

Genetic Characteristics and Relatedness of Imported *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor in Korea

HyeonHee Kim¹, Semi Jeon², JunYoung Kim¹, SeongHan Kim², Deog-Yong Lee¹

¹Division of Enteric Diseases, ²Division of TB and Respiratory Diseases, Center for Infection Diseases, Korea National Institute of Health, KCDC, Cheongwon, Korea

Background: Cholera is a representative water-borne disease that is caused by *V. cholera* ctx (+). *V. cholera* El Tor was previously the primary pathogen, but after the seventh pandemic outbreak, it was replaced by a *V. cholera* El Tor variant with a classical phenotype and genotype. In this study, we investigated the genotypic and phenotypic characteristics of imported *V. cholerae* El Tor in Korea.

Methods: Forty-nine *V. cholerae* O1 El Tor strains isolated from 2004 to 2011 were used in this study. Polymerase chain reaction amplification of the *ctxB* and *rstR* genes was used for biotype determination. An antimicrobial susceptibility test was performed for phenotypic analysis, and pulse field gel electrophoresis (PFGE) was used for analysis of genetic relatedness.

Results: Classical *ctxB* genes were found in all of the isolates, while classical, El Tor, and combined *rstR*

genes were found. Twenty strains showed antimicrobial resistance against streptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, nalidixic acid, and ciprofloxacin. Based on PFGE, all isolates were grouped as cluster B. The country of origin and resistance pattern were highly related, although the time of influx and serogroup were not.

Conclusion: Isolates of *V. cholera* El Tor imported since 2004 were hybrids of *V. cholera* El Tor, which has the classical *ctxB* gene and is considered to be a CTX prophage. The SXT element plays an important role in antimicrobial resistance. PFGE patterns, which can be used for analysis of imported *V. cholerae*, revealed the relatedness of the resistant isolates. (Ann Clin Microbiol 2013;16:25-32)

Key Words: Antimicrobial resistance, PFGE, *V. cholerae* El Tor

서 론

콜레라는 수인성 설사질환의 대표적인 질환으로 개발도상국을 중심으로 지속적으로 유행하고 있는 질병이다. 콜레라의 원인은 1817년 제1차 대유행(pandemic)부터 제6차 대유행까지는 *V. cholerae* O1 classical형이 주요 원인 병원체였으나 제7차 대유행부터는 *V. cholerae* El Tor형으로 교체되어 지금까지도 유행이 지속되고 있다[1]. 국내에서는 1991년 이후 2001년까지 모두 10회의 발생이 보고되었고 2002년 이후부터는 국내환자 발생이 보고되지 않고 있지만, 인도, 중국 그리고 동남아시아 지역의 해외 여행객에 의한 유입 사례들은 지속적으로 보고되고 있다[1,2]. 또 최근에는 2007년 베트남에서의 대규모 유행과 2010년 아이티에서 2,100명이 넘는 사망자가 발생한 대규모 유행이 보고되어 공중 보건에서의 심각성이 여전히 존재하고 있

다[3,4].

V. cholerae O1은 classical과 El Tor 두 종류의 biotype (생물형)으로 나뉜다. El Tor형은 1905년 이집트의 El Tor지역에서 처음 보고된 biotype으로 classical형과 달리 polymyxin B에 내성이며, chicken cell agglutination test에서 응집을 나타내고 Voges-Proskauer (VP)에서 양성인 생물학적 특징을 가진다[5]. 최근 전세계적으로 유행 중인 *V. cholerae* O1 El Tor형은 *V. cholerae* O1 El Tor형을 기반으로 *V. cholerae* O1 Classical형의 표현형과 유전자형의 특성을 지니고 있어 atypical El Tor strain (hybrid, altered strain 혹은 El Tor variants)이라 불리고 있다[6].

콜레라 독소 유전자 중 하나인 *ctxB* 유전자는 39번과 68번 amino acid 위치의 염기서열 변이에 따라 *ctxB* El Tor형과 *ctxB* classical형으로 나뉘게 된다. *ctxB* El Tor형의 경우는 39번 amino acid가 tyrosine, 68번 amino acid는 isoleucine이지만 *ctxB* classical형은 39번이 histidine, 68번이 threonine으로 구성되어 있다[5,7,8]. *rstR* 유전자는 CTX prophage repressor에 관련된 유전자로 그 염기서열에 따라 El Tor형, classical형, environmental형, calcutta형으로 나뉜다[9,10]. 그러나 최근 확인된 atypical El Tor들은 *ctxB* 유전자가 El Tor형이 아닌 classical형의

Received 1 August, 2012, Revised 26 November, 2012

Accepted 26 November, 2012

Correspondence: Deog-Yong Lee, Division of Enteric Diseases, Center for Infection Diseases, KNIH, KCDC, Osong Health Technology Administration Complex, 187 Osong Saengmyeong 2-ro, Osong-eup, Cheongwon 363-951, Korea. (Tel) 82-43-719-8113, (Fax) 82-43-719-8149, (E-mail) leedy0610@korea.kr

유전자를 보유하는 것이 특징이며, 또한 이들은 EI Tor형과 classical형의 *rstR* 유전자를 동시에 보유하는 경우도 있다.

또한 과거에 분리되었던 콜레라균은 대부분의 항균제에 대하여 감수성을 보였지만, 최근 분리주의 경우에는 항균제 내성률이 높아지는 추세이다. 콜레라균이 내성을 보이게 되는 메커니즘에는 multi-drug efflux pump 활성화, extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs)의 생산, plasmid 매개 quinolone과 fluoroquinolone계 약제에 대한 내성과 chromosomal DNA의 변이 등이 주요 기전으로 알려져 있다[11]. SXT element는 1992년 인도에서 분리된 *V. cholerae* O139 MO10에서 처음 확인된 구조로 integration conjugative element이며 streptomycin, chloramphenicol, sulfamethoxazole, trimethoprim 등의 항균제에 대한 내성 유전자들을 보유하고 있는 것으로 알려져 있다[12].

본 연구에서는 공중 보건에서의 위협이 될 수 있는 콜레라의 유행에 대비하여 2004년 이후 해외로부터 유입된 *V. cholerae* O1 *ctx* (+)를 대상으로 병원성 유전자의 특성 및 항균제 내성률을 조사하여 국내 콜레라 발생 대응을 위한 기반 연구를 수행하였으며, 유전자 지문 조사를 통해 유입 균주 간의 유전학적 연관관계를 규명해보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 균주

2004년부터 2011년 사이에 국립검역소와 공중보건실험실들을 통해 수집된 *V. cholerae* O1 *ctx* (+) 균주로서 필리핀, 태국, 베트남, 인도, 인도네시아, 중국, 캄보디아 지역 여행객으로부터 분리된 *V. cholerae* 균주 중 유전자 검사를 통해 CTX ϕ 를 보유하고 있는 49주를 대상으로 하였다(Table 1). 2004년 이전 분리 균주와 유전적 특성과 연관성을 비교 분석하기 위해 1992년과 1994년 해외 유입 환자에서 분리된 균주 2주와 2001년 국내에서 발생한 환자의 분리주 1주를 대조 균주로 사용하였다.

Table 1. Distribution of *V. cholerae* according to countries of origin and time of influx

Year*	Countries of origin							Total
	Philippines	Thailand	Vietnam	India	Indonesia	China	Cambodia	
2004	4	0	0	1	0	0	0	5
2005	8	7	0	1	1	0	0	17
2006	4	1	0	0	1	0	0	6
2007	3	2	0	1	0	0	0	6
2008	3	0	0	1	0	0	0	4
2010	0	0	3	1	3	0	1	8
2011	1	0	0	1	0	1	0	3
Total	23	10	3	6	5	1	1	49

**V. cholerae* O1 was not isolated in 2009.

선별된 균주는 상용화키트인 API 20E (bioMérieux, Inc., Durham, NC, USA)를 이용하여 생화학 동정을 실시하였고, 콜레라 진단용 항혈청(Denka Seiken Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 슬라이드 응집법으로 *V. cholerae*의 혈청형을 판단하였다. Biotype은 Safa 등[5]의 방법에 따라 polymixin B 감수성 시험, chicken cell agglutination 시험 그리고 Voges-Proskauer (VP)에 대한 시험을 실시하였다.

2. 유전자형 확인

ctxB 유전자의 유형은 PCR법을 이용하여 유전자를 증폭한 후 염기서열을 분석을 통해 확인하였다. PCR에 사용된 primer는 상용화 프로그램인 Primer Express[®] Software v3.0 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 제작하였으며 (Table 2), PCR 반응에서 변성(denaturation)은 94°C에서 30초, 결합(annealing)은 60°C에서 30초, 그리고 연장(extension)은 72°C에서 40초간 30회 반복수행하였다. PCR 산물은 전기영동을 통해 증폭 여부를 확인한 후 염기서열 분석을 통해 biotype을 결정하였다. *rstR* 유전자를 분류하기 위한 primer는 Choi 등[9]의 방법을 사용하였고, SXT element의 증폭은 Dalsgaard 등[13]의 방법을 이용하였다(Table 2).

3. 항균제 감수성 검사

항균제 감수성은 Sensititre system (TREK Diagnostic Systems, Inc., Cleveland, OH, USA)을 이용하여 제조사의 방법에 따라 최소억제농도(MIC)를 측정하였다. 검사에 사용된 항균제는 총 16종으로 ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid, tetracycline, ampicillin, gentamicin, streptomycin, nalidixic acid, cefoxitin, cephalothin, ceftriaxone, cefotaxime, chloramphenicol, ampicillin/

Table 2. Oligonucleotide sequences used in this study to detect *ctx*, *rst* & *sxt*

Primers	Sequences (5'→3')	References
<i>ctxBF</i>	CGAACCACAAAAAGCCCAC	In this study
<i>ctxBR</i>	TGCGATGAAAAACCCAAAGTC	
<i>rstRETF</i>	TGAGCATAAGCTCTTGATTT	Choi et al. [9]
<i>rstRETR</i>	AAGGCTAGCCAACCAAAGAAAGG	
<i>rstRclaf</i>	CAGCAAAGCCTCCATCAAAA	Choi et al. [9]
<i>rstRclar</i>	GTTCAAAAATTAGGGATTAAAGAGTTGAG	
<i>rstREnvF</i>	GCTTCATTTGTGTATTGGTCTATTA	Choi et al. [9]
	GGTAGTTA	
<i>rstREnvR</i>	TCGAGTTGTAAATTCATCAAGAGTGA	
	AAAA	
<i>rstRCalf</i>	TCAAGCTTTTTTTTGCTTTATCTTA	Choi et al. [9]
<i>rstRCalR</i>	TGGCAACAAAGCACATTAAAGA	
<i>rstRCF</i>	GATGTTTACGATAGCCTAGAAGAC	Choi et al. [9]
	TT	
<i>rstRCR</i>	TACAGTGATGGCTCAGTCAATGC	
<i>sxt1</i>	GCTGGATAGGTTAAGGGCGG	Dalsgaard et al. [13]
<i>sxt2</i>	CTCTATGGGCACTGTCCACATTG	

sulbactam, amikacin, sulfamethoxazole/trimethoprim, imipenem 이 사용되었다. 항균제 감수성 결과는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline에 따라 장내세균 기준에 준하여 내성 여부를 판정하였으며[14], 대조 균주는 *Escherichia coli* ATCC25922를 사용하였다.

4. Pulse-field electrophoresis (PFGE)

대상 균주 간의 유전학적 연관관계는 PFGE를 통해 분석하였다. 균주의 전처리와 제한효소 처리는 국립보건연구원의 PFGE 표준 지침에 따라 수행하였다(unpublished observation). 전처리 과정을 통해 확보한 유전자는 전기영동장치(CHEF Mapper system, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 6 V/cm, 14°C, block 1에서 2-10초의 조건으로 13시간, block 2에서는 20-25초의 조건으로 6시간 동안 전기영동을 실시하여 유전자를 분석하였다.

각 PFGE 유형 사이의 연관관계는 유전자분석 소프트웨어(BioNumerics, Applied Maths, Sint-Martem-Latem, Belgium)를 사용하여 Dice coefficient와 1.5% tolerance를 적용하여 분석하였고, Dendrogram은 unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) 방법으로 연관성을 판단하였다.

결 과

1. Biotype 결정

선별된 균주의 생화학 검사결과 49주 모두 *V. cholerae*로 확인되었고, 혈청형은 49주 중 O1 Inaba가 5주, O1 Ogawa가 44주로 확인되었다. Biotype 확인 결과 49주 모두 polymixin B에 내성은 보였으나, chicken cell에서는 모두 응집이 일어나지 않았으며, Voges-Proskauer (VP) 시험 결과 49주 중 1주에서만 양성 반응을 보였고 나머지 균주들은 모두 음성 반응을 보였다. 표현형만으로는 classical형과 El Tor형의 구분이 어려웠으나, polymixin B 검사 결과를 바탕으로 El Tor형으로 구분하였다.

2. 유전자형 확인

ctxB 유전자의 염기서열을 분석한 결과는 본 연구에 사용된 49주 모두 classical형의 *ctxB* 유전자를 보유하고 있었다. 그러나 *rstR* 유전자의 경우 *rstR* El Tor형만을 보유한 균주들은 16주, *rstR* classical형만을 보유한 균주들은 9주, *rstR* El Tor형과 classical형을 동시에 보유한 균주들은 24주였다. Environmental형이나 Calcutta형 *rstR* 유전자들을 보유한 균주는 확인되지 않았다. *rstC*는 RS1 element 보유 여부를 확인하는 유전자로 40주가 보유하고 있었고, SXT element 존재 여부를 알기 위해 확인한 *sxt* 유전자는 모두 19주에서만 확인되었다(Tables 3 and 4).

3. 항균제 감수성 검사

검사 대상 항균제 중 내성을 보인 항균제는 총 4종으로 stre-

ptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, nalidixic acid, 그리고 ciprofloxacin였다. 대상 균주 49개 균주 중 내성을 보인 균주는 총 20주로서 이 중 19주는 streptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, nalidixic acid, 그리고 ciprofloxacin에 대해 동시에 내성을 보였고, 1주만 nalidixic acid와 ciprofloxacin에 내성을 보였다. 유입국가별 시기를 살펴보면 필리핀은 총 23건의 국내 유입 중 2008년도 1건에서만 항균제 내성을 보였으며, 태국은 2005년, 2006년 그리고 2007년 총 10건의 국내 유입 중 2006년 1건을 제외한 9건 모두에서 항균제 내성을 보였다. 베트남은 2010년 3건의 국내 유입 균주 모두 내성을 보였으며, 인도는 2006년을 제외한 전 연도에서 1건씩의 국내 유입이 확인되었는데, 2004년 분리주를 제외한 나머지 균주에서 모두 내성을 보였다. 인도네시아는 2005년, 2006년 그리고 2010년에 총 5건의 유입이 있었으나 내성은 확인되지 않았다. 중국과 캄보디아는 2011년과 2010년 1건씩의 유입이 있었는데 모두 내성을 보였다. 내성을 보인 균주 중 2007년 인도에서 유입된 1주만 nalidixic acid와 ciprofloxacin에 내성을 보였고, 나머지는 모두 네 종류의 항균제에 내성을 보였다(Table 5).

4. PFGE 결과 분석

이전의 연구에서 국내에서 분리된 *V. cholerae* O1균들을 대상으로 PFGE를 실시한 후 유사도 88%를 기준으로 분류한 결과 1999년도를 기점으로 A group에서 B group으로 cluster의 변화가 확인된 바 있다[15]. 본 연구에서 시험된 균주들의 PFGE 유형을 1999년 이후 국내에서 분리된 *V. cholerae* O1균의 PFGE 유형이 보관되어 있는 PulseNet-Koera DB와 비교한 결과 모두 B집단의 cluster에 속하는 것을 확인하였다. 대상 균주 간 유입 시기와 혈청형에 따른 연관성은 보이지 않았으나 유입 국가와 항균제 내성 경향에 따른 연관관계는 높게 나왔다. 국가별 유입 주 대부분은 유입시기에 관계없이 각각 90% 이상의 높은 유사도를 나타내었으며, 특히 필리핀과 태국 유래 주들은 다른 국가 유래 주와 달리 90% 이상의 높은 연관 관계를 보였다. 또한 streptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, nalidixic acid, ciprofloxacin 내성주 대부분이 92% 이상의 높은 유사도를 보였으며, 태국 유래 분리주에서 주로 확인이 되었다(Fig. 1).

고 찰

1991년 멕시코와 인도에서 분리된 균주에서 *ctxA* 유전자는 El Tor형, *ctxB* 유전자는 classical형을 갖는 *V. cholerae* O1 atypical El Tor가 확인되었고[6,16,17], 태국에서도 1986년 이후 분리된 균주에서 *V. cholerae* O1 atypical El Tor형이 확인이 되었다[18]. 국내에서는 1992년까지는 *ctxB* 유전자가 El Tor형인 전형적인 *V. cholerae* O1 El Tor만이 분리되었으나, 1994년

Table 3. Genetic characteristics of *V. cholerae* O1 El Tor in Korea from 2004 to 2011 by country

No.	Year	Country	<i>ctxB</i> sequence type	<i>rstR</i> type				RS1 element	SXT element
				El	Cla	Env	Cal	<i>rstC</i>	SXT
199200959	1992	Unknwon	El Tor	+	-	-	-	+	-
199401070	1994	Thailand	Classical	+	+	-	-	+	-
200101761	2001	Korea	Classical	+	-	-	-	+	-
200413555	2004	India	Classical	-	+	-	-	-	-
200416840	2004	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200418292	2004	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200420067	2004	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200420068	2004	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200501876	2005	Indonesia	Classical	-	+	-	-	-	-
200512188	2005	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200514306	2005	Thailand	Classical	+	-	-	-	+	+
200514307	2005	Thailand	Classical	+	-	-	-	+	+
200514308	2005	Thailand	Classical	+	-	-	-	+	+
200514309	2005	Thailand	Classical	+	-	-	-	+	+
200514310	2005	Thailand	Classical	+	-	-	-	+	+
200514311	2005	Thailand	Classical	+	-	-	-	+	+
200514312	2005	Thailand	Classical	+	-	-	-	+	+
200516521	2005	Philippines	Classical	+	-	-	-	+	-
200516946	2005	India	Classical	+	+	-	-	+	+
200517010	2005	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200517173	2005	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200518295	2005	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200518631	2005	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
20051E171	2005	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
20051E453	2005	Philippines	Classical	-	+	-	-	-	-
200600448	2006	Philippines	Classical	-	+	-	-	-	-
200600494	2006	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200600495	2006	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200600585	2006	Thailand	Classical	+	+	-	-	+	-
200600586	2006	Indonesia	Classical	+	+	-	-	+	-
200600654	2006	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200700448	2007	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200701544	2007	India	Classical	+	-	-	-	+	+
200704648	2007	Thailand	Classical	+	-	-	-	+	+
200704649	2007	Thailand	Classical	+	+	-	-	+	+
200709509	2007	Philippines	Classical	-	+	-	-	-	-
200709510	2007	Philippines	Classical	-	+	-	-	-	-
200800020	2008	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200803505	2008	India	Classical	+	-	-	-	+	+
200803983	2008	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
200804066	2008	Philippines	Classical	+	+	-	-	+	-
201000167	2010	Indonesia	Classical	-	+	-	-	-	-
201000747	2010	Indonesia	Classical	-	+	-	-	-	-
201000748	2010	Vietnam	Classical	+	+	-	-	+	+
201000749	2010	India	Classical	+	+	-	-	+	+
201000882	2010	Indonesia	Classical	-	+	-	-	-	-
201001254	2010	Vietnam	Classical	+	-	-	-	+	+
201001451	2010	Cambodia	Classical	+	-	-	-	+	+
201001602	2010	Vietnam	Classical	+	-	-	-	+	+
201101054	2011	India	Classical	+	+	-	-	+	+
201101575	2011	Philippines	Classical	+	-	-	-	+	-
201101625	2011	China	Classical	+	-	-	-	+	+

Abbreviations: SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; El, El Tor; Cla, classical; Env, environmental; Cal, calcutta.

Table 4. Genotypic characteristics of *V. cholerae* O1 El Tor in Korea from 2004 to 2011 by country

Year	Genetic type (No. of isolates)*						
	Philippines	Thailand	Vietnam	India	Indonesia	China	Cambodia
2004	rstR-El,rstR-cla, rstC (4)			rstR-cla (1)			
2005	rstR-El,rstR-cla, rstC (6)	rstR-El,rstC, SXT (7)		rstR-El,rstR-cla, rstC,SXT (1)	rstR-cla (1)		
	rstR-El, rstC (1)						
2006	rstR-El,rstR-cla, rstC (3)				rstR-El,rstR-cla, rstC (1)		
	rstR-cla (1)						
2007	rstR-El,rstR-cla, rstC (1)	rstR-El,rstC, SXT (1)		rstR-El,rstC, SXT (1)			
	rstR-cla (2)	rstR-El,rstR-cla, rstC,SXT (1)					
2008	rstR-El,rstR-cla, rstC (3)			rstR-El,rstC, SXT (1)			
2010			rstR-El,rstR-cla, rstC,SXT (1)	rstR-El,rstR-cla, rstC,SXT (1)	rstR-cla (3)		rstR-El,rstC, SXT (1)
			rstR-El,rstC, SXT (2)				
2011	rstR-El,rstC (1)			rstR-El,rstR-cla, rstC,SXT (1)		rstR-El,rstC, SXT (1)	

Abbreviations: El, El Tor; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim.

Table 5. Antibigram of *V. cholera* O1 El Tor based on countries or origin and time of influx

Year	Antibiogram (No. of isolates)*						
	Philippines	Thailand	Vietnam	India	Indonesia	China	Cambodia
2004							
2005		S,SXT,NA,CIP (7)		S,SXT,NA,CIP (1)			
2006							
2007		S,SXT,NA,CIP (2)		NA,CIP (1)			
2008	S,SXT,NA,CIP (1)			S,SXT,NA,CIP (1)			
2010			S,SXT,NA,CIP (3)	S,SXT,NA,CIP (1)			S,SXT,NA,CIP (1)
2011				S,SXT,NA,CIP (1)		S,SXT,NA,CIP (1)	

Abbreviations: S, streptomycin; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; NA, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin.

태국에서 유입된 분리주에서 *ctxB* 유전자형이 classical형인 *V. cholerae* O1 atypical El Tor가 처음 확인된 이후 2001년 국내 분리주 그리고 2004년 이후 해외 유입 분리주에서 지속적으로 *ctxB* 유전자형이 classical형인 *V. cholerae* O1 atypical El Tor가 분리되고 있다.

rstR 유전자형은 한 군주에 하나 또는 두 종류의 유전자형을 공유할 수 있으며, 이는 CTX prophage와 RS1 element에 서로 다른 유전자가 위치함으로서 가능하다고 추정되고 있다. Classical형 *rstR* 유전자만 보유하고 있는 군주를 대상으로 *rstC* 유전자 보유 여부를 확인해 본 결과 *rstC* 유전자가 확인된 군주는 없었다. 최근 Lee 등[19]이 분석한 Mozambique에서 분리된

V. cholerae O1 El Tor형의 경우 classical형의 *rstR* 유전자를 포함하고 있는 CTX prophage만으로 구성된 유전적 구조를 가지고 있었다. 이번 연구에서 확인한 군주 역시 RS1 element가 존재하지 않으며, Mozambique 분리주와 동일하게 CTX prophage만으로 구성된 구조를 갖고 있는 것으로 생각한다.

1996년부터 인도 등지에서 분리된 군주에서 fluoroquinolone 계 항균제에 대한 내성이 증가함에 따라[20], 국내 유입 군주의 항균제 감수성을 확인해 본 결과 2005년 이후 유입된 군주에서 streptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, nalidixic acid, 그리고 ciprofloxacin에 내성을 갖고 있는 18주(36.7%)와 nalidixic acid 그리고 ciprofloxacin에 내성을 갖는 군주 1주(2.0%)가 확

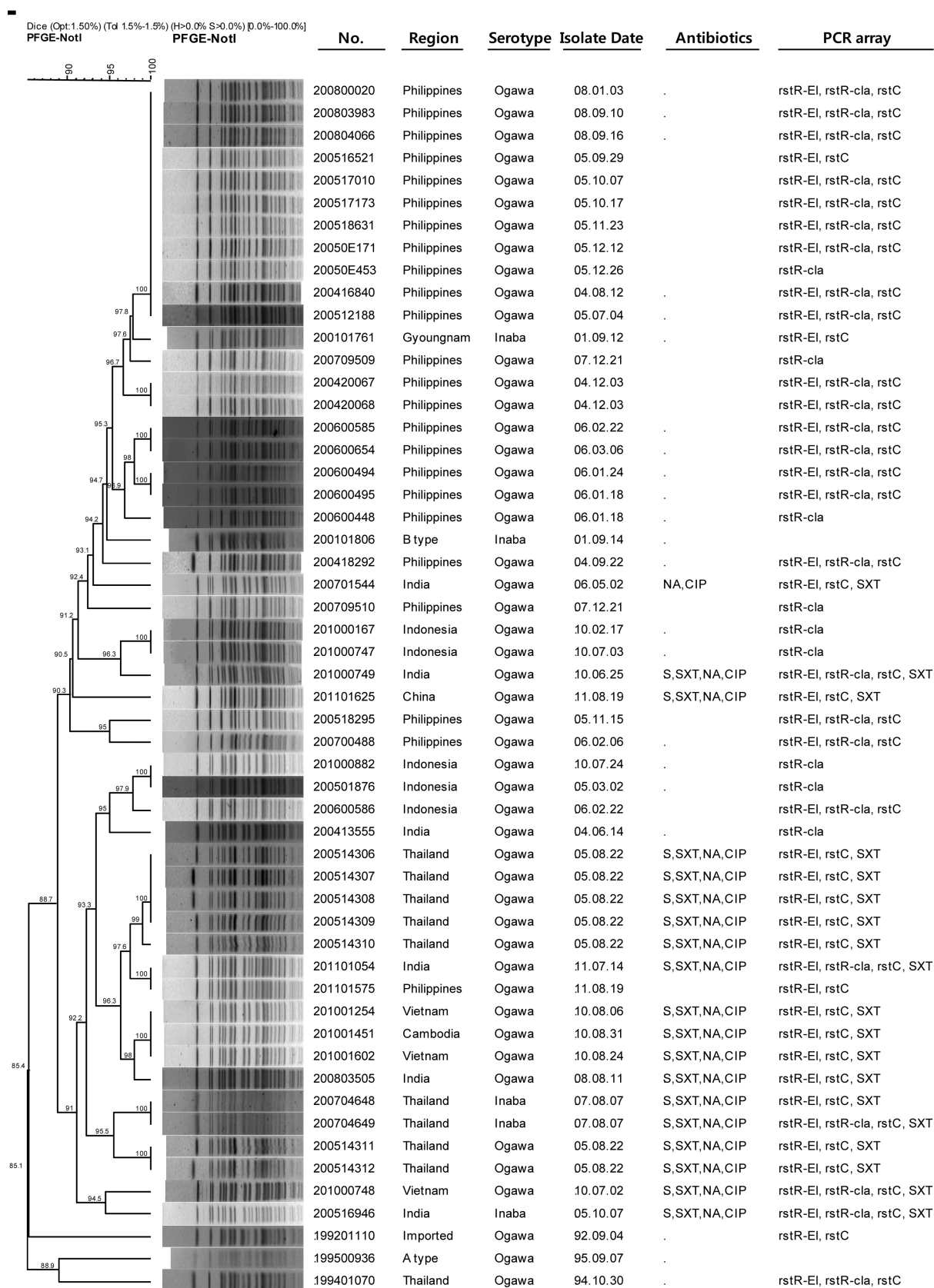


Fig. 1. Dendrogram of *NotI*-digested PFGE patterns *V. cholerae* O1 El Tor strains. PFGE pattern is grouped as cluster B and showing high similarity with their imported nation (90%) and antimicrobial resistance pattern (92%).

인하였다. 내성을 보이는 군주가 유입된 주요 국가는 태국, 베트남, 인도, 중국, 그리고 캄보디아였으며, 최근 연구 결과에 의하면 남아프리카, 그리고 태국 및 인도와 같은 동남아시아 지역에서 분리된 군주에서도 sulfamethoxazole/trimethoprim과 streptomycin에 대한 내성이 보고된 바 있다[20,21]. 본 연구에서도 sulfamethoxazole/trimethoprim과 streptomycin에 대한 높은 내성률이 확인되었고, 내성 군주에서 *sxt* 유전자가 확인됨으로서 SXT element와 항균제 내성 관련 유전자가 연관성이 높음을 확인할 수 있었다. 또한 태국 유래 분리주에서 주로 분리되었으며, 이러한 내성 패턴을 보이는 군주가 다른 나라로 확산되고 있어 국내 유입 군주에서도 증가할 것으로 예상되고 있다.

국내 분리된 *V. cholerae* O1 El Tor형의 PFGE 유형은 1999년 이전 분리된 A type과 1999년 이후 분리된 B type으로 구분된다[15]. 2004년 이후 분리된 군주들은 모두 B type과 유사한 밴드 유형을 보였으며, 국가별로는 필리핀 유입 분리주와 태국 유입 분리주로 88.7%의 유사성을 가지며 cluster를 형성하였다. 필리핀 유입 분리주는 *rstR*-El Tor형과 *rstR*-classical형을 동시에 보유하고, 태국 유입 분리주는 *rstR*-El Tor형만 보유하고 있었으며, 대부분의 항균제 내성주가 여기에 포함되어 PFGE 유형에 따른 *rstR* 유형 구분 및 항균제 내성 양상까지 구분하였다.

국내에서 분리되는 *V. cholerae* O1은 대부분 국내 발생보다는 해외 유입 형태로 전파되고 있다. 최근 항균제 내성주가 해외로부터 유입됨으로써 공중 보건학적인 우려가 있으나 이 연구를 통하여 PFGE 유형 분석과 관련하여 항균제 내성주에 대한 연관성을 찾을 수 있었고, *V. cholerae* O1 atypical El Tor에 대한 유전자형 구분도 가능하였다. 본 연구 결과는 국내 유입 콜레라균에 기초 분석 자료로서 신속한 대응과 조치를 위한 기본 자료로 가치가 있다고 할 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- Kaper JB, Morris JG Jr, Levine MM. Cholera. Clin Microbiol Rev 1995;8:48-86.
- Kim SH. Prevention and Management of Cholera. Agreement of Biological Weapon Restriction. Seoul; 2007:23-30.
- Chin CS, Sorenson J, Harris JB, Robins WP, Charles RC, Jean-Charles RR, et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. N Engl J Med 2011;364:33-42.
- Nguyen BM, Lee JH, Cuong NT, Choi SY, Hien NT, Anh DD, et al. Cholera outbreaks caused by an altered *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype strain producing classical cholera toxin B in Vietnam in 2007 to 2008. J Clin Microbiol 2009;47:1568-71.
- Safa A, Nair GB, Kong RY. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. Trends Microbiol 2010;18:46-54.
- Alam M, Nusrin S, Islam A, Bhuiyan NA, Rahim N, Delgado G, et al. Cholera between 1991 and 1997 in Mexico was associated with infection by classical, El Tor, and El Tor variants of *Vibrio cholerae*. J Clin Microbiol 2010;48:3666-74.
- Nair GB, Qadri F, Holmgren J, Svennerholm AM, Safa A, Bhuiyan NA, et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. J Clin Microbiol 2006;44:4211-3.
- Raychoudhuri A, Mukhopadhyay AK, Ramamurthy T, Nandy RK, Takeda Y, Nair GB. Biotyping of *Vibrio cholerae* O1: time to redefine the scheme. Indian J Med Res 2008;128:695-8.
- Choi SY, Lee JH, Kim EJ, Lee HR, Jeon YS, von Seidlein L, et al. Classical RS1 and environmental RS1 elements in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains harbouring a tandem repeat of CTX prophage: revisiting Mozambique in 2005. J Med Microbiol 2010;59:302-8.
- Nusrin S, Khan GY, Bhuiyan NA, Ansaruzzaman M, Hossain MA, Safa A, et al. Diverse CTX phages among toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated between 1994 and 2002 in an area where cholera is endemic in Bangladesh. J Clin Microbiol 2004;42:5854-6.
- Ghosh A and Ramamurthy T. Antimicrobials & cholera: are we stranded? Indian J Med Res 2011;133:225-31.
- Burrus V, Marrero J, Waldor MK. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. Plasmid 2006;55:173-83.
- Dalsgaard A, Forslund A, Sandvang D, Arntzen L, Keddy K. *Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the *aadA2* gene located on class 1 integrons. J Antimicrob Chemother 2001;48:827-38.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-first Informational Supplement. Document M100-S20. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011.
- Kim SH, Kim JY, Kang YH, Park YK, Lee BK. Pulsed-field gel electrophoresis-based molecular typing reveals a shift in the major type of *Vibrio cholerae* O1 isolated in Korea. J Microbiol Biotechnol 2006;16:1814-8.
- Goel AK, Jain M, Kumar P, Jiang SC. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* outbreak strains with altered El Tor biotype from southern India. World J Microbiol Biotechnol 2010;26:281-7.
- Goel AK, Jain M, Kumar P, Sarguna P, Bai M, Ghosh N, et al. Molecular characterization reveals involvement of altered El Tor biotype *Vibrio cholerae* O1 strains in cholera outbreak at Hyderabad, India. J Microbiol 2011;49:280-4.
- Na-Ubol M, Srimanote P, Chongsa-Nguan M, Indrawattana N, Sookrun N, Tapchaisri P, et al. Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand. Indian J Med Res 2011;133:387-94.
- Lee JH, Han KH, Choi SY, Lucas ME, Mondlane C, Ansaruzzaman M, et al; Mozambique Cholera Vaccine Demonstration Project Coordination Group. Multilocus sequence typing (MLST) analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates from Mozambique that harbour the classical CTX prophage. J Med Microbiol 2006;55:165-70.
- Garg P, Sinha S, Chakraborty R, Bhattacharya SK, Nair GB, Ramamurthy T, et al. Emergence of fluoroquinolone-resistant strains of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor among hospitalized patients with cholera in Calcutta, India. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1605-6.
- Okoh AI and Igbinosa EO. Antibiotic susceptibility profiles of some *Vibrio* strains isolated from wastewater final effluents in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa. BMC Microbiol 2010;10:143.

=국문초록=

최근 국내 유입 *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor의 특성 및 연관성 분석

질병관리본부 국립보건연구원 감염병센터 ¹수인성질환과, ²결핵호흡기세균과김현희¹, 전세미², 김준영¹, 김성한², 이덕용¹

배경: 콜레라균은 수인성 설사질환의 대표적인 원인 병원체로 *Vibrio cholera* (*V. cholerae*) O1 classical형이 주요 원인 병원체였으나 제7차 대유행부터는 *V. cholerae* El Tor형으로 교체되어 지금까지도 유행이 지속되고 있다. 최근 전세계적으로 유행 중인 *V. cholerae* O1 El Tor형은 *V. cholera* O1 El Tor형을 기반으로 *V. cholerae* O1 classical형의 표현형과 유전자형의 특성을 지니고 있다. 본 연구에서는 2004년 이후 해외로부터 유입된 *V. cholerae* O1 *ctx* (+)를 대상으로 병원성 유전자의 특성 및 항균제 내성률을 조사하여 국내 콜레라 발생 대응을 위한 기반 연구를 수행하고자 하였다.

방법: 대상 균주는 2004년부터 2011년 사이에 국내로 유입된 *V. cholera* O1 El Tor 49주로서 PCR기법을 이용하여 *ctxB* 유전자와 *rstR* 유전자 분석을 통해 biotype 분석을 실시하였고, 항균제 감수성 검사를 통해 내성 경향을 확인하였다. 또한 유전자 지문분석법(Pulsed Field-Gel Electrophoresis)을 이용하여 유입 균주 간 유전적 연관 관계를 분석하였다.

결과: 대상 균주 중 *ctxB* 유전자는 전부 classical형을 보였으나, *rstR* 유전자는 El Tor형, classical형 그리고 두 가지 biotype을 모두 가지고 있는 균주가 확인되었다. Streptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, nalidixic acid, 그리고 ciprofloxacin에 내성을 보이는 균주가 20주 확인되었으며, PFGE 유형은 기존 연구를 통해 성립된 방법에 따라 확인하였을 경우 모두 B그룹의 cluster로 구분되었다. 대상 균주 간 유입 시기와 혈청형에 따른 연관성은 보이지 않았으나 유입국가와 항균제 내성 경향에 따른 연관관계는 높게 나왔다.

결론: 2004년 이후 해외 유입 콜레라균은 *ctxB* 유전자형이 classical형인 hybrid *V. cholerae* O1 El Tor만 분리되고 있으며, classical형 *rstR* 유전자만 보유하고 있는 균주 중에 *rstC* 유전자가 확인된 균주는 확인되지 않아 Mozambique 분리주와 동일하게 CTX prophage만으로 구성된 구조를 갖고 있는 것으로 생각한다. 내성 균주에서 *sxt* 유전자가 확인됨으로서 SXT element와 항균제 내성 관련 유전자가 연관성이 높음을 확인할 수 있었다. PFGE 유형 분석과 관련하여 항균제 내성 주에 대한 연관성을 찾을 수 있어 국내 유입 콜레라균에 대한 기초 분석 자료로 활용 가치가 있을 것이다. [Ann Clin Microbiol 2013;16:25-32]

교신저자 : 이덕용, 363-951, 충북 청원군 오송읍 오송생명 2로 187
질병관리본부 국립보건연구원 감염병센터 수인성질환과
Tel: 043-719-8113, Fax: 043-719-8149
E-mail: leedy0610@korea.kr