

豚由來 *Escherichia coli* 의 抗生物質耐性 및 傳達性耐性因子에 關하여

卓 鍊 斌

鄭 吉 澤

慶北大學校 農科大學 獸醫學科

서울大學校 獸醫科大學

緒 論

抗生物質은 各種 傳染病治療에 効果의으로 使用되어 왔으나 한편 抗生物質에 對한 耐性菌의 出現을 招來하였으며 그 出現頻度는 더욱 높아가고 있다.^{4,7,8)}

1959年 落合¹⁶⁾ 및 1960年 秋葉 등¹⁷⁾이 接合에 의한 藥劑耐性 傳達現像을 報告한 後 많은 研究者들^{1-3,9,10,13)}에 의하여 傳達性耐性因子(R因子)는 Gram 陰性腸內細菌에 널리 分布해 있음이 알려졌다. 1971年 Mercer 등⁶⁾은 抗生物質 投與豚群에서 分離한 *Escherichia coli*의 84.8%가 R因子에 感染되어 있다고 報告하였다. 또한 Mitsuhashi 등⁹⁾은 tetracycline 1% 含有飼料을 投與한 豚群은 全部가 抗生物質에 對한 低抗性 *E. coli*를 排泄한다고 報告하였으며 우리나라에서도 1975年 河¹⁴⁾는 犬由來 *Salmonella*에서, Tak¹²⁾은 *Salmonella typhi*에서 R因子의 分布를 報告한 바 있다.

저자 등은 우리나라에서 家畜由來 腸內細菌의 藥劑耐性 및 耐性菌의 R因子 分布狀況을 究明하는 것은 臨床 및 公衆衛生上 重要한 問題라고 생각되어 抗生物質添加飼料의 投與와 傳染性耐性菌의 出現頻度와의 相關關係를 實驗하여 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

對象家畜: tetracyclin을 7.5mg/kg 含有한 配合飼料로 飼育하고 있는 多頭飼育農家의 成豚 11頭(抗生劑群)와 抗生物質이 全然 含有되지 않은 飼料로 飼育하고 있는 副業農家의 成豚 13頭(非抗生劑群)를 對象으로 하였다.

供試菌: rectal swab에 의하여 얻은 糞을 Mac-Conkey 寒天培地에 塗沫培養하여 lactose를 分解한 菌集落中 5~10個를 任意로 擇하여 semi-solid nutrient agar에 各各 穿刺培養하여 保存하고 이들 菌에 對하여 indol 產生能, sorbitol, mannitol 및 arabinose의

分解能, malonate 利用 및 運動性 등을 檢査하여 *E. coli*로 同定된 161株(抗生劑群 78株, 非抗生劑群 83株)를 供試하였고 R回子の 被傳達菌으로는 日本 群馬大學 三橋教授로부터 分讓받은 *E. coli* ML 1410 NA^r 및 sodium azide에 低抗性이 있는 *S. typhimurium* LT₂를 使用하였다.

抗菌性物質: 供試한 抗菌性物質은 kanamycin(KM, 日本 萬有製藥), ampicillin(AP, 鍾根堂), tetracycline(TC, Pfizer Co.), chloramphenicol(CM, 鍾根堂), streptomycin(SM, Hoechst Co.), sulfisomidine(SA, 日本 第一製藥), nalidixic acid(NA, Sterling-Winthrop Labs.)로서 이들 藥品을 MacLowry 등⁵⁾의 方法에 따라 適當한 溶媒에 溶解시킨 다음 稀釋하여 使用하였다.

地培: SA에 對한 感受性檢査에는 Mueller-Hinton agar(MHA)를 使用하였고 SA 以外의 抗菌性物質에 對한 感受性檢査에는 nutrient agar(NA)를 使用하였으며 耐性傳達試驗에는 brain heart infusion broth(BHIB)를 使用하였다.

抗菌性物質에 對한 感受性檢査: Steers 등¹¹⁾의 方法에 準하였다. 即 各抗生物質을 0.4, 0.8, 1.6, 3.1, 6.3, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 800μg/ml가 되도록 稀釋하여 分注하고 NA 또는 MHA를 普通 使用量의 2倍濃度가 되도록 調製하여 一定量의 flask에 分注하여 멸균한 후 50°C의 恒溫槽에 保存하면서 抗菌性物質의 稀釋液을 等量 加하여 混合한 후 平板에 分注하였으며 調製後 5일이 경과한 것은 使用하지 않았다.

供試菌을 nutrient broth에 18時間 培養하여 生理食鹽水로 100倍稀釋한 菌液을 multiple inoculator로 抗菌性物質을 含有한 培地에 接種하고 37°C에서 24時間 培養한 다음 集落形成의 有無를 보아 最少發育阻止濃度(MIC)를 判定하였다. SA에 있어서는 抗菌性物質이 含有되지 않은 培地에서의 菌의 繁殖과 比較하여 繁殖이 顯著히 抑制되는 最少濃度를 MIC로 定하였다.

藥劑耐性傳達試驗: 供試菌과 被傳達菌을 各各 5ml

Table 1. Drug Resistance of *E. coli* Isolated from Pigs Fed with TC (7.5mg/kg) Containing Feedstuffs

Resistant to ^a	No. of Strains ^b
TC(200), SM(400), SA(400), KM(50)	A12-1
TC(200), SM(400), SA(400)	A6-1, 3, 4, 5, 6, 7, 9
TC(400), SM(100), SA(400)	A3-1, 8
TC(100), SM(200), SA(400)	A3-5
TC(200), SM(200), AP(50)	A2-5, A11-1, 2
TC(400), SM(200)	A3-3, 6, 7
TC(200), SM(100)	A1-2, 5, 7, 8
TC(50), SM(100)	A2-3
TC(50), AP(50)	A7-1, 7, A12-4
TC(200), SA(400)	A7-3
TC(50), KM(50)	A1-8
TC(200)	A4-3, A12-2
TC(50)	A2-9, A7-2, 6, A11-9

a : Numerals in parentheses indicate MIC, b : A1, A2...indicate pig no.

Note: TC-Tetracycline, SM-Streptomycin, AP-Ampicilin, SA-Sulfisomidine, KM-Kanamycin

의 BHIB에 接種하여 가끔 振盪하면서 37°C에서 3~4時間 培養한 다음 1ml의 供試菌과 4ml의 被傳達菌을 混合하여 37°C 18時間 培養하였다. 이들 混合培養菌液 0.1ml를 NA (25µg/ml)와 TC (25µg/ml), SM (25µg/ml), SA (100µg/ml), AP (12.5µg/ml) 또는 KM (12.5µg/ml)를 含有한 培地에 各各 均等히 塗布한 다음 37°C에서 24時間 培養하여 集落形成의 有無를 보아 耐性傳達를 判定하였고 必要에 따라 TC, SM, AP, KM 혹은 SA 만 含有한 培地를 併用하여 傳達頻度を 算出하였다. 供試菌은 NA와 選擇藥劑를 含有한 培地에서 發育하지 않음을 確認하였다.

結果 및 考察

非抗生劑群으로부터 分離한 *E. coli*는 8株 全部가 MIC 6.3µg/ml 이하로서 感受性菌이었으나 抗生劑群으로부터 分離한 *E. coli* 78株中 또는 TC, SM, SA, AP 또는 KM에 耐性인 菌은 33株(42.3%)였다(표 1). Mercer 등¹⁾이 牛 및 豚을 對象으로 報告한 84.8%의 耐性菌出現보다는 낮은 分布를 나타내고 있는데 이는 投藥된 抗生物質의 種類 및 量의 差異에 依한 것으로 생각된다. 耐性菌 33株는 TC 單劑耐性인 6株를 除外하고는 TC와 他藥劑에 對한 多劑耐性으로 이들 多劑性菌中 22株(66.7%)가 SM 耐性을, 12株(36.4%)가 SA 耐性을 隨伴하였고 AP 耐性 및 KM 耐性을 隨伴하는 것도 낮은 頻度로 出現하였으나 CM 耐性은 1株도 없

었다. 이 結果로 보아 TC를 投藥할 경우 *E. coli*는 TC 耐性은 물론 SM 耐性 및 SA 耐性도 같이 획득됨을 알 수 있다. Mitsubishi 등²⁾도 患者由來 *E. coli*의 藥劑耐性檢査에서 CM 耐性 *E. coli*는 극히 稀少하다고 報告하였는데 이는 本實驗結果와 같은 傾向이어서 CM 耐性은 잘 획득되지 않는다고 생각된다.

耐性菌 33株의 耐性樣相을 보면 第2表와 같이 TC, SM, SA 및 KM에 耐性인 菌이 1株, TC, SM 및 SA에 耐性인 菌이 10株, TC, SM 및 AP에 耐性인 菌이 3株, TC 및 SM에 耐性인 菌이 8株, TC 및 AP에

Table 2. Resistance Patterns of Strains Isolated

Resistance Patterns	No. of Resistant Strains	Per cent
TC, SM, SA, KM	1	3.0
TC, SM, SA	10	30.3
TC, SM, AP	3	9.1
TC, SM	8	24.2
TC, AP	1	3.0
TC, SA	3	9.1
TC, KM	1	3.0
TC	6	18.2
Total	33	100

Note: TC-Tetracycline, SM-Streptomycin, AP-Ampicillin, SA-Sulfisomidine, KM-Kanamycin

Table 3. Resistance Transfer of Isolates to *E. coli* ML 1410 NA^r

Resistance Pattern	No. of Strains	Transferability of Resistance to				
		TC	SM	SA	KM	AP
TC, SM, SA, KM	1	0	0	0	0	— ^a
TC, SM, SA	10	2	2	0	—	—
TC, SM, AP	3	1	3	—	—	0
TC, SM	8	7	7	—	—	—
TC, AP	1	0	—	—	—	0
TC, SA	3	0	—	0	—	—
TC, KM	1	0	—	—	0	—
TC	6	1	—	—	—	—

a : Not tested, TC-Tetracycline, SM-Streptomycin, AP-Ampicillin, SA-Sulfisomidine, KM-Kanamycin.

Table 4. Resistance Transfer of Isolates to *Salmonella typhimurium* LT₂^a

Resistance Pattern	No. of Strains	Transferability of Resistance to				
		TC	SM	SA	KM	AP
TC, SM, SA, KM	1	0	0	0	0	— ^b
TC, SM, SA	10	0	5	0	—	—
TC, SM, AP	3	0	3	—	—	0
TC, SM	8	7	8	—	—	—
TC, AP	1	0	—	—	—	0
TC, SA	3	0	—	0	—	—
TC, KM	1	0	—	—	0	—
TC	6	0	—	—	—	—

a : Sodium azide-resistant, b : Not tested, TC-Tetracycline, SM-Streptomycin, AP-Ampicillin, SA-Sulfisomidine, KM-Kanamycin

耐性인 菌이 1株, TC 및 SA에 耐性인 菌이 3株, TC 및 KM에 耐性인 菌이 1株, TC에만 耐性인 菌이 6株로서 81.8%가 多劑耐性菌이었다. 耐性樣相別로는 TC, SM 및 SA에 耐性인 菌이 30.3%로 가장 많았고 TC 및 SM에 耐性인 菌이 24.2%였다. Mercer 등⁶⁾의 成績도 같은 傾向이어서 動物由來 *E. coli*는 TC, SM 및 SA에 對한 三劑耐性이 가장 頻繁히 나타나는 것으로 생각된다.

E. coli ML 1410을 被傳達菌으로 使用하여 接合에 依한 耐性傳達을 實際한 結果는 第3表와 같다. TC, SM 및 SA에 耐性인 供試菌 10株中에서 2株가 TC 및 SM에 耐性を 傳達하였으며 TC, SM 및 AP에 耐性인 3株에있어서는 SM耐性은 모두 傳達하였으나 TC耐性은 1株만이 傳達하였다. TC 및 SM에 耐性인 8株中에서 7株가 그 耐性を 傳達하였고 TC單劑耐性이

6株에 있어서는 1株만이 耐性を 傳達하여 TC, SM 및 AP耐性菌과 TC 및 SM耐性菌이 높은 傳達率을 나타내었다.

S. typhimurium LT₂를 被傳達菌으로 使用한 耐性傳達成績(표 4)을 보면 TC, SM 및 SA에 耐性인 供試菌 10株中에서 5株가 SM耐性만을 傳達하였고 TC, SM 및 AP에 耐性인 3株도 SM耐性만을 傳達하였으나 TC 및 SM에 耐性인 8株에 있어서는 SM耐性은 全株가 傳達하였고 TC耐性은 7株가 傳達하였다.

被傳達菌別로 耐性傳達樣相을 比較하여 보면 TC耐性은 11株가 *E. coli* ML 1410에, 7株가 *S. typhimurium*에 各各 傳達하여 TC耐性은 *E. coli* ML 1410에의 傳達率이 높았으나 SM耐性傳達에 있어서는 供試菌中 12株가 *E. coli* ML 1410에, 17株가 *S. typhimurium* LT₂에 耐性이 傳達되어 SM耐性은 *S. ty-*

Table 5. Transfer Frequency of Drug Resistance of Isolates to *E. coli* ML 1410 and *S. typhimurium* LT₂

Strains (Resistance Pattern)	Transfer Frequency ^a	
	TC	SM
A1-2 (TC, SM)	10 ^{-1.0} (10 ^{-7.9})	10 ^{-6.3} (10 ^{-6.6})
A3-3 (TC, SM)	10 ^{-1.1} (10 ^{-6.8})	10 ^{-8.6} (10 ^{-6.9})
A3-8 (TC, SM, SA)	10 ^{-2.7} (—)	10 ^{-7.2} (10 ^{-6.0})
A6-3 (TC, SM, SA)	10 ^{-8.5} (—)	10 ^{-8.5} (10 ^{-7.2})
A4-3 (TC)	10 ^{-2.2} (—)	
A11-2 (TC, SM, AP)	10 ^{-4.9} (—)	10 ^{-7.9} (10 ^{-7.1})

a : Frequency to *S. typhimurium* LT₂ in parentheses, b : Not tested, TC-Tetracycline, SM-Streptomycin, SA-Sulfisomidine, AP-Ampicillin.

typhimurium LT₂에의 耐性傳達率이 높은 傾向이어서 被傳達에 따라 耐性傳達樣相이 다름을 알 수 있었다. 被傳達에 따른 耐性傳達頻度を 比較하여 보면(표 5) TC 耐性은 大概 10^{-1.0}~10^{-4.9}의 높은 頻도로 *E. coli* ML 1410에 傳達되었으나 *S. typhimurium* LT₂에 는 극히 낮은 頻도로 傳達되었다. 그러나 SM 耐性은 *E. coli* ML1410 및 *S. typhimurium* LT₂에 10^{-6.0}~10^{-8.6}의 낮은 頻도로 各各 傳達되어 被傳達菌에 따른 傳達頻도의 差異는 크지 않았으나 *S. typhimurium* LT₂에의 傳達頻도가 약간 높은 傾向이었다.

結 論

投生物質含有飼料(tetracycline, 7.5mg/kg)로 飼育한 成豚 11頭 및 抗生物質非含有飼料로 飼育한 成豚 13頭로부터 分離한 *Escherichia coli* 161株를 供試하여 tetracycline (TC), chloramphenicol (CM), streptomycin (SM), ampicillin (AM), kanamycin (KM), sulfisomidine (SA) 및 nalidixic acid (NA)에 對한 感受性을 檢査하고 耐性菌에 對하여는 耐性傳達을 實驗하여 다음과 같은 成績을 얻었다.

1. 抗生物質이 舍有되지 않은 飼料로 飼育한 豚으로부터 分離한 *E. coli* 最少阻止濃度(MIC)가 6.3μg/ml 이하로서 全菌株가 感受性菌이었으나 TC 含有飼料로 飼育한 豚群으로부터 分離한 *E. coli* 78株에 있어서는 TC, SM, AP, KM 또는 SA에 耐性인 菌이 33株로서 分離菌株의 42.3%가 耐性을 갖고 있었다.

2. 耐性菌 33株中 單劑耐性菌 6株(18.0%), 二劑耐性菌 13株(39.4%), 三劑耐性菌 13株(39.4%) 및 四劑耐性菌 1株(3.0%)로서 多劑耐性菌이 81.8%였으며 耐

性樣相은 TC, SM 및 SA 耐性菌이 10株(30.3%)로서 가장 많았고 다음은 TC 및 SM 耐性菌 8株(24.2%), TC 및 SA 耐性菌 3株(9.1%)의 順이었다.

3. 耐性菌 33株中 17株가 接合에 依하여 *E. coli* ML 1410이나 *S. typhimurium* LT₂에 耐性이 傳達되었으며 耐性菌의 51.5%가 R因子를 가지고 있었다.

4. 被傳達菌에 따라 耐性傳達樣相 및 耐性傳達頻도가 相異하였다.

參 考 文 獻

1. Anderdon, E.S. and Lewis, M.J.: Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in *Salmonella typhimurium*. Nature (1965) 208 : 843.
2. Datta, N.: Transferable drug resistance in an epidemic strain of *Salmonella typhimurium*. J. Hyg. (1962) 60 : 301.
3. Franklin, T.J.: Resistance of *Escherichia coli* to tetracyclines: Change in permeability to tetracyclines in *Escherichia coli* bearing transferable resistance factors. Biochem. J. (1967) 105 : 371.
4. Ikeda, A.: Types and drug sensitivity of bacterial enteropathogens isolated in neighboring countries of Japan. Trop. Med. (1969) 11 : 91.
5. MacLowry, J.D., Jaqua, M.J. and Selepak, S.T.: Detailed methodology and implementation of a semi-automated serial dilution microtechnique for antimicrobial susceptibility testing. Appl.

- Microbiol. (1970) 20 : 46.
6. Mercer, H.D., Pocerull, D., Gaines, S., Wilson, S. and Bennett, J.V.: Characteristics of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from animals: Relationship to veterinary and management uses of antimicrobial agent. Appl. Microbiol. (1971) 22 : 700.
 7. Mitsuhashi, S., Harada, K., Hashimoto, H. and Egawa, R.: Drug-resistance of Shigella prevalent in Japan. J. Exp. Med. (1961) 31 : 47.
 8. Mitsuhashi, S., Hashimoto, H., Egawa, R., Tanaka, T. and Nagai, Y.: Drug-resistance of enteric bacteria IX. Distribution of R factors in gram negative bacteria from clinical source. J. Bact. (1967) 93 : 1242.
 9. Mitsuhashi, S., Hashimoto, H. and Suzuki, K.: Drug-resistance of enteric bacteria XIII. Distribution of R factors in *Escherichia coli* strains isolated from livestock. J. Bact. (1967) 94 : 1166.
 10. Smith, H.W. and Halls, S.: Observations on infective drug resistance in Britain. Vet. Res. (1966) 78 : 415.
 11. Steers, E., Flotz, E.L. and Graves, B.S.: An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot. Chemother. (1959) 2 : 307.
 12. Tak, R.: Susceptibility to antimicrobial drug and transferable resistance of *Salmonella typhi* in Korea. Kor. Cent. J. Med. (1975) 29 : 241.
 13. Walton, J.E.: Infectious drug resistance in *Escherichia coli* isolated from healthy farm animals. Lancet (1966) 2 : 1300.
 14. 河大有 : 개에서 분리한 *Salmonella* 의 藥劑耐性과 R 因子. 大韓微生物學會誌 (1975) 10 : 70.
 15. 秋葉朝一郎, 小山恒太郎, 一色義人, 木村貞夫, 福島敏雄 : 多劑耐性 赤痢菌의 發生機序에 關する研究. 日本醫事新報 (1960) 1866 : 46.
 16. 落合國太郎, 山中敏樹, 木村勝直, 澤田 收 : 赤痢菌相互間及ひこれと大腸菌の之間における藥劑耐性の遺傳に 關する研究. 日本醫事新報 (1959) 1861 : 34.

Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* from Pigs Fed with Antibiotics-containing Feedstuffs

Ryun Bin Tak, D.V.M., M.S., Ph.D.

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Gyeongbuk University

Gill Taik Chung, D.V.M., M.S., Ph.D.

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

Abstract

One hundred and sixty one *Escherichia coli* strains isolated from 24 swine (11 swine fed with feedstuffs containing 7.5 mg/kg of tetracycline and 13 swine not received antibiotic) were studied for the drug resistance and distribution of R factors.

About 42 per cent of *E. coli* strains isolated from pigs of a herd fed with tetracycline (TC)-containing feeds were resistant to TC, streptomycin (SM), sulfisomidine (SA), ampicillin (AP) and kanamycin (KM), alone or in combination thereof, but none of the swine not receiving antibiotic containing feedstuffs excreted *E. coli* resistant to these drugs. Among resistant strains, 18.2% were found to be singly resistant to TC, whereas 81.8% were resistant to two or more antibiotics.

The most common pattern was the triple resistant to TC, SM and SA (30.3%), and followed by double ones to TC and SM (24.2%). About one half of resistant strains carried R factors which were transferable to the recipients by conjugation. In spite of feeding with feedstuffs containing only TC, high incidences of multiple resistance and R factors were observed in the *E. coli* isolated from these swine.