

원유로부터 분리한 대장균의 독소 산생 및 약제 감수성에 관한 연구

이강록[†] · 정경태 · 이우원 · 이승미 · 김홍태 · 선주연 · 이동수
부산광역시 보건환경연구원 축산물위생검사소

Detection of Toxigenic Gene and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Bulk Milk

Gang-Rok Lee[†], Kyung-Tae Chung, Woo-Won Lee, Seung-Mi Lee, Hong-Tae Kim, Ju-Yeon Sun and Dong-Soo Lee
Veterinary Service Laboratory

Abstract

The prevalence of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) in bulk milk was investigated by multiplex polymerase chain reaction (mPCR) technique. The PCR assay using virulence specific primers was differentiated virulence from non virulence *E. coli*.

Among the total of 100 *E. coli* strains, only one strain of EHEC and ETEC was recovered individually.

The two pathogenic *E. coli* isolates were resistant to kanamycin, streptomycin and gentamicin.

Key Word : Toxigenic *E. coli* , PCR

서 론

대장균은 사람과 포유류의 장내에 존재하는 정상 세균 총으로서 비병원성세균으로 알려져있으나 일부는 병원성을 나타내는 것으로 알려져있으며 이들을 병원성대장균이라한다. 병원성대장균은 발병기전에 따라 장독소원성대장균(Enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), 장관병원성대장균(Enteropathogenic *E. coli*, EPEC), 장관침습성대장균(Enteroinvasive *E. coli*, EIEC), 장관흡착성대장균(Enteroadherent *E. coli*, EAEC) 및 장관출혈성대장균(Enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC)등으로 분류되어지고 있다¹⁾.

이중 EHEC는 Shiga-like toxin(SLT)을 산생하며 주요증상으로는 사람에게서 단순설사, 출혈성장염, 용혈성요독증후군(Hemolytic Uremic Syndrome, HUS)을 ETEC는 사람에서는 소아설사를 일으키며, 돼지에서는 심한 수양성 설사나 부종병, 송아지에서는 백리증을 유발함으로써

양축농가에 막대한 경제적 손실을 초래하고 있다.

ETEC가 생산하는 장독소에는 열에대하여 안정성을 나타내는 내열성장독소(heat-stable enterotoxin,ST)와 열에의하여 파괴되는 이열성장독소(heat-labile enterotoxin, LT)로 구분된다²⁾.

EHEC와 ETEC의 진단을 위하여 많은 방법들이 개발되어 있으나 많은 시간이 소요되고 진단에도 한계가 있는 실정이다^{1,3)}. 따라서 최근에는 특정 primer를 이용한 polymerase chain reaction(PCR)방법이 개발되어 편리함과 정확성이 높아 진단에 많이 응용되고 있는 실정이다⁴⁻⁷⁾. 또한 이들 병원성 대장균의 감염 예방 및 치료를 위하여 많은 항생물질이 사용되고 있으며, 이로 인한 내성균 출현으로 치료에 어려움이 많은 것이 현실이다⁸⁾.

본 연구에서는 EHEC와 ETEC의 동시검출을 위한 이등의 multiplex PCR(mPCR)방법을 이용하여¹²⁾ 원유로부터 분리된 대장균 중에서 병원성대장균의 분포상황 및 항생제 감수성검사를 실시하였기에 그 결과를 보고하는 바이다.

[†] Corresponding author. E-mail:yigr304@korea.kr
Tel:+82-51-331-0095, Fax:+82-51-338-8266

재료 및 방법

균분리 동정 : 2007년 8월부터 2008년 5월까지 관내 30개 목장의 유즙을 채취하여 MacConky Agar (Difco, USA)에 도말하여 37°C overnight 배양후 붉은색 집락을 채취하여 Edward 및 Ewing의 방법에 따라 IMViC 및 각종 생화학적 성상검사로 대장균임을 확인하였다⁹⁾.

표준균주 : ST, LT 산생 표준균주는 우리연구원에 보관중인 ATCC35401을 사용하였으며, SLT 산생 균주는 돼지로부터 분리하여 Senka Deiken(Japan)사의 VTEC-RPLA test kit를 사용하여 Reverse passive latex agglutination 시험으로 독소 산생이 확인된 PSL6-4을 사용하였다.

병원성 대장균에 대한 Primer 작성 : 장독소 산생(ST, LT) 및 SLT 산생 대장균의 검출을 위한 특이 Primer는 Table 1과 같이 합성(Bioneer사)하여 제작자의 지시에 따라 사용하였다.

Table 1. Primers used in multiplex PCR of ETEC and EHEC

Virulence factor	Primer sequences (5'-3')	size of product(bp)
SLT	GAG CGA AAT AAT TTA TAT GTG TGA TGA TGG CAA TTC AGT AT	518
ST	CCC CTC TTT TAG TCA GTC CCA GCA CAG GCA GCA TTA CA	165
LT	CAG ACT ATC AGT CAG AGG TTG TTC ATA CTG ATT GCC GCA	417

Template DNA준비 : 표준균, 대조균 및 시험균의 배양은 tryptic soy agar에 도말하여 37°C, overnight 배양한 집락 2-3개를 tryptic soy broth에 접종 37°C, overnight 배양한 균액 1ml을 eppendorf tube에 넣고 5000rpm 으로 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 멸균 증류수 1ml로 재부유하여 동일 조건으로 원심분리한후 멸균증류수 500ml에 재부유한 다음 100°C 15분간 끓인 것을 template DNA로 사용하였다.

병원성 대장균 검출을 위한 PCR시험 : 표준균주 및 분리 대장균으로부터 ST, LT, SLT 산생 유무를 검사하기 위하여 각각의 primer를 사용한 PCR 및 3종의 primer를 혼합한 multiplex PCR을 이등의 방법으로 실시하였다¹²⁾.

요약하면 template DNA 10ul, primer 2ul(forward, reverse 각 1ul), 10X PCR buffer 5ul, dNTP 5ul, taq DNA polymerase 1ul를 혼합한후 D.W로 50ul되게 맞추어 T-gradient thermal cycler(Biometra, Germany)를 이용하여 DNA 증폭을 시도하였다. multiplex PCR의

반응 시간 및 온도는 최초 94°C 10분간 denaturation한 후, 94°C 1분간 denaturation, 56°C 1분간 annealing, 72°C 1분간 extention하는 과정을 30회 반복하였으며, 마지막 extention은 72°C에서 10분간 실시하였다. 최종 증폭산물에 대하여 1.5% ethidiumbromide agarose gel로 전기영동하여 관독하였다.

항생제 감수성 시험 : 분리된 병원성 대장균에 대한 항생제 감수성 시험은 disc 시험법(BBL)으로 실시하였으며, 사용한 항생제는 Neomycin(N), Tetracyclin(Te), Trimethoprim/sulfamethoxazole(sxt), Streptomycin(Sm), Kanamycin(Km), Colistin(CL), Chloramphenicol(C), Ampicillin(Am), Amikacin(AN), Cefalothin(CF), Amoxicillin(A), Gentamicin(Gm)등 12종을 사용하였다.

결 과

균 분리 동정 : 관내 목장 30개소로부터 채취한 원유로부터 100주의 대장균을 분리하였으며 각종 생화학적 성상검사를 통하여 대장균임을 확인하였으며, 아울러 *Salmonella*도 동시 분리를 시도 하였으나 분리되지 않았다.

ST, LT, SLT DNA 검출을 위한 PCR 조건 : 표준 균주를 사용하여 ST, LT 및 SLT DNA검출을 위하여 각각 및 mPCR을 실시한 결과 결과는 Fig 1과 같다.

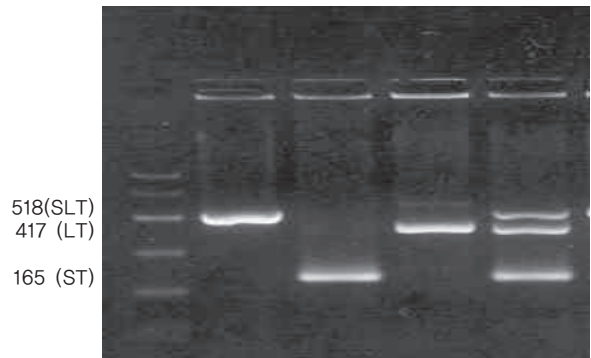


Fig 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR products of *E.coli* reference virulence genes (Lane M: Mark, 1: SLT, 2: ST, 3: LT, 4:multiplex PCR result)

원유로부터 병원성 대장균의 분리 : 원유로부터 분리된 대장균에 대하여 확립된 mPCR 조건을 이용하여 병원성 유무를 검사한 결과 SLT 및 LT산생주 각 1주씩 2주(2%)의 병원성대장균이 분리되었다.

분리 병원성 대장균의 항생제 감수성 검사 결과 : 분리된 병원성 대장균 2주에 대하여 항생제 감수성 검사 결과 Table 2와 같이 나타났다.

Table 2. Antimicrobial Resistance of Pathogenic Ecoli Isolated from Bulk Milk,

Strains	Antimicrobial Resistance
SLT	Km Sm Gm Tc
LT	Am Km Sm Gm Stx

고 찰

대장균은 동물의 장관에 존재하며 분변에 포함되어 정상으로 배출되는 장내세균이지만 일부 대장균에서는 병원성을 나타내고 있으며, 주로 어린동물에 여러 가지 형태의 질병을 유발함으로써 양축농가에는 많은 경제적 손실을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 병원성인자를 빨리 검출하기 위한 많은 진단법중 요즘에는 직접 이들 병원성인자를 찾아내는 PCR기법이 많이 사용되어지며 특이 여러 가지 primer를 사용하여 multiplex PCR을 실시함으로써 많은 노력과 시간을 절약할수 있는 장점이있다^{4,5)}.

본 연구에서도 이등이 실시한 방법¹²⁾으로 반복실험한 결과 annealing온도가 56℃에서 가장 좋은 반응을 나타내었을 뿐만아니라 비특이적 반응도 나타나지 않아 multiplex PCR이 병원성 대장균증 진단에 적용하면 빠르고 정확한 진단이 이루어져 양축농가에 도움을 줄 수있으리라 사료된다.

한편 확립된 PCR조건으로 유즙 유래 대장균 100주를 대상으로 병원성 유무를 조사한 결과 SLT, LT산생주가 각 1주씩으로 이는 송등¹⁰⁾의 도축돈 분변으로부터 SLT 분리율 3.9%, 함등¹¹⁾의 실사자돈으로부터 분리한 대장균의 48.4%가 장독소를 산생하였다는 보고와는 큰 차이를 보이고 있어 축종이나 검사 시료에 따라 병원성 대장균의 분포가 상당한 차이가 있음을 알 수 있었다. 한편 분리된 병원성대장균이 정상적인 젖소의 유선조직에 존재하고 있는 것인지 분변이나 기타 외부의 다른 요인에 의해 오염된 것인지는 알 수 없어 앞으로 여기에 대한 연구가 필요할 뿐만 아니라, 병원성대장균이 유방염의 원인균으로 작용하는지 여부도 알려져 있지 않아 향후 이에 대한 연구도 필요하리라 사료된다. 정상 유즙에서도 병원성대장균이 검출됨으로써 이는 착유과정에 있어서 다른 데로 전파도 가능하리라 사료되며 특히 사람으로의 전파가능성도 배제할 수 없는 실정으므로 착유 시 주의가 필요하리라 사료된다.

분리된 병원성대장균의 항생제감수성 시험결과 박등⁸⁾

의 실사자돈에서 분리한 결과와는 균주등의 차이로 직접 비교는 할 수 없으나 다제내성균으로 나타나고 있어 유즙을 통하여 다른 개체로의 다제내성 병원성 대장균의 전파가 이루어질 경우 신중한 치료제 선택이 요구되므로, 반드시 실험실 검사가 이루어진 후 최적의 항생제를 선택하여야 할 것으로 사료된다.

결 론

2007. 8월부터 2008년 5월까지 관내 30개 농장으로부터 채취한 유즙으로부터 100주의 대장균을 분리하여 mPCR방법으로 병원성을 조사한 결과 2주의 병원성대장균이 분리되었다.
- 분리된 병원성대장균은 SLT산생 1주, LT산생 1주이었다.
- 분리된 병원성대장균에 대하여 항생제 내성검사결과 Km, Sm 및 Gm에 공통으로 내성을 나타내었다.

참고문헌

- Chart. H. Toxigenic Escherichia coli. J Appl Microbiology Symposium Supplement. 1998. 84. 77S-86S
- Nataro. JP, Kaper, JB. Diarrheagenic Escherichia coli Clin Microbiology Rev. 1998. 11. 142-201
- 이상운, 정석찬, 박용호, 우희중. PCR에 의한 대장균의 이열성 장독소 유전자 검출. 대한미생물학회지. 1996. 31. 145-154
- Franck. SM, Bosworth. BT, Moon. HW. Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing Escherichia coli strains from calves. J Clin Microbiol. 1998. 36. 1795-1797
- Pass. MA, Odedra. R, Batt. RM. Multiplex PCRs for identification of Escherichia coli virulence genes. J Clin Microbiol. 2000. 38. 2001-2004
- Toma. C, Lu. Y, Higa. N, Nakasone. N, Chinen. I, Baschkier. A, Rivas. M, Iwanaga. M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic Escherichia coli. J Clin Microbiol. 2003. 41. 2669-2671
- Vidal. R, Vidal. R, Lagos. R, Revine. M, Prado. V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic Escherichia coli. J

- Clin Microbiol. 2004. 42. 1787-1789
8. 박주연, 신나리, 박용호, 유한상. 실사 자돈으로부터 분리한 *Escherichia coli*의 특성에 관한 연구; 항균제 감수성, 장독소 및 섬모의 유전형 분포 및 plasmid profiles. 대한수의학회지. 2000. 40. 301-310
 9. Edwards. PR, Ewing. WH. Identification of enterobacteriae. Burgess Publishing Co. Mineapolis, Min. USA. 1972
 10. 송영환, 김지영, 채미경, 박창식, 김명철, 전무형. 도축돈 장 분변으로부터 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*의 분리와 성장. 대한수의학회지. 2004. 44. 551-559
 11. 함희진, 천두성, 채찬희. 포유자돈 소장에서 분리된 대장균의 섬모항원과 장내독소 분포양상. 대한수의학회지. 1997. 37. 779-784
 12. 이강록, 이우원, 이승미, 이동수. PCR을 이용한 야생 조류 유래 병원성대장균(EHEC, ETEC)검출에 관한 연구. The Annual Report of Busan Metropolitan City Institute of Health & Environment. 2006. 16(1). 62-65