

Characterization of *Salmonella* spp. Clinical Isolates in Gyeongsangbuk-do Province, 2012 to 2013

Oh-Geun Kweon¹, Jin Seok Kim², Gou-Ok Kim¹, Chang-Il Lee¹, Kwang-Hyeon Jeong¹, Junyoung Kim²

¹Division of Microbiology, Gyeongsangbuk-do Provincial Government Institute of Health and Environment,

²Division of Enteric Diseases, Center for Infectious Diseases, Korea National Institute of Health, Cheongwon, Korea

Background: Extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones are important antimicrobials for treating invasive salmonellosis, and emerging resistance to these antimicrobials is of paramount concern.

Methods: A total of 30 *Salmonella* spp. clinical isolates recovered in Gyeongsangbuk-do from 2012 to 2013 were characterized using antibiotic resistance profiles and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

Results: A high prevalence of multidrug-resistant isolates, mainly showing an ampicillin, nalidixic acid, chloramphenicol resistance pattern, was observed. Four extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing isolates (3 CTX-M-15 isolates and 1 CTX-M-27 isolate) were found. The *bla*_{CTX-M-27} gene was carried by an IncF conjugative plasmid in the *S. Infantis* isolate. The *bla*_{CTX-M-15} gene were carried by an IncF (2 isolates) or IncHI2 (1 isolate) conjugative plasmid in *S.*

Enteritidis. In addition, a single mutation of GyrA, Ser83Thr (1 isolates), Asp87Tyr (9 isolates), Asp87Gly (4 isolates), and Asp87Leu (3 isolates), was detected in nalidixic acid-resistant *Salmonella* spp. isolates. *Xba*I PFGE analysis of all isolates revealed more than 19 different pulsotypes. The most common *S. Enteritidis* PFGE pattern (SEGX01.003) was associated with a larger number of cases of invasive salmonellosis than all other patterns.

Conclusion: The information from our study can assist in source attribution, outbreak investigations, and tailoring of interventions to maximize disease prevention. (Ann Clin Microbiol 2014;17:50-57)

Key Words: Drug resistance, Extended-spectrum beta-lactamase, Nalidixic acid, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, *Salmonella*

INTRODUCTION

살모넬라균은 수인성·식품매개성 감염질환의 대표적인 원 인병원체로 장티푸스와 비장티푸스 살모넬라로 크게 분류되며 사람과 동물에게 위장염이나 패혈증 등의 질병을 일으키고 있다[1]. 편모항원, 군체항원, 협막항원에 따라 약 2,600개의 혈청 형으로 구분되고 이 중 일부 혈청형이 사람에게 감염을 일으키고 있다[2]. 비장티푸스성 살모넬라속균은 오염된 식품이나 물을 섭취 하거나 동물과의 접촉 등이 주요 감염원으로 알려져 있다[3,4].

1990년대 후반에 들어서면서부터 국내·외에서 살모넬라속 균을 비롯한 장내세균에 의한 감염환자가 급증하고 있다. 특히 미국에서만 매년 1만명 정도가 살모넬라균에 감염되고 이 중 370여 명 정도는 사망까지 이르는 것으로 알려져 있다[5]. 국내

에서도 매년 1,000여 건의 살모넬라속균 감염 사례가 꾸준히 보고되었으나 현재까지 그 발생원인과 감염경로는 대부분 밝혀지지 않았다. 주목할 만한 점은 이 병원체들에서 치료용 항균제에 내성이 계속해서 증가되고 있다는 것이며 최근 국내에서 분리되고 있는 살모넬라균들의 경우에도 β -lactam 계열, quinolone 계열 등 4-5계열의 항균제에 대해 내성을 갖고 있는 경우가 점점 늘어나고 있어 치료에 있어 어려워질 뿐아니라 항균제가 남용될 것이 우려되고 있다[6]. 현재 전 세계적으로 살모넬라균 같은 식중독 원인균에서도 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)의 생산 확인 및 분류 등에 대한 연구나 quinolone계 항균제에 대한 주요 내성 기전 등 항균제 내성의 기전에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 이 내성주간의 유전학적 연관성에 관한 연구도 활발히 진행되고 있다[7-9].

최근 집단 급식 시설의 증가와 식품 유통구조의 대형화로 감

Received 28 February, 2014, Revised 8 May, 2014, Accepted 14 May, 2014

Correspondence: Junyoung Kim, Division of Enteric Diseases, Center for Infectious Diseases, Korea National Institute of Health, Korea Centers for Disease Control and Prevention, 187 Osongsaengmyeong 2(i)-ro, Osong-eup, Cheongwon 363-700, Korea. (Tel) 82-43-719-8116, (Fax) 82-43-719-8149, (E-mail) jun49@hanmail.net

© The Korean Society of Clinical Microbiology.

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

염성 설사질환이나 식중독의 대규모 발생의 가능성이 여전히 높은 실정이고 이 경우 광범위한 항균제의 사용으로 병원체의 항균제 내성이 더욱 증가될 가능성도 같이 높아지게 된다. 그러나 국내에서의 항균제 내성에 대한 연구는 주로 병원 내 감염의 경우로 집중되어 있으며 대규모 집단 발생을 일으키는 살모넬라균 같은 식중독 병원체에 대해서는 항균제 내성에 관한 연구 정도가 다소 미진한 형편이다. 현재 항균제 내성 균주에 의한 감염환자발생은 환자 개인의 건강뿐 아니라 가계 경제에 지장을 주며 지역이나 국가경제에도 많은 타격을 줄 수 있다. 또 이런 내성관련 유전자들이 인간에게 치명적인 감염질환을 일으키는 병원체로 전달된다면 그 또한 심각한 위협이 될 수밖에 없다. 따라서 본 연구에서는 2012-2013년 경북지역의 설사 환자에서 분리된 살모넬라균을 대상으로 항균제 내성양상과 기전을 파악하고, 균주들 간의 유전학적 연관성을 확인하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

1. 균주의 분리 및 동정

2012년부터 2013년까지 경북지역의 2, 3차 종합병원 4군데에 내원한 설사환자의 분변으로부터 살모넬라균을 분리하였다. 분리균의 동정은 Edward와 Ewing의 방법[10]을 참고하여 Vitek 2 compact (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France)를 이용하였다. 예비확인 균주에 대하여 살모넬라 진단용 항혈청을 이용하여 혈청형을 조사하였으며, O군 및 Vi 항혈청은 국립보건연구원(KNIH)에서 공급받고 H 항혈청은 BD Difco (Difco, Detroit, MI, USA)사의 제품을 사용하였다.

2. 항균제 감수성 시험

항균제 감수성 시험은 microbroth dilution 방법에 따라 Sensititre의 KRDCF 패널(TREK Diagnostic Systems, Westlake, OH, USA)을 사용하여 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 확인하였다. 대상 항균제는 ampicillin (AMP), ceftriaxone (CRO), cefotaxime (CTX), imipenem (IPM), amikacin (AMK), ceftioxin (FOX), ampicillin/sulbactam (SAM), nalidixic acid (NAL), ciprofloxacin (CIP), tetracycline (TCY), chloramphenicol (CHL), gentamicin (GEN), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), amoxicillin/clavulanic acid (AMC)의 14종이고, 감수성 시험의 정도관리를 위해서 *Escherichia coli* ATCC 25922 균주와 *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 균주를 사용하였다. 각 항균제에 대한 감수성 및 내성결과는 Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) [11]의 기준에 따라 판정하였다.

3. ESBL 유형 탐색

분리균주의 ESBL 및 plasmid-mediated AmpC β -lactamase 유형은 TEM-1 및 DHA, SHV, OXA, CMY-2, CTX-M-I, CTX-M-II, CTX-M-IV group에 특이적인 primer를 이용한 multiplex PCR 방법으로 확인하였다[12]. CTX-M 유형의 ESBL 생산이 확인된 균주에서는 *bla*_{CTX-M} 유전자를 CTX-M-I 및 CTX-M-IV group에 특이적인 primer [13]를 이용하여 PCR로 증폭시킨 뒤, 자동염기서열분석기 ABI 3700 sequencer (Applied Biosystems Foster City, CA, USA)를 이용하여 염기서열을 확인하였고, NCBI의 BLAST 프로그램(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)을 이용하여 GenBank에 등록된 염기서열과 비교하여 최종 유형을 결정하였다.

4. Plasmid replicon 유형 확인

ESBL 생산균주의 plasmid 유형은 *Enterobacteriaceae*에서 주로 관찰되는 plasmid family의 replicon에 특이적으로 결합하는 18쌍의 primer set을 이용하여 multiplex PCR 기법으로 확인하였다[14].

5. *gyrA*, *parC* 유전자의 돌연변이 확인

Quinolone계 내성의 주원인이 되는 DNA gyrase와 topoisomerase IV에서의 돌연변이 여부를 확인하기 위하여 이 효소들을 암호화하는 *gyrA* 유전자와 *parC* 유전자의 염기서열 중 quinolone계 내성과 관계되는 돌연변이가 빈발하는 부위인 quinolone resistance determining region (QRDR)을 PCR로 증폭시켜 염기서열을 분석하고 변이여부를 확인하였다[15].

6. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

PFGE 시험은 제한효소 *Xba*I (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 미국질병통제센터(CDC)에서 운영하는 PFGE network (PulseNet)의 PFGE 표준실험법[16]에 따라 실시하였다. 전기영동은 CHEF-Mapper system (Bio-rad, Hercules, CA, USA)에서 1.0% Seakem Gold agarose gel에 넣어 0.5×TBE, 6V/cm, 14°C, 2.16-63.8초 switch time의 조건으로 18시간 동안 실시하였다. 각 PFGE 유형 사이의 연관관계는 BioNumerics (Applied Maths, Ghent, Belgium) system을 사용하여 분석하였다. Banding patterns의 분석은 Dice coefficient와 1.5% tolerance를 적용하였고, dendrogram은 unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) 방법으로 작성하였다.

RESULTS

1. 살모넬라 혈청형

2012년부터 2013년까지 경북지역 4개 병원에 내원한 설사환자

Table 1. MIC₅₀ and MIC₉₀ of antibiotics for *Salmonella* spp. isolates (n=30)

Antibiotics	Breakpoints		MIC ₅₀ (μ g/mL)	MIC ₉₀ (μ g/mL)	No. (%) of isolates		
					S	I	R
Ampicillin	S \leq 8	R \geq 32	128	128	12 (40)	0	18 (60)
Ceftriaxone	S \leq 1	R \geq 4	0.06	64	26 (86.7)	0	4 (13.3)
Cefotaxime	S \leq 1	R \geq 4	0.06	8	26 (86.7)	0	4 (13.3)
Cefoxitin	S \leq 8	R \geq 32	0.5	4	30 (100)	0	0
Ampicillin/Sulbactam	S \leq 8	R \geq 32	16	32	12 (40)	8 (26.7)	10 (33.3)
Amoxicillin/Clavulanic acid	S \leq 8	R \geq 32	8	16	25 (83.3)	5 (16.7)	0
Imipenem	S \leq 1	R \geq 4	0.06	0.06	30 (100)	0	0
Amikacin	S \leq 16	R \geq 64	0.5	0.5	30 (100)	0	0
Gentamicin	S \leq 4	R \geq 16	0.5	64	24 (80)	0	6 (20)
Nalidixic acid	S \leq 16	R \geq 32	256	256	13 (43.3)	0	17 (56.7)
Ciprofloxacin	S \leq 1	R \geq 4	0.06	0.25	30 (100)	0	0
Tetracycline	S \leq 4	R \geq 16	0.5	128	23 (76.7)	0	7 (23.3)
Chloramphenicol	S \leq 8	R \geq 32	8	64	19 (63.3)	0	11 (36.7)
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	S \leq 2	R \geq 4	1	1	28 (93.3)	0	2 (6.7)

Table 2. MICs of *Salmonella* spp. isolates

Strain	Serotype	MICs (μ g/mL) of antibiotics													
		AMP	CRO	CTX	FOX	SAM	AMC	IMP	AMK	GEN	NAL	CIP	TCY	CHL	SXT
1	Typhi	0.5	0.06	0.06	4	1	1	0.06	0.5	0.5	0.5	0.06	0.5	4	1
2	Typhimurium	128	0.06	0.06	0.5	16 (I)	8	0.06	0.5	0.5	256	0.5	256	8	1
3	Sandiego	0.5	0.06	0.06	0.5	1	1	0.06	0.5	0.5	4	0.06	0.5	8	1
4	Enteritidis	128	0.06	0.06	0.05	32	8	0.06	0.5	0.5	256	0.06	0.5	64	1
5	Enteritidis	128	0.06	0.06	0.5	32	8	0.06	0.5	0.5	256	0.25	0.5	64	1
6	Enteritidis	128	64	8	0.5	16	8	0.06	0.5	64	256	0.25	64	4	1
7	Enteritidis	128	0.06	0.06	0.5	16	8	0.06	0.5	0.5	256	0.25	0.5	64	1
8	Senftenberg	0.5	0.06	0.06	4	1	1	0.06	0.5	0.5	4	0.06	0.5	8	1
9	Typhimurium	128	0.06	0.06	0.5	32	8	0.06	0.5	16	4	0.06	128	4	1
10	Enteritidis	128	64	8	0.5	16	8	0.06	0.5	64	256	0.25	128	8	1
11	Typhimurium	0.5	0.06	0.06	0.5	1	1	0.06	0.5	0.5	4	0.06	0.5	8	1
12	Enteritidis	0.5	0.06	0.06	0.5	1	1	0.06	0.5	0.5	256	0.06	0.5	8	1
13	Enteritidis	128	0.06	0.06	0.5	32	16	0.06	0.5	0.5	256	0.06	0.5	64	1
14	Enteritidis	0.5	0.06	0.06	0.5	1	1	0.06	0.5	0.5	256	0.25	0.5	8	1
15	Typhimurium	0.5	0.06	0.06	0.5	2	1	0.06	0.5	0.5	256	0.5	0.5	8	1
16	Enteritidis	128	0.06	0.06	0.5	32	16	0.06	0.5	0.5	256	0.25	0.5	64	1
17	Bardo	0.5	0.06	0.06	0.5	2	2	0.06	0.5	0.5	4	0.06	0.5	8	1
18	Enteritidis	128	0.06	0.06	0.5	32	8	0.06	0.5	0.5	128	0.06	0.5	64	1
19	Thomson	0.5	0.06	0.06	0.5	2	2	0.06	0.5	0.5	4	0.06	0.5	8	1
20	Paratyphi B	128	0.06	0.06	0.5	32	16	0.06	0.5	0.5	0.5	0.06	32	64	1
21	Infantis	128	64	8	4	64	16	0.06	0.5	0.5	4	0.06	0.5	8	32
22	Paratyphi B	128	0.06	0.06	0.5	16	8	0.06	0.5	0.5	256	0.25	0.5	64	1
23	Enteritidis	128	0.06	0.06	0.5	16	8	0.06	0.5	0.5	256	0.06	0.5	64	1
24	Typhimurium	128	0.06	0.06	4	16	8	0.06	0.5	64	256	0.5	4	64	32
25	Typhimurium	0.5	0.06	0.06	4	1	1	0.06	0.5	0.5	4	0.06	0.5	8	1
26	Typhimurium	0.5	0.06	0.06	4	1	1	0.06	0.5	0.5	4	0.06	0.5	8	1
27	Enteritidis	128	0.06	0.06	0.5	32	8	0.06	0.5	0.5	256	0.25	0.5	64	1
28	Enteritidis	128	64	8	0.5	16	4	0.06	0.5	64	256	0.25	128	8	1
29	Stanley	0.5	0.06	0.06	0.5	1	1	0.06	0.5	0.5	0.5	0.06	0.5	8	1
30	Typhimurium	128	0.06	0.06	0.5	64	16	0.06	0.5	128	8	0.06	256	8	1

Abbreviations: AMP, Ampicillin; CRO, Ceftriaxone; CTX, Cefotaxime; FOX, Cefoxitin; SAM, Ampicillin/Sulbactam; AMC, Amoxicillin/Clavulanic acid; IMP, Imipenem; AMK, Amikacin; GEN, Gentamicin; NAL, Nalidixic acid; CIP, Ciprofloxacin; TCY, Tetracycline; CHL, Chloramphenicol; SXT, Trimethoprim/Sulfamethoxazole. Values in boldface indicate higher value than the breakpoint of CLSI.

에서 분리된 살모넬라속 균주들은 총 30주였으며, A 병원에서 22주, B 병원에서 1주, C 병원에서 6주, D 병원에서 1주가 확인되었다. 분리된 균주의 혈청형은 총 10종이었으며, *S. Enteritidis*가 13주(43.3%)로 가장 많았고, *S. Typhimurium*이 8주(26.7%)로 확인되었다. *S. Paratyphi* B가 2주(6.7%)였고, *S. Bardo*, *S. Infantis*, *S. Sandiego*, *S. Senftenberg*, *S. Stanley*, *S. Thompson*, *S. Typhi*가 각각 1주(3.3%)씩 분리되었다.

2. 항균제 감수성 경향 분석

분리된 살모넬라속 30균주에 대한 14종 항균제의 감수성 시험 결과는 Table 1과 2에 요약하였다. 전체 살모넬라속균의 내성률은 AMP가 60%로 가장 높았고, NAL (56.7%), CHL (36.7%), SAM (33.3%), TCY (23.3%) 순으로 내성률이 관찰되었다 (Table 1). GEN, CRO, CTX, SXT 항균제에는 20% 이하의 내성률을 나타내었고, FOX, AMC, IMP, AMK, CIP의 다섯가지 항균제에는 모든 균주가 100% 감수성을 나타내었다. 살모넬라속 균주에서 AMP와 NAL의 MIC₅₀과 MIC₉₀ 모두 각각 128 µg/mL, 256 µg/mL으로서 높은 MIC 분포를 보였지만, 나머지 항생제의 MIC₅₀은 각 항균제의 내성판단기준(breakpoint)을 넘지 않았다.

혈청형별 항균제 내성양상은 *S. Enteritidis* (n=13)의 경우 모든 균주(100%)에서 NAL에 대한 내성이 관찰되었고, AMP 84.6%, CHL 61.5%, SAM 46.2%의 내성률을 보였다. 특히, 3세대 세팔로스포린계열 항균제(CRO와 CTX)에 내성을 보이는 4균주 중 3주가 *S. Enteritidis*이었다. *S. Typhimurium*은 검사한 8균주 중 4균주(50%)에서 AMP 내성이 관찰되었고, 3균주(37.5%)가 각각 NAL, GEN, TCY에 대해서 내성을 보였다

(Table 2).

분리균 중 21균주(70%)가 적어도 한 가지 이상의 항균제에 내성을 나타내었으며, 3가지 계열 이상의 항균제에 내성을 보이는 다제내성은 18균주(60%)에서 관찰되었다. 특히, AMP에 내성을 보이는 18균주 모두에서 다제내성이 관찰되었다(Table 1). 혈청형 *S. Enteritidis*의 84.6% (11/13), *S. Typhimurium*의 50% (4/8), *S. Infantis* (1/1)와 *S. Paratyphi* B (2/2) 균주들도 다제내성균이었다. 반면, 그외 기타 혈청형 균주들은 모든 약제에 대하여 감수성을 보였다.

3. ESBL 유전형 및 Plasmid replicon 확인

대상균주 중 AMP, CRO, CTX에 내성을 나타낸 4개 균주에 대하여 PCR과 염기서열분석을 통해 ESBL 유형 및 plasmid replicon을 확인하였다. Multiplex PCR로 확인된 ESBL 유형은 *S. Enteritidis* 3개 균주의 경우 CTX-M-I group이었고, *S. Infantis*에서는 CTX-M-IV group 유전자가 확인되었으며, 추가로 TEM-1 β-lactamase도 확인되었다. CTX-M-II group 및 SHV, OXA, DHA, CMY형 유전자에 대하여 PCR 양성 반응을 보이는 균주는 없었다. *S. Enteritidis* 3균주에서 검출된 CTX-M-I group은 모두 *bla*_{CTX-M-15}으로 확인되었으며, *S. Infantis* 균주의 CTX-M-IV group은 *bla*_{CTX-M-27}과 염기서열이 일치하였다(Table 3). ESBL 및 기타 항균제 내성의 전파과정의 원인을 확인하기 위하여 *bla*_{CTX-M} 유전자를 가지는 4균주의 plasmid replicon을 확인한 결과, 하나의 *S. Enteritidis* 균주(6번)에서는 IncHI2 유형이, 10번과 28번 *S. Enteritidis* 및 21번 *S. Infantis* 균주에서는 IncF 유형이 확인되었다(Table 3).

Table 3. Molecular characteristics of *Salmonella* spp. resistant to third-generation cephalosporins and quinolones

Strain	Serotype	<i>bla</i> _{CTX-M} gene	Other <i>bla</i> gene	Plasmid replicon	Mutations in QRDR	
					<i>gyrA</i>	<i>parC</i>
2	<i>S. Typhimurium</i>	—	—	—	Asp87→Leu	—
4	<i>S. Enteritidis</i>	—	—	—	Asp87→Tyr	—
5	<i>S. Enteritidis</i>	—	—	—	Asp87→Tyr	—
6	<i>S. Enteritidis</i>	CTX-M-15	—	IncHI2	Asp87→Tyr	—
7	<i>S. Enteritidis</i>	—	—	—	Asp87→Tyr	—
10	<i>S. Enteritidis</i>	CTX-M-15	—	IncF	Asp87→Tyr	—
12	<i>S. Enteritidis</i>	—	—	—	Asp87→Gly	—
13	<i>S. Enteritidis</i>	—	—	—	Asp87→Gly	—
14	<i>S. Enteritidis</i>	—	—	—	Asp87→Tyr	—
15	<i>S. Typhimurium</i>	—	—	—	Asp87→Leu	—
16	<i>S. Enteritidis</i>	—	—	—	Asp87→Tyr	—
18	<i>S. Enteritidis</i>	—	—	—	Asp87→Gly	—
21	<i>S. Infantis</i>	CTX-M-27	TEM-1	IncF	—	—
22	<i>S. Paratyphi</i> B	—	—	—	Ser83→Thr	—
23	<i>S. Enteritidis</i>	—	—	—	Asp87→Gly	—
24	<i>S. Typhimurium</i>	—	—	—	Asp87→Leu	—
27	<i>S. Enteritidis</i>	—	—	—	Asp87→Tyr	—
28	<i>S. Enteritidis</i>	CTX-M-15	—	IncF	Asp87→Tyr	—

4. Quinolone 항균제의 내성기전 확인

Quinolone계 항균제에 대한 내성기전 연구를 위하여 NAL에 내성이 확인된 17균주(*S. Enteritidis* 13주, *S. Typhimurium* 3주, *S. Paratyphi B* 1주)에 대하여 *gyrA*와 *parC* 유전자의 QRDR 염기서열을 분석하였다. 모든 균주에서 NAL 내성을 유도하는 것으로 알려진 *GyrA*의 83번째 혹은 87번째 아미노산기에 변이가 관찰되었다. 83번째 아미노산치의 serine이 threonine (Ser83→Thr)으로 치환된 *S. Paratyphi B* 1균주를 제외하고, 16균주에서

는 87번째 aspartic acid에서 변이가 관찰되었으며, *S. Typhimurium* 3균주에서는 leucine (Asp87→Leu)으로, *S. Enteritidis* 9균주, 4균주에서는 각각 tyrosine (Asp87→Tyr), glycine (Asp87→Gly)으로 치환되어 있었다(Table 3). 하지만, 모든 NAL 내성균주에서 *parC* 유전자의 변이는 확인되지 않았다.

5. 살모넬라속 균주들간 유전학적 연관성 분석

살모넬라속균 30주들이 역학적으로 관련이 있는지 알아보기 위하여 PFGE를 수행하였다. 혈청형별로 *XbaI*-PFGE 유형을 분

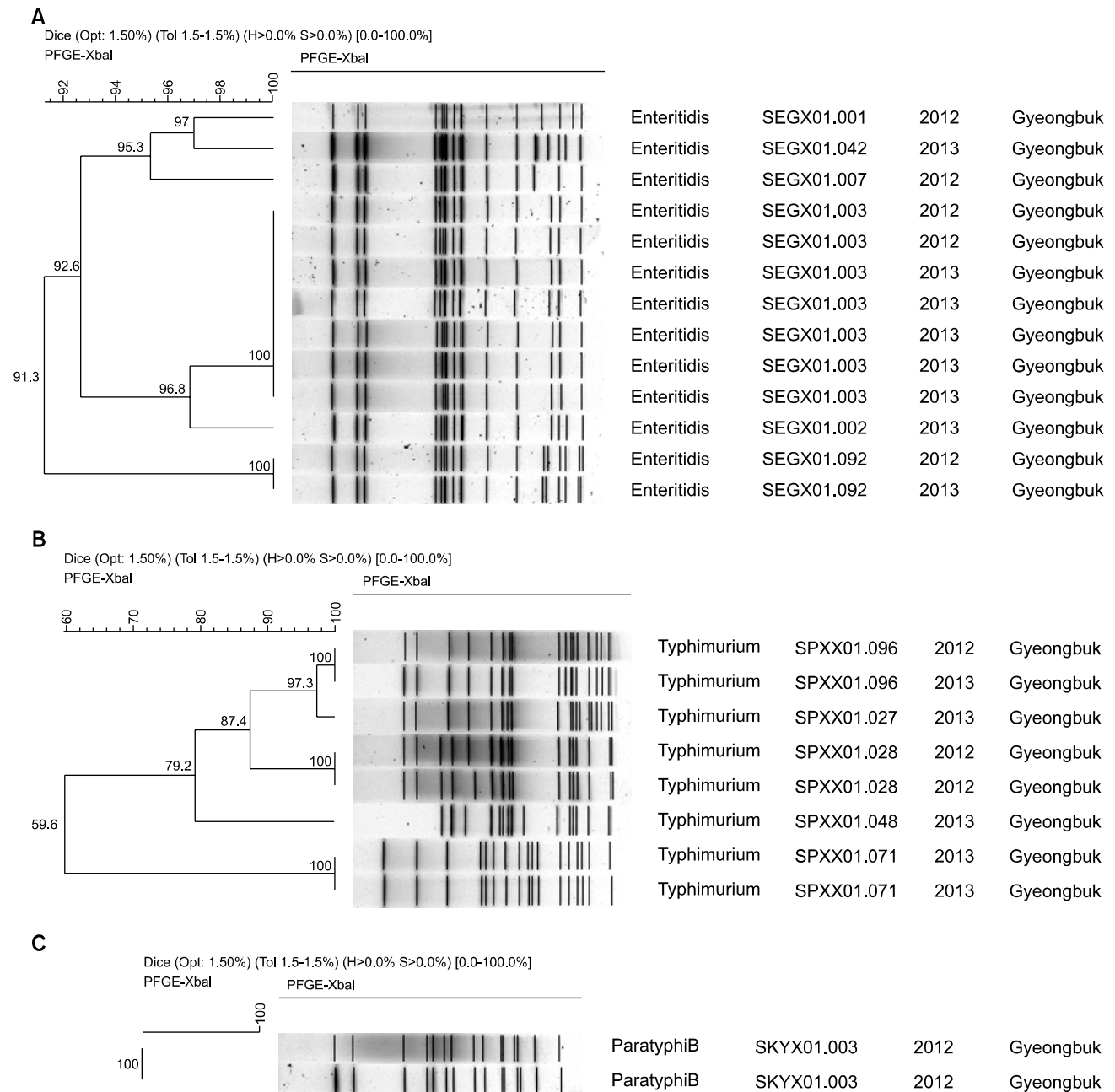


Fig. 1. Clustering of *XbaI* digested PFGE patterns for *Salmonella* spp..

석한 결과, *S. Enteritidis* 7주, *S. Typhimurium* 6주(각 2주), *S. Paratyphi B* 2주가 100%의 유연관계를 보였다(Fig. 1). *S. Enteritidis* 13주에서는 총 6개 PFGE 유형이 확인되었고, 유형 간 유사도는 91.3%였다. 국내 펄스넷 코리아의 *S. Enteritidis* PFGE Data Base 자료와 비교한 결과, SEGX01.003형(7주, 53.8%)이 주요 유형으로 확인되었고, 2군주(15.4%)는 SEGX01.092 유형으로 국내에서는 처음으로 확인되었다. *S. Typhimurium* 8주는 5개 PFGE 유형으로 SPXX01.096, SPXX01.028, SPXX01.017이 각각 2군주씩이 확인되었고 군주 간 연관관계는 97.3-56.9%였으며, 이 중 SPXX01.096은 국내에서 처음으로 확인된 유형이다. *S. Paratyphi B*는 2주 모두 SKYX01.003 유형으로 확인되었고 *S. Bardo*, *S. Infantis*, *S. Sandiego*, *S. Senftenberg*, *S. Stanley*, *S. Thomson*, *S. Typhi*의 다른 혈청형에 대해서도 유전학적 정보를 확보하였다. ESBL을 생산하는 *S. Enteritidis* 3군주의 PFGE유형은 SEGX01.002, SEGX01.042와 SEGX01.092로 각각 다르게 나타났다.

DISCUSSION

일반적으로 살모넬라속균 감염질환에는 항균제를 사용한 치료를 하고 있지는 않지만 합병증이 의심되는 영·유아와 노인, 면역억제제 치료중인 환자 등의 경우에는 quinolone계나 3세대 cephalosporin계 항균제 등을 1차 치료제로 사용하고 있다[17]. 그러나 최근 국내외에서는 이 계열 항균제들에 대해 내성을 보이는 살모넬라속균이 지속적으로 보고되고 있는 실정이며 특히, 국내 살모넬라균에 대한 내성 경향에 대한 보고에 따르면 2008년을 기점으로 AMP나 NA를 중심으로 다양한 종류의 항균제에 대한 내성이 급격하게 증가하고 있는 것으로 확인되고 있다[18,19]. 이러한 항균제 내성의 확산을 방지하기 위해서는 특정 항균제에 어떤 내성 기전이 관여하고 있는지를 확인하고 어떤 경로를 통해서 전파되는지를 알아보는 것에 대한 조사연구가 필수적으로 요구된다.

2012년부터 2013년까지 경북지역에서 분리된 설사원인병원체 가운데 46.8%가 살모넬라속균으로 가장 많이 차지하는 것으로 확인되었고 혈청형별 분석 결과, Enteritidis가 전체 13주로 가장 많았고 Typhimurium이 8주, ParatyphiB가 2주를 차지하고 있었으며 Bardoo, Infantis, Sandiego, Senftenberg, Stanley, Tompson, Typhi 각각 1주씩이 확인되었다. 우리나라에서 분리된 살모넬라균의 AMP 내성률은 전국 평균 44.6% 수준으로 보고되고 있고 대부분의 지역들이 유사한 수준을 보이고 있었으나 경북지역에서는 내성률이 60% 정도로 확인되었고 CTX와 NA에 대한 내성률 역시 전국 평균이 각 9.5%와 43.8%인데 비해 13.3%와 56.7%로 확인되어 전체적으로 경북지역 살모넬라속균 분리주가 항균제에 대한 내성률이 다소 높은 것으로 판단되었다.

CTX에 내성을 보이는 살모넬라속균 4주는 모두 ESBL을 생산하는 것으로 확인되었다. Colom 등[20]과 Melano 등[21]의 연구를 비롯한 최근 관련 연구에서는 ESBL 생산주들은 대부분 하나의 군주에 여러 종류의 *bla* 유전자를 보유하는 것으로 보고되고 있었으나 이번 경북지역에서 확인된 ESBL 생산 살모넬라속균은 *S. Enteritidis* 3개 분리주가 *bla*_{CTX-M-15} 유전자를 *S. Infantis* 1개 분리주가 *bla*_{CTX-M-27} 유전자 한개만을 가지고 있어 최근 유행하고 있는 ESBL 생산주들과는 조금 다른 양상을 보였다[20,21]. ESBL 생산주들은 다양한 replicon 유형의 plasmid에 *bla* 유전자를 보유하고 이것을 통해 내성유전자를 전달하는 것으로 보고되고 있으며 우리나라에서도 사람과 닭에서 분리된 살모넬라속균 분리주들 가운데 *bla*_{CTX-M-15} 또는 *bla*_{CTX-M-14} 유전자를 가진 IncFII와 IncI1 replicon 유형의 plasmid가 보고된 바 있다[22,23]. 본 연구에서도 ESBL을 생산하는 *S. Enteritidis*와 *S. Infantis* 3주가 IncFII 유형의 plasmid에 *bla* 유전자를 포함한 것으로 확인했고 *S. Enteritidis* 1주에서도 IncHI2 replicon 유형의 plasmid에 *bla* 유전자가 존재하는 것으로 확인하였다. 이 결과를 통해서도 기존에 다양한 연구와 마찬가지로 ESBL을 암호화하는 내성 유전자가 plasmid에 의해 매개되어 세균 간 수평적 전달에 의해 쉽게 ESBL 생산능력이 전파될 수 있을 것으로 예상할 수 있었다.

경북지역에서 분리된 30주의 살모넬라속균 중 17주는 NA에 128-256 μ g/mL 내성 범위로 확인되었다. 항균제에 대한 내성의 원인을 확인하기 위해 일차원적인 원인이 되는 것으로 알려진 세균의 DNA gyrase를 암호화하는 *gyrA* 유전자와 topoisomerase IV를 암호화하는 *parC* 유전자의 변이여부를 확인하였다. 그 결과, 내성이 확인된 모든 분리주 중 ParatyphiB 1주가 *gyrA* 유전자의 QRDR 부위의 83번 아미노산 잔기에 변이가 있는 것을 제외하고 모두 87번 아미노산 잔기에 변이가 확인되었다. 선별된 17주들의 MIC값 범위(ciprofloxacin, 0.25-0.5 μ g/mL)로 보면 *gyrA* 유전자에서 이 위치의 변이 외에는 quinolone계 항균제에 대한 내성에 다른 내성기전이 관여하지 않을 것으로 추정되었다[24].

본 연구에서는 항균제 내성 기전을 공유하는 군들 외에도 2년간 경북지역에서 분리된 살모넬라속균 30주를 대상으로 PFGE 시험법을 이용하여 군주 간 유전학적 연관성을 확인해 보고자 하였다. 살모넬라속균의 PFGE 유형은 그 혈청형별로 분석하게 되는데 *S. Enteritidis*의 경우 13주 사이에서 6개의 PFGE 유형이 확인되었고 그 중 7군주가 SEGX01.003유형으로 펄스넷 코리아의 *S. Enteritidis* PFGE Data Base에서 가장 많이 확인되는 유형이었으나 SEGX01.092 유형은 국내에서는 처음으로 확인된 유형으로 펄스넷 코리아 *S. Enteritidis* PFGE Data Base에 새롭게 등록되었다. 그러나 경북지역 *S. Enteritidis* 분리주들 간의 PFGE 유형의 연관관계는 91.26-96.97%로 높게 나타나, 이를 근거로 봤을 때는 13주의 유전학적 근원은 유사한 것

으로 볼 수 있었다. *S. Typhimurium*의 경우에도 펄스넷 코리아 *S. Typhimurium* PFGE Data Base에서 처음으로 SPXX01.096 유형이 확인되긴 했으나 8주사이의 연관관계가 59.63-97.30%로 매우 낮게 나타났으며 또, 항균제의 내성 경향의 차이도 다양해 유적학적 근원이 유사하다고는 볼 수 없었다.

2년 동안 경북지역에서 분리된 살모넬라균속의 특성에 대한 연구를 통하여 주요 항균제에 대한 내성기전이나 분리균들 간의 유전학적 연관성을 확인한 사실은 시사하는 바가 크다. 이 결과는 살모넬라균속 이외에 경북지역에서 분리된 설사 원인 병원체에서도 이 지역만의 다양한 특성의 존재가 가능성을 의미하기 때문이다. 특히, 이들의 항균제 내성기전이 EHEC와 같은 병원성이 강한 병원체나 이질균과 같이 전파속도가 빠른 병원체로 전달될 경우, 경북지역의 공중보건에 있어 심각한 위협이 될 수 있으므로 이에 대한 집중적인 감시 및 관리가 필요하다고 판단된다.

REFERENCES

- Khakhria R, Woodward D, Johnson WM, Poppe C. *Salmonella* isolated from humans, animals and other sources in Canada, 1983-92. *Epidemiol Infect* 1997;119:15-23.
- Jones TF, Ingram LA, Cieslak PR, Vugia DJ, Tobin-D'Angelo M, Hurd S, et al. Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *J Infect Dis* 2008;198:109-14.
- Mermin J, Hutwagner L, Vugia D, Shallow S, Daily P, Bender J, et al; Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: a population-based, case-control study. *Clin Infect Dis* 2004;38 Suppl 3: S253-61.
- Kimura AC, Reddy V, Marcus R, Cieslak PR, Mohle-Boetani JC, Kassenborg HD, et al; Emerging Infections Program FoodNet Working Group. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in the United States: a case-control study in FoodNet sites. *Clin Infect Dis* 2004;38 Suppl 3:S244-52.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis* 2011;17:7-15.
- Gatto AJ, Peters TM, Green J, Fisher IS, Gill ON, O'Brien SJ, et al. Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 4 and *S. Typhimurium* definitive phage type 104 in nine European countries, 2000-2004: results of an international multi-centre study. *Epidemiol Infect* 2006;134:729-36.
- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-51.
- Oteo J, Aracil B, Alós JJ, Gómez-Garcés JL. High rate of resistance to nalidixic acid in *Salmonella enterica*: its role as a marker of resistance to fluoroquinolones. *Clin Microbiol Infect* 2000;6:273-6.
- McEwen SA and Fedorka-Cray PJ. Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis* 2002;34 Suppl 3:S93-106.
- Ewing WH. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*. New York; Elsevier Science Publishing Co. Inc., 1986.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement. Document M100-S20. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
- Kim JY, Jeon SM, Rhie HG, Lee BK, Park MS, Lee H, et al. Rapid detection of extended spectrum β -lactamase (ESBL) for *Enterobacteriaceae* by use of a multiplex PCR-based method. *Infect Chemother* 2009;41:181-4.
- Kim JS, Kim J, Kim SJ, Jeon SE, Oh KH, Cho SH, et al. Characterization of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase-producing diarrheagenic *Escherichia coli* isolates in the Republic of Korea during 2008-2011. *J Microbiol Biotechnol* 2014;24:421-6.
- Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005;63:219-28.
- Casin I, Breuil J, Darchis JP, Guelpa C, Collatz E. Fluoroquinolone resistance linked to GyrA, GyrB, and ParC mutations in *Salmonella enterica* Typhimurium isolates in humans. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1455-7.
- CDC. Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulse-Field Gel Electrophoresis (PFGE). http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/P_NL05_Ec-Sal-ShigPFGEprotocol.pdf [Online.] (last visited on 04 April 2014).
- Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis* 2001;32:263-9.
- Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;54:13-21.
- KARMS. Korean Antimicrobial Resistance Monitoring System. KCDC, 2011.
- Colom K, Pérez J, Alonso R, Fernández-Aranguiz A, Lariño E, Cisterna R. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{OXA-1} genes in *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett* 2003;223:147-51.
- Melano R, Corso A, Petroni A, Centrón D, Orman B, Pereyra A, et al. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:36-42.
- Hopkins KL, Liebana E, Villa L, Batchelor M, Threlfall EJ, Carattoli A. Replicon typing of plasmids carrying CTX-M or CMY beta-lactamases circulating among *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3203-6.
- Tamang MD, Nam HM, Kim TS, Jang GC, Jung SC, Lim SK. Emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-15 and CTX-M-14)-producing nontyphoid *Salmonella* with reduced susceptibility to ciprofloxacin among food animals and humans in Korea. *J Clin Microbiol* 2011;49:2671-5.
- Drlica K and Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61:377-92.

=국문초록=

경북지역 설사환자에서 분리된 *Salmonella* 균의 특성 분석

¹경상북도보건환경연구원 미생물과, ²질병관리본부 국립보건연구원 수인성질환과

권오근¹, 김진석², 김규옥¹, 이창일¹, 정광현¹, 김준영²

배경: 최근 국내외서는 3세대 세팔로스포린계와 퀴놀론계 항균제 내성을 갖는 살모넬라속균에 대한 보고가 증가하고 있다. 이와 관련하여 본 연구에서는 경북지역 설사환자에서 분리된 살모넬라속균을 대상으로 하여 항균제 내성 경향을 확인하고 주요 항균제에 대한 내성주를 선별하여 원인을 하고자 했으며 추가로 이 지역에서 분리된 살모넬라속균의 유전학적 연관성을 확인하고자 했다.

방법: 2012년부터 2013년까지 경북지역 설사환자에서 분리된 살모넬라속균을 대상으로 혈청형 확인을 확인하고 Sensititre 패널을 이용하여 최소억제농도(MIC)값을 측정한 후 WHONet 프로그램을 이용하여 항균제 내성 경향을 분석하였다. 이 결과를 토대로 확인된 주요 항균제에 대해 내성을 보이는 균주는 선별하여 그 내성원인기전을 확인 하였다. 추가로 경북지역에서 분리된 모든 살모넬라속균은 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)를 이용하여 균주간 유전학적 연관성을 확인하였다.

결과: 경북지역에서 설사환자에서 분리된 살모넬라속균 30주는 10개의 혈청형으로 확인되었다. 이 중 21주가 1개이상 항균제에 내성을 보였고 4주가 extended spectrum beta lactamase (ESBL)을 생산하였으며 17주가 퀴놀론계 항균제 내성주로 확인 되었다. ESBL 생산 살모넬라속균은 *S. Enteritidis* 3주에서 CTX-M-15형 ESBL을 생산하였고 *S. Infantis* 1주가 CTX-M-27형 ESBL을 생산하는 것으로 확인되었으며 IncFII (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-27})과 IncHI2 (*bla*_{CTX-M-15}) replicon 유형의 plasmid에 *bla* 유전자를 보유하고 있었다. 17개의 퀴놀론계 항균제에 내성인 균주는 *S. Paratyphi* 1주가 *gyrA* 유전자의 83번 아미노산 잔기에 변이가 있는 것을 제외하고 모두 87번 아미노산 잔기에 변이가 확인되었다. 경북지역에서 분리된 살모넬라속균을 대상으로 혈청형별로 PFGE 분석한 결과, *S. Enteritidis* 13주는 연관관계가 91.26-96.97%로 유전학적 근원이 유사한것으로 확인되었으나 *S. Typhimurium*은 59.63-97.30%로 비교적 낮은 연관성을 갖는 것으로 확인되었다.

결론: 설사환자에서 분리된 주요 항균제에 대해 내성을 보이는 살모넬라속균들은 경북지역외에도 국내 공중보건에 심각한 위협이 될 수 있을 것으로 추정되며 향후 이에 대한 집중적인 감시 및 관리가 필요할 것으로 판단된다. [Ann Clin Microbiol 2014;17:50-57]

교신저자 : 김준영, 363-700, 충북 청원군 오송읍 오송생명2로 187
질병관리본부 국립보건연구원 감염병센터 수인성질환과
Tel: 043-719-8116, Fax: 043-719-8149
E-mail: jun49@hanmail.net