

설사 증상의 돼지 분변에서 분리된 용혈성 대장균의 항생제 내성과 독소의 인체로부터 분리된 균주로의 전이

이계남 · 정병열¹ · 이연희*

서울여자대학교 생물학과 항생제내성균주은행, ¹수의과학검역원 동물약품과

1997년과 1998년 사이에 설사 증상을 보이는 돼지의 분변으로부터 총 56 균주의 *Escherichia coli*를 분리하여 이중 용혈성을 나타내는 38 균주의 항생제 내성과 독소 생산능을 확인하였다. 항생제 한천 희석법으로 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration)를 측정된 결과 36 균주(94.7%)가 tetracycline에 대해 내성을 나타내었고, 27 균주(71.0%)는 ampicillin에 내성, 26 균주(68.4%)는 chloramphenicol에 내성, 그리고 21 균주(55.2%)는 trimethoprim에 내성을 나타내었으나, aztreonam, amikacin, norfloxacin에 내성을 나타낸 균주는 발견되지 않았다. 이중 4가지 이상의 항생제에 대해 내성을 가지는 다제내성(multiple drug resistance, MDR)을 보인 균주는 총 38 균주 중 21 균주(55.3%)였다. 또한 이중 디스크 시험법(Double Disk Synergy Test)을 수행한 결과 extended spectrum β -lactamase를 생산하는 균주는 없는 것으로 나타났다. 이들 중 가장 많은 수의 균주가 내열성 독소(ST, 89.5%)를 생산하였고, 다음으로 베로 독소(VT와 VTe, 각각 47.4%)와 이열성 독소(LT, 31.6%)를 생산하는 것으로 나타났다. 이 중에서 8 균주(21.0%)는 ST만을 생산하였던 반면에 12 균주(31.6%)는 LT와 ST를 동시에 생산하였고, 13 균주(34.2%)는 ST, VT, VTe를 동시에 생산하였으며, 5 균주(13.2%)는 VT와 VTe를 동시에 생산하는 것으로 나타났다. 그러나 네 가지 독소를 동시에 생산하는 균주는 없었다. 또한 이 균주들은 매우 다양한 혈청형 (serotype)을 가지고 있음이 확인되었다. 사람에 직접적인 유해성을 가지고 있는 지 확인하기 위해 사람 방광 유래의 T-24 세포와 장내 포피 유래의 Caco-2 세포에 대한 부착능을 시험하였을 때, 16 균주(42.1%)가 T-24 방광 세포에, 그리고 17 균주(44.7%)가 Caco-2 장 세포에 대해 강한 부착능을 나타내었다. 특히 11 균주(28.9%)는 두 세포 모두에 강한 부착능을 가지고 있었다. Filter mating method를 수행하여 이들 균주들의 독소 생산 유전자와 항생제 내성 유전자가 사람에서 분리된 균주로 전달되는 것을 확인할 수 있었다. 본 실험의 결과는 설사 증상을 나타내는 돼지로부터 분리된 용혈성 *E. coli*의 독성과 세포 부착능력, 그리고 항생제 내성간의 상호 연관성을 보여주지 않았으나 동물 분리 세균의 항생제 내성과 독소 생산 능력이 유전자 전달을 통해서 뿐만 아니라 세균의 직접 접촉에 의해서도 인체로 전달될 수 있는 것을 보여주는 것이다.

Key words □ antimicrobial resistance, enterotoxin, hemolytic *Escherichia coli*, verotoxin

현재까지 여러 나라에서 돼지의 주요 장내 병원균 중의 하나인 *Escherichia coli*에 의한 감염 실태와 분리된 *E. coli*의 항생제 내성, 또는 독소 생산 등 병독성 인자에 대한 연구가 진행되어 왔다(5, 13, 18). 동물의 설사증이나 부종 또는 혈변 등의 증상은 주로 용혈성을 나타내는 *E. coli*의 감염에 의해 유발되는 것으로 알려져 있고(6, 28), 감염된 병원성 *E. coli*는 장관 내에 부착하여 증식하며, 질병을 일으키는 병독성 인자(virulence factor)로 부착인자(colonization factor)와 독소(toxin)를 생산 한다(20-22, 29, 35, 39). *E. coli*의 섬모 (pili)는 *E. coli*를 장관 내벽에 강하게 부착시키는 역할을 하고, 부착된 *E. coli*는 장관 내에서 증식하며 여러 가지 독소를 생산해낸다(1, 16, 40). 설사 증상을 유발하는 *E. coli*는 크게 독소형(enterotoxigenic *E. coli*), 병인형(enteropathogenic *E. coli*), 침입형(enteroinvasive *E. coli*), 출혈성(enterohemorrhagic *E. coli*) 등으로 나누어지고, 그 종류에 따라

작용 기전이 서로 다르다(10, 24). 독소형은 섬모항원(fimbriae 또는 pili antigen)과 장내 독소(enterotoxin)를 분비하여 소장 내에서 cAMP 또는 cGMP를 증가시키고, Na⁺와 Cl⁻ 이온의 교환을 방해하여 HCO₃⁻ 등의 이온과 물의 흡수를 감소시킴으로 인해 탈수를 유발하여 대사성산증으로 결국 폐사를 유도한다(7, 19, 23, 36, 38). 출혈성은 리보솜의 60S subunit을 불활성화 시킴으로써 단백질 합성을 종결시키는 베로 독소(verotoxin: VT)를 분비하는데, 이 독소가 혈액에 흡수되어 전신의 혈관을 파괴하는 것으로 알려져 있다(1, 12, 15, 27, 32-33, 37). 또한 베로 독소의 변형체인 VTe는 돼지의 부종(edema disease)을 유발하는 것으로 알려져 있는데(40), 이는 매우 복합적인 요인에 의해 발생하는 질병으로 음식이나 환경적 요인, 또는 유전적 감수성 등이 중요한 발병 요인으로 작용하기도 한다. 특히 신생 돼지나 이유기 돼지에 병원성을 갖는 *E. coli*는 독소형으로 이들은 장내 독소인 이열성 독소(heat-labile toxin: LT)와 내열성 독소(heat-stable toxin: ST) 중 한개 또는 두개를 동시에 생성하는 것으로 알려져 있다(10, 24). 이들의 진단을 위하여 용혈성능(hemolytic activity)을 *E. coli*

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-970-5664, Fax: 02-970-5901
E-mail: yhlee@swu.ac.kr

의 병독성(virulence) 표지(marker)로 사용하고 있다(2, 13). 그러나 일단 발현된 경우에는 치료가 힘들기 때문에 발병이 확산될 위험이 있는 경우에 증상이 나타나기 전에 장내 병원성 *E. coli*에 감수성이 높은 우수한 항생제를 사료에 첨가하여 섭취하도록 하고 있다. 그러나 빈번한 항생제의 사용은 항생제에 대해 내성을 가지는 세균을 유발할 수 있는 위험이 있으나, 이에 대한 체계적인 감독과 연구가 미비한 실정이다.

우리나라의 경우 설사 증상이나 부종을 나타내는 돼지의 *E. coli* 감염 실태와 항생제 내성 경향에 대한 보고가 있기는 하지만(8-9), 동물로부터 분리된 *E. coli*의 사람에 대한 직접적인 유해성 등에 대한 연구는 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 동물로부터 분리된 용혈성 *E. coli*의 항생제 내성 경향과 이들이 생산하는 toxin의 전이 여부를 파악하고자 하였으며, 동물로부터 분리된 균주의 사람에 대한 직접적인 유해성 여부를 파악하기 위하여 사람 유래 세포주(human cell line)에 대한 부착능을 확인하였다.

재료 및 방법

대상균주

1997년과 1998년 사이에 설사 증상을 나타내는 돼지의 분변으로부터 *E. coli* 총 56 균주를 분리하여 이들에 대한 용혈성 *E. coli* 검출 시험을 수행하였다.

용혈성 *E. coli*의 검출

용혈성을 확인하기 위하여 한천 혈액 배지(Trypticase Soy Agar with 5% sheep blood, BBL, USA)에 각각의 균주를 계대 배양하였다. 37°C 항온기에서 18시간 배양한 후, 용혈성(hemolysis) 여부를 판독하였다.

항생제 최소억제농도(Minimal inhibitory concentration, MIC) 측정

National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (25) 기준에 따라서 항생제 한천 희석법으로 항생제 최소억제농도(MIC)를 측정하였다. 시험 항생제로는 ampicillin, cephalothin, aztreonam, gentamicin, amikacin, neomycin, kanamycin, norfloxacin, tetracycline, chloramphenicol, trimethoprim을 사용하였고, chloramphenicol (Acros, NJ, USA)을 제외한 모든 항생제는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 순수 배양된 집락을 멸균된 0.85% NaCl 용액에 McFarland nephelometer No. 0.5로 탁도를 맞춘 후 시험 항생제가 각각 0.25~128 µg/ml 농도로 함유된 Muller-Hinton (MH) 한천배지에 10⁴ CFU를 접종하였다. 37°C 항온기에 18 시간 배양 후 10개 이하의 집락이 형성된 농도를 MIC로 결정하였다. 결과의 정확성을 위하여 참조 균주인 *E. coli* ATCC 25922의 감수성을 동시에 측정하였다.

β-Lactamase 생산 균주의 선별

β-Lactamase의 생산 여부를 확인하기 위해 대수기의 세균을

초음파 파쇄기로 파쇄한 crude extract에 β-lactamase의 기질로 작용하는 nitrocefin 용액(500 µg/ml)을 떨어뜨려 색깔의 변화로 β-lactamase의 생산 여부를 확인하였다.

Isoelectric focusing (IEF) gel electrophoresis

β-Lactamase의 pI를 측정하기 위해 IEF를 실시하였다. 대수기의 세균을 초음파 파쇄기로 파쇄한 crude extract를 ampholite gel (pH 3.0~10.0)에 넣고, Mini IEF 111 apparatus (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 이용하여 100 V에서 15분, 200 V에서 15분, 450 V에서 1시간 전기영동 하였다. Gel에 nitrocefin 용액(500 µg/ml)을 떨어뜨려 β-lactamase의 위치를 확인하였고, 이를 pI 표지 단백질의 pI를 사용하여 작성한 회귀곡선과 비교하여 pI를 결정하였다.

PCR을 이용한 β-lactamase 유전자 검출

β-Lactamase 유전자를 검출하기 위하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. 사용된 프라이머(primer)는 IEF 결과에 따라 AmpC에 특이적인 프라이머 5'-CTACGGTCT GGCTGCTA-3'와 5'-TGGAGCAAGAGGCGGTA-3'를 사용하였다 (26). PCR 반응조건은 95°C에서 denaturation 10분, denaturation (95°C 1분), annealing (56°C 1분), extension (72°C 1분)의 과정을 30회 반복한 후 마지막으로 extension을 72°C에서 10분간 시행하였다. 증폭된 산물 5 µl를 1% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 생산된 DNA 단편의 크기를 확인하였다.

Double disk synergy 시험법에 의한 extended spectrum β-lactamase (ESBL) 생산 균주의 검출

Ampicillin과 cephalothin에 내성이면서 β-lactamase를 생산하는 균주의 ESBL 생산 여부를 확인하기 위해 NCCLS 지침에 따라 double disk synergy 시험법을 수행하였다. 순수 배양된 집락을 백금침으로 채취한 후, 0.85% NaCl 용액에 McFarland nephelometer No. 0.5로 탁도를 맞춘 세균 현탁액을 면봉으로 MH 한천 배지에 고르게 접종한 후, 일정한 간격을 두고 cefotaxime (30 µg), cefotaxime과 clavulanic acid (cefotaxime 30 µg과 clavulanic acid 10 µg), ceftazidime (30 µg), ceftazidime과 clavulanic acid (cefotaxime 30 µg과 clavulanic acid 10 µg)이 함유된 디스크를 올려놓았다. 세균이 접종된 배지는 37°C 항온기에 18시간 배양한 후 각 항생제 디스크 주위에 생긴 성장 억제환의 크기를 측정하여 NCCLS 기준에 따라 내성 여부를 확인하였다. 또한 clavulanic acid의 β-lactamase 억제 효과에 의한 억제대의 확장 현상이 5 mm 이상으로 관찰되면 ESBL 생산 양성으로 판정하였다. 결과의 정확성을 위하여 참조 균주 *E. coli* ATCC 25922를 동시에 시험하였다.

PCR을 이용한 toxin 유전자의 검출

PCR을 이용하여 enterotoxins (ST와 LT)과 verotoxins (VT와 VTe) 유전자들을 검출하였다. 시험에 사용된 프라이머는 Table 1

Table 1. Primers to amplify specific regions of genes for enterotoxins (LT and ST) and vectoroxins (VT and VTe)

Target gene coding for toxin(s)	Oligonucleotide sequence (5' → 3')	Expected size (bp)	Reference
LT ^a	GGCGACAGATTATACCGTGC CCGAATTCTGTTATATATGTC	696	3
ST ^b	ATCGCATTTCTTCTTGCAFC GGGCGCCAAAGCATGCTCC	172	3
VT ^c	CTTCGGTATCCTATFCCCGG GGATGCATCTCTGGTCATTG	478	3
VTe ^d	CCTTAACTAAAAGGAATATA CTGGTGGTGATGATTAATA	230	3

^aDetects LT enterotoxin produced by human and porcine ETEC strains.

^bDetects ST enterotoxin produced by porcine ETEC strains.

^cDetects VT synthesized by porcine strains.

^dOnly detects VTe synthesized by porcine strains associated with the edema disease.

과 같다. 반응조건은 95°C에서 denaturation 10분, denaturation (95 °C 1분), annealing (ST와 LT, 52°C 1분; VT, 57°C 1분; VTe, 47°C 1분), extension (72°C 1분)의 과정을 30회 반복한 후 마지막으로 extension을 72°C에서 10분간 시행하였다. PCR 증폭 산물은 전기 영동하여 생산된 DNA 절편의 크기를 확인하였다.

혈청형 분석

O (O1~O169)와 H (H1~H51)의 항혈청(Denka Seiken, Tokyo, Japan)을 이용하여 응집 반응 형성 여부로 O와 H의 혈청형을 결정하였다.

접합에 의한 toxin과 내성 유전자 전달

Filter mating 방법에 따라 유전자 전달시험을 실시하였다. 내성 공여자로 설사 증상을 나타내는 돼지에서 분리된 독소를 생산하는 균주를 사용하였고, 내성 수여자는 사람에서 분리된 β -lactamase를 생산하는 균주를 사용하였다. Norfloxacin에 감수성이면서 kanamycin에 내성인 두 균주(CCARM 1197, 1211)를 내성 공여자로 하고, norfloxacin에 내성이면서 kanamycin에 감수성이 β -lactamase를 생산하는 임상 분리 *E. coli* 한 균주(CCARM 1334)를 내성 수여자로 사용하였다. 내성 공여자와 수여자를 각각 brain heart infusion (BHI, Difco) 액체배지에 접종하여 하룻밤 진탕 배양하였다. 공여자 배양액 50 μ l와 수여자 배양액 450 μ l를 새 BHI 액체배지 4.5 ml이 들어있는 시험관에 넣어서 혼합하고, 이 혼합 배양액 1 ml을 0.45 μ m nitrocellulose 여과지(Milipore, Bedford, MA)에 부착시킨 다음 37°C 항온기에서 3시간 배양하였다. 배양된 여과지를 1 ml의 새 BHI 액체배지에 넣어 진탕한 후 100 μ l를 취해, norfloxacin과 kanamycin이 함유된 MacConkey 한천배지에 각각 접종하였다. 37°C 항온기에서 18시간 배양한 후 transconjugants를 선별하였다. 유전자 전달을 확인을 위하여 transconjugants의 toxin 유전자는 PCR로 확인하였고, 내성은 항생제 한천 희석법을 사용하여 항생제 내성 전달 여부를 확인하였다.

사람 유래 세포주에 대한 부착능 실험

동물로부터 분리된 균주가 사람에게 직접 부착하여 위해성을 가할 수 있는지 확인하기 위해 사람 방광 유래 세포주인 T-24 세포와 사람 장내표피 유래 세포주인 Caco-2 세포에 대한 부착능을 실험하였다. T-24 세포는 열로 불활화시킨 10% fetal bovine serum (FBS), 2 g의 sodium bicarbonate/L, antibiotic-antimycotic (pH 7.2)를 함유한 RPMI 1640 배지에서 배양시켰다. Caco-2 세포는 열로 불활화시킨 10% FBS, 3.7 g의 sodium bicarbonate/L, antibiotic-antimycotic (pH 7.4)를 함유한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 배양시켰다. 동물에서 분리된 용혈성 *E. coli* (1×10^8 cells)를 T-24 세포와 Caco-2 세포(2×10^6 cells)에 첨가하여 37°C의 5% CO₂ 항온기에서 1시간 반응시켰다. 인산완충용액으로 세척하여 부착되지 않은 박테리아를 제거한 후 메탄올로 고정하여 그람염색 후 광학현미경으로 세포에 부착된 세균의 수를 계수하였다. 이때 무작위로 20 필드를 선정하고 각 필드의 세포에 부착된 세균의 수를 계수하고, 이들을 평균하여 필드당 부착된 세균의 수를 계산하였다. 이때 필드당 부착된 세균의 수가 100개를 넘는 경우 강한 부착성을 가진 것으로 판단하였다.

결 과

용혈성 *E. coli*의 검출

설사 증상을 나타내는 돼지의 분변에서 분리된 *E. coli* 56 균주를 혈액한천배지에 접종하여 용혈성을 확인한 결과, 총 38 균주(67.8%)가 용혈성을 나타내어 이들을 실험 대상으로 하였다.

동물 분리 균주의 항생제 내성

설사 증상을 나타내는 돼지로부터 분리된 용혈성 *E. coli* 38 균주의 항생제 최소억제농도(MIC)를 측정된 결과 높은 내성율을 나타내는 항생제는 tetracycline (94.7%), ampicillin (71.0%), chloramphenicol (68.4%), trimethoprim (55.2%) 순으로 나타났다. 모든 균주는 aztreonam, amikacin, norfloxacin에 대해 감수성이었다 (Table 2). 4개 이상의 항생제에 대해 내성을 가지는 다제내성(multiple drug resistance, MDR)을 보인 균주는 38 균주 중 21

Table 2. Antimicrobial resistance of hemolytic *E. coli* isolated from pigs suffering diarrhea

Class and antimicrobials	Resistant strains (%)	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Ranges
Penicillins				
Ampicillin	27 (71.0)	>128	>128	8~>128
β-Lactam				
Cephalothin	11 (28.9)	16	32	4~32
Monobactams				
Aztreonam	0 (0.0)	<0.25	<0.25	<0.25~<0.25
Aminoglycosides				
Gentamicin	17 (44.7)	4	32	<0.25~32
Amikacin	0 (0.0)	2	4	0.5~8
Kanamycin	14 (36.8)	4	>128	0.5~>128
Neomycin	14 (36.8)	4	32	1~128
Tetracyclines				
Tetracycline	36 (94.7)	128	128	4~>128
Fluoroquinolones				
Norfloxacin	0 (0.0)	2	4	<0.25~8
Phenicol				
Chloramphenicol	26 (68.4)	128	>128	1~>128
Folate pathway inhibitors				
Trimethoprim	21 (55.2)	>128	>128	<0.25~>128

균주(55.3%)인 것으로 나타났다. 또한 aminoglycoside계 항생제에 대해서는 17%가 gentamicin에 내성을 나타내었고, 각각 14% *γ*-neomycin과 kanamycin에 대해 내성을 나타냈다.

β-Lactamase 생산 균주의 선별

β-Lactamase의 발색 기질로 작용하는 nitrocefin을 각 균주의 파쇄액에 처리한 결과, 38 균주 중 34 (89.5%) 균주가 양성 반응을 나타내어 대부분의 용혈성 *E. coli*가 β-lactamase를 생산하는 것으로 나타났다. 이들의 ampicillin에 대한 최소억제농도는 16~128 μg/ml 이상 이었고, cephalothin에 대한 최소억제농도는 4~32 μg/ml로 다양했다.

이들 중 cephalothin에 대해 내성(최소억제농도가 32 μg/ml 이상)인 10 균주가 생산하는 β-lactamase의 pI를 확인한 결과 모두 pI 8.2 이었다. 이는 AmpC type의 β-lactamase로 추정되었다. 이를 확인하기 위해 AmpC에 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 실시한 결과, β-lactamase 양성균주는 모두 AmpC-like type의 β-lactamase를 가지고 있었다. 이들 AmpC-like type의 β-lactamase는 모두 플라스미드에 존재하는 것으로 확인되었다 (Fig. 1).

ESBL 생산 균주의 선별

β-Lactamase를 생산하는 균주 중에서 ESBL을 생산하는 균주가 존재하는지 확인하기 위해 double disk synergy 시험법을 실시하였다. Disks는 cefotaxime, cefotaxime과 clavulanic acid, ceftazidime, ceftazidime과 clavulanic acid가 사용되었다. NCCLS 지침에 따라 결과를 확인하였을 때, 38 균주 중에서 ESBL를 생

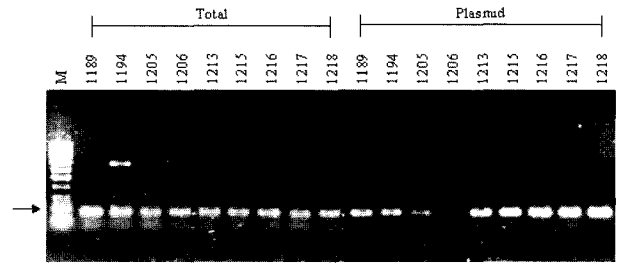


Fig. 1. PCR with specific primers to AmpC using total and plasmid DNA. Arrow indicates the DNA fragment with an expected molecular weight 169 bp.

산하는 균주는 없는 것으로 확인되었다.

PCR을 이용한 toxin 유전자 확인

돼지의 설사 증상을 유발하는 *E. coli*에서 주로 분비되는 enterotoxins (ST와 LT)과 verotoxins (VT와 VTe) 유전자의 존재 여부를 Table 1에 열거된 프라이머를 사용하여 확인한 결과는 Table 3에 정리되어 있다. ST가 가장 많은 34 균주(89.5%)에서 나타났고, 그 다음으로 VT와 VTe가 각각 18 균주(47.4%), 그리고 LT가 12 균주(31.6%)에서 나타났다. 이들 중에서 8 균주(21.0%)는 ST만 생산하였던 반면에, 12 균주(31.6%)는 LT와 ST를 동시에 생산하였고, 13 균주(34.2%)는 ST, VT, VTe를 동시에 생산하였으며, 5 균주(13.2%)는 VT와 VTe를 동시에 생산하는 것으로 나타났다. 그러나 네 가지 독소를 동시에 생산하는 균주는 없는 것으로 나타났다.

접합에 의한 toxin과 항생제 내성 유전자 전달

Filter mating 방법에 따라 유전자 전달 시험을 실시한 결과로부터 2개의 transconjugants를 얻었다. 이들의 항생제 내성 유전자 전이 현상을 확인하기 위해 항생제 억제 최소농도를 실험한 결과는 Table 4와 같고, toxin 유전자 전이는 PCR과 전기영동을 이용하여 확인하였다(Fig. 2). 특히 내성 수여자로부터 내성 공여자의 역전달 현상을 배제하기 위하여, 내성 수여자는 플라스미드가 아닌 염색체에 의해 내성이 매개되어 쉽게 전달되지 않는 특징을 가진 퀴놀론계 항생제인 norfloxacin에 내성을 가진 균주

Table 3. Toxins produced by hemolytic *E. coli* isolated from pigs suffering diarrhea

Toxins	No. (%)
LT, ST, VT, VTe	- ^a
ST, VT, VTe	14 (36.8)
LT, ST	12 (31.6)
VT, VTe	4 (10.5)
LT	-
ST	8 (21.1)
VTe	-
VT	-
Total	38 (100.0)

^aNot detected

Table 4. Antimicrobial susceptibilities of *E. coli* isolated from pigs suffering diarrhea (donors) and clinical isolate (recipient), and their trans-conjugants

	CCARM No.	Antimicrobial resistance (MIC, µg/ml)														Toxin	
		Amp ^a	Azt ^b	Cep ^c	Cef ^d	Cft ^e	Cfx ^f	Gen ^g	Ami ^h	Neo ⁱ	Kan ^j	Nor ^k	Tet ^l	Chl ^m	Tri ⁿ	Str ^o	ST
Donors	1197	>128	<0.25	16	0.5	<0.25	<0.25	8	2	32	>128	<0.25	>128	>128	>128	>128	ST
	1211	>128	<0.25	16	0.5	<0.25	<0.25	8	2	32	>128	<0.25	>128	>128	>128	32	ST
Recipient	1334	>128	<0.25	64	32	8	8	64	16	0.5	1	64	>128	>128	>128	128	-
Trans-conjugants	TC1197 ^p	>128	<0.25	16	<0.25	<0.25	8	8	1	64	>128	128	>128	>128	>128	>128	ST
	TC1211 ^q	>128	<0.25	16	<0.25	<0.25	8	<0.25	1	32	>128	128	>128	>128	>128	128	-

^aAmpicillin; ^baztreonam; ^ccephalothin; ^dceftazidime; ^ecefotaxime; ^fcefoxitin; ^ggentamicin; ^hamikacin; ⁱneomycin; ^jkanamycin; ^knorfloxacin; ^ltetra-cycline; ^mchloromphenicol; ⁿtrimethoprim; ^ostreptomycin; ^ptransconjugant of 1205 and 1348; ^qtransconjugant of 1211 and 1348; ^rnot detected

를 선별하였다. 결과에서와 같이 TC1197에서는 동물에서 분리된 균주에서 생산되는 독소인 ST 유전자가 내성 수여자로 사용하였던 사람으로부터 분리된 균주로 전달되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 TC1211의 경우는 ST 유전자의 전달이 일어나지 않은 것으로 확인되었다. 이와 동시에 항생제 내성, 특히 transconjugants의 선별에 사용하였던 norflaxacin과 kanamycin에 대한 내성은 TC1197과 TC1211에서 각각 128 µg/ml 이상과 128 µg/ml로 높아진 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 내성 공여자로부터 내성 수여자에게로 독소 유전자뿐만 아니라 항생제 내성에 관련된 유전자의 전이가 있었음을 확인할 수 있었다.

혈청형 분석

항혈청을 이용한 응집반응으로 혈청형을 분석한 결과, 단 17 균주(44.7%)에서만 혈청형이 분류되었고(serotyping), 나머지 균주에서는 타입이 결정되지 않았다(nontypable). 혈청형이 분류된 용혈성 *E. coli*의 O 혈청형은 총 14 종류로 매우 다양하게 나타났다(Table 5). 가장 많은 것으로 나타난 O 혈청형은 각각 2 균주

가 O-27, O-63, O114 이었고, O-18, O-78, O-115, O-125, O-126, O-127, O-148, O-153, O-157, O-158, O-167이 각각 1 균주씩 이었다. 이들은 돼지의 설사 증상을 유발하는 것으로 알려져 있는 *E. coli* 중 ETEC(O-27, O-78, O-148), EIEC(O-167), EPEC(O-125, O-126, O-127), EHEC(O-157)에 해당되는 그룹으로 매우 다양한 그룹이 분포되어 있음을 보여준다.

H 혈청형(Table 6)으로는 16 균주(42.1%)가 분류되었고, 4 균주에서는 H, 18 균주에서는 H 타입이 결정되지 않았다(nontypable). 본 실험에서는 총 6 종류의 H 혈청형이 확인되었는데, 4 균주가 H-4, 4 균주가 H-10, 3 균주가 각각 H-9와 H-40, 1 균주가 각각 H-19와 H-20이었다. H-7은 발견되지 않았고, O-157을 나타내었던 한 균주는 H-19인 것으로 확인되었다.

인체 유래 세포주에 대한 부착능

본 실험의 대상 세균 38 균주 중 16 균주(42.1%)가 T-24 방광 세포에 강한 부착능을 가졌으며, 17 균주(44.7%)는 Caco-2 장내 세포에 대해 강한 부착능을 가졌다(Table 7). 특히 11 균주(28.9%)는 두 세포에 동시에 강한 부착능을 가지고 있었다.

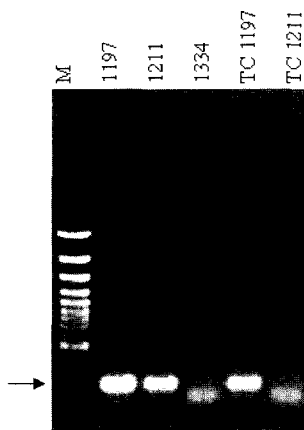


Fig. 2. PCR with specific primers to ST using total DNA from donors (CCARM 1197, 1211), recipient (1334), and their transconjugants (TC1197, TC1211). Arrows indicate DNA fragments with an expected molecular weight 172 bp for ST. Transconjugants were represented as TC1197, transconjugant of 1197 and 1334; TC1211, transconjugant of 1211 and 1334.

Table 5. O-serotypes of hemolytic *E. coli* isolated from pigs suffering diarrhea

O type	No. (%)
O-18	1 (2.6)
O-27	2 (5.3)
O-63	2 (5.3)
O-78	1 (2.6)
O-114	2 (5.3)
O-115	1 (2.6)
O-125	1 (2.6)
O-126	1 (2.6)
O-127	1 (2.6)
O-148	1 (2.6)
O-153	1 (2.6)
O-157	1 (2.6)
O-158	1 (2.6)
O-167	1 (2.6)
17 (44.7%)	

Table 6. H-serotypes of hemolytic *E. coli* isolated from pigs suffering diarrhea

H type	No. (%)
H-4	4 (10.5)
H-9	3 (7.9)
H-10	4 (10.5)
H-19	1 (2.6)
H-20	1 (2.6)
H-40	3 (7.9)
	16 (42.0)

Table 7. Adherent activity of hemolytic *E. coli* isolated from pigs suffering diarrhea to T-24 human bladder cells and Caco-2 intestinal cells

CCARM No.	Number of adherent bacteria ^a	
	T-24 cells	Caco-2 cells
1183	119.6	413.5
1184	285.9	407.8
1185	275.9	369.4
1186	8.8	141.2
1187	138.5	100.3
1188	4.1	4.0
1189	90.1	120.9
1190	54.2	81.8
1192	6.5	109.1
1193	29.5	86.0
1194	78.5	15.8
1195	180.9	246.3
1196	584.8	136.4
1197	82.9	178.8
1198	0.0	6.8
1199	74.3	253.1
1200	219.2	85.7
1201	1.5	31.1
1202	208.4	255.5
1203	727.0	166.4
1204	155.2	4.0
1205	7.2	2.3
1206	99.4	2.6
1207	31.8	150.0
1208	20.1	3.6
1209	4.4	3.6
1211	19.7	8.6
1212	107.8	7.4
1213	11.9	30.4
1214	5.2	62.8
1215	28.6	17.4
1216	30.7	9.0
1217	60.7	9.0
1218	101.8	2.8
1219	533.6	156.7
1220	581.7	2.8
1221	405.3	129.9
1222	663.0	277.2

고찰

용혈성 *E. coli*는 신생 돼지나 이유기 돼지의 설사 증상을 유발하는 가장 일반적인 균주로 알려져 있다(6, 28). 이중 독소형(ETEC)과 출혈성(EHEC와 VTEC)은 사람뿐만 아니라 동물, 특히 돼지의 설사 증상을 유발하는 가장 대표적인 균주이다. 외국의 보고에 의하면 환자들로부터 분리된 ETEC와 VTEC의 발생율은 스페인의 경우 1992년에 0%에서 1999년에는 4.4%(3) 증가하는 추세를 보였고, 스위스의 경우에는 1999년부터 2000년 사이에 설사 증세가 있는 환자의 경우의 10.2%와 설사 증세가 없는 환자의 경우 20.2%로 보고 되어있다(30). 돼지의 경우에는 1986년부터 1991년 사이에 스페인에서 ETEC가 16.9%, VTEC가 4.1%인 것으로 보고 되어있다(4, 14).

이들 ETEC와 VTEC에 있어 중요한 병독성 요소(virulence factor)는 독소의 생산이다. 본 실험에서는 1997년과 1998년 사이에 국내에서 분리된 설사 증상을 나타내는 돼지의 분변으로부터 분리된 용혈성 *E. coli* 38 균주에 대해 ST, LT, VT, 그리고 VTe를 생산하는 유전자를 PCR로 확인한 결과 ST가 가장 보편적인 것으로 나타났고, VT와 VTe, 그리고 LT의 순으로 나타났다. ST가 가장 보편적인 것으로 나타난 결과는 Garabal 등(14)의 결과와 일치하는 것이다. 그러나 Blanco 등과 Osek(4, 28)의 보고에 서와 같이 사람으로부터 분리된 균주에 대한 결과에서는 LT가 가장 보편적인 것으로 나타나 사람과 동물로부터 분리되는 *E. coli*가 생산하는 독소는 서로 차이가 있는 것으로 생각되고 있다. 특히 이들 중에는 하나의 독소만을 생산하는 균주가 있었던 반면에, 대부분의 균주들은 두개 이상의 독소를 동시에 생산하였다. 이는 플라스미드 상에 존재하는 것으로 알려져 있는 독소의 생산에 관련된 유전자가 동일한 플라스미드 상에 있는 경우도 있고 각각 다른 플라스미드에 존재하는 경우도 있어서 경우에 따라 하나의 독소가 단독으로 생산 될 수도 있는 반면 두개 이상의 독소가 동시에 생산되는 경우도 있기 때문이다(24, 28).

본 실험에서 38 균주의 용혈성 *E. coli*는 매우 다양한 O와 H 혈청형을 가지고 있음이 확인되었다. 각각 14 종류의 O 그룹과 6 종류의 H 그룹이 발견되었으나, 이들 중 우세한 혈청형은 확인되지 않았다. 이들 O와 H를 생산하는 유전자는 독소를 생산하는 유전자와 달리 염색체 상에 존재하기 때문에 이 결과는 돼지의 설사 증상에 관련된 *E. coli*가 매우 다양하다는(clonal diversity) 것을 보여주는 결과이다. 본 실험 결과에서 나타난 *E. coli*의 O-혈청형은 돼지의 설사 증상을 유발하는 것으로 알려져 있는 *E. coli* 중 ETEC (O-27, O-78, O-148), EIEC (O-167), EPEC (O-125, O-126, O-127), EHEC (O-157) 등 다양한 그룹에 해당되는 것으로 나타났다 (24). 그러나 본 실험의 결과는 외국에서 사람의 질병에 관련된 것으로 보고 되어 있는 혈청형인 O-26, O-91, O-103, O-111, O-117, O-118, O-121, O-128, O-145, O-146 이나 돼지의 설사를 유발하는 것으로 보고 된 O-8, O-9, O-20, O-101, O-138, O-141형은 없는 것으로 나타났다(3, 4, 13). 이는 국내에서 분리된 *E. coli*의 혈청형이 외국에서 보고된 것과 차이가 있는 것으로, 이는 대부분의 병독성 특징들

(virulence traits)이 전이가 가능한 유전적 요소(transferable genetic elements)인 플라스미드나 트랜스포존에 의해 조절되기 때문에 기존에 알려진 보편적인 병원성 혈청형(pathogenic serotypes)을 가진 균주에서 기존과는 다른 희귀한 혈청형(uncommon type)을 가진 균주로 바뀔 가능성이 있을 것으로 생각 된다(11). 아직까지 국내에서 설사 증상을 나타내는 돼지로부터 분리된 *E. coli*의 혈청형에 대한 병인론적 연구가 미비한 실정으로 이에 대해서는 더 많은 연구가 진행되어야 할 필요가 있는 것으로 생각된다.

돼지의 설사 증상을 유발하는 용혈성 *E. coli*의 치료에 주로 사용되는 broad-spectrum 항생제의 사용은 내성 균주의 증대를 야기 시켜왔다(18). 본 연구 결과는 tetracycline (94.7%), ampicillin (71.0%), chloramphenicol (68.4%), trimethoprim (55.2%)에 대한 동물 분리 *E. coli*의 내성 정도를 보여주고 있다. 특히 4개 이상의 항생제에 대해 내성을 가지는 다제내성(multiple drug resistance, MDR)을 보인 균주는 38 균주 중 21 균주(55.3%)인 것으로 나타났다. 일반적으로 동물에 있어 질병 치료의 목적 외에 성장 촉진의 목적으로 사료에 항생제를 첨가하기 때문에 tetracycline이나 aminoglycoside계 항생제에 대한 내성이 높을 것으로 추측되었는데(2, 18), 본 결과에서 tetracycline 외에도 aminoglycoside계 항생제인 gentamicin에 대해 내성을 나타낸 균주는 17% 이었고, neomycin과 kanamycin에 내성을 나타낸 균주는 각각 14%로 나타났다.

또한 1980년 이후 캐나다 등에서 독성의 문제로 인해 동물의 사료에 사용이 금지된 chloramphenicol에 대한 내성을 가진 균주들이 계속 증가하고 있다는 보고가 있다(2). 본 결과에서도 26 균주(68.4%)에서 chloramphenicol에 대한 내성을 나타내었다. 이는 대부분의 내성 유전자들, 특히 gentamicin, chlormaphenicol, 그리고 trimethoprim에 대한 내성 유전자들이 플라스미드나 트랜스포존, 또는 인테그론에 존재하기 때문에 쉽게 내성유전자들이 전파될 수 있기 때문으로 생각 된다(3, 6, 11, 18). 따라서 동물에 gentamicin이나 sulfamethoxazole-trimethoprim 등의 사용으로 chloramphenicol의 사용이 금지된 후에도 chloramphenicol에 대한 내성을 가진 균주의 증가를 유발되는 것으로 생각된다. 한 가지 다행스러운 것은 최근에 임상에서 그 사용량의 증가로 심각한 문제로 대두되고 있는 ESBL(17, 31)을 생산하는 균주가 발견되지 않은 점이다.

용혈성 *E. coli*에서 독소를 생산하는 유전자가 다른 균주로 전달될 경우 매우 심각한 문제가 발생할 것으로 예측된다. 이에 독소를 생산하는 유전자가 다른 균주로 전달되는지 여부를 확인한 결과 플라스미드를 매개로 하여 전달되는 것으로 나타났다. 특히 사람으로부터 분리된 β -lactamase를 생산하는 임상 균주에 전달 여부를 실험한 결과 얻어진 transconjugant로부터 항생제 내성뿐만 아니라 독소를 생산하는 능력이 전달되는 것으로 나타나, 이는 동물뿐만 아니라 사람에게도 매우 심각한 문제를 야기할 것으로 추측되었다.

또한 동물 분리 균주가 사람 세포에 직접 부착하여 유해성을 나타낼 수 있는지를 확인하기 위한 사람 유래 세포 부착 실험에

서 16 균주(42.1%)가 T-24 방광 세포에 강한 부착능을 가진 것으로 나타났고, 17 균주(44.7%)가 Caco-2 장내 세포에 대해 강한 부착능을 가진 것으로 나타났으며, 특히 11 균주(28.9%)는 두 세포에 동시에 강한 부착능을 나타내었다.

본 연구 결과에서는 이 균주들 간의 독성과 세포 부착능력, 그리고 항생제 내성간의 상호 연관성이 발견되지는 않았다. 하지만 두 가지 세포 모두에 강한 부착능을 가진 CCARM 1184, 1185, 1187, 1222 등의 4 균주는 항생제 내성도 강한 다제내성을 나타낸 균주였고, CCARM 1190, 1192, 1220, 122 등의 4 균주는 다제내성인 동시에 3개 이상의 toxin을 생산하는 균주들로 이런 균주들이 인체에 감염 되면 항생제 내성을 가진 동시에 독성을 나타내어 심각한 문제를 야기할 것으로 예상되며, 또한 이런 균주들로부터 독성과 내성이 인체 정상 세균총과 병원균에 전이될 가능성도 충분히 예상된다. 따라서 이에 대한 돼지의 용혈성 *E. coli*에 대한 감시 체계가 필요한 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 농림부(201102-3)와 보건복지부(03-PJ1-PG1-CH03-0002) 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. Agbodaze, D. 1999. Verocytotoxins (Shiga-like toxins) produced by *Escherichia coli*: a minireview of their classification, clinical presentations and management of a heterogeneous family of cytotoxins. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 22, 221-230.
2. Bischoff, K.M., D.G. White, P.F. McDermott, S. Zhao, S. Gaines, J.J. Maurer, and D.J. Nisbet. 2002. Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine. *J. Clin. Microbiol.* 40, 389-394.
3. Blanco, M., J.E. Blanco, E.A. Gonzalez, A. Mora, W. Jansen, T.A. Gomes, L.F. Zerbini, T. Yano, A.F. de Castro, and J. Blanco. 1997. Genes coding for enterotoxins and verotoxins in porcine *Escherichia coli* strains belonging to different O:K:H serotypes: relationship with toxic phenotypes. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2958-2963.
4. Blanco, J.E., M. Blanco, A. Mora, and J. Blanco. 1997. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrototoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: Relationship with in vivo pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2953-2957.
5. Blanco, M., J.E. Blanco, A. Mora, G. Dahbi, M.P. Alonso, E.A. Gonzalez, M.I. Bernardez, and J. Blanco. 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-xi*). *J. Clin. Microbiol.* 42, 645-651.
6. Celemin, C., P. Rubio, P. Echeverria, and S. Suarez. 1995. Gene toxin patterns of *Escherichia coli* isolated from diseased and healthy piglets. *Vet. Microbiol.* 45, 121-127.
7. Cheng, E., L. Cardenas-Freytag, and J.D. Clements. 1999. The role of cAMP in mucosal adjuvanticity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT). *Vaccine* 20, 38-49.
8. Choi, C., W. Cho, H. Chung, T. Jung, J. Kim, and C. Chae. 2001.

- Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene in isolates in weaned pigs with diarrhea and/or edema disease. *Vet. Microbiol.* 81, 65-71.
9. Choi, C., H.J. Ham, D. Kwon, J. Kim, D.S. Cheon, K. Min, W.S. Cho, H.K. Chung, T. Jung, K. Jung, and C. Chae. 2002. Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 64, 71-73.
 10. Clarke, S.C. 2001. Diarrhoeagenic *Escherichia coli*- an emerging problem? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 41, 93-98.
 11. Cobbold, R. and P. Desmarchelier. 2002. Horizontal transmission of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* within groups of dairy calves. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4148-4152.
 12. Friedrich, A.W., J. Borell, M. Bielaszewska, A. Fruth, H. Tschape, and H. Karch. 2003. Shiga toxin 1c-producing *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic characterization and association with human disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2448-2453.
 13. Frydendahl, K. 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet. Microbiol.* 85, 169-182.
 14. Garabal, J.I., E.A. Gonzalez, F. Vazquez, J. Blanco, and M. Blanco. 1995. Toxigenic *Escherichia coli* in Spanish piggeries from 1986 to 1991. *Vet. Microbiol.* 47, 17-25.
 15. Karmali, M.A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 15-38.
 16. Laohachai, K.N., R. Bahadi, M.B. Hardo, P.G. Hardo, and J.I. Kourie. 2003. The role of bacterial and non-bacterial toxins in the induction of changes in membrane transport: implications for diarrhea. *Toxicon.* 42, 687-707.
 17. Lee, S.H., J.Y. Kim, S.H. Shin, Y.J. An, Y.W. Choi, Y.C. Jung, H.I. Jung, E.S. Sohn, S.H. Jeong, and K.J. Lee. 2003. Dissemination of SHV-12 and characterization of new AmpC-type beta-lactamase genes among clinical isolates of *Enterobacter* species in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2477-2482.
 18. Maynard, C., J.M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrín, R.C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Larivière, and J. Harel. 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3214-3221.
 19. Merritt, E.A. and W.G. Hol. 1995. AB5 toxins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 165-171.
 20. Montecucco, C., E. Papini, and G. Schiavo. 1994. Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett.* 346, 92-98.
 21. Montecucco, C. 1998. Protein toxins and membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 530-536.
 22. Nagano, K., K. Taguchi, T. Hara, S. Yokoyama, K. Kawada, and H. Mori. 2003. Adhesion and colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cecum of mice. *Microbiol. Immunol.* 47, 125-132.
 23. Nair, G.B. and Y. Takeda. 1998. The heat-stable enterotoxins. *Microbial Pathogenesis.* 24, 123-131.
 24. Nataro, J.P. and J.B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 142-201.
 25. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard-Fifth Edition. *NCCLS.*
 26. Nelson, E.C. and B.G. Elisha. 1999. Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 957-959.
 27. O'Loughlin, E.V. and R.M. Robins-Browne. 2001. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect.* 3, 493-507.
 28. Osek, J. 1999. Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet. Microbiol.* 68, 209-217.
 29. Osek, J. 2000. Virulence factors and genetic relatedness of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhea. *Vet. Microbiol.* 71, 211-222.
 30. Pabst, W.L., M. Altwegg, C. Kind, S. Mirjanic, D. Hardegger, and D. Nadal. 2003. Prevalence of enteroaggregative *Escherichia coli* among children with and without diarrhea in Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2289-2293.
 31. Pai, H., H.J. Lee, E.H. Choi, J. Kim, and G.A. Jacoby. 2001. Evolution of TEM-related extended-spectrum β -lactamases in Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3651-3653.
 32. Paton, J.C. and A.W. Paton. 1998. Pathogenesis and diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 450-479.
 33. Payne, C.J., M. Petrovic, R.J. Roberts, A. Paul, E. Linnane, M. Walker, D. Kerby, A. Burgess, R.M. Smith, T. Cheasty, G. Willshaw, and R.L. Salmon. 2003. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 gastroenteritis in farm visitors, North Wales. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 526-530.
 34. Peruski, L.F. Jr, B.A. Kay, R.A. El-Yazeed, S.H. El-Etr, A. Cravito, T.F. Wierzbica, M. Rao, N. El-Ghorab, H. Shaheen, S.B. Khalil, K. Kamal, M.O. Wasfy, A.M. Svennerholm, J.D. Clemens, and S.J. Savarino. 1999. Phenotypic diversity of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains from a community-based study of pediatric diarrhea in periurban Egypt. *J. Clin. Microbiol.* 37, 2974-2978.
 35. Qadri, F., S.K. Das, A.S. Faruque, G.J. Fuchs, M.J. Albert, R.B. Sack, and A.M. Svennerholm. 2000. Prevalence of toxin types and colonization factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 38, 27-31.
 36. Rappuoli, R., M. Pizza, G. Douce, and G. Dougan. 1999. Structure and mucosal adjuvanticity of cholera and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Immunol. Today* 20, 493-500.
 37. Sandvig, K. 2001. Shiga toxins. *Toxicon.* 39, 1629-1635.
 38. Stacy-Phipps, S., J.J. Mecca, and J.B. Weiss. 1995. Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1054-1059.
 39. Vidal, R., M. Vidal, R. Lagos, M. Levine, and V. Prado. 2004. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1787-1789.
 40. Waddell, T.E., C.A. Lingwood, and C.L. Gyles. 1996. Interaction of verotoxin 2e with pig intestine. *Infect. Immun.* 64, 1714-1719.

(Received September 13, 2004/Accepted December 1, 2004)

ABSTRACT : Transfer of Genes for Antimicrobial Resistance and Toxin of Hemolytic *Escherichia coli* Isolated from Feces of Pig Suffering Diarrhea to Human Isolates

Kyenam Lee, Byeong Yeal Jung¹, and Yeonhee Lee* (Department of Biology and Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea, ¹National Veterinary Research and Quarantine, Anyang, Kyonggi-Do 430-824, Korea)

Between 1997 and 1998 in Korea, 56 isolates of *Escherichia coli* were obtained from pig suffering diarrhea. Among those, 38 isolates that showed the hemolytic activity, antimicrobial resistance, and toxin production were studied. Among 38 isolates, thirty-six isolates (94.7%) were resistant to tetracycline, 27 isolates (71.0%) were resistant to ampicillin, 26 isolates (68.4%) were resistant to chloramphenicol, and 21 isolates (55.2%) were resistant to trimethoprim, while none was resistant to aztreonam, amikacin, and norfloxacin. Among these isolates, 21 isolates (55.3%) were multiple drug resistant to at least four different class antimicrobial agents. Extended spectrum β -lactamase producing isolates were not detected in the double disk synergy test. In these hemolytic *Escherichia coli*, heat-stable enterotoxin (89.5%) was the most prevalent toxin, followed by verotoxins (47.4%), and then heat-labile enterotoxin (31.6%). Except 8 isolates (21.0%) which produced ST only, 12 isolates (31.6%) produced ST and LT, 13 isolates (34.2%) produced ST, VT, and VTe, and 5 isolates (13.2%) produced VT and VTe. However, none produced all 4 types of toxin, simultaneously. The predominant serotype could not be determined by the agglutination method. Sixteen isolates (42.1%) were strongly adhered to T-24 bladder cell and 17 isolates (44.7%) were to Caco-2 intestinal cell. Especially, 11 strains (28.9%) were evaluated as strongly adhesive to both T-24 cells and Caco-2 cells. Genes for toxin and the antimicrobial resistance were transferred to clinical isolates of *Escherichia coli* from human urine by the filter mating method. Results suggest the possibility that antimicrobial resistance and toxin can be transferred from animals to humans by direct contact of resistant bacteria as well as gene transfer, although there was no correlation between toxin production, adherent activity, and antimicrobial resistance among hemolytic *E. coli* isolated from pig suffering diarrhea.