

도축돈 장분변으로부터 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*의 분리와 성상

송영환 · 김지영 · 채미경 · 박창식¹ · 김명철 · 전무형*

충남대학교 수의과대학

¹충남대학교 형질 전환복제돼지연구센터

(게재승인: 2004년 10월 5일)

Identification and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from the feces of slaughtered pigs

Young-hwan Song, Ji-young Kim, Mi-kyung Chae, Chang-sik Park¹,
Myung-chul Kim and Moo-hyung Jun*

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

¹Research Center for Transgenic Cloned Pigs, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Accepted: October 5, 2004)

Abstract : Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) causes various clinical signs in human and animals, and has been indicated as a global enteropathogen with zoonotic importance. In this study, the feces of healthy pigs were collected from the slaughtered pigs of Daejeon abattoir during the period from December 2001 to October 2002. Of 326 specimens, 13 STEC were confirmed by culture, PCR and colony hybridization. The isolates were further studied for toxin types, pathogenic factors, plasmid profiles, and antimicrobial resistance to characterize the genetic and toxigenic properties. In PCR, all of 13 isolates were evident to have shiga toxin gene (*stx*). Of 13 isolates *stx1* gene was detected in 4 and *stx2* gene in 9. The genes of *eaeA*, *hlyA* and *rfbE* were not present in any isolates. In colony hybridization using shiga toxin common primer (STXc), 2 to 9 per 100 colonies subcultured from 13 isolates showed the positive reaction. In the examination for plasmid profiles of the isolates, one to eleven plasmids with varying sizes of 1.0 Kb to 100 Kb were detected, and the 13 STEC could be classified into four groups by the plasmid patterns. The antimicrobial resistance patterns of the isolates were comparably corresponded with the plasmid profile patterns.

Key words : shiga toxin-producing *E. coli*, fecal samples, pigs, genetic and toxigenic factors

서 론

대장균(*E. coli*)은 동물의 장관내에 주로 서식하는 통성혐기성균으로 갓 태어난 신생동물의 위장관내에서 서식하고 숙주와 공생관계를 유지하거나 질병을 유발한다 [17]. *E. coli*는 숙주의 면역 방어기전이 저하되거나 위장관 계통의 방어장벽이 손상을 입었을 경우 장점막에서 대량 증식하고 감염을 유발하여 설사, 폐혈증, 요로

감염증 등을 야기한다. 이와같은 병인기전은 *E. coli* 균주의 병원성과 밀접한 관계가 있다 [17, 18].

설사를 일으키는 *E. coli*의 병인기전과 관련된 인자로는 shiga toxin(Stx), heat-stable toxin, enterohemolysin, intestinal adherence factor, pO157 plasmid, iron transport system, lipopolysaccharides 등이 알려져 있다 [10, 18]. 이 가운데, Stx는 *stx*, intestinal adherence factor(intimin)은 *eaeA*, enterohemolysin은 *hlyA*, 그리고 lipopolysaccharides

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(R11-2002-100-0000-0)의 지원을 일부 받아 수행되었음.

*Corresponding author: Moo-hyung Jun

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

[Tel: +82-42-821-6753, Fax: +82-42-822-4216, E-mail: mhjun@cnu.ac.kr]

는 *rfbE* 유전자에 각각 암호되어 있으며, Stx는 shiga toxin-producing *E. coli*(STEC)와 enterohemorrhagic *E. coli*(EHEC)의 병원성을 지배하는 주요 인자로 밝혀져 있다 [10, 18]. STEC, 일명 vero cytotoxin-producing *E. coli*(VTEC)는 Stx 독소를 산생하고 attaching/effacing(A/E)병변을 유발하며 60 MDa plasmid를 가지는 정형적 EHEC와 Stx 독소를 생산하면서도 A/E 병변을 유발하지 않고 60 MDa plasmid가 없는 비정형 EHEC로 구분된다 [10, 17, 18].

STEC에는 Stx1 혹은 Stx2를 생산하는 것과 Stx1과 Stx2 모두를 생산하는 것으로 구분될 수 있으며 모두 사람과 동물에서 설사증과 밀접한 관계가 있으며, EHEC의 병인기전에는 Stx 뿐만 아니라 intimin, enterohemolysin, lipopolysaccharide 등이 관계가 있다 [17, 22, 23]. 이 중 *eaeA*에 의해 암호되는 intimin은 97-kDa A/E 단백질로 *E. coli*가 숙주의 장점막에 부착할 수 있도록 하는 역할을 한다. 또한 대부분의 EHEC에 존재하는 90 Kb 크기의 plasmid에 있는 *hlyA* 유전자에 암호되어 있는 enterohemolysin이 있으며, 이것은 출혈성 대장염과 출혈성 요독증 증후군의 병인기전에 중요한 역할을 한다 [18, 23].

STEC에는 43여종의 혈청형이 있으며, O26, O11 및 O157 혈청형은 사람에서는 출혈성 설사증, 출혈성 대장염, 급성신장질환, 출혈성 요독증 증후군, 혈전성 혈소판감소성 자반병을 일으키고 돼지에서는 설사증 및 부종병, 송아지에서는 이유 후 설사증을 유발한다 [9, 14, 18]. 특히 최근 O157:H7 혈청형은 사람 출혈성 설사증을 유발하는 병원체로 주목을 받고 있다 [5, 10]. 따라서 STEC은 국내외적으로 주요한 인수공통전염병의 병원체로서 인정되어, 가축과 축산식품에 대한 STEC의 분리 및 동정과 역학조사 연구가 여러나라에서 수행되었으며, 최근 유전자 검색 기법을 이용한 독소 관련 유전자의 성상에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 [7-9, 12, 21].

국내에서는 정상 동물 분변으로부터 *E. coli* O157:H7 및 Stx 산생균 분리 시험을 수행하여 O157:H7 혈청형을 검출한 바 있으며 [6], 도축장에서 처리된 식육에 대한 *E. coli* O157 오염여부를 검사하여 쇠고기, 돈육 및 계육에서 균이 분리되었다고 보고된 바 있다 [1]. 또한 *E. coli* O157:H7 신속검출을 위한 multiplex-PCR 기법을 확립하여 쇠고기에 대한 검출시험을 실시한 결과 *stx1*과 *stx2* 유전자를 가진 *E. coli*를 검출한 바 있다 [3]. STEC은 사람과 직접 또는 간접적으로 접촉이 가능한 산업동물 및 애완동물에 광범위하게 보균되어 있으며, 분변으로 배설되어 환경과 축산식품에 오염되어 공중보건학적 문제를 야기할 수 있으므로 정상 동물에 대한 STEC의

분포 실태를 구명할 필요가 있음이 지적되고 있다 [6, 7, 9, 21, 23].

본 연구에서는 대전지역소재 도축장에서 도축되는 돼지의 장분변에 대해 배양법, PCR 및 colony hybridization을 이용하여 STEC을 분리하고 reverse passive latex agglutination test를 이용하여 Stx 독소의 유전자형과 독소형을 시험하였다. 또한 enterohemolysin과 intimin을 암호하는 *hlyA* 및 *eaeA* 유전자를 검색하고 분리균주의 plasmid profile에 대한 일련의 시험을 수행하였다.

재료 및 방법

가검물 채취

2001년 12월부터 2002년 10월까지 대전지역 도축장에서 무작위로 선정한 정상돼지(5~6개월령, 90~110 kg) 326두의 결장부위를 무균적으로 절개 후 내용물을 멸균 면봉으로 3~5 g 정도 채취하여 생리식염수가 첨가된 멸균 수송용기에 넣어 냉장상태를 유지하면서 실험실로 운반하여 공시하였다.

공시균주 및 배지

E. coli ATCC 35150(STEC, O157:H7)을 대조용 균주로 공시하였다. Brain heart infusion broth(BHI, Difco), Luria-Bertani broth(LB broth, Difco), SIM 배지(Difco), MacConkey agar(Difco)를 공시하였다. 또한 MacConkey agar에 D-sorbitol(Difco) 1% 되게 첨가한 Sorbitol MacConkey agar를 선택배지로 사용하였다.

균배양 및 polymerase chain reaction(PCR)

채취된 분변을 각각 1 g 씩 10 ml의 BHI에 접종하여 37°C에서 20시간 동안 진탕 배양하였다. 그 후 배양액 0.1 ml를 취해 5 ml의 LB broth에 접종한 후 37°C에서 6시간 동안 다시 진탕 배양하였다. 세균배양액 1 ml를 15,000 rpm에서 5분간 원심 후 멸균된 phosphate-buffer saline(PBS, pH 7.1)에 3번 세척 후 100 µl의 멸균 증류수로 강하게 교반시키며 부유시켰다.

균부유액을 95°C에서 5분간 처리한 후 15,000 rpm에서 원심한 다음 상층액 1 µl에 STXc-F와 STXc-R 각각 1 µl 씩, 10×reaction buffer(100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH9.0) 5 µl, dNTPs mixture(10 mM, each dNTP 2.5 mM) 4 µl, taq polymerase(바이오니아) 1 µl(2 Unit) 그리고 멸균증류수 37 µl를 가하여 총 50 µl가 되도록 혼합한 후 PCR을 수행하였다. 1% ethidium bromide agarose gel을 이용하여 전기영동 하였고 Image Analyser(Pharmacia)로 판독하였다 [16, 24].

PCR 결과 *stx* 유전자 양성반응을 나타낸 분변의 배양

Table 1. Characteristics of the primers and reaction conditions for polymerase chain reaction

Primers ^a	Sequences	Location	Sizes	PCR condition (°C/m'sec")
STXc-F	5'-GAGCGAAATAATTTATATGTG-3'	280-300	518	94/5', 94/1'
STXc-R	5'-TGATGATGGCAATTCAGTAT-3'	778-797		58/1'30" 72/1'30"
STX1-F	5'-GAAGAGTCCGTGGGATTACG-3'	1022-1041	130	94/5', 94/1'
STX1-R	5'-AGCGATGCAGCTATTAATAA-3'	1132-1151		60/1'30" 72/1'30"
STX2-F	5'-GCGTTTTGACCATCTTCGT-3'	415-433	378	94/5', 94/1'
STX2-R	5'-ACAGGAGCAGTTTCAGACAG-3'	773-792		55/1'30" 72/1'30"
EaeA-F	5'-GTGGCGAATACTGGCGAGACT-3'	853-873	891	94/5', 94/30"
EaeA-R	5'-CCCCATTCTTTTCACCGTCG-3'	1723-1743		65/30" 72/1'30"
HlyA-F	5'-GGTGCAGCAGAAAAAGTTGTAG-3'	238-259	1551	94/5', 94/1'
HlyA-R	5'-TCTCGCCTGATAGTGTTTGGTA-3'	1767-1788		59/1'30" 72/1'30"
RfbE-F	5'-GTCTGGACTCAACGTGGATT-3'	181-200	986	94/5', 94/1'
RfbE-R	5'-AACTTGCTCATTCGATAGGC-3'	1147-1166		55/1'30" 72/1'30"

^aSTXc for STEC, STX1 and STX2 for *stx1* and *stx2*, EaeA and HlyA for virulence genes, RfbE for *E. coli* O157.

액은 MacConkey agar에 도말하여 37°C에서 18시간 배양 후 분홍색을 나타내는 100개의 집락을 LB agar에 patching method로 재 접종하여 colony hybridization에 사용하였다 [24]. STEC과 *E. coli* O157의 검출을 위해 STXc [16] 및 RfbE [26] primers를, toxin typing을 위해 STX1 [25] 및 STX2 [19] primers를, 그리고 병원성 인자인 intimin과 enterohemolysin 관련 유전자 검출을 위해 EaeA [13] 및 HlyA [15] primers를 각각 작제하였다 (Table 1).

Colony hybridization

DIG DNA Labelling and Detection kit(Boehringer Mannheim, Germany)와 Masahisa *et al.* [20]의 방법을 응용하여 수행하였다. STXc primers로 증폭된 518 bp의 DNA 분절을 100°C에서 10분간 끓여 denaturation 시킨 후 2 µl의 hexaprimer와 2 µl의 dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 및 digoxigenin이 표지된 dUTP를 첨가하고 1 µl의 Klenow enzyme을 가하여 37°C에서 18시간 동안 반응시킨 다음 2 µl의 EDTA 용액을 가하여 반응을 정지시켰다. 이어서 4M lithium chloride 용액과 100% ethanol으로 침전시켰으며 이것을 50 µl의 TE용액(100 mM Tris-Cl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 부유하여 digoxigenin이 표지된 gene probe DNA를 제조하였다. Nylon membrane

(Boehringer Mannheim, Germany)을 LB agar에 형성된 집락에 붙이고 5분간 정치시킨 후 떼어내어 filter paper (Whatmann, Germany) 위에서 변성액(0.5N NaOH, 1.5M NaCl)으로 15분간, 중화액(1.5M NaCl, 1M Tris)으로 15분간 각각 처리하고, 다시 2X SSC(0.3M NaCl, 30 mM Sodium citrate, pH 7.0)로 15분간 처리하였다. 용해된 집락을 30분간 80°C로 열을 가해 DNA를 고정하였다. 이후 kit 사용 방법에 따라 hybridization 반응과 발색반응 시험을 수행하였고, STEC 양성으로 증명된 집락을 선택하여 다음 시험에 공시하였다.

***E. coli* O157 검색**

STXc primers를 이용한 PCR에서 양성반응을 보인 균주들을 *E. coli* O157에 특이적인 RfbE primers를 이용한 PCR을 수행하였다. 또한 Farmer *et al.* [11]의 방법에 따라 Sorbitol MacConkey agar 평판에 접종하고 18~24시간 배양한 후 sorbitol를 분해하지 않는 백색 집락을 선발하고 다시 MacConkey agar 평판에 도말하여 유당을 분해하는 집락을 검색하였다.

Reverse passive latex agglutination(RPLA) 시험

VTEC-RPLA test kit(Senka Deiken, Japan)를 이용하여 수행하였다 [16]. 분리된 STEC을 BHI agar에 접종하여

37°C에서 16시간 배양 후 백금이 2배 정도의 균을 채취하여 Polymyxin B 용액(5000U/ml) 1 ml에 부유시킨 후 10분 간격으로 진탕하며 37°C에서 30분간 배양하였다. 그 후 900 g에서 15분간 원심하여 상층액을 실험에 사용하였다. 96 well V-type microplate(Becton Dickinson, USA)를 이용하여 25 µl의 희석액이 가해진 well에 균배양 상층액을 가하여 2배 단계 희석하였다(1:2~1:128). 여기에 Stx1 토끼항체와 Stx 2 토끼항체가 각각 코팅된 라텍스입자를 25 µl 씩 가하였다. 음성대조로 정상 토끼 IgG가 코팅된 라텍스입자를 공시하였고, 양성대조로는 verotoxin 1과 2를 공시하였다. Microplate는 습윤상자에 넣어 실온에서 18시간 반응시킨 후 침전정도를 육안으로 확인하였으며 반응정도에 따라 1+에서 3+로 표시하였다.

혈청형 시험

E. coli antisera kit(Denka Seiken, Tokyo, Japan)를 이용하여 수행하였다 [23]. O혈청형 시험은 분리균을 BHI agar에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 백금이의 3~4배 크기의 균을 채취하여 3 ml의 멸균 생리식염수에 부유시켰다. 부유액을 121°C에서 15분간 처리한 후 900 g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 버리고 0.5 ml의 멸균 생리식염수를 가하여 사용하였다. 슬라이드 글라스 위에 병원성 *E. coli* 관련 43개 O항혈청을 각각 떨어뜨린 후 항원액 10 µl 씩을 가하여 혼합한 다음 응집 여부를 관찰하였다. H형별 시험은 분리된 STEC을 SIM배지에서 3~5회 계대 배양하여 운동성을 증가시킨 후 실시하였다. 시험관에 병원성 *E. coli* 관련 22개 H항혈청 100 µl와 항원액 0.5 ml 씩을 각각 혼합한 후 50°C 항온수조에서 1시간 반응시킨 다음 응집상태를 관찰하였다. 결과의 판정은 O군별 시험은 1분내에 강한 응집반응을 나타내는 것은 양성으로 판정하였다. H형별 시험은 선상의 특이한 응집을 보이는 것을 양성으로 하였다.

Plasmid profile

LB broth에 37°C 18시간 동안 진탕 배양한 균액을 15,000 rpm에서 3분간 원심 분리한 후 상층액을 제거하고 100 µl의 TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 2 mM EDTA, pH 7.9)로 침전균액을 재부유시켰다. Lysis buffer(3% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 12.6) 200 µl를 가한 후 섞어주고 항온수조에서 55°C, 45분간 처리한 후 Phenol-chloroform solution(1:1 vol/vol)을 가해 교반 후 15,000 rpm에서 10분간 원심하였으며, 다시 원침한 다음 상층액을 취하여 0.7% ethidiumbromide agarose gel을 이용하여 전기영동 하였고 Image Analyser(Pharmacia)로 판독하였다 [24].

항생제 내성 검사

시험균주를 Mueller Hinton medium(Difco)에 접종한 후 Sensi-Disc(Becton Dickinson, U.S.A.)을 이용하여 amikacine(AN, 30 µg), amoxicillin-clavulanic acid(AMC, 20 µg+10 µg), ampicillin(AM, 10 µg), cefazolin (CZ, 30 µg), ceftiofur(CT, 30 µg), cephalothin(CF, 30 µg), ciprofloxacin(CIP, 5 µg), clindamycin(CC, 2 µg), colistin (CL, 10 µg), enrofloxacin(ENR, 5 µg), erythromycin(E, 15 µg), gentamicin(GM, 10 µg), kanamycin(K, 30 µg), lincomycin (L, 2 µg), linco-spectin(LS, 15 µg+200 µg), neomycin(N, 30 µg), streptomycin(S, 10 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim(SXT, 23.75 µg+1.25 µg), tetracycline(TE, 30 µg), tylosin(TL, 150 µg)의 20가지 항생제에 대한 내성을 검사하였다 [16].

결 과

STEC의 분리

대전지역소재 도축장에서 채취한 돼지 분변가검물 326건을 배양하고 Stx common primer STXc를 이용하여 PCR을 실시한 결과 13개(3.9%)의 분변에서 518 bp의 특이밴드가 증폭됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1, Table 2). STXc primers를 이용한 PCR에서 양성반응을 보인 배양액을 MacConkey agar에 접종한 후 분홍색을 나타내는 집락을 LB agar에 접종하여 colony hybridization을 실시한 결과 100개의 집락 중 2~9개의 집락이 STEC으로 증명되었다. 각 분변가검물로부터 STEC으로 증명된 집락 중 하나를 선택하여 순수배양하였으며 분리주를 S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12 및 S13으로 명명하였다(Table 2).

E. coli O157의 검색

STEC으로 동정된 13주를 Sorbitol MacConkey agar에 배양하였던 바 모두 분홍색 집락을 나타내어 O157 음성이었다. 또한 RfbE primers를 이용하여 PCR을 수행하였던 바 모두 음성이었으며, O 및 H형에 대한 혈청형 시험에서도 O157형은 검색되지 않았다(Table 2). 또한 intimin과 enterohemolysin 검출을 위해 EaeA 및 HlyA primers를 각각 이용하여 PCR을 수행한 바 13주의 STEC 분리주 모두 음성으로 나타났다(Table 2).

독소형 결정

13주의 STEC 분리주에 대해 STX1(STX1-F, STX1-R) 및 STX2(STX2-F, STX2-R) primers를 이용하여 PCR을 실시하였으며, Reverse passive latex agglutination test로 독소형을 시험하였다. 그 결과 Fig. 1 및 Table 2에서 나

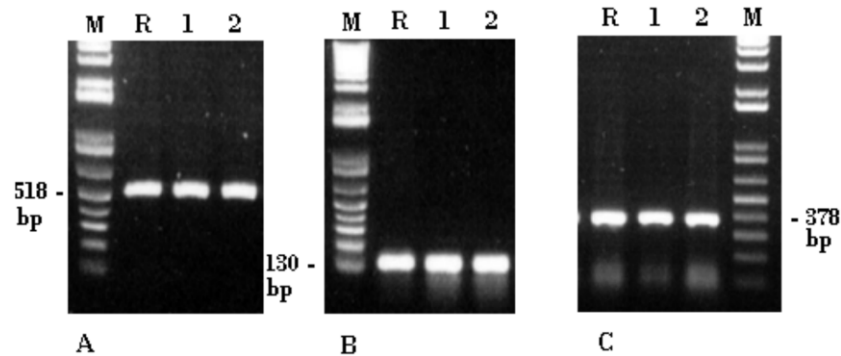


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the genes of *stx*(A), *stx1*(B) and *stx2*(C) amplified by PCR using STXc, STX1 and STX2 primers, respectively. Lane R; Reference strain *E. coli* ATCC35150(O157:H7), Lane 1~2; STEC isolates, M; 1 Kb Plus Ladder marker.

Table 2. Characterization of 13 strains of STEC isolated from the feces of healthy pigs

Strains	Sampling date	Serotype ²⁾	PCR ¹⁾					Plasmid patterns	
			<i>stx</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eaeA</i>	<i>hlyA</i>		<i>rfbE</i>
S1	Dec. 2001	OUT:HUT	+	+	-	-	-	-	A
S2	Dec. 2001	OUT:H11	+	+	-	-	-	-	A
S3	Dec. 2001	OUT:HUT	+	+	-	-	-	-	A
S4	Dec. 2001	OUT:HUT	+	+	-	-	-	-	A
S5	Dec. 2001	O166:NM	+	-	+	-	-	-	C
S6	Dec. 2001	OUT:NM	+	-	+	-	-	-	D
S7	Jan. 2002	O128:NM	+	-	+	-	-	-	C
S8	Feb. 2002	OUT:NM	+	-	+	-	-	-	C
S9	Mar. 2002	O166:NM	+	-	+	-	-	-	B
S10	Mar. 2002	OUT:NM	+	-	+	-	-	-	B
S11	May. 2002	OUT:NM	+	-	+	-	-	-	B
S12	Aug. 2002	O166:NM	+	-	+	-	-	-	B
S13	Sep. 2002	O128:NM	+	-	+	-	-	-	D

¹⁾+: positive, -: negative

²⁾OUT: O-untypable, HUT: H-untypable, NM: nonmorbidity

Table 3. Stx-types in 13 strains of STEC isolated from the feces of healthy pigs

Strains	VTEC-RPLA		
	Stx1	Stx2	Sensitivity ¹⁾ /Titers ²⁾
S1	+	-	3+ / (1:128)
S2	+	-	3+ / (1:128)
S3	+	-	3+ / (1:128)
S4	+	-	3+ / (1:128)
S5	-	+	1+ / (1:32)
S6	-	+	1+ / (1:16)
S7	-	+	1+ / (1:8)
S8	-	-	-
S9	-	+	1+ / (1:16)
S10	-	+	1+ / (1:16)
S11	-	+	1+ / (1:16)
S12	-	+	1+ / (1:16)
S13	-	-	-

¹⁾VTEC-RPLA test sensitivity

²⁾End-point of positive reaction in VTEC-RPLA test

타넨 바와 같이 13주의 STEC 분리주 중 S1, S2, S3 및 S4주는 *stx1* 유전자에 해당하는 130 bp의 특이밴드가 증폭되었으며 S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12 및 S13 주에서는 *stx2* 유전자에 해당하는 378 bp의 특이밴드가 증폭되었으며, *stx1*과 *stx2*를 동시에 가지는 STEC은 관찰되지 않았다.

Reverse passive latex agglutination test에서는 S1, S2, S3 및 S4주는 Stx1에 대해 양성반응을 보였으며 응집력가는 1:128이었다. 그리고 S5, S6, S7, S9, S10, S11 및 S13주는 Stx2로 판명되었으며 응집력가는 1:8~1:32 이었다. PCR에서 Stx2에 양성반응을 나타낸 S8 및 S13주는 음성으로 나타났다(Table 3).

Plasmid profiles

13주 STEC의 plasmid profile을 비교하여(Fig. 2), 10~11개(약 100, 40, 20, 5.0, 4.0, 2.5, 2.3, 2.0, 1.8, 1.5 및

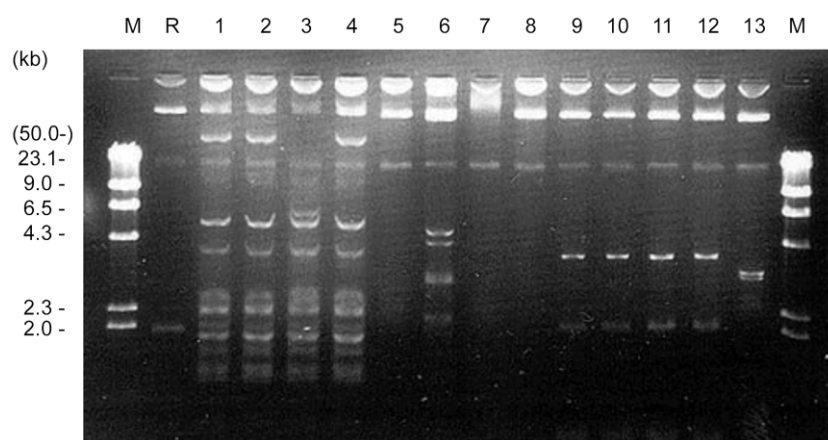


Fig. 2. Plasmid profiles of 13 STEC isolates.

Lane R; Reference strain *E. coli* ATCC35150(O157:H7), Lane 1~13; STEC isolates(1:S1, 2:S2, 3:S3, 4:S4, 5:S5, 6:S6, 7:S7, 8:S8, 9:S9, 10:S10, 11:S11, 12:S12, 13:S13), M; Lambda DNA/*Hind*III Markers.

Table 4. Antimicrobial susceptibility of 13 strains of STEC isolated from the feces of healthy pigs

Antimicrobial drugs	No. of strains(%)		
	Resistant	Intermediate	Susceptible
Amikacin(AN)	0(0)	0(0)	13(100)
Amoxicillin-clavulanic acid(AMC)	0(0)	11(84.6)	2(15.4)
Ampicillin(AM)	13(100)	0(0)	0(0)
Cefazolin(CZ)	0(0)	9(69.2)	4(30.8)
Ceftiofur(CT)	0(0)	10(76.9)	3(23.1)
Cephalothin(CF)	2(15.4)	11(84.6)	0(0)
Ciprofloxacin(CIP)	0(0)	1(7.7)	12(92.3)
Clindamycin(CC)	13(100)	0(0)	0(0)
Colistin(CL)	0(0)	10(76.9)	3(23.1)
Enrofloxacin(ENR)	2(15.4)	1(7.7)	10(76.9)
Erythromycin(E)	13(100)	0(0)	0(0)
Gentamicin(GM)	0(0)	0(0)	13(100)
Kanamycin(K)	4(30.8)	0(0)	9(69.2)
Lincomycin(L)	13(100)	0(0)	0(0)
Linco-spectin(LS)	0(0)	0(0)	13(100)
Neomycin(N)	0(0)	0(0)	13(100)
Streptomycin(S)	13(100)	0(0)	0(0)
Sulfamethoxazole-trimethoprim(SXT)	2(15.4)	6(46.1)	5(38.5)
Tetracycline(TE)	13(100)	0(0)	0(0)
Tylosine(TL)	13(100)	0(0)	0(0)

1.0 Kb 크기의 밴드를 나타내는 S1, S2, S3 및 S4주는 A형, 4개(약 100, 20, 4.0 및 2.0 Kb 크기)의 밴드가 관찰된 S9, S10, S11 및 S12주는 B형, 그리고 2개(약 100 및 20 Kb 크기)의 밴드를 보이는 S5, S7 및 S8주는 C형으로 구분하였다. 또한 7개(약 100, 80, 20, 4.5, 4.3, 3.0 및 2.2 Kb 크기)의 밴드를 나타내는 S6주와 4개(약 100,

20, 3.5 및 3.3 Kb 크기)의 밴드를 보이는 S13주는 D형으로 분류하였다(Table 2).

항생제 내성과 plasmid patterns

Amikacin을 포함한 20개의 항생제에 대한 내성 검사 결과 분리된 13주의 STEC 모두 AM, CC, E, L, S, TE,

Table 5. Antimicrobial resistance patterns of 13 strains of STEC isolated from the feces of healthy pigs

Strains	Plasmid patterns	Resistant antimicrobials
S1	A	AM, CC, E, K, L, S, TE, TL
S2	A	AM, CC, E, K, L, S, TE, TL
S3	A	AM, CC, E, K, L, S, TE, TL
S4	A	AM, CC, E, K, L, S, TE, TL
S5	C	AM, CC, E, L, S, SXT, TE, TL
S6	D	AM, CC, ENR, E, L, S, TE, TL
S7	C	AM, CC, E, L, S, TE, TL
S8	C	AM, CF, CC, ENR, E, L, S, SXT, TE, TL
S9	B	AM, CC, E, L, S, TE, TL
S10	B	AM, CC, E, L, S, TE, TL
S11	B	AM, CC, E, L, S, TE, TL
S12	B	AM, CC, E, L, S, TE, TL
S13	D	AM, CF, CC, E, L, S, TE, TL

TL의 7가지 항생제에 대해 내성을 나타냈으며 CF에 대해 2주(15.4%), ENR에 대해 2주(15.4%), K에 대해 4주(30.8%) 그리고 SXT에 대해 2주(15.4%)가 각각 내성을 나타내었다. AN, GM, LS 및 N에 대해서는 13주 모두 감수성이 있는 것으로 나타났으며 나머지 항생제에 대해서는 중등도 이상의 감수성을 나타냈다(Table 4).

분리된 13주의 STEC 모두 시험에 사용한 20개의 항생제에 대해 7개 이상에서 내성을 나타내었다. 균주별 내성양상은 10종의 약제에 대한 내성균이 1주, 8종의 약제에 대한 내성균이 7주, 7종의 약제에 대한 내성균이 5주로 나타났(Table 5). 항생제 내성과 plasmid profile pattern을 비교한 바 A형 4주는 AM, CC, E, K, L, S, TE 및 TL, 그리고 B형 4주는 AM, CC, E, L, S, TE 및 TL에 대해 저항성을 보여 완전 일치하였다. C형 3주는 80~87.5% 그리고 D형 2주는 87.5%의 내성 항균제에의 일치율을 보였다. S8주는 특이하게 10개 약제에 대해 내성을 나타냈다(Table 5).

고 찰

*E. coli*의 병원성과 관련된 인자 중 shiga toxin producing *E. coli*(STEC)은 사람과 직접 또는 간접적으로 접촉이 가능한 산업동물 및 애완동물에 광범위하게 보균되어 있으며, 분변으로 배설되어 환경과 축산식품 등에 오염되어 공중보건학적 문제를 야기할 수 있다 [7, 9, 17, 23]. 또한 STEC의 검출빈도는 사육환경 및 지역에 따라 다양하므로 축산물의 안정성 확보를 위해 도축돈에 대한 STEC의 분포 실태를 구명할 필요가 있다 [1, 6, 9, 21]. 따라서 본 연구에서는 대전소재 도축장에서

도축되는 정상 돼지 분변을 채취하여 STEC 분리 시험을 하여 326개의 분변 재료에서 13주를 동정하고 병원학적 및 유전학적 성상을 연구하였다.

Bulte 등 [9]은 독일에서 사육중인 건강한 동물로부터 분리한 2,100주의 *E. coli*에 대해 Stx1과 Stx2의 특이 유전자 탐색기법을 이용한 DNA-DNA colony hybridization 기법을 이용하여 STEC을 검출한 바 돼지에서 6.7%의 비율로 STEC이 존재하고 있음을 보고하였고, Beutin 등 [7]은 독일에서 사육중인 건강한 소, 면양, 염소, 돼지 등 7종의 가축 720마리에서 직장 및 결장으로부터 분변을 채취하여 colony hybridization으로 STEC을 검색한 결과 208마리에서 STEC이 분리되었으며, 동물별로 면양에서 66.6%, 염소에서 56.1%, 소에서 21.1%, 돼지에서 7.5%의 비율로 존재한다는 연구결과를 보고한 바 있다. 이들의 성적은 본 시험에서 얻어진 STEC 분리율 3.9%(13/326)보다 다소 높은 것으로 나타났다. 그러나 Osek [21]는 폴란드에서 이유자돈 중 설사를 일으키는 개체와 건강한 개체에서 PCR기법을 이용 STEC을 검사한 바 46마리의 건강한 자돈 중 2마리(4.8%)에서 Stx2 variant인 Stx2e가 분리되어 본 성적과 유사한 성적을 보고한 바 있다.

국내에서는 차 등 [6]이 경남지방의 건강한 소와 돼지의 분변에서 STEC의 일종인 *E. coli* O157를 분리한 바 소에서 3주 돼지에서 2주의 O157 혈청형의 *E. coli*가 분리되었다고 보고하였으며, 고 및 홍 [1]은 경기 및 강원 지역의 도축장에서 처리된 식육에서 *E. coli* O157:H7의 혈청형이 우육, 돈육 및 계육에서 6.4%, 2.5% 및 1.1%가 분리되었다고 보고하였다.

동물 분변이나 축산식품에 대한 STEC의 분리율은 지역, 동물 종 및 사육환경 등 역학적 요소에 따라 차이가 있으며, 사용된 검색기법의 감수성과 특이성에 따라 영향을 받을 수 있을 것으로 생각된다. 국내 STEC의 분리율이 다른 나라에 비해 비교적 낮으며, 특히 돼지에서 분리율이 낮게 나타난 것은 환경적 요인 외에 검사동물의 수와 사용한 검사법의 감수성 등 여러 요인이 작용한 결과이며, 이에 대한 지속적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

STEC 분리주에 대한 독소형 시험 결과 Stx1 또는 Stx2를 각각 생산하는 분리주는 있었으나 Stx1과 Stx2를 동시에 생산하는 분리주는 없었다. 이러한 결과는 Beutin 등 [7]이 건강한 돼지에서 분리한 9주의 STEC에 대해 독소형시험 결과, Stx1를 생산하는 분리주가 2주, Stx2를 생산하는 주가 7주, 그리고 Stx1과 Stx2 모두를 생산하는 주는 없었다고 보고한 결과와 유사하였다. 그리고 분리주 S8과 S13은 stx2 유전자를 가지고 있었으나 VTEC-RPLA 시험 결과 음성으로 나타난 현상은 사람

으로부터 분리하여 STEC에서도 입증된 바 있었으며, 독소유전자와 항원성은 차이가 있음을 보여 주었다 [7]. 따라서 VTEC-RPLA은 빠르고, 쉬운 독소형 스크리닝 시험법이지만 보다 정확한 Stx의 검출 및 typing을 위해선 PCR과 VTEC-RPLA 시험을 병행해서 수행하는 것이 바람직 하다고 생각된다.

Stx와 더불어 enterohemorrhagic *E. coli*가 질병을 유발 시키는데 작용하는 94 kDa크기의 장내부착인자인 intimin을 암호화하는 유전자와, 90 Kb 크기로 plasmid에 위치하는 enterohemolysin 암호 유전자를 검출하기 위해 각각 EaeA와 HlyA primers를 작제하여 PCR을 실시하였으나 13 STEC 분리주 모두에서 음성반응이 나타났다. 또한 분리주의 plasmid profile 결과와 비교하여 볼 때 90 Kb와 비슷한 크기의 plasmid는 관찰되었으나 enterohemolysin을 암호화 하는 hlyA gene은 없는 것으로 생각된다. 이러한 성적은 Gannon 등 [13]이 돼지에서 분리한 4주의 STEC에 대해 multiplex PCR기법으로 eaeA 검출시험을 실시한 바 모두 음성이었다고 보고한 것과 같은 결과를 보였다. 그러나 Beutin 등 [7]이 colony hybridization을 이용하여 건강한 돼지에서 분리한 STEC 중 hlyA gene을 가지고 있는 분리주가 2.6% 미만이라고 보고한 결과와, Rowland 등 [23]이 호주에서 사육중인 젓소에서 분리한 STEC에서 enterohemolysin과 intimin의 보유율을 조사한 결과 약 20%의 STEC이 이 병원성 인자들을 가지고 있었다는 보고와 비교할 때 다소 차이가 있었으며 이런 성상은 STEC의 역학적 특성을 규명하는데 중요한 요인으로 지적되고 있다 [7, 23].

13주의 STEC에 대한 plasmid profile을 plasmid의 수와 크기에 따라 4개 군으로 구분할 수 있었으며, 정 등 [4]과 박 등 [2]이 돼지 분변으로부터 분리한 대장균의 plasmid profile 성상을 시험하여 분리주들이 1.0~125 Kb 크기의 다양한 수의 plasmid가 관찰되었다는 연구 결과와 유사하였다. 또한 13주의 STEC의 plasmid 패턴과 내성을 나타내는 항생제제의 종류를 plasmid 형과 균주 간에 상호 비교한 바 매우 연관성이 높다는 사실을 알 수 있었다. 다만 S8주의 경우 다른 분리주들에 비해 함유하고 있는 plasmid의 수는 적지만 10종의 항생제에 내성을 나타내는 것으로 보아 함유하고 있는 plasmid 내에 많은 항생제에 대한 내성 유전자가 존재할 가능성이 있는 것으로 생각된다.

본 시험에 공시한 가검물의 수량은 적은 편이나 국내 건강 도축돈의 장관내에 서식하고 있는 STEC의 독소형과 유전적 성상을 구명할 수 있었다. STEC은 산업동물 및 애완동물에 광범위하게 분포되어 있으며, 공중보건학적으로 중요한 인수공통병원체로 인정되고 있기 때문에 축종, 계절 및 지역별로 보다 광범위한 동물을 대상

으로 분자역학적 연구를 수행할 필요가 있다고 생각된다.

결 론

2001년 12월부터 2002년 10월까지 대전소재 도축장에서 도축된 돼지 326두의 분변을 채취하여 균분리 배양법, PCR 및 colony hybridization 방법을 이용하여 13주(3.9%)의 shiga toxin-producing *E. coli*(STEC)를 분리하였다. STEC 분리주에 대해 PCR을 실시한 바 STX common primer인 STXc에서는 13주 모두 518 bp의 특이밴드가 나타났고, STX1 primers에서는 4주에서 stx1 유전자에 해당되는 130 bp, 그리고 STX2 primers에서는 9주에서 stx2 유전자에 해당되는 378 bp의 특이밴드가 각각 관찰되었다. stx1과 stx2를 동시에 가지는 STEC은 관찰되지 않았으며, PCR에서 Stx2에 양성반응을 나타낸 S8 및 S13주는 음성으로 나타났으며, 13주의 STEC 모두 eaeA, hlyA, rfbE 유전자가 검출되지 않았다.

또한 STXc primers를 이용한 PCR에서 특이밴드를 나타내는 분변 가검물에 대해 colony hybridization을 수행한 바 100개 당 2~9개의 집락이 STEC 특이 반응을 보였다. 13주의 STEC 분리주에 대한 plasmid profile 분석 결과 4가지 패턴이 관찰되었으며, 20종의 항생제에 대한 내성패턴을 plasmid profile 패턴과 비교한 바 높은 연관성을 보였다.

참고문헌

1. **고주연, 홍종해.** 도체 표면의 분변오염과 verotoxin 생성 *Escherichia coli* O157:H7 분리에 관한 연구. 한국식품위생안전성학회지. 1997, **12**, 78-82.
2. **박주연, 신나리, 박용호, 유현상.** 설사 자돈으로부터 분리한 *Escherichia coli*의 특성에 관한연구; 항균제 감수성, 장독소 및 섬모의 유전형의 분포 및 plasmid profile. 대한수의학회지. 2000, **40**, 301-310.
3. **정석찬, 정병열, 윤장원, 조윤상, 김종업, 박용호.** 쇠고기 중 *Escherichia coli* O157:H7 신속검출을 위한 multiplex-PCR기법 개발. 대한수의학회지. 1998, **38**, 173-181.
4. **정수관, 정석찬, 최원필.** 돼지 유래 대장균의 생물학적 특성과 plasmid profile 에 대하여. 대한수의학회지. 1990, **30**, 287-295.
5. **진형근, 차인호, 김용환.** 설사환자로부터 verotoxin 생산대장균의 분리 및 생물학적 특성. 한국수의공중보건학회지. 1996, **20**, 89-96.
6. **차인호, 김용환.** 동물분변에서 *Escherichia coli* O157:H7의 분리 및 이들 균이 생산하는 verotoxin-2의 생물화학적 특성. 대한수의학회지. 1996, **36**, 371-378.
7. **Beutin, L. Geier, D. Steinruck, H., Zimmermann, S.**

- and Scheuts, F. Prevalence and some properties of verotoxin(Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. J. Clin. Microbiol. 1993, **31**, 2483-2488.
8. **Botteldoorn, N., Heyndrickx, M., Rijpens, N. and Herman, L.** Detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* by a VTEC/EHEC multiplex PCR in porcine faeces and pig carcass swabs. Res. Microbiol. 2003, **154**, 97-104.
 9. **Bulte, M., Montenegro, M. A., Helmuth, R., Trunpf, T. and Reuter, G.** Detection of verotoxin-producing *E. coli*(VTEC) in healthy cattle and swine with DNA-DNA colony hybridization method. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 1990, **103**, 380-384.
 10. **Clarke, S. C., Haigh, R. D., Freestone, P. P. and Williams, P. H.** Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 2003, **16**, 365-378.
 11. **Farmer, J. J. 3rd and Davis, B. R.** H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin. Microbiol. 1985, **22**, 620-625.
 12. **Fukushima, H., Hoshina, K. and Gomyoda, M.** Long-term survival of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O222, and O157 in bovine feces. App. Environ. Microbiol. 1999, **65**, 5177-5181.
 13. **Gannon, V. P. J., D'souza, S., Graham, T., King, R. K., Rahn, K. and Read, S.** Use of the flagella H7 gene as a target in multiplex PCR assays and improved specificity in identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. J. Clin. Microbiol. 1997, **35**, 656-662.
 14. **Gannon, V. P., Gyles, C. L. and Friendship, R. W.** Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. Can. J. Vet. Res. 1998, **52**, 331-337.
 15. **Herbert, S., Lothar, B. and Helge, K.** Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect. Immun. 1995, **63**, 1055-1061.
 16. **Hiroshi, A., Sou-ichi, M., Toshikazu, S., Teizo, T., Hisao, K., Tetsuya, I. and Kouichi, T.** Detection and long-term existence of shiga toxin(Stx)-producing *Escherichia coli* in sheep. Microbiol. Immunol. 1998, **42**, 683-688.
 17. **James, P. N. and Kaper, J. B.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Reviews. 1998, **11**, 142-201.
 18. **Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L.** Pathogenic *Escherichia coli*. Nat. Rev. Microbiol. 2004, **2**, 123-140.
 19. **Maite, M. and Juan, J.** Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the shiga toxin 2 gene. Appl. Environ. Microbiol. 1998, **64**, 2443-2448.
 20. **Masahisa, W., Toshio, S., Midori, K., Takeshi, S., Shinji, Y., Toru, T., Chihiro, S. and Yoshifumi, T.** Identification and characterization of a newly isolated shiga toxin 2-converting phage from shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Infect. Immun. 1998, **66**, 4100-4107.
 21. **Osek, J.** Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrhegic and healthy piglets after weaning. Vet. Microbiol. 1999, **68**, 209-217.
 22. **Phillip, I. T., Laura, M. S., Yoo-lee, Y., Teresa, R. W., Srdjan, J. and Thomas, S. W.** Acquisition of the *rfb-gnd* Cluster in Evolution of *Escherichia coli* O55 and O157. J. Bacteriol. 2000, **182**, 6183-6191.
 23. **Rowland, C. and Patricia, D.** Characterisation and clonal relationships of Shiga-toxigenic *Escherichia coli*(STEC) isolated from Australia dairy cattle. Vet. Microbiol. 2001, **79**, 323-335.
 24. **Sambrook, J. and Russell, D. W.** Molecular cloning a laboratory manual. 3rd ed, Cold Spring Harbor Press, New York, 2001.
 25. **Terezinha, K., Maria, R. B., Andrea, M. M., Tania, A. T. G., Monica, A. M. V., Claudete, S. A. F. and Antonio, J. P. F.** Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from ostriches with respiratory disease. Vet. Microbiol. 2001, **83**, 71-80.
 26. **Tsukamoto, T. and Kawai, T.** Identification of *Escherichia coli* O157 antigen by polymerase chain reaction. Kansenshogaku Zasshi. 1998, **72**, 738-741.