한국가축위생학회지 제32권 제3호(2009)
Korean J Vet Serv 32(3) : 241~249 (2009)

소의 분변과 도체에서 shiga toxin-producing *Escherichia coli*의 분리와 특성

채희선* · 김능희 · 한혜진 · 손홍락 · 김창기 · 김선홍 · 이정학 · 김종택[1]
서울시보건환경연구원, [1]강원대학교 수의과대학

(접수 2009. 9. 4, 게재승인 2009. 9. 25)

Characterization and isolation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from Bovine feces and Carcass

Hee-Sun Chae*, Neung-Hee Kim, Hye-Jin Han, Hong-Rak Son, Chang-Ki Kim, Sun-Heung Kim, Jung-Hark Lee, Jong-Taek Kim[1]

Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health & Environment, Seoul 427-070, Korea
[1]College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

(Received 4 September 2009, accepted in revised from 25 September 2009)

Abstract

Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) strains can cause broad spectrum of human disease, including diarrhea, hemorrhagic colitis, and the life-threatening hemolytic uremic colitis (HUS). We examined 868 samples was taken from bovine feces and carcass from January to December 2008 in Seoul. Twenty two (9.5%) shiga toxin -producing *Escherichia coli* were isolated from the 230 of bovine feces, and two (0.31%) were isolated from the 638 of carcasses. Serotype of *E. coli* isolates were O157 (10, 41.6%), O26 (10, 41.6%), O111 (1, 4.2%) and UT (3, 12.6%). In PCR, the isolates displayed three different stx gene combination (*stx1* [2, 8.4%]], *stx2* [3, 12.6%] and *stx1* and *stx2* [19, 87.5%]). The *eaeA* and *hlyA* gene were found in 11 (45.8%) of the 24 strains. *Saa* gene was present only one strains (4.2%). Toxin typing using reverse passive latex agglutination test showed the same result in VT 1. But it showed different result in VT 2. In antimicrobial susceptibility test, all isolates were sensitive to amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin and colistin. Eighteen strains (75.0%) of 24 isolates showed the multi-resistant patterns with over 3 drugs. PFGE was performed after the genomic DNA of twenty four isolates was digested with *Xba* I. the 24 isolates showed 7 (A ~ G) PFGE type.

Key word : STEC, Serotype, *Stx* gene, PCR, Antimicrobial susceptability test

서 론

*Escherichia coli*는 사람과 온혈동물의 장관 내에 주로 서식하는 정상세균총이지만 숙주와 공생관계를 유지하거나 질병을 유발한다(송 등, 2004). 특히 장관출혈성대장균(enterohemorrhagic *Escherichia coli*: EHEC)은 출혈성대장염(hemorrhagic colitis: HC)의 원인균으로서 *Shigella dysenteriae* type1이 생성하는 shiga 독소와 동일하거나 유사한 독소를 생성한다. 장관출혈성대장균의 감염은 반드시 출혈성 대장염을 나타내지 않으며, EHEC가 생성하는 독소가 verotoxin (VT)이므로 EHEC를 VTEC라고도 하며 최근에는 EHEC를 Shiga

* Corresponding author: Hee-Sun Chae, Tel. +82-2-570-3440, Fax. +82-2-570-3442, E-mail. heedoogy@seoul.go.kr

toxin producing *E. coli* (STEC)로 명명하기도 한다(김과 오, 1998).

VT는 VT1, VT2가 알려져 있으며, 특히 VT2는 몇 종류의 변이독소도 밝혀져 있다. VT는 RNA N-glycosidase 활성을 발휘하여 28S rRNA의 5 '말단에서 adenine을 유리시킴으로써 단백합성 저해작용을 나타내며, 또한 VT와 함께 다른 병원인자로는 부착성이 중요시되고 있다. EHEC는 장관상피세포에 부착에 관여하는 60MDa의 plasmid를 보유하는 부착세포에 대하여 attaching-effacing 현상을 나타내는 *eae* 유전자를 염색체에 보유하는 등 관련 병원성유전자가 알려져 있다(Clarke 등, 2003).

현재까지 EHEC의 혈청형은 100 종류 이상이 알려져 있고 EHEC의 분리빈도는 약 70%는 혈청형이 O157:H7이며 미국, 캐나다 그리고 영국에서 대규모 식중독과 연관성이 있다. 그 외에 주요한 혈청형은 O111, O26, O91, O103, O111, O128 및 O145의 빈도가 높은 것으로 보고되어 있다(Pradal 등, 2000).

VTEC는 여러 동물 특히 소의 장내에 넓게 분포되어 있으며, 시판되는 돼지고기, 닭고기 양고기 등에서도 검출되어 다른 동물도 VTEC의 매개체 역할을 할 수 있는 것으로 보고되고 있다(고와 홍, 1997). 따라서 육회나 생간 등을 날 것으로 먹는 식습관과 패스트푸드와 냉동식품의 확대 보급으로, 이 균으로 인한 발병 가능성이 충분이 잠재되어 있다.

본 연구에서는 소의 분변과 도체표면에서 PCR을 수행하여 Shiga toxin gene을 가지고 있는 *E. coli*를 분리하였으며, 독소를 생산하는 균주에 대하여 혈청학적검사를 수행하여 shiga toxin을 생성하는 *E. coli*의 혈청형의 분포를 조사하였다. 또한 분리균주에 대하여 생화학적검사, 항생제감수성검사를 통하여 균의 특성을 연구하고자 하였다. 이를 통하여 균의 오염실태를 파악하고 이로 인해 축산물의 위생관리 및 안전성을 보다 더 향상시키고 소비자에게 안전한 식육을 공급함으로서 시민보건 향상에 이바지 하고자 한다.

재료 및 방법

공시시료

2008년 1월 1일부터 현재까지 서울시소재 도축장에서 소분변 150건과 관내농가에서 채취한 분변 80건 그리고 도축된 소의 도체표면에서 638건을 easy swab으로 채취하여 20시간 내에 사용하였다.

Toxigenic *E. coli*의 선택배양 및 순수분리

소와 돼지의 도체표면을 easy swab으로 swabing한 액체 1ml를 9ml의 mEC broth (Merck, Germany)에 접종하여 36℃에서 24시간 배양하였다. 증균배양액을 CT-smac agar와 EMB agar (Merck, Germany)에 각각 도말하여 36℃에서 24시간 배양하였다. CT-smac agar에서 sorbitol을 분해하지 못하는 무색집락과 EMB agar에서 금속성의 광택을 보이는 집락을 선별하여 VT toxin 유전자에 대한 PCR을 수행한 후 PCR 양성 집락을 Tryptic soy agar (Merck, France)에 계대배양한 후 API 20E (Biomerieux, France)에 접종하고 36℃에서 24시간 배양한 후 결과를 판독하였다.

PCR을 이용한 병원성 검사

분리된 *E. coli* 분리주에서 shiga toxin gene의 병원성 여부를 확인하기 위하여 병원성과 관련 있는 *stx1, stx2, eaeA, hlyA, saa* gene에 대한 PCR을 실시하였다. template DNA는 BHI broth에 증균된 배양액을 사용하였으며, G-spin genomic DNA extraction kit(Intron, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하여 template DNA로 사용하였다. PCR primer는 *stx1, stx2, eaeA, hlyA, saa* gene의 primer를 사용하였으며 그 sequence는 Table 1과 같다. PCR은 PCR premix (Bioneer, Korea)를 사용하였으며, 1uM의 각각의 primer와 template 1μl를 넣어 PCR을 실시하였다. PCR 반응조건은 *stx1, stx2, eaeA, hlyA*의 경우 94℃, 2분간 predenaturation, 94℃ 1분간 denaturation, 63℃ 1분간 annealing, 72℃ 1분 30초간 extension과정을 35 cycle 실시하였으며, 최종 cycle의 extension은 10분으로 하였다. *saa*의 PCR 조건은 anealing 온도를 53℃로 조정하여 위의 조건과 동일하게 실시하였다. PCR 반응산물 1μl을 2.0% agarose gel에 전기 영동하여 특이밴드를 확인하였다.

혈청학적 검사

O 항혈청 응집반응: Shiga toxin을 생성하는 *E. coli* 분리주를 tryptic soy agar (Merck, Germany)에 배양한 후 신선한 집락을 식염수(0.85%)가 들어있는 tube에 부유하고 이 부유액을 100℃에서 30~60분간 boiling

Table 1. Primer sequences used in the PCR and the expected sizes of products

Primers[a]	Sequences (5'-3')	Targets	Size (bp)
stx1F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	*stx1*	180
stx1R	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
stx2F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	*stx2*	255
stx2 R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
eaeAF	GACCCGGCACAAGCATAAGC	*eaeA*	384
eaeAR	CCACCTGCAGCAACAAGAGG		
hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	*hlyA*	534
hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT		
saaF	CGT GAT GAA CAG GCT ATT GC	*saa*	119
saaR	ATG GAC ATG CCT GTG GCA AC		

시켰다. 끓인 균액을 900g에서 10분간 원심 후 상층액을 제거하였다. 남은 펠렛을 식염수(0.85%)로 Mac-Faland No. 3 탁도로 조정하고 그 균액에 최종농도가 0.5%되게 formalin을 첨가하였다. 그 다음 *E. coli* anti-serum set 1 (Denka seiken, Japan)으로 O group을 결정한 뒤 해당 혈청을 평판응집반응을 실시하여 혈청형을 판정하였다.

Toxin typing

VTEC-RPLA test kit (Denka Seiken, Japan)을 이용하여 수행하였다. 분리된 *E. coli*를 BHI agar에 접종하여 37℃에서 16시간 배양한 후 백금이로 균을 채취하여 Polymyxin B용액(5000U/ml) 1ml에 부유시킨 후 10간격으로 37℃에서 30분간 진탕 배양하였다. 그 후 900g에서 15분간 원심하여 상층액을 사용하였다. 25μl의 희석액을 96 well V bottom plate(Costar, USA)에 분주한 후 상층액을 넣어 2배에서 128배까지 계단 희석하였다. 여기에 1열에는 감작 라텍스 VT1을 2열에는 감작 라텍스 VT2를 각각 25μl씩 분주하였다. 양성대조로는 베로톡신 1형과 베로톡신 2형을 사용하였다. 감작라텍스를 분주 후 실온에서 16시간 이후에 육안 판별하였다.

항생제 내성검사

소분변에서 분리된 *E. coli* 24주를 National committee for clinical laboratory standards (NCCLS)의해 인증된 디스크 확산법에 의해 실험하였다(National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). 항생제 디스크는 BBL sensi-disc (Becton dickinson, USA)를 사용하여 amikacin (AN), amoxicillin/clavulanic acid (AMC), ampicillin (AM), carbenicillin (CB), cefaclor (CEC), cefazolin (CZ), cefotaxime (CTX), chloramphenicol (C), ciprofloxacin (CIP), colistin (CL), gentamicin (GM), kanamycin (K), streptomycin (S), sulfisoxazole (G), tetracycline (TE), trimethoprim/ sulfame-thoxazole (STX)의 16종의 항생제에 대한 내성을 검사하였다. Tryptic soy agar (Merck, Germany)에서 자란 4~5개의 집락을 mueller hinton broth (Difco, USA)에 부유시키고 Densitmat기(Biomerieux, France)로 탁도가 McFarland No. 0.5가 되도록 조정한 다음 균액을 mueller hinton agar (Difco, USA)에 도말하고 3~5분간 건조시켰다. 그 후 disc dispenser (Becton dickinson, USA)를 이용하여 디스크를 옮겨 심고 37℃에서 2일 동안 배양하여 발육억제대를 측정하였다.

Chromosomal DNA의 제한효소 처리 및 PFGE

PFGE는 Gautom 등(1997)과 Matushek 등(1996)의 방법을 변형하여 사용하였다. 순수 분리한 25개의 분리주와 표준균주를 TSA agar에 37℃, 24시간 배양시킨 후 면봉을 이용하여 cell suspension TE (Tris-EDTA) buffer (10mM Tris, pH 8.0 and 1mM EDTA, pH 8.0)에 colorimeter 15%의 투명도로 조정하여 현탁하였다. 만들어진 균 현택액 200μl에 동량의 1.0% seakem gold agarose를 균일하게 섞은 후 바로 plug mold(Bio-rod, USA)에 넣어 4℃에서 10분간 굳혔다. 이 plug를 ES buffer (0.5M EDTA, pH 9.0; 1% sodium-lauroyl sarcosine) 1.5ml와 proteinase K 40μl (20mg/ml)를 섞은 용액에 55℃에서 1시간동안 진탕처리 하였다. proteinase K가 처리된 plug는 멸균증류수로 55℃에서 10분간 진탕하여 세척한 후 plug wash TE buffer에 넣어 55℃, 30분간 4회 세척하였다. 세척이 끝난 plug는 1mm의 두께로 자른 다음 50 Unit의 *Xba* I(Takara, 15Unit/μl)로 37℃, 2시간동안 제한효소를 처리하였다. 제한효소반응이 끝나면 반응액을 제거하여 PFGE에

사용하였으며, seakem gold agarose를 사용하여 1% agaose gel에 loading하였다. 다 만들어진 gel은 전기영동 cell에 넣어 Chef mapper PFGE (Bio-rod, USA)를 이용하여 initial 2,16s, final 54.17s에서 19시간 전기영동하였으며, gradient 6.0V, angle은 각각 60도와 −60도에서 실시하였다. 전기영동이 완료되면 ethidium bromide 용액(0.5mg/ml)에 gel을 넣어 30분간 염색 후 증류수에서 24시간 탈색하였다. PFGE 결과는 Tenover 등의 방법(1995)에 따라 각 균주의 DNA 위치가 다른 절편 수에 따라서 group을 결정하였고, BioNumerics software (Core-Bio, Korea)를 이용하여 Dice법으로 dendrogram을 작성하여 균주간의 유연관계를 비교분석 하였다.

결 과

2008년 1월부터 2008년 12월까지 관내농가와 도축장에서 도축된 소의 분변 총 230건에서 *stx1*과 *stx2* gene을 이용한 PCR로 shiga toxin을 생성하는 *E. coli*를 분리한 결과 22주(9.5%)가 분리되었으며, 소의 도체표면에서는 638건 중 2주(0.31%)가 분리되었다. 각각의 분리균주에 대하여 API 20E로 생화학적 검사를 수행한 결과 24건 모두 *E. coli*로 동정되었다.

분리주에 대하여 *E. coli* antiserum set 1을 이용하여 O항원의 혈청학적 검사를 실시한 결과 24주 중 10주(41.6%)는 O157, 10주(41.6%)는 O26, 1주(4.2%)는 O111 그리고 나머지 3주(12.5%)는 UT(untypable)로 나타났다(Table 2).

PCR은 분변이나 식품에서 병원성미생물의 병원성을 판단하는데 가장 감도가 있다고 알려져 있다. 병원성 인자를 암호하는 *stx1, stx2, eaeA, hlyA, saa* 유전자를 검출하기 위하여 STEC 24주에 대하여 PCR을 실시한 결과는 Fig. 1에서와 같이 180bp, 255bp, 384bp, 534bp 그리고 119bp 크기의 증폭산물이 균주에 따라 다양하게 나타났다. *Stx* gene에 대한 PCR 결과 *stx1*만 가지고 있는 분리주는 2주(8.3%), *stx2* 유전자만을 가지고 있는 분리주는 3주(12.5%), 그리고 *stx1*과 *stx2*를 동시에 가지고 있는 분리주는 19주(79.2%)로 나타났다. *eaeA*와 *hlyA* gene의 PCR 결과 11(41.6%)주에서 *eaeA*와 *hlyA* 유전자를 가지고 있었으며, 그 중 10주가 혈청형이 O157, 1주는 UT로 나타났다. *saa* 유전자의 경우 24주 중 1주(4.1%, O26)만이 PCR 결과 검출되었다.

VTEC-RPLA test kit (Denka seiken, Japan)을 이용하여 24주의 분리균주 vero toxin형을 검사한 결과(Table 2), VT1에 대해 21 (87.5%)주가 양성반응을 보였으며, 응집역가는 1 : 4~1 : 64이었다. 이는 *stx1* gene을 PCR

Table 2. Characteristics of the *E. coli* isolates

Isolate number	Source	Serotype	PCR	PFGE type	VTEC- RPLA test result	
					VT 1	VT 2
S1	feces	O26	*stx1, stx2*	A1	1:32	–
S2	feces	O26	*stx1, stx2*	A1	1:16	–
S3	feces	O26	*stx1, stx2*	A1	1:32	–
S4	feces	UT	*stx2*	G	–	1:2
S5	feces	O26	*stx1, stx2*	C	1:32	–
S6	carcass	O26	*stx1, stx2*	A5	1:32	–
S7	feces	O111	*stx2*	B	–	–
S8	feces	O26	*stx1, stx2*	A3	1:8	–
S9	feces	O26	*stx1, stx2*	A3	1:16	–
S10	feces	O26	*stx1, saa*	F1	1:4	–
S11	feces	UT	*stx1*	F2	1:8	–
S12	carcass	O26	*stx1, stx2*	A4	1:64	–
S13	feces	O157	*stx1, stx2, eaeA, hlyA*	D1	1:32	1:32
S14	feces	O157	*stx1, stx2, eaeA, hlyA*	D1	1:32	1:32
S15	feces	O157	*stx1, stx2, eaeA, hlyA*	D1	1:16	1:32
S16	feces	O26	*stx1, stx2*	A2	1:32	–
S17	feces	O157	*stx1, stx2, eaeA, hlyA*	D1	1:16	1:32
S18	feces	O157	*stx1, stx2, eaeA, hlyA*	D1	1:16	1:16
S19	feces	O157	*stx1, stx2, eaeA, hlyA*	D2	1:64	1:16
S20	feces	O157	*stx1, stx2, eaeA, hlyA*	D2	1:64	1:16
S21	feces	O157	*stx1, stx2, eaeA, hlyA*	D2	1:32	1:8
S22	feces	O157	*stx1, stx2, eaeA, hlyA*	D2	1:64	1:8
S23	feces	O157	*stx1, stx2, eaeA, hlyA*	D2	1:32	1:8
S24	feces	UT	*stx2, eaeA, hlyA*	E	–	1:16

한 결과와 일치하였다. VT 2는 12주(50.0%)가 응집역가 1:2~1:32로 나타났으나, *stx2* gene에 대한 PCR 결과 22주가 양성밴드를 보여 RPLA와는 큰 차이를 보였다(Table 2).

항생제 검사를 실시한 결과, amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, colistin에 24주 모두 감수성을 보였으며, 내성이 많이 관찰되는 항생제는 streptomycin 19주(80.0%), sulfisoxazole 17주(70.8%), tetracycline 16주(66.0%), kanamycin (62.5%), ampicillin 14주(58.3%), carbenicillin (54.1%)로 나타났다(Table 3). 다제내성 양상을 보면 18주(75.0%)가 세 가지 이상의 항생제에 내성을 보였다. 1주(4.1%)가 각각 K, S, G, TE; AM CB, S, G, TE (I); AM, CB, S, TE; AM, CB, S; C, K, S, G, TE에 내성을 보였으며, 6주(25.0%)는 AM, CB, K, S, G, TE에, 2주(8.3%)는 K, S, G, TE, STX에, 5주(20.8%)는 AM, CB, C, GM, K, S, G, TE, STX에 내성을 보였다(Table 4).

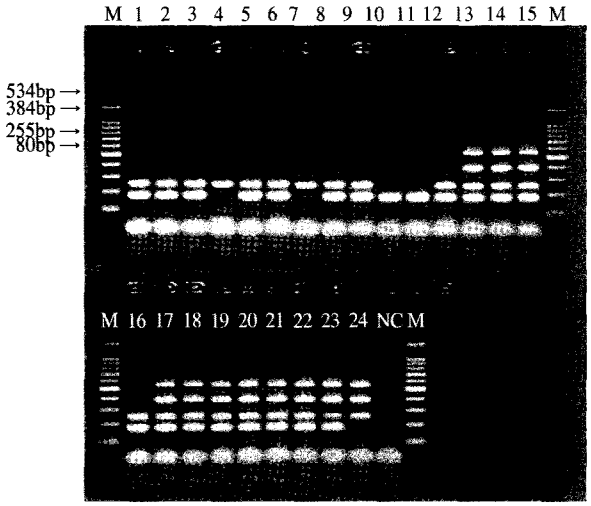

Fig. 1. Patterns of the multiplex PCR of 24 of *E. coli* isolates. Lane M; 100bp DNA ladder, Lanes 1 to 24; *E. coli* isolates, Lane NC; negative control.

분리된 24주의 *E. coli*에 대해 *Xba* I restriction enzyme으로 처리 후 PFGE를 실시한 결과 Fig. 1과 같이 17~19개의 분획으로 나타났다. 85%의 상동성 기준으로 PFGE dendrogram을 그린 결과 7개의 PFGE type (A~G)으로 나뉘었다(Fig. 2). 혈청형별로 상동성을 살펴보면 O26의 경우 10개의 균주 중 8주가 86%이상의 상동성을 보였으며, *saa* gene을 가지고 있는 O26은 70%의 상동성을, 다른 한주는 76%의 상동성을 보였다. O157의 경우 10개 균주가 85%이상의 상동성을 보였다. 혈청형에 걸리지 않은 UT (untypable) 3주의 경우 1주가 O157과 유사한 병원성 인자를 가지고 있었으며, PFGE에서도 O157과 79%의 상동성을 보였다.

고 찰

세계적으로 shiga toxin producing *E. coli* (STEC)는 소를 사육하는 모든 농장에서 분리되며, 소에서 장염을 발병시키는 주요 병원소로 알려져 있다. 국내외적으로 STEC의 분리와 특성에 관한 활발한 연구가 이루어져 있고, 분리율은 동물이나, 외적환경에 따라 다양하게 보고되어 있다(Clarke 등, 2003; 임 등, 2006; Fukuyama 등, 2003). 임 등(2006)은 송아지 설사분변으로부터 STEC를 분리한 결과 255건 중 PCR로 26건 (10%)을 분리하였고, Aida 등(2007)은 소에서 10%의

Table 3. Antimicrobial susceptivility of 24 strains of *E. coli* isolates

Antimicrobial agents	Disc potency (μg)	No. of isolates (%)		
		Resistant	Intermediate	Susceptiblae
Amikacin	30	0	0	24 (100)
Amoxicillin/Clavulanic acid	20/10	0	0	24 (100)
Ampicillin	10	14 (58.3)	0	10 (41.7)
Carbenicillin	100	13 (54.1)	0	11 (45.9)
Cefaclor	30	0	0	24 (100)
Cefazolin	30	0	0	24 (100)
Cefotaxime	30	0	0	24 (100)
Chloramphenicol	30	6 (30)	0	18 (70)
Ciprofloxacin	5	0	0	24 (100)
Colistin	10	0	0	24 (100)
Gentamicin	10	5 (20)	0	19 (80)
Kanamycin	30	15 (62.5)	1 (4.1)	8 (33.4)
Streptomycin	10	19 (80)	5 (20)	0
Sulfisoxazole	250	17 (70.8)	0	7 (29.2)
Tetracycline	30	16 (66.0)	3 (14.0)	5 (20)
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	1.25/23.75	7 (29.2)	1 (4.1)	16 (66.7)

STEC을 분리하였다. Pradel 등(2000)은 소분변에서 34%, 소고기에서 4%가 분리되었다고 보고한 바 있으며, Furuhata 등(1999)은 27.1%를 분리하였다. 본 연구에서는 소 분변에서 9.5%의 분리율을 보여, 우리나라의 임 등(2006)의 결과와 Aida 등(2007)의 결과와는 비슷한 분리율을 나타냈으나, Furuhata 등(1999)과 Pradel 등(2000)의 결과보다는 훨씬 낮은 분리율을 보였다. 이와 같이 분리율이 차이가 나는 이유는 실험자나 분리지역 그리고, 분리방법에 따라 차이가 있을 것으로 사료된다.

Table 4. Multiple drug resistant patterns in *E. coli* isolates

Multiple drug resistance pattern	No. of isolates (%)
AM, CB, K, S, G, TE	6 (25.0)
K, S, G, TE	1 (4.1)
AM, CB, S, G, TE (I)	1 (4.1)
AM, CB, S, TE	1 (4.1)
K, S, G, TE, STX	2 (8.3)
AM, CB, S	1 (4.1)
AM, CB, C, GM, K, S, G, TE, STX	5 (20.8)
C, K, S, G, TE	1 (4.1)
Total	18 (75.0)

*E. coli*의 혈청형은 O항원이 173종, H항원이 60종이 알려져 있으며 O와 H 혈청형을 조합하면 약 2,000여 개의 혈청형이 분류되며, 이 중 STEC의 혈청형은 지금까지 100종류 이상이 알려져 있다(Kamali, 1989). STEC에 대한 연구 및 식중독 발생사례는 과거에는 대장균 O157:H7에 의한 경우가 대부분이었으나, 최근 그 외의 혈청형인 O111, O26, O104 등에 의한 발생사례가 빈번하게 보고되어 O157외의 혈청형의 분포조사

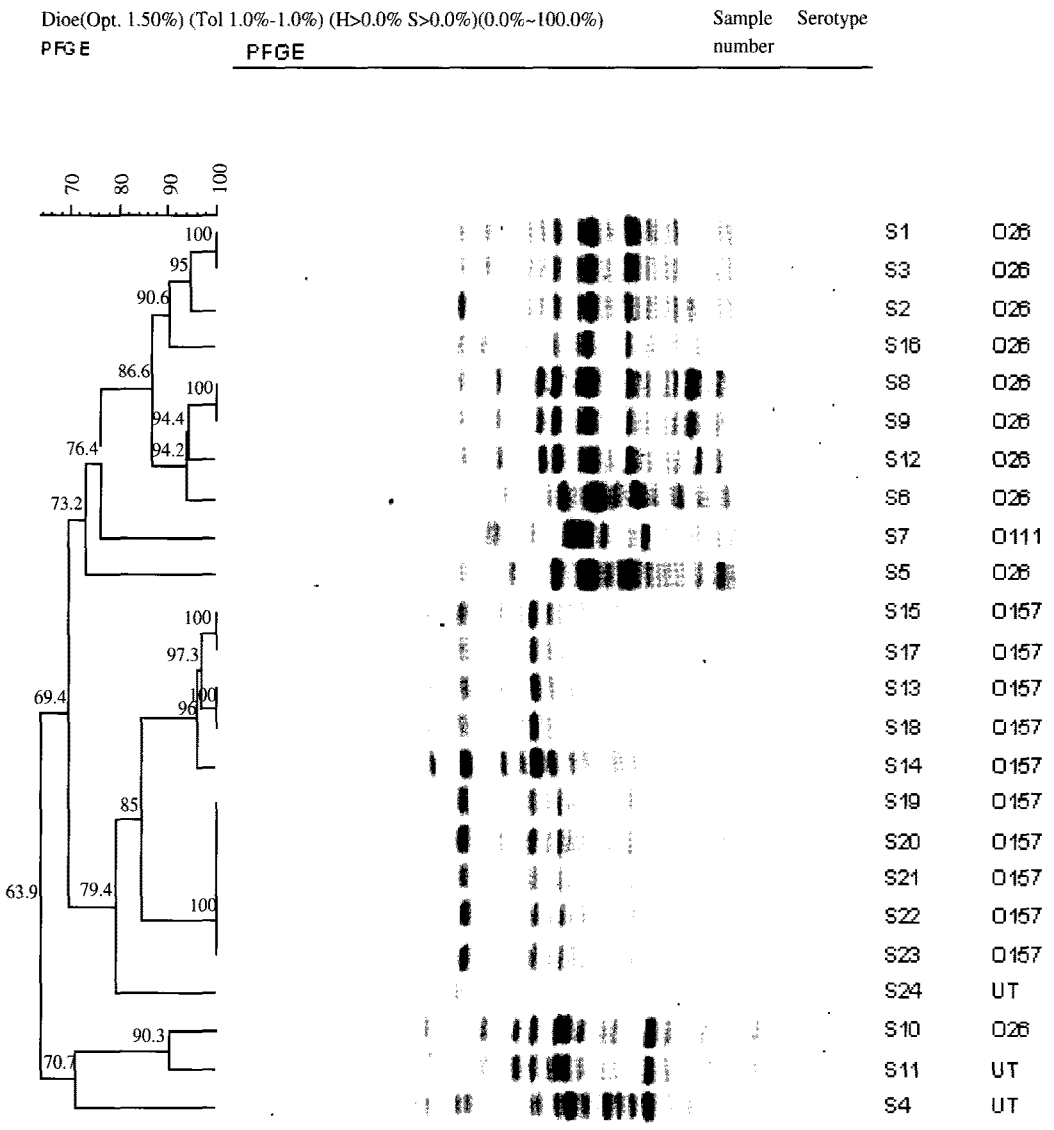

Fig. 2. Dendrogram showing the clustering of PFGE patterns for 24 *E. coli* isolates.

와 연구가 요구되고 있다(곽효선 등, 2000; Toma 등, 2004).

Furuhata 등(1999)은 68주의 STEC 혈청형을 분류해 본결과 O111, O2, O82, O153 등 9가지 혈청형으로 나타났으며, Pradal 등(2000)은 330주의 STEC을 분리하여 혈청형을 분석한 결과 O113, O6, O171, O46 등 13개의 혈청형으로 나뉘었다고 보고한바 있다. 본 연구에서는 24주의 STEC 분리주에 대한 혈청학적검사결과 O157, O111, O26, UT형으로 나뉘었으며, 균주의 수가 적고 검체의 종류가 다양하지 않아 혈청형이 다양하게 나오지 않은 것으로 보이며, 동물의 종류와 검체 그리고 균주 수에 따라 혈청형이 여러 가지로 나뉘는 것을 알 수 있다.

PCR은 분변이나 식품에서 병원성미생물의 병원성을 판단하는데 가장 감도가 있다고 알려져 있으며, *Stx* gene의 PCR을 통하여 국내외 STEC의 검색과 연구가 이루어졌다(송 등, 2004; Cooksen 등, 2006; Pradel 등, 2000). 그러나 STEC은 shiga toxin만으로 질병을 일으키기 어렵기 때문에 다른 병원성 존재여부를 검사해야만 한다. Paton 등(2002)은 STEC에서 사람에게 임상적으로나 역학적으로 치명적인 질병을 일으키는 균에 대한 중요한 정보를 수집하기 위하여 LEE pathogenic island를 encoding 하는 *eaeA* 유전자와 *hlyA*유전자의 보유여부를 확인하는 것이 중요하다고 언급하였고, Jekins 등(2003)은 LEE-negative STEC균주에서 large virulence plasmid를 암호화하는 *saa* gene이 사람에서 병원성이 있는 중요 병원성인자일 가능성이 높다고 보고하였다. 본 실험에서는 *Stx* gene을 가진 24주에 대하여 *eaeA, hlyA* 그리고 *saa* gene의 PCR 결과 11(41.6%)주에서 *eaeA*와 *hlyA* gene를 가지고 있었으며, *saa* gene의 경우 1주(4.1%)만이 검출되었다. 따라서 24주 중 12주(50%)가 사람에게 역학적으로 HUS같은 치명적인 질병을 일으킬 가능성이 있다고 보여지며, 이러한 감염을 막기 위하여 STEC에 대한 지속적인 감시와 분변에 의한 지육오염을 철저히 막아야 할 것으로 사료된다.

Kamali 등(1998)은 VTEC-RPLA법에 의해 shiga toxin 1과 2를 검정하였고, 이 방법이 vero cell assay 보다 빠르고 간편하게 독소형과 역가를 측정하는데 유용한 방법이라 하였다. 본 연구에서는 VTEC-RPLA test kit (Denka seiken, Japan)을 이용하여 24주의 분리균주 vero toxin형을 검사한 결과, VT1에 대해 21(87.5%)주가 양성반응을 보였으며, 응집역가는 1 : 4～1 : 64이었고, *stx1* gene을 PCR 한 결과와 일치하였다. VT 2에 대해서는 12주(50.0%)가 1 : 2～1 : 32로 나타났으나, *stx2* gene에 대한 PCR 결과 22주가 양성밴드를 보여 RPLA와는 큰 차이를 보였다. 이는 Beutin 등(1993)이 VT 1 toxin의 경우 PCR과 RPLA의 결과가 일치하였으나, VT 2 toxin의 경우 *stx2* gene에서 RPLA검사결과 일부가 검출되지 않았다고 보고한 실험결과와 비슷한 양상을 보였다. 또한 정 등(1999)은 독소원성대장균에서 장독소 검색을 위한 RPLA와 PCR 기법의 감도를 비교한 결과 PCR이 DNA 농도가 1ng/ml까지 검출이 가능하여 RPLA보다 독소를 검출하는데 감도가 훨씬 높다고 보고한 바 있다. VTEC-RPLA는 빠르고, 쉬운 독소형 스크리닝 시험법이지만 보다 정확한 *Stx*의 검출과 typing을 위하여, 감도가 높은 PCR방법과 RPLA 법으로 검사를 동시에 수행하는 것이 효과적일 것으로 사료된다.

가축에서의 질병의 치료, 예방 목적 및 동물의 생산성을 증가시키기 위한 목적의 성장촉진제로 투여한 항생제가 최근 들어 오 · 남용에 의한 부작용으로 잔류문제나 내성균의 출현 및 전파 등의 축산물 안전성에 대한 중요한 문제를 야기하고 있다(임 등, 2006). Meng 등(1998)은 소와 사람과 식품에서 *E. coli* O157:H7을 분리하여 항생제 감수성검사를 실시한 결과 분리주에서 24%가 최소한 1가지 이상의 약제에 내성을 보였으며, 소에서 분리된 균주에서 내성율이 34%로 가장 높게 나타났다고 보고하여, 가축에서의 성장촉진과 치료목적으로 투여한 항생제가 소에서의 내성율을 높인다고 보고하였다. 임 등(2006)은 분리주의 대부분이 carbenicillin과 ampicillin에 높은 내성을 보인다고 보고하였으며, Schroeder 등(2002)은 tetracycline과 sulfamethoxazole에서 높은 내성을 보였고, Threlfall 등(2000)은 streptomycin, sulphonamides 그리고 tetracyclines에서는 내성율이 높게 나타난다고 보고하였다. 본 연구에서도 streptomycin, sulfisoxazole, tetracycline, kanamycin, ampicillin, carbenicillin에서 내성율이 높게 나타나, 국내외 연구 결과와 비슷한 양상을 보였다. 3가지 이상의 약제에 다재내성을 보인 균주의 대부분은 streptomycin-sulfisoxazole-tetracycline의 패턴을 보이며 이는 Meng 등은 연구결과와 거의 일치하였다.

PFGE는 제한효소로 자른 chromosomal DNA를 주기적으로 변화되는 전기 자기장을 발생시켜, 그 이동상을 보는 방법으로 매우 높은 변별력을 보여 다양한 종류의 세균에 대한 역학연구에 활용되고 있다 (Tenover 등, 1995). 최근에는 식품과 환자에서 분리된

균주간, 동물분리주와 사람분리주, 같은 bioserotype을 가진 균주, 혈청형이 분리되지 않은 병원성 균주 그리고 균주의 molecular typing 및 특성 등에 대한 유전학적 연관성 및 상동성을 규명하는데 유용하게 쓰이고 있다(Cookson 등, 2006; Khan 등, 2002).

본 연구에서는 분리된 24주의 *E. coli*에 대해 *Xba* I restriction enzyme으로 처리 후 PFGE를 실시한 결과 85%의 상동성 기준으로 PFGE dendrogram을 그린 결과 7개의 PFGE type (A～G)으로 나뉘었다. 혈청형별로 상동성을 살펴보면 O26의 경우 10개의 균주 중 8주가 86%이상의 상동성을 보였으며, *saa* gene을 가지고 있는 O26은 70%의 상동성을, 다른 한주는 76%의 상동성을 보였다. O157의 경우 10개 균주가 85%이상의 상동성을 보였다. O157의 경우 동일한 균주가 많이 관찰되었는데, 이는 같은 시기의 동일한 농장에서 출하된 소에서 분리한 것으로, 농장 자체에 균이 오염되어 같은 균을 보균하고 있다가 검출된 것으로 보인다. 혈청형에 걸리지 않은 UT (untypable) 3주의 경우 1주가 O157과 유사한 병원성 인자를 가지고 있었으며, PFGE에서도 O157과 79%의 상동성을 보였다. 이와 같이 PFGE typing은 균주의 serotype이나 병원성유전자의 보유에 따라 균주간 변별력을 보여 molecular typing 방법으로 유용한 tool이라 사료된다. 이는 PFGE가 균의 RAPD처럼 부분적이거나 랜덤한 부분을 가지고 typing을 하는것이 아니라 균의 전체적인 Chromosome을 가지고 typing을 실시하기 때문에 변별력이 좋은 것으로 사료된다. Khan 등(2002)도 RAPD와 PFGE로 molecular typing을 실시하였는데 RAPD는 다른종류의 샘플에서 분리된 균주와 다른 병원성인자를 보유한 균주사이에 동일한 profile을 보인 반면 PFGE의 결과 별개의 profile을 형성하여 이 방법이 변별력이 높다고 보고한바 있다.

이 연구를 통하여 shiga toxin을 생성하는 *E. coli*의 분리율과 균주의 혈청형 등 균주의 특성을 알아보았으며, 앞으로도 사람과 다양한 축종에서 분리된 균주 간에 비교실험을 한다면 사람 감염간에 역학관계를 규명하는데도 도움이 되리라 생각한다. 특히 우리나라는 육회 및 간 등을 날것으로 먹는 식습관이나 소고기의 소비량이 증가함에 따라 이 균에 의한 감염가능성이 높다고 사료된다. 따라서, 식중독의 예방 및 안전한 축산물의 생산을 위하여 유통되는 식육에 대한 STEC의 지속적인 검사와 위생적인 분뇨처리 및 축사관리 그리고 도축장의 위생관리의 강화에 더욱 힘써야 할 것으로 사료된다.

결 론

Escherichia coli (*E. coli*)는 건강한 동물의 장내에 존재하기도 하지면, Toxigenic *E. coli*의 경우 오염된 식품을 통해 사람에서 식중독을 일으키기도 한다. 본 연구에서는 소와 분변과 도체표면에서 VT-toxin을 생성하는 대장균을 분리하여 그 혈청형을 분리하였다.

관내농가와 도축장에서 도축된 소의 분변 총 230에서 *stx1*과 *stx2* gene을 이용한 PCR로 shiga toxin을 생성하는 *E. coli*를 분리한 결과 총 22건(9.5%)을 분리하였으며, 도축되는 소의 도체표면에서는 638중에서 2건(0.31%)이 분리되었다. 분리된 균주에 대하여 API 20E로 생화학 검사를 수행한 결과 24건 모두 전형적인 *E. coli*로 동정되었다. 분리된 균주로 혈청학적 검사를 실시한 결과 10건(41.6%)은 O157, 10건(41.6%)은 O26, 1건(4.2%)은 O111, 나머지 3건(12.6%)은 UT (untypable)로 나타났다.

Shiga toxin gene을 검출하기 위한 PCR을 수행한 결과 PCR 결과 *stx1*만 가지고 있는 분리주는 2주(8.3%), *stx2* 유전자만을 가지고 있는 분리주는 3주(12.5%), 그리고 *stx1*과 *stx2*를 동시에 가지고 있는 분리주는 19주(79.2%)로 나타났다. 실제 독소의 생성능과 역가를 확인하기 위하여 VT toxin에 대한 RPLA를 실시한 결과 VT1에 대해 21 (87.5%)주가 양성반응(1 : 4～1 : 64)을 보였으며, *stx1* gene을 PCR 한 결과와 일치하였다. VT2는 12주(50.0%)가 응집역가가 1 : 2～1 : 32로 나타났으나, *stx2* gene에 대한 PCR 결과 22주가 양성밴드를 보여 RPLA와는 큰 차이를 보였다

항생제 검사를 실시한 결과, amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, ciprofloxacin, colistin에 24주 모두 감수성을 보였으며, 내성이 많이 관찰되는 항생제는 streptomycin 19주(80.0%), sulfisoxazole 17주(70.8%), tetracycline 16주(66.0%), kanamycin (62.5%), ampicillin 14주(58.3%), carbenicillin (54.1%)로 나타났다. 3가지 이상의 다제내성 양상을 보인 분리주는 18주(75.0%)였다.

참 고 문 헌

곽효선, 차진, 강길진, 김훈, 박선희, 김창민. 2000. 국내 유통식품

에서 분리된 verotoxin 생성 *Escherichia coli*의 특성. 식품위생안전학회지 15(3): 241-247.

고주언, 홍종해. 1997. 도체표면의 분변오염과 verotoxin 생성 *Escherichia coli* O157:H7 분리에 관한연구. 한국식품위생학회지 12(1): 78-82.

김영부, 오양호. 1998. Polymerase chain reaction 법 및 혈중항체를 이용한 vero 독소생성대장균의 검출. 대한미생물학회지 33(1): 99-110.

송영환, 김지영, 채미경, 박창식, 김명철, 전무형. 2004. 도축돈 장분변으로부터 shiga toxin-producing *Escherichia coli*의 분리와 성상. 대한수의학회지 44(4): 551-559.

임금기, 강문일, 김상기, 남경우, 박현주, 박진량, 조경오, 이봉주. 2006. 송아지 설사분변으로부터 shiga toxin-producing *Escherichia coli*의 분리 및 특성규명. 대한수의학회지 46(2): 135-142.

정희곤. 1999. 독소원성대장균이 생산하는 장독소의 검색을 위한 RPLA 법과 PCR기법의 감도비교. 한국환경위생학회지 25(1): 6-9.

Aidar UL, Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Leomil L, Dahbi G, Mora A, Onuma DL, Silveira WD, Pestana AF. 2007. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from calves in Sao paulo, Brazil. *Int J Food Microbiol* 115(3): 297-306.

Beutin L, Geier D, Steinruck H, Zimmermann S, Scheuts F. 1993. Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *J Clin Microbiol* 31(9): 2483-2488.

Clarke SC, Haigh RD, Freestone PP, Williams PH. 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* 16(3): 365-378.

Cookson AL, Croucher D, Pope C, Bennett J, Tomson CF, Attwood GT. 2006. Isolation, characterization and epidermiological accessment of shiga toxin producing *Escherichia coli* isolates from Newzealand. *J Clin Microbiol* 44(5): 1863-1866.

Furuhata K, Sakata S, Okamoto T, Yamamoto S, Honda M, Kai A, Itoh T, Hara M, Tabuchi K, Fukuyama M. 1999. Prevalence and serotypes of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolates from diary cattle. *Jpn Assoc Infect Dis* 73(5): 445-501.

Fukuyama M, Furuhata K, Oonaka K, Sakata S, Hara M, Kakuno Y, Itoh T, Kai A, Obata H, Watanabe T. 2003. Isolation and serotypes of vero toxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) from pigions and crows. *Jpn Assoc Infect Dis* 77(1): 5-9.

Gautom RK. 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of Escherichia coli O157:H7 and other gram-negative organism in 1 day. *J Clin Microbiol* 35(11): 2977-2980.

Jenkins C, Perry NT, Cheasty T, Shaw DJ, Frankel G, Dougan G, Gunn GJ, Smith HR, Paton AW, Paton JC. 2003. Distribution of the saa gene in strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli* of human and bovine origins. *J Clin Microbiol* 41(4): 1775-1778.

Kamali MA. 1998. Infection by verocytotoxin-producing Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev* 2(1) : 15-38.

Khan A, Das SC, Ramamurthy T, Sikdar A. Khanam J, Yamasaki S, Takeda Y, Balakrish NG. 2002. Antibiotic resistance, virulence gene, and molecular profiles of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from diverse sources in Calcutta, India. *J Clin Microbiol* 40(6): 2009-2015.

Matushek MG, Bonten MJM, Hayden MK. 1996. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 34(10): 2598-2600.

Meng J, Zhao S, Doyle MP, Joseph SW. 1998. Antibiotic resistance of *Escherichia coil* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. *J Food Prot* 61(11): 1511-1514.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals : Approved standard. 2eds. NCCLS. Wayne: M31-A2.

Paton AW, Paton JC. 2002. Direct detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1, stx2, eae, ehxA*, and saa. *J Clin Microbiol* 40(1): 271-274.

Pradal N, Livrelli V, Livrelli V, Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheutz F, Sirot J, Joly B, Forestier C. 2000. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in france. *J Clin Microbiol* 38(3): 1023-1031.

Schroeder CM, Zhao C, Debroy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, Wagner DD, McDermott PF, Walker RD, Meng J. 2002. Antimicrobiol resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from humans, cattle, swine and food. *Appl Environ Microbiol* 68(2): 576-581.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis : Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33(7): 2233-2239.

Threfall EJ, Ward LR, Frost JA, Willshaw GA. 2000. The emergene and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *Int J Food Microbiol* 62(1): 1-5.

Toma C, Espinosa EM, Song T, Miliwebsky E, Chinen I, Iyoda S, Iwanaga M, Rivas M. 2004. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 42(11): 4937-4946.