

포유자돈 소장에서 분리된 대장균의 생화학 성상과 항생제 감수성 결과

함희진 · 민경섭* · 채찬희*

서울시 보건환경연구원
서울대학교 수의과대학*
(1997년 9월 3일)

Antibiotics susceptibility and biochemical characterization of *Escherichia coli* associated with diarrhea from preweaning piglets

Hee-jin Ham, Kyoung-sub Min* , Chan-hee Chae*

Seoul Metropolitan Institute of Health and Environment
College of Veterinary Medicine, Seoul National University*

(Received Sep 3, 1997)

초 록 : A retrospective study of 132 cases of natural *Escherichia coli* infection in preweaning piglets with diarrhea submitted to the Department of Veterinary Pathology in Seoul National University from 1995 to 1996 was performed to determine the biochemical characteristics and antibiotics susceptibility. Most field isolates were lysine decarboxylase-positive (99.2%), phenylalanine decarboxylase-negative (100%), and fermented sorbitol (91.7%). Antibiotic susceptibilities will be determined by agar diffusion method. A large percentage of isolates were resistant to many antibiotics in common usage. Most isolates were susceptible to colistin (98.8%), gentamycin (64.3%), amikacin (100%), and ceftiofur sodium (64.2%), whereas most isolates were notably resistant to ampicillin (86.9%), neomycin (66.7%), streptomycin (84.5%), tetracycline (98.8%), penicillin (98.8%), and amoxicillin (58.3%).

Key words : *Escherichia coli* , pig, antibiotic susceptibility, biochemical characterization.

서 론

대장균은 자연계 및 사람과 동물의 장내에 많이 서식

하는 세균으로서 약 10,000종 이상이 알려져 있으나 현재까지 혈청형이 완전히 규명된 것은 수천종에 불과하다. 이들 대장균중 사람과 동물에 병원성을 가진 대장균의 혈청형은 수십종에 불과하며, 항원구조가 밝혀진 것

본 연구는 1996년도 학술진흥재단 자유공모과제(과제번호 1G 0104)에 의해 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Chanhee Chae, Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon 441-744, Republic of Korea.

은 164종의 O항원, 99종의 K항원, 56종의 H항원이 등록되어 있다^{1,2}.

대장균의 종류는 크게 장내 독소형 대장균(*enterotoxigenic Escherichia coli*), 장내 병원성 대장균(*enteropathogenic E coli*), 장내 침입형 대장균(*enteroinvasive E coli*), 장내 출혈성 대장균(*enterohemorrhagic E coli*) 등 4그룹으로 나누어진다³. 이들 4그룹의 대장균은 설사를 일으키는 기전도 각각 다르다. 장내 독소형 대장균은 섬모항원(*fimbriae*)를 보유하고 장내독소(*enterotoxin*)을 분비하며, 장내 출혈성 대장균은 *Shiga-like toxin*을 분비하여 설사를 일으킨다^{4,5}. 자돈의 대장균 설사증은 연령과 밀접한 관계가 있으며, 특히 1주일령 이하의 포유자돈에서 다발하고 있다. 설사증상을 발현하는 포유자돈에 대한 광범위하고도 무분별한 항생제의 남용이 이루어짐으로 인해 내성균의 출현, 특히 다약제 내성균의 출현빈도가 증가되어 감염증 치료, 예방에 심각한 문제로 대두되고 있는 실정이다⁶. 본 실험에서는 국내 양돈산업에 막대한 손실을 주고 있는 포유자돈에서의 대장균 설사증 발생시 치료제의 선택 및 자돈설사증을 일으키는 대장균들의 성상들의 추이를 살펴봄으로써 국내 양돈산업과 나아가 공중보건에 기여하고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

표준균주 : 본 시험에 표준균주로 이용한 *E coli* ATCC 10536, *E coli* ATCC 43889는 서울시 보건환경연구원에서 분양받아 *peptone* 1%, *NaCl* 0.5% 및 *glycerol* 20%이 각각 첨가된 *semi-solid BHI agar*에서 배양한 후, -70℃에서 냉동보관 하였다. 분양받은 세균은 *tryptic soy agar plate*에 접종, 37℃ 배양기(*incubator*)에서 24시간 배양하여 전형적인 집락(*colony*)를 확인한 후 사용하였다.

시험균주 : 본 시험시료는 경기도, 경상남북도, 전라남북도, 충청남북도 등지에 소재하는 양돈장으로부터 1995년 3월부터 1996년 8월까지 서울대학교 수의과대학 병리학교실로 의뢰된 설사증상을 발현하고 있는 2주령 이하의 포유자돈 150두로부터 분리된 132종의 대장균을 시험균주로 사용하였다. 공장과 회장의 점막부위에서 멸균된 면봉에 의해 채집된 장점막 내용물을 이용하여 대장균들을 분리동정하여 *tryptic soy agar plate*에 접종, 37℃에서 24시간 배양하여 전형적인 집락(*colony*)를 확인한 후 사용하였다. 제시험이 필요한 경우는 표준균주

와 같은 방법으로 -70℃ 냉동보관하면서 사용하였다.

생화학적 분리동정시험 : 분리된 대장균은 생화학적 검사를 통하여 확인 동정되었다. 먼저 *MacConkey agar*와 *KIA agar*에서 유당 분해능, 가스 생성여부를 확인하고 *IMViC* 시험을 실시한 후, 확인된 대장균들에 대해 *H₂S* 생성능, *urease* 산생능, *gelatin* 액화능, 운동성(*motility*), *decarboxylase test*, *phenylalanine deaminase test*, *malonate utilization* 및 당분해 시험 등 모두 39종류의 튜브를 이용한 생화학적 확인시험을 실시하였다⁷.

항생제 감수성 시험 : 항생제 감수성 검사는 *disc diffusion method*에 의해 실시하였고⁸ 감수성 판정기준은 *National Committee for Clinical Laboratory Standards*에 근거하여 검사하였다⁹. 분리한 대장균 132균주중 84균주에 대한 항생제 감수성 시험을 실시하였다. 시험균액을 *MacFarland No. 0.5*로 표준농도화 된 균액을 배지 전체에 바르고, 10분간 방치하여 표면의 습기를 흡수시킨 후 디스크를 배지에 접촉하여 37℃에서 18시간 배양하였다. 배양후 *zone reader*(*Fisher Products*)로 억제대의 크기를 측정하였다. 사용한 항생제의 종류에는 *ampicillin* (10mcg), *colistin*(10mcg), *neomycin*(30mcg), *gentamycin* (10mcg), *streptomycin*(10mcg), *tetracycline*(30mcg), *penicillin* (10 units), *amoxicillin*(30mcg), *sulfamethoxazole + trimethoprim* (23.75mcg + 1.25mcg), *lincomycin*(2mcg), *polymyxin*(300 units), *amikacin*(30mcg), *ceftiofur sodium*(30mcg) 등 13종류를 사용하였다. *Lincomycin*와 *ceftiofur sodium*(*ROSCO, Denmark*)을 제외한 나머지 항생제는 미국 *Difco*사에서 구입하였다.

결 과

야외분리 대장균 확인 동정 : 경기도, 경상남북도, 전라남북도, 충청남북도 등지에 소재하는 양돈장으로부터 서울대학교 수의과대학 병리학교실로 의뢰된 설사 포유자돈 150두를 대상으로 분리동정한 야외 분리균주는 총 143개였으며 이들중 선택배지와 생화학적 시험 등으로 최종 대장균으로 확인된 균주는 132개였고, 본 실험은 동정이 확인된 132개 대장균을 대상으로 실시되었다.

생화학적 시험 : 생화학적 시험에서는 일반적인 대장균의 성상을 보였는데 특히 *sheep blood hemolysis*는 132개 균주중 13주가 양성을 보여 9.8%의 양성율을 보였다. *Decarboxylase test*에서의 양성율은 *lysine* 99.2%, *arginine* 6.8%, *ornithine* 46.2%, *phenylalanine* 0% 등으로 나

Table 1. Biochemical characteristics of 132 *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea

Test	No. of positive	Percentage
Nitrate	132	100
Urease	0	0
Hydrogen sulfide(KIA)	2	1.5
Motility	29	22.0
Gelatine 22 °C	0	0
Malonate	6	4.5
Gas	132	100
DNAse	0	0
Oxidation-Fermentation	132	100
Sheep Blood Hemolysis	13	9.8
IMViC test		
Indole	132	100
Methyl Red	132	100
Voges proskauer	0	0
Simmon's citrate	0	0
Decarboxylase test		
Lysine	131	99.2
Arginine	9	6.8
Ornithine	61	46.2
Phenylalanine	0	0

Table 2. Results of aerobic acid production from carbohydrates of 132 *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea

Test	No. of positive	Percentage
Monosaccharides		
Arabinose	114	86.4
Glucose	132	100
Rhamnose	129	97.7
Xylose	130	98.5
Mannose	132	100
Sorbitol	41	31.1
Disaccharides		
Maltose	119	90.2
Lactose	132	100
Melibiose	114	86.4
Cellobiose	6	4.5
Sucrose	68	51.5
Trehalose	132	100
Trisaccharides		
Raffinose	89	67.4
Glucosides		
Amygdalin	1	0.8
Salicin	64	48.5
Alcohols		
Adonitol	18	13.6
Inositol	2	1.5
Mannitol	132	100
Sorbitol	121	91.7
Dulcitol	76	76.0
Erythritol	1	0.8

타났다(Table 1). 그의 monosaccharides인 arabinose, glucose, rhamnose, xylose, mannose, sorbose, disaccharides인 maltose, lactose, melibiose, cellobiose, sucrose, trehalose, trisaccharides인 raffinose, glucosides인 amygdalin, salicin 및 alcohols인 adonitol, inositol, mannitol, sorbitol, dulcitol, erythritol 등에 대한 대장균의 특징적인 생화학적 성상이 관찰되었다(Table 2).

항생제 감수성 : 전체 분리 132균주중 84 야외분리 대장균들에 대한 항생제 감수성 검사에서 colistin, gentamycin, polymyxin, amikacin, ceftiofur sodium 등 5종류에 현저한 감수성을 보인 반면, ampicillin, neomycin, streptomycin, tetracycline, penicillin, amoxicillin, lincomycin 등 7종류에서는 현저한 저항성을 나타내었다. Sulfamethoxazole + trimethoprim에서는 감수성과 저항성을 동시에 나타내었다(Table 3).

Table 3. Susceptibility test of 84 strains *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea against antimicrobial agents

Antimicrobial agents	Susceptible strains(%)	Intermediate strains(%)	Resistant strains(%)
Ampicillin	9.6	3.6	86.9
Colistin	98.8	1.2	0
Neomycin	21.4	11.9	66.7
Gentamycin	64.3	0	35.7
Streptomycin	10.7	4.8	84.5
Tetracycline	1.2	0	98.8
Penicillin	0	1.2	98.8
Amoxicillin	28.6	11.9	58.3
Sulfamethoxazole + trimethoprim	46.4	6.0	47.6
Lincomycin	23.8	40.4	35.7
Polymyxin	100	0	0
Amikacin	100	0	0
Ceftiofur sodium	64.2	20.2	15.5

고 찰

본 연구에서는 포유자돈에서 설사증상을 일으키는 대장균들을 자돈 소장에서 분리시도하여 132주의 대장균을 동정하였고 이들에 대한 생화학적 성상 및 항생제 감수성 시험을 실시하였다. 야외분리 대장균주들의 동정 과정에서 나타난 생화학적 성상에서는 김 등¹⁰(1980), 윤

등¹(1984)이 실험한 결과와 비교해보면 대체적으로 일치하였다. Lysine decarboxylase는 1980년 77.6%, 1984년 90.3%, 본 실험에서 99.2% 양성율을 보였고, raffinose는 1980년 53.0%, 1984년 66.8%, 본 실험에서 67.4% 양성율을 나타내 년차적으로 증가추세를 보였다. 반면, maltose는 1980년 100.0%, 1984년 93.7%, 본 실험에서 90.2% 양성율을, sorbitol은 1980년 98.5%, 1984년 98.1%, 본 실험에서 91.7% 양성율을 나타내 년차적으로 감소추세를 보였다. 특히 sorbitol-positive 대장균이 감소함으로 인해 sorbitol-negative 대장균이라서 문제시 되고 있는 *E coli* O157:H7균의 특징을 고려해볼 때 앞으로도 *E coli* O157:H7균과 같은 변이 병원성 균주의 출현 가능성이 많다고 사료되며, 특이할 만한 점이라고 생각된다¹¹. 또한 arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, motility 및 arabinose 등에서도 다소 불규칙한 차이들을 보였다. Sheep blood agar에서 용혈능은 김 등¹⁰은 1981년 경기, 강원도 3개 도시 근교부근 분리균주에서 12.9%로, 윤 등⁴은 1983년 경기도 이천군 분리균주에서 11.2%, 1984년 경기, 충청지역 분리균주에서 19.9%로 각각 보고했고, 김¹²은 1987년 수원 근교 분리균주에서 15.5%로 각각 보고해본 실험결과인 9.8%와 대체로 일치하고 있다.

항생제 감수성 검사결과는 김 등¹³(1980)이 1977년에서 1979년 사이에 실험한 야외분리 대장균들에 대한 항생제 저항성 결과인 colistin 3.9%, neomycin 29.7%, penicillin G 96.1%, streptomycin 88.3%, tetracycline 86.7% 등과는 일치하고, ampicillin 31.3%, gentamycin 0% 등과는 일치하지 않았으며, 김 등¹⁴이 1978년 다른 지역에서의 결과인 ampicillin 95.2%, colistin 3.2%, lincomycin 100%, penicillin 96.8%, streptomycin 77.4%, tetracycline 93.5%, sulfamethoxazole+trimethoprim 35.5% 등과는 일치하고, neomycin 8.1%, gentamicin 0% 등과는 일치하지 않았으며, 윤 등⁴이 1983년 경기도 이천군 소재 농장에서의 결과와 비교할 때도 penicillin 0%, streptomycin 5.5%, tetracycline 0% 등과는 일치하고, ampicillin 50.7%, colistin 64.4%, gentamicin 98.6%, neomycin 45.2% 등과는 일치하지 않았다. 그러나 김¹⁵(1981)이 1978년 4월부터 10월까지 실험한 항생제 감수성 결과들과는 공통점이 없었다. 한편 본시험결과 대장균에 감수성은 ceftiofur sodium, colistin, polymyxin B, amikacin 등은 포유자돈 대장균 설사증에 큰 효과가 있을 것으로 보이며, 내성으로 나타난 ampicillin, streptomycin, tetracycline, penicillin 등은 포유자

돈 대장균 설사증에 효과가 적을 것으로 보인다. 또한 시험결과 92.9%가 전체 13종의 실험한 항생제중 3-8개에 감수성이 있는 것으로 나타났고, 이 중에서도 4-6개에 감수성이 있는 대장균들이 전체의 63.1%를 차지해 많은 대장균들이 이미 수많은 항생제들에 대해 내성을 갖고 있는 것으로 나타났다. 한편 본 실험에 사용한 항생제들 중에 그람양성균에만 주로 유효한 항생물질에는 penicillin, lincomycin, 그람음성균에만 주로 유효한 항생물질에는 polymyxin B, colistin, 그람양성, 음성균에 모두 유효한 항생물질에는 streptomycin, neomycin, 광범위 항생물질에는 tetracycline 등이 있다¹⁶.

결론

포유자돈의 설사증을 일으키는 대장균 132주 분리동정하였고 이들에 대해 39종의 생화학적 시험, 17종의 항생제 감수성 시험을 실시하였다. 첫째, 대장균 동정확인 시험 결과에서는 sheep blood agar에서 9.8%의 용혈능을 보였고, lysine 99.2%, arginine 6.8%, ornithine 46.2%, sorbitol 91.7% 등의 양성율을 보였다. 둘째, 항생제 감수성 시험에서는 ceftiofur sodium, colistin, gentamycin, polymyxin, amikacin 등에서 현저한 감수성을 나타내었다.

참고문헌

1. 윤용덕, 김종만, 김동성. 자돈의 대장균성 설사증에 관한 연구 1. 설사 자돈으로부터 분리된 병원성 대장균의 혈청형 분포조사. 농사보고(축산,가축), 26:1:66-71, 1984.
2. 김봉환. 자돈의 병원성 대장균증에 관한 연구 1. 설사 자돈으로부터 분리한 대장균의 혈청형 동정. 대한수의학회지, 121:87-91, 1981.
3. Chae C. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Korean J Vet Res*, 33:567-572, 1993.
4. 윤용덕, 김종만, 김동성 등. 돼지 세균성 소화기 질환에 대한 연구 1. 자돈의 대장균성 설사병의 예방 및 치료에 관한 연구. 한국축산과학연구보고, 3:136-151, 1983.
5. Chae C. Shiga toxin, Shiga-like toxin and Verotoxin. *Korean J Vet Res*, 33:773-779, 1993.
6. 조광현, 박노찬, 권현일 등. 설사자돈 유래 대장균의

- 항생물질 내성에 관하여. 한국가축위생학회지, 15: 134-143, 1992.
7. Brenner DJ. Facultatively anaerobic gram-negative rods. In Krieg NR, Holt JG, ed *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology Volume 1*, 1st ed, Williams & Wilkins, Baltimore:408-423, 1984.
 8. Bauer LW, Kirby WM, Sherris JC, et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, 45:493-494, 1966.
 9. NCCLS. Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacterial that grow aerobically in *National Commitee for Clinical Laboratory Standards*, 2nd ed. NCCLS Co., Villanova Pa, 1988.
 10. 김봉환, 김동성, 이창구. 자돈의 병원성 대장균증에 관한 연구 1. 양돈농가 실태 및 설사자돈에서 분리한 대장균의 성상 조사. *대한수의학회지*, 121:81-86, 1981.
 11. Ratnam S, March SB, Ahmed R. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J Clin Microbiol*, 26:2006-2012, 1988.
 12. 김원용. *Escherichia coli*의 hemolysin 생성을 지배하는 plasmid 유전자의 전달. 서울대학교 수의대 논문집, 12:109-125, 1987.
 13. 김봉환, 이재진, 김기석 등. 동물유래 병원세균의 각종 항생물질에 대한 감수성 조사. *대한수의학회지*, 120:85-92, 1980.
 14. Kim BH, Rhee JC, Kim DS. The *in vitro* drug resistance of *Escherichia coli* isolated from piglets, calves, lamb and goats with diarrhea. *Korean J Vet Res*, 1972, 19:121-126.
 15. 김종배. 돈유래 *Escherichia coli*의 항생제 내성분포와 R factor 전달에 미치는 5-iodo-2-deoxyuridine과 acridine orange의 영향. 서울대학교 수의대 논문집, 6:24-53, 1981.
 16. 김기천, 김동현, 김병옥 등. *신종합미생물학*. 학창사, 서울:414-416, 1991.