J. Fd Hyg. Safety
Vol. 22, No. 2, pp. 116~119 (2007)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

eae+ *Escherichia coli*의 항생제 감수성 및 내성 패턴

이민화 · 최창순*
중앙대학교 생활과학대학 식품영양학과

Antimicrobial Resistance Profiles of *eae Positive Escherichia coli*

Min Hwa Lee and Changsun Choi*
Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Chung-Ang University
(Received June 1, 2007/Accepted June 15, 2007)

ABSTRACT – The antimicrobial susceptibility and antibiotic resistance patterns of 67 *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from pigs were investigated by disc diffusion method. Sixty-seven *E. coli* isolated from pigs showed susceptibility to Ceftiofur (98.5%), Lincomycin+Spectinomycin (74.6%), Danofloxacin (73.1%), Enrofloxacin (64.2%), and Neomycin (41.8%). However, the multiple resistance patterns were also seen in *eae*+ *E. coli isolates*. Neomycin+Tylosin+Penicillin+Tetracycline, Tylosin+Penicillin+Tetracycline, and Neomycin+Tylosin+Danofloxacin+Penicillin+Tetracycline+Enrofloxacin were the most prevalent patterns of multiple antibiotic resistance.

Key words: *Escherichia coli*, *eae* gene, Antimicrobial resistance, Antibiotics

서 론

식중독을 일으키는 주요한 병원체인 대장균은 병원성을 일으키는 독소의 존재 여부 및 감염 패턴에 따라서 크게 Enterotoxigenic *Escherichia coli*(ETEC), Enteropathogenic *Escherichia coli*(EPEC), Enterohemorrhagic *Escherichia coli*(EPEC), Enteroaggregative *Escherichia coli*(EAEC), Enteroinvasive *Escherichia coli*(EIEC), Diffusely adherent *Escherichia coli*(DAEC)로 분류된다. 이렇게 다양한 분류체계를 가지는 대장균이 가지는 병원성 인자에 대한 연구가 지속적으로 수행되어오고 있으며, 새로운 병원성 인자 및 독소가 속속 보고되고 있다[1].

장 상피세포(enterocyte) 표면에 부착하여 brush border를 손상시키는 병인론을 특징으로 하는 장병원성 대장균(EPEC)에 대한 연구에서 *eae* 유전자의 존재가 처음 발견된 이후 많은 후속 연구가 진행되었다. Locus of enterocyte effacement(LEE)에 위치하는 *eae*는 현재까지 14개의 subtype(α-1, α-2, β, γ, ε, ζ, η, θ, ι, κ, λ, μ, ν, ζ)이 발견되었으며, 그 중에서도 β형이 가장 빈번하게 검출되는 것으로 알려져 있다[2-4].

*Correspondence to: Changsun Choi, D.V.M., Ph.D., Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Chung-Ang University, 72-1 Nae-ri, Daeduk-myun, Ansung-si, Kyounggi-do, Korea
Tel: 82-31-670-4589, Fax: 82-310-676-8741
E-mail: cchoi@cau.ac.kr

eae 유전자에 의하여 생성되는 intimin은 장병원성 대장균(EPEC)의 장 상피세포 부착을 유도할 뿐만 아니라, 미세융모의 위축, 가교형성, 극성 액틴 및 박테리아 부착 부위에 대한 세포골격 인자의 응축을 일으킴으로써 특징적인 attaching and effacing(A/E) 병변을 형성하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 이유로 장병원성 대장균을 attaching and effacing *E. coli*(AEEC)라고도 부른다[1,5].

최근 몇몇 연구팀들은 *eae* 유전자가 장병원성 대장균(EPEC)에 뿐만 아니라 장출혈을 특징으로 하는 장출혈성 대장균(EHEC)과의 상관성이 높은 것으로 보고하였다. 장출혈성 대장균(EHEC)은 Shiga toxin을 생성하는 특징이 있어 Shiga-toxin producing *E. coli*(STEC)으로 명명되기도 하며, 생성된 Shiga toxin이 Vero cell에 독성을 나타내므로 Verocytoxin-producing *E. coli*(VTEC)으로 불리기도 한다. 장출혈성 대장균(EHEC) 중에서 특히 *E. coli* O157:H7은 소고기, apple cider등 다양한 원인 식품에 의한 대규모 발병을 일으켰으며, 특히 면역력이 약한 노인이나 어린이에게 용혈성 요독 증후군(Hemolytic Uremia Syndrome; HUS)과 혈소판 감소성 자반병(Thrombocytopenic Purpura)으로 인한 치명적 손상을 일으키는 임상적 특징이 있다[1].

개발도상국가의 유아 설사병을 일으키는 주요 병원체인 장병원성 대장균(EPEC)은 항생제를 이용한 치료가 어려운 특징이 있다. 또한 *E. coli* O157:H7에 오염된 소고기에 의하여 감염되는 장출혈성 대장균은 선진국, 개발도상국에 상관없이 발생하며, EPEC과 같이 항생제 치료가 잘

되지 않기 때문에 공중보건학적 중요성이 부각된다[1, 5]. 해외뿐 아니라 국내에서도 *eae*+ *E. coli*에 의한 요로감염과 뇌수막염이 신생아에게서 발생한 바 있으나, 이러한 분리주에 대한 항생제 내성 및 감수성에 대한 자료는 보고되지 못 하였다[2,5]. 따라서 본 연구에서는 돼지로부터 분리한 *eae*+ *E. coli*를 대상으로 항생제 감수성 검사를 수행함으로써 항생제 감수성 및 내성 패턴을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

시험균주

소화기 질환을 보이는 돼지의 장 내용물로부터 분리 동정된 대장균 분리주 2000개를 확보하였으며, attaching and effacing (*eae*) 유전자를 보유하고 있는 대장균 67개를 선발하였다. 검사에 사용된 균주의 *eae* 유전자 보유 여부는 Ha 등이 보고한 중합효소 연쇄 반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 이용하여 확인하였다[6].

항생제 디스크

항생제 감수성 검사에 사용된 약제들은 주로 돼지 소화기 질환 치료에 자주 사용되는 약제 중에서 8종을 선정하였다. Penicillin(10 IU/Unit; Beckton-Dickinson(BD), Sparks, MD, U.S.A.), Tetracycline(30 μg/unit; BD; Sparks, MD, U.S.A.), quinolone계 항생제인 Danofloxacin(5 μg/unit; Difco, Detroit, MI, U.S.A.)과 Enrofloxacin(5 μg/unit; Bayer, England, UK)을 구매하여 사용하였다. 또한 Ceftiofur, Neomycin, Tylosin, Linsmycin(Lincomycin + Spectinomycin)에 대한 항생제 디스크는 (주) 동방(서울, 대한민국)으로부터 제공받아 실험에 사용하였다.

항생제 감수성 시험

eae 유전자를 보유한 대장균 분리주에 대한 항생제 감수성 시험은 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)의 disc diffusion method에 준하여 실시하였다[7]. MacConkey agar에서 배양된 특징적인 대장균 분리주 집락을 Tryptic Soy Broth(TSB; Difco, Sparks, MD, U.S.A.)에 접종하고 37°C incubator에서 24시간 진탕 배양하여 접종액을 준비하였다. 접종액의 균농도를 희석하여 Mueller-Hinton Agar (MH; Difco, Sparks, MD, U.S.A.)에 고르게 도말 접종하였다. 접종액을 도말 후 15분 이내에 항생제 디스크를 Dispenser를 이용하여 적용하고, 배양기에서 37°C 18시간 배양 후 균 억제대의 크기를 관찰하여 NCCLS의 기준에 따라 내성 여부를 판정하였다.

결과 및 고찰

약제별 감수성 조사

eae 유전자를 가진 *E. coli* 분리주 67개에 대한 항생제 감수성 시험 결과는 Table 1과 같다. 검사에 사용된 8종의 항생제 중에서 *eae*+ *E. coli* 분리주 50% 이상이 감수성을 나타내는 항생제는 4종이었다. 총 67개 *eae*+ *E. coli* 중에서 Ceftiofur sodium(Cef)은 66개(98.5%) 분리주에 대하여 강력한 억제 효과를 가지는 것으로 조사되었으며, Linsmycin(Li), Danofloxacin(DFX), Enrofloxacin(ENR)에 대하여 각각 50개(74.6%), 49개(73.1%), 43개(64.2%) 분리주에 대하여 억제 효과가 관찰되었다. Neomycin(Ne)은 67개 분리주 중에서 28개(41.8%) 분리주에 대하여 억제 효과를 나타내었다. Tylosin(Ty), Tetracycline(TE), Penicillin (P10)은 *eae*+ *E. coli* 분리주 67개 모두에서 감수성이 없는 것으로 조사되었다.

소의 대장균 감염증 치료에 주로 사용되어온 Ceftiofur가 소에서 분리된 *eae*+ *Escherichia coli* 분리주에 대하여 감수성이 높은 것으로 Holland 등이 보고한 바 있다[8]. 그러나 돼지의 대장균 설사증 치료에도 사용되기 시작한 Ceftiofur에 대한 감수성 검사결과는 보고된 바가 없었다. 본 연구에 사용된 *eae*+ *Escherichia coli* 분리주의 98.5%가 Ceftiofur에 대한 감수성을 나타내고, 내성균 출현율이 현저히 낮았는데, 이는 돼지 대장균 감염증 치료에 사용된 Ceftiofur 사용량이 기존에 사용된 항생제에 비하여 적고, 기간도 짧아 항생제 내성의 출현이 현저히 낮은 것으로 보인다. 이러한 자료에 근거하여 Ceftiofur가 *eae*+ *Escherichia coli* 감염증 치료에 유용하게 활용될 수 있는 약제로 사료되며, 후속 연구를 통하여 이 약제에 대한 내성 출현여부에 대한 감시와 내성기전 연구가 필요할 것으로 생각된다.

소화기 질환 치료에 많이 쓰이는 Tylosin, Tetracycline, Penicillin은 *eae* 유전자를 가진 대장균 분리주 67개 모두에서 감수성이 없는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과에 따르면 돼지 *eae*+ *Escherichia coli* 의 감염 치료가 어려움을 알 수 있다. 따라서 *eae*+ *Escherichia coli* 감염증

Table 1. Antimicrobial susceptibility of *eae*+ *Escherichia coli*

Antibiotics*	P10	TE	Ne	Li	Ty	ENR	DFX	Cef
No. of susceptible isolates	0 (0%)	0 (0%)	28 (41.8%)	50 (74.6%)	0 (0%)	43 (64.2%)	49 (73.1%)	66 (98.5%)

*P10, Penicillin; TE, Tetracycline; Ne, Neomycin; Li, Lincomycin+Spectinomycin; Ty, Tylosin; ENR, Enrofloxacin; DFX, Danofloxacin; Cef, Ceftiofur sodium.

에 대한 약제의 선정에 특히 주의할 필요가 있을 것을 사료된다. 선행 연구결과를 보면 tetracycline, penicillin과 같이 사료 첨가제로서 오랫동안 사용되어온 약제는 대장균, 살모넬라와 같은 소화기 병원성 세균에 대하여 내성률이 높은 것으로 보고되고 있어 공중보건학적 측면에서 예방이 중요하며, 내성균 출현에 대한 추적조사를 수행할 필요가 있다[8-10]. 도축장 정육으로부터 대장균을 분리하여 항생제 내성을 조사한 송 등은 항생제 첨가된 사료로 사육된 가축에서 tetracycline의 내성이 높게 나타나며, 항생제 사용이 중단된 경우라도 일단 획득한 내성은 장기간 지속되는 것으로 보고하였다[9].

억제대별 항생제 감수성

각각의 항생제에 대한 효능은 disc diffusion test에서 나타난 세균 억제대 직경을 측정함으로써 감수성(susceptible, S), 중증도 감수성(intermediate, I), 내성(resistant, R)으로 판정하였다. 그 결과는 Table 2와 같다. Ceftiofur sodium (Cef)은 62개 분리주에서 감수성을 나타내었고, 4개 분리주에서 중증도의 감수성을 나타내었다. 퀴놀론계 항생제인 Danofloxacin(DFX)과 Enrofloxacin(ENR)의 경우 각각 40개, 34개 분리주가 감수성을 나타내었고, 각각 9개의 분리주가 중증도의 감수성을 나타내었다. Linsmycin(Li; Lincomycin + spectinomycin)과 Neomycin(Ne)은 각각 50개, 28개 분리주가 감수성을 나타내었으며, 중증도 감수성을 나타내는 균주는 없었다.

von Muffling 등이 돼지와 소에서 분리된 대장균에 대한 항생제 감수성 결과는 본 연구 결과와 유사한 양상을 나타내었으나, Enrofloxacin, Gentamicin, Cephalothin 이 100% 감수성을 나타내었다[10]. 또한 이 등은 닭 분변 유래의 대장균을 대상으로 항생제 내성패턴을 조사하였는데, Enrofloxacin에 관한 내성과 중간내성이 각각 59.2%, 13.6%로 조사되었다[11]. 본 연구에서는 돼지 유래 *eae*+ *Escherichia coli*가 Enrofloxacin에 대한 감수성이 64%로써 이 등의 연구 결과와 유사한 양상을 관찰할 수 있었다. 본 연구에 사용된 항생제에 비하여 Enrofloxacin과 Danofloxacin은 내성을 나타내는 비율이 낮았으나, 항생제 내성을 보이는 분리주의 출현은 이러한 병원체 감염을 치료하는데 장애물로 작용할 것이다.

Table 2. Antibiotic susceptibility of *eae*+ *E. coli* based on inhibitory zone diameter.

Antibiotics	Number of isolates		
	Susceptible (S)	Intermediate (I)	Resistant (R)
Ceftiofur	62 (92.5%)	4 (6.0%)	1 (1.5%)
Lincomycin + Spectinomycin	50 (74.6%)	-	17 (25.4%)
Danofloxacin	40 (59.7%)	9 (13.4%)	18 (26.9%)
Enrofloxacin	34 (50.8%)	9 (13.4%)	24 (35.8%)
Neomycin	28 (41.8%)	-	39 (58.2%)
Penicillin	0 (0%)	0 (0%)	67 (100%)
Tetracycline	0 (0%)	0 (0%)	67 (100%)
Tylosin	0 (0%)	0 (0%)	67 (100%)

항생제 내성 유형 분석

*eae*유전자를 가진 *E. coli*의 항생제 내성 유형은 Table 3과 같다. 항생제 내성의 유형은 총 12개의 유형으로 분류되었으며, 최소 3개부터 최대 7개 약제에 대하여 내성을 보이는 Multi-drug resistance pattern을 가지는 것으로 조사되었다. Neomycin + Tylosin + Penicillin + Tetracycline 내성형이 18개(27%) 분리주에서 관찰되는 대표적인 다제 내성형 이었다. Tylosin + Penicillin + Tetracycline 3제 내성형이 16주(24%), Neomycin + Tylosin + Danofloxacin + Penicillin + Tetracycline + Enrofloxacin 6제 내성형이 8주(11.9%), Neomycin + Linsmycin + Tylosin + Danofloxacin + Penicillin + Tetracycline + Enrofloxacin 7제 내성형이 6주(8.96%), Linsmycin + Tylosin + Penicillin + Tetracycline 4제 내성형이 5주(7.46%), Neomycin + Linsmycin + Tylosin + Penicillin + Tetracycline 5제 내성형이 4주(5.97%) 등의 순으로 나타났다.

돼지도체에서 분리한 대장균을 대상으로 한 송 등의 결과에 의하면 Ampicillin + Streptomysin + Tetracycline 3제 내성형이 가장 많았고, Ampicillin + Streptomysin + Sulfamethoxazole + Tetracycline 4제 내성형과 Tetracycline 단제 내성형이 많은 것으로 나타났고, 또한 닭 도체에서 분리된 *E. coli*의 항생제 내성양상에서도 Tetracycline 단제 내성형이 16.3%로 가장 많은 것으로 나타났다[9]. 또한

Table 3. Multi-drug resistant profiles of *eae*+ *E. coli* isolates.

No. of Antibiotics	Antibiotic resistant patterns*	No. of isolates
3	Ty + P10 + TE	16 (23.9%)
4	Ne + Ty + P10 + TE	18 (26.9%)
	Li + Ty + P10 + TE	5 (7.5%)
	Ty + DFX + P10 + TE	2 (3.0%)
	Ty + P10 + TE + ENR	1 (1.5%)
5	Ne + Li + Ty + P10 + TE	4 (6.0%)
	Ne + Ty + DFX + P10 + TE	3 (4.5%)
	Ty + DFX + P10 + TE + ENR	2 (3.0%)
6	Ne + Ty + DFX + P10 + TE + ENR	8 (11.9%)
	Ty + DFX + P10 + TE + ENR + Cef	1 (1.5%)
	Ne + Li + Ty + P10 + TE + ENR	1 (1.5%)
7	Ne + Li + Ty + DFX + P10 + TE + ENR	6 (8.9%)
Total	12 patterns	67 (100%)

* P10, Penicillin; TE, Tetracycline; Ne, Neomycin; Li, Lincomycin+Spectinomycin; Ty, Tylosin; ENR, Enrofloxacin; DFX, Danofloxacin; Cef, Ceftiofur sodium.

이 등은 수산물에서 분리한 대장균을 대상으로 한 연구에서 Penicillin, Tetracycline, Neomycin에 대한 항생제 내성이 각각 100, 21.6, 6.1%라고 발표하였다[12]. 본 연구에 사용된 *eae*+ 대장균이 Penicillin, Tetracycline, Tylosin에 대하여 100%의 내성을 나타냄으로써 항생제 내성인자의 전이가 더욱 활발한 것으로 추정된다.

본 연구에서 얻은 결과는 돼지에서 문제시되는 대장균 감염증 중에서 특히 *eae* 유전자를 가진 대장균 감염증 치료에 적합한 항생제 선택을 위한 자료가 될 것이며, 현재 식품 및 축산분야에서 문제시되는 장 병원성 대장균 제어에 필요한 정보를 제공할 수 있다고 사료된다. 또한 본 연구에 따르면 *eae*+ *E. coli*가 항생제에 대한 내성률이 매우 높으므로 내성기전 획득에 관한 분자생물학적 연구가 병행되어야 할 것이다.

요 약

돼지로부터 분리한 *eae*+ *Escherichia coli* 67주에 대한 항생제 감수성 시험 결과, Ne에 41.8%, Li에 74.6%, DFX에 73.1%, ENR에 64.2%, Cef에 98.5%의 감수성을 나타내었다. 총 8종의 항생제에 대한 *E. coli* 의 내성패턴을 분석하였을 때 12가지 내성 패턴을 나타내었으며, 그 중 4제, 3 제 및 6제에 각각 26주(39%), 16 주(24%), 10주(14.9%)로 높았으며, 7종 항생제에 대해 내성을 나타내는 균주도 6주(8.9%)가 확인되었다.

본 실험에 의하면 최근에 사용되기 시작한 항생제의 경우 항생제 내성의 출현이 활발하지 않았으며, 지속적으로 노출된 항생제에 대해서는 감수성이 현저히 낮은 것으로 나타났다. Penicillin, Tetracycline, Neomycin은 본 실험에서 100%의 내성을 나타내며 돈육에서 분리되는 대장균간에 내성 전이가 활발한 것으로 추정되었다.

감사의 말씀

본 연구는 2006년도 중앙대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Nataro J.P., Kaper J.B., Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 142-201 (1998).
2. Jenkins C., Lawson A.J., Cheasty T., Willshaw G.A., Wright P., Dougan G., Frankel G., Smith H.R. Subtyping intimin genes from enteropathogenic *Escherichia coli* associated with outbreaks and sporadic cases in the United Kingdom and Eire. *Mol. Cell. Probes*. **17:** 149-156 (2003).
3. Krause G., Zimmermann S., Beutin L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin-(eae) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet. Microbiol.* **106**: 87-95 (2005).
4. Ramachandran V., Brett K., Hornitzky M.A., Dowton M., Bettelheim K.A., Walker M.J., Djordjevic S.P. Distribution of Intimin Subtype among Escherichia coli Isolates from Ruminant and Human Sources. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 5022-5032 (2003).
5. 이은정, 문지영, 김영부. 신생아에서 분리된 *eae* 유전자 양성 병원성 대장균의 세포 부착성 및 유전자형. *J. Bacteriol. Virol.* **35**: 11-21 (2005).
6. Ha SK, Hong K, Choi C, Jung K, Ha Y, Kim J, Kim SH, Yoon B, Chae C. Polymerase chain reaction analysis of eae gene subtypes present in attaching and effacing Escherichia coli isolated from pigs with diarrhea. *J. Vet. Diagn. Invest.* **16**: 576-578 (2004).
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically; Approved standard. 5ed. M7-A5. (2000).
8. Holland R.E., Wilson R.A., Holland M.S., Yuzbasiyan-Gurkan V., Mullaney T.P., White D.G., Characterization of *eae*+ *Escherichia coli* isolated from healthy and diarrheic calves. *Vet. Microbiol.* **66**: 251-263 (1999).
9. 송시욱, 정석찬, 김성일, 정명은, 김계희, 이지연, 임숙경, 이영주, 조남인, 박종명, 박용호. 2003년도 국내 도축장에서 분리한 세균의 항생제 감수성 조사, 1. 도축장의 식육으로부터 분리한 E. coli의 항생제 감수성. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth*. **28**: 215-221 (2004).
10. von Muffling T., Smaijlovic M., Nowak B., Sammet K., Bulte M., Klein G. Preliminary study of certain serotypes, genetic and antimicrobial resistance profiles of verotoxigenic Escherichia coli (VTEC) isolated in Bosnia and Germany from cattle or pigs and their products. *Int. J. Food Microbiol.* **117**: 185-191 (2007).
11. 이영주, 김애란, 정석찬, 송시욱, 김재홍. 닭 분변 유래 E. coli 및 Salmonella spp.의 항생제 내성패턴. *Kor. J. Vet. Res* **45**: 75-83 (2005).
12. 이재인, 한기영, 박홍현. 수산물에서 분리한 대장균의 분리특성 및 항생제 감수성. *Kor. J. Food Nutr.* **16**: 111-115 (2003).