

식육중 *Escherichia coli* O157 검출을 위한 enzyme immunoassay 기법 개발

정병열 · 정석찬 · 조동희 · 김종엽 · 박용호* · 신쌍재** · 김성국** · 김봉환***

농림부 수의과학검역원 세균과 · 서울대학교 수의과대학*
코넬대학교 수의과대학** · 경북대학교 수의과대학***
(1998년 3월 25일 접수)

Development of an enzyme immunoassay for detection of *Escherichia coli* O157 in meat

Byeong-yeal Jung, Suk-chan Jung, Dong-hee Cho, Jong-yeom Kim, Yong-ho Park*,
Sang-jae Shin**, Sung-guk Kim**, Bong-hwan Kim***

Department of Bacteriology, National Veterinary Research and Quarantine Services, MAF, Anyang, 430-016, Korea
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea*
New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY, 14850, USA**
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea***
(Received Mar 25, 1998)

Abstracts : A sensitive and rapid enzyme immunoassay(EIA) to detect *Escherichia coli* O157 in ground beef was developed by using a sandwich type assay with polyclonal antibodies to *E coli* O157. *E coli* O157 in ground beef could be detected within 15hr, including incubation for 12hr in enrichment broth and 3hr in immunoassay. The EIA could detect 1.3×10^5 cells of *E coli* O157/g of ground beef without enrichment. The lowest limit of detection was 0.23 *E coli* O157 per g of meat after enrichment. Confirmation was required in the positive specimens in the EIA by culture method even though the negative specimens were not. These results suggested that the immunoassay could be a very efficient method for the screening *E coli* O157 in meat.

Key words : *Escherichia coli* O157, EIA, screening.

서 론

Escherichia coli O157:H7은 1982년 미국 미시칸주와

오래곤주에서 같은 쇠고기를 먹고 출혈성 설사를 일으킨 환자로부터 처음 분리보고¹된 이후로, 이 균에 의한 식중독은 전세계적으로 발생하고 있다.² *E coli* O157:H7은 enterohemorrhagic *E coli* (EHEC) group으로 분류되며,

Address reprint requests to Dr. Byeong-yeal Jung, National Veterinary Research and Quarantine Services, #480, Anyang 6 dong Anyang, Kyunggi, 430-016, Republic of Korea.

세포벽내의 intimin에 의해 장상피세포에 부착하며, 음모 세포 파괴로 출혈성 대장염을 유발하고³, *Shigella dysenteriae* type 1이 산생하는 독소와 거의 유사한 독소를 산생하기 때문에 명명되는 shiga-like toxin(SLT) I, II와 II의 변이형 독소 등을 산생한다⁴. 비록 이러한 병원성 인자를 가지고 사람에게서 발병하는 다른 병원성 대장균이 많이 보고되고 있으나⁵ *E coli* O157:H7은 사람의 출혈성 대장염에서 가장 많이 분리되며, 심한 경우 용혈성 요독 증후군 또는 혈소판 감소성 자반병으로 진행되어 치명적이다².

이 식중독의 감염원은 아직 정확하게 밝혀져 있지는 않으나 사람에서의 발병 대부분이 조리가 덜 된 갈은 쇠고기를 섭취한 후 유발되었기 때문에⁶ 축산식품에서 이 병원체의 신속 스크리닝 기법에 대한 많은 연구가 진행 중에 있다⁷⁻¹⁰. *E coli* O157:H7의 스크리닝 및 확인에는 크게 3가지 방법을 기초로 하고 있다. 원인체 분리에 의한 방법¹¹, SLT 등 병원성 유전자에 대한 DNA probe를 이용하는 방법^{12,13} 그리고 SLT, O157 또는 H7에 대한 항체를 이용하는 방법^{7,14} 등이 있다. 균분리동정은 시간이 많이 소요되며, DNA probe를 이용하는 방법은 복잡하고 다소 특이성이 낮기 때문에 신속하고 민감하며 쉽게 사용할 수 있는 enzyme immunoassay(EIA)가 많이 이용되고 있다¹⁵. 하지만 국내에 아직 *E coli* O157:H7 검출을 위한 EIA 키트가 개발되지 않아 전량 수입에 의존하고 있는 실정이다.

따라서 이 연구에서는 쇠고기중 *E coli* O157을 신속히 검출하기 위한 스크리닝 기법을 개발하여 특이성과 민감성 및 축산식품에의 적용 가능성 등에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 : EIA에 사용된 capture antibody(cAb) 제조와 키트의 민감성 조사를 위하여 *E coli* O157:H7 ATCC 43894를 사용하였고, 특이성 조사에 사용된 균주는 Table 1에서와 같이 O₃ 등 *E coli* 32주와 *Aeromonas salmonicida* 등 총 48주를 사용하였다.

E coli O157:H7 중균방법 : 증균배지로 cefixime (50ng/ml)과 vancomycin(40μg/ml, Sigma)이 첨가된 tryptic soy broth(CV-TSB)를 사용하였다. 식육일 경우 25g을 CV-TSB 225ml와 혼합하여 균질화하였으며, 분변은 1g을 CV-TSB 9ml와 혼합하여, 37℃ 호기로 일야정치배양

하였다.

E coli O157:H7 분리동정 : 분리 및 동정은 Sanderson *et al*¹⁶의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, 일야증균액을 멸균식염수로 10³부터 10⁵배로 희석하여 cefixime (50ng/ml)과 potassium tellurite(2.5μg/ml)가 첨가된 sorbitol MacConkey agar plate(CT-SMAC)에 각각 도말하여 37℃, 호기로 일야배양하였다. 다음날 대장균과 동일한 크기의 무색집락을 모두 취하여 MacConkey agar(Difco)에 희선점종하여 37℃, 호기로 일야배양하여 붉은색 집락을 형성한 균을 BLIRA broth(Merck)에 접종, 배양한 후 350nm 자외선을 조사하여 형광을 나타내지 않는 균을 대상으로 IMViC 시험, KCN 생존능 및 cellobiose 분해능 등 생화학 시험, O157과 H7 혈청형 동정, multiplex PCR¹⁰ 등으로 *E coli* O157:H7을 확인하였다.

EIA 키트 제작 : Ewing의 방법¹⁷에 준하여 *E coli* O157에 대한 토끼면역혈청을 만든 후 automated FPLC system (Pharmacia Biotech)과 protein A cartridge(Bio Rad)를 이용하여 항체를 정제한 후 BCA protein assay kit(Pierce)로 농도를 측정하였다. 정제된 항체를 cAb로 사용하였으며, 0.1M carbonate buffer(pH 9.6)를 이용하여 microplate(Nunc)에 0.5μg/well 분주하여 37℃, 3시간 방치하였다가 4℃에서 하루 반응시킨 후 0.05%(v/v) Tween 20이 첨가된 phosphate buffered saline(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na₂HPO₄ · 7H₂O, 1.4mM KH₂PO₄, pH 7.2, PBST)으로 5회 세척하였다. 2%(w/v) skim milk(Difco)가 첨가된 PBST를 분주하여 실온에서 30분 이상 방치하여 blocking한 후, PBST로 5회 세척하여 스크리닝용 키트로 사용하였다.

EIA 키트에 의한 스크리닝 방법 : 증균된 시료의 일부를 10분간 끓인 후 실온으로 식힌 다음 EIA 키트에 100μl 분주하여 실온에서 2시간 반응시켰다. PBST로 5회 세척한 후 peroxidase labeled *E coli* O157:H7 antibody(Kirkegaard and Perry Laboratories)를 10ng/well 분주한 후 실온에서 30분 반응시킨 다음, PBST로 5회 세척하였다. TMB (Kirkegaard and Perry Laboratories)로 발색시켰으며 발색 정도는 405nm에서 측정하였다. 흡광도가 0.2 미만이면 음성, 0.2부터 0.5까지는 의양성, 0.5를 초과할 경우 양성으로 판정하였으며, 이 범위의 설정은 식육 증균액에 10⁵CFU/ml이상의 *E coli* O157을 검출하기 위한 것이다.

특이성 조사 : 제작된 EIA 키트는 증균배지내 *E coli* O157 유무를 확인하는 것이므로 증균배지 성분 외의 가양성 반응여부를 조사하였다. 즉, *E coli* O157:H7 증

균배지로 많이 사용되고 있는 TSB 및 EC broth(Difco)와 대조균으로 PBS를 사용하였으며, 일야증균된 *E coli* O157:H7을 원심수거하여 TSB, EC 및 PBS로 10⁷CFU/ml 부터 10⁰CFU/ml까지 단계희석하여 EIA 결과를 비교하였으며, *E coli* 등 48주를 순수배양하여 EIA 키트에 적용하여 제작된 키트의 특이성을 조사하였다.

민감성 및 *E coli* O157:H7의 증균양상 조사 : 식육에 *E coli* O157:H7을 1.3×10⁸CFU/g부터 1.3CFU/g까지 인공적으로 접종한 후 증균전과 18시간 증균후 EIA 적용결과를 비교하였다. 한편 식육에 인위적으로 *E coli* O157:H7을 2.1CFU/g과 0.21CFU/g을 오염시켜 18시간후 증균된 *E coli* O157:H7을 조사하였다.

적정 증균시간 조사 : *E coli* O157:H7을 식육 g당 2.3CFU와 0.23CFU를 인공적으로 접종하여 증균전, 증균 6시간, 12시간, 18시간후에 각각 EIA를 실시하였다.

EIA와 *E coli* O157:H7 분리동정의 비교 : EIA 키트의 야외적용 가능성을 알아보기 위하여 최고기 35건과 소분변 50건을 EIA 키트에 적용하여 *E coli* O157 유무를 스크리닝함과 아울러 *E coli* O157:H7 분리동정을 실시하여 성적을 비교하였다.

결 과

제작된 EIA 키트의 특이성을 조사한 결과(Table 1), *E*

Table 1. Evaluation of specificity of the EIA with pure cultures

Organism*	Serotype	EIA**	Organism*	Serotype	EIA**
<i>E coli</i>	O3:H31	-	<i>E coli</i>	O137:H41	-
	O4:H-	-		O139:H1	-
	O6:H-	-		O141:H4	-
	O8:H-	-		O149:H10	-
	O14:H-	-		O150:H6	-
	O15:H25	-		O157:H19	+
	O16:H48	-		O157:H7	+
	O38:H30	-	O157:NM	+	
	O45:H23	-	<i>Aeromonas salmonicida</i>	-	
	O51:H24	-	<i>Bacillus subtilis</i>	-	
	O55:H-	-	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	+	
	O78:H-	-	<i>Edwardsiella tarda</i>	-	
	O101:H-	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	
	O111:H-	-	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	
	O114:H32	-	<i>Listeria innocua</i>	-	
	O116:H10	-	<i>Listeria ivanovii</i>	-	
	O117:H4	-	<i>Listeria murrayi</i>	-	
	O118:H-	-	<i>Salmonella typhimurium</i>	-	
	O119:H27	-	<i>Salmonella choleraesuis</i>	-	
	O120:H6	-	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	
O123:H16	-	<i>Salmonella paratyphi A</i>	-		
O131:H26	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	-		
O132:H28	-	<i>Streptococcus agalactiae</i>	-		
O133:H29	-	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	-		

* *E coli* strains were received from Statens Serum Institute(Denmark) except O78:H-(WHO Enterobacteria center), O157:H7(ATCC 43894), O157:NM(*E coli* Reference center, USA), *Aeromonas salmonicida*(FPC 365, Japan), *Bacillus subtilis*(ATCC 6633), *Citrobacter amalonaticus*(Fairfax hospital, USA), *Edwardsiella tarda*(FPC 231, Japan), *Klebsiella pneumoniae*(NVRT 2948, Korea), *Listeria monocytogenes*(ATCC 19114), *Listeria innocua*(ATCC 33090), *Listeria ivanovii*(ATCC 19119), *Listeria murrayi*(ATCC 25401), *Salmonella typhimurium*(ATCC 19585), *Salmonella choleraesuis*(Statens Serum Institute, Denmark), *Salmonella enteritidis*(ATCC 13076), *Salmonella paratyphi A*(Statens Serum Institute, Denmark), *Staphylococcus aureus*(ATCC 5657), *Streptococcus agalactiae*(ATCC 13812), *Streptococcus dysgalactiae*(ATCC 27957).

** The results of EIA were expressed as negative(< 0.2), suspect(0.2-0.5), positive(> 0.5) on the basis of the cutoff value calculated from the negative controls at 405nm.

Table 2. Results of EIA to detect *E coli* O157 : H7 in inoculated three different medium

Medium	No. of diluted <i>E coli</i> O157 : H7(CFU/ml)							
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰
PBS	+	+	+	+	+/-	-	-	-
TSB	+	+	+	+	+/-	-	-	-
EC	+	+	+	+	+/-	-	-	-

Table 3. Detection of *E coli* O157 : H7 in inoculated beef meat with the enrichment EIA

Enrichment	No. of inoculated <i>E coli</i> O157 : H7(CFU/g)								
	1.3×10 ⁸	1.3×10 ⁷	1.3×10 ⁶	1.3×10 ⁵	1.3×10 ⁴	1.3×10 ³	1.3×10 ²	1.3×10 ¹	1.3
Pre-enrichment	+	+	+	+	+/-	-	-	-	-
Post-enrichment	+	+	+	+	+	+	+	+	+

coli O157:H19, *E coli* O157:H7, *E coli* O157:NM (nonmotile), *Citrobacter amalonaticus* 에서만 양성반응이 나타났으며, 나머지 44주에서는 모두 음성으로 나타났다.

증균배지 성분에 의한 가양성반응 유무를 조사한 결과(Table 2), PBS로 희석한 후의 결과와 TSB나 EC broth로 희석한 결과가 동일하여, 배지성분들은 전혀 EIA에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

EIA 키트의 민감성을 알아보기 위하여 쇠고기에 인공적으로 *E coli* O157:H7을 1.3×10⁸CFU/g부터 1.3CFU/g까지 10진단계별로 각각 접종하여 증균전과 증균후의 EIA 결과를 조사한 바(Table 3) 증균전에는 1.3×10⁵CFU/g까지 검출할 수 있었으나, 18시간 증균후에는 1.3CFU/g까지도 검출할 수 있었다.

식육에 오염된 *E coli* O157:H7의 증균양상을 비교조사한 바, 식육에 0.21CFU/g의 *E coli* O157:H7이 오염되어 있더라도 18시간 증균후에는 증균액 1ml에 4.2×10⁸CFU까지 증균되었다(Table 4).

Table 4. Growth of *E coli* O157 : H7 in inoculated beef meat after enrichment

Samples	No. of <i>E coli</i> O157 : H7 inoculated(CFU/g)	No. of <i>E coli</i> O157 : H7/ml of enrichment broth after 18hr enrichment
A	2.1	5.4×10 ⁸
B	0.21	4.2×10 ⁸

증균시간의 효과를 조사한 바, *E coli* O157:H7을 쇠고기 1g당 2.3CFU를 접종했을 때는 증균 6시간부터 EIA로 검출이 가능하였고, 쇠고기 1g당 0.23CFU를 접종했을 경우 증균 6시간후에는 의양성이었으나 증균 12시간이 후에는 양성반응을 보였다(Table 5).

Table 5. Effect of enrichment time to detect *E coli* O157 : H7 in beef meat

No. of inoculated <i>E coli</i> O157 : H7 in beef meat(CFU/g)	Enrichment time(hour)			
	0	6	12	18
2.3	-	+	+	+
0.23	-	+/-	+	+

쇠고기 35건과 소 분변 50건을 대상으로 EIA와 *E coli* O157:H7 분리동정을 동시에 실시하여 비교한 결과(Table 6)

Table 6. Comparing the results of EIA with those obtained with culture method

Sample(No. of samples tested)	No. of samples with indicated result			
	EIA		Culture method	
	positive	negative	positive	negative
Beef meat(35)	0	35	0	35
Bovine feces(50)	4	46	0	50

쇠고기 35건에서는 EIA와 *E coli* O157:H7 분리동정에서 모두 음성으로 나타나 100% 일치율을 보였으며, 소분변 50건중 EIA 키트에서 4건이 양성으로 나타났으나 *E coli* O157:H7은 분리되지 않았다.

고 찰

E coli O157:H7은 24시간 이내에 sorbitol을 분해하지 못하는 특성때문에 sorbitol MacConkey agar(SMAC)를 초대분리배지로 많이 사용하며¹⁸, β -glucuronidase 활성유무¹⁹, O157과 H7 항원유무 등에 근거하여 다른 *E coli*들과 구분하고 있다. 그러나 이러한 생화학 성상을 기초로 한 확인방법은 효율성이 낮아서 최근에는 면역학적인 방법을 스크리닝에 많이 이용하고 있다^{7,20}.

본 실험에서 제작된 *E coli* O157 스크리닝용 EIA 키트는 *E coli* O157:H7의 O항원에 대한 polyclonal antibody (pAb)를 cAb와 detection antibody(dAb)로 사용한 sandwich ELISA 방법이다. 따라서 *E coli*의 O항원이 157이면 H항원에 상관없이 양성반응을 나타내며, 특히 *Citrobacter amalonaticus*가 본 EIA 키트에서 양성반응으로 나타난 것은(Table 1), *E coli* 이외에 *Yersinia enterocolitica*, *Brucella* spp, *Citrobacter* spp 등도 *E coli* O157과 공통항원을 가지기^{21,22} 때문인 것으로 사료된다. 그러나 자료로 제시되지는 않았지만 *Citrobacter* spp 등은 *E coli* O157:H7 분리배지인 CT-SMAC에서 발육이 매우 억제될 뿐만 아니라 sorbitol을 분해하기 때문에 비록 EIA 키트에서 양성반응을 유발하더라도 *E coli* O157:H7 분리동정법으로 쉽게 구별이 가능하리라 본다.

제작된 EIA 키트의 증균전 민감도는 식육에 *E coli* O157:H7이 1.3×10^5 CFU/g 이상 있어야만 검출가능하였다(Table 3). 그러나 *E coli* O157:H7이 0.21CFU/g 오염되어 있더라도 18시간 증균과정을 통해 4.2×10^8 CFU까지 증균되므로(Table 4), 식육중에 수개의 *E coli* O157:H7이 오염되어 있더라도 충분히 본 EIA 키트로 검출할 수 있으리라 사료된다. 특히 *E coli* O157:H7이 식육에 0.23 CFU/g 오염되어도 12시간 증균으로 충분히 검출할 수 있었던 본 실험의 결과는(Table 5), 외국의 성적⁷과 매우 유사하였다.

쇠고기와 소 분변을 EIA 키트에 적용하여 *E coli* O157 유무를 확인함과 동시에 *E coli* O157:H7을 분리시도한 결과(Table 6), 쇠고기에서는 전혀 양성반응이 나타나지

않았으며, 소 분변중에서는 4건(8%)이 EIA에서 양성이었으나 *E coli* O157:H7이 분리되지 않은 것은 분변중에 *E coli* O157과 공통항원을 가지는 균들에 의한 것으로 추정된다²¹.

이러한 결과로 미루어 EIA 결과가 음성이면 시료에 *E coli* O157이 없으므로 더이상 *E coli* O157:H7 분리를 시도할 필요가 없으며, EIA 결과가 양성일 경우에는 *E coli* O157에 의한 양성인지 또는 O157 이외의 공통항원을 가지는 다른 균들에 의한 것인지를 *E coli* O157:H7 분리동정으로 확인하여야 할 것으로 사료된다.

축산식품중 *E coli* O157:H7 오염유무를 조사하기 위하여 전적으로 *E coli* O157:H7 분리동정에만 의존한다면 많은 시간과 노력이 소요될 것이다. 그러나 EIA 키트로 먼저 스크리닝하여 양성반응을 보인 시료에 대해서만 *E coli* O157:H7을 분리한다면 효율성을 높일 수 있다. 특히 본 EIA 키트는 증균후 3시간 이내에 결과판독이 가능하고, microplate를 이용하므로 다량의 시료를 손쉽게 처리할 수 있을 뿐만 아니라 고가의 장비를 필요로 하지 않아 *E coli* O157을 스크리닝 하기에 유용하리라 사료된다.

결 론

축산식품중 *E coli* O157의 오염유무를 신속히 확인하기 위한 EIA 키트를 제작하여 그 특이성과 민감성 그리고 쇠고기 및 소 분변 적용시험 등을 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *E coli* 등 총 48주를 순수배양하여 EIA 키트에 적용한 결과, *E coli* O157:H19, *E coli* O157:H7, *E coli* O157:NM, *Citrobacter amalonaticus*에서만 양성반응이 나타났으며, 나머지 44주에서는 모두 음성으로 나타났다.

2. 쇠고기에 인위적으로 *E coli* O157:H7을 오염시켜 EIA 키트를 적용한 결과, 증균전에는 1.3×10^5 CFU/g까지 검출 가능하였으나 12시간 증균후에는 0.23CFU/g까지 검출할 수 있었다.

3. 쇠고기 및 소 분변을 대상으로 EIA 키트와 *E coli* O157:H7 분리동정을 동시에 실시한 결과, 소 분변 50건중 *E coli* O157:H7은 분리되지 않았으나 EIA에서 4건(8%)의 양성반응이 나타났으며, 쇠고기 35건에서는 EIA와 *E coli* O157:H7 분리동정 결과가 모두 음성으로 나타나 100% 일치율을 보였다.

참 고 문 헌

1. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New Engl J Med*, 308:681-685, 1983.
2. Hockin J, Lior H. Hemorrhagic colitis and hemorrhagic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O157:H7 in Canada. *Can Dis Weekly Rep*, 13:203-204, 1987.
3. Wells JG, Davis BR, Wachsmuth K, *et al.* Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol*, 18:512-520, 1983.
4. O'Brien AD, LaVeck GD. Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1 like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 40:675-683, 1983.
5. Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infections of the Gastrointestinal Tract*, p739-761, Raven Press, NY, 1995.
6. Lamothe F, Gaudreau C, Bernard D, *et al.* Hemorrhagic colitis following the consumption of hamburgers-Quebec. *Can Dis Weekly Rep*, 9:50-51, 1983.
7. Kim MS, Doyle MP. Dipstick immunoassay to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef. *Appl Environ Microbiol*, 58:1764-1767, 1992.
8. Padhye NV, Doyle MP. Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl Environ Microbiol*, 57:2693-2698, 1991.
9. Todd ECD, Szabo RA, Peterkin P, *et al.* Rapid hydrophobic grid membrane filter-enzyme-labeled antibody procedure for identification and enumeration of *Escherichia coli* O157 in foods. *Appl Environ Microbiol*, 54:2536-2540, 1988.
10. Jung SC, Jung BY, Yoon JW, *et al.* Development of a multiplex-PCR for the rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 from raw beef. *Korean J Vet Res*, 38:173-181, 1998.
11. Okrend AJG, Rose BE, Bennett B. A screening method for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from ground beef. *J Food Prot*, 53:249-252, 1990.
12. Samadpour M, Liston J, Ongerth JE, *et al.* Evaluation of DNA probes for detection of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in food and calf fecal samples. *Appl Environ Microbiol*, 56:1212-1215, 1990.
13. Levine MM, Xu J, Kaper JB, *et al.* A DNA probes to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemolytic uremic syndrome. *J Infect Dis*, 156:175-182, 1987.
14. Weeratna RD, Doyle MP. Detection and protection of verotoxin 1 of *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl Environ Microbiol*, 57:2951-2955, 1991.
15. Flint SH, Hartley NJ. Evaluation of the TECRA *Escherichia coli* O157 visual immunoassay for tests on dairy products. *Letters Appl Microbiol*, 21:79-82, 1995.
16. Sanderson MW, Gay JM, Hancock DD, *et al.* Sensitivity of bacteriologic culture for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. *J Clin Microbiol*, 33:2616-2619, 1995.
17. Ewing WH. Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. Elsevier Science Publishing Co. 4ed, NY, 1986.
18. March SB, Ratnam S. Sorbitol-MacConkey medium for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. *J Clin Microbiol*, 23:869-872, 1986.
19. Thompson JS, Hodge DS, Borczyk AA. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* O157. *J Clin Microbiol*, 28:2165-2168, 1990.
20. Wright DJ, Chapman PA, Siddons CA. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. *Epidemiol Infect*, 113:31-39, 1994.
21. Bettelheim KA, Evangelidis H, Pearce JL, *et al.* Isolation of *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen. *J Clin Microbiol*, 31:760-761, 1993.
22. Borczyk AA, Hamett N, Lombos M, *et al.* False-positive identification of *Escherichia coli* O157:H7 by commercial latex agglutination tests. *Lancet*, 336:946-947, 1990.