

내열성장독소 생산 대장균의 판정*

서울대학교 의과대학 미생물학교실 및 소아과학교실**

장우현 · 김문교 · 최명식 · 양남용 · 고광욱** · 서정기**

=Abstract=

Assay of Heat Stable Enterotoxin Producing *E. coli*

Woo Hyun Chang, Moon Gyo Kim, Myung Sik Choi, Nam Ung Yang, Kwang Wook Ko,**
and Jung Ki Seo**

Department of Microbiology and Pediatrics,* College of Medicine, Seoul National University
Seoul, Korea

Enterotoxigenic *E. coli* is one of causative agents of the infantile diarrhea and traveler's diarrhea. A modified infant mouse assay (IMA) was developed for the detection of heat stable enterotoxin (ST) of *E. coli* isolated from diarrheal and control infants and assay system was established with using enterotoxin producing reference strains.

The supernatant of the 24 hour-shaking culture of *E. coli* in Casamino Acid Yeast Extract Salt Broth (CYES-2) was ingested orally into the 2~4 day old ICR mice. After the mice were kept at 25°C for 4 hours, they were sacrificed and the gut weight body weight ratio(GW/BW) was taken as the index of fluid accumulation induced by heat stable enterotoxin of *E. coli*.

The results obtained were as follows;

1. The GW/BW responses of IMA tested with enterotoxin reference strains of *E. coli* (*E. coli* O 148 H 28 : ST+LT+, *E. coli* O 78 H- : ST+LT+, *E. coli* O 15 H 11 : ST-LT+, *E. coli* O 1 H 7 : ST-LT-) appeared to be ST dose-dependent, and not LT-dependent. From the dose-response curve, 25 μ l of culture supernatant was determined as test amount of the IMA.
2. Frequency distribution of IMA result from 643 strain of *E. coli* showed normal distribution at low GW/BW ratio and dispersed pattern at high GW/BW ratio. The GW/BW ratios of 0.056 ± 0.004 (mean \pm SD) of normal distribution which distributed from 0.044 to 0.068 ($P < 0.01$) was considered as ST negative. Thus the GW/BW ratio above 0.069 could be regarded as ST positive.

서 론

장독성대장균은 동물에서 뿐 아니라 사람에서도 소아 설사나 여행자 설사의 중요원인균 중의 하나로 알려져 있다^{23,24}.

장독성대장균이 생산하는 장독소는 易熱性腸毒素(Heat Labile Enterotoxin, LT)와 耐熱性腸毒素(Heat

Stable Enterotoxin, ST) 두 가지로, 이중 耐熱性腸毒素은 분자량이 4,000 dalton 정도의 작은 물질로 장내표피세포에 작용하여 cyclic GMP의 생산을 증가시켜 수분 분비를 유도해 설사를 일으키며 易熱性腸毒素은 분자량이 100,000 정도의 물질로 cyclic AMP를 증가시켜 설사를 유발시킨다고 알려져 있다²⁰.

耐熱性腸毒素은 면역원성이 거의 없어 腸毒素 단독으로는 항체를 얻기 어려운 실정이다^{13,14,16}. 따라서

* 본 연구 소요경비의 일부는 1983년도 서울대학교 병원 특진연구비로 충당되었음.

내열성장독소 측정법은 면역학적 방법이나 생화학적 방법으로는 시행되고 있지 않으며 다만 생물학적 효과를 볼 것으로서만 가능하다.

생물학적 방법 중에는 토끼, 개 등의 ligated ileal loop 법^{2,3}과 Infant Mouse Assay^{4,7,18,22} 법 등이 흔히 쓰이는 방법으로 소개되어 있다.

저자들은 내열성장독소생산 대장균을 판별하기 위하여 Dean⁴ 등의 Infant mouse assay 법을 검토하여 젓먹이 생쥐에 먹이는 대장균배양 상청액의 분량과 장관내 체액축적대 체중비의 관계를 분석하여 내열성장독소 생산 대장균 판별의 기준을 마련하였다.

실험재료 및 방법

1. 균 주

WHO collaborating center for phage typing and resistance of enteric bacteria, Division of enteric pathogens, Central Public Health Laboratory, London에서 분양받은 *E. coli* O 148 H 28(ST+LT+), *E. coli* O 78 H-(ST+LT-), *E. coli* O 15 H 11(ST-LT+), *E. coli* O 1 H 7(ST-LT-)와 1981년도 여름 경인지방의 소아설사환자와 비설사 소아대조군에서 분리한 *E. coli* 643주를 대상으로 하였다.

2. 배 지

독소생산배지로는 Evans(1973)⁶ 등에 따라 Casamino acid Yeast Extract Salt Broth(CYES-2)를 사용하였다.

3. 내열성장독소 측정

Dean 등의 방법을 수정하여 IMA를 다음과 같이 시행하였다.

각 균주를 CYES-2에 24시간 진탕배양하여 그 배양 상청액을 독소액으로 사용하였다.

생후 2~4일 된 젓먹이 생쥐(ICR)를 어미로부터 격리하여 3~5마리씩 한 실험군으로 하여 독소액을 자동 피펫으로 경구적으로 투여한 후 25°C에서 4시간 두어 독소반응을 유도하였다. 생쥐를 Chloroform으로 죽인 후 해부하여 장관(Gut)를 떼내고 실험군별로 나머지 몸체(Body)와의 무게의 비(Gutweight/Body weight)로서 내열성장독소 생산 여부를 판정하였다.

이 때 독소액에 2% Evans blue 액을 한방울씩 넣어 장내 색소 침착으로 먹인 독소액이 장관내에 틀림없이 들어간 것을 확인하였다.

매 실험군마다 내열성 및 이열성 장독소를 생산하지

않는 *E. coli* O1 HT(ST-LT-) 배양액을 대조로 삼았다.

성 적

1. 투여량에 따른 독소반응

장관내에 수분 축적을 명확히 판별할 수 있는 독소의 분량을 결정하기 위하여 이열성장독소와 내열성장독소를 모두 생산하는 *E. coli* O 148 H 28(ST+LT+), 내열성장독소만 생산하는 *E. coli* O 78 H-(ST+LT-), 이열성장독소만 생산하는 *E. coli* O 15 H 11(ST-LT+), 이열성장독소와 내열성장독소 모두 생산하지 않는 *E. coli* O 1 H 7(ST-LT-)의 배양액을 5 μ l, 15 μ l, 25 μ l, 50 μ l씩 각군에 투여하여 GW/BW를 측정하여 그림 1에 표시하였다. 즉 *E. coli* O 148 H 28(ST+LT+) 투여군에서는 각각 0.092 \pm 0.007, 0.095 \pm 0.009, 0.096 \pm 0.004, 0.098 \pm 0.008로 5 μ l 투여 부터 높은 값을 보였다. 한편 내열성장독소만 생산하는 *E. coli* O 19 H(ST+LT-) 배양액을 투여한 군에서는 각각 0.061 \pm 0.004, 0.071 \pm 0.006, 0.077 \pm 0.003, 0.090 \pm 0.009으로 투여량의 증가에 따라 점차 수치가 증가하는 양상을 나타내었다. 한편 이열성장독소만을 생산하는 *E. coli* O 15H11(ST-LT+) 배양액을 투여한 군이나 이열성, 내열성장독소를 모두 생산하지 않는 *E. coli* O 1 H 7(ST-LT-) 배양액을 투여한 군에서는 투여량의 증가에 관계없이 GW/BW

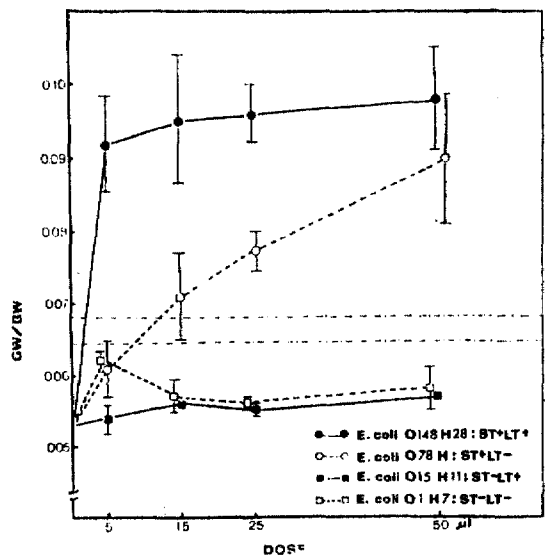


Fig. 1. Dose response of the culture supernatant of enterotoxin producing and non producing *E. coli* strains in infant mouse assay.

BW의 값이 0.054~0.062 사이에서 큰 변동이 없었다. 따라서 IMA는 내열성장독소에만 특이적으로 반응하는 검사방법임을 확인할 수 있었다.

한편 배양액의 증가에 따른 GW/BW 값의 증가가 독소생산하지 않는 *E. coli* O15H11과 *E. coli* O1H7 배양액 투여시의 GW/BW 값과 독소를 생산하는 *E. coli* O148H28과 *E. coli* O78H 배양액 투여시의 GW/BW 값과 분명히 구별되는 분량은 25 μ l임을 알게 되었다. 따라서 본 실험의 투여량을 25 μ l로 정하였다.

2. IMA의 재현도와 신뢰구간

E. coli 배양액 25 μ l를 경구적으로 젓먹이생쥐에 먹었을 때 독소반응의 결과로 표시되는 GW/BW 값의 재현도를 측정 한 결과를 표 1에 표시하였다. 즉 *E. coli* O148H28(ST+LT+) 배양액을 19번 되풀이 먹었을 때의 GW/BW는 평균 0.096 ± 0.017 이었으며 변이계수는 17.7%였고 *E. coli* O78H-(ST+LT-) 배양액을 18번 반복 투여하였을 때의 GW/BW는 평균 0.077 ± 0.012 이었으며 변이계수는 15.6%였다. 한편 내열성장

Table 1. Reproducibility of Infant mouse assay for ST in culture supernatant of enterotoxin producing and nonproducing *E. coli*

Strain	No. of tests	Mean	SD*	CV** (%)
<i>E. coli</i> 0148H28 ST+LT-	19	0.096	0.017	17.7
<i>E. coli</i> 078H(-) ST+LT-	18	0.077	0.012	15.6
<i>E. coli</i> 015H11 ST-LT+	13	0.055	0.004	7.2
<i>E. coli</i> 01H7 ST-LT-	12	0.056	0.003	5.3

* SD: standard Deviation, ** CV: Coefficient of Variation

독소를 생산하지 않는 *E. coli* O15H11(ST-LT-)와 *E. coli* O1H7(ST-LT-)의 배양액을 각각 13회, 12회 반복 투여했을 때 GW/BG와 변이계수는 각각 0.055 ± 0.004 , 7.2%, 0.056 ± 0.003 , 5.3%였다.

이상 결과로 보아 재현성이 있는 것으로 인정되었다. 소아설사환자와 비설사 소아에서 분리한 총 643주의 대장균을 대상으로 배양액 25 μ l를 경구투여한 IMA의

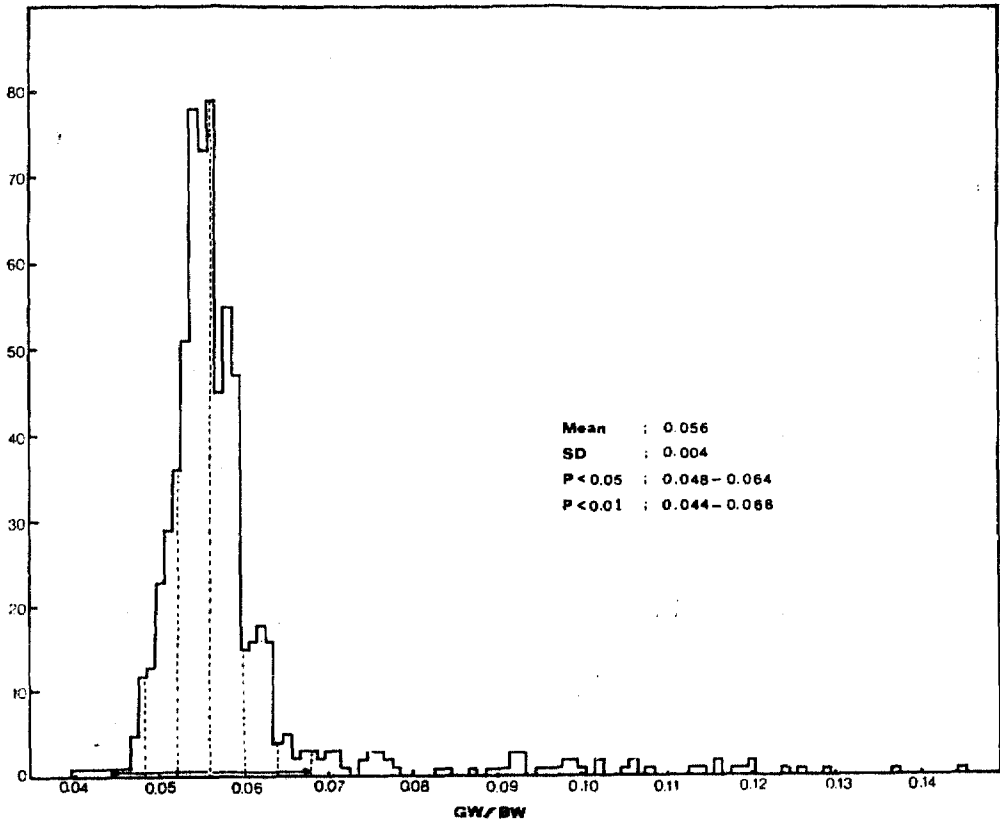


Fig. 2. Distribution of ratios of GW/BW for *E. coli* culture supernatant in the infant mouse assay.

결과를 그림 2에 표시하였다. 이 분포도는 낮은 수치의 GW/BW에서는 정규분포를, 높은 수치에서는 최고 0.145까지 불규칙적으로 분산 분포하였다. 낮은 수치를 보인 정규분포 부분은 평균 0.056, 표준편차 0.004였고 이는 내열성장독소 음성균주의 평균치와 표준편차로 간주할 수 있었으며 95% 신뢰 구간을 0.048~0.064로, 또 99%의 신뢰 구간의 분포를 0.044~0.068로 볼 수 있었다. 따라서 내열성 장독소 생산의 판별은 $GW/BW=0.068$ 이하를 99% 신뢰도의 음성으로 그 이상을 양성으로 하였다.

고 안

대장균의 내열성장독소(ST)생산 판별기준을 정하기 위해 Infant Mouse Assay를 시행하였다.

IMA는 다른 토끼나 새끼돼지의 ligated loop assay, Oral Dosing Assay²¹ 등에 비해 적은 동물을 사용하므로 다루기 쉽고 많은 양을 동시에 처리할 수 있는 이점이 있으며 이열성장독소 아닌 내열성장독소에 민감하다고 알려져 있다^{2,5}.

IMA의 시행은 일반적으로 젓먹이 생쥐로서 장내세균이 정확하기 전의 생쥐에 독소액울 30G 바늘로 위에 직접 주사하는 방법과 경구투여하는 방법이 있으나 경구투여법이 투여의 성공률이 높고 쥐의 사망률이 낮으며 많은 양의 멸균된 30G 바늘이 필요없는 장점이 있다. 또 장독소생산 표준균주를 사용한 본 연구의 IMA 결과에서 확인할 수 있었던 바와 같이 LT 생산여부에 관련없이 ST 비생산균주(*E. coli* O15H11:ST-LT⁺, *E. coli* O1H7:ST-LT⁻)는 GW/BW의 값이 낮고 또 배양액 투여량의 증감에 따른 변동이 없었으며 LT 생산을 하거나(*E. coli* O148H28:ST+LT⁺), 안 하거나(*E. coli* O78H⁻:ST+LT⁻) ST를 생산하는 균주이면 ST 생산여부에 따른 GW/BW 값이 차이 지 있었으므로 GW/BW 값은 LT 생산과는 무관하여 ST 생산에 기인하는 값으로 판단할 수 있다.

Olsson과 Söderland²¹는 0.1 ml를 위에 주사하여 IMA를 실시한 결과 변이계수가 4.5~13.8%라고 하였다. 이에 비교하여 본 실험결과도 5.3~17.7%로서 보이고 있어 IMA는 상당히 재현도가 높다고 할 수 있다. 그리고 25 μ l의 경구투여법으로 투여량의 증가에 따른 생쥐 자연사를 높이지 않고도 IMA를 성공적으로 시행할 수 있었다.

Gyle¹⁰ 등은 다른 장독성대장균주로부터 얻은 ST 플라스미드들에서 유전적인 차이를 보고하였다. 또 다른 장독성대장균주로부터 얻은 ST는 분자량에도 차이

가 있고^{7,11}, 내열성¹²과 Metanol 용해도²²가 다른 성분이 있다고 한다. 따라서 ST는 여러 종류의 Sub-type이 존재한다고 믿어지고 있다²⁰. 이런 보고들은 본 연구의 ST 양성 균주간 GW/BW 값의 넓은 변동을 설명할 수도 있을 것이다.

또 ST의 종류에 따라 반응하는 숙주동물에 차이가 있으며 생쥐에 반응하지 않는 ST도 존재한다는 보고^{19,21}도 있으나 Infant Mouse Assay는 여전히 가장 좋은 ST 측정법으로 채택되고 있다.

그런 점에서 순수분리 정제된 ST를 이용한 면역학적 방법이라던가 그 외 좀 더 나은 ST 측정법 개발이 요망된다.

결 론

장독성대장균은 여름철 소아설사의 중요한 원인균의 하나로 생각되고 있다.

대장균에서 내열성장독소(ST)의 생산여부를 판별할 수 있는 기준을 마련하기 위하여 장독소생산 표준균주와 소아 설사환자와 대조군에서 분리한 대장균을 사용하여 Infant Mouse Assay를 시행하였다.

CYES-2에서 24시간 진탕배양한 각 균주의 배양상청액을 독소액으로 하여 생후 2~4일된 젓먹이 생쥐에 경구투여하여 4시간 후 장내수분 축적량을 Gut Weight/Body Weight의 비로 선정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *E. coli* O148H28=(ST+LT⁺), *E. coli* O78H⁻(=ST+LT⁻), *E. coli* O15H11:(ST-LT⁺), *E. coli* O1H7:(ST-LT⁻)를 사용하여 IMA를 시행한 결과 GW/BW의 값은 ST의 생산에 따라 변화하였으며 LT 생산과는 무관하였다. 배양상청액 5, 15, 25, 50 μ l 투여량증가에 따라 ST 생산균주는 용량반응을 보였으며 ST 비생산 균주는 변화가 없었다. 용량반응의 결과로부터 25 μ l를 양성 음성 판별을 위한 기본 투여량으로 결정하였다.

2. 분리된 총 643주의 대장균을 대상으로한 IMA 결과의 분포는 낮은 GW/BW 값에서는 정규분포를, 높은 GW/BW 값에서는 널리 분산분포를 보였다. 정규분포를 보인 부분은 GW/BW의 평균과 표준편차가 0.056 ± 0.004 였으며 0.044~0.068(P<0.01) 부분을 ST 음성으로 간주하고 이에 따라 0.069 이상을 ST 양성으로 결정할 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Alderete J.F. and Robertson D.C.: *Purification and chemical characterization of the Heat-Stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 19 : 1021—1030, 1978.
- 2) Burgess M.N., Bywater R.J., Cowley C.M., Mullan N.A., and Newsome P.M.: *Biological evaluation of a methanol soluble, Heat-Stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves*. *Infect. Immun.* 21 : 526—531, 1978.
- 3) Byers P.A. and DuPont H.L.: *Pooling method for screening large numbers of Escherichia coli for production of heat-stable enterotoxin, and its application in field studies*. *J. Clin. Microbiol.* 9 : 541—543, 1979.
- 4) Dean A.G., Ching Y., Williams R.G. and Harden L.B.: *Test for Escherichia coli enterotoxin using infant mice: Application in a study of diarrhea in children in Honolulu*. *J. Infect. Dis.* 125 : 407—411, 1972.
- 5) Evans, D.J. Jr, Evans D.E. and Gorbach L.: *Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from man*. *Infect. Immun.* 8 : 725—730, 1974.
- 6) Evans D.G., Evans D.J. Jr. and Pierce N.F.: *Differences in the response of rabbit small intestine to Heat-Labile and Heat-Stable enterotoxins of Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 14 : 95—99, 1976.
- 7) Gianella R.A.: *Suckling mouse model for detection of heat-stable Escherichia coli enterotoxin: Characteristics of the model*. *Infect. Immun.* 14 : 95—99, 1978.
- 8) Gomes J.A., Rodrigues, A.C., Simões M., Serafim M.B. and Pestana de Castro A.F.: *Simplification of method for the production and storage of specimens to be tested for heat-stable enterotoxin of Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 10 : 786—790, 1979.
- 9) Gyles, C.L.: *Limitations of the infant mouse test for Escherichia coli heat stable enterotoxin*. *Can. J. Comp. Med.* 43 : 371—379, 1979.
- 10) Gyles, C., So. M. and Falkow S.: *The enterotoxin plasmids of Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 130 : 40—49, 1974.
- 11) Jack T.M. and Wu B.J.: *Biochemical properties of Escherichia coli low molecularweight, heat-stable enterotoxin*. *Infect. Immun.* 9 : 342—347, 1974.
- 12) Kapitany R.A., Forsyth G.W., Scott A., McKenzie S.F., Worthington R.W.: *Isolation and partial characterization of two different heat-stable enterotoxins produced by bovine and porcine strains of enterotoxigenic Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 26 : 173—177, 1979.
- 13) Klipstein F.A., Engert R.E. and Clements J. D.: *Protection in rats immunized with Escherichia coli heat stable enterotoxin*. *Infect. Immun.* 34 : 637—639, 1981.
- 14) Klipstein F.A., Egnert R.F. and Clements. J. D.: *Development of a vaccine of cross-linked heat-stable and heat labile enterotoxins that protects against escherichia coli producing either enterotoxin*. *Infect. Immun.* 37 : 550—557, 1982.
- 15) Klipstein F.A., Egnert R.F. and Houghten R. A.: *Properties of synthetically produced escherichia coli heat stable enterotoxin*. *Infect. Immun.* 39 : 117—121, 1983.
- 16) Moon H.W., Baetz A.L. and Gianella, R.A.: *Immunization of swine with heat-stable Escherichia coli enterotoxin coupled to a carrier protein does not protect suckling pigs against an escherichia coli strain that produces heat-stable enterotoxin*. *Infect. Immun.* 39 : 990—992, 1983.
- 17) Moon H.W., Fung, P.Y., Whipp S.C., Isaacson R.E.: *Effects of age and ambient temperature on the response of infant mice to heat stable enterotoxin of Escherichia coli: Assay modifications*. *Infect. Immun.* 20 : 36—39, 1978.
- 18) Mullan N.A. Burgess M.N. and Newsome P. M.: *Characterization of a partially purified, methanol-soluble heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice*. *Infect. Immun.* 1 : 779—784, 1978.

- 19) Nalin D.R., Levine M.M., Young C.R., Bergquist E.J. and McLaughlin J.C.: *Increased Escherichia coli detection after concentrating culture supernatants: Possible new enterotoxin detectable in dogs but not in infant mice* *J. Clin. Microbiol.* 8 : 700—703, 1978.
- 20) Newsome P.M., Burgess M.N. and Mullan N. A.: *Effect of Escherichia coli heatstable enterotoxin on cyclic GMP levels in mouse intestine.* *Infect. Immun.* 22 : 290—291, 1978.
- 21) Olsson E and Söderlind O.: *Comparison of different assays for definition of heat-stable enterotoxigenicity of Escherichia coli porcine strains* *J. Clin. Microbiol.* 11 : 6—15, 1980.
- 22) Pestana de Castro A.F., Serafim M.B., Rangel H.A. and Guerrant R.L.: *Swiss and inbred mice in the infant mouse test for the assay of Escherichia coli thermostable enterotoxin.* *Infect. Immun.* 22 : 972—974, 1978.
- 23) Sack R.B., Gorbach S.L., Banwell J.G., Jacobs B., Chatterjee B.D. and Mitra R.C.: *Enterotoxigenic E. coli isolated from patients with severe cholera like disease.* *J. Infect. Diseases.* 123 : 378—385, 1971.
- 24) Sack D.A., McLaughlin J.C., Sack R.B., Qrskor F. and Orkov. I.: *Enterotoxigenic E. coli isolated from patients at a hospital in Decca.* *J. Infect. Diseases.* 135 : 275—280, 1977.
- 25) Takeda, Y., Takeda T., Yano T, Yamamoto K. and Miwatani T.: *Purification and partial characterization of heat-stable enterotoxin of enterotoxigenic Escherichia coli.* *Infect. Immun.* 25 : 978—985, 1979.
- 26) Whipp S.C., Moon H.W. and Argenzio R.A.: *Comparison of enterotoxic activities of heat-stable enterotoxins from class 1 and class 2 Escherichia coli of swine origin.* *Infect. Immun.* 31 : 245—251, 1981.