

설사 자돈에서 분리된 병원성 대장균에 관한 연구

김광재, 윤교복, 최봉출, 신은경, 김종술, 박양주, 이유태

강원도가축위생시험소

Studies on enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea

Kwang-Jae Kim, Kyo-Bok Yoon, Bong-Chul Choi, Eun-Kyung Shin,
Jong-Sool Kim, Yang-Joo Park, You-Sub Lee

Kangwon Veterinary Service Laboratory

Abstract

This study was carried out to investigate the biochemical characteristics, antibiotic susceptibility, serogroups and pili producibility test of enterotoxigenic *Escherichia coli*(ETEC) isolated from piglets with diarrhea in Kangwon province from March to October 1996.

1. Sixty eight *E coli* strains were isolated from 72 piglets with diarrhea and the biochemical and cultural reaction were compared with the classification criteria of Edwards and Ewing.

2. The serogroups of 26 isolates were classified as O8 : K87 6(8.8%), O20 : K101 4(5.9%), O141 : K85 4(5.9%), O9 : K103 : P987 3(4.4%), O45 : K 2(2.9%) O139 : K82 2(2.9%), O64 : K⁻ 2(2.9%), O149 : K91 1(1.5%), O157 : K88ac 1(1.5%) and O115 : K⁻ 1(1.5%), respectively.

3. In antibiotic susceptibility test, the isolates showed high susceptible to Ak, Eno, Na, Gm, Am and Km, whereas resistance to Tc, Sm and Cf.

4. Sixty one strains(89.7%) of 68 *E coli* isolates were resistant to one or more drugs. The isolates resistant to 2 and 3 or more drugs were 60.3% and 19.1%, respectively. Among the 16 multiple resistant patterns, Sm Tc(11.5%), Cf Sm Tc(11.5%), Cf Cp Sm Su Tc(9.8%) and Cf Cp Sm Su Tc(8.2%) patterns were frequently observed.

5. MRHA of guinea pig erythrocytes was detected in 9 out of 26 OK serotype and 9 out of 42 unidentified serotypes. MRHA titers of serotypes showed from 16 to 32 in O141 : K85 and no titers in O139 : K82.

6. By the GM1 ganglioside ELISA, β -, α -, and γ -hemolysin producing strains was detected as 36, 6, and 5 from heat labile enterotoxin(LT) of 47 ETEC, respectively. The distribution of LT toxin from 112 isolates was showed β -hemolysin, 2 isolates α -hemolysin and 3 isolates γ -hemolysin from 26 OK serotypes.

Key word : Piglet with diarrhea, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Colibacillosis.

서 론

돼지의 대장균증은 주로 이유 전후의 자돈에서 집단적으로 발생하여 양돈 농가에 경제적 손실을 초래하는 큰 요인이 된다. 대장균증은 어린 돼지의 중요한 소화기 전염병으로 자돈의 연령, 모체 이행 항체의 보유 및 방어능력, 조기 이유, 사양관리, 계절적 환경요인, 각종 스트레스 등 복합적인 요인으로 인하여 일어날 수 있다¹⁻⁵⁾.

*Escherichia coli*는 건강한 동물의 장내에 존재하는 그람음성 간균으로 1893년 Jensen이 송아지 설사증의 원인이 대장균이라는 것을 보고한 이후 병원성과 관련된 많은 연구가 이루어 졌다⁶⁻⁸⁾. 병원성 대장균 감염증은 임상증세 및 발병 기전에 따라 병원성 대장균 설사증과 대장균성 장독혈증으로 구분할 수 있다.

대장균성 장독혈증의 발병기전은 이유 후 약 1주일경의 돼지에 주로 발생하는 부종병, 대장균의 균체독소에 의한 endotoxin shock와 출혈성장염 등이 있다. 부종병의 발병기전은 균체독소에 의한 과민반응설과 부종독소(edema toxin : edema disease principle)에 의한 독소설이 있다. 그러나 많은 예에서 균체독소와 부종독소가 결합적으로 작용하는 경우가 많다⁹⁾.

병원성 대장균 설사증의 발병기전은 유즙이나 사료 등에 혼입되어 섭취된 enterotoxigenic *E. coli*(ETEC)가 colonization factor인 pili항원에 의해 상부소장(십이지장과 공장)의 상피세포에 부착·증식하면서 산출하는 장독소가 소장점막을 자극하므로써 장점막을 통한 수분과 전해질 대사에 이상이 생겨 조직내 수분이 장관내로 유출됨으로써 설사가 유발되며, 특히 대장균이 산출하는 일부의 장독소는 사람에서

콜레라균의 장독소와 유사하고 설사유발 기전도 거의 같은 것으로 보고되어 있다^{2,10)}.

*E. coli*는 건강한 동물의 장내에 존재하지만, 그중에서 특정균주가 일정한 조건하에 병원성을 나타내고 있다. *E. coli*의 분류·동정에는 혈청형, 생물형, 파지형 및 전기영동 분류형이 이용되고 있다. 이중 혈청형 분류가 가장 널리 이용되고 있으며, 또한 균체항원(somatic antigen : O), 캡막항원(capsular antigen : K), 편모항원(flagella antigen : H)등을 가지고 있어 그 구조 및 항원 특이성에 의하여 혈청학적으로 분류된다. 이러한 혈청형 분류에 173개의 O항원, 80개의 K항원 그리고 56개의 H항원이 이용되고 있다¹¹⁾.

ETEC는 heat labile enterotoxin(LT)과 heat stable enterotoxin(ST)중 한개 혹은 두 독소를 동시에 생산하며, K88, K99, P987 및 F41 등의 pili항원을 보유하고 있다. 이들 독소 및 K88, K99, F41 pili항원 생산은 서로 다른 전달성 plasmid에 의해 지배되고 있으며 가장 빈번히 문제가 되는 O group은 지역에 따라 차이는 있지만 O8, O9, O10, O35, O45, O64, O101, O115, O119, O138, O139, O141, O147, O149, O157 등 특정의 혈청형에 속한다고 알려져 있다¹²⁻¹⁵⁾. 이들 중 자돈에서는 K88, K99 및 P987를 가진 대장균이, 어린 송아지와 어린양에서는 K99, F41을 가진 대장균이 주로 문제가 된다고 보고되었다¹⁵⁾.

*E. coli*의 pili생성은 균주, 배지 조성, 배양 시간 및 온도에 따라 영향을 받으며, pili부착능은 돼지의 유전형질 및 나이에 따라 부착능에 대한 감수성이 차이가 있는 것으로 보고되어 있다¹⁶⁾. Pili항원은 mannose-resistant hemagglutina-

tion(MRHA) test, 형광항체 또는 전자현미경 등에 의해 증명된다¹⁷⁻²¹⁾.

대장균성 설사증의 예방 및 치료를 위해 광범위 항생물질을 무분별하게 사용하면 감수성균은 사멸하지만 다른한편으로는 이들 약제에 대한 내성균이 출현하게 되고, 특히 다약제 내성균이 증가 하게 된다²²⁻²⁴⁾. 한편 장독소 생산과 pili항원이 내성균의 R plasmid와 상호 전달이 이루어지고 있어 설사증 예방과 치료에 어려움이 있다²⁵⁻²⁷⁾. 따라서 현재 대장균증의 치료 보다는 백신접종을 위하여 많은 연구가 학자들에 의해 활발히 진행되고 있다.

이 실험에서는 강원지역에서도 자돈의 대장균 감염증이 다발하고 있는 실정이나 아직까지 이에 대한 체계적인 조사가 이루어지지 않고 있어 본병 발생시 치료제의 선택 및 자돈설사증의 감염 예방을 위한 기초자료를 제공하고자 강원지역 양돈장에서 사육 중인 포유자돈의 설사분변에서 분리된 *E coli*의 생화학적 성상, 항생물질에 대한 감수성, 장독소 생산능, hemolysin생성 등의 특성을 파악한 바 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 균 분리재료

1996년 3월부터 9월까지 강원도 춘천, 철원, 화천, 양구지역에 위치한 37개의 양돈장에서 사육되고 있는 10~40일령의 자돈 중 극심한 설사를 동반하는 72두로 부터 면봉법(culture swab, Difco)으로 직장의 분을 채취하여 균 분리재료로 하였다.

2. E coli 분리 및 동정

대장균 분리는 가검물을 MacConkey agar plate에 접종·배양하고 유당을 분해하는 집락과 blood agar plate에서 완전용혈을 나타낸 집락 및 희백색의 smooth한 집락을 선정하여 triple sugar iron(TSI) slant에 배양하였다.

대장균의 동정은 TSI 배지에서 대장균으로 인정되는 균주를 semisolid nutrient agar에 이

식배양하고 5°C에 보존하면서 Edwards와 Ewing²⁸⁾의 방법에 준하여 OF, oxidase, IM-ViC시험 및 당분해능시험 등의 결과를 종합하여 판정하였다.

3. 혈청학적 동정

분리균의 혈청형은 Φ rskov 등²⁹⁾의 방법에 준하여 생산된 10종의 OK 항혈청을 이용하여 평판응집 방법으로 판정하였다.

4. 항균성 약제에 대한 감수성 시험

Steer 등³⁰⁾의 평판 희석법에 따라 항균제 감수성시험을 실시하였으며, 항균제의 희석은 MacLowry 등³¹⁾의 방법에 준하였다. 항균제는 amikacin(Ak), ampicillin(Am), cephalothin(Cf), chloramphenicol(Cp), enrofloxacin(Eno), gentamicin(Gm), kanamycin(Km), nalidixic acid(Na), sulfadimethoxin(Su), streptomycin(Sm), tetracycline(Tc) 등 11종의 Sigma 제품을 사용하였으며, 이들 약제별 최종 농도는 Gm은 12.5 μ g/ml, Su는 800 μ g/ml, 기타 항균제는 각각 25 μ g/ml가 되도록 brain heart infusion(BHI) agar 및 Müller-Hinton agar에 부어 평판 배지를 제조하였다.

분리균은 trypticase soy broth에 37°C에서 28시간 배양하여 멸균 생리식염수로 100배 희석한 후 multiple inoculator를 사용하여 항균제가 첨가된 배지에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하고 균의 발육 유무에 따라 내성균을 판정하였다.

5. 약제내성인자 전달시험

약제내성 유전인자(R plasmids)를 가진 68주를 공여균으로 *E coli* ML1410을 수용균으로 사용하여 내성인자의 전달 여부를 검사하였다.³²⁾

6. Pilus 생성능 검사

Mannose resistant hemagglutination(MRHA) test는 Jone과 Rutter³³⁾의 방법에 따라 Minca medium에 18~24시간 37°C에서 배양한 항원을

0.5% mannose PBS에 0.025ml씩을 U-form microplate(Dynatech laboratory)에 넣은 후 2배 계열희석하였다. Alserver solution과 동량으로 guinea-pig의 혈액을 채취한 후 PBS로 3회 세척한 다음 PBS에 1% (v/v)가 되도록 부유시켜 만든 1% guinea-pig 적혈구액 0.025ml를 dropper로 plate에 점적 하면서 잘 혼합하여 0~4℃에서 2~3시간 방치 후 혈구응집 유무를 관찰하여 판정하였다.

7. Hemolysin 생성능 확인

분리균을 혈액배지에 도말 접종한 후 37℃에서 24시간 배양하여 균주변의 용혈대를 관찰하고 용형성상에 따라 β-, α- 및 γ-hemolysin 생성능을 확인하였다.

8. 이열성 장독소(heat-labile enterotoxin : LT) 증명

LT의 증명은 WHO방법³⁴⁾에 따라 enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)법으로 실시하였다. 즉 분리균을 50ml의 Casamino acid-yeast extract medium(CYEM)에 접종하고 37℃에서 18~24시간 진탕배양하여 8,000g로 원심한 후 그 상층액을 사용하였다.

이열성 독소의 검출을 위해 100μl의 GM₁ ganglioside(1μl/ml, Sigma)를 96well plate(Costar)에 coating하고 하룻밤 방치하였다. 그 후 200μl의 PBS-Tween 20으로 3회 세척하였고, bovine serum albumin(BSA)이 3%가 되도록 첨가한 PBS-Tween 20을 100μl 첨가하였다. 이어서 37℃에서 1시간 방치한 후 200μl의 PBS Tween 20으로 3회 세척하고, CYEM에서 배양하고 원심분리하였던 상층액 100μl을 첨가하여 37℃에서 90분 동안 방치한 후 PBS-Tween 20으로 3회 세척하였다. 다음으로 BSA가 1%가 되도록 첨가한 PBS-Tween 20으로 희석한 1 : 3,200 guinea pig anticholera toxin serum(Sigma) 100μl을 첨가한 후 37℃에서 2시간 배양하였다. 1% BSA가 첨가된 PBS Tween 20에 1 : 200으로 희석한 alkaline phosphatelabelled anti-guinea pig IgG(Sigma) 100μl을 첨가한

후 다시 37℃에서 1시간 배양하였다. 그리고 PBS Tween 20으로 3회 세척하였고 이에 10% diethanolamine buffer에 용해시킨 p-nitrophenyl phosphate substrate(1μl/ml, Sigma) 100μl을 첨가하였다. 이것을 다시 37℃에서 45분간 배양후 3N NaOH 25μl으로 반응을 정지시키고 405nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

판정은 두 well의 optical density(OD)평균치를 음성 대조군의 평균치와 비교하여 OD치의 차가 0.2이상일 경우 LT생성 양성균주로 판정하였다.

결 과

1. 분리균주

강원도 4개 지역 37개 양돈장에서 설사증상을 보이는 자돈에서 분리한 대장균은 Table 1과 같이 55두 모든 유래의 72두 자돈에서 68주의 대장균을 분리하였다.

2. 분리균주의 대사 특성

분리균 68주에 대한 생화학적 성상을 검사한 성적은 Table 2와 같다. 분리균은 methyl-red 반응, catalase 생성, nitrate 환원능 및 OF 시험에서는 모두 100% 양성을 나타내었으며 Vogesproskauer 반응, citrate 이용성, oxidase 활성, gelatin액화능, H₂S 생성, sodium malonate 이용성, phenylalanine deaminase 및 urease

Table 1. The isolation frequency of E coli from rectal swab of piglets with diarrhea

Area	Pig farms	Sows	Piglets	Isolates
A	6	9	9	9
B	5	9	11	11
C	18	25	35	33
D	8	12	17	15
Total	37	55	72	68

생산능 등에서는 모두 음성이었다. 한편, aesculin 가수분해능에서는 47.1%가 양성을 보였고, 운동성이 인정된 것은 46주(67.7%)이었다.

3. 대장균 분리주의 당분해능

분리균주의 당분해능은 Table 2에서 보는 바와 같다. 즉 glucose, arabinose, fructose, lactose 및 maltose는 분리주 100%가, trehalose, xylose, mannitol은 각각 97.1%, 95.6%, 91.2%가, salicin, sucrose, adonitol은 각각 51.5%, 45.6%, 7.4%가 이용하였으나 inositol은 이용하지 못하였다.

4. 분리주의 혈청형

분리균주 68주를 대상으로 OK 혈청형을 검색한 결과 26주(38.2%)에서 혈청형이 확인되

었다. 확인된 혈청형은 O8 : K87이 6주(8.8%), O20 : K101 및 O141 : K85가 각각 4주, O9 : K103 : P987이 3주, O45 : K-, O139 : K82, 및 O64 : K-가 각각 2주, O149 : K91, O157 : K88ac 및 O115 : K-이 각각 1주로 나타났다(Table 3). 나머지 42주에서는 혈청형 구분이 되지 않았다.

5. 분리주의 항균제 감수성

분리균 68주의 항균제에 대한 감수성은 Table 4와 같다. 즉 Na, Eno 및 Ak가 각각 67주(98.5%)로 가장 감수성이 높았으며, Gm은 62주(91.2%), Am은 59주(86.8%), Km은 54주(79.4%) 등으로 중등도의 감수성이 있으나, Cp 44주(64.7%), Su 39주(57.4%), Cf 21주(30.9%), Sm 14주(20.6%), Tc 10주(14.7%) 등은 감수성이 낮았다.

Table 2. Metabolic characteristics of 68 E coli isolates

Properties	No of positive strains	%	Properties	No of positive strains	%
Indol	64	94.0	Urease	0	0
Methyl-Red	68	100.0	OF test	68	100.0
Voges-Proskauer	0	0	Aesculin	32	47.1
Citrate	0	0	Gas from glucose	68	100.0
Catalase	68	100.0	Arabinose	68	100.0
Motility	46	67.7	Xylose	65	95.6
Oxidase	0	0	Fructose	68	100.0
Lysine decarboxylase	5	80.9	Lactose	68	100.0
Arginine dihydrolase	21	30.9	Maltose	68	100.0
Ornithine decarboxykase	44	64.7	Sucrose	31	45.6
Nitrate	68	100.0	Trehalose	66	97.1
Gelatin	0	0	Adonitol	5	7.4
Hydrogen sulfide	0	0	Mannitol	62	91.2
Sodium malonate	0	0	Inositol	0	0
Phenylalanine	0	0	Salicin	35	51.5

Table 3. Serotypes of 68 *E coli* isolates

Serotypes	No. of strain	%
O8 : K87	6	8.8
O20 : K101	4	5.9
O141 : K85	4	5.9
O9 : K103 : P987	3	4.4
O45 : K-	2	2.9
O139 : K82	2	2.9
O64 : K-	2	2.9
O149 : K91	1	1.5
O157 : K88ac	1	1.5
O115 : K-	1	1.5
Non-identified	42	61.8
Total	68	100.0

Table 4. Antibiotic susceptibility of 68 *E coli* isolates

Antibiotics	No. of strain	%
Ak	67	98.5
Am	59	86.8
Cf	21	30.9
Cp	44	64.7
Eno	67	98.5
Gm	62	91.2
Km	54	79.4
Na	67	98.5
Su	33	57.4
Sm	14	20.6
Tc	10	14.7
Total	68	100.0

Ak : amikacin, Am : ampicillin, Cf : cephalothin, Cp : chlorampenicol, Eno : enrofloxacin, Gm : gentamicin, Km : kanamycin, Na : nalidixic acid, Su : sulfadimethoxin, Sm : streptomycin, Tc : tetracycline.

6. 항균제 내성균주의 내성유형

항균제 내성균의 내성양상은 Table 5에서와

같이 분리 대장균 68주 중 61주(89.7%)가 1종 이상의 약제에 내성을 보였다. 내성균 중 1제 내성 균은 7주(10.3%)이었고, 나머지 54주(79.4%)는 2~7제의 항균제에 내성을 보였다. 그중 항균제 2종과 5종류에 내성을 보이는 유형이 각각 13주(19.1%)로 출현빈도가 높았으며, 다음으로 7종 9주(13.2%), 4종 8주(11.8%), 1종 및 3종이 각각 7주(10.3%), 그리고 6종 4주(5.9%) 순으로 나타났다.

한편, 내성균의 항생제에 대한 내성유형은 16 유형이었으며, 그중 Sm Tc, Cf Sm Tc형의 출현율이 가장 높았다.

7. 내성균주의 R plasmids 전달

1종 이상의 항균제에 내성을 보인 61주를 공여균으로 ML1410을 수용균으로하여 R plasmids의 전달성을 검토한 결과는 Table 6과 같다.

즉, Km는 14주 중 12주(85.7%)가 내성인자를 전달하여 그 빈도가 가장 높았으며, 다음

Table 5. Antibiotic resistant patterns of isolates

Resistance patterns	No	%
Am Cf Gm Km Sm Su Tc	3	4.9
Am Cf Cp Gm Sm Su Tc	3	4.9
Am Cf Cp Km Sm Su Tc	3	4.9
Cf Cp Km Sm Su Tc	4	6.6
Cf Km Sm Su Tc	4	6.6
Cf Cp Sm Su Tc	3	4.9
Cf Cp Sm Su Tc	6	9.8
Cf Sm Su Tc	3	4.9
Cf Cp Sm Tc	5	8.2
Cf Sm Tc	7	11.5
Sm Tc	7	11.5
Cf Tc	3	4.9
Sm Tc	3	4.9
Sm	3	4.9
Tc	4	6.6
Cf	3	4.9
Total (16 patterns)	61	100.0

Table 6. Transfer of R plasmids from drug resistant *E coli* to recipient

Antibiotics	No. of resistant	Transferred	
		No	%
Am	9	5	55.6
Cf	47	30	63.8
Cp	24	9	37.5
Gm	6	4	66.7
Km	14	12	85.7
Su	29	14	48.3
Sm	54	19	35.2
Tc	58	20	34.5

으로 Gm은 6주 중 4주(66.7%), Cf는 47주 중 30주(63.8%), Am은 9주 중 5주(55.6%), Su는 29주 중 14주(48.3%), Cp는 24주 중 9주(37.5%), Sm은 54주 중 19주(35.2%), Tc는 58주 중 20주(34.5%) 순으로 나타났다.

8. *E coli*의 pili 생성능

분리균 68주에 대한 pili 생성능을 MRHA법

으로 검사한 결과 OK혈청형이 구분되었던 26주에서는 9주(34.6%)가, 혈청형의 구분이 되지 않았던 42주에서는 7주(16.7%)가 양성으로 나타났다. 한편, O8 : K87, O9 : K103 : 987P 및 O45 : K-의 혈청형을 갖는 균주에서는 각각 1주에서 MRHA 역가가 64배로 높게 나타났고, 혈청형이 되지 않았던 42주에서는 7주가 2배에서 64배까지의 역가를 보였다(Table 7).

9. 이열성 장독소 생산능

분리 *E coli* 68주를 대상으로 hemolysis 및 이열성 장독소 생성 여부를 조사한 바 Table 8에서 보는 바와같이 47주(69.1%)가 이열성 장독소를 생성하였다. 이중 36주가 β -hemolysin, 6주가 α -hemolysin 그리고 5주가 γ -hemolysin을 생산하였다. 한편 OK혈청형의 분류가 가능하였던 26주에서는 16주가 이열성 장독소를 생성하였으며 이중 11주가 β -hemolysin을, 나머지 각 2주가 α -hemolysin 및 γ -hemolysin을 생성하여 이열성 장독소와 hemolysin 생성간에는 밀접한 상관관계를 나타내었다.

Table 7. Mannose resistant-hemagglutination titers of *E coli* isolates serotypes

Strains	No of strains	Positive strains	MRHA titers						
			2	4	8	16	32	64	128
O8 : K87	6	1						1	
O20 : K101	4	1			1				
O141 : K85	4	2				1	1		
O9 : K103 : P987	3	1							1
O45 : K-	2	1							1
O139 : K82	2	0							
O64 : K-	2	1		1					
O149 : K91	1	1					1		
O157 : K88ac	1	1							
O115 : K-	1	0							
Non-identified	42	7	1	1	1	1	1	1	2

*Somatic capsular antigen

**Mannose resistant-hemagglutination test

Table 8. Correlation of hemolysin and enterotoxin(LT) released from *E coli* and OK serotypes

Hemolysin	LT* from 68 <i>E coli</i>		LT from 26 OK** serotypes	
	+ ^a	- ^b	+	-
α	6	1	2	2
β	36	10	11	5
γ	5	4	3	2
Total(%)	47(69.1)	14(29.8)	16(61.5)	9(34.6)

* : Heat-labile toxin, ** : Somatic capsular antigen

a : Product of heat labile toxin, b : Non-product of heat labile toxin

고 찰

우리 나라의 최근 5년('91~'95)간 수의과학연구소의 병성감정 실적 통계에 따르면 총 733건에서 세균성 질병이 446건(60.8%)이었고 그 중에서도 대장균증은 176건(24%)이며, 부종병은 79건(10.8%)으로써 대장균에 의한 질병 발생률은 전체 질병 발생건수의 약 34.8%를 차지하는 것으로 밝혀져 있다. 우리나라에서 발생하고 있는 돼지의 대장균성 설사증은 주로 생후 2~4주령에 다발하며 이것은 모체 이행 항체의 소멸 시기인 2~3주령에 농장에 상재해 있는 병원균의 침입으로 인한 것이며 이러한 질병을 앓은 자돈은 폐사 또는 성장지연 등 경제적으로 큰 피해를 가져온다. 따라서 설사병으로 인한 피해를 줄이는 방향의 연구가 절실히 요구된다고 본다. 자돈의 병원성 대장균증은 병원성 대장균이 소장점막에 부착하여 증식하면서 enterotoxin을 생산하여 설사를 일으키지만, ETEC라 해도 소장점막에의 부착 능력이 없으면 설사를 일으키지 못하므로 소장점막에 균체를 부착케하는 pili항원은 자돈 설사증에 주요한 역할을 하고 있다.

심한 설사를 하는 자돈 72두에서 분리된 68주의 대장균에 대한 생화학적 성상은 Edwards와 Ewing²⁸⁾의 분류기준과 거의 일치하였으며, 지금까지 자돈의 대장균성 설사증에서 분리된 대장균의 O혈청형은 지역에 따라 차이는 있으나 비교적 소수의 혈청형에 한정되고 있는데, O2, O6, O8, O9, O20, O32, O45, O64, O98, O101, O115, O138, O139, O141, O147,

O149, O157 등이 주로 많이 분리되고 있다.^{22,35~40)} 이 실험에서 설사자돈 72두에서 분리된 야외주 68주의 혈청형 동정을 위해 Φ rskov 등의 방법²⁹⁾에 준하여 생산된 10종의 OK 항혈청을 이용하여 평판 응집반응법으로 26주의 혈청형을 확인하였다. 이들중 높은 분리빈도를 나타낸 OK 혈청형은 O8 : K87(8.8%), O20 : K101(5.9%), O141 : K85(5.9%), O9 : K103 : P987(4.4%), O45 : K-(2.9%), O139 : K82(2.9%), O64 : K-(2.9%), O149 : K91(1.5%), O157 : K88ac(1.5%), O115 : K-(1.5)의 10종으로서 전체의 38.2%였으며 미확인된 혈청형은 42주였다. 이들 OK혈청형은 자돈의 대장균증과 관련된 주요 혈청형으로서 강원지방의 양돈장에서 발생하는 대장균의 OK 혈청형의 분포가 다른 연구자들의 보고와 유사함을 알 수 있었다. 또한 Ree⁴¹⁾는 자돈에서 부종병을 일으키는 주요 원인 대장균의 혈청형은 O138 : K81, O139 : K82, O141 : K85 등이라고 보고하였는데 Dune과 Lemman²⁾ 그리고 Kim³⁾도 같은 견해를 표명하고 있다. 분리된 *E coli* 68주의 항생물질에 대한 감수성 시험 및 내성 양상을 조사하였던 바 Na, Eno, Ak, Gm 및 Am 등에서는 각각 98.5%, 98.5%, 98.5%, 91.2%, 86.8%의 높은 감수성을 나타내었으나 Sm, Tc에 대해서는 각각 20.6%, 14.7%로 나타내어 높은 내성이 있음을 알 수 있었다.

분리균 68주에 대한 항균제 감수성검사 결과 Tc, Sm에 내성인균이 각각 85.3%, 79.4%로 가장 많았으며 Cf에 내성인균이 69.1%, Su 및 Cp에 대한 내성 균이 각각 42.6%, 35.3% 등으로

나타났는데, 이는 Kim 등⁴²⁾이 Tc, Sm에 각각 93.6%, 82.6%의 내성균이 존재한다는 보고와 유사하였다. 약제별 내성 양상을 알아보기 위한 공시균 68주에 대한 내성균 조사에서는 단제 내성균 보다는 다제 내성균의 출현이 높았고 전체적인 약제내성 유전자의 전달률은 89.7%로 나타났으며 각 약제별 내성인자 전달빈도는 Km이 85.7%로 가장 높게 나타난 반면 Tc는 34.5%로 가장 낮게 나타났다. Km의 경우 내성균 출현율은 높았지만 내성인자 전달빈도가 낮게 나타나 이와 최⁴³⁾, 조 등⁴⁴⁾의 성적과 유사하였으며, 전체적으로 Tc, Sm에서 약제 내성균이 가장 많이 출현하는데 이는 Sm 과 Tc를 사료 첨가제 또는 치료약제로 널리 사용하여 왔기 때문인 것으로 판단되었다.

탁과 정⁴⁵⁾, Dey 등⁴⁶⁾은 사료 첨가제에 의한 다제 내성균의 출현이 크게 문제시되고 있음을 입증한 바 있다.

Pili에 의한 MRHA 등은 pili가 상피세포에 부착하는 것과 같은 기전에 의하며, pili의 manose binding activity가 상피세포에 부착하는 작용 및 탐식세포의 탐식작용과 관련된다^{47,48)}. 또한 대장균의 소장벽 부착력은 yeast cell이나 적혈구 응집력과 밀접한 관계가 있으며 K88과 K99는 MRHA능력이 있는 반면 type I somatic common pili는 혈구응집능이 없으며, F41은 기니피크와 사람 A형 적혈구를 강하게 응집하나 기니피크는 적혈구를 응집하지 못한다^{49~52)}. Pili 생성능 검사를 위하여 Minca broth를 이용하여 혈청형 동정 야외주와 미 혈청형 동정 야외주의 MRHA test를 실시하였다. 26주 OK혈청형에서는 9주(34.6%)가, 42주의 미확인 항혈청형에서는 7주(16.7%)가 양성 반응을 나타냈으며 O8 : K87은 64배의 MRHA가를 나타내었고 O64 : K-은 4배의 저조한 MRHA가를, O139 : K82는 MRHA의 반응이 없었다. 이러한 결과는 OK 혈청형이 동정된 균에서 MRHA로 인해 pili생성능을 잘 보였다는 연구자들의 결과와 일치함을 확인할 수 있었다^{53~55)}.

미동정 혈청형 46주에 대한 MRHA가는 2배에서 64배까지의 다양한 pili 생성능을 나타내었는데, 이는 Clegg⁵¹⁾의 돼지에서 분리된 대장

균의 혈청형과 미동정된 혈청형에서의 MRHA가의 양성 반응의 성적과 일치함을 확인할 수 있었다.

여러 연구자들은 토끼 회장결찰 시험법과 신생 마우스 검정법 그리고 GM1 ganglioside ELISA등을 이용하여 대장균의 이열성 및 내열성 장독소에 대하여 연구^{14,56~58)}한 바 있으며 hemolysin 생성과 상관관계에 대해 보고를 하였다. 이 연구에서는 분리한 대장균에 대하여 hemolysin 및 장독소 생성여부를 알아보기 위해 GM1 ganglioside ELISA⁵⁶⁾를 응용하였다. 그 결과 야외주 68주 중 6주가 α -hemolysin을 생성하였고, 36주가 β -hemolysin, 5주가 γ -hemolysin을 생성하였으며 47주가 이열성 장독소를 생성하였다.

최근 전문화, 집약화 되는 양돈경영에 있어서 동물의 질병치료 및 예방목적으로 복합 항균제의 구분별한 사용이 이루어지고 있는데 이는 내성균 특히 다제 내성균의 출현을 가속화시킴으로써 약제내성 병원성 대장균에 의한 자돈 설사증의 예방과 치료에 커다란 영향을 미칠 것으로 판단된다. 따라서 대장균성 설사증의 효과적인 예방을 위해서는 여러 지역 양돈장을 대상으로 폭 넓은 혈청형의 분포조사를 통한 효과적인 백신개발과 함께 제한효소에 의한 plasmid분석과 병원성 관련 인자의 encoding gene을 밝히는 연구가 이루어져야 된다고 생각된다.

결 론

강원도내 양돈장에서 채취한 돼지 직장 내용물에서 *E coli* 특성을 조사하기 위하여 분리균에대한 생화학적 성상, 항생물질의 감수성 시험, OK혈청형 동정, 장독소 및 hemolysin 생성에 관한 조사를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 강원지방 양돈장의 설사증세를 보이는 72두의 자돈에서 68주의 대장균을 분리하였으며, OK혈청형으로 동정된 것은 26주(38.2%)로써, O8 : K87 6주(8.8%), O20 : K101 4주(5.9%), O141 : K85 4주(5.9%), O9 : K103 : K987 3주

(4.4%), O45 : K- 2주(2.9%), O139 : K82 2주(2.9%), O64 : K- 2주(2.9%), O149 : K91 1주(1.5%), O157 : K88ac 1주(1.5%), O115 : K- 1주(1.5%) 등 이었다.

2. 분리된 약외주는 amikacin(98.5%), enrofloxacin(93.5%), nalidixic acid(98.5%), gentamicin(91.2%) 등에 높은 감수성을 보인 반면, tetracycline(85.3%), streptomycin(79.4%), cephalothin(69.1%) 등에는 낮은 감수성을 보였다.

3. Pili생성능 검사에서는 OK 혈청형 26주 중 9주(34.6%)에서 MRHA양성 반응이었으며 42주의 미분류 OK혈청형에서는 7주(16.7%)가 양성 반응을 나타내었다.

4. 이열성 장독소도 OK 혈청형 26주 중 16주에서 생성되었으며 이중 2주가 α -hemolysin, 11주가 β -hemolysin, 그리고 3주는 γ -hemolysin을 생성하였다.

참고문헌

1. Sojka WJ. 1965. *Echerichia coli* in domestic animals and poultry. Commonwealth Agr Bureau, Bucks.
2. Dune HW, Leman AB. 1975. Diseases of swine. 4 ed., Iowa State Univ Press, Ames. 650.
3. Kim BH. 1978. Enteric colibacillosis in pigs. A review. *Korean J Vet Publ Hlth* 2 : 80.
4. Sojka WJ. 1973. Enteropathogenic *Echerichia coli* in man and Animals. *Can Inst Food Sci Technol* 6 : 52.
5. 김봉환. 1981. 자돈의 하리성 질병의 예방과 치료(上). *대한수의사회지* 17(3) : 16-22.
6. Smith HW, Sheila H. 1967. Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J Path Bacteriol* 93 : 531-543.
7. Nielsen NO, Moon HW, Roe WE. 1968. Enteric colibacillosis in swine. *JAVMA* 153 : 1590-1606.
8. Smith HW, Linggood MA. 1971. Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference diarrhea. *J Med Microbiol* 4 : 457-485.
9. 김봉환, 김동성, 이창구. 1981. 자돈의 병원성 대장균에 관한연구. 1. 양돈 농가 실태 및 설사 자돈에서 분리한 대장균의 성장조사. *대한수의학회지* 21(2) : 81-86.
10. Gyles CL, Stevens JB, Craven JA. 1971. A study of *Echerichia coli* strains isolated from pigs with gastrointestinal disease. *Can J Comp Med* 35 : 258.
11. Gyles CL. *Escherichia coli*. Pathogenesis of bacterial infections in animal. 2 ed. Gyles CL and Thoen Co : 164-187.
12. Clegg S. 1982. Serological heterogeneity among fimbrial antigens causing mannose-resistant hemagglutination by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 35 : 745-748.
13. Costea SR, Hoopes KH. 1979. Sensitivities of *Escherichia coli* antimicrobial antibiotics. *Am J Vet Res* 41 : 1880-1883.
14. Czerkinsky CC, Svennerholm AM. 1983. Ganglioside GM1, enzyme-linked immunosorbent assay for simple identification of heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 17 : 965-969.
15. Clantz PJ, Kradel DC. 1971. *Escherichia coli* O149 : K91, K88ac : H10 isolated from pigs with colibacillosis in the United States. *Am J Vet Res* 32 : 1607-1608.
16. Bijlsma IG, de Nijs A, Vander Meer C, et al. 1982. Different pig phenotypes affect adherence of *Escherichia coli* to jejunal brush borders by K88ab, K88ac or K88ad antigen. *Infect Immun* 37 : 891-894.
17. De Graaf FK, Klaasen-Boor P, Van Heer JE. 1980. Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. *Infect Immun* 30 : 125-132.
18. De Graaf FK, Wientjes FB, Klaasen-Boor

- P. 1980. Production of K99 antigen by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of antigen group O8, O9, O20 and O101 grown at different conditions. *Infect Immun* 27 : 216-222.
19. Evans DG, Evans DJ, Tava WS, et al. 1978. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adult with diarrhea. *Infect Immun* 19 : 727-736.
 20. Gaastra W, Graaf FK. 1982. Host-specific fimbrial adhesions of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol Rev* 46 : 129-161.
 21. Guinee PAA, Veldkamp J, Hansen WH. 1977. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 15 : 676-678.
 22. 윤용덕, 김종만, 김동성 등. 1983. 돼지 세균성 소화기 질병에 관한 연구, 1. 자돈의 대장균성 설사병의 예방 및 치료에 관한 연구. *한국축산과학연구보고* 3 : 136-151.
 23. 김현수, 탁연빈. 1985. 하리자돈으로 부터 분리한 대장균에 관하여. *한국수의공중보건학회지* 9 : 19-28.
 24. 김순재, 노상석. 1986. 대장균증에 걸린 어린 돼지에서 분리한 용혈성 대장균에 관한 연구. *건국대학교 논문집* 11 : 195-210.
 25. Anderson ES. 1986. Drug resistance in *Salmonella typhimurium* and its implications. *Brit Med J* 3 : 333-339.
 26. Hard K. 1981. Bacterial plasmids. Thomas Nelson Ltd. Hong Kong : 50-74.
 27. Watanabe T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol Rev* 27 : 87-115.
 28. Edwards PK, Ewing WH. 1972. Identification of enterobacteriaceae. 3 ed. Burgess Publishing Co, Minneapolis, Minnesota : 93-134.
 29. Ørskov I, Ørskov F, Jann B, et al. 1977. Serology, chemistry and genetics of O and K antigen of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* 41 : 667-710
 30. Steer E, Foltz FL, Graves BS, 1959. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiotic Chemother* 9 : 307.
 31. Macclowry JD, Jague MJ, Selepak T. 1970. Detailed methodology and implementation of a semi-automated serial dilution micro-technique for antimicrobial susceptibility testing. *Appl Microbiol* 20 : 46-53
 32. Ishiguro N, Gato J, Sato G. 1980. Genetical relationship between R plasmid derived from *Salmonella* and *Escherichia coli* obtained from pig farm and its epidemiological significance. *J Hyg Camb* 84 : 365.
 33. Jones GW, Rutter JM. 1972. Role of the K88 antigens in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect Immun* 6 : 918.
 34. World Health Organization(WHO). 1983. Manual for laboratory investigation of acute enteric infection. *CDD*. 38-44.
 35. Soderlind O, Mollby R. 1979. Enterotoxins O-groups and K88 antigen in *Escherichia coli* from neonatal piglets with and without diarrhea. *Infect Immun* 24 : 611-616.
 36. Wilson RA, Francis DH. 1986. Fimbriae and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. *Am J Vet Res* 47 : 213-217.
 37. Chen C, Kume T, Nakazawa M, et al. 1984. *Escherichia coli* originated from diarrhea of suckling piglets in Taiwan. II. Serological properties. *Kitasato Arch Exp Med* 57 : 211-220.
 38. Murray CJ. 1987. *Salmonella* and *Escherichia coli* from veterinery and human sources in Australia during 1985 and 1986. *Aust Vet J* 64 : 256-257.

39. 윤용덕, 김종만, 김동성. 1984. 자돈의 대장균성 설사증에 관한 연구. 1. 설사 자돈으로부터 분리된 병원성 대장균의 혈청형 분포 조사. 농시보고 26-1(축산, 가위) : 66-71.
40. 김봉환. 1981. 자돈의 병원성 대장균에 관한 연구. 2. 설사자돈으로부터 분리한 대장균의 혈청형 동정. 대한수의학회지 21 : 87-91.
41. Ree TA. 1959. Studies on *Escherichia coli* of animal origin. 3. E coli serotypes from pigs. *J Comp Pathol* 69 : 334-338.
42. Kim BH, Kim DS, Lee CK. 1989. The *in vitro* drug resistance of *Escherichia coli* isolated from suckling piglets 1977 and 1978. 농사시험연구 21 : 57.
43. 이강록, 최원필. 1986. 우 유래 장독소 산생 대장균에 대하여. 대한수의학회지 26 : 66-77.
44. 조광현, 박노찬, 권헌일. 1992. 설사자돈 유래 대장균의 항생물질 내성에 관하여. 한가위지 15(2) : 134-143.
45. 탁연빈, 정길택. 1976. 돈 유래 *Escherichia coli*의 항생물질 내성 및 전달성 인자에 관하여. 대한수의학회지 16 : 159-163.
46. Dey BP, Blendon DC, Burton GC. 1977. Therapeutic responses of piglets to experimentally induced colibacillosis. *Res Vet Sci* 23 : 340.
47. Bar-shavit Z, Goldman R, Ofek I, et al. 1980. Mannose-binding activity of *Escherichia coli* : A determinant of attachment and ingestion of the bacteria by macrophages. *Infect Immun* 29 : 417-424.
48. Silverblatt FJ, Dreyer JS, Schuer S. 1979. Effect of pili on susceptibility of *Escherichia coli* to phagocytosis. *Infect Immun* 24 : 218-223.
49. Burrows MR, Sellwood R, Gibbons RA. 1976. Hemagglutinating anve properties associated with the K99 antigen of bovine strains of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 96 : 269-275.
50. Cravioto A, Scotland SM, Rowe B. 1982. Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans. *Infect Immun* 36 : 189-197.
51. Clegg S. 1982. Serological heterogeneity among fimbrial antigens causing mannose-resistant hemagglutination by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 35 : 745-748.
52. Evans DJ, Evans DG, Dupont HL. 1979. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined with humans, bovine, chicken, and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. *Infect Immun* 23 : 336-346.
53. Dreyfus LA, Friedmann LA, Robertson DC. 1984. Characterization of the mechanism of action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect Immun* 44 : 493-501.
54. Evans DG, Evans DJ. 1978. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen(CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6, and O8. *Infect Immun* 21 : 638-647.
55. Harel J, Lapoite H, Fallara A, et al. 1991. Detection of genes for fimbrial antigens enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J Clin Microbiol* 29 : 745-752.
56. Svennerholm AM, Holmgren J. 1978. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay(GM1-ELISA) procedure. *Current Microbiol* 1 : 19-23.
57. Tsuti T, Taga S, Honda T, et al. 1982. Molecular heterogeneity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 38 : 444-448.
58. Kramer TT, Nderito PC. 1967. Experimental *Escherichia coli* Diarrhea in hysterectomy-derived one day, fasting pigs. *Am J Vet Res* 28 : 959-964.