

설사 자돈으로부터 분리한 *Escherichia coli*의 특성에 관한 연구; 항균제 감수성, 장독소 및 섬모의 유전형의 분포 및 plasmid profiles

박주연 · 신나리 · 박용호 · 유한상

서울대학교 수의과대학 및 농생명공학부
(2000년 4월 10일 게재승인)

Characteristics of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea; antimicrobial susceptibility, genotypes of enterotoxins and pili and plasmid profiles

Joo-youn Park, Na-ri Shin, Yong-ho Park, Han-sang Yoo

College of Veterinary Medicine and School of Agricultural Biotechnology,
Seoul National University
(Accepted by Apr 10, 2000)

Abstract : The antimicrobial susceptibility, genotypes of enterotoxins(LT, STa) and pili(K88, 987P), and plasmid profiles were investigated with 102 *Escherichia coli* isolated from piglets showing diarrhea in Korea. Almost of them were susceptible to ceftiofur(99%), cefquinone(97.1%). However they showed resistance to bacitracin(100%), streptomycin(98%), vancomycin(97%), trimethoprim/sulfamethoxazole(87.2%), tetracycline(84.3%) in antimicrobial susceptibility test. Moreover, all of the isolates demonstrated resistance to more than 2, and 78% of them were resistant to more than 8 of total 17 drugs. Multiplex PCRs for genotyping of enterotoxins(LT, STa) and pili(K88, 987P) were established with primers designed based on sequences from Genebank. Seventeen strains(16.6%) of the isolates had STa gene, 11 strains(10.8%) of them had both STa and LT genes, and 18 strains(17.8%) had K88 gene. But none of the isolates harbored a gene exclusively encoding LT. The gene encoding 987P pili was not found in all isolates. Fifty-four strains of 102 isolates(52.9%) had plasmid with various sizes ranging from 125kb to 1.1kb. Numbers of plasmid per isolates were also various, from 1 to 9. Distinctive relationship between plasmid profiles and genotypes of enterotoxins and pili in the isolates was not found. These results might provide the basic knowledge to establish strategies for the treatment and prevention

본 연구는 농림기술개발사업 기획과제 "고품질 규격품 청정 돼지고기 생산산업화 기술개발"과 서울대학교 수의과대학 수의과학연구소 지원에 의해서 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

Address reprint requests to Dr. Han-sang Yoo, Department of Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, 103 Seodun-dong, Suwon 441-744, Republic of Korea.

Key words : *Escherichia coli*, antimicrobial susceptibility, genotypes of enterotoxins and pili, plasmid profiles.

서 론

대장균(*Escherichia coli*)은 Family Enterobacteriaceae, Genus *Escherichia* 에 속하는 Gram 음성의 단간균으로 포유동물을 비롯한 다양한 동물의 장관내에 존재하는 정상 세균총 중의 하나이다¹. 이들 균에 의한 발병은 이들이 생성하는 여러가지 병원성 인자에 의하여 다양한 형태로 나타날 수 있으나 주로 어린 동물에서 소화기 장애를 유발하여 설사를 일으키는 경우가 대부분이다. 그 발병양상은 이들이 생성하는 병원성 인자에 따라서 다양하며 이들에 따라서 이들 대장균을 여러 종류의 균으로 분류하고 있다. 이들 병원성 인자들중 어린 돼지의 설사에서 중요시되는 것은 외독소인 장독소(enterotoxin)와 장점막에 부착소로서의 역할을 하는 섬모(pili)로 알려져 있다². 과거의 대장균의 분류방법은 주로 O(somatic) 항원, H(flagella) 항원 및 K(capsular) 항원에 의한 혈청형(serotype)에 의한 분류가 주로 진행되었다^{1,3,4}. 또한 동물 및 사람에서 이들 균은 발병기전에 따라서 Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Enteropathogenic *E. coli* (EPEC), Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), Enteroaggregative *E. coli* (EAEC), Enteroinvasive *E. coli* (EIEC), Diffusely adherent *E. coli* (DAEC)로 구분하여 사용되고 있다². 이들중 ETEC가 어린 돼지의 설사에 가장 깊이 관여하는 것으로 밝혀져 있으며 이러한 세균성 설사를 치료, 예방하기 위하여 많은 항균제들이 개발되어 사용되어 왔다. 그러나 이러한 항생, 항균제는 설사증을 치료, 예방하기 위하여 광범위하고 무분별하게 사용됨으로써 이로 인한 내성균의 출현 특히 다제 내성균의 출현빈도가 증가함에 따라서 대장균 감염증의 치료, 예방에 심각한 문제로 대두되고 있다⁵. 이러한 약제 내성의 변화는 조사 당시에 주로 사용되는 약제의 종류, 조사시기, 지역 등에 따라서 다양하게 나타날 수 있고 또한 이러한 약제 내성은 plasmid 에 의해서 균간에 전파된다.

질병의 발생은 원인균들이 생성하는 병원성 인자들에

의해서 주로 유발된다. 그러므로 질병을 효율적으로 예방하기 위해서는 이들 원인균들이 생성하는 병원성 인자에 대한 숙주동물의 면역력을 증가시켜주는 것이 중요한 예방책으로 생각된다. 이러한 병원성인자의 분포는 지역, 시기 등에 따라서 분포양상이 다를 수 있기 때문에 이들의 분포양상을 조사하는 것이 중요하다. 대장균의 주요 병원성 인자로는 Heat-stable toxin(ST)와 Heat-labile toxin(LT)의 장독소와 장점막의 부착에 중요한 작용을 하는 K88, 987P 등의 pili를 들 수 있는데² 이들 생성을 조사하기 위하여 여러가지 검출기법들이 개발되어 사용되고 있으나^{6,7} 각기 장단점을 가지고 있어서 본 실험에서는 유전자 검출을 통한 검색기법을 확립하였다. 본 연구에서는 국내 설사 자돈에서 분리한 대장균의 약제 감수성 양상 및 plasmid 분포양상과 장독소 및 섬모 유전자의 분포양상을 PCR 기법 확립을 통하여 조사하였다.

재료와 방법

공시균주 : 본 실험에 사용한 균주는 1998년 중부지방의 양돈장에서 설사 자돈으로부터 분리, 동정한 대장균을 사용하였다. 대장균의 분리, 동정은 멸균면봉을 이용하여 설사 자돈의 직장내에서 분변을 채취하여 탈삼유한 5%의 면양 혈액액을 포함한 혈액배지에 접종한 후 37℃에서 18시간 배양후 대장균의 전형적인 형태를 나타내고 대장균이 순수 분리 또는 우세 집락으로 나타나는 경우에 이들 집락을 선별하여 MacConkey agar(Difco)와 EMB agar(Difco)에서 배양성상 및 *Bergey's manual*¹에 따라서 IMViC 시험 등의 생화학적 시험후 미생물 자동동정 장치인 VITEK system(bioMerieux Vitek Inc. Hazelwood, MO, USA)을 이용하여 최종 동정한 후 공시하였다. 본 시험에 사용한 표준균주는 국립수의과학검역원에서 분양받은 균주로서 *E. coli* K88, *E. coli* 987P, *E. coli* O148 : H28, E2424/75BIA (ST⁺LT⁻), *E. coli* O78 : H-E19450/α(ST⁺LT⁻) 및 *E. coli* O15 : H11E9638/O/78(STLT⁺)이었다.

항균제 감수성 검사 : 설사 자돈의 직장 분변으로부터 분리한 *E. coli* 102주에 대한 항균제 감수성 검사는 Bauer와 Kirby의 방법⁸에 따라 시험하였다. 사용한 항균제는 BBL사(Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA)의 bacitracin, tetracycline, ampicillin, norfloxacin, vancomycin, gentamicin, streptomycin sulfamethoxazole-trimethoprim, carbenicillin, nalidixic acid, neomycin, amikacin, colistin, chloroamphenicol, Hoechst Rousset Co.의 cefquinone, A/S Rosco(Denmark)의 ceftiofur 및 Bayer AG의 enrofloxacin 등 17종의 항균제를 사용하였으며, National Committee for Clinical Laboratory Standard(NCCLS)의 기준에 의하여 감수성 여부를 판정하였다. 즉, 접종균액은 tryptic soy agar에 37℃ 24시간 배양한 균을 Muller Hinton broth에서 18시간 배양한 후 멸균 생리식염수로 희석하여 MacFarland scale No. 0.5 BaSO₄ 표준 비색관에 맞추었다. 접종균액을 멸균된 면봉으로 Müller Hinton agar에 끌고루 바른 다음, 항생제 디스크를 20mm 간격으로 배지 표면에 부착시키고 37℃에서 18시간 배양 후 발육억제대를 측정하여 각 항생제에 대한 감수성 여부를 판정하였다.

LT, ST, K88 및 987P의 primer : PCR 기법을 이용하여 LT, ST, K88 및 987P의 유전자 분포를 확인하기 위한 PCR primer는 GeneBank에서 얻은 정보를 바탕으로 작성하여 DNA synthesizer를 이용하여 합성하였다. 본 실험에 사용한 primer의 sequence는 Table 1과 같다.

Table 1. Nucleotide sequences of primers used in this study

Primers	Nucleotide sequences(5'→3')	Size of product(bp)
K88F	CAATTGCTGCATCTGCTG	184
K88R	TTGGTTCCACCATTGGTC	
987PF	CCTCTCTGTTTCAGTGGTAC	350
987PR	GGCGTTGTGTCTGAAATGT	
LTF	CAGACTATCAGTCAGAGGTTG	417
LTR	TTCATACTGATTGCGCA	
STF	CCCCTCTTTTATGTCAGTC	165
STR	CCAGCACAGGCAGGATTACA	

LT/STa multiplex PCR : Tryptic soy broth(Difco)에

서 37℃에서 18시간동안 배양한 균을 집균하여 멸균 PBS로 2회 세척한 후 0.5ml의 3차 멸균 증류수에 재부유시켜 100℃에서 20분간 boiling 후, 14000×g로 5분간 원심집균을 하여 상등액을 취하여 동량의 phenol/chloroform 용액으로 추출후 4℃ 12,000×g에서 5분간 원심후 상등액을 취하여 두 배 용량의 cold ethanol을 가하여 -20℃에서 24시간 방치하였다. 방치후 12,000×g(4℃)로 5분간 원심분리하여 DNA pellet을 70% ethanol로 세척후 air dry 시킨 후 50μl 멸균 증류수에 부유시켜 이를 template DNA로 사용하였으며 PCR 반응액은 10mM Tris-HCl(pH 8.4), 50mM KCl, 4mM MgCl₂, 10mM dNTP, 각각 100pM primer, 2U *Taq* polymerase, 1μl template DNA를 넣어 최종 반응량이 50μl가 되게 하였다. PCR 반응은 최초 denaturation을 94℃, 5분간 실시한 후, denaturation 94℃, 1분, annealing 55℃, 1분, extension 72℃, 1분으로 하여 35회 반복 실시한 다음, 마지막 extension을 72℃, 5분간 실시하였다. PCR 증폭산물은 loading buffer와 5:1로 혼합하여 2.0% agarose gel, 0.5×TBE buffer(45mM Tris-borate, 1mM EDTA, pH 8.0)하에서 60V, 2시간동안 전기영동 실시후 Etbr 용액(1μg/ml in D.W.)에서 염색한 후 UV transilluminator를 이용하여 관찰후 polaroid camera로 사진촬영을 실시하였다.

K88/987P multiplex PCR : 상기의 방법과 동일한 방법을 이용하여 template DNA를 준비하였고 PCR 반응 용액은 10mM Tris-HCl(pH 8.4), 50mM KCl, 10mM MgCl₂, 10mM dNTP, 각각 100pM primer, 2U *Taq* polymerase, 2.5 μl template DNA를 넣어 최종 반응량이 50μl가 되게 하였다. PCR 반응은 최초 denaturation을 94℃, 5분간 실시한 후, denaturation 95℃, 1분, annealing 56℃, 1분, extension 72℃, 1분으로 하여 35회 반복 실시한 다음, 마지막 extension을 72℃, 5분간 실시하였다. PCR 증폭산물은 loading buffer와 5:1로 혼합하여 2.0% agarose gel, 0.5×TBE buffer(45mM Tris-borate, 1mM EDTA, pH 8.0)하에서 60V, 2시간동안 전기영동 실시 후, Etbr 용액(1μg/ml in D.W.)에서 염색한 후 UV transilluminator를 이용하여 관찰후 polaroid camera로 사진촬영을 실시하였다.

Plasmid 분리 : 설사 자돈의 분변에서 분리한 *E. coli*의 plasmid profile을 알아보기 위해 alkaline lysis 방법⁹을 이용하여 plasmid를 분리하였다. 즉, 5ml의 LB broth에 균을 접종하여 26℃에서 48시간동안 진탕배양후 원심집균하였으며, solution I (50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM

Tris-Cl, pH 8.0, 4mg/ml lysozyme) 100 μ l를 가하여 mix한 후 실온에서 5분간 방치하였다. 신중하게 준비한 solution II (0.2N NaOH, 1% SDS) 200 μ l를 가하여 가볍게 섞어 준 후 얼음속에 5분간 방치하고, solution III (3M sodium acetate, pH 4.8) 150 μ l를 넣고 vortex한 후 얼음속에 10분간 방치하였다. 12,000 \times g(4 $^{\circ}$ C)로 5분간 원심분리한 후 상등액을 다른 tube에 옮기고 동량의 phenol/chloroform 용액(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 넣어 vortex한 후 다시 12,000 \times g(4 $^{\circ}$ C)로 5분간 원심분리한 후 상등액을 다른 tube에 옮기고 두 배 용량의 cold ethanol을 가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치하였다. 12,000 \times g(4 $^{\circ}$ C)로 5분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰으며, DNA pellet은 70% ethanol로 2회 세척하고 진공건조시킨 후 다시 RNase 용액(20 μ g/ml in TE buffer) 50 μ l에 재용해하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 정치한 후, loading buffer(0.25% bromophenol

blue, 0.25% xylene cyanol FF, 40%(w/v) sucrose in water)와 5:1로 혼합하여 0.8% agarose gel, 0.5 \times TBE buffer(45mM Tris-borate, 1mM EDTA, pH 8.0)하에서 70V, 2시간동안 전기영동한 다음 Etbr 용액(1 μ g/ml in D.W.)에서 염색한 후 UV transilluminator를 이용하여 관찰후 polaroid camera를 이용하여 사진촬영을 실시하였다.

결 과

항균제 감수성 : 설사 자돈으로부터 분리동정한 대장균 102주에 대하여 amikacin의 16종의 항균제에 대하여 감수성 검사를 실시한 결과 Table 2에서와 같이 bacitracin (100%), streptomycin(98%), vancomycin(97%), trimethoprim/sulfamethoxazole(87.2%), tetracycline(84.3%)에 대하여는 높은 저항성을 나타내었고, ceftiofur(99%), cefquinone(97.1%)

Table 2. Antimicrobial susceptibility of 102 *E. coli* isolated from piglets with diarrhea

Antimicrobial drugs	Potency/disc	No. of strains(%)		
		Resistant	Intermediate	Susceptible
Amikacin(AN)	10 μ g	5(4.9)	57(55.9)	40(39.2)
Ampicillin(am)	30 μ g	78(76.5)	0(0.0)	24(23.5)
Bacitracin(B)	10IU	102(100.0)	0(0.0)	0(0.0)
Carbenicillin(CB)	100 μ g	72(70.6)	0(0.0)	30(29.4)
Cefquinone(CEQ)	10 μ g	0(0.0)	3(2.9)	99(97.1)
Ceftiofur(XNL)	30 μ g	0(0.0)	1(1.0)	101(99.0)
Chloramphenicol(C)	30 μ g	74(72.5)	5(4.9)	23(22.5)
Colistin(CL)	10 μ g	4(3.9)	64(62.7)	34(33.3)
Enrofloxacin(ENR)	5 μ g	43(42.2)	7(6.9)	52(50.9)
Gentamicin(GM)	10 μ g	56(54.9)	31(30.4)	15(14.7)
Nalidixic acid(NA)	30 μ g	67(65.7)	7(6.9)	28(27.4)
Neomycin(N)	30 μ g	69(67.6)	26(25.5)	7(6.9)
Norfloxacin(NOR)	10 μ g	42(41.2)	7(6.9)	53(51.9)
Streptomycin(S)	10 μ g	100(98.0)	1(1.0)	1(1.0)
Tetracycline(Te)	30 μ g	86(84.3)	11(10.8)	5(4.9)
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole(SXT)	23.75 μ g/1.25 μ g	89(87.2)	1(1.0)	12(11.8)
Vancomycin(Va)	30 μ g	99(97.0)	2(2.0)	1(1.0)

Table 3. Multidrug resistance patterns of 102 *E. coli* isolated from piglets with diarrhea

No. of antibiotic	Multidrug patterns	No. of isolates
14	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-N-NA-GM-ENR-NOR-AN	4
13	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-N-NA-GM-ENR-NOR	19
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-N-NA-ENR-NOR-AN	1
12	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-N-NA-ENR-NOR	7
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-CB-N-NA-GM-ENR-NOR	2
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-N-GM-ENR-NOR	1
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-N-NA-GM-ENR-NOR	1
11	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-N-NA-GM	4
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-NA-GM-ENR	2
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-CB-N-NA-ENR-NOR	2
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-N-NA-GM-CL	1
	B-Va-S-SXT-Tc-C-N-NA-GM-ENR-NOR	1
	B-Va-S-Tc-AM-CB-N-NA-GM-ENR-NOR	1
10	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-N-NA	2
	B-Va-S-SXT-AM-C-CB-N-NA-GM	1
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-CB-N-NA-GM	2
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-NA-GM	1
	B-Va-S-SXT-Tc-C-N-NA-ENR-NOR	1
	B-Va-S-SXT-AM-C-CB-NA-ENR-NOR	1
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-N-NA-CL	1
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-NA-CL	1
9	B-Va-S-SXT-Tc-C-N-NA-GM	2
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-N	3
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-GM	2
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB-NA	2
	B-Va-S-SXT-AM-C-CB-N-NA	1
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-CB-GM-CL	1
	B-Va-S-Tc-AM-C-CB-N-NA	1
8	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-CB	3
	B-Va-S-SXT-Tc-C-CB-N	1
	B-Va-S-SXT-Tc-C-NA-GM	1
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-CB-N	1
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-C-N	1
	B-S-SXT-AM-C-CB-N-GM	1
	B-Va-S-SXT-AM-CB-NA-GM	1
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-CB-NA	1
	B-Va-S-Tc-AM-C-CB-N	1
7	B-Va-S-SXT-Tc-AM-N	1
	B-Va-S-SXT-Tc-AM-CB	2
	B-Va-S-SXT-Tc-C-NA	1
	B-Va-S-AM-C-CB-NA	1
	B-Va-S-SXT-Tc-N-GM	1
	B-Va-S-SXT-C-NA-CL	1
6	B-Va-S-SXT-Tc-N	1
	B-Va-S-SXT-Tc-C	1
	B-Va-S-Tc-N-GM	1
	B-Va-S-SXT-N-GM	1
	B-Va-S-SXT-Tc-GM	1
	B-Va-S-Tc-AM-GM	1
5	B-Va-S-SXT-GM	1
	B-Va-S-SXT-N	1
	B-S-Tc-C-N	1
	B-Va-S-SXT-NA	1
4	B-Va-S-GM	1
	B-Va-Tc-C	1
3	B-Va-S	3
2	B-Va	1

Abbreviations: See in Table 2.

에 대하여는 높은 감수성을 나타내었고, norfloxacin(51.9%), enrofloxacin(50.9%) 대하여는 중등도의 감수성을 나타내었다. 시험대상 102균주 모두 2약제 이상에 대하여 내성을 나타내었고, 8종 이상의 약제에 대하여는 79주(77.5%)가 내성을 나타내었다. 또한 13약제에 대하여 내성을 나타내는 균주가 20주(19.6%)로 가장 높았고, 9약제에 대하여는 12주(11.8%), 12 및 11약제에 대하여 내성을 나타내는 균주가 각각 11주(10.8%)의 순으로 나타났다(Table 3).

장독소 유전자의 분포 : 대장균에서 생성되는 장독소 유전자의 보유양상을 조사하기 위하여 이들 유전자에 특이적인 primer를 Genebank에서 얻은 정보를 이용하여 작성하였고 이들 primer를 이용하여 STa와 LT 장독소 유전자를 증폭한 결과, 165bp와 417bp 크기의 STa 및 LT 유전자가 증폭되었다(Fig 1). 설사 자돈에서 분리한 대장균 102주에 대하여 LT 및 STa 유전자의 분포를 PCR 기법을 이용하여 조사한 결과 조사균주중 STa 유전자만을 함유하고 있는 것은 17주(16.6%)였고, STa와 LT 유전자를 동시에 가지고 있는 균주는 11주(10.8%)였으나 LT 유전자만을 보유하고 있는 균주는 없었다.

Fig 1. Electrophoretic analysis of amplified *E coli* ST and LT genes by multiplex PCR. Template DNA was prepared and the genes were amplified by multiplex PCR as described in materials and methods. Lane M: Molecular weight marker (100bp ladder), lane 1: positive control(*E coli* 0148: 728, ST⁺, LT⁺), lanes 2-4: *E coli* isolates(ST⁺, LT⁺), lane 5: negative control(no template DNA), lanes 6-8: *E coli* isolates(ST⁺, LT⁺), and lanes 9-11: *E coli* isolates(ST⁻, LT⁻)

섬모 유전자의 분포 : 설사 분변으로부터 분리한 대장균의 섬모 유전자 분포양상을 조사하기 위하여 multiplex PCR 기법을 이용하여 K88과 987P 섬모 유전자를 증폭한 결과 184bp와 350bp 크기의 K88과 987P 섬모 유전자가 증폭되었다(Fig 2). 설사 자돈에서 분리한 대장균 102

Fig 2. Electrophoretic analysis of amplified *E coli* K88 and 987P genes by multiplex PCR. Template DNA was prepared and the genes were amplified by multiplex PCR as described in materials and methods. Lane M: Molecular weight marker (100bp ladder), lane 1: positive control(K88⁺, 987P⁺), lanes 2-5: *E coli* isolates(K88⁺), lanes 6-8: *E coli* isolates(K88⁻, 987P⁺), lane 9: negative control(no template DNA).

주에 대하여 K88 및 987P 유전자의 분포를 multiplex PCR 기법을 이용하여 조사한 결과 분리균에서 이들 섬모 유전자의 분포는 K88 유전자 보유균주가 18주(17.8%)로 조사되었고, 987P 섬모에 대한 유전자를 보유하고 있는 균주는 확인할 수 없었다.

Plasmid profile 및 장독소와 섬모 유전자의 상관관계: 설사 자돈에서 분리한 대장균에서 plasmid 분포양상을 조사한 결과 총 54주(52.9%)가 plasmid를 함유하고 있었으며, 크기는 125kb에서부터 1.1kb 까지로 다양하였으며 함유하고 있는 plasmid의 수도 1개에서 9개 까지로 다양하였다(Table 4). Plasmid의 크기 및 수와 장독소 또는 pili 유전자 보유간에는 상관관계는 확인할 수 없었다(Table 4).

고 찰

어린 돼지에서 설사는 다양한 원인에 의해서 유발될 수 있으나 그 원인들중 미생물 원인체가 가장 중요한 원인체로 작용을 한다. 세균성 원인체중 자돈에서는 주로 대장균이 주요 원인체의 하나로 작용한다. 대장균은 정상세균총으로 모든 포유동물의 장관내에 존재할 뿐만 아니라 다양한 혈청형을 가지고 있다. 현재까지 국내에서는 이 질병의 치료 및 예방을 위하여 항생제 투여, bacterin과 pili를 이용한 vaccine의 개발^{10,11} 등 많은 연구가 진행되어 왔음에도 불구하고 지금까지도 양돈산업에서 가장 많은 경제적 피해를 주는 질병중 하나이다. 특히 항생제의 예방적 적용은 항생제 잔류, 내성균의 출현

Table 4. The relationship between plasmid profiles and genes encoding enterotoxin and pili in *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea

No.	Size of plasmids(Kb)	Enterotoxin	Pili	No.	Size of plasmids(Kb)	Enterotoxin	Pili
I-1		ST ⁺		II-12	6.6		
I-4		ST ⁺ , LT ⁺	K88 ⁺	II-13	2.7		
I-5			K88 ⁺	II-14		ST ⁺	K88 ⁺
I-6			K88 ⁺	II-15	5.9		
I-7	125		K88 ⁺	II-19	2.7		
I-9	125, 5.3			II-23	125, 4.4		
I-11		ST ⁺		II-25			K88 ⁺
I-14			K88 ⁺	II-26	1.8		
I-17		ST ⁺ , LT ⁺	K88 ⁺	II-27	3.3		
I-18		ST ⁺ , LT ⁺	K88 ⁺	II-28	5.3		
I-22	125, 3.5, 2.2			II-29	125, 3.8, 3.2		
I-24	125, 3.8			II-30	5.2, 3.5		
I-25	125, 3.8		K88 ⁺	II-33	125, 2.5		
I-26	125, 4.1, 2.4			II-34	4.0	ST ⁺ , LT ⁺	
I-27	125, 3.3, 2.6, 2.3	ST ⁺		II-35	4.4	ST ⁺	
I-28		ST ⁺		II-36	3.7, 1.2	ST ⁺	
I-32	3.8	ST ⁺ , LT ⁺	K88 ⁺	II-39	125, 4.0	ST ⁺	
I-33		ST ⁺ , LT ⁺		II-40	3.5	ST ⁺	K88 ⁺
I-34	4.1			II-41	4.4	ST ⁺ , LT ⁺	
I-35	125, 3.8			II-42	5.3, 1.1	ST ⁺ , LT ⁺	K88 ⁺
I-36			K88 ⁺	II-43	3.4	ST ⁺	
I-37	4.1, 2.9, 1.9			II-44	6.6		
I-38	3.8			II-45	125, 7.8, 4.4, 3.7, 3.2, 2.6, 2.3, 1.7, 1.5		
I-39	5.3, 3.8, 2.7, 1.4	ST ⁺		II-46	9.4, 4.4, 2.8, 2.2, 1.6		
I-41	125, 4.1			II-48	1.7	ST ⁺	K88 ⁺
I-42	125, 4.4, 2.3			II-49		ST ⁺	K88 ⁺
II-2	125, 4.4, 3.9			II-50	1.7	ST ⁺ , LT ⁺	K88 ⁺
II-3	125			II-51	5.9		
II-4		ST ⁺		II-53	2.3	ST ⁺	
II-6	125	ST ⁺ , LT ⁺	K88 ⁺	II-55	8.8, 2.9	ST ⁺	
II-7	125, 3.8, 2.1	ST ⁺		II-56	4.4, 3.2		
II-8	2.3	ST ⁺		II-57	5.9		
II-9	125, 4.4			II-59	5.9, 4.4, 4.0, 3.2		
II-11	4.4, 2.3			II-60	125, 8.2, 5.7, 4.9, 4.0, 3.1	ST ⁺ , LT ⁺	

등으로 임상학적 적용, 안전 축산물의 생산 등과 같은 공중보건학적 문제점을 유발하고 있다⁵. 국내 분리 대장균들에 대한 항생제 감수성 조사연구는 많이 수행되어 왔으나 시기와 지역에 따라서 다양한 차이를 나타내고 있고 또한 효율적인 vaccine의 개발을 위해서는 원인균들이 생성하는 주요 병원성 인자들의 분포에 대하여 충분한 조사가 이루어져야 할 것으로 생각되어 본 연구에서는 최근 설사 자돈에서 분리된 대장균들 항생제 감수성을 조사하였고, 이들 균주들의 병원성 인자들의 보유 상황 및 plasmid 분포를 조사하였다. 대장균에 대한 억제 내성양상은 1970년대 말에 경기도 일원의 농장에서 설사 자돈으로부터 분리한 대장균의 경우 tetracycline, streptomycin, penicillin 등에 저항성, nalidixic acid, ampicillin, cephalothin, kanamycin, chloramphenicol에 감수성을 나타내었으며 공시균종의 약 70%가 8종의 공시약제중 3제 이상의 약제에 대하여 저항성을 나타내었다¹². 1980년대 중반에 경남 일원에서 분리한 대장균의 경우는 penicillin, erythromycin, tetracycline, streptomycin에 대하여 높은 저항성을, gentamicin, kanamycin에 대하여 높은 감수성을 나타내었다¹³. 1990년대 중반에 돼지에서 분리한 균주들은 cefoperazone, amikacin, cefotaxin, polymyxin 등에 대하여 높은 감수성을, clindamycin, erythromycin, Triple sulfa, doxycycline, streptomycin, tetracycline에 대하여 높은 저항성을 나타내었다^{14,15}. 이러한 결과들을 본 연구결과와 비교해볼 때에 저항성 양상은 대체적으로 유사하였으나 계속적으로 다제 내성을 나타내는 균주들이 증가하고 있음을 알 수 있다. 돼지에 장내에 상재하는 비병원성 대장균에서도 병원성 대장균과 같이 항생제 저항성을 나타내는 것으로 보아 antibiotic resistance gene이 병원성, 비병원성 대장균으로 서로 이동하여 다제 내성 균주가 증가하는 것으로 사료된다¹⁶.

대장균의 병원성에 관여하는 인자들중 가장 중요한 인자의 하나인 장독소인 ST와 LT의 측정은 WHO⁶의 기준에 따라서 ST의 경우 infant mouse assay 법을, LT의 경우는 GM₁-ganalioside ELISA 법을 사용하여 왔다. 그러나 ST를 위한 infant mouse assay 법은 bioactivity를 가진 장독소들을 검출할 수 있다는 장점을 가지고 있으나 시술상 여러가지 문제점들을 내포하고 있어서 본 실험에서는 민감하고 신속한 multiplex PCR 기법을 이용하여 이들 유전자를 검출함으로써 검색할 수 있는 기법을 확립하였다. 이 기법을 이용하여 조사한 결과, 분리주 102주

중 enterotoxin 또는 fimbrial adhesin gene을 지닌 균주는 35.3%, STa 유전자를 함유한 균주는 27.5%, LT 유전자를 함유한 균주는 10.8%로 이 결과는 VET-RPLA 법 및 cholera 항혈청을 이용한 침전반응에 의한 검출결과⁷ 및 genotype에 의한 분류결과¹⁷와도 다소 차이를 나타내었다. 이러한 차이는 면역학적 방법을 이용하는데 따른 비특이반응의 가능성, 자돈의 연령, 공시균주 분리시기 및 지역에 따른 차이 등에 의한 것으로 사료된다.

대장균에 분포하는 섬모 항원의 종류에 대한 조사는 섬모항원의 종류에 따라서 기니픽, 닭, 말, 사람 등의 적혈구를 이용하여 수동혈구 응집반응시험을 이용하여 실시하여 왔다. 그러나 이러한 반응들은 시험자, 균 배양조건 등에 따라서 차이를 나타낼 수 있기 때문에 본 실험에서는 PCR 기법을 이용하여 이들 유전자의 존재를 확인함으로써 이들의 분포를 조사하고자 하였다. 수동혈구 응집반응을 이용하여 조사한 섬모항원의 분포양상과 비교한 결과 K88 보유율은 유사하였으나 987P 보유율은 차이를 나타내고 있었다. 외국 보고¹⁸에 의하면 설사 자돈에서 K88, 987P 보유율은 각각 19.1%, 1.1%로, 987P 보유율에서 본 실험의 결과와 약간의 차이를 나타내었으나 미국⁸, 영국²⁰, 폴란드²¹ 등의 여러 보고들을 비교해볼 때에 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 Wilson *et al*²²이 설사 돼지로부터 대장균에서 조사한 K88 보유율은 72%, Nagy *et al*²³이 조사한 K88 보유율은 61%로 본 실험의 결과보다는 훨씬 높게 나타났다. 기존의 보고에 의하면 이는 F4 및 다른 fimbrial antigen은 신생 자돈의 설사증을 유발시키는 대장균과 관련이 깊은 반면, 이유후 자돈 설사증을 나타내는 균에서는 관련성이 적은 것으로 알려져 있다^{24,25}. 한편 권 등¹⁷의 결과에서는 fimbrial adhesin중 987P gene을 가장 많이 보유하고 있는 것으로 나타나 본 실험의 결과와는 상반되는 결과를 나타내었다. 자돈의 설사에 관련된 대장균의 분포에서 국내 전반적으로 K88이 주로 분포하고 있는 것으로 생각된다. 주로 송아지 설사에 관여하는 것으로 알려진 K99가 돼지 유래 대장균에서도 12.1% 존재하였다는 보고에 대하여는 다각적인 측면에서 검토가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

일반적으로 plasmid는 약제 내성, 장독소 등 병원성 인자들의 생성에 관여하는 유전자를 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 특히 비교적 크기가 큰 plasmid는 장독소, pili 등의 병원성 인자의 유전자를 함유하고 있는 것

으로 알려져 있다. 그러나 본 조사에서는 이러한 상관관계가 높지 않게 나타나지 않았는데 이것은 장관내 또는 환경내에서 대장균의 유전자 변이 등에 의한 것으로 사료되나 이 부분에 대하여는 좀더 구체적인 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

국내 설사 자돈으로부터 분리동정한 대장균 102주에 대하여 항균제 감수성 검사, 장독소와 섬모의 유전형 분포 및 plasmid profile을 조사하였다. 이들 분리에 대해 항균제 감수성 검사를 실시한 결과 bacitracin(100%), streptomycin(98%), vancomycin(97%), trimethoprim/sulfamthoxazole (87.2%), tetracycline(84.3%)에 대하여 높은 저항성을 나타낸 반면 ceftiofur(99%), cefquinone(97.1%)에 대하여는 높은 감수성을 나타내었다. 또한 분리주 모두 2가지 이상의 약제에 대하여 내성을 나타내었으면 대부분의 균주가 다제 약제 내성을 나타내어 항생제 내성이 증가하고 있음을 보여주었다.

장독소 및 섬모의 유전자의 보유상황을 multiplex PCR로 조사한 결과 STa gene, STa와 LT gene, K88 gene 보유율은 각각 16.6%, 10.8%, 17.8% 였으며 987P gene을 보유한 균주는 하나도 검출되지 않았다. 그러므로 국내 자돈의 설사에 관련된 대장균의 분포는 ST와 K88이 주된 것으로 생각된다. Plasmid 보유양상을 조사한 결과 plasmid의 크기는 125kb~1.1kb로 다양하였으며 균당 보유하고 있는 plasmid의 수도 1~9까지로 다양하였다. 장독소 및 섬모 유전자 보유양상과 plasmid profile의 뚜렷한 상관관계는 관찰되지 않았으나 추후 병원성 인자의 유전과 관련하여 이에 대한 심도있는 연구가 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Frits Rskov Genus I. *Escherichia*. In Kreig NR, Holt JG, ed. *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology* Vol. 1, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore; 408-423, 1984.
2. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11(1):142-201, 1998.
3. Edwards PR, Ewing WH. Identification of Enterobac-

teriaceae. Burgess Publishing Co., Mineapolis, Minn. USA. 1972.

4. Loir H. Classification of *Escherichia coli*. p31-72, In C.L. Gyles(ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford, United Kingdom. 1966.
5. Yoo HS. Recent technology for the diagnosis and prevention of swine diseases. *Proceedings of the International Symposium for the 50th Anniversary of the Gyeongsang National University*, 35-48, 1998.
6. World Health Organization (WHO). Manual for laboratory investigations of acute enteric infections. CDD. pp.38-44, 1983.
7. 함희진, 천두성, 채찬희. 포유자돈 소장에서 분리된 대장균의 섬모항원과 장내독소 분포양상. 대한수의학회지, 37(4):779-784, 1997.
8. Bauer AW, Kirby WMJC. Antibiotic susceptibility testing by a standardized disc method. *Am J Clin Path*, 36:493, 1966.
9. Sambrook J, Fritish EF, Maniatis T. *Molecular cloning; A laboratory manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.25-1.28, 1989.
10. 윤용덕, 김종만, 김동성. 자돈의 대장균성 설사증에 관한 연구 1. 설사 자돈으로부터 분리된 병원성 대장균의 혈청형 분포조사. 농시보고, 26(1)(축산, 가위); 66-71, 1984.
11. 윤용덕, 김종만, 김동성. 자돈의 대장균성 설사증에 관한 연구. 2. 자돈의 대장균성 설사증 백신개발. 농시보고. 26(1)(축산, 가위); 72-79, 1984.
12. 김종배, 마점술. 돈유래 *Escherichia coli*의 항생제 내성 분포와 R factor 전달에 미치는 5-iodo-2'-deoxyuridine과 acridine orange의 영향. 서울대 수의대 논문집, 6(1):24-40, 1981.
13. 이주홍, 조희택, 김용환 등. 설사 자돈으로부터 병원성 대장균, 캄필로박터속균 및 살모넬라속균의 분리동정. 대한수의학회지, 28(1):67-73, 1988.
14. 함희진, 민경섭, 채찬희. 포유자돈 소장에서 분리된 대장균의 생화학적 성장과 항생제 감수성 결과. 대한수의학회지, 37(4):773-777, 1997.
15. 김종만, 진남섭, 김종완 등. 가축의 설사변에서 분리된 대장균과 살모넬라균의 항균물질 감수성과 마우

- 스에서 치료효과. 대한수의학회지, 37(2):389-403, 1997.
16. Sunde M, Fosseum K, Solberg A, Sorum H. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* of the normal intestinal flora of swine. *Microb Drug Resist Winter*, 4(4):289-299, 1998.
 17. Kwon D, Kim O, Chae C. Prevalence of genotypes for fimbriae and enterotoxins and of O serotypes in *Escherichia coli* isolated from diarrheic piglets in Korea. *J Vet Diagn Invest*, 11:146-151, 1999.
 18. Osek J. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet Microbiol*, 68:209-217, 1999.
 19. Fairbrother JM, Larivaiere S, Johnson WM. Prevalence of fimbrial antigens and enterotoxins in nonclassical serogroups of *Escherichia coli* isolated from newborn pigs with diarrhea. *Am J Vet Res*, 49:1325-1328, 1988.
 20. Wray C, McLaren IM, Carroll PJ. *Escherichia coli* isolated from farm animals in England and Wales between 1986 and 1991. *Vet Rec*, 133:439-442, 1993.
 21. Osek J, Truszczynski M. Occurrence of fimbriae and enterotoxins in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in Poland. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 15(4):285-292, 1992.
 22. Wilson RA, Francis DH. Fimbriae and enterotoxins associated with *E coli* serogroups isolated from pigs with colibacillosis. *Am J Vet Res*, 47:213-217, 1986.
 23. Nagy B, Casey TA, Moon HW. Phenotype and genotype of *E coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary. *J Clin Microbiol*, 28:651-653, 1990.
 24. Moon HW. Colonization factor antigens of enterotoxigenic *E coli* in animals. *Curr Top Microbiol Immunol*, 151:147-165, 1990.
 25. Gaastra W, de Graaf FK. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *E coli* strains. *Microbiol Rev*, 46:129-161, 1982.