

최 종
연구보고서

항생제내성 수퍼박테리아 출현실태 파악 및
방제에 관한 연구

연구기관
서울대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “항생제내성 수퍼박테리아 출현실태파악 및 방제에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월

주관연구기관명 : 서 울 대
총괄연구책임자 : 박 용 호
세부연구책임자 : 박 용 호
협동연구기관명 : 서울여대
협동연구책임자 : 이 연 희
협동연구기관명 : 고 려 대
협동연구책임자 : 김 우 주
협동연구기관명 : 전 북 대
협동연구책임자 : 이 존 화

요 약 문

I. 제 목

항생제내성 수퍼박테리아 출현실태파악 및 방제에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

주요 항생제 내성 균주의 분포실태 파악, 축산물 유래 저항성균 및 내성 항생제의 종류 조사, 분자생물학적 및 유전학적인 기법을 통한 내성균의 항생제 내성 유전자 획득 경로 분석 등의 항생제내성 수퍼박테리아의 출현 실태파악 및 방제에 관한 연구를 통해 안전 축산물을 확보하고자 하였다.

특히 본 연구는 동물, 축산물 및 환경유래 항생제 내성원인균과 인체임상 내성균과의 상호연관성 여부 및 내성전달 경향을 분자생물학적 기법을 활용하여 최초로 분석함으로써, 축산농가는 물론 일반 소비자들에게도 정확한 정보를 제공할 수 있는 기반을 조성하였다.

2. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

최근 전 세계적으로 크게 문제시되는 축산물의 위해 요인인 축산물 유래 위해 병원성 세균, 항생제 저항 병원성 세균 및 잔류 항생제 등에 대한 관심이 크게 고조되었다. 이러한 시점에서 항생제 저항 축산물 위해 병원성 세균에 대한 유전자 분석 등과 같은 분자생물학적 차원에서의 분석 기술을 확립하고 이를 활용하여 축산물로부터 인체로 전이될 수 있는 가능성에 대하여 확인하는 것이 필요하며, 아울러 국내 출현 가능한 항생제 내성 수퍼박테리아의 특성 및 성상을 비교 분석함으로써 안전 축산물 생산을 위한 기술을 확립할 수 있다. 또한 축산 현장에서 사용되고 있는 주요 항생제 중, 만에 하나 인체에 유해한 수퍼박테리아를 유발할 가능성이 있는 경우에는 이를 대체할 수 있는 물질의 개발 및 방안을 강구하여 앞으로 제기될 수 있는 축산물의 안전성에 대한 확고한 대책을 마련할 수 있다.

나. 경제 · 산업적 측면

이미 유럽을 비롯한 일본 등 선진국에서 사용이 금지되었고, 국내에서도 사용이 금지된 avoparcin 등 동물용 사료첨가 항생제에 의한 인체의 Vancomycin 저항 *Enterococcus*, Vancomycin 저항 *S. aureus* 출현 여부를 첨단기술로 확인함으로써, 국내 축산업에서 야기될 수 있는 안전 축산물 생산 저해로 인한 경제적 피해를 사전에 예방할 수 있게 된다. 또한, 이러한 연구를 통해 국제적 추세에 따르고 피해를 사전에 대비함으로써, 국제교류상 대두될 수 있는 국내 축산물 안전성에 대한 기술적 신뢰성을 확보하여 국내 축산업 및 관련 산업의 보호는 물론 국민 건강 확보를 통해 국내 먹거리 산업과 관련된 국가 산업 구조의 안정적 발전을 기할 수 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 항생제 내성 수퍼박테리아 출현양상 파악 및 방제연구

가. 동물 중 항생제 내성 유전자 발현 병원성 세균 검출

1) 축산물, 축산 분변 유래 항생제 내성 세균 분리 동정 및 항생제 내성 유전자 확인

가) 분리, 동정된 항생제 내성 병원성 세균에 대한 내성유전자 (genotype) 및 표현형 (phenotype) 확인

나. 도축장 및 축산물 판매업소의 축산물 중 항생제 내성 세균 출현양상 파악

1) 주요 축산물 위해 미생물 동정 및 항생제 내성 조사

가) 축산물 위해 미생물 오염 실태 조사

나) 주요 축산물 위해 미생물 분리, 동정

다) 분리, 동정된 미생물의 항생제 감수성 검사 실시를 통한 내성패턴 확인

2) 분리 균주의 항생제 내성별 분류

가) 각각의 내성에 관련된 유전자 조사

나) 변이유전자 분석 및 전이성 조사

3) 항생제 내성 유전자 조사에 의한 내성 균주 출현 양상 파악

다. 항생제 내성 균주들의 내성인자 분석

1) 분리된 주요 축산물 균주의 주요 항생제 내성 유전자 특이 검출 기법 확립

2) 항생제 내성 유전자 검출에 의한 내성 균주의 성상 연구

2. 내성균의 내성기전과 연관성 연구

가. 동물, 축산물, 및 인체 임상 분리 내성 세균의 내성기전 분석

- 1) 분리 내성균주의 항생제 내성 유전자 분석 및 내성 유발 기전 확인 (항생제 target의 변화, Efflux mechanism에 의한 세포 밖으로 항생제 배출, Antibiotic inactivating enzyme 생산 등 해당 항생제에 따른 내성기전 규명)
- 나. 축산물 관련 내성균주 분리 및 특성 조사
- 다. 인체 임상 분리 내성 세균 유전자 분석
 - 1) 인체 임상 분리 내성 세균 감염 실태 조사
 - 가) 주요 임상균주 분리 및 동정
 - 나) 임상검체로부터 다제 내성균 분리
 - 2) 항생제 내성 유전자 검출
 - 가) PCR 등의 기법을 이용하여 검출
 - 나) Isoelectrofocusing electrophoresis 등의 기법을 이용하여 검출
- 라. 다제 내성균의 유전자형별 분석
 - 1) 분리된 다제 내성 균주들의 내성 기전 검사
 - 가) 다제 내성 균주들의 특징 조사
 - 나) 다제 내성 균주들의 항생제에 대한 내성기전 검사
- 마. VRE의 내성유전자, 분자역학적 연구 (Overlapping PCR, sequencing을 이용한 *vanA* cluster mapping)
 - 1) Plasmid analysis
 - 2) PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis)
- 바. *Salmonella* spp.의 내성유전자, 분자역학적 연구
 - 1) PCR, sequencing을 이용한 내성유전자 검색 (Quinolone 내성, *parC*, *gyrA* gene point mutation, DT104)
 - 2) RAPD (Random-amplified polymorphic DNA)
- 사. 축산물 유래 균주와 임상 분리균주의 상관성 분석
 - 1) 동물, 축산물 및 인체 임상 분리균주와의 연관관계 조사
 - 가) 동물, 축산물 및 인체 임상 분리균주의 내성 유전자 비교 조사
 - 나) 인체 분리주와 동물 분리주의 상관성 조사

3. 주요가축에서의 *E. coli* O157:H7과 MRSA 및 VISA의 분포 및 항생제 내성분석

- 가. 동물, 축산물 중 MRSA 및 VISA 검출
 - 1) 전라, 경상지역의 소, 돼지, 닭 등 우리나라 주요 가축 소화기관에 분포하고 있는 MRSA와 VISA 검출확인
 - 2) 축산물 중 MRSA와 VISA 검출확인

- 3) 대규모 방목장과 소규모 사육장 중 MRSA와 VISA 감염률 파악
- 4) 내성을 보이는 약제를 대체할 수 있는 감수성 약제 선별 연구
- 나. 주요가축 및 축산물의 항생제내성 *E. coli* O157:H7의 조사와 감수성 약제 연구
 - 1) 소, 돼지, 닭 등 우리나라 주요 가축 소화기관에 분포하고 있는 항생제 내성 *E. coli* O157:H7의 조사
 - 가) 주요 가축 소화기관으로부터 *E. coli* O157:H7 분리, 동정
 - 나) 분리, 동정된 *E. coli* O157:H7의 항생제 감수성 검사 실시
 - 2) 식용에 이용될 축산물에 분포하는 항생제 내성 *E. coli* O157:H7 조사
 - 가) 주요 가축 소화기관으로부터 *E. coli* O157:H7 분리, 동정
 - 나) 분리, 동정된 *E. coli* O157:H7의 항생제 감수성 검사 실시
 - 3) 대규모 방목장과 소규모 사육장의 항생제 내성 *E. coli* O157:H7의 오염도 조사
 - 가) 주요 가축 소화기관으로부터 *E. coli* O157:H7 분리, 동정
 - 나) 분리, 동정된 *E. coli* O157:H7의 항생제 감수성 검사 실시
 - 4) 감염 시 치료제로 사용하기 위한 감수성 약제 조사
- 다. 항생제 내성 MRSA 및 *E. coli* O157:H7의 내성인자 분석
 - 1) 주요 항생제 내성 유전자 특이 검출 기법 확립
 - 2) 항생제 내성 유전자 검출에 의한 내성 균주 성상 분석
 - 3) 인체분리 항생제 내성 균주와 분자 생물학적 상관성 분석

4. 주요가축에서의 *Campylobacter* spp.의 분포 및 항생제 내성분석 연구

- 가. 동물, 축산물 중 항생제내성 *Campylobacter* spp. 검출
 - 1) 축산물 분포 항생제 내성 *Campylobacter* spp. 검출확인
 - 2) 대규모 방목장과 소규모 사육장 및 사료 중 항생제 내성 *Campylobacter* spp. 감염률 파악
 - 3) 내성을 보이는 약제를 대체할 수 있는 감수성 약제 선별 연구
- 나. 주요가축의 항생제내성 *Campylobacter* spp.의 조사와 감수성 약제 연구
 - 1) 소, 돼지, 닭 등 우리나라 주요 가축 소화기관에 분포하고 있는 항생제 내성 *Campylobacter* spp.의 조사
 - 가) 주요 가축 소화기관으로부터 *Campylobacter* spp. 분리, 동정
 - 나) 분리, 동정된 *Campylobacter* spp.의 항생제 감수성 검사 실시
 - 2) 식용에 이용될 축산물들에 분포하는 항생제 내성 *Campylobacter* spp.의 조사
 - 가) 주요 가축 소화기관으로부터 *Campylobacter* spp. 분리, 동정
 - 나) 분리, 동정된 *Campylobacter* spp.의 항생제 감수성 검사 실시
 - 3) 대규모 방목장과 소규모 사육장에 항생제 내성 *Campylobacter* spp.의 오염도 조사
 - 가) 주요 가축 소화기관으로부터 *Campylobacter* spp. 분리, 동정

- 나) 분리, 동정된 *Campylobacter* spp.의 항생제 감수성 검사 실시
- 4) 감염 시 치료제를 위한 감수성 약제 조사
- 다. 항생제내성 *Campylobacter* spp.의 내성인자 분석
 - 1) 주요 항생제 내성 유전자 특이 검출 기법 확립
 - 2) 항생제 내성 유전자 검출에 의한 내성 균주 성상 분석
 - 3) 인체분리 항생제 내성 균주와 분자 생물학적 상관성 분석

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 가축, 축산물, 환경, 인체 임상 유래의 지표 미생물 (VRE, *S. aureus*, *E. coli*) 및 병원성 세균 (*Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.)의 분리 및 항생제 내성 파악

1) 신속 간편한 분리 동정기법 확립

가) *Salmonella*의 신속 간편한 분리 동정 기법

(1) Conventional method에 비해 배양시간이 단축되는 배양 기법 확립 및 monoclonal antibody를 이용한 *Salmonella* 진단 kit를 도입, 26시간내에 *Salmonella* 검출이 가능.

25 g sample + BPW 200 ml
 ↓ 37°C, 7 h incubation
 Enriched culture 200 ml + RV broth 200 ml
 ↓ 42°C, 19 h incubation
 Test by PBM *Salmonella* MAb test kit

나) Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA)의 신속 간편한 분리 동정 기법

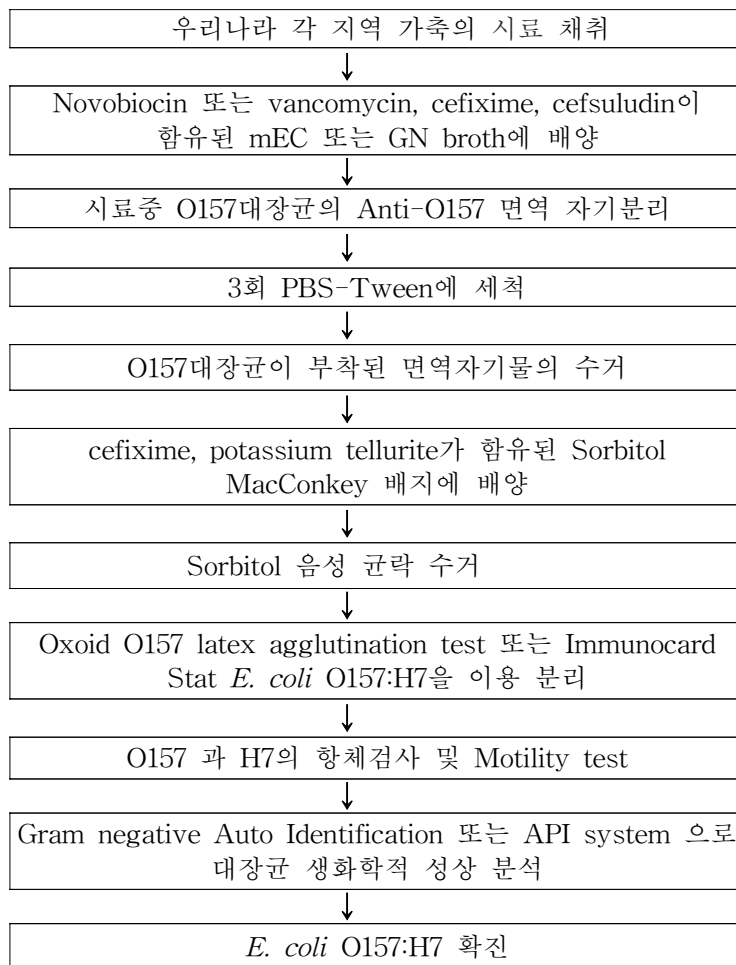
(1) MRSA의 PBP2a를 진단하는 **MRSA-SCREEN Test**를 수행, PCR로 검출하지 못했던 MRSA균주 검출.



S6-S and S23-S, strong positive reaction of S6 strain and weak positive reaction of S23 strain with sensitized latex particle; S6-C and S23-C, negative reactions of S6 and S23 strains with control latex particle.

다) *E. coli* O157:H7 신속 간편한 분리 동정 기법

(1) Anti-O157 면역 자기분리를 이용, *E. coli* O157:H7을 신속, 간편하게 분리 동정



2) 균주별 분리율 (총 샘플 수: 6915, 총 분리균 수: 2021)

가) *S. aureus* 총 분리균 수/총 샘플 수: 986/2931 (33.6%)

- (1) 축산물 유래 균주: 786주
- (2) 임상, 인체 유래 균주: 200주
- 나) *Salmonella* spp. 총 분리균 수/총 샘플 수: 339/1292 (26.2%)
 - (1) 축산물 유래 균주: 229주
 - (2) 임상, 인체 유래 균주: 110주
- 다) *E. coli* 총 분리균 수/총 샘플 수: 326/1034 (31.5%)
 - (1) 축산물 유래 균주: 233주
 - (2) 환경 유래 균주: 71주
 - (3) 임상, 인체 유래균주: 22주
 - * EHEC: 45/1854(2.42%)
- 라) *Enterococcus faecium/faecalis* 총 분리균 수/총 샘플 수: 177/1145 (15.5%)
 - (1) 축산물 유래 균주: 83주
 - (2) 임상, 인체 유래 균주: 94주
- 마) *Campylobacter* spp. 총 분리균 수/총 샘플 수: 193/513 (37.6%)
 - (1) 축산물 유래 균주: 182주
 - (2) 임상, 인체 유래 균주: 11주

나. 가축 및 축산물, 환경유래 및 인체임상 항생제 내성 분리 균주 특성 파악

- 1) 항생제 내성 특이 유전자 검출
 - 가) PCR
 - (1) *Salmonella* spp. - quinolone resistant determining region (QRDR) in *gyrA* 및 integron gene 검출
 - (2) MRSA 및 *S. aureus* - *mecA*, *mecI*, *mecR*, IS1272, *ccrAccrB*, Tn554, IS431, *mer*, pT181, pUB110, 및 staphylococcal enterotoxin (SE) genes 검출
 - (3) VRE - *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*, *vanS*, *ddl* gene 및 Tn1546 검출
 - (4) *E. coli* - extended-spectrum β -lactamase (ESBL), *aac*, *aphI*, *aphII*, *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *rfbE0157*, *EhlyA*, LTa, STb, VTc 및 VTed 검출
 - 나) Isoelectric focusing electrophoresis (IEF)
 - (1) *Salmonella* 및 *E. coli*의 ESBL 검출을 위한 최적 condition 확립
 - 다) Real time PCR (RT-PCR)
 - (1) *Campylobacter*의 hydrolysis of sodium hippurate 및 *CeuE* gene 검출
- 2) 유래별 분리균주의 상관성 분석
 - 가) Overlapping PCR- VRE의 IS1542, IS1216 및 IS1251 검출을 통한 *vanA* gene

cluster mapping

- 나) Plasmid transfer - *Salmonella* spp., VRE, *E. coli*
- 다) RAPD - *Salmonella* spp., *E. coli*
- 라) PFGE - *Salmonella* spp., MRSA, *Campylobacter* spp., VRE

다. *Salmonella* spp.의 항생제 내성 분석 및 인체 임상 분리주와의 비교 분석

1) 주요 분리 균종

- 가) 인체 임상 분리주 - *S. enteritidis*가 주된 serotype을 차지
- 나) 동물 및 축산분리주 - *S. typhimurium*가 주된 serotype을 차지

2) 다제 내성을 비교

- 가) 사람과 동물 분리주 간에 유의적 차이는 나타나지는 않았으나 **사람 분리주에서 보다 높은 내성 비율을 보임**

3) 인체 임상 분리주와 축산물 분리주의 연관성

- 가) PFGE 분석 결과 - 총 17 subtype 중 **단 한 subtype에서만 사람균주와 동물균주 간의 공통성을 보임**

- 나) 항생제 내성 유전자 분석 결과, **동물 또는 축산물 분리 *Salmonella* spp.가 사람으로 전이된 유전적인 근거는 찾을 수 없었음**

- 다) 동물분리 *Salmonella* spp.로부터 *E. coli*로의 integron 전이 가능성이 실험적으로 확인됨

- 라) 동물유래 균주에서 quinolone resistance 비율이 비교적 높게 보고되었고 *gyrA* sequence에서의 point mutation도 검출

- 마) 동물유래 균주에서의 **quinolone 계열 내성은 축산업에서의 해당 항생, 항균제 사용에서 영향을 받은 것으로 판단됨**

- 바) *Salmonella* spp.에 대한 지속적인 모니터링 및 연구의 필요성

라. MRSA 및 VISA의 항생제 내성 분석 및 인체 임상 분리주와의 비교 분석

1) 가축 및 축산물에서의 MRSA 및 VISA 분리

- 가) 축산물에서 VISA 및 VRSA는 검출되지 않았음
- 나) MRSA는 3.6%의 낮은 비율로 검출되었으며, 주로 유방염 감염 원유로부터 분리됨

2) 다제 내성을 비교

- 가) **축산물 유래 MRSA들은 대부분 5종 정도의 항생제에만 내성을 보였음**
- 나) **인체 임상분리균주들은 14종의 항생제 중 11종 이상의 항생제에 내성을 보였음**

3) SCCmec typing을 통한 인체 임상 분리주와 축산물 분리주의 연관성

- 가) 유방염 분리균주들은 전형적인 community-acquired MRSA의 특성을 나타내었음
- 나) 동물병원 및 사람병원 유래 균주들은 대부분 hospital-acquired MRSA의 특성을 보

였음

4) PFGE 분석을 통한 인체 임상 분리주와 축산물 분리주의 연관성

가) **인체 임상유래 균주와 동물 유래 균주간의 homology는 없었음**

나) 사람 및 동물간의 교차 오염 및 유전자 pool 혼합의 가능성은 낮은 것으로 생각됨

다) *mecI* gene의 point mutation이 인체 병원 분리 균주에서만 발견되었음

라) 인체 병원 분리주인 ccarm3001과 시판 닭 분리 MRSA의 유전자분석 결과 및 *mecI* gene 분석결과는 병원 항생제 사용 관리의 **중요성**을 입증

마) 추후 community-acquired MRSA 및 hospital-acquired MRSA간의 전파 경로에 대한 연구 필요

마. VRE의 항생제 내성 분석 및 인체 임상 분리주와의 비교 분석

1) 가축 및 축산물에서의 VRE 분리

가) 임상적으로 문제가 되는 vancomycin 고농도 내성 *vanA*는 주로 닭고기에서 분리되었음 (40%)

나) 1997년 avoparcin의 동물 사용 금지 이후에도 VRE는 축산물에서 계속 검출되고 있음

다) Vancomycin 저농도 내성인 *vanC* VRE의 경우, 건강한 사람을 포함한 인체 분리율은 낮게 나타남

라) 축산물에서는 닭뿐만 아니라 소, 돼지 모두에서 *vanC* VRE가 다량 분리됨

2) 인체 임상 분리주와 축산물 분리주의 연관성

가) PFGE 양상 및 *vanA* gene cluster 구조, 항생제 내성 패턴은 거의 일치하지 않았음

나) 축산분리 *vanA* VRE의 *van* gene은 실험적으로 다른 *Enterococcus* spp.로 거의 전이되지 않았음

다) 아직까지 가축에서 사람으로의 VRE의 전파가 이루어지지 않은 것으로 사료됨

라) *VanA* VRE가 분리된 동일 sample에서 분리된 *S. aureus*에서는 *van* gene이 검출되지 않았고, VRE로부터 *S. aureus*로의 *van* gene 전이는 이루어지지 않은 것으로 사료됨

마) 국내의 경우 임상적으로 *vanC* VRE의 문제가 보고된 바는 없으나, 외국의 경우 임상에서의 분리율이 증가하고 있으므로 지속적인 모니터링 및 관리가 필요

바) 국내 축산물에서의 VRE 분리율이 높은 만큼 동물에서 사람으로의 전파 가능성을 지속적으로 연구하고, 이를 차단하기 위해 노력해야 할 것으로 판단됨

바. *E. coli* 및 *E. coli* O157:H7의 항생제 내성 분석 및 인체 임상 분리주와의 비교 분석

1) *E. coli* 분리균주들의 정상 및 다제 내성균 비교

- 가) 36.8%의 축산물 유래 용혈성 대장균이 다제 약제 내성을 보였고, ESBL 산생 균주는 존재하지 않았음
 - 나) 축산물 유래 대장균들 중 aminoglycoside 내성률은 44.7%였음
 - 다) 임상분리 대장균의 경우, ESBL 산생균주가 7.3%였으며, 이들의 76.5%가 다제 내성을 나타내었음
 - 라) 임상분리 ESBL 산생 대장균들 중 quinolone계 내성 균주가 27.5%였음
 - 마) 임상분리 ESBL 산생 대장균들은 QRDR 상의 *gyrA* 및 topoisomerase IV의 A subunit *parC* 부위에 높은 유전자 변이를 보이고 있었으며, 추가적으로 *gyrB*, *parE* 등에서도 변이를 나타내었음.
- 2) 인체 임상 분리주와 축산물 분리주의 연관성
- 가) 임상분리 ESBL 산생 대장균들은 주로 TEM 유형의 ESBL을 보유하고 있었으며, 실험적으로 이 유전자들이 동물 균주로 전파됨이 입증되었음
 - 나) 한강 등의 환경에서도 ESBL 산생 대장균이 분리되었음
 - 다) 이러한 결과들은 인체 병원에서 분리된 ESBL 산생 대장균의 관리가 절실히 필요함을 제시함
 - 라) 축산물 유래 대장균의 사람으로의 전이에 대한 근거는 확인되지 않음
- 3) 축산물 유래 *E. coli* O157:H7의 다제 내성 및 정상
- 가) 축산물 유래 *E. coli* O157:H7은 62.2%가 항생제 다제 내성 균주였으며, 보유하는 toxin type 및 높은 aminoglycoside 계열 내성으로 이들이 인체에 위협이 될 가능성이 있음을 암시
 - 나) 외국에 비해 현저히 높은 내성으로 관리 및 주의가 요구됨
 - 다) 축산분야에서의 aminoglycoside 및 fluoroquinolone제제 사용 및 관리가 필요

사. *Campylobacter* spp.의 항생제 내성 분석 및 인체 임상 분리주와의 비교 분석

- 1) *Campylobacter* spp. 분리 균주의 항생제 내성
- 가) 축산물 유래 *C. jejuni*와 *C. coli*의 항생제 내성검사 결과 ciprofloxacin, nalidixic acid등 quinolone계 항생제와 tetracycline에서 높은 내성율을 보였음
 - 나) 인체분리주에서는 축산물 분리주에 비해 낮은 내성율을 보였음
- 2) 인체 임상 분리주와 축산물 분리주의 연관성
- 가) 특히 문제시되는 quinolone계 항생제에 내성을 보이는 균주의 PCR 및 분석결과, quinolone계 항생제의 target인 *gyrA* gene의 point mutation을 확인할 수 있었음.
 - 나) PFGE 분석결과, 축산물에서 분리된 균주와 인체분리주 사이의 연관성은 찾아볼 수 없었음
 - 다) 내성을 보이는 항생제가 국내 사료 첨가용으로 쓰이는 항생제와 연관성을 가지고 있다는 점에서 사료첨가 항생제에 의한 항생제 내성 유발 가능성이 보임

라) 인체분리주의 수가 적어 축산물 분리주와의 정확한 비교분석에 어려움이 있는 관계로 추후 식중독 발생시 지속적인 *Campylobacter* spp.의 모니터링이 요망됨

2. 연구결과의 활용: 내성 전달기전 파악 및 차단 기술 모색

가. 내성전달기전 파악 기술 확립

1) Overlapping PCR, PFGE, RAPD, plasmid profiling, 및 transconjugate 분석 등을 통해 항생제 내성 및 관련 유전자의 전달기전 파악 기술 확립

나. 항생제 내성 경향 파악

1) *Salmonella* spp., MRSA, VRE, *E. coli* 및 *E. coli* O157:H7, *Campylobacter* spp. 등 축산물 유래 균주들의 항생제 내성 경향을 파악하고 이들을 인체분리 균주의 항생제 내성 패턴과 비교

다. 차단 기술 모색 가능

- 1) 주요 항생제 내성균 유도 및 전달 관련 항생제 사용 규제
- 2) 축산에서의 항생제 대체 물질 (비특이 면역 증강제, Probiotics 등)의 지속적 개발
- 3) 축산물 위해 미생물 방지를 위해 축산농가 및 소비자 홍보 확대

SUMMARY

I. Project title

Studies on the surveillance and control of antibiotic resistant superbacteria

II. Objectives and necessities of the project

1. Objectives of the project

Surveillance of antibiotic resistant bacteria and the analysis of resistance inducing mechanisms related with antibiotic resistant gene transfer using molecular and microbiological techniques have been carried out to secure the safety of livestock products.

In particular, this study has been focused on the correlation between antibiotic resistant bacteria from animal origin such as animals and livestock products and human origin and the transfer of resistance between them using molecular and biological techniques for the first time in Korea. Therefore, this study can provide correct information about antibiotic resistance in livestock industry and consumers.

2. Necessities of the project

A. Technical aspect

Recently, interests on pathogenic bacteria from animals that can cause hazard in livestock products, antibiotic resistant bacteria and residual antibiotics of livestock products are increasing worldwide because these might spread via the food chain to human and cause human infection. Therefore, the establishment of analyzing method for antibiotic resistant gene of bacteria in livestock products and its application on the examination of transferability of antibiotic resistant bacteria from animal to human were studied. Characterization of antibiotic resistant bacteria isolated in Korea was also carried out to establish techniques for production of safe which secure livestock products. We tried to find antibiotics used in animal husbandry and might cause clinical problems (superbacteria), and seek for the alternative ways to substitute for

these antibiotics. With all these results, the scientific approach can be obtained for safety of livestock products.

B. Economic and industrial aspect

In developed countries such as Europe, it is strongly suggested that the use of glycopeptide antibiotic avoparcin in the animal husbandry has resulted in the selective increase in vancomycin resistant enterococci (VRE) in animal intestines, with subsequent appearance of VRE in the human community. Therefore, the European Union banned the use of avoparcin in animal husbandry, and Korea followed that policy. The surveillance of VRE and vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) using advanced techniques can be a way to prevent from the potential economic losses in livestock products by providing correct information and safe livestock and livestock products. This study also enables Korean livestock products to be accepted internationally as safe by providing correct informations and techniques. Finally, public health and stable livestock industry are established with the promotion of the national industrial development related to livestock products.

III. The contents and scope of the project

1. Surveillance and protection of antibiotic resistant superbacteria

A. Detection of pathogenic bacteria that express antibiotic resistant gene(s) from animals

1) Isolation of antibiotic resistant bacteria from livestock products, animal feces and identification of their antibiotic resistant genes

a) Identification of genotype and phenotype of isolated antibiotic resistant bacteria

B. Surveillance of antibiotic resistant bacteria from livestock products at slaughterhouses and retail markets

1) Isolation of pathogenic bacteria from livestock products and investigation on their antibiotic resistance patterns

a) Surveillance of pathogenic bacteria from livestock products

b) Isolation and identification of pathogenic bacteria from livestock products

c) Identification of antibiotic resistance patterns of isolates

2) Classification of isolated bacteria according to the antibiotic resistant patterns

- a) Identification of antibiotic resistance genes
- b) Investigation of mutation and transferability of antibiotic resistant genes
- 3) Study on the patterns of occurrence of antibiotic resistant bacteria by the surveillance of the antibiotic resistant genes
- C. Analysis of antibiotic resistance factors of antibiotic resistant bacteria
 - 1) Establishment of detection method specific for antibiotic resistance genes of isolates
 - 2) Study on the characteristics of antibiotic resistant bacteria by detection of antibiotic resistant genes
- 2. Studies on antibiotic resistance mechanism and correlation of antibiotic resistant bacteria between livestock and human isolates
 - A. Analysis of antibiotic resistance mechanism and correlation between antibiotic resistant bacteria from animal, livestock product and human clinical isolates
 - 1) Analysis of antibiotic resistant genes of isolated antibiotic resistant bacteria and confirmation of resistance-inducing mechanism (change of antibiotic target, elimination of antibiotics by efflux mechanism, and production of antibiotic inactivating enzyme)
 - B. Isolation, identification and characterization antibiotic of resistant bacteria in livestock products
 - C. Analysis of antibiotic resistant genes of clinical human isolates
 - 1) Prevalence of antibiotic resistant bacteria isolated from clinical human isolates
 - a) Isolation and identification of bacteria isolated from human sources
 - b) Isolation of multi-drug resistant bacteria from clinical specimens
 - 2) Detection of antibiotic resistant genes from isolates
 - a) Detection by molecular biological techniques such as PCR
 - b) Detection using isoelectrofocusing electrophoresis (IEF)
 - D. Analysis of multi-drug resistant bacteria by genotyping
 - 1) Studies on the mechanism of isolated multi-drug resistant bacteria
 - a) Characterization of multi-drug resistant bacteria
 - b) Antibiotic resistant mechanism of multi-drug resistant bacteria
 - E. Molecular epidemiologic examination of resistance genes of vancomycin resistant enterococcus (VRE) (Overlapping PCR and *vanA* cluster mapping by sequencing)
 - 1) Plasmid analysis
 - 2) PFGE (pulsed-field gel electrophoresis)

F. Molecular epidemiologic examination of resistance genes of *Salmonella* spp.

- 1) Search for resistant genes by PCR and sequencing
(Quinolone resistance, *parC*, *gyrA* gene point mutation and DT104)
- 2) RAPD (random-amplified polymorphic DNA)

G. Analysis of genetic relatedness between antibiotic resistant bacteria from livestock and human clinical isolates

- 1) Correlation between isolates from livestock and livestock products and human clinical isolates
 - a) Comparison of antibiotic resistant genes of superbacteria isolated from livestock, livestock products and human
 - b) Investigation of correlation between them

3. Investigation of distribution of *E. coli* O157:H7, MRSA and VISA and analysis of antibiotic resistance in livestock and livestock products

A. Detection of MRSA and VISA in livestock and livestock products

- 1) Detection of MRSA and VISA in digestive system of livestock such as cow, pig and poultry in Jeolla and Gyung-sang provinces in Korea
- 2) Detection of MRSA and VISA in livestock products
- 3) Investigation of infection rates of MRSA and VISA in large pasture and small farms
- 4) Selection of susceptible antimicrobials as substitutes for the resistant antibiotics

B. Investigation of antibiotic resistant *E. coli* O157:H7 in animals and selection of susceptible drugs

- 1) Detection of *E. coli* O157:H7 in digestive system of livestock such as cow, pig, and poultry in Korea
 - a) Isolation and identification of *E. coli* O157:H7 from digestive system of animals
 - b) Antibiotic susceptibility test of isolated *E. coli* O157:H7
- 2) Investigation of antimicrobial resistance of *E. coli* O157:H7 in livestock products
 - a) Isolation and identification of *E. coli* O157:H7 from digestive system of animals
 - b) Antibiotic susceptibility test of isolated *E. coli* O157:H7
- 3) Investigation of contamination level of *E. coli* O157:H7 in large pasture, small farms and feed
 - a) Isolation and identification of *E. coli* O157:H7 from digestive system of livestock
 - b) Antibiotic susceptibility test of isolated *E. coli* O157:H7

- 4) Screening of effective antibiotics for the treatment of infected animals
 - C. Analysis of resistant genes of MRSA and *E.coli* O157:H7
 - 1) Establishment of specific detection method for major resistant genes
 - 2) Characterization of antibiotic resistant bacteria by detection of resistant genes
 - 3) Analysis of genetic relatedness of antibiotic resistant bacteria between human and animal origins by molecular techniques
4. Investigation of distribution of *Campylobacter* spp. and analysis of antibiotic resistance in livestock and livestock products
- A. Detection of *Campylobacter* spp. in livestock and livestock products
 - 1) Detection of *Campylobacter* spp. in livestock products
 - 2) Investigation of infection rates of *Campylobacter* spp. in large pasture and small farms
 - 3) Selection of susceptible antimicrobials as substitutes for the resistant antibiotics
 - B. Investigation of antibiotic resistant *Campylobacter* spp. in animals and selection of susceptible drugs
 - 1) Detection of *Campylobacter* spp. in digestive system of livestock such as cow, pig, and poultry in Korea
 - a) Isolation and identification of *Campylobacter* spp. from digestive system of animals
 - b) Antibiotic susceptibility test of isolated *Campylobacter* spp.
 - 2) Investigation of antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in livestock products
 - a) Isolation and identification of *Campylobacter* spp. from digestive system of animals
 - b) Antibiotic susceptibility test of isolated *Campylobacter* spp.
 - 3) Investigation of contamination level of *Campylobacter* spp. in large pasture, small farms
 - a) Isolation and identification of *Campylobacter* spp. from digestive system of livestock
 - b) Antibiotic susceptibility test of isolated *Campylobacter* spp.
 - 4) Screening of effective antibiotics for the treatment of infected animals
 - C. Analysis of resistant genes of *Campylobacter* spp.
 - 1) Establishment of specific detection method for major resistant genes
 - 2) Characterization of antibiotic resistant bacteria by detection of resistant genes
 - 3) Analysis of genetic relatedness of antibiotic resistant bacteria between human and animal origins by molecular techniques

IV. Results and proposals for its application

1. Results

A. Isolation and identification of indicative organisms (VRE, *S. aureus* and *E. coli*) and pathogenic bacteria (*Salmonella* spp., and *Campylobacter* spp.) from livestock, livestock products, environments and humans and investigation of their antibiotic resistance

1) Establishment of quick and simple isolation and identification method

a) Quick and simple isolation and identification method for *Salmonella*

- (1) Establishment of detection method that includes culturing method which can reduce culture time compared with conventional method by introduction of a *Salmonella* test kit with monoclonal antibody which enables *Salmonella* to be isolated in 26 hours

25 g sample + BPW 200 ml
↓ 37°C, 7 h incubation
Enriched culture 200 ml + RV broth 200 ml
↓ 42°C, 19 h incubation
Test by PBM *Salmonella* MAb test kit

b) Quick and simple isolation and identification method for Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA)

- (1) **MRSA-SCREEN Test for detecting PBP2a of MRSA. Detection of MRSA which couldn't be detected by PCR.**

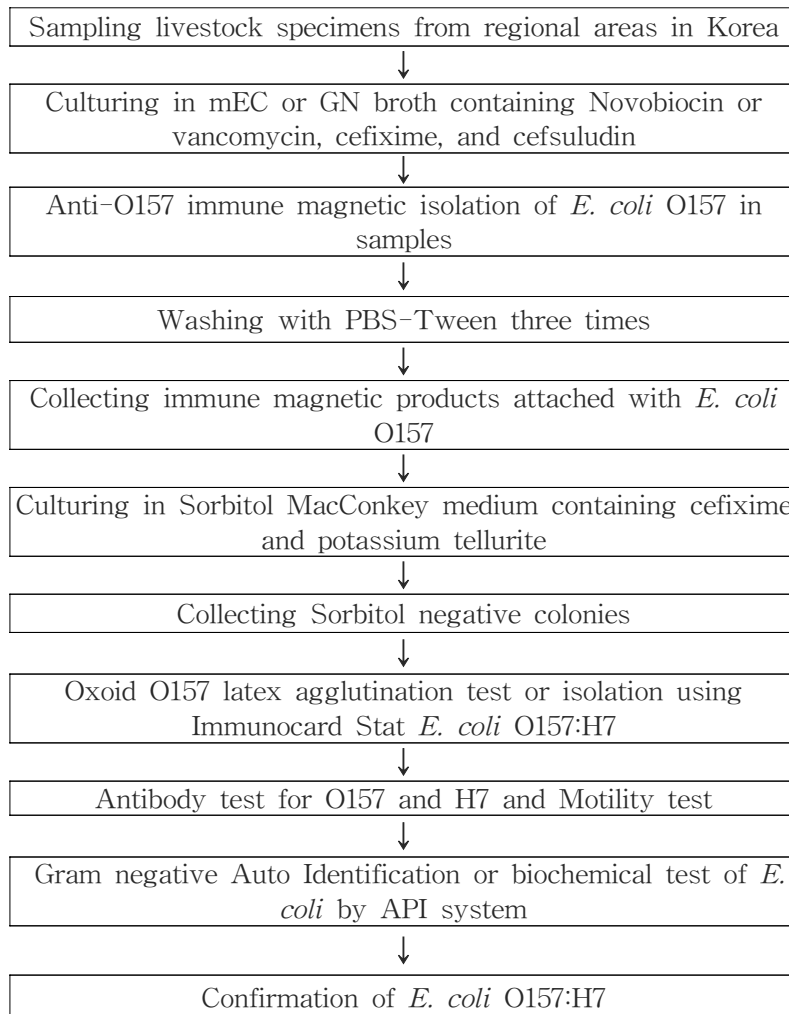


S6-S and S23-S, strong positive reaction of S6 strain and weak positive reaction of S23 strain with sensitized latex particle; S6-C and S23-C, negative reactions of S6 and S23 strains with control latex particle.

c) Quick and simple isolation and identification method for *E. coli* O157:H7

- (1) Quick and simple isolation and identification of *E. coli* O157:H7 using **Anti-O157**

immune magnetic isolation



2) Isolation rate (Total No. of samples: 6915, Total No. of isolates: 2021)

- a) *S. aureus* (Total No. of isolates/ Total No. of samples): 986/2931 (33.6%)
 - (1) Animal originated isolates: 786 strains
 - (2) Human clinical isolates: 200 strains
- b) *Salmonella* spp. (Total No. of isolates/ Total No. of samples): 339/1292 (26.2%)
 - (1) Animal originated isolates: 229 strains
 - (2) Human clinical isolates: 110 strains
- c) *E. coli* (Total No. of isolates/ Total No. of samples): 326/1034 (31.5%)

- (1) Animal originated isolates: 233 strains
- (2) Environment originated isolates: 71 strains
- (3) Human clinical isolates: 22 strains
 - * EHEC: 45/1854 (2.42%)
- d) *Enterococcus faecium/faecalis* (Total No. of isolates/ Total No. of samples):
177/1145 (15.5%)
 - (1) Animal originated isolates: 83 strains
 - (2) Human clinical isolates: 94 strains
- e) *Campylobacter* spp. (Total No. of isolates/ Total No. of samples): 193/513 (37.6%)
 - (1) Animal originated isolates: 182 strains
 - (2) Human clinical isolates: 11 strains

B. Characterization of antibiotic resistant isolates originated from livestock, livestock products, environments and human hospitals

- 1) Detection of antibiotic resistant genes
 - a) PCR
 - (1) *Salmonella* spp. - quinolone resistant determining region (QRDR) in *gyrA*, detection of integron gene
 - (2) MRSA and *S. aureus* - detection of *mecA*, *mecI*, *mecR*, IS1272, *ccrAccrB*, Tn554, IS431, *mer*, pT181, pUB110, and staphylococcal enterotoxin (SE) genes
 - (3) VRE - detection of *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*, *vanS*, *ddl* gene and Tn1546
 - (4) *E. coli* - detection of extended-spectrum β -lactamase (ESBL), *aac*, *aphI*, *aphIII*, *stx1*, *stx2*, *eaeA*, *rfbE*₀₁₅₇, *EhlyA*, LTa, STb, VTc and VTed
 - b) Isoelectric focusing electrophoresis (IEF)
 - (1) Establishment of optimal condition for ESBL detection of *Salmonella* spp. and *E. coli*
 - c) Real time PCR (RT-PCR)
 - (2) Detection of gene for hydrolysis of hippurate in *Campylobacter* spp. and *CeuE*
- 2) Classification of Isolates according to their origin - Analysis of their genetic correlation
 - a) Overlapping PCR - *vanA* gene cluster mapping by detection of IS15421, IS1216, and IS1251
 - b) Plasmid transfer - *Salmonella* spp., VRE, and *E. coli*
 - c) RAPD - *Salmonella* spp., and *E. coli*

d) PFGE – *Salmonella* spp., MRSA, and *Campylobacter* spp.

C. Antibiotic resistance analysis for *Salmonella* spp. and comparison between livestock and human clinical isolates

- 1) Major isolates from different sources
 - a) Human clinical isolates – *S. Enteritidis* was major serotype.
 - b) Isolates of animals and livestock – *S. Typhimurium* was major serotype.
- 2) Comparison of multi-drug resistance patterns
 - a) There were no significant differences between human and animal isolates although slightly high resistance patterns were observed in human isolates
- 3) Correlation between human clinical isolates and animal and livestock product isolates
 - a) PFGE analysis result – Among 17 subtypes, only one subtype had common band pattern between human and animal isolates
 - b) Antibiotic resistance gene analysis result – The genetic correlation between human and animal isolates, of which *Salmonella* spp. have been transferred from livestock or livestock products to human was not found
 - c) The probability of integron gene transfer from animal-originated *Salmonella* spp. to *E. coli* was confirmed *in vitro*.
 - d) Relatively high quinolone resistance rate of *Salmonella* spp. isolates were observed in animals and point mutation in *gyrA* sequences was also found.
 - e) The high quinolone resistance rate in animal-originated strains seemed to be affected by the frequent use of quinolone antibiotics in animal husbandry.
 - f) Studies and monitoring on the antibiotic resistant *Salmonella* spp. should be continued.

D. Analysis of antibiotic resistance of MRSA and VISA, and comparison between human clinical and animal isolates

- 1) Isolation of MRSA and VISA in livestock and livestock products
 - a) VISA and VRSA were not isolated from livestock product.
 - b) MRSA were isolated in low detection rate (3.6%). Most MRSA isolates were originated from mastitis-infected raw milk.
- 2) Comparison of multi-drug resistance patterns
 - a) Most MRSA originated from livestock products were resistant to about 5 antibiotics.
 - b) Human clinical isolates were resistant to more than 11 antibiotics among 14

antibiotics.

- 3) Analysis of correlation between human clinical isolates and animal isolates using SCC*mec* typing
 - a) Isolates from mastitis-infected milk were characterized as community-acquired MRSA
 - b) Most MRSA isolates from animals or human hospitals were confirmed as hospital-acquired MRSA
- 4) Analysis of correlation between human clinical isolates and animal isolates by PFGE
 - a) There was no homology between human clinical and animal isolates.
 - b) It seemed that the cross contamination between human and animals and the possibility of genetic mixing are low.
 - c) Point mutation of *mecI* gene was detected only in human isolates
 - d) **According to the results of *mecI* gene mutation and *ccarm* 3001 analysis, the prudent use of antibiotics in human hospital is significantly important.**
 - e) It is necessary to define the transfer routes between community- and hospital-acquired MRSA.

E. Analysis of antibiotic resistance of animal originated VRE and comparison of them with human clinical isolates

- 1) Isolation of VRE from livestock and livestock products
 - a) *VanA* VRE which showed high-level resistant to vancomycin and teicoplanin, were isolated in a large numbers from poultry (40%).
 - b) VRE have been continuously detected in livestock products since the use of avoparcin was banned in 1997.
 - c) *VanC* VRE which showed low-level resistant to vancomycin, were isolated in a low rate in healthy human
 - d) *VanC* VRE were isolated from cattle and pig as well as poultry.
- 2) Correlation between isolates of human origin and animal origin
 - a) PFGE pattern, *vanA* gene cluster and antimicrobial resistant pattern showed no genetic relatedness between human and animal isolates.
 - b) *VanA* isolates from animal hardly transferred vancomycin resistance gene to enterococci under the experimental conditions.
 - c) It is considered that vancomycin resistant determinant of VRE has not been transferred from animal to human.

- d) It seems that *van* gene is not transferred from VRE to *S. aureus* based on the results that *van* gene from *S. aureus* isolated from the same livestock products which had *vanA* VRE was not detected.
- e) *VanC* VRE have been recently increasing as a pathogen of human hospital infection in EU. Therefore, it is necessary to establish continuous monitoring and management program for the control of *vanC* VRE although there was no clinical report of *vanC* VRE in hospitals in Korea.
- f) Isolation rate of VRE from livestock was high, so it is required to examine the probability of transfer of resistance from animal to human. Also, efforts to prevent dissemination of vancomycin resistance should be continued.

F. Antimicrobial resistant patterns of *E. coli* and *E. coli* O157 and comparison of isolates from animal and human origin

- 1) Characterization of isolates and comparison of multi-drug resistant bacteria
 - a) A total of 36.8% of EHEC isolated from animal origin showed multi-drug resistance and there was no ESBL *E. coli*.
 - b) A total of 44.7% of *E. coli* isolates from animal origin were resistant to aminoglycosides.
 - c) Among *E. coli* isolates from human origin, a total of 7.3% produced ESBL and of which, 76.5% showed multi-drug resistance.
 - d) A total of 27.5% of ESBL producing *E. coli* of human isolates were resistant to quinolone.
 - e) High genetic diversity was found at *gyrA* of QRDR and subunit *parC* of topoisomerase IV in clinical *E. coli* isolates which produce ESBL with additional mutations at *gyrB* locus.
- 2) Correlation between human and animal isolates
 - a) ESBL producing clinical *E. coli* isolates usually retained TEM type ESBL and this gene was transferred to animal originated *E. coli* under experimental condition
 - b) ESBL producing *E. coli* was also isolated from an environmental source such as Han river.
 - c) These results suggested that management and control of ESBL producing *E. coli* in human hospitals is very important.
 - d) There is no evidence of the transfer of *E. coli* from animal to human.
- 3) Multi-drug resistance and characteristics of *E. coli* O157 isolated from livestock
 - a) *E. coli* O157 from livestock could be a threat to human since a total of 62.2% of

isolates had multi-drug resistant characteristics and most of the isolates were resistant to aminoglycoside antibiotics and produced toxins.

- b) It is necessary that surveillance and monitoring of *E. coli* O157 should be continued because antibiotic resistant rate was remarkably higher than those in other countries.
- c) Special cautious management and guideline for prudent use of aminoglycoside and fluoroquinolone in livestock husbandry should be established.

G. Analysis of antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and comparison of isolates from animal and human origin

- 1) Antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. isolates
 - a) The results of antimicrobial resistance analysis of *C. jejuni* and *C. coli* isolated from animals showed high resistance to tetracycline and quinolone such as ciprofloxacin, nalidixic acid, etc..
 - b) Human Isolates showed lower resistance to antibiotics than animals.
- 2) Correlation between animal and human isolates
 - a) As the results of genetic analysis of isolates resistant to quinolone by PCR and sequencing, point mutation of *gyrA* gene which is a target to quinolone was detected.
 - b) There was no genetic relatedness between animal and human isolates based on PFGE analysis.
 - c) Antimicrobial feed additives might induce resistance of isolates to antibiotics since the same antimicrobials had been used as feed additives.
 - d) Continuous monitoring and surveillance of *Campylobacter* spp. which cause food borne diseases should be established to prevent the transfer of antibiotic resistant bacteria from animal to human.

2. Future application: Understanding of resistance transfer mechanism and establishment of preventive methods

A. Establishment of techniques for understanding of resistance transfer mechanisms

- 1) Establishment of complete analysis methods for antimicrobial resistance and its transfer mechanism using molecular techniques such as overlapping PCR, PFGE, RAPD, plasmid profiling and transconjugation.

B. Understanding of propensity of antimicrobial resistance

- 1) Understanding of propensity of antimicrobial resistance of isolates such as *Salmonella* spp., MRSA, VRE, *E. coli*, *E. coli* O157:H7 and *Campylobacter* spp. from livestock.

C. It is able to find the methods to prevent transfer of antimicrobial resistant bacteria based on these results.

- 1) Regulation and control of antimicrobials which are scientifically proven to induce antimicrobial resistance and transfer its resistance gene from animal to human or vice versa
- 2) Continuous development of substitutes to antimicrobials such as non-specific immunostimulator, probiotics, etc.
- 3) Distribution of standard guidelines for farmers and customers for the prudent use of antimicrobials

CONTENTS

Chapter 1. Outlines of the project	27
Section 1. Necessities of the project.....	27
Section 2. Status and problems in related technology in domestic and overseas.....	37
Chapter 2. Contents of the project and its results	39
Section 1. Materials and methods.....	39
Section 2. Study on antibiotic resistance mechanism and relatedness of <i>Salmonella</i> spp.....	60
Section 3. Study on antibiotic resistance mechanism and relatedness of <i>Staphylococcus aureus</i>	81
Section 4. Study on antibiotic resistance mechanism and relatedness of <i>Enterococcus</i> spp.....	94
Section 5. Study on antibiotic resistance mechanism and relatedness of <i>E. coli</i>	110
Section 6. Study on antibiotic resistance mechanism and relatedness of <i>Campylobacter</i> spp.....	158
Chapter 3. Accomplishment and subsequent contributions	163
Section 1. Accomplishment.....	163
Section 2. Subsequent contributions.....	168
Chapter 4. Application of the results	170
Section 1. Application	170
Section 2. Publications.....	170
Chapter 5. References	175

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	27
제1절 연구개발의 필요성.....	27
제2절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점.....	37
제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	39
제1절 연구수행방법.....	39
제2절 <i>Salmonella</i> spp.의 내성기전과 연관 연구.....	60
제3절 <i>Staphylococcus aureus</i> 의 내성기전과 연관 연구.....	81
제4절 <i>Enterococcus</i> spp.의 내성기전과 연관 연구.....	94
제5절 <i>E. coli</i> 의 내성기전과 연관 연구.....	110
제6절 <i>Campylobacter</i> spp.의 내성기전과 연관 연구.....	158
제 3 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	163
제1절 목표달성도.....	163
제2절 관련분야에의 기여도.....	168
제 4 장 연구개발결과의 활용계획.....	170
제1절 활용계획.....	170
제2절 문헌발표실적.....	170
제 5 장 참고문헌.....	175

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발의 필요성

최근 축산업이 집단사육 형태로 대규모화되어감에 따라 운영과 관리면에서는 효율성을 높일 수 있게 되었으나 질병 원인에 노출될 가능성과 질병전파의 위험성은 더욱 높아지게 되었으며 이에 따라 질병을 예방, 치료하기 위한 치료약제의 집중적인 사용이 증가하고 있다. 이러한 질병감염의 위험성을 배제하기 위하여 주요 가축질병 예방을 위한 백신개발 및 백신접종 프로그램 작성, 항균제의 사료첨가에 의한 사전 감염 차단은 물론, 초기 감염 시 감수성 높은 항균제 선발에 의한 적절한 치료대책 수립 등 다양한 방법이 이용되고 있으며, 항균제 내성균이 사람에게 전파되지 않는 안전축산물을 생산하기 위해 항균제 사용에 대한 적절한 기준 설정이 무엇보다 필요하다.

그러나 이러한 질병 예방과 치료를 위한 방법 중에서 백신의 이용은 포괄적인 질병방어보다는 제한된 특정질병 원인에 대해서만 소기의 성과를 기대할 수 있을 뿐, 병원성이 높은 미생물의 감염 시엔 그나마 기대에도 미치지 못하는 결과를 가져오게 된다. 항균성 약제에 의한 질병 예방 및 치료는 일시적인 효과는 있으나 근본적이고 종합적인 질병방제를 이루기에는 매우 미흡하며, 무분별한 약제의 오용 및 남용은 추후 더욱 강력한 항균제를 필요로 하게 되고 결과적으로는 내성균의 만연으로 인하여 질병의 확산 및 난치성 질병을 유발할 수 있다는 점에서 신중을 기하여야 할 방법이다. 또한 최근에는 사료첨가용이나 치료약제로 이용되고 있는 동물용 항균제의 무절제한 사용과 휴약 기간의 미준수로 항균제 다제 내성균의 출현을 초래하게 되었고 이에 따른 항균제의 축산물 내 잔류로 인하여 축산물을 통한 인체 영향이 크게 우려되고 있다. 예를 들면, 질병 예방을 위한 사료첨가용 항균제 avoparcin은 동일한 glycopeptide 항균제 계열에 속하는 인체용 vancomycin에 내성을 가진 세균인 vancomycin-resistant enterococci(VRE)의 발생을 유발시킴으로써 최근에는 동물용 avoparcin의 사용을 금지하고 있는 국가가 증가하고 있을 뿐 아니라, 많은 사료 첨가용 항균제의 사용을 엄격히 제한하거나 최소화하려는 추세로 변화되어 가고 있다. 안전축산물 생산을 위한 적절한 항균제 설정을 위해서는 우선 우리나라 가축의 주요 항생제 내성 균주의 분포실태를 파악하고, 축산물 관련 주요 저항성균 및 내성 항생제의 종류 조사와 내성균의 항생제 내성 유전자 획득 경로 분석을 분자생물학적 및 유전학적 기법을 통한 역학 연구와 함께 초기 감염 시 적절한 항생제의 투여를 위한 항생제 선택 등이 조사되어야 한다.

1. 기술적 측면

가. 항균제 내성 기전

세균의 항균제에 대한 내성은 크게 자연내성 (intrinsic resistance)과 획득내성 (acquired

resistance)으로 나뉜다. 1) 자연내성은 균속 (genus) 혹은 균종 (species)에 따라 특이하며, 항균제의 범위는 자연내성에 의해서 결정된다. 그 예로, vancomycin은 그람양성세균에 대해서는 항균력이 강하지만, 그람음성세균에 대한 항균력은 없는데, 이는 vancomycin의 분자가 크고, 소수성 (hydrophobic)이어서 그람음성세균의 외막을 투과할 수 없기 때문이다. 2) 획득내성은 세균의 염색체 유전자 변이 (mutation)나, plasmid 혹은 transposon에 매개되는 내성 유전자의 획득에 의해서 생기며, 일부 균주만이 갖는다. 그 예로, *Enterococcus faecalis* 대부분은 vancomycin에 감수성이지만, 일부 균주는 *vanA* 혹은 *vanB* 유전자의 획득에 의하여 이 항균제에 내성이다. 내성 유전자는 염색체 혹은 plasmid에 존재한다. 염색체 DNA는 안정적인데 반하여, plasmid DNA는 균종내 혹은 균종간 심지어는 균속 간을 손쉽게 이동한다. 또한 plasmid는 여러 가지 내성 유전자를 동시에 지닐 수 있기 때문에, 여러 가지 항균제에 대한 내성을 한꺼번에 전달할 수 있다. 내성 유전자의 전달방법은 접합 (conjugation), 형질도입 (transduction, bacteriophage에 의한 내성 유전자 전달), 전환 (transformation, 균종간 DNA의 직접 전달) 등 다양하다. 이 중 접합은 가장 흔한 내성전달 기전이며, 그 매개체는 plasmid 혹은 transposon 등이다. Transposon은 내성 유전자를 지니고 세균 사이를 자유롭게 건너다니기 때문에 conjugative transposon 혹은 'jumping gene' 이라고도 불리운다. 일부 세균은 항균제에 노출되면 항균제에 대한 내성 정도가 강해지며, 이를 유도 (induction)라 한다. 세균의 내성은 유도성에 따라서 구성형 (constitutive)과 유도성 (inducible)으로 나눌 수 있다. *Enterobacter*는 그 대표적인 예로서, *Enterobacter*는 *E. coli*와 유사한 염색체성 AmpC형 β -lactamase를 생성한다. 그러나 *E. coli*의 이 효소 생성량은 작고, 항균제 자극에 의해서 유도되지 않으므로, 이 세균은 새로운 내성 유전자를 획득하지 않는 한 ampicillin과 협범위 cephalosporin에 감수성이 있다. 이에 반해서 *Enterobacter*는 ampicillin이나 협범위 cephalosporin에 노출되면 유도에 의해서 β -lactamase를 다량 생성하므로 이들 항균제에 내성이 있다. 한편 이들 항균제에 노출된 *Enterobacter* 중 일부 균주는 염색체 유전자의 변이에 의해서 탈억제 (derepressed) 균주가 된다. 탈억제 균주는 항균제 자극과는 상관없이 β -lactamase를 계속 다량 생성하므로, 역시 이들 항균제에 내성이 있다. 즉, 염색체 변이가 없는 *Enterobacter*는 ampicillin과 협범위 cephalosporin에 유도성 내성이며, 탈억제 변이주는 구성형 내성이다.

세균이 항균제에 내성이 되는 기전으로는 1) 효소에 의한 항균제의 불활성화, 2) 표적 물질의 변화, 3) 세포막의 항균제 투과성 변화, 4) 세포 외로의 항균제 유출 등 다양하다. 세균은 이들 중 한가지 또는 여러 가지 기전의 복합에 의하여 항균제에 내성이 된다.

1) 효소에 의한 항균제의 불활성화

β -lactamase가 그 대표적인 예이다. β -lactamase는 β -lactam환을 가수분해함으로써 이 구조에 의하여 항균력을 발휘하는 약제를 불활성화한다. 그러나 세균이 β -lactamase를 생성

한다고 해서 모든 β -lactam 항균제에 내성이 되는 것은 아니다. 그 예로, β -lactamase를 생성하는 *Staphylococcus aureus*는 이 효소가 분해하는 penicillin, ampicillin, piperacillin 등에는 내성이 있지만, 이 효소에 안정한 methicillin, oxacillin, nafcillin 등에는 감수성이 있다. 이는 β -lactamase에 따라서 가수분해할 수 있는 기질 (항균제)의 범위가 다르기 때문이다. Aminoglycoside를 불활성화하는 효소도 있다. *Enterococcus*는 저농도의 aminoglycoside에 자연내성인데, 이는 세포막의 특성 때문에 이 항균제가 세포 내로 투과되는 양이 적기 때문이다. 그러나 aminoglycoside를 penicillin, vancomycin 등과 병합해서 사용하면 이 세균의 치료에 좋은 효과를 볼 수 있는데, 이는 penicillin이나 vancomycin이 aminoglycoside의 세포 내로의 침투를 도와주기 때문이다. 이 병합요법은 *Enterococcus*에 의한 패혈증 등 중증 감염증의 치료에 널리 사용되어 왔다. 그러나 최근 분리되는 *Enterococcus* 중에는 이 병합요법에 내성인 세균이 많은데, 이는 이들 내성세균이 aminoglycoside 변형효소 (aminoglycoside modifying enzyme)를 생성함으로써 고농도의 aminoglycoside에 내성이 되었기 때문이다. 한편, chloramphenicol acetyltransferase는 chloramphenicol을 불활성화하며, *Enterobacteriaceae*와 *Haemophilus influenzae*는 흔히 이 효소의 생성에 의하여 chloramphenicol에 내성이 된다.

2) 표적 물질의 변화

항균제가 결합하는 표적 단백질의 변화나, 표적 단백질의 과량생성에 의해서 내성을 획득하는 세균도 있다. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* 등 그람양성 세균 중에는 이 기전에 의해서 β -lactam 항균제에 대한 내성을 획득한 세균이 많다. β -lactam 항균제 표적은 penicillin-binding protein (PBP)이다. *S. aureus*는 β -lactam 항균제와의 친화도가 낮은 새로운 PBP (PBP 2')를 생성해서 methicillin에 내성이 된다. *S. pneumoniae*는 기존의 PBP 변성에 의해서 β -lactam 항균제에 대한 내성을 획득한다. *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae* 등 그람음성 세균 중에도 이러한 기전에 의해서 β -lactam 항균제에 대한 내성을 획득한 세균이 있다. Vancomycin-내성 *Enterococcus* (VRE) 또한 표적 물질의 변성에 의하여 vancomycin에 대한 내성을 획득한 예이다. Vancomycin은 peptidoglycan 전구체의 N-terminal D-Ala-D-Ala와 결합하여서 PBP가 이 부위에 결합하지 못하게 하며, 그 결과로 세균은 peptidoglycan 중합에 의한 세포벽 합성을 못하게 된다. 그러나 VRE의 N-terminal은 D-Ala-D-Lac 등으로 변화되어서 vancomycin과의 친화도가 1/1,000 이하로 감소되며, 이로 인하여 vancomycin에 대한 내성을 획득하는 것으로 알려졌다.

3) 세포막의 항균제 투과성 변화

Porin은 세포 외막의 단백질이며, 그람 음성세균에만 존재한다. Porin은 영양물질을 받아들이고, 대사산물을 내보내는 통로로 생각되는데, 항균제 대부분은 이 구조를 통해서 세포 내

로 들어간다. *E. coli*의 외막에는 여러 종류의 porin이 있지만, 항균제는 주로 OmpF와 OmpC를 투과한다. 항균제의 porin 투과도는 항균제 분자의 전하 (charge), 소수성 (hydrophobicity) 및 분자량에 따라 결정된다. 음성 (陰性) 전하의 분자는 양성 (陽性) 혹은 양성 (兩性, zwitterion) 전하의 분자에 비하여 porin을 통과하는 속도가 느리다. 또한 소수성 분자는 친수성 (hydrophilic) 분자에 비해서, 분자량이 큰 항균제는 분자량이 작은 항균제에 비해서 porin을 잘 투과하지 못한다. Methicillin은 소수성이기 때문에 porin을 잘 투과하지 못하며, 따라서 그람음성 세균에 대한 항균력이 없다. 큰측쇄 (side chain)을 갖고 있는 mezlocillin, piperacillin, cefoperazone 등은 분자량이 커서 porin을 잘 투과하지 못한다. Imipenem은 양성 (兩性) 전하를 갖고 있고, 친수성이며 분자량이 299로 비교적 작기 때문에 β -lactam 항균제 중 porin 구조를 가장 잘 투과한다. 다른 그람음성세균도 *E. coli*와 유사한 porin을 갖고 있다. 그러나 *P. aeruginosa*의 porin은 다르다. 연구에 따르면 imipenem에 감수성인 *P. aeruginosa*의 외막에는 D2 단백질이 있지만, 이 항균제에 내성인 세균에는 D2 단백질이 없으며, 그 외의 단백질은 차이가 없다고 한다. 따라서 *P. aeruginosa*에서는 D2 단백질이 imipenem을 특이적으로 통과시키는 것으로 생각된다. 이와 같이 그람음성간균에서는 porin이 항균제 감수성에 많은 영향을 미치며, porin이 소실 혹은 변화되면 항균제에 대한 내성 정도가 높아지게 된다. 그러나 porin이 완전히 없는 세균은 영양물질을 받아들일 수 없기 때문에 존재할 수 없으며, 소량의 porin만 있어도 항균제는 이를 투과하므로, porin의 소실만으로 항균제에 고도 내성이 되기는 어렵다. 다만 다른 내성기전과 상승적으로 작용하여서 내성 정도를 높일 수는 있다. β -lactam 이외의 항균제 역시 porin을 통해서 세포 내로 들어간다. *Enterobacteriaceae*와 *H. influenzae*는 흔히 효소 생성에 의하여 chloramphenicol에 대한 내성을 획득하지만, porin 구조의 소실에 의해서도 내성이 될 수 있다. Aminoglycoside, quinolone 등에 대한 내성도 porin 구조의 소실에 의해서 획득하는 것으로 알려졌다.

4) 세포 외로의 항균제 유출

세포 내로 유입된 항균제를 능동적으로 세포 외로 유출하는 세균도 있다. 이 내성 기전은 ribosome의 단백질생성을 저해하는 tetracycline이나 macrolide에 내성인 세균과 DNA gyrase의 활성을 억제하는 quinolone에 내성인 세균에서 볼 수 있다. *P. aeruginosa* 세포 외막의 OprK 단백질은 세포 내의 독성 성분을 세포 외로 유출하는 기능이 있는데, 이 단백질을 다량 발현하는 변이주는 유출에 의해서 ciprofloxacin, nalidixic acid, tetracycline, chloramphenicol 등 여러 항균제에 내성이 된다. 이와 같이 능동적인 유출에 의해서 여러 가지 항균제에 대한 내성을 획득하는 기전은 다제내성 펌프 (multidrug resistance pump, MDR)라 불린다 [Lewis 등, 1997]. MDR 펌프는 *S. aureus* 등의 그람양성 세균, *E. coli*, *P. aeruginosa* 등 그람음성 세균 뿐 아니라, 진균인 *Candida albicans*, 원충인 *Plasmodium falciparum* 등도 갖고 있다. *S. aureus*의 MDR 펌프로는 NorA, QacA, QacB 등이 알려졌다

다. QacA 단백을 다량 발현하는 균주는 chlorhexidine에, NorA를 다량 발현하는 균주는 quinolone에 내성이다. *E. coli*의 MDR 펌프로는 EmrAB 등이 알려졌는데, 이 단백을 다량 발현하는 균주는 nalidixic acid와 thiolactomyhcin에 내성이다. *Staphylococcus aureus*는 폐렴 (특히 원내폐렴), 피부 및 연조직 감염, 균혈증 등을 일으키는 그람양성 구균으로, 가장 흔한 병원균종의 하나이다. *Staphylococcus*에 의한 감염에 beta-lactamase에 안정한 penicillin이 일차적으로 사용되었으나 1990년대 *S. aureus*의 35-66%가 methicilline-resistant *S. aureus* (MRSA)로 밝혀지면서 glycopeptide인 vancomycin의 사용이 증가되어 왔다. 그러나 최근 다른 그람 양성 구균의 하나인 *Enterococci* 균종에서 vancomycin에 대한 내성을 나타내는 vancomycin-resistant enterococci (VRE)가 발견되었으며, National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS)의 자료에 의하면 미국에서 원내 VRE 발생률이 0.3% (1989년)에서 7.9% (1993년)으로 20배 이상 증가된 것으로 밝혀졌다. VRE에 대한 많은 연구에 의해 VRE의 내성 유전자가 다른 그람양성 구균으로 전이될 수 있다는 가능성이 논의되어 오던 중 실제로 1996년 이후 일본과 미국, 프랑스에서 vancomycin에 중간정도의 내성을 나타내는 vancomycin intermediate resistant *S. aureus* (VISA)균이 발견되어 더욱 충격을 주고 있다. VISA는 VRE와 같이 다른 여러 항생제에도 내성을 보였다 (multiple agents resistant).

VISA의 발생은 몇몇 균종이 현재 사용중인 항생제의 다용으로 완전한 저항성서를 획득할 것이라는 가능성을 시사함과 동시에 VISA균에 감염된 환자를 위한 새로운 항생제의 부재로 심각성을 더하고 있다.

가) Vancomycin-intermediate resistant *S. aureus* (VISA)

① Vancomycin resistant *S. aureus*의 분류

Vancomycin에 대한 저항력의 정도는 National Committee for Clinical Laboratory Standards에 의해 vancomycin susceptible < 4 µg/ml, intermediate resistant 8-16 µg/ml, resistant > 32 µg/ml로 분류되어 있다.

나) Vancomycin resistant mechanism

VISA균의 내성기전은 아직 정확하게 밝혀지지 않았으나, 몇 가지의 가설이 보고되고 있다. 첫 번째는 plasmid-mediate gene transfer에 의해 *Enterococcus*의 *vanA* vancomycin-resistant gene들이 *S. aureus*로 이동했을 가능성이 있다. 이러한 형태의 전이로 *S. bovis*의 *vanB*와 *Bacillus circulans*의 *vanA*가 임상분리체 (isolate)에서 보고되었다.

그러나 MRSA균에서 이러한 vancomycin resistant gene의 전이는 실제 체내 병원균에서는 발견되지 않았다. 일본의 195개 비대학 병원에서 970가지의 MRSA균에 대한 실험을 한 결과, 13가지 MRSA (1.3%)에서 heterogenous vancomycin-resistance (HVR)가 나타났고 7개 대학병원에서 129개의 MRSA test를 한 결과, 12가지 MRSA (9.3%)에서 HVR이 나타났지만 이들 중 enterococcal VR gene (*vanA*, *vanB*)을 가지고 있는 균은 없었다. 또 미국에서 발생한 VISA균으로 시험한 결과 VISA균에서도 *vanA*, *vanB*, *vanC* 유전자를 갖고 있지

않았다. 미국환자에서 분리한 VISA균을 pulsed-field gel electrophoresis에서 분리한 결과, VISA와 MRSA의 cloning을 분간할 수 없었다. 이로써 MRSA가 아직 밝혀지지 않은 기전으로 인해 VISA로 변했음을 알 수 있다.

두 번째 가설은 이런 기전에 저항성을 갖게 된 것이 오랜 기간동안 vancomycin에 노출되어 자연적으로 저항성을 가진 돌연변이들이 생겼다는 것이다. 이 가설을 뒷받침할 수 있는 몇 가지 실험 결과들이 있다. 1956년 Geraci는 28일 동안 매일 vancomycin의 농도를 높여 가면서 VISA를 만들었다. 이렇게 얻어진 VISA의 MIC는 17-24 mcg/ml을 나타냈다.

세 번째는 vancomycin resistant (VR)을 나타내는 균주들이 생성하는 penicillin-binding protein (PBP)이다. Vancomycin에 대한 MIC가 8-32 mcg/ml인 *S. aureus*를 연구한 결과 이들 균주가 PBP2를 다량 생산하는 것으로 밝혀졌다. 부수적으로 methicillin에도 저항력이 있는 균들은 이와 유사한 PBP2'를 과잉 생산했다. 최근 Sieradzki, Tomasz는 MIC가 100 mcg/ml 이상인 돌연변이 *S. aureus*로 실험한 결과, PBP2 또는 PBP2'과 같은 많은 양의 PBP들을 생성해 내는 것을 알아냈는데 이렇게 PBP 활성이 증가되면 vancomycin과 같은 glycopeptide 항생제가 세균 세포벽의 peptidoglycan에 결합하는 것이 억제되어 저항력을 갖게 되는 것으로 생각되고 있다.

Glycopeptide 계열의 항생제인 vancomycin은 peptidoglycan 전구체인 peptidyl-D-Ala-D-Ala에 결합하여 세포벽합성을 억제하여 살균작용을 발휘한다. 이러한 항생제 내성을 *vanA*와 *vanB* 유전자에 의해 산생되는 효소에 의하여 변형된 peptidoglycan 전구체인 UDP-N-acetylmuramyl-L-Ala-Glu-L-Lys-D-Ala-D-lactate를 산생함으로써 항생제 결합력의 감소를 가져와 일어나게 된다. VRE는 1986년 유럽에서 처음 보고된 이래 그 발생율이 급속히 증가하고 있으며 1989년에는 미국에서, 1992년에는 국내에서도 병원에서의 감염 사례가 처음 보고된 바 있다 (CDMR, 1999). VRE의 경우 beta-lactam 제제나 aminoglycoside 제제에도 대개 내성을 보이므로 효과적인 치료 약제가 드물고, 환자간 또는 오염된 환경이나 기구, 의료진으로부터 다른 환자에 전파될 수 있으며, 가축에서 생산성 향상을 목적으로 동종 계열, 즉 glycopeptide 계열 항균제인 avoparcin을 치료 용량보다 낮은 농도로 사용함으로써 동물에서 유발된 VRE가 사람으로 전파되었다는 주장이 제기되고 있다. 그 결과, 미국, 유럽 등 선진국에서는 많은 종류의 사료 첨가용 항생제의 사용이 엄격히 제한되고 있으며 그 종류도 점점 줄어들고 있는 추세이다.

Salmonella typhimurium DT104는 기존의 *Salmonella*균과는 달리 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides와 tetracycline (ACSSuT)에 대한 multiple antimicrobial resistance pattern (R-Type)을 보이며 이미 미국, 영국, 캐나다, 독일, 프랑스, 오스트리아, 덴마크 등의 선진국을 포함하여 세계 여러 나라에서 보고되고 있다. 이 균은 감염증에 대한 항생제 치료의 어려움 외에 transformation 등을 통해 다른 균들로 항생제 내성에 관여하는 유전자의 전파를 일으킬 위험성이 있으며, 영국에서는 이미 trimethoprim과 ciprofloxacin에 대한 additional resistance를 가지는 *S. typhimurium* DT104가 보고되었다.

대장균은 원래 ampicillin과 amoxicillin에 감수성이 있었으나, plasmid를 통해 유전된 *TEM-1* β -lactamase에 의한 내성이 1965년 처음 보고된 이후 전세계적으로 광범위하게 전파되어 병원 및 지역사회에서 분리되는 균주의 40-60% 정도가 이 기전에 의한 항생제 내성을 보이고 있으며 이러한 내성 균주들은 amoxicillin에 β -lactamase 억제제인 clavulanic acid를 결합시킨 항생제 (amoxicillin/clavulanate)에 대개 감수성을 보인다. 그러나 30% 정도의 균주는 *TEM-1* β -lactamase의 과량분비로 인해 이런 병합 항균요법에도 내성을 보이고 있다. Fluoroquinolone은 그람음성 간균에 대해 강력한 항균력을 가진 항균제인데, 최근 분리된 *E. coli* 중 floxacine에 대한 내성비율이 30% 이상 증가하여 크게 우려되는 상황이다. 1998년 Kansenshogaku의 보고에 의하면 O157 대장균의 경우 plasmid profile을 크게 4개 형태로 나눌 수 있는데 항생제 내성 형태의 변화가 plasmid의 profile의 변화에 따라 일치하여 항생제 내성은 plasmid가 상당한 부분 관여하는 것으로 추측할 수 있었다. 또한 최근 일본에서 1996년 O157 대장균의 대량 발생시 균주들을 각각 조사한 결과 Tetracycline-저항 R-plasmid를 찾아낼 수 있었다. 이 plasmid는 50과 95 kb 두 종류인데 이 두 종류 모두에서 *tet* resistant 유전자를 찾아낼 수 있었다. O157 대장균에서는 여러개의 plasmid가 있을 수 있는데 지금까지 알려진 것 중 가장 작은 3.3 kb plasmid는 *S. typhimurium* 균주들의 항생제 내성 plasmid인 NTP16과 98% 이상 동일성을 보여 이 plasmid 또한 항생제 내성에 관여하는 것으로 확실시되고 있다.

영국을 비롯한 EC 국가들은 인체에서 내성균을 유발할 가능성이 있는 (구체적인 연구결과 또는 명확한 근거는 없으나) 사료 첨가 항생제제 아연 bacitracin을 비롯하여 인체에 사용되고 있는 erythromycin, lincosimide, streptogramin류에 대한 교차 내성 우려가 있는 spiramycin, 내성 장구균과 포도상구균 치료제인 tsristinamycin과 교차내성 가능성이 있을 수 있다는 이유로 virginiamycin을 사료첨가 항생제 list에서 배제시켰다. 또한 vancomycin 내성균 치료용인 streptogramin의 교차 내성 우려를 제기하여 인산 tyrosin 제제 또한 사용 금지 조치하였다. Avoparcin 외에 상기 4개 사료 첨가 항생제제의 사용 금지는 축산 분야의 질병 예방에 의한 생산성 향상에 막대한 영향을 줄 수 있는 조치로서 이에 대한 국내에서의 연구 및 대책 수립과 함께 대체물질 개발이 매우 시급한 실정이다. 뿐만 아니라 국내의 인체 병원에서도 사료 첨가 항생제로 인한 인체에서의 내성 수퍼박테리아 출현 가능성을 끊임 없이 제기하고 있어 이를 확인하기 위한 수의축산에서의 실태 파악이 크게 요구되고 있다.

2. 경제·산업적 측면

최근 3년간 항생물질의약품의 생산실적을 살펴보면 1995년도 887,276백만원, 1996년도 971,222백만원, 1997년도 1,010,575백만원으로서 1995년 기준 평균 14% 증가하였다.

이 기간 중 전체 의약품 생산실적 대비 항생물질의약품의 점유율은 1995년도 전체 의약품 생산실적 5,637,837백만원 중 16%를, 1996년도 전체 의약품 생산실적 6,347,339백만원 중

15%를, 1997년도 전체 의약품 생산실적 6,805,580백만원 중 15%를 각각 점유하여 약효군별 점유율에서 항생물질 의약품의 생산실적이 주요 생산품목으로 취급되고 있다.

항생물질 의약품 중 약효 분류별 생산실적은 약효분류번호 618의 주로 그람양성, 음성균에 작용하는 것이 1996-1997년간 지속적인 거대생산실적을 나타내고 있으며 1997년의 경우 동 품목 생산실적은 81개 업소 771품목 7,577억원에 이르는 등 동일품목의 과다생산으로 인한 과다경쟁이 치열한 시장구조를 갖고 있어 소비를 조장하고 있는 실정이다.

항생제 남용 및 오용은 바로 항생제 내성 수퍼박테리아의 출현을 야기할 수 있으며, 특히 축산물 생산 가축의 사료 첨가용으로 이용되는 항생제에 의한 인체 질병 치료 항생제 내성균이 생성될 수 있다는 가능성으로 축산업의 어려움을 증대시키고 있다. 검증되지 않은 가능성으로 인한 축산물의 안전성 여부에 대한 논란이 가중되면서 생산 농가는 축산물에 대한 소비자의 외면과 함께 사료 첨가항생제를 배제한 생산성 유지라는 이중 부담으로 매우 위축된 산업의 생산자의 입장에 처해있다. 따라서 국내 축산업의 안정적 성장과 국민 의식의 불안감 등을 해소할 수 있는 제안과제는 국내 축산업의 안정을 기할 수 있으며 나아가서는 국제 시장 개방에 따른 국내 축산물의 안정성을 홍보함과 아울러 근본적인 대책 마련을 꾀함으로써 미래 축산 및 관련산업을 보장할 수 있는 기틀을 마련하는데 그 필요성이 요구된다.

3. 사회·문화적 측면

1996년 5월 일본에서 4개월된 영아의 수술부위에 감염된 MRSA 치료를 위해서 vancomycin을 사용했지만 감염부위의 화농성 농양이 치료되지 않았다. Arbekacin, ampicillin/sulbactam을 투여하여 이 영아의 MRSA균 감염증을 치료할 수 있었다. 영아의 MRSA균을 broth microdilution test로 MIC를 측정한 결과 8 mg/ml로 나타나 VISA로 밝혀졌다. 미국에서는 당뇨와 만성 신부전을 앓고 있던 59세의 남자환자가 MRSA에 의해 탈수를 동반한 복막염(peritonitis)에 감염되었다. 치료를 위해 vancomycin을 18주동안 투여한 후 다시 재발한 MRSA가 glycopeptide에 대해 intermediate resistance를 나타내어, catheter의 제거와 rifampin, co-trimoxazole (trimethoprim-sulfamethoxazole)을 투여하여 치료했다. 또 다른 경우는 66세의 당뇨병 환자로 MRSA에 의해 재감염된 bacteremia 치료를 위해 장기간 항생제를 처방 받았으며 신기능이 저하되어 복강 내 투석을 받아왔다. 항생제 치료는 vancomycin으로 18주간 치료를 받던 중 혈액 내에서 VISA균 (MIC = 8 mg/ml)이 발견되었다. 이에 vancomycin, gentamicin, rifampin을 투여하여 치료할 수 있었다. 이 환자의 초기 MRSA균은 vancomycin에 감수성이 있었으나 치료중에 발견된 VISA는 분리하여 Centers for Disease Control and Prevention (CDC)에서 조사한 결과 gentamicin, co-trimoxazole, tetracycline, imipenem에 감수성을 보였다. 프랑스의 경우, 백혈병을 앓고 있는 아이에게서 VISA가 발견되었고

quinupristin/dalfopristin을 투여하여 VISA균을 치료했으며, 나중에 분리하여 실험한 결과, cotrimoxazole에도 효과적이었음을 확인할 수 있었다.

지금까지 발표된 대부분 VISA균에 감염된 환자들은 모두 VISA균에 의한 감염 이전에 MRSA균에 감염되었고, 4명 중 3명의 환자는 오랜 기간동안 투석을 하고 있었다. 대부분의 VISA 감염환자들은 감수성을 보이는 항생제들의 복합치료에 의해 치료되었으므로 VISA균이 아직 우려하고 있는 만큼 전혀 치료 불가능한 staphylococcal infection은 아닌 것 같다. 문제는 환자의 VISA균의 vancomycin에 대한 저항성을 얼마나 빨리 발견해 낼 수 있느냐에 달려있다. 현재 미생물 실험실에서 가장 많이 시행하고 있는 disk diffusion test는 VISA의 MIC를 측정할 수 없다. 값이 비싸긴 하지만 E-test strips는 낮은 level의 vancomycin resistance (VR)도 감지할 수 있으므로 간편하고 저렴하게 VR을 측정하기 위해서 breakpoint plate의 vancomycin 농도를 6 mg/ml로 하고 doubling dilution을 한번만 시행하고 있다.

미국 질병 조절 및 예방 센터의 연구자들에 따르면 인도 대륙과 베트남으로의 여행이 미국에서 발견된 다중약제 내성을 보이는 *S. typhi* 감염의 대부분을 차지한다고 한다. 조지아주 아틀란타시에 있는 미국 질병 조절 및 예방 센터의 Marta-Louise Ackers 박사와 동료 연구자들은 1996년 6월부터 1997년 3월에 걸쳐서 미국 공중보건부에 주어진 역학 정보에서 *S. typhi*가 동정된 장티푸스 열의 증상을 가진 293명의 환자들의 자료를 모았다. 연구팀은 12개의 항생제에 내성을 보이는 균주를 찾았다.

연구자들이 의학잡지 'The Journal of the American Medical Association'지에서 보고한 연구에 따르면 환자들의 81%가 질환이 발생하기 전 6주 내에 미국 이외의 지역으로 여행을 하였다. 동정된 균의 25%는 한가지 이상의 항생제에 내성을 보였고 17%는 5가지 이상의 항생제에 내성을 보였다. 이들 약제는 ampicillin, chloramphenicol 그리고 trimethoprim-sulamethoxazole을 포함하였다. Akers 박사는 "동정된 균 중 아무것도 ciprofloxacin 또는 ceftriaxone에 저항성을 보이는 경우는 없었다. 동정된 균의 7%는 nalidixic acid에 대해 내성 (NARST)을 가졌다. 최근의 증례 보고들과 병원 기반의 연구들은 NARST 감염을 가진 환자를 치료하는데 있어서 ciprofloxacin의 효용성이 감소되었음을 보여주었다."라고 말했다. 연구자들은 논문에서 chloramphenicol, ampicillin, 그리고 trimethoprim-sulamethoxazole이 인도 대륙과 베트남에서 발생한 NARST 감염에서 *S. typhi*의 일차 치료제로서 더 이상 유용하지 않다고 하였다. 이 연구와 다른 증례 보고들의 증거들은 ciprofloxacin, 다른 fluoroquinolones과 ceftriaxone이 곧 더 이상 가치가 없을 것이라고 기술하였다.

Shiga toxin (Stx) 생산 대장균 (STEC) 또는 verocytotoxin 대장균 (VTEC) *E. coli* O157은 비혈액성 설사, 혈액성 설사, 혈액성 장염, 용혈성 요독증 등을 일으키며, 죽음을 초래하는 질병이다. STEC의 경우 약 100여종이 넘는 serotype이 있으나 세계적으로 O157 strain이 가장 빈번히 발생, 문제를 일으키고 있어서 미생물 영역에서는 주로 이 균주에 대한 연구가 이루어지고 있다. O157 대장균은 1980년 초 미국에서부터 두드러진 발생을 보이면서 1982에서 1996년

까지 300명 이상이 이 병원균에 의해서 고통을 받고 수십명의 생명을 빼앗았다. 급기야 미국 CDC (Center for Diseases Control)는 이 균을 신 급성전염병원 (Emerging Disease Pathogen)으로 분류하였다. 지금도 O157균과 다른 장출혈성 대장균에 의해서 미국내 연간 62,000명이 이 병원균에 감염되어 고통을 받고 있으며, 평균 52명씩의 사망률을 보이고 있다. 이웃 일본만 해도 1996년 이 O157 대장균이 10,000명 이상을 감염시켜 질병을 일으켰으며 12명의 죽음을 초래한 이래 매년 수천명의 환자를 발생시켰으며 그 중 여러 명을 죽음에 이르게 하고 있다 (국립보건원 자료). O157 대장균에 의한 outbreak는 캐나다, 유럽, 남미 그리고 호주에서도 마찬가지로 심각하다. 매년 이들 나라에서 shiga toxin 생산 대장균에 의해 수십명에서 수백명이 감염되며 그 중 대부분은 O157 대장균에 의한 감염이었다. 특히 우려할만한 점은 미국, 호주, 캐나다, 아르헨티나, 영국 등은 육우 대량생산국으로, 육우의 수입개방에 따라 O157 대장균의 전파가 급속도로 확산될 것이다. 미국의 경우 2000년 U. S. Meat Animal Research Center의 보고에 의하면 국소적으로 87%의 미국 내 소들이 O157 대장균에 감염되어 있는 것으로 나타났다. 특히 곡류를 주식으로 하는 소들에 있어서 감염율은 더욱 심하여 우리나라와 같이 방목을 하지 않고 축사 안에서 농후사료로 사양관리되는 지역은 더욱이 위험한 상태에 놓일 것이다.

O157대장균의 인체 내 전파는 대부분이 쇠고기, 소의 분변물, 우유 등으로, 소를 통하여 이루어진다. 감염된 소는 심한 하리, 장관성 수종, 혈액성 하리 등을 일으키며 어린 송아지에 있어서는 죽음을 초래할 수도 있다. 어떤 소들에서는 질병을 일으키지 않고 보균만 하는 경우도 있다. 또한 O157 대장균은 현재 알려진 병원성 대장균주들 중 유일한 인수공통전염병원균이므로 더욱 주목을 받고 있다. 즉 다른 대장균주들은 숙주특이성을 가지고 있어 감염상태가 동물과 인간으로 확실히 구분되어 있다. 최근 이처럼 대장균도 인수공통전염병원균성을 보이는 것은 이 대장균의 빠른 진화능력에 기인한다. 하지만 이 대장균이 어떤 이류로 동물과 인간에게 심각한 질병을 일으키는지, 질병을 야기해서 숙주로부터 어떤 생리적 도움을 얻는지 분명치 않다. 세계적으로 O157 대장균의 발생과 그 심각성이 날로 커짐과 동시에 우리나라에서도 발생보고가 있었다. 1998년 일본 교토대학 연구팀에 의해서 처음 국내 인체에서 분리된 대장균이 O157 대장균주임이 밝혀졌다. 이 팀은 1990년부터 1996년까지 부산대 부속병원에서 설사나 HUS를 가진 환자로부터 수거한 균주에서 O157:H7 혈청형을 갖고 60-MD plasmid를 가지며 *stx1*을 소유한 O157 대장균을 분리해냈다. 그 뒤 1999년 국립보건원은 당해 6월 경북 구미에서 *stx2*를 가진 O157 대장균에 감염된 환자를 확인하였다. 1996년 부산시 보건환경 연구원과 경상대학교 수의과대학팀은 소와 돼지의 분변에서 3주와 2주의 O157 대장균을 분리해냈다. 하지만 아직도 우리나라에서 O157 대장균에 대한 정확한 감염율 조사가 없었고, 특히 인체전파의 주요 매개가 되는 축산물 특히 소에서 발생을 조사는 공중보건학적 측면에서 가장 먼저 선결되어야 할 문제이다. O157 대장균에 대한 항생제 사용은 가장 논란을 야기시키는 문제 중 하나이다. 그만큼 이 대장균은 여러 항생제에 저항성이 강하다. 지금까지 알려진 O157 대장균 내성 항생제는 ampicillin, kanamycin, sulfisoxazole streptomycin, tetracycline, ticarcillin 등이다. O157 대장균에 감염된 환자를 위해 다가적인 항생제 요법이 임상적으로 실시되었다. 하지만 결론적으로

아직까지 특별한 약물 치료제가 없고 오히려 어떤 항생제는 질병을 더욱 악화시켜 심각한 문제로 남아있다. 1983년 Carter 등은 또한 ampicillin과 sulfonamide를 O157 대장균 감염 환자에게 투여한 결과 이 항생제를 투여하지 않은 환자들과 비교할 때 오히려 용혈성 요독증 (HUS)을 유발시켰다. 이 결과를 토대로 할 때 어떤 항생제 투여는 환자를 치료하기는커녕 오히려 shiga toxin을 유발시키고 그 독성기전에 도움을 주어 환자를 악화시킨다는 결론을 내렸다. 그럼에도 불구하고 최근 일본에서는 fosfomycin으로 O157 대장균 증상 발생 3일 이내에 환자를 치료할 경우 어느 정도 효과를 거둔 예가 있다. 하지만 이 항균제도 그 효과는 확증 받지 못하고 있으며, in vitro 상에서 Shiga toxin 생산을 증가시켜 환자나 환축의 장기 치료시 악영향을 미칠 것으로 예상된다. 최근 2000년 일본의 Murakami 등은 roxithromycin, rokitamycin, clindamycin 등이 levofloxacin과 혼합 투여할 때 대장균의 치료에 효과가 있을 것으로 추정되어 실험동물을 이용 조사하고 있다.

1997년 미국에서 수입된 쇠고기가 *E. coli* O157:H7에 오염된 사실을 이미 확보된 첨단 기술을 이용하여 확인하였던 바, 항의차 방문한 미국 대표단으로부터 분석기술의 적합성과 결과의 타당성을 인정 받을 수 있었던 것은 이와 같은 문제 발생을 사전에 예측하여 개발한 국내 기술 확보에 따른 것으로 볼 수 있다. 따라서 최근 문제시되고 있는 축산물 유래 병원성 세균이 항생제 내성 여부를 명확히 진단하고 이러한 항생제 저항 세균 분리 동정 기술 확립과 연구 결과를 토대로 근본적인 risk assessment와 함께 risk management가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 또한 EU 국가를 비롯한 선진국에서 오랫동안 사용되어 왔던 동물 사료 첨가 항생제 사용을 금지시킨 현 시점에서 더욱 과제 수행의 필요성이 있다고 할 수 있다.

축산물 유래 주요 병원성 세균에 의한 감염을 사전에 차단하거나 치료를 위한 노력은 지속적으로 이루어지고 있으나 새로운 인체 유해 세균의 출현, 특히 축산물을 통한 항생제 잔류 및 항생제 내성 수퍼박테리아의 출현은 현대사회의 국민들에게 커다란 불안감으로 다가오게 되었다. 농축산물의 생산, 가공 및 소비에 이르기까지 철저한 검증과 내성균 발생 확인으로 농축산물 생산품에 대한 신뢰를 구축할 수 있으며 농축산물로부터 항생제 내성균의 인체로의 이행 여부를 정확히 파악함으로써 항생제의 농축산에서의 사용허가를 판단할 수 있는 중요한 자료를 제공할 수 있다. 안전한 축산물 공급 노력을 전세계적으로 초유의 관심사로 대두되었으며 축산물 안전과 인체 위험성을 유발하는 근본적인 원인을 제거하고 필요한 대책 마련은 사회적, 문화적인 측면에서 매우 시급한 실정이므로 제안과제 수행의 필요성이 있다.

제2절 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

미국에서 150종의 항생제가 승인되었고 27종이 현재 임상 시험중에 있으며, 1993년에는 오직 1종의 항생제만이 사용 승인되었고, 1994년에는 단 한종의 사용 승인된 바가 없는 실

정이다. 이후에도 불과 몇 종의 항생제만이 겨우 승인된 상황에 있다. 이러한 항생제 기피 또는 미진한 개발과 함께 특정 질병의 예방을 위하여 백신개발을 위한 많은 연구들이 수행되어지고 있으나 그 효과가 기대에 부응하지 못하는 경우가 많다. 따라서 축산과 동물생체에 치명적인 악영향을 미치는 이러한 질병에 대한 예방제 및 치료제의 대체물질 개발에 대한 연구가 전 세계적으로 매우 활발히 이루어지고 있으며, 많은 과학자들은 동물생체에 잔류하지 않고 인체에 영향을 주지 않는 항균성 약제, 생리활성물질, 생균제 또는 생체 면역증강제에 대한 집중적인 연구에 높은 관심을 기울이고 있는 실정이다.

임상균주의 경우, MRSA, *Pseudomonas*, *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Vibrio*, VRE 등 여러 종류의 항생제내성 균주를 선별하여 보고하고 있다. 이들 균주들은 MIC test를 통하여 항생제 내성여부를 확인하였으며, VRE, *E. coli* 경우는 각기 vancomycin 내성기전과 quinolone 기전을 밝혀내어 DB화하였다. *Aeromonas*와 *Campylobacter*의 경우 검색키트를 개발하여 SCI 논문을 발표하였다. *Helicobacter*의 경우 임상균주를 분리하고 이들의 분자생물학적 검사와 연관관계를 조사하여 SCI 논문에 발표하였다. 이에 따라 서울여자대학교에는 각종 내성기전연구에 필요한 생화학적, 분자생물학적 기법이 수립되어 축산분리균주에 대한 내성 기전 연구를 원활하게 수행할 것이다.

외국의 경우, 농축산 유래 병원성세균의 인체 감염이 보고되고 있으며 특히 내성균의 인체 감염에 대한 우려가 높아지고 있어 내성기전이 같은 항생제의 사용이 금지되고 있는 실정이다. 특히 EU의 경우는 사료첨가 항생제 사용을 금지한 바 있고, 미국과 일본도 이에 동조하는 추세에 있어 우리나라도 이에 대한 대책이 매우 시급한 실정이다.

제 2 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구수행방법

1. 주요 미생물의 분리동정 방법

가. 주요 미생물의 개략적인 분리동정 과정은 Table 1과 같다.

1) *Salmonella* spp.의 분리 동정

2000~2003년 사이에 도축장, 도계장 sample, 양계장 닭의 분변 및 급성 위장염, 설사증으로 입원한 환자들에서 *Salmonella* spp.를 분리하였다.

가) 혈청학적 시험

Table 1의 방법으로 분리된 *Salmonella* spp.의 혈청학적 시험을 수행하였다. *Salmonella* antisera A, B, C, D, E를 이용, O항원 혈청을 나누었다. 슬라이드 글라스 위에 생리 식염수를 떨어뜨려 백금으로 혼합하고 응집 여부를 관찰하였다. *Salmonella* 편모 항원 응집실험은 0.6% 포르말린 생리식염수 동량을 배양액에 넣어서 30분 동안 두어서 이것을 항원으로 사용하였다. 생리 식염수 25 ml에 0.1 ml 항혈청의 비율로 항혈청을 희석시켰다. 희석한 항혈청 0.5 ml을 작은 시험관에 첨가하고 여기에 항원을 동량(0.5 ml) 넣는다. 한 가지 항원에 대해 Difco에서 시판 중인 Spicer-Edward 항혈청 1, 2, 3, 4, L complex, EN complex, 1 complex 등 모두 7가지 항혈청을 넣고 50°C 항원 수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후 솜털 같은 편모 응집 반응을 확인하였다. 반고체 배지를 녹여서 45°C정도 식혀서 phase I 항원의 항혈청을 적당하게 희석하여 배지에 떨어뜨려서 고르게 섞고, 배지가 굳으면 실험 균주를 접종하였다. 38°C에서 20시간 정도 배양, phase I 항원을 흡수시켜 맨 밑바닥 균주를 따서 brain heart infusion broth에 접종하고 phase I 항원 실험 방법과 동일한 방법으로 phase II 항원을 구하였다. O항원과 편모 항원 phase II를 종합하여 *salmonella* 혈청형을 확정 지었다.

나) Enrichment 방법 및 진단 kit 개발

현재 이용되고 있는 conventional method 는 다음과 같다.

25 g sample + BPW 225 ml
↓ 37°C, 24 h incubation
Enriched culture 0.1 ml + RV broth 9.9 ml
↓ 42°C, 24 h incubation
Inoculation to HE agar, XLD agar and BSA
↓ 37°C, 24 h incubation
Biochemical and Serological test

Conventional method는 배양에 48시간이 걸리고 살모넬라 확진에는 더 많은 시간이 소요되므로 안전한 식품 생산에 직접 적용하기엔 단점이 있다. 이에 본 연구에서는 다음과 같이 배양시간을 단축시키고 Salmonella 진단 kit를 도입, 26시간 내에 *Salmonella* 검출을 가능하도록 하였다.

25 g sample + BPW 200 ml
↓ 37°C, 7 h incubation
Enriched culture 200 ml + RV broth 200 ml
↓ 42°C, 19 h incubation
Test by PBM Salmonella MAb test kit

2) *S. aureus*의 분리 동정

2000~2003년 사이에 도축장, 도계장 sample, 양계장 닭의 분변, 소, 돼지 닭 등의 가축 목장, 원유 sample, 시판 닭고기, 돼지고기, 쇠고기 등에서 *S. aureus*를 분리 동정하였다.

가) 우유 및 식육 특정 부위에서의 *S. aureus* 분리 동정

우유는 20-50 ml의 시료를 3000 rpm, 30분으로 centrifuge 한 다음 0.5-1 ml 정도만 침전물로 남기고 상층액을 버린 뒤 침전물을 증균하지 않고 직접 배양하였다.

식육은 TSB나 SB를 적신 거즈를 식육표면을 swab하여 증균하여 사용하거나, 5-10 g을 stomacher를 이용 2분정도 homogenization하여 증균 후 사용하였다. 식육의 표면이나 식육 내에 있는 화농은 상품화된 일회용 면봉 applicator로 swab하여 증균한 다음 사용하였다.

관절과 기관은 TSB나 SB로 적신 거즈로 부위를 swab한 다음 증균하여 사용하였다. 이후의 과정은 Table 1과 동일한 과정을 취하였다.

나) Presumptive methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) 및 vancomycin intermediate resistant *S. aureus* (VISA)의 분리 및 확진

Table 1 및 위의 방법으로 분리된 *S. aureus*를 2-8 µg/ml oxacillin이 함유된 Muller Hinton broth에 배양시킨 뒤 증균된 균락을 Presumptive MRSA로 간주하였다. 이후 presumptive MRSA의 확인을 위해 *mecA* 유전자 검출을 위한 중합효소 연쇄반응법 (Polymerase chain

reaction, 이하 PCR), minimal inhibitory concentration (MIC)에 의한 oxacillin과 vancomycin에 대한 내성 측정으로 MRSA 와 VISA를 구별하고, 최종 단클론성 항체를 이용 penicillin-binding protein (PBP) 검출에 의한 MRSA-SCREEN Test 등을 수행하여 분리기법을 활용하였다.

Table 1. 주요 미생물의 분리 동정 과정

<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i>
Prienrichment 샘플 25 ml + BPW 225 ml (37 °C, 24±2 h) Selective enrichment 중균된 BPW 배양액 0.1 ml + RV 10 ml (42°C, 24±2 h)	Prienrichment 샘플 25 ml + modified Tryptic Soy Broth (supplememnted with 10 % NaCl)(37°C, 18 h)	Fecal sample swab을 Bile esculin azide agar 에 접종 (37°C, 24 h)	Prienrichment 샘플 25 ml + modified <i>E.coli</i> broth 225 ml (37°C, 20-24 h)	Prienrichment 샘플 25 ml + Bolton Broth (37°C, 4 h) + Anitibiotic (37°C, 44 h)
Selective Plating BSA, XLD, SS agar (37°C, 24 h)	Selective Plating Baired Parker Agar(37°C, 36 h)	Black colony :Growth in 6.5% NaCl	Selective Plating MacConkey agar Chromocult agar (37°C, 24 h)	Selective Plating mCCDA (37°C, 24 h)
Biochemical Tests TSI LIA Urease Polyvalent O antiserum/ H antiserum SIM MR/VP Sitrate ONPG	Biochemical Tests Catalase Mannitol Maltose DNase TNase Coagulase VP test	Biochemical Tests Catalase Motility Yellow pigment Acidification test - lactose, arabinose, sorbitol, mannitol, xylose, rhamnose, raffinose	Biochemical Tests TSI Phenylalanine deaminase agar Fluorocult broth Urease Mannitol Maltose Rhamnose Cellulobiose Lysine MR-VP 37°C,24 h	Biochemical Tests Gram 염색, Oxidase, Catalase, Hippurate Hydrolysis, Indoxyl Acetate, Nitrate reduction Urease, TSI, 25°C, 37°C, 42°C Growth
ACSSuT 다제 내성균 검출 Phage Typing	API, Vitek 확진 VISA, MRSA VRSA 등 확진	Specific Multi plex PCR for <i>E .spp.(tuf)</i> , <i>Van</i> gene (<i>VanA</i> , <i>B</i> , <i>C</i>), <i>E.</i> <i>faecium</i> , <i>E. faecalis</i> (<i>ddl</i> gene) E-test 등 이용	Preenrichment에 서 selective plating시 IMS 방법도 도입. PCR 및 API, VITEK등 이용	Specific PCR for mutated <i>gyrA</i> gene

3) Vancomycin resistant enterococci (VRE) 분리 동정

2000~2003년 사이에 임상 감염환자의 검체와 국내 수 개 농장 및 도축장, 도계장 sample, 양계장의 닭 분변, 시판 닭고기, 돼지고기, 쇠고기 등에서 VRE를 분리 동정하였다.

가) 시판 닭고기에서의 VRE 검출

Fecal swap sample의 경우 Table 1과 같은 방법으로 enterococci를 분리하였으며 시판 닭고기의 경우는 각각 25 g 씩 취하여 다음(Figure 1)과 같은 방법으로 VRE를 동정, 분리하였다. Vancomycin 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 포함한 BHI broth (BBL, Becton Dickinson, USA)에서 검체를 37°C에서 16시간 동안 현탁배양하여 자라는 균을 선별배지(vancomycin 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 포함한 enterococcosel agar: 56 g/ℓ)에서 24시간 동안 배양했다. Enterococcosel agar (BBL, Becton Dickinson, USA)에서 검은색의 집락을 형성하는 경우 vancomycin에 내성을 갖는 장구균으로 생각하고 혈액 한천 배지에서 계대 배양하였고, vancomycin에 내성을 갖는 *Lactococcus* 또는 *Pediococcus* 등을 감별하기 위해 pyrrolidonyl arylamidase (Oxoid, England: 이하 PYR) 활성도 검사를 시행하였다.

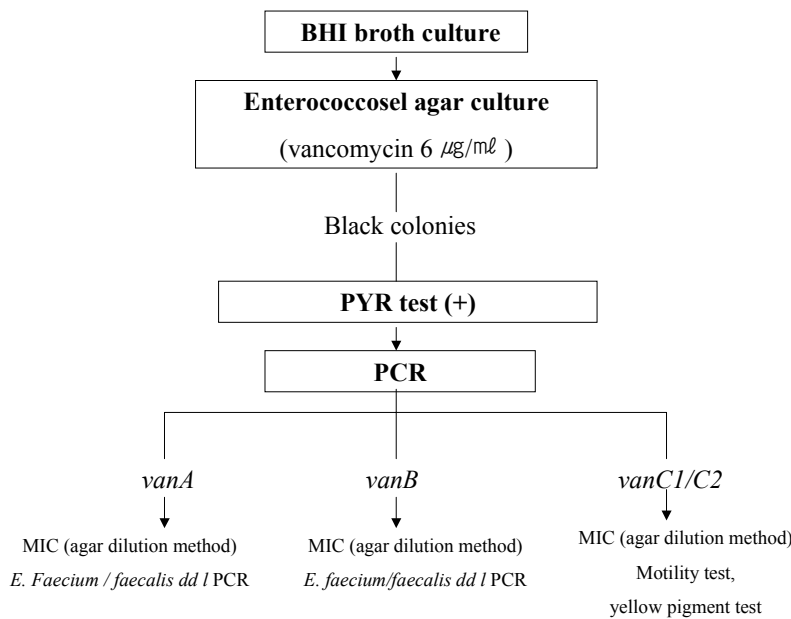


Figure 1. Diagnostic algorithm for identification of vancomycin-resistant enterococci.

* API-Strep, pyr test, modified PCR, motility test, yellow pigmentation test로 균종 동정

Vancomycin 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 enterococcosel agar에서 vanomycin 내성 유무 판정

나) PCR에 의한 VRE 균종 확인 및 내성 유전형 결정

PCR 활성도 양성인 균주에 대해서는 어떤 유전형에 속하는지를 알고자 *vanA* 및 *vanB*, *vanC1*, *vanC2* primer를 사용해 PCR로 내성 유전자형을 결정하였다. 표준 균주로는 *vanA* 형인 *E. faecium* 1024, *vanB*형인 *E. faecium* JB7, *vanC*-1형인 *E. casseliflavus* *concentratae*, *vanC*-2형인 *E. gallinarum* *concentrate*를 사용하였고, 각각에 특이한 primer를 사용하였다 (Table 2). PCR 반응물의 최종 volume은 20 μ l 이었고, condition은 predenaturation 94°C에서 3분, denaturation 94°C에서 1분, annealing 55°C (C2는 50°C)에서 30초, extension 72°C에서 1분, final extension 72°C에서 10분간으로 30 cycles을 시행하였다. Taq polymerase 효소는 Behringer Mannheim (Indianapolis, USA)사 제품을 사용하였고 중합효소 연쇄반응은 PCR 2600 system (Perkin-Elmer Cetus, USA)을 이용하였다.

*E. faecium*과 *E. faecalis* *ddl* primer를 사용하여 *E. faecium*과 *E. faecalis* 균종 인지를 확인하였고 *ddl* PCR이 음성이며 C1/C2인 경우는 yellow pigment test와 motility test를 추가로 시행하였다 (Figure 1).

Table 2. Primer sequence of vancomycin-resistant enterococci (VRE)

primer	primer sequence	product size
<i>vanA</i> (F)	5'-GATAGCTACTCCCGCCTTTTGGG-3'	380bp
<i>vanA</i> (R)	5'-TATCCGTCCTCGCTCCTCTG-3'	
<i>vanB</i> (F)	5'-CATCGCCGTCCCCGAATTTCAA-3'	667bp
<i>vanB</i> (R)	5'-GATGCGGAAGATACCGTGGCT-3'	
<i>vanC1</i> (F)	5'-TGACCCGCTGAAATATGAAG-3'	400bp
<i>vanC1</i> (R)	5'-TCGGCTTGATAAAGATCGGG-3'	
<i>vanC2</i> (F)	5'-CTCCTACGATTCTCTTG-3'	439bp
<i>vanC2</i> (R)	5'-CGAGCAAGACCTTTAAG-3'	
<i>E. faecalis</i> <i>ddl</i> (F)	5'-ATCAAGTACAGTTAGTCT-3'	941bp
<i>E. faecalis</i> <i>ddl</i> (R)	5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3'	
<i>E. faecium</i> <i>ddl</i> (F)	5'-TAGAGACATTGAATATGC-3'	550bp
<i>E. faecium</i> <i>ddl</i> (R)	5'-TCGAATGTGCTACAATC-3'	

4) *E. coli* 및 *E. coli* O157:H7 분리 동정

2000~2003년 사이에 임상 감염환자의 검체와 국내 수 개 농장 및 도축장, 도계장 sample, 양계장의 닭 분변, 시판 닭고기, 돼지고기, 쇠고기 등에서 *E. coli* 및 *E. coli* O157:H7을 분리, 동정하였다.

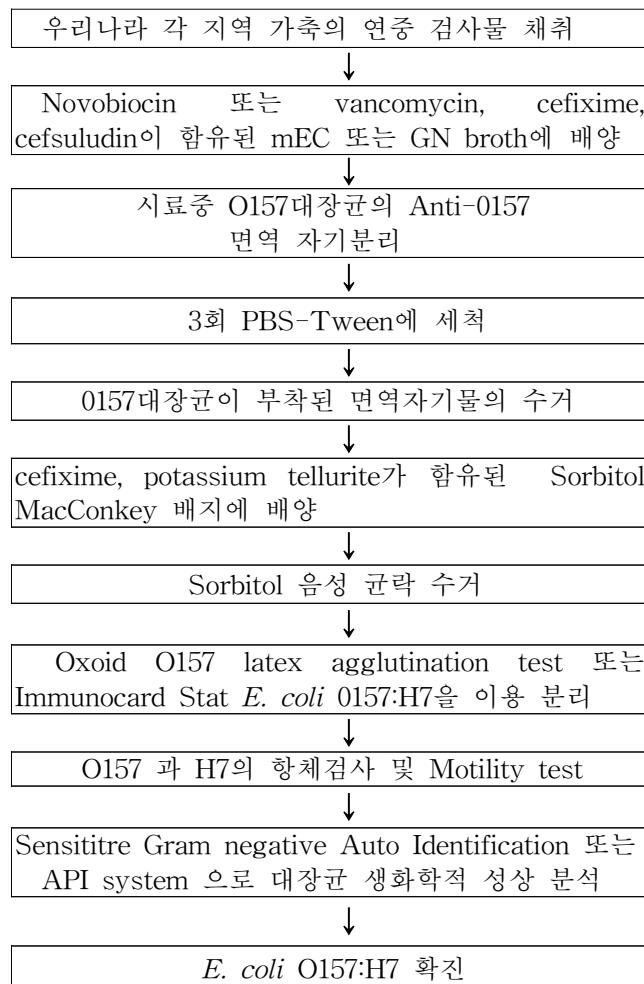
가) Anti-O157 면역 자기분리를 이용한 *E. coli* O157:H7 분리 동정

Table 1의 conventional method와 함께 anti O157: H7면역 자기 분리법을 이용하여 *E.*

E. coli O157:H7분리를 시도하였으며 그 방법은 다음과 같다 (Table 3).

검사물을 우선 novobiocin 또는 vancomycin, cefixime, cefsuludin이 함유된 mEC 또는 GN broth에 배양 20-24시간 증균하였다. 그 증균액으로 O157대장균의 Anti-O157 면역 자기분리, IMS (DynaL beads)를 실시하여 CT-SMAC agar (Cefixime:50ug/l + Potassium tellurite 2.5mg/l)에 50 ul IMS 희석액을 streaking한 후 37°C에서 20-24시간 정도 배양하였다. 배양 후 CT-SMAC agar에서 non-fermented colony를 수거, Oxoid O157 latex agglutination test 또는 Meridian의 Immunocard Stat *E. coli* O157:H7을 이용 양성균주를 Presumptive *E. coli* O157으로 간주하였고 O157 과 H7 항체를 이용 혈청형을 확인하였다. 이후 auto Identification 또는 API system으로 대장균의 생화학적 성상 분석하여 *E. coli* O157:H7을 최종 확인하였다.

Table 3. Anti-O157 면역 자기분리를 이용한 *E. coli* O157:H7 분리 방법



5) *Campylobacter*의 분리 동정

2000~2003년 사이에 임상 감염환자의 검체와 국내 수 개 농장 및 도축장, 도계장 sample, 양계장의 닭 분변, 시판 닭고기, 돼지고기, 쇠고기 등에서 *Campylobacter*를 분리 동정하였다.

시료를 멸균백에 넣은 다음, Buffered peptone water 400 ml를 넣어 균질화 시킨 후, 10 ml를 항생제(Cefoperazone 10 mg, Vancomycin 10 mg, Trimethoprim 10 mg, Cyclohexidide 25 mg/L)와 5% Horse blood를 첨가한 Bolton broth에 넣은 다음, 미호기성 조건(5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂)하에 37°C에서 4시간, 42°C에서 48시간 배양시켰다. 항생제(cefoperazone 32 mg, Amphotericin B 10 mg)를 첨가한 mCCDA(Modified *Campylobacter* Charcoal Differential Agar)에 접종한 다음 미호기성 조건에서 37°C, 48시간 배양하였다. *C. jejuni* 종은 회색의 축축하고 평평하고 번진 형태의 집락을 형성하고 금속성 광택이 있거나 혹은 없는 녹색 혹은 건조된 외형을 가진 것도 접종하였다. *C. coli* 종은 색상에서 크림형 회색, 축축하고 약간 올라온 콜로니를 취하였다.

가) 생화학적 확인

① 일반시험법

- 그람염색 : 그람음성 간균으로 갈매기 날개 모양이나 S형으로 보인다.
- 운동성 시험: 균집락을 영양 액체배지 또는 Mueller-Hinton Broth로 부유시킨 후 위상차 현미경이나 광학 현미경으로 관찰하였다(*Campylobacter*는 빠르게 전진하는 운동성(darting/tumbling)을 보임).
- Catalase 시험 : Brucella 배지에서 24-48시간 배양하여 자란 집락에 과산화수소(3% H₂O₂) 몇 방울을 떨어졌을 때 거품이 생긴 양성을 확인하였다.
- Oxidase 시험 : Brucella 배지에서 자란 집락에 Kovac's reagent를 떨어졌을 때 진한 자주색으로 변하거나, Oxoid Oxidase Identification Touch stick BR64를 사용했을 때 청 자주색으로 변하면 양성을 나타내었다.

② 혈청학적 검사법

라텍스 슬라이드 응집으로 *C. jejuni*, *C. lari*, *C. coli*를 검출하는 키트가 상품화되어 있으며 균속 수준까지 동정이 가능하다. 이 검사법은 각 균종의 세포벽 항원을 검출하는 것으로 항원 추출액과 세포벽 항원에 대한 특이 항체가 붙어있는 라텍스 부유물을 혼합한 후 응집여부로 결과를 판정하였다.

③ 분리 동정

호열성 *Campylobacter*속(*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*)는 43°C에서 잘 자란다. 이들 균은 hippurate 가수분해능, indole acetate 가수분해능, H₂S 생성능, 항생제 내성

등으로 감별하였다.

- Hippurate 가수분해 : 혈액 한천배지에 자란 집락을 1% hippurate 수용액 0.4 ml에 접종한 후 37°C water bath에 2시간 두었다가 관찰하였다. 진한 자주빛이 양성이고 약한 청색은 음성을 나타내었다.
- Indoxyl acetate 가수분해 : 10% indoxyl acetate를 적신 paper strip이나 disc를 올린 후 공기 중에 말린다. 상온에서 10분 지난 후 관찰하였을 때 blue/grey 색을 나타낸 양성 반응을 선별하였다.

나) PCR에 의한 확인

*C. jejuni*와 *C. coli*를 동정하기 위하여 Gonzalez 등 primer를 사용하였다. 이번 primer는 각각의 세균내의 siderrophore transport 유전자로써 *C. jejuni*의 CeuE 유전자 JEJ1 (5'CCTGCTACGGTCAAAGTTTTGC3'), JEJ2 (5'GATCTTTTTGTTTTGTGCTGC3'), *C. coli*의 CeuE 유전자 COL1 (5'ATGAAAAAATATTTAGTTTTTGCA 3'), COL2 (5'ATTTTATTATTTGTAGCAGCG3')를 사용하였다. 반응조건은 100 ng의 template(GuCN 방법이용)와 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 3.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.2 mM dNTPs, 100 pmole, 1 unit Taq polymerase으로 하였으며, Perkin-Elmer 9700으로 30 cycle, denaturing step (30 s, 94°C), primer annealing (30 s, 57°C), chain extension (1 min, 72°C). 추가 extension step (5 min, 72°C) 반응을 실시하였다.

2. 내성균의 내성기전과 연관 연구

축산과 임상, 그리고 환경으로부터 수집된 균주들의 항생제 내성 정도를 파악하고, 내성에 따른 내성 유전자를 검출하였으며, 이들 유전자에 의한 특성을 분석하였다. 또한 축산과 임상, 그리고 환경분리 균주간의 유전자 패턴에 따른 상호 연관성 및 내성 전달여부를 확인하였다.

가. 항생제 감수성 검사 및 항생제 내성 유전자 검출

분리된 균주들에 대한 항생제 감수성 검사를 NCCLS 방법에 의하여 agar dilution test, broth dilution test, disc diffusion test, E-test 등을 이용 조사하였다. 표준균주로는 *Escherichia coli* ATCC 25922주를 사용하였다. 또한 내성세균을 항생제 내성별로 분류하여 내성유전자의 분석 및 내성 유발 기전 확인(항생제 target의 변화, efflux 기전에 의한 세포 밖으로 항생제 배출, 항생제 불활화 효소의 생산)을 위하여 다양한 생화학적, 분자 유전학적 연구를 하였다. 내성세균의 항생제 내성에 관련하는 유전자를 증폭할 수 있도록 제작한 특

이 primer를 이용한 PCR과 Isoelectric focusing electrophoresis (IFE; 예: 베타락타메이즈)로 항생제 불활화 효소의 생산을 확인 실험을 수행하였다. 항생제 목표점의 돌연변이에 의한 내성 기전(예: 퀴놀론계 항생제)의 확인을 위하여 유전자의 염기서열 분석을 수행하였다.

나. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) 방법을 이용한 내성균주의 근연관계 분석

PFGE를 이용하여 동물 분리 균주와 임상균주와의 연관성을 조사하였다. 이를 위해 대수기의 균으로 agarose plug를 제조하고 이 상태로 genomic DNA를 노출시켰다. 각 균주에 적당한 제한 효소를 처리하고 이를 pulse field gel에 삽입시켜 CHEF DR III(Bio-rad, U.S.A.)를 이용, 전기영동하여 DNA를 전개하였다. 이를 EtBr로 염색하여 세균간의 근연관계를 분석하였다. 각 균종별 자세한 방법은 다음과 같다.

1) *Salmonella* spp.의 PFGE 분석

동정된 *salmonella*의 순수 배양 colony 1개를 6 ml BHI (brain heart infusion) broth에 백금니를 이용하여 잘 풀고 37°C 부란기에서 흔들면서 18시간 동안 배양하였다. 균 부유액 3 ml를 microcentrifuge tube에 취하여 13,000 rpm으로 4°C에서 1분간 원심 분리하여 상층액을 버렸다. 균 침전물은 1 mg/ul lysozyme과 1.5 ug/ml RNase가 포함된 500 ul의 2X lysis buffer(12 mM Tris, 0.2 mM EDTA, 2 M NaCl, 1.0% SLS, 1.0% deoxycholate)에 부유시켰다. 이것을 50°C에 보관시킨 1.6% low melting point agarose 0.5 ml에 세균 부유액을 섞은 다음, 짧게 진탕하고 plug mold에 조심스럽게 피펫으로 혼합액을 섞었다. plug mold는 냉장고에 넣어 10분간 고형화 시켰다. Plug가 굳은 다음 mold에서 빼어내어 1 mg/ul lysozyme과 3 ug/ml RNase가 포함된 3 ml의 1X lysis buffer (6 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.5% SLS, 0.5% deoxycholate)에 넣어 37°C에서 24시간 반응을 시켰다. Lysis buffer를 부어 버린 후 10% SDS와 0.75 mg/ml proteinase K를 포함한 ESP buffer 2.7 ml를 넣고 50°C에서 24시간 동안 반응시켰다. ESP buffer를 버린 후 1 mM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)가 포함된 10 ml의 dilute TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) buffer를 넣고 실온에서 1시간씩 2번 반응시켜 proteinase K를 inactivation 시켰다. Proteinase K inactivation solution을 버린 후 plug를 넣고 55°C에서 1시간 동안 배양시킨 후에 세척하였다. Proteinase K inactivation solution을 버린 후 plug를 Petri-dish에 넣고, 20 ml dilute TE buffer를 넣은 후에 shaker에서 1시간씩 2번 진탕하여 plug를 세척하였다. Plug를 2 mm 크기로 자르고 200 ul 멸균수에 10X buffer, 0.1% BSA와 60 u SmaI을 넣어 소화반응 시킨 후 CHEF-DR III(Bio-Rad)를 이용하여 1% agarose gel에서 전기 영동을 시행하였다. 전기영동 조건은 pulse time 3-30 sec, angle 120°, 6 V, 23h로 시행하였다. PFGE 시행 후 전기영동 gel을 ethidium bromide solution에 염색한 후, Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation Image and Analysis 120 System(Kodak, Rochester, NY, USA)을 이용하여 PFGE gel 영상을 컴퓨터에 저장하였다.

2) VRE의 PFGE 분석

동정된 VRE의 순수 배양 colony 1 개를 2 ml BHI (brain heart infusion) broth에 백금 니를 이용하여 잘 풀고 35°C 부란기에서 흔들면서 24시간 동안 배양하였다. 균 부유액 400 μ l를 microcentrifuge tube에 취하여 13,000 rpm으로 4°C에서 1분간 원심 분리하여 상층액을 버렸다. 균 침전물은 10 μ l lysozyme (0.5 mg/ml)과 1.5 μ l RNase (500 μ g/ml)이 포함된 0.5ml의 2X lysis buffer (12mM Tris, 0.2mM EDTA, 2M NaCl, 1.0% SLS, 1.0% deoxycholate)에 부유시켰다. 이것을 55°C에 보관시킨 1.6% low melting point agarose 0.5 ml에 세균 부유액을 섞은 다음, 짧게 진탕하고 plug mold에 조심스럽게 피펫으로 혼합액을 섞었다. plug mold는 냉장기에 넣어 20분간 고형화 시켰다. Plug가 굳은 다음 mold에서 빼어내어 60 μ l lysozyme (50 mg/ml)과 18 μ l RNase (500 μ g/ml)이 포함된 3 ml의 1X lysis buffer (6 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.5% SLS, 0.5% deoxycholate)에 넣어 37°C에서 철야 배양시켰다. Lysis buffer를 부어 버린 후 10% SDS 600 μ l와 30 μ l proteinase K (20 mg/ml)를 포함한 ESP buffer 3 ml를 넣고 55°C에서 4시간 동안 부유시켰다. ESP buffer를 버린 후 5 ml의 dilute TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) buffer를 넣고 55°C에서 1시간 동안 부유시켰다. Dilute TE buffer를 버린 후 plug를 Petri-dish에 넣고, 20 ml dilute TE buffer를 부어 넣은 후에 shaker에서 1시간 동안 진탕하여 plug를 세척하였다. Plug를 2mm 크기로 자르고 *Sma*I로 소화반응 시킨 후 CHEF-DR III(Bio-Rad)를 이용하여 1% agarose gel에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동 조건은 pulse time 1-30 sec, angle 120°, 200 V, 23h로 시행하였다. PFGE 시행 후 전기영동 gel을 ethidium bromide solution에 염색한 후, Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation Image and Analysis 120 System (Kodak, Rochester, NY, USA)을 이용하여 PFGE gel 영상을 컴퓨터에 저장하였다.

3) *S. aureus*의 PFGE 분석

동정된 *S. aureus*의 순수 배양 colony 1 개를 2 ml TSB (tryptic soy broth)에 백금이를 이용하여 잘 풀고 35°C 부란기에서 흔들면서 24시간 동안 배양하였다. 균 부유액 1 ml를 microcentrifuge tube에 취하여 13,000 rpm으로 4°C에서 1분간 원심 분리하여 상층액을 버렸다. 균 침전물을 0.3 ml의 2X lysis buffer (12 mM Tris, 0.2 mM EDTA, 2 M NaCl, 1.0% SLS, 1.0% deoxycholate)에 부유시킨 뒤, 50°C에 보관시킨 2% low melting point agarose 0.3 ml와 잘 혼합, plug mold에서 20분간 고형화 시켰다. Plug가 굳은 다음 mold에서 빼어내어 10 unit lysostaphin이 포함된 3 ml의 1X lysis buffer (6 mM Tris, 0.1 mM EDTA, 1 M NaCl, 0.5% SLS, 0.5% deoxycholate)에 넣어 37°C에서 2시간 배양시켰다. Lysis buffer를 부어 버린 후 10% SDS 600 μ l와 30 μ l proteinase K (20 mg/ml)를 포함한 ESP buffer 3 ml를 넣고 50°C에서 overnight 동안 배양시켰다. ESP buffer를 버린 후 50 ml의 dilute TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA) buffer에서 1시간 간격으로 4회 washing 하였다. Plug를 2 mm 크기로 자르고 *Sma*I로 소화반응 시킨 후 CHEF-DR III(Bio-Rad)를 이용하여 1% agarose gel에서 전기영동을 시행하였다. 전기영동 조건은 pulse time 10-50

sec, angle 120°, 6 V/cm, 20 h로 시행하였다. PFGE 시행 후 전기영동 gel을 ethidium bromide solution에 염색, PFGE gel 영상을 컴퓨터에 저장하였다.

4) PFGE type 판정기준

각 균주의 DNA 절편양상에 따른 PFGE 분자형별의 판정기준은 Tenover 등이 제안한 기준을 이용하였다⁸⁾. 즉, 육안적 분자형 분석 상 밴드의 차이가 없으면 동일한 분자형, 2-3 밴드 차이가 나면 밀접히 연관된 분자 아형, 4-6밴드의 차이가 있으면 집단 발생과 연관 가능성이 있는 분자 아형으로 분리하였으며 7밴드 이상 차이가 나는 경우 다른 분자형으로 분석하였다. DNA 절편양상은 Dendrogram molecular analysis software (Bio Rad, USA)를 이용하여 UPGMA (unweighted clustering paired-group method using arithmetic averages)로 군집 분석을 시행하였다.

다. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 방법을 이용한 내성균주의 유전자 pattern 분석

8~10개의 염기서열로 이루어진 random primer를 이용하여 PCR을 수행하고 이 결과 생산된 DNA fragment를 비교 분석하여 균간의 상호 연관관계를 조사하였다. 이를 위해 대수기 상태의 균에서 genomic DNA를 분리하고 여기에 random primer를 이용하여 PCR을 수행하여 생산된 DNA 절편을 전기영동으로 분리하였다. 염색 후 각 절편의 크기를 상호 비교하여 균주간의 상호연관관계를 분석하였다.

1) *Salmonella* 균주의 RAPD 분석

분리된 모든 *Salmonella* 균주의 PCR operation condition은 predenaturation은 94°C에서 2분간, denaturation 94°C에서 30초, annealing 35°C에서 1분, extension 72°C 2분으로 35 cycles, 그리고 final extension은 72°C에서 10분간 시행하였다. Taq polymerase 효소는 Behringer Mannheim(Indianapolis, USA)사 제품을 사용하였으며, 실험에 사용된 primer sequence는 5'-CCCGTCAGCA-3'를 사용하였고 중합효소 연쇄반응은 PCR 2600 system (Perkin-Elmer Cetus, USA)을 이용하였다.

라. 내성 전달 기전 확인

축산, 환경, 임상으로부터 분리된 균주간의 내성 전달 기전을 확인하기 위하여 접합 실험을 실시하였으며, 이들로부터 얻어진 transconjugants의 항생제 내성 정도를 실험하여 plasmid를 매개로 한 항생제 내성 전달 현상을 확인하였다.

마. 축산, 환경 분리 균주의 human cell line에 대한 부착성 여부 확인

축산, 환경, 임상 균주 간의 직접 접촉에 의한 내성 전달 여부를 확인하기 위하여 축산, 환경 분리 균주의 human cell line에 대한 부착성 여부 확인 실험을 실시하였으며, 이로부터 균주의 직접 접촉에 의한 내성 전달 가능성을 확인하였다.

바. *Salmonella* spp.의 Quinolone Resistant Determining Region(QRDR)에 대한 PCR 및 염기서열 분석 및 유기용매 내성 검사 연구

1) Non-typhoidal *Salmonella* (NTS) spp.의 Quinolone Resistant Determining Region (QRDR)에 대한 PCR 및 염기서열 분석

가) 체세포 DNA 추출

Nalidixic acid 내성을 보인 사람 및 가축 분리주의 집락을 각각 2-3개씩 취하여 멸균 증류수 100 μ L에 부유 시킨 후 vortexing을 시행하고 100°C에서 5분간 가열한 후 4°C에서 5-10분간 냉각시켜 세포벽을 파괴하였다. 13,000 rpm으로 20-30초 동안 원심 분리를 시행하고, DNA를 포함하는 상층부를 분리하여 PCR에 사용하였다.

나) *gyrA* 유전자에 대한 PCR

gyrA1(5'-ACG-TAC-TAG-ATG-ACT-GG-3')과 *gyrA2*(5'-AGA-AGT-CGC-CGA-TAG-AAG-3')을 *gyrA* 유전자 증폭에 필요한 primer로 사용하였다. 100 ng의 template DNA, 5 μ L의 완충액, 10 mM dNTP 용액 1 μ L, 1 U Taq polymerase 0.5 μ L로 구성된 PCR 혼합물 50 μ L와 *gyrA1* primer (10 pmol) 0.5 μ L, *gyrA2* primer (10 pmol) 0.5 μ L, 그리고 40.5 μ L의 증류수를 섞어 반응액을 만들었다. GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 95°C에서 3분 동안 초기 전변성과정을 거친 후, 30 주기의 증폭 과정을 반복하였다. 각 증폭 과정은 95°C에서 60초간의 변성 과정, 55°C에서 60초간의 냉각 과정, 72°C에서 60초간 확장 과정, 72°C에서 10분간의 최종 확장 과정으로 구성하였다. PCR을 통하여 얻어진 결과물은 QIAEX II kit(QIAGEN GmbH, Germany)를 사용하여 정제하였다.

다) 염기 서열 분석

정제한 PCR 결과물을 대상으로 핵산 염기 서열 분석을 시행하였다. 염기 서열 분석을 위한 primer는 중합 효소 반응은 ABI 3730 DNA sequencer (Applied Biosystem, USA) 및 Bigdye v3.1을 사용하였다.

2) 유기 용매 내성 검사

Nalidixic acid에 내성을 보이는 균들을 30°C에서 하룻밤 배양한 후, 유리 Petri dish안의 고형 M-H agar에 접종하고, 대조군 plate를 제외한 각각의 plate에 95% Hexane과 99.9% Cyclohexane을 3:1로 섞은 유기 용매를 깊이 3 mm가 되도록 소량 첨가하였다. 이 plate들을 30°C에서 48시간 배양한 후 판독하여, colony를 이룬 균주는 유기 용매 내성균주로 판독하였다.

사. 분리된 MRSA 의 MRSA-SCREEN Test에 의한 PBP 2a 검출 및 SCCmec 유전자형 분석

1) MRSA-SCREEN Test에 의한 PBP 2a 검출

β-lactam계 항생제의 결합을 감소시켜 세균의 내성력을 부여하는 Penicillin-binding 단백질 변형인 PBP 2a의 발현여부를 알아내기 위하여, 각 presumptive MRSA 균주로부터 단백질을 추출하여 anti-PBP 2a monoclonal antibody sensitized latex와 혼합 agglutination 반응을 관찰하여 양성유무를 판정하였다. 1개 loopful 균락을 수거하여 4 drop의 extraction reagent과 혼합한 뒤 3분 정도 중탕하여 실온에서 5-10분 정도 방치하였다. 이 혼합액에 다시 1 drop의 제2 extraction reagent를 첨가하고 1,500 × g, 5분간 원심분리한 뒤 상층액 50 ul를 취하여 test card의 두 개 circle에 주입하였다. 다시 이 혼합액에 1 drop의 anti-PBP 2a monoclonal antibody sensitized latex와 1 drop의 negative control latex를 각각 첨가한다. Test card를 3분 정도 회전하면서 agglutination 반응을 관찰하여 양성유무를 판정하였다.

2) Staphylococcal enterotoxin (SE) 진단 multiplex PCR 기법 개발

가) SE 진단의 필요성 및 multiplex PCR 개발의 의의

*S. aureus*의 SE는 현재 SEA부터 SEQ까지 발견되었으며 그 수는 점점 늘어나고 있는 추세이다. 이들 toxin은 *S. aureus*에 의해 야기되는 식중독의 주요한 원인으로 섭취 시 구토, 발열 등을 유발시킨다. 따라서 식품 중에 오염되어 있는 *S. aureus*가 어떠한 toxin을 보유하고 있는지 확인해보는 것이 중요하다 하겠다. 현재 PCR을 이용한 진단이 가장 일반적으로 사용되고 있으나 SE의 종류가 워낙 다양하여 개별 PCR을 사용하기엔 번거롭고 무리가 있는 것이 사실이다. 이에 본 연구에서는 SEA부터 SEJ까지 한번에 진단 가능한 extended-single reaction multiplex PCR (esr-mPCR)법을 개발하였다. 이 방법은 기존의 multiplex PCR과는 달리 각 toxin의 공통적인 sequence를 이용하여 단 두 종류의 forward primer를 이용함으로써 primers간의 hindrance를 줄이고, 공통 sequence를 지닌 미 발견 toxin의 진단 가능성을 높였다.

나) Esr-mPCR에 사용한 primers

사용한 primer는 다음과 같다.

Table 4. Staphylococcal toxin primers used for esr-mPCR

Description	Nucleotide sequences*	Gene location	Size
Universal forward primer	5'-TGTATGTATGGAGGTGTAAC-3'	-	-
Second forward primer	5'-TACATGTATGGAGGTGCCAC-3'	-	-
Reverse primer for <i>sea</i>	5'-TTGAACACTGTCCTTGAGC-3'	691-673	304 bp
Reverse primer for <i>seb</i>	5'-ATAGTGACGAGTAAGGTA-3'	825-808	165 bp
Reverse primer for <i>sec</i>	5'-TTGTAAGGTGGACTTCTATC-3'	904-885	379 bp
Reverse primer for <i>sed</i>	5'-GGCTTTAGTGTCTAATGT-3'	2003-1086	422 bp
Reverse primer for <i>see</i>	5'-GCCAAACCTGTCTGAG-3'	600-585	213 bp
Reverse primer for <i>seg</i>	5'-AAGTCATTGTCTATTGTTCG-3'	642-624	93 bp
Reverse primer for <i>seh</i>	5'-GAATGAGTAATGTCTAGGAG-3'	807-788	255 bp
Reverse primer for <i>sei</i>	5'-GCAGTCCATGTCCTGTATAA-3'	787-768	334 bp
Reverse primer for <i>sej</i>	5'-AGTTCACCTGACTTCAACG-3'	1828-1809	531 bp

*: Underlined base pairs were intentionally changed to avoid formation of primer-dimers and hairpin loops.

다) Extended-single reaction multiplex PCR method

PCR 반응은 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.1% Triton-X, 0.2 mM dNTP mixture(Promega, Madison, USA), 0.5 μ l of 5x Qual-upTM(Neurotics, Taejon, Korea), 1.6 mM MgCl₂, 0.2 pmol의 각 reverse primers (SEA, SEB, SEC, SEH, SEI, 및 SEJ), 0.4 pmol의 universal forward primer, 각 reverse primer (SED, SEE, 및 SEG), 그리고 0.04 pmol의 second forward primer를 100 μ l volume으로 하여 실행하였다. Template는 1 ng template DNA를 사용하였다. 반응액은 hot start PCR법으로, 5 U Taq DNA polymerase (Promega)를 이용하여 반응시켰으며, 94°C에서 4 min간의 pre-denaturation이후 두 cycle로 실행하였다. 첫 cycle은 denaturation (94°C, 1 min), annealing (52°C, 1 min) 및 extension (72°C, 1 min)의 5 cycle로 구성하였으며 두 번째 cycle은 denaturation (94°C, 45 s), annealing (50 °C, 30 s), 및 extension (72°C, 45 s)로 27 cycle로 구성하였다.

2) SCCmec 유전자형 분석

MRSA의 methicillin 내성을 나타내는 *mecA* gene은 Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*(SCC*mec*) 이라는 고유한 genetic element에 존재한다. SCC*mec*은 양 말단의 inverted and direct repeats, site specific recombinase genes (*ccrA* and *ccrB*), 그리고 *mecA* gene complex로 구성되어 있다. Mec gene complex는 *mecI* gene, *mecR1* gene(MS and PB domains), 그리고 IS1272 등으로 구성된다. 이에 본 연구에서는 국내 축산물 분리 MRSA의 SCC*mec* 유전자형을 분석해보고 병원 분리 MRSA의 그것과 비교, 분석하였다.

현재까지 밝혀진 SCC*mec*의 4가지 type에 대한 모식도는 다음과 같다 (Fig. 2)

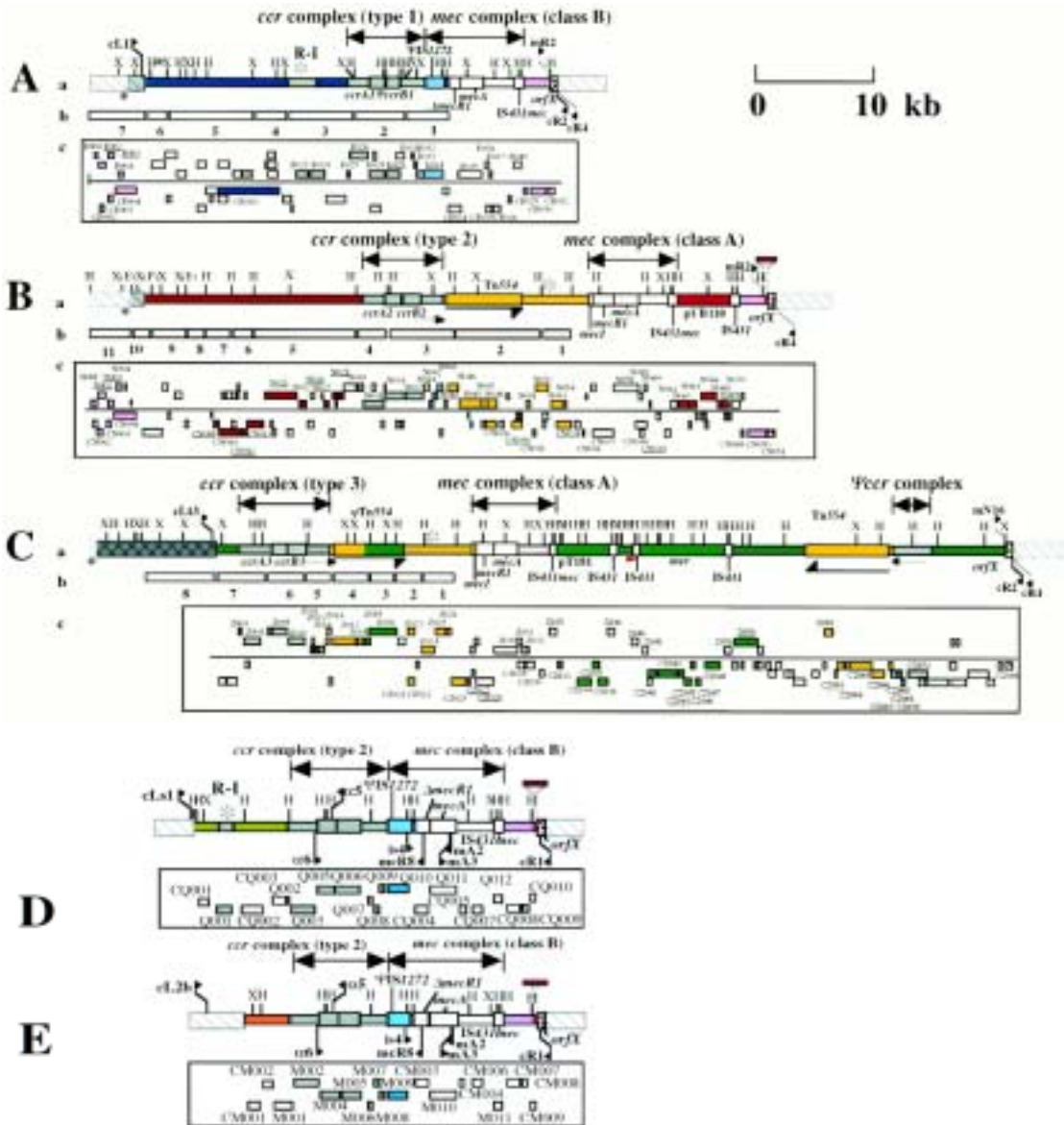


Fig. 2. Four types of SCCmec complex (By Ito et al., 2001; Ma X.X. et al., 2002)
 A, SCCmec type I; B, SCCmec type II; C, SCCmec type III; D, SCCmec type IVa; E, SCCmec type IVb

가) SCCmec gene 증폭 및 sequencing

SCCmec 분석에 사용된 primer는 Table 5와 같다. 이들을 이용하여 각 primer의 melting temperature 및 product size를 고려하여 PCR을 수행하였고, 얻어진 product는 QIAGEN gel

extraction kit를 이용, 정제, sequencing하였다.

Table 5. SCC*mec* gene 증폭에 사용된 primer sequences

Primer	Sequences	Genes
mA	5'ccaaacccgacaactac3'	mec class A, B공통
mecI2	5'gacttgattgttctctgtt3'	mec class A
Rorf2	5'ggacaacttaagccagggtta3'	mec class B
mecRA1	5'gtctccacgttaattccatt3'	<i>mecR1</i> (MS domain)
mecRA2	5'gtcgttcattaagatatgacg3'	
mecRB1	5'aagcaccgttactatctgcaca3'	<i>mecR1</i> (PB domain)
mecRB2	5'gagtaaatttggtcgaatgcc3'	
mecI1	5'aatggcgaaaagcacaaca3'	<i>mecI</i>
mecI2	5'gacttgattgttctctgtt3'	
β2	5'attgccttgataatagccttct3'	<i>ccrB</i> 공통
α2	5'aacctatatcatcaatcagtagct3'	<i>ccrA1</i>
α3	5'taaaggcatcaatgcacaacact3'	<i>ccrA2</i>
α4	5'agctcaaaagcaagcaatagaat3'	<i>ccrA3</i>

나) *mecI* 및 *ccr* gene sequence 분석

MRSA의 특성을 나타내는 PBP 2a gene을 coding하는 *mecA* gene은 *mecI* gene에 의해 억제된다. 일부 MRSA는 이 *mecI* gene mutation으로 인해 constructive resistance를 나타낸다는 것이 밝혀져 있다. 이에 *mecI* gene의 유전자 서열 분석을 시도하였다. 또한 SCC*mec* fragment를 정확한 위치에 정확한 orientation으로 이동시키는 역할을 하는 *ccr* gene의 유전자 서열 분석을 통해 균주간의 유사성 및 상호 연관성을 살펴보았다. 분석프로그램으로는 DNA star를 사용하였다.

다) SCC*mec*에 존재하는 추가적인 유전자 분석

모든 MRSA에 존재하는 IS431 copy를 추가적으로 분석하였고 SCC*mec* type II의 경우는 pUB110, Tn554의 존재여부, SCC*mec* type III의 경우는 pT181, *mer* gene, Tn554의 존재여부를 해당 primer를 사용하여 추가로 분석하였다.

아. VRE 균주의 유전자 분석

1) Overlapping PCR을 이용한 *vanA* gene cluster mapping

VRE의 연원을 규명하고 주된 전파 방식을 확인하기 위해서는 vancomycin 내성을 지령하는 *vanA* gene cluster (Tn 1546-like element)의 유전적 구조 규명이 필수적이다.

VanA gene cluster (Tn 1546-like element)의 가장 흔한 구조 변화를 일으키는 요인이 IS (insertion sequence)의 삽입이므로 IS1542 specific primer (*orf2-vanR*), IS1216 specific

primer (*vanXY*), IS1251 specific primer (*vanSH*) 이상 3쌍의 primer를 사용하여 분석하였고 (Table 6), 결과에 따라서 type 1에서 5까지 다섯 가지 종류로 분류하였다 (Figure 3).

Figure 3. Genetic maps of *Tn1546*-like element types of VRE (*vanA E.faecium*)

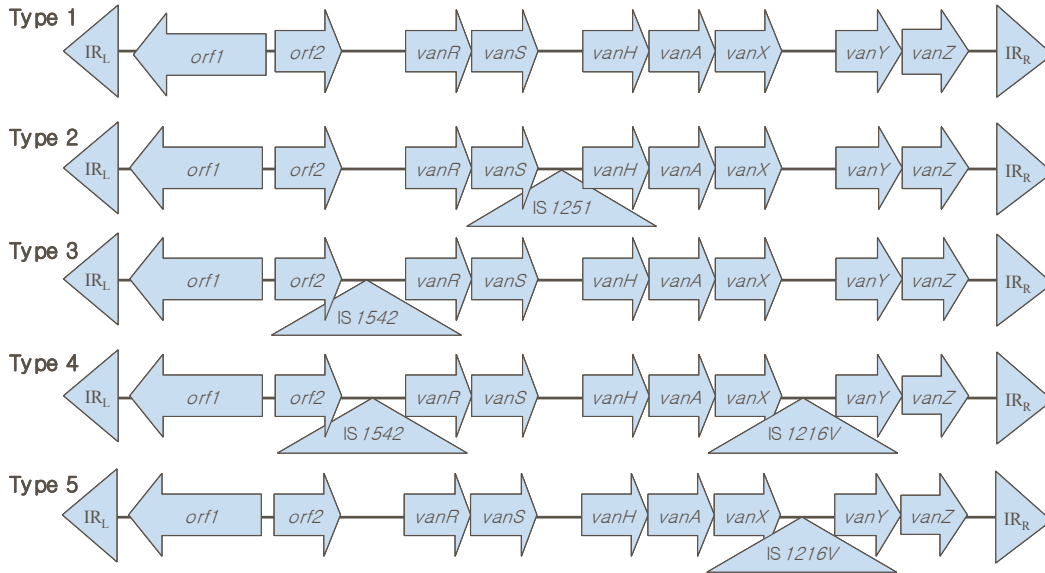


Table 6. Overlapping PCR에 사용된 Nucleotide sequences of PCR primers

Gene-specific primers	Nucleotide sequence	Expected size
IS1542 specific primer (<i>orf2-vanR</i>)		
<i>orf2</i> -F	5'-TTGCGGAAAATCGGTTATATTC	1bp
<i>vanR</i> -R	5'-CGGATTATCAATGGTGTCGTT	
IS1216 specific primer (<i>vanXY</i>)		
<i>vanX</i> -F	5'-ACTTGGGATAATTTACCCGG	1.29bp
<i>vanY</i> -R	5'-CCTCCTTGAATTAGTATGTGGT	
IS1251 specific primer (<i>vanSH</i>)		
<i>vanS</i> -F	5'-ACCGACTATTCCAAACTAGAAC	1.5bp
<i>vanH</i> -R	5'-ATCCATAAACAGTAATGCCGAT	

2) VRE가 보유하는 *van* gene 및 Tn 유전자 검출

VRE에 존재하는 *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2*, *vanS* 및 Tn 유전자를 검출하고자 하였으며 이에 사용된 primer는 다음과 같다 (Table 7).

Table 7. Primer sets of using this study

Gene		DNA sequence of prime
<i>vanA</i>	forward	5'-GCT ATT CAG CTG TAC TC-3
	reverse	5'-CAG CGG CCA TCA TAC GG-3
<i>vanB</i>	forward	5'-CAT CGC CGT CCC CGA ATT TCA AA-3
	reverse	5'-GAT GCG GAA GAT ACC GTG GCT-3
<i>vanC1</i>	forward	5'-GGT ATC AAG GAA ACC TC-3
	reverse	5'-CTT CCG CCA TCA TAG CT -3
<i>vanC2</i>	forward	5'-CTC CTA CGA TTC TCT TG-3
	reverse	5'-CGA GCA AGA CCT TTA AG-3
<i>vanS</i>	forward	5'-CGA CAC CAT TGA TAA TAA TCC GA-3'
	reverse	5'-ACA TCT CTT AGG ACC TCC TT-3'
Tn1546	forward (<i>orf1</i>)	5'-AAT CTT CAT TAA AGC TAC CTG TCC G-3'
	reverse (<i>vanY</i>)	5'-TAT CTC ATA ACG AAG ATT AGT CGG C-3'

자. *E. coli* 의 toxin 유전자, extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 유전자 및 *aac*, *aph I*, and *aph II* 유전자의 검출

1) PCR용 template DNA 추출

PCR을 위한 균주의 DNA 추출은 각 균주를 1.5 ml TSB에 18-20 시간 37°C로 shaking 배양하여 원심분리를 통해 pellet을 형성시킨 후 상층액 배지를 제거하고 세척을 위해 멸균 증류수로 resuspending하였다. 다시 이를 원심분리하여 상층액을 제거하고 이 과정을 1-2회 반복하였다. 세척 마지막 과정의 pellet은 다시 50-100 ul의 멸균 증류수로 희석하여 10-20 분 정도 중탕하였다. 중탕 후 실온에서 5-10분 정도 방치한 후 13,000 rpm으로 2-3분 원심 분리하여 상층액을 PCR DNA template로 사용한다.

2) *rfbE*₀₁₅₇, *eae*, *Ehly*, *stx1*, *stx2* 유전자 검출 및 사용된 primer

PCR 20 ul 반응에 2 ul의 DNA template와 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5

mM MgCl₂, 200 μM 각각의 deoxynucleoside triphosphate, 1 U의 Taq polymerase (Takara, Japan), 1× PCR buffer에서 수행하였다. Thermocycling 조건은 94°C에서 2 분 detature하고, 끝이어 30 cycles의 PCR을 94°C에서 40 s, 60°C 에서 20 s, 72°C 에서 60 s 로 수행하고 마지막 10분의 extension을 72°C에서 수행한다. 전기영동은 1× TBE (8.9 M Tris, 8.9 M boric acid, 0.2 M EDTA)를 함유한 1% agarose gel에서 80 V for 1-1.5시간 수행하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV로 예상 DNA 산물을 관찰한다. 사용된 primer는 Table 8과 같다. 또한 LT, ST 및 VTc, VTed genes 검출을 위한 primer는 Table 9와 같다.

Table 8. Primers used PCR amplification of *E. coli* O157:H7 genes

Primer	Nucleotide sequence(5'-3')	Gene	Product size (bp)	Reference
E0157-1F	CGGACATCCATGTGATGTGG	<i>rfbE</i> ₀₁₅₇	259	Schmidt et al., 1995
E0157-1R	TTGCCTATGCAGCTAATCC	<i>rfbE</i> ₀₁₅₇		
E0157-2F	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	<i>EhlyA</i>	543	Schmidt et al., 1995
E0157-2R	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	<i>EhlyA</i>		
E0157-3F	GACCCGGCACAAGCATAAGC	<i>eaeA</i>	384	Yu et al., 1992
E0157-3R	CCACCTGCAGCAACAAGAGG	<i>eaeA</i>		
E0157-5F	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	<i>stx</i> ₁	180	Jackson et al., 1987b
E0157-5R	AGAACGCCCACTGAGATCATC	<i>stx</i> ₁		
E0157-6F	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	<i>stx</i> ₂	255	Jackson et al., 1987a
E0157-6R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	<i>stx</i> ₂		

Table 9. Primers used in PCR to amplify specific fragments from genes for enterotoxins (LT and ST) and vectoroxins (VT and VTe)

Target gene coding for toxin(s)	Primer code	Oligonucleotide sequence (5'3')	Predicted size of amplified product (bp)
LTa	LT-1	GGCGACAGATTATACCGTGC	696
	LT-2	CCGAATTCTGTTATATATGTC	
STb	ST-1	ATCGCATTTCTTCTTGCATC	172
	ST-2	GGGCGCCAAAGCATGCTCC	
VTc	VT-1	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	478
	VT-2	GGATGCATCTCTGGTCATTG	
VTed	VTe-1	CCTTAACTAAAAGGAATATA	230
	VTe-2	CTGGTGGTGTATGATTAATA	

a, Detects LT enterotoxin produced by human and porcine ETEC strains.

- b, Detects ST enterotoxin produced by porcine ETEC strains.
- c, Detects VT produced by human and bovine VTEC strains.
- d, Only detects VTe synthesized by porcine strains associated with the edema disease.

3) ESBL 유전자 검출

*E. coli*의 ESBL 생산여부를 확인하고 등전점과 유전자 염기서열을 분석하여 내성유전자의 유전형을 규명하였으며 이를 위해 사용된 primer는 Table 10과 같다.

Table 10. Primers for β -lactamase genes

ESBL	Primer Sequence	Product size (bp)
TEM	5'-ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3'	1,100
	5'-GACAGTTACCAATGCTTAATC-3'	
OXA	5'-TCAACTTTCAAGATCGCA-3'	609
	5'-GTGTGTTTAGAATGGTGA-3'	
CTX-M	5'-TCGTCTCTCCAGA-3'	1,000
	5'-CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG-3'	
AmpC	5'-CTACGGTCTGGCTGCTA-3'	169
	5'-TGGAGCAAGAGGCGGTA-3'	

4) *E. coli*의 *aac*, *aph I*, and *aph II* 유전자 검출

*E. coli*의 *aac*, *aph I*, and *aph II* 유전자를 검출하고자 하였으며 이에 사용된 primer는 Table 11과 같다.

Table 11. Primers used in PCR to amplify specific fragments from genes for *aac*, *aph I*, and *aph II*

Target gene coding for enzyme	Primer code	Oligonucleotide sequence (5→3)	Predicted size of amplified product (bp)
AAC	aac-1	GTGTGCTGCTGGTCCACAGC	627
	aac-2	AGTTGACCCAGGGCTGTTCGC	
APH I	aph I-1	ATGGGCTCGCGATAATGTC	600
	aph I-2	CTCACCGAGGCAGTTCCAT	
APH II	aph II-1	GAACAAGATGGATTGCACGC	680
	aph II-2	GCTCTTCAGCAATATCACGG	

5) *E. coli* O157:H7의 vero cell cytotoxicity Assay

BHI broth 증균 broth에 24시간 정도 증균시킨 배양액을 2500 rpm에서 30분간 원심침전을

시킨 후, 그 상층액만을 0.25 um필터로 filtering한 액을 96well 에 배양하여 24시간 자란 vero cell에 접종하였다. Vero cell을 10% calf 혈청을 첨가한 Eagle MEM 배지를 사용하여 24시간 배양하고 vero cell을 monolayer로 배양하여 trypsin 처리한 후, 세포 부유액 200 ul에 50 ul의 시료를 첨가하여 5% CO₂ 존재 하에서 18-24시간 배양, 전자현미경으로 vero cell의 사멸 정도를 관찰하였다. Medium을 control로 하여 cytotoxicity 정도를 판정하였다. 판정 시 사멸된 세포의 정도에 따라 등급을 0에서 10으로 분류하였다.

차. *Campylobacter* spp.

1) Real Time Polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 확인반응

Real Time PCR은 최근 기존의 PCR 방법보다 신속하고, 높은 감도로 증폭이 되며, 오염을 줄일 수 있는 장점을 가진 방법이다. PCR 반응과 같이 반응조건은 1X TaqMan buffer A, 5 mM MgCl₂, 200 μM each dATP, dCTP, and dGTP; 400 μM dUTP, 0.02 μM *C. jejuni*-specific probe, 0.3 μM *C. jejuni*-specific primer, 1 U of AmpErase uracil N-glycosylase, 2.5 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase을 실시하였으며 *C. jejuni*를 위해서는 Hippurcase 검출을 위한 primer(Primer express 1.0을 이용하여 design 인 5'CTGCTTCTTTACTTGTGTGGCTTT3'와 5'GCTCCTATGCTTACAACCTGCTGAAT 3'와 FAM 5'CATTGCGAGATACTATGCTTTG 3'의 probe를 이용하였다.

또한 *C. coli*를 검출하기 위해서는 *Ceu E* gene을 검출하는 primer인 5'GATAAA-GTTGCAGGAGTTCCAGCTA 3'과 5'AACTCCACCTATACTAGGCTTGTCT 3' 그리고 probe 5'에 FAM 부착된 5'CTGTAAGTATTTTGGCAAGTTT 3'를 이용하였으며, AmpErase uracil N-glycosylase를 50°C에서 5분간 처리함으로써 오염된 PCR product를 제거시켜 주었으며, 95°C에서 10분간 가열한 다음, 95°C에서 20초간, 60°C에서 1분간 annealing 및 extension을 모두 40 cycles을 실시하고 ABI SDS 7700의 program을 통해서 실험결과를 확인하였다.

2) Pulse Field Gel Electrophoresis(PFGE)에 의한 균주 연관성 확인

Pulsenet(CDC, USA)의 rapid PFGE protocol에 준하여 시행하였다. 즉, Brucella Agar에서 37°C, 24시간 배양한 균집락을 Cell suspension buffer(CSB, 29 mM Tris-Cl(pH 8.0, 20 mM NaCl, 50 mM EDTA))에 풀어 McFarland 탁도 No. 3.0으로 맞추었다. 이중 1 ml를 원심분리한 후 2X CSB 넣은후 1% SKG agarose(SeaKem Gold agarose, FMC)와 섞어 plug mold에 분주하였다.

1 mg lysoyme를 넣은 CSB 1ml에 37°C water bath에서 4시간동안 반응시킨다. 200 μl 의 Proteinase K buffer(20 mM Tris(pH 8.0), 50 mM EDTA)로 풀어 proteinase K 50 μL(10 mg/ml) stock solution)넣고 잘 섞은 다음 50°C water bath에서 overnight 시킨다. Lysis가 끝난 plug를 각각 washing buffer(20 mM Tris(pH 8.0), 50 mM EDTA)로 상온에서 1시간

씩 모두 4회를 실시하였다.

세척이 끝난 plug를 SmaI(Takara)이 포함된 SmaI buffer 100 μ L에 넣어 30°C에서 overnight digestion하였다. 처리를 마친 plug와 size marker(lambda ladder PFG marker E 또는 low range PFG marker, New England Biolabs)를 0.5X TBE에 녹인 1% SKG agarose gel의 well에 끼우고, 1% low melting agarose(sea plaque GTG, FMC)로 빈틈을 채운다음 agarose 판을 CHEF mapper(Bio-Rad)에 장착하고, auto algorithm으로 14°C, initial switch time 6.75 s, final switch time 38.35 s, gradient 6 V/cm, included angle 120, running time 18 h로 전기 영동하였다.

전기영동이 끝난 agarose 판을 EtBr용액(3 μ g/ml)에 침지하여 15분간 염색하고, 증류수로 30분간 세척한 다음 자외선 조사하에서 확인하였다. 촬영된 agarose gel 사진을 scanning 하여, Molecular Analyst 1.0(Bio-rad) program으로 분석하였다. Similarity는 band based similarity coefficient중 dice coefficient로 계산하였고, clustering에는 Ward algorithm을 사용하였다.

제2절 *Salmonella* spp.의 내성기전과 연관 연구

1. 축산물에서 분리된 *Salmonella* spp. grouping 및 integron 조사

가. O antigen - grouping 결과

Salmonella antiserum (Difco.)을 통해 serologic하게 *Salmonella* spp.임을 확인하였으며, O antigen - grouping을 시행하였다. 그 결과는 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. *Salmonella* spp.의 O antigen - grouping 결과

O antigen	C1	C2	D	A	B	H
No. of Isolates	12	29	16	1	10	2

나. 항생제 감수성 test

분리균들의 항생제 감수성 테스트를 실시한 결과, 아직까지 국내 분리균주들은 뚜렷한 다제 항생제 내성을 보이지 않고 있었다. 또한, 최근 외국에서 분리가 되고 있는 Cephalosporin 계열에 대한 내성균들도 매우 적은 상황이었다. 그러나 각각의 몇몇 항생제 (Chloramphenicol, Nalidixic acid, Streptomycin, tetracycline)에 대한 내성율이 높은 것으로

나타나므로 항생제 사용에 있어서 좀더 주의를 기울여야 할 필요가 있다.

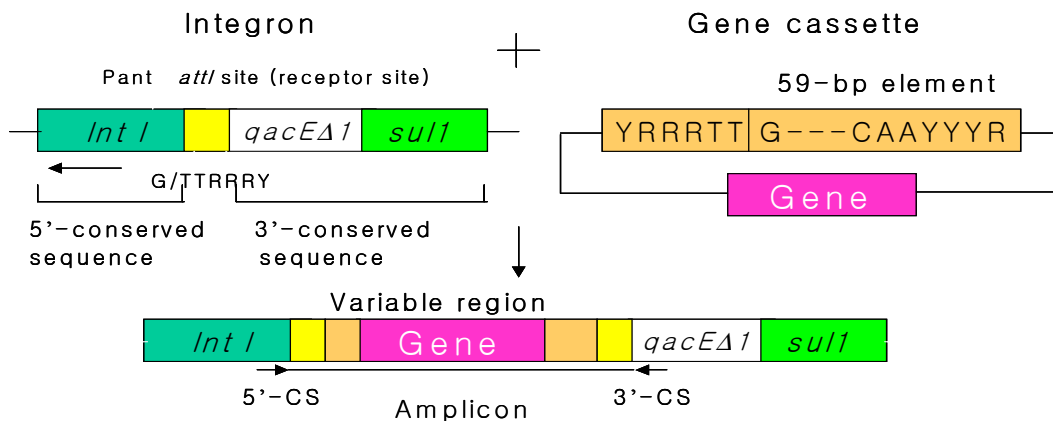
다. 항생제 내성 gene 중의 하나인 integron 조사

항생제 내성에서 가장 중요한 것 중 하나가 transmission인데, 세균들이 항생제 내성 gene 을 빠르고 효과적으로 전달할 수 있는 방법들 중 하나가 integron이다. Integron은 gene cassettes라 불리는 mobile elements(거의 대부분이 항생제 내성 gene)를 포함한 genes을 capturing 하고 mobilizing 할 수 있는 site-specific recombination system을 가진 genetic unit이다. 따라서, 이에 대한 조사는 항생제 내성기전을 이해하는데 필요한 과정이라 할 수 있다. 본 연구에서는 분리균 중 multidrug-resistance (penicillin, erythromycin, streptomycin, tetracycline 등)를 보이는 균주에 대해서 class1 integron의 유무 및 variable region 구조의 크기에 따른 분리를 구분하였다(by Levesque, C. and P.H. Roy. 1993. PCR analysis of integrons, p590-594) (Table 2, Fig. 1). 그 결과 닭에서는 약 40%, 돼지에서는 약 26%가 integron을 가지고 있는 것으로 나타났다. 특이할 만한 사항으로는 닭은 모두 1.6 kb의 integron을 가지고 있고, 돼지는 모두 1.0 kb의 integron을 가지고 있다는 점이다. 이를 더 정확히 하기 위해서는 각각의 variable gene에 대한 연구가 더 진행되어야 하겠다.

Table 2. Integron analysis

Source	No. of Integron	Size of Integron
Poultry	12 / 30 (40%)	1.6 kb
Pork	10 / 39 (26%)	1.0 kb

Fig. 1. Integron 모식도



2. 축산물에서 분리된 ESBL 생산 *Salmonella*의 특성

돼지와 닭에서 분리한 Multiple Drug-Resistant *Salmonella*에 대해 double disk synergy test로 ESBL생산 균주에 대한 확인 실험을 하였다. 2주의 ESBL 생산 균주를 선발하여 isoelectrofocusing gel electrophoresis, ESBL유전자의 sequencing을 시험하고, 두 균주의 내성 유전자의 전달 실험을 하였다. 이로부터 TEM-76과 TEM-104 유전자의 확인과 내성 유전자의 전달 여부를 확인하였다.

가. 항생제 내성 *Salmonella* spp. 의 분리

총 83균주의 동물로부터 분리된 *Salmonella* 중 *S. agona*(11 isolates), *S. derby*(three isolates), *S. enterica* serovar Enteritidis(17 isolates), *S. enterica* serovar Typhimurium(43 isolates), *S. rissen*(seven isolates), *S. montevideo*(one isolate), 그리고 *S. travis*(one isolates)이 다제내성균으로 확인되었고, 이들의 항생제 내성 경향은 다음과 같다 (Table 3, Table 4, Fig. 2)

Table 3. MICs of antimicrobial-resistant animal isolates of *Salmonella* spp. and the types of β -lactamases in *Salmonella* spp.

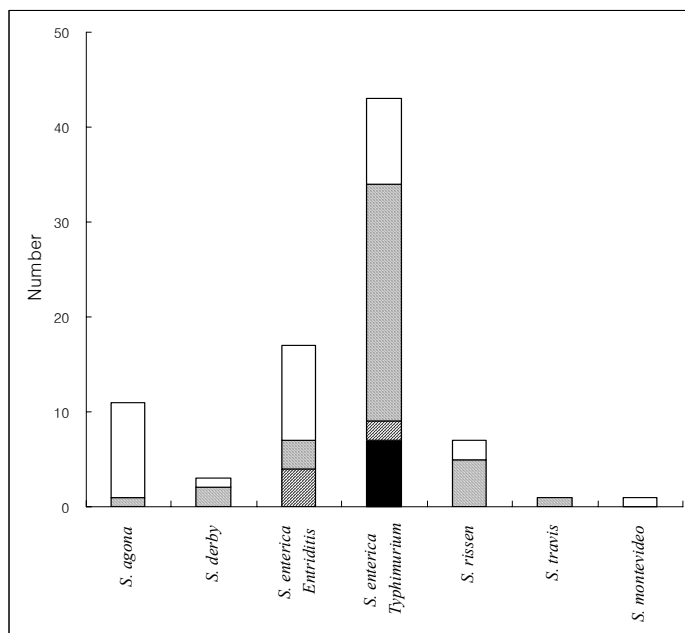
Isolate No.	Source	Amp ^a	Chl ^b	Strep ^c	Sulf ^d	Tet ^e	Flor ^f	Kan ^g	Gen ^h	Neo ⁱ	Nor ^j	Type ^k	β -lactamase
ST ^l 7	pig	128	16	16	≥1024	≥128	8	2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	ASuT	TEM-104
ST 8	pig	≥128	64	32	1024	≥128	16	2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	ACSSuT	TEM-76
ST 9	pig	≥128	64	16	≥1024	≥128	8	2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	ACSuT	TEM-70
ST 40	pig	≥128	64	16	≥1024	128	16	2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	ACSuT	TEM-70
ST 45	pig	≥128	16	8	≥1024	≥128	8	2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	ASuT	TEM-104
ST 47	pig	≥128	16	16	≥1024	128	8	2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	ASuT	TEM-70
ST 48	pig	≥128	32	32	≥1024	≥128	8	2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	ACSuT	TEM-70
ST 110	pig	128	16	≥128	8	≥128	8	2	≤0.5	≤0.5	≤0.5	AST	TEM-1E
ST 103	milk cow	≥128	32	≥128	≥1024	≥128	8	≥128	≤0.5	≤0.5	≤0.5	ACSSuT	TEM-70
SE ^m 104	chicken	≥128	16	≥128	≥1024	≥128	8	1	≤0.5	1	1	ASSuT	TEM-70
SE 105	chicken	≥128	≥128	≥128	≥1024	≥128	8	1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	ACSSuT	TEM-1E
SE 106	chicken	≥128	≥128	≥128	≥1024	≥128	8	1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	ACSSuT	TEM-70
SE 180	chicken	≥128	≥128	≥128	≥1024	≥128	8	1	≤0.5	≤0.5	≤0.5	ACSSuT	TEM-104

a, ampicillin; b, chloroamphenicol; c, streptomycin; d, sulfomethoxazole; e, tetracycline; f, florphenicol; g, kanamycin; h, gentamicin; i, norfloxacin; j, norfloxacin; k, resistant type; l, *S. enterica* serovar Typhimurium; m, *S. enterica* serovar Enteritidis

Table 4. MIC₅₀ and MIC₉₀ of antimicrobial resistant animal isolates of *Salmonella* spp.

	MIC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicillin	128	128
Chloroamphenicol	32	128
Streptomycin	32	128
Sulfomethoxazole	1024	1024
Tetracycline	128	128
Kanamycin	2	2
Gentamycin	0.5	0.5
Neomycin	0.5	0.5
Norfloxacin	0.5	0.5

Fig. 2. Numbers of antimicrobial-resistant *Salmonella* isolated from food-producing animals.

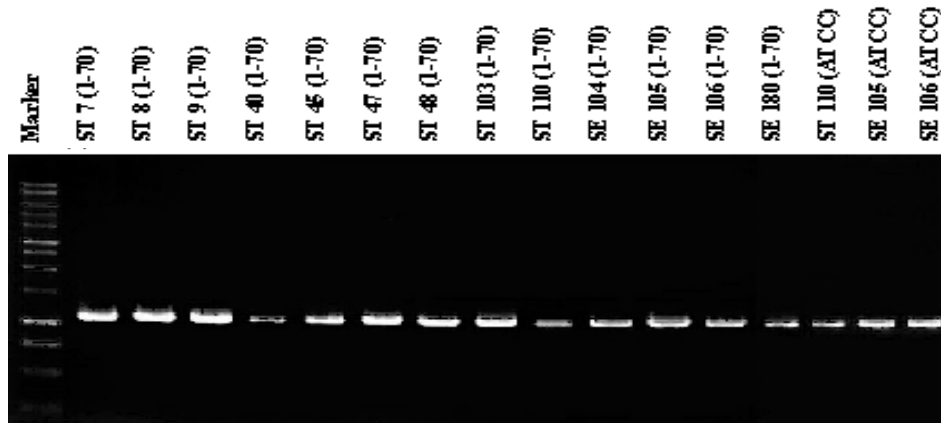


■, resistant to ampicillin, sulfomethoxazole, and tetracycline; ▨, resistant to ampicillin and tetracycline; ▩, resistant to tetracycline; □, susceptible

나. β -lactamase 생산 균주의 검출

Double disk synergy test를 통한 β -lactamase의 검출시험결과 ST8와 SE180이 양성반응을 보여 이들을 IEF한 결과 pI 5.4의 TEM인 것으로 나타났다. 이들을 염기서열 분석한 결과 TEM-1E, TEM 70, TEM-76, and TEM-104로 밝혀졌다.

Fig. 3. DNA fragments produced from PCR with specific primers to TEM using transconjugants produced from *E. coli* CCARM 1-70 and *E. coli* ATCC 25922.



다. 항생제 내성 전달

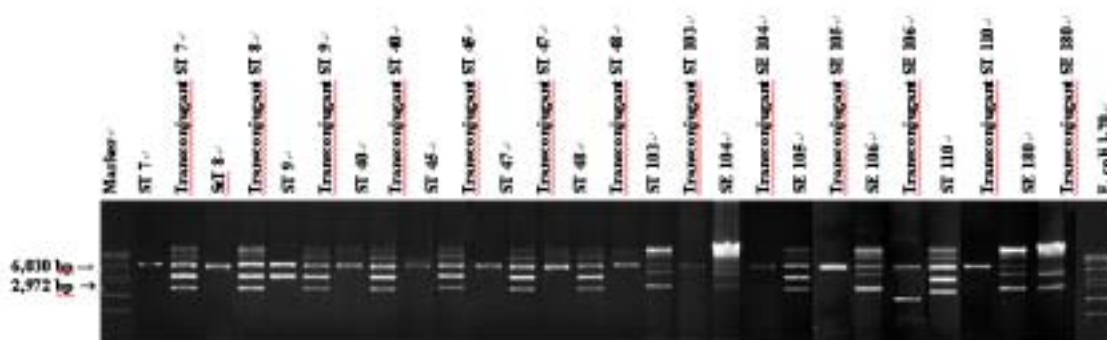
E. coli CCARM 1-70에 대해 내성 유전자의 전달 여부를 확인해 보고자 하였다. 그 결과, transconjugant에 대한 항생제 내성 시험과 TEM specific primer를 이용한 PCR을 통해 내성이 전달된 것이 확인되었다 (Table 5, Fig. 4).

Table 5. MICs of transconjugant *E. coli* after broth mating with *Salmonella*

Isolate No.	AMP ^a		CHP ^b		FLO ^c		SM ^d		SSS ^e		TET ^f	
	<i>Sal</i> ^g	<i>E. coli</i> ^j	<i>Sal</i>	<i>E. coli</i>	<i>Sal</i>	<i>E. coli</i>	<i>Sal</i>	<i>E. coli</i>	<i>Sal</i>	<i>E. coli</i>	<i>Sal</i>	<i>E. coli</i>
ST ^h 7	128	>128	16	>128	8	8	16	>128	>1024	>1024	>128	>128
ST 8	>128	>128	64	>128	16	8	16	>128	1024	>1024	>128	>128
ST 9	>128	>128	64	>128	8	8	16	>128	>1024	>1024	>128	>128
ST 40	>128	>128	64	>128	16	8	16	>128	>1024	>1024	128	>128
ST 45	>128	>128	16	>128	8	8	8	>128	>1024	>1024	>128	>128
ST 47	>128	>128	16	>128	8	8	16	>128	>1024	>1024	128	>128
ST 48	>128	>128	32	>128	8	8	32	>128	>1024	>1024	>128	>128
ST 103	>128	>128	32	>128	8	8	128	>128	>1024	>1024	>128	>128
ST 110	128	>128	16	>128	8	8	>128	128	8	>1024	>128	>128
SE ⁱ 104	>128	>128	16	>128	8	8	>128	>128	>1024	>1024	>128	>128
SE 105	>128	>128	>128	>128	8	8	>128	>128	>1024	>1024	>128	>128
SE 106	>128	>128	>128	>128	8	8	>128	>128	>1024	>1024	>128	>128
SE 180	>128	>128	>128	>128	8	8	>128	>128	>1024	>1024	>128	>128
<i>E. coli</i> ^k	16		64		8		32		256		128	

a, ampicillin; b, chloramphenicol; c, florphenicol; d, streptomycin; e, sulfomethoxazole; f, tetracycline; g, *Salmonella*; h, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; i, *Salmonella enterica* serovar Entritidis; j, MIC of transconjugant; k, recipient *E. coli* CCARM 1-70

Fig. 4. Plasmids isolated from *Salmonella* and transconjugant produced from *E. coli* CCARM 1-70 and each *Salmonella* spp.



E. coli ATCC 25922에 대해서도 내성 유전자의 전달 여부를 확인해 보고자 하였고 그 결과, 내성의 전달이 확인되었다 (Table 6).

Table 6. MICs of transconjugants from broth mating with *E. coli* ATCC 25922 as a recipient.

Isolate No.	Ampicillin		Chloroamphenicol		Streptomycin		Sulfomethoxazole		Tetracyclin	
	Donor	Trans ^a	Donor	Trans	Donor	Trans	Donor	Trans	Donor	Trans
SE ^b 110	128	>128	16	>128	>128	128	8	>1024	>128	>128
SE105	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>1024	>1024	>128	>128
SE106	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>1024	>1024	>128	>128
<i>E. coli</i> ^c	4		4		4		16		1	

a, transconjugants; b, *S. enterica* serovar Enteritidis; c, *E. coli* ATCC 25922

라. PFGE 패턴분석

네 개의 MDR *S. enterica* serovar Typhimurium(ST40, ST48, ST45, and ST47)유전자형을 분석하기 위하여 PFGE를 실시한 결과 같거나 비슷한 결과를 보였다. ST7과 ST8은 매우 유사함을 보였고, ST9, ST103, ST110는 유사성이 거의 없음이 나타났다. 네 주의 *S. enterica* serovar Enteritidis는 서로 간에 유사성을 보여주고 있다. (Fig. 5, Fig 6).

Fig. 5. PFGE of antimicrobial-resistant animal isolates of *Salmonella*.

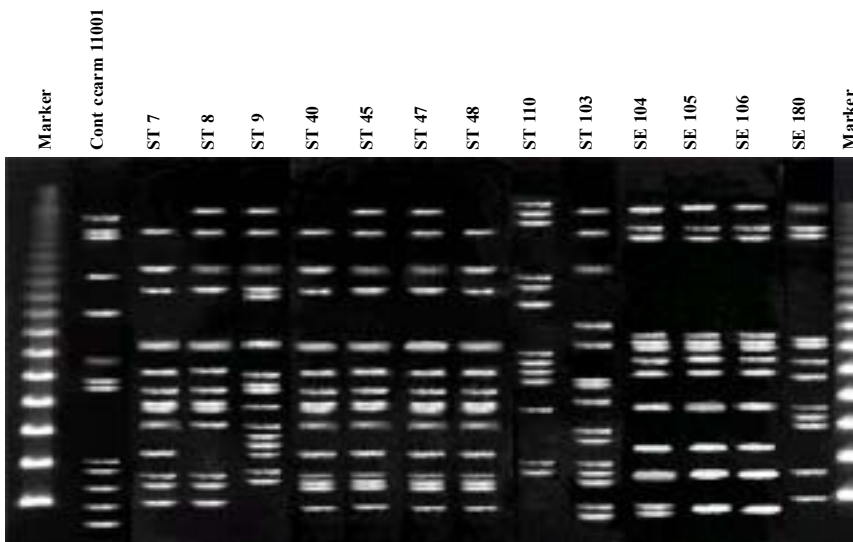
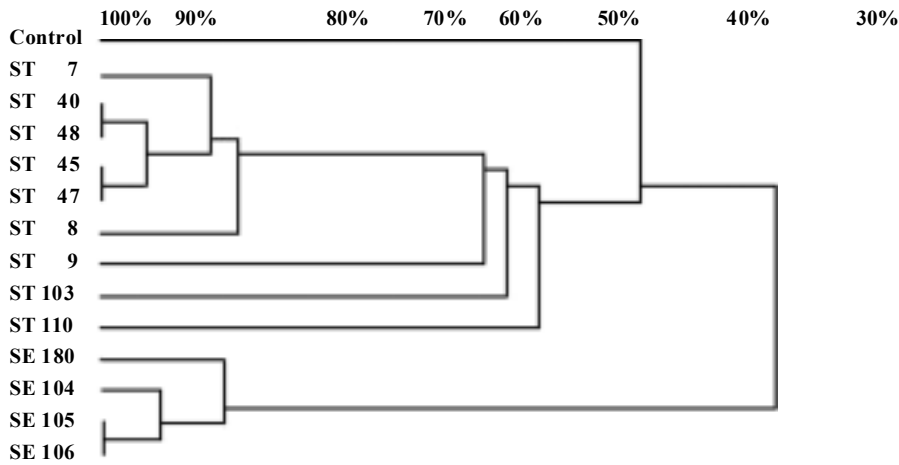


Fig. 6. Pylogeny of antimicrobial-resistant animal isolates of *Salmonella*.



3. 임상검체 및 축산물에서의 분리된 *Salmonella* spp.의 비교 분석

가. 급성 설사증 환자로부터 *Salmonella* spp. 50주 분리

1) 2000-2001년 사이 임상검체에서 *Salmonella* spp. 분리 및 임상적 특징

2000-2001년 사이에 설사와 발열을 주소로 내원한 50명의 환자의 대변에서 *Salmonella*가 분리되었으며, 균종분포는 *S. enteritidis* 4주, *S. typhimurium*이 4주 이외에 group A 2주, B 14주, C 10주, D 12주, E 4주였다(Table 7). 이들 *Salmonella* spp.의 감염은 50주 모두 지역사회 획득 감염이었으며 평균 연령은 36세이었지만 50세 이상의 고령이 35%, 5세 이하의 소아가 22%를 차지하였고 남녀 성비의 차이는 보이지 않았다. 당뇨, 악성 종양, 신기능 저하, 간기능 이상, 소화기 궤양, 순환기 질환 등의 기저질환이 대부분 없었으며 이전에 항생제나 면역억제제를 투여한 환자는 없었다. 집단 발병과 연관된 경우는 없었으며 발열(81.3%), 설사(75%), 구역/구토(68.8%), 복통(56.3%) 등의 증상을 보였다. 평균 입원 기간은 8.8(4-14)일이었으며 항생제 치료를 받았고 사망한 경우는 없었다.

Table 7. 급성설사증 환자에서의 *Salmonella* 분리 균종의 분포 (2000-2001년)

균종	분리주수 (%)
<i>Salmonella enteritidis</i>	4 (8%)
<i>Salmonella typhimurium</i>	4 (8%)
<i>Salmonella</i> group A	2 (4%)
<i>Salmonella</i> group B	14 (28%)
<i>Salmonella</i> group C	10 (20%)
<i>Salmonella</i> group D	12 (24%)
<i>Salmonella</i> group E	4 (8%)
Total	50 (100%)

2) 임상분리주와 축산물 분리주 간의 항생제 내성 비교

위의 임상분리주 중 검체를 얻을 수 있었던 21주와, 양계장 닭 259마리의 대변배양에서 분리된 *Salmonella* spp. 28주 (분리율: 10.8%)간의 항생제 내성을 비교해 보고자 하였다. 축산물 분리 *Salmonella* spp.의 균종은 table 8과 같으며 이들간의 항생제 내성 비교는 다음과 같다(Table 9, Fig. 7). NCCLS 기준 검사법에 의한 agar dilution method 로 MIC를 검사한 결과, 가축과 사람에서 분리된 *Salmonella* 사이에 통계적으로 의미있는 항생제 감수성 차이를 보이지 않았다.

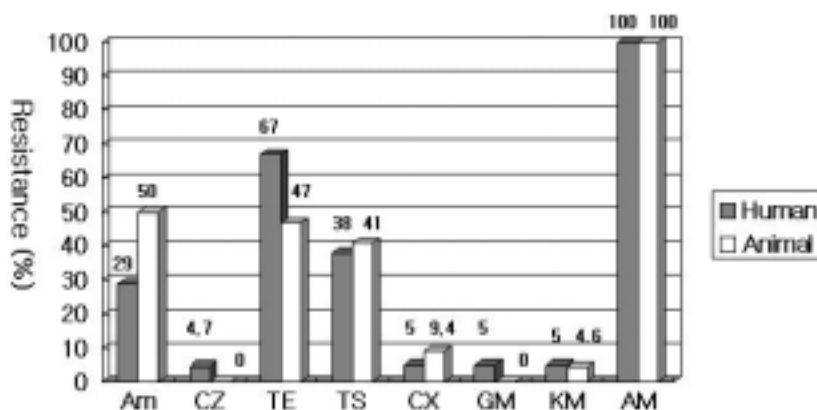
Table 8. 축산물 (양계장 닭 분변)에서의 *Salmonella* 분리 균종의 분포

균종	분리주수 (%)
<i>S. enteritidis/dublin</i>	4 (14.3%)
<i>S. typhimurium</i>	3 (10.7%)
<i>S. derby</i>	1 (3.6%)
<i>S. tennessee</i>	4 (14.3%)
<i>Salmonella</i> spp.	16 (57.1%)
Total	28 (100%)

Table 9. *Salmonella*의 항생제 감수성 검사 결과

Antibiotic	Farm animal (N=28)		Human (N=21)	
	MIC 50	MIC 90	MIC 50	MIC 90
	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)	($\mu\text{g/ml}$)
Ampicillin	16	>128	8	>128
Cefazolin	2	8	2	8
Tetracycline	8	>128	128	>128
Trimethoprim-sulfamethoxazole	2	8	2	128
Ciprofloxacin	0.5	2	0.125	0.125
Gentamicin	1	1	1	2
Kanamycin	4	4	4	16
Amikacin	>128	>128	>128	>128

Figure 7. 사람과 축산물에서 분리된 *Salmonella* spp.의 항생제 감수성 비교



Am, ampicillin; CZ, cefazolin; TE, tetracycline; TS, trimethoprim-sulfamethoxazole; CX, ciprofloxacin; GM, gentamicin; KM, kanamycin; AM, amikacin

나. 급성 설사증 환자로부터 *Salmonella* spp. 24주 분리

1) 2000-2003년 사이 임상검체에서 *Salmonella* spp. 분리 및 임상적 특징

2000년 10월부터 2003년 1월까지 고려대학교 구로병원에서 분리된 24주의 *Salmonella* 균주가 분리된 환자는 남자가 15명, 여자가 9명이였다. 평균 연령은 25세(\pm 21세)이였고, 남자의 평균 연령은 25세 (\pm 21세), 여자의 평균 연령은 24세(\pm 22세)이였다. 남녀의 성비는 남성이 62.5%로 남성이 다소 높았다. 환자들은 당뇨, 악성 종양, 신기능 저하, 간기능 이상, 소화기

폐양, 순환기 질환 등의 기저질환은 대부분 없었다. 집단 발병된 경우는 없었으며 21주가 되면, 1주가 혈액, 2주가 객담에서 검출되었다. 분리된 *Salmonella* 균주의 혈청형은 *Salmonella group D serovar Enteritidis*가 12주(50%)로 가장 흔한 혈청형이었고, *Salmonella group B serovar Typhimurium*이 5주(20.8%)로 다음을 차지하였다(Table 10). 환자들의 평균 입원기간은 14.22(3-62)일이었으며 6명의 환자는 입원 없이 외래에서 치료를 받았다. 환자들의 거주지는 대부분 구로병원 주위 지역에 거주하는 거주자였다.

Table 10. 급성설사증 환자에서의 *Salmonella* 분리 균종의 분포 (2000-2003년)

균종	분리주수 (%)
<i>S. Enteritidis</i>	12 (50)
<i>S. Typhimurium</i>	5 (20.8)
<i>S. Istanbul</i>	1 (4.17)
<i>S. Montevideo</i>	1 (4.17)
<i>S. London</i>	1 (4.17)
<i>S. Heidelberg</i>	1 (4.17)
<i>S. Ohio</i>	1 (4.17)
<i>S. Kambole</i>	1 (4.17)
<i>S. Tennessee</i>	1 (4.17)
Total	24 (100)

2) 임상분리주와 축산물 분리주 간의 항생제 내성 비교

위의 임상분리주 24주와, 양계장 닭 대변배양에서 분리된 *Salmonella* spp. 64주를 대상으로 항생제 감수성 양상을 비교하였다. 축산물 분리 *Salmonella* spp.의 균종은 *Salmonella group B serovar Typhimurium*이 15주(23.44%)로 가장 흔한 혈청형이었고 *Salmonella group D serovar Enteritidis*가 14주(21.88%)로 다음을 차지하였다(Table 11).

Table 11. 축산물 (양계장 닭 분변)에서의 *Salmonella* 분리 균종의 분포

균종	분리주수 (%)
<i>S. Typhimurium</i>	15 (23.44)
<i>S. Enteritidis</i>	14 (21.88)
<i>S. Tennessee</i>	13 (20.31)
<i>S. Salamae</i>	9 (14.06)
<i>S. Montevideo</i>	6 (9.37)
<i>S. Virginia</i>	4 (6.25)
<i>S. Bovismorbificans</i>	3 (4.69)
Total	64 (100)

이들간의 항생제 내성 양상을 비교한 결과, 사람분리 *Salmonella* 균주의 항생제 내성 양상은 24균주 중 1개 이상의 항생제에 내성을 보이는 균주는 14주(58.3%)였고, 두 균주는 3개의 항생제에 내성을 보였으며, 한 균주는 4개의 약제에 내성을 보였다. 사람균주에서 가장 높은 내성율을 나타내는 항균제는 tetracycline으로서 시험균주의 45.83%(11/24)가 내성을 나타내었고, 그 다음은 ampicillin으로 시험균주의 37.5%(9/24)가 내성을 나타내었다(Table 12). Ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, amikacin, ceftriaxone에 내성을 보이는 균주는 없었다.

가축분리 *Salmonella* 균주의 항생제 내성 양상은 균주 64주중 1개 이상의 항생제에 내성을 보이는 균주는 62.5%(40/64)였고, 3개의 항생제에 내성을 나타내는 균주는 17.2%(11/64)였다. 가장 높은 내성율을 나타내는 항균제는 ampicillin과 tetracycline으로 시험균주의 50%(32/64)가 내성을 나타내었다. 역시 ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, amikacin, ceftriaxone에 내성을 보이는 균주는 없었으며 추가로 gentamicin 내성 균주도 관찰되지 않았다.

Table 12. 사람 및 축산물 분리 *Salmonella* 균주의 항생제 감수성 양상 (감수성율)

Antibiotics	MIC	임상 분리주		축산물 분리주	
		Percent (number)	others	Percent (number)	others
Ciprofloxacin	≥4	0% (0)		15.63% (10)	
Ciprofloxacin	≥0.25	12.5% (3)		0% (0)	
Ceftriaxone	≥64	0% (0)		0% (0)	
Amikacin	≥64	0% (0)		0% (0)	
Ampicillin	≥32	37.5% (9)		50% (32)	
Ampicillin	16	4.17% (1)	I	45.3% (64)	I
Cefazolin	≥32	4.17% (1)		0% (0)	
Cefazolin	16	4.17% (1)	I	12.5% (8)	I
Chloramphenicol	≥32	4.17% (1)		14.1% (9)	
Chloramphenicol	16			1.56% (1)	I
Gentamicin	≥16	8.3% (2)		0% (0)	
Kanamycin	≥64	4.17% (1)		4.7% (3)	
Tetracycline	≥16	45.8% (11)		50%(32)	
Tetracycline	16	45.8% (11)		4.7%(3)	I
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	≥4/76	0% (0)		0%(0)	

I, intermediate sensitive

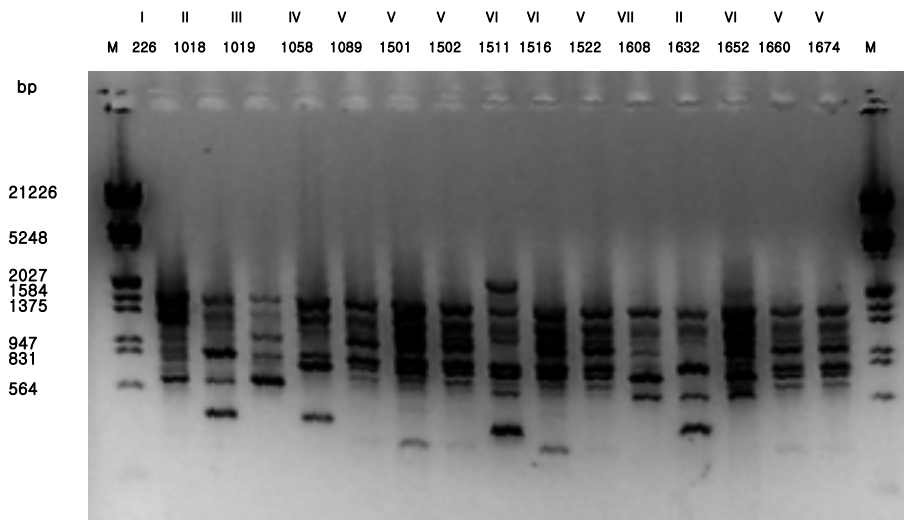
3) 임상분리 및 축산물 분리 *Salmonella* 균주의 RAPD 분석, 비교

사람 24주와 가축 64주의 RAPD pattern은 Figure 8과 Figure 9와 같았고 이들의 분포양상은 Table 13와 같았다.

사람 분리 24주의 RAPD 형은 11개형으로 나왔다. RAPD I type 1주, II type 3주, III type 1주, IV type 1주, V type 10주, VI type 2주, VII type 1주, VIII type 1주, IX type 1주, X type 1주, XI type 1주로 총 11가지의 RAPD type이 나왔다.

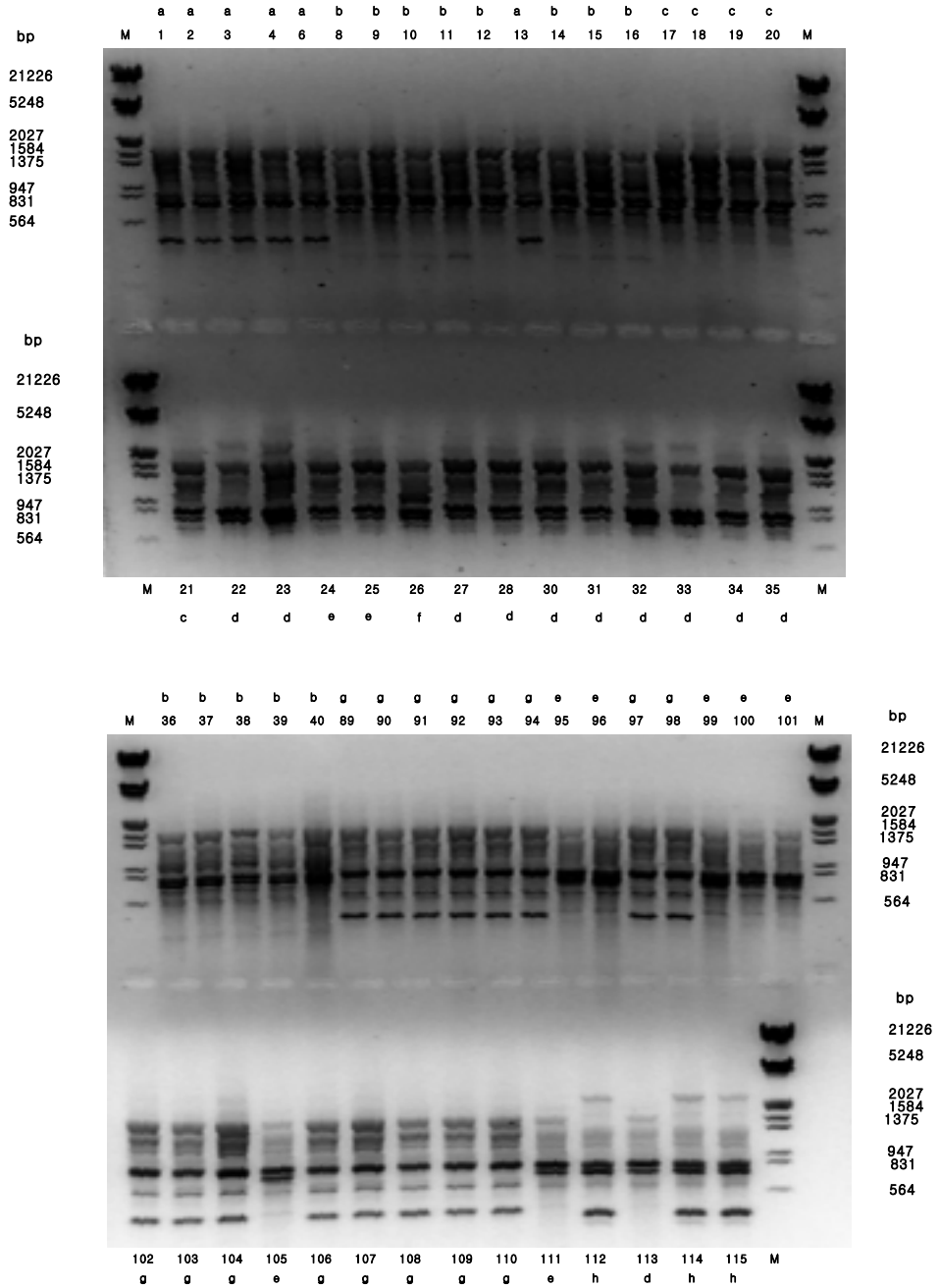
닭의 분변에서 분리된 64주의 RAPD 형은 총 8가지 type으로 나왔고, RAPD a type은 6주, b type은 13주, type c는 5주, type d는 11주, type e는 9주, type f는 1주, type g는 16주, type h는 3주였다.

Figure 8. 임상분리 *Salmonella* 균주 24주의 Random-amplified polymorphic DNA pattern.



M, Molecular weight marker (단위: bp); first line, RAPD pattern; second line, sample number

Figure 9. 축산물 분리 *Salmonella* 균주 64주의 Random-amplified polymorphic DNA pattern



M, Molecular weight marker (단위: bp); first line, RAPD pattern; second line, sample number

Table 13. 임상과 가축 분리 *Salmonella* 균주의 RAPD type 분포 양상

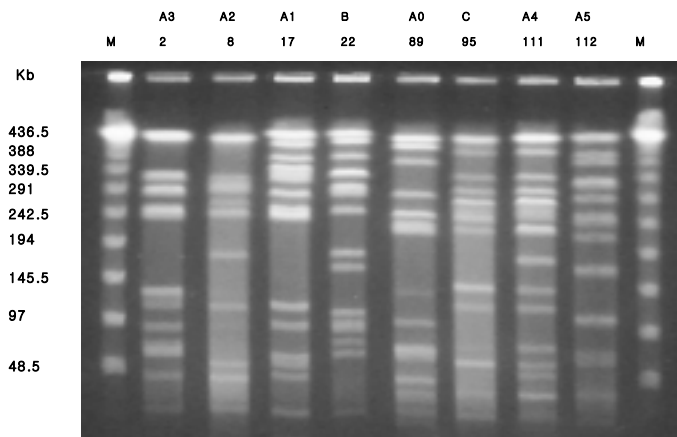
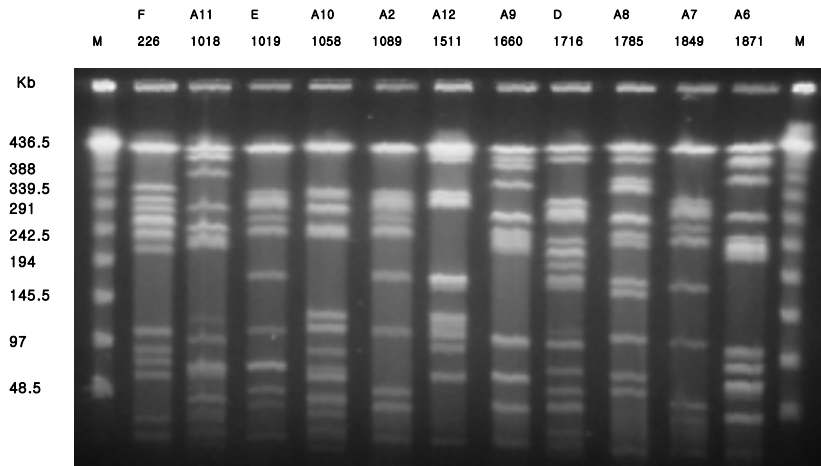
임상분리주 RAPD type	Sample number	축산물 분리주 RAPD type	Sample number
I	226	a	1, 2, 3, 4, 6, 13
II	1018, 1632, 1717	b	8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 36, 37, 38, 39, 40
III	1019	c	17, 18, 19, 20, 21
IV	1058	d	22, 23, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 113
V	1089, 1501, 1502, 1522, 1660, 1674, 1690, 1697, 1698, 1849	e	24, 25, 95, 96, 99, 100, 101, 105, 111
VI	1511, 1516, 1652	f	26
VII	1608	g	89, 90, 91, 92, 93, 94, 97, 98, 102, 103, 104, 106, 107, 108, 109, 110
VIII	1708	h	112, 114, 115
XI	1716		
X	1785		
XI	1871		

4) 임상과 가축 분리 *Salmonella* 균주의 PFGE 형별 분석

사람과 가축분리 *Salmonella* 균주의 PFGE pattern은 분포양상은 Figure 10, Table 14와 같았다. 사람 24주 중 1주는 PFGE typing이 되지 않았고, 4가지의 PFGE 분자형(A, D, E, F)을 나타내었으며, A 분자형은 8가지의 아형(A2, A6-A12)으로 나뉘었다. 가축 64주 중 2주는 typing이 되지 않았고, 3가지의 PFGE 분자형(A, B, C)을 나타내었으며, A 분자형은 6가지의 아형(A0-A5)으로 나뉘었다. PFGE 형별 A2 아형에는 사람 분리주 9주와 가축분리주 11주가 속하여 교차 감염의 가능성을 나타내었다.

PFGE 형별분석에서 typing이 되지 않은 3주를 제외하고 나머지 균주들의 RAPD와 PFGE의 pattern을 비교하였을 때 사람에서는 73.9%(17/23)에서 일치율을 보였고, 가축에서는 71%(44/62)에서 일치율을 보였다.

Figure 10. 임상과 가축 분리 *Salmonella* 균주의 PFGE pattern



M, molecular weight marker(단위: Kb); First line, PFGE pattern; Second line, sample number. 사람 1주와 가축 2주는 typing 되지 않았음

Table 14. 가축과 사람의 PFGE type 분포 양상

PFGE type	임상분리주 sample number	축산물 분리주 sample number	합계
A0		89, 90, 91, 92, 93, 94, 97, 98, 102, 103, 106, 107, 108, 109, 110	16
A1		17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 30, 31, 34, 35	14
A2	1089, 1501, 1502, 1516, 1522, 1674, 1690, 1697, 1698	8, 9, 10, 11, 12, 15, 36, 37, 38, 39, 40	20
A3		1, 2, 3, 4, 6, 13	6
A4		111, 113	2
A5		112, 114, 115	3
A6	1871		1
A7	1849		1
A8	1717, 1785		2
A9	1660		1
A10	1058		1
A11	1018, 1632		2
A12	1511, 1608, 1652		3
B		22, 23, 32, 33, 104, 105	6
C		95, 96, 99, 100, 101	5
D	1716		1
E	1019		1
F	226		1
합계	11	8	19

*사람 1708과 가축 14, 16은 PFGE typing이 되지 않았음.

4. 임상검체 및 축산물에서 분리된 Non-typhoidal *Salmonella*(NTS) spp.의 Quinolone 저도내성의 기전 및 의의

가. 임상검체 및 축산물에서 분리된 NTS는 다음과 같다(Table 15).

Table 15. Serotypes of the NTS

Serotypes	Human isolates % (number)	Livestock isolates % (수)		
		Chicken isolates % (number)	Pork isolates % (number)	Total livestock isolates % (number)
<i>S. Enteritidis</i>	47.2%(17)	37.84%(14)		21.88%(14)
<i>S. Typhimurium</i>	22.2%(8)		55.56%(15)	23.44%(15)
<i>S. Istanbul</i>	2.78%(1)			
<i>S. Montevideo</i>	2.78%(1)	16.22%(6)		9.37%(6)
<i>S. London</i>	2.78%(1)			
<i>S. Heidelberg</i>	2.78%(1)			
<i>S. Ohio</i>	2.78%(1)			
<i>S. Kambole</i>	2.78%(1)			
<i>S. Tennessee</i>	2.78%(1)	35.14%(13)		20.31%(13)
<i>S. Rissen</i>	2.78%(1)			
<i>S. Schwarzengrund</i>	2.78%(1)			
<i>S. Newport</i>	2.78%(1)			
<i>S. Brandenburg</i>	2.78%(1)			
<i>S. Salamae</i>			33.53%(9)	14.6%(9)
<i>S. Virginia</i>		10.8%(4)		6.25%(4)
<i>S. Bovismorbificans</i>			11.11%(3)	4.69%(3)
Total	100%(36)	100%(37)	100%(27)	100%(64)

나. Nalidixic acid 및 ciprofloxacin의 MIC

디스크 확산검사상 nalidixic acid에 내성을 보였던 86주(사람 분리주 5주 및 가축 분리주 81주)의 nalidixic acid 최소 억제 농도는 한 주에서 32 µg/mL였으며 나머지는 85주는 128 µg/mL 혹은 그 이상이었다(Table 16). 이들 균주의 ciprofloxacin 최소 억제 농도는 0.06 µg/mL에서 4 µg/mL를 보였다(Table 17). 현재 NCCLS guideline에 비추어, ciprofloxacin의 최소억제농도 ≤ 1 µg/mL 인 감수성 균은 86주 중 67주(77.9%)였으며, 이 가운데 quinolone 저도 내성 NTS(ciprofloxacin 최소 억제 농도 : 0.125-1.0 µg/mL)에 해당하는 균은 65주로 대부분을 차지하였다. 최소억제농도가 1µg/mL 보다 높으면서 4 µg/mL 보다 낮은 중등도 내성균은 18주(20.9%)였다. 최소억제농도 ≥4 µg/mL로 ciprofloxacin 내성인 균은 1주(0.01%)가 있었으며, 이 균의 ciprofloxacin 최소억제농도는 4 µg/mL였다.

Table 16. Results of disc diffusion test of NTS to nalidixic acid

	Human isolates	Livestock isolates
Susceptible	5 (13.9%)	81 (45.3%)
Resistant	31 (86.1%)	98 (54.7%)
Total	36 (100%)	179 (100%)

Table 17. MIC of the NTS to ciprofloxacin and nalidixic acid

Antibiotics	MIC (ug/mL)						% Resistance	
	Range		MIC ₅₀		MIC ₉₀		H	L
	Human isolates (n = 36)	Livestock isolates (n = 179)	H	L	H	L		
Ciprofloxacin	0.06 - 1	0.125- 4	0.25	2	1	2	0	0.56
Nalidixic acid	32 - 128<	128<	0.125	128<	128<	128<	13.9	45.3

H : Human isolates, L : Livestock isolates

다. NTS의 Quinolone Resistant Determining Region(QRDR)에 대한 PCR 및 핵산 서열 분석
총 86주의 nalidixic acid 내성 균주 가운데 61주(사람 분리주 4주, 가축 분리주 57주)를 대상으로 *gyrA*의 PCR을 시행하고 여기서 얻어진 PCR 생산물의 염기 서열을 분석한 결과,

총 23주의 결과를 얻을 수 있었다. 이중 12주에서 *gyrA* 83번 아미노산에 점 변이가 관찰되었다(Ser83 → Phe). 9주에서는 *gyrA* 83번 아미노산 이외에도 87번 아미노산의 point mutation을 추가로 발견할 수 있었는데, 6주는 Asp87 → Glu, 2주는 Asp87 → Tyr, 나머지는 Asp87 → Arg로 아미노산의 변이가 관찰되었다. 2주는 *gyrA*의 83번이나 87번의 아미노산 모두에서 변이가 관찰되지 않았다(Table 18).

라. 유기 용매 내성 검사

86주의 nalidixic acid 내성 균주를 대상으로 유기 용매 내성 검사를 시행한 결과, 사람 분리주 5주 중 4주(80%), 가축 분리주 81주 중 11주(11%)에서 유기 용매 내성을 보였다. 유기 용매 내성 유무에 따른 ciprofloxacin MIC 의 변화는 뚜렷하게 관찰되지 않았다(Table 19).

Table 18. Sequence of a portion of QRDR in *gyrA* of the low dose quinolone-resistant NTS

Names of the isolate	MIC (NA) (µg/mL)	MIC (CIP) (µg/mL)	DNA sequence of a portion of <i>gyrA</i> gen
<i>gyrA</i> sequence (wild type)			5'-GGTGACTCGGCGGTTTATGACACG-3'
Ser83 (TCG)→ Phe (TTC)			
2-41	128	1	5'-GGCGATTTCGCAGTGTATGACACC-3'
2-42	128	1	5'-GGCGATTTCGCAGTGTATGACACC-3'
2-43	128	1	5'-GGCGATTTCGCAGTGTATGACACC-3'
2-45	128	1	5'-GGCGATTTCGCAGTGTATGACACC-3'
2-47	128	1	5'-GGCGATTTCGCAGTGTATGACACC-3'
2-48	128	1	5'-GGCGATTTCGCAGTGTATGACACC-3'
2-49	128	1	5'-GGCGATTTCGCAGTGTATGACACC-3'
2-50	128	1	5'-GGCGATTTCGCAGTGTATGACACC-3'
2-55	128	1	5'-GGCGATTTCGCAGTGTATGACACC-3'
2-57	128	1	5'-GGCGATTTCGCAGTGTATGACACC-3'
JYL17	>128	0.125	5'-GGCGATTTCGCAGTGTATGACACC-3'
S1018	>128	1	5'-GGCGATTTCGCAGTGTATGACTAC-3'
Ser83 (TCG) →Phe (TTC) and Asp87 (GAC) → Tyr (TAC)			
2-44	128	1	5'-GCGA-TTTC_CAGTGTATTACACC-3'
2-53	128	1	5'-GGCGATTTCCCAGTGTATTACACC-3'
Ser83 (TCG) →Phe (TTC or TAC) and Asp87 (GAC) → Glu (GAA or GAG)			
JYL19	>128	0.25	5'-GGCGATTTCGCAGTGTACGAAACC-3'
JYL6	>128	0.25	5'-GGCGATTACACAGTGAATGAAACC-3'
JYL23	>128	0.25	5'-GGCGATTTCGCACTGTACGAGACC-3'

2-62	128	1	5'-GGCGTTTTCGCAGTGTATGAAACC-3'
2-111	>128	2	5'-GGCGATTTCGCACTGTATGAAACC-3'
2-124	>128	2	5'-GGCGATTTCGCAGTGTACGAAAAC-3'
Ser83 (TCG) → Phe (TTC) and Asp87 (GAC) → Arg (CGA)			
2-117		2	5'-GGCGATTTC CC AGTGTATCGAACA-3'
no point mutation on 83, 87 amino acids			
2-58	128	1	5'-GGTGACTCGGCGGTTTATGACACC-3'
JYL12	128	0.125	5'-GGTGACTCGGCGGTTTATGACACC-3'

Table 19. Results of the organic solvent tolerance test.

	Human isolates (n=5)		Livestock isolates (n=81)		total
Susceptible	1 (20%)	MIC (ciprofloxacin) 1 µg/mL	72 (88.9%)	MIC (ciprofloxacin) 1 µg/mL - 4 µg/mL	73 (84.9 %)
Resistant	4 (80%)	MIC (ciprofloxacin) 0.06 µg/mL- 1 µg/mL	9 (11.1%)	MIC (ciprofloxacin) 0.25 µg/mL - 2 µg/mL	13 (15.1 %)

제3절 *Staphylococcus aureus*의 내성기전과 연관 연구

1. MRSA, VRSA 및 VISA 분리 동정 및 항생제 내성 분석 결과

가. 시료채취 및 Presumptive MRSA 균주의 분리

충청, 전라, 경상지역의 목장, 도축장, 도계장, 식육가공공장, 축산물작업장 등에서 우리나라 주요 산업동물인 소, 돼지, 닭 등에서 총 1,913점의 시료를 채취, 위에서 설명한 표준방법에 의하여 *Staphylococcus aureus*의 분리, 동정을 실시하였다. 그 결과 총 시료 1,913점 중 421 시료에서 *S. aureus*가 검출되었다(Table 1). *S. aureus*는 모든 축종에서 골고루 분리되었지만, 대부분이 원유에서 검출되었으며, 돼지의 식육, 닭의 관절 부위에서 비교적 높은 검출율을 보였다.

Table 1. Isolation of methicillin (oxacillin)-resistant *S. aureus* isolates from major food animals (2001. 5월-2003. 4월)

Animal	site/ source	No. of specimen	Positive sample for <i>S. aureus</i>	Oxacillin -resistant ^b (2-8 μ g/ml)	Oxacillin -resistant ^c (>8 μ g/ml)	<i>mecA</i> positive sample
Cattle	Meat ^a	54	5	0	0	0
	Feces	68	2	0	0	0
	Milk	894	265	7 ^d	10	12
	Feed	32	3	0	0	0
	Joint	51	6	0	0	0
	Trachea	49	5	0	0	0
Pig	Meat ^a	161	39	2	0	0
	Feces	68	2	0	0	0
	Feed	37	2	0	0	0
	Joint	116	17	0	0	0
	Trachea	72	17	1	0	0
	Uterus	15	5	0	0	0
Chicken	Meat ^a	69	9	2	1	1
	Feces	35	2	0	0	0
	Feed	36	4	0	0	0
	Joint	119	33	3	2	2
	Trachea	37	5	0	0	0
Total		1,913	421	15	13 ^e	15

^aMost of *S. aureus* were isolated from suppurative regions in the meat.

^bNumbers of samples that contained *S. aureus* resistant to 2 to 8 μ g/ml of oxacillin.

^cNumbers of samples that contained *S. aureus* resistant to greater than 8 μ g/ml of oxacillin.

^dTwo of seven oxacillin (MIC, 2-8 μ g/ml) resistant *S. aureus* strains from milk samples of dairy cattle were positive for *mecA* gene by PCR, while the other oxacillin resistant strains within this range of MIC were negative for *mecA*.

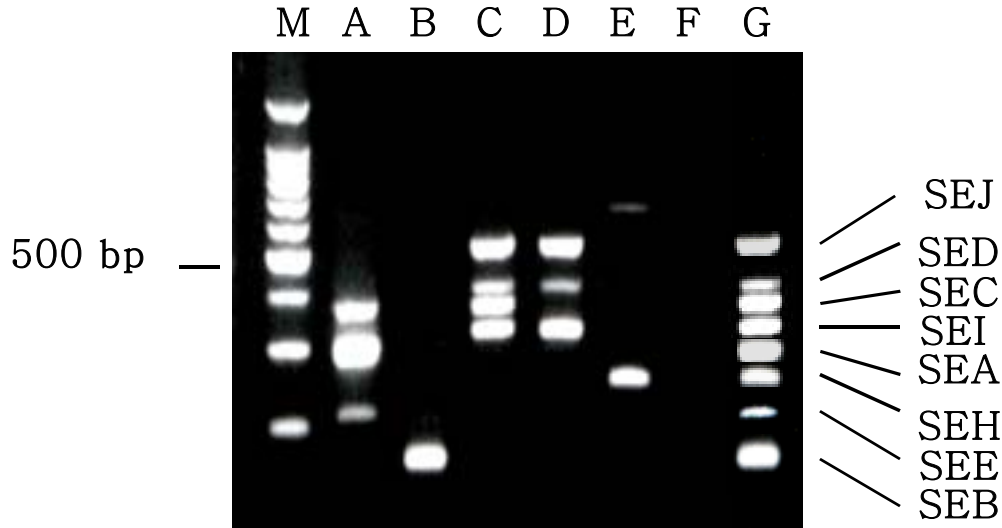
^eAll of oxacillin (MIC, > 8 μ g/ml) resistant *S. aureus* strains were positive for *mecA*.

나. *S. aureus*의 SE gene 검출을 위한 esr-mPCR

1) 표준균주를 이용한 esr-mPCR

SE를 생산하는 것으로 알려져 있는 표준균주들을 이용하여 esr-mPCR을 수행한 결과, SEG를 제외한 모든 SE의 detection이 가능하였다 (Fig. 1).

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the amplified PCR products produced by *esr*-mPCR.



M, 100-bp ladder; A, *Staphylococcus aureus* FRI 913; B, *S. aureus* MNHOCH; C, *S. aureus* FRI 361; D, *S. aureus* FRI 472; E, *S. aureus* FRI 569; F, *S. aureus* RN 4220, and G, amplified SE ladder prepared by pooling PCR products generated in individual reactions.

2) 축산물 유래 균주를 이용한 SE detection

총 141의 *S. aureus* 분리균주(시판 돼지고기 23주, 시판 닭고기 42주, 돼지 도축장 sample 37주, 도계장 sample 39주)에 대해 *esr*-mPCR을 수행한 결과, 총 27주가 toxigenic strain으로 확인되었다. 검출된 toxin은 다음과 같다 (Table 2).

Table 2. Characterization of toxigenic *S. aureus* isolates obtained in Korea

Source	No. isolates	No. isolates with each PCR toxin type	Percentage
Retail pork	23	1 SEA, 8 SEI	39%
Retail chicken	42	1 SEH	2%
Porcine abattoir samples	37	5 SEA, 10 SEI, 2 SEA and SEI	46%
Chicken abattoir samples	39	0	0%

Table 2와 같이, 국내 축산물에서 확인된 주된 toxin type은 SEI였고 그 다음이 SEA로 나타났다. 외국의 주된 toxin type이 SEA, SEC, SEB, SEE등의 major toxin인 것과는 차이가 존재하였다. 현재 *S. aureus*에 의해 야기되는 주된 식중독의 95%가 이들 major toxin에 의

해 야기되는 것으로 밝혀져 있고 나머지 5%가 그 외의 minor toxin에 의한 것으로 추정되
는바, 국내 축산물 유래 SE에 대한 지속적인 monitoring이 필요하다고 생각된다.

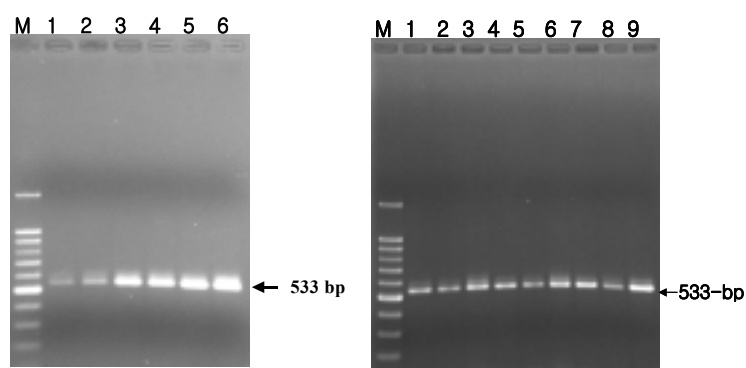
다) Presumptive MRSA 및 VISA 분리, 동정

분리된 *S. aureus*를 대상으로 하여 2-8 $\mu\text{g/ml}$ oxacillin 농도에서 내성을 보이는 *S. aureus*
28주를 presumptive MRSA를 선발하였다. 본 연구사업에서 동물시료에서 분리한 *S. aureus*
중 2 $\mu\text{g/ml}$ vancomycin의 저항균이 없어 VISA 및 VRSA는 검출되지 않았다.

라. Presumptive MRSA 균주의 PCR에 의한 *mecA* 유전자 검출

유전자 *mec*은 변형 penicillin-binding 단백질인 PBP 2a를 encoding하고 있다. 이로서 β -
-lactam계 항생제에 약하게 결합하여 oxacillin이나 methicillin같은 항생제는 세균의 세포벽
합성에 영향을 주지 못하여 세균이 내성을 띠게 된다. 즉, 유전자 *mec*의 존재여부를 알아냄
으로써 균주의 MRSA 여부를 확인할 수 있다. 각 presumptive MRSA 균주로부터 DNA를
추출하여 유전자 *mecA*를 특이적으로 감지할 수 있는 primer set로 PCR한 결과
presumptive MRSA 균주 28개중 15개가 유전자 *mecA*를 소유하였다(Table 1, Fig. 2). 이
중 3주는 닭의 식육과 관절에서, 12주는 젖소의 우유에서 분리되었다.

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of *mecA* PCR product.



lane: M, size marker; 1 to 6 on the left, and 1 to 9 on the right, MRSA strain
originated from animals. Size of *mecA* PCR product is indicated.

마. MRSA에 대한 MIC 결과

위 방법에서 확인된 presumptive MRSA균주를 대상으로 NCCLS (National Committee of
Clinical Laboratory Standard)의 방법에 따라 Agar dilution method로 oxacillin,
vancomycin에 대해 MIC 수행한 결과 MRSA로 확인된 균주에서 모두 oxacillin에 대한 내
성이 높게 나타났다(Table 3). 그러나 vancomycin에 대한 내성을 보인 균주는 없어 VISA

및 VRSA 균주는 발견되지 않았다.

Table 3. Results obtained with diagnostic tests on methicillin (oxacillin)-resistant *S. aureus* originated from animals.

Isolate	Origin	Oxacillin-S creen	Oxacillin MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Vancomycin MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)	mecA PCR	MRSA-Screen
SA006	Chicken	+	16	<2	+	+
SA023	Cattle	+	4	<2	-	\pm^*
SA030	Pig	+	8	<2	-	-
SA031	Pig	+	4	<2	-	-
SA032	Pig	+	4	<2	-	\pm^*
SA033	Pig	+	4	<2	-	-
SA037	Pig	+	2	<2	-	-
SA046	Cattle	+	32	<2	+	+
SA049	Chicken	+	1	<2	-	-
SA055	Chicken	+	2	<2	-	-
SA058	Chicken	+	4	<2	-	-
SA095	Chicken	+	32	<2	+	+
SA097	Chicken	+	32	<2	+	+
SA106	Cattle	+	32	<2	+	+
SA107	Cattle	+	4	<2	-	-
SA108	Cattle	+	4	<2	-	-
SA109	Cattle	+	16	<2	+	+
SA120	Cattle	+	32	<2	+	+
SA122	Cattle	+	32	<2	+	+
SA123	Cattle	+	>128	<2	+	+
SA124	Cattle	+	64	<2	+	+
SA125	Cattle	+	8	<2	+	+
SA126	Cattle	+	6	<2	+	+
SA129	Cattle	+	16	<2	-	-
SA130	Cattle	+	8	<2	+	+
SA236	Cattle	+	128	<2	+	+
SA237	Cattle	+	64	<2	+	+
SA240	Cattle	+	4	<2	-	-

+, positive; -, negative.

*Slight agglutination of these two strains became visualized after 10 to 15 min reactions, while other positive reactions were determined within 3 min (Fig. 2).

바. MRSA의 disk diffusion susceptibility test에 이용한 항생제 내성 조사

위 방법에서 확인된 MRSA균주를 대상으로 NCCLS(National Committee of Clinical Laboratory Standard)의 방법에 따라 amikacin, ampicillin, cefoxitin, ciprofloxacin, ceftiofur, clindamycin, kanamycin, penicillin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazole, imipenem 등을 이용 disk diffusion susceptibility test에 의해 내성 및 감수성 항생제 조사를 수행하였

다(Table 4). MRSA 15 균주 중 amikacin, trimethoprim-sulfamethoxazole에 내성이 있는 균주는 없었으며, norfloxacin 과 ofloxacin에 비교적 감수성이 높고, ampicillin 과 penicillin 에 모두 내성이 있었다.

Table 4. Antibiotic susceptibility profiles by disk diffusion method for *mecA* positive MRSA isolates

Isolate No. ^a	Susceptibility														Anti-biotype	
	an	am	fox	cf	cip	cc	e	gm	im	k	nor	ofx	p	te		sxt
006	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	A
046	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	S	B
095	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	A
097	S	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	A
106	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	R	R	S	B
109	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R	S	C
120	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	D
122	S	R	R	S	S	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	E
123	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	F
124	S	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	G
125	S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	H
126	S	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	H
130	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	F
236	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	C
237	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I

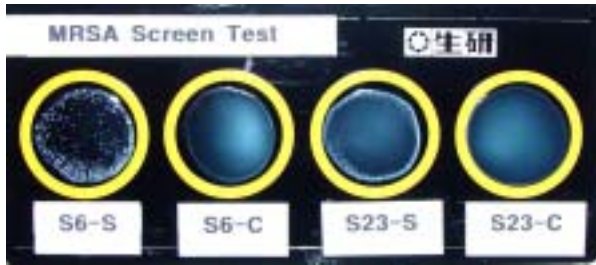
^aIsolate numbers are in accordance with Table 2.

Abbreviation: an, amikacin; am, ampicillin; fox, cefoxitin; cf, cephalothin; nor, norfloxacin; ofx, ofloxacin; p, penicillin; sxt, trimethoprim-sulfamethoxazole; S, susceptible; R, resistant.

사. MRSA의 MRSA-SCREEN Test에 의한 PBP 2a 검출

β-lactam계 항생제의 결합을 감소시켜 세균의 내성력을 부여하는 penicillin-binding 단백질 변형인 PBP 2a의 발현여부를 알아내기 위하여, 각 presumptive MRSA 균주로부터 단백질을 추출하여 anti-PBP 2a monoclonal antibody sensitized latex와 혼합 agglutination 반응을 관찰하여 양성유무를 판정하였다(Table 1, Fig. 3). PCR 반응에서 유전자 *mecA*를 소유한 5개의 균주에서 모두 강한 양성을 보였으며, PCR 반응에서 유전자 *mecA*를 감지하지 못한 2개의 균주(S23 와 S39)에서도 약한 양성을 보였다.

Figure 3. Performance characteristics of the MRSA-Screen latex agglutination test.



S6-S and S23-S, strong positive reaction of S6 strain and weak positive reaction of S23 strain with sensitized latex particle; S6-C and S23-C, negative reactions of S6 and S23 strains with control latex particle.

2. 축산물 분리 MRSA의 SCCmec 분석 및 병원 분리 균주와의 비교 분석

가. 축산물 분리 MRSA

1999~2003년 분리 유방염 MRSA 16 균주와 2003년 분리 시판 닭고기 분리 3주에 대해 분석을 시도하였으며 그 결과를 동물병원 분리 MRSA 3주와 사람 병원 분리 MRSA 7주와 비교 분석하였다.

나. SCCmec 의 구조 및 type

MRSA의 methicillin 내성을 나타내는 *mecA* gene은 Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*(SCC*mec*) 이라는 고유한 genetic element에 존재한다. SCC*mec*은 양 말단의 inverted and direct repeats, site specific recombinase genes(*ccrA*, *ccrB*), 그리고 *mecA* gene complex로 구성되어 있다. *S. aureus*의 *ccr* gene complex는 현재 3가지 type이 존재함이 밝혀졌는데 type 1(*ccrA1ccrB1*), type 2(*ccrA2ccrB2*), 그리고 type 3(*ccrA3ccrB3*)가 그것이다. Mec gene complex는 *mecI* gene, *mecR1* gene(MS and PB domains), 그리고 IS1272 등으로 구성된다. 4가지 class의 mec gene complex가 *Staphylococcus* spp.에 존재하는데 단지 class A 와 class B만이 *S. aureus*에 존재한다고 밝혀져 있다. Mec class A는 *mecI*, intact *mecR1*, *mecA*, 그리고 IS431R로 구성된 반면 mec class B는 IS1272, *mecR1* (PB domain이 삽입된 IS1272에 의해 잘려져 있다), *mecA*, 그리고 IS431R로 구성된다. 지금까지 *ccr* types과 mec complex classes의 조합에 의해 4가지 types의 SCC*mec*이 밝혀져 있다. Hospital-acquired MRSA에서는 type I, II, 및 III 가 보고된 반면, community-acquired MRSA에는 type IV만이 존재하는 것으로 밝혀져 있다. 현재까지 hospital-acquired MRSA와 community-acquired MRSA간의 연관성에 대해 자세히 밝혀진 바는 없으나 community-acquired MRSA의 기원에 관해 두 가지 학설이 제기되고 있다. 하나는 hospital-acquired MRSA가 community로 이전되어 community-acquired MRSA가 되었다

는 설이고 또 다른 하나는 *mec* gene등을 보유하는 coagulase negative Staphylococcus (CNS)로부터 유전자가 이전된 결과라고 보는 설이다.

본 연구에서는 국내 유방염 분리 *S. aureus* 16주, 시판 닭고기 분리 3주, 동물 병원 분리 3주, 인체 병원 분리주 7주에 대해 항생제 내성 패턴 및 SCC*mec* typing, *ccrgene* sequencing, 그리고 이들간의 연관성을 알아보기 위한 PFGE analysis를 시도하였다.

다. 축산물 및 병원분리균 MRSA의 항생제 내성 조사

NCCLS 방법의 disk diffusion test를 이용, MRSA 균주들에 대해 항생제 내성을 조사하였다(Table 5). 항생제 내성 패턴을 보면 인체 병원 및 동물 병원 분리 *S. aureus*의 경우는 test 한 14종의 항생제에 대해 11종 이상의 내성을 보인 반면 유방염 분리 균주들은 penicillin, gentamicin, ampicillin, nafcillin 등에만 내성을 보였으며 methicillin에 대해서는 중간 내성 혹은 내성을 보여 전형적인 community-acquired MRSA의 phenotype을 나타내었다. 또한 시판 닭고기 분리 3주의 경우는 penicillin, erythromycin, clindamycin, tetracycline에만 내성을 보였고 역시 methicillin에 대해서는 중간 내성만을 보여 community-acquired MRSA의 phenotype을 나타내었다. 유방염 분리주 31, 72번 균주는 methicillin이나 oxacillin 내성을 나타내진 않았으나 *mecA* gene은 보유하고 있는 것으로 나타났다.

라. SCC*mec* typing

이들 균주에 대해 SCC*mec* typing을 시도한 결과는 다음과 같다(Table 6). Table 6에서와 같이 몇몇 균주를 제외한 유방염 분리균주들은 유전형 역시 community-acquired MRSA로 나타났다. 동물 병원 및 인체 병원 유래 균주들(ccarm-3001 제외)은 모두 hospital-acquired MRSA의 유전적 특성을 나타내었다. 특이한 점은 인체 병원 유래 균주인 ccarm-3001은 phenotype은 hospital-acquired MRSA이면서도 유전형은 community-acquired MRSA라는 점이다. 이 균주가 실제 hospital-acquired인지 혹은 community-acquired인지 기록이 존재하지 않아 파악할 수는 없으나 hospital-acquired와 community-acquired 균주간의 SCC*mec* gene complex transfer에 관한 단서를 제공해 줄 수 있을 것으로 보인다. 실제로 이 균주는 PFGE typing에서도 병원 유래 균주들과 유방염 유래 균주들 모두와 유사한 연관성을 보이고 있었다 (Fig. 4, Fig. 5).

Table 5. 축산물 및 병원 분리 MRSA의 항생제 내성 조사

Origin	Isolates	P	IPM	CC	NF	TE	GM	AM	CIP	OX	CF	VA	SXT	E	C	MIC (Met) ($\mu\text{g/ml}$)
M	99-132	R	S	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	16
	99-133	R	S	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	32
	99-136	R	S	S	R	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	8
	99-164	R	S	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	16
	00-425	R	S	S	R	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	16
	00-428	R	S	S	R	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	16
	31	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.5
	61	R	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	16
	62	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	16
	64	R	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	16
	65	R	S	S	R	S	R	R	I	R	S	S	S	S	S	8
	66	R	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	8
	68	R	S	S	R	S	R	R	I	R	S	S	S	S	S	16
	69	R	S	S	R	S	R	R	I	R	S	S	S	S	S	8
70	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	8	
72	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	2	
C	94-1	R	S	R	S	R	S	S	S	I	S	S	S	R	S	4
	94-2	R	S	R	S	R	S	S	S	I	S	S	S	R	S	4
	94-3	R	S	R	S	R	S	S	S	I	S	S	S	R	S	4
A	snuvet-1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	1024
	snuvet-2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	1024
	snuvet-3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	1024
H	ccarm-3001	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	1024
	ccarm-3002	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	512
	ccarm-3051	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	1024
	ccarm-3514	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	512
	ccarm-3521	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	256
	ccarm-501	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	1024
	ccarm-3089	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	1024

M, milk; C, chicken; A, animal hospital; H, human hospital

S, susceptible; R, resistant; I, intermediate resistant

P, penicillin; IPM, imipenem; CC, clindamycin; NF, nafcillin; TE, tetracycline; GM, gentamicin; AM, ampicillin; CIP, ciprofloxacin; OX, oxacillin; CF, cephalothin; VA, vancomycin; SXT,

trimethoprim-sulfamethoxazole; E, erythromycin; C, chloramphenicol

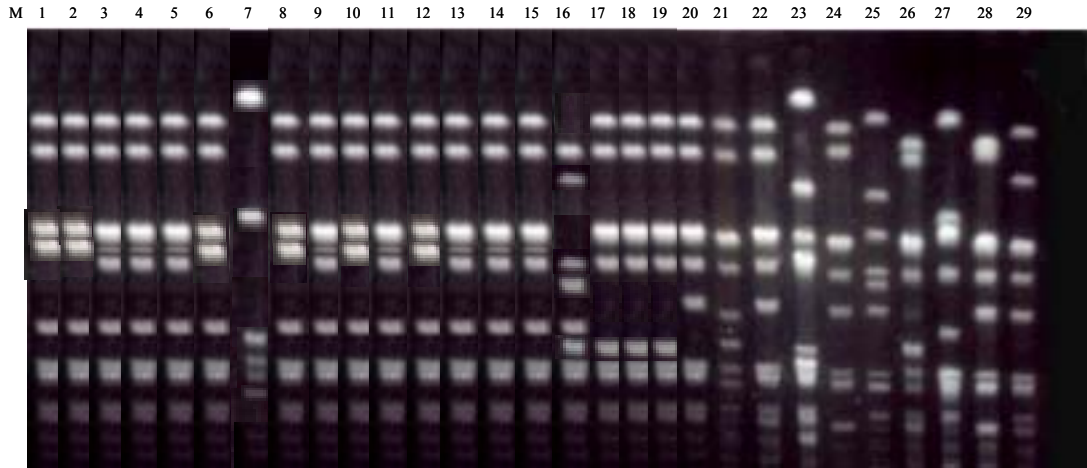
Table 6. SCCmec type analysis

origin	Isolates	<i>mecA</i>	SCCmec					ccr type	SCCmec type
			MS	PB	IS1272	<i>mecI</i>	<i>mec</i> class		
M	99-132	+	+	-	+	-	B	2	IV
	99-133	+	+	-	+	-	B	2	IV
	99-136	+	+	-	+	-	B	2	IV
	99-164	+	+	-	+	-	B	2	IV
	00-425	+	+	-	+	-	B	2	IV
	00-428	+	+	-	+	-	B	2	IV
	31	+	-	-	-	-	?	-	?
	61	+	+	-	+	-	B	2	IV
	62	+	+	-	+	-	B	2	IV
	64	+	+	-	+	-	B	2	IV
	65	+	+	-	+	-	B	2	IV
	66	+	+	-	+	-	B	2	IV
	68	+	+	-	-	-	?	2	?
	69	+	+	-	+	-	B	2	IV
70	+	+	-	+	-	B	2	IV	
72	+	-	-	-	-	?	2	?	
C	94-1	+	+	+	-	+	A	2*	IIa
	94-2	+	+	+	-	+	A	2*	IIa
	94-3	+	+	+	-	+	A	2*	IIa
A	snuvet-1	+	+	+	-	+	A	2	II
	snuvet-2	+	+	+	-	+	A	2	II
	snuvet-3	+	+	+	-	+	A	2	II
H	ccarm-3001	+	+	-	+	-	B	2	IV
	ccarm-3002	+	+	+	-	+	A	2	II
	ccarm-3051	+	+	+	-	+	A	2,3	III
	ccarm-3514	+	+	+	-	+	A	2	II
	ccarm-3521	+	+	+	-	+	A	2,3	III
	ccarm-501	+	+	+	-	+	A	2	II
	ccarm-3089	+	+	+	-	+	A	2	II

M, milk; C, chicken; A, animal hospital; H, human hospital

+, gene 보유; -, gene 보유하지 않음; *: sequencing 결과 type 3로 나타남

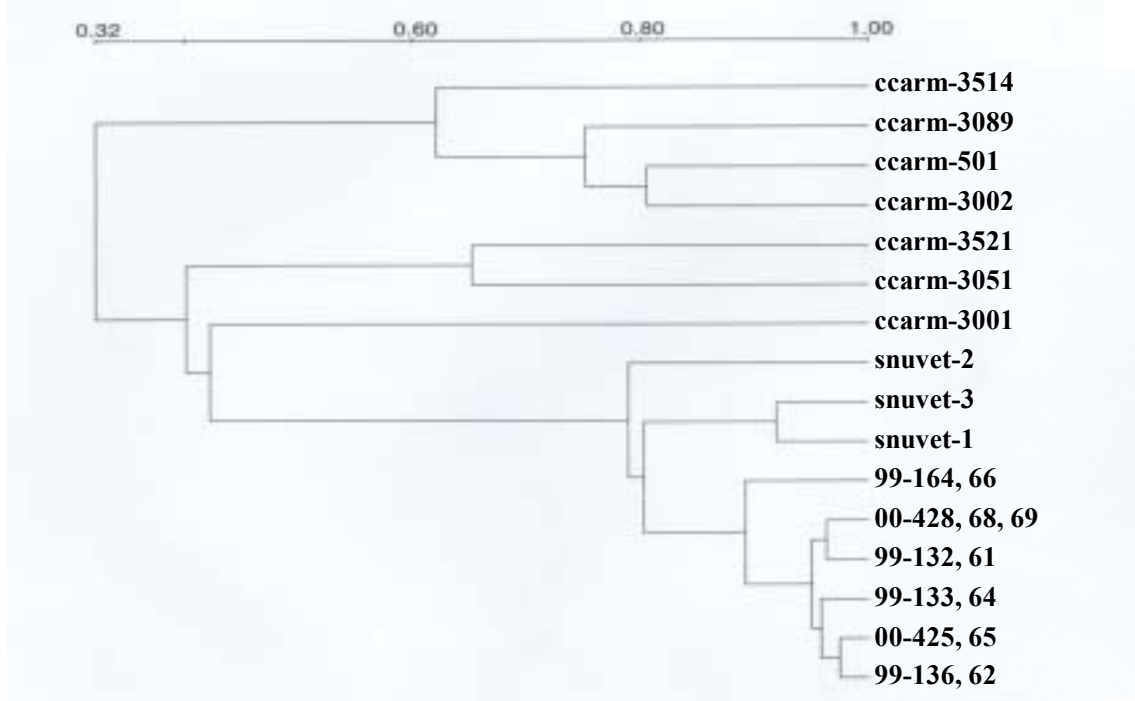
Fig. 4. PFGE analysis



M, marker; lane 1, 99-132; lane 2, 99-133; lane 3, 99-136; lane 4, 00-425; lane 5, 99-428; lane 6, 99-164; lane 7, 31; lane 8, 61; lane 9, 62; lane 10, 64; lane 11, 65; lane 12, 66; lane 13, 68; lane 14, 69; lane 15, 70; lane 16, 72; lane 17, 94-1; lane 18, 94-2; lane 19, 94-3; lane 20, snuvet-1; lane 21, snuvet-2; lane 22, snuvet-3; lane 23, ccarm-3001, lane 24, ccarm-3002; lane 25, ccarm-3051; lane 26, ccarm-3514; lane 27, ccarm-3521; lane 28, ccarm-501; lane 29, ccarm-3089

Ccarm-3001 균주의 phenotype이 항생제 다중 내성이고, 또한 분리된 병원이 3차 진료 병원인 점을 감안할 때, hospital 및 community-acquired MRSA의 기원에 관해 2가지 가설이 가능하다. 첫째는 ccarm-3001 균주가 SCCmec type IV 유전형을 지닌 hospital-acquired MRSA라는 것이다. 이 같은 가설로부터 community-acquired MRSA가 hospital-acquired MRSA로부터 유래되었다는 추정이 가능해진다. 이후 antibiotic pressure가 높지 않은 community에 존재하면서 다재내성의 phenotype을 잃었을 수 있다. 둘째는 ccarm-3001 균주가 SCCmec type IV 유전형을 지닌 community-acquired MRSA이다가 3차 병원까지 전전하게 되면서 항생제 다재 내성의 phenotype을 보유하게 되었다는 가설이다. 이 같은 가설은 community-acquired MRSA라도 병원의 관리 불충분으로 인해 충분히 다재 내성을 띠는 hospital-acquired MRSA가 될 수 있다는 근거를 제공해 준다. 그 어떤 경우이더라도 MRSA의 출현에 있어 병원의 관리가 무엇보다 중요한 초점이 된다는 사실을 반영한다 하겠다.

Fig. 5 Pylogeny of MRSA



마. *MecI* 와 *ccr* genes sequencing 분석

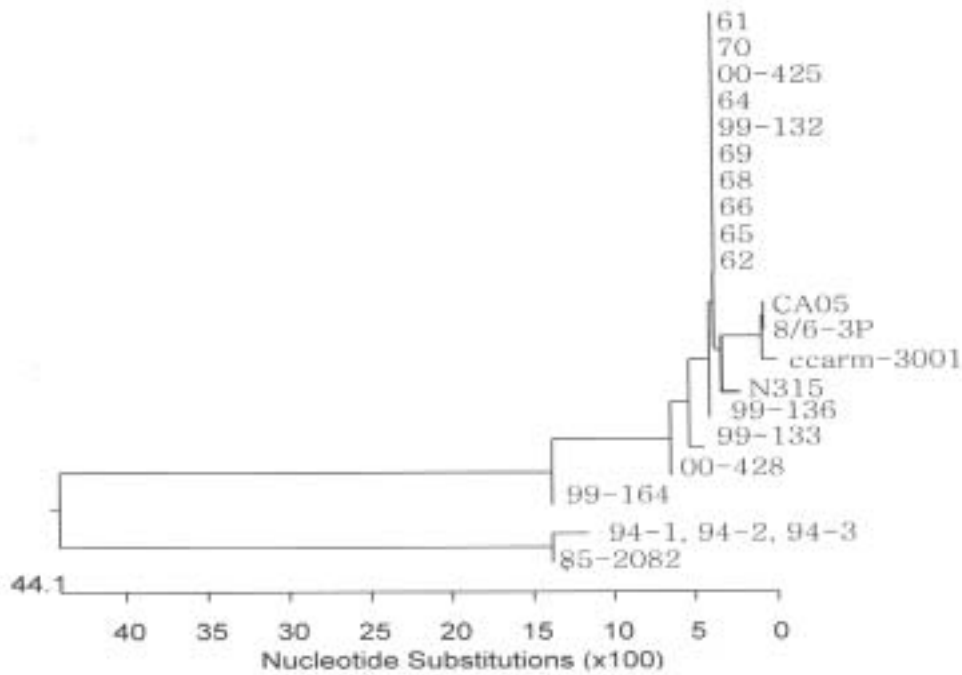
MecA gene의 transcription을 억제하는 *mecI* gene sequencing 결과, 인체병원 유래 균주인 ccarm-3051, ccarm-3521에서만 non-sense mutation이 도입되어 있었다. SCCmec type 중 가장 그 유전자 구성이 복잡하고 다양한 항생제 내성 gene을 보유하고 있는 SCCmec type III인 이 두 균주에서 non-sense mutation이 검출되었다는 점은, antibiotic pressure를 높게 받은 균주일수록 돌연변이로 변이가 더 쉽게 나타난다는 사실과 함께 병원에서의 항생제 관리의 중요성을 뒷받침하고 있다.

SCCmec을 정확한 위치에 전달하는 역할을 하는 *ccr* gene에 대한 sequencing을 시도하고 그에 근거한 pylogenic tree를 분석한 결과, SCCmec type IV에 속하는 균주들에서만 외국의 균주들과 차이를 나타내었다(Fig. 6). 특히하게도 국내 분리 유방염 균주들은 community-acquired MRSA이면서도, 전형적인 SCCmec type IV 균주들보다 SCCmec type II 균주의 그것과 더 유사함을 보이고 있었다. 반면 ccarm-3001은 전형적인 SCCmec type IV의 *ccr* gene과 유사성을 나타내었다.

또 한가지 특이한 점은 시판 닭고기에서 분리된 94-1, 94-2, 94-3 균주들이다. 본 실험실에 선 최근 3년간 도계장 및 시판 닭고기에서 MRSA분리를 시도해 왔으나 단 한 주도 분리된 적이 없었다. 이 세 균주들은 2003년 가을에서야 분리되었으며 같은 매장의 다른 닭고기와

는 달리 단 한 sample에서 분리된 균주들이다. 이들 세 균주의 genotype 및 phenotype은 모두 동일하여 동일 colony 유래 균주로 생각된다. 이들은 앞서 기술한 바와 같이 phenotype은 community-acquired MRSA였으나 genotype은 hospital-acquired MRSA에서 만 보이는 type II를 나타내고 있었다. 또한 *ccr* gene은 type 2 primer에 의해 증폭되었고 예상 product size역시 type 2와 동일하였음에도 sequencing 결과는 type 3와 100% homology를 나타내었다(Fig. 6). 이에 이들 균주의 SCCmec type은 IIa로 기술하였다 (Table 6). 시판 닭고기 및 도축장에서 지난 3년간 MRSA가 분리된 적이 없다가 이 같은 세 균주가 불연속적으로 분리된 것으로 볼 때 이들 균주는 유통과정에서 오염된 것으로 판단된다. 따라서 hospital-acquired MRSA가 어떤 경로에선지 시판 닭고기에 오염되었고 antibiotic pressure가 낮은 상태에서 다제내성을 잃은 것으로 생각된다.

Fig. 6. Phylogenic analysis of *ccr* gene sequences



CA05, SCCmec type IVa 균주 (외국분리주); 8/6-3P, SCCmec type IVb 균주(외국분리주); N315, SCCmec type II 균주 (외국분리주); 85-2082, SCCmec type III 균주 (외국분리주)

바. 추가적인 유전자들의 분석 결과

모든 MRSA에 존재하는 IS 431 copy를 추가적으로 분석한 결과, typing이 불가능했던 유통 분리 균주 31, 70 이외엔 모두 예상대로의 copy number를 지니고 있었다(1절의 사,

Fig. 3 참조). SCCmec type II에 속하는 균주들은 모두 pUB110, Tn554를 지니고 있었으며 SCCmec type III에 속하는 ccarm-3521 균주도 pT181, mer gene, Tn554를 지니고 있었다. 다만 ccarm-3051의 경우, pT181, mer gene은 존재하지 않는 것으로 생각되며 이와 관련한 유전자 분석은 추후 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

사. SCCmec 유전자 분석의 결론

SCCmec typing 및 유전자 분석 결과를 종합해 볼 때, 국내 유방염 분리균주들은 전형적인 community-acquired MRSA의 특성을 나타내고, 동물병원 및 사람병원 유래 균주들은 대부분 hospital-acquired MRSA라고 요약할 수 있다. 이들의 PFGE 패턴을 비교해 보면 ccarm-3001 균주를 제외한 균주들은 인체유래 균주들은 인체유래 균주들끼리, 그리고 동물 유래 균주들은 동물유래 균주들간에 homology를 보이고 있어 사람 및 동물간의 교차 오염 및 유전자 pool 혼합의 가능성은 낮은 것으로 생각된다. 다만 ccarm-3001 및 시판 닭 분리 MRSA의 존재는 병원 관리실태의 중요성을 입증하고 있으며 community-acquired MRSA 및 hospital-acquired MRSA간의 전파 경로에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

제4절 *Enterococcus* spp.의 내성기전과 연관 연구

1. 도계장에서 분리된 vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) 분석

Avoparcin은 glycopeptide항생제의 일종으로 avoparcin에 내성 세균은 vancomycin에도 내성을 나타낸다. 1999년 이후에 avoparcin의 동물에 대한 사용이 금지된 이후 2000년~2001년 사이에 도계장에서 닭의 내장에서 VRE 균주를 분리하고, PFGE로 균주들의 내성 유전자간의 연관성을 분석하였다. 또한 이들로부터 *vanA*-*VanB* 불일치 균주를 선발하여 이들의 분자 유전학적인 상호 연관관계를 분석하였다.

가. VRE 분리

594주의 *Enterococci*를 서울 근교 도계장 4곳에서 닭의 분변으로부터 분리하였다. 이중 71주의 vancomycin-resistant *Enterococci*를 대상으로 시험하였다. 이들은 *E. faecium*(n=54), *E. gallinarum*(n=16), *E. caesselifalvus*(n=1)였고, vancomycin-resistant *E. faecalis*는 발견되지 않았다.

나. 항생제 내성 시험

Vancomycin-resistant *E. faecium* 중 38주는 VanA였고, vancomycin과 teichoplanin에 모두 내성을 나타내었다. 16주는 VanB였고, vancomycin에는 내성을 나타내었으나

teichoplanin에는 내성이 없었다(Table 1). 16주의 vancomycin-resistant균주는 *E. gallinarum*는 VanC1 였고, 1주의 vancomycin-resistant *E. casselifalvus*는 VanC2, 71주중 60 (85.7%) erythromycin에 내성을 나타내었다.

Table 1. MIC of VRE isolated from chickens

	Species	Genotype	Phenotype	MIC (g/ml)		
				Vancomycin	Teichoplanin	Erythromycin
1-01	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
1-02	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
1-03	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
1-05	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
1-06	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
1-07	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
1-08	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
1-09	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
1-11	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
1-12	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥ 64
1-13	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
2-02	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
2-03	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
2-04	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	0.5
2-05	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	0.5
2-06	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥128
3-03	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥64
3-04	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	64	64
3-05	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥64
3-08	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥64
3-12	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥128	≥64
3-15	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	64	64	≤0.5
3-19	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	64	32	≤0.5
3-24	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	64	≤0.5
3-32	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	64	≥64	≤0.5
3-33	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥128	≥64
3-38	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥64
3-42	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	≥64	≥64

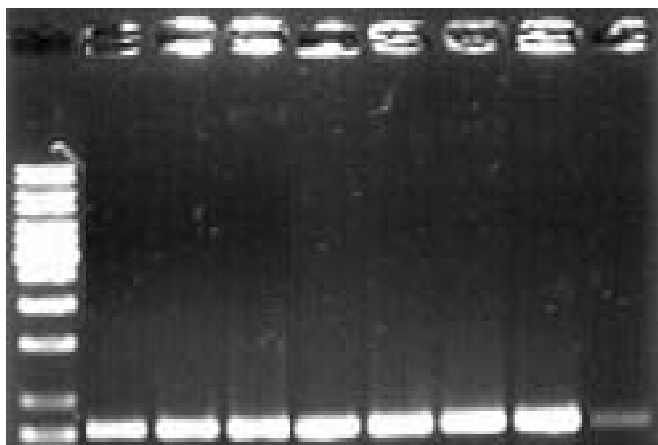
3-10	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	16	≥64
3-11	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	16	≥64
3-13	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	16	≤0.5
3-27	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	16	≥64
3-29	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	16	≥64
3-31	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	16	≥64
3-33	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	16	≥64
3-34	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	16	≥64
3-35	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	16	≥64
3-36	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanA	≥64	16	≥64
3-01	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	8	2
3-06	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	8	≥64
3-09	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	8	≥64
3-16	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	8	≥64
3-20	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	8	≥64
3-21	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	8	≥64
3-18	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	4	≥64
3-28	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	4	≥64
3-51	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	4	≥64
3-07	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	2	≥64
3-17	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	2	≥64
3-14	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	1	≥64
3-02	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	1	≥64
3-22	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	1	≥64
3-25	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	≥64	≤0.5	≥64
3-26	<i>E. faecium</i>	<i>vanA</i>	VanB	8	1	≤0.5
3-23	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	1	≥64
3-37	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	4	≤0.5	≥64
3-39	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	≤0.5	≥64
3-40	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	≤0.5	≥64
3-41	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	≤0.5	≥64
3-44	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	≤0.5	≤0.5
3-45	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	≤0.5	≥64
3-46	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	1	≥64
3-47	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	≤0.5	≥64
3-48	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	≤0.5	≥64

3-49	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	≤0.5	≥64
3-50	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	≤0.5	≥64
3-52	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	≤0.5	≥64
3-53	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	≤0.5	≥64
3-54	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	8	≤0.5	1
3-55	<i>E. gallinarum</i>	<i>vanC1</i>	VanC1	4	≤0.5	≥64
3-43	<i>E. casseliflavus</i>	<i>vanC2</i>	VanC2	2	≤0.5	≥64

다. Vancomycin-resistance genes의 검출

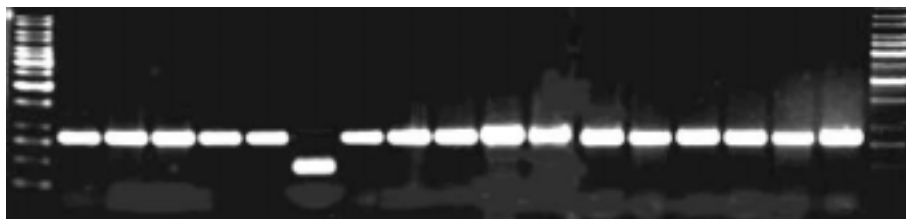
Vancomycin-resistance genes의 검출을 위해 Multiplex PCR을 실시한 결과. VanB phenotype을 보인 *E. faecium*에서 *vanB* genes이 아닌 *vanA* genes이 검출되었다(Fig. 1). VanA를 보인 VRE *faecium*, VanC1를 보인 VRE *gallinarum*, VanC2를 보인 VRE *casseliflavus*들은 각각 *vanA*, *vanC1*, and *vanC2*를 나타내었다(Fig. 2 and Table 1). 모든 VanB/*vanA* incongruent 균주는 3차 샘플링 동안에 얻어졌다.

Fig. 1. Multiplex PCR with primers specific to *vanA* and *vanB*.



M, 1 kb DNA ladder; lane 1-4, VanA-*vanA*; lane 5-7, VanB-*vanB*; lane8, control.

Fig. 2. Multiplex PCR with primers specific to *vanC1* and *vanC2*.

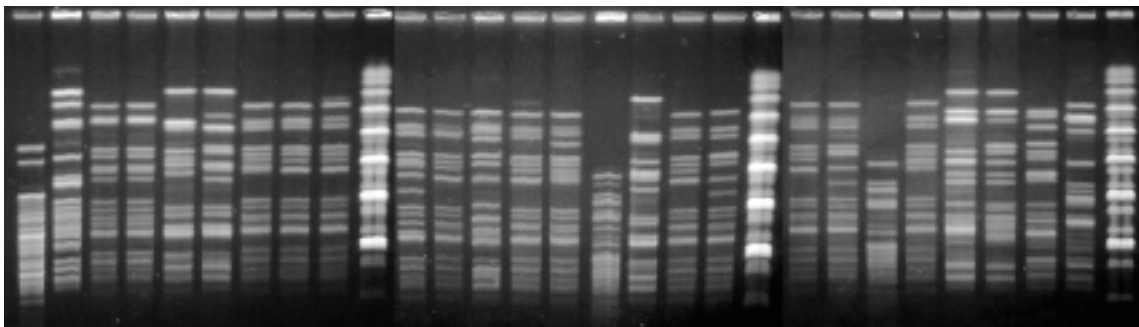


M, 1 kb DNA ladder; lane 1-16, VanC1-*vanC1* ;lane 17, VanC2-*vanC2*.

라. PFGE

26주의 *E. faecium*에 대해 *Sma* I-digested genomic DNA를 분석한 결과 4 개의 PFGE 패턴으로 분리할 수 있었다. 그러나 사람으로부터 분리된 VanB/*vanA* incongruence는 동물로부터 분리된 VanB/*vanA* incongruence 주와 매우 유사한 패턴을 나타내고 있었다.

Fig. 3. PFGE of VRE *faecium* with VanB/*vanA* incongruence. *Sma*I-digested DNA fragments of 26 isolates were electrophoresed.



2. 축산물에서 분리된 *E. faecalis* & *E. faecium*의 분석 (VRE;*vanA*, *vanB*, *vanC*-1, *vanC*-2 genes)

2003년 3월부터 11월에 걸쳐 100 닭고기, 50 소고기, 50 돼지고기, 508 닭 분변, 37 소 분변, 1981 원유를 검사하여 VRE를 분리하였다. 식육은 서울, 경기지역의 소매점에서 구입하였으며, 닭 분변은 경기지역의 도계장에서, 소 분변은 강원지역의 목장에서 채취하였다. 원유는 전국적으로 목장에서 수집하였다. API 20 strep으로 균종을 확인하였으며 *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/3* primer를 사용해 PCR로 내성 유전자형을 결정하였다. 동정된 VRE 균주는 vancomycin, teicoplanin, ampicillin, cloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, penicillin, tetracycline에 대해 한천배지희석법(agar dilution method)을 사용하여 감수성을 평가하였다. MIC의 해석은 NCCLS의 정의에 기준하였다. 이 중 vancomycin MIC ≥ 4 g/ml 의 균주를 선택하여 실험에 사용하였다. 분리균 중 *vanA*형의 균주는 PFGE와 transferbility test를 실시하였다.

가. 축산물에서 분리된 VRE

Vancomycin MIC ≥ 4 g/ml 이상의 VRE는 총 246 주가 분리되었다(Table 2). 분리된 246 주 중 51주가 *vanA* 형 *E. faecium*(20.7%), 1주가 *vanA* 형 *E. durans*, 154주가 *vanC1* *E.*

gallinarum(62.6%), 39주가 *vanC2/3* 형 *E. casseliflavus*(15.8%)이었다.

Table 2. 분리된 VRE

Sample type (sample No.)	<i>E. faecium</i> <i>vanA</i>	<i>E. durans</i> <i>vanA</i>	<i>E. gallinarum</i> <i>vanC1</i>	<i>E. casseliflavus</i> <i>vanC2/3</i>	VRE-pos. ^a (%)
Poultry meat (100)	44	0	42	15	68 (68)
Poultry feces (508)	7	0	77	7	89 (17.5)
Beef meat (50)	0	1	11	10	19 (38)
Pork meat (50)	0	0	17	6	20 (40)
Bovine feces (37)	0	0	0	1	1 (2.7)
Raw milk (1981)	0	0	7	0	7 (0.3)
Total	51	1	154	39	197 (26.4) ^b

^a Number of sample with vancomycin-resistant enterococci (VRE) by means of a vancomycin MIC ≥ 4 g/ml; ^b except raw milk

나. 항생제 내성

1) VanA 형 분리주의 항생제 내성 패턴, PFGE typing, transferability

VanA 형 VRE는 닭고기에서 44주, 닭분변에서 7주, 소고기에서 1주가 분리되었다. 돼지고기, 소분변, 원유에서는 분리되지 않았다. Vancomycin, teicoplanin에만 저항성을 보인 소고기 분리주를 제외하고는 모두 4가지 이상의 항생제에 내성을 보였다. 분리주 52주 모두 vancomycin에 내성을 보였으며 50주(96.1%)가 tetracycline에, 49주(94.2%)가 teicoplanin에, 48주(92.3%)가 penicillin에 내성을 나타내었다. 또한 erythromycin, ciprofloxacin, ampicillin, chloramphenicol의 항생제에서도 각각 43주(82.6%), 40주(76.9%), 11주(21.1%), 7주(13.4%)가 내성을 나타내었다. Gentamicin에는 2주(3.8%)의 분리주만이 내성을 나타내었다(Table 3).

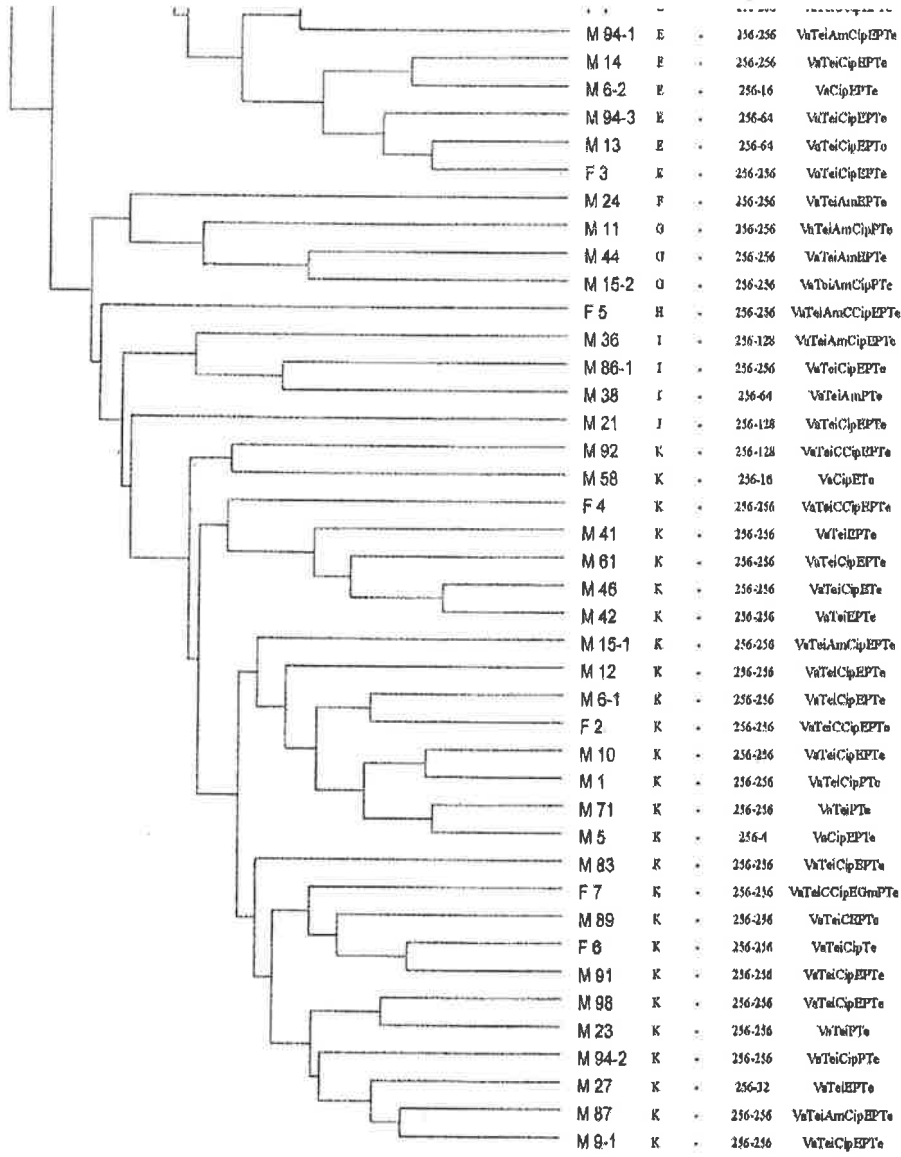
Table 3. 축산물에서 분리된 *vanA* VRE의 항생제 내성 조사

Antibiotic	Poultry meat (n=44)	Poultry feces (n=7)	Beef meat (n=1)	Pork meat (n=0)	Bovine feces (n=0)	Raw milk (n=0)	Total (n=52)
Vancomycin	44 (100%)	7 (100%)	1 (100%)				52 (100%)
Teicoplanin	41 (93.1%)	7 (100%)	1 (100%)				49 (94.2%)
Ampicillin	10 (22.7%)	1 (14%)	0				11 (21.1%)
Chloramphenicol	2 (4.5%)	5 (71%)	0				7 (13.4%)
Ciprofloxacin	33 (75%)	7 (100%)	0				40 (76.9%)
Erythromycin	37 (84.1%)	6 (85%)	0				43 (82.6%)
Gentamicin	1 (2.3%)	1 (14%)	0				2 (3.8%)
Penicillin	42 (95.5%)	6 (85%)	0				48 (92.3%)
Tetracycline	43 (97.7%)	7 (100%)	0				50 (96.1%)

PFGE 분석이 되지 않은 소에서 분리된 *vanA*형 *E. durans*를 제외한 나머지 51주의 패턴분석 결과 A에서 K까지 11가지의 다양한 패턴이 나왔다. 패턴은 Quantity one ver. 4.1.1.을 이용하여 60%의 동일성을 기준으로 나누어졌다. 패턴 E(12주)와 K(26주)가 가장 많이 발견되어 이 두 형이 한국의 대표적인 *vanA*형 VRE라 할 수 있겠다.

52주의 *vanA*형 VRE의 transferability 실험 결과 2주(M 96, M 65)만이 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ cells per donor cell의 빈도로 vancomycin내성 유전자가 전달되었다.

Fig. 5. *vanA*형 VRE의 PFGE 패턴 Dendrogram (Dice, UPGMA), transferability,



^a M : 닭고기 분리주, F : 닭분변 분리주

^b Va, vancomycin; Tei, teicoplanin; Am, ampicillin; C, chloramphenicol; Cip, ciprofloxacin; E erythromycin; Gm, gentamicin; P, penicillin; Te, tetracycline

2) *VanC1* 형 분리주의 항생제 내성 패턴

VanC1 형 *E. gallinarum*는 닭고기에서 42주, 닭분변에서 77주, 소고기에서 11주, 돼지고기에서 17주, 원유에서 7주가 분리되었다. 소분변에서는 분리되지 않았다. 90%의 분리주가 한가지 이상의 항생제에 내성을 보였으며 53%의 분리주가 3가지 이상의 항생제에 내성을 나타내었다. Vancomycin, teicoplanin, ampicillin에 내성을 보인 분리주는 없었다. 136주(88.3%)가 tetracycline에, 95주(61.6%)가 erythromycin에, 82주(53.2%)가 ciprofloxacin에, 54주(35%)가 gentamicin에 내성을 나타내었다. 또한 chloramphenicol, penicillin 의 항생제에서도 각각 30주(19.4%), 18주(11.6%)가 내성을 나타내었다(Table 4).

Table 4. 축산물에서 분리된 *vanC1 E. gallinarum*의 항생제 내성 조사

Antibiotic	Poultry meat (n=42)	Poultry feces (n=77)	Beef meat (n=11)	Pork meat (n=17)	Bovine feces (n=0)	Raw milk (n=7)	Total (n=154)
Vancomycin	0	0	0	0		0	0
Teicoplanin	0	0	0	0		0	0
Ampicillin	0	0	0	0		0	0
Chloramphenicol	5 (11.9%)	20 (25.9%)	4 (36%)	1 (5.8%)		0	30 (19.4%)
Ciprofloxacin	15(35.7%)	64(83.1%)	1 (9%)	2 (11.7%)		0	82 (53.2%)
Erythromycin	31 (73.8%)	54 (70.1%)	3 (27.2%)	6 (35.2%)		1 (14%)	95 (61.6%)
Gentamicin	2 (4.7%)	48 (62.3%)	1 (9%)	3 (17.6%)		0	54 (35%)
Penicillin	4 (9.5%)	12 (15.5%)	0	2 (11.7%)		0	18 (11.6%)
Tetracycline	39 (92.8%)	76(98.7%)	5 (45%)	13 (76.4%)		3 (42%)	136 (88.3%)

3) *VanC2/3* 형 분리주의 항생제 내성 패턴

VanC2/3 형 *E. casseliflavus*는 닭고기에서 15주, 닭 분변에서 7주, 소고기에서 10주, 돼지고기에서 6주, 소 분변에서 1주가 분리되었다. 원유에서는 분리되지 않았다. 77%의 분리주가 한가지 이상의 항생제에 내성을 보였으며 33%의 분리주가 3가지 이상의 항생제에 내성을 나타내었다. Vancomycin, teicoplanin, ampicillin에 내성을 보인 분리주는 없었다. 22주

(56.4%)가 tetracycline에, 19주(48.7%)가 ciprofloxacin에, 13주(33.3%)가 erythromycin에 내성을 나타내었다. Gentamicin, penicillin, chloramphenicol의 항생제에 대해서는 각각 2주(5.1%), 2주(5.1%), 1주(2.5%)만이 내성을 나타내었다(Table 5).

Table 5. 축산물에서 분리된 *vanC1 E. casseliflavus*의 항생제 내성 조사

Antibiotic	Poultry meat (n=15)	Poultry feces (n=7)	Beef meat (n=10)	Pork meat (n=6)	Bovine feces (n=1)	Raw milk (n=0)	Total (n=39)
Vancomycin	0	0	0	0	0		0
Teicoplanin	0	0	0	0	0		0
Ampicillin	0	0	0	0	0		0
Chloramphenicol	0	1 (14.2%)	0	0	0		1 (2.5%)
Ciprofloxacin	6 (40%)	7 (100%)	3 (30%)	2 (33.3%)	1 (100%)		19 (48.7%)
Erythromycin	3 (20%)	6 (85.7%)	4 (40%)	0	0		13 (33.3%)
Gentamicin	1 (6.6%)	1 (14.2%)	0	0	0		2 (5.1%)
Penicillin	1 (6.6%)	0	1 (10%)	0	0		2 (5.1%)
Tetracycline	9 (60%)	7 (100%)	4 (40%)	2 (33.3%)	0		22 (56.4%)

3. 임상검체 및 축산물에서 분리된 VRE의 항생제 내성 및 분자유전학적 연관성

가. 임상 감염 환자로부터 VRE 분리

2000-2001년 사이의 입원환자 50명의 검체에서 API-Strep kit 검사와 감수성 검사 상 VRE가 분리되었으며 VRE가 분리된 검체는 소변(urine) 34예, 창상(wound site) 11예, 담(Bile) 2예, 정맥 카테터(IV catheter) 2예, 혈액(Blood) 1예로, VRE 감염증의 대부분은 요로 감염(UTI)과 창상감염(wound infection)이었다. 동정된 균주의 종류는 *E. faecium*이 39주, *E. faecalis* 9주, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*가 각각 1주였고, 감수성 검사 상 VanA 표현형이 76%, Van B 표현형이 20%를 차지하였다.

Table 6. 임상검체의 종류에 따른 VRE의 분리주수 (2000-2001년)

검체 종류	균주수(%)
Urine	34 (68%)
Wound	11 (22%)
IV catheter	2 (4%)
Bile	2 (4%)
Blood	1 (2%)
Total	50주 (100%)

Table 7. 임상검체 분리 enterococci 균종 및 vancomycin 내성형에 따른 VRE 분리주의 분포

균종	vancomycin 내성형		
	Van A	Van B	Van C
<i>E. faecium</i>	31	8	0
<i>E. faecalis</i>	7	2	0
<i>E. gallinarum</i>	0	0	1
<i>E. casseliflavus</i>	0	0	1

Table 7의 결과는 API-Strep kit 검사와 E-test 항생제감수성 검사결과에 의한 것으로 전체 50주 중, 연구기간중 분리주를 얻을 수 있었던 20주에 대해서는 앞서 언급한 분리방법에 따라 PCR을 통해 균주 동정을 시행하였다. PCR을 통한 검사상 20주 모두 *vanA type E. faecium*이었으며 API-Strep kit 검사와 E-test 항생제 감수성 검사상 VanB형 또는 *E. faecalis*로 동정 보고되었던 균주도 모두 *vanA E. faecium*으로 최종 동정되었다(Table 8).

나. 임상검체로부터 VRE가 분리된 감염환자의 임상자료 분석-인구학적 자료(나이, 성), 위험요인, 항생제 사용력, 면역억제제 사용력, 치료 및 예후

2000년에서 2001년도 사이에 50명의 입원 환자에서 VRE가 분리되었는데, 평균 연령은 60세, 82%가 50세 이상 고령이었으며 남녀의 성비는 남성이 58%로 다소 높았다. 분리된 장소는 46%가 중환자실이었으며 나머지는 일반 병동이었다. 기저질환으로는 당뇨 22예(44%),

약성질환 10예(20%), 신경계 질환 24예(48%), 신부전 16예(32%) 등 이었다. 30%(15명)에서 항생제 치료를 시행했는데 치료약제는 teicoplanin(5), chloramphenicol(1), doxycycline(2), linezolid(4), synergid(3) 등 이었다. 사망률은 36%(18명)이었다.

다. 건강인에서의 VRE의 분리

건강 검진 센터에 내원한 건강인 200명의 대변 검체에서 앞서 언급한 분리검사에 따라 최종적으로 VRE 2주(1%) (*vanC2* genotype, *E. casseliflavus*)가 분리되었다(Table 8).

라. 축산물로부터 VRE의 분리

Vancomycin 6 µg/ml이 포함된 Enterococcosel agar plate에서 vanomycin 내성 유무 판정하였고 API-Strep kit, pyr test, PCR, motility test, yellow pigmentation test로 균종 동정하였다.

1) 양계장 닭, 소, 돼지의 대변 검체 150개의 배양에서 VRE 22주(15%)가 분리되었는데 균종별로는 *Enterococcus faecium* 1주, *E. gallinarum* 15주, *E. casseliflavus* 6주가 분리되었다. 생 닭고기 15마리의 분비물 배양 검사상 9마리(60%)에서 *Enterococcus faecium*(*vanA* type)이 분리되었다(Table 8).

Table 8. VRE의 균종과 내성 유전형

Vancomycin Resistance Genotype	Species	Number of strains from:			
		Animal		Human	
		Animal stool (N=150)	Chicken meat (N=15)	Healthy people (N=200)	Hospitalized patient* (N=20)
<i>vanA</i>	<i>E. faecium</i>	1	9	0	20
	<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0
<i>vanB</i>	<i>E. faecium</i>	0	0	0	0
	<i>E. faecalis</i>	0	0	0	0
<i>vanC1</i>	<i>E. gallinarum</i>	15	0	0	0
<i>vanC2</i>	<i>E. casseliflavus</i>	6	0	2	0
Total		22 (14.7%)	9 (60%)	2 (1%)	20

* 임상 분리주 50주 중에서 검체를 얻을 수 있었던 20주.

마. 축산물과 임상검체(건강인 분리주 포함)로부터 분리된 VRE의 항생제 감수성 검사를 통한 MIC 결과 및 비교

VRE는 임상에서 분리된 VRE 50주 중 검체를 얻을 수 있었던 20주, 건강인 200명에서 분리된 2주, 가축에서 분리된 31주 등 총 53주에 대해 vancomycin, teicoplanin, ampicillin, erythromycin, tetracycline, chloramphenicol에 대하여 NCCLS 기준 검사법에 의한 agar dilution method로 MIC를 검사하고, gentamicin과 streptomycin은 MIC가 $>128\mu\text{g/ml}$ 의 경우 고도내성에 대하여 검사하였다(Table 9).

1) 가축 대변 검체 분리 VRE 22주는 vancomycin에 저도의 내성($\text{MIC}_{50/90}$: $8\mu\text{g/ml}$), teicoplanin($\text{MIC}_{50/90}$: $0.25/1\mu\text{g/ml}$)에 감수성을 보이며 tetracycline($\text{MIC}_{50/90}$: $64/128\mu\text{g/ml}$), streptomycin($\text{MIC}_{50/90}$: $>128/>128\mu\text{g/ml}$)을 제외한 ampicillin, erythromycin과 chloramphenicol 등에도 감수성 또는 저도의 내성을 보였다

2) 생닭고기 분비물 분리 VRE 9주의 경우는 모두 *vanA*형으로 vancomycin($\text{MIC}_{50/90}$: $>128/>128\mu\text{g/ml}$), teicoplanin($\text{MIC}_{50/90}$: $>128/>128\mu\text{g/ml}$)을 포함한 대부분의 항생제에 내성을 보였다.

3) 건강인 분리 VRE 2주는 vancomycin에 저도의 내성($\text{MIC}_{50/90}$: $8\mu\text{g/ml}$), teicoplanin ($\text{MIC}_{50/90}$: $0.25/1\mu\text{g/ml}$)에 감수성을 보이며, 또한 ampicillin($\text{MIC}_{50/90}$: $4/8\mu\text{g/ml}$)과 tetracycline($\text{MIC}_{50/90}$: $0.25/0.5\mu\text{g/ml}$), erythromycin($\text{MIC}_{50/90}$: $1/1\mu\text{g/ml}$), chloramphenicol ($\text{MIC}_{50/90}$: $2/2\mu\text{g/ml}$), gentamicin($\text{MIC}_{50/90}$: $4/8\mu\text{g/ml}$), streptomycin($\text{MIC}_{50/90}$: $32\mu\text{g/ml}$) 등에도 감수성 또는 저도의 내성을 보였다

4) 모두 *vanA*형인 임상 분리 VRE 20주의 경우, 생 닭고기 분비물 분리주와 같이 vancomycin($\text{MIC}_{50/90}$: $>128/>128\mu\text{g/ml}$), teicoplanin ($\text{MIC}_{50/90}$: $16/128\mu\text{g/ml}$)을 포함한 대부분의 항생제에 내성을 보였다.

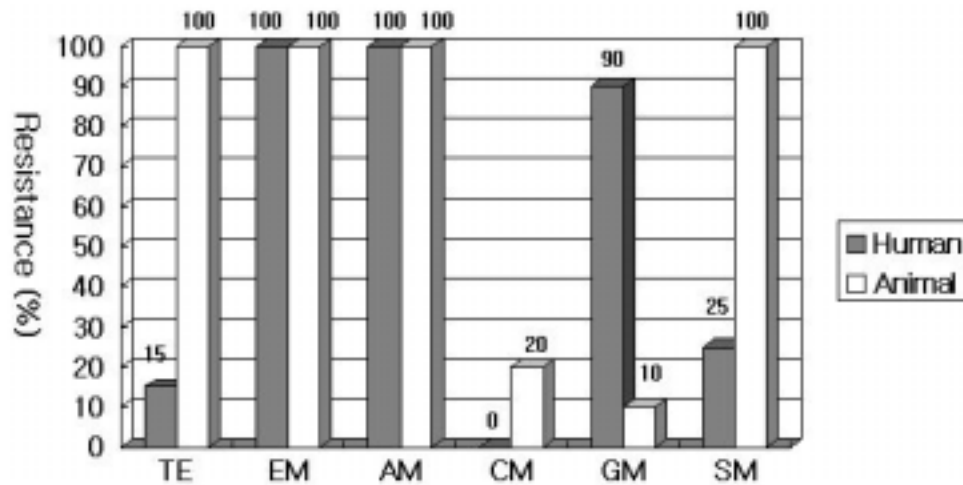
특이하게도 가축 분리 주는 tetracycline에 높은 내성을 보였으나 인체 분리주의 경우 건강인 분리 주와 임상 분리 주 모두 대부분 감수성을 보였다. 그리고 chloramphenicol의 경우는 가축에서 분리된 *van A* 2주 이외에 모두 감수성을 보였다

VanA E. faecium 분리주에 있어서, 사람에서 분리된 경우(임상 분리 20주)와 가축에서 분리된 10주 사이의 항생제 감수성 차이를 비교하였는데 erythromycin과 ampicillin은 사람과 가축에서 모두 100% 내성을 보였지만, chloramphenicol은 내성률이 매우 낮았고 사람에서는 모두 감수성을 보였다(사람/가축, 0/20% $p=0.038$). Tetracycline과 streptomycin은 가축에서 각각 100% 내성을 보였으나 사람에서는 상대적으로 내성이 적었고(tetracycline 15%, $p=<0.001$; streptomycin, 25% $p=<0.001$), gentamicin의 경우는 오히려 사람에서 내성률이 더 높았다 ($p=<0.001$, Figure 6).

Table 9. 가축 및 사람 분리 VRE의 항생제 감수성 검사 결과

	Animal				Human			
	Animal stool (N=22)		Intestinal secretion (N=9)		Healthy people (N=2)		Hospitalized patient* (N=20)	
	MIC 50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC 90 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC 50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC 90 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC 50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC 90 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC 50 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC 90 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Vancomycin	8	8	>128	>128	8	8	>128	>128
Teicoplanin	0.25	1	>128	>128	0.25	1	16	128
Tetracyclin	64	128	128	>128	0.25	0.5	0.5	16
Erythromycin	0.5	>128	>128	>128	1	1	>128	>128
Chloramphenicol	2	4	8	64	2	2	4	16
Ampicillin	16	16	>128	>128	4	8	>128	>128
Gentamicin	8	>128	32	>128	4	8	>128	>128
Streptomycin	>128	>128	>128	>128	32	32	64	>128

Figure 6. 사람과 가축에서 분리된 *vanA* VRE의 항생제 감수성 비교



TE, tetracycline; EM, erythromycin; AM, ampicillin; CM, chloramphenicol; GM, gentamicin; SM, streptomycin

바. 임상검체 및 축산물에서의 분리된 VRE의 분자유전학적 연관성 연구

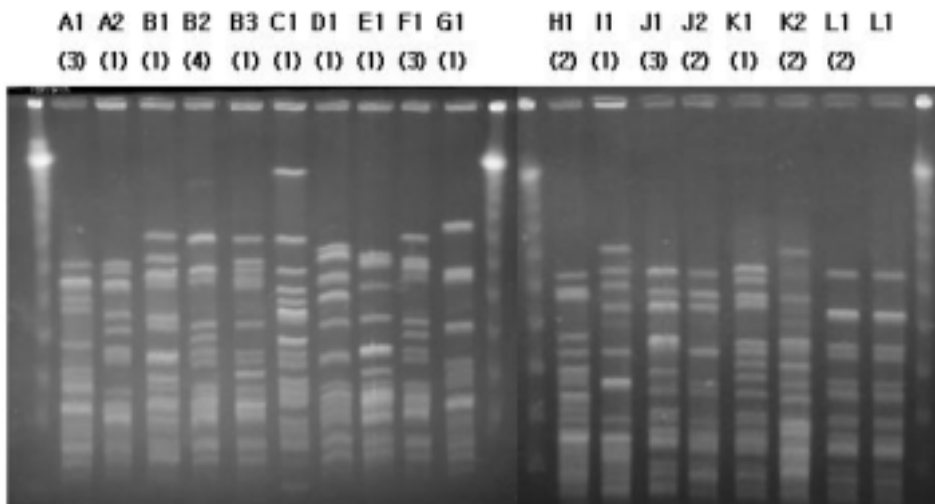
1) 축산물과 임상검체(건강인 분리주 포함)로부터 분리된 VRE의 PFGE를 이용한 분자유전적 연관성 조사

가) *VanA* 분리주의 PFGE 양상 분석

VanA 유전형 VRE(*E. faecium*) 30주(임상환자 20주, 가축대변 1주, 생닭고기 분비물 9주)를 대상으로 PFGE를 시행하였다. *VanA* 분리주의 PFGE 양상을 분석했을 때 12가지 분자형별(A-L)으로 분리되었다. 임상 분리주의 경우 20주의 PFGE 양상이 9가지 분자형별(A-I)로 다양하게 나타났으며 한 가지 분자형별이 두드러지게 많이 나타나지 않았다. 생 닭고기 분비물 분리 VRE 9주의 경우는 J형 5주, K형 또는 그 아형 3주, L형 1주로 나타났다. 가축 대변 검체 분리 VRE 1주는 임상 분리 주와 같은 분자형별 또는 아형을 보이지는 않았지만 생 닭고기의 L형과 같은 분자형을 보였다(Figure 7).

VanA VRE의 PFGE 양상을 분석한 결과 임상 분리주의 경우 매우 다양하게 나타났으며 한 가지 형이 두드러지게 많이 나타나지는 않았다. 따라서 내성 균 주의 수직 전파 보다는 plasmid에 의한 내성 유전자의 수평 전파의 가능성이 높다고 생각할 수 있다. 하지만 생 닭고기 분비물 분리주의 경우 9주가 3가지 PFGE 양상으로 일부에서 일치하는 소견을 보였고 한 균주는 가축 대변 검체 분리주와 PFGE 양상이 일치하였다. 따라서 가축의 경우는 내성 균 주의 수직 전파와 내성 유전자의 수평 전파 가능성을 모두 생각해 볼 수 있겠다.

Figure 7. PFGE patterns of *vanA E. faecium* isolates



A1~I1, human; J1~K2, intestinal secretion; L1, intestinal secretion & animal stool

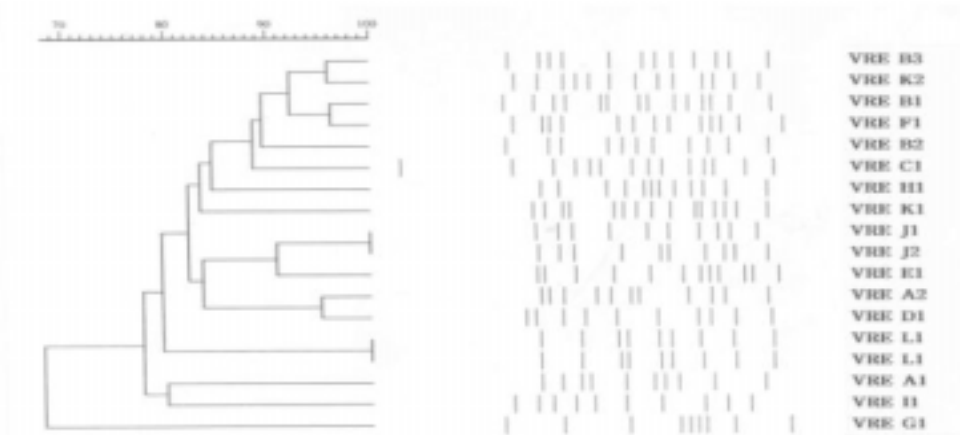
나) *VanC* 분리주의 PFGE 양상 분석

*VanC1*과 *vanC2* 분리 주의 PFGE 결과 일치하는 균주는 없었으며 다양하게 나타났다.

2) 임상검체 및 축산물에서 분리된 VRE 균주의 overlapping PCR을 이용한 *vanA* gene cluster(Tn1541-like element) mapping 결과

VanA gene cluster의 유전적 다양성을 5가지 형으로 나누었을 때, 임상 분리 주의 경우는 type 1(Tn1546과 동일)에 국내 7주 및 미국 2주, type 2(*vanS*와 *vanH*사이에 IS1251 존재)에 미국 10주, type 3(*orf2*와 *vanR* 사이에 IS1542 존재)에 국내 2주, type 4(*orf2*와 *vanR* 사이에 IS1542, *vanX*와 *vanY*사이에 IS1216V 존재) 국내 12주, type 5(*vanY*, *vanZ* 사이에 변이) 국내 9주가 분포되었다. 국내 분리 30주는 4가지 형으로 나뉘었으며, type 4 12주, type 5 9주, type 1 7주 및 type 3 2주 순으로 분포되었다. 임상 분리 주와는 달리 가축(가금류) 분리 27주의 경우는 대부분 type 1 만이 관찰 되었지만, 국내에서 최 등의 2001년 보고를 포함한 몇 차례 연구에서 100% type 1으로 보고 한 것과 달리 type 5가 처음 분리 되었다는 데 의의가 있겠다(Table 10).

Figure 8. Dendrogram of *vanA* *E.faecium* isolates



A1~I1, human; J1~K2, raw chicken meat; L1, animal & raw chicken meat

임상 분리 주의 경우 가축(가금류) 분리 주와 달리 *vanA* gene cluster의 유전적 다양성을 보였으며 가축(가금류) 분리 주에서 보인 type 1이 두드러지게 많이 관찰되지도 않았다. 따라서 아직까지 국내의 경우 가축에서 사람으로 반코마이신 내성 유전자의 수평 전파의 가능성은 높지 않은 것으로 생각된다.

Table 10. *vanA* gene cluster(Tn1541-like element) 의 유전적 다양성 분석

		type				
		type 1	type 2	type 3	type 4	type 5
Clinical isolates (42)	Korea (30)	7	-	2	12	9
	USA (12)	2	10	-	-	-
Poultry isolates (27)	Meat secretion (26)	25	-	-	-	1
	Stool (1)	1	-	-	-	-
total (69)		35	10	2	12	10

제5절 *E. coli*의 내성기전과 연관 연구

1. 동물에서 분리된 용혈성 대장균의 항생제 내성

동물로부터 분리된 용혈성 대장균의 항생제 내성 정도와 이들이 생산하는 toxin의 전이 여부를 파악하고자 하였으며, 동물로부터 분리된 균주의 사람에게 대한 유해성 여부를 파악하기 위하여 human cell line에 부착성 여부를 확인하였다.

가. 용혈성 대장균의 검출

국립수의과학검역원으로부터 설사증을 나타내는 돼지의 분변에서 분리된 용혈성 *E. coli* 56주를 기증 받아 blood 배지에 hemolysis 형성 여부를 확인한 결과, 총 56 균주 중 38 균주 (67.8%) 만이 hemolysis를 형성하는 것으로 나타나 이들을 용혈성 대장균으로 하여 다음 단계의 실험 대상으로 하였다.

나. 동물분리 균주의 항생제 내성

용혈성 대장균은 신생돼지나 이유기 돼지의 설사증을 유발하는 가장 보편적인 균주로 알려져 있다. 이 균주에 의한 감염증의 치료제로 broad-spectrum 항생제를 사용하고 있다. 항생제 사용은 내성 균주의 유발을 촉진하는 것으로 생각되고 있다. 이에 본 연구에서는 설사증

을 나타낸 돼지로부터 분리된 용균성 대장균 38주의 항생제 내성 경향을 실험하였다 (Table 1) 가장 높은 내성율을 나타내는 항생제는 tetracyclin (94.7%), ampicillin (71.0%), chloramphenicol (68.4%), trimethoprim (55.2%) 순으로 나타났다. 또한 모든 균주에서 aztreonam, amikacin, norfloxacin에 대해서는 감수성인 것으로 나타났다. 5개 이상의 항생제에 대해 내성을 가지는 다제내성 (multiple drug resistance)을 보인 균주는 38 균주 중 14 균주 (36.8%)로 나타났다. Tetracyclins과 aminoglycosides 계열의 항생제가 주로 돼지의 감염증 치료제나 성장촉진제로 많이 사용되고 있기 때문에 이러한 계열의 항생제에 대한 내성이 매우 높을 것으로 예상되었으며, 결과에서와 같이 94.7%가 tetracyclin에 대해 내성을 나타냈고, 17%가 gentamicin 내성, 14%가 각각 neomycin과 kanamycin에 대해 내성을 나타냈다.

Table 1. Antimicrobial resistance phenotypes of swine *E. coli* isolates

Class and antimicrobial	Resistant strains	(%)	MIC50	MIC90	Ranges
Penicillins					
Ampicillin	27	71.0	>128	>128	8 ~ >128
β -Lactam					
Cephalothin	11	28.9	16	32	4 ~ 32
Monobactams					
Aztreonam	0	0.0	<0.25	<0.25	<0.25 ~ <0.25
Aminoglycosides					
Gentamicin	17	44.7	4	32	<0.25 ~ 32
Amikacin	0	0.0	2	4	0.5 ~ 8
Kanamycin	14	36.8	4	>128	0.5 ~ >128
Neomycin	14	36.8	4	32	1 ~ 128
Tetracyclines					
Tetracycline	36	94.7	128	128	4 ~ >128
Fluoroquinolones					
Norfloxacin	0	0.0	2	4	<0.25 ~ 8
Phenicols					
Chloramphenicol	26	68.4	128	>128	1 ~ >128
Folate Pathway inhibitors					
Trimethoprim	21	55.2	>128	>128	<0.25 ~ >128

다. β -Lactamase 생산 균주의 선별

Penicillin계 항생제에 내성 기전의 하나인 β -lactamase를 생산여부를 확인하고자 nitrocefin test를 실시하였다. 효소의 기질로 작용하는 nitrocefin을 각각의 균주의 crude extract에 처리한 결과 균주 중 34 (89.5%) 균주가 양성 반응을 나타내 β -lactamase를 생산하는 것으로 나타났다. 이들의 ampicillin에 대한 최소억제 농도는 16에서 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상과 cephalothin에 대한 최소억제농도는 4에서 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 다양하게 나타났다.

이들 중 cephalothin에 대해 최소억제 농도가 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 10 균주에 대해서는 이들의 pI를 확인하기 위해 IEF를 실시한 결과 모두에서 pI 8.2 이상이였다. 이는 TEM-1, pI 5.4; SHV-1, pI 7.6; CTX-M-1, pI 8.9; AmpC, pI 8.0 이상인 것과 비교하여 AmpC type의 β -lactamase를 생산할 것으로 추측되었다. 이들에 대해 AmpC를 증폭할 수 있는 primer로 PCR을 실시한 결과 모두에서 AmpC-like type의 β -lactamase가 존재하는 것으로 나타났다.

특히 AmpC-like type의 β -lactamase가 플라스미드상에 있는지 크로모솜 상에 있는지 확인한 결과 모두 plasmid 상에 존재하는 것으로 확인되었다.

라. ESBL 생산 균주의 선별

β -Lactamase를 생산하는 균주 중에서 ESBL을 생산하는 균주가 존재하는지 확인하기 위해 double disk synergy test를 실시하였다. Disks는 cefotaxime, cefotaxime과 clavulanic acid, ceftazidime, ceftazidime과 clavulanic acid 가 사용되었다. NCCLS 지침에 결과를 확인하였을 때 56 균주에서 ESBL를 생산하는 균주는 하나도 없었다.

마. Toxin 유전자 확인

돼지의 설사증을 유발하는 대장균에서 주로 분비되는 enterotoxin과 verotoxin 유전자의 존재 여부를 확인한 결과는 Table 2와 같다. ST gene이 가장 많은 33균주 (86.8 %)에서 나타났다, 그 다음으로 VT gene이 14 isolates (39.5%), VTe gene이 14 균주 (39.5%), 그리고 LT gene이 13 균주 (34.2%)에서 나타났다. 이들 중에서 10 (26.3%) 균주는 ST만, 1 (2.6%) 균주는 LT만, 1 (2.6%) 균주는 VTe 만, 12 (31.6%) 균주는 LT와 ST를, 10 (26.3%) 균주는 ST, VT, VTe를, 3 (7.9%) 균주는 VT와 VTe를, 그리고 1 (2.6%) 균주는 ST와 VT를 동시에 생산하는 것으로 나타났다.

Table 2. Toxins produced by hemolytic *E. coli*

Toxin	No. (%)
LT, ST, VT, VTe	-
LT, ST, VTe	-
ST, VT, VTe	10 (26%)
LT, ST	12 (32%)
VT, VTe	3 (8%)
ST, VT	1 (3%)
LT	1 (3%)
ST	10 (26%)
VTe	1 (3%)
VT	-
Total	38 (100%)

바. 접합에 의한 toxin 유전자 전달

Filter binding 방법에 따라 toxin 유전자 전달시험을 실시하였다. 제1군은 aztreonam 내성, trimethoprim 감수성인 두 균주 (98-1, 98-25)를 내성공여자로 하고, aztreonam 감수성, trimethoprim 내성인 ESBL을 생산하는 임상분리 *E. coli* (152)를 내성 수여자로 사용하였다. 제2군은 aztreonam 내성, kanamycin 감수성인 네 균주 (97-22, 98-1, 98-27, 98-28)를 내성공여자로 하고, aztreonam 감수성, kanamycin 내성인 ESBL을 생산하는 임상분리 *E. coli* 두 주 (89, 131)를 내성 수여자로 사용하였다. 이로부터 ST toxin을 가진 10개의 transconjugants를 얻었다. 이들의 유전자 전이 현상을 확인하기 위해 항생제 MIC를 실험한 결과는 Table 3와 같다.

Table 3. Antimicrobial susceptibilities of *E. coli* animal and clinical isolates, animal isolate, and their transconjugants

	Amp ^a	Azt ^b	Cep ^c	cefta ^d	cefot ^e	cfx ^f	Gen ^g	Ami ^h	Neo ⁱ	Kan ^j	Nor ^k	Tet ^l	Chl ^m	Tri ⁿ	Str ^o
97-22	>128	<0.25	16	1	>0.25	8	1	2	0.5	>128	128	>128	>128	>128	>128
98-1	>128	<0.25	8	1	>0.25	4	2	2	64	>128	1	>128	64	>128	128
98-25	>128	<0.25	2	1	>0.25	2	8	1	16	>128	<0.25	>128	>128	>128	32
98-27	>128	<0.25	2	1	>0.25	2	8	1	16	>128	<0.25	>128	>128	>128	128
98-28	>128	<0.25	2	1	>0.25	2	16	1	64	>128	<0.25	>128	>128	>128	128
152	>128	4	128	>128	128	2	64	2	16	>128	<0.25	>128	4	>128	128
89	>128	8	>128	32	32	2	>128	>128	128	>128	64	>128	128	>128	64
131	>128	<0.25	32	32	8	2	32	2	0.5	4	<0.25	>128	2	>0.25	4
TC1 (98-1→152)	>128	4	128	128	4	4	32	2	64	>128	2	>128	64	>128	>128
TC2 (98-25→152)	>128	8	128	>128	8	4	32	1	32	>128	0.5	>128	128	>128	128
TC3 (97-22→89)	>128	8	>128	16	128	2	2	2	64	>128	<0.25	>128	>128	0.5	128
TC4 (98-1→89)	>128	4	>128	16	8	4	2	2	64	>128	1	128	128	>128	>128
TC5 (98-27→89)	>128	2	>128	16	8	2	8	1	32	>128	<0.25	>128	>128	>128	>128
TC6 (98-28→89)	>128	2	>128	16	8	2	8	1	32	>128	0.5	>128	>128	>128	128
TC7 (97-22→131)	>128	2	32	32	4	2	16	2	32	>128	0.5	>128	>128	<0.25	128
TC8 (98-1→131)	>128	2	128	32	16	4	32	2	64	>128	2	>128	64	>128	128
TC9 (98-27→131)	>128	2	32	128	4	2	32	1	32	>128	1	>128	>128	>128	>128
TC10 (98-28→131)	>128	2	32	128	4	4	32	1	32	>128	1	>128	>128	>128	>128

a, Ampicillin; b, Aztreonam; c, Cephalothin; d, ceftazidime; e, cefotaxime; f, cefoxitin; g, Gentamicin; h, Amikacin; i, Neomycin; j, Kanamycin; k, Norfloxacin; l, Tetracyclin; m, Chloromphenicol; n, Trimethoprim; o, Streptomycin

사. 혈청형 분석

항혈청을 이용하여 응집반응을 통한 혈청형을 분석한 결과 단 17균주(44.7%) 만이 serotyping 되었고, 나머지 균주에서는 nontypable 하였다. Serotype이 분류된 hemolytic *E. coli* 의 O serogroup 매우 다양한 것으로 나타났다(Table 4). 가장 많은 것으로 나타난 O serogroup은 각각 2 균주가 O-27, O-63, O114였고, serogroup O-18, O-78, O-115, O-125, O-126, O-127, O-148, O-153, O-157, O-158, O-167가 각각 1 균주씩 이었다. 보편적으로 serogroups O-157, O-148, O-20, O-78, O-128, O-6, O-8, O-15가 ETEC와 관련있는 것으로 알려져 있으나 본 실험의 결과로는 38 균주에서 단 한 균주도 이들 혈청형을 가진 균주가 없는 것으로 나타났다.

H serogroup의 결과는 Table 5과 같다. H serogroup에서는 16 균주 (42.1%)만이 분류되었고 4 균주에서는 nonmotile, 18 균주에서는 H nontypeable 이었다. 가장 보편적인 H serogroups은 4 균주에서 H-4, 4 균주에서 H-10, 3 균주에서 H-9과 H-40 이었으며, 1 균주에서 H-19과 H-20이었다.

H-7 serogroup은 없는 것으로 나타났으며, 1 균주에서 O-157 serotype을 나타냈으나 H-19 serotype인 것으로 확인되어 특별한 문제는 없는 것으로 나타났다.

Table 4. O-serotypes of hemolytic *E. coli*

O type	No. (%)
O-18	1
O-27	2
O-63	2
O-78	1
O-114	2
O-115	1
O-125	1
O-126	1
O-127	1
O-148	1
O-153	1
O-157	1
O-158	1
O-167	1
17 (44.7%)	

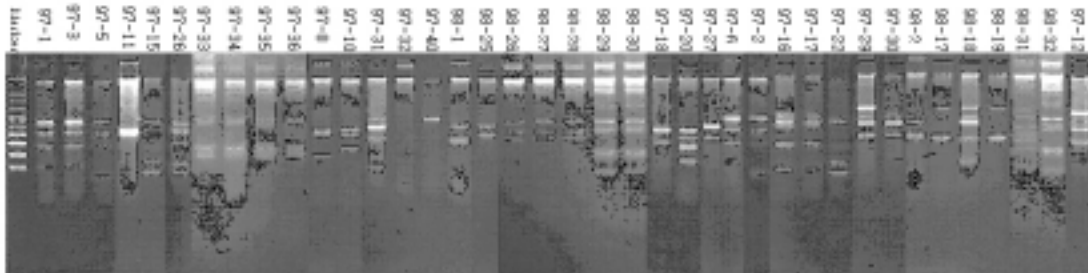
Table 5. H-serotypes of hemolytic *E. coli*

H type	No. (%)
H-4	4
H-9	3
H-10	4
H-19	1
H-20	1
H-40	3
16 (42.1%)	

아. Plasmid 패턴 분석

용혈성 대장균의 플라스미드 패턴은 Fig. 1와 같다.

Fig. 1. Plasmid profiles of hemolytic *E. coli*. Marker, supercoiled marker



자. Human cell line에 대한 부착능

동물 분리 균주의 사람 세포에 대한 부착능을 확인하기 위해 human T-24 bladder cell과 Caco-2 intestinal cell에 대한 부착능 실험을 한 결과는 Table 6와 같다. 16 균주 (42.1%)가 bladder cell에 강한 부착능을 가진 것으로 나타났고, 17 균주 (44.7%)가 Caco-2 intestinal cell에 대해 강한 부착능을 가진 것으로 나타났다.

Table 6. Adherent activity of the hemolytic *E. coli* to T-24 human bladder cells and Caco-2 intestinal cells

Isolate No.	Number of adherent bacteria ^a	
	T-24 cells	Caco-2 cells
97-1	119.6	413.5
97-2	285.9	407.8
97-3	275.9	369.4
97-5	8.8	141.2
97-6	138.5	100.3
97-8	4.1	4.0
97-10	90.1	120.9
97-11	54.2	81.8
97-15	6.5	109.1
97-16	29.5	86.0
97-17	78.5	15.8
97-18	180.9	246.3
97-20	584.8	136.4
97-22	82.9	178.8
97-26	0.0	6.8
97-27	74.3	253.1
97-29	219.2	85.7
97-30	1.5	31.1
97-31	208.4	255.5
97-32	727.0	166.4
97-40	155.2	4.0
98-1	7.2	2.3
98-2	99.4	2.6
98-17	31.8	150.0
98-18	20.1	3.6
98-19	4.4	3.6
98-25	19.7	8.6
98-26	107.8	7.4
98-27	11.9	30.4
98-28	5.2	62.8
98-29	28.6	17.4
98-30	30.7	9.0
98-31	60.7	9.0
98-32	101.8	2.8
98-33	533.6	156.7
98-34	581.7	2.8
98-35	405.3	129.9
98-36	663.0	277.2

a, Mean numbers of adhering *E. coli* per 20 fields.

2. 동물에서 분리된 용혈성 대장균의 aminoglycoside계 항생제 내성

동물로부터 분리된 *E. coli*의 aminoglycoside계 항생제에 대해 내성을 가지는 균주를 대상으로 그 내성기전을 파악하고자 하여 PCR 반응을 이용한 aminoglycoside 변형효소의 검출과 integron gene cassette를 검출하였다.

가. 균주의 특성

1997년과 1998년 사이에 설사증을 나타내는 돼지의 분변으로부터 분리된 용혈성 *E. coli* 38 균주 중 17 균주 (44.7%)가 gentamicin에 대해 내성을 나타내었고, 이 17 균주를 aminoglycoside계 항생제 내성 기전 연구의 대상으로 하였다.

나. Aminoglycoside 변형효소의 검출

Aminoglycoside 내성 균주 17주를 대상으로 PCR을 이용하여 aminoglycoside 변형효소의 검출 시험을 하였다. 그 결과 13 균주가 amino기를 acetyl화 하는 acetyltransferase (AAC)를, 8 균주가 amino기를 인산화하는 phosphotransferase I (APH I)을, 5 균주가 phosphotransferase II (APH II)를 가지고 있는 것으로 나타났다.

다. Integron 함유 *E. coli*

Integron을 함유하고 있는지 확인하기 위하여 *int* genes의 conserved regions을 증폭한 결과 용혈성을 나타낸 gentamicin 내성 동물분리 균주 총 17 균주 중 16 균주 (94.1%)가 integron을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 특히 16 균주 중 8 균주는 플라스미드 상에 가지고 있는 것으로 확인되었다.

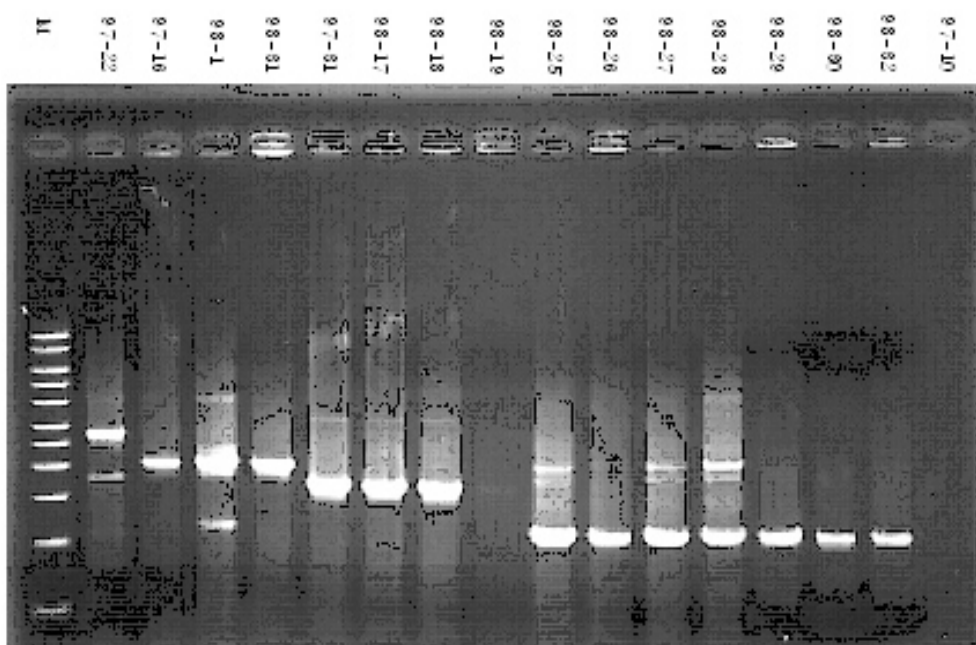
라. Gene cassette regions의 특성

Class 1과 class 2 integrons의 함유경향을 파악하기 위해 PCR로 증폭한 결과 동물 분리 균주에서 gene cassette regions은 2 균주 (97-10과 98-19)를 제외한 14 균주가 class 1 integron을 가진 것으로 나타났고, class 2 integron을 가진 균주는 단 한 균주도 없었다. Gene cassette region의 크기는 1.2 kb에서 2.5 kb로 다양하게 나타났다 (Fig. 2). class 1 integron을 가진 14 균주는 gene cassette region의 크기에 따라 크게 4가지로 구분할 수 있다. 1 균주는 2.5 kb, 3 균주는 2 kb, 3 균주는 1.8 kb, 8 균주는 1.2 kb의 gene cassette를 함유하고 있는 것으로 나타났다.

마. Gene cassette regions의 염기서열 분석

Integron에 있는 gene cassette를 규명하고자 하여, 동물 분리 2 균주 (98-18, 98-25)를 선별해 PCR로 증폭된 class 1 gene cassette regions을 염기서열 분석하였다. 그 결과 균주 98-18과 98-25에 함유된 gene cassette는 streptomycin과 spectinomycin에 내성을 나타내는 *aadA1* gene cassette로 확인되었다.

Fig. 2. PCR products of different 15 gene cassettes in class 1 integrons of animal isolates of *E. coli*. M, 1 kb DNA marker, 97-10 was not detected class 1 integron.



3. 임상분리 *E. coli* 분리 균주의 항생제 내성 분석

총 233주의 임상 *E. coli* 가운데 184주 (78.9%)는 ampicillin에 대해 내성을 나타냈으며, 80주 (34.3%)는 cephalothin에, 93주는 (39.9%) gentamicin에, 그리고 73주 (31.3%)는 norfloxacin에 대해 내성을 나타냈다. 이들의 MIC₅₀과 MIC₉₀은 다음과 같다(Table 7). Ampicillin (MIC₉₀ >128 µg/ml)은 내성범위인 32 µg/ml 이상에서 대부분의 균주에 대해 효

과적인 항균력을 나타내지 못한 반면에 cephalothin, gentamicin, norfloxacin은 각각 내성 범위 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 (cephalothin), 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상 (gentamicin, norfloxacin)에서 60% 이상의 균주에 대해 효과적인 항균력을 나타내는 것으로 나타났다. 특히, 7 균주 (3.0%)는 4가지 항생제에 대해 고도내성 (128 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상)을 나타냈다.

Table 7. Comparison of antimicrobial susceptibility among 233 clinical isolates of *Escherichia coli*

Antimicrobial agents	MIC50	MIC90	Range ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Ampicillin	>128	>128	0.5 ~ >128
Cephalothin	16	>128	<0.25 ~ >128
Gentamicin	4	128	<0.25 ~ >128
Norfloxacin	<0.25	>128	<0.25 ~ >128

가. Double-disk synergy test (DDST)를 통한 ESBL 생산균주의 검출

총 233주의 임상 *E. coli* 중에서 17 주 (7.3%)가 DDST 양성반응을 나타냈다. 이들 균주는 ampicillin과 cephalothin에 대해 내성을 나타냈다. 이중에서 5 균주는 4가지 항생제에 대해 고도내성 (>128 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 나타냈다. ESBL 생산균주에 대해서는 6가지 항생제에 대해 추가적으로 MIC 실험을 시행하였다. Table 8에서와 같이, 13 균주 (76.5%)는 multi-drug resistance (MDR)를 나타내고 있다. 그러나 이들 중 단 1 균주만이 cefoxitin에, 3 균주가 cefotaxime에, 8 균주가 ceftazidime에 대해 내성을 나타내었다.

나. Isoelectric focusing gel electrophoresis (IFE)

pI를 결정하기 위해 IEF를 실시한 결과 5.4에서 8.4까지 다양한 pI 값을 나타내었으며 이로부터 11 균주 (64.7%)는 TEM을 2 균주 (11.7%)는 TEM과 AmpC; 2 균주 (11.7%)는 TEM과 OXA; 1 균주 (5.8%)는 TEM, CTX-M 그리고 AmpC; 1 균주 (5.8%)는 AmpC를 생산하는 것으로 추정하였다 (Table 8, Table 9, Fig. 3).

Table 8. Antimicrobial susceptibilities, pIs and type of ESBLs of *E. coli* isolates and the type of ESBLs

No.	MIC ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)										pI	Type of ESBL		
	Amp ^a	Cep ^b	Gen ^c	Nor ^d	Tet ^e	Chl ^f	Tri ^g	Cef ^h	Ctx ⁱ	Cft ^j				
14	>128	>128	8	64	2	8	<0.25	8	<0.25	0.5	5.4		TEM-1	
15	>128	64	64	64	>12 8	>12 8	32	1	<0.25	<0.25	5.4	8.0	TEM-1	AmpC
20	>128	128	64	0.5	>12 8	>12 8	32	8	32	128	5.4	5.9	TEM-52	
25	>128	>128	64	<0.25	4	>12 8	32	4	8	32	5.4	5.9	TEM-52	
81	>128	>128	>12 8	>128	>12 8	>12 8	32	8	2	64	5.4		TEM-1	
86	>128	>128	>12 8	1	>12 8	>12 8	32	8	8	32	5.9		TEM-52	
89	>128	>128	4	<0.25	2	8	0.5	2	64	2	5.4	8.0	TEM-1	AmpC
96	>128	>128	>12 8	>128	>12 8	8	32	>128	16	8	5.4	8.0	TEM-1	OXA-33
98	>128	>128	>12 8	>128	>12 8	>12 8	32	4	16	16	5.4		TEM-1	
120	>128	32	>12 8	>128	>12 8	>12 8	32	16	>128	128		8.0		AmpC
129	>128	>128	>12 8	2	>12 8	>12 8	32	16	16	32	5.4	5.9	TEM-1	
131	>128	128	64	<0.25	>12 8	4	<0.25	1	<0.25	2	5.4		TEM-15	
152	>128	>128	128	<0.25	128	8	<0.25	2	16	32	5.4	5.9	TEM-20	
154	>128	>128	>12 8	>128	128	>12 8	<0.25	4	16	2	5.4 7.3	5.9	TEM-1	OXA-30
168	>128	>128	>12 8	128	>12 8	>12 8	32	2	64	4	5.4 8.4	8.0	TEM-1	CTX-M-3 AmpC
205	>128	64	1	0.5	128	>12 8	32	2	32	4	5.4		TEM-1	
221	>128	>128	>12 8	<0.25	2	32	32	2	8	32	5.4	5.9	TEM-52	

a, ampicillin; b, cephalothin; c, gentamicin; d, norfloxacin; e, tetracycline f, chloramphenicol; g, trimethoprim; h, ceftazidime; i, cefotaxime; j, ceftazidime

다. ESBL의 염기서열 분석

β -lactamase 를 생산하는 유전자를 PCR로 증폭하여 염기서열을 분석한 결과 TEM을 생산하는 것으로 추정된 균주 중 10 균주 (58.8%)는 TEM-1 like, 1 균주 (5.9%)는 TEM-15,

1 균주 (5.9%)는 TEM-20, 4 균주 (23.5%)는 TEM-52를 생산하는 것으로 나타났다. OXA type을 나타내는 두 균주 중 1 균주는 OXA-1과 단 한군데 amino acid만이 다른 OXA-30 [Arg(AGA)131→Gly(GGA)]이었고, 1 균주는 OXA-1과 amino acid가 Ala48(GCA)→Val(GTA), Arg(AGA)131→Gly(GGA), Asp(GAT)208→Glu(GGA)의 세군데 다른 OXA-33을 생산하였다.

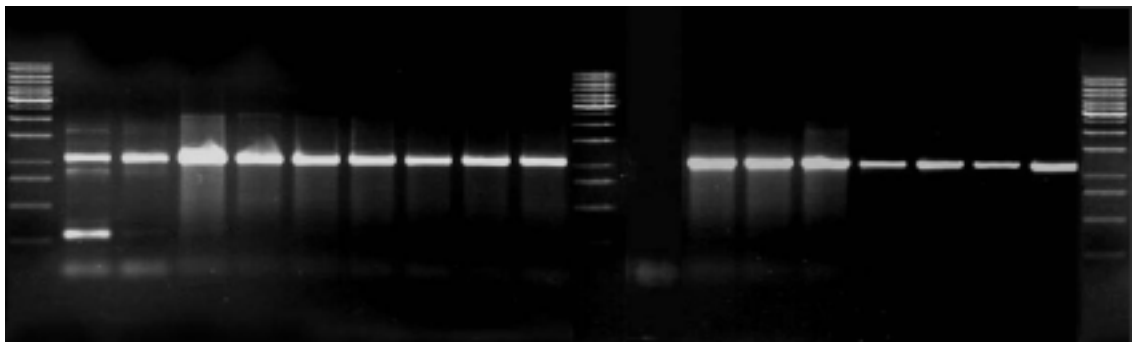
CTX-M type ESBL을 생산하는 균주는 염기서열 분석결과 CTX-M-3으로 나타났다. 이는 CTX-M-1과 비교하여Val(GTT)→77Ala(GCT), Asp(GAT)114→Asn(AAT), Ser(TCT)→Ala(GCT), Asn(AAT)288→Asp(GAT)의 네 군데amino acid 가 다른 것으로 알려져 있다. AmpC type의 ESBL을 생산하는 균주는 모두 chromosomal AmpC type의 ESBL을 생산하는 것으로 나타났다.

Table 9. Distribution of ESBL produced by clinical isolates of *E. coli*

ESBL type	No. of isolates
TEM-1	5
TEM-15	1
TEM-20	1
TEM-52	4
TEM-1 + AmpC	2
TEM-1 + OXA-30	1
TEM-1 + OXA-33	1
TEM-1 + CTX-M-3 + AmpC	1
AmpC	1
Total	17

Fig. 3. PCR with specific primers to TEM. M, molecular size marker.

M 14 15 20 25 81 86 89 96 98 M 120 129 131 152 154 168 205 221 M



라. 내성유전자의 전달

Filter binding 방법에 의해 내성전달시험을 실시한 결과 TEM 유전자가 동물로부터 분리된 *E. coli*에 전달되는 것으로 확인되었다. 이들의 항생제에 대한 MIC는 Table 10과 같다.

Table 10. Antimicrobial susceptibilities of *E. coli* clinical isolates, animal isolate, and their transconjugants

	Amp ^a	Azt ^b	Cep ^c	cefta ^d	cefoe	cfx ^f	Gen ^g	Nor ^h	Tet ⁱ	Chl ^j	Tri ^k
25	>128	2	64	128	32	2	32	0.5	8	>128	>128
221	>128	4	>128	>128	128	4	64	<0.25	8	32	>128
97-32	4	<0.25	16	0.5	<0.25	4	8	0.5	>128	2	<0.25
TC1 (25→97-32)	>128	2	32	128	128	2	32	0.5	>128	>128	>128
TC2 (221→97-32)	>128	<0.25	32	2	<0.25	2	64	0.5	>128	32	>128

a, Ampicillin; b, Aztreonam; c, Cephalothin; d, ceftazidime; e, cefotaxime; f, ceftazidime; g, Gentamicin; h, Norfloxacin; i, Tetracyclin; j, Chloromphenicol; k, Trimethoprim

마. RAPD와 PFGE를 이용한 유전자 구조 분석

RAPD와 PFGE 패턴을 통해 유전자 구조를 분석한 결과 17 균주의 ESBL-생산 *E. coli* 들은 각각의 균주 간에 연관성이 매우 낮은 것으로 나타났다 (Fig. 4). RAPD 결과뿐만 아니라, PFGE 결과 역시 이들 균주 간에 유사성은 매우 낮은 반면에 다양성이 매우 높은 것으로 나타나 이들이 clonal spread는 아닌 것으로 확인됐다 (Fig. 5).

Fig. 4. RAPD pattern of chromosomal DNA and their phylogeny.

M 14 15 20 25 81 86 89 96 98 M 120 129 131 152 154 168 205 221 M

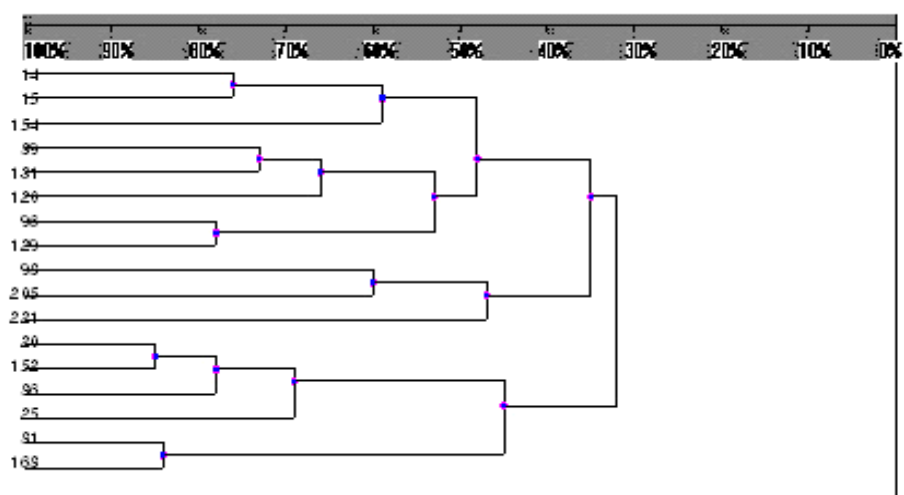
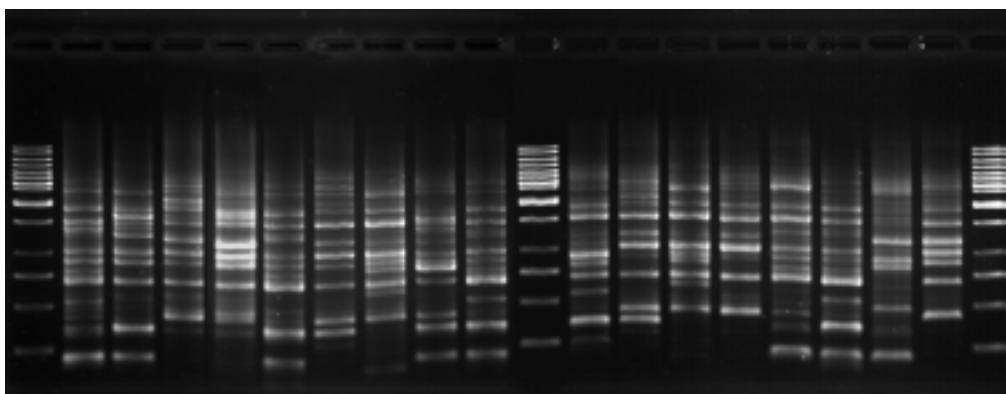
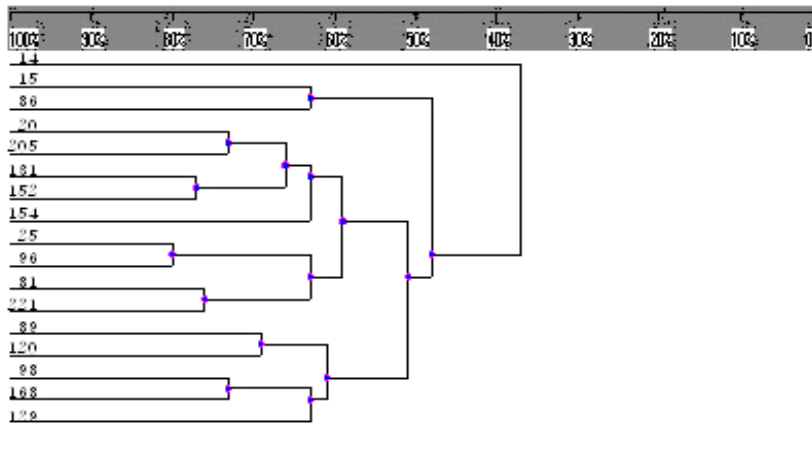
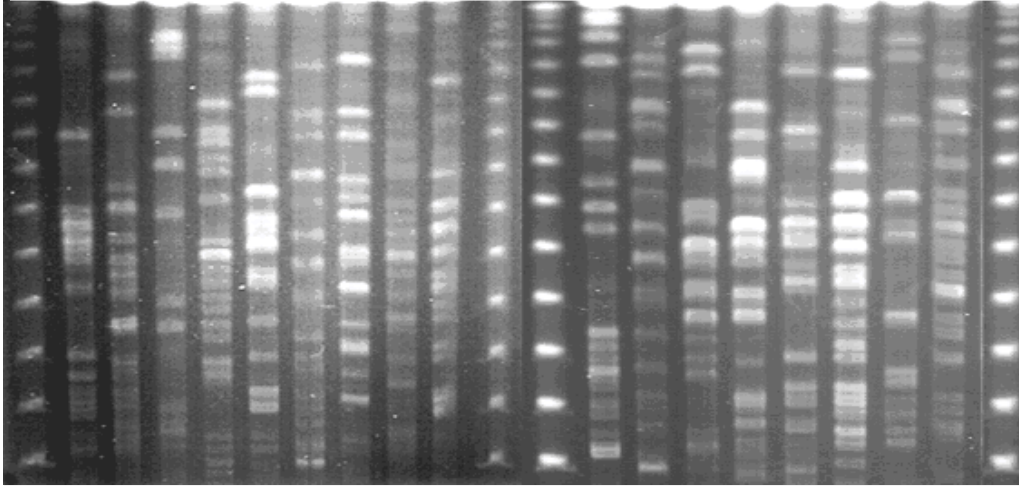


Fig. 5. PFGE pattern of genomic DNA digested with *Xba*I and their phylogeny.

M 14 15 20 25 81 86 89 96 98 M 120 129 131 152 154 168 205 221 M



4. 임상에서 분리된 *Escherichiacoli*의 퀴놀론계 항생제에 대한 내성

임상에서 분리된 *E. coli* 중 quinolone계 항생제에 내성을 가지는 균주에 대한 내성 기전을 파악하고자 하여 quinolone내성 결정영역 (QRDR)에 대한 *gyrA*의 변이와 quinolone제의 또 다른 표적이 되는 topoisomerase IV를 만드는 유전자인 *parC*의 변이를 확인하고자 하였다. 이와 함께 막 투과성에 관여하는 외막 단백질을 분리하여 그 패턴과 항생제 내성의 관계를 규명하고자 하였다.

가. Fluoroquinolone에 대한 내성

총 233주의 임상 *E. coli* 가운데 norfloxacin 대해 내성을 나타내는 64 균주에 대해서는 추가로 제 3세대와 4세대 fluoroquinolone계열의 항생제인 ciprofloxacin, ofloxacin, gemifloxacin, sparfloxacin, trovafloxacin에 대한 항생제 MIC를 측정하였다. 그 결과 64 균주 모두 ciprofloxacin, ofloxacin, gemifloxacin, sparfloxacin, trovafloxacin에 대해 내성을 나타내었다(Table 11). 이들의 MIC₅₀과 MIC₉₀은 Table 12에 정리하였다.

Table 11. Antibiotic susceptibilities of *E. coli* isolates investigated in this study

	MIC					
	NFLX ^a	CPFX ^b	OFLX ^c	GMFX ^d	SPFX ^e	TVFX ^f
3	16	8	8	4	8	8
5	16	8	8	4	8	8
9	64	32	32	8	32	16
10	>128	128	32	8	32	16
14	64	16	32	8	16	16
15	64	64	32	8	32	16
29	>128	>128	64	8	16	64
34	>128	>128	128	32	>128	128
39	>128	128	128	32	128	64
41	64	32	32	8	16	8
45	64	32	32	8	16	16
47	64	128	64	16	64	32
55	16	16	16	8	8	8
57	>128	>128	>128	32	>128	64
58	>128	128	64	16	64	32
61	128	64	32	16	32	32
76	128	64	32	8	64	32
81	>128	128	64	8	32	16
82	>128	64	32	16	64	32

91	>128	>128	64	32	128	64
92	32	16	16	8	16	16
96	128	32	32	8	32	32
98	>128	32	32	4	32	16
102	16	8	16	4	8	8
104	32	16	16	4	8	8
107	128	64	32	8	32	16
115	>128	64	64	16	64	32
117	16	8	8	4	8	8
120	>128	>128	>128	64	>128	>128
121	64	8	16	4	8	8
122	64	16	32	4	16	8
125	>128	128	64	16	32	16
127	64	16	16	8	16	16
130	64	16	16	8	16	16
135	16	8	16	8	16	16
140	>128	16	16	8	8	16
143	16	16	16	4	16	16
144	>128	>128	128	32	>128	>128
146	>128	128	64	16	128	32
151	128	32	16	4	8	8
153	>128	64	32	8	16	16
154	128	>128	64	16	64	64
165	>128	64	32	2	64	16
168	128	64	32	4	64	16
169	>128	64	32	16	32	32
171	64	16	32	8	32	16
172	128	32	32	4	16	16
174	128	64	32	8	16	8
175	128	64	32	8	16	8
186	>128	128	64	16	32	32
188	128	64	64	16	64	16
189	128	32	16	4	16	16
194	>128	128	64	2	64	8
195	64	8	16	2	8	8
197	16	64	64	8	64	32
200	>128	128	64	16	64	64
201	128	64	64	16	64	64
203	>128	64	64	16	64	32
204	32	16	16	4	8	16
207	64	15	16	8	16	16

208	32	16	16	4	4	4
212	16	8	32	2	4	4
215	>128	64	64	16	64	32
221	128	16	16	4	32	16

a, Norfloxacin; b, Ciprofloxacin; c, Ofloxacin; d, Gemifloxacin; e, Sparfloxacin; f, Trovafloxacin

Table 12. Minimum inhibitory concentration (MIC) of five fluoroquinolones of 64 norfloxacin-resistant *E. coli*

Fluoroquinolones	Concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	MIC50	MIC90	Range ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Ciproxacin	64	>128	8 ~ >128
Ofloxacin	32	64	8 ~ 128
Gemifloxacin	8	16	2 ~ 64
Sparfloxacin	32	128	4 ~ >128
Trovafloxacin	16	64	4 ~ >128

나. *gyrA* 및 *parC*의 유전적 분석

476-bp의 PCR 증폭산물을 염기서열 분석한 결과 QRDR의 *gyrA*에 대한 변화는 64 균주 모두 83번 위치의 serine이 leucine으로 변형된 것으로 나타났다. 이 외에 중요한 변형 위치는 87번 위치의 aspartic acid으로 전체 64균주 중 53 균주가 tyrosine으로, 8 균주가 asparagine으로 변형되었고, 나머지 3 균주에서는 변화가 없었다. 이로부터 fluoroquinolone 계열 항생제에 대해 내성을 가지는 *E. coli*에서는 *gyrA*의 83번 위치의 serine이 leucine으로 변형되는 것이 내성을 가지게 하는 결정적인 역할을 하는 것으로 나타났다 (Table 13). 한편, fluoroquinolone에 대해 내성을 나타내는 많은 균주에서 topoisomerase IV의 A subunit에서 돌연변이가 발견되고 있다는 보고가 있어, 본 연구에서도 *parC*에 대한 돌연변이 여부를 확인하였다. 397-bp의 QRDR의 *gyrA* 아나로그인 *parC* 증폭산물을 염기서열 분석한 결과는 다음과 같다. *parC*에 대한 변화에서는 80번 위치의 serine이 각각 isoleucine (46 균주), arginine (3 균주)로 변화되었고, 15 균주에서는 변화가 없었다. 84번 위치의 glutamic acid는 valine (3 균주), glycine (1 균주), lysine (1 균주)로 변화되었으며, 59 균주에서는 변화가 없었다. 이 외에 특이하게 2개의 균주에서 108번 위치의 alanine이 threonine

으로 변화된 것이 관찰되었다 (Table 13).

Table 13. *gyrA* and *parC* mutations in QRDR of *E. coli* isolates investigated in this study

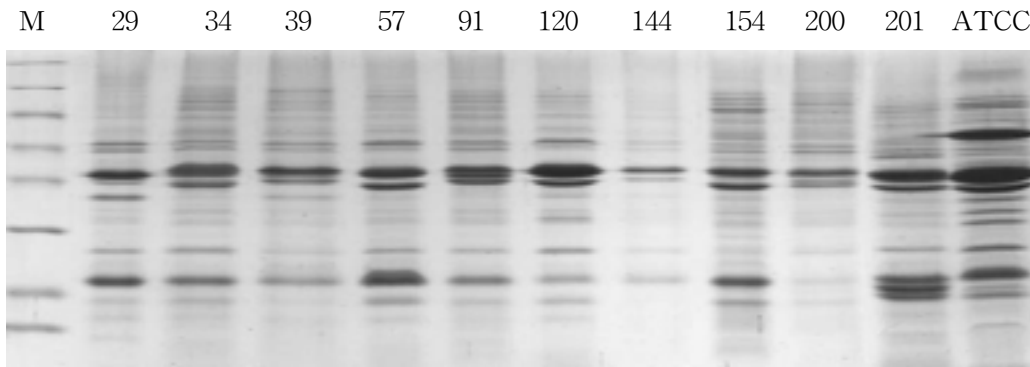
	<i>gyrA</i>		<i>parC</i>		
	Ser83	Asp87	Ser80	Glu84	Ala108
3	Leu	Asn			
5	Leu	Asn			
9	Leu	Asn	Ile		
10	Leu	Tyr	Ile		
14	Leu	Asn	Ile		
15	Leu	Asn	Ile		
29	Leu	Asn	Ile		
34	Leu	Asn	Ile		
39	Leu	Asn	Ile		Thr
41	Leu	Asn			
45	Leu	Asn			
47	Leu	Asn	Ile		Thr
55	Leu	Asn	Ile		
57	Leu	Asn	Arg		
58	Leu	Asn	Ile		
61	Leu	Asn	Ile		
76	Leu	Asn	Ile		
81	Leu	Asn	Ile		
82	Leu	Asn	Ile		
91	Leu	Tyr	Arg	Val	
92	Leu	Asn	Ile		
96	Leu	Asn	Ile		
98	Leu	Asn	Ile		
102	Leu	Asn			
104	Leu	Asn	Ile		
107	Leu	Asn	Ile		
115	Leu	Asn	Ile		
117	Leu	Asn			
120	Leu	Tyr	Ile		
121	Leu	Tyr	Arg		
122	Leu	Asn	Ile		
125	Leu	Asn	Ile		
127	Leu	Asn			
130	Leu	Asn			
135	Leu	Asn	Ile		

140	Leu	Asn	Ile	
143	Leu	Asn		
144	Leu	Tyr	Ile	Val
146	Leu	Tyr	Ile	
151	Leu	Tyr		
153	Leu	Tyr	Ile	Val
154	Leu	Asn	Ile	
165	Leu	Asn	Ile	
168	Leu	Asn		
169	Leu	Asn	Ile	Gly
171	Leu	Asn		
172	Leu	Asn	Ile	
174	Leu	Asn	Ile	
175	Leu	Asn	Ile	
186	Leu	Asn	Ile	
188	Leu	Asn	Ile	
189	Leu	Asn	Ile	
194	Leu			Lys
195	Leu			
197	Leu		Ile	
200	Leu	Asn	Ile	
201	Leu	Asn	Ile	
203	Leu	Asn	Ile	
204	Leu	Asn	Ile	
207	Leu	Asn		
208	Leu	Asn	Ile	
212	Leu	Asn	Ile	
215	Leu	Asn	Ile	
221	Leu	Asn	Ile	

다. 외막 단백질의 분석

외막 단백질의 변화로 fluoroquinolone의 투과도가 변화되는데, *E. coli*의 경우 fluoroquinolone은 우선적으로 OmpF porin을 통해 이동하는 것으로 알려져 있고, 내성균주는 이 porin이 소실 또는 감소되어 있는 경우가 많다. 이에 각각의 균주로부터 외막 단백질의 패턴을 관찰하기 위해 SDS-PAGE로 확인하였다 (Fig. 6).

Fig. 6. Profile of 15% SDS-PAGE showing OMPs of isolates which resistant to trovafloxacin. M, protein marker (kDa)



5. 임상에서 분리된 ESBL 생산 *E.coli*의 integron에 의한 항생제내성

임상으로부터 분리된 ESBL을 생산하는 *E. coli*의 항생제 내성이 integron에 의한 것인지 알아보하고자 하여 integron의 존재 여부를 확인하고, 존재가 확인된 균주에 대해서는 함유된 gene cassette의 특성을 파악하고자 하였다.

가. 균주의 특성

2001년에 분리된 임상 *E. coli* 233 균주중 ESBL을 생산하는 것으로 확인된 17 균주를 시험 대상으로 하였다. ESBL을 생산하는 17 균주는 β -lactam계 항생제에 대해 내성을 가질 뿐만 아니라 다른 항생제에 대해서도 높은 내성을 보였으며 (Table 14), 이들 항생제에 대한 내성은 주로 integron을 매개로 전달되는 것으로 알려져 있어 이들 균주에 대해 integron이 함유되어 있는지 확인하고자 하여 다음 실험을 진행하였다.

나. Integron 함유 *E. coli*

Integron을 함유하고 있는지 확인하기 위하여 *int* genes의 conserved regions을 증폭한 결과 ESBL 생산 *E. coli* 17 균주 중 총 13 균주(76.4%)가 integron을 함유하고 있는 것으로 나타났다. 이들 중 1 균주를 제외하고 12 균주가 플라스미드 상에 integron을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

다. Gene cassette regions의 특성

Class 1과 class 2 integrons의 함유 경향을 파악하기 위해 PCR로 증폭한 결과 12 균주가 class 1 integron을 가진것으로 나타났고, class 2 integron을 가진 균주는 단 한 균주도 없었다 (Fig. 7).

라. Gene cassette regions의 염기서열 분석

Integron에 있는 gene cassette를 규명하고자 하여, 2 균주 (86, 96)를 선별해 PCR로 증폭된 class 1 gene cassette regions을 염기서열 분석하였다. 그 결과 균주 86에 함유된 gene cassette는 streptomycin과 spectinomycin에 내성을 나타내는 *aadA1* gene cassette로 나타났다. 균주 96의 경우 streptomycin과 spectinomycin에 내성을 나타내는 *aadA5* gene cassette와 trimethoprim에 내성을 나타내는 type 1 dihydrofolate reductase인 *dfrA17* gene cassette를 가진 것으로 나타났다.

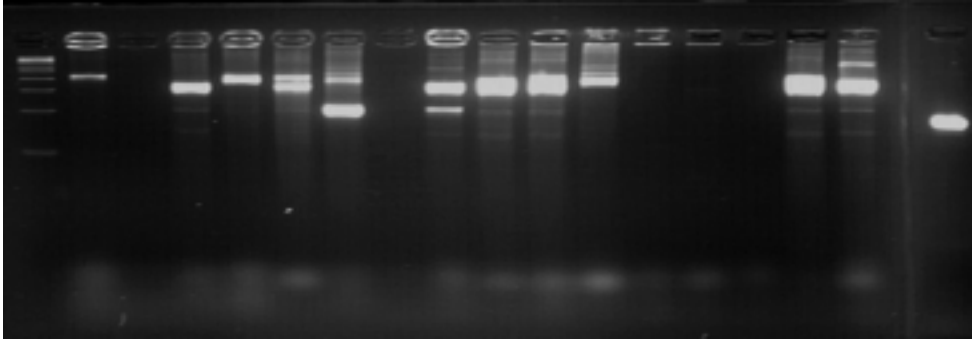
Table 14. Antimicrobial susceptibilities and type of ESBLs of *E. coli* isolates

No.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)									
	Amp ^a	Cep ^b	Gen ^c	Nor ^d	Tet ^e	Chl ^f	Tri ^g	Cef ^h	Ctx ⁱ	Cft ^j
14	>128	>128	8	64	2	8	<0.25	8	<0.25	0.5
15	>128	64	64	64	>128	>128	32	1	<0.25	<0.25
20	>128	128	64	0.5	>128	>128	32	8	32	128
25	>128	>128	64	<0.25	4	>128	32	4	8	32
81	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	8	2	64
86	>128	>128	>128	1	>128	>128	32	8	8	32
89	>128	>128	4	<0.25	2	8	0.5	2	64	2
96	>128	>128	>128	>128	>128	8	32	>128	16	8
98	>128	>128	>128	>128	>128	>128	32	4	16	16
120	>128	32	>128	>128	>128	>128	32	16	>128	128
129	>128	>128	>128	2	>128	>128	32	16	16	32
131	>128	128	64	<0.25	>128	4	<0.25	1	<0.25	2
152	>128	>128	128	<0.25	128	8	<0.25	2	16	32
154	>128	>128	>128	>128	128	>128	<0.25	4	16	2
168	>128	>128	>128	128	>128	>128	32	2	64	4
205	>128	64	1	0.5	128	>128	32	2	32	4
221	>128	>128	>128	<0.25	2	32	32	2	8	32

a, ampicillin b, cephalothin; c, gentamicin; d, norfloxacin; e, tetracycline f, chloramphenicol; g, trimethoprim h, ceftaxime i, cefotaxime; j, ceftazidime

Fig. 7. PCR products of different 15 gene cassettes in class 1 integrons of clinical isolates of *E. coli*. M, 1 kb DNA marker.

M 14 15 20 25 81 86 89 96 98 120 129 131 152 154 168 205 221



6. 임상에서 분리된 *E. coli*의 퀴놀론계 항생제에 대한 내성

임상에서 분리된 *E. coli* 중 quinolone계 항생제에 내성을 가지는 균주에 대한 내성 기전을 파악하고자 하여, quinolone내성 결정영역에 대한 *gyrA*와 *gyrB*의 변이와 quinolone제의 또 다른 표적이 되는 topoisomerase IV를 만드는 유전자인 *parC*와 *parE*의 변이를 확인하고자 하였다. 또한 균주 간의 유전적 다양성을 파악하기 위해 RAPD를 통한 유전자의 구조를 분석하였다.

가. MIC 측정

E. coli 43 균주 중 norfloxacin에 대해 내성을 가지는 균주는 38균주 (88.3%), nalidixic acid에 대해 내성을 가지는 균주는 40균주 (93.0%), ciprofloxacin에 대해 내성을 가지는 균주는 38균주 (88.3%), ofloxacin에 대해 내성을 가지는 균주는 38균주 (88.3%)였다 (Table 15). 퀴놀론 계열 항생제인 norfloxacin, nalidixic acid, ciprofloxacin, ofloxacin에 대해 내성을 가지는 *E. coli* 43균주 중 4개의 항생제에 대해 모두 내성을 나타낸 38균주를 실험 대상으로 하여 퀴놀론계 항생제에 대한 내성 기작을 알아 보기 위해 *gyrA*와 *gyrB*, *parC*와 *parE* 변이를 확인하였다.

Table 15. MIC of fluoroquinolone resistant isolates of *E. coli*

<i>E.coli</i> strains CCARM No.	MIC($\mu\text{g/ml}$)			
	Norfloxacin	Nalidixic acid	Ciprofloxacin	Ofloxacin
1391	>128	>128	128	64
1394	>128	>128	64	32
1396	>128	>128	128	128
1398	>128	>128	>128	128
1401	>128	>128	64	64
1402	>128	>128	64	32
1403	>128	>128	64	64
1405	>128	>128	64	32
1407	>128	>128	64	32
1408	128	>128	32	32
1412	>128	>128	>128	64
1413	128	>128	32	32
1415	>128	>128	>128	64
1417	>128	>128	128	64
1418	>128	>128	64	32
1419	>128	>128	64	32
1420	>128	>128	64	32
1423	>128	>128	>128	128
1424	>128	>128	>128	64
1425	>128	>128	128	32
1426	>128	>128	128	64
1421	128	>128	32	32
1390	128	>128	32	32
1392	128	>128	32	32
1399	>128	>128	128	32
1406	128	>128	32	16
1414	128	>128	32	16

1416	128	>128	32	16
1385	64	>128	16	16
1388	64	>128	16	16
1393	64	>128	32	16
1404	64	>128	32	64
1409	64	>128	16	16
1410	64	>128	16	16
1411	64	>128	16	16
1384	32	>128	16	16
1397	64	>128	16	16
1400	16	>128	8	8
1427	4	>128	0.5	2
1395	4	>128	1	2
1387	0.25	8	<0.125	0.5
1386	<0.125	4	<0.125	<0.125
1422	<0.125	4	<0.125	<0.125

나. *Escherichia coli* 의 *gyrA*의 유전적 분석

476-bp의 PCR 증폭산물을 염기서열 분석한 결과 QRDR의 *gyrA*에 대한 변화는 38균주 모두에서 *GyrA*의 83번째 아미노산이 Serine에서 Leucine으로 변이 된 것으로 나타났다. Aspartic acid인 87번째 아미노산의 변이를 확인한 결과 32균주가 Asparagine으로 변이되었고, 4균주가 Tyrosine으로, 1균주가 Histidine으로, 1균주가 Glycine으로 변이된 것으로 나타났다(Table 16).

다. *Escherichia coli* 의 *gyrB*의 유전적 분석

*GyrB*에서 변이가 가장 흔하게 발견되는 위치인 426번 위치와 447번 위치의 아미노산에는 아무런 변이가 발견되지 않았다. 그러나 28 균주에서 269번 위치의 Glutamic acid가 Lysine으로 변이된 것으로 나타났고, 457번 위치의 Phenylalanine이 9 균주에서 Serine으로, 7 균주에서 valine으로 변이되었으며, 12 균주에서 325번 위치의 Aspartic acid가 Asparagine으로, 15 균주에서 363번 위치의 Glutamic acid가 Lysine로 변이 되었다 (Table 17).

라. *Escherichia coli* 의 *parC*의 유전적 분석

Fluoroquinolone에 대해 내성을 나타내는 많은 균주에서 topoisomerase IV의 A subunit에서 돌연변이가 발견되고 있다는 보고가 있어, 본 연구에서도 *parC*에 대한 돌연변이 여부를 확인하였다. 397-bp의 QRDR 의 *gyrA* 아나로그인 *parC* 증폭산물을 염기서열 분석한 결과는 다음과 같다 (Table 16). 30 균주에서 80번 위치의 Serine이 Isoleucine으로 변이 되었고, 84번 위치의 Glutamic acid가 2 균주에서 Lysine으로, 2 균주에서 Glycine으로, 5 균주에서 Valine으로 변이된 것으로 나타났다.

마. *Escherichia coli* 의 *parE*의 유전적 분석

*parE*의 경우 10 균주에서 458번 위치의 Serine이 Alanine으로 변이된 것이 확인되었다 (Table 17).

Table 16. Mutations in QRDR of *gyrA* and *parC* for clinical isolates of *E. coli*

<i>E. coli</i> CCARM No.	<i>gyrA</i> Amino acid exchange	<i>parC</i> Amino acid exchange
1391	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Ala109(GCG)->Thr(ACG)
	Asp150(GAC)->Arg(GGA)	
1394	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1396	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1398	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Lys39(AAA)->Arg(TCG)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Pro40(CCT)->Thr(ACT)
	Asp150(GAC)->Ala(GCA)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
1401	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	GLU84(GAA)->LYS(AAA)
	Asp87(GAC)->Tyr(TAC)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
		Glu(GAA)84->Gly(GGA)
1402	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Leu158(CTA)->His(CAC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
1403	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Tyr(TAC)	
1405	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Glu84(GAA)->Val(GTA)
1407	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)

	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Glu84(GAA)->Val(GTA)
1408	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1412	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1413	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1415	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1417	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1418	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1419	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Glu84(GAA)->Gly (GGA)
1420	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Glu84(GAA)->Val(GTA)
1423	Ser83(TCG)->Val(GTA)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Tyr(TAC)	
1424	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1425	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Glu84(GAA)->Val(GTA)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
	Glu139(GAA)->Ala(TTG)	
1426	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Tyr(TAC)	
	Asp150(GAC)->Ala(GCC)	
	Glu152(GAA)->Gly(GAA)	
1421	Ser83(TCG)->Thr(ACC)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Gly(GGC)	
1390	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1392	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1399	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
	Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Glu84(GAA)->Val(GTA)

1406	Ser83(TCG)->Leu(TTG) Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Leu158(CTA)->Arg(CGA)
1414	Ser83(TCG)->Leu(TTG) Asp87(GAC)->Asn(AAC) Asp150(GAT)->His(CAC)	Ser80(AGC)->Ile(ATC) Met157(ATG)->Ile(ATC)
1416	Ser83(TCG)->Leu(TTG) ASP87(GAC)->Asn(AAC)	Glu84(GAA)->Lys(AAA)
1385	Ser83(TCG)->Leu(TTG) Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1388	Ser83(TCG)->Leu(TTG) Asp87(GAC)->His (CAC)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
1393	Ser83(TCG)->Leu(TTG) Asp87(GAC)->Asn(AAC) Asp150(GAC)->Tyr(TAT)	Arg44(CGC)->Ser(AGC) Ser80(AGC)->Ile(ATC)
1404	Ser83(TCG)->Leu(TTG) Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1409	Ser83(TCG)->Leu(TTG) Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Ser80(AGC)->Ile(ATC) Leu158(CTA)->His(CAT)
1410	Ser83(TCG)->Leu(TTG) Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
1411	Ser83(TCG)->Leu(TTG) Asp87(GAC)->Asn(AAC) Tyr149(TAT)->Thr(ACG) Asp150(GAC)->Leu(TTG)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
1384	Ser83(TCG)->Leu(TTG) Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Lys39(AAA)->Glu(GAA) Ser80(AGC)->Ile(ATC)
1397	Ser83(TCG)->Leu(TTG) Asp87(GAC)->Asn(AAC)	Ser80(AGC)->Ile(ATC)
1400	Ser83(TCG)->Leu(TTG) Asp87(GAC)->Asn(AAC)	
1427	Ser83(TCG)->Leu(TTG)	Leu158(CTA)->Cys(TGC)
1395	Ser83(CGG)->PHE(TTC)	GLY53(GGC)->GLU(GAG)
1387	Ser83(TCG)->Thr(ACC)	ALA142((GCT)->Ser(TCA) Leu152(TTG)->Met(ATG) Leu158(GCT)->Arg(CGT)

Table 17. Mutations in QRDR of *gyrB* and *parE* for clinical isolates of *E. coli*

CCARM No.	<i>gyrB</i>	<i>parE</i>
	Amino acid exchange	Amino acid exchange
1391		
1394	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Asp325(GAT)->Asn(AAT) Glu363(GAA)->Lys(AAA)	Ser458(TCG)->Ala(GCG)
1396	Leu232(CGT)->Pro(CCT) Lys233(AAA)->Glu(GAA) Phe457(TTC)->Ser(TCT)	
1398	Phe457(TTC)->Val(GTC)	
1401	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Glu363(GAA)->Lys(AAA) Phe457(TTC)->Val(GTC)	
1402	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Glu363(GAA)->Lys(AAA) Phe457(TTC)->Ser(TCT)	Ser458(TCG)->Ala(GCG)
1403	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Asp325(GAT)->Asn(AAT) Glu363(GAA)->Lys(AAA)	Ser458(TCG)->Ala(GCG)
1405	Glu354(GAG)->Arg(CGG) Glu363(GAA)->Lys(AAA)	Phe506(TTC)->Leu(CTT) Ile529(ATT)->Leu(CTT)
1407	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Asp325(GAT)->Asn(AAT) Glu363(GAA)->Lys(AAA) Thr382(ACC)->Pro(CCC) Phe457(TTC)->Ser(TCT)	Ile529(ATT)->Leu(CTT)
1408	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Asp325(GAT)->Asn(AAT) Thr382(ACC)->Pro(CCC) Phe457(TTC)->Ser(TCT)	Leu416(CTT)->Phe(TTT)
1412	Glu277(GAA)->Asp(GAT) Ile279(ATC)->Val(GTG) Asp292(GAT)->Thr(ACC)	Ser458(TCG)->Ala(GCG)

	Gln354(CAG)->Arg(CGT)	
	Ile357(ATT)->Val(GTG)	
	Arg359(CGT)->Gln(CAG)	
	Ile361(ATC)->Thr(ACT)	
	Glu363(GAA)->Val(GTG)	
	Lys379(AAA)->Leu(TTG)	
	Met383(ATG)->Gln(CAG)	
	Glu398(GAG)->Val(GTT)	
	Ile403(ATT)->Asp(GAC)	
	Phe457(TTC)->Val(GTC)	
1413	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	Ser458(TCG)->Ala(GCG)
	Lys356((AAA)->Val(GTG)	
	Phe457(TTC)->Val(GTC)	
1415	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	
	Glu363(GAA)->Lys(AAA)	
	Glu376(GAG)->Lys(AAG)	
	Arg420(CGT)->Cys(TGT)	
	Leu445(CTG)->Arg(CGA)	
	Phe457(TTC)->Val(GTC)	
1417	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	Ser458(TCG)->Trp(TGG)
	His335(CAC)->Arg(CGG)	
	Leu351(CTG)->Val(GTG)	
	Gln360(CAG)->Arg(CGG)	
	Glu363(GAA)->Lys(AAA)	
	Arg385(CGT)->Cys(TGT)	
	Phe457(TTC)->Val(GTC)	
1418	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	Ser458(TCG)->Ala(GCG)
	Leu404(CTG)->Pro(CCG)	
	Phe457(TTC)->Val(GTC)	
1419	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	
	Phe457(TTC)->Val(GTC)	
1420	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	Ile529(ATT)->Leu(CTT)
	Phe457(TTC)->Val(GTC)	
1423	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	Ser458(TCG)->Trp(TGG)
	Phe457(TTC)->Val(GTC)	
1424	Phe457(TTC)->Ser(TCT)	Ser458(TCG)->Trp(TGG)
1425	Glu400(GAA)->Leu(TTG)	Ile529(ATT)->Leu(CTT)
	Leu408(CTG)->Val(GTG)	
	Arg420(CGT)->Gly(GGT)	
	Leu421(CTG)->V(GTG)	
1426	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	Ser458(TCG)->Ala(GCG)
	Asp325(GAT)->Asn(AAT)	
	Gln354(CAG)->Lys(AAG)	
	Glu363(GAA)->Lys(AAA)	
	Glu376(GAG)->Lys(AAG)	
	Arg420(CGT)->Cys(TGT)	

1421	Phe457(TTC)->Ser(TCT) Glu269(GAA)->Lys(AAA) Ile282(ATT)->Phe(TTT) Asp285(GAT)->Asn(AAT) Asp325(GAT)->Asn(AAT) Phe457(TTC)->Val(GTC)	Ala512(GCG)->Thr(ACG)
1390	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Asp325(GAT)->Asn(AAT) Glu363(GAA)->Lys(AAA)	
1392	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Ser308(TCG)->Trp(TGG)	Leu416(CTT)->Phe(TTT)
1399	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Asp325(GAT)->Asn(AAT) Glu363(GAA)->Lys(AAA) Glu376(GAG)->Lys(AAG) Glu400(GAA)->Leu(TTG)	Ile529(ATT)->Leu(CTT)
1406	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Asp285(GAT)->Asn(AAT) Ala344(GCC)->Pro(CCC)	Leu416(CTT)->Phe(TTT)
1414	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Glu363(GAA)->Lys(AAA) Glu376(GAG)->Lys(AAG)	
1416	Phe457(TTC)->Ser(TCT)	
1385	Gln368(CAG)->Pro(CCG) Phe457(TTC)->Ser(TCT)	Leu416(CTT)->Phe(TTT)
1388	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Phe457(TTC)->Ser(TCT)	
1393	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Asp325(GAT)->Asn(AAT) Glu363(GAA)->Lys(AAA) Glu376(GAG)->Lys(AAG)	
1404	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Asp325(GAT)->Asn(AAT) Glu363(GAA)->Lys(AAA)	Ile468(ATC)->Ser(AGC)
1409	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Asp325(GAT)->Asn(AAT) Glu376(GAG)->Lys(AAG)	
1410	Glu269(GAA)->Lys(AAA) Asp285(GAT)->Asn(AAT) Ile298(CCG)->Leu(CTT) Asp325(GAT)->Asn(AAT) Val330(GTG)->Gly(GGG) Gly336(GGC)->Leu(CTG) Arg420(CGT)->Cys(TGT)	
1411	Asp268(GAC)->His(CAC)	

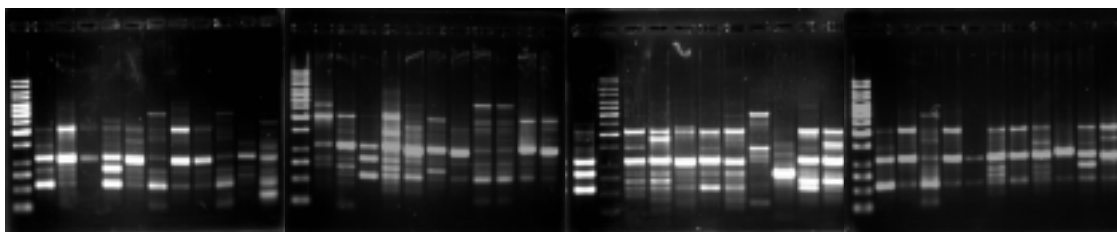
	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	
	Asp285(GAT)->Asn(AAT)	
	Ile313(ATC)->Met(ATG)	
	Arg420(CGT)->Cys(TGT)	
1384	Asp268(GAC)->Asn(AAC)	Lys508(AAA)->Glu(GAA)
	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	Phe510(TTT)->Leu(CTT)
	Arg420(CGT)->Cys(TGT)	
1397		
1400	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	
1427	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	Glu460(GAA)->Val(GTA)
	Glu277(GAA)->Asp(GAT)	
	Ile279(ATC)->Val(GTG)	
	Ala284(GCC)->Pro(CCT)	
	Asp292(GAT)->Thr(ACC)	
	Glu354(GAG)->Arg(CGT)	
	Ile357(ATT)->Val(GTG)	
	Arg359(CGT)->Gln(CAG)	
	Ile361(ATC)->Thr(ACT)	
	Glu363(GAA)->Val(GTG)	
	Lys379(AAA)->Leu(TTG)	
	Met383(ATG)->Gln(CAG)	
	Glu391(GAA)->His(CAC)	
	Glu398(GAG)->Val(GTT)	
	Glu402(GAA)->Asp(GAC)	
	Arg420(CGT)->Phe(TTT)	
1395	Glu269(GAA)->Lys(AAA)	
	His274(CAC)->Tyr(TAC)	
	Glu277(GAA)->Asp(GAT)	
	Ala284(GCC)->Ser(AGC)	
	Asp325(GAT)->Asn(AAT)	
	Glu354(GAG)->Asp(GAT)	
	Gly355(GGT)->Asn(AAC)	
	Ile357(ATT)->Val(GTT)	
	Arg359(CGT)->Lys(AAG)	
	Ile361(ATC)->Met(ATG)	
	Glu378(GAA)->Asp(GAC)	
	Glu402(GAA)->Asp(GAC)	
1387	Glu391(GAA)->Cys(TGC)	Ala512(GCG)->Thr(ACG)
	Glu398(GAG)->Val(GTT)	Glu545(GAG)->Ala(GCG)
	Ile402(ATT)->Asp(GAC)	
	Arg420(CGT)->Cys(TGT)	
1386		
1422	Glu363(GAA)->Arg(CGC)	

바. RAPD를 이용한 유전자 구조 분석

RAPD 패턴을 통해 유전자 구조를 분석한 결과는 Fig 8과 같다. *E. coli* 43 균주 중 15균주를 선별하여 phylogeny tree를 통해 패턴을 분석한 결과 균주 간에 연관성이 매우 낮은 것으로 나타났다 (Fig 9).

Fig. 8. RAPD profile of 43 clinical isolates of *E. coli*.

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 M 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 M 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 M 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44



1, CCARM1413; 2, CCARM1415; 3, CCARM1417; 4, CCARM1417; 5, CCARM1418; 6, CCARM1419; 7, CCARM1420; 8, CCARM1423; 9, CCARM1424; 10, CCARM1425; 11, CCARM1426; 12, CCARM1421; 13, CCARM1391; 14, CCARM1394; 15, CCARM1396; 16, CCARM1398; 17, CCARM1401; 18, CCARM1402; 19, CCARM1403; 20, CCARM1405; 21, CCARM1407; 22, CCARM1408; 23, CCARM1412; 24, CCARM1390; 25, CCARM1392; 26, CCARM1399; 27, CCARM1406; 28, CCARM1414; 29, CCARM1416; 30, CCARM1385; 31, CCARM1388; 32, CCARM1393; 33, CCARM1404; 34, CCARM1409; 35, CCARM1410; 36, CCARM1411; 37, CCARM1384; 38, CCARM1397; 39, CCARM1400; 40, CCARM1427; 41, CCARM1395; 42, CCARM1387; 43, CCARM1386; 44, CCARM1422

타내었다. 14 균주 (63.6%)는 norfloxacin에 대해 내성을 나타내었고, 2 균주는 (9.1%) ceftazidime에 대해 내성, 7 주는 (31.8%) cefotaxime에 대해 내성을 나타내었다. 1 주 (57-214)는 ceftazidime과 cefotaxime에 모두 내성을 나타내었다

다. β -lactamase 생산 균주의 검출

DDST와 pI를 실시하여 β -lactamase 생산 균주를 검출하였다. pI는 5.0, 5.6, 5.7, 6.0, 8.3, 9.2의 다양한 band를 확인할 수 있었고, 이로부터 AmpC, CMY, OXA, TEM을 추측하여 이들에 대해 PCR을 실시하였다. cephalothin-resistant isolates는 모두 AmpC를 생산하는 것으로 나타났다. 이와함께 16주는 TEM을 동시에 생산하였지만 4 주 (58-020, 58-145, 58-147, 58-165)는 AmpC만 생산하였다. 2 주는 OXA를, 다른 2 주는 CMY를 생산하는 것으로 나타났다.

라. 부착성 시험

T24 human bladder cells과 Caco-2 human intestinal epithelial cells에 대한 부착성 시험을 한 결과 (Fig. 10), 6 주는 T24 cells에 부착하였고, 2 주(55-100, 55-111)는 Caco-2 cells에 약하게 부착되는 것으로 나타났다. T24 cell에 부착성은 47에서 93 cells/field인데 반해, Caco-2 cells은 5에서 10 cells/field로 나타났다 (Table 19).

Table 19. Average number of bacterial cells adhered to human bladder cells in one field

Isolate No.	Bacterial cells/field ^a
55-100	92.900 ± 7.765
55-111	46.750 ± 3.161
55-127	89.925 ± 6.266
55-130	54.225 ± 5.042
57-214	76.225 ± 6.748
58-156	72.950 ± 13.530

^aNumber of bacterial cells attached to human bladder cells averaged over 20 fields

Table 18. MIC, growth inhibition zone in DDST, and ESBL genes detected with PCR of environmental isolates of *E. coli*

Isolate No.	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^a						Growth inhibition zone (mm) ^b						ESBL Genes ^c
	AMP ^d	NOR ^e	GM ^f	CAZ ^g	CEP ^h	CTX ⁱ	CAZ	CAZ+CA ^j	CEP	CEP+CA	CTX	CTX+CA	
55-100	≥128	<0.5	64	16.0	128	4	20.5	28.5	8.0	20.5	21.5	34.0	AmpC, TEM
55-101	≥128	32	64	<0.5	64	<0.5	25.0	23.5	10.0	15.5	27.0	31.0	AmpC, TEM
55-111	≥128	<0.5	64	16	128	8	18.5	27.5	9.0	20.0	20.5	31.0	AmpC, TEM, OXA
55-122	≥128	<0.5	64	16	64	4	19.0	29.5	10.0	20.0	21.5	24.0	AmpC, TEM
55-127	≥128	<0.5	64	8	128	4	20.0	28.0	8.0	19.5	21.5	31.5	AmpC, TEM
55-130	>128	<0.5	64	16	128	4	20.0	28.0	10.0	21.5	21.0	34.0	AmpC, TEM, OXA
55-135	>128	>128	64	32	128	8	17.5	17.5	9.0	17.5	20.0	22.5	AmpC, TEM
56-102	>128	<0.5	32	<0.5	64	<0.5	26.5	26.5	10.0	15.5	32.0	32.0	AmpC, TEM
56-107	>128	>128	>128	4	>128	64	23.0	29.5	6.0	22.5	13.5	30.5	AmpC, TEM
56-121	>128	32	32	4	>128	64	22.0	28.5	6.0	17.5	13.5	30.0	AmpC, TEM
56-155	>128	32	32	8	>128	64	22.0	27.5	6.0	17.5	13.5	29.5	AmpC, TEM
56-171	>128	32	32	8	>128	128	20.0	29.5	6.0	18.0	12.0	31.0	AmpC, TEM, CMY
57-214	>128	>128	128	32	>128	>128	14.5	16.5	6.0	7.0	6.0	12.5	AmpC, OXA
57-279	>128	32	32	8	>128	128	22.0	29.0	6.0	17.0	13.0	29.5	AmpC, TEM
58-007	>128	<0.5	32	2	>128	1	22.0	25.5	6.0	11.0	25.0	25.0	AmpC, TEM
58-020	>128	32	64	4	>128	32	22.0	28.5	6.0	20.0	15.5	29.0	AmpC
58-097	>128	<0.5	16	8	64	4	21.5	27.5	14.0	24.0	24.5	35.0	AmpC, TEM
58-145	>128	32	64	2	>128	32	22.0	29.0	6.0	20.0	15.5	28.5	AmpC
58-147	>128	32	64	2	>128	32	22.5	28.0	6.0	20.5	15.5	28.5	AmpC
58-148	>128	32	32	2	>128	64	21.0	27.5	6.0	19.0	15.5	28.5	AmpC, CMY
58-156	>128	>128	16	<0.5	128	<0.5	26.0	26.0	9.0	18.0	28.5	28.0	AmpC, TEM
58-165	>128	32	32	2	>128	32	20.5	26.0	6.0	19.5	15.0	27.5	AmpC

^aMinimal inhibitory concentration determined by agar dilution method; ^bGrowth inhibition zone by DDST; ^cESBL genes detected with PCR; ^dAmpicillin; ^eNorfloxacin; ^fGentamicin; ^gCeftazidime; ^hCephalothin; ⁱCefotaxime; ^jClavulanic acid (Resistance determined with MIC and size difference)

more than 5 mm in DDST are marked with a gray background)

마. ESBL 생산 환경분리 *E. coli*의 연관성

RAPD 패턴을 통한 균주간의 연관성을 확인한 결과 2 주를 제외하고, 각 균주간에 유사성이 매우 낮음을 알 수 있었다 (Fig. 11 and Fig. 12).

Fig. 10. Light microscopy of ESBL-producing *E. coli* adhered to T24 human bladder cells (A) and Caco-2 intestinal epithelial cells (B). Control: *E. coli* ATCC 25922.

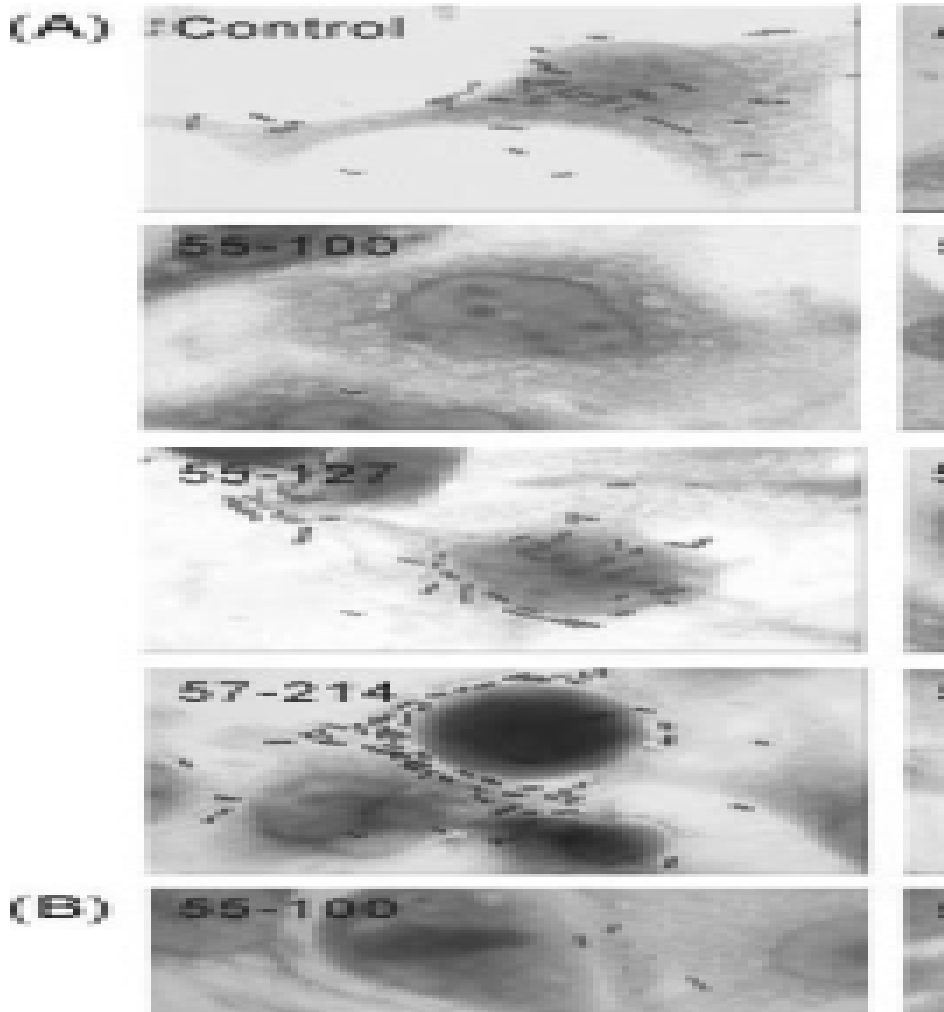
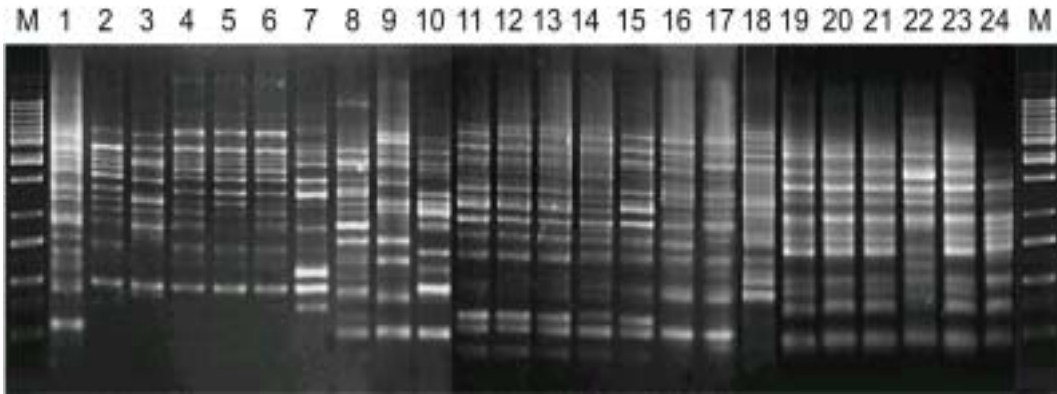
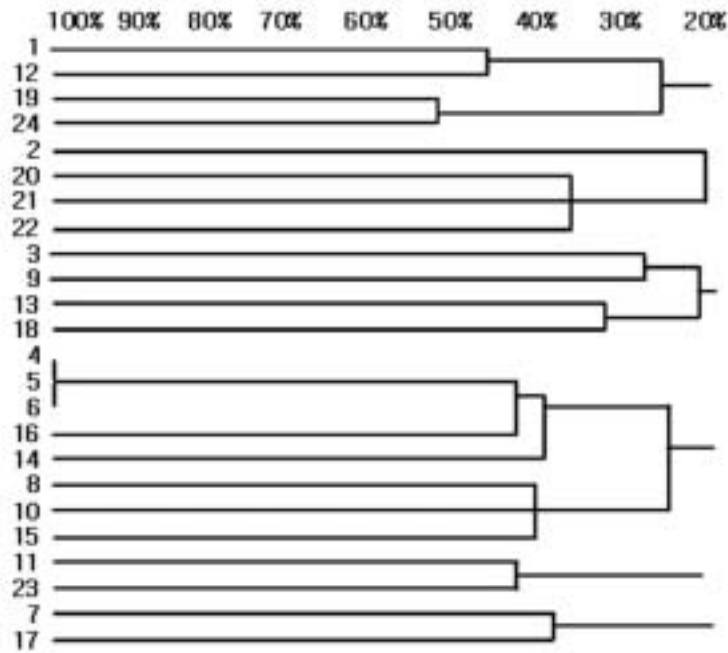


Fig. 11. Random amplified polymorphic DNA analysis.



Lanes: M, 1-kb DNA ladder; 1, *E. coli* ATCC 25922; 2, 55-100; 3, 55-101; 4, 55-111; 5, 55-122; 6, 55-127; 7, 55-130; 8, 55-135; 9, 56-102; 10, 56-107; 11, 56-121; 12, 56-155; 13, 56-171; 14, 57-214; 15, 57-279; 16, 58-7; 17, 58-20; 18, 58-97; 19, 58-145; 20, 58-147; 21, 58-148; 22, 58-156; 23, 58-165; 24, 58-173.

Fig. 12. Phylogeny of ESBL-producing *E. coli* based of RAPD. RAPD profile was carried out and groups were divided by 2% confidence.



Lanes: 1, *E. coli* ATCC 25922; 2, 55-100; 3, 55-101; 4, 55-111; 5, 55-122; 6, 55-127; 7, 55-130; 8,

55-135; 9, 56-102; 10, 56-107; 11, 56-121; 12, 56-155; 13, 56-171; 14, 57-214; 15, 57-279; 16, 58-7; 17, 58-20; 18, 58-97; 19, 58-145; 20, 58-147; 21, 58-148; 22, 58-156; 23, 58-165; 24, 58-173.

8. 항생제 내성 *E. coli* O157조사

가. 시료채취 및 *E. coli* O157 균주의 분리

충청, 전라, 경상지역의 목장, 도축장, 도계장, 식육가공공장, 축산물작업장 등에서 2000년 4월부터 2003년 9월까지 우리 나라 주요 산업동물인 소, 돼지, 닭 등에서 시료를 채취, 위에서 설명한 방법에 의하여 *E. coli* O157:H7 분리동정을 실시한 결과는 아래 Table 20과 같다. 총 시료 1,854점 중 *E. coli* O157:H7이 45시료에서 검출되었다. *E. coli* O157:H7는 소의 44시료에서 분리되었으며, 돼지의 1시료에서 분리되었고, 닭의 시료에서는 분리되지 않았다.

나. *E. coli* O157의 disk diffusion susceptibility 이용 내성 및 감수성 항생제조사

확인된 *E. coli* O157:H7 균주를 대상으로 NCCLS (National Committee of Clinical Laboratory Standard)의 방법에 따라 23종 항생제를 이용 disk diffusion susceptibility test 실시하여 1종 이상의 항생제에 내성이 있는 내성균주 32종을 확인하였다 (Table 21). 내성 균주들은 주로 piperacillin, ticarcillin, streptomycin, gentamicin, cephalothin, ampicillin, kanamycin, tetracycline등에 내성을 보였으며 기타 항생제에는 비교적 저항성이 없었다. 항생제 내성이 있는 32주 중 전 균주 (100%)가 streptomycin에 항생제 내성을 보였고, 30주 (93.8%)가 각각 tetracycline 과 sulfisoxazole에 내성을 보였다. 비교적 낮은 항생제 내성분포가 ceftriaxone (1, 3%), chloramphenicol (3, 9%), gentamicin (4, 12%), amoxicillin/clavulonic acid (5, 15%), trimethoprim/sulphamethoxazole (21%)에서 관찰되었다. 흥미롭게도 두개의 균주가 fluoroquinolone계 항생제인 ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin에 내성을 나타내었다. 전 균주가 amikacin, imipenem, cefoprazon 및 cefazolin에 감수성을 보였다. 항생제 내성균주 32주에서 13개의 서로 다른 항생제 내성형이 관찰되었다 (Table 22). 가장 흔한 항생제 내성형은 내성균주의 11주 (34.4%)에 해당되는 streptomycin-tetracycline-kanamycin-ampicillin-piperacillin-cephalothin-sulfisoxazole-ticarcillin형 이었다. 분리된 45주의 *E. coli* O157 중 28주 (62.2%)가 4가지 이상의 항생제에 내성을 나타내었다. 3주가 각각 10, 12, 13종의 항생제에 내성을 나타내었다. 이들 다제내성 균주 중 2균주가 fluoroquinolone계 항생제에 내성을 나타내었다. 13개의 항생제 내성형 중에서, 각각의 내성형에 속하는 대표적인 1~2개의 균주를 선택하여 총 18개의 균주를 대상으로 10종의 항생제에 대한 MIC를 실시하였다. 이들 균주에 대한 MICs 분포는 Table 23과 같다. 총 18균주 중 12, 7, 18, 6, 6, 17, 14, 15, 14, 10주가 각각 amikacin, cefazolin, cefoperazone, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, nalidixic acid, norfloxacin, ofloxacin, trimethoprim/sulphamethoxazole의 감수성 범위 내에 분포하였다.

Table 20. Isolation of EHEC 0157 from major food animals in Korea (2000. 4월~2003. 9월)

Date	Cattle		Pig		Chicken	
	Samp No	Posi No	Samp No	Posi No	Samp No	Posi No
2000, Apr	27	0	21	0	0	0
May	38	4	15	0	0	0
Jun	30	3	0	0	81	0
Jul	15	2	36	0	27	0
Aug	32	3	15	0	78	0
Sep	70	3	0	0	28	0
Oct	95	2	0	0	0	0
Nov	30	0	0	0	29	0
Dec	20	0	12	0	27	0
2001, Jan	25	0	15	0	27	0
Feb	20	0	19	0	81	0
Mar	57	0	7	0	0	0
Apr	25	0	0	0	0	0
May	30	3	12	0	0	0
Jun	50	4	35	0	0	0
Jul	54	3	28	0	0	0
Aug	19	0	31	0	0	0
Sep	20	0	0	0	0	0
Oct	38	0	0	0	0	0
Nov	34	0	0	0	0	0
Dec	0	0	36	1	0	0
2002, Jan	26	0	20	0	0	0
Feb	0	0	0	0	48	0
Mar	0	0	0	0	44	0
Apr	25	0	0	0	0	0
May	12	1	0	0	0	0
Jun	25	1	0	0	0	0
Jul	18	1	8	0	0	0
Aug	31	3				
Sep	25	2				
2003, May	30	1				
Jun	45	2				
Jul	27	2				
Aug	19	1				
Sep	45	3				
Total	1,074	44	310	1	470	0

Samp No: Number of animals or Flocks (chicken) sampled

Posi No: Numbers of presence of *E.coli*0157 from the samples

Table 21. Tendency of antibiotic-resistance of 32 *E. coli* O157 isolates

Antimicrobial agent	No. of isolates(%)
Streptomycin	33(100%)
Tetracycline	30(94%)
Sulfisoxazole	30(94%)
Kanamycin	27(84%)
Ampicillin	22(69%)
Ticarcillin	22(69%)
Piperacillin	20(63%)
Cephalothin	19(59%)
Minocycline	11(34%)
Trimethoprim/Sulphametoxazole	7(22%)
Amoxicillin/Clavulonic acid	5(16%)
Gentamicin	4(13%)
Chloramphenicol	3(9%)
Nalidixic acid	3(9%)
Ciprofloxacin	2(6%)
Ofloxacin	1(3%)
Norfloxacin	1(3%)
Ceftriaxone	1(3%)
Amikacin	0(0%)
Imipenem	0(0%)
Cefoperazone	0(0%)
Cefazoline	0(0%)

Table 22. Distribution of antibiotic-resistance patterns in 32 *E. coli* O157 isolates

Type	Resistance pattern	No. of isolates(%)
1	S	4(12.5%)
2	S + TE + K+G	4(12.5%)
3	S+TE+AM+PIP+G+TIC	1(3.1%)
4	S+TE+AM+PIP+CF+G+TIC	1(3.1%)
5	S+TE+K+AM+PIP+CF+G+TIC	11(34.4%)
6	S+TE+K+AM+PIP+CF+MI+G+TIC	3(9.4%)
7	S+TE+K+MI+SXT+C+G	2(6.2%)
8	S+TE+K+AM+MI+AmC+G+TIC	1(3.1%)
9	S+TE+K+AM+MI+SXT+GM+G+TIC	1(3.1%)
10	S+TE+K+SXT+AmC+GM+NA+G	1(3.1%)
11	S+TE+SXT+AmC+GM+NA+CIP+G+OFX+NOR	1(3.1%)
12	S+TE+K+AM+PIP+CF+MI+SXT+AmC+GM+NA+CIP	1(3.1%)
13	S+TE+K+AM+PIP+CF+MI+SXT+AmC+C+CRO+G+TIC	1(3.1%)

S, Streptomycin; TE, Tetracycline; G, Sulfisoxazole; K, Kanamycin; AM, Ampicillin; TIC, Ticarcillin; PIP, Piperacillin; CF, Cephalothin; MI, Minocycline; SXT, Trimethoprim/Sulphamethoxazole; AmC, Amoxicillin/Clavulonic acid; GM, Gentamicin; C, Chloramphenicol; NA, Nalidixic acid; CIP, Ciprofloxacin; OFX, Ofloxacin; NOR, Norfloxacin; CRO, Ceftriaxone

Table 23. Distribution of MICs for 18 selective *E. coli* O157 isolates

Antibiotic (BP ^a)	Number of isolates for which the MIC(g/ml) was as follows :									
	≤0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
AN(≤16, ≥64)							12	6		
CFZ(≤8, ≥32)						7	11			
CFP(≤16, ≥64)			13			1	4			
CIP(≤1, ≥4)			6	10	1	1				
GM(≤4, ≥16)					6	7	5			
IPM(≤4, ≥16)		1	2	4	10	1				
NAL(≤16, ≥32)						4	10	2	1	1
NOR(≤4, ≥16)		2	11	1	1	1	1	1		
OFX(≤2, ≥8)		1	12	1	2	1	1			
SXT ^b (≤2/38, ≥4/76)	1	3		6	4		4			

AN, Amikacin; CFZ, Cefazolin; CFP, Cefoperazone; CIP, Ciprofloxacin; GM, Gentamicin; IPM, Imipenem; NAL, Nalidixic acid; NOR, Norfloxacin; OFX, Ofloxacin; SXT, Trimethoprim/Sulphamethoxazole

^aBreakpoints for susceptible and resistant isolates by MIC

^b0.25=0.25/4.75; 0.5=0.5/9.5; 2=2/38; 4=4/76; 16=16/304

다. Motility assay와 PCR에 의한 유전자 검출

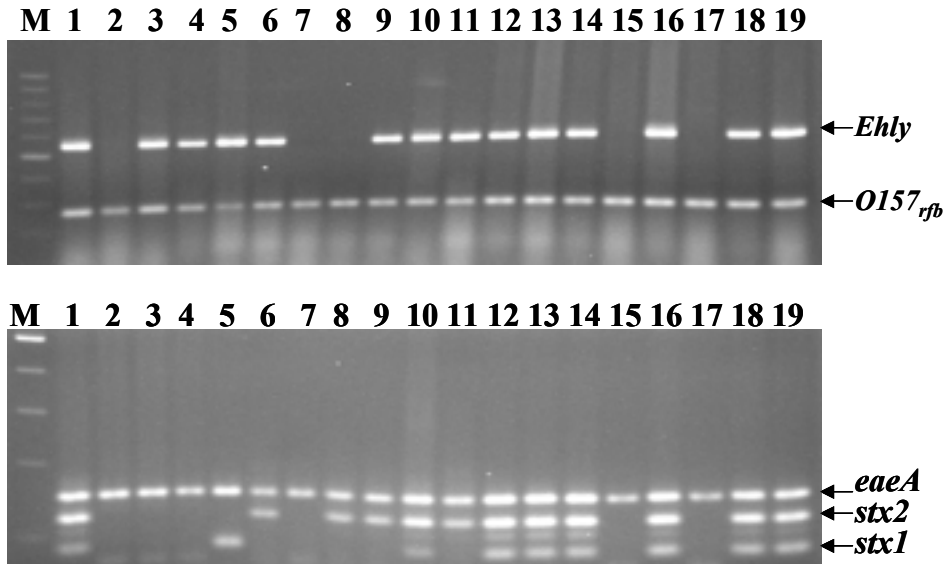
Serological test로 최종적으로 O157에 속하는 균주 32개중 8개가 non-motile로 확인되었다 (Table 24). 독성유전자 검색을 위해 상기한 PCR primer를 이용 PCR을 실시한 결과, 23개의 균주에서 *stx1* 또는 *stx2*을 지니고 있는 것으로 나타났으며 3개는 *stx1* 만 9개 *stx2*만 11개는 두 개 *stx* 유전자를 가지고 있는 것으로 나타났다. 또한 24개가 *Ehly*을 가지고 있었고, 모든 균주에서 *eaeA* gene을 지니고 있었다 (Table 24 and Figure 13).

Table 24. Characteristics of EHEC O157 isolates from calves

Diarrhea	Serotype	No. of isolates	Presence of following virulence genes				
			<i>rfaA</i>	<i>hlyA</i>	<i>eaeA</i>	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
+	H7	8	+	+	+	+	+
+	H7	2	+	+	+	+	-
+	H7	5	+	+	+	-	+
+	H7	1	+	-	+	-	+
+	H7	3	+	+	+	-	-
+	H7	1	+	-	+	-	-
+	NM	2	+	+	+	+	+
+	NM	1	+	+	+	+	-
+	NM	1	+	+	+	-	+
-	H7	1	+	+	+	+	+
-	H7	2	+	-	+	-	+
-	NM	4	+	-	+	-	-

+, presence; -, absence

Figure 13. Representative gels for multiplex PCR amplification of DNA extracted from selected *E. coli* O157 isolates from cattle showing presence of diverse virulence genes.



EhlyA (543 bp) and *rfbEO157* (259 bp) genes on the top pictures, and *eaeA* (384 bp), *stx2* (255 bp) and *stx1* (180 bp) genes on the bottom picture. Lane M, DNA size marker; lane 1 to 18, cattle origin *E. coli* O157; lane 19, ATCC 43894 *E. coli* O157. The relative positions in the gel of predicted size of PCR products are indicated by arrowheads on the right sides.

라. *E. coli* O157:H7의 Vero cell cytotoxicity Assay

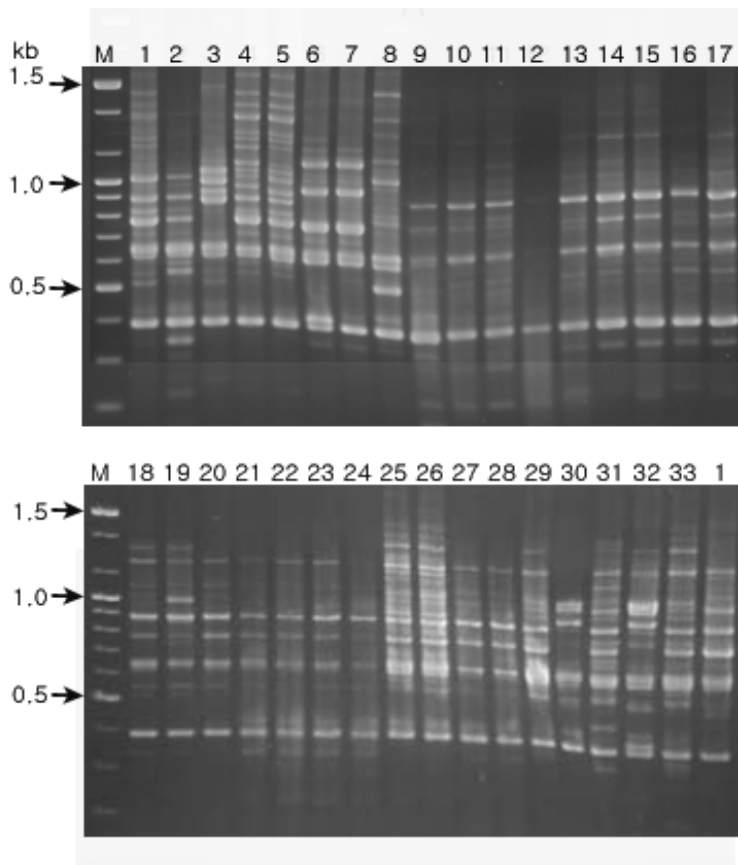
BHI broth 증균시킨 배양액을 96well 에 배양하여 vero cell monolayer에 첨가 한 후 18-24시간 배양, 전자현미경으로 vero cell의 사멸 정도를 관찰하여 cytotoxicity 정도를 판정한다. 판정 시 사멸된 세포의 정도에 따라 등급을 0에서 10으로 분류하였다. 31개의 균주 중 *stx2*, 혹은 *stx1*과 *stx2*를 가진 균주가 대체적으로 높은 독성상태를 보였다.

마. RAPD patterns

32주의 *E. coli* O157 내성균주들간의 유전적 상관성을 파악하고자 AP-PCR로 시험하였다. 이 실험을 통하여 32균주 중 육안적으로 8개의 서로 다른 RAPD majority pattern (types A~H)이 관찰되었다 (Fig. 14). GelCompar 분석에서 RAPD type A, B, C, F는 각각 96, 90, 96, 88 %의 유전적 상관성을 나타내었다. 가장 많은 빈도의 RAPD pattern은 20개 (62.5%)의 균주가 해당되는 type F였으며, 이는 다시 6가지의 subtype (F₁~F₆)로 분류되었

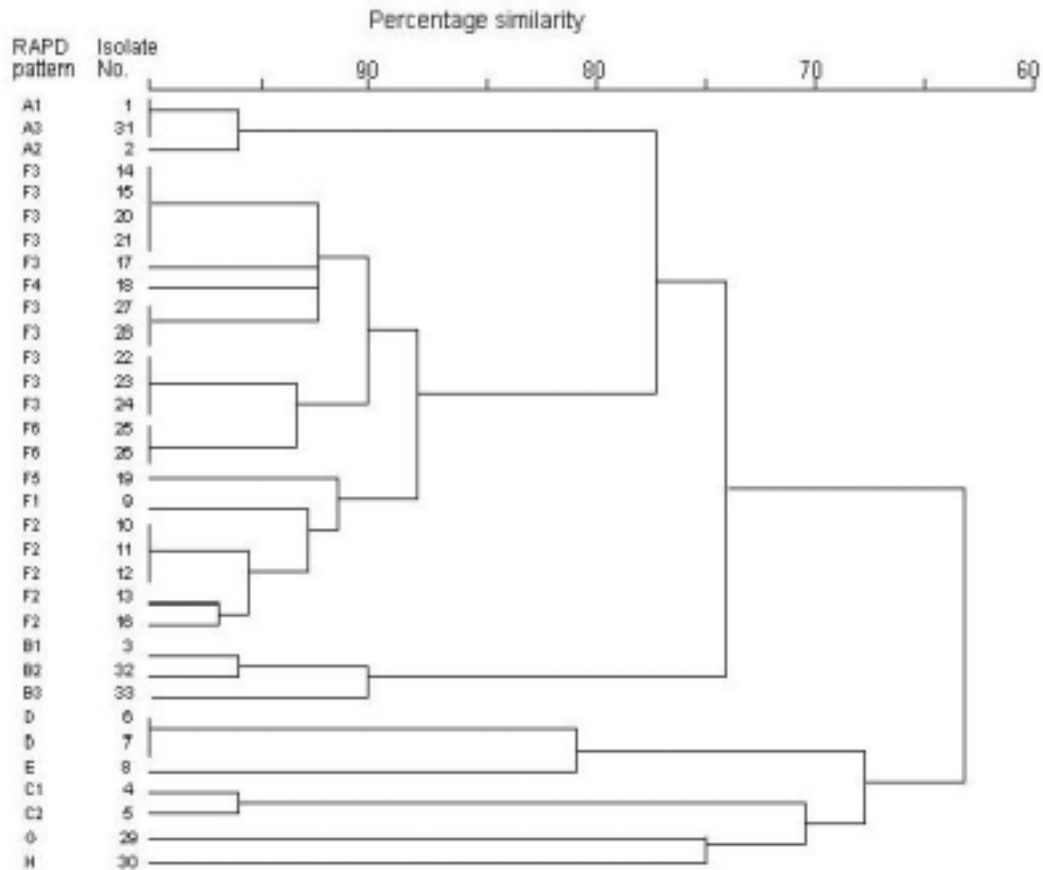
다. 이들 6가지의 subtype 중 F₃ (11, 55%)이 가장 높은 빈도를 보였다. 각 내성균주들간의 RAPD 패턴과 항생제 내성유형의 분석결과 RAPD-F₃ type에 속하는 11개의 모든 균주들은 항생제 내성유형 Type 5에 속했다. 항생제 내성유형 type 7, 8, 9, 10에 속하는 균주들은 각각 RAPD pattern type D, E, G, H에서 관찰되었다. 본 실험에서 10가지 이상의 항생제에 내성이 있는 3주는 RAPD Pattern type B (subtypes B₁~B₃)에서 관찰되었다. 그러나, 항생제 내성유형 Type1에 속하는 균주들은 두가지의 RAPD pattern (types A, C)를 나타내었고, 이들 두 RAPD pattern은 서로 다른 양상을 보였다 (Fig. 14). GelCompar 분석을 통한 RAPD type A와 RAPD type C에 해당되는 균주들 사이의 유전적 상관성은 단지 63%에 불과했다 (Fig. 15).

Fig 14. RAPD patterns of antibiotic resistant-*E. coli* O157 isolates from generated by arbitrarily primed-PCR with primer M13.



Isolate number (in accordance with Fig .14) are indicated above the lanes, and molecular weight markers (M). Molecular sizes are indicated on the left. RAPD patterns of isolates generated by the primer are designated as A to H (shown in Fig. 15) based on visual interpretation of RAPD results generated by the primer.

Fig 15. Dendrogram showing the level of similarity between RAPD patterns of 33 antibiotic resistant-*E. coli* O157 isolates as determined by arbitrarily primed-PCR with primer M13 and subsequent GelCompar analysis of digitized photographs.



Scale indicates level of genetic relatedness within this set of isolates. Each pattern of isolates is designated as A to H based on visual interpretation of combined RAPD results shown in Fig 14.

바. *E. coli* O157:H7의 내성기전과 연관 연구 결론

항생제 내성에 관한 본 연구에서는 한국소에서 분리한 항생제 내성 *E. coli* O157의 높은 분포를 보였다. 소의 분변에서 분리한 45주의 *E. coli* O157에 대한 22종의 항생제 감수성 시험에서, 32주 (71.1%)가 최소한 한 가지 이상의 항생제에 내성을 나타내었다. 이들 내성균주 32주 중에서 32주 (100%), 30주 (93.8%), 30주 (93.8%)가 각각 streptomycin, tetracycline, sulfisoxazole에 내성을 나타내었다. 내성균주 32주 중 28주 (87.5%)가 4가지 이상의 항생제에 내성을 나타내었다. 소에서 이러한 *E. coli* O157 균주의 높은 항생제 내성분포는 매우 놀라운 일이었다. 이러한 결과는 이제까지 발표된 *E. coli* O157에 대한 항생제 내성 중 가장 높은 분포를 나타내는 것이었다. 미국에서 최근 발표된 연구 결과에서는 소에서 분리된 *E. coli* O157 균주에서 tetracycline과 sulfa drugs에 각각 20% 와 14%의 항생제 내성을 보였고, 이들 균주의 7.2% 만이 4가지 이상의 항생제에 내성을 나타내었다. 이러한 항생제 내성균주 출현은 농장에서의 항생제 과다사용에 기인한다(20, 21, 23, 26). 한국에서는 동물의 질병 치료·예방 및 성장촉진 등의 목적으로 항생제가 남용되고 있다. 이러한 항생제의 무분별한 사용은 *E. coli* O157 균주들 간의 높은 항생제 내성분포의 원인이 될 수 있다. 집약적으로 가축이 사육되는 농장에서 항생제가 무분별하고 과도하게 사용되고 있으며, *E. coli* O157균주는 이러한 항생제들에 대한 내성을 획득할 수 있다. 특히 소는 사육되는 환경에서 많은 항생제에 노출되어 있기 때문에, *E. coli* O157의 무증상 전달자로서 내성균주의 주요 병원소(reservoir)로서 작용할 수 있다. 본 연구에서는 모든 항생제 내성균주들이 streptomycin에 내성을 나타내었고, 이러한 항생제에 높은 내성은 농장에서 aminoglycoside계 항생제의 과도한 사용에 기인한다고 생각된다. 이러한 결과들은 aminoglycoside계 항생제는 이 지역 가축의 *E. coli* O157에 더 이상 효과가 없으며 또한 더 나아가 이러한 항생제의 사용이 금지되어야 한다고 생각된다. *E. coli* 다제내성은 내성유전자를 다양한 항생제에 전파시킬 수 있는 plasmids, transposons, intergrons 같은 유전적 요소에 기인한다. 다제내성 *E. coli* O157균주의 높은 분포는 공중보건학적으로 심각한 문제가 되고있다.

Fluoroquinolone계 항생제는 내성이 드물며, gram-negative 세균에 효과가 탁월하다고 알려져 있다. 그러나 본 실험에서 2균주가 fluoroquinolone계 항생제인 cirprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin에 내성을 보였다. 이 결과는 fluoroquinolone계 항생제에 내성이 있는 *E. coli* O157 균주가 이지역에 분포됨을 알 수 있었다. 한국에서 fluoroquinolon계는 시판되고 수의분야에서 사용되고 있다. Fluoroquinolone계 항생제에 내성이 있는 *E. coli* O157 균주의 출현은 가축 사육환경에서 enrofloxacin의 남용과 오용에 기인한다고 생각된다. Fluoroquinolone계 항생제에 내성을 나타내는 *E. coli* O157균주들은 또한 10종 이상의 항생제에 내성을 나타내었다. 항생제에 내성이 있는 *E. coli* O157의 대부분은 인간에게 심각한 질병을 초래할 수 있으며, 미래 치료를 위한 항생제 선택에 어려움을 초래할 수 있다고 생각된다. 이러한 사실들은 공중보건을 보장하기위해 수의분야에서 항생제 사용에 관한 감시

체계의 확립과 *E. coli* O157균주들 간의 항생제 내성출현에 대한 지속적인 감독 강화가 필요하다. 이처럼 *E. coli* O157균주들의 높은항생제 내성분포에도 불구하고 몇몇 항생제에 높은 감수성을 나타낸다는 점은 무척 고무적이었다. 모든 균주가 amikacin, imipenem, cefoperazon, cefazoline에 항생제 감수성을 나타내었다. 18주의 항생제 내성균주들의 MIC에 따른 항생제 감수성 시험결과 전균주가 cefoperazone에 항생제감수성 범위내에 있었다. Imepenem 항생제에는 17주가 항생제 감수성 범위내에 있었으며 1주가 중간내성범위내에 있었다. 어떤 항생제는 Shiga toxin-encoding bacteriophages를 유도하여 Shiga toxin의 분비를 촉진시킬 수 있다. 하지만 imipenem은 *E. coli* O157의 Shiga toxin과 endotoxin의 낮은 분비를 유도하는 것으로 알려져 있다. 그리하여 imipenem은 *E. coli* O157 감염증을 치료하는데 안전하고 효과적인 항생제임을 알 수 있었다.

E. coli O157 virulence marker의 PCR분석에서 항생제 내성 *E. coli* O157 균주의 모든 균주 (32주)와 27주는 각각 *eaeA*와 *EhlyA*에 양성을 나타내었다. 이들 내성균주의 대부분은 accessory virulence factor인 intimin 과 enterohemolysin을 생성함을 알 수 있었다. 더불어 25주가 *stx2* 또는 *stx2/stx1*에 양성이었다. 인간질병과 관련된 균주 중 Shiga toxin type 2를 생산하는 균주는 Shiga toxin type 1을 생산하는 균주보다 독성이 강하며, hemolytic-uremic syndrome과 같은 심각한 합병증을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이 점은 한국에서 항생제 내성 *E. coli* O157의 대부분은 인간에게 심각한 질병을 유발할 수 있음을 알 수 있었다.

AP-PCR을 통해 생성되는 RAPD분석은 세균을 분류하는데 유용한 molecular method로 인정되고 있다. 32개의 *E. coli* O157 내성균주들간의 유전적 상관성을 파악하고자 RAPD patterns을 분류하였다. 이 실험을 통하여 32균주 중 육안적으로 8개의 서로다른 RAPD majority pattern(pattern A~H)이 AP-PCR을 통해 관찰되었다 GelCompar분석에서 같은 RAPD pattern내에 있는 균주 간은 상당히 높은 유전적 상관성을 보였다. 예외적으로 항생제 내성형 type 1에 속하는 균주들은 서로 상당히 다른 양상을 나타내는 RAPD type에 속하였지만, 각 내성균주의 항생제 내성형과 RAPD 유형의 분석결과 두 유형간은 대체적으로 일치함을 보였다. RAPD를 통한 항생제 내성 *E. coli* O157 분류는 항생제 내성유형과 일치함을 보였으며, 이 결과를 통하여 RAPD는 *E. coli* O157의 항생제 내성유형을 분류하는데 유용한 도구가 될 수 있음을 알 수 있었다.

제6절 *Campylobacter* spp.의 내성기전과 연관 연구

1. PCR 이용 *Campylobacter jejuni* / *coli* 확인

Campylobacter jejuni 와 *C. coli*를 분리하기 위해 Gonzalez 등의 방법을 사용하였다. 포

준균주로 ATCC 33560 *C. jejuni* 와 ATCC 33559 *C. coli*를 사용하였으며, 생닭, 돼지고기 및 쇠고기에서 *C. jejuni* (793bp)가 검출되었고, 생닭에서만 *C. coli*(894bp)가 검출되었다. *C. jejuni* 만을 검출하는 primer를 사용한 경우에는 *C. coli*는 검출되지 않았으며(그림(a)), *C. coli* 만을 검출하는 primer를 사용한 경우에는 *C. jejuni*는 전혀 검출되지 않았다(그림(b)).

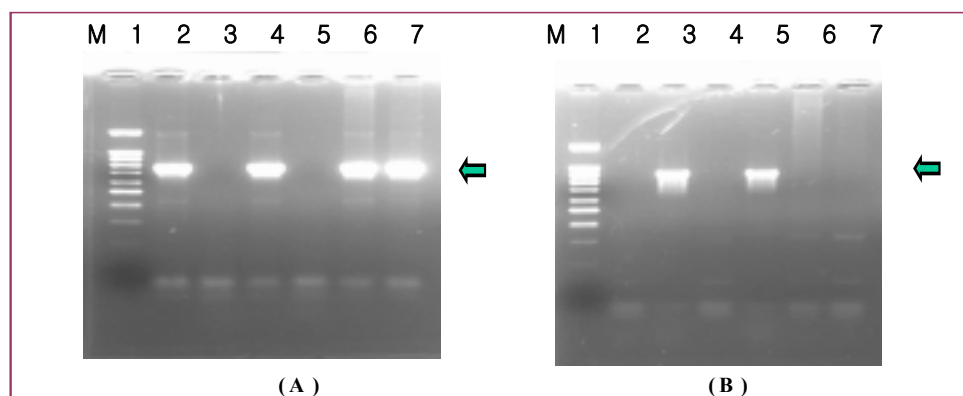


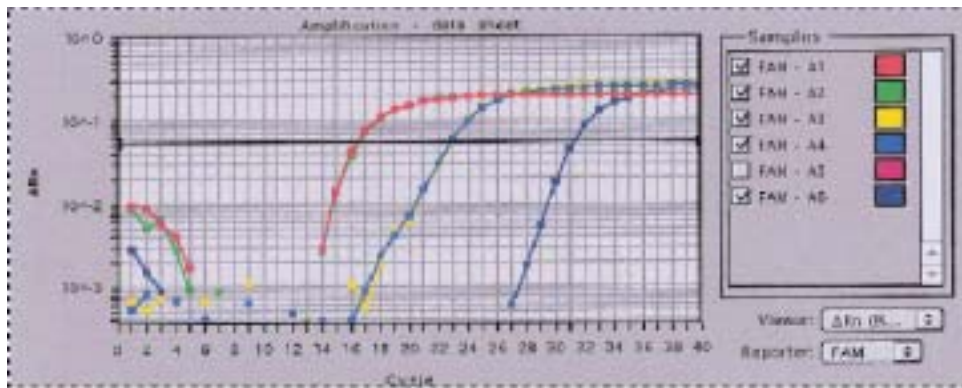
Fig. 3. PCR을 통한 *C. jejuni* and *C. coli* 확인

(A) *C. jejuni*-specific primer를 이용한 전기영동 사진(793bp) (B) *C. coli*-specific primer를 이용한 전기영동 사진 (894bp) Lane 1 : *C. jejuni* ATCC 33560, Lane 2 ; *C. coli* ATCC 33559, Lane 3:생닭 유래 *C. jejuni* ; Lane 4 :생닭 유래 *C. coli* ; 5,돼지고기 유래 *C. jejuni*, Lane 6, 쇠고기 유래 *C. jejuni*. Lanes marked M are DNA size marker (1-kb ladder; Intron biotech., Korea)

2. Real time PCR을 통한 *Campylobacter* 균 확인 (ABI SDS 7700)

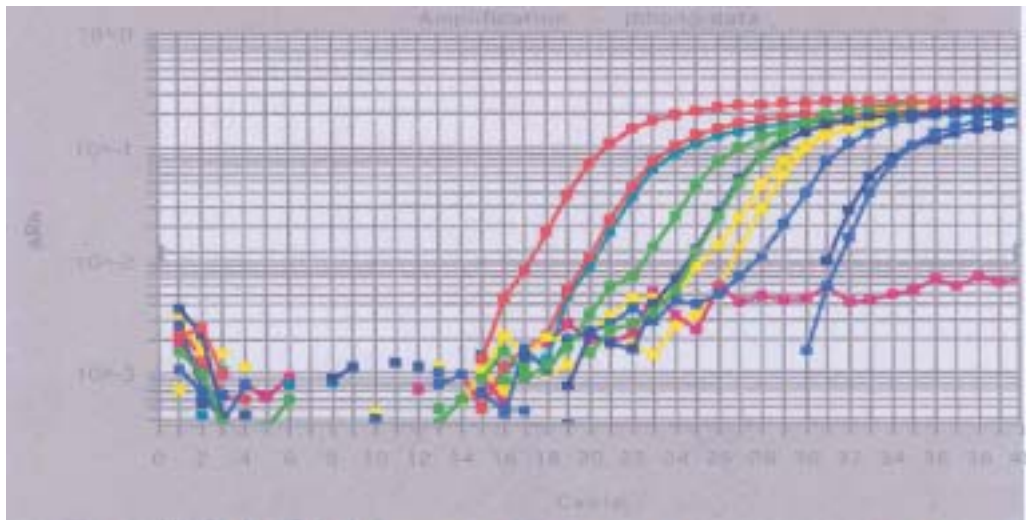
Real time PCR을 통한 방법은 적은 균량으로도 측정을 할 수 있는 방법으로 반응액에 10 CFU인 경우에도 검출이 가능하다(Nogva 등, 2000). Fig 2에서는 *Campylobacter* spp. 를 검출하기 위해 real time PCR을 이용하였다. Fig 2 의 (A)에서는 *C. jejuni*를 검출한 그림으로 A1은 ATCC 33560 *C. jejuni*를 검출한 그림으로 PCR의 15 Cycle 정도부터 측정 가능한 fluorescence를 띄기 시작한 것을 나타냈다. 다른 wide type *C. jejuni*도 반응이 나타남을 알 수 있었다. (B)에서는 B1에 ATCC 33559 *C. coli*를 검출하기 위한 그림으로 17 Cycle에서 측정 가능한 fluorescence를 띄기 시작한 것으로 나타냈다. B2에서는 No template로 균의 template를 넣지 않은 것으로 반응이 나타나지 않았다. 나머지 B3부터 B12는 wide type *C. coli* 반응을 한 것으로 반응이 나타남을 알 수 있었다.

Fig. 4. Real time PCR을 통한 *Campylobacter jejuni* 와 *coli* 검출



(A) *Campylobacter jejuni*의 검출그림.

A1 : ATCC 33560 *C. jejuni*, A2 : *C. jejuni* 1, A3 : *C. jejuni* 2, A4 : *C. jejuni* 3, A5 : *C. jejuni* 4, A6 : *C. jejuni* 5



(B) *Campylobacter coli*의 검출그림.

B1 : ATCC 33559 *C. coli*, B2 : No template, B3 : *C. coli* 1, B4 : *C. coli* 2, B5 : *C. coli* 3, B6 : *C. coli* 4, B7 : *C. coli* 5, B8 : *C. coli* 6, B9 : *C. coli* 7, B10 : *C. coli* 8, B11 : *C. coli* 9, B12 : *C. coli* 10

3. *C. jejuni* 및 *C. coli* 항생제 내성 측정

*Campylobacter*의 경우 주요 식중독 원인균으로 최근들어 특히 Quinolone 및 Macrolide 항생제 등에 대한 내성균의 출현이 크게 문제가 되고 있다. 본 연구기간중 돈육, 우유 및 계육에서 분리된 *C. jejuni* 및 *C. coli*에 대한 항생제 감수성 검사 및 최소억제농도(MIC) 측정, 퀴놀론계 항생제 내성 유발관련 유전자(*gyrA* gene) 검출등을 통하여 항생제 내성 *Campylobacter*에 대한 분석을 실시하였다. 특히 *Campylobacter*에서 문제시되는 퀴놀론계항생제는 Nalidixic Acid에서 비교적 최근에 개발되어 사용되는 Ciprofloxacin에 이르기까지 연구에 사용된 전 quinolone제재에 대하여 고도내성을 보였으며 Quinolone계 항생제의 Target인 *gyrA* gene의 point mutation도 PCR 및 증폭산물의 염기서열분석(Sequencing)을 통하여 확인하였다. 그러나, Fig. 1의 1번 분리균주는 내성유전자는 확인할 수 없었으나 항생제 감수성시험에서 내성을 보였고, 11번 분리균주는 내성유전자가 확인되었음에도 불구하고 항생제 감수성 시험에서는 감수성을 보였는데 이는 퀴놀론계항생제 내성유발의 주요인으로 알려진 mutated *gyrA* gene 이외에 Efflux pump, *parC* & *parE* 등이 기타 요인 복합적으로 작용하였을 것으로 추정한다. 특히, 항생제 내성을 보이는 항생제가 국내 동물용 사료의 사료 첨가용 항생제로 사용되는 CTC(Chlortetracycline), Tylosin(Macrolide), Sulfathiazole(Sulfa-), Carbadox, Linsmycin(Lincomycin + Spectinomycin), Apramycin(Gentamicin과 유사한 Aminoglycoside), Neomycin(Aminoglycoside) 등의 항생제와 연관성을 가지고 있다는 점에서 사료 첨가 항생제에 의한 항생제 내성 유발 가능성을 제기할 수 있다고 사료된다.

Table. 1. Comparison of antimicrobial resistance profiles of *C. jejuni* and *C. coli* isolates from chicken (n=194) and *C. jejuni* isolates human (n=13).

Antimicrobial agent	MIC brakpoint (ug/mL)	No.(%) of <i>Campylobacter</i> spp.			
		<i>C. jejuni</i> (n=104)		<i>C. coli</i> (n=103)	Total (n=207)
		chicken origin (n=91)	human origin (n=13)		
Ciprofloxacin	5	95(45.9)		96(46.4)	191(92.3)
		84(40.6)	11(5.3)		
Erythromycin	15	4(1.9)		18(8.7)	22(10.6)
		4(1.9)	0(0.0)		
Nalidixic acid	30	98(47.3)		93(45.0)	191(92.3)
		87(42.0)	11(5.3)		
Tetracycline	30	79(38.1)		87(42.1)	166(80.2)
		69(33.3)	10(4.8)		

4. *Campylobacter* 분리균주에서의 quinolone계항생제 내성유발 관련 유전자 확인

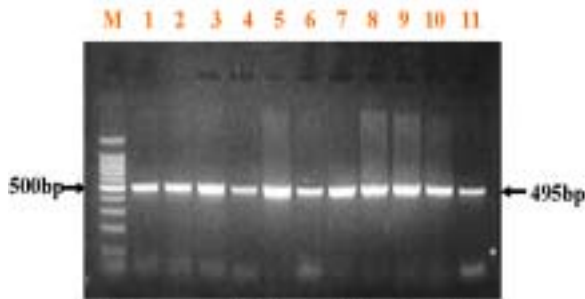


Fig. 1 Agarose gel of thermophilic *Campylobacter*-specific PCR products of isolates

M, 100-bp DNA ladder(Promega); 1,Y0 0630-7;
2,Y0 0630-8-4; 3,Y0 0630-9-2; 4,Y0 0630-9-3;
5,Y0 0630-15-4; 6,Y0 0630-21-2; 7,Y0 0630-24-1;
8,Y0 0803-22-1; 9,Y0 0803-22-2; 10,Y0 0803-22-3;
11,Y0 0803-23-2

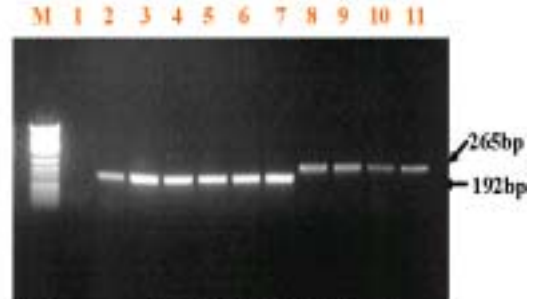


Fig. 2 Agarose gel of of MAMA PCR products

M, ϕ X174DNA/*Hinf* I Marker(Promega); 1,Y0 0630-7;
2,Y0 0630-8-4; 3,Y0 0630-9-2; 4,Y0 0630-9-3; 5,Y0
0630-15-4; 6,Y0 0630-21-2; 7,Y0 0630-24-1; 8,Y0 0803-
22-1; 9,Y0 0803-22-2; 10,Y0 0803-22-3; 11,Y0 0803-23-
2; 2 through 7, DNAs from *gyrA* mutant *C. coli* (192-bp
PCR products were generated); 8 through 11, DNAs
from *gyrA* mutant *C. jejuni*(265-bp PCR products were
generated)

5. *Campylobacter* spp. 임상균주의 PFGE 결과

SM 1 2 3 4 5 SM 6 7 8 9 10 11 12 13

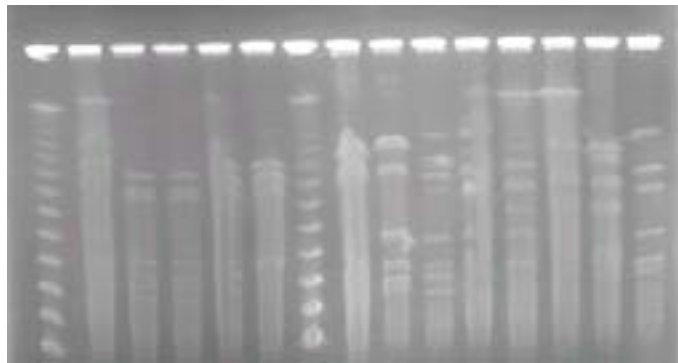


Fig 5. 임상에서 분리한 PFGE pattern for *Campylobacter* spp.

SM : Mid Range PFG Marker (BioLabs), Lane 1 : *C. jejuni* 임상균주 1, Lane 2 : *C. jejuni*
임상균주 2, Lane 3 : *C. jejuni* 임상균주 3, Lane 4 : *C. jejuni* 임상균주 4, Lane 5 : *C. jejuni*
임상균주 5, Lane 6 : *C. jejuni* 임상균주 6, Lane 7 : *C. jejuni* 임상균주 7, Lane 8 : *C. jejuni*
임상균주 8, Lane 9 : *C. jejuni* 임상균주 9, Lane 10 : *C. jejuni* 임상균주 10, Lane 11 : *C.*
jejuni 임상균주 11, Lane 12 : *C. jejuni* 임상균주 12, Lane 13 : *C. jejuni* 임상균주 13

제 3 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 목표달성도

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
1차년도 (2001년)	<p><제1세부과제> 서울대 박용호</p> <p>동물, 및 사료 중 항생제 내성 유전자 발현 병원성 세균 검출</p>	<p>○ 축산물, 사료 및 축산분변 유래 항생제 내성 세균 분리 동정 및 항생제 내성 유전자 확인</p> <p><i>Salmonella enteritica</i> subsp. <i>enteritica</i> serovar Typhimurium DT104(ACSSuT내성) 및 Multi-drug resistant <i>Salmonella</i> spp. (<i>cmlA/tetR</i>, <i>bla_{PSE-1}</i> <i>bla_{TEM}</i> genes)</p> <p><i>Staphylococcus aureus</i>(MRSA, VRSA 및 VISA; <i>mecA</i>, <i>femA</i> genes)</p> <p><i>Enterococcus faecalis</i>, <i>E. faecium</i>(VRE;<i>vanA</i>, <i>vanB</i>, <i>vanC-1</i>, <i>vanC-2</i> genes)</p> <p><i>Escherichia coli</i>(Multi-drug resistant EHEC;<i>hlyA</i>, <i>mphA</i>)</p> <p>Quinolone resistant <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>(<i>gyrA</i> gene)</p> <p>- 분리, 동정된 항생제 내성 병원성 세균에 대한 내성유전자(genotype) 및 표현형(phenotype)확인</p>	100
	<p><제1협동과제> 서울여대 이연희</p> <p>동물, 축산물, 사료 및 임상증상 인체 내성균주 검 따른 내성기전 분석 및 상호연관성검사</p>	<p>○ 분리 내성균주의 항생제 내성 유전자 분석 및 내성 유발 기전 확인(항생제 Target의 변화, Efflux mechanism에 의한 세포막으로 항생제 배출, Antibiotic inactivating enzyme 생산등 해당 항생제에 따른 내성기전 규명)</p> <p>○ 축산물 관련 내성균주 분리 및 특성 조사</p> <p>- 주요 축산물 관련 및 인체 임상균주 상호연관성 연구</p> <p>· <i>Salmonella enteritica</i> subsp. <i>enteritica</i> serovar Typhimurium DT104(ACSSuT내성) 및 Multi-drug resistant <i>Salmonella</i> spp.</p> <p>· <i>Staphylococcus aureus</i>(MRSA, VRSA 및 VISA)</p> <p>· <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>E. faecium</i>(VRE)</p> <p>· <i>Escherichia coli</i>(Multi-drug resistant EHEC)</p> <p>· Quinolone resistant <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i></p>	100

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
1차년도 (2001년)	<p><제2협동과제> 고려대 김우주</p> <p>임상증상 인체내성균 유전자 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 임상증상 인체 내성균주 감염 실태 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 주요 임상균주 분리 및 동정 <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Salmonella enteritica</i> subsp. <i>enteritica</i> serovar Typhimurium DT104(ACSSuT내성) 및 Multi-drug resistant <i>Salmonella</i> spp. ▪ <i>E. faecalis</i>, <i>E. faecium</i>(VRE) ○ 분리 균주의 항생제 내성 유전자 분석 	100
	<p><제3협동과제> 전북대 이존화</p> <p>동물, 축산물중 항 생제내성 MRSA 및 VISA 검 출</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 전라, 경상지역의 소, 돼지, 닭 등 우리나라 주요 가축 소화기관에 분포하고 있는 항생제 내성 MRSA와 VISA 검출확인 ○ 축산물 분포 항생제 내성 MRSA와 VISA 검출확인 ○ 대규모 방목장과 소규모 사육장 및 사료중 항생제 내성 MRSA와 VISA 감염률 파악 ○ 내성약제 이후의 감수성 약제 선발 연구 	100

구분	연구개발목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
2차년도 (2002년)	<p data-bbox="363 555 561 633"><제1세부과제> 서울대 박용호</p> <p data-bbox="363 701 582 920">도축장 및 축산물 판매업소의 축산물 중 항생제 내성 세균 출현양상 파악</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 주요 축산물 위해 미생물 동정 및 항생제 내성 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 축산물 위해 미생물 오염 실태 조사 - 주요 축산물 위해 미생물 분리, 동정 <i>Salmonella enteritica</i> subsp. <i>enteritica</i> serovar Typhimurium DT104(ACSSuT내성) 및 Multi-drug resistant <i>Salmonella</i> spp. ○ <i>Staphylococcus aureus</i>(MRSA, VRSA 및 VISA; <i>mecA</i>, <i>femA</i> genes) ○ <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>E. faecium</i>(VRE;<i>vanA</i>, <i>vanB</i>, <i>vanC</i>-1, <i>vanC</i>-2 genes) ○ <i>Escherichia coli</i>(Multi-drug resistant EHEC;<i>hlyA</i>, <i>mphA</i>) ○ Quinolone resistant <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i>(<i>gyrA</i> gene) - 분리, 동정된 미생물의 항생제 감수성 검사 실시를 통한 내성패턴 확인 ○ 분리 균주의 항생제 내성별 분류 <ul style="list-style-type: none"> - 각각의 내성에 관련된 유전자 조사 - 변이유전자 분석 및 전이성 조사 ○ 항생제 내성 유전자 조사에 의한 내성 균주 출현양상 파악 	100
	<p data-bbox="363 1279 561 1357"><제1협동과제> 서울여대 이연희</p> <p data-bbox="363 1424 582 1644">인체 임상분리 균주의 항생제 내성 기전 및 축산물 유래 균주의 상관성 검사</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차년도에서 분리한 <ul style="list-style-type: none"> - <i>Salmonella enteritica</i> subsp. <i>enteritica</i> serovar Typhimurium DT104(ACSSuT내성) 및 Multi-drug resistant <i>Salmonella</i> spp. - <i>Staphylococcus aureus</i>(MRSA, VRSA 및 VISA) - <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>E. faecium</i>(VRE) - <i>Escherichia coli</i>(Multi-drug resistant EHEC) - Quinolone resistant <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i> 균주의 항생제 내성 유전자 조사 ○ 항생제 내성 유전자 검출 <ul style="list-style-type: none"> - PCR 등의 기법을 이용하여 검출 - Isoelectrofocusing electrophoresis 등의 기법을 이용하여 검출 ○ PFGE에 의한 내성균주의 유전자 패턴 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 동물 분리 균주의 유전자 pattern 비교 - 동물 분리 균주와 임상균주와의 연관성 조사 ○ RAPD 방법에 의한 내성균주 유전자 패턴 분석 ○ 인체 분리 항생제 내성 균주와의 분자 생물학적 상관성 분석 	100

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도
2차년도 (2002년)	<p><제2협동과제> 고려대 김우주</p> <p>임상 증상 인체 내성균의 유전자적 상관성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 임상증상 인체 내성균 유전자 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 임상검체로부터 다제내성균 분리 <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Salmonella enteritica</i> subsp. <i>enteritica</i> serovar Typhimurium DT104(ACSSuT내성) 및 Multi-drug resistant <i>Salmonella</i> spp. ▪ <i>E. faecalis</i>, <i>E. faecium</i>(VRE) ○ VRE의 내성유전자, 분자역학적 연구 (Overlapping PCR, Sequencing을 이용한 <i>vanA</i> cluster mapping) <ul style="list-style-type: none"> - Plasmid analysis - PFGE (pulsed-field gel electrophoresis) ○ <i>Salmonella</i> spp.의 내성유전자, 분자역학적 연구 <ul style="list-style-type: none"> - PCR, sequencing을 이용한 내성유전자 검색 (퀴놀론 내성, <i>parC</i>, <i>gyrA</i> gene point mutation,DT104) - RAPD (Random-amplified polymorphic DNA) 	100
	<p><제3협동과제> 전북대 이존화</p> <p>주요가축의 항생제내성 <i>E. coli</i> O157:H7의 조사와 감수성약제 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 소, 돼지, 닭 등 우리나라 주요 가축 소화기관에 분포하고 있는 항생제 내성 <i>E. coli</i> O157:H7의 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 주요 가축 소화기관으로부터 <i>E. coli</i> O157:H7 분리, 동정 - 분리, 동정된 <i>E. coli</i> O157:H7의 항생제 감수성 검사 실시 ○ 식용에 이용될 축산물들에 분포하는 항생제 내성 <i>E. coli</i> O157:H7의 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 주요 가축 소화기관으로부터 <i>E. coli</i> O157:H7 분리, 동정 - 분리, 동정된 <i>E. coli</i> O157:H7의 항생제 감수성 검사 실시 ○ 대규모 방목장과 소규모 사육장 그리고 그곳에 사용하는 사료에 항생제 내성 <i>E. coli</i> O157:H7의 오염도 조사 ○ 감염시 치료제를 위한 감수성약제 조사 	100

구 분	연구 개발 목 표	연구개발 내용 및 범위	달성도
3차년도 (2003년)	<제1세부과제> 서울대 박용호 항생제 내성 균 주들의 내성인자 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 분리된 주요 축산물 균주의 주요 항생제 내성 유전자 특이 검출 기법 확립 ○ 항생제 내성 유전자 검출에 의한 내성 균주의 성상 연구 	100
	<제1협동과제> 서울여대 이연희 축산물 유래 균 주와 임상 분리 균주의 상관성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1,2 차년도에서 분리한 <ul style="list-style-type: none"> · <i>Salmonella enteritica</i> subsp. <i>enteritica</i> serovar Typhimurium DT104(ACSSuT내성) 및 Multi-drug resistant <i>Salmonella</i> spp. · <i>Staphylococcus aureus</i>(MRSA, VRSA 및 VISA) · <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>E. faecium</i>(VRE) · <i>Escherichia coli</i>(Multi-drug resistant EHEC) · Quinolone resistant <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>C. coli</i> 균주의 항생제 내성 유전자 분석 ○ 동물, 축산물 및 인체 임상 분리균주와의 연관관계조사 <ul style="list-style-type: none"> - 동물, 축산물 및 인체 임상 분리균주의 내성 유전자 비교 조사 - 인체분리주와 동물분리주의 상관성 조사 	100
	<제2협동과제> 고려대 김우주 다제내성균의 유전자 형별 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 분리된 다제내성균주들의 내성 기전 검사 <ul style="list-style-type: none"> - 다제내성균주들의 특징 조사 - 다제내성균주들의 항생제에 대한 내성기전 검사 ○ 임상분리균주와의 연관관계 조사 <ul style="list-style-type: none"> - 동물, 축산물 및 인체 임상 분리 균주의 내성 유전자 비교 연구 - 내성 유전자 상호 관련성 조사 	100
	<제3협동과제> 전북대 이준화 항생제내성 MRSA, VISA 및 <i>E. coli</i> O157:H7의 내성인자 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 주요 항생제 내성 유전자 특이 검출 기법 확립 ○ 항생제 내성 유전자 검출에 의한 내성 균주 성상 분석 ○ 인체분리 항생제 내성 균주와 분자 생물학적 상관성 분석 	100

--	--	--	--

제2절 관련분야에의 기여도

지난 10여년간 전 세계적으로 가축과 인체에 위협이 되고 있는 세균의 항생제 내성 출현이 커다란 문제로 대두되고 있다. 특히 축산업에서 성장촉진제로 항생제가 사용되면서 발생하는 가축에서의 항생제 내성균 출현은 가축 부산물의 섭취와 그에 따른 인체에서의 항생제 내성균에 의한 인수공통감염이 우려되고 있다. 여러 가지 항생제에 동시내성을 나타내는 다제 내성균에 의한 감염은 치료가 더욱 어려워지고 있다. 항생제 내성균 감염의 치료에서의 문제점은 축산업에서뿐만 아니라, 이들 세균에 오염된 축산물을 통한 인체 감염의 치료에 있어서도 문제를 야기할 수 있다. 항생제 내성균 감염의 대두는 축산업에 있어서 비용증가와 생산량 저하의 문제를 일으키고, 인체 감염에서는 고가항생제 사용 및 입원치료기간의 증가로 인한 의료비용증가, 합병증 및 사망률의 증가를 일으키는 문제가 있다.

한국에서도 국제교류가 활발해지고 더불어 외국의 병원성 세균들의 유입가능성이 더욱 많아지고 축산물수입이 증가됨에 따라 이를 통한 신종세균의 국내 확산이 가속화될 전망이다. 이들 세균들은 대부분 여러 가지 항생제에 내성을 나타내고 있어 그 치료가 점차 어려워지고 있다. 또한 이들 대부분은 인수공통전염병으로 나타나고 있어 공중보건상 가장 심각한 위해 요인들이다. 이들 내성균들은 우리나라와 같이 특별한 항생제 선택 체계가 없고, 일반인들이 항생제를 쉽게 구할 수 있어 사회적으로 항생제가 과다하게 남용되고 있는 등 급격한 내성증가 요인은 다른 나라 보다 훨씬 크다. 항생제 내성증가는 새로운 고가 항생제 사용증가, 치료기간 증가, 사망률 등을 증가시키고 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위해서는 우리나라에서 만연되고 있는 이들 내성세균들의 분포와 감염 및 오염율을 정확히 파악해야 한다. 그럼으로써 이들 세균들이 전파되는 경로를 차단할 수 있고 근절할 수 있는 대책이 확립된다. 저항성 항생제 조사와 내성기전에 관련된 분자생물학적 그리고 유전학적 성상을 조사함으로써 약제에 내성이 되기 전 초기 감염시 적절한 항생제 투여를 위한 항생제 선택을 이룰 수 있다.

본 연구에서는 인수공통감염증을 일으킬 수 있는 다항생제 내성균중에서 대표적인 병원균을 대상으로 축산물과 인체에서의 발생빈도, 항생제 내성율, 분자역학적 관련성 및 항생제내성기전의 연구를 수행하였다.

본 연구를 통해 축산물과 인체감염에서 문제가 되고 있는 항생제 내성세균들의 분포와 감염율을 정확히 파악하고 이들 세균들이 전파되는 경로를 차단함과 동시에 근절할 수 있는 대책을 확립하고자 하였다. 본 연구 결과가 관련 분야의 기술 발전에 미치는 영향은 다음과 같이 요약할 수 있겠다.

1. 축산물과 인체감염에서 다항생제 내성세균의 분포도 파악을 통한 전파 경로 차단 및

근절 대책 마련

2. 다항생제 내성세균의 분리법 및 항생제 감수성 검사 방법 확립
3. 내성기전에 관련된 분자생물학적, 분자유전학적 성상 조사
4. 다항생제 내성세균의 항생제 내성기전 및 출현기전 조사
5. 임상 분리 세균과 축산 유래의 균주의 항생제 내성 정도와 발생 분포 모니터링
6. 가축 분리 항생제 내성 균주의 인체 임상 분리 균주로 내성 전달 경향 모니터링
7. 가축, 환경 분리 내성 균주와 임상 분리 균주 간의 항생제 내성 전달 차단 대책 마련
8. 축산업에서 항생제 사용 지침 및 항생제 내성균 감시 체계 수립의 방향 제시를 위한 기본자료 구축

제 4 장 연구개발결과의 활용계획

제1절 활용계획

본 연구 결과를 바탕으로 향후 인체분리 균주와의 생물학적 상관성 분석, 내성 유전자의 패턴 분석을 수행하여 종합된 결과를 바탕으로 각 시도 가축위생시험소나 보건연구소에 축산물 중 항생제 내성 균주 분리 기술을 전수하는 한편 관련정보를 지속적으로 제공하고 또한, 축산물에서 분리되는 내성균과 인체 분리주 간의 유전적 상관성 분석에 따라 축산가에서 안전하고 효과적으로 사용할 수 있는 항생제에 대한 자료를 제공하는 한편, 선진외국농가의 항생제 사용관련지침과 대체물질사용정보를 제공함으로써 안전하고 인체무해한 축산물 생산을 지속적으로 기할 수 있을 것이다.

1. 축산물 중 항생제 내성 주요 식중독 원인균의 분자생물학적 특성 파악
: 기술전수 (각 시도 가축위생시험소 등)
2. 축산물 및 사람임상 유래 항생제 내성균주 내성정도 파악 및 분포 모니터링
: 축산농가 정보제공
3. 가축 및 축산물, 환경유래 항생제 내성균의 인체 임상내성균으로의 내성전달기전 경향 분석: 기초자료
4. 가축 및 축산물, 환경유래 항생제 내성균 및 인체 임상내성균 지속적 모니터링
: 시책건의
5. 축산농가에서의 항생제 사용지침 및 항생제 내성균 감세체계수립 방향제시
: 시책건의 및 농가 정보제공

제2절 발표 실적

1. 논문게제(국제 SCI 논문게제 13편, 3편 투고준비, 국내 SCI 3편 투고완료)

1. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization., *Veterinary Microbiology*, 86: 295-301, 2002

2. Methicillin(oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Applied and Environmental Microbiology, 69(11); 6489-6494, 2003
3. Structural studies of *Streptococcus pneumoniae* EPSP synthase in unliganded State, tetrahedral intermediate bound state and S3P-GLP bound state, Molecular Microbiology, 51(4) 963-71, 2004
4. Occurrence and characteristics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in calves associated with diarrhoea. Veterinary Microbiology, 98;323-328, 2004
5. Emergence of *vanA* Genotype Vancomycin-Resistant Enterococci with Low or Moderate Levels of Teicoplanin Resistance in Korea. Journal of Clinical Microbiology, 42(4):1785-6, 2004.
6. Oral inoculation of A/J mice detects invasiveness differences between *Listeria monocytogenes* epidemic and environmental strains., Infection and Immunity, 72(7):4318-21: 2004.
7. Rapid screening of *Salmonella* spp. using PBM BioSign™ *Salmonella* test and evaluation of the PBMS test. Asian-Australian Journal of Animal Science, 2004, accepted.
8. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in KOREA., International Journal of Food Microbiology. 2004, Accepted.
9. Detection of Extended Spectrum β -Lactamase Producing Multi-Drug Resistant Environmental Isolates of *Escherichia coli* That Bind to Human Bladder Cells., Antimicrobial Drug Resistance, 2004, Accepted.
10. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea, International Journal of Food Microbiology, 2004, Accepted.
11. Evaluation of MRSA-screen latex agglutination test for the Detection of Animal Origin methicillin-resistant *staphylococci*, Journal of Clinical Microbiology, 42(6): 2780-2, 2004.

12. Isolation and identification of *E.coli* O157:H7 using different detection methods and molecular determination by multiplex PCR and RAPD., Journal of Veterinary Science. 2004, submitted to publication.
13. Epidemiological investigation of VRE of KOREA., Vet. Microbiology. 2004, Accepted.
14. Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* sp. from cattle farms in the NW US., Veterinary Microbiology, 2004, Accepted.
15. Characterization and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated in Korea. Vet Microbiology, 2004, In preparation
16. Characterization of transposon Tn1549 associated with the *vanB2* gene cluster in enterococci isolated from Korea., Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004, In preparation.
17. Identification of a multiresistant pheromone responding region of *vanB*-carrying plasmid(pJWK41) in *Enterococcus faecalis*., Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, In preparation.
18. Low Prevalence of Fecal VRE Colonization in Healthy People Despite High Recovery in Farm Animals and Raw Chicken Meat in Korea. Korean Journal of Internal Medicine. 2004, submitted to publication.
19. 한국에서 사람과 가축에서 분리된 *Salmonella*의 분자유전학적 연구. 감염과 화학요법, 2004, submitted to publication.

2. 학회 발표(국제학회 5편, 국내학회 10편)

1. Antibiotic resistant *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Campylobacter jejuni* isolated from poultry processing in Korea, IAFP conference, San Diego USA, 6/30-7/3, 2002
2. Prevalence and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* sp. isolated

from cattle farms in the northwestern United States. CRWAD meeting (Conference of Research Workers in Animal Diseases. Chicago, U.S.A. 2003. 11.8 -11.11)

3. Characterization of Staphylococcal cassette chromosome *mec*(*Sccmec*) complex integrated in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates in Korea. 대한수의학회, 2003.

4. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria* species and *Staphylococcus aureus* isolated from poultry carcasses. 대한수의학회, 2003.

5. Susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria monocytogenes* isolated from livestock products and their related environmental areas. 대한수의학회, 2003.

6. Detection of Genes for TEM-76 and TEM-104 in Multiple Drug-Resistant Animal Isolates of Salmonella and Their Transferability to Human Isolate of *Escherichia coli*. International Symposium on antimicrobial Agents and Resistance. COEX CENTER, Seoul, Korea. 2003

7. Characterization of Extended Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Escherichia coli*. International Symposium on antimicrobial Agents and Resistance. COEX CENTER, Seoul, Korea. 2003

8 First Report of VanB-vanA Incongruent Vancomycin-Resistant Enterococcus in Korea. International Symposium on antimicrobial Agents and Resistance. COEX CENTER, Seoul, Korea. 2003

9. Emergence of vancomycin-resistant enterococci (VRE) with vanB-phenotype, *vanA*-genotype in a Korean Hospital. 4th International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance p250.

10. 한국에서 사람과 가축에서 분리된 *Salmonella*의 분자유전학적 연구. 2003년 11월. 대한감염학회-대한화학요법학회 추계학술대회 초록집.

11. Methicillin(oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food

animals and their potential transmission to humans. International meeting of the Federation of Korea microbiology, 2003.10

12. Incidence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in calves associated with diarrhea and their characteristics, 47회 대한 수의학회, 2003.10.

13. Evaluation of MRSA-Screen latex agglutination test for detection of animal methicillin (Oxacillin)- resistant *Staphylococcus aureus*, 47회 대한 수의학회, 2003.10.

14. Methicillin(oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk and chicken specimens, 46회 대한 수의학회, 2002, 10.

15. Isolation and characteristics of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 strains from cattle, 11th International Conference of the association of Institutions for Veterinary Medicine, Kuala Lumpur, Malaysia, 2004.08

제 5 장 참고문헌

AE Bogaard, P Mertens, NH London, EE Stobberingh : High prevalence of colonization with vancomycin- and pristinamycin-resistant enterococci in healthy humans and pigs in the netherlands : is the addition of antibiotics to animal feeds to blame?. J Antimicrob Chemother 40:454-456, 1997.

Aires de Sousa, M., I. S. Sanches, M. L. Ferro, M. J. Vaz, Z. Saraiva, T. Tendeiro, J. Serra, and H. de Lencastre. Intercontinental spread of a multidrug-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. J. Clin. Microbiol. 36:2590-2596. 1998.

A Kjerulf, L Pallesen, H Westh: Vancomycin-resistant enterococci at a large university hospital in Denmark. APMIS 104: 475-479, 1996.

Allerberger, F., D. Rossboth, M. P. Dierich, S. Aleksic, H. Schmidt, and H. Karch. Prevalence and clinical manifestations of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in Austrian children. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15:545-550. 1996.

Baay, M. F., in't Veld, J. H. J., Alternative antigens reduce cross-reactions in an ELISA for the detection of *Salmonella Enteritidis* in poultry. J. Appl. Bacteriol. 74(3), pp. 243 - 247. 2000.

Carlson et al., 1999. S.A. Carlson, L.F. Bolton, C.E. Briggs, H.S. Hurd, V.K. Sharma, P.J. Fedorka-Cray and B.D. Jones, Detection of multiresistant *Salmonella Typhimurium* DT104 using multiplex and fluorogenic PCR. Mol. Cell. Probes 13, pp. 213 - 222. 1999.

Casewell, M., C. Friis, E. Marco, P. McMullin, and I. Phillips. The European ban on growth-promoting antibiotics and animal health. J. Antimicrob. Chemother. 52:159-161.

Casin et al., 1999. I. Casin, J. Breuil, A. Brisabois, F. Moury, F. Grimont and E. Collates, Multidrug-resistant human and animal *Salmonella Typhimurium* isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and intern-encoded beta-lactamase PSE-1. J. Infect. Dis. 179, pp. 1173 - 1182. 1999.

Chen CR, Malik M, Snyder M, Drlica K: DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. J Mol Biol 258: 627-37, 1996.

Colan, J. W., R. KuoLee A. Webb, A. D. Cox, M.B. Perry. Oral immunization of mice with a glycoconjugate vaccine containing the O157 antigen of *Escherichia coli* O157:H7 admixed with cholera toxin fails to elicit protection against subsequent colonization by the pathogen. Can. J. Microbiol. 46:283-290. 2000.

Cordovez, A., V. Prado, L. Maggi, J. Cordero, J. Martinez, A. Misraji, R. Rios, G. Soza, A. Ojeda, and M. M. Levine. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* associated with hemolytic-uremic syndrome in Chilean children. J. Clin. Microbiol. 30: 2153-2157. 1992.

Dean-Nystrom, E. A., B.T. Bosworth, W. C. Cray Jr., and H. W. Moon. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. Infect. Immun. 65:1842-1848. 1997.

Dessen, A., Di Guilmi, A.M., Vernet, T., and Dideberg, O., Molecular mechanisms of antibiotic resistance in gram-positive pathogens. Curr Drug Targets Infect Disord 1: 63-77. 2001.

Elder, R.O., Keen, J.E., Siragusa, G.R., Barkocy-Gallagher, G.A., Koohmaraie, M. and Laegreid, W.W., Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. PNAS 7, pp. 2999 - 3003. 2000.

el-Ziney M. G., J. M. Debevere. The effect of Reuterin on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk and cottage cheese. J Food Prot 61:1275-1280. 1998.

G Klein, A Pack, G Reuter : Antibiotic resistance patterns of enterococci and coourence

of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in germany. Applied and Environmental Microbiology, 1825-1830, 1998.

Guilmi, A.M.D., and Dessen, A., New approaches towards the identification of antibiotic and vaccine targets in *Streptococcus pneumoniae*. EMBO Rep 3: 728-734. 2002.

Haarmann C., H. Karch, M. Frosch, H. Schmidt., A 3.3-kb plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is closely related to the core region of the *Salmonella typhimurium* antibiotic resistance plasmid NTP16. Plasmid. 39: 134-140. 1998.

Hashimoto, Y., K. Tanimoto, Y. Ozawa, T. Murata, and Y. Ike., Amino acid substitutions in the VanS sensor of the VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus* strains result in high-level vancomycin resistance and low-level teicoplanin resistance. FEMS Microbiol. Lett. 185:247-254. 2000.

Herold, B. C., L. C. Immergluck, M. C. Maranan, D. S. Lauderdale, R. E. Gaskin, S. Boyle-Vavra, C. D. Leitch, and R. S. Daum., Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. JAMA 279:593-598. 1998.

Hoyle, B., Renewed concerns over *E. coli* O157:H7 in Ground beef. ASM News. 66(6):331-332. 2000.

Herman Goossens: Spread of *vancomycin-resistant* enterococci : differences Between the united states and europe. Infection Control and Hospital Epidemiology 546-551, 1998.

Hiasa H, Yousef DO, Marains KJ: DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex. J Biol Chem 271:26424-26429, 1996.

Huppertz, H.I., D. Busch, H. Schmidt, S. Aleksic, and H. Karch. , Diarrhea in young children associated with *Escherichia coli* non-O157 organisms that produce Shiga-like toxin. J. Pediatr. 128:341-346. 1998.

Hussain, Z., L. Stoakes, S. Garrow, S. Longo, V. Fitzgerald, and R. Lannigan., Rapid

detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative coagulase-negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide test. *J. Clin. Microbiol.* 38:2051-2054. 2000.

Groisman and Ochman, E.A. Groisman and H. Ochman , The path to *Salmonella*. *ASM News* 66 (2000), pp. 21 - 26. 2000.

Ihnot et al., A.M. Ihnot, A.M. Roaring, R.K. Wierzba, N.G. Faith and J.B. Luchansky , Behavior of *Salmonella Typhimurium* DT104 during the manufacture and storage of pepperoni. *Int. J. Food Microbiol.* 40 (1998), pp. 117 - 121. 1998.

Jones and Falkow, 1996. B.D. Jones and S. Falkow , Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu. Rev. Immunol.* 14, pp. 533 - 561. 1996.

Khan et al., 2000. A.A. Khan, M.S. Nawaz, S.A. Khan and C.E. Cerniglia , Detection of multidrug-resistant *Salmonella Typhimurium* DT104 by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, pp. 355 - 360. 2000.

Laconcha et al., I. Laconcha, N. Lopez-Molina, A. Rementeria, A. Audicana, I. Perales and J. Garaizar , Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella Enteritidis* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 40 (1998), pp. 27 - 34. 1998.

Lauderdale, T. L., L. C. McDonald, Y. R. Shiau, P. C. Chen, H. Y. Wang, J. F. Lai, and M. Ho. Vancomycin-resistant enterococci from humans and retail chickens in Taiwan with unique VanB phenotype-vanA genotype incongruence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 525-527. 2002.

Martineau, F., F. J. Picard, N. Lansac, C. Menard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 231-238. 2000.

Melter, O., I. Santos Sanches, J. Schindler, M. Aires de Sousa, R. Mato, V. Kovarova,

H. Zemlickova, and H. de Lencastre., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal types in the Czech Republic. J. Clin. Microbiol. 1999.

Ohya, T. and Ito, H., Experimental infection of calves with *Escherichia coli* O157:H7. J. Vet. Med. Sci. 61, pp. 1187 - 1189. 1999.

Phillips, I., M. Casewell, T. Cox, B.D. Groot, C. Friis, R. Jones, C. Nightingale, R. Preston, and J. Waddell. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. J. Antimicrob. Chemother. 53:28-52.

Kampranis SC, Maxwell A: *The DNA gyrase-quinolone complex*. J Biol Chem 273:22615-22626, 1998.

Sandhu, K.S. and Gyles, C.L., Pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in the intestine of calves. Can. J. Vet. Res. 66, pp. 65 - 72. 2002.

Sefton AM, Maskell JP, Williams JD: Selection of resistant variants of respiratory pathogens by quinolones. Int J Antimicrob Agents 12:129-134, 1999.

Seguin, J. C., R. D. Walker, J. P. Caron, W. E. Kloos, C. G. George, R. J. Hollis, R. N. Jones, and M. A. Pfaller. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. J. Clin. Microbiol. 37:1459-1463. 1999.

Shuttleworth, W.A., Pohl, M.E., Helms, G.L., Jakeman, D.L., and Evans, J.N., Site-directed mutagenesis of putative active site residues of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Biochemistry 38: 296-302. 1999.

Tan and Shelef, 2000. W. Tan and L.A. Shelef , Automated detection of *Salmonella* spp. in foods. J. Microbiol. Meth. 37, pp. 87 - 91. 2000.

Terwilliger, T.C., Maximum likelihood density modification. Acta Crystallogr D 56: 965-972. 2000.

Threlfall et al., 1998. E.J. Threlfall, F.J. Angulo and P.G. Wall , Ciprofloxacin-resistant

Salmonella Typhimurium DT104. Vet. Rec. 142, p. 255. 1998.

Van der Wolf et al., 1999. P.J. van der Wolf, J.H. Bongers, A.R.W. Elbers, F.M.M.C. Franssen, W.A. Hunneman, A.C.A. van Exsel and M.J.M. Tielen , *Salmonella* infections in finishing pigs in the Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. Vet. Microbiol. 67, pp. 263 - 275. 1999.

Zadoks, R., W. van Leeuwen, H. Barkema, O. Sampimon, H. Verbrugh, Y. H. Schukken, and A. van Belkum., Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol. 38: 1931-1939. 2000.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.