

대장균의 항균제 내성과 독력 유전자의 분석을 활용한 융합기술연구

한재일¹, 성현호², 박창은^{3*}

¹단국대학교 일반대학원 보건학과, ²동남보건대학교 임상병리과, ³남서울대학교 임상병리학과

Study on Convergence Technique Using the Antimicrobial Resistance and Virulence Genes Analysis in *Escherichia coli*

Jae-II Han¹, Hyun-Ho Sung², Chang-Eun Park^{3*}

¹Department of Public Health, Graduate School of Dankook University

²Department of Clinical Pathology, Dongnam University

³Department of Biomedical Laboratory Science, Namseoul University

요약 본 연구는 항균제에 내성을 보이는 대장균의 특성을 알아보기 위해 설사환자에서 분리된 대장균에 대한 항균제 감수성 및 병원성 인자의 상관성을 분자융합적 기술을 통해 조사하였다. 분리한 대장균의 항균제 내성은 60주에서 ESBL(extended spectrum β -lactamase) positive균주가 8주이고, negative균주는 52주였다. ESBL 양성 8주 중 2주는 병원성 유전자가 검출되지 않았으며, *stb*(3주), *fliCh7*(1주), *fliCh7-eae*(2주)로 나타났다. ESBL 음성 52주 중 26주는 병원성 유전자가 검출되지 않았고, *stx1*(3주), *stb*(10주), *fliCh7* 및 *eae*(각 2주), *stx1-fliCh7*(2주), *stx1-stb*(4주), *fliCh7-stb*(2주), *fliCh7-stb-eae*(1주)이었다. 결론적으로 항균제 내성이 증가하는 시대에 분자 융합적 관점에서 독력 유전자의 분포와 항균제 내성과의 관계는 적게 나타났으나, 향후 다양한 독력 유전자의 분석을 통한 융합기술연구가 이루어진다면 보다 정확한 병원성 인자를 추정할 수 있을 것으로 사료된다.

• **Key Words** : 항균제 내성, 융합기술, 대장균, 광범위 베타락탐 분해효소, 독력 유전자

Abstract This study was conducted to investigate the characteristics of antibiotic resistant *E. coli*. its antibiotic susceptibility and pathogenicity were analyzed via molecular convergence technique, for the relationship of antibiotic susceptibility and pathogenicity. The 60 isolated strains consisted of ESBL(+)(8) and ESBL(-)(52) strains. The ESBL(+)(8) strains consisted of 2 strains without a pathogenic gene, *stb*(3), *fliCh7*(1), and *fliCh7-eae*(2). The ESBL(-)(52) strains consisted of 26 strains without a pathogenic gene, *stx1*(3), *stb*(10), *fliCh7*(2), *eae*(2), *stx1-fliCh7*(2), *stx1-stb*(4), *fliCh7-stb*(2), and *fliCh7-stb-eae*(1). In conclusion, antibiotic resistance is increasingly, Focused on molecular convergence, showed the correlation of pathogenicity with antibiotic resistance was poor. However, It will be able to find the exact pathogenic factor in the future through convergence technique including the analysis of virulence genes.

• **Key Words** : Antimicrobial resistance, Convergence technique, *Escherichia coli*, Extended-spectrum beta-lactamases, Virulence genes

*교신저자 : 박창은(eun2777@hanmail.net)

1. 서론

1.1 연구의 배경 및 필요성

Escherichia coli(*E. coli*, 대장균)는 사람이나 동물의 장관 내에 사는 세균으로 요로 감염 및 위장관계 질환을 유발하는 세균이며, 병원성 대장균을 포함한 세균에 의한 감염질환에 대한 질병치료를 대부분 항균제로 치료하고 있다. 다양한 경로를 통해 항균제와 접하게 되는 기회가 많아지게 되면서 세균들은 항균제 내성을 획득하게 되는 기회를 얻어 항균제 내성문제가 날이 갈수록 심각해지고 많은 감염질환의 원인세균에서 내성률이 매우 높게 나타나고 있어 특히 Gram 음성 간균의 내성유전자는 지속적으로 축적되어 널리 사용되는 항균제에 대한 내성세균은 매우 흔한 상태이다[1]. 최근에는 광범위 베타락탐 분해효소(extended-spectrum β -lactamase: ESBL)를 생산하는 균주가 증가하여 문제가 되고 있다. ESBL은 penicillin과 cephalosporin 뿐 아니라 광범위 cephalosporin, aztreonam 등 광범위 항균제를 동시에 무력화 시키는 것으로 보아 내성세균은 이미 심각한 문제가 되고 있다[2].

19세기 말에 세균에서 최초로 분리된 독소들이 발견되기 시작하였다. 최근에는 박테리아 독소들의 종류를 구조적, 기능적인 기준을 통해 분류하면, 올리고펩타이드 독소는 세포질막의 리셉터에 결합한 후 세포 내 대사 작용에 영향을 끼치게 되며, *E. coli*는 심지어 열에 안정한 enterotoxin(heat-stable enterotoxins, STs; STaP, STaH, STb)과 enteroaggregative strains(EAST1)와 같은 다른 올리고펩타이드 독소를 생성하기도 한다[3]. STaP는 동물과 사람의 ETEC에 의해 생성되나, STaH는 사람의 ETEC에 의해서만 생성된다.

특정한 리셉터를 통해 host cell의 B subunit에 부착되면 리셉터가 매개하는 endocytosis에 의해 LT는 초기화되며 endocytosis에서 세포질망상구조로 후방수송의 이동이 이루어진다. 이때 A subunit은 효소적 분해가 이루어지며 이는 큰 A1과 작은 A2 분획으로 나누어지게 된다[4]. A1분획의 효소적 활동을 NAD-dependent ADP-ribosylation으로 일어나며 이는 enzyme adenyl cyclase를 통해 규칙적으로 나타나게 되며, 이는 영구적인 활성화와 높은 수준의 cyclic adenosine monophosphate를 가능하게 해준다. LT의 활성화는 또한 CTFR가 열리게 해주며 이는 염소, 탄소이온의 분비를 증가시켜주며 Na이온흡수의 저해를 통해 콜레라 같은 설사를 유발하게 된

다. 이는 개발도상국의 신생아나 새끼 돼지, 여행자 설사 등의 경우에도 해당된다. 두 개의 다른 LT enterotoxin은 메인 리셉터의 특이성이 LTp/h와 CT와는 항원적으로 다르지만, 효소학적 활성화는 비슷한 작용을 나타내며, 인체 분리 *E. coli*에서 생성된다. 두 개의 다른 LT-2a와 LT-2b를 코딩하는 유전자는 염색체에 존재하고 있다. 모든 LT enterotoxin들은 좋은 immunogen이며 LTp는 설사 백신에도 존재한다[5].

VTx는 사람, 돼지 및 소의 의 VTEC와 EHEC에서 생성된다. 이 균주들은 VTx2a, c, d를 생성하여 용혈성 요독증후군을 일으키며 VTx2e는 돼지에서 부종을 일으킨다[6]. VTx의 가장 큰 특징은 *in vitro*와 *in vivo*에서 과지에 위치한 유전자에 의해 encoding 된다는 것이다[7]. VTx는 세포 표면 리셉터로 Gb3, 4, VTx2e를 사용하며 생체내에서 표적부위는 장세포가 아니다[8]. 사람과 새끼 돼지에서 VTx는 백혈구와 연관되어 혈액을 따라 이동하며 특히 신사구체 혈관 표피세포에 있는 리셉터에 결합한다. 세포내에 들어간 후 독소는 골지체를 통해 내포낭에서 소포체로 이동되며 A subunit이 효소적으로 분해되며 활성화된 a1 분획은 세포질로 들어가 특정 adenosin의 부산물이 N-glycosylation을 통해 28S의 rRNA로 분해된다. 단백질의 합성은 내피세포에 의해 저해되고 혈관벽도 손상을 받게 된다. VTx는 또한 혈전성 미소혈관증(thrombotic microangiopathy)을 유발하여 용혈과 저혈소판증, 신부전을 유발한다[9]. VTx를 생성하는 *E. coli*는 반추동물의 장에 군집하지만 Vtx는 혈관 병변이나 반추동물에서의 질병을 일으키지 않는 이유는 첫 번째 Vtx는 장상피를 통과하지 않으며 VTx가 식균 작용을 통해 리소솜에서 제거되기 때문이다[10]. 이에 VTx는 좋은 immunogen이기 때문에 부종질환을 예방할 수 있다[11].

RTX 독소는 세포용해소 종류의 독소로서 이는 cytoplasmic membrane에 구멍을 형성하여 진핵세포를 죽이거나 용해시킨다. 이러한 큰 단백질은 계통학적으로 그람 음성균이 생성하는 독소와 관련이 있으며, nanopeptide repeats에 의해 구별되며 Ca^{2+} 와 결합되어 있는 C-말단을 지칭한다. 이는 독성 활성화에 필요하며 type1 secretion system에 의해 분비되며, 가장 대표적인 것은 leucotoxins/haemolysin이며 Lkt, Apx, Mmx, moraxella moniae가 있다. 그러나 최초 RTX 독소는 107kDa으로 *E. coli* 알파용혈을 일으키는 102개의 아미

노산 이었다.

α 용혈소는 몇몇의 extra-intestinal과 intestinal 감염을 일으키는 pathogenic type의 *E. coli*에 의해 생성되며 α 용혈소는 encoding하는 유전자 cluster는 염색체에 존재하며, Intimin은 *eae*유전자에 의해 암호화된 94kDa세포막 단백질로, 세균과 숙주세포막 사이의 부착을 긴밀하게 하는 역할을 하며[12], Tir은 장병원성대장균을 전달하는 단백질의 하나로 숙주세포막으로 삽입 되어 intimin에 대한 수용체로 작용한다[13].

1.2 연구의 목적

본 연구는 항균제에 내성을 보이는 대장균의 특성을 조사하고 환자에서 분리된 대장균에 대한 항균제 내성 및 감수성 그리고 병원성 독력인자의 존재유무를 분자융합적 기술을 활용하여 병원성 인자와 항균제 감수성과의 상관성을 조사하고자 하였다.

2. 연구 방법

2.1 대장균 분리

실험에 사용된 검체는 2013년 1월말부터 6월말까지 충남소계 종합병원 환자에서 분리된 설사변에서 총 350개의 시료를 무균적으로 채취하여 멸균된 용기에 밀봉하고 실험에 사용하기 전까지 -60°C 이하로 냉동 보관하였다.

설사환자 시료를 Tryptic soy broth (TSB, Difco, USA) 배지에 접종하여 37°C 에서 하룻밤 진탕배양한 후 Eosin Methylene Blue Agar (EMB agar, Difco, USA) 배지에 획선 도말하였다. 전형적인 금속성의 녹색 광택을 띄는 콜로니를 Kligler Iron Agar (KIA, Difco, USA)에 접종한 후 A/A (acid/acid) 성상을 띄면서 gas가 발생한 균주에 대해 Vitek(Densi CHE K Plus, Bio-Merieux, France)을 이용하여 동정하였다.

선별된 집락은 tryptic soy agar(Difco, USA) 평판배지에 단일도말하고 37°C 에서 24시간 순수배양을 확인하였다. 순수 배양된 균주는 보관배지(1%의 peptone과 30%의 glycerine)에 따서 균질화 시킨 후 -80°C 에 동결 보관하고 실험에 사용하였다

2.2 항균제감수성검사

항균제 감수성 시험은 Manual of antimicrobial susceptibility testing[14], 및 Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI) guidelines[15]에 의해 실시하였다. 즉 Muller Hinton agar(Difco, USA)을 이용하여 E-test를 사용하였다. 사용된 E-strip(bioMerieux, France)은 extended spectrum beta lactam(ESBL)양성, 음성과 ampicillin(AM), ampicillin/ clavulanic acid (AMC), Piperacillin(PIP), Piperacillin/ Tazobactam (TZP), Cefazolin(CZ), Cefoxitin(FOX), Cefptaxime (CTX), Ceftazidime (CAZ), Cefepime(FEP), Aztreonam (ATM), Imipenem(IPM), Meropenem(MEM), Amikacin (AN), Gentamicin(GM), Tobramycin(NN), Ciprofloxacin (CIP), Tetracycline (TE), Trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT)이었다.

순수 분리된 *E. coli*를 TSA배지에서 37°C 24시간 3회 배양하여 형성된 단일 집락을 Muller Hinton broth (Oxoid, UK)에 접종하여 37°C 에서 24시간 진탕배양 하였다. 배양된 균액의 농도는 MacFarland scale 0.5 표준 탁도로 희석하였으며 멸균된 면봉을 이용하여 Muller Hinton agar에 균일하게 도말, 평판을 좌우로 돌려서 한 차례 바르고 평판 주위를 돌려 마무리하였다. 도말한 평판을 실온에 5분간 방치해 건조시킨 후 E-strip(epsilometer test)을 이용해 19종의 항균제 스트립을 4장의 plate에 나누어서 배지 표면에 부착하였다. 평판을 뒤집어서 37°C 에서 24시간 배양한 후 스트립 주변에 형성된 각 항균제에 대한 억제대 농도를 측정하고 CLSI guideline (NCCLS)에 기준하여 감수성과 내성을 판정하였다.

항균제의 정도관리를 위하여 *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC27853을 이용하여 control zone diameter를 BD BBL Sensi-disc antimicrobial susceptibility test discs에 따라 측정하여 유의성을 판정하였다.

2.3 유전자분석

Deep freezer(-80°C)에 보관된 균주를 tryptic soy agar(Difco, USA)에 획선도말하고 37°C 에서 24시간 배양하여 순수 배양 유무를 확인하고 3회 계대배양한 균을 시험에 사용하였다. 시험균을 0.5x TBE buffer(Bioneer, Korea)에 시험균을 부유시킨 후 균 부유농도를 1.0

MacFarland scale에 맞추고 DNA 추출에 사용하였다. DNA 추출은 TMAccuPrep Genomic DNA extraction kit method(Bioneer, Korea)을 이용하여 추출하였다.

<Table 1> Sequences of primer sets for pathogenic determinants for *E. coli*.

Target	Sequences of primer sets(5'→3')
<i>Stx1</i>	<i>Shiga toxin 1</i>
	5'-ACACTGGATGATCTCAGTGG-3' 5'-CTGAATCCCCCTCCATTATG-3'
<i>fliC_{H7}</i>	<i>H7 flagella antigen</i>
	5'-GCGCTGTGCGAGTTCTATCGAGC-3' 5'-CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC-3'
<i>Stb</i>	<i>Heat-stable enterotoxin b(Stb)</i>
	5'-GCGTCCTGCGTATCAGTAT-3' 5'-CTTTTAAGGCAAGCGTCGTC-3'
<i>eae</i>	<i>Intimin</i>
	5'-GACCCGCAACAAGCATAAGC-3' 5'-CCACCTGCAGCAACAAGAGG-3'

<Table 2> PCR conditions for pathogenic determinants in *E. coli*.

Target	PCR conditions ^a			Size (bp)
	Denaturation (°C/sec)	Annealing (°C/sec)	Extension (°C/sec)	
<i>Stx1</i>	94/60	58/45	72/90	614
<i>fliC_{H7}</i>	94/60	60/45	72/90	625
<i>Stb</i>	94/60	57/45	72/90	241
<i>eae</i>	94/30	55/45	70/90	384

a: PCR was carried out for 25 cycles.

균부유액 200 μ l에 proteinase K(20 μ g/ml) 20 μ l와 binding buffer 200 μ l를 가하고 vortex mixer로 잘 혼합한 후 60°C에 10분간 가온하였다. 그리고 Isopropanol 100 μ l를 가하고 잘 혼합한 후 binding column tube에 옮기고 8,000rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 이후 washing buffer를 통해 3회 세척하였다. 최종적으로 DNA 회수를 위해 용출액 100 μ l를 가한 후 8,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 추출하였다. *E. coli*의 DNA에 존재하는 병원성 인자는 PCR법에 의해 실시하였다. 즉 시험 *E. coli* 균주의 DNA를 추출한 다음 <Table 1>에 정리한 병원성 인자의 primer를 이용하여 병원성인자 유전자 유무에 의해 판정하였다.

이때 병원성 인자의 PCR 증폭조건은 <Table 2>와 같다. PCR 최종산물은 1% agarose에서 전기영동하고 Gel Doc XR⁺(Bio-Rad, USA)에서 유전자 발현양상을 확인하였다.

3. 연구결과

3.1 대장균의 항균제 감수성 분포

대장균의 항균제 내성의 분포는 <Table 3>와 같다. ESBL 내성 8주의 각 항균제 별 내성율에 있어서 모두 내성인 것은 AM, PIP, CZ, CTX로 나타났고, 중등도 내성은 AMC 내성이 3주(37.5%), FOX 내성이 1주(12.5%), NN 내성이 2주(25.0%)로 나타났다.

한편 ESBL 음성 52주의 각 항균제 별 내성율은 AM 내성 33주(63.5%), 감수성 19주(36.5%)이었으며, AMC 내성 3주(5.7%), 중등도 내성 6주(11.5%), 감수성 43주(82.8%)이었으며, PIP 내성 16주(30.7%), 중등도 내성 5주(9.7%), 감수성 31주(59.6%)이었으며, TZP 중등도 내성 1주(1.9%), 감수성 51주(98.1%)이었으며, CZ 내성 1주(1.9%), 중등도 내성 1주(1.9%), 감수성 50주(96.2%)이었으며, FOX 내성 1주(1.9%), 중등도 내성 3주(5.7%), 감수성 48주(92.4%)이었으며, CTX 감수성 52주(100%)이었으며, CAZ 내성 1주(1.9%), 감수성 51주(98.1%)이었으며, FEP 및 ATM 각 감수성 52주(100%)이었으며, IPM 내성 1주(1.9%), 감수성 51주(98.1%), MEM 및 AN 감수성 각 52주(100%)이었으며, GM 내성 13주(25.0%), 감수성 39주(75.0%)이었으며, NN 중등도 내성 10주(19.2%), 감수성 42주(81.8%)이었으며, CIP 내성 16주(30.7%), 중등도 내성 1주(1.9%), 감수성 35주(67.4%)이었으며, TE 내성 23주(44.2%), 내성 29주(55.8%)이었으며, SXT 18주(34.6%), 감수성 34주(65.4%)이었다.

3.2 대장균의 병원성 유전자 분석

병원성 유전자 검출과 ESBL 양성률과 음성균을 비교한 결과는 <Table 4>와 같다. 검사한 60주중 28주(46.7%)는 병원성 유전자가 검출되지 않았으며, 32주(53.3%)에서 하나 이상의 병원성 유전자가 검출되었다.

<Table 3> Distribution of antimicrobial resistance rates for *E. coli* isolated from patients with diarrhea.

Antimicrobials	Percentage of isolates								
	ESBL positive (n=8)			ESBL negative (n=52)			Total (n=60)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Ampicillin	8	-	-	33	-	19	41	-	19
Amoxicillin/clavulanic acid	2	3	3	3	6	43	5	9	46
Piperacillin	8	-	-	16	5	31	24	5	31
Piperacillin/Tazobactam	-	-	8	-	1	51	-	1	59
Cefazolin	8	-	-	1	1	50	9	1	50
Cefoxitin	2	1	5	1	3	48	3	4	53
Cefotaxime	8	-	-	-	-	52	8	-	52
Ceftazidime	5	-	3	1	-	51	6	-	54
Cefepine	6	-	2	-	-	52	6	-	54
Aztreonam	7	-	1	-	-	52	7	-	53
Imipenem	-	-	8	1	-	51	1	-	59
Meropenem	-	-	8	-	-	52	-	-	60
Amikacin	-	-	8	-	-	52	-	-	60
Gentamicin	6	-	2	13	-	39	19	-	41
Tobramycin	2	2	4	-	10	42	2	12	46
Ciprofloxacin	6	-	2	16	1	35	22	1	37
Tetracycline	5	-	3	23	-	29	28	-	32
Trimethoprim/sulfamethoxazole	4	-	4	18	-	34	22	-	38

n: number of isolates. S: sensitive result. I: intermediate resistance. R: resistant result.

단일 유전자가 검출된 균은 21주(35.0%)이었으며, *stx1* 유전자는 3주에서만 검출되었으며, *stb*는 13주에서 검출되었으며, *fliC_{H7}* 유전자는 3주에서만 검출되었으며, *eae* 유전자는 2주에서만 검출되었다. 2개의 병원성 유전자가 검출된 균주는 10주(16.7%)이었으며, *stx1-fliC_{H7}* 유전자 검출이 2주, *stx1-stb* 유전자 검출이 4주, *fliC_{H7}-stb* 유전자 검출이 2주 그리고 *fliC_{H7}-eae* 유전자 검출이 2주이었다. *fliC_{H7}-stb-eae* 3종 유전자 검출 균주는 1주이었다. ESBL 양성 8주 중 2주는 병원성 유전자가 검출되지 않았으며, *stb* 유전자 검출 3주, *fliC_{H7}* 유전자 검출 1주 *fliC_{H7}-eae* 유전자 검출이 2주이었다. ESBL 음성 52주 중 26주는 병원성 유전자가 검출되지 않았으며, *stx1* 유전자 검출 3주, *stb* 유전자 검출 10주, *fliC_{H7}* 및 *eae* 유전자 검출 각 2주이었으며, *stx1-fliC_{H7}* 유전자 검출 2주, *stx1-stb* 유전자 검출 4주, 그리고 *fliC_{H7}-stb* 유전자 검출 2주이었으며, *fliC_{H7}-stb-eae* 유전자 검출이 1주이었다.

<Table 4> Multiple possession of virulence genes in *E. coli* isolated from patients with diarrhea.

virulence gene	No of isolates		Total (n=60)
	ESBL positive (n=8)	ESBL negative (n=52)	
None	2	26	28(46.7%)
<i>stx1</i>		3	21(35.0%)
<i>stb</i>	3	10	
<i>fliC_{H7}</i>	1	2	
<i>eae</i>		2	
<i>stx1-fliC_{H7}</i>		2	10(16.7%)
<i>stx1-stb</i>		4	
<i>fliC_{H7}-stb</i>		2	
<i>fliC_{H7}-eae</i>	2		
<i>fliC_{H7}-Stb-eae</i>		1	1(1.6%)

4. 논의

병원성 대장균은 다양한 기전을 통해 인간의 숙주에 질병을 일으킨다. 세포의 표면과 세포내에서 생산하여 독력을 유발하기 때문에 다양한 독력인자와 내성인자의 연관성에 대해 야기되고 있다. 비병원성 세균의 병원성 인자를 획득, 대장균의 감염으로 인한 항균제의 사용증가 등이 최근 대두되고 있다[16]. 본 연구에서는 설사환자에서 분리된 60균주의 대장균의 항균제 검사결과 AM 경우 68.3%가 내성을 보였다. 이 중 ESBL 양성 균주는 모두 내성이었고, ESBL 음성 균주는 52균주 중 63.5%가 Ampicillin 에 내성을 나타냈다. β-lactamase inhibitor제인 AMC는 8.3%가 내성을 보였는데 이중 ESBL 양성 은 25%가 내성이었고, ESBL 음성은 5.7%가 내성을 보여 다른 항균제보다 낮은 내성율을 보여주었다. 세파로스포린계 항균제의 경우 1 세대인 CZ은 60균주 중 9(15%)균주가 내성을 보였는데 이중 ESBL 양성 모두 내성이었고, ESBL 음성은 1.9%가 내성을 보였을 뿐이다. FOX은 0.5%가 내성을 보였는데 ESBL 양성 25%가 내성이었고, 음성은 1.9%만이 내성을 보였다. 3세대 항균제인 CTX 과 4세대 항균제인 FEP의 경우에는 ESBL 양성 75%의 내성을 보인 반면 음성주에서는 내성을 보이는 균주가 없었다. GM의 경우에는 ESBL 양성 75%, 음성은 25%가 내성을 보여 전체적으로 31.7%가 내성을 보였다. CIP은 ESBL 양성 75%, 음성 30.7%가 내성을 보여 전체

적으로 36.7%가 내성을 보였다. SXT은 36.7%가 내성을 보였다. 이중 ESBL 양성 50%, 음성 34.6%균주가 내성을 보였다. 그람 음성 간균의 최종 치료제인 카바페넴 계열의 항균제인 IPM 내성은 ESBL 양성주에서는 없었으나, 음성주에서 단 1균주가 내성을 나타내었다.

ESBL 양성 *E. coli*의 발현율은 최근 10년간 급속히 증가하여 국내에서는 1998년 *Pai*의 연구[17]에서 *E. coli*의 4.8~7.5%가 ESBL 효소를 생산한다고 하였고, 2002년 Kim 등의 연구[18]에서는 기저질환이 있는 환자의 *E. coli*에서 17.9%가 분리되었으며 2004년 *Lee* 등[19]의 연구에서 지역사회 획득 소아 요로감염 환자 중 ESBL 생성 *E. coli*가 10.8%까지 보고되었다. ESBL 생산 균주의 증가는 카바페넴의 사용을 유도하고 카바페넴의 사용은 카바페넴 내성의 증가를 초래하고 있다. 이상과 같이 대장균에 대한 항균제 내성은 다양한 양상으로 보였다. 오래된 항균제에 대한 내성은 높은 비율을 나타낸 반면 세팔로스포린계 3 및 4세대 약제에 대한 내성은 비교적 낮은 양상을 보였다. 이와 같은 결과는 항균제 사용에 대한 관리와 규제가 필요함을 보였다. 따라서 항균제 적절한 사용과 적극적인 규제가 필요함을 증명한 것이다. 대장균의 다중 병원성 유전자 검출관계는 검사한 60주 중 46.7%는 병원성 유전자가 검출되지 않았으며, 53.3%에서 하나 이상의 병원성 유전자가 검출되었다. 단일 유전자가 검출된 균은 35.0%이었으며, 2개의 병원성 유전자가 검출된 균주는 16.7%이었으며, 3종 유전자 검출 균주는 1주이었다. ESBL 양성 8주 중 25%는 병원성 유전자가 검출되지 않았으며, *stb* 유전자 검출 37.5%, *fliC7* 유전자 검출 12.5%, *fliC7-eae* 유전자 검출이 25%이었다. ESBL 음성 중 50%는 병원성 유전자가 검출되지 않았으며, *stx1* 유전자 검출 5.8%, *stb* 유전자 검출 19.2%, *fliC7* 및 *eae* 유전자 검출 각 3.8%이었으며, *stx1-fliC7* 유전자 검출 3.8%, *stx1-stb* 유전자 검출 7.7%, 그리고 *fliC7-stb* 유전자 검출 3.8%이었으며, *fliC7-stb-eae* 유전자 검출이 1.9%이었다. 병원성 대장균 중 병원성을 다수 발현하게 되면 중증으로 진행되기 쉽기 때문에 다수의 병원성 보유 유무는 매우 중요하다고 생각된다. 그러나 다수의 병원성 유전자가 동시 발현하는지에 대해서는 알려진 바가 없다. 따라서 앞으로 계속 연구되어야 할 것으로 생각된다.

실사원성 대장균의 분포는 다양하며 국내에서 분석된 결과도 제한된 지역으로 편중되어 있어 지역 간 차이를

분별할 수 없었다. 이와 같은 결과를 해결하기 위해서는 지역별 분석이 필요하며, 병원성 대장균의 병원성 분석이 매우 필요하다.

따라서 항균제 내성 분포와 병원성독력인자와의 상관성을 분자융합적 기술을 통하여 정보를 축적하고 분석한다면 추후에 내성정보와 병원성 인자의 정보를 활용하여 치료 및 예방에 기여 할 것으로 보일 뿐만 아니라 세균은행 등에서도 활용될 것으로 보인다. 현재의 높은 항균제 내성에 대해 적절한 치료를 위해서는 분자융합적 관점에서 병원성과 관련된 독력유전자의 융합 기술을 활용하여 내성과 독력유전자의 진단을 통해 항균제 치료에 활용한다면 항균제 내성에 따른 정확한 정보를 제공하여 국민 건강에 활용될 수 있을 것으로 보인다.

5. 결론

본 연구에서는 환자의 분변에서 분리한 병원성 대장균 60건을 대상으로 항균제에 내성을 보이는 대장균의 특성을 알아보기 위해 환자에서 분리된 대장균에 대한 항균제 내성 및 병원성 독력 인자의 분자융합적 관점에서 확인하였다. 항균제내성을 보면, AM 68.3%, TE 46.7%, PIP 40%, CIP 및 SXT 36.7%, GM 31.7%순으로 내성율이 높았고, 다약제 내성을 보면, 3가지 이상 다약제 내성이 52%를 차지하였다. 또한 독력유전자 검출을 보면, 병원성 대장균은 32주(53.3%), 비병원성 대장균은 28주(46.7%)로 나왔다. 따라서 병원성을 결정하는 독력인자와 항균제 내성과의 상관성을 표준화된 분자융합기술을 통해 조사하여 향후 항균제 내성에 따른 독력에 대한 정보를 제공하여 세균성 감염의 진단에 객관적인 진단기준을 제공할것으로 사료된다.

REFERENCES

- [1] A. H. Jack, G. A. Robert, F. A. Carlos, "Do antibiotics maintain antibiotic resistance", Drug Discovery Today, Vol. 5, No. 5, pp. 195-204, 2000.
- [2] M. Park, S. D. Park, S. H. Kim, G. L, H. J. Woo, H. W. Kim, B. A, I. H. Jang, Y. Uh, J. B. Kim, "Comparison of Molecular Characteristics of Extended Spectrum β -lactamase Producing

- Escherichia coli Strains Isolated from Patients with Urinary Tract Infections between 2 Time Periods of 1989 and 2010 at Gangwon Province in Korea”, *Journal of Experimental & Biomedical Sciences*, Vol. 19, No. 3, pp. 275-279, 2013.
- [3] S. J. Savarino, A. Fasano, J. Watson, B. M. Martin, M. M. Levine, S. Guandalin, P. Guerry, “Enteraggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of E. coli heat-stable toxin”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 90, No. 7, pp. 3093-3097, 1993.
- [4] H. W. Smith, S. Halls, “Observation by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on Escherichia coli infections in pigs, calves, lambs, and rabbits”, *J. Pathol. Bacteriol.*, Vol. 93, No. 2, pp. 499-529, 1967.
- [5] M. N. Burgess, R. J. Bywater, C. M. Cowley, N. A. Mullan, P. M. Newsome, “Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves”, *Infect. Immun.*, Vol. 21, No. 2, pp. 526-531, 1978.
- [6] F. Scheutz, L. D. Teel, L. Beutin, D. Pierard, G. Buvens, H. Karch, A. Mellmann, A. Caprioli, R. Tozzoli, S. Morabito, N. A. Strockbine, A. R. Melton-Celsa, M. Sanchez, S. Persson, A. D. O’Brien, “Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature”, *J. Clin. Microbiol.*, Vol. 50, No. 9, pp. 2951-2963, 2012.
- [7] D. J. Bolton, “Verocytotoxigenic (Shiga toxin-producing) Escherichia coli : virulence factors and pathogenicity in the farm to fork paradigm”, *Foodborne Pathog. Dis.*, Vol. 8, No. 3, pp. 357-365, 2011.
- [8] H. Karch, T. Meyer, H. Russmann, J. Heesemann, “Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of Escherichia coli upon subcultivation”, *Infect. Immun.*, Vol. 60, No. 8, pp. 3464-3467, 1992.
- [9] S. Bjork, M. E. Briemer, G. C. Hansson, K. A. Karlsson, H. Leffler, “Structure of blood group glycosphingolipids of human small intestine. A relation between the expression of fucolipids of epithelial cells and the ABO, Le and Se phenotype of the donor”, *J. Biol. Chem.*, Vol. 262, No. 14, pp. 6758-6765, 1987.
- [10] D. E. Hoey, L. Sharp, C. Currie, C. A. Lingwood, D. L. Gally, D. G. Smith, “Verotoxin 1 binding to intestinal crypt epithelial cells results in localization to lysosomes and abrogation of toxicity”, *Cell. Microbiol.*, Vol. 5, No. 2, pp. 85-97, 2003.
- [11] M. Johansen, L. O. Andresen, S. E. Jorsal, L. K. Thomsen, T. E. Waddell, C. L. Gyles, “Prevention of edema disease in pigs by vaccination with veritoxin 2e toxoid”, *Can. J. Vet. Res.*, Vol. 61, No. 4, pp. 280-285, 1997.
- [12] J. G. Mainil, E. Jacquemin, E. Oswald, “Prevalence and identity of cdt-related sequences in necrotogenic Escherichia coli”, *Vet Microbiol.*, Vol. 94, No. 2, pp. 159-165, 2003.
- [13] B. Kenny, R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, B. B. Finlay, “Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells”, *Cell*, Vol. 91, No. 4, pp. 511-520, 1997.
- [14] OIE Terrestrial Manual, Chapter 1.1.6. -Laboratory methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing; pp. 56-65, 2008.
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21st informational supplement. CLSI document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2011.
- [16] H. J. Doughari, P. A. Ndakidemi, I. S. Human, S. L. Benade, C. McDonald, “Virulence, resistance genes, and transformation amongst environmental isolates of Escherichia coli and Acinetobacter spp.”, *J. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 22, No. 1, pp. 25-33, 2012.
- [17] H. Pai, “The characteristics of extended-spectrum β lactamase in Korea isolates of Enterobacteriaceae”, *Yonsei. Med. J.*, Vol. 39, No. 6, pp. 514-519, 1998.
- [18] Y. K. Kim, H. Pai, H. J. Lee, S. E. Park, E. H. Choi, J. Kim, J. H. Kim, E. C. Kim, “Bloodstream

infections by extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: Epidemiology and clinical outcome", *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol. 46, No. 5, pp. 1481-1491, 2002.

- [19] J. W. Lee, J. S. Shin, J. W. Seo, M. A. Lee, S. J. Lee, "Incidence and risk factors for extended-spectrum betalactamase-producing *Escherichia coli* in community-acquired childhood urinary tract infection, *J. Korean Soc. Pediatr. Nephrol.* Vol. 8, No. 3, pp. 214-222, 2004.

저자소개

박 창 은 (Chang-Eun Park) [정회원]



- 2008년 8월 : 아주대학교 의학과 (분자의학박사)
- 2009년 3월 ~ 현재 : 남서울대학교 임상병리학과 부교수

<관심분야> : BT융합, 생명정보학,

성 현 호 (Hyun-Ho Sung) [정회원]



- 2015년 현재 : 서남대학교 보건학 박사 수료
- 2014년 3월 ~ 현재 : 동남보건대학교 임상병리학과 조교수

<관심분야> : 의용공학, 임상병리학, 통계학

한 재 일 (Jae-Il Han) [정회원]



- 2015년 현재 : 단국대학교 보건학 박사
- 1994년 8월 ~ 현재 : 서울아산병원 진단검사의학과

<관심분야> : 임상병리학, 생명공학