The Korean Journal of Microbiology, Vol. 39, No. 4, December 2003, p. 293-295
Copyright©2003, The Microbiological Society of Korea

속 보

동물에서 분리된 용혈성 대장균의 항생제 내성

동물의 설사증이나 부종 또는 혈변 등은 용혈성을 나타내는 대장균(*Escherichia coli*) 감염에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다. 대장균의 감염에 의한 설사증이나 부종은 병원성 대장균이 오염된 사료나 물 등을 통한 경구감염에 의해 주로 전파되며, 신생 동물의 경우는 분변을 통한 감염이나 어미의 유두를 통한 감염이 주된 감염경로이다. 감염된 병원성 대장균은 장관벽에 부착하여 증식하게 되는데 이때 질병을 일으키게 되는 병독성 인자(virulence factor)는 부착인자(colinization factor)와 독소(toxin)이다(3, 9, 17). 대장균 균체에 돌출된 섬모(pili)는 대장균이 장관벽 내에 강하게 부착시키는 역할을 하며, 부착된 대장균은 장관내에서 증식하며 여러 가지 독소를 생산한다. 대장균의 종류는 크게 독소형(ETEC), 병인형(EPEC), 침입형(EIEC), 출혈성(EHEC)등으로 나누어지며(16), 종류에 따라 작용기전이 조금씩 다르게 나타난다. 독소형대장균은 섬모항원(fimbriae or pili) 과 장내독소(enterotoxin)를 분비하여 소장 내에서 cAMP 또는 cGMP를 증가시켜 Na^+와 Cl^- 이온의 교환을 방해하여 HCO_3 등 이온과 물의 흡수를 감소시킴으로 인해 탈수를 유발하여 대사성산증으로 결국 폐사를 유도하고, 출혈성대장균은 베로독소(verotoxin, shiga-like toxin)을 분비하여 이 독소가 혈액에 흡수되어 전신의 혈관을 파괴하는 것으로 알려져 있다(2, 5, 12, 15). 특히 포유자돈에 병원성을 갖는 대장균은 독소형 대장균으로서 이들은 장내독소인 이열성 독소(heat-labile toxin: LT)와 내열성 독소(heat-stable toxin: ST)중 한개 또는 두개를 동시에 생성하는 것으로 알려져 있다(11). 이들의 진단을 위하여 용혈성능(hemolytic activity)을 대장균의 병독성(virulence) 표지(marker)로 사용하고 있다. 일단 발현된 경우는 치료가 힘들기 때문에 발병이 확산될 위험이 있을 경우 증상이 나타나기 전에 장내 병원성 대장균에 감수성이 높은 우수한 항생제를 사료에 첨가하여 섭취하도록 하고 있다. 그러나 잦은 항생제의 사용은 항생제에 대해 내성을 가지는 세균을 유발할 수 있는 위험이 있으며(1, 4, 7, 8), 이에 대한 체계적인 감독과 연구가 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서는 동물로부터 분리된 용혈성 대장균의 항생제 내성 정도를 파악하여 항생제 사용에 대한 경각심을 불러일으키고 항생제의 사용에 대한 지침을 마련하는데 기초 자료를 제공하고자 하였다.

본 연구에서는 동물로부터 분리된 70종의 병원성대장균의 용혈성과 항생제 내성경향을 파악하였다. 2001년 국립수의과학검역원에서 분리한 돼지병원성 대장균 55균주와 2002년 서울대학교 수의과대학에서 돼지로부터 분리한 장관출혈성 대장균(Enterohemorrhagic *E. coli*) 4균주, 그리고 *E.coli* O157:H7 11균주를 실험대상으로 하였다. 실험에 사용된 70균주 중 총 44균주가 베타 용혈성(β-hemolytic activity)을 나타냈으며, 26균주에서는 용혈성을 보이지 않았다. 용혈성을 보인 균주에 대한 독소는 모두 장내독소인 이열성 독소인 것으로 나타났다. 실험에 사용된 70균주에 대해 amipicillin, cephalothin, gentamicin, norfloxacin에 대한 항생제 최소억제농도 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) 측정을 NCCLS(10)의 지침에 따라 표준 평판배지희석법 (standard agar dilution method)으로 실험하였으며, 실험에 사용된 항생제는 모두 Sigma (Louis, MO, USA) 제품을 사용하였다. 이를 위해 Muller Hinton (MH, Difco, Cockeysville, MD, USA) 배지에 각각의 균주를 10^4 CFU 접종하여 10 콜로니이하를 보이는 농도를 MIC로 정하였다. *E. coli* ATCC 25922 균주를 대조구로 하여 실험하였다. 항생제 내성 실험 결과는 Table 2에 요약되어 있다.

Ampicillin에 대해서는 다른 항생제에 비해 비교적 높은 내성을 가지는 것으로 나타났는데, 40 균주(57.1%)가 내성을 나타내었으며, 10균주(14.3%)가 중간내성, 19균주(27.1%)가 민감성을 나타내었다. Cephalothin에 대해서는 15균주(21.4%)가 내성, 17균주(24.3%)가 중간내성, 38균주(54.3%)가 민감성을 나타내었다. Gentamicin에 대해서는 23균주(32.9%)가 내성, 3균주(4.3%)가 중간내성, 44균주(62.9%)가 민감성인 것으로 나타났으며, norfloxacin에 대해서는 비교적 낮은 내성을 보였다. 5균주(7.1%) 만이 내성을 나타내었고, 2균주(2.9%)가 중간내성, 63균주 (90.0%)가 민감성을 보이는 것으로 나타났다.

특히 ampicillin의 경우 MIC_{50}과 MIC_{90}이 모두 128 μg/ml 이상이었으며, cephalothin의 경우 각각 8 μg/ml과 32 μg/ml, gentamicin의 경우 0.5 μg/ml와 32 μg/ml이었고, norfloxacin의 경우 0.25 μg/ml 이하와 4 μg/ml로 비교적 낮은 내성을 나타냈다 (Table 1). 4가지 균주에 대해 모두 내성을 가진 균주가 3균주 (4.3%)였으며, 4가지 균주에 대해 민감성을 보인 균주는 25균주 (35.7%)였다 (Table 3).

Cephalothin에 내성을 보이는 15균주에 대해서는 extended spectrum β-lactamases (ESBLs) 생성 여부를 판단하기 위하여 제3세대 항생제인 cefotaxime, ceftazidine과 clavulanic acid를 이용하여 double-disk synergy test (DDST)를 NCCLS의 지침에 따라 실시하였다. MH 평판배지에 10^8 CFU/ml 되도록 농도를 맞춘 각각의 균주를 면봉을 이용하여 고루 펴 바르고, 6 mm 지름의 디스크에 각각 cephalothin (30 μg), cephalothin와 clavulanic acid (30 μg of cephalothin plus 10 μg of clavulanic acid), ceftazidime

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

Table 1. Comparison of antimicrobial susceptibilities among 70 veterinary isolates of *Escherichia coli*

Antibiotics	MIC_{50}	MIC_{90}	Range
Ampicillin	>128	>128	8 ~ >128
Cephalothin	8	32	8 ~ 32
Gentamicin	0.5	32	<0.25 ~ 64
Norfloxacin	<0.25	4	<0.25 ~ >128

Table 2. Percentage of strains susceptible, intermediate, resistant to antibiotics

	% of strain susceptible, intermediate, resistant against antibiotics			
	Ampicillin (%)	Cephalothin (%)	Gentamicin (%)	Norfloxacin (%)
Susceptible	19 (27.1)	38 (54.3)	44 (62.9)	63 (90.0)
Intermediate	10 (14.3)	17 (24.3)	3 (4.3)	2 (2.9)
Resistant	40 (57.1)	15 (21.4)	23 (32.9)	5 (7.1)
Total	70 (100.0)	70 (100.0)	70 (100.0)	70 (100.0)

(30 μg), ceftazidime와 clavulanic acid (30 μg of ceftazidime plus 10 μg of clavulanic acid), cefotaxime (30 μg), cefotaxime와 clavulanic acid (30 μg of cefotaxime plus 10 μg of clavulanic acid)를 올려놓고 37°C에서 18시간 배양하였다. 결과는 NCCLS의 지침에 따라 clavulanic acid에 의한 억제환(inhibition zone)의 지름이 5 mm 이상 차이가 나는 것을 ESBL 생산균주로 판별하였다. 이에 대한 결과는 모두 음성으로 나타나 ESBL을 생성하는 동물분리균주는 발견되지 않았다.

현재 국내에서 임상분리 균주에 ESBL 생산에 대한 여러 연구결과들이 있다(6, 13, 14). 항생제 내성뿐만 아니라 이들 ESBL 생산에 관련된 유전자들의 전이가 플라스미드를 매개로 하여 비교적 쉽게 전달되는 것으로 알려져 있다. 이 경우 획득된 내성은 내성자체로서 치료의 어려움뿐만 아니라 플라스미드를 매개로 한 다른 내성을 함께 획득할 수 있는 가능성 때문에 질병 치료에 대한 항생제의 선택과 적절한 항생제 사용에 대한 어려움을 야기하게 되어 문제가 될 수 있다. 따라서 항생제 내성의 확산을 막기 위해 이들에 대한 철저한 관리가 필요하며, 보다 체계적인 항생제 내성 경향에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Table 3. Phenotypes of antimicrobial resistance

Phenotype of resistance	Number of isolates	Percentage (%)
All susceptable	25	35.7
Amp[a]	20	28.6
Cep[b]	-[e]	0.0
Gen[c]	-	0.0
Nor[d]	1	1.4
Amp, Cep	1	1.4
Amp, Gen	8	11.4
Amp, Nor	-	0.0
Cep, Gen	3	4.3
Cep, Nor	-	0.0
Gen, Nor	-	0.0
Amp, Cep, Gen	7	10.0
Amp, Cep, Nor	1	1.4
Amp, Gen, Nor	1	1.4
Cep, Gen, Nor	-	0.0
Amp, Cep, Gen, Nor	3	4.3
Total	70	100.0

[a], ampicillin; [b], cephalothin; [c], gentamicin; [d], norfloxacin; [e], none

이계남 · 박용호[1] · 정병열[2] · 이연희*
서울여자대학교 자연과학대학 생물학과, 항생제내성균주은행,
[1]서울대학교 수의과대학, [2]국립수의과학검역원

감사의 글

본 연구는 농림부 과제(과제번호 : 201102-3)의 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Horne, C., B.A. Vallance, W. Deng, and B.B. Finlay. 2002. Current progress in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* vaccines. *Expert. Rev. Vaccines.* 1, 483-493.
5. Karch, H. 2001. The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)-associated hemolytic-uremic syndrome. *Semin. Thromb. Hemost.* 27, 207-213.
6. 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.
7. Maynard, C., J.M. Fairbrother, S. Bekal, F. Sanschagrin, R.C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Lariviere, 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.
8. Molbak, K., P.S. Mead, and P.M. Griffin. 2002. Antimicrobial therapy in patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection. *JAMA.* 288, 1014-1016.
9. Nagano, K., K. Taguchi, T. Hara, S. Yokoyaa, K. Kawada, and H. Mori. 2003. Adhesion and colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in cecum of mice. *Microbiol. Immunol.* 47, 125-132.
10. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard-Fifth Edition. *NCCLS.* 20, 7-10.
11. Nishikawa, Y., Z. Zhou, A. Hase, J. Ogasawara, T. Kitase, N. Abe, H. Nakamura, T. Wada, E. Ishii, K. Haruki, and Surveillance Team. 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*. *Jpn. J. Infect. Dis.* 55, 183-190.
12. Ochoa, T.J., and T.G. Cleary. 2003. Epidemiology and spectrum of disease of *Escherichia coli* O157. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16, 259-63.
13. Pai, H., S. Lyu, J.H. Lee, J. Kim, Y. Kwon, J.W. Kim, and K.W. Choe. 1999. Survey of extended-spectrum β-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1758-1763.
14. 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.
15. 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.
16. Rodriguez-Angeles, G. 2002. Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli*. *Salud. Publica. Mex.* 44, 464-475.
17. Vranes, J., V. Kruzic, N. Sterk-Kuzmanovic, and S. Schonwald. 2003. Virulence characteristics of *Escherichia coli* strains causing asymptomatic bacteriuria. *Infect.* 31, 216-220.

(Received November 3, 2003/Accepted November 26, 2003)

ABSTRACT : Antibiotic Resistance of Hemolytic *Escherichia coli* Isolated from Animals in Korea

Kyenam Lee, Yong-Ho Park[1], Byungyul Chung[2], and Yeonhee Lee*
(Department of Biology, College of Natural Sciences, Seoul Women's University and Culture Collection of Antibiotic Resistant Microbes, Seoul 139-774, Korea, [1]College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea, [2]National Veterinary Research and Quarantine, Anyang, 430-824, Korea)

Total 70 isolates of *Escherichia coli* obtained from pigs were studied. Forty four isolates had β-hemolytic activity which was heat labile. Minimum inhibitory concentration test indicated that 40 isolates (57.1%), 15 isolates (21.4%), 23 isolates (32.9%), and 5 isolates (7.1%) were resistant to ampicillin, cephalothin, gentamicin, and norfloxacin, respectively. None of them were extended spectrum β-lactamases (ESBLs) producer when the double disk synergy test (DDST) was performed.

Key words □ antibiotic resistance, ESBL, hemolytic *E. coli*