

# 임상 검체에서 분리된 nontyphoid *Salmonella*에서의 integron의 빈도와 특징

울산대학교 항균제내성 미생물유전학 연구센터<sup>1</sup>, 울산대학교 의과대학 서울아산병원 감염내과<sup>2</sup>, 울산대학교 의과대학 서울아산병원 진단검사의학과<sup>3</sup>, 성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 진단검사의학과<sup>4</sup>, 질병관리본부 장내세균과<sup>5</sup>  
이정은<sup>1,2</sup>·박수진<sup>1,2</sup>·김성한<sup>1,2</sup>·김미나<sup>3</sup>·이남용<sup>4</sup>·이복권<sup>5</sup>·이상오<sup>1,2</sup>·김양수<sup>1,2</sup>·우준희<sup>1,2</sup>·최상호<sup>1,2</sup>

## Detection and Characterization of Integrons in Nontyphoid *Salmonella* Clinical Isolates

Jung Eun Lee<sup>1,2</sup>, Su Jin Park<sup>1,2</sup>, Sung-Han Kim, M.D.<sup>1,2</sup>, Mi-Na Kim, M.D.<sup>3</sup>, Nam Yong Lee, M.D.<sup>4</sup>, Bok Kwon Lee, Ph.D.<sup>5</sup>, Sang-Oh Lee, M.D.<sup>1,2</sup>, Yang Soo Kim, M.D.<sup>1,2</sup>, Jun Hee Woo, M.D.<sup>1,2</sup> and Sang-Ho Choi, M.D.<sup>1,2</sup>  
Center for Antimicrobial Resistance and Microbial Genomics<sup>1</sup>, University of Ulsan, Department of Infectious Diseases<sup>2</sup>, and Department of Laboratory Medicine<sup>3</sup>, University of Ulsan College of Medicine, Asan Medical Center, Department of Laboratory Medicine<sup>4</sup>, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Division of Enteric Bacterial Infection<sup>5</sup>, Korean Center for Disease Control and Prevention, Seoul, Korea

**Background :** Nontyphoid *Salmonella* (NTS) is a leading cause of human food-borne enteritis. It has been known that integron, a naturally occurring gene capture and expression element, plays an important role in the development and dissemination of multidrug-resistance. In this study, we investigated the prevalences and molecular characteristics of integrons in NTS clinical strains.

**Materials and Methods :** Between 1995–96 and 2000–03, a total 261 NTS clinical strains comprising 39 serotypes were collected from clinical specimens. All strains were serotyped, and the MICs of ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline, and trimethoprim were determined by agar dilution method. Integrons were detected by PCR amplification of integrase genes, and gene cassettes were determined by PCR and sequencing. Conjugation experiments were performed using *E. coli* J53 as a recipient. The clonal relationship was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).

**Results :** Of the 261 strains tested, class 1 integrons were present in 21 strains (8.0%). Class 2 and class 3 integrons were not found. The integron-positive rate was higher in *S. Typhimurium* (24.2% [8/33]) than in *S. Enteritidis* (2.0% [3/153]). Overall rates of antimicrobial resistance were higher in integron-positive strains. *dhfr12-orfF-aadA2* gene cassette was detected in 5 strains, *aadA2* in 4 strains, *dhfr17-orfF-aadA5* in 2 strains, and *addA1* in 1 strain. Ten integron-positive transconjugants were successfully selected. Among 8 integron-positive strains of *S. Typhimurium*, 7 had similar PFGE patterns.

**Conclusion :** This study suggests that integrons are already playing a significant role in antimicrobial resistance in NTS. Continuous monitoring is needed to detect the emergence and spread of integron-mediated antimicrobial resistance.

**Key Words :** *Salmonella*, Integrons, Antibiotic resistance

## 서 론

Nontyphoid *Salmonella* (NTS)는 식품매개 식중독의 중요한 원인균으로 NTS에서의 항균제 내성이 가지는 보건

학적 의미는 매우 크다. 최근 주로 외국 연구들에서 NTS에서 항균제 내성과 세균 간의 내성 관련 유전자들의 전달에 integron의 역할이 큼이 보고 되었다(1–5). Integron은 주로 그람 음성 세균에서 발견되며 그 내부에 하나 또는 그 이상의 항균제 내성관련 유전자를 포함하는 이동 가능한 유전자 집단(mobile gene cassette)이다(6). Integron의 발견은 내성 유전자들의 DNA 염기서열 분석과정에서 상류지역에 동일한 서열이 존재함을 관찰함으로써 1980년대 중

Submitted : 23 February, 2009, Accepted : 24 March, 2009  
Correspondence author : Sang-Ho Choi, M.D.  
Department of Infectious Diseases, Asan Medical Center,  
Asanbyeongwon-gil 86, Songpa-gu, Seoul 138-736, Korea  
Tel : +82-2-3010-3304, Fax : +82-2-3010-6970  
E-mail : sangho@amc.seoul.kr

반에 이루어졌지만(7), 항균제 내성과 관련되기 이전부터 존재했던 것으로 추정되며 세균 간의 유전자 전달을 통해 세균의 진화과정에 큰 역할을 해 온 것으로 추정된다(8). Integron은 재조합 효소(recombinase)를 생산하는 integrase 유전자(*intI*)의 염기서열에 따라 class 1에서 class 5 까지 다섯 종류로 구분되는데 class 4와 class 5는 *Vibrio* species에서만 발견된다(8). Class 1, class 2, class 3는 주로 그람 음성세균에서 발견되고 항균제 내성과 관련이 있는데, 그 중 class 1 integron이 가장 흔하며 임상적으로 의미를 가지는 경우가 많다(9). Class 1 integron에는 공통적으로 5' 말단 불변영역(5' conserved sequence; 5'-CS)와 3' 말단 불변영역(5' conserved sequence; 3'CS)이 있고 그 사이에 가변영역(variable region)이 존재하는데, 이 가변영역 내의 *attI* 유전자 위치에 내성 관련 유전자 집단(gene cassette)이 삽입됨으로써 그람 음성 세균의 항균제 내성에 관여하게 된다(9, 10). Integron 내에는 삽입과 절단된 유전자의 순서에 따라 다양한 형태와 수가 존재하고 이에 따라 여러 가지 조합형의 다제 내성균 출현이 가능하게 되며 세균 간에 이동을 통해 쉽게 전파될 수 있는 특징을 가진다(9, 11). 따라서 integron의 분포와 특징에 대한 연구는 그람 음성 세균에서의 항균제 내성의 출현과 전파를 추적하는데 있어 매우 중요한 역할을 한다고 하겠다.

본 연구는 우리나라 환자들의 임상검체에서 분리된 NTS 균주들을 대상으로하여 항균제 내성의 분포와 변화, integron의 보유율과 유전자학적 특성을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상균주

임상 검체에서 분리된 NTS 261 균주를 대상으로 하였다. 균주는 서울아산병원과 삼성서울병원에서 전향적으로 수집되었으며 1995-1996년 사이에 54 균주, 2000-2003년 사이에 207 균주가 수집되었다. 검체별로 살펴보면 대변에서 분리된 경우가 209 균주(80.0%)로 가장 많았으며, 혈액에서 23 균주(8.8%), 기타 검체에서 29 균주(11.1%)가 분리되었다. 한 환자당 1 균주만을 대상으로 하였다.

혈청형 구분은 Kauffman-White scheme에 따라 결정하였고(12) *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*)와 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*)로 분류된 균주들은 O-항원은 슬라이드 응집 법으로, H-항원은 시험관 응집 법으로 결정하여 파지형을 결정하였다(13). 총 261 균주는 39개의 혈

청형으로 분류되었다. *S. Enteritidis*가 가장 많았고(58.6%, 153/261), *S. Typhimurium* (12.6%, 33/261), *S. London* (5.4%, 14/261), *S. Sinstorff* (3.1%, 8/261)의 순이었다. 그 외 *S. Hadar*가 6 균주(2.3%), *S. Montevideo* 4 균주(1.5%), *S. Heidelberg*와 *S. Infantis*가 각각 3 균주(1.1%), *S. Concord*, *S. Ngili*, *S. Braenderup*, *S. Dublin*, *S. Brandenburg*, *S. Geraldton*이 각각 2균주(0.8%), *S. Bareilly*, *S. Mbankada*, *S. Bukuru*, *S. Tennessee*, *S. Haifa*, *S. Schwarzengrund*, *S. Pakistan*, *S. Mkamba*, *S. Larochelle*, *S. Hadar*, *S. Manhattan*, *S. Bardo*, *S. Blockley*, *S. Eschweiler*, *S. Nchanga*, *S. Gallinarum*, *S. Onireke*, *S. Bradford*, *S. Essen*, *S. Cuckmere*, *S. Othmarschen*, *S. Suberu*, *S. Stanley*, *S. Kedougou* or *S. Pisa*, *Salmonella enterica* subspecies *salamae*가 각각 1 균주씩(0.4%)였다. *S. Enteritidis* 153 균주는 9개의 파지형으로 분류되었고, PT21 (42.5%, 65/153), PT4 (23.5%, 36/153), PT1 (20.3%, 31/153)의 순이었다. *S. Typhimurium* 33 균주는 11개의 파지형으로 분류되었는데 DT104 complex (21.2%, 7/33; 104B 4 균주, 104L 3 균주), DT49B (18.2%, 6/33), DT190 (9.1%, 3/33) 순이었다. 저자들은 이들 균주들을 대상으로 하여 nalidixic acid 내성의 빈도와 내성기전에 대한 연구결과를 보고한 바 있다(14).

### 2. Integron 유전자에 대한 중합효소 연쇄반응 검사 (polymerase chain reaction, PCR)

DNA를 추출하여 integrase 유전자(*IntI*)에 대한 PCR을 시행하였다. PCR을 위한 primer로는 hep 35 (5'-TGC GGG TYA AAR GAT BTK GAT TT-3')와 hep 36 (5'-CAR CAC ATG CGT RTA RAT-3')를 사용하였다(9). PCR 반응 혼합물 50  $\mu$ L에는 DNA 20 ng, 각각의 primer 10 pmole씩, *Taq* polymerase (TaKaRa-Korea Biomedical, Inc., Seoul, Korea) 1.25 U, 10 $\times$  buffer 5  $\mu$ L, 10 mM dNTP, 증류수 37  $\mu$ L을 포함시켰다. PCR 반응의 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 1회 반응 후 94 $^{\circ}$ C에서 40초, 57 $^{\circ}$ C에서 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 반응을 30 회 반복하고 최종 72 $^{\circ}$ C에서 10분간 증폭하였다. 이렇게 얻은 증폭산물을 1.0% agarose gel에서 100V로 20분 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 아래에서 확인하였다.

### 3. Integron의 유전자형 분류

Integron의 유전자형을 보기 위하여 제한효소인 *Rsa*I (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)와 *Hinf*I

(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)를 이용하여 restriction fragment length polymorphism (RFLP) 검사를 시행하였다. PCR product 5  $\mu$ L와 10 $\times$  restriction enzyme buffer 2  $\mu$ L, 제한효소 *Rsa*I 또는 *Hinf*I 2.0 U를 섞고 멸균된 증류수로 최종 제한효소 반응액을 20  $\mu$ L로 맞추고 37 $^{\circ}$ C 1시간 반응시킨 후 1.5% agarose gel에 전기영동 하였다. 전기영동 상에서 보인 산물들의 크기를 기준으로 integron의 종류를 결정하였다(9).

#### 4. 항균제 감수성 검사

항균제 감수성 검사는 Mueller-Hinton 배지를 사용하여 한천 희석법으로 ampicillin (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), chloramphenicol (Sigma), streptomycin (Sigma), sulfamethoxazole (Sigma), tetracycline (Sigma), trimethoprim (Sigma)에 대한 최소억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 결정하였다. Nalidixic acid에 대한 MIC 검사는 E-test (AB biodisk, Solna, Sweden)를 사용하였다. 표준 균주로는 *Escherichia coli* ATCC 25922를 사용하였고 모든 검사를 2회 이상 반복하여 Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)의 기준에 따라 각 항균제에 대한 내성 여부를 결정하였다(15).

#### 5. Gene cassette 염기서열 분석

Gene cassette에 있는 유전자를 알아 보기 위해 PCR과 염기서열분석을 시행하였다. Primer로는 hep 58 (5'-TCA TGG CTT GTT ATG ACT GT-3')과 hep 59 (5'-GTA GGG CTT ATT ATG CAC GC-3')를 사용하였고 (16), 염기서열 결정은 ABI Prism<sup>®</sup> BigDye Terminators Cycle Sequencing Kit와 ABI Prism<sup>®</sup> 3700 Automated DNA Analyzer (Applied Biosystem, Foster, USA)를 사용하였다. 염기서열 분석은 BLAST 2.0 프로그램(National Center for Biotechnology Information, <http://ncbi.nlm.nih.gov>)을 이용하였다.

#### 6. 접합(conjugation)에 의한 내성 전달 시험

Integron을 포함한 plasmid가 다른 세균으로 전달 가능한지 알아보기 위해 접합(conjugation) 실험을 하였다. Sodium azide에 내성인 *E. coli* J53을 수용자(recipient)로 사용하였다. Integron 양성균주와 *E. coli* J53을 trypticase soy broth (TSB)에 하루 배양한 후, 각 0.4 ml씩 TSB 4 mL와 섞어 16-18시간 배양하였다. 이를 sodium azide (Sigma) 100  $\mu$ g/mL와 ampicillin (Sigma) 100  $\mu$ g/mL 또는 streptomycin (Sigma) 100  $\mu$ g/mL을 포함한

trypticase soy agar (TSA) 배지에 접종하여 피전달접합 균주(transconjugant)를 선별하였다. 선별된 균주들을 대상으로 integrase에 대한 PCR을 시행하여 integron을 확인하고 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline, trimethoprim에 대한 MIC를 측정하였다.

#### 7. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

대상균을 5 mL의 TSB 배지에서 하룻밤 배양하여 균침사를 PIV 완충용액(10 mM Tris, pH 7.6, 1 M NaCl)에 부유시켜 1.3% InCert Agarose (FMC Biopro, Rockland, USA)에 동량을 섞은 후 즉시 주형(mold)에 넣어 plug을 만들었다. Plug을 준비된 lysis 용액(6 mM Tris pH 6.0, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 7.6)에 넣어 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에 잠기도록 하여 하룻밤 반응시켰다. 그 후 4 ml ESP 용액(0.5 M EDTA pH 8.0, 2% sodium lauryl sarcosine, 20  $\mu$ g/mL proteinase K)를 넣어 진탕 항온 수조에서 55 $^{\circ}$ C에서 6시간 처리 후, 37 $^{\circ}$ C 항온 수조에서 증류수로 2회, TE 완충용액(10 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA pH 7.6)으로 2회 세척하였다. 제한 효소 *Xba*I (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)을 37 $^{\circ}$ C에서 18시간 동안 처리하였다. 반응이 끝나면 plug을 1% SeaKem GTG agarose gel (Cambrex Bio Science, Rockland, USA)의 well에 넣고 CHEF-DRIII system (Bio-rad Laboratories, Inc., USA)을 이용하여 22시간 동안 전기영동(6 volt/cm, 120 $^{\circ}$ , initial time 2.2 sec, final time 54.2 sec) 하였다. Gel을 0.5  $\mu$ g/mL ethidium bromide로 30분간 염색 후 증류수로 2시간 탈 염색하고 자외선에서 확인하였다. 균주간의 유연 관계는 Tenover 등이 제안한 기준(17)으로 비교 분석하였다.

### 결 과

#### 1. Integron 보유율과 분류

261 균주 중 21 균주(8.0%)가 integrase 검출을 위한 PCR에 양성이었다. 21 균주 중에서는 *S. Typhimurium*가 8 균주(38.0%)로 가장 많았고, *S. Enteritidis* 3균주(14.2%), *S. Heidelberg*와 *S. Montevideo*가 각각 2 균주(9.5%), 그 외에 *S. Dublin*, *S. Sinthof*, *S. Cuckmere*, *S. Othmarschen*, *S. Haifa*, *Salmonella enterica* subspecies *salamae*가 각각 1균주였다. 혈청형 별로 integron 보유율을 살펴보면 *S. Typhimurium* 24.2% (8/33), *S. Enteritidis* 2.0% (3/153), *S. Montevideo* 50.0% (2/4), *S.*

Heidelberg 66.6% (2/3)이었다. RFLP 결과 21 균주 모두에서 491 bp의 1 band만이 관찰되어 모두 class 1 integron으로 확인되었다.

## 2. 약제내성양상

항균제 감수성 검사 결과는 Table 1에 정리하였다. 전체 균주에서의 내성률 변화를 살펴보면 trimethoprim을 제외하고 감수성 시험을 시행한 모든 항균제의 내성률이 1995-1996년 균주에 비해 2000-2003년 분리 균주에서 증가하였다. 주요 혈청형인 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*의 경우에는 *S. Enteritidis*에서 trimethoprim의 내성률이 3.2%에서 1.6%로 감소한 것을 제외하고는 내성률이 증가하였다. *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*를 제외한 균주들의 경우 ampicillin, streptomycin, tetracycline, trimethoprim의 내성률은 감소하였으나 1995-1996년에 분리된 균주의 수가 9 균주로 적어 해석에 주의를 요한다.

Integron 존재 유무에 따라 항균제 MIC를 비교해 보았

는데(Table 2), 전체 균주에서의 내성률 변화를 살펴보면 nalidixic acid를 제외한 모든 항균제에 대한 내성률이 integron 양성 균주 군에서 높았다. 다제내성(세 개 계열 이상의 항균제에 내성)인 경우도 integron 양성 균주들에서 integron 음성인 균주에 비해 많았다(85.7% [18/21] vs. 32.9% [79/240]). Integron 양성이었던 *S. Typhimurium* 8 균주의 경우 chloramphenicol, streptomycin, tetracycline에 대해 100%, ampicillin, sulfamethoxazole에 대해 87.5% (7/8)가 내성이었다. 하지만, *S. Enteritidis*의 경우 streptomycin에 대한 내성률은 변화가 없었고(33.3% vs. 33.3%) tetracycline에 대한 내성률은 integron 음성 균주들에서 더 높았다(92.0% vs. 66.6%).

## 3. Gene cassette에 대한 염기서열 분석

Integron 양성 21 균주의 gene cassette에 대한 PCR 결과는 Table 3에 정리하였다. 7 균주에서 약 2 kb, 5 균주에서 약 1 kb 크기의 PCR band가 발견되었다. 6 균주에서

Table 1. Antibiotic Resistance Patterns of 261 Nontyphoid *Salmonella* strains

Serotype (number)	No. of resistant isolates (%)						
	AMC	CHP	SM	SMX	TC	TMP	NA
Period of 1995-1996							
<i>S. Enteritidis</i> (n=31)	4 (12.9)	1 (3.2)	2 (6.4)	4 (12.9)	5 (16.1)	1 (3.2)	0
<i>S. Typhimurium</i> (n=14)	0	2 (14.2)	2 (14.2)	3 (21.4)	9 (64.2)	4 (28.5)	1 (7.1)
Others (n=9)	3 (33.3)	1 (11.1)	5 (55.5)	4 (44.4)	6 (66.6)	3 (33.3)	0
Subtotal (n=54)	7 (12.9)	4 (7.4)	9 (16.6)	11 (20.3)	20 (37.0)	8 (14.8)	1 (1.8)
Period of 2000-2003							
<i>S. Enteritidis</i> (n=122)	61 (50.0)	12 (9.8)	49 (40.1)	64 (52.4)	54 (44.2)	2 (1.6)	33 (27.0)
<i>S. Typhimurium</i> (n=19)	8 (42.1)	9 (47.3)	17 (89.4)	14 (73.6)	15 (78.9)	6 (31.5)	3 (15.7)
Others (n=66)	19 (28.7)	8 (12.1)	15 (22.7)	19 (28.7)	22 (33.3)	4 (6.0)	9 (13.6)
Subtotal (n=207)	88 (42.5)	29 (14.0)	81 (39.1)	97 (46.8)	91 (43.9)	12 (5.7)	45 (21.7)

Abbreviations: AMC, ampicillin; CHP, chloramphenicol; SM, streptomycin; SMX, sulfamethoxazole; TC, tetracycline; TMP, trimethoprim; NA, nalidixic acid

Table 2. Antibiotic Resistance Patterns According to the Presence or Absence of Integron

Strain (number)	No. of resistant isolates (%)							
	AMC	CHP	SM	SMX	TC	TMP	NA	MDR
Integron positive (n= 21)	18 (85.7)	12 (57.1)	16 (76.1)	18 (85.7)	17 (80.9)	11 (52.3)	3 (14.2)	18 (85.7)
Integron negative (n=240)	76 (31.6)	20 (8.3)	72 (30.0)	88 (36.6)	97 (40.4)	4 (1.6)	43 (17.9)	79 (32.9)
<i>S. Enteritidis</i> (n=153)	65 (42.4)	13 (8.4)	51 (34.6)	68 (44.4)	60 (29.2)	3 (1.9)	33 (21.5)	60 (39.2)
Integron positive (n=3)	2 (66.6)	1 (33.3)	1 (33.3)	3 (100)	2 (66.6)	1 (33.3)	0	2 (66.6)
Integron negative (n=150)	63 (42.0)	12 (18.6)	50 (33.3)	65 (43.3)	58 (92.0)	2 (3.1)	33 (22.0)	58 (38.6)
<i>S. Typhimurium</i> (n=33)	9 (27.3)	11 (33.3)	19 (57.5)	17 (51.5)	28 (84.8)	7 (21.2)	4 (12.1)	18 (54.5)
Integron positive (n=8)	7 (87.5)	8 (100)	8 (100)	7 (87.5)	8 (100)	5 (62.5)	2 (25.0)	8 (100)
Integron negative (n=25)	2 (8.0)	3 (12.0)	11 (44.0)	10 (40.0)	20 (80.0)	2 (8.0)	2 (8.0)	10 (40.0)
Others (n=75)	22 (29.3)	9 (12.0)	20 (26.6)	23 (30.66)	28 (37.3)	7 (9.3)	9 (12.0)	19 (25.3)
Integron positive (n=10)	9 (90.0)	3 (30.0)	7 (70.0)	8 (80.0)	7 (70.0)	5 (50.0)	1 (10.0)	8 (90.0)
Integron negative (n=65)	13 (20.0)	6 (9.2)	13 (20.0)	15 (23.0)	21 (35.3)	2 (3.0)	8 (12.3)	11 (16.9)

Abbreviations: AMC, ampicillin; CHP, chloramphenicol; SM, streptomycin; SMX, sulfamethoxazole; TC, tetracycline; TMP, trimethoprim; NA, nalidixic acid; MDR, multidrug resistance (defined as resistance to more than 3 classes of antibiotics)

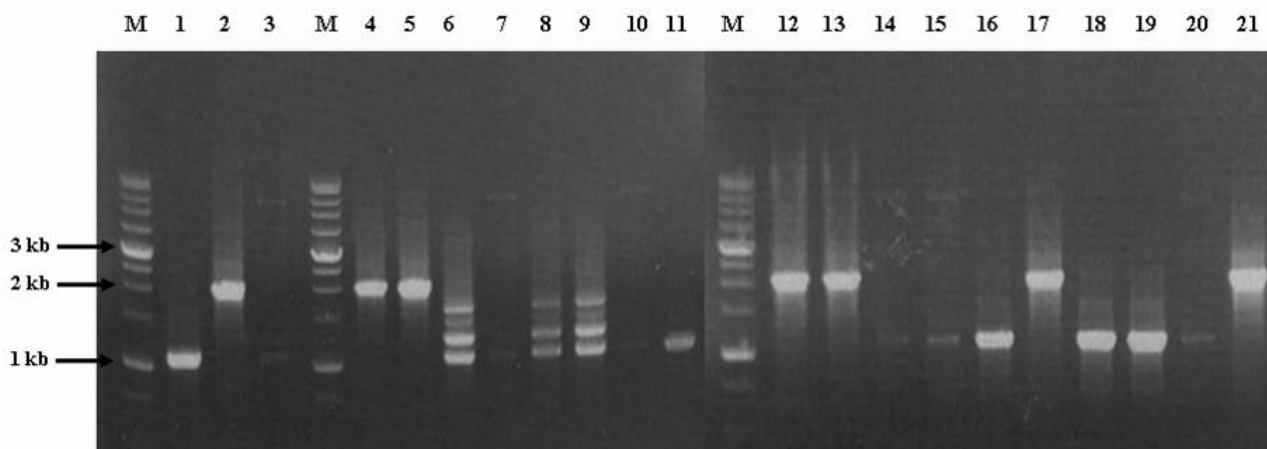
는 integron 내에 PCR band가 발견되지 않았고, 3 균주는 여러 band와 DNA 증폭이 약하게 되어 염기서열 분석을 할 수 없었다(Fig. 1).

Integron내 gene cassette에 대한 염기서열 분석 결과 PCR 산물이 약 2 kb 크기인 7 균주 중에서 5 균주(*S. Enteritidis* PT4, *S. Typhimurium* RDNC, *S. Typhimurium* DT190, *S. Sinstorf*, *S. Haifa* 각각 1 균주)에서 *dhfr12-orfF-aadA2*, *S. Heidelberg* 2 균주에서 *dhfr17-*

*orfF-aadA5*가 존재하였다(Table 3). PCR 산물이 약 1 kb 크기인 5 균주 중 4 균주(*S. Typhimurium* DT104L, *S. Dublin*, *S. Cuckmere*, *S. Haifa* 각각 1 균주)가 *aadA2*, *S. Enteritidis* PT4 1 균주가 *aadA1* 를 가지고 있었다.

#### 4. 접합에 의한 내성 전달

Integron을 가지고 있는 21 균주 중 10 균주(47.6%)에서 접합에 의한 내성 전달이 확인되었다. 이들 균주와 상응



**Figure 1.** Polymerase chain reaction fragments from the cassette regions of class 1 integrons. M, Molecular weight Marker (1 kb ladder); *S. Enteritidis* (Lanes 1–3); *S. Typhimurium* (Lanes 4–11); *S. Heidelberg* (Lanes 12, 13); *S. Montevideo* (Lanes 14, 15); *S. Dublin* (Lane 16); *S. Sinstorf* (Lane 17); *S. Cuckmere* (Lane 18); *S. salamae* (Lane 19); *S. Othmarschen* (Lane 20); *S. Haifa* (Lane 21).

**Table 3.** Distribution of Class 1 Integron Gene Cassette and Antibiotic Resistance Patterns of 21 Integron-carrying Strains

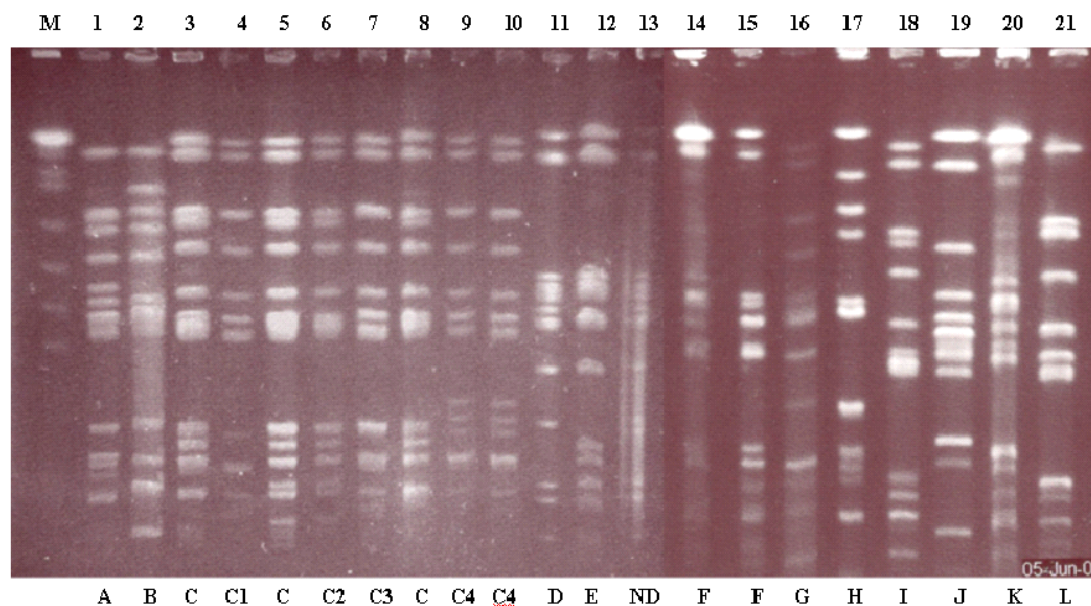
Strain number	Serotype or subspecies	Phage type	PCR size (kb)	Gene cassette	Resistance patterns
1	<i>S. Enteritidis</i>	PT4	1.0	<i>aadA1</i>	SSu
2	<i>S. Enteritidis</i>	PT4	2.0	<i>dhfr12-orfF-aadA2</i>	ASuTTm
3	<i>S. Enteritidis</i>	PT6	–	–	ACSuT
4	<i>S. Typhimurium</i>	RDNC	2.0	<i>dhfr12-orfF-aadA2</i>	ACSSuTTmN
5	<i>S. Typhimurium</i>	DT190	2.0	<i>dhfr12-orfF-aadA2</i>	ACSSuTTmN
6	<i>S. Typhimurium</i>	DT8	–	–	ACSTTm
7	<i>S. Typhimurium</i>	DT20	–	–	CSSuT
8	<i>S. Typhimurium</i>	DT36	–	–	ACSSuTTm
9	<i>S. Typhimurium</i>	DT104B	–	–	ACSSuTTm
10	<i>S. Typhimurium</i>	DT104L	–	–	ACSSuT
11	<i>S. Typhimurium</i>	DT104L	1.0	<i>aadA2</i>	ACSSuT
12	<i>S. Heidelberg</i>	–	2.0	<i>dhfr17-orfF-aadA5</i>	ACSSuTm
13	<i>S. Heidelberg</i>	–	2.0	<i>dhfr17-orfF-aadA5</i>	ASSuTTm
14	<i>S. Montevideo</i>	–	–	–	AT
15	<i>S. Montevideo</i>	–	–	–	AT
16	<i>S. Dublin</i>	–	1.0	<i>aadA2</i>	ASSu
17	<i>S. Sinstorf</i>	–	2.0	<i>dhfr12-orfF-aadA2</i>	ASuTm
18	<i>S. salamae</i>	–	1.0	<i>aadA2</i>	SSuT
19	<i>S. Cuckmere</i>	–	1.0	<i>aadA2</i>	ACSSuT
20	<i>S. Othmarschen</i>	–	–	–	ASSuTTm
21	<i>S. Haifa</i>	–	2.0	<i>dhfr12-orfF-aadA2</i>	ACSSuTTmN

Abbreviations : RDNC, reacts but dose not conform to any standard phage type; A, ampicillin; C, chloramphenicol; S, streptomycin; S, sulfamethoxazole; T, tetracycline; Tm, trimethoprim; N, nalidixic acid

Table 4. Antibiotic Resistance Patterns and MICs for 10 Conjugated Strains and Their Transconjugants

Strain number	Strain	Resistance profile	MIC ( $\mu$ L/mL)					
			AMC	CHP	SM	SMX	TC	TMP
1	<i>S. Enteritidis</i> PT4	SSu	8	4	128	>512	1	0.25
	Transconjugant	Su	16	4	16	512	1	0.125
4	<i>S. Typhimurium</i> RDNC	ACSSuTTmN	>128	>128	>128	>512	>128	>128
	Transconjugant	ACSSuTmN	>128	>128	64	>512	4	>128
5	<i>S. Typhimurium</i> DT190	ACSSuTTmN	>128	>128	>128	>512	>128	>128
	Transconjugant	ACSSuTTmN	>128	>128	>128	>512	>128	>128
7	<i>S. Typhimurium</i> DT20	CSSuT	8	64	>128	>512	128	0.25
	Transconjugant	CSSu	16	128	64	512	1	0.125
12	<i>S. Heidelberg</i>	ACSSuTm	>128	128	>128	>512	1	>128
	Transconjugant	ASSuTm	>128	8	>128	512	1	>128
13	<i>S. Heidelberg</i>	ASSuTTm	>128	4	128	>512	>128	>128
	Transconjugant	ASSuTm	>128	4	128	>512	1	>128
14	<i>S. Montevideo</i>	AT	>128	4	4	32	128	0.25
	Transconjugant	AT	>128	4	1	4	128	0.125
17	<i>S. Sinfors</i>	ASuTm	>128	4	16	>512	1	>128
	Transconjugant	ATm	>128	4	8	16	1	>128
20	<i>S. Othmarschen</i>	ASSuTTm	>128	4	>128	>512	128	>128
	Transconjugant	ASTTm	>128	4	64	8	128	>128
21	<i>S. Haifa</i>	ACSSuTTmN	>128	>128	>128	>512	>128	>128
	Transconjugant	ACSSuTTmN	>128	>128	>128	>512	>128	>128
	<i>E.coli</i> Az <sup>R</sup> J53		16	4	4	16	1	0.5

Abbreviations: RDNC, reacts but dose not conform to any standard phage type; A or AMC, ampicillin; C or CHP, chloramphenicol; or SM, streptomycin; Su or SMX, sulfamethoxazole; T or TC, tetracycline, Tm or TMP, trimethoprim



**Figure 2.** Pulsed-field gel electrophoresis patterns of chromosomal DNA restriction fragments resolved in 1.0% Seakem Gold agarose in 0.5×TBE buffer for *Salmonella* DNA digestion with *Xba*I. M, ladder size marker; *S. Enteritidis* (Lanes 1–3); *S. Typhimurium* (Lanes 4–11); *S. Heidelberg* (Lanes 12,13); *S. Montevideo* (Lanes 14,15); *S. Dubulin* (Lane 16); *S. Sinfors* (Lane 17); *S. salamae* (Lane 18); *S. Cuckmere* (Lane 19); *S. Othmarschen* (Lane 20); *S. Haifa* (Lane 21); ND, not determined.

하는 10 균주의 피전달접합균주(transconjugant)의 각 항균제에 대한 MIC 결과 및 내성양상(resistance profile)은 Table 4에 정리하였다. 내성양상을 기준으로 하였을 경우 3 균주는 공여균과 일치하였고, 7 균주는 각각 한 항균제

를 제외하고는 내성양상이 일치하였다(Table 4).

## 5. PFGE

대상 균주의 PFGE 양상은 모두 12형(A–L)으로 분류

되었으며 그 중 *S. Enteritidis*는 서로 연관성이 없었고 *S. Typhimurium* 8 균주 중 7 균주, *S. Heidelberg* 2 균주가 유사했다(Fig. 2). 혈청형이 다른 균주들은 모두 다른 유전자형이었다.

## 고 찰

본 연구에서는 국내 임상 검체에서 분리된 NTS 균주들을 대상으로 전달성 내성(transferable antimicrobial resistance)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 integron의 빈도와 유전학적 특성에 관한 연구를 수행하였다. 현재까지 우리나라에서 사람에게서 분리된 *Salmonella enterica*에서의 integron에 관한 연구는 매우 제한적이다. NTS를 대상으로 하였던 연구 결과를 살펴보면, Oh 등은 1999년에서 2002년 사이에 서울시 보건환경연구원에 검사의뢰 되었던 식중독환자의 분변검체에서 분리된 *S. Typhimurium* 49 균주 중 4균주(8.2%)에서 class 1 integron이 존재 함을 보고하였고(18), Sohn 등은 2003년에서 2004년 사이에 경북지역의 설사환자에서 분리된 *S. Typhimurium* 17 균주 중 3 균주(17.6%)에서 class 1 integron이 존재함을 보고하였다(19). 최근, Kim 등은 서울지역 설사환자에서 분리된 33 NTS 균주 중에서 4 균주(12.1%)에서 class 1 integron이 존재함을 보고하였다(20). 이와 같이 지금까지의 국내연구는 소규모로 일부 혈청형에서만 진행되었다. 본 연구는 임상 검체에서 연속적으로 분리된 다양한 혈청형의 NTS 균주들을 대상으로 integron의 분포율을 살펴본 대규모 연구라는 점에서 의미가 있겠다.

본 연구에서 전체 균주의 8.0% (21/261)가 integron을 가지고 있었고 nalidixic acid를 제외하고는 항균제들에 대한 내성률이 전반적으로 integron 보유 균주들에게서 높았고 다제 내성과도 유의한 관련을 보였다. 이는 우리나라에서도 integron이 항균제 내성 발현에 이미 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다. 혈청형 별로 integron 양성률을 살펴보면 *S. Typhimurium*에서 integron 양성률이 높았는데 이는 외국에서의 보고와 일치한다(21, 22).

Integron내 유전자를 분석한 결과 *dhfr12-orf-aadA2*가 5 균주, *dhfr17-orf-aadA5*가 2 균주에서 나타나 *dhfr-orf-aadA* 형태가 가장 흔했다. *dhfr-orf-aadA*는 *dhfr*와 *aadA* 유전자가 재조합 된 형태로 각각 trimethoprim과 aminoglycoside에 대한 내성 유전자로 7 균주 모두 trimethoprim과 streptomycin에 내성이었다. 이와 같은 형태는 *Salmonella*와 다른 장내 세균을 대상으로 한 기존의 연

구에서 흔히 보고 되어 있는데(23, 24), 주목할 만한 것은 1998년에서 2000년 사이에 우리나라 남서부지역에서 대규모 발생했던 *Shigella sonnei* 유행시 분리된 여러 균주들과(25) 임상검체에서 분리된 *Escherichia coli* 균주들에서(26, 27) class 1 integron과 integron 내부에 포함된 *dhfr12-orf-aadA2*이 이미 보고되었다는 점이다. 이는 *Salmonella*를 포함한 우리나라의 주요 장내세균들 사이에 gene cassette들이 전파되고 있을 가능성을 시사한다. 앞에서 언급한 국내연구들에서는 Sohn 등이 보고한 integron 양성 균주 3 균주 모두에서 *dhfr10-orf-aadA2*이 발견되었고(19), Kim 등의 연구에서는 *aadA2*가 2 균주에서 발견되었고 *aadA1*, *aad2-orf-aadA2*가 각각 1 균주에서 발견되었다(20). 6 균주(28.6%)에서는 integron 내에 유전자가 존재하지 않았는데, integron 내부에 삽입된 유전자가 없어 5'-CS와 3'-CS영역이 서로 인접해 있는 경우로 생각된다(28).

Integron이 존재하는 균주들을 대상으로 한 접합(conjugation)연구에서는 21 균주 중 10 균주에서 양성되었고 이는 plasmid를 매개로 내성유전자들이 전달되었음을 의미한다. Table 4에 정리한 바와 같이 내성양상(resistance profile)은 대체적으로 일치하는 경향을 보였다. 내성여부가 공여균주와 차이를 보인 7 균주의 경우를 살펴보면 tetracycline에 대해 차이를 보인 경우가 3 균주로 가장 많았고 그 다음이 sulfamethoxazole 2 균주, 그리고 streptomycin과 chloramphenicol이 각각 1 균주였다. 본 연구에서는 plasmid에 대한 분석이나 항균제 내성기전에 대한 분석은 따로 하지 않았으나 향후 연구가 필요하겠다.

PFGE 결과 12형으로 분리가 되었다. *S. Typhimurium* 8 균주 중 7 균주가 C형으로 유사한 형태를 보였으나 phage type과 gene cassette까지 같은 경우는 없어 동일 클론으로 보기는 힘들며 서로 다른 혈청형에서 같은 형태의 gene cassette들이 확인된 점을 볼 때 NTS 균들 간에 integron을 매개로 gene cassette들의 전파가 있었음을 시사하는 것이라 하겠다.

본 연구에서는 우리나라의 임상 검체에서 분리된 NTS 균주들에서의 integron의 분포와 미생물학적·유전학적 특징을 살펴보았다. 다양한 혈청형에서 integron이 발견되었고 *S. Typhimurium*에서 가장 흔했다. Integron을 가진 균주에서의 항균제 내성률이 의미있게 높았고 integron을 매개로한 NTS 균들 간의 항균제 내성의 전파가 의심되어 이미 우리나라에서도 integron 관련 내성이 중요한 부분을 차지하고 있음을 확인하였다. 향후 우리나라에서도 integron에 관련한 연구가 지속적으로 필요하겠다.

## References

- 1) Ridley A, Threlfall EJ. Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic *Salmonella typhimurium* DT 104. *Microb Drug Resist* 4:113–8, 1998
- 2) Daly M, Buckley J, Power E, O'Hare C, Cormican M, Cryan B, Wall PG, Fanning S. Molecular characterization of Irish *Salmonella enterica* serotype typhimurium: detection of class I integrons and assessment of genetic relationships by DNA amplification fingerprinting. *Appl Environ Microbiol* 66:614–9, 2000
- 3) Guerra B, Soto S, Cal S, Mendoza MC. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2166–9, 2000
- 4) Lindstedt BA, Heir E, Nygård I, Kapperud G. Characterization of class I integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. *J Med Microbiol* 52:141–9, 2003
- 5) Rodríguez I, Rodicio MR, Herrera-León S, Echeita A, Mendoza MC. Class 1 integrons in multidrug-resistant non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated in Spain between 2002 and 2004. *Int J Antimicrob Agents* 32:158–64, 2008
- 6) Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 39:185–91, 1995
- 7) Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 3:1669–83, 1989
- 8) Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 4:608–20, 2006
- 9) White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2658–61, 2001
- 10) Sallen B, Rajoharison A, Desvarenne S, Mabilat C. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist* 1:195–202, 1995
- 11) Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 15:593–600, 1995
- 12) Popoff MY. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. In: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris. Institute Pasteur, 2001
- 13) Anderson ES, Ward LR, Saxe MJ, de Sa JD. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J Hyg (Lond)* 78:297–300, 1977
- 14) Choi SH, Woo JH, Lee JE, Park SJ, Choo EJ, Kwak YG, Kim MN, Choi MS, Lee NY, Lee BK, Kim NJ, Jeong JY, Ryu J, Kim YS. Increasing incidence of quinolone resistance in human non-typhoid *Salmonella enterica* isolates in Korea and mechanisms involved in quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother* 56:1111–4, 2005
- 15) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement, 2008
- 16) White PA, McIver CJ, Deng Y, Rawlinson WD. Characterisation of two new gene cassettes, *aadA5* and *dfxA17*. *FEMS Microbiol Lett* 182:265–9, 2000
- 17) Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33:2233–9, 1995
- 18) Oh YH, Song MO, Kim MS, Park SG, Lee YK. Detection of antibiotic resistant genes in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium isolated from food borne patients in Seoul using multiplex-PCR. *J Bacteriol Virol* 35:183–90, 2005
- 19) Sohn CK, Lee JA, Lee DO, Han W, Jung JK. Structural analysis of class I integron gene cassette and assessment of genetic relationships by PFGE of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium isolated in Gyeongbuk area. *Kor J Microbiol* 42:12–8, 2006
- 20) Kim TE, Kwon HJ, Cho SH, Kim S, Lee BK, Yoo HS, Park YH, Kim SJ. Molecular differentiation of common promoters in *Salmonella* class 1 integrons. *J Microbiol Methods* 68:453–7, 2007
- 21) Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJ, Woodward MJ. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother* 53:208–16, 2004
- 22) Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC, Wannet WJ, Verbruggen AJ, Maas HM, Gaastra W. Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among non-typhoidal *Salmonella* serovars in The Netherlands. *Int J Antimicrob Agents* 28:172–9, 2006
- 23) Cameron FH, Groot Obbink DJ, Ackerman VP, Hall RM. Nucleotide sequence of the AAD(2") amino-

- glycoside adenylyltransferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfrII* in R388. *Nucleic Acids Res* 14:8625-35, 1986
- 24) Peters ED, Leverstein-van Hall MA, Box AT, Verhoef J, Fluit AC. Novel gene cassettes and integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2961-4, 2001
  - 25) Oh JY, Yu HS, Kim SK, Seol SY, Cho DT, Lee JC. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among *Shigella sonnei* isolates from southwestern Korea during epidemic periods. *J Clin Microbiol* 41:421-3, 2003
  - 26) Yu HS, Lee JC, Kang HY, Ro DW, Chung JY, Jeong YS, Tae SH, Choi CH, Lee EY, Seol SY, Lee YC, Cho DT. Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J Clin Microbiol* 41:5429-33, 2003
  - 27) Kang HY, Jeong YS, Oh JY, Tae SH, Choi CH, Moon DC, Lee WK, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *J Antimicrob Chemother* 55:639-44, 2005
  - 28) Bissonnette L, Roy PH. Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 174: 1248-57, 1992