

PCR 기법 이용 VTe 분비 대장균 검출

윤순식 · 박남용* · 임정택*

농촌진흥청 수의과학연구소
전남대학교 수의과대학*
(1995년 11월 29일 접수)

Detection of VTe-producing *E coli* using PCR method

Soon-seek Yoon, Nam-yong Park, Jeong-taek Lim

National Veterinary Research Institute, Rural Development Administration
College of Veterinary Medicine Chonnam National University*

(Received Nov 24, 1995)

Abstract : Several methods for rapid and accurate detection of VTe-producing *E coli* were established. These methods contain beta-glucuronidase-secretion test, beta-haemolysis-production test in blood agar, verocytotoxicity test, and PCR.

All of the VTe-producing strains made beta-haemolysis on 5% sheep blood agar. VTe-producing strains secreted beta-glucuronidase whereas 0157:H7 strains producing VTI or VTII did not secrete that enzyme. Verocytotoxicity test was established for rapid diagnosis. VTe detection was rapider in Vero cell suspension than Vero cell monolayer. In PCR, there was a positive result only in VTe-producing *E coli*, not in VTI or VTII-producing *E coli*.

In this experiment, 165 strains of *E coli* were isolated from feces or intestinal contents of post-weaning piglets showing nervous sign or diarrhea. And 20 strains of *E coli* that produced VTe were selected by verocytotoxicity test and PCR.

According to these experiments, there was a direct correlation between verocytotoxicity test and PCR. And verocytotoxicity test is recommended as a routine diagnostic method and PCR does as a accurate diagnostic method to detect VTe-producing *E coli*.

Key words : VTe, edema disease, PCR.

서 론

돼지 부종병은 이유자돈에 다발하는 질병으로서 1938년 Shank 등¹에 의해 최초 보고된 이래 여러 연구자들²⁻⁴에 의

해 보고되어온 질병이며 bowel edema 또는 gut edema라고도 알려져 왔던 질병으로서 사료의 급변에 의해 발생하며 특히 잘 자라고 건강한 자돈에 다발하는 것이 특징이다.

돼지 부종병은 용혈성 대장균이 원인체로 추정되었으나⁵⁻⁷ 분리 대장균의 인공감염결과 부종병은 유발시키는

Address reprint request to Soon-Seek Yoon, National Veterinary Research Institute, #480, Anyang 6-Dong, 430-016, Republic of Korea.

데 성공함으로써 확증되었다⁸. 부종병 이환자돈의 장 내용물 상청액을 먹임으로서 질병을 유발시켜 이를 edema disease principle(EDP)이라 명명하였으며^{4,6} 대장균의 freeze-thaw lysate를 정맥접종하여 부종병을 유발시킴으로써 이를 확인하였다⁹⁻¹¹. 이후 EDP에 관한 연구가 계속 진행되었으며 이 toxin은 Vero cell에 세포독성이 있는 Vero toxin(VT)의 일종이라는 것이 밝혀졌다¹²⁻¹⁶.

또한 Vero toxin은 Shiga-like toxin(SLT)이라고도 불리워지고 있으며 VTe는 SLTIIvariant라고 불리어지고 있다. 최근까지도 연구자에 따라 VTe와 SLTIIvariant가 혼용되고 있으며 이 논문에서는 편의상 VTe로 통일하여 사용하겠다.

대장균종 사람에서 VT를 분비하는 0157:H7 혈청형을 제외하고는 모두 beta-glucuronidase라는 효소를 가지고 있다는 것이 알려져 왔으며 이를 이용한 대장균의 동정방법이 알려져 왔다¹⁸⁻²⁰.

분리한 대장균이 부종병을 일으키는 원인균인 지를 검사하기 위해 초기에는 대장균의 0 및 K항원에 대한 항체를 이용한 슬라이드 응집반응 이용하였으며 부종병과 관계된 균주는 0138:K81, 0139:K82, 0141:K85라는 것이 밝혀졌다^{2,8,14,21,22}.

부종병 원인 대장균을 구분하는 또다른 방법으로 VTe를 검출하기 위해 Vero cell에서의 세포독성을 이용하는 진단방법이 알려져 왔으며²³⁻²⁵ 최근에 와서는 toxin 즉 단백질을 검출하는 단계를 지나 분자생물학적 방법 즉 toxin 생성 gene을 검출하는 기법으로서 DNA probe를 이용한 hybridization 진단법이²⁶⁻²⁸ 도입되었으며 특히 primer를 이용한 Polymerase Chain Reaction(PCR) 기법도²⁹⁻³² 연구되고 있다.

본 연구는 돼지 부종병 원인체의 신속한 감별을 위해 Vero cell을 이용한 세포독성 시험기법을 확립하고 신속정확한 진단기법으로 PCR 기법을 확립하고자 하며 아울러 돼지에서 Vero toxin을 분비하여 부종병을 일으키는 대장균이 beta-glucuronidase를 분비하는지의 여부를 조사하고자 한다. 또한 부종병 이환자돈, 이유후 설사중에 이환된 자돈으로부터 대장균을 분리한 후 확립한 진단기법을 적용하여 부종병 유발 원인균을 동정하고자 한다.

재료 및 방법

대장균 분리 : 1993년과 1994년도에 수의과학연구소에

병성감정의뢰된 돼지 소장 내용물 83점과 야외농장에서 채취한 분변 105점으로부터 세균분리를 시도하였다. Mac-Conkey 배지와 5% 면양혈액이 포함된 혈액배지에 심어 대장균으로 의심되는 균주를 선발하였다.

표준균주 : VTe와 VII, VIII 표준균주는 Canada Guelph 대학으로 부터 분양받아 사용하였으며 VTe 산생균주로 412(0138:K82), VTI 산생균주는 H30, VTII 산생균주는 933W를 각각 이용하였다^{16,33}.

Beta-glucuronidase 산생능 검사 : 표준균주 및 분리균주의 beta-glucuronidase 산생능 검사를 위해 2% 4-methylumbelliperyl-beta-D-glucuronide(MUG)가 포함된 Brilliant green bile broth(Biolife)¹⁸⁻²⁰에 대장균을 접종하여 4-12시간 후 Wood lamp(Thomas model UVGL-58)에서 long wave(366nm)로 관찰하여 형광을 발하는 것을 대장균으로 동정 보관하였다.

세포독성검사를 위한 VTe 준비 : 보관한 균을 꺼내어 TSB에 접종한 후 24시간 진탕배양하였다. 세균 배양액을 eppendorf tube로 옮겨 13,000rpm으로 5min 원심하여 상청액을 채취, 이를 -70℃ 냉동고에 보관하면서 세포독성 검사를 위한 VTe로 이용하였다.

세포독성 검사 : 세포배양은 5% Foetal Bovine Serum (FBS)과 Gentamicin 60μl/ml를 첨가한 alpha-Minimum Essential Medium(MEM)을 이용하였다. VTe 50μl를 세포 접종시와 monolayer 형성후에 각각 접종하여 CPE 형성유무를 도립현미경(Olympus IMT-2)으로 관찰하였다²²⁻²⁴.

Polymerase Chain Reaction(PCR) :

1) 세균 genomic DNA 추출 : 대장균 배양액 1.5ml를 eppendorf tube로 옮겨 13,000rpm으로 5min 동안 원심하여 균을 수거한 다음 boiling 방법으로 DNA를 분리하였다. 100μl의 TE로 DNA를 현탁시켜 5mg/ml RNase 2μl (100μg/ml)를 넣어 37℃로 1시간동안 배양하여 RNA를 제거하였다³⁰⁻³².

2) Oligonucleotide primer 작성 : DNA synthesizer (Applied biosystem Co. model 392)를 이용하여 primer를 작성하였으며 56℃에서 30분동안 deprotecting 시킨 뒤 농축기(Speed Vac, Savant AS290)로 건조시켜 -70℃ 냉동고에 보관하였다 Forward primer는 403-423에 위치하며 염기서열은 5' -CCA CCA GGA AGT TAT ATT TCC-3' 이며 reverse primer는 1141-1161에 위치하며 염기서열은 5' -TTC ACC AGT TGT ATA TAA AGA-3' 로 각 21 base pair(bp)이며 amplified product size는 759 base pair

이다^{29,31,34,35}.

3) 반응조건 : 작성한 Primer와 DNA를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR은 최종 100 μ l가 되게 하였으며 template DNA 1 μ l(1 μ g), 10X buffer 10 μ l, 2.5mM dNTP(final 10mM) 4 μ l, 50mM MgCl₂(final 1.5mM) 3 μ l, forward primer 및 reverse primer 각 1 μ l(50pmol), Tag polymerase 2 μ l(2.5unit), ddH₂O 78 μ l를 혼합하여 사용하였다. PCR은 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 2분, annealing 45 $^{\circ}$ C 2분, extension 72 $^{\circ}$ C 1분으로 하여 30 cycle을 하였으며 최초 denaturation은 94 $^{\circ}$ C 5분, 최후 elongation은 72 $^{\circ}$ C 7분으로 하여 Thermal cycler(Pharmacia Biotech, Gene ATAQ controller)를 이용하여 실시하였다. PCR 산물은 EtBr(ethidium bromide) 0.5 μ l/ml가 포함된 1% agarose에서 전기영동하여 UV lamp에서 band를 관찰하였다²⁹⁻³¹.

4) Primer 특이성 검사 : PCR의 특이성을 조사하기 위하여 VTe, VTI, VTII 표준균주인 412, H30, 933W로부터 genomic DNA를 추출하여 동일한 조건에서 PCR을 실시한 후 전기영동하여 759bp의 특이 band 유무를 관찰하였다.

5) PCR의 민감성 조사 : VTe 생성균주인 412 균주로부터 genomic DNA를 추출하여 Spectrophotometer(Pharmacia Biotech, Gene Quant)로 DNA양을 측정하였으며 TE로 DNA를 1 μ l부터 100ag까지 10배씩 단계희석하여 PCR을 실시하였다.

6) PCR에 의한 분리균의 VTe gene 검출 : Vero cell에 세포독성이 있는 균주의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 실시하였으며 전기영동한 다음 759bp의 특이 band 유무를 관찰하였다.

결 과

표준균주 및 분리균주의 beta-glucuronidase 산생능 검사 : VTe 표준균주로서 412, VTI 표준균주로서 H30 및 VTII 표준균주로서 933W를 공시하였다. 933W 균주는 음성을 나타낸 반면 412 균주는 양성을 나타내어 VTe 분비균주는 beta-glucuronidase를 산생하는 것으로 나타났다(Fig 1).

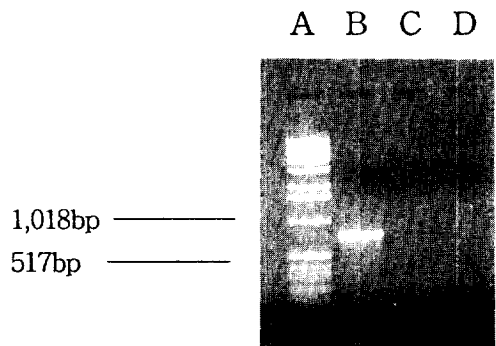
대장균 분리 : 채취한 분변 205점을 세균검사한 결과 MacConkey 배지 및 혈액배지상에서 대장균으로 의심되는 균 188주를 선발하였다. 이 균을 MUG배지에 접종하여 배양한 후 Wood lamp 아래에서 검사한 결과 23주가

음성이었으며 165주가 형광을 나타내었으며 이를 대장균으로 동정하였다.

표준균주의 Vero cell 및 HeLa cell에서의 세포독성 시험 : 96well plate에 cell을 넣은 즉시 VTe 및 VTI, VTII를 접종한 균과 monolayer를 형성한 후에 VTe를 접종한 균으로 나누어 세포독성 검사를 실시하였으며 동시접종균과 monolayer 형성한 후에 접종한 모두에서 접종후 18시간 후에 CPE를 관찰할 수 있었다. VTI 및 VTII 접종균에서는 HeLa cell의 경우도 Vero cell의 경우와 비슷하였지만 VTe 접종균에서는 Vero cell의 경우보다 세포독성이 약한 것을 관찰하였다(Fig 2-5).

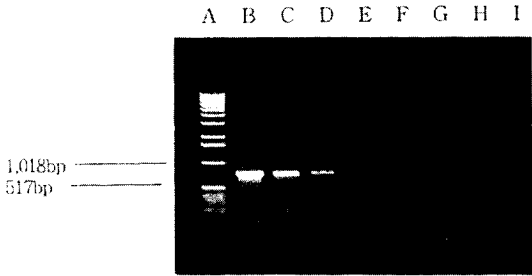
분리균주의 세포독성 시험 : MUG 배지 검사결과 양성으로 판명된 대장균에 대하여 Vero cell에서의 세포독성 검사를 실시한 결과 총 188주중 20주가 Vero cell에 세포독성이 있었다. Vero cell에 세포독성이 있는 균주는 모두 혈액배지에서 beta-hemolysis를 일으키는 것으로 나타났으며 MUG배지에서 음성을 보이는 균에 대한 세포독성 결과 모두 음성이었다. 분리균중 10주는 부종병에 이환된 돼지로부터 분리되었으며 10주는 이유후 설사증상을 보이는 자돈으로부터 분리되었다.

합성한 primer의 특이성 조사 : DNA synthesizer로 합성한 primer의 특이성을 조사하기 위하여 VTe, VTI 및 VTII 표준균주를 이용하여 PCR을 실시한 결과 VTe 표준균주에서만 759bp의 특이 band가 관찰되어 작성한 primer가 VTe에 특이성이 있는 것으로 판명되었다(Text-fig 1).



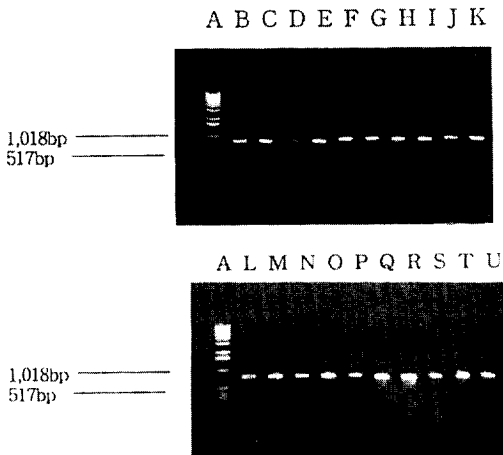
Text-fig 1. Agarose gel electrophoresis of PCR product of genomic DNA of standard *E. coli* to test specificity of PCR
Lane A : 1Kb DNA ladder
Lane B : *E. coli* strain 412(VTe)
Lane C : *E. coli* strain H30(VTI)
Lane D : *E. coli* strain 933W(VTII)

PCR의 민감성 조사 : VTe 생성균주인 412균주로부터 genomic DNA를 추출한 후 TE buffer로 1μg부터 100ag 까지 10배씩 단계회석하여 100V로 PCR을 실시한 결과 육안적으로 관찰 가능한 최소 DNA량은 10ng이었으며 사진촬영시 1ng까지 확인할 수 있었다(Text-fig 2).



Text-fig 2. Agarose gel electrophoresis of PCR product of genomic DNA of standard *E coli* to test sensitivity of PCR
 Lane A : 1Kb DNA ladder,
 Lane B : 1μg DNA, Lane C : 100ng DNA
 Lane D : 10ng DNA, Lane E : 1ng DNA
 Lane F : 100pg DNA, Lane G : 10pg DNA
 Lane H : 1pg DNA, Lane I : 100ag DNA

분리 균주에 대한 PCR : Vero cell에서의 세포독성 검사 결과 양성인 총 20주의 대장균에 대하여 PCR을 실시한 결과 20주 모두 VTe gene을 가지고 있는 것을 확인하였다(Text-fig 3).



Text-fig 3. Agarose gel electrophoresis of PCR product of genomic DNA of isolated *E coli* to detect VTe gene
 Lane A : 1Kb DNA ladder
 Lane B-U : PCR product of genomic DNA of isolated *E coli*

고 찰

돼지 부종병은 일반적으로 임상증상 및 병리조직학적 소견이 특이하기 때문에 이를 근거로 진단을 내리고 있으며 원인체의 분리 및 동정에 관한 연구가 국내에서는 거의 수행되고 있지 않다. 그러나 정확한 진단 및 심도있는 연구를 위해서는 원인체의 분리 및 동정이 필수적인 것이며 외국에서는 이에 대한 연구가 최근에 많이 수행되고 있는 실정이다^{24,26,32,36}.

돼지 부종병의 원인체 진단을 위한 접근방법은 크게 두 가지이며 세포독성을 이용해 VTe를 검출하는 방법과 VTe를 생성하는 유전자를 검출하는 방법이다. 본 실험에서는 Vero cell과 HeLa cell을 이용한 세포독성 실험과 PCR을 이용한 유전자 검출을 시도하였다.

대장균을 간단하게 동정할 수 있는 방법에 대한 연구가 수행되어 오던 중 대장균이 beta-glucuronidase를 분비한다는 사실에 기초하여 이 효소에 의해 가수분해되어 형광을 발하는 기질(substrate)인 MUG를 이용하여 손쉽게 대장균을 동정할 수 있다는 사실이 여러 연구자들¹⁸⁻²⁰에 의해 보고되었기에 본 실험에서도 MUG 배지를 이용하였다. 대부분의 대장균이 beta-glucuronidase를 분비하나 특이하게 VT를 분비하는 0157:H7 대장균은 이 효소를 분비하지 않기 때문에 VT를 분비하는 대장균의 동정을 위해서 이 배지가 이용되어 왔다. 이에 착안하여 돼지에서 VTe를 분비하여 부종병을 일으키는 대장균이 이 효소를 분비하지 않을 것이라는 가정하에 시험을 하였으나 부종병을 일으키는 대장균은 일반 대장균과 마찬가지로 beta-glucuronidase를 분비하는 것으로 판명되었다.

MUG 배지검사에서 대장균으로 판명된 균에 대하여 빠르고 정확하게 VTe 분비여부를 검사할 수 있는 방법으로서 Vero cell에서의 CPE 형성여부를 검사하였다. VTe의 접종시간을 달리하여 조사한 결과 Vero cell 현탁액과 VTe를 동시 접종한 균에서 세포변성 효과를 가장 빠르게 관찰할 수 있었으며 이 결과는 Dobrescu 등²³의 보고와 일치하였다.

1977년 Speirs 등³⁷은 대장균이 분비하는 이열성 독소(Heat-Labile Toxin, LT)를 Vero cell에 접종하였을 때 세포가 커지고 가는 섬유소가 덩굴과 같이 나오는 것을 관찰하였으며 이런 변화는 18시간 이후에는 관찰되지 않은 반면 VT는 72시간 이후에도 CPE를 일으키며 LT와는 달리 세포가 둥글게 변한다고 하였다^{23,24,38}.

여러연구자들^{35,40,41}에 의해 Vero cell과 HeLa cell에 대한 VTe의 독력의 차이는 receptor 부착능의 차이에 의한 것이라는 것이 밝혀져 왔다. 1987년 Marques 등¹⁶은 VTe는 Vero cell에는 독성이 강한 반면 HeLa cell에는 독성이 약하다고 보고하였는데 이 보고는 본 실험의 결과와 일치하였다.

본 실험 결과 Vero cell에서의 CPE 양상은 정상세포에 비해 세포가 둥글게 변하는 것으로 나타나 Speirs 등³⁷의 보고와 일치하였으며, HeLa cell의 경우도 둥글게 변하는 모습을 관찰할 수 있었으나 Vero cell의 경우보다 세포독성이 약한 것을 확인할 수 있었다. 실험결과 VTe는 HeLa cell과 Vero cell 모두에 세포독성이 있는 것으로 확인되었으나 세포독성을 이용해 VTe를 검출하기 위해서는 HeLa cell보다 Vero cell을 이용하는 것이 좋은 것으로 나타났다.

1988 Weinstein 등과 Gyles 등^{24,35}은 VTe를 encoding하는 gene의 염기서열을 분석하였으며 이를 근거로 1990년 Johnson 등³⁰, 1992년 Imberechts 등과 Woodward 등^{32,29}은 PCR 기법을 이용 VIII와 VTe를 구분하였다. 본 실험에서는 Imberechts 등이 사용한 primer를 DNA synthesizer (Applied Biosystem Co, model 392)로 합성하여 실험에 공하였으며 합성한 primer의 GC함량이 낮기 때문에 annealing 온도를 45℃로 낮게 하여 PCR을 실시하였다. 표준 균주에 대한 특이성 검사결과 VTe에만 특이성이 있는 것으로 확인되었다. PCR의 민감성을 검사하기 위하여 대장균의 genomic DNA를 1μg부터 1ag까지 희석하여 실험한 결과 1ng의 genomic DNA까지 검출할 수 있었다. 야외 분리균주중 Vero cell에 CPE를 나타내는 균주에 대해 PCR을 실시한 결과 759bp의 특이 band를 전균주에서 관찰할 수 있었다. VTI와 VTII가 돼지에서 분리됐다는 보고가 아직까지 없기 때문에, 돼지유래 대장균으로부터 VTe 검출을 위하여는 Vero cell을 이용한 세포독성시험만으로도 진단을 위해서는 충분하리라 생각된다. 그러나 VTI와 VTII를 분리하는 균주가 돼지에서도 분리될 가능성이 있기 때문에 확진을 위하여는 PCR 기법의 도입이 필요하다고 사료된다.

분리한 대장균에 대해 Vero cell에 대한 세포독성 실험과 PCR 기법을 이용한 검사결과, 본 실험에서는 총 20주의 균주를 분리하였으며 이중 10주는 부종병에 이환된 돼지에서 분리되었으며 10주는 이유후 설사증을 보이는 돼지에서 분리되었다.

결론

돼지 부종병의 진단은 주로 임상증상과 해부 및 조직소견에 의지해 왔으며 돼지 부종병을 일으키는 원인에 대한 연구가 드물었기에 이에 대한 실험을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

돼지 부종병을 일으키는 대장균은 5% 면양 혈액을 첨가한 혈액배지상에서 모두 용혈성이 있었으며 일반 대장균과 마찬가지로 beta-glucuronidase를 분비하여 MUG가 첨가된 배지에서 형광을 발했다.

돼지 부종병의 신속진단 방법으로서 Vero cell을 이용한 세포독성 실험은 실험이 간단하고 정확한 것으로 밝혀졌으며 세포를 넣은 즉시 VTe를 접종하는 것이 monolayer가 형성된 후에 넣은 것보다 CPE 형성이 뚜렷하였다. CPE는 18시간 이내에 관찰할 수 있었으며 세포가 둥글게 변하는 것이 주 소견이었다. HeLa cell에서의 세포독성 실험결과 Vero cell의 경우와 CPE 양상이 비슷하였으나 독성이 Vero cell의 경우보다 약했다.

정확한 진단방법으로서 PCR을 실시하였으며 작성한 primer는 VII와 VIII에는 특이성이 없고 VTe에만 특이성이 있는 것으로 나타나 VTe검출을 위한 primer로 이용할 수 있으며 민감성을 조사한 결과 1ng까지 검출할 수 있었다.

돼지의 가검시료에 대한 검사결과 총 165주의 대장균을 분리하였으며 세포독성 및 PCR 실험결과 Vero cell에 세포독성을 나타내는 균주는 모두 PCR에서도 양성으로 나와 두 실험의 결과가 일치하였으며 VTe를 분리하는 대장균 총 20주를 선발하였다.

Legends for figures

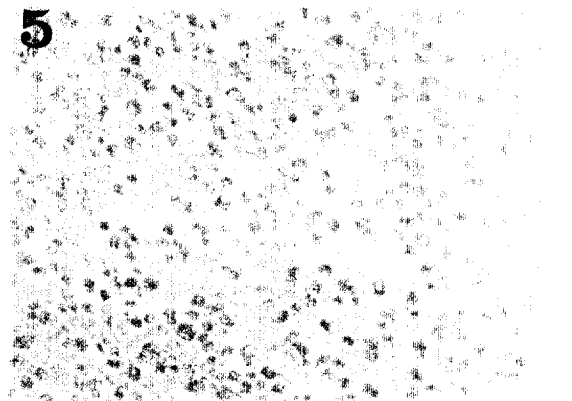
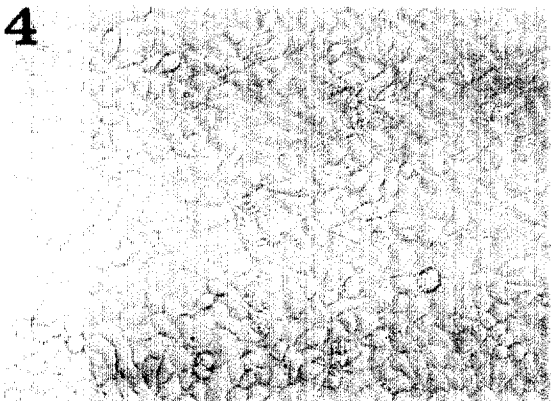
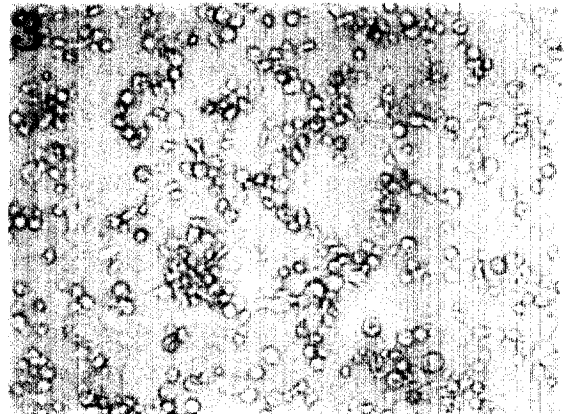
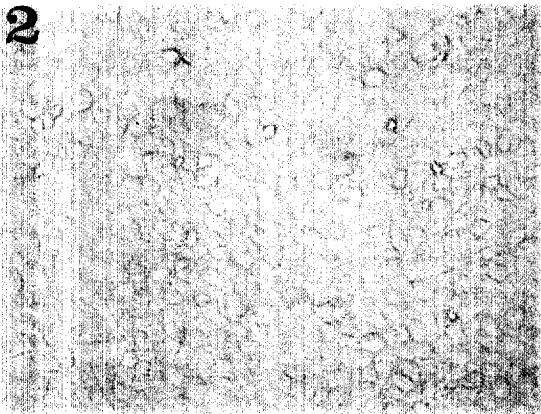
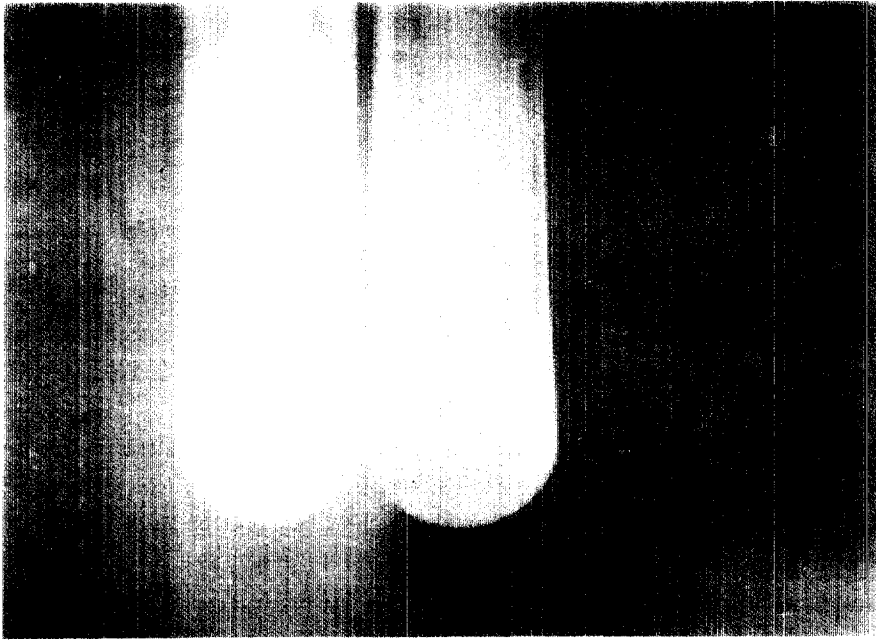
Fig 1. Negative reaction(right tube) : VTI-producing *E coli* inoculation. Positive reaction(left tube) : VTe-producing *E coli* inoculation

Fig 2. Normal Vero cell

Fig 3. CPE pattern of Vero cell inoculated with VTe : Note the rounding-up.

Fig 4. Normal HeLa cell.

Fig 5. CPE pattern of HeLa cell inoculated with VTe : Note the rounding-up.



참 고 문 헌

1. Shanks PL. An unusual condition affecting the digestive organs of pig. *Vet Record*, 50:356-358, 1938.
2. Richards WPC, Fraser CM. Coliform enteritis of weaned pigs. A description of the disease and its association with hemolytic *Escherichia coli*. *Cornell Vet*, 51:245-257, 1961.
3. Schofield FW, Schroder JD. Some important aspects of oedema disease in swine(entero-toxemia). *Can J Comp Med*, 18:24-28, 1954.
4. Timonny JF. Oedema disease of swine. *Vet Record*, 68:849-851, 1956.
5. Davis JW, Allen RC, Smibert RM. Studies on hemolytic *E coli* associated with edema disease of swine. I. Separation and properties of a toxin of hemolytic *E coli*. *Am J Vet Res*, 736-740, 1961.
6. Gitter M, Lloyd MK. Haemolytic *Bact coli* in the bowel oedema syndrom Part II-Transimssion and protection experiments. *Brit Vet J*, 113:212-218, 1957.
7. Gregory DW. Edema disease in swine. *Vet Med*, 185-187, 1954.
8. Smith HW, Halls S. The Production of oedema disease and dirrhea in weaned pigs by the oral administration of *E coli* : Factors that influence the course of the experimental disease. *J Med Microbiol*, 1:45-59, 1967.
9. Clugston RE, Nielsen NO. Experimental edema disease of swine (*E coli* enterotoxemia) I. Detection and preparation of an active principle. *Can J Comp Med*, 38:22-28, 1974.
10. Clugston RE, Nielsen NO, Smith DLT. Experimental edema disease of swine (*E coli* enterotoxemia) III. Pathology and pathogenesis. *Can J Comp Med*, 38:34-43, 1974.
11. Kurtz HJ, Short EC. Pathogenesis of edema disease in swine; Pathologic effects of hemolysis, autolysate, and endotoxin of *E coli*(0141). *Am J Vet Res*, 37:15-24, 1976.
12. Gannon VPJ, Gyles CL. Characteristic of Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease. *Vet Microbiol*, 24:89-100, 1990.
13. Gannon VPJ, Gyles CL, Wilcock BP. Effects of *E coli* Shiga-like toxines(Verotoxins) in pigs. *Can J Vet Res*, 53:306-312, 1989.
14. Linggood MA, Thompson JM. Verocytotoxin production among porcine strains of *E coli* and its association with oedema disease. *J Med Microbiol*, 25:359-362, 1987.
15. MacLeod DL, Gyles CL, Wilcock BP. Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin II variant. *Vet Pathol*, 28:66-73, 1991.
16. Marques LRM, Peris JSM, Cryz SJ, et al. *E coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol Lett*, 44:33-38, 1987.
17. O'brien AD, Holmes PK. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbial Review*, 51:206-220, 1987.
18. Petzel JP, Hartman PA. Monensin based medium for determination of total gram-negative bacteria and *E coli*. *Appl Environ Microbiol*, 49:925-933, 1985.
19. Robinson BJ. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *E coli* in foods. *Appl Environ Microbiol*, 48:285-288, 1984.
20. Trepeta RW, Edberg SC. Methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide based Medium for rapid isolation and identification of *E coli*. *J Clin Microbiol*, 19:172-174, 1984.
21. Ewing WH, Tatum HW, Davis BR. *E coli* serotypes associated with edema disease of swine. *Cornell Vet*, 48:201-206, 1958.
22. Gannon VPJ, Gyles CL, Friendship RW. Characteristics of verotoxigenic *E coli* from pigs. *Can J Vet Res*, 52:331-337, 1988.
23. Dobrescu L. New biological effect of edema disease principle(*E coli*-neurotoxin) and its use as an *in vitro* assay for this tixin. *Am J Vet Res*, 44:31-34, 1983.

24. Maniar Ac, Williams T, Anand CM, et al. Detection of Verotoxin in stool specimens. *J Clin Microbiol*, 38:134-135, 1990.
25. Petric M, Karmali MA, Arbus GS, et al. Effects of cycloheximide and puromycin on cytotoxic activity of *E coli* verocytotoxin(Shiga-like toxin). *J Clin Microbiol*, 25:1265-1268, 1987.
26. Brown JE, Sethabutr O, Jackson MP, et al. Hybridization of *E 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, 1989.
27. Shin SJ, Chang YF, Timour M, et al. Hybridization of clinical *E coli* isolates from calves and piglets in New York state with gene probe for enterotoxin (STaP, STb, LT), Shiga-like toxins(SLT-I, SLT-II) and adhesion factors(K88, K99, F41, 987P). *Vet Microbiol*, 38:217-225, 1994.
28. Thomas A, Smith HR, Rowe B. Use of digoxigenin-labelled oligonucleotide DNA probes for VT2 and VT2 human variant genes to differentiate verocytotoxin-producing *E coli* strains of serogroup O157. *J Clin Microbiol*, 31:1700-1703, 1993.
29. Imberechts H, Greve HD, Schlicker C, et al. Characterization of F107 fimbriae of *E coli* 107/86, which causes edema disease in pigs, and nucleotide sequence of the F107 major fimbrial subunit gene, *fedA*. *Infect Immun*, 60:1963-1971, 1992.
30. Johnson WM, Pollard DR, Lior H, et al. Differentiation of genes coding for *E coli* verotoxin 2 and the verotoxin associated with porcine edema disease (VTe) by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 28:2351-2353, 1990.
31. Pollard DR, Johnson WM, Lior H, et al. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *E coli* by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 28:540-545, 1990.
32. Woodward MJ, Carroll PJ, Wray C. Detection of entero-and verocytotoxin genes in *E coli* from diarrhoeal disease in animals using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*, 31:251-261, 1992.
33. MacLeod DL, Gyles CL. Purification and characterization of an *E coli* Shiga-like toxin II variant. *Infect Immun*, 58:1232-1239, 1990.
34. Gyles CL, Grandis SAD, MacKenzie C, et al. Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining verocytotoxin production in a porcine edema disease isolates of *E coli*. *Microbial Pathogenesis*, 5:419-426, 1988.
35. Weinstein DL, Jackson MP, Samuel JE. Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from an *E coli* strain responsible for edema disease of swine. *J Bacteriol*, 170:4223-4230, 1988.
36. Feng PS, Hartman PA. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *E coli*. *Appl Environ Microbiol*, 43:1320-1329, 1982.
37. Speirs JJ, Stavric S, Konowalchuk J. Assay of *E coli* heat-labile Enterotoxin with Vero cells. *Infect Immun*, 16:617-622, 1977.
38. Giugliano LG, Mann GF, Drasar BS. Response of mammalian cell line to the toxins of *E coli*. *J Med Microbiol*, 531-539, 1982.
39. Fuchs G, Mobassaleh, Donohue-Rolfé RK. Pathogenesis of *Shigella* diarrhea: Rabbit intestinal binding site for *Shigella* toxin. *Infect Immun*, 53:372-377, 1987.
40. DeGrandis S, Law H, Brunton J, et al. Globotetraosylceramide is recognized by the pig edema disease toxin. *J Biol Chem*, 264:12520-12525, 1989.
41. Samuel JE, Perera LP, Ward S, et al. Comparison of the glycolipid receptor specificities of Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variants. *Infect Immun*, 58:611-618, 1990.