

## 부산지역 설사환자에서 분리한 병원성대장균 특성 및 유전자형 분석

박혜영·박연경<sup>†</sup>·박은희·박선희·황인영·성경혜·이미옥·김기곤  
미생물과

### Characterization and Genotyping Investigation of Diarrheogenic *E. coli* Isolated from Diarrhea Patients in Busan

Park Hye-young, Park Yon-koung<sup>†</sup>, Park Eun-hee, Park Sun-hee,  
Hwang In-yeong, Sung Gyung-hye and Lee Mi-ok

Microbiology Division

#### Abstracts

We isolated the diarrheogenic *E. coli* from patients with food-borne diseases during 2010 - 2013 in Busan, South Korea.

A total of 144 isolates were characterized by pathogenicity typing. Among them, 115 isolates were tested by serotyping, antimicrobial susceptibility tests and PFGE in addition.

By serotyping, the 100 isolates were identified by 17 kinds of O serotype, and 71 isolates were identified by O and H sera. The predominant serotypes were O6:H16, O152:H10, O169:H41 and O1:H12 in order. By pathogenicity typing, ETEC(87 isolates) was the most prevalent, followed by the EPEC(51 isolates) and, EHEC(6 isolates). By antimicrobial susceptibility tests, 26 strains(48.38 %) of outbreak isolates were susceptible to all of the 17 antimicrobial agent used in this study, and 60 strains(10.3 %) were resistant to only one antimicrobial agent, tetracycline. 41.4 %(12 strains) of cooperation hospital isolates were resistant to two or more agent, showing multi drug resistance and the isolates resistant to the 8 antibiotics were 1 strain. The study of genetic diversity, carried out by PFGE, revealed 36 distinct restriction profiles clustered in 12 distinct groups. Diarrheogenic *E. coli* showed the diversity in genotyping, pathotyping and serotyping. PFGE is considered a adapted method in epidemiological studies of *E. coli*.

**Key words** : Diarrheogenic *E. coli*, Serotyping, Pathotyping, PFGE, Antibiotics resistance

## 서론

사람을 포함한 포유류의 장관에 존재하는 정상 세균총인 대장균(*Escherichia coli*)은 통성혐기성 균으로 편모를 가지고 있으며 분변을 통해서 외부 환경으로 방출되기 때문에 음용수나 식품의 위생적인 처리를 확인하기 위한 검사지표로써 유용하게

사용되고 있다<sup>1,2)</sup>. 위생지표로만 인식되던 대장균이 1940년대 중반 영국의 한 유아원에서 발생한 집단설사의 원인균(Enteropathogenic *E. coli*, EPEC)으로 알려지기 시작하면서 1960년대부터 현재까지 기전에 따라 EIEC(Enteroinvasive *E. coli*), ETEC(Enterotoxigenic *E. coli*), EHEC(Enterohemorrhagic *E. coli*), EAEC(Enteraggregative *E. coli*) 총 5종

<sup>†</sup> Corresponding author. E-mail : akacia@korea.kr  
Tel : +82-51-309-2822, Fax : 82-51-309-2829

류의 병원성대장균이 알려져 있다<sup>3,4)</sup>. 이런 병원성대장균은 주로 설사증, 성인의 위장염, 식중독 등과 같은 장관계 질환을 유발하고 요로 감염증, 복막염, 패혈증 및 수막염 등과 같은 질환도 야기하는데, 이와 같은 증상은 대장균의 병원성과 밀접한 관계가 있다<sup>5)</sup>.

특히, 전 세계적으로 병원성대장균이 식품매개질환으로 주목을 받기 시작한 것은 1982년 미국 오레곤주와 미시건주에서 O157:H7 EHEC에 오염된 햄버거 섭취로 발생한 집단발생<sup>6)</sup> 이후이며 우리나라에서도 2003년 광주에서 EHEC O157에 의한 집단 설사질환 발생으로 인해 병원성대장균에 대한 관심이 커지게 되었다<sup>7)</sup>.

현재 우리나라에서는 EHEC의 경우 증상의 심각성으로 인해 식중독과 달리 제1군감염병으로 지정하여 국가에서 관리하고 있으며 그 외 병원성대장균은 지정감염병으로 지정(EAEC 제외)하여 식중독의 범주에서 관리되고 있다. 1944년 Kauffman가 대장균의 혈청학적 분류법을 발표한 이후, 지금까지 180종 이상의 균체(somatic, O) 항원과 90여종의 캡슐(capsule, K) 항원 그리고 56종 이상의 편모(flagellar, H)항원이 밝혀졌고<sup>8)</sup>, 병원성대장균은 이 항원들의 조합으로 혈청형을 분류해왔다. 그러나 이런 혈청형을 이용한 방법은 너무 많은 시간과 비용을 요구하며 새로운 혈청형 조합이 계속 확인되고 있으며 기존에 분류되었던 혈청형들 또한 다른 병원성 특징들을 나타내기도 하여(동일한 혈청형에서 서로 다른 증상과 병원성인자들이 확인) PCR에 의한 유전자 확인을 통해 병원성대장균을 확인하는 것이 더 효율적이고 효과적인 방법으로 인식되고 있다. 대표적으로 2011년 독일에서 3,368명 환자와 36명의 사망자를 유발한 역사적으로 2번째로 큰 대장균에 의한 집단발병 건으로 기록된 O104:H4 EHEC를 들 수 있다. 원인 병원체인 대장

균 O104:H4는 EHEC로 집단 발병은 물론이고 사람에서도 분리된 적이 없던 혈청형이었다<sup>9)</sup>.

식약처 발표(2009년 - 2012년)에 따르면 우리나라에서 발생하는 주요 식중독원인 병원체는 노로바이러스와 병원성대장균이었으며, 이들 병원체에 의한 4년 동안의 발생건수는 노로바이러스 144건, 병원성대장균 128건으로 노로바이러스에 의한 발생이 12 % 정도 많았으나, 발생된 환자수는 병원성대장균이 7,550명, 노로바이러스가 5,751명으로 병원성대장균이 노로바이러스 보다 약 31 % 많아 병원성대장균에 의한 식중독 발생이 더 대규모로 일어남을 알 수 있다<sup>10)</sup>.

이에 본 연구에서는 식중독의 주요 원인병원체인 병원성대장균의 특징을 확인하기 위하여 2010년 - 2013년 부산시내 6개 협력병원을 내원한 설사환자 및 집단식중독 환자의 가검물에서 대장균을 분리, PCR을 통해 병원성대장균을 확인한 후 혈청형 및 항생제 감수성 검사를 실시하여 그 실태를 분석하고, 이들 균에 대한 PFGE를 실시하여 균주 간 유사성을 조사한 후 혈청형, 병원성인자, 항생제 내성과 균주 간 연관성에 대해서도 분석하여 균종의 유행양상과 역학적 측면에서 이들 방법의 유용성을 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시용균주

2010년 - 2012년 부산시내 6개 협력병원에 내원한 설사환자 및 2011년 - 2013년 관내 집단식중독 의심환자 가검물에서 분리한 병원성대장균을 대상으로 하였다.

### 균 분리 및 배양

설사환자의 분변을 MacConky agar(Difco, USA)

에 직접 도말하여 37 °C에서 24시간 배양하였다. 전형적인 분홍색 집락을 선별하여 Kligler Iron Agar(KIA, Difco, USA)에 접종한 후 사면부와 고층부 모두 노란색이며 가스 생성 균을 대장균으로 추정하였다. 추정된 집락은 Tryptic soy agar(TSA, Oxoid, UK)에 도말하여 37 °C에서 24시간 배양하여 순수 분리하였다. 순수 분리된 균의 생화학적 동정은 Vitek II compact(BioMerieux, France) 장비를 사용하여 대장균임을 최종 확인하였다<sup>11)</sup>.

분리된 모든 균주는 10 % glycerol을 넣은 Tryptic soy broth(TSB, Oxoid, UK)에 접종하여 -70 °C에서 보관하였다.

#### 병원성유전자 검출(PCR)

분리된 대장균의 병원성은 multiplex PCR을 통한 병원성 유전자의 검출 여부로 확인하였다. 순수 분리된 대장균을 멸균 증류수 500 µL에 부유시키고 100 °C에 20분간 끓인 후, 14,000 g에 5분간 원심분리한 후 상층액을 PCR template로 사용하였다. 사용한 병원성 유전자는 총 7종 이며, EHEC는 *st1*, *st2*; EPEC는 *eaeA*, *bfpA*; ETEC *lt*, *st*; EIEC는 *spa*, Pathogenic *E. coli* Detection Kit(GeNnet bio, Korea)를 사용하였다. 95 °C 10분 1회, 95 °C

30초, 60 °C 20초, 72 °C 1분 35회, 72 °C 5분의 조건으로 PCR을 수행하였다. 결과는 1.5 % agarose gel에 PCR 산물 5 µL씩 loading하여 100V에 30분간 전기영동하였다. 양성 대조물질은 ETEC strain NCCP 14039, EPEC strain NCCP 14038의 DNA를 사용하였다.

#### 혈청형 분석

병원성대장균으로 확인된 균주에 대한 혈청형 확인은 국립보건연구원에서 공급받은 항혈청과 DENKA SEIKEN(Japan)사의 대장균 항혈청을 사용하였다 (Table 1).

O 혈청형 확인은 평판 슬라이드 응집법을 이용했으며, TSA에 순수 분리된 대장균을 1 mL saline (0.85 %)에 현탁하여 100 °C에서 1시간 가열하고 900 g에서 20분간 원심분리한 후, 상층액을 버리고 펠렛을 300 µL saline에 부유시켜 O 혈청형 확인을 위한 균액으로 사용하였다. 슬라이드 글라스에 균액과 항혈청을 혼합하여 30초 이내에 응집을 일으키는 혈청을 O 혈청형으로 결정하였다. 자가응집 여부 확인을 위한 대조균은 항혈청 대신 saline을 사용하여 확인하였다.

H항원은 시험관응집법으로 실시하였으며, Motility

**Table 1.** O and H antisera for determination of serotype

Supplier	Polyvalent sera	Monovalent sera
DENKA SEIKEN	Polyvalent 1	O1, O26, O86a, O111, O119, O127a, O128
	Polyvalent 2	O44, O55, O125, O126, O146, O166
	Polyvalent 3	O18, O114, O142, O151, O157, O158
	Polyvalent 4	O6, O27, O78, O148, O159, O168
	Polyvalent 5	O20, O25, O63, O153, O167
	Polyvalent 6	O8, O15, O115, O169
	Polyvalent 7	O28ac, O112ac, O124, O136, O144
	Polyvalent 8	O29, O143, O152, O164
KNIH		H2, H4, H5, H6, H7, H9, H10, H11, H12, H16, H18, H19, H20, H21, H27, H28, H34, H40, H41, H42, H45, H51
		O3, O12, O21, O39, O91, O99, O103, O104, O115, O120

GI(Oxoid, UK)에 천자 접종하여 37 °C에서 16 - 18시간 배양한 후 배지의 윗 부분을 루프를 이용하여 버리고 아래로 자라 내려간 대장균을 Motility GI에 2번 계대 배양 한 후 충분히 자란 대장균을 Veal Infusion Broth(VIB, Difco, USA)에 접종하여 37 °C에서 20시간 배양한 후 0.6 % formalin saline 동량을 배양액에 넣어 30분 동안 균을 고정시키고 각 각의 균주에 대해 22종의 항혈청을 각각의 시험관에 3방울씩 떨어뜨린 후 고정된 항원액 0.5 mL를 가하여 50 °C 항온수조에서 3시간 정치 반응한 후 응집 여부를 확인하였다.

**항생제 감수성 시험**

병원성대장균으로 확인된 144주 중 집단식중독 환자에서 분리한 86주와 협력병원 환자에서 분리한 29주를 대상으로 항생제 감수성 시험을 실시하였으며, 방법은 식품의약품안전청에서 발간된 항생제 내성균 검사 표준 시험법 중 미생물자동화기기

를 이용한 감수성 시험법에 따라 실시하였다<sup>12)</sup>. BioMerieux사(France)의 Vitek II compact 기기를 이용하여 수행하였으며, 항생제 키트는 국립보건연구원과 BioMerieux사가 공동 개발한 AST-N169를 사용하였다.

본 실험에 사용된 17종의 항생제 종류 및 내성 판단기준은 Table 2와 같고, 2012년 CLSI 기준<sup>13)</sup>에 따랐다. 균주는 TSA(Difco, USA)에 접종하여 37 °C에서 24시간 배양한 후 3 mL의 saline(0.45 %)에 균액을 0.6 McF(BioMerieux, France)로 만들어 이 균액 145 µL를 취해 3 mL saline(0.45 %)에 주입하고 잘 섞은 후 실험에 사용하였다.

**PFGE(Pulsed Field Gel Electrophoresis)**

항생제감수성 시험을 실시한 균주를 대상으로 PFGE를 실시하였으며, 시험방법은 질병관리본부 국립보건연구원에서 발간한 PFGE(Pulsed Field Gel Electrophoresis) 표준실험법<sup>14)</sup>에 따랐다. TSA

**Table 2.** Determination of susceptibility, intermediated resistance and resistance of bacteria to 17 antimicrobial agents

Group	Antimicrobial name	Susceptibility	Intermediate	Resistance
Penicillin	Ampicillin	≤ 8	16	≥ 32
	Amikacin	≤ 16	32	≥ 64
	Ampicillin/Sulbactam	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16
	Amoxicillin/Clavulanic Acid	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16
Cephalosporin(first)	Cephalothin	≤ 8	16	≥ 32
	Cefazolin	≤ 8	16	≥ 32
Cephalosporin(second)	Cefoxitin	≤ 8	16	≥ 32
	Cefotetan	≤ 16	32	≥ 64
Cephalosporin(third)	Cefotaxime	≤ 8	16 - 32	≥ 64
	Ceftriaxone	≤ 8	16 - 32	≥ 64
Quinolon	Ciprofloxacin	≤ 1	2	≥ 4
	Nalidixic acid	≤ 16	-	≥ 32
Chloramphenicol	Chloramphenicol	≤ 8	16	≥ 32
Aminoglycoside	Gentamycin	≤ 4	8	≥ 16
Carbapenem	Imipenem	≤ 4	8	≥ 16
Tetracycline	Tetracycline	≤ 4	8	≥ 16
Sulfonamide	Trimethprim/Sulfamethoxazole	≤ 2/38	-	≥ 4/76

배지에 24시간 이상 배양된 균주를 사용하였으며, 제한효소는 *Xba* I(NEB, 40 U/μL)를, molecular weight marker는 *Salmonella* serovar Braenderup ATCC BAA-664를 사용하였다. gradient 6.0 V/cm, included angle 120°, initial time 2.16초, final time 54.17초의 조건으로 14 °C에서 18시간 전기영동을 실시하여 밴드를 확인하였으며 이 결과는 BioNumerics software(Applied Maths, Belgium)를 이용하여 Dice similarity index방법으로 Dendrogram을 작성하여 균주간의 유연관계를 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### 균 분리현황

2010년 - 2012년 동안 부산시내 6개 협력병원에 내원한 설사환자에서 58주, 2011년 - 2013년 동안 관내 집단식중독 의심환자에서 86주를 분리하여 총 144주의 병원성대장균을 분리하였다.

연도별로 2010년도에 15건, 2011년도 협력병원 환자에서 24건, 집단식중독 환자에서 11건, 2012년도는 각각 19건과 21건, 2013년도에는 집단설사환자에서 54건 분리하였다.

### 병원성대장균 및 혈청형 분리현황

총 144건의 병원성대장균 중 ETEC는 87건(60.4 %), EPEC 51건(35.4 %), EHEC 6건(4.2 %)이었으며, EIEC는 검출되지 않아, 2013년 Simona Santana 등<sup>15)</sup>의 결과와 유사하였다.

ETEC로 확인된 87건 중 *st*, *lt* 유전자를 모두 가진 대장균은 40주(46.0 %)였으며, *st*만 보유한 대장균은 46주(52.9 %), *lt*만 보유한 균주는 1건(1.2 %)이었다. EPEC 51건 중 49건(96.1 %)은 *eaeA* 유전자만 보유하고 단, 2건(3.9 %)만이 *eaeA*와 *bfpA* 유전자를 동시에 보유하고 있었다.

6건의 EHEC 중 *vt2*만 보유한 대장균은 1건(16.7 %), *vt*와 *eaeA*유전자를 가진 대장균은 5건(83.3 %)이었다. 병원성대장균 144건 중 집단식중독에서 분리된 대장균은 총 86주로 ETEC가 71건(82.6 %)을 차지하였으며 그 외 15주(17.4 %)는 모두 EPEC였다.

병원성대장균 144주 중 ETEC가 87주(60.4 %)로 가장 많이 차지하였으나 이 중 71주가 집단식중독 발생으로 분리된 것이며 개별발생은 16건에 불과했다. EPEC의 경우 51주(35.4 %) 중 개별발생 건이 35주를 차지해 산발적으로 발생하는 설사질환은 대부분 EPEC에 의한 것임을 알 수 있었다.

분리된 144주의 병원성대장균 중 본 실험에 사용한 53개의 O 항혈청으로 확인된 균주는 총 100주(69.4 %)로 17개의 혈청형(O1, O6, O15, O18, O20, O25, O26, O55, O63, O127a, O128, O142, O148, O152, O153, O159, O169) 그룹으로 나누어졌으며, 나머지 44주(30.6 %)는 O 항혈청으로 확인되지 않았다. O 혈청형이 확인된 100주 중 H 혈청은 총 62주(62 %)에서 7종류(H2, H6, H7, H10, H12, H16, H41)의 그룹으로 확인되었으며, 9주(9 %)는 운동성이 없었으며, 29주는 본 실험에서는 혈청형을 확인할 수 없었다. O와 H 혈청형을 모두 확인할 수 있었던 대장균은 총 71주(53.5 %)로 15개의 혈청형으로 확인되었다. 71주 중 혈청형 O6:H16 대장균이 40주(40 %)로 가장 많았으며 그 다음은 O152:H10혈청형으로 11주(11 %)가 확인 되었다. 가장 많이 검출된 O6:H16 39주와 O152:H10의 11주 및 O169:UN 21주는 각각 2013, 2011과 2012년 발생한 집단식중독 분리 균주였으며, 그 외 혈청형들은 각 1주 내지 2주 분리되어 다양한 혈청형 분포를 나타내었다. O6:H16와 O25:NM은 ETEC에서만 확인 되었으나 *st*, *lt* 유전자는 다양하게 보유하고 있었으며 O26:NM은 EPEC와 EHEC에서 모두 확인되었다(Table 3).

**Table 3.** O Serotype and virulence genes distribution of *E. coli* isolates

Category	Virulence genes	Total no. of isolates	O Serotype(total no. of isolates)
ETEC	<i>st, lt</i>	40	O6:H16(39), O6:UN(1)
	<i>st</i>	46	O6:H16(1), O25:NM(2), O152:H10(11), O153:H12(2), O159:UN(1), O169:H41(2), O169:UN(22)*, UN(5)
	<i>lt</i>	1	O25:NM(1)
EPEC	<i>eaeA</i>	49	O15:H16(1), O18:UN(1), O20:H6(2), O26:NM(1), O26:UN(1), O55:UN(1), O63:H6(2) O127a:NM(1), O128:H2(1), O142:NM(1), O148:NM(1), O153:H7(1), O153:NM(1), O153:UN(1), UN(33)**
	<i>eaeA, bfpA</i>	2	UN(2)
EHEC	<i>vt2</i>	1	O1:H12(1)
	<i>vt2, eaeA</i>	2	O26:NM(1), UN(1)
	<i>vt1, eaeA</i>	2	UN(2)
	<i>vt1&amp;2, eaeA</i>	1	UN(1)

UN, unknown; NM, non-motile; \_\_\_\_, isolated strains of outbreak; \*, 21 of 22 strains were isolated outbreak; \*\*, 15 of 33 strains were isolated outbreak

부산에서 2011년과 2012년 3건의 집단식중독을 일으킨 ETEC-*st* O6:H16, ETEC-*st* O169:UN의 경우 다른 나라에서도 발생 예를 찾아 볼 수 있는데, ETEC O6:H16은 일본에서 1991 - 4년 까지 총 10건의 집단식중독을 일으켰으며<sup>17)</sup>, 최근인 2005년에는 김치로 인해 발생된 2건의 집단 식중독에서 400여명의 환자를 유발시켰으며, ETEC O169은 일본(1991 - 4년 까지 총 15건) 및 미국에서 1970년대 중반 이후에서 가장 빈번히 일어나는 집단식중독 원인균으로 보고되고 있다.<sup>17-20)</sup>, 2013년 분리된 ETEC-*st, lt* O152:H10는 보고된 경우가 없었으며 O169와 O6과 더불어 주요 원인체로 알려져 있는 ETEC O148:H28는 본 연구에서 1건도 분리되지 않았다.

**항생제 감수성 결과**

항생제 감수성 검사를 실시한 115주 중 집단식중독에서 분리된 86주의 경우 60주(69.8 %)에서 tetracycline 내성을 나타내었으며, 26주는 17종의 항생제에 감수성을 나타내었다.

협력병원 환자에서 분리한 29주에 대한 항생제별 내성 분포를 살펴보면 ampicillin 12주(41.4 %)로 가장 높았으며 그 다음으로 tetracycline이 11주(38.0 %), nalidixic acid과 trimethprim/sulfamethoxazole 각 8주(27.6 %), ampicillin/sulbactam, cefalotin과 cefazolin 각 3주(10.3 %), gentamycin 2주(6.9 %), amox-icillin/clavulanic acid, cefotaxime, ciprofloxacin, chloramphenicol과 ceftriaxone는 각 1주(3.4 %)에서 내성을 보였으며 cefotetan, cefoxitin, imipenem과 amikacin에는 29건 모두 감수성이었다. 항생제 계열별 내성률을 살펴보면 penicillin계 내성이 가장 많았고 그 다음 tetracycline계였으며 quinolone계, sulfonamide계, cephalosporins계 순 이었다(Table 4).

두 종류 이상의 항생제에 내성을 갖는 다제내성 결과는 사용된 17종의 항생제에 모두 감수성이인 균은 14주(48.3 %)였으며 1개 항생제에 내성이인 균은 총 3주(10.4 %)로 NA 2주, SXT 1주, Te 60주였다. 2종 이상의 항생제에 내성을 보이는 다제내성 균주는 총 12주(41.4 %)였으며, 각 3종에 5주(17.2 %),

**Table 4.** Antimicrobial resistance of *E. coli* isolates

Antimicrobial	No.(%) of resistant isolates	No. of intermediate isolates
Ampicillin	12(41.4)	
Amoxicillin/Clavulanic Acid	1(3.4)	1(3.4)
Ampicillin/Sulbactam	3(10.3)	3(10.3)
Cefalotin	3(10.3)	10(34.5)
Cefazolin	3(10.3)	
Cefotetan	0	
Cefoxitin	0	
Cefotaxime	1(3.4)	
Imipenem	0	
Amikacin	0	
Gentamycin	2(6.9)	
Nalidixic acid	8(27.6)	
Ciprofloxacin	1(3.4)	
Tetracycline	11(38.0)	
Chloramphenicol	1(3.4)	1(3.4)
Ceftriaxone	1(3.4)	
Trimethprim/Sulfamethoxazole	8(27.6)	

4종에 3주(10.4 %), 5종에 2주(6.9 %), 7종과 8종에 각각 1주(3.5 %) 씩 나타났다(Table 5).

7종의 항생제에 내성을 보이는 대장균은 2010년에 분리된 O26:NM EHEC-*vt2*, *eaeA*이며, 8종

에 내성을 보이는 균주는 2011년에 분리한 O25:NM ETEC-*st*였다. 특히 ETEC-*st*의 경우 3세대 cephalosporin과 quinolone계의 ciprofloxacin에 대한 내성을 보였으며 1세대 cephalosporin계인

**Table 5.** Antimicrobial resistant patterns and simultaneously resistance ratio of *E. coli* isolates(except outbreak isolates)

Multiplicity of Resistance	Resistant Pattern	No.(%) of Isolates	Subtotal(%)
0	All susceptible	14(48.3)	14(48.3)
1	NA	2(6.9)	3(10.4)
	SXT	1(3.5)	
3	AM-TE-SXT	2(6.9)	5(17.2)
	AM-SAM-Te	1(3.5)	
	AM-GM-Te	1(3.5)	
	AM-NA-Te	1(3.5)	
4	AM-NA-TE-SXT	3(10.4)	3 (10.4)
5	AM-NA-CIP-Te-C	1(3.5)	2 (6.9)
	AM-AmC-SAM-CF-CZ	1(3.5)	
7	AM-SAM-CF-CZ-GM-Te-SXT	1(3.5)	1(3.5)
8	AM-CF-CZ-CTX-CRO-NA-Te-SXT	1(3.5)	1(3.5)
Total		29(100)	29(100)

AM, ampicillin; AmC, Amoxicillin/Clavulanic Acid; C, chloramphenicol; CF, Cefalotin; CIP, Ciprofloxacin; CTX, cefotaxime; CZ, cefazolin; GM, gentamicin; IPM, imipenem; NA, nalidixic acid; SAM, ampicillin/sulbactam; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; Te, tetracycline; CRO, Ceftriaxone

cefalotin과 cefazolin의 내성도 같이 보였다.

이런 항생제 내성에 대한 조사는 항생제 내성 인자 특성상 균주 간 내성 전이는 언제든지 일어날 수 있기 때문에 항생제 내성에 대한 phenotype과 더불어 내성유전자에 대한 연구도 수행할 필요가 있을 것으로 사료된다.

**PFGE 분석**

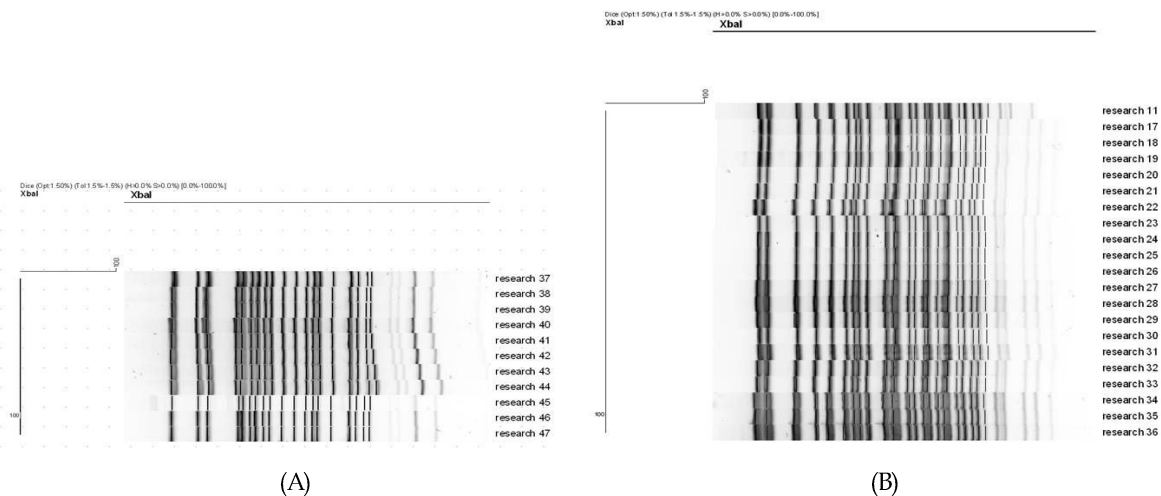
2010년부터 2013년까지 부산지역 설사환자에서 분리한 총 144주의 *E. coli* 중 115주에 대하여 PFGE를 실시하였다. 115주 중 개별적으로 병원을 내원한 설사환자에서 분리한 29주와 집단식중독 분리주인 86주를 각 BioNumerics software(Applied Maths, Belgium)를 이용하여 Dice similarity index로 Dendrogram을 작성 한 후 균주간의 유연관계를 비교 분석하였다.

집단식중독 분리주의 연도별 PFGE 패턴은 2011년도에 분리한 11주(ETEC, *lt*-positive, O152:H10)는 유사도 100 %로 나타났으며, 2012년도에 분리한 21주(ETEC, *st*-positive, O169:UN)는 서로 다른

두 집단에서 분리되었음에도 서로 간 유사도를 분석해본 결과 100 %로 나타나 동일 유래의 대장균에 의해 발생되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 2013년도에는 한 집단에서 총 54주의 *E. coli*를 분리하였는데 이 중 39주는 ETEC(*st*, *lt*-positive, O6:H16), 15주는 EPEC(*eaeA*-positive, serotype unknown)였으며, PFGE분석 결과 ETEC 39주는 100 % 유사성을 나타내었으나 EPEC 15주의 경우 12주는 100 % 유사성을 보여 동일 유래에서 발생되었음을 확인할 수 있었고 3주의 경우 81.1 %, 69.6 %, 59.3 %의 유사성을 나타내어 집단식중독과는 관련 없이 발생한 건임을 알 수 있었다(Fig. 2).

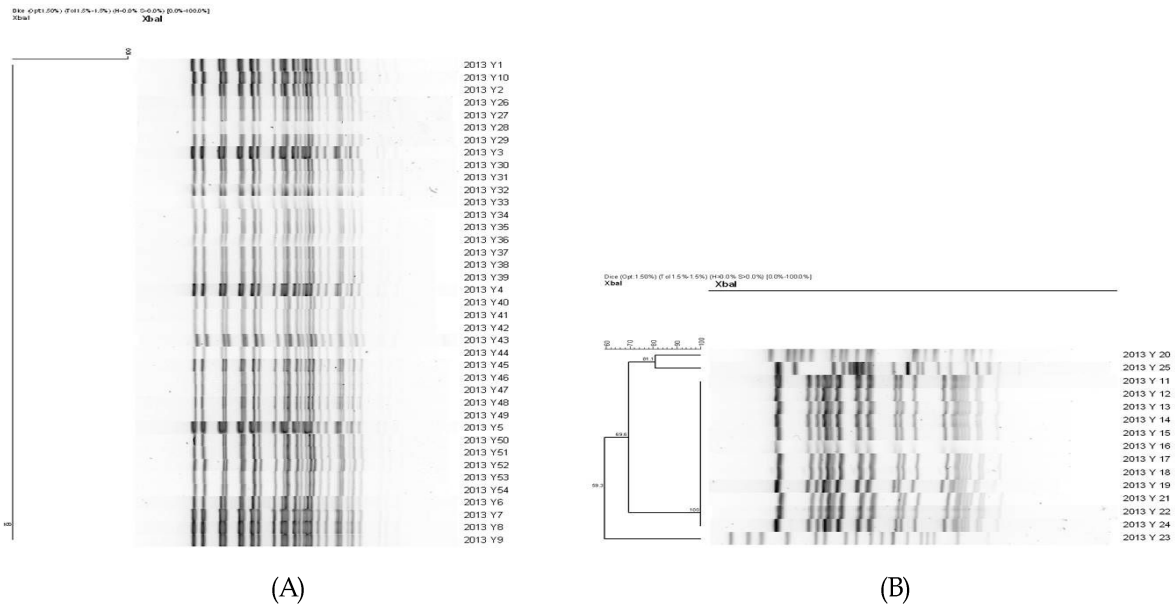
이상의 실험 결과로 PFGE는 집단 식중독 발생 시 분리된 병원성대장균간의 연관 관계를 확인하기에 효과적인 방법임을 확인할 수 있었으며<sup>22)</sup>, 부산지역 분리균주에 대한 지속적인 PFGE 분석은 식중독의 대규모 집단발생시 혈청형 및 병원성 인자로만 확인이 어려운 연관성을 확인하여 역학조사수행에 많은 도움이 될 것으로 판단된다.

협력병원 환자에서 분리한 29주의 병원성대장균



**Fig. 1.** Dendrogram generated by Bionumeric software, showing distance calculated by Dice similarity index of PFGE XbaI profiles among (A) 11 *E. coli* isolated from patients of foodborn outbreak in 2011; Enterotoxigenic *E. coli*, *lt*, O152:H10 (B) 21 *E. coli* isolated from patient of foodborn outbreaks in 2012; Enterotoxigenic *E. coli*, *st*-positive, serotype O169:UN. The degree of similarity(%) is shown on the scale.





**Fig. 2.** Dendrogram generated by Bionumeric software, showing distance calculated by Dice similarity index of PFGE XbaI profiles among 54 *E. coli* isolated from patients of foodborn outbreak in 2013. The degree of similarity(%) is shown on the scale. (A) 39 Enterotoxigenic *E. coli*, *st*, *lt*-positive, serotype O6:H16 (B) 15 Enteropathogenic *E. coli*, *eaeA*-positive, serotype unknown.

을 분석한 결과 총 11개의 PFGE 유형으로 나누어 졌으며(similarity > 78 %), 61 - 100 %의 유사성을 보였다(Fig. 3).

115주 중 집단식중독 분리주(100 % 유사성을 보이는 균주는 1주씩 선택)와 개별 발생건의 균주에 대한 dendrogram 비교분석한 결과 62.9 - 100 %의 유사성을 보이며 유사성 85 %이상 일 경우 12개의 PFGE 유형으로 나누어 졌다(Fig. 4). 2013년 식중독 분리주인 2013Y1, 11, 20, 23(EPEC)은 각각 PFGE group I, III, V에 속했다. research 15, 16인 ETEC-*st* O153:H12 2주는 100 % 유사성을 보인 반면, research 54, 61 EPEC-*eaeA* O20:H6와 research 59, 60 EPEC-*eaeA* O63:H6는 같은 혈청형과 같은 항생제 패턴(모두 감수성)임에 불구하고 각각 80 %와 85.3 %의 유사성을 보였다. research 53, 57(O26)과 research 12, 14(O153) 처럼 O 혈청형만 동일한 경우 다른 group으로 분류되었고 O25:NM 혈청형을 가진 research 2(ETEC-*st*, 17개 중

7개 항생제에 내성), research 1(ETEC-*lt*, 17개 항생제에 감수성)과 research 3(ETEC-*st*, 17개 항생제에 감수성)의 경우 같은 group V에 속하기는 했지만 research 2가 ETEC지만 research 1, 3보다 EPEC-*eaeA* O15:H16과 더 유사성이 높게 나타나 PFGE 결과와 병원성인자, 항생제내성패턴 및 혈청형과의 유의성은 찾을 수 없었다(Fig. 4).

## 요 약

2010년 - 2012년 부산시내 6개 협력병원 내원 설사환자 및 2011년 - 2013년 관내 집단식중독 의심환자 가검물에서 총 144건의 병원성대장균을 분리하였다.

1. 연도별로는 2010년도에 15건, 2011년도 협력병원환자에서 24건, 집단식중독 환자에서 11건의 균주가 분리되었으며, 2012년도는 각각 19건과 21건, 2013년도에는 집단설사환자에서 54건이 분리되었다.

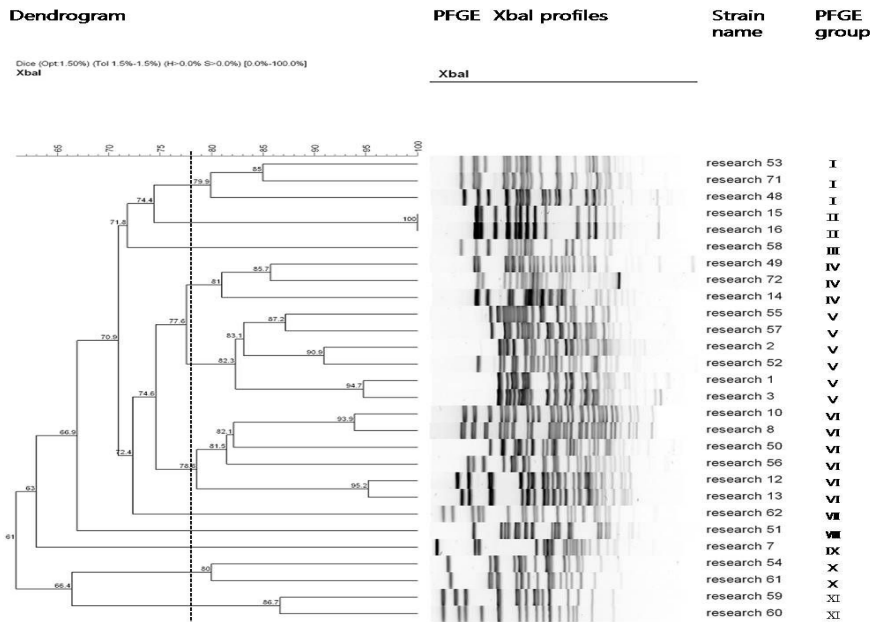


Fig. 3. Dendrogram generated by Bionumeric software, showing distance calculated by Dice similarity index of PFGE Xbal profiles among 29 *E. coli* isolated from diarrhea patients in 2010 - 2012. The degree of similarity (%) is shown on the scale.

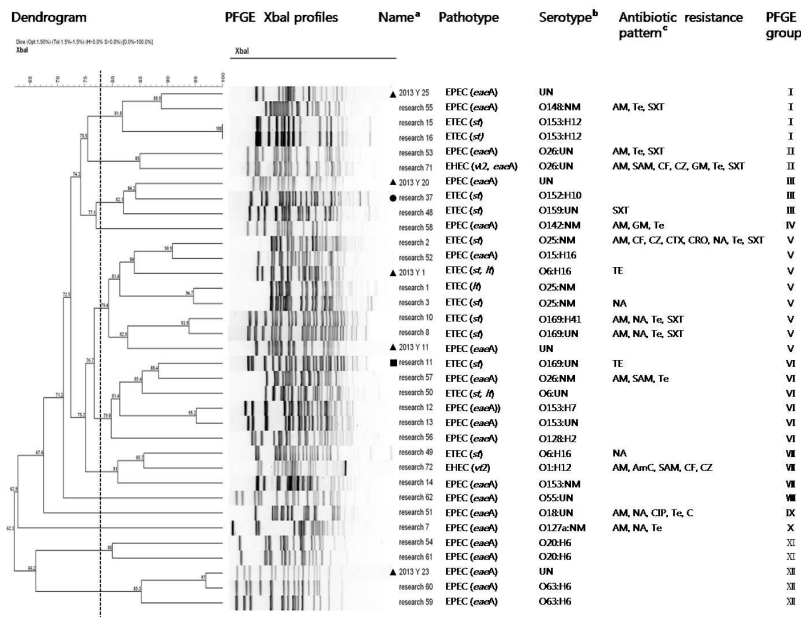


Fig. 4. Dendrogram generated by Bionumeric software, showing distance calculated by Dice similarity index of PFGE Xbal profiles among 36 *E. coli* isolated from patients of foodborn outbreak in 2011. The degree of similarity(%) is shown on the scale.

<sup>a</sup>●, 2011 outbreak isolated strains; ■, 2012 outbreak isolated strains; ▲, 2013 outbreak isolated strains

<sup>b</sup>UN, unknown NM, none motile

<sup>c</sup>AM, ampicillin; AmC, Amoxicillin/Clavulanic Acid; C, chloramphenicol; CF, cephalothin; CIP, Ciprofloxacin; CTX, cefotaxime; CZ, cefazolin; GM, gentamicin; NA, nalidixic acid; SAM, ampicillin/sulbactam; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; Te, tetracycline; CRO, Ceftriaxone

2. 분리된 144주의 병원성대장균 중 100주는 53개의 항혈청 중 17개 혈청형(O1, O6, O15, O18, O20, O25, O26, O55, O63, O127a, O128, O142, O148, O152, O153, O159, O169)으로 확인되었으며 O혈청형이 확인되지 않은 균주는 총 44주였다. O혈청형이 확인된 100건 중 H혈청은 총 62주에서 7종류(H2, H6, H7, H10, H12, H16, H41)의 혈청형이 확인되었으며, 29주는 H혈청형을 확인할 수 없었으며 9주는 운동성이 없었다.
3. 총 144건의 병원성대장균 중 ETEC 87건, EPEC 51건, EHEC는 6건이었으며, EIEC는 검출되지 않았다. ETEC가 144건 중 87건, 60.4 %로 가장 많이 차지하였으나 이 중 71주가 집단식중독 발생으로 분리된 주로 개별발생은 14건에 불과하며 EPEC의 경우 51주(36 %) 중 개별발생 건이 35주를 차지해 산발적으로 발생하는 설사질환은 대부분 EPEC에 의해 발생되었다.
4. 항생제 감수성 검사를 실시한 115주 중 집단식중독에서 분리된 86주 중 60주(69.8 %)에서 tetracycline 내성을 나타내었으며, 26주는 17종의 항생제에 감수성을 나타내었다. 협력병원 환자에서 분리한 29주에 대한 항생제 내성 결과는 모두 감수성인 균은 14주였으며 1개 항생제에 내성인 건은 3주였으며 2종 이상의 항생제에 내성을 보이는 다제내성 균주는 총 12주로, 각 3종에 5주, 4종에 3주, 5종에 2주, 7종과 8종에 각각 1주씩의 항생제내성을 보이는 패턴을 나타내었다.
4. 집단식중독을 발생시켰던 병원성대장균은 모두 감수성이거나 tetracycline에만 내성을 나타내었다. penicillin계 내성이 가장 많았고 그 다음 tetracycline계였으며 quinolone계와 sulfonamide계, cephalosporins계 순 이었다.
5. 2011 - 2013년 발생한 집단식중독에서 분리한 병원성대장균의 PFGE 분석 결과, 동일 유래를 확인할 수 있었으며 이 결과로 집단식중독 발생 시 균주간의 역학조사를 위해 PFGE가 효과적인 방법임을 확인할 수 있었다.
6. 115주(식중독 분리주 및 혈청확인 주) 중 집단식중독 분리주(100 % 유사성을 보이는 균주는 1주씩 선택)와 협력병원환자에서 분리한 균주를 비교한 결과 62.9 - 100 %의 유사성을 보이며 유사성 78 %이상에서 12개의 PFGE 유형으로 나누어졌다. 병원성인자와 항생제 내성패턴 및 혈청형과 PFGE group과의 유의성은 찾을 수 없었다.

## 참고문헌

1. Kim, J. Y., Park, M. Y., Kim, J. Y. Park, Y. J., and Lee, J. H., Short Communication: solation frequency and antimicrobial resistance of Escherichia coli & Enterococcus spp. isolated from beef & pork on sale in Seoul, Korea, The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science, 36(2), 111 - 119(2013)
2. Lee, M. J. and Park, H. G., A Study of Distribution and Characteristics of Isolated Bacteria of Coliform Bacteria in Water Quality River, International Journal of Environmental Sciences, 712 - 713(2012)
3. Park, S. G., Ham, H. J., Kim, E. J. and Hwang, K. H., Serotype and tranfer of drug Resistance in E. coli Isolated from Patients, Report of S. I. H. E., 32, 13 - 19(1996)
4. Gross, R. J., and Rowe, B., *Escherichia coli*

- diarrhoea. *Epidemiology and Infection*, 95 (3), 531 - 550(1985)
5. Kaper, J. B., Nataro, J. P. and Mobley, H. L. T., Pathogenic *Escherichia coli*, *Nature*, 2, 123 - 140(2004)
  6. Range, J. M., Sparling, P. H., Crowe, C., Griffin, P. M., and Swerdlow, D. L., Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982 - 2002, *Emerging infectious diseases*, 11(4), 603(2005)
  7. Kim, S. H., Song, H. J., Jung, J. G., Ha, D. L. and Lee, J. B., Genotypic and Phenotypic Characterization of Enteropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Diarrheal Patients in Gwangju. *Journal of Bacteriology and Virology*, 36(3), 167 - 174(2006)
  8. Evans, D., Jr J. and Evans, D. G., Classification of pathogenic *E. coli* according to serotype and production of virulence factor antigen *Rev*, *Infect*, 5, 692 - 701(1983)
  9. Brzuszkiewicz, E., Thürmer, A., Schuldes, J., Leimbach, A., Liesegang, H., Meyer, F. D. and Daniel, R., Genome sequence analyses of two isolates from the recent *Escherichia coli* outbreak in Germany reveal the emergence of a new pathotype: Enteropathogenic - Haemorrhagic *Escherichia coli* (EAHEC), *Archives of microbiology*, 193 (12), 883 - 891(2011)
  10. Ministry of Food and Drug Safety in the Korea. <http://www.mfds.go.kr/e-stat/index.do>.
  11. 질병관리본부 국립보건연구원 감염병 실험실 진단 I 질환별 시험법, 61 - 62(2005)
  12. 식품의약품안전청, 항생제 내성균 검사 표준 시험법, 133 - 137(2010)
  13. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-second informational supplement, Clinical and Laboratory Standards Institute. M100 - S22, Vol. 32.(2012)
  14. 이복권 등 공저, PFGE(Pulsed Field Gel Electrophoresis) 표준실험법, 질병관리본부 국립보건연구원, 1 - 32(2008)
  15. Santona, S., Diaz, N., Fiori, P. L., Francisco, M., Sidat, M., Cappuccinelli, P., and Rappelli, P., Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in industrialized and developing countries, *The Journal of Infection in Developing Countries*, 7(03), 214 - 219 (2013)
  16. Devasia, R. A., Jones, T. F., Ward, J., Stafford, L., Hardin, H., Bopp, C., and Schaffner, W., Endemically Acquired Foodborne Outbreak of Enterotoxin-producing *Escherichia coli* Serotype O169: H41, *The American journal of medicine*, 119(2), 168 - e7(2006)
  17. Nishikawa, Y., Helander, A., Ogasawara, J., Moyer, N. P., Hanaoka, M., Hase, A., and Yasukawa, A., Epidemiology and properties of heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* serotype O169: H41, *Epidemiology and infection*, 121(1), 31 - 42(1998)
  18. Beatty, M. E., Bopp, C. A., Wells, J. G., Greene, K. D., Puh, N. D., and Mintz, E. D., Enterotoxin-producing *Escherichia coli*

- O169: H41, United States, Emerging infectious diseases, 10(3), 518(2004)
19. Kudoh, Y., Zen-Yoji, H., Matsushita, S., Sakai, S. and Maruyama, T., Outbreaks of acute enteritis due to heat-stable enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli*, *Microbiology and Immunology*, 21, 175 - 178(1977)
  20. Morbidity and Mortality, Follow-up on outbreak of gastrointestinal illness at Crater Lake National Park, Oregon, 24, 261 - 262 (1975)
  21. So, H. C., Pearl, D. L., von Königslöw, T., Louie, M., Chui, L., and Svenson, L. W., Spatio Temporal Scan Statistics for the Detection of Outbreaks Involving Common Molecular Subtypes: Using Human Cases of *Escherichia coli* O157: H7 Provincial PFGE Pattern 8(National Designation ECXAI. 0001) in Alberta as an Example, *Zoonoses and Public Health*(2012)
  22. Gorla, M. C. O., de Lemos, A. P. S., Quaresma, M., Vilasboas, R., Marques, O., de Sá, M. U. and Dias, J., Phenotypic and molecular characterization of serogroup C *Neisseria meningitidis* associated with an outbreak in Bahia, Brazil, *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, 30(2), 56 - 59(2012)