

자돈 분변 유래 병원성 대장균의 병원성 인자 및 항생제 내성 양상

신현숙 · 김근호 · 서진성 · 김영욱 · 임숙경 · 정병열*

농림축산검역본부 세균질병과

Virulence factors and antimicrobial resistance patterns of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fecal samples of piglets

Hyun Sook Shin, Keun-Ho Kim, Jin Sung Seo, Young Wook Kim, Suk-Kyung Lim, Byeong Yeal Jung*

Bacterial Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

Pathogenic *Escherichia coli* is the cause of a wide range of diseases in pigs, including diarrhea, edema disease, and septicemia. Diarrhea caused *E. coli* may result in significant economic losses, making pathogenic *E. coli* an important pathogen for the swine industry. This study investigated the prevalence of virulence factor genes, antimicrobial resistance phenotypes, and resistance genes in *E. coli* isolated from feces of piglets in Korea between 2017 and 2020. As a result, 119 pathogenic *E. coli* isolates were obtained from 601 fecal samples. The F4 adhesin gene and the STb enterotoxin gene were commonly present in *E. coli* isolated from diarrhea samples. The dominant virulotypes of isolates from diarrhea samples were STb, Stx2e, and F4:LT:STb. More than 80% of the screened isolates were resistant to ampicillin, sulfisoxazole, chloramphenicol, or tetracycline. To confirm the resistance mechanisms for β -lactam or quinolone, we investigated the genotypic factors of resistance. Each of the ceftiofur-resistant *E. coli* produced an extended-spectrum β -lactamase encoded by *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-27}, and *bla*_{CTX-M-55}. And all ciprofloxacin-resistant *E. coli* harbored mutations in quinolone-resistance-determining-regions. In addition, some of the ciprofloxacin-resistant *E. coli* contained the plasmid-mediated-quinolone-resistance genes such as *qepA*, *qnrB1*, or *qnrD*. This study has confirmed that the F4 fimbria and the STb enterotoxin are the most predominant in pathogenic *E. coli* isolated from piglets with diarrhea in Korea and there is a great need for responsible and prudent use of antimicrobials to treat colibacillosis.

Received February 16, 2023

Revised March 16, 2023

Accepted March 16, 2023

Corresponding author:

Byeong Yeal Jung

E-mail: jungby@korea.kr

https://orcid.org/0000-0003-3229-8932

Key Words: Piglet, Diarrhea, *E. coli*, Virulotype, AST

서론

대장균은 신생자돈이나 이유자돈의 설사, 부종, 패혈증 등 다양한 질병을 유발한다. 특히 설사와 부종병은 발병률과 폐사율이 높을 뿐 아니라, 증체율 감소 등으로 경제적 손실을 초래하므로 양돈산업에서 관심이 매우 크다(Zimmerman 등, 2019; Misumi 등, 2021).

이러한 병원성 대장균은 독소 산생능, 부착인자 등 질병을 유

발하는 방식에 따라서 장독소형 대장균(ETEC), 부종병대장균(EDEC)과 장출혈성대장균(EHEC)을 포함하는 시가독소생성 대장균(STEC), 장병원성 대장균(EPEC), 장외병원성 대장균(ExPEC)으로 구분한다. ETEC가 산생하는 장독소로는 heat-labile enterotoxin (LT), heat-stable enterotoxin (ST), enteroaggregative heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) 등이 알려져 있으며 이들 장독소는 돼지에서 분비성 설사를 유발하여 심각한 탈수와 전해질 불균형에 이르게 한다. 또한 설사증을 보이는 돼

지에서 EDEC가 분리되기도 하는데, EDEC가 산생하는 shiga toxin 2e (Stx2e)는 순환계로 흡수되어 모세혈관의 손상을 일으켜 부종병을 유발한다(Dubreuil 등, 2016; Zimmerman 등, 2019; Misumi 등, 2021).

ETEC와 EDEC는 일반적으로 부착인자를 이용하여 숙주의 소장 상피세포에 부착한 후 독소를 산생하기 때문에 숙주에서 부착인자에 대한 수용기의 존재가 감수성을 결정하는 것으로 보고된다. 부착인자 중 선모는 F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18, F41 등이 주로 알려져 있는데, 돼지에서 F4의 수용기는 모든 일령에서 발현되고 F5, F6, F41의 수용기는 출생 후부터 발현이 점차 감소하는 반면 F18의 수용기는 이유 후부터 발현된다. 따라서 F5, F6, F41 대장균은 주로 포유자돈에서 설사를 유발하고 F18 대장균은 이유자돈에서, F4 대장균은 모든 일령의 돼지에서 설사를 유발할 수 있는 것으로 보고된다(Dubreuil 등, 2016; Zimmerman 등, 2019).

선모를 이용한 백신은 대장균의 부착을 방해하는 항체를 유도하므로 설사 예방에 매우 유용한 것으로도 알려져 있다(Dubreuil 등, 2016; Zimmerman 등, 2019). 따라서 설사증을 예방하기 위한 전략으로 병원성 대장균의 부착인자에 대한 조사가 수행되고 있다. 국내 연구에서는 이전에 F5가 유행하다가, 2000년대 후반부터 F4가 우세형이 되었으며, 최근에는 F18과 함께 F4도 유행하는 것으로 확인된다. 부착인자와 더불어 독소 유전자의 유행정도 함께 조사되는데 과거에는 EAST1, STb, LT가 우세하였으나, 최근에는 STb, EAST1, Stx2e의 검출률이 높았다(Byun 등, 2013; Do 등, 2020). 해외 연구에서는 일본에서는 부착인자로 F4가 유행했었고, 미국에서는 부착인자로 F4가, 독소로는 STb, LT가 유행했었다고 보고된 바 있다(Katsuda 등, 2006; Zhang 등, 2007). 그리고 유럽에서는 F4와 EAST1 또는 STb가 우세하였다(Luppi 등, 2016; Brand 등, 2017; Vidal 등, 2020).

한편 대부분의 양돈장에서는 대장균증뿐만 아니라 여러 질병의 치료를 위하여 다양한 항생제를 사용하고 있다. 그러나 장기간의 항생제 사용과 오남용에 의한 내성균의 출현은 양돈산업뿐 아니라 공중보건 측면에서도 매우 중요한 문제를 가져온다. 따라서 전 세계 국가들은 WHO를 중심으로 항생제 내성에 대응하기 위한 글로벌 행동계획을 수립하여 추진하고 있으며 우리나라에서도 범부처 차원의 「국가 항생제 내성 관리대책」을 수립하고 수의 분야에서 항생제 내성률을 조사하여 공표하고 있다. 이 조사에 따르면 국내 돼지 유래 대장균의 70% 이상이 ampicillin, chloramphenicol, sulfisoxazole, streptomycin, tetracycline에 내성이 있었다(식품의약품안전평가원 등, 2021). 유럽

식품안전청 보고에서도 전 세계에서 돼지로부터 분리된 대장균의 70% 이상이 aminopenicillin, sulfonamide, tetracycline계 항생제에 내성임을 확인할 수 있다. 그리고 아시아에서 3세대 cephalosporin, flouroquinolone계 항생제에 대한 대장균의 내성률이 유럽 등 다른 대륙에 비하여 높다고 보고하였다(Nielsen 등, 2021).

이러한 내용을 배경으로 본 연구에서는 양돈장 자돈의 분변에서 대장균을 분리하여 우점하는 선모 및 ETEC 장독소 유전자의 분포상황을 조사하였다. 아울러 분리균주에 대한 항생제 내성 양상 파악과 더불어 3세대 cephalosporin과 flouroquinolone 내성유전자를 분석하였다.

재료 및 방법

시료 내역

2017년부터 2020년 7월까지 국내 25개의 양돈장(경기 2, 경남 13, 경북 6, 전남 1, 제주 2, 충남 1)에서 36회에 걸쳐 포유자돈(n=180)과 이유자돈(n=421)으로부터 총 601개의 분변샘플을 수집하였다. 분변은 채취한 당일 냉장 상태로 운반하여 균 분리 재료로 사용하였다. 분변은 Bristol stool chart (Heaton과 Lewis, 1997)에 따라 설사(n=440)와 비설사(n=161)로 구분하였다.

대장균 분리 및 동정

채취한 분변은 MacConkey agar plate (BD, France)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 이후 핑크색 집락을 Eosin Methylene Blue agar (Oxoid, England)로 계대하여 37°C, 24시간 배양한 후 급속성 광택의 의심집락을 선발하고 Vitek-MS (BioMerieux, Germany)로 대장균을 동정하였다. 동정된 대장균은 blood agar plate (Synergy Innovation, Korea)에 희석접종하여 용혈성을 확인하였다.

선모 및 독소 유전자 검출

분리된 대장균에 대하여 선모 유전자 5종(F4, F5, F6, F18, F41)과 독소 유전자 4종(LT, STa, STb, Stx2e)을 Zhang 등(2007)의 방법을 응용하여 PCR 방법으로 검출하였다. 검사한 선모 및 독소 유전자가 한 종류 이상 검출되거나 용혈성을 갖는 경우 병원성 대장균으로 분류하였다.

Table 2. Prevalence of virulence factors of pathogenic *E. coli* isolated from fecal samples of piglets

Sample type (n)	No. (%) of isolates with indicated fimbria or toxin genes										
	Fimbria						Toxin				
	-*	F4	F5	F6	F18	F41	-	LT	STa	STb	Stx2e
Diarrhea (92)	43 (46.7)	27 (29.3)	7 (7.6)	0	17 (18.5)	0	11 (12.0)	19 (20.7)	26 (28.3)	52 (56.5)	18 (19.6)
Non-diarrhea (27)	11 (40.7)	2 (7.4)	2 (7.4)	0	12 (44.4)	0	10 (37.0)	3 (11.1)	3 (11.1)	9 (33.3)	7 (25.9)
P-value	0.582	0.020	0.972	n.a. [†]	0.006	n.a.	0.003	0.261	0.068	0.034	0.476

*Not detected, [†]Not applicable.

Table 3. Prevalence of toxin and fimbrial genes carried by pathogenic *E. coli* isolated from diarrhetic piglets

Fimbria	Distribution of the toxin genes										
	-*	LT	STa	STb	Stx2e	LT:STb	STa:STb	STa:Stx2e	STb:Stx2e	STa:STb:Stx2e	Total
-	2 [†]	3	2	17	12	1	4	0	1	1	43
F4	2	0	0	4	0	11	6	0	0	0	23
F5	1	0	4	1	0	0	0	0	0	0	6
F18	6	0	3	0	1	3	0	3	0	0	16
F4:F5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
F4:F18	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	3
Total	11	4	11	22	13	15	11	3	1	1	92

*Not detected, [†]Number of hemolytic *E. coli* without fimbria and toxin genes.

Stx2e (n=12, 13.0%), F4:LT:STb (n=11, 12.0%) 순으로 분포하였다(Table 3).

항생제 감수성 시험과 다제 내성 분석

설사 시료 분리주(n=46)들은 주로 FIS (91.3%), CHL (87.0%), AMP (84.8%), TET (82.6%), STR (71.7%)에 내성을 나타내었고, CAZ, FEP, MEM에는 모두 감수성이었다. 비설사 분리주 (n=23)들은 AMP (100%), CHL과 TET (95.7%), FIS (91.3%), STR과 SXT (65.2%)에 내성이었고, AMC, CAZ, FEP, FOX, MEM에는 모두 감수성이었다(Table 4).

설사 시료 분리주와 비설사 시료 분리주 간 각 항생제에 대한 내성률에는 유의한 차이가 없었다(P>0.05). 그러나 시험한 농도 범위 내에서 설사 시료 분리주의 CAZ, XNL, FEP, FOX, GEN, COL, CIP에 대한 MIC₉₀ 수치가 비설사 분리주에 대하여 2~16 배 높게 나타났다(Table 4).

분리주의 다제 내성 패턴을 분석하기 위해 항생제 가짓수 별로 분리주에서 가장 빈번하게 나타난 내성 표현형을 조사하였다 (Table 5). 4종의 항생제 조합에서는 설사(33/46, 71.7%), 비설사(19/23, 82.6%) 동일하게 CHL-FIS-TET-AMP에 내성을 나타내는 유형이 가장 많았다.

내성유전자 검사

3세대 cephalosporin계 항생제인 XNL에 내성인 병원성 대장균은 총 7주였으며, 검출된 bla_{CTX-M} 변이형은 bla_{CTX-M-14}, bla_{CTX-M-27}, bla_{CTX-M-55}였다. 이들은 모두 동일 계열인 CAZ에는 감수성이었으며 aminopenicillin계 AMP에 내성이었다. β-Lactam에 속하지 않는 항생제로는 공통적으로 STR에 내성이었다(Table 6).

CIP에 내성인 대장균의 특성을 Table 7에 나타내었다. 이 균주 모두는 NAL에 대한 MIC가 감수성 판정기준의 4배 이상으로 높은 내성을 나타냈다. 이 대장균들의 gyrA, parC, parE 유전자에서 다양한 돌연변이가 확인되었다. 13주 모두 공통적으로 gyrA유전자의 83번 코돈에 변이(Ser83Leu)를 가지고 있었으며, gyrB에는 변이가 없었다. 7주는 gyrA에 이중변이(Ser-83Leu, Asp87Asn)와 parC에 변이(Ser80Ile 또는 Ser80Arg)를 가지고 있었다. PMQR을 검출한 결과, 13주 중 7주에서 qepA, qnrB1, 또는 qnrD가 확인되었다. QRDR들에 다중변이를 가진 대장균은 QRDR에 단일변이와 PMQR을 동시에 가지는 대장균에 비하여 CIP에 대한 MIC가 높았다.

Table 4. Antimicrobial resistance of pathogenic *E. coli* isolates from diarrhea (D, n=46) and non-diarrhea (ND, n=23) of piglets

Classification	Antimicro- bials*	Sample type	No. of isolates with MIC values (µg/mL) of:†												MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistance		P
			0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256			512	no.	
β-Lactam combination agent	AMC	D			5 [‡]	10	21	9	1						8	16	1	2.2	0.48
		ND			0	2	16	5	0						8	16	0	0	
Cephems cephalosporin III	CAZ	D			40 [‡]	1	3	0							1	2	0	0	n.a. [§]
		ND			23 [‡]	0	0	0							1	1	0	0	
		D			33 [‡]	4	3	0	6 [‡]						0.5	8	6	13.0	0.26
cephalosporin IV	FEP	ND			21 [‡]	1	0	1 [‡]						0.5	0.5	1	4.3		
		D			36 [‡]	1	5	0	4	0	0			0.25	1	0	0	n.a.	
		ND			21 [‡]	1	0	1	0	0				0.25	0.25	0	0		
cephamycin	FOX	D			0	7	24	10	4	1				4	16	1	2.2	0.48	
		ND			0	2	15	4	2	0				4	8	0	0		
Penems carbapenems	MEM	D			46 [‡]	0	0	0						0.25	0.25	0	0	n.a.	
		ND			23 [‡]	0	0	0						0.25	0.25	0	0		
Penicillins aminopenicillin	AMP	D			6 [‡]	1	0	0	0	0	0	0	0	0	64	64	39	84.8	0.05
		ND			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	64	64	23	100	
		D			28 [‡]	2	0	3	7	0	6 [‡]				1	64	13	28.3	0.58
Aminoglycosides	STR	ND			12 [‡]	1	1	1	6	1	1 [‡]			1	16	8	34.8		
		D						13 [‡]	5	2	26 [‡]			128	128	33	71.7	0.58	
		ND						8 [‡]	3	0	12 [‡]			128	128	15	65.2		

Table 4. Continued

Classification	Antimicro-bials*	Sample type	No. of isolates with MIC values (µg/mL) of:†												MIC ₅₀	MIC ₉₀	Resistance		P									
			0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256			512	no.		(%)								
Folate pathway inhibitors	FIS	D														4 [‡]	0	0	0	0	0	0	42 [‡]	512	42	91.3	0.57	
	ND	ND														3 [‡]	0	0	0	0	0	0	20 [‡]	512	20	87.0		
	SXT	D	8 [‡]	4	1	1	4	28 [‡]															4	4	28	60.9	0.73	
	ND	ND	3 [‡]	3	1	0	1	15 [‡]																4	4	15	65.2	
Lipopeptides	COL	D																										
	ND	ND																										
Polymyxins	COL	D																										
	ND	ND																										
Phenicol	CHL	D																										
	ND	ND																										
Quinolones	COL	D																										
	ND	ND																										
Quinolones	NAL	D																										
	ND	ND																										
Fluoroquinolones	CIP	D	18 [‡]	11	4	1	2	3	3	4 [‡]																		
	ND	ND	7 [‡]	8	3	1	0	2	0	2																		
Tetracyclines	TET	D																										
	ND	ND																										

*AMC, amoxicillin-clavulanic acid; CAZ, ceftazidime; XNL, ceftiofur; FEP, cefepime; FOX, ceftiofur; MEM, meropenem; AMP, ampicillin; GEN, gentamicin; STR, streptomycin; FIS, sulfisoxazole; SXT, trimethoprim-sulphamethoxazole; COL, colistin; CHL, chloramphenicol; NAL, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin; TET, tetracycline.
[†]Breakpoints are indicated with vertical lines. The dilution ranges tested for each antimicrobial agent are those contained within the white area, [‡]Number of isolates with MIC values equal to or higher/lower than concentrations of the tested range, [§]Not applicable.

Table 5. Multiple antimicrobial resistance patterns of pathogenic *E. coli* isolated from fecal samples of piglets

No. of resistant antimicrobials	Isolates from diarrhea samples (n=46)		Isolates from non-diarrhea samples (n=23)	
	No. (%) of isolates	Most frequent patterns	No. (%) of isolates	Most frequent patterns
4	33 (71.7)	CHL-FIS-TET-AMP	19 (82.6)	CHL-FIS-TET-AMP
5	26 (56.5)	CHL-FIS-TET-AMP-STR	15 (65.2)	CHL-FIS-TET-AMP-SXT
6	16 (34.8)	CHL-FIS-TET-AMP-STR-SXT	9 (39.1)	CHL-FIS-TET-AMP-SXT-NAL
7	9 (19.6)	CHL-FIS-TET-AMP-STR-NAL-CIP	7 (30.4)	CHL-FIS-TET-AMP-SXT-NAL-GEN
8	3 (6.5)	CHL-FIS-TET-AMP-STR-SXT-COL-GEN CHL-FIS-TET-AMP-STR-NAL-CIP-GEN	2 (8.7)	CHL-FIS-TET-AMP-SXT-NAL-CIP-STR

*Abbreviations are shown in Table 4.

Table 6. Characteristics of ceftiofur resistant *E. coli* isolated from fecal samples of piglets

Isolate ID	Farm	Sample type*	MIC (µg/mL)			<i>bla</i> _{CTX-M} type	Other antimicrobial resistance except for β-lactams	Virulotype
			XNL [†]	CAZ	AMP			
031	A	ND	>8	1	>64	14	STR, FIS, SXT, TET, CHL	Stx2e
055	B	D	>8	8	>64	55	STR, FIS, SXT, TET, CHL	Stx2e
056	B	D	>8	8	>64	55	STR, FIS, SXT, TET, CHL	Stx2e
057	C	D	>8	≤1	>64	27	STR, FIS, SXT, TET, CHL, COL	F18:STb:LT
058	C	D	>8	8	>64	27	STR	F5:STa
059-1	C	D	>8	2	>64	27	STR, FIS, SXT, TET, CHL, COL	F5:STa
059-2	C	D	>8	2	>64	27	STR	F18:STb:LT

*D, diarrhea; ND, non-diarrhea, [†]Abbreviations are shown in Table 4.

Table 7. Characteristics of ciprofloxacin resistant *E. coli* isolated from feces of piglets

Isolate ID	Farm	Sample type*	MIC (µg/mL)		Mutations in QRDRs				PMQR genes	Virulotype
			CIP [†]	NAL	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>		
001	A	D	8	>128	S83L	WT [†]	WT	WT	<i>qepA</i>	F4:LT:STb
002	A	D	4	>128	S83L	WT	WT	WT	<i>qepA</i>	F4:LT:STb
003	A	D	4	>128	S83L	WT	WT	WT	<i>qepA</i>	F4:LT:STb
007	A	ND	4	>128	S83L	WT	WT	WT	<i>qepA</i>	F4:LT:STb
017	B	D	16	>128	S83L, D87N	WT	S80I	WT	-	F5:STa
018	B	ND	16	>128	S83L, D87N	WT	S80I	WT	-	F5:STa
022	C	D	>16	>128	S83L, D87N	WT	S80I	S458A	-	STb
053	D	ND	4	>128	S83L	WT	WT	WT	<i>qnrB1</i>	F4:LT:STb
062	E	D	>16	>128	S83L, D87N	WT	S80I	WT	-	F18:STa
063	F	D	>16	>128	S83L, D87N	WT	S80R	WT	-	F18:STb:LT
064	F	ND	16	>128	S83L, D87N	WT	S80R	WT	-	F18:STb:LT
067	F	D	8	>128	S83L	WT	WT	WT	<i>qnrD</i>	STa:STb
068	G	D	8	>128	S83L, D87N	WT	S80I	WT	<i>qnrD</i>	F18

*D, diarrhea; ND, non-diarrhea, [†]Abbreviations are shown in Table 4.

고찰

2017년과 2020년 사이에 수집된 포유 및 이유 자돈의 분변에서 대장균을 분리하여 부착인자 및 독소 유전자를 검사하였

다. 설사 시료와 비설사 시료에서 병원성 대장균 분리율은 유의한 차이가 없었는데(Table 1), 비설사에서 대장균이 분리된 원인으로는 대장균이 정상 세균총의 일부이기 때문으로 생각된다. 반대로 병원성 대장균에 대한 감수성은 돼지의 유전형질이나 면

역상태에도 영향을 받을 수 있어 장관에 침입 되었더라도 설사가 유발되지 않을 가능성이 있다. 추가적으로 자돈 설사증의 원인에는 급여, 이유시기나 계절 등 환경적 요인과 *Clostridium* spp., *Salmonella*, PEDV, PRRSV, rotavirus 등 다른 감염원도 존재한다(Dubreuil 등, 2016; Zimmerman 등, 2019).

설사와 비설사에서 병원성 대장균의 분리율은 유의한 차이가 없었으나, 설사 시료의 분리주에는 설사를 유발하는 것으로 알려진 장독소(LT, STa, STb)의 분포가 우세하였으며, 반대로 비설사 시료 분리주에서는 독소유전자 미검출 비율이 설사보다 3배 이상 높았다(Table 2). 따라서 설사 시료에 설사증을 유발할 수 있는 병원성 대장균이 상대적으로 많이 분포되어있는 것으로 추론할 수 있다.

설사에서 분리된 병원성 대장균에는 부착인자로는 F4, 독소형 유전자로는 STb 검출 비율이 높았고(Table 2), 병원성형으로는 STb, Stx2e, F4:LT:STb형이 많았다(Table 3). 이전 연구결과에서 포유자돈에서 분리된 대장균의 부착인자는 F4 (31.9%), 장독소는 EAST1 (41.4%), LT (31.0%), STb (31.0%)가 우세했고, 병원성형으로는 F4:LT:STb:EAST1 (17.2%)이 우세했음을 확인할 수 있다(Byun 등, 2013). 그리고 2007에서 2018년 사이에는 대장균증 증상의 자돈에서 분리된 대장균에서 부착인자로 F18 (26.6%), F4 (17.9%)가 우세했고, 장독소는 STb (41.8%), Stx2e (25.7%), STa (25.1%) 순으로 많았으며, 병원성형으로는 STb (7.6%), F4:LT:STb (7.0%), F18:Stx2e (5.2%) 순으로 우세했었다(Do 등, 2020). 따라서 국내에서는 F4:LT:STb를 가진 대장균이 지속적으로 돼지 설사증의 원인이 되는 것으로 생각된다.

선모는 고면역원성 분자이나 교차 반응이 낮은 것으로 알려져 있다(Dubreuil 등, 2016). 그러므로 Ikwap 등(2016)은 우간다에서 F4가 가장 유행하였다고 보고하며 아울러 ETEC 감염 예방을 위하여 F4기반의 백신을 우선적으로 사용해야 한다고 기술하였다. 그리고 2020년에 발표된 중국의 연구에서 산둥지방에는 부착인자로 F41이 가장 유행하고 있다고 보고하였는데, 이 원인으로 F4 균체를 백신으로 사용한 효과라고 기술한 바 있다(Li 등, 2020). 그러므로 국내 양돈장의 ETEC에 의한 설사증 예방을 위한 면역원으로는 F4, F18를 이용하는 것이 효과적일 것으로 생각된다. 그럼에도 불구하고 분리주 중 54주(45.4%)의 부착인자가 동정되지 않은 바(Table 2), 이에 대한 추가적인 연구가 수행되어야 할 것이다.

한편 전체 분리주 중 21.0%의 병원성 대장균에서 Stx2e가 검출되었다(Table 2). Stx2e는 STEC가 산생하는 독소로 부종 및 신경장애, 기립 불능 등을 나타내고 높은 폐사율을 보인다. 다른 보고에서도 대장균증 자돈에서 분리된 대장균의 Stx2e 검출

률이 높은 것이 확인되는 바(Do 등, 2020; Misumi 등, 2021), ETEC의 예방과 더불어 높은 비율로 분리되고 있는 STEC도 주의해야 할 것으로 생각된다.

자돈의 분변에서 분리된 병원성 대장균 분리주 중 80% 이상이 AMP, CHL, FIS, TET에 내성이었으며 60% 이상은 STR, SXT에 내성이었다(Table 4). Do 등(2020)의 조사 결과에서도 본 연구의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 또한 국가 항생제 사용 및 모니터링 자료에서도 2007년 이후부터 돼지의 분변에서 분리된 대장균의 60% 이상이 AMP, CHL, FIS, STR, TET에 대하여 내성이었다(One Health 항생제 내성균 다부처 공동 대응사업). Aminopenicillin, phenicol, sulfonamide, tetracycline계 항생제는 2012년부터 2016년까지 양돈부분 국내 판매량 상위 4개 계열에 속하고 현재도 많이 사용되는 항생제이다(농림축산검역본부, 2020). 따라서 이들 항생제에 대한 장기적인 노출이 대장균의 내성율을 높인 것으로 유추된다.

Aminopenicillin, sulfonamide, tetracycline에 대한 돼지유래 대장균의 내성은 전세계에서 전반적으로 높게 나타난다(Nielsen 등, 2021). 본 연구 중 분리된 병원성 대장균 분리주들은 AMP, CHL, FIS, TET 각각에 대한 내성률이 높을 뿐 아니라, 75%가 네 가지 항생제에 동시에 내성을 나타내었다(Table 6). 이 항생제들은 세계동물보건기구(WOAH)에서 지정된 수의에서 결정적으로 중요한 항생제(VCIAs)에 속한다. VCIAs는 사용되는 질병의 범위가 넓고 특정 질병에 대하여 필수적이며 대체 약물이 부족할 때 지정되는 항생제인데(WOAH, 2021), 이미 높은 비율의 병원성 대장균이 VCIAs에 대한 내성이 있는 것으로 확인된 것이다. 또한 AMP와 TET는 대장균 설사증 치료에 이차적으로 선택되는 항생제이기도 한데 1차적으로 사용되는 SXT(농림축산검역본부, 2020)와 동시에 내성인 병원성 대장균이 53.6%에 달하였다. 병원성 대장균의 항생제 내성은 질병 치료를 위한 항생제 사용량을 증가시키고, XNL, COL 등 최종적으로 선택되어야 할 항생제의 사용을 촉발한다. 본 조사결과에서도 분리된 병원성 대장균이 주요 치료항생제에 내성을 갖는 것이 확인됨에 따라 항생제 내성 확산에 악순환이 우려된다.

β -Lactam계 항생제는 세균의 세포벽 합성을 저해하는 물질로 세균성 질병 치료에 폭넓게 이용된다. 그래서 광범위한 β -lactam 항생제에 작용하는 β -lactam 가수분해 효소(ESBL)를 가진 대장균의 출현이 큰 우려 사항이 되고 있다. 특히나 중요시되고 있는 ESBL 유전형은 CTX-M형이다. CTX-M은 3세대 cephalosporin계 항생제인 cefotaxime (CTX)에 대한 가수분해능이 있으며, 다양한 변이주들이 사람, 가축, 음식 및 환경 시료에서 전 세계적으로 폭발적으로 보고되고 있다(Cantón

등, 2012; Bevan 등, 2017; Kim 등, 2021). 의학과 수의학에서 중요한 bla_{CTX-M} type은 $bla_{CTX-M-14}$ 와 $bla_{CTX-M-15}$ 로, 각각의 하위 변이들의 모임인 CTX-M-9군, CTX-M-1군이 전 세계적으로 우세한 것으로 알려져 있다(Cantón 등, 2012; Bevan 등, 2017).

본 연구에서는 XNL에 내성 균주의 bla_{CTX-M} type을 조사하였다. 검출된 bla_{CTX-M} type은 $bla_{CTX-M-14}$ (CTX-M-9군), $bla_{CTX-M-27}$ (CTX-M-9군), $bla_{CTX-M-55}$ (CTX-M-1군)이었다(Table 6). 이전의 조사 결과와 아울러 국내 양돈장에서도 CTX-M-1군과 CTX-M-9군이 가장 유행하는 것으로 확인된 것이다(Shim 등, 2019; Song 등, 2020; Kim 등, 2021). ESBL의 폭발적 확산의 원인 중 하나는 ESBL을 갖는 몇몇 세균이 aminoglycosides, quinolones 등 다제내성을 가져 공동선택 및 확산에 유리하기 때문인데(Cantón 등, 2012; Bevan 등, 2017) 분리된 XNL에 내성 균주들도 공통적으로 STR에 내성이었고 2주를 제외하고 4~5개 계열의 항생제에도 동시에 내성을 나타낸 다제내성균이었다. 따라서 ESBL 생성균주의 확산에 대하여 지속적으로 관심을 기울여야 할 것으로 생각된다.

한편 우리나라를 포함한 아시아에서 flouroquinolone계 항생제에 대한 돼지 유래 대장균의 내성률이 다른 대륙에 비하여 높은 것으로 보고되고 있다(Nielsen 등, 2021; Hayer 등, 2022). 수의에서는 주로 enrofloxacin (ENR)이 사용되는데, ENR의 사용이 인체에서 중요한 치료항생제인 CIP에 대한 내성균을 발생시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 flouroquinolone계 항생제는 가축의 주요한 질병 치료에서 최종으로 선택하도록 권장되고 있으며(농림축산검역본부, 2020; Grabowski 등, 2022; Hayer 등, 2022), 국내 모든 가금류에 사용이 금지되었다(관계부처 합동, 2021).

따라서 CIP에 내성인 병원성 대장균의 quinolone 내성유전자들을 검사하였다(Table 7). Quinolone 내성은 QRDR의 변이 또는 PMQR의 존재로 나타난다. QRDR인 *gyr*과 *par* 유전자는 quinolone계 항생제의 표적분자인 gyrase와 topoisomerase를 암호화하므로, 치환된 아미노산 수가 많을수록 항생제에 대한 내성이 크게 나타나는 것으로 알려져 있다(Grabowski 등, 2022; Hayer 등, 2022). 따라서 *gyr*에 이중변이와 *par*에 변이를 동시에 가지고 있는 분리주들이 *gyr* 단일변이 균주보다 CIP에 대하여 높은 내성을 나타낸 것으로 생각된다.

PMQR은 QRDR의 변이보다 회피효과가 낮지만 플라스미드에 존재하기 때문에 수평전달이 가능하고 QRDR 변이에 비하여 빠르게 내성을 확산시킬 수 있어 감시가 필요하다. 본 조사에서는 Hu 등(2017)과 Sung(2018)의 조사에서는 검출되지 않았던

PMQR인 *qnrB1*, *qnrD*이 검출되었다. 이로써 국내 양돈장에 이전 보고 보다 다양한 PMQR이 존재하는 것이 확인된 것이다. 더욱이 quinolone 내성 유전인들이 농장별로 서로 다른 패턴을 나타내는 등 국내 양돈장 대장균에 flouroquinolone에 대한 다양한 내성인자가 확산되어 있는 것이 확인되었다. 그러므로 더욱 적극적인 내성균 제어를 위한 활동이 필요할 것으로 생각된다.

결론

국내 자돈의 설사와 비설사에서 병원성 대장균을 분리하고 분리주의 병원성유전자 분포와 항생제 내성을 조사하고 비교하였으며, β -lactam 및 quinolone 내성 대장균의 내성유전자를 검사하였다. 연구 결과 자돈설사 유래의 대장균에는 부착인자로는 F4, 장독소로는 STb가 가장 유행하는 것으로 확인되었으며 Stx2e를 가진 대장균도 널리 분포하는 것으로 확인되었다. 많은 대장균 분리주들이 CHL-FIS-TET-AMP에 동시에 내성을 나타내었고, 대장균 설사증에 주로 쓰이는 SXT-AMP-TET에 동시에 내성인 균의 비율도 높았다. 또한 양돈장에서 의학 및 수의학에서 결정적으로 중요한 XNL, CIP 내성균이 분리되었으며 이 분리주들이 전 세계적으로 주의를 요하는 항생제 내성 관련 유전형을 가지고 있는 것이 확인되었다. 대장균 설사증 예방을 위해서는 정기적인 조사를 통하여 병원성 유행형을 파악하고 이에 따라 적절한 백신을 사용하는 노력이 필요할 것으로 생각된다. 더불어 위생관리를 철저히 하며 예방적 항생제 사용을 피하고 치료 시 항생제 감수성 검사로 항생제 남용을 줄여 항생제 내성균의 확산 예방에도 노력을 기울여야 하겠다. 돼지고기는 우리나라 국민이 가장 많이 소비하는 육류이다. 공중보건 유지와 안전한 먹거리 공급을 위하여 양돈산업 구성원의 적극적 참여가 요구된다.

감사의 글

본연구는 농림축산검역본부의 농림축산검역검사기술개발사업(B-1543081-2021-23-01)의 연구비 지원에 의해 수행되었다.

CONFLICT OF INTEREST

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

ORCID

Hyun Sook Shin, <https://orcid.org/0000-0003-1431-4249>
 Keun-Ho Kim, <https://orcid.org/0000-0001-6126-8818>
 Jin Sung Seo, <https://orcid.org/0000-0002-3473-6994>
 Young Wook Kim, <https://orcid.org/0000-0003-0498-6594>
 Suk-Kyung Lim, <https://orcid.org/0000-0002-7549-9411>
 Byeong Yeal Jung, <https://orcid.org/0000-0003-3229-8932>

REFERENCES

- 관계부처 합동. 2021. 국가 항생제 내성 관리대책(2021~2025). <http://www.mohw.go.kr/re>.
- 농림축산검역본부. 2020. 돼지 항생제 처방 가이드라인.
- 식품의약품안전평가원, 농림축산식품부, 농림축산검역본부, 한국동물약품협회. 2021. 2020년도 국가 항생제 사용 및 내성 모니터링-동물, 축산물-보고서.
- Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. 2017. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother* 72: 2145-2155.
- Brand P, Gobeli S, Perreten V. 2017. Pathotyping and antibiotic resistance of porcine enterovirulent *Escherichia coli* strains from Switzerland (2014~2015). *Schweiz Arch Tierheilkd* 159: 373-380.
- Branger C, Zamfir O, Geoffroy S, Laurans G, Arlet G, Thien HV, Gouriou S, Picard B, Denamur E. 2005. Genetic background of *Escherichia coli* and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis* 11: 54-61.
- Byun JW, Jung BY, Kim HY, Fairbrother JM, Lee MH, Lee WK. 2013. O-serogroups, virulence genes of pathogenic *Escherichia coli* and Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns of O149 isolates from diarrhoeic piglets in Korea. *Vet Med-Czech* 58: 468-476.
- Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. 2012. CTX-M Enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* 3: 110.
- Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. 2008. Plasmid-mediated quinolone resistance pump *QepA2* in an *Escherichia coli* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 3801-4.
- Do KH, Byun JW, Lee WK. 2020. Virulence and antimicrobial resistance genes of pathogenic *Escherichia coli* from piglets showing diarrhea before and after ban on antibiotic growth promoters in feed. *Korean J vet Res* 60: 163-171.
- Dubreuil JD, Isaacson RE, Schifferli DM. 2016. Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* 7: 10.
- Grabowski Ł, Gaffke L, Pierzynowska K, Cyske Z, Choszcz M, Węgrzyn G, Węgrzyn A. 2022. Enrofloxacin—the ruthless killer of eukaryotic cells or the last hope in the fight against bacterial infections. *Int J Mol Sci* 23: 3648.
- Hayer SS, Casanova-Higes A, Paladino E, Elnekave E, Nault A, Johnson T, Bender J, Perez A, Alvarez J. 2022. Global distribution of fluoroquinolone and colistin resistance and associated resistance markers in *Escherichia coli* of swine origin - A systematic review and meta-analysis. *Front Microbiol* 13: 834793.
- Heaton KW, Lewis SJ. 1997. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 32: 920-924. Retrieved on 2/3/2007.
- Hu YS, Shin S, Park YH, Park KT. 2017. Prevalence and mechanism of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from swine feces in Korea. *J Food Prot* 80: 1145-1151.
- Ikwap K, Larsson J, Jacobson M, Owiny DO, Nasinyama GW, Nabukenya I, Mattsson S, Aspan A, Erume J. 2016. Prevalence of adhesin and toxin genes in *E. coli* strains isolated from diarrheic and non-diarrheic pigs from smallholder herds in northern and eastern Uganda. *BMC Microbiol* 16: 178.
- Katsuda K, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H. 2006. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *J Vet Diagn Invest* 18: 350-4.
- Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. 2009. *oqxAB* encoding a multidrug efflux

- pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3582-4.
- Kim KY, Park JH, Kwak HS, Woo GJ. 2011. Characterization of the quinolone resistance mechanism in foodborne *Salmonella* isolates with high nalidixic acid resistance. *Int J Food Microbiol* 146: 52-6.
- Kim YA, Kim H, Seo YH, Park GE, Lee H, Lee K. 2021. Prevalence and molecular epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* from multiple sectors of the swine industry in Korea: a Korean nationwide monitoring program for a one health approach to combat antimicrobial resistance. *Ann Lab Med* 41: 285-292.
- Li S, Wang L, Zhou Y, Miao Z. 2020. Prevalence and characterization of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from piglets suffering post-weaning diarrhoea in Shandong Province, China. *Vet Med Sci* 6: 69-75.
- Luppi A, Gibellini M, Gin T, Vangroenweghe F, Vandenbroucke V, Bauerfeind R, Bonilauri P, Labarque G, Hidalgo Á. 2016. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Manag* 2: 20.
- Misumi W, Funamori T, Hamada K, Iwamoto J, Fujisono S, Chitose K, Kusumoto M. 2021. Association between antimicrobial treatment and resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased swine in Kagoshima Prefecture, Japan. *J Vet Med Sci* 83: 358-369.
- Nielsen SS, Bicout DJ, Calistri P, Canali E, Drewe JA, Garin-Bastuji B, Gonzales Rojas JL, Gortazar Schmidt C, Herskin M, Michel V, Miranda Chueca MA, Padalino B, Pasquali P, Roberts HC, Sihvonen LH, Spoolder H, Stahl K, Velarde A, Viltrop A, Winckler C, Dewulf J, Guardabassi L, Hilbert F, Mader R, Baldinelli F, Alvarez J. 2021. Scientific Opinion on the assessment of animal diseases caused by bacteria resistant to antimicrobials: Swine. *EFSA Journal* 19: 7113.
- One Health 항생제 내성균 다부처 공동대응사업. https://www.kdca.go.kr/nohas/common/main.do.act/al/sal0301vw.jsp?PAR_MENU_ID=04&MENU_ID=0403&page=1&CONT_SEQ=368388.
- Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, D'Andrea MM, Giacobone E, Amicosante G, Romero E, Rosso-lini GM. 2003. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol* 41: 4264-9.
- Shim JB, Seo KW, Lee YJ. 2019. Antimicrobial resistance and virulence genes of β -lactamase producing *E. coli* isolated from commercial layers. *J Pre Vet Med* 43: 31-37.
- Song JH, Oh SS, Kim JH, Park SK, Shin JW. 2020. Clinically relevant extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from food animals in south Korea. *Front Microbiol* 11: 604.
- Sung JY. 2018. Analysis of quinolone resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from clinical specimens and livestock feces. *Korean J Clin Lab Sci* 50: 422-430.
- Vidal A, Aguirre L, Seminati C, Tello M, Redondo N, Martín M, Darwich L. 2020. Antimicrobial resistance profiles and characterization of *Escherichia coli* strains from cases of neonatal diarrhea in Spanish pig farms. *Vet Sci* 7: 48.
- WHO. 2018. Critically important antimicrobials for human medicine 6th. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>.
- WOAH. 2021. OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. <https://www.woah.org/app/uploads/2021/06/a-oie-list-antimicrobials-june2021.pdf>.
- Zhang W, Zhao M, Ruesch L, Omot A, Francis D. 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* 123: 145-152.
- Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J. 2019. Colibacillosis. pp. 807-834. In: Fairbrother JM, Nadeau E(ed.). *Diseases of swine*. 11th. Wiley-Blackwell. USA.