pISSN 2466-1384 eISSN 2466-1392
Korean J Vet Res (2020) 60(3):163~171
https://doi.org/10.14405/kjvr.2020.60.3.163

ORIGINAL ARTICLE

사료 첨가 항생제 금지 전후 돼지 설사증 유래 대장균의 병원성 인자 및 항생제 내성 유전자

도경효[1] · 변재원[2] · 이완규[1,*]
[1]충북대학교 수의과대학, [2]농림축산검역본부

Virulence and antimicrobial resistance genes of pathogenic *Escherichia coli* from piglets showing diarrhea before and after ban on antibiotic growth promoters in feed

Kyung-Hyo Do[1], Jae-Won Byun[2], Wan-Kyu Lee[1,*]
[1]*College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea*
[2]*Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea*

Abstract: This study examined the prevalence of adherence factors, toxin genes, antimicrobial resistance phenotypes, and resistance genes in *Escherichia coli* (*E. coli*) isolated from piglets with diarrhea before and after the ban on antibiotic growth promoters (AGPs) in Korea from 2007 to 2018. In this period, pathogenic 474 *E. coli* isolates were obtained from diarrheic piglets. The virulence factors and antimicrobial resistance genes were assayed using a polymerase chain reaction, and the susceptibility to antibiotics was tested according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines. After the ban on AGPs, the frequency of F4 (12.5% to 32.7%) increased significantly, and LT (31.9% to 20.3%) and EAST-I (46.5% to 35.2%) decreased significantly. In addition, the resistance to streptomycin (45.8% to 67.9%), cephalothin (34.0% to 59.4%), and cefazlin (10.4% to 28.8%) increased significantly. Colistin resistance plasmid-mediated genes, *mcr*-1 and *mcr*-3, were detected after the ban on AGPs. The results of this study can provide useful data for analyzing the impact of the ban on AGPs on the virulence profiles and antimicrobial resistance of *E. coli* isolated from piglets with diarrhea in Korea.

Keywords: virulence factors, antimicrobial resistance, swine, *Escherichia coli*, antibiotic growth promoters

*Corresponding author

Wan-Kyu Lee
Laboratory of Veterinary Bacteriology and Infectious Diseases, College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, 1 Chungdae-ro, Seowon-gu, Cheongju 28644, Korea

Tel: +82-43-261-2960
Fax: +82-43-267-2595
E-mail: wklee@cbu.ac.kr

ORCID:
Kyung-Hyo Do
https://orcid.org/0000-0001-6080-0374
Jae-Won Byun
https://orcid.org/0000-0001-5664-2107
Wan-Kyu Lee
https://orcid.org/0000-0001-5087-6359

Conflict of Interest
The authors declare no conflicts of interest.

Received: June 19, 2020
Revised : July 24, 2020
Accepted: July 29, 2020

서 론

병원성 대장균은 돼지에서 설사병(diarrhea), 부종병(edema disease) 등을 유발하여 발육부진, 출하일령 지연, 폐사 등으로 양돈 농가에 심각한 경제적 손실을 입히고 있으며, 2017년 농림축산검역본부 역학조사에 의하면 돼지 대장균 감염증이 비법정 질병진단 실적 중 세 번째로 많이 진단되고 있는 상황이다[1].

돼지 대장균증의 원인체인 병원성 대장균은 신생자돈이나 포유자돈에서는 장관 상피세포의 부착에 있어서 F4, F5, F6 등의 부착인자가 우세하게 검출되고 있다. 그러나 이유자돈의 경우에는 우세한 부착인자가 F18섬모 항원으로 검출되고 있으며, 부착 후 LT, STa, STb, EAST-1 등과 같은 독소를 분비함으로써 자돈에 설사를 유발하는 것으로 알려지고 있다[2]. 일부 Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC)는 섬모항원 F18과 독소 Stx2e를 산생하여 이유 후 자돈 및 육성·비육돈에서 부종병을 일으키기도 한다[3]. 이와 같이 대장균이 보유한 병원성 인자는 연령별, 지역별, 연도별 변화에 따라 다양하게 분리되는 것이 특징이기 때문에 각 지역별로 효율적인 돼지 대장균증의 예방 및 치료대책을 수립하기 위해서는 병원성 대장균의 돼지 연령별, 연도별 우점종의 병원성 인자 분석이 우선적으로 필요한 상황이다[4].

항생제는 그동안 양돈 산업에서 질병을 치료하고 예방하는 데에 매우 중요한 역할을 해왔으며, 특히 이유자돈 설사증이나 부종병의 치료 및 예방법으로 양돈산업에서 항생제가 배합사료 내에 첨가되어 많이 사용되었다. 그러

나 항생제의 광범위하고 무분별한 사용은 내성균의 출현 빈도를 증가시킴으로써 양돈 질병의 치료 및 예방에 심각한 문제를 일으키게 되었다[5]. 항생제 내성의 변화는 사용되는 항생제의 종류, 조사 시기, 지역 등에 따라 다양하게 나타난다고 알려져 있기에 효율적인 항생제의 사용을 위해서는 항생제 내성의 분포 양상을 조사하는 것이 중요하다고 할 수 있다[6].

또한 배합사료 내 항생제는 질병을 사전에 예방하는 목적 외에도 가축의 성장을 촉진하는 차원에서 일반적으로 많은 농가에서 사용되어 왔다. 그러나 각 농가에서 무분별한 배합사료 내 첨가 항생제의 사용으로 인하여 항생제의 사용량이 제어되지 못함으로써 항생제 잔류와 내성균의 출현과 같은 항생제 오남용의 문제가 대두되었다. 항생제 내성 세균의 증가는 곧 치료 효율 감소 및 질병의 예방 치료 비용을 증대시키는 결과로 이어지고 있다[7]. 특히 한국은 미국, 일본, 유럽 등의 국가들과 비교하여 항생제 사용량이 월등히 많은 것으로 나타나고 있으며 이러한 항생제의 오남용은 항생제 잔류와 내성균의 출현을 야기하여 동물 건강은 물론 사람의 건강 또한 위협하고 있는 실정이다[8]. 이러한 항생제 오남용의 문제를 방지하기 위하여 덴마크는 2000년부터, EU는 2006년부터 자돈에 대한 성장 촉진 목적의 항생제 사용을 정책적으로 전면 사용 금지하였으며[9], 한국에서도 1997년 apramycin, spiramycin, olaquiniodox 등 6종, 2005년 5월에는 oxytetracycline HCl, erythromycin 등 28종, 2009년 1월에는 oxytetracycline, chlortetracycline 등 7종, 2011년 7월에는 virginamycin 등 9종을 배합사료에 첨가 금지한 이후 현재 모든 항생제는 배합사료 내 첨가가 금지되었다. 그러나 국내 양돈농가에서는 배합사료 내 항생제 첨가가 전면 금지된 이후 치료 목적의 항생제 사용량 증가로 인하여 오히려 설사증 및 부종병 유발 병원성 대장균의 분리율이 급격히 증가한 것으로 보고되고 있다[10].

그동안 국내에서는 돼지 대장균증 유발 병원성 대장균에 대한 지속적인 병원성, 역학적 연구 및 항생제 내성 조사가 수행되어 왔지만, 연구 분석 기간이 보통 1년에서 5년간으로 단기간이었기 때문에, 전체적인 국내 대장균증의 연령별, 지역별, 경시적 발병인자 현황분석에는 부족한 실정이다. 특히 성장촉진 목적의 항생제 사용을 금지한 2011년을 기점으로 국내 병원성 대장균의 항생제 내성 패턴은 빠르게 변화할 것으로 예측되지만 실제 국내외적으로 이와 같은 항생제 금지 전후의 내성 프로파일링을 연구한 것은 이번 연구가 최초일 것으로 판단되기 때문에 매우 의미 있는 연구가 될 것으로 기대하고 있다.

따라서 본 연구에서는 2007년부터 2018년까지 12년 동안 한국 양돈장에서 분리한 설사증 돼지 유래 병원성 대장균 474균주를 대상으로 병원성 인자 분석, 항생제 내성 프로파일링, 내성 기전에 관련된 유전자 분석(ESBL family gene, *qnr, mcr, Amp* 등)을 이용한 유전학적 성상 조사를 실시하고, 국내에서 배합사료 내 항생제 첨가 전면 금지시기인 2011년을 전후하여 비교 분석하는 것을 연구 목적으로 하였다.

재료 및 방법

대장균 분리

2007년부터 2018년까지 대장균증 증상을 보이는 자돈에서 병원성 대장균 474균주를 분리하였다. 분리과정은 모두 50~100두의 모돈이 있는 120개의 서로 다른 농가를 대상으로 실시하였다. 병원성 대장균의 분리를 위하여 분변 또는 장 내용물을 무균적으로 채취한 후 즉시 MacConkey agar (Becton Dickinson, MD, USA)와 5% Sheep blood agar (Asan Co., Korea) 배지에 도말하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 각 배지에서 전형적인 대장균의 모양을 나타내는 집락을 선별한 후 VITEK Ⅱ system (bioMereiux Marcy I' Etoile, France)을 이용하여 동정하였다. 분리된 균주들은 추후 실험을 위하여 50% glycerol stock을 이용하여 -70°C에서 냉동보관하였다.

부착인자 및 Toxin genes 검출

양돈 농가 돼지 대장균 설사증 유래 병원성 대장균의 부착인자인 Fimbrial gene과 LT, STa, STb, Stx2e 독소에 대한 조사는 Multiplex PCR을 이용하였으며, Non-fimbrial adhesin gene 및 EAST-I 독소에 대해서는 Single PCR을 이용하였다.

PCR을 위한 template DNA는 Boiling method를 이용하여 추출하였다[11]. PCR의 reaction volume은 20 μL로 2x EmeraldAmp Master Mix (Takara, Japan), 검출 유전자에 해당하는 primer 2 μM, 3 μL의 DNA로 조성하였으며, PCR의 온도 조건은 기존 기술한 방법에 따라 설정하였다[1,12]. 증폭이 끝난 후 증폭산물은 Ethidium bromide로 염색한 2% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

항생제 감수성 검사

항생제 감수성 검사는 Kirby-Bauer의 방법에 따라 디스크 확산법으로 실시하였다[13]. 항생제는 양돈 농가에서 돼지 대장균증 치료에 주로 활용하는 다음의 16가지를 실험에 사용하였다: gentamicin (10 μg), streptomycin (10 μg), neomycin (30 μg), cephalothin (30 μg), cefazolin (30 μg), cefepime (30 μg), cefoxitin (30 μg), nalidixic acid (30 μg), ciprofloxacin (5 μg), norfloxacin (10 μg), ampicillin (10 μg), amoxicillin/clavulanic acid (20/10 μg), trimethoprim/sulfamethoxazole (23.75/1.25 μg), chloramphenicol (30 μg), colistin (10 μg), tetracycline (30 μg). 각 항생제는 Becton Dickinson 사에서 판매하는 BBL-Sensi-Disk를 구입하여 사용하였다. 다제내성은 3개 이상의 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) subclass에 내성을 나타낸 균주를 다제내성균으로 간주하였다.

항생제 내성 유전자 조사

PCR을 위한 template DNA는 상기 기술한 Boiling method를 이용하여 추출하였다. 조사 유전자로는 광범위 β-lactam

계 항생제 저항 유전자인 ESBL (Extended Spectrum β-lactamase) family인 *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA, *bla*CTX-M group 1, *bla*CTX-M group 2, *bla*CTX-M group 9와 [14] quinolone계 항생제 저항 유전자인 *qnrA* [15], Plasmid 유래 colistin 내성 유전자인 *mcr*-1, *mcr*-2, *mcr*-3 [16], 그리고 ampicillin 내성 유전자인 *Amp* gene [17]을 검사하였으며, 각 항생제 내성 유전자의 Primer 및 PCR condition은 각 참고문헌의 조건에 따라 설정하였다. PCR의 reaction volume은 20 μL로 2x EmeraldAmp Master Mix (Takara), 검출 유전자에 해당하는 primer 2 μM, 3 μL의 DNA로 조성하였다.

통계적 분석

통계 분석은 SPSS 버전 12.0 프로그램(SPSS, USA)을 이용하여 chi square test를 실시하였고 통계적 유의수준은 $p < 0.05$로 설정하였다.

결 과

부착인자의 보유율

병원성 대장균의 부착인자 보유율에 대한 조사 결과를 Table 1에 나타내었다. 2007년부터 2018년간 한국 양돈 농가 설사증 환돈 유래 병원성 대장균 중 126균주(26.6%)가 F18을 보유하고 있었으며, 뒤이어 AIDA-I가 98균주(20.7%)로 우세하게 검출되었다. 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전후를 비교하였을 때, F18은 18균주(12.5%)에서 108균주(32.7%)로 그 검출률이 유의적으로 급격하게 증가한 반면, F4는 11균주(7.6%)에서 4균주(1.2%), F6는 13균주(9.0%)에서 5균주(1.5%)로, 그리고 paa의 경우 64균주(44.4%)에서 20균주(6.1%)로 유의적으로 감소하였다.

Toxin gene의 보유율

Toxin gene의 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전후 보유율은 Table 2에 나타내었다. 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전(2007-2011년), 금지 후(2011-2018년), 그리고 전기간(2007-2018년) 동안 한국 양돈 농가 설사증 환돈 유래 병원성 대장균 중 우세 검출 독소 유전자는 STb (198균주, 41.8%)였으며, EAST-I (183균주, 38.6%)이 두 번째로 높은 보유율을 보임을 확인하였다. STa, STb 및 Stx2e의 경우 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전후 보유율에 유의적인 변화가 없었으나, LT 및 EAST-I의 경우 각각 31.9%에서 20.3%로, 46.5%에서 35.2%로 보유율이 유의적으로 감소하였다.

Pathotype 및 Virotype 분석

대장균의 pathotype 별로 분석한 결과(Table 3), pathotype 중 ETEC가 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전에는 57.6%, 금지 후에는 50.0%로 검출되며 한국 이유자돈에서 가장 우세한 병원성형임을 확인하였다. 또한 Toxin gene과 adhesin

Table 1. Colonization factors of pathogenic *Escherichia coli* from diarrheic piglets before and after ban on antibiotic growth promoters in feed during 2007 to 2018

Colonization factor		2007-2011 (n = 144)	2011-2018 (n = 330)	2007-2018 (n = 474)
Fimbriae	F4	32 (22.2)	53 (16.1)	85 (17.9)
	F5	11 (7.6)	4 (1.2)**	15 (3.2)
	F6	13 (9.0)	5 (1.5)**	18 (3.8)
	F18	18 (12.5)	108 (32.7)**	126 (26.6)
	F41	7 (4.9)	7 (2.1)	14 (3.0)
Non-fimbrial adhesins	eae	3 (2.1)	4 (1.2)	7 (01.5)
	paa	64 (44.4)	20 (6.1)**	84 (17.7)
	AIDA-I	19 (13.2)	79 (23.9)**	98 (20.7)

**Significant difference between 2007-2011 and 2011-2018 ($p < 0.01$).

Table 2. Toxin genes of pathogenic *Escherichia coli* from diarrheic piglets before and after ban on antibiotic growth promoters in feed during 2007 to 2018

Toxins	2007-2011 (n = 144)	2011-2018 (n = 330)	2007-2018 (n = 474)
LT	46 (31.9)	67 (20.3)**	113 (23.8)
STa	35 (24.3)	84 (25.5)	119 (25.1)
STb	60 (41.7)	138 (41.8)	198 (41.8)
Stx2e	37 (25.7)	85 (25.8)	122 (25.7)
EAST-I*	67 (46.5)	116 (35.2)*	183 (38.6)

*Significant difference between 2007-2011 and 2011-2018 ($p < 0.05$).
**Significant difference between 2007-2011 and 2011-2018 ($p < 0.01$).

Table 3. Pathotypes and virotypes of pathogenic *Escherichia coli* from diarrheic piglets before and after ban on antibiotic growth promoters in feed during 2007 to 2018

Pathotype Virotype	2007-2011 (n = 144)	2011-2018 (n = 330)	2007-2018 (n = 474)
ETEC	83 (57.6)	165 (50.0)	248 (52.3)
F4:LT:STb:EAST1	5 (3.5)	28 (8.5)*	33 (7.0)
AIDA:STb:EAST1	2 (1.4)	25 (7.6)**	27 (5.7)
STa:STb	3 (2.1)	8 (2.4)	11 (2.3)
EAST1	6 (4.2)	4 (1.2)*	10 (2.1)
STb	6 (4.2)	3 (0.9)*	9 (1.9)
F18:STa:STb	0 (0)	8 (2.4)	8 (1.7)
Others	61 (42.4)	89 (27.0)**	150 (31.6)
STEC	17 (11.8)	43 (13.0)	60 (12.7)
Stx2e	2 (1.4)	15 (4.5)	17 (3.6)
F18:AIDA:Stx2e	0 (0)	15 (4.5)**	15 (3.2)
F18:Stx2e:EAST1	0 (0)	6 (1.8)	6 (1.3)
Others	15 (10.4)	7 (2.1)**	22 (4.6)
EPEC	1 (0.7)	0 (0)	1 (0.2)
eae:paa	1 (0.7)	0 (0)	1 (0.2)
eae	1 (0.7)	0 (0)	1 (0.2)
ETEC/STEC	20 (13.9)	42 (12.7)	62 (13.1)
F18:AIDA:Stx2e	0 (0)	8 (2.4)	8 (1.7)
F18:LT:Stx2e	2 (1.4)	6 (1.8)	8 (1.7)
Others	18 (12.5)	28 (8.5)	46 (9.7)
ETEC/EPEC	1 (0.7)	4 (1.2)	5 (1.1)
F18:eae:LT:STa	0 (0)	1 (0.3)	1 (0.2)
eae:AIDA:STa:STb	0 (0)	1 (0.3)	1 (0.2)
F5:eae:paa:AIDA:STa:STb	1 (0.7)	0 (0)	1 (0.2)
eae:paa:STa:EAST1	0 (0)	1 (0.3)	1 (0.2)
eae:STa:STb	0 (0)	1 (0.3)	1 (0.2)
None†	21 (14.6)	76 (23.0)*	97 (20.5)

†Isolates encoding no adhesin and/or toxin genes.
*Significant difference between 2007-2011 and 2011-2018 ($p < 0.05$).
**Significant difference between 2007-2011 and 2011-2018 ($p < 0.01$).

gene의 조합인 virotype을 보았을 때, 배합사료 내 항생제 첨가 금지 이전에는 ETEC/F4:LT:STb:EAST1은 5균주 (3.5%), ETEC/AIDA:STb:EAST1은 2균주(1.4%)로 매우 낮은 검출률을 보였으나, 금지 이후에는 각각 28균주(8.5%), 25균주(7.6%)로 검출률이 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. ETEC 외에 STEC에서도 virotype의 유의적인 차이를 확인하였는데, STEC/Stx2e와 STEC/F18:AIDA:Stx2e는 금지 이전 각각0균주 (0.0%)였으나, 금지 이후에는 각각 15균주 (4.5%)로 검출률이 증가하였다.

항생제 내성 표현형 분석

배합사료 내 항생제 첨가 금지 전후 병원성 대장균의 항생제 내성률을 분석한 결과, streptomycin (45.8% → 67.9%), cephalothin (34.0% → 59.4%), cefazolin (10.4% → 28.8%), cefepime (0.7% → 4.5%), nalidixic acid (41.0% → 53.0%), ampicillin (48.6% → 68.2%), amoxicillin/clavulanic acid (25.7% → 37.3%), trimethoprim/sulfamethoxazole (33.3% → 48.5%), chloramphenicol (53.5% → 68.5%), colistin (5.6% → 19.4%), tetracycline (53.5% → 67.6%)으로 증가하였다. 한편 gentamicin과 neomycin의 경우 항생제 금지 전후 내성율이 약간 감소하는 경향을 나타내었지만 통계적 유의성은 관찰할 수 없었다(Table 4). 실험 전기간에 걸쳐 높은 내성률을 나타낸 항생제는 chloramphenicol (63.9%), tetracycline (63.3%), ampicillin (62.2%)이었으며, colistin (15.2%), cefoxitin (9.7%), cefepime (3.4%)은 낮은 내성률을 나타내었다.

다제내성 분석

Table 5에서와 같이 다제내성률을 분석하였을 때, 배합사료 내 항생제 첨가 금지 이전 (2007-2011년)에 비하여 금지 이후 (2011-2018년)에 모든 항생제에 감수성을 보인 균주가

Table 4. Antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* from diarrheic piglets before and after ban on antibiotic growth promoters in feed during 2007 to 2018

Antimicrobial agents	2007-2011 (n = 144)	2011-2018 (n = 330)	2007-2018 (n = 474)
Gentamicin	52 (36.1)	106 (32.1)	158 (33.3)
Streptomycin	66 (45.8)	224 (67.9)**	290 (61.2)
Neomycin	72 (50.0)	159 (48.2)	231 (48.7)
Cephalothin	49 (34.0)	196 (59.4)**	245 (51.7)
Cefazolin	15 (10.4)	095 (28.8)**	110 (23.2)
Cefepime	1 (0.7)	15 (4.5)*	16 (3.4)
Cefoxitin	11 (07.6)	35 (10.6)*	46 (9.7)
Nalidixic acid	59 (41.0)	175 (53.0)*	234 (49.4)
Ciprofloxacin	39 (27.1)	102 (30.9)	141 (29.7)
Norfloxacin	38 (26.4)	96 (29.1)	134 (28.3)
Ampicillin	70 (48.6)	225 (68.2)**	295 (62.2)
AMC	37 (25.7)	123 (37.3)*	160 (33.8)
SXT	48 (33.3)	160 (48.5)*	208 (43.9)
Chloramphenicol	77 (53.5)	226 (68.5)**	303 (63.9)
Colistin	8 (5.6)	64 (19.4)**	72 (15.2)
Tetracycline	77 (53.5)	223 (67.6)**	300 (63.3)

The data are expressed as number (%) of isolates.
AMC, amoxicillin / clavulanic acid; SXT, trimethoprim / sulfamethoxazole.
*Significant difference between before and after ($p < 0.05$).
**Significant difference between before and after ($p < 0.01$).

Table 5. Multiple resistance of pathogenic *Escherichia coli* from diarrheic piglets before and after ban on antibiotic growth promoters in feed during 2007 to 2018

No. of resistance	2007-2011 (n = 144)	2011-2018 (n = 330)	2007-2018 (n = 474)
0 subclass	60 (41.7)	22 (6.7)**	82 (17.3)
1 subclass	0 (0)	5 (1.5)	5 (1.1)
2 subclasses	2 (1.4)	11 (3.3)	13 (2.7)
3 subclasses	2 (1.4)	25 (7.6)**	27 (5.7)
4 subclasses	4 (2.8)	37 (11.2)**	41 (8.6)
5 subclasses	13 (9.0)	36 (10.9)	49 (10.3)
6 subclasses	19 (13.2)	33 (10.0)	52 (11.0)
7 subclasses	19 (13.2)	42 (12.7)	61 (12.9)
8 subclasses	8 (5.6)	35 (10.6)	43 (9.1)
9 subclasses	7 (4.9)	36 (10.9)*	43 (9.1)
10 subclasses	9 (6.3)	32 (9.7)	41 (8.6)
11 subclasses	1 (0.7)	10 (3.0)	11 (2.3)
12 subclasses	0 (0)	6 (1.8)	6 (1.3)
Multi-resistant (> 2 subclasses)	82 (56.9)	292 (88.5)**	374 (78.9)

Antimicrobial subclasses defined by the Clinical and Laboratory Standards Institute are used.
*Significant difference between before and after ($p < 0.05$).
**Significant difference between before and after ($p < 0.01$).

41.7% (60균주)였으나, 금지 이후에는 그 비율이 6.7%로 유의미하게 감소한 것을 확인하였다. 이외에 금지 이후에 비율이 유의적으로 증가한 항목 또한 확인할 수 있었는데, 세 종류의 항생제 subclass에 내성을 보이는 균주의 비율이 1.4%에서 3.3%로, 네 종류에 내성을 보이는 비율은 2.8%에서 11.2%로 유의미하게 증가하였으며, 세 종류 이상의 antimicrobial subclass에 저항하는 다제내성균의 빈도는 금지 이전 56.9%에서 금지 이후 88.5%로 크게 증가한 것을 확인하였다.

Table 6. Antimicrobial resistance genes of pathogenic *Escherichia coli* from diarrheic piglets before and after ban on antibiotic growth promoters in feed during 2007 to 2018

Resistant antimicrobial agents	Resistance genes	2007-2011 (n = 144)	2011-2018 (n = 330)	2007-2018 (n = 474)
β-Lactam antibiotics	*bla*TEM	119 (82.6)	291 (88.2)	410 (86.5)
	*bla*SHV	13 (9.0)	28 (8.5)	41 (8.6)
	*bla*OXA	9 (6.3)	24 (7.3)	33 (7.0)
	*bla*CTX-M gp 1	21 (14.6)	53 (16.1)	74 (15.6)
	*bla*CTX-M gp 2	77 (53.5)	171 (51.8)	248 (52.3)
	*bla*CTX-M gp 9	25 (17.4)	59 (17.9)	84 (17.7)
Quinolones	*qnrA*	51 (35.4)	166 (50.3) **	217 (45.8)
Colistin	*mcr-1*	0 (0)	4 (1.2)	4 (0.8)
	mcr-2	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	mcr-3	0 (0)	8 (2.4)	8 (1.7)
Ampicillin	*Amp*	52 (36.1)	170 (51.5) **	222 (46.8)

*Significant difference between before and after ($p < 0.05$).
**Significant difference between before and after ($p < 0.01$).

항생제 내성 유전자 분석

Table 6에 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전후 항생제 내성 유전자의 분포 비율을 나타내었다. 광범위 β-lactam계 항생제 저항 유전자인 ESBL gene 중 가장 우세하게 검출된 것은 *bla*TEM으로 한국 양돈 농가 설사증 환돈 유래 병원성 대장균에서 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전 82.6%, 금지 후 88.2%, 2007-2018년간 86.5%를 차지하였다. Colistin 항생제 내성 저항 유전자인 *mcr* gene의 경우 특이하게 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전에는 전혀 검출되지 않았으나, 금지 후에 *mcr-1*이 4균주(1.2%), *mcr-3*이 8균주(2.4%)로 검출되었다. 배합사료 내 항생제 첨가 금지 후 내성 유전자의 검출률은 *qnr*A가 35.4%에서 50.3%로, *Amp*의 검출률이 36.1%에서 51.5%로 금지 전에 비하여 유의적으로 증가한 것에 반해 ESBL gene인 *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*OXA, *bla*CTX-M group은 큰 변화율이 나타나지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 2007년부터 2018년까지 한국 양돈 농가 설사증 환돈에서 분리한 병원성 대장균 474균주에 대하여 F4, F5, F6, F18, F41 및 eae, paa, AIDA-I과 같은 부착인자 및 STa, STb, Stx2e, EAST-I과 같은 독소 생성 유전자를 조사하였으며, 항생제 감수성 검사 및 항생제 내성 유전자를 통한 항생제 내성률을 확인한 후, 2011년 7월 한국에서 배합사료 내 항생제 첨가를 전면 금지한 때를 전후로 하여 병원성 및 항생제 내성 양상을 비교, 분석하였다.

병원성 대장균의 독소 발현 및 임상증상 발현에 있어서 제일 먼저 중요한 것은 대장균의 장내 상피세포 부착 능력이다. 양돈 농가 병원성 대장균 중 주로 검출되는 fimbriae로는 F4, F5, F6, F18, F41 등이 있으며, non-fimbrial antigen으로는 eae, paa, AIDA-I 등이 있다. 부착인자는 지역, 시기, 숙주의 연령에 따라 검출률이 다양하게 나타난다고 알려져 있다. 중국, 일본, 유럽, 미국 등 여러 나라에서 가장 빈번하게 검출되는 fimbrial antigen으로 F4와 F18이 알려져 있다[4,18-20]. 본 연구에서도 가장 우세하게 검출된 부착인자는 F18 (26.6%, 126균주)이었으며, F4가 17.9% (85균주)로 fimbrial antigen 중 두 번째로 높은 빈도로 검출되었다 (Table 1).

본 연구에서는 Non-fimbrial antigen 중 AIDA-I이 가장 우세하게 검출되었다(20.7%, 98균주). AIDA-I은 diffuse adherence에 관련된 부착인자로, 독소생성 유전자인 EAST-I, ST와 연관성이 있는 것으로 알려져 있으며, F18 보유 대장균에서 흔히 검출되는 것으로 알려져 있다[12,21].

기존 선행연구를 통하여 한국에서 배합사료 내 항생제 첨가 금지 후 부종병 관련 병원성형인 STEC의 검출률이 올라갔음을 보고하였다[1]. 본 연구에서 STEC와 연관성이 높다고 알려진[22] 부종병 유발 독소를 산생하는 Stx2e 유전자의 검출률은 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전후에 큰 변화가 나타나지 않았지만(Table 2), F18과 AIDA-I의 검출률이 크게 증가하였다는 결과를 볼 때 최근 한국 양돈농가에서 부종병의 발병 위험성이 증가하였을 것으로 추정할 수 있다.

반면 F18, AIDA-I과 다르게 paa의 경우 검출률이 배합사료 내 항생제 첨가 금지 후44.4%에서 6.1%로 급격히 감소하였다. paa는 LT, STa, STb를 생성하여 삼투성 설사를 유발하는 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC)와 달리 돼지 장벽의 attaching and effacing lesion을 통한 비흡수성 설사를 유발하는 것으로 알려져 있다[23]. 이러한 paa 인자의 검출률 감소는 향후 한국 양돈 농가에서 비흡수성 설사 증병은 감소에 영향을 미칠 것으로 추정된다.

Toxin gene과 adhesin gene의 조합인 virotype을 살펴보았을 때(Table 3), 배합사료 내 항생제 첨가 금지 이전에는 각 pathotype 별로 뚜렷한 우세 virotype이 관찰되지 않은 반면,

금지 이후에는 ETEC에서 F4:LT:STb:EAST1이 28균주, AIDA:STb:EAST1이 25균주, Stx2e와 F18:AIDA:Stx2e가 각각 15균주로 pathotype별 우세 virotype을 확인할 수 있었다. 특이하게도, toxin gene과 adhesin gene을 모두 encoding하고 있지 않은 균주가 금지 이전에는 21균주(14.6%), 금지 이후에는 76균주(23.0%)가 관찰되었는데, 이 균주들은 이번 연구에서 검사한 fimbrial, non-fimbrial adhesin gene 및 toxin gene 이외에 다른 병원성 인자를 보유하고 있었던 것으로 생각되며, 이런 현상에 대한 후속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

한국 양돈 농가 유래 병원성 대장균의 항생제 내성률을 조사한 결과, chloramphenicol (63.9%), tetracycline (63.3%), ampicillin (62.2%), streptomycin (61.2%)에 대한 항생제 내성률이 가장 높게 검출되었다(Table 4). 항생제 내성률은 항생제의 사용량과 비례하여 증가하는 것으로 알려져 있는데[24], 흥미롭게도 배합사료 내 항생제 첨가 금지 이후에 gentamicin과 neomycin을 제외한 모든 항생제의 내성률이 증가하였다. 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전후의 국내 동물용 항생제 판매량을 조사한 결과, aminoglycoside계 항생제는 2008년 73톤에서 2016년 48톤으로 판매량이 약 25톤 감소하였는데, gentamicin과 neomycin에 대한 내성률 감소는 항생제 판매량의 감소와 관련이 있을 것으로 사료된다. Tetracycline계 항생제의 2008-2010년 국내 평균 판매량은 374톤에서 2012-2016년 평균 판매량은 253톤으로 약 94톤 감소하였는데, tetracycline 내성률의 증가 원인은 항생제 사용 외에도 다른 요인이 관여하는 것으로 추측된다. 국내 가축 분변에서 분리한 대장균의 항생제 내성 양상을 분석한 결과, streptomycin, ampicillin 등 대부분의 항생제 내성이 tetracycline과 함께 관찰되는 것으로 보고되고 있는데[8], 이를 통하여 다른 항생제의 사용으로 인한 항생제 내성 획득 시 인접한 tetracycline 내성 유전자를 함께 획득할 가능성이 있는 것으로 생각된다[3].

WHO에서는 사람에서 의학적인 중요도에 따라 항생제의 감수성을 확보하기 위하여 항생제를 CIA (critically important antimicrobials), HIA (highly important antimicrobials), IA (important antimicrobials) 그룹으로 분류하고 있는데, 이 중 CIA는 우선적으로 중요한 관리가 필요한 항생제로 분류되며, fluoroquinolone계, 제3세대 및 제4세대 cephalosporin계, macrolide계 항생제가 포함된다 [25]. 이러한 관점에서 비추어 보았을 때, Fluoroquinolone계 항생제인 ciprofloxacin과 norfloxacin에 대한 내성률이 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전에 비하여 금지 후에 내성률이 높아졌으며, 이러한 항생제 내성률의 증가는 공중보건학적으로 중요한 문제라고 할 수 있다.

본 연구 결과, 배합사료 내 항생제 첨가 금지 이전에는 82균주(56.9%)로 검출되었던 다제내성균이 금지 이후에는 292균주(88.5%)로 그 검출률이 크게 증가하였음을 확인하였다. 사용한 항생제의 종류가 다르기에 다제 내성률을 직접적으로 비교하기에는 무리가 있지만, 한국에서 금지 이후의 다제내성률은 덴마크의 가축 유래 대장균에서 보고한 돼지의 다제 내성률(25.0%)에 비해서 매우 높은 결과이다[26]. 국내에서 배합사료 내 항생제 첨가 금지 이후 돼지 대장균 감염증 등 세균성 질병이 급증하였는데[1], 이에 대처하기 위하여 질병 치료 목적의 항생제 사용량이 증가하였기 때문에 항생제 내성률 및 다제내성균의 출현이 증가한 것으로 추측된다[8]. 또한 아직 국내에서는 항생제 사용에 대한 규제가 선진국에 비해 엄격하지 못하기 때문에 수의사가 아닌 축산 관련 종사자 등 비전문가에 의한 항생제 사용이 많은 것도 이런 현상의 원인이 될 수 있다고 사료된다[8].

1983년도에 plasmid 매개에 의하여 ESBL 생성 균주가 독일에서 처음 보고된 이후[27], 대장균은 대표적인 ESBL 생성 균주로 전세계적으로 분리 및 보고되고 있다. ESBL 생성 균주의 출현으로 기존의 β-lactam계 항생제와 WHO에서 분류한 CIA 그룹 중 특히 cephalosporin 계열의 항생제가 무력화됨에 따라 양돈 농가의 치료 효과 감소뿐만 아니라 축산물 또는 축산환경을 통해 직간접적으로 사람에게 전달될 수 있다는 점에서 공중보건학적으로 중요한 문제점이 될 수 있다[8]. 양돈 농가 유래 병원성 대장균의 항생제 유전자의 검출률을 조사하였을 때(Table 6), 광범위 β-lactam계 항생제 저항 유전자 (ESBL) 중 *bla*TEM이 검출률 86.5% (410균주)로 가장 우세하게 검출되었다. *bla*TEM 유전자는 TEM은 그람 음성 세균에서 가장 흔하게 관찰되는 plasmid 매개 β-lactamase로, 대장균에서 ampicillin 내성의 90% 이상이 이 효소의 생성과 관련이 있다[28]. 또한 ampicillin 내성에 관련된 *Amp* 유전자의 배합사료 내 항생제 첨가 금지 이후 검출률이 51.5% (170균주)로 금지 전(36.1%, 52균주)에 비하여 검출률이 크게 증가하였는데, 이는 Table 4에서 나타낸 것처럼 ampicillin의 내성률이 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전 48.6% (70균주)에서 금지 후 68.2% (225균주)로 크게 증가하게 된 원인이 된 것으로 생각된다.

2016년 plasmid 매개 colistin 내성 유전자인 *mcr*-1이 중국에서 식육, 인체 및 돼지에서 최초로 발견, 보고된 이후로[29] 전세계적으로 *mcr*-1의 변형형인 *mcr*-2 및 *mcr*-3 유전자가 보고되고 있다[16]. 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전에는 *mcr* 유전자는 전혀 검출되지 않았지만, 금지 이후 *mcr*-1이 1.2% (4균주), *mcr*-3가 2.4% (8균주) 검출되었다 (Table 6). *Mcr* 유전자가 Plasmid 매개인 것을 고려할 때 colistin에 대한 항생제 내성률이 수평전파를 통하여 크게 증가할 것으로 예상된다. 국내외 연구결과 colistin에 대한 항생제 내성률은 높지 않은 것으로 보고되고 있는데[10,29,30], 본 연구에서는 배합사료 내 항생제 첨가 금지 이후 colistin에 대한 내성률이 5.6%에서 19.4%로 크게 증가하였음을 확인하였다(Table 4). Colistin은 aminoglycoside계 항생제와 함께 양돈 농가에서 높은 폐사율로 큰 문제를 일으키는 부종병의 치료제로 추천되는 약물이기 때문에 항생제의 신중한 사용 등 관리를 통하여 내성률 관리에 주의를 기울여야 할 필요성이 있는 것으로 보인다.

본 연구에서는 2007년부터 2018년까지 한국의 약 120개

의 양돈장에서 돼지 대장균증 증상을 보이는 돼지에서 분리한 병원성 대장균 474 균주를 대상으로 장내 상피세포 부착 인자와 독소 산생 유전자, 항생제 내성률 및 항생제 내성 유전자에 대해 분석함으로써 12년간에 걸친 한국 돼지 대장균증의 중요한 우점종의 병원성 인자 분석 및 항생제 내성 현황파악을 진행하였다. 이번 연구결과는 한국 양돈 농가에 심각한 경제적 피해를 입히는 돼지 대장균 설사증의 효과적인 치료 및 예방 전략 수립 이외에도 배합사료 내 항생제 첨가 금지가 병원성 대장균 병원성형 우점종 변화에 미치는 영향에 대하여 분석하는 데에 중요한 연구자료가 될 것으로 판단된다.

감사의 글

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림식품기술기획평가원의 농식품 기술융합 창의인재양성사업의 지원 (과제번호: 320005-4) 및 충북대학교 국립대학육성사업 (2019)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Do KH, Byun JW, Lee WK. Prevalence of O-serogroups, virulence genes, and F18 antigenic variants in *Escherichia coli* isolated from weaned piglets with diarrhea in Korea during 2008-2016. J Vet Sci 2019;20:43-50.
2. Fairbrother JM, Gyles CL. Colibacillosis. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (eds.). Diseases of Swine. 10th ed. pp.723-749. Wiley-Blackwell, Oxford, 2012.
3. Do KH, Byun JW, Lee WK. Antimicrobial resistance of Stx2e positive *Escherichia coli* before and after ban on antibiotic growth promoters. J Biomed Transl Res 2017;18:84-92.
4. Luppi A, Gibellini M, Gin T, Vangroenweghe F, Vandenbroucke V, Bauerfeind R, Bonilauri P, Labarque G, Hidalgo Á. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. Porcine Health Manag 2016;2:20.
5. Luppi A. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. Porcine Health Manag 2017;3:16.
6. Cameron-Veas K, Moreno MA, Fraile L, Migura-Garcia L. Shedding of cephalosporin resistant *Escherichia coli* in pigs from conventional farms after early treatment with antimicrobials. Vet J 2016;211:21-25.
7. de la Torre E, Colello R, Fernández D, Etcheverría A, Di Conza J, Gutkind GO, Tapia MO, Dieguez SN, Soraci AL, Padola NL. Multidrug resistance in *Escherichia coli* carrying integrons isolated from a pig farm with moderate antibiotic use. J Gen Appl Microbiol 2015;61:270-273.
8. Lim SK, Byun JR, Lee HS, Moon DC, Jang GC, Jung SC. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated from pigs and their farm environment in Korea. J Prev Vet Med 2014;38:61-68.
9. Diana A, Manzanilla EG, Calderón Díaz JA, Leonard FC, Boyle LA. Do weaner pigs need in-feed antibiotics to ensure good health and welfare? PLoS One 2017;12:e0185622.
10. Animal and Plant Quarantine Agency. Establishment of Antimicrobial Resistance Surveillance System for Livestock 2018. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Sejong, 2019.
11. Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. Vet Microbiol 2007;123:145-152.
12. Do KH, Byun JW, Lee WK. Serogroups, virulence genes and antimicrobial resistance of F4+ and F18+ *Escherichia coli* isolated from weaned piglets. Pak Vet J 2019;39:266-270.
13. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1966;45:493-496.
14. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β-lactamases in Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother 2010;65:490-495.
15. Chung HS, Lee H, Lee Y, Yong D, Jeong SH, Lee BK, Jung SC, Lim SK, Lee K, Chong Y. A Korean nationwide surveillance study for non-typhoidal *Salmonella* isolated in humans and food animals from 2006 to 2008: extended-spectrum β-Lactamase, plasmid-mediated ampC β-lactamase, and plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes. Korean J Clin Microbiol 2012;15:14-19.
16. Do KH, Park HE, Byun JW, Lee WK. Virulence and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* encoding *mcr* gene from diarrhoeic weaned piglets in Korea during 2007-2016. J Glob Antimicrob Resist 2020;20:324-327.
17. Rayamajhi N, Kang SG, Lee DY, Kang ML, Lee SI, Park KY, Lee HS, Yoo HS. Characterization of TEM-, SHV- and AmpC-type β-lactamases from cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae isolated from swine. Int J Food Microbiol 2008;124:183-187.
18. Xu G, An W, Wang H, Zhang X. Prevalence and characteristics of extended-spectrum β-lactamase genes in Escherichia coli isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang province, China. Front Microbiol 2015;6:1103.
19. Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. Acta Vet Scand 2017;59:31.
20. Kusumoto M, Hikoda Y, Fujii Y, Murata M, Miyoshi H, Ogura Y, Gotoh Y, Iwata T, Hayashi T, Akiba M. Emergence of a multidrug-resistant shiga toxin-producing enterotoxigenic *Escherichia coli* Lineage in diseased swine in Japan. J Clin Microbiol 2016;54:1074-1081.
21. Duan Q, Yao F, Zhu G. Major virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* in pigs. Ann Microbiol 2012; 62:7-14.
22. Niewerth U, Frey A, Voss T, Le Bouguénec C, Baljer G, Franke S, Schmidt MA. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8:143-149.
23. Leclerc S, Boerlin P, Gyles C, Dubreuil JD, Mourez M, Fairbrother JM, Harel J. paa, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. Res Microbiol 2007;158:97-104.
24. Kennedy CA, Walsh C, Karczmarczyk M, O'Brien S, Akasheh N, Quirke M, Farrell-Ward S, Buckley T, Fogherty U,

Kavanagh K, Parker CT, Sweeney T, Fanning S. Multi-drug resistant *Escherichia coli* in diarrhoeagenic foals: Pulsotyping, phylotyping, serotyping, antibiotic resistance and virulence profiling. Vet Microbiol 2018;223:144-152.
25. WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. World Health Organization, Geneva, 2017.
26. DANMAP. Use of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Bacteria from Food Animals, Food and Humans in Denmark. DANMAP, Copenhagen, 2019.
27. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983;11:315-317.
28. Yang F, Zhang K, Zhi S, Li J, Tian X, Gu Y, Zhou J. High prevalence and dissemination of β-lactamase genes in swine farms in northern China. Sci Total Environ 2019;651:2507-2513.
29. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 2016;16:161-168.
30. Government of Canada. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2016. Public Health Agency of Canada, Guelph, 2019.