

Original Article

Antimicrobial resistance of Stx2e positive *Escherichia coli* before and after ban on antibiotic growth promoters

Kyung-Hyo Do¹, Jae-Won Byun², Wan-Kyu Lee^{1*}

¹College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

²Foreign Animal Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

The emergence of antimicrobial resistant *Escherichia (E.) coli* is a major problem in pig farms. To tackle this issue, in July 2011, the Korean government banned the use of antimicrobials for growth promotion of animals in farms. Moreover, *E. coli* encoding the Stx2e gene cause edema disease which results in high mortality and morbidity in pig farms. Therefore, the aim of this study was to investigate the prevalence of antimicrobial resistance among *E. coli* encoding the Stx2e gene isolated from weaned piglets with diarrhea before and after the ban on antibiotic growth promoters (AGPs) in Korea from 2007 to 2016. In this period, 479 *E. coli* isolates were obtained from weaned piglets with diarrhea, and of them, 144 *E. coli* isolates encoding the Stx2e gene were detected by polymerase chain reaction. The susceptibility of the *E. coli* isolates to antibiotics were tested using the standard Kirby-Bauer disk diffusion method. The most frequently observed resistances in isolates obtained from weaned piglets in the last 10 years were to tetracycline (92.4%) and chloramphenicol (88.9%). The prevalence of resistance to colistin (3.1% to 16.5%) and tetracycline (86.2% to 97.5%) was also observed to have increased over this period. Additionally, multi-drug resistance was also found to have increased (87.7% to 97.5%) after the ban on AGPs. These findings provide useful data for designing prevention and treatment strategies for postweaning diarrhea and edema disease, and can be used in future studies on antimicrobial resistance in Korea.

Key words: Antimicrobial resistance, *Escherichia coli*, Stx2e, Edema disease, Weaned piglets

Introduction

이유자돈은 이유 후에 모체이행항체의 저하 및 사양환경조건 변화 등 많은 복합적인 요인으로 인해 질병에 취약해진다 [1]. 이유자돈에서 특히 큰 피해를 입히는 질병은 대장균 감염증(colibacillosis)이며, 그 중에서도 이유자돈 설사증(postweaning diarrhea)과 부종병(edema disease)이 잘 알려져 있다. 이유자돈 설사증과 부종병은 설사, 발육 지연 및 높은 폐사율로 양돈 농가에 큰 경제적 피해를 입히는 중요한 질병이다 [2]. 대장균[*Escherichia (E.) coli*]은 이유자돈의 장내에 서식하는 미생물로서 그들이 갖는 병원성 인자(adhesin, toxin gene 등)에 따라 enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), Shiga toxin producing *E. coli* (STEC)와 같은 여러 병형(pathotype)으로 분류된다 [3].

Verocytotoxin producing *E. coli*라고도 불리는 STEC는 부종병의 원인체로 알려져 있으며, 전신 혈관에 손상을 입히는 독소인 Shiga toxin (Verocytotoxin)을 생성한다 [4]. Shiga toxin은 단량체인 A subunit과 오량체인 B subunit으로 이루어진 58~70 kDa 분자량의 복합단백질이다. B subunit은 세포 수용체인 globotetraosylceramide와 결합, 세포독성의 특이성, 세포 외 정착성 및 항체 형성 등에 관여하며, A subunit은 세포 내에서 리보솜에 작용하여 단백질 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다 [5]. Shiga toxin은 크게 VT1과 VT2 그룹으로 나뉘는데, VT2는 VT2e, VT2c, VT2d로 구성된다. 이 중에서 VT2e라고도 불리는 Stx2e는 돼지 혈관 내피 세포에 특징적으로 활성을 갖고 있기 때문에 부종병의 발생에 중요한 역할을 하고 있는 것으로 잘 알려져 있다 [6].

항생제(antibiotics)는 그동안 양돈산업에서 질병을 치료하고 예방하는 데 매우 중요한 역할을 해왔으며 [7], 특히 이유자돈 설사증이나 부종병의 치료 및 예방법으로 사료 첨가 항생제를 양돈산업에서 많이 사용하였다. 그러나 사료 첨가 항생제의 광범위하고 무분별한 사용은 내성균의 출현, 특히 다제 내성균의 출현빈도를 증가시킴으로써 양돈질병의 치료 및 예방에 심각한 문제를 일으키고 있다 [8]. 또한 사료 첨가 항생제의 오남용은 식육 내 항생제의 잔류 등을 초래하여 공중

*Corresponding author: Wan-kyu Lee

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

Tel: +82-43-261-2960, E-mail: wklee@cbnu.ac.kr

보건학적으로도 중요한 문제점으로 여겨지고 있다 [9]. 따라서 질병 치료의 목적이 아닌 항생제 사용을 유럽 연합에서는 1986년 스웨덴을 시작으로 2006년에 모두 금지하였으며, 국내에서는 2011년 7월 배합사료 내 항생제 첨가를 전면금지하게 되었다.

항생제 내성의 변화는 사용되는 항생제의 종류, 조사시기, 지역 등에 따라 다양하게 나타날 수 있기 때문에 항생제의 효율적인 사용을 위해서는 항생제 내성의 분포 양상을 조사하는 것이 중요하다고 할 수 있다. 따라서 덴마크 [10], 일본 [11], 캐나다 [12] 등 선진국에서는 국가 차원에서 병원성 세균에 대한 항생제 내성을 조사하고 있으며 국내에서도 2003년부터 농림축산검역본부를 주축으로 지속해서 항생제 내성을 전국적으로 조사해 오고 있다.

그동안 국내 양돈장에서 분리한 비병원성 및 병원성 대장균의 항생제 내성에 대해서는 많은 연구가 있었지만, 배합사료 내 항생제 첨가 금지를 전후하여 병원성 대장균, 특히 부종병 유발 Stx2e 유전자 보유 대장균에 대한 항생제 내성 변화에 대한 연구는 찾아볼 수 없는 상황이다. 따라서 이번 연구에서는 2007년부터 2016년까지 설사증을 나타내는 이유자돈에서 분리한 대장균 중에서 Stx2e 유전자를 갖는 대장균 144 균주를 선발하여 배합사료 내 항생제 첨가 금지 시기인 2011년을 전후한 항생제 내성 변화를 비교하였다.

Materials and Methods

대장균 분리

2007년부터 2016년까지 설사 증상을 보이는 이유자돈으로부터 대장균을 분리하였다. 분변 또는 장 내용물을 무균적으로 채취한 후, 즉시 맥콩키(Becton Dickinson, MD, USA)와 혈액(Asan Co., Asan, Korea)배지에 도말하고 37°C에서 하루 동안 배양하였다. 각 배지에서 전형적인 대장균의 모양을 나타내는 집락을 선별한 후, VITEK II system (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France)을 이용하여 동정하였다. 선별된 균주들은 추후 실험을 위하여 50% glycerol에 넣어 -70°C에서 보관하였다.

Stx2e 유전자의 검출

분리한 대장균에 대해 증합효소연쇄반응법 (polymerase chain reaction, PCR)을 사용하여 Stx2e 유전자의 존재 여부를 검사하였다. 유전자를 검출하기 위한 primer 정보 및 PCR 조건은 기존의 방법에 따라 실시하였다. 배양된 집락을 200 µL의 증류수에 현탁한 뒤 100°C에서 10분간 가열한 후 8,000 × g에서 원심분리하여 그 상층액을 취해 PCR의 template로 사용하였다. PCR mixture의 조건은 2 × EmeraldAmp Master Mix (Takara Bio, Otsu, Japan)와 2 µM의 각각의 primer, 그리고 3 µL의 DNA template를 첨가하여 최종 용량이 20 µL가 되도록 하여 PCR을 수행하였다. 증폭산물은 ethidium bromide를 첨가한 2% agarose gel 상에서 전기영동하여 확인하였다 [13].

항생제 감수성 검사

항생제 감수성 검사는 Kirby-Bauer의 방법에 따라 디스크 확산법으로 실시하였다 [14]. 항생제는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidance를 참

고하여 다음의 16가지를 실험에 사용하였다: gentamicin (10 µg), streptomycin (10 µg), neomycin (30 µg), cephalothin (30 µg), cefazolin (30 µg), cefepime (30 µg), ceftiofur (30 µg), nalidixic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), norfloxacin (10 µg), ampicillin (10 µg), amoxicillin / clavulanic acid (20 / 10 µg), trimethoprim / sulfamethoxazole (23.75 / 1.25 µg), chloramphenicol (30 µg), colistin (10 µg), tetracycline (30 µg). 각 항생제 디스크는 Becton Dickinson 사(BD)에서 판매하는 BBL-Sensi-Disk를 구입하여 사용하였다. Stx2e 유전자 양성 대장균을 Mueller-Hinton broth medium (BD)에 37°C에서 하룻밤 배양한 후 멸균된 증류수를 이용하여 탁도를 McFarland Standard No. 0.5가 되도록 조정된 뒤 Mueller-Hinton agar (BD)에 도말하였다. 37°C에서 18시간 배양한 다음 항생제 디스크 주위의 억제환의 직경을 측정하여 Becton Dickinson 사의 매뉴얼에 따라 내성 여부를 판정하였다. 다제 내성은 Magiorakos의 기준에 따라 3개 이상의 CLSI subclass에 내성을 나타낸 균주를 다제 내성균으로 간주하였다 [15].

통계적 분석

통계 분석은 SPSS 버전 12.0 프로그램(SPSS, Chicago, Illinois, USA)을 이용하였다. 사료 첨가 항생제 금지 전후의 각 항생제에 대한 내성률을 분석하기 위하여 chi square test를 실시하였고 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

Results

Stx2e 유전자 보유 대장균의 항생제 내성률

2007년부터 2016년까지 설사증이 있는 이유자돈에서 대장균 479 균주를 분리하였으며, 그 중에서 Stx2e gene을 가지고 있는 대장균 144 균주를 선발하였다. 항생제 내성률을 측정할 결과, Table 1에서와 같이 Tetracycline (92.4%), Chloramphenicol (88.9%), Ampicillin (86.1%), Streptomycin (79.2%), Neomycin (69.4%), Nalidixic acid (66.0%)에서 높은 내성을 나타내었다. 한편, Colistin (10.4%), Cefoxitin (25.0%), Cefazolin (30.6%)은 낮은 내성을 나타내었으며, 특히 Cefepime의 경우 지난 10년간 내성균이 전혀 검출되지 않았다.

국내에서 배합사료 내 항생제 첨가가 금지된 2011년을 전후하여 내성률의 변화를 분석한 결과, Gentamicin (70.8% → 43.0%), Cefazolin (43.1% → 20.3%), Cefoxitin (40.0% → 12.7%), Ciprofloxacin (56.9% → 34.2%), Norfloxacin (56.9% → 30.4%), 그리고 Trimethoprim / Sulfamethoxazole (70.8% → 45.6%)에서 내성률이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 Tetracycline (86.2% → 97.5%)과 Colistin (3.1% → 16.5%)의 경우, 배합사료 내 항생제 첨가 금지 후에 오히려 내성률이 증가하는 결과를 확인할 수 있었다.

Stx2e 유전자 보유 대장균의 다제 내성률

Stx2e 유전자를 갖고 있는 144 균주의 항생제 다제 내성

를 분석한 결과(Table 2), 가장 많은 내성 양상은 10개의 subclass에 내성을 나타낸 패턴(21.5%)이며, 뒤이어 5~7개의 subclass에 내성을 나타내는 패턴이 많은 빈도로 검출되었다. 10개 subclass 내성 패턴의 경우, 배합사료 내 항생제 첨가 금지 이전에는 33.8%나 검출되었지만, 금지 이후에는 11.4%로 현저한 감소 추세를 나타내었다.

검사한 12 종류의 subclass 항생제 중 3개의 subclass 이상에 내성을 나타낸 다제 내성균 분포율은 2011년 항생제 금지 이전에는 87.7%이었지만, 금지 이후에는 97.5%로 그 비율이 증가하는 결과를 나타내었다. 검사한 항생제 12개의 subclass에 모두 감수성을 나타낸 균주(0 subclass)는 지난 10년간 단 4균주 뿐이었으며, 이는 모두 배합사료 내 항생제 첨가 금지 이전에 분리되었다.

Stx2e 유전자 보유 대장균의 내성 패턴

Stx2e gene을 갖는, 설사 증상을 보이는 이유자돈에서 분리한 대장균의 항생제 내성 패턴을 Table 3에 표시하였다. 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전후로 가장 흔히 나타나는 내성 패턴은 14종류의 항생제에 내성을 나타내는 GM-S-N-CF-CZ-FOX-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C-TE이었으며, 사료 첨가 항생제 금지 이전에는 65균주

중 21균주가 검출되었지만 금지 이후에는 79균주 중 단 5균주만이 검출되어 현저한 감소 결과를 나타내었다. 또한, 사료 첨가 항생제 금지 이전에 존재했던 내성 패턴들은 금지 이후에 사라지는 경향을 보였으며, 금지 이후에는 새롭게 출현한 내성 패턴들이 다수 관찰되었다.

Discussion

본 연구에서는 2007년부터 2016년까지 설사증을 보이는 이유자돈에서 479 균주의 대장균을 분리하였으며, 그 중 Stx2e 유전자를 갖는 144개 균주에 대해 항생제 내성을 조사하고, 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전후의 항생제 내성 결과를 비교하였다. 국내에서 지난 10년간 분리한 Stx2e 유전자 양성 대장균은 Tetracycline (92.4%), Chloramphenicol (88.9%), Ampicillin (86.1%) 및 Streptomycin (79.2%) 등에 대해 높은 저항성을 나타냈으며, 이와 같은 결과는 덴마크, 캐나다, 일본의 모니터링 결과와 유사하였다.

지난 10년간의 내성률을 항생제 별로 비교한 결과, 그동안 오랜 기간 많은 양으로 사용해 온 Tetracycline, Chloramphenicol, Ampicillin, Streptomycin 등이 다른 항생제에

Table 1. Antimicrobial resistance of *E. coli* encoding Stx2e gene isolated from weaned piglets in Korea from 2007 to 2016

Antimicrobial subclass	Antimicrobial agents	No. of resistant isolates (Antimicrobial resistance %)		
		Before ¹⁾ (n = 65)	After (n = 79)	Total (n = 144)
Aminoglycosides	Gentamicin**	46 (70.8)	34 (43.0)	80 (55.6)
	Streptomycin	47 (72.3)	67 (84.8)	114 (79.2)
	Neomycin	51 (78.5)	49 (62.0)	100 (69.4)
Cephalosporin I	Cephalothin	41 (63.1)	41 (51.9)	82 (56.9)
	Cefazolin**	28 (43.1)	16 (20.3)	44 (30.6)
Cephalosporin IV	Cefepime	²⁾	-	-
Cephamycin	Cefoxitin**	26 (40.0)	10 (12.7)	36 (25.0)
Quinolones	Nalidixic acid	48 (73.8)	47 (59.5)	95 (66.0)
Fluoroquinolone	Ciprofloxacin**	37 (56.9)	27 (34.2)	64 (44.4)
	Norfloxacin**	37 (56.9)	24 (30.4)	61 (42.4)
Aminopenicillin	Ampicillin	53 (81.5)	71 (89.9)	124 (86.1)
β-Lactam / β-lactamase-inhibitor combination	Amoxicillin / Clavulanic acid	34 (52.3)	45 (57.0)	79 (54.9)
Folate-pathway inhibitors	Trimethoprim / Sulfamethoxazole**	46 (70.8)	36 (45.6)	81 (56.3)
Phenicol	Chloramphenicol	57 (87.7)	71 (89.9)	128 (88.9)
Polymyxins	Colistin**	2 (3.1)	13 (16.5)	15 (10.4)
Tetracyclines	Tetracycline*	56 (86.2)	77 (97.5)	133 (92.4)

¹⁾The use of antimicrobials for growth promotion in animal production has been banned since July 2011 in Korea.

²⁾ Not detected.

* Significant difference between before and after ($P < 0.05$).

** Significant difference between before and after ($P < 0.01$).

비해 높은 내성률을 나타내었다. 이와 같은 결과는 국내의 다른 연구 결과에서도 보고되었는데, 조 등 [16]은 2005년 돼지에서 분리한 대장균에 대한 항생제 내성 검사 결과, Tetracycline 내성률이 97.8%로 검사 항생제 중에 가장 높았으며, Ampicillin 내성률도 89.1%로 검사 항생제 중 두 번째로 높은 것으로 나타났다. 비교적 최근에 보고한 임 등 [9]의 연구 결과에서도 tetracycline과 ampicillin, streptomycin의 내성률이 각각 76.1%, 64.6%, 그리고 58.4%로 검사 항생제 중 가장 높은 내성률을 나타냈다는 점에서 본 연구 결과와 유사한 결과를 제시하였다. 그러나 내성률은 임 등의 연구 결과에 비해 본 연구 결과에서 더욱 높게 측정되었는데 (tetracycline: 92.4%, ampicillin: 86.1%, streptomycin: 79.2%), 이것은 균주의 유래 차이 등이 원인일 것으로 생각된다. 한국의 국가 항생제 내성 모니터링 연구 결과에 따르면 일반적으로 병원성 세균의 항생제 내성이 정상 가축에서 분리한 세균의 항생제 내성에 비하여 더 높게 측정되는 경향이 있는 것으로 보고되고 있다 [17]. 본 연구에서는 설사증의 이유자돈에서 분리한 대장균의 항생제 내성률을 측정한다면, 임 등의 연구는 정상 가축에서 분리한 대장균의 내성률을 측정하였기 때문으로 추측된다.

외국에서 분리한 Stx2e 양성 대장균의 항생제 내성률과 본 실험 결과를 비교한 결과, 이번 결과의 내성률이 미국 [18],

일본 [19] 등에 비하여 높게 나타나고 있었다. 그러나 Tetracycline의 경우는 미국에서도 약 71%가 내성을 나타내었으며, 일본도 약 85%를 기록하며 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 덴마크 [10], 일본 [11], 캐나다 [12]의 정상 가축에서 분리한 대장균의 항생제 내성률과 결과를 비교한 경우에는 유사한 결과를 확인할 수 있었다.

배합사료 내 항생제 첨가 금지 전후의 항생제 내성률을 비교하였을 때, gentamicin, cefazolin, cefoxitin, ciprofloxacin, norfloxacin, 그리고 trimethoprim / sulfamethoxazole은 금지 전에 비해 금지 후에 유의적으로 내성률이 감소하였음을 확인할 수 있었다. 사료 첨가 항생제 금지 전후의 국내 동물용 항생제 판매량을 조사한 결과, aminoglycoside계 항생제는 2008년 73톤에서 2016년 48톤으로 판매량이 약 25톤 감소하였으며, quinolones 계 항생제의 판매량은 51톤에서 46톤으로, sulfonamides는 15톤에서 9톤으로 감소하였다 [17]. 이들 항생제의 내성률 감소는 항생제 판매량의 감소와 관련이 있을 것으로 생각되는데 Dewulf 등 [20]도 돼지에서 분리한 대장균의 항생제 내성률과 사용량 사이에는 연관성이 있을 것으로 보고하고 있다.

본 실험에서 tetracycline의 내성률 경향을 분석한 결과, 배합사료 내 항생제 첨가 금지 전의 86.2%에 비해 금지 후에 97.5%로 내성률이 유의적으로 증가하는 것을 확인할 수 있

Table 2. Multiple resistance of *E. coli* encoding Stx2e gene isolated from weaned piglets in Korea from 2007 to 2016¹⁾

No. of resistance ²⁾	No. of resistant isolates (Antimicrobial resistance %)		
	Before ³⁾ (n = 65)	After (n = 79)	Total (n = 144)
0 subclass*	4 (6.2)	- ⁴⁾	4 (2.8)
1 subclass	1 (1.5)	-	1 (0.7)
2 subclasses	3 (4.6)	2 (2.5)	5 (3.5)
3 subclasses	1 (1.5)	3 (3.8)	4 (2.8)
4 subclasses	4 (6.2)	9 (11.4)	13 (9.0)
5 subclasses	6 (9.2)	16 (20.3)	22 (15.3)
6 subclasses	7 (10.8)	13 (16.5)	20 (13.9)
7 subclasses	6 (9.2)	12 (15.2)	18 (12.5)
8 subclasses	2 (3.1)	8 (10.1)	10 (6.9)
9 subclasses	9 (13.8)	4 (5.1)	13 (9.0)
10 subclasses**	22 (33.8)	9 (11.4)	31 (21.5)
11 subclasses	-	3 (3.8)	3 (2.1)
Multi-resistant* (≥ 3 subclasses)	57 (87.7)	77 (97.5)	134 (93.1)

¹⁾ There was no isolate resistant to more than 11 antimicrobial subclasses.

²⁾ Antimicrobial subclasses defined by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) are used.

³⁾ The use of antimicrobials for growth promotion in animal production has been banned since July 2011 in Korea.

⁴⁾ Not detected.

* Significant difference between before and after ($P < 0.05$).

** Significant difference between before and after ($P < 0.01$).

Table 3. Antimicrobial resistance patterns of *E. coli* encoding Stx2e gene isolated from weaned piglets in Korea from 2007 to 2016

No. ¹⁾	Antimicrobial resistance patterns	No. of isolates		
		Before ³⁾ (n = 65)	After (n = 79)	Total (n = 144)
0	-	4	-	4
1	GM	1	-	1
2	C-TE	2	-	2
	N-NA	1	-	1
	N-TE	-	1	1
3	S-TE	-	1	1
	N-AM-C	1	-	1
	S-C-TE	-	1	1
4	N-AM-AMC-TE	-	2	2
	N-AM-C-TE	1	-	1
	S-AM-C-TE	1	3	4
	S-C-CL-TE	-	1	1
	S-N-NA-AMC	-	1	1
5	GM-CF-AM-C-TE	1	-	1
	GM-S-AM-C-TE	1	-	1
	GM-S-N-NA-TE	-	1	1
	NA-AM-AMC-C-TE	1	-	1
	S-AM-AMC-C-TE	-	1	1
	S-AM-SXT-C-TE	-	1	1
	S-CF-AMC-C-TE	-	1	1
	S-CF-AM-C-TE	-	1	1
	S-NA-AM-C-TE	-	1	1
	S-N-AM-C-TE	-	1	1
	S-N-CF-AM-TE	-	1	1
S-N-CIP-AM-TE	-	1	1	
6	GM-AM-AMC-SXT-C-TE	-	2	2
	GM-N-NA-AM-C-TE	-	1	1
	GM-S-N-NA-AMC-TE	1	-	1
	N-CIP-NOR-SXT-C-TE	-	1	1
	S-AM-AMC-SXT-C-TE	-	1	1
	S-NA-AM-SXT-C-TE	-	1	1
	S-NA-CIP-AM-C-TE	-	1	1
	S-N-AM-AMC-C-TE	-	2	2
	S-N-AM-SXT-C-TE	1	2	3
S-N-CF-AM-C-TE	1	1	2	
7	CF-NA-AM-AMC-SXT-C-TE	1	-	1
	CF-NA-CIP-AM-AMC-SXT-TE	1	-	1
	GM-NA-AM-SXT-C-CL-TE	-	1	1
	GM-N-NA-AM-AMC-C-TE	-	1	1
	GM-S-N-AM-AMC-C-TE	-	1	1
	GM-S-N-AM-SXT-C-TE	1	1	2
	GM-S-N-CF-AM-C-TE	-	1	1
	GM-S-N-NA-AM-AMC-C	-	1	1
	GM-S-N-NA-AM-C-TE	1	-	1
	N-CF-NA-AM-SXT-C-TE	-	1	1
	N-NA-CIP-NOR-SXT-C-TE	1	-	1
	S-NA-AM-AMC-SXT-C-TE	-	1	1
	S-N-CF-AM-AMC-C-TE	-	2	2
	S-N-CF-NA-AM-C-TE	-	1	1
	S-N-NA-AM-AMC-C-TE	-	1	1
S-N-NA-AM-SXT-C-TE	1	-	1	

Table 3. Antimicrobial resistance patterns of *E. coli* encoding Stx2e gene isolated from weaned piglets in Korea from 2007 to 2016

No. ¹⁾	Antimicrobial resistance patterns	No. of isolates		
		Before ³⁾ (n = 65)	After (n = 79)	Total (n = 144)
8	GM-N-NA-CIP-NOR-SXT-C-TE	1	-	1
	GM-S-N-AM-AMC-C-CL-TE	-	1	1
	GM-S-N-CF-AM-AMC-C-TE	-	1	1
	GM-S-N-CF-AM-SXT-C-TE	1	-	1
	GM-S-N-CF-NA-AM-C-TE	-	1	1
	GM-S-N-NA-AM-SXT-C-TE	3	-	3
	S-CF-CZ-NA-AM-SXT-C-TE	-	1	1
	S-CF-NA-AM-AMC-SXT-C-TE	-	1	1
	S-N-CF-AM-AMC-C-CL-TE	-	1	1
	S-N-CF-AM-SXT-C-CL-TE	1	-	1
S-N-CF-NA-AM-SXT-C-TE	-	2	2	
9	GM-CF-NA-NOR-AM-SXT-C-CL-TE	1	-	1
	GM-S-N-CF-NA-AM-AMC-C-TE	-	1	1
	GM-S-N-CF-NA-AM-SXT-C-TE	1	-	1
	S-CF-NA-AM-AMC-SXT-C-CL-TE	-	1	1
	S-CF-NA-CIP-NOR-AM-AMC-C-TE	-	1	1
	S-N-NA-CIP-NOR-AM-AMC-C-TE	-	1	1
10	GM-S-N-CF-CZ-AM-AMC-SXT-C-TE	-	1	1
	GM-S-N-CF-NA-AM-AMC-C-CL-TE	-	1	1
	GM-S-N-CF-NA-CIP-NOR-SXT-C-TE	1	-	1
	GM-S-N-NA-CIP-NOR-AM-AMC-C-TE	-	1	1
	GM-S-N-NA-CIP-NOR-AM-SXT-C-TE	1	1	2
	S-CF-CZ-NA-CIP-NOR-AM-SXT-C-TE	-	1	1
	S-CF-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C-TE	-	1	1
	S-N-CF-CZ-NA-CIP-AM-SXT-C-TE	-	1	1
11	GM-S-N-CF-NA-CIP-NOR-AM-AMC-C-TE	-	3	3
	GM-S-N-CF-NA-CIP-NOR-AM-SXT-C-TE	2	-	2
12	GM-S-N-CF-NA-CIP-NOR-AM-AMC-C-CL-TE	-	1	1
	GM-S-N-CF-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C-TE	2	-	2
	GM-S-N-CF-NA-CIP-NOR-AM-SXT-C-CL-TE	-	1	1
13	N-CF-CZ-FOX-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C-TE	1	-	1
	GM-N-CF-CZ-FOX-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C-TE	-	1	1
	GM-S-CF-CZ-FOX-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C-TE	-	1	1
	GM-S-CF-CZ-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C-CL-TE	-	2	2
	GM-S-N-CF-CZ-FOX-NA-CIP-NOR-AM-AMC-C-TE	2	-	2
	GM-S-N-CF-CZ-FOX-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C	2	-	2
	GM-S-N-CF-CZ-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C-TE	2	-	2
S-CF-CZ-FOX-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C-CL-TE	-	1	1	
14	GM-N-CF-CZ-FOX-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C-CL-TE	-	1	1
	GM-S-N-CF-CZ-FOX-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C-TE	21	5	26
15	GM-S-N-CF-CZ-FOX-NA-CIP-NOR-AM-AMC-SXT-C-CL-TE	-	1	1

GM: gentamicin, S: streptomycin, N: neomycin, CF: cephalothin, CZ: cefazolin, FEP: cefepime, FOX: ceftiofur, NA: nalidixic acid, CIP: ciprofloxacin, NOR: norfloxacin, AM: ampicillin, AMC: amoxicillin / clavulanic acid, SXT: trimethoprim / sulfamethoxazole, C: chloramphenicol, CL: colistin, TE: tetracycline

¹⁾No. of antimicrobials which is resistant to *E. coli* encoding Stx2e gene

었다. 이 기간 동안 tetracycline계 항생제 국내 판매량을 조사한 결과, 2008-2010년 평균 판매량은 347 톤이었으나 2012-2016년 평균 판매량은 253톤으로 약 94톤 감소하였다. 따라서 tetracycline 내성률의 증가 원인은 항생제 사용 외에도 다른 요인이 관여하는 것으로 추측된다. 임 등은 국내 가축 분변에서 분리한 대장균의 내성 양상을 분석한 결과, streptomycin, ampicillin 등 대부분의 항생제 내성이 tetracycline과 함께 관찰되는 것으로 보고하고 있으며 [9,21,22], 이러한 내성 패턴은 미국의 연구 결과에서도 보고되고 있다 [23]. 그러므로 tetracycline의 내성 패턴 결과를 미루어 볼 때, 다른 항생제 사용으로 인한 항생제 내성 획득 시 인접한 tetracycline 내성 유전자를 함께 획득할 가능성이 있는 것으로도 생각된다 [24].

WHO에서는 사람에서 의학적인 중요도에 따라 항생제의 감수성을 확보하기 위하여 항생제를 CIA (critically important antimicrobials), HIA (highly important antimicrobials), IA (important antimicrobials) 그룹으로 분류하고 있다 [25]. 이 중 CIA는 우선적으로 중요한 관리가 필요한 항생제로 분류되며, fluoroquinolone계, 제 3, 4세대 cephalosporin계, macrolide계 항생제가 포함된다 [25]. Fluoroquinolone계 항생제인 ciprofloxacin (56.9% → 34.2%)과 norfloxacin (56.9% → 30.4%)에 대한 내성률은 사료 첨가 항생제 금지 전에 비해 금지 후에 낮아졌음을 확인할 수 있다. 그러나 아직 덴마크 (1%) [10], 일본 (2.9%) [11], 캐나다 (0%) [12]의 모니터링 결과에 비해 높은 것으로 나타나기 때문에 내성률 관리에 주의를 기울여야 할 필요성이 있는 것으로 보인다. Ciprofloxacin과 norfloxacin은 2008년에는 7~8톤이 판매되었으나, 2016년에는 전혀 판매되지 않은 것을 보아 항생제의 사용이 감소하여 내성률 또한 감소한 것으로 생각되지만 [20], 아직 선진국과 비교하여 높은 내성률을 나타내고 있기 때문에 항생제의 신중한 사용 등 사용에 대한 관리를 통해 내성 관리를 할 필요가 있다고 생각된다.

국내외의 연구 결과, colistin의 내성률은 높지 않은 것으로 보고되고 있다 [10,12,17,23,26]. 이번 연구 결과에서 colistin의 내성률은 평균 10.4%로서 금지 이전의 3.1%에 비해 금지 이후에는 16.5%의 내성률로 크게 증가하였음을 확인할 수 있다. Colistin은 aminoglycosides계 항생제와 함께 ED의 치료제로 추천되는 약물이기 때문에 [2], 항후 부종병의 새로운 치료제 선정에 많은 노력이 필요할 것으로 생각된다.

사료 첨가 항생제 금지 전후를 기점으로 Stx2e 양성 대장균의 항생제에 대한 내성을 비교한 결과, colistin에 대한 내성은 3.1%에서 16.5%로, tetracycline에 대한 내성은 86.2%에서 97.5%로 증가하였음을 확인할 수 있었다. Colistin과 tetracycline은 돼지 부종병의 치료뿐만 아니라 다른 가축의 질병 치료에도 사용되고 있다. 따라서 이와 같은 항생제 내성률의 증가는 기존 항생제의 치료효과 감소 뿐만 아니라, 축산물 또는 축산환경을 통해 직간접적으로 사람에게 전될 수 있다는 점에서 대장균의 항생제 내성 증가는 공중보건학적으로 중요한 문제이다 [9]. 이번 연구 결과, 설사 증상을 보이는 이유자돈에서 분리한 Stx2e 양성 대장균의 cefepime에 대한 내성은 지난 10년간 한국에서 관찰되지 않고 있으며, 이와 같은 결과는 Meng 등도 돼지에서 분리한

STEC가 cefepime에 대해 내성을 거의 나타내지 않는다는 보고와 일치하고 있다 [27]. 또한 농림축산검역본부의 항생제 내성 조사 결과, 질병 이환 돼지에서 분리한 대장균의 경우 ceftiofur에 대해 내성을 거의 나타내지 않는 것으로 보고되고 있다. 따라서 cefepime과 ceftiofur는 현재 내성률이 증가하고 있는 것으로 보이는 colistin과 tetracycline을 대체할 항생제 후보로 추천되고 있다.

본 연구결과 다제 내성균의 분포는 매우 높게 나타났다. 흥미롭게도, 배합사료 내 항생제 첨가 금지 이전에는 모든 항생제에 감수성을 보이는 균주가 6.2% 존재하였지만 (Table 2), 금지 이후에는 모든 균주가 최소 2개의 antimicrobial subclass에 저항하는 것으로 나타났다. 세 종류 이상의 항생제 subclass에 내성을 보이는 다제 내성균의 비율도 금지 전 87.7%에서 금지 후 오히려 97.5%로 증가하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 결과는 사용한 항생제의 종류가 다르므로 다제 내성률을 직접 비교하기는 어렵지만, 미국의 가축 유래 대장균에서 보고한 돼지의 다제 내성률(51.7%)에 비해서도 높은 결과이다 [15]. 이유는 명확하지 않지만 국내에서 항생제 사료 첨가 금지 이후 돼지 대장균 감염증 등 세균성 질병이 급증하였는데, 이와 같은 질병 치료용으로 항생제 사용이 많이 증가하였기 때문으로 추측된다. 또한 아직 국내에서는 항생제 사용에 대한 규제가 선진국에 비해 엄격하지 못하기 때문에 수의사가 아닌 축산 관련 종사자 등 비전문가에 의한 항생제 사용이 많은 것도 이런 현상의 원인이 될 수 있다고 생각된다 [9]. 그러나 10개의 antimicrobial subclass에 저항하는 내성 패턴은 항생제 첨가 금지 이전에 비해 금지 이후에서 유의적으로 줄어들고 있는 점이 고무적인 내용이라고 생각된다. 이와 같은 결과는 위에서 언급한 gentamicin, cefazolin, cefoxitin, ciprofloxacin, norfloxacin, trimethoprim / sulfamethoxazole 등의 항생제에 대한 내성이 줄어들고 동시에 ampicillin, chloramphenicol, colistin, tetracycline 등에 대한 내성이 증가하는 항생제 내성 패턴이 변화하는 결과로도 생각된다.

본 연구에서는 2011년 항생제의 사료 첨가 금지를 전후하여 국내 설사 이유자돈에서 분리한 Stx2e 양성 대장균의 지난 10년간 항생제 내성 경향을 분석한 결과, gentamicin, ciprofloxacin, norfloxacin, trimethoprim / sulfamethoxazole과 같은 자주 사용되었던 항생제들에 대한 내성은 낮아진 반면, colistin과 tetracycline에 대한 내성률은 증가하였고, 다제 내성균의 비율 또한 증가하는 경향을 나타내었다. 이와 같은 연구 결과는 대장균증 및 부종병의 예방 및 치료에 대한 기초 정보를 제공할 뿐만 아니라 항후 항생제 내성 연구와 사용 관리에 대한 전략을 수립하는 데에 중요한 자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

Acknowledgements

본 결과물은 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원의 생명산업기술개발사업의 지원을 받아 연구되었음 (114058-03-3-CG000).

ORCID

Wan-Kyu Lee, <http://orcid.org/0000-0001-5087-6359>

References

1. Hampson DJ. Postweaning *Escherichia coli* Diarrhoea in Pigs. In: Gyles CL. (ed.). *Escherichia coli* in domestic animals and humans. UK: CAB International; 1994. p.171-192.
2. Fairbrother JM, Gyles CL. Colibacillosis. In: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (eds.). *Diseases of Swine*. 10th ed. USA: A John Wiley Sons Inc.; 2012. p.723-749.
3. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. *Escherichia coli* In: Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO (eds.). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 4th ed. USA: John Wiley & Sons; 2011. p.267-308.
4. Tseng M, Fratamico PM, Bagi L, Delannoy S, Fach P, Manning SD, Funk JA. Diverse virulence gene content of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from finishing swine. *Appl Environ Microbiol* 2014;80:6395-6402.
5. Seo B, Jeong C, Kang A, Cho H, Kim W. Evaluation of the virulence genes and Shiga toxin-producing abilities of *Escherichia coli* field isolates causing edema disease in pigs. *Korean J Vet Serv* 2016;39:87-92.
6. Imberechts H, De Greve H, Lintermans P. The pathogenesis of edema disease in pigs. A review. *Vet Microbiol* 1992;31:221-233.
7. Wegener HC. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr Opin Microbiol* 2003;6:439-445.
8. Jensen HH, Hayes DJ. Impact of Denmark's ban on antimicrobials for growth promotion. *Curr Opin Microbiol* 2014;19:30-36.
9. Lim SK, Nam HM, Moon DC, Jang GC, Jung SC. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from healthy animals during 2010-2012. *Korean J Vet Res* 2014;54:131-137.
10. DANMAP 2013. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. pp.13, pp.91-93, Copenhagen, ISSN 1600-2032.
11. JVARM. A Report on the Japanese Veterinary Antimicrobials Resistance Monitoring System 2000 to 2007. pp.10-15, National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tokyo, 2009.
12. Government of Canada. Canadian integrated program for antimicrobial resistance surveillance (CIPARS) 2008. pp.142-156, Public Health Agency of Canada, Guelph, 2011.
13. Byun JW, Jung BY, Kim HY, Fairbrother JM, Lee MH, Lee WK. 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 (Praha)* 2013;58:468-476.
14. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;45:493-496.
15. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Microbiology* 2011;18:268-281.
16. Cho JK, Ha JS, Kim KS. Antimicrobial drug resistance of *Escherichia coli* isolated from cattle, swine and chicken. *Korean J Vet Public Heal* 2006;30:9-18.
17. Animal and Plant Quarantine Agency. Establishment of antimicrobial resistance surveillance system for livestock 2012. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, 2013.
18. Schroeder CM, Zhao C, Debroy C, Torcolini J, Zhao S, White DG, Wagner DD, McDermott PF, Walker RD, Meng J. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O157 Isolated from Humans, Cattle, Swine, and Food. *Society* 2002;68:576-581.
19. Uemura R, Sueyoshi M, Nagayoshi M, Nagatomo H. Antimicrobial susceptibilities of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from pigs with edema disease in Japan. *Microbiol Immunol* 2003;47:57-61.
20. Dewulf J, Catry B, Timmerman T, Opsomer G, de Kruif A, Maes D. Tetracycline-resistance in lactose-positive enteric coliforms originating from Belgian fattening pigs: Degree of resistance, multiple resistance and risk factors. *Prev Vet Med* 2007;78:339-351.
21. Lim SK, Lee HS, Byun JR, Park SY, Jung SC. Antimicrobial resistance of commensal bacteria isolated from food-producing animals I. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from cattle faecal samples. *Korean J Vet Public Heal* 2007;31:21-29.
22. Lim SK, Lee HS, Nam HM, Cho YS, Kim JM, Song SW, Park YH, Jung SC. Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003-2004. *Int J Food Microbiol* 2007;116:283-286.
23. Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ, McDermott PF. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. *Emerg Infect Dis* 2012;18:741-749.
24. Rosengren LB, Waldner CL, Reid-Smith RJ, Checkley SL, McFall ME, Rajić A. Antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* isolated from grow-finish pigs in 20 herds in Alberta and Saskatchewan. *Can J Vet Res* 2008;72:160-167.
25. WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. World Health Organization, Geneva, 2009.
26. Uemura R, Sueyoshi M, Nagayoshi M, Nagatomo H.

- Antimicrobial susceptibilities of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from pigs with edema disease in Japan. *Microbiol Immunol* 2003;47:57–61.
27. Meng Q, Bai X, Zhao A, Lan R, Du H, Wang T, Shi C, Yuan X, Bai X, Ji S, Jin D, Yu B, Wang Y, Sun H, Liu K, Xu J, Xiong Y. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pigs in China. *BMC Microbiology* 2014;14:5.