

전남 지방의 설사 자돈에서 분리된 병원성 대장균에 관한 연구

김자숙·박형춘·정인호·오은희·박석준·고홍범*
전라남도축산기술연구소서부지소·전남대학교 수의과대학*

Studies on the pathogenic *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea in Chonnam

Ja-Sook Kim, Hyung-Choon Park, In-Ho Chung, Eun-Hee Oh, Hong-Burn Koh*

Southern Branch Of Chonnam Livestock Reach Institute,

*College of Veterinary Medicine, Chonnam National University**

Abstract

Porcine *E. coli* infection is a disease caused by Enterotoxin produced by Enterotoxigenic *Escherichia coli*(ETEC). Enteric colibacillosis has become an economically important disease in pigs as a result of increasing intensification of farrowing management. The present study undertaken to obtain the antibiotic sensitivity and distribution of serogroups and pili producibility test of ETEC from *E. coli* isolates in Chonnam. The results obtained were as follows.

1. A total of 71 isolates identified as *E. coli* employing IMViC system from rectal specimens of 54 piglets with diarrhea.
2. In antibiotic sensitivity test, isolates showed high sensitivity to AN, CM, Fox, GM, but resistance to EM, NA TC.
3. The distribution of 25 isolates of serogroups were 0141:K85(11.3%), 08:K87(8.5%), 064:K⁻(5.6%), 0138:K81(4.2%), 0139:K82(2.8%), 0157:K88ac(1.4%) and 0149:K91(1.4%).
4. MRHA of guinea pig erythrocytes was detected in 8 out of 25OK serotypes and 9 out of 46 unidentified serotypes. MRHA titers of serotypes showed from 64 to 128 in 0141:K85, 2 in 0138:K81 and no titers in 0139:K82.
5. The production of heat labile enterotoxin of ETEC was detect 39 out of 52 isolates showed β -hemolysin, 7 out of 52 isolates showed γ -hemolysin and 6 out of 52 isolates showed γ -hemolysin by GM₁ ganglioside ELISA. The distribution of LT toxin were in 12 isolate

showed β -hemolysin, 2 isolates showed α -hemolysin and 3 isolates showed γ -hemolysin in 25 OK serotypes.

Key Word : Piglet, Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Colibacillosis.

서 론

*E. coli*는 장내세균총과에 속하는 그람 음성균으로 세균성 자돈 설사증의 주원인이며 경제적 손실 또한 크다.^{1,18,20,29,37,43,44)} 대부분의 *E. coli*는 무해한 균이지만 어떤 균주들은 장관 감염증, 패혈증, 요도 감염증 또는 유방염의 원인이 되기도 한다. 병원성 *E. coli*의 분류 동정에는 혈청형, 생물형, 파괴형 그리고 전기 영동 분류형이 이용되고 있다. 이중 세포벽(O), 협막(K) 그리고 편모(K) 항원의 특성을 이용한 혈청형 분류가 가장 광범위하게 이용되고 있으며 이러한 혈청형 분류 목적으로 173개의 O 항원, 80개의 K 항원 그리고 56개의 H 항원이 이용되고 있다. 이중 H 항원은 같은 O 항원 균의 병원성을 확인하는데 지표로서 이용되고 있다.¹⁴⁾

Enterotoxigenic *Escherichia coli*(ETEC)는 장독소를 생산하여 설사를 유발하는데 K88(F4), K99(F5), K987P(F6), F41 등의 pili 항원들이 소장 상피 점막에 부착하여 기병원성을 갖는다고 하였으며^{1,21,29,37)} 자돈에서는 K88 K99 및 987P를 함유한 대장균이 어린 송아지와 어린양에서는 K99와 F41을 함유한 대장균이 주로 문제가 된다고 되어 있다.²¹⁾ *E. coli*의 pili는 균체표면에 있는 솜털처럼 가늘고 긴 단백질 성분이며 plasmid gene에 의해서 생성된다. 이러한 pili의 생성은 균주, 배지조성, 배양 시간 및 온도에 따라 영향을 받는다.^{38~39)} 또한 pili 부착능은 돼지의 유전형질에 따라 감수성이 있는 것과 저항성이 있는

것으로 알려졌으며 돼지의 나이에 따라 부착능에 대한 감수성이 차이가 있다.³⁾ Pili 항원은 manose-resistant hemagglutination(MRHA) test, 형광항체 또는 전자현미경 등에 의해 증명된다.^{10,11,15,20,25)}

특히 pili 항원을 가진 ETEC는 Heat-labile toxin(LT)과 Heat-stable toxin(ST) 어느 하나를 산생²¹⁾하거나 혹은 두 가지 독소를 동시에 산생하며 ST는 생후 2~4일된 젓먹이 마우스 검사법으로, LT는 Y mouse adrenal cell을 사용한 단층세포배양법 및 효소표시면역 검사법으로 측정할 수 있다.^{9,31,36,49,50)} LT의 분자량은 10만 이상으로써 항원성이 높은 toxin인데 비해 ST는 그 분자량이 5천 이하로써 항원성이 없다.²⁶⁾ 최근 어린 가축의 설사증으로 인한 폐사 등 피해를 효과적으로 줄이기 위한 일환으로 백신개발을 목적으로 장독소형 대장균에 대한 연구가 여러학자들에 의해 보고되었으며 현재에도 활발히 진행되고 있다.^{5,41)}

이 연구는 전남지방 양돈장의 포유자돈의 설사증에서 분리된 *E. coli*의 혈청학적 분류와 항생물질에 대한 감수성 시험과 장독소(enterotoxin) 및 hemolysin 생성여부를 확인하여 양돈장에서 *E. coli*에 의한 감염증 예방을 위한 기초 자료를 제공하고자 실시되었다.

재료 및 방법

• 실험재료

전남 지역 양돈장에서 심한 설사를 주증으로

하는 포유 자돈 54두를 대상으로 직장 면봉법 (Culture swab, Difco)으로 재료를 채취하였다.

• 사용배지

*E. coli*를 분리하기 위해 MacConkey agar(Difco)와 blood agar(Difco)는 pili 생성을 검사하기 위해 Minca medium(KH_2PO_4 1.36g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10.1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.008g, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.001g, $\text{FeCl}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.000135g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0004g, Glucose 1g, Casamino acid 1g, Yeast extract 1g, Bacto agar 3g, distilled water 1.000ml, pH 7.5)을 사용하였다. 이열성장독소를 확인하기 위해서는 trace salt solution(MgSO_4 5g, MnCl_2 0.5g, 0.5% FeCl_3 solution 10ml, distilled water 90ml)이 1ml 첨가된 Casamino acid-yeast extract medium(CYEM : casamino acid 20g, yeastextract 6g, NaCl 2.5g, K_2HPO_4 8.71g, distilled water 999ml)을 사용하였다.

• *E. coli* 분리 및 동정

실험재료를 MacConkey agar와 blood agar에 십여 18~24시간 배양하고 MacConkey agar plate의 경우 유당 분해 집락 1~2개를 선정하고 blood agar plate에서는 완전 용혈을 나타낸 탄백색(炭白色)의 smooth한 집락을 1~2개 선정하여 순수분리 하였다. 순수 분리된 집락은 자동 미생물 동정 장치(vitek system, automicrobic system, AMS)를 이용하여 생화학적 성상에 의하여 동정하였다.

• 혈청학적 동정

분리균을 혈청학적으로 동정하기 위해 Ørskov.F and Ørskov.I 및 Ørskov et al의 방법⁵³⁾에 준하여 생산된 22종의 OK 항혈청을 이용하여

평판 응집 반응법으로 OK 항혈청을 결정하였다.

• 감수성 시험

분리균을 blood agar에 접종하여 37°C에서 18~24시간 배양한 후 멸균 0.15M 식염수에 균액을 표준탁도액(MacFarland scale No, 2)과 같은 농도로 희석한 다음 Dulaney¹³⁾과 Krumpner³⁴⁾의 기준에 따라 디스크 확산법으로 실시하였다.

감수성시험에 사용된 약제로서는 Amikacin(AN), Ampicillin(AM), Carbenicillin(CB), Cefamandole(MA), cefoxitin(FOX), Cephalothin(CF), Chloramphenicol(CM), Gentamicin(GM), Tetracycline(TC), Streptomycin(SM), Kanamycin(KM), Erythromycin(EM), Nalidixic acid(NA) 이었다.

• Pilus 생성능 검사

Mannose-resistant hemagglutination(MRHA) test는 Jones와 Rutter의 방법²⁸⁾으로 실시하였다. MRHA test는 Minca broth에 18~24시간 37°C에서 배양한 항원을 0.5% mannose PBS(NaCl 8g, Na_2HPO_4 11.5g, KH_2PO_4 0.2g, KCl 0.2g, D-mannose 5g, distilled water 1.000ml, pH 7.2) 0.025ml씩을 U-form microplate(Dynatech laboratory)에 넣은 후 2배수 희석하였다. Alsever 용액(glucose 2.05g, sodium Citrate 8g, NaCl 0.42g, citric acid 0.055g, distilled water 100ml)과 guinea-pig에서 채혈한 동량의 혈액을 섞은 후 PBS로 3회 세척후 PBS에 1% (v/v)로 부유시켜 만든 1% guinea-pig 적혈구액 0.025ml를 dropper(Dynatech Laboratories)로 plate에 점적 하면서 잘 혼합하여 0~4°C에서 2~3시간 방치 시킨 후 혈구 응집이 일어난 항원의 최고 희석배수를 MRHA로 정하였다.

• Hemolysin의 검사

분리균을 blood agar에 도말 접종한 다음 용혈 여부로 hemolysin을 증명하였다.

• 이열성 장독소(Heat-labile enterotoxin : LT)의 검사

분리균주의 이열성 장독소(LT) 증명을 위해 분리균을 CYEM에 접종하고 37℃에서 18~24시간 진탕 배양하여 원심한 후 그 상층액을 시험재료로 준비하였다. Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA)는 WHO방법⁵²⁾에 준하여 다음과 같이 실시하였다. 이열성 독소의 준비는 50ml의 CYEM에 대장균을 접종한 다음 37℃ 진탕 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양액을 8,000g에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 사용하였다. 이열성 독소의 검출을 위해 GM₁ ganglioside(1ug/ml, sigma)100ul을 96 well plate(Costar, cambridge, Mass)에 coating 하여 하룻밤 방치한 후 다음날 PBS/Tween 20을 200ul로 3회 세척하여 PBS/Tween 20에 3% bovine serum albumin을 100ul 첨가하였다. 37℃에서 1시간 배양 후 다시 200ul PBS/Tween 20으로 3회 세척하였다. 여기에 원심 분리 후 준비한 상층액 100ul을 첨가하여 37℃에서 90분 동안 배양한 후 PBS/Tween 20으로 3회 세척하였다. 다음으로 1% BSA가 첨가된 PBS/Tween 20으로 희석한 1:3,200 guinea pig anti-cholera toxin serum(Sigma) 100ul을 첨가한 후 37℃에서 2시간 배양하였다. 1% BSA가 첨가된 Tween 20에 1:200으로 희석한 alkaline phosphatelabelled anti-guinea pig IgG(Sigma) 100ul을 첨가한 후 다시 37℃에서 1시간 배양하였다. 그리고 PBS/Tween 20으로 3회 세척하였다. 10% diethanolamine buffer에 용해시킨 P-nitrophenyl phosphate substrate(1mg/ml,

sigma) 100ul을 첨가하였다. 37℃에서 45분간 배양 후 3N NaOH 25ul으로 반응을 정지시키고 405nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

판정은 두 well의 optical density(OD) 평균치를 음성 대조균의 평균치와 비교하여 OD치의 차가 0.2 이상일 경우 LT 생성 양성균주로 판정하였다.

결 과

• E. coli의 분리 동정

분리된 71주의 생화학적 성상을 조사한 결과는 표 1에 나타내었다. 아외 분리주는 urease, H₂S, phenylalanine deaminase, malonate, gelatin 시험에서 음성 반응을 나타내었고 IMViC 시험 결과 표준균주의 성상과 거의 일치하였으며 ornithine decarboxylase, arginine dehydrolase, galactosidase(ONPG) 시험과 arginine dehydrolase 시험에서는 양성반응을 보였으며 당 분해 시험 결과 표준균주와 분리균주간의 성상이 동일하였다.

• 혈청학적 동정

전남지방의 설사자돈 54두에서 분리된 아외주 71주의 혈청형을 표 2에 나타내었다. OK 항혈청에 의해서 25주의 항혈청이 동정되었고 46주는 미 동정되었다.

• 감수성 시험

분리된 71주에 대한 약제 감수성을 조사 해본 결과 표 3에서와 같이 Amikacin(AN), Chloramphenicol(CM), Cefoxitin(FOX), Gentamicin(GM)에서 높은 감수성을 나타내었으나 Erythromycin(EM), Nalidixic acid(NA), Tetracycline(TC)에 대해서는 낮은 감수성을 나타내었다.

Table 1. Biochemical properties of 71 *Escherichia coli* isolated from piglet with diarrhea

Test or Substrates	Reaction of isolates	No. of positive	%
Methyl red	+	70	98.5
Voges-Proskauer	-	0	0
Indole production	+	67	94.3
Oxidase	-	0	0
Motility	+	65	91.5
Citrate utilization	-	2	2.81
Gelatin	-	0	0
Acetamide	-	3	4.22
ONPG	+	71	100
H ₂ S production	-	10	14
Esculin hydrolysis	-	0	0
Ornithine decarboxylase	+	63	88.7
Plant indican	-	3	4.2
Malonate	-	0	0
Arginine dehydrolase	-	34	47.8
Urease	-	0	0
Phenylalanine deaminase	-	0	0
Polymyxin B sensitivity	-	2	2.8
Glucose acid	+	71	100
TDA	-	6	8.4
P-coumaric	+	63	88.7
Acid from			
Sorbitol	+	66	99.9
Mannitol	+	67	94.3
Adonitol	-	4	5.6
Raffinose	+	37	52.1
Lactose	+	69	97.1
Sucrose	+	41	57.7
Maltose	+	64	90.1
Rhamnose	+	59	83
Xylose	+	65	91.5
Argine	-	7	9.8
Lysine	+	70	98.5
Dulcitol	-	31	49.2
Salicin	-	30	42.2
Arabinose	+	71	100
Inositol	-	2	2.8

Table 2. O(Somatic)K(Capsule) serotypes of 71 *Escherichia coli* isolates from piglet with diarrhea

OK serotype	No. of strain	Percentage(%)
O141:K85	8	11.3
O8:K87	6	8.5
O64:K ⁻	4	5.6
O138:K81	3	4.2
O139:K82	2	2.8
O157:K88ac	1	1.4
O149:K91	1	1.4
non-identified	46	64.8
Total	71	100.0

Cephalothin(CF) 과 Streptomycin(SM), dole(MA), Kanamycin(KM)에 대한 감수성은 Ampicillin(AM), Carbenicillin(CB), Cefamandole(MA), Kanamycin(KM)에 대한 감수성은 다양하였다.

Table 3. Antimicrobial drug susceptibility against 71 *Escherichia coli* isolated from piglet with diarrhea

Drugs	Concentration of disk(μ g)	Susceptibility	
		No. of strains	Percentage(%)
Amikacin	30	65	91.5
Ampicilin	10	40	56.3
Carbenicillin	100	37	52.1
Cefamandole	30	33	46.4
Cefoxitin	30	62	87.3
Cephalothin	30	15	21.1
Chloramphenicol	30	67	94.3
Gentamicin	10	68	92
Erythromycin	5	5	7.0
Kanamycin	30	38	53.5
Nalidixic acid	30	3	2.8
Streptomycin	10	19	26.7
Tetracycline	30	4	5.4
Tobramycin	5	53	74.6

• Pili 생성능 검사

분리된 71주에 대한 pili 생성능을 조사하여 그 결과를 표 4에 나타내었다. 25주의 OK 혈청형에서는 8주(32%), 46주의 미 항혈청형에서는 9주(19.5%)가 양성 반응의 MRHA를 나타냈으며 표 5에서와 같이 O141:K85는 64배 및 128배의

MRHA를 나타내었고 O138:K81은 2배의 저조한 MRHA를 나타냈으며 O139:K82는 MRHA의 반응이 없었다.

미 동정 혈청형 46주에 대한 MRHA는 2배 및 64배의 다양한 pili 생성능을 나타냈었다.

Table 4. Mannose Resistant-hemagglutination test against *Escherichia coli* isolated from piglet with diarrhea

	No. of piglet	No. of pili positive strain	Percentage(%)
Serotype	25	8	32
Non-serotype	46	9	19.5

Table 5. Mannose Resistant-hemagglutination test titration against *Escherichia coli* isolated from piglet with diarrhea

OK* serotypes non-serotypes	No. of strain	No. of pili positive strain	MR-HA**						
			2	4	8	16	32	64	128
O141:K85	8	2						1	1
O8:K87	6	1						1	
O64:K ⁻	4	1		1					
O138:K81	3	2	2						
O139:K82	2								
O157:K88ac	1	1						1	
O149:K91	1	1		1					
non identified serotypes	46	9	2	1	1	1	2	2	

* Somatic Capsular antigen

** Mannose Resistant-hemagglutination test

• Hemolysis 및 이열성 장독소 증명

분리된 71주의 *E. coli* 균주로 부터 hemolysis 및 이열성 장독소 생성여부를 조사하여 표 6에 나타내었다. 52주(73.2%)가 이열성 장독소를 생성

하였다. 이들중 39주가 β -hemolysin, 7주가 α -hemolysin 그리고 6주가 γ -hemolysin을 나타내었다. 또한 OK 혈청형 25주 중 17주가 이열성 장독소를 생성하였으며 이중 12주가 β -hemolysin

을 2주가 α -hemolysin을 생성하여 이열성 장독소와 hemolysin 생성간에 밀접한 상관관계를 나타내었다.

고찰

돼지의 설사 발생 양상은 원인체를 비롯하여 계절과 사양관리 상태 등에 따라 매우 다양하며 포유 자돈에서 40~50%가 병원성 대장균의 감염

에 의해서 발생되고 있다.^{1,18,44)}

사람과 동물에 질병을 일으킬 수 있는 대장균은 장병원성 대장균(Enteropathogenic *Escherichia coli* : EPEC), 장독소형 대장균(Enterotoxigenic *Escherichia coli* : ETEC), 장침입형 대장균(Enteroinvasive *Escherichia coli* : EIEC) 등으로 분류 할 수 있으며 이들중 어린 가축에서 심한 설사를 일으키는 대장균은 주로 장독소형 대장균이다.^{19,45,50)} 장독소형 대장균에 감염되면

Table 6. Correlation of hemolysin and enterotoxin(LT) released from 71 *Escherichia coli* and OK serotypes

	LT* of 71 <i>E. coli</i>		LT of 25 OK** serotypes	
	+ ^a	- ^b	+	-
α -hemolysin	7	2	2	2
β -hemolysin	39	13	12	4
γ -hemolysin	6	4	3	2
Total(%)	52(73.2)	19(26.7)	17(68)	8(32)
X ² value	7.8088			

* : Heat-Labile Toxin, ** : Somatic Capsular antigen.

a : product of heat labile toxin, b : nonproduct of heat labile toxin

villous enterocytes에 존재하는 ganglioside와 결합하게 되며 세포막에 존재하는 adenylyl cyclase 나 guanyl cyclase를 활성화시키므로 adenosine triphosphate(ATP) 나 guanosine triphosphate (GTP) 가 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) 나 cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 상태로 증가되어 양이온 전해질이 장관 내로 다량 유출되고 Na⁺ 재흡수가 억제되어 설사가 유발된다.^{33,45)}

ETEC의 pili는 돼지에서는 K88, K99, 987P 및 F41이 소와 양에서는 K99 및 F41이 사람에서

는 colonization factor antigen / I (CFA / I) 와 colonization factor antigen / II (CFA / II), F12 등이 있는 것으로 밝혀져 있으며 이들은 *E. coli*가 장관 상피세포에 부착하는데 관계한다.^{16,30,31)}

이 연구에서는 전남 지역 양돈장에서 심한 설사를 하는 자돈54두를 대상으로 자동 미생물 동정 장치(Vitek system, automicrobic system, AMS)를 이용하여 71주의 대장균을 분리하였다. 분리된 71 야외주에 대한 생화학적 성상을 표준 균주의 성상과 비교하였던 바 glucose, maltose 및 mannitol분해능은 모두 양성 반응을 나타내어

표준균주의 성장과 일치^{7,13,34)} 하였으며 oxidase, catalase 시험 및 H₂S 생성에서 다소 차이를 나타냈다. 이는 환경의 변화에 따른 변이주의 출현에 의한 것이라 생각된다.

분리 동정된 대장균 야외주는 혈청형 동정을 위해 Ørskov, F and Ørskov, I 및 Ørskov et al의 방법⁵³⁾에 준하여 생산된 22종의 OK 항혈청을 이용하여 평판 응집 반응법으로 25주의 혈청형을 확인하였다. Sojka 등⁴⁸⁾은 자돈에서 설사를 일으키는 대장균은 O8:K87:K88, O8:K35:K99, O9:K103:K, O20:K101:K, O45:K88, O101:K30:K99, O149:K88, O157:K88 등이라고 보고하였다. 한편 Smith 등⁴⁷⁾은 자돈에서 분리된 ETEC 64주중 17주가 K99 항원을 가지고 있으며 K99 항원을 가진 대장균의 O Serotypes는 O8, O9, O64, O101, O140 등이라 하여 K99 항원을 가진 대장균은 자돈 대장균의 주요 원인균임을 재확인하였다. 이 연구에서 설사자돈 54두에서 분리된 야외주 71주의 대장균중 22종 OK 혈청에 양성 반응을 보인 대장균은 25주였고 이들중 높은 분리 빈도를 나타낸 OK 혈청형은 O141:K(11.3%), O8:K87(8.5%), O64:K(5.6%), O138:K81(4.2%), O139:K82(2.8%), O157:K88ac(1.4%), O149:K91(1.4%)의 7종으로서 전체의 35.2%였으며 미확인된 혈청형은 46주였다. 이들 OK 혈청형은 자돈의 대장균증과 관련된 주요 혈청형으로서 전남 지방의 양돈장에서 발생하는 대장균의 OK 혈청형의 분포가 다른 연구자들의 보고¹⁴⁾와 유사함을 알 수 있었다. 또한 Rees⁴²⁾는 자돈에서 부종병을 일으키는 주요 원인 대장균의 혈청형은 O138:K81, O139:K82, O141:K85 등이라고 보고하였는데 이 연구에서 분리된 대장균중 O138:K81(3주), O139:K82(2주), O141:K85(8주) 혈청형의 분포를 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 이 지방 양돈장의 대장균에 의한 부종병의 혈청 분포를

간접적으로 비교 확인할 수 있으며 앞으로 이들 질병의 예방을 위한 기초 자료로 이용 될 수 있다고 생각된다.

분리된 *E. coli*의 항생물질에 대한 감수성 및 내성 양상을 조사 하였던 바 AN, CM, FOX, 및 GM에서는 84~94%의 높은 감수성을 나타내었으나 EM, NA, TC에 대해서는 2~7%의 감수성을 나타내어 높은 내성이 있음을 알 수 있었으며 CF와 AM, CB, MA, KM에 대한 감수성은 다양하였다. 이 연구에서 나타난 *E. coli*에 대한 약제 감수성 시험 결과는 다른 연구자의 보고^{2,29,32,37)}과 비교할 때 GM에 대해서는 감수성을 나타내었으나 외국에서는 감수성이 높은 TC에 대해 높은 내성을 나타내어 국내 분리주와 국외 분리주간의 내성 양상에 큰 차이를 나타내었다. 국내 분리주들의 TC에 대한 내성률이 높은 것은 최근 양돈장에서 TC제를 무분별하게 남용함으로써 내성균주가 출현한 것으로 생각된다. 또한 이러한 문제점은 국내에서 무차별한 약제 선정으로 내성균 출현뿐만 아니라 항생제가 잔류된 축산물 폐기물로 인해 각종 수자원 중의 미생물이 사멸 내지 내성인자 획득 등 미생물 생태계 파괴는 인해 공중보건학상 중요한 문제로 대두되므로 약제 선택시 신중을 기해야 할 것으로 생각된다.

Pili에 의한 MR-HA등은 pili가 상피세포에 부착하는 것과 같은 기전에 의하며 pili의 mannose binding activity가 상피세포에 부착하는 작용 및 탐식세포의 탐식작용과 관련된다.^{2,46)} 또한 대장균의 소장벽 부착력은 yeast cell이나 적혈구 응집능력과 밀접한 관계가 있으며 K88과 K99는 MRHA능력이 있는 반면 type I somatic common pili는 혈구응집능 없으며⁴⁾ F41은 기니픽과 사람 A형 적혈구를 강하게 응집하나 K99는 전혀 응집하지 않으며 반대로 말 적혈구를 강하게 응집하나 기니픽 적혈구는 응집하지 못한다.⁸⁾ Pili

생성은 배지의 성분 및 항생제에 의해서도 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, L-alanine에 의하여 K99항원의 생성이 억제 되었으며^{22~24)} L-alanine 뿐만 아니라 chloramphenicol에 의하여 K99항원의 생성이 완전히 억제되었다.³⁵⁾ *E. coli*는 시험관내에서 계대할 경우에 pili 생성능이 소실되기도 하나 세균을 in vivo상태로 환원시키면 pili 생성능이 쉽게 회복된다.^{40,45)} 실험실에서 계대배양중에 987P 항원의 생성이 중지된 균주를 동물에 계대하여 987P가 다시 생성되었음을 확인 하였으며⁴⁰⁾ K88과 987P 항원의 생성이 중단된 상태에 있는 균주를 Minca broth에서 계대 배양하여 pili 생성이 다시 이루어졌다고 하였다.⁴⁵⁾

이 연구에서는 pili 생성능 검사에서 pili 생성능이 저조한 단점을 피하기 위하여 유기물 함유량이 많은 BHIA나 TSA대신 Minca broth를 이용하여 혈청형 동정 야외주와 미혈청형 동정 야외주의 MR-HA(Mannose-resistant hemagglutination) test를 실시하였다. 25주의 OK 혈청형에서는 8주(32%)가, 46주의 미확인 항혈청형에서는 9주(19.5%)가 양성 반응을 나타냈으며 O141:K85는 64배 및 128배의 MR-HA를 나타내었고 O138:K81은 2배의 저조한 MR-HA를 나타냈으며 O139:K82는 MR-HA의 반응이 없었다. 이 연구에서는 분리된 71주에 대한 pili 생성능은 25주의 OK 혈청형에서는 8주(32%), 46주의 미항혈청형에서는 9주(19.5%)가 양성 반응의 MRHA를 나타냈으며 이중 혈청형 O141:K85는 64배 및 128배의 MRHA를 나타내었고 O138:K81은 2 배의 저조한 MRHA를 나타냈으며 O139:K82는 MRHA의 반응이 없었다. 이러한 결과는 OK 혈청형이 동정된 균에서 MR-HA로 인해 pili 생성능을 잘 보였다는 연구자들의 결과와 일치함을 확인 할 수 있었다.^{6,17)} 미 동정 혈청형 46주에 대한 MRHA가는 2배 및

64배의 다양한 pili 생성능을 나타냈었다. Clegg⁶⁾은 돼지에서 분리된 대장균의 혈청형과 미동정된 혈청형에서의 MRHA가의 양성 반응의 성적과 일치함을 확인 할 수 있었다.

여러 연구자들은 토끼 회장 결찰 시험법과 신생 마우스 검정법 그리고 GM₁ ganglioside ELISA 등을 이용하여 대장균의 이열성, 내열성 장독소에 대하여 연구^{9,12,16,27,50)}한바 있으며 hemolysin 생성과의 상관관계에 대해 보고를 하였다. 이 연구에서는 분리한 대장균에 대하여 hemolysin 및 장독소 생성 여부를 알아보기 위해 GM₁ ganglioside ELISA⁵¹⁾을 이용하였다. 야외주 71주 중 52주(73.2%)가 β -hemolysin을 생성하였고, 9주(12.7%)가 α -hemolysin을 생성하였으며 52주(73.2%)가 이열성 장독소를 생성하였다.

Kramer³³⁾는 OK 혈청형과 hemolysin 생성 사이의 이열성 장독소의 밀접한 상관성을 보고하였다. 이 연구에서도 4주가 α -hemolysin을 생성하였고 17주가 이열성 장독소를 생성하였으며 이열성 장독소와 hemolysin 생성간에 밀접한 상관관계를 나타내었다. 또한 Wiklund⁴⁹⁾ 그리고 Tsuti⁵¹⁾ 등은 포유 자돈에서 분리한 대장균의 72.5% 중 82%가 장독소를 생성하여 79%의 β -hemolysin과 높은 상관관계가 있음을 보고하였다. 이 연구에서도 분리된 71주의 *E. coli* 균주로 부터 hemolysis 및 이열성 장독소 생성여부는 52주(73.2%)가 β -hemolysin을, 9주(12.7%)가 α -hemolysin을 생성하였다. 52주(73.2%)가 이열성 장독소를 생성하였으며 또한 OK 혈청형 25주 중에서 16주가 β -hemolysin을, 4주가 α -hemolysin을 생성하였고 17주가 이열성 장독소를 생성하였으며 이열성 장독소와 hemolysin 생성간에 밀접한 상관관계를 나타내었다.

이 연구에서 얻어진 결과는 최근 전문화, 집약

화 되는 양돈 경영에 있어서 문제점으로 대두되고 있는 자돈의 대장균성 설사증의 예방을 위한 몇 가지 기초자료를 제공할 수 있었다. 그러나 대장균성 설사증의 효과적인 예방을 위해서는 여러 지역 양돈장을 대상으로 폭 넓은 혈청형의 분포 조사를 통한 효과적인 백신개발과 함께 제한 효소에 의한 plasmid 분석과 병원성 관련 인자의 encoding gene을 밝히는 연구가 이루어져야 된다고 생각된다.

결 론

전라남도내 양돈장에서 채취한 돼지 직장 내용물에서 *E. coli* 특성을 조사하기 위하여 분리균에 대한 생화학적 성상, 항생물질의 감수성 시험, OK 혈청형 동정, 장독소 및 hemolysin 생성에 관한 조사를 실시하여 다음과 같은 결과를 얻

었다.

1. 전남지방의 양돈장의 설사 자돈에서 54두 71주의 대장균을 분리하였으며 야외분리 25(36%) 주의 OK 혈청형은 O141:K85, O8:K87, O64:K, O138:K81 등으로 동정되었다.

2. 분리된 야외주는 Amikacin, Gentamicin, cefoxitin에 감수성반응을 나타냈으며 Tetracyclin, Erythromycin, Nalidixic acid에 내성반응을 나타내었다.

3. Pili 생성능 검사에서는 OK혈청형 25주 중 8주(32%)에서 MRHA양성 반응이었으며 46주의 미분류 OK혈청형에서는 9주(19.5%)가 양성 반응을 나타내었다.

4. 이열성 장독소는 OK 혈청형 25주 중 17주에서 생성되었으며 이중 2주가 α -hemolysin, 12주가 β -hemolysin, 그리고 3주는 γ -hemolysin을 생성하였다.

참 고 문 헌

1. Arbuckie JBR. 1968. The distribution of certain *Escherichia coli* strains in pigs and their environment. *Brit Vet J.* 124:152~155.
2. Bar-shavit Z, Goldman R, Ofek I, Shron N and Mirelman D. 1980. Mannose-binding activity of *Escherichia coli* : A determinant of attachment and ingestion of the bacteria by macrophages. *Infect Immun.* 29:417~424.
3. Bijlsma IG, de Nijs A, vander Meer C and Frik JF. 1982. Different pig phenotypes affect adherence of *Escherichia coli* to jejunal brush borders by K88ab, K88ac, or K88ad antigen. *Infect Immun.* 37: 891~894.
4. Burrows MR, Sellwood R and Gibbons RA. 1976. Hemagglutinating anve properties associated with the K99 antigen of bovine strains of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol.* 96:269~275.
5. Chidlow JW and Porret P. 1977. Uptake of maternal antibody by the neonatal pig following intramuscular and intramammary vaccination of the preparturient sow. *Res Vet Sci.* 23:185~190.
6. Clegg S. 1982. Serological heterogenesity among fimbrial antigens causing mannose-resistant hemagglutination by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 35:745~748.
7. Coates SR and Hoopes KH. 1979. Sensitivities of *Escherichia coli* isolated from bovine and porcine enteric infections to antimicrobial antibiotics. *Am J Vet Res.* 41:1882~1883.
8. Cravioto A, scotland SM and Rowe B. 1982. Hemagglutination activity and colonization factor antigens I and II in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from humans. *Infect Immun.* 36:189~197.
9. Czerkinsky CC and Svennerholm AM. 1983. Ganglioside GM₁, enzyme-linked immunosorbent assay for simple identification of heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 17:965~969.
10. De Graaf FK, Klaasen-Boor P and VanHeer JE. 1980. Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. *Infect Immun.* 30:125~132.
11. De Graaf FK, Wientjes FB and Klaasen-Boor P. 1980. Production fo K99 antigen by enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of antigen groups O₈, O₉, O₂₀ and O₁₀₁ grown at different conditions. *Infect Immun.* 27:216~222.
12. Dreyfus LA, Friedmann LA and Robertson DC. 1984. Characterization of the mechanism of action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Infect Immun.* 44:493~501.
13. Glantz PJ, Gyles CL, Greenfield J and øtskov F. 1974. Isolation of *Escherichia coli* O 157 from pigs with colibacillosis in canada and the united states. *Can J Comp Med.* 37:200~

202.

14. Gyles CL : *Escherichia coli*. Pathogenesis of bacterial infectious in animal. 2th edn. Gyles CL and Thoen CO. pp164~187.
15. Evans DG, Evans DJ, Taaq WS and Dupont HL. 1978. Detestion and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adult with diarrhea. *Infect Immun.* 19:727~736.
16. Evans DG and Evans DJ. 1978. New surface-associated heat-labile colonization factor Antigen(CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of sewgroups O₆, and O₈. *Infect Immun.* 21:638~647.
17. Evans DJ, Evans DG, and Dupont HL. 1979. Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined with humans, bovine, chicken, and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. *Infect Immun.* 23:336~346.
18. Francis DH and Willgohs JA. 1991. Evaluation of a live avirulent *Escherichia coli* vaccine for K88, LT⁺ enterotoxigenic colibacillosis in weaned pigs. *Am J Vet Res.* 52:1051~1055.
19. Gaastra W. and De Graaf FK. 1982. Host specific fimbrial adhesins of non invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains not belonging to the classical serotypes. *Infect Immun.* 15:549~555.
20. Gaastra W and Graaf FK. 1982. Host-specific fimbrial adhesions of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol Rev.* 46:129~161.
21. Glantz PJ and Kradel DC. 1971. *Escherichia coli* 0149:K91, K88ac:H10 isolated from pigs with colibacillosis in the United states. *Am J Vet Res.* 32:1607~1608.
22. Graaf FK, Klemm P and Graastra W. 1980. Purification, characterization, and partial covalent structure of *Escherichia coli* adhesive antigen K99. *Infect Immun.* 33:877~883.
23. Graaf FK and Roorda I. 1982. Production, purification, characterization, of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. *Infect Immun.* 36:751~758.
24. Graff FK, Klaasen-boor DP, and Hees JE. 1980. Biosynthesis of the K99 surface antigen is repressed by alanine. *Infect Immun.* 30:125~128.
25. Guinee PAA, Veldkamp J and Hansen WH. 1977. Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 15:676~678.
26. Guinee PAM and Jansen WH. 1979. Behavior of *Escherichia coli* K antigens K88ab, K88ac, and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion and hemagglutination. *Infect Immun.* 23(3):700~705.
27. Harel J, Lapointe H, Fallara A, Lortie LA, Bigras-Poulin M, Lariviere S, and Fairbrother

- JM. 1991. Detection of genes for fimbrial antigens enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J Clin Microbiol.* 29:745~752.
28. Jones GW and Rutter JM. 1972. Role of the K88 antigens in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglet. *Infect Immun.* 6:918~923.
 29. Kenworthy R and Allen WD. 1966. The significance of *Escherichia coli* to the young pig. *J Comp Pathol.* 76:31~35.
 30. Klemm P, Ørokov I and Ørokov F. 1983. Isolation and characterization of F12 adhesive fimbrial antigen from uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun.* 40:91~96.
 31. Klipstein FA, Engert RF and clements JD. 1982. Development of a vaccine of cross-linked heat-stable and heat-labile enterotoxin that protects against *Escherichia coli* producing either enterotoxin. *Infect Immun.* 37:550~557.
 32. Klipstein FA, Engert RF, Houghten RA and Rowe B. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *J Clin Microbiol.* 19:798~803.
 33. Kramer TT and Nderito PC. 1967. Experimental *Escherichia coli* Diarrhea in hysterectomy-derived one day ,fasting pigs. *Am J Vet Res.* 28:959~964.
 34. Krumpferman PH. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of Foods. *Appl Environ Microbiol.* 46:165~170.
 35. Lindahl M and carlstebt I. 1990. Binding of K99 fimbriac of enterotoxigenic *Escherichia coli* to pig small intestinal mucin glycopeptide. *J Gen Microbiol.* 136:1609~1614.
 36. Mcclane B and strouse R. 1984. Rapid detection of clostridium perfringens type A enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 19:112~115.
 37. Moon HW, Isaacson RE and Polenz J. 1979. Mechanisms of enteropathogenia *Escherichia coli* with intestinal epithlium. *Am J Clin Nutr.* 32:119~224.
 38. Morgan RL, Isaacson RE, Moon HW, Brinton CC and To CC. 1978. Immunization of suckling pigs against enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrheal disease by vaccinating dams with purified 987p or K99 pili : Protection correlates with pilus homology of vaccine and challenge. *Infect Immun.* 22:771~777.
 39. Morris JA, Thornas AC, Scott W, Sojka J and Wells GA. 1982. Adhesion in vitro and in vivo associated with an adhesive antigen(F41) produced by a K99 mutant of the reference strain *Escherichia coli* B41. *Infect Immun.* 36:1146~1153.
 40. Nagy B, Moon HW and Isaacson RE. 1977. Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli* : Selection of piliated form in vivo, adhesion of piliated forms to epithelial cells in vitro, and incidence of al pilus antigen among porcine enteropathegenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 16:344~352.
 41. Nagy B, Moon HW, Isaacson RE, To CC and Brinton CC. 1978. Immunization of suckling

- pigs against enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. *Infect Immun.* 21:269~274.
42. Ree TA. 1959. Studies on *Escherichia coli* of animal origin, 3, *E. coli*, serotypes from pigs. *J Comp Pathol.* 69:334~338.
 43. Ristaino PA, Levine Charles RY. 1983. Improved GM1-enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J Clin Microbiol.* 18:808~815.
 44. Ronnberg B and Wadström T. 1983. Rapid detection by a coagglutination test of heat-labile enterotoxin in cell lysates from blood agar-grown *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 17:1021~1025.
 45. Schneider RA and To SCM. 1982. Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains that express K88 and 987p pilus antigen. *Infect Immun.* 36:417.
 46. Silverblatt FJ, Dreyer JS and Schauer S. 1979. Effect of pili on susceptibility of *Escherichia coli* to phagocytosis. *Infect Immun.* 24:218~223.
 47. Smith W, Gaastra JP, Kumerling JF, Vliegenthart G and de Graaf FK. 1984. Isolation and structural characterization of the equine erythrocyte receptor for enterotoxigenic *Escherichia coli* K99 fimbrial adhesion. *Infect Immun.* 46:578~584.
 48. Sojka WJ, Lloyd MK and Sweeney EJ. 1960. *Escherichia coli* serotypes associated with certain pig diseases. *Res Vet Sci.* 1:17~27.
 49. Svennerholm A and Wiklund G. 1983. Rapid GM1-Enzymelinked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *J Clin Microbiol.* 17:596~600.
 50. Svennerholm AM and Holmgren J. 1978. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a Ganglioside Immunosorbent assay (GM1-ELISA) procedure. *Current Microbiol.* 1:19~23.
 51. Tsuti T, Taga S, Honda T, Takeda Y and Miwatani T. 1982. Molecular heterogeneity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 38:444~448.
 52. World Health Organization (WHO) 1983. Manual for Laboratory investigation of acute enteric infection. CDD. p.38~44.
 53. Ørskov I, Ørskov F, Jann B and Jann K. 1977. Serology, chemistry and genetics of O and K antigen of *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev.* 41:667~710.