

In situ hybridization기법을 이용한 shiga toxin-producing *Escherichia coli*의 검출 및 stx2의 염기서열분석

김의중^{1,2}, 이동영¹, 최혜심¹, 주세익¹, 이정희², 김상현³, 반성환³

서울대학교 의과대학 임상병리학교실¹, 서울대학교병원 임상의학연구소²,
순천향대학교 의과대학 구미병원 소아과학교실³

Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* by In Situ Hybridization and Sequence Analysis of Stx2

Eui Chong Kim, M.D.^{1,2}, Dong Young Lee, M.D.¹, Hae Shim Choi, M.S.¹, Se Ik Joo, M.S.¹,
Jung Hee Lee, M.S.², Sang Hyun Kim, M.D.³ and Sung Hwan Ban, M.D.³

Department of Clinical Pathology¹, Seoul National University College of Medicine;
Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital², Seoul; Department of Pediatrics, Kumi
Hospital, Soonchunhyang University College of Medicine, Kumi³, Korea

Background : Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) was found in several serotypes of *E. coli* including O157 serotype. Sorbitol-MacConkey agar may be useful for the detection of *E. coli* O157, but is not helpful for the detection of sorbitol-fermenting STEC other than O157. Moreover, some strains of *E. coli* O157 can ferment sorbitol. In this study, in situ hybridization using DNA probe of shiga toxin was used for the isolation of STEC from the PCR-positive stool and sequence analysis of a part of shiga toxin gene was performed.

Methods : The stool was incubated in LB broth overnight and DNA was extracted from the culture fluid. Multiplex PCR was performed with primers for stx1 and stx2 genes. Specimen showed PCR-positive was incubated on MacConkey agar and colonies were blotted with nitrocellulose membrane. Digoxigenin-labelled DNA probe for shiga toxin was made by PCR and the positive colonies were detected with anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate and nitroblue tetrazolium. Agglutination test with antisera was performed for the serotyping and VTEC-RPLA kit was used for the toxin production. Sequence analysis of PCR products was performed with automatic sequence analyser.

Results : An stx1-negative, but stx2-positive PCR was observed in a three-year-old girl, who visited Kumi Hospital on July 19, 1999 complaining of vomiting and diarrhea. The positive colonies were isolated by in situ hybridization using stx2-specific DNA probe. The titers of stx1 and stx2 by VTEC-RPLA test were negative and 1:64, respectively. Agglutination for the serotyping was not observed with all of the O antisera. 160-nucleotide sequence of stx2 of this isolate was identical with bacteriophage 933W (GenBank X07865), except for the change (T→C) of 957th nucleotide and amino acid sequence was identical each other.

Conclusions : For the sensitive detection of STEC from the stool of patients with diarrhea, multiplex PCR is recommended with stx1- and stx2-specific primers. And in situ hybridization should be performed in PCR-positive specimen for the isolation of STEC. This method may be helpful for the detection of STEC as the causative microorganisms in food-borne outbreak.

(Korean J Clin Microbiol 2000;3:94-98)

Key words : Shiga toxin, *Escherichia coli*, PCR, In situ hybridization, digoxigenin DNA probe

면, 크로이츠펔트-야콥병의 변종은 소의 해면상 뇌증이 인체에 감염된 결과라는 사실을 강력하게 시사하나 아직 전파경로와 인간의 노출정도에 대해서는 모른다 고 한다[1].

프리온 전파의 위험

특수한 경우에 프리온병은 전파될 수 있으므로 수기 상으로는 감염이 된다고 한다. 그러나 누적 자료로는 쉽게 전파되지 않으며 감염병이 아니라고 나타난다. 조직검사를 하는 병리사나 의사에서 크로이츠펔트-야콥병이 발생한 보고가 있으나, 발생률이 일반인보다 더 높지는 않다. 거기다 의료종사자와 산발형이나 획득형 크로이츠펔트-야콥병 환자의 가족들에서 질병의 발생빈도가 증가되지 않았으므로 환자 가족들에게 질병에 대하여 위험도가 증가되지 않았다고 한다. 더구나, 검사실 직원들이 오염된 조직을 취급하는 것과 크로이츠펔트-야콥병의 발병과의 관련이 된다는 어떤 뚜렷한 증거도 아직 없다. 따라서 모든 조직에서처럼 일반적 주의사항을 따라야만 한다. 부검시 주의해야 할 특별한 권고안이 발간되었다[9,10].

오염제거[1]

프리온은 대부분의 멸균법과 화학적 소독에 내성을 나타낸다. 즉, 포르말린 고정과 조직 처치, 자외선 조사, 섭씨 121도의 고압증기멸균법, 알코올 및 페놀 류의 소독약이 살균효과가 없다.

가장 효과적인 오염제거 방법이 미국과 영국사이에 약간의 의견 불일치가 있다.

영국의 권장방법 : 섭씨 134도에서 138도 사이의 고압증기멸균을 18 분 동안 시행하거나, 유리 염소를 이용하기 위하여 20,000 ppm 이상의 차아염소산 나트륨 용액 내에서 한 시간이상 노출시키는 것이다(표준 표백용액으로는 충분한 양의 유리 염소를 이용하기에는 턱없이 부족하다).

미국의 권장방법 : 섭씨 132도에서 고압증기멸균을 한 시간이상 시행하거나, 실온에서 1mol/L 수산화나트륨 용액에 넣어 둔다.

조직 불룩 : 조직에 해로운 효과가 없이 90% 개미산에서 한 시간동안 담가두어 오염을 제거하며, 그 다음 포르말린으로 고정한다

피부에 직접 접촉이 된 경우에는 1mol/L 수산화나트륨으로 수분 동안 세척한다. 접촉이 되었거나 상처가

난 피부로 노출이 된 후에 시행하는 예방법에 관해서는 합의된 방법이 없으며, 노출된 부분을 외과적으로 제거하거나 프레드니솔론을 경구로 투여한다. pentosan 이 치료가능 약제로 언급되기도 한다.

결 론

프리온은 핵산이 이용되지 않는 순수한 단백질성 감염 입자로서, 정상 단백질의 3차 구조가 변화되는 독특한 특성을 가진 새롭게 인정된 감염 인자이다. 프리온병은 모두 사망하며, 현재로서는 특이한 치료법이 없다. 프리온은 감염성은 있지만, 전염성이 있는 원인 인자는 아니다. 그럼에도 불구하고 특별한 오염 제거 방법이 추천된다.

참 고 문 헌

1. Nixon RR. *Prions and prion diseases. Lab Med* 1999;30:335-8.
2. Asher DM. *Transmissible spongiform encephalopathies. In : Murray PR, Baron EJ, et al. eds. Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington DC:ASM Press, 1999:1145-57.*
3. Prusiner SB. *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science* 1982; 216:136-44.
4. Alper T, Haig DA, Clarke MC. *The exceptionally small size of the scrapie agent. Biochem Biophys Res Commun* 1966;22:278-84.
5. Prusiner SB. *Prion diseases and the BSE crisis. Science* 1997; 278:245-50.
6. Koneman EW, Allen SD, et al. eds. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. Philadelphia:Lippincott. 1997:1223.*
7. Chesebro B. *BSE and prions : uncertainties about the agent. Science* 1998; 279:42-3.
8. Fauci AS, Braunwald E, et al. eds. *Harrison's principles of internal medicine. 14th ed. New York:McGraw-Hill. 1998:2449-51.*
9. Rank JP. *How can histotechnologists protect themselves from Creutzfeldt-Jacob disease?Lab Med* 1999; 30:305-6.
10. Baron EJ, Peterson LR, et al. eds. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology. 9th ed. St Louis:Mosby. 1994:585-6.*

서 론

Shiga toxin을 생성하는 *Escherichia coli* (STEC)는 대부분 O157형이지만, O157형 이외에도 O26, O91, O111, O103, O113 등과 같이 여러 혈청형이 있음이 밝혀졌다 [1]. 환자의 대변에서 직접 Shiga toxin 유전자를 중합 효소연쇄반응(PCR)으로 검출하더라도, 대변에는 일반 대장균이 다수 섞여 있기 때문에 STEC을 감별하기 어렵다. Sorbitol-MacConkey agar로는 O157형만 찾아 낼 수 있으며, sorbitol을 발효하는 다른 혈청형의 STEC은 통상적인 방법으로 환자의 대변에서 찾아내기가 쉽지 않다. 더구나 *E. coli* O157 중에도 sorbitol을 발효하는 균주가 있다고 보고되었다 [2]. 따라서 저자들은 PCR에서 양성을 보인 환자의 대변에서 STEC을 찾아내기 위하여, shiga toxin에 대한 DNA probe를 이용한 in situ hybridization기법을 확립하였으며, 이 방법을 통하여 설사환자의 대변에서 STEC을 분리하였고, 그 유전자의 일부에 대하여 염기서열을 분석하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

환자의 대변을 면봉으로 소량 채취하여 vancomycin (6µg/mL)을 첨가한 LB broth에 하룻밤 배양하고, 배양액 1 mL을 원심분리한 후 증류수 1 mL로 균침사를 풀고, 그 중 100µL를 100℃에서 15분간 끓이고, 원심분리 후 상층액 5µL를 DNA template로 사용하였다. Multiplex PCR을 위하여 2 쌍의 primer를 사용하였는데, Paton 등이 제안한 Stx1F와 Stx1R, 그리고 Stx2F와 Stx2R을 사용하였다 [3, 4]. Multiplex PCR은 증류수 34.5µL, 10X Buffer (Boehringer Mannheim, Germany) 5µL, 10 mM dNTP 1µL, 4 개의 primer (10 pmol/µL) 각각 1µL, Taq. polymerase (Boehringer Mannheim, Germany) 0.5µL와 DNA template 5µL를 혼합하여 총 50µL 부피로 실시하였다. Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 (Roche Diagnostic Systems, U.S.A.)에서 94℃ 30초, 60℃ 30초와 72℃ 30초로 30회 증폭하였다. 증폭산물 10µL를 2% agarose에서 100 V로 30분간 전기영동하고, ethidium bromide로 염색한 다음 Stx1과 Stx2에 해당하는 각각 180 bp와 255 bp가 관찰되는 지를 확인하였다.

PCR에서 양성으로 판정된 대변을 면봉으로 채취하

여 생리식염수 10 mL에 풀고, 10배씩 3 단계 희석한 후 각 희석액 마다 100µL를 MacConkey agar 전면에 유리 막대로 넓게 펴서 골고루 접종하여, 37℃에서 16시간 배양하였다. 이 중에서 균집락이 비교적 잘 흩어져 있는 배지를 선택하여, 30분간 냉장고에 두어 차갑게 한 다음, 증식한 균집락들을 in situ hybridization을 위하여 nitrocellulose membrane(Hybond-C, Amersham Pharmacia Biotech, USA)에 붙혔하였다. Membrane을 배지에서 떼어내기 전에 정확한 위치를 표시하기 위하여 주사바늘로 세 군데에 구멍을 뚫었다.

균집락이 묻어있는 면을 위로 향하게 하여 0.5 M NaOH로 적신 Whatman 3MM paper에 올려 놓고 2-3분간 두었다. 이 과정을 한번 더 반복하였다. 1 M Tris-HCl, pH 7.4로 적신 3MM paper로 옮기고 2-3분간 두었다. 이 과정을 한번 더 반복하였다. 1.5 M NaCl-0.5 M Tris-HCl, pH 7.4로 적신 3MM paper로 옮기고 2-3분간 두었다. Nitrocellulose membrane을 30분간 공기 중에서 말린 후, 1.5 M NaCl-0.5 M Tris-HCl, pH 7.4 용액에 담가 클리넥스 티슈를 이용하여 nitrocellulose membrane에 붙어 있는 세균 조각을 조심스럽게 완전히 떼어 내었다. 0.3 M NaCl에 담갔다 꺼내어 공기 중에서 말린 다음 80℃에서 2시간 두었다 [5].

병원성 대장균의 균집락을 찾아내기 위하여 DIG nucleic acid detection kit (Roche Molecular Biochemicals, Germany)를 사용하였는데, 시약 사용 설명서를 참조하였으며, 아래와 같이 방법을 다소 변형하였다. Nitrocellulose membrane을 비닐 백에 넣고, formamide와 동량 섞은 hybridization buffer (5X SSC; 2% blocking reagent; 0.1% N-lauroylsarcosine; 0.02% SDS) 20 mL를 가한 다음 42℃에서 160 rpm으로 2시간 흔들었다. 용액을 버리고 100℃에서 15분간 가열한 DNA probe 5µL를 넣은, formamide와 동량 섞은 hybridization buffer 5 mL를 가하고, 42℃에서 160 rpm으로 16-18시간 흔들었다. 2X SSC-0.1% SDS 용액 50 mL로 실온에서 5분씩 두 번 세척하고, 0.1XSSC-0.1% SDS 용액 50 mL로 68℃에서 5분씩 두 번 세척하였다. Nitrocellulose membrane을 buffer 1 (0.1 M maleic acid; 0.15 M NaCl, pH 7.5)-0.3% Tween-20 용액으로 1분간 세척하고, buffer 2 (buffer 1으로 1% blocking reagent를 만든 용액) 100 mL에 서서히 흔들면서 30분간 두었다. 비닐백을 이용하여 buffer 2로 5,000 배 희석한 anti-digoxigenin-alkaline phosphatase conjugate 용액 10 mL에 30분간 둔 다음, 100 mL의 buffer 1으로 15분씩 두 번 세척하였다. 20 mL의 buffer 3 (100 mM Tris-HCl, pH9.5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂)에 2분간 둔 다음 5 mL의 새로 만든 색반응 용액(10 mL의 buffer 3에 NBT/BCIP 200µL를 혼합한 용액)을 가하고 암소에 두고, 색반응이 나타나면 50 mL의 buffer 4 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)로 반응을 중지시켰다.

* 본 논문의 일부는 1999년 10월 9일 제38차 대한임상병리학회 학술대회 및 1999년 11월 27일 대한감염학회 학술대회에서 구연으로 발표하였음.

접수번호 : CM 3-2-1

교신저자 : 김 의중

(110-744) 서울시 종로구 연건동 28

서울대학교병원 임상병리과

Tel : (02) 760-3500 Fax : (02) 764-3698

E-mail : euichong@plaza.snu.ac.kr

Shiga toxin에 대한 digoxigenin-labeled DNA probe는 상기한 primer와 DIG-11-dUTP가 포함된 dNTP labeling mixture (Roche Molecular Biochemicals, Germany)를 사용하여 PCR을 통하여 제조하였다. *E. coli*의 혈청형을 규명하기 위하여 병원대장균면역혈청 세트 (Denka Seiken, Japan)를 사용하였고, 독소생성시험을 위하여 VTEC-RPLA 키트(Denka Seiken, Japan)를 사용하였다. 자동분석기를 이용하여 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석하였다.

결 과

내원 하루 전부터 잘 먹지 못하고, 3회의 설사와 1회의 구토를 주소로 1999년 7월 19일 순천향의대 구미병원 소아과에 내원한, 경상북도 석적에 거주하는 3세(생후 30개월) 여아의 대변 배양액을 multiplex PCR한 결과 stx1은 음성이었으나, stx2는 양성이었다. Stx2에 대한 DNA probe를 이용한 in situ hybridization으로 대변에서 양성 균집락을 분리할 수 있었다. 세균 동정을 위한 VITEK GNI card에서 bionumber 6004724633으로, *E. coli*로 동정되었다. 이 균주는 VTEC-RPLA에 의한 독소생성시험에서 stx1은 음성이었으나, stx2는 1:64로 양성이었다. O157 항혈청을 포함한 *E. coli*의 여러 항혈청에 응집반응이 모두 관찰되지 않았다. 160 개의 염기서열을 BLAST 프로그램에 의하여 검색한 결과 박테리오파지 933W (GenBank X07865)의 957 번 T가 C로 바뀐 것 이외에는 서로 일치하였으며, 아미노산 서열은 동일하였다.

고 찰

저자는 shiga toxin 유전자에 대한 PCR에서 양성이었던 환자의 대변에서 sorbitol-MacConkey agar를 이용하여 *E. coli* O157:H7을 검출하여 보고한 바 있다[6]. 그 후 응급실로 내원한 설사환자를 대상으로 EHEC의 검출을 위하여 stx 유전자에 대한 PCR을 계속 실시하고 있었다. 본 환자의 검체에서 stx2에 대한 PCR이 양성이었으나, sorbitol-MacConkey agar에서 무색의 균집락이 관찰되지 않았기 때문에, STEC을 통상적인 배양법으로는 검출할 수 없었다. 따라서 본 연구에서는 in situ hybridization 기법을 확립하여 환자의 대변으로부터 STEC을 찾아내고자 하였다.

균집락이 골고루 넓게 퍼져 있는 MacConkey 한천배지를 얻기 위하여, 환자의 대변 중에 세균 수를 미리 알 수 없기 때문에, 대변을 10배씩 3단계로 희석한 생리식염수 용액 100 (L를, 완전히 말린 직경 100-mm 한천배지에 접종하여 500 - 1,000 개의 균집락이 증식한 배지를 선택하여 nitrocellulose membrane에 블롯하였다. 또한 균집락의 크기가 너무 크면 블롯하기가 어려워지

므로 오후 6시경에 접종하여 배양을 시작하여 다음날 오전 9시에 블롯을 실시하여 배양시간을 15 - 16 시간으로 맞추었다. 만일 500 - 1,000 개의 균집락을 보이는 배지가 없으면, 희석배수를 조정하여 다시 접종하였다. 일반적으로 분자생물학적 연구에서 균집락의 블롯은 재조합 플라스미드를 찾기 위하여 *E. coli*를 nutrient agar에 배양하는데, 이 경우 약 8시간 지나면 균집락이 형성되지만, 본 실험에서 사용한 MacConkey agar에서는 8시간에서 균집락이 형성되지 않았기 때문에 일과시간에 맞추어 배양시간을 15 - 16시간으로 조정하였다.

한천배지에서 직접 균집락을 membrane에 블롯할 때 nitrocellulose membrane (Hybond-C) 이나 uncharged nylon membrane (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech 또는 Nylon membrane for colony and plaque hybridization, Roche Molecular Biochemicals)을 사용해야 한다. 본 실험에서 양성전하로 처리된 nylon membrane (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech 또는 positively charged nylon membrane, Roche Molecular Biochemicals)을 사용한 결과 비특이적인 양성반응이 다수 관찰되어, 균집락 블롯을 위하여 양성전하로 처리된 nylon membrane은 부적당함을 알 수 있었다. 또한 membrane에 DNA를 부착시키는 과정에서 nitrocellulose membrane은 UV cross-link가 되지 않으므로 반드시 80℃에서 2시간 이상 가열해야 한다. Nylon membrane은 80℃에서 2시간 이상 가열하거나, UV cross-link 중에서 편리한 방법을 선택할 수 있다.

본 연구에서 검출한 *E. coli*의 혈청형을 규명하기 위하여 병원대장균면역혈청 세트 (Denka Seiken, Japan)를 사용하였는데, 이 세트에 들어 있는 항혈청에 모두 응집을 일으키지 않아 혈청형을 알아낼 수 없었다. Bettelheim 등은 태국의 설사환자 458명을 대상으로 O157 EHEC shiga toxin 표지자를 사용하여 16명으로부터 STEC을 검출하였으며, 그 중 5명에서 분리한 STEC 5 균주는 O1부터 O169까지의 모든 항혈청을 사용하였는데도 응집이 일어나지 않아 혈청형을 알 수 없었다고 보고한 바 있다[7]. 이 사실은 STEC에서 지금까지 알려진 혈청형 이외에도 새로운 혈청형이 존재함을 제시하는 결과라고 하겠다. 본 실험에서는 Denka Seiken에서 제공하는 총 43종의 항혈청 (O1, O6, O8, O15, O18, O20, O25, O26, O27, O28ac, O29, O44, O55, O63, O78, O86a, O111, O112ac, O114, O115, O119, O124, O125, O126, O127a, O128, O136, O142, O143, O144, O146, O148, O151, O152, O153, O157, O158, O159, O164, O166, O167, O168, O169)과 모두 응집반응이 일어나지 않았으므로, 본 연구에서 검출한 STEC은 이들 이외의 혈청형인 것으로 생각된다.

STEC이 생산하는 Shiga toxin은 verocytotoxin이라고도 하며, 혈청학적 특징과 유전자 염기서열에 따라 크게 stx1과 stx2의 두 종류로 구분한다. Stx1은 *Shigella*

	10	20	30	40	50	60	70	80
X07865	CCTCACTCTG	AAGTGGGGGC	GAATCAGCAA	TGTGCTTCGG	GAGTATCGGG	GAGAGGATGG	TGTCAGAGTG	GGGAGAATAT
This study	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*C*****	*****
	90	100	110	120	130	140	150	160
X07865	CCTTTAATAA	TATATCAGCG	ATACTGGGGA	CTGTGGCCGT	TATACTGAAT	TGCCATCATC	AGGGGGCGCG	TTCTGTTCGC
This study	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****

Fig. 1. Nucleic acid sequence of stx2. No. 1 corresponds to No. 895 of bacteriophage 933w slt-II gene (GenBank X07865).

dysenteriae type 1의 Shiga toxin과 동일한 항원성을 가지며, 유전자 염기서열도 동일하고, 균주에 따라 염기서열에 차이를 보이지 않는다. 그러나 Stx2는 균주에 따라 다소 다양한 염기서열이 관찰되어 A subunit와 B subunit가 각각 99%와 95%의 상동성을 갖는 변이형이 보고되었다[8]. 따라서 본 연구에서 검출된 stx2가 변이형인지를 파악하기 위하여 A subunit의 일부를 대상으로 염기서열을 분석한 결과, 염기서열이 박테리오파지 933w와 비교하여 하나의 염기밖에 차이가 나지 않았기 때문에 본 연구에서 검출된 stx2는 변이형이 아닌 것으로 판단하였다.

결론적으로, 설사 환자의 대변에서 STEC을 예민하게 검출하려면 선택증균배지를 사용하여 균수를 늘린 다음 multiplex PCR을 실시하고, 양성인 검체를 대상으로 shiga toxin 유전자에 대한 표지자로 사용하여 in situ hybridization기법을 시행해야 하며, 특히 식중독 집단 발생의 원인규명을 위하여 본 연구의 방법을 이용하면 STEC을 검출하는데 큰 도움이 될 것으로 생각한다.

요 약

배 경 : Shiga toxin을 생성하는 *Escherichia coli* (STEC)에는 O157형 이외에도 여러 혈청형이 있음이 밝혀졌다. 일반적으로 병원검사에서 사용하고 있는 sorbitol-MacConkey agar로는 O157형만 찾아 낼 수 있으며, sorbitol을 발효하는 다른 혈청형의 STEC은 환자의 대변에서 검출하기 어렵다. 더구나 *E. coli* O157 중에도 sorbitol을 발효하는 균주가 있다고 보고되었다. 따라서 저자들은 shiga toxin에 대한 DNA probe를 이용한 in situ hybridization기법으로 설사 환자의 대변에서 STEC를 분리하였으며, 그 유전자의 일부에 대하여 염기서열을 분석하였다.

방 법 : 환자의 대변을 LB broth에 하룻밤 배양하고, 배양액에서 DNA를 추출하여 multiplex PCR을 실시하였다. Primer로는 Paton 등이 제안한 stx1F, stx1R, stx2F와 stx2R을 사용하였다. PCR에서 양성으로 판정된 대변을 MacConkey agar에 배양하고, 증식한 균집락들을 in situ hybridization을 위하여 nitrocellulose membrane에 블롯하였다. Shiga toxin에 대한 digoxigenin-labeled DNA probe는 PCR을 통하여 제조하였으며, anti-digoxigenin-

alkaline phosphatase conjugate와 nitroblue tetrazolium (Boehringer Mannheim, Germany)을 이용하여 양성 균집락을 검출하였다. *E. coli*의 혈청형을 규명하기 위하여 병원대장균면역혈청 세트를 사용하였고, 독소생성시험을 위하여 VTEC-RPLA 키트를 사용하였다. 자동분석기를 이용하여 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석하였다.

결 과 : 구토와 설사를 주소로 1999년 7월 19일 순천향의대 구미병원 소아과에 내원한 3세 여아의 대변 배양액을 multiplex PCR한 결과 stx1은 음성이었으나, stx2는 양성이었다. Stx2에 대한 DNA probe를 이용한 in situ hybridization으로 대변에서 양성 균집락을 분리할 수 있었다. 이 균주는 VTEC-RPLA에 의한 독소생성시험에서 stx1은 음성이었으나, stx2는 1:64로 양성이었다. O157 항혈청을 포함한 *E. coli*의 여러 항혈청에 응집반응이 모두 관찰되지 않았다. 160 nt의 염기서열을 BLAST 프로그램에 의하여 검색한 결과 박테리오파지 933W (GenBank X07865)의 957 번 T가 C로 바뀐 것 이외에는 서로 일치하였으며, 아미노산 서열은 동일하였다.

결 론 : 설사 환자의 대변에서 STEC을 예민하게 검출하려면 multiplex PCR을 실시하고, 양성인 검체를 대상으로 in situ hybridization기법을 이용해야 하며, 특히 식중독 집단발생의 원인규명을 위하여 본 연구의 방법을 이용하면 STEC을 검출하는데 큰 도움이 될 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- Abbott SL. Laboratory aspects of non-O157 toxigenic *E. coli*. Clin Microbiol newsletter 1997;19:105-8.
- Gunzer F, Bohm H, Russmann H, Bitzan M, Aleksic S, Karch H. Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol 1992;30:1807-10.
- Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev 1998;11:450-79.
- Paton AW, Paton JC. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex

- PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic E. coli hlyA, rfbO111, and rfbO157. J Clin Microbiol* 1998;36:598-602.
5. Bagdasarian M, Bagdasarian MM, *Gene cloning and expresssion*. In : Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Krieg N. ed. *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington, D.C.:American Society for Microbiology, 1994:414.
 6. 김의종, 오준호, 이환중. 환자 대변에서 중합효소연쇄 반응을 이용한 *E. coli* O157:H7의 검출. *감염* 1999;31: 420-4.
 7. Bettelheim KA, Brown JE, Lolekha S, Echeverria P. *Serotypes of Escherichia coli that hybridized with DNA probes for genes encoding shiga-like toxin I, Shiga-like toxin II, and serogroup O157 enterohemorrhagic E. coli fimbriae isolated from adults with diarrhea in Thailand. J Clin Microbiol* 1990;28:293-5
 8. Russmann H, Schmidt H, Heesemann J, Caprioli A, Karch H. *Variants of shiga-like toxin II constitute a major toxin component in Escherichia coli O157 strains from patients with haemolytic uraemic syndrome. J Med Microbiol* 1994;40:338-43.
-