic acid(NA)	25
Chloramphenical(CL)	25	Neomycin(NM)	50
Cephalexin(CX)	25	Oxytetracycline(OT)	25
Cephalothin(CP)	32	Penicillin-G(PG)	16
Erythromycin(EM)	8.0	Spectinomycin(ST)	25
Gentamicin(GM)	12.5	Streptomycin(SM)	12.5
Kanamycin(KM)	25		

Ⅲ. 結果 및 考察

泄瀉患者에서 VT生産 大腸菌의 分布調査를 위하여 大腸菌을 分離하였던 結果 145名의 泄瀉患者 糞便으로부터 177株의 大腸菌을 分離하였다. 分離菌 177株는 Table 3에서와 같이 indole시험, MR시험, nitrate reduction시험에서는 陽性反應을, VP시험, urease시험, citrate 시험, KCN시험, malonate시험, phenylalanine deaminase시험, gelatin液化시험 및 oxidase시험에서는 陰性反應을 나타내어 大腸菌의 生物學的 性狀과 一致하였다.

Table 3. Biological characteristics of 177 isolates of *Escherichia coli*

Characteristics	Reactions	No. of strains (%)
Indole	+	177(100.0)
MR	+	177(100.0)
VP	−	177(100.0)
Urease	−	177(100.0)
Citrate	−	177(100.0)
KCN	−	177(100.0)
Nitrate reduction	+	177(100.0)
Malonate	−	177(100.0)
Sodium acetate	+	169(95.5)
Phenylalanine deaminas3	−	177(100.0)
Gelatin liquefaction	−	177(100.0)
Oxidation	−	177(100.0)

+ : Positive reaction　　− : negative reaction

또한 分離菌들의 糖分解 成績도 大腸菌의 性狀과 一致하였다.(Table 4)

Table 4. Carbohydrate fermentation properties of 177 isolates of *Escherichia coli*

Characteristics	Reactions	No.of strains (%)
Glucose	AG	171(96.6)
Lactose	+	177(100.)
Sucrose	+	85(48.0)
Mannitol	+	177(100.)
Inositol	+	168(94.9)
Sorbitol	+	130(73.4)
Salicin	+	51(28.8)
Adonitol	−	160(90.4)
Dulcitol	−	172(97.2)

+ ; positive reaction　　− ; negative reaction

AG : acid and gas production

泄瀉患者 145名의 糞便으로부터 177株의 大腸菌을 分離하였고, 分離株 177株에 대하여 Vero cell을 이용한 細胞毒性 시험으로 VT生産有無를 調査하였던 바, Table 5와 같이 15株(8.5%)의 分離株가 CPE(cytopathic effect)를 나타내었으며, 泄瀉患者에 대하여는 15名(5.6%)의 泄瀉患者로부터 VT生産大腸菌이 檢出되었다. 국내에서는 VT生産大腸菌의 分布에대한 調査가 報告된 바 없고, verotoxin에 의해 惹起되는 疾病 및 毒性을 고려해 볼때 이러한 結果는 매우 중요한 의미를 지니며, 더욱 정확한 治療를 위하여 一般 病·醫院에서도 迅速, 正確하게 診斷할 수 있는 診斷用 試藥의 開發이 時急하다고 思料된다.

Table 5. Percentages of isolated *Escherichia coli* strains and patients harbouring VT-producing *Escherichia coli*

No. of diarrheal patients	No. of isolates	No. of VT producing strains(%)	No. of patients harbouring VT-producing *E. coli*
145	177	15(8.5)	10(5.6)

뿐만 아니라, 1990년 Thailand[65]에서 소의 糞便으로부터 11−84%, 屠殺場의 신선한 牛肉으로부터 8~28% 및 流通되고 있는 牛肉으로부터 9%의 VT生産大腸菌이 檢出되었다고 報告한 바 있고, Real등[66]이 돼지고기에서 3.8%의 VT生産大腸菌을 分離 報告한 바 있으며, Riley등[67]이 햄버거 由來의 VT生産大腸菌에 의해 발생한 hemorrhagic colitis 患者로부터 본 菌을 分離 報告한 바 있어, 食生活 문화가 많이 바뀐 국내에서도 VT生産大腸菌에 의한 感

染에 유의해야 할 것으로 思料된다.

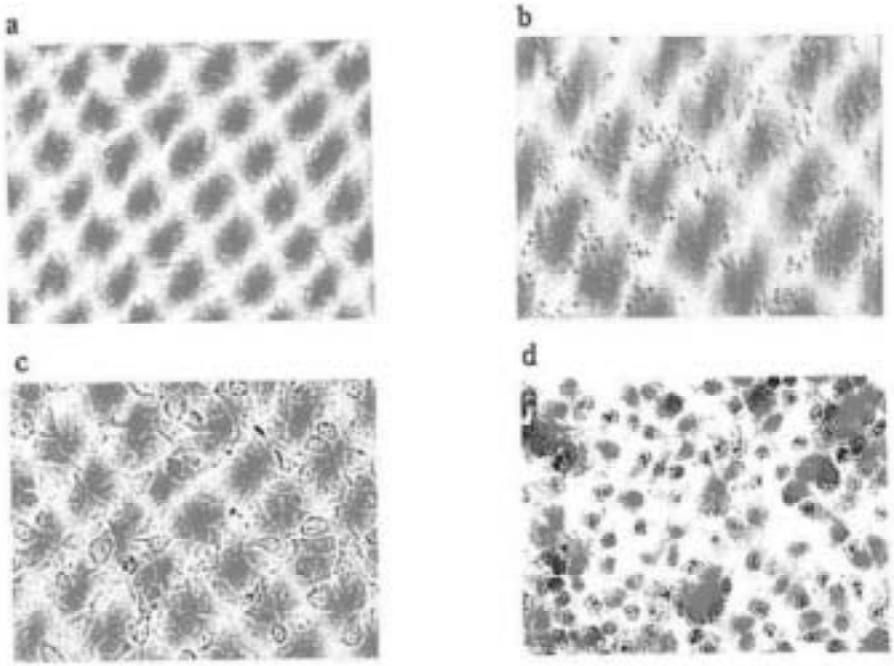

Fig. 1. Micrographs of CPE in the Vero(A, B) and HeLa Cells(C, D) exposed to a cultured filtrates of isolated strains. A and C were mormal cells. B and D were exposed cells for 36h in cultured filtrates of isolated strains.

Vero cell및 HeLa cell에 대한 分離菌의 cytotoxicity는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 cytopathic effect를 나타내었으며, 각 分離株의 cytotoxicity程度는 Table 6과 같이 나타내었고, 10株(66.6%)가 1.6×10^{7} CD_{50}, 1.6×10^{5} CD_{50} 및 1.6×10^{3} CD_{50}의 toxicity를 나타낸 分離株가 각각 2株(13.3%)로 나타났으며, HeLa cell에 대하여도 Vero cell과 비슷한 成績을 나타내었다.

Chik등[80]과 Nancy등[68]은 VT의 cytotoxicity시험을 위하여 각각 Vero cell과 HeLa cell을 利用하였고, Blanco등[70]에 따르면 VT1 및 VT2는 HeLa cell에 대하여 毒性을 나타내지만 VTE는 毒性을 나타내지 못한다고 報告한 바 있다. 이와같은 사실로 미루어 볼때 본 실험에 公試된 泄瀉患者由來 VT生産大腸菌들은 VT1 또는 VT2일 것으로 推測되며, 正確한 toxin의 分類를 위해서는 antitoxin 製造 및 이를 이용한 中和試驗이 병행되어야 할 것으로 생각된다.

Table 6. Cytotoxic dose 50% for vero and HeLa cell of 15 strains isolated VT-producing *Escherichia coli*

Toxicity* (CD_{50}/ml of incubated supernatants)	No. of strains (%) for Vero cell	No. of strains (%) for Vero cell
1.6×10^{1}	2(13.3)	2(13.3)
1.6×10^{2}	2(13.3)	3(20.0)
1.6×10^{3}	10(66.6)	9(60.0)
1.6×10^{4}	1(6.6)	1(6.6)

* : The dose of incubated suppernatant crude toxin required to kill 50% of the approximately 16,000 Vero and HeLa cells in a microtiter well within 24 h.

한편, 分離된 VT生產大腸菌 15株에 대하여 VT生產大腸菌으로 밝혀진 23種의 O-group 抗血淸으로 型別한 成績은 Table 7과 같다.

Table 7. Serological distribution of 15 strains isolated VT-producing *Escherichia coli*

Serotypes	No. of positive strains	% of positive strains
O2	1	6.7
O4	1	6.7
O113	1	6.7
O111	2	13.3
O114	1	6.7
O115	2	13.3
O118	1	6.7
Total	9	60.0
Untypable	6	40.0

泄瀉患者 糞便으로부터 分離한 VT生產大腸菌에 대한 血淸型의 分布는 分離菌 15株중 9株(60.0%)가 公試한 抗血淸에 陽性反應을 나타내었으며, 나머지 6株(40.0%)는 公試한 어느 血淸과도 反應을 나타내지 않았다. 分離된 VT生產大腸菌에서 比較的 出現頻度가 높았던 血淸型은 O111 및 O115 serotype으로서 公試菌중 각각 2株(13.3%)이었으며, O2, O4, O113, O114 및 O118등도 각각 1株(6.7%)씩 分布하였다.

또한, 型別되지않은 6株는 Karmali[24]등이 보고한 23種의 VT生產大腸菌 血淸型에 대하여 반응을 나타내지 않아 이들의 血淸型에 대한 調査硏究가 되어져야 할 것으로 思料되며, 본

실험결과 이들 23種의 血淸型에 반응을 나타내더라도 반드시 VT를 生産하지는 않았다.

分離株에 대한 藥劑의 感受性을 보기위하여 AK등 15種의 藥劑에 대하여 感受性試驗을 실시하였던 바, 그 成績은 Table 8과 같다.

Table 8. Susceptibilities of 15 strains isolated VT-producing *Escherichiacoli* to antimicrobials

Drugs	No. of resistant strains(%)	Drugs	No. of patients strains(%)
Ampicillin	15(100.)	Kanamycin	3(20.0)
Erythromyci	15(100.)	Cephalexin	2(13.3)
Methicillin	15(100.)	Nalidixic acid	2(13.3)
Penicillin G	14(93.3)	Oxytetracycline	2(13.3)
Streptomycin	5(33.3)	Spectinomycin	2(13.3)
Cephalothin	4(26.7)	Gentamicin	1(13.3)
Neomycin	4(26.7)	Amikacin	0
Chloramphenicol	3(20.0)		

AK에 대하여는 全 菌株가 感受性이었으나, GM, CX, NA, OT, ST, CL, KM, CP, NM 및 SM에 대하여는 6.7~33.3%의 菌株가 耐性을, PG에 대하여는 分離菌 1株를 제외한 全 菌株(93.3%)가 耐性을, AM, EM 및 MT에는 分離菌 모두가 耐性을 나타내었다. 이들 耐性菌株의 耐性樣相은 分離菌 모두가 3種類이상의 藥劑에 대해서 耐性을 나타내었고, 모두 9種類의 耐性型으로 分類되었으며 多劑耐性型중 4劑耐性型(AM, EM, MT, PG)이 46.7%, 7劑耐性型이 20%로서 높은 分布를 나타내었다.(Table 9)

Table 9. Distribution of resistant patterns of 15 strains isolated VT-producing *Escherichia coli* from diarrheal patients

Resistant patterns	No. of resistant strains	%
AM, CL, CX, CP, EM, KM, MT, NA, NM, PG, ST, SM	1	6.7
AM, CP, EM, KM, MT, NM, OT, PG, SM	1	6.7
AM, CL, CP, EM, MT, OT, PG, SM	1	6.7
AM, CP, EM, MT, N, PG, ST	1	
AM, CX, EM, MT, NM, PG, SM	1	
AM, CL, EM, KM, MT, PG, SM	1	20.0
AM, EM, GM, MT, NM, PG	1	6.7
AM, EM, MT, PG	7	46.7
AM, EM, MT	1	6.7

이상의 결과로 보아 본 실험에 公試된 VT生產大腸菌들은 大部分의 公試藥劑에 대해 높은 感受性을 나타내고 있으나, verotoxin生產大腸菌의 感染을 비롯한 각종 細菌性 疾病의 退治를 위해서는 사용藥劑의 濫用과 誤用이 없도록 治療藥劑 선발에 보다 愼重을 기해야 할 것이며, 이를 위해서는 VT生產大腸菌의 耐性化 趨勢를 持續的으로 把握해 나가야 할 것으로 思料된다.

V. 結　　論

Verotoxin 生產 大腸菌의 檢出方法을 摸索하기 위하여 1次的으로 釜山地域의 泄瀉患者 145名을 대상으로 硏究調査한 결과 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 泄瀉患者 145名의 糞便으로부터 177株의 大腸菌을 分離하였으며,이들중 細胞毒性試驗에 의한 VT 生產 大腸菌은 15株(8.5%)이었다.
2. 泄瀉患者 145名중 VT 生產 大腸菌을 保有하고 있는 患者는 10名(5.6%)이었다.
3. 分離된 VT 生產 大腸菌의 細胞에 대한 毒性은 1.6×10^{7} CD_{50}을 나타낸 分離株가 66.6%로서 가장 많았고, 1.6×10^{8} CD_{50}의 높은 毒性을 나타낸 分離株가 1株(6.6%)였다.
4. 分離된 VT 生產 大腸菌의 血淸型은 60%의 分離株가 公試 抗血淸에 型別되었고, O111 및 O115 serotype을 비롯한 7種類의 血淸型으로 分類되었다.
5. 分離된 VT 生產 大腸菌의 藥劑에 대한 感受性을 調査한 結果 AM, EM 및 MT에 대하여 分離菌 모두 耐性을 나타내었고, AK에 대하여는 分離菌 모두 感受性을 나타내었다.
6. 分離된 大腸菌의 藥劑耐性型은 分離菌 모두 3劑以上의 多劑耐性型으로 나타내 이들에 의한 疾病의 效果的인 治療를 위하여 藥劑선발에 愼重을 기하여야 할 것으로 思料된다.

Ⅵ. 參考 文獻

1) Goldschmidt,M.C & DoPont,H.L. Enteropathogenic *Escherichia coli* : Lack of correlation of serotype with pathogenicity. J. Infect. Dis,. 133, 153, 1976.

2) Dallas,W.S. & Falkow,S. The molcular nature of heat-labile enterotoxin(LT) of *Escherichia coli*, Nature, 277, 406, 1979.

3) Kinjo,T., Shimabukuro,Y. And Tamaki, M. Drug resistant strains of bacteria isolated from domestic animals in Okinawa, Bull, Agr, Univ. Ryukyu, 24, 475-486, 1977.

4) Katherine,H. and Linton,A.H. The distribution of O-antigen types of *E. coli* in normal calves, compared with man and their R plasmids carriage. J. Appl. Back., 40, 317-330, 1976.

5) O'Brien,A.D., LaVeck,G.D., thompson,M.R. and Formal, S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*, J. Infect. Dis., 146, 763-779, 1982.

6) Basta,M., Karmali,M. and Lingwood,C. Sensitive receptor-specified enzyme-linked immunosorbent assay for *Escherichia coli* verocytotoxin. J. Clin. Microbiol., 27, 1617-1622, 1989.

7) Pai,CH., Ahmed,N., Lior,H. *et al*, Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxin-producing *Escherichia coli* a two-year prospective study. J. Infect Dis., 157, 1054-1057, 1988.

8) Riley,LW. The epidemiologic, clinical and microbiologic features of hemorrhagic colitis. Annu. Rev. Microbiol., 41, 383-407, 1987.

9) Pai,CH., Gordon,R., Sims,H.V., *et al*, Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157 : H7. Ann. Int. Med., 101, 738-742, 1984.

10) Hockin,J.C. and Lior,H. Hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome caused by to *Escherichia coli* O157 : H7 in Canada. Can. Dis. Wkly Rep., 13, 203-204, 1987.

11) Karmali,M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 151, 775-782, 1985.

12) Clugston,R.E., Neilson, N.O. and Smith, D.L.T. Experimental edema disease of swine. Can. J. Comp. Med., 38, 34-43, 1974.

13) Shanks,P.L. An unusal condition affecting the digestive organs of the pig. Vet. Rec., 50, 356-358, 1938.

14) Timoney,J.E. Oedema disease of swine. Vet. Rec., 68, 849-851. 1956.

15) Strockbine,N.A., Marques,L.R.M., Newland,J.W. *et al.* Two toxin converting phasges from *Escherichia coli* O157 : H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biological activities. Infect. Immun., 53, 135-140 1986.

16) Marques,L.R.M., Peiris,J.S.M., Cryz,S.J. *et al. Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin. II. FEMS Microbiol. Letts., 44, 33-38, 1987.

17) Konowalchuk,J., Speirs,J.I. and Stavric,S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli.* Infect. Immun., 18, 775-779, 1977.

18) Karmali,M.A., Petric,M., Lim,C. *et al.* The association between hemolytic uremic syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli.* J. Infect. Dis., 151, 775-782. 1985.

19) Albert,B., William,J.H.Jr., Henry,D.I. and Shadomy, M.J. Manual of clinical microbilogy, 5th ed., 367-370, 1991.

20) Cooke,E.M. *Escherichia coli* and man. churchill Livingstone, London., 1973.

21) DuPont,H.L. *Escherichia coli* diarrhea, 219-234, 1982.

22) DuPont,H.L., Formal,S.B., Hornick,R.B. *et al.* Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. N. Engl. J. Med. 258, 1-9, 1971.

23) Ewing,W.H. Isolation and identification of *Escherichia coli* serotypes associated with diarrea disease. Center for Disease Control, Atlanta., 1963.

24) Karmali,M.A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli.* Clin. Microbiol. Rev., 2, 15-38, 1989.

25) Kauffmann,F. and Dopont,A. *Escherichia coli* Strains from infantile gastro-enteritis. Acta Pathol. Microbiol, Scand., 27, 552-564, 1950.

26) Reley,L.W., Remis,R.S., Helgerson,S.D., *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med., 308, 681-685, 1983.

27) Sack,R.B. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli.* Annu. Rev. Microbiol., 29, 333-353, 1975.

28) Tullock,E.F., Ryan,Jr.K.J., Formal,S.B. and Franklin, F.A. Invasive enteropathogenic *Escherichia coli* dysentery. annu. Intern. Med., 78. 13-17, 1973.

29) Orskov,I., Orskov,F., Jann,B. and Jann, K. Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli,* Bacteriol, Rev., 41, 667-710.

30) O'Brien,A.D. and Holmes,R.K. Shiga and Shiga-like toxins. Microbiol. Rev., 51, 206-220, 1987.

31) Endo,T., Tsurgi,K., Yutsudo,T. *et al.* Site of action of verotoxin(VT2) from *Escherichia coli* O157 : H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. Eur. J. Biochem., 171, 45-50, 1988.

32) Igarashi,K., Ogasawara,T., Ito,K. *et al.* Mode of action of verotoxins(VT1 and VT2) : demonstration of RNA N-glycosidase activity of the toxins. Abstract of international symposium and workshop on verotoxin-producing *E. coli* infections. Toronto., 12-15, 1987.

33) Morrison,D.M., Tyrell,D.L.J. and Jewell,L.D. Colonic biopsy in verotoxin-induced hemorrhagic colitis and thrombotic thrombocytopenic purpura(TTP). Am. J. Clin. Pathol., 86, 108-112, 1985.

34) Ramsay,P.G. and Neill,M.A. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with *Escherichia coli* O157 : H7. Washington Morb. Mort. Wkly. Rep., 35, 549-551, 1986.

35) Konowalchuk,J., Dickie,N., Stavric,S. and Speirs,J.L. Comparative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli.* Infect. Immun., 22, 644-648. 1978.

36) Konowalchuk,J., Dickie,N., Stavric,S. and Speirs,J.L. Properties of an *Escherichia coli* cytotoxin. Infect. Immun., 20, 575-577. 1978.

37) Gasser,C., Gautier,E., Steck,A., Siebenmann,R.E. and Oechslin,R. Lamolytisch-Uramische Syndrome : bilaterale niereninden-nekrosen bei akuten erworbenen hamolytischen anamien. Schweiz Med. Wochenschr, 85, 905-909, 1955.

38) Koster,F., Levin,J., *et al.* Hemolytic uremic syndrome a after shigellosis. Relation to endotoxemia and circulating immune complexes. N. Engl. J. Med., 298, 927-933, 1977.

39) Raghupathy.P., Date,A., Shastry,J.C.M., Sudarsanam,A. and Jadhav,M. Haemolytic-Ureamic syndrome complicating Shigella dysentery in South Indian children. Br. Med. J., 1, 1518-1521, 1978.

40) Baker,N.M., Mills,A.E., Rachman,I. and Thomas,J.E.P. Hemolytic uremic syndrome in typhoid fever. Br. Med. J., 2, 84-87, 1974.

41) Chamovitz,B.N., Hartstein,A.I., Alexander,S.R., Terry,A.B., Short,P. *et al. Campylobacter jejuni* associated hemolytic uremic syndrome in a mother and daughter. Pediatrics, 71, 253-256, 1983.

42) Prober,G.C., Tune.B. and Hoder,L. *Yersinia pseudotuberculosis* septicemia. Am. J. Dis. Child, 133, 623-624, 1979.

43) Lenz,G., Goes,U., Baron,D., Jonger,H., Heller,W., Sugg,U. and Lissner,R. Association of exposed Thomsen-Friedenreich antigen(T antigen) and acute renal failure in septic patients(letter). Lancet, i, 292-293, 1984.

44) Mettler,N.E. Isolation of microtatobiote from patients with hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura and from mites in the United States. N. Engl. J. Med., 281, 1023-1027, 1969.

45) Chan,J.C.M., Eleff,M.G. and Campbell,R.A. The hemolytic-uremic syndrome in non-related adopted siblings. J. Pediatra, 75, 1050-1053, 1969.

46) Karmali,M.A., Steele,B.T., Petric,M. and Lim,C. Sporadic cases of hemolytic uremic syndrome associated with fecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli*, Lancet, i, 619-620, 1983.

47) Sandra,B.H. and Samuel,R. Sorbitol-Ma Cconkey medium for detection of *Escherichia coli* O157 : H7 associated with hemorrhagic colitis. J.Clin.Microbiol., 23, 869-872. 1986.

48) Edwards,P.R. and Ewing,W.H. Identification of enterobacteriaceae. 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., New York, 93-136, 1986.

49) Mary,K.G. and Joel,M.D. Quantitative microtiter cytotoxicity assay for Shigella toxin. J. Clin. Microbiol, 12, 361-366, 1980.

50) Steers,E., Plotz,E.L. and Graves,B.S. Inocular replating apparatus for rutine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot. chemother., 9, 307-311, 1959.

51) 하경임, 서성일, 박종욱, 서민호. 대장균의 R-plasmid의 특성과 항균제내성. 대한미생물학회지, 25(1), 19-26, 1990.

52) Hanzawa,Y., *et al.* Incompatibility groups of R-plasmid in *Escherichia coli* isolated from animal waste. Jpn. J. Vet. Sci., 46(4), 453-457, 1984.

53) Ishiguro,N., Gato,J. and Sato,G. Genetical relationship between R plasmids derived from *Salmonella* and *Escherichia coli* obtained from a pig farm and it epidemiological significance. J. Hyg. Camb., 34, 365-379, 1979.

54) 정수판, 정석찬, 최원필. 돼지유래 대장균의 생물학적 특성과 plasmid profile에 대하여. 대한수의 학회지, 30(3), 287-295, 1990.

55) 정유주, 박연빈. 닭에서 분리한 *Escherichia coli*의 중금속 및 항생물질 내성에 관하여. 한국수의 공중보건학회지, 5(1), 5-31, 1981.

56) Kinjo,T. Durg resistant strains of bacteria isolated from domestic animals in Okinawa. II. Distribution of R facts in fecal *E. coli* strains isolated from pigs and chickens. Sci. Bull. Coll. Agr. Univ. Ryukyus. 21, 389-402, 1974.

57) Krumperman.P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. Applied and Environ. Microbiol., 46 (1), 165-170, 1983.

58) Mitsuhashi,S., Hashimoto,H. and Suzuki,K. Drug resistance of enteric bacteria. XIII.

Distribution of R factors in *Escherichia coli* strains isolated from liverstock. J. Bacteriol., 94(4), 1166-1169, 1967.

59) 박청규. 젖소유방염유래 장내세균의 약제내성 및 R-plasmids. 대한수의학회지, 21(1), 25-31, 1981.

60) Sato,G., *et al.* Detection of conjugative R plasmids confering chloramphenicol resistance in *Escherichia coli* isolated from domestic and feral pigeons and crows. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., A241, 407-417, 1978.

61) Sato,G., Ichijo,S. and Konishi,T. Incompatibility of r plasmids derived from Salmonella and *Escherichia coli* strains isolated simultaneously from a bovine fecal sample. Am. Vet. Med. Assoc., 41(12), 1982-1986. 1980.

62) 탁연빈, 정길택. 돈유래 *Escherichia coli*의 항생물질내성 및 전달성 내성인자에 관하여. 대한수의 학회지,16(2), 159-163, 1976.

63) 탁연빈, 김영홍, 박청규. 가축 장내세균의 항생물질에 대한 감수성 및 전달성 내성인자에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지. 3(1), 23-28, 1979.

64) 여상건,김정우. 설사자돈유래 *Escherichia coli*의 항균성물질 내성 및 R-plasmid. 경상대학교 축산진흥연구소보. 12, 45-49, 1985.

65) Suthienkul,O., brown,J.E., Seriwatana,J., Tienthongdee,S., Sastravaha,S. and Echeverria, P. Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retailmeats and cattle in Thailand. Appl. Environ. Microbiol., 56(4), 1135-1139, 1990.

66) Read,S.C., Gyles,C.L., Clarke,R.C., Lior,H. and McEwen,S. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli*in ground beef, pork and chicken in Southwestern Ontario. Epidemiol. Infec., 105(1), 11-20, 1990.

67) Riley,L.W., Remis,R.S., Helgerson,S.D., *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med., 308, 681-685. 1983.

68) Chik,H.Pai, James,K.K. and Gwyneth,L.M. Experimental infection of infant rabbits with Verotoxin-producing *Escherichia coli.* Infec. Immun., 51, 16-23, 1986.

69) Nancy,A.S., Lilian,R.M.M., Randall,K.H. and O'Brien,A.D. Characterization of monoclonal antibodies against Shiga-like toxin from *Escherichia coli.* Immun., 50, 695-700, 1985.

70) Blanco,J., Gonzalez,E.A., Bernardez,I. and Reguuerio,B. Differentiated biological activity of vero cytotoxin(VT) released by human and porcine *Escherichia coli* stains. FEMS Microbiol. Lettes., 20, 167-170, 1984.