

Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter coli* Isolates from Swine

Shin-Moo Kim^{1*}, Mi-Rae Choi¹, Pil-Seung Kwon¹, Hyeon-Je Song²,
In-Ho Jang³ and Yunsop Chong^{4,5}

¹Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan, Korea,

²Department of Clinical Pathology, Gwangju Health College University, Gwangju, Korea,

³Department of Laboratory Medicine, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju, Korea,

⁴Department of Laboratory Medicine and ⁵Research Institute of Bacterial Resistance, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Swine is a common source of *Campylobacter coli* human gastroenteritis, for the treatment of which erythromycin and fluoroquinolones are recommended. The prevalence of antimicrobial-resistant *C. coli* differs significantly depending on countries. We investigated the prevalence of *C. coli* in swine from a farm in Buan-gun, Korea in 2010, and determined antimicrobial susceptibility of the isolates. Rectal swab specimens were used to inoculate *Campylobacter* Preston media and incubated microaerophilically at 42°C for 48 h. The species were identified by phenotypic tests and by detecting *hipO* and *glyA* genes. PCR was used to detect mutations of A2074C in 23S rRNA gene, and quinolone resistance-determining region (QRDR) of *gyrA*, which are associated with high level resistance to erythromycin, and with ciprofloxacin, respectively. Antimicrobial susceptibility was determined by the disk diffusion and agar dilution tests. Of the 100 specimens, 55 (55%) yielded *C. coli*, and 23 of them (41.8%) had A2074G mutation. A2074G mutated isolates showed the lowest MIC₉₀ of imipenem, while those of ampicillin and clindamycin were relatively low. The majority of both A2074G mutation-positive and -negative isolate were susceptible to ampicillin, cefotaxime, and chloramphenicol. All isolates were resistant to ciprofloxacin, and had mutation in QRDR of *gyrA*. In conclusion, *C. coli* was detected in 55% of swine, and A2074G mutation was detected in 41.8% of the isolates. All isolates had *gyrA* mutation-mediated ciprofloxacin resistance.

Key Words: *Campylobacter coli*, Swine, 23S rRNA gene, *gyrA*

서론

*Campylobacter jejuni*와 *Campylobacter coli*는 식품매개 장염균이다. 이들 세균은 각종 야생동물과 가축의 장관

내에 널리 분포되어 있으며, 특히 닭, 칠면조, 돼지, 개, 소, 고양이 등은 이 세균의 보균율이 높은 것으로 보고되고 있다 (1). 캄필로박터 장염은 항균제 치료없이 회복되는 것이 보통이지만, 감염환자가 면역성이 저하되었거나 전신성 감염이거나, 장염이 장기간 계속되는 경우에는 erythromycin 혹은 ciprofloxacin 등의 투여가 필요하다 (2~4).

뉴질랜드에서는 돼지의 감염예방이나 빠른 체중 증가를 목적으로 erythromycin 계열인 tylosin과 tiamulin의 사용이 2002년까지 허가되었었다. 동물사료에 macrolide나 fluoquinolone을 첨가하면 이들 항균제에 내성인 캄필로박터가 증가하고 이들 내성균이 사람에게 감염을 일으키면

Received: December 23, 2010/ Revised: February 5, 2011

Accepted: February 11, 2011

*Corresponding author: Shin-Moo Kim, Ph.D. Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Iksan 570-750, Korea.

Phone: +82-63-840-1211, Fax: +82-63-840-1219

e-mail: smkim1211@hanmail.net

**This study was supported by a research fund from Wonkwang Health Science University, 2010.

치료하기 어려우며, 따라서 세계적인 공중보건의 문제가 되고 있다 (5). *C. jejuni*와 *C. coli*의 여러 항균제에 대한 내성이 여러 나라에서 보고되고 있으며 (6), 1990년 이래로 macrolide 내성률이 증가되고 있다. 벨기에의 Vanhoof 등은 (7) 사람에서 분리된 *C. jejuni* 중 8.4%가 erythromycin에 내성임을 보고하였고, *C. coli*의 erythromycin 내성률은 타이완에서 50% (8), 스페인에서 34.2% (9), 독일에서 29.4% (10), 이탈리아에서 24.1% (11), 미국에서 4~9% (12)로 보고되었다.

Erythromycin 내성 *C. coli*는 특히 돼지에서, *C. jejuni*는 닭에서 분리율이 높으며 (2, 13, 14), 또한 캄필로박터에 감염된 사람이 항균제 치료를 받는 중에도 내성균이 나타날 수 있다. 그러므로 캄필로박터 균종의 macrolide 내성 연구와 감시의 중요성이 높아지고 있다. 캄필로박터의 erythromycin에 대한 고도 내성은 염색체성 매개이며, erythromycin의 작용점인 23S rRNA의 2,074나 2,075의 nucleotide 치환 때문임이 알려져 있는데, 이 위치는 *Helicobacter pylori*의 2,142와 2,143 위치, 그리고 *Escherichia coli*의 2,058과 2,059 위치에 해당된다 (15~17).

프랑스와 스페인에서 분리한 erythromycin 고도 내성 캄필로박터 균주 대부분에는 A2075G 변이가 있었고, A2074C 변이는 드물었다 (18~20). 또한 우리나라 분리 *C. coli*에 대한 한 연구에서는 A2075G 변이만이 보고되었다 (21). 그러나 일본에서 분리한 *C. jejuni* 12주와 *C. coli* 11주 중의 12주는 erythromycin에 고도 내성이었는데, 이들에서는 A2074C 변이만 관찰되었고, A2075G 변이는 관찰되지 않았다 (16). 이 연구자들이 시험관 내에서 선택한 erythromycin 고도 내성 *C. jejuni* 균주 대부분에서는 A2074C 변이가 검출되었고, 한 균주에서는 A2074C와 동시에 A2075C 변이가 검출되었다. 이와 같이 A2074C나 A2075G 변이 균주의 비율이 연구자에 따라서 다른 것은 erythromycin 고도 내성균 분리지역이나 캄필로박터 균종이 다르기 때문일 수 있을 것으로 생각된다.

이에 본 연구에서는 전북 부안의 한 양돈장 돼지를 대상으로 *C. coli*의 보균률을 밝히고, 23S rRNA의 A2074C 변이를 PCR 신속법으로 검출하며, A2074C 변이 양성균과 음성 균주의 erythromycin 감수성 및 다른 항균제에 대한 감수성을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

*Campylobacter coli*의 분리와 동정

전북 부안의 한 양돈장에서 사육 중인 돼지 100마리의 직장에서 2010년 1월에 면봉으로 변 검체를 채취하여 시험에 사용하였다. *C. coli* 분리를 위해서는 Campylobacter Preston agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK) 평판에 검체를 면봉으로 도말한 다음 백금이로 희석하고, 미산소성 환경에서 42°C로 48시간 배양하여 회백색의 원형인 또는 퍼진 집락을 선택하였다. 순수 분리된 세균은 미산소성 시험, 그람염색성과 형태, oxidase 시험, 30 µg의 nalidixic acid와 cephalothin 디스크 감수성 시험, hippurate 가수분해 시험을 전통적 방법으로 시험하여 균종을 동정하였으며 (22), 또한 PCR에 의한 *hipO*와 *glyA* 유전자를 검출하여 *C. coli*를 동정하였다.

분리된 균주는 미산소성 환경에서 37°C, 48시간 배양한 후 집락을 15% glycerol BHI broth 1 ml에 진하게 풀어 넣어 -70°C에 냉동 보관하였다가 실험에 사용하였다.

PCR에 의한 *hipO*와 *glyA* 검출 및 변이 *gyrA*와 A2074C 변이 23S rRNA 검출

*C. jejuni*와 *C. coli*의 신속한 동정을 위해서는 Wang 등 (23)의 방법에 따라 각각 *hipO*와 *glyA* 유전자 검출을, *C. coli*의 erythromycin 고도 내성균 감별을 위해서는 Alonso 등 (15)의 방법에 따른 23S rRNA A2074C 변이 검출을, ciprofloxacin 내성균에서 *gyrA* 유전자의 quinolone resistance determining regions (QRDR) 변이 확인을 위해서는 Zirstein 등 (25)의 방법에 따른 검출을 PCR로 시행하였다.

혈액우무배지에 접종하여 37°C의 미산소성 환경에서 48시간 배양한 집락을 증류수에 부유시켜 10분간 끓인 다음 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층을 PCR 용 주형으로 사용하였다. 사용된 primer 염기서열은 Table 1과 같으며, Genotek Co. (Yuseoung, Daejeon, Korea)에 의해 합성되었다.

Forward와 reverse primer 각각을 2 µl, PCR mastermix (dNTP, *Taq* polymerase, MgCl₂) 4 µl, 8-MOP 12 µl, 주형 DNA 2 µl를 넣어 PCR 반응의 최종액을 20 µl로 하였다.

PCR 반응은 thermal cycler (GeneAmp PCT system, Perkin Cetus, Norwalk, CT, USA)를 사용하여 시행하였고, 위 3 종류의 유전자 증폭은 94°C에서 5분간 pre-denaturation,

Table 1. Primers used to identify *Campylobacter coli* and to detect mutations in *gyrA* and nucleotide 2074 in 23S rRNA

Primer name	Target gene	Sequence (5' to 3')	Amplicon size (bp)	Reference
CJF	<i>C. jejuni hipO</i>	ACTTCTTTATGCTTGCTGC	323	23
CJR		GCCACAACAAGTAAAGAAGC		
CCF	<i>C. coli glyA</i>	GTAAAACCAAAGCTTATCGTG	126	23
CCR		TCCAGCAATGTGTGCAATG		
CampyMAMAgryA1-F	<i>gyrA</i>	TTTTTAGCAAAGATTCTGAT	265	24
CampyMAMAgryA5-R		CAAAGCATCATAAACTGCAA		
23SRNA-F	23S rRNA	TTAGCTAATGTTGCCCGTACCG	485	15
ERY2074-R		AGTAAAGGTCCACGGGGTCTGG		

94°C에서 30초간 denaturation, 57°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension의 조건으로 30회 반복한 다음, 72°C에서 5분간 post-extension을 시킨 후 4°C에서 중합반응을 종료시켰다. 반응 후 생성물은 ethidium bromide 염색액과 함께 2% agarose gel에서 전기영동하여 결과를 확인하였다.

항균제 감수성 시험

표준 디스크 확산법 (25)으로 시험하였으나 배지는 5% 면양 혈액을 넣은 Muller-Hinton agar (MHA, Difco Laboratories, Detroit MI, USA)를 사용하였다. 순수배양된 집락을 tryptic soy broth (TSB)에 부유하여 McFarland 0.5 관 탁도로 맞춘 직접부유액을 만들었다. 이것을 면봉으로 배지표면에 접종한 후 디스크를 놓고 37°C 미산소성 환경에서 48시간 배양한 후에 결과를 판독하였으며, 정도관리를 위해서 *Escherichia coli* ATCC 25922를 사용하였다. 디스크는 ampicillin 10 µg, cefotaxime 30 µg, cephalothin 30 µg, chloramphenicol 30 µg, erythromycin 15 µg, amikacin 30 µg, gentamicin 10 µg, kanamycin 30 µg, imipenem 10 µg, nalidixic acid 30 µg, ciprofloxacin 5 µg, tetracycline 30 µg, trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) 1.25/23.75 µg (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD, USA)을 사용하였다.

우무희석법(agar dilution method)은 Fitzgerald 등 (22)의 방법에 따랐다. 권장되는 용매에 용해시킨 항균제를 5% 혈액을 첨가한 MHA에 넣고 평판배지를 만들었다. 사용된 항균제는 ampicillin, cephalothin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 및 imipenem (Merk

Table 2. Prevalence of *Campylobacter coli* isolates and their mutation rate in 23S rRNA A2074C

Test	No. of specimen tested	No. (%) positive
<i>C. coli</i> isolation	100	55 (55)
23S rRNA A2074C mutation detection	55	23 (41.8)

Sharp & Dohme, Rahway, NJ, USA)이었다. 순수배양된 집락을 TSB에 부유하여 McFarland 0.5관 탁도로 맞춘 직접부유액을 만들었다. Replicator를 써서 접종하고, 미산소성 환경, 37°C에서 48시간 배양한 후에 관찰하여 증식을 완전히 억제시킨 최소 항균제 농도를 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)로 판단하였다.

결 과

C. coli 분리율과 분리 균주의 성상

2010년 1월에 부안지역 돼지 100마리에서 직장을 통해 채취한 변 검체를 배양하여 55주(55%)의 *C. coli*가 분리되었다. *C. coli* 55주의 배양특성과 생화학적 성상은 전형적이었으나, 예외로 nalidixic acid에 감수성인 균주는 없었다. PCR에 의해 모든 균주에서 *glyA* 유전자가 검출되었고, *hipO* 유전자는 검출되지 않아서 표현형에 의한 *C. coli* 동정과 일치하였다(Table 2~3, Fig. 1~2).

항균제 감수성

분리 균주 중 23S rRNA A2074C 변이 양성은 23주 (41.8%), 음성은 32주(58.2%)이었다(Table 2). A2074C 변이 양성 균주는 디스크법 감수성 시험으로 kanamycin

Table 3. Phenotypic and genetic characteristics of *Campylobacter coli* isolate

Isolate no./source	Hippurate hydrolysis	MIC ($\mu\text{g/ml}$) of:		Detection by PCR and mutation				Erythromycin MIC ($\mu\text{g/ml}$)
		Nalidixic acid	Ciprofloxacin	<i>hipO</i>	<i>glyA</i>	<i>gyrA</i> mutation	A2074C mutation ^a	
C01-1	-	128	16	-	+	+	-	4
C01-2	-	128	16	-	+	+	-	8
C01-3	-	64	32	-	+	+	+	≥ 128
C01-4	-	128	4	-	+	+	-	4
C01-5	-	32	8	-	+	+	+	≥ 128
C01-6	-	128	64	-	+	+	-	4
C01-7	-	64	64	-	+	+	+	≥ 128
C01-8	-	128	8	-	+	+	-	1
C01-9	-	128	8	-	+	+	+	≥ 128
C01-10	-	32	4	-	+	+	-	≤ 0.5
C01-11	-	32	32	-	+	+	+	≥ 128
C01-12	-	64	32	-	+	+	+	≥ 128
C01-13	-	128	32	-	+	+	-	4
C01-14	-	64	32	-	+	+	-	≤ 0.5
C01-15	-	64	32	-	+	+	-	≤ 0.5
C01-16	-	64	16	-	+	+	-	≤ 0.5
C01-17	-	64	32	-	+	+	+	≥ 128
C01-18	-	32	8	-	+	+	-	2
C01-19	-	64	8	-	+	+	-	4
C01-20	-	64	16	-	+	+	-	4
C01-21	-	64	4	-	+	+	+	≥ 128
C01-22	-	64	32	-	+	+	+	≥ 128
C01-23	-	128	32	-	+	+	-	4
C01-24	-	64	8	-	+	+	-	4
C01-25	-	64	8	-	+	+	-	4
C01-26	-	64	32	-	+	+	+	≥ 128
C01-27	-	32	8	-	+	+	+	≥ 128
C01-28	-	64	32	-	+	+	+	≥ 128
C01-29	-	64	16	-	+	+	+	≥ 128
C01-30	-	128	32	-	+	+	-	8
C01-31	-	128	32	-	+	+	-	4
C01-32	-	128	16	-	+	+	-	4
C01-33	-	128	16	-	+	+	-	4
C01-34	-	64	32	-	+	+	+	≥ 128
C01-35	-	128	16	-	+	+	+	≥ 128
C01-36	-	64	16	-	+	+	+	≥ 128

Table 3. Continued

Isolate no./source	Hippurate hydrolysis	MIC ($\mu\text{g/ml}$) of:		Detection by PCR and mutation				Erythromycin MIC ($\mu\text{g/ml}$)
		Nalidixic acid	Ciprofloxacin	<i>hipO</i>	<i>glyA</i>	<i>gyrA</i> mutation	A2074C mutation ^a	
C01-37	-	64	16	-	+	+	+	≥ 128
C01-38	-	128	16	-	+	+	-	16
C01-39	-	64	16	-	+	+	+	≥ 128
C01-40	-	128	16	-	+	+	-	4
C01-41	-	128	32	-	+	+	-	2
C01-42	-	32	16	-	+	+	-	≤ 0.5
C01-43	-	128	16	-	+	+	-	1
C01-44	-	64	4	-	+	+	-	2
C01-45	-	32	32	-	+	+	+	128
C01-46	-	32	4	-	+	+	-	2
C01-47	-	64	32	-	+	+	+	≥ 128
C01-48	-	32	4	-	+	+	-	≤ 0.5
C01-49	-	128	16	-	+	+	-	8
C01-50	-	128	32	-	+	+	-	8
C01-51	-	64	16	-	+	+	+	≥ 128
C01-52	-	128	16	-	+	+	-	4
C01-53	-	128	32	-	+	+	+	≥ 128
C01-54	-	64	32	-	+	+	-	2
C01-55	-	128	64	-	+	+	+	≥ 128

^a A2074C mutation of 23S rRNA gene.

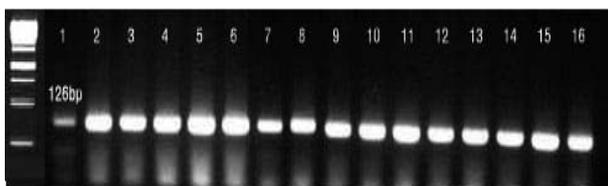


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of PCR-generated amplicons by using primer pairs for *glyA* gene for identification of *C. coli*. Lane M: size marker, lane 1 to 15: isolate no. C01-1 to C01-15, lane 16: *C. coli* ATCC3359.

과 cotrimoxazole에는 각각 91%와 96%가, amikacin과 gentamicin에는 44%와 52%가, chloramphenicol에는 4%가 내성을 보였으나, cefotaxime에 내성인 균주는 없었다. 한편 A2074C 변이 음성 균주는 kanamycin과 cotrimoxazole에는 각각 75%와 87%가, amikacin에는 16%가, cefotaxime과 chloramphenicol에는 각각 3%가 내성이었으나, genta-

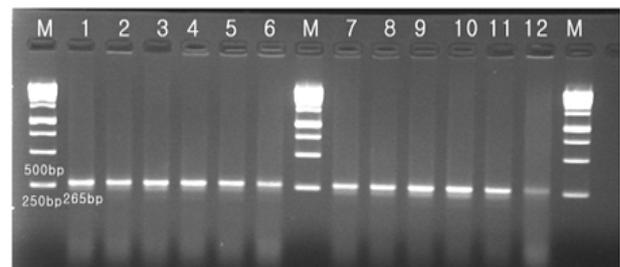


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR-generated amplicons by using primer pairs for *gyrA* gene for detection of ciprofloxacin-resistant *C. coli*. Lane M: size marker, lane 1 to 12: isolate no. C01-1 to C01-12.

micin에 내성인 균주는 없었다(Table 4).

우무회석법으로 시험된 항균제의 MIC 범위, MIC₅₀ 및 MIC₉₀은 Table 5와 같았다. 즉, 23S rRNA A2074C 변이 양성 균주에 대한 MIC 범위와 MIC₉₀은 각각 imipenem

이 0.06~4 µg/ml와 4 µg/ml, ampicillin이 0.5~≥128 µg/ml와 16 µg/ml, erythromycin이 ≥128 µg/ml와 ≥128 µg/ml, clindamycin이 8~128 µg/ml와 64 µg/ml, 그리고 tetracycline이 4~128 µg/ml와 128 µg/ml이었다. A2074C 변이 음성인 균주에 대한 MIC 범위와 MIC₉₀은 각각 imipenem이

0.06~1 µg/ml와 0.5 µg/ml, ampicillin이 ≤0.5~≥128 µg/ml와 32 µg/ml, erythromycin이 ≤0.5~16 µg/ml와 8 µg/ml, clindamycin이 ≤0.5~64 µg/ml와 2 µg/ml, 그리고 tetracycline이 ≤0.5~≥128와 128 µg/ml이었다.

우무회석법 감수성 시험에 의한 항균제의 MIC에 breakpoint를 적용하여 해석할 때(Table 5) 23S rRNA A2074C 변이 양성 균주는 모두가 imipenem에 감수성이었으나, ampicillin과 chloramphenicol에는 각각 4%, amikacin에는 44%, gentamicin에는 52%, kanamycin에는 91%, tetracycline에는 74%가 내성이었고, cephalothin, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin 및 nalidixic acid에는 모두가 내성이었다. A2074C 변이 음성 균주는 imipenem과 gentamicin에는 모두가 감수성이었으나, cefotaxime과 chloramphenicol에는 각각 3%, ampicillin과 clindamycin에는 각각 9%, amikacin에는 16%, kanamycin에는 75%, tetracycline에는 59%가 내성이었고, cephalothin, ciprofloxacin과 nalidixic acid에는 모두가 내성이었다. 한편 시험된 모든 균주에서는 변이된 *gyrA* 유전자가 검출되었다.

Table 4. Comparison of antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter coli* isolates with and without 23S rRNA A2074 mutation

Antimicrobial agents	Isolate with 23S rRNA A2074C mutation					
	Positive (n = 23)			Negative (n = 32)		
	S ^a	I	R	S	I	R
Cefotaxime	78	22	0	78	19	3
Chloramphenicol	96	0	4	97	0	3
Amikacin	56	0	44	75	9	16
Gentamicin	48	0	52	100	0	0
Kanamycin	9	0	91	9	16	75
Cotrimoxazole	4	0	96	13	0	87

^a Susceptibility (%) by disk diffusion test. S, susceptible; I, intermediate; R, resistant

Table 5. MIC of antimicrobial agents for *Campylobacter coli* isolates with and without 23S rRNA A2074C mutation

Isolates with A2074C mutation (No. tested)	Antimicrobial agent	MIC (µg/ml)			Resistance (%)
		Range	50%	90%	
Positive (23)	Ampicillin	0.5~≥128	8	16	4
	Cephalothin	64~≥128	≥128	≥128	100
	Clindamycin	8~128	32	64	100
	Erythromycin	≥128	≥128	≥128	100
	Imipenem	0.06~4	0.125	4	0
	Nalidixic acid	32~128	64	64	100
	Ciprofloxacin	4~64	32	32	100
	Tetracycline	4~128	32	128	74
Negative (32)	Ampicillin	≤0.5~≥128	4	32	9
	Cephalothin	64~≥128	≥128	≥128	100
	Clindamycin	≤0.5~64	≤0.5	2	9
	Erythromycin	≤0.5~16	4	8	0
	Imipenem	0.06~1	0.125	0.5	0
	Nalidixic acid	32~128	128	128	100
	Ciprofloxacin	4~64	16	32	100
	Tetracycline	≤0.5~≥128	16	128	59

고 찰

사람에게 감염을 일으키는 캄필로박터 균종은 주로 고온성 캄필로박터인 *C. jejuni*와 *C. coli*이다. *C. jejuni*는 닭과 소가, *C. coli*는 돼지가 많이 보균하며 (21, 26), 사람은 보균동물로부터 감염되어 캄필로박터 장염을 일으킨다. Nielsen 등 (27)은 덴마크의 돼지에서 분리한 균종별 비율이 *C. coli*는 94.5%, *C. jejuni*는 4.1%, *C. lari*는 1.4%이었음을 보고하였고, Alter 등 (28)은 독일 돼지에서의 *C. coli*의 분리율이 64%라고 하였으며, Shin과 Lee (21)는 한국의 양돈장 돼지에서 114주(19.9%)의 *C. coli* 분리를 보고하였다. 본 연구에서는 100마리의 돼지 변 중 55%에서 *C. coli*가 분리되어 덴마크나 독일에서 보다는 분리율이 낮았으나, Shin과 Lee (21)의 보고 보다는 높아서, 우리나라에서도 돼지가 *C. coli*의 중요한 감염원임을 알 수 있었다.

임상검사실에서 이용하던 *C. coli* 감별 기준에 속하는 nalidixic acid 감수성과 cephalothin 내성은 nalidixic acid 내성 균주의 출현으로 인해 그 이용가치가 적어졌다. 본 연구에서는 *C. coli* 균주 중에 nalidixic acid에 감수성인 균주가 없어서 이 시험의 가치가 전혀 없음을 보였다. *C. coli*는 hippurate 가수분해 시험 음성이므로, 양성인 *C. jejuni*와 감별하는데, Dassanayake 등 (29)은 *C. jejuni*의 13%가 이 시험 음성이었음을 보고하여, 이 성상에 의한 감별도 쉽지 않을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 Wang 등 (23)이 보고한 *gbyA*와 *hipO* 유전자 검출을 동정에 이용한 바, 시험 균주 모두가 *gbyA* 유전자 양성이고 *hipO* 유전자 음성이어서, 표현형에 의한 *C. coli*의 동정이 모두 정확하였음을 보였다. 따라서 이 유전적 방법은 표현형에 의한 동정이 불확실한 경우에 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 판단되었다.

Macrolide계인 erythromycin과 quinolone계인 ciprofloxacin은 사람의 캄필로박터 장염 치료에 쓰이는 중요한 항균제이다. 가축의 감염 치료를 위해 항균제를 투여하거나, 가축의 발육촉진을 위해서 항균제를 넣은 사료로 사육하면 항균제 내성 캄필로박터가 선택되어 (6), 가축으로부터 사람에게 항균제 내성 캄필로박터가 전파됨이 보고되었다 (30).

동물이 보균하는 캄필로박터 균종 중, 돼지에서 분리한 *C. coli*의 macrolide 내성률은 높음이 보고되었다 (31, 32).

일본의 식육용 동물에서 분리된 균주에 대한 한 연구에서는 *C. jejuni* 분리주 모두가 macrolide에 감수성이었으나, *C. coli*는 48.4%가 내성이었다 (33). Kim 등 (34)은 우리나라의 환자와 닭에서 분리된 *C. jejuni* 54주 중에 erythromycin 내성균이 없었음을 보고하였다. 유럽 Animal Health Study Center는 erythromycin 내성 *C. jejuni*와 *C. coli*의 분리율은 동물에 따라서 다르다고 하였는데 (35), 돼지에서 분리된 erythromycin 내성 *C. coli* 균주의 분리율이 덴마크에서는 35.7%, 네덜란드에서는 41.8%로 보고되었다.

Payot 등 (18)이 프랑스 돼지에서 분리한 *C. coli*의 5.4%는 erythromycin 고도 내성균(MIC ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$)이었고, 11.6%는 저도 내성균이(8~16 $\mu\text{g/ml}$)이었다. Shin과 Lee (21)는 우리나라 돼지에서 분리한 *C. coli* 균주 중 49주(8.6%)가 고도 내성(MIC ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$)이었음을 보고하였다. Macrolide는 50S ribosome subunit의 23S rRNA와 결합하여 단백질 합성을 저해하는 정균성 항균제이다. *C. coli*의 erythromycin 저농도 내성은 유출펌프 때문이고, 고농도 내성은 주로 23S rRNA의 영역 V에 있는 peptidyl transferase loop의 2,074와 2,075의 nucleotide 치환으로 인해 macrolide가 결합되지 않아서 일어난다 (6). 23S rRNA 변이 중 흔히 관찰되는 것은 A2075G 변이이고, A2074C 변이는 드물다고 알려져 있으나 (17, 18), 일본에서 분리한 *C. jejuni* 12주와 *C. coli* 11주 중의 12주는 erythromycin에 고도 내성이었는데, 이들에서는 A2074C 변이만 관찰되었고, A2075G 변이는 관찰되지 않았다 (16).

본 연구에서는 PCR로 23S rRNA의 A2074C 변이 검출을 시도한 바, *C. coli* 중 23주(41.8%)가 양성이었으며, 우리나라 일부 지역에서도 돼지가 erythromycin에 고도 내성인 *C. coli*의 병원소임을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 한 농장의 돼지에서 분리한 균주가 대상이었으므로 같은 클론의 세균이 확산되어 있었을 가능성이 있으며, 따라서 다른 지역돼지에서 분리한 erythromycin 내성 *C. coli* 균주의 A2074C 변이를 규명할 필요가 있다고 하겠다.

Fluoroquinolone이 개발된 초기에는 여러 균종에 대한 항균력이 대단히 높았고 (36), 캄필로박터 장염 치료에 유용하게 사용되었다 (37). 그러나 fluoroquinolone이 널리 사용됨에 따라서 이 항균제에 내성인 캄필로박터 균주가 점차 증가하였다 (38). Payot 등 (18)은 프랑스 돼지에서 분리한 *C. coli* 균주의 fluoroquinolone 내성률이 65.8%임을 보고하였고, Kim 등 (34)은 우리나라 익산지역 닭

과 환자에서 분리한 *C. jejuni* 균주 모두가 ciprofloxacin에 내성임을 보고하였다. 본 연구에서도 *C. coli* 균주 모두가 ciprofloxacin에 내성을 나타내었다. 본 연구에서는 Zirnstein 등 (24)이 보고한 *gyrA* 유전자 변이를 PCR로 검출한 바, 분리한 *C. coli* 균주 모두가 양성이어서, 분리주의 ciprofloxacin 내성은 *gyrA* 유전자 변이 때문임이 확인되었고, *Campylobacter* 감염 치료에 fluoroquinolone을 사용할 수 없을 것임을 보였다.

Payot 등 (18)은 erythromycin 고도 내성(MIC ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$) 균주는 clindamycin에도 내성이었음과 저도 내성(MIC 8~16 $\mu\text{g/ml}$) 균주는 감수성이었음을 보고하였는데, 본 연구에서도 이와 유사한 결과를 보였다.

결론으로 부안지역 돼지의 *C. coli* 보균률은 55%로 높고 분리된 균주 중 41.8%에서 23S rRNA의 V영역 A2074C 변이가 검출되었으며, 이들 균주 모두에 대한 erythromycin의 MIC는 ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 모든 균주는 ciprofloxacin에 내성이었고, *gyrA*의 QRDR의 변이가 검출되었다. 23S rRNA의 A2074C 변이 양성 및 음성 균주 대부분은 ampicillin, cefotaxime, 및 chloramphenicol에 감수성이었으며, 따라서 *C. coli* 장염 치료에 이들 항균제가 유용하게 사용될 수 있다고 판단되었다.

참 고 문 헌

- Friedman J, Neimann J, Wegener HC, Tauxe RV. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infection in the united states and other industrialized nations. In: Nackamkin I Blaser MJ, editors, *Campylobacter* 2nd ed, Washington D.C.: ASM Press; 2000. p.121-38.
- Aarestrup FM, Engberg J. Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*. *Vet Res* 2001;32:311-21.
- Aarestrup FM, Nielsen EM, Madsen M, Engberg J. Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. from humans, pigs, cattle, and broilers in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2244-50.
- Allos BM. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis* 2001;32:1201-6.
- Harrow SA, Gilpin BJ, Klena JD. Characterization of erythromycin resistance in *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* isolated from pig offal in New Zealand. *J Appl Microbiol* 2004;97:141-8.
- Gibreel A, Taylor DE. Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58:243-55.
- Vanhoof R, Vanderlinden MP, Dierickx R, Lauwers S, Yourassowsky E, Butzler JP. Susceptibility of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* to twenty nine antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;14:553-6.
- Li CC, Chiu CH, Wu JL, Huang YC, Lin TY. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *coli* by using E-test in Taiwan. *Scand J Infect Dis* 1998;30:39-42.
- Saenz Y, Zarazaga M, Lantero M, Gastanares MJ, Baquero F, Torres C. Antibiotic resistance in *Campylobacter* strains isolated from animals, foods, and humans in Spain in 1997~1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:267-71.
- Luber P, Wagner J, Hahn H, Bartelt E. Antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated in 1991 and 2001~2002 from poultry and humans in Berlin, Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3825-30.
- Pezzotti G, Serafin A, Luzzi I, Mioni R, Milan M, Perin R. Occurrence and resistance to antibiotics of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in animals and meat in northeastern Italy. *Int J Food Microbiol* 2003;82:281-7.
- Gupta A, Nelson JM, Barrett TJ, Tauxe RV, Rossiter SP, Friedman CR, et al. Antimicrobial resistance among *Campylobacter* strains, United States, 1997~2001. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1102-9.
- Chuma T, Ikeda T, Maeda T, Niwa H, Okamoto K. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from broilers in the southern part of Japan from 1995 to 1999. *J Vet Med Sci* 2001;63:1027-9.
- Van Looveren M, Daube G, De Zutter L, Dumont JM, Lammens C, Wijdoooghe M, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* strains isolated from food animals in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:235-40.
- Alonso R, Mateo E, Churruca E, Martinez I, Girbau C, Fernández-Astorga A. MAMA-PCR assay for the detection of point mutations associated with high-level erythromycin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. *J Microbiol Methods* 2005;63:99-103.
- Niwa H, Chuma T, Okamoto K, Itoh K. Rapid detection of mutations associated with resistance to erythromycin in *Campylobacter jejuni/coli* by PCR and line probe assay. *Int J Antimicrob Agents* 2001;18:359-64.
- Vacher S, Ménard A, Bernard E, Mégraud F. PCR-restriction

- fragment length polymorphism analysis for detection of point mutations associated with macrolide resistance in *Campylobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1125-8.
- 18) Payot S, Avrain L, Magras C, Praud K, Cloeckert A, Chaslus-Dancla E. Relative contribution of target gene mutation and efflux to fluoroquinolone and erythromycin resistance, in French poultry and pig isolates of *Campylobacter coli*. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:468-72.
 - 19) Vacher S, Menard A, Bernard E, Santos A, Megraud F. Detection of mutations associated with macrolide resistance in thermophilic *Campylobacter* spp. by real-time PCR. *Microb Drug Resist* 2005;11:40-7.
 - 20) Perez-Boto D, Lopez-Portoles JA, Simon C, Valdezate S, Echeita MA. Study of the molecular mechanisms involved in high-level macrolide resistance of Spanish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2083-8.
 - 21) Shin E, Lee Y. Characterization of erythromycin-resistant porcine isolates of *Campylobacter coli*. *Microb Drug Resist* 2010;16:231-9.
 - 22) Fitzgerald C, Nachamkin I. *Campylobacter* and *Arcobacter*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2007. p.933-62.
 - 23) Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell C, Barton C, Price L, et al. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4744-7.
 - 24) Zirnstein G, Li Y, Swaminathan B, Angulo F. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:3276-80.
 - 25) CLSI. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. CLSI Document Clinical and Laboratory Standards Institute M45-A. Wayne PA 2006;26:16-7.
 - 26) Guévremont E, Nadeau E, Sirois M, Quessy S. Antimicrobial susceptibilities of thermophilic *Campylobacter* from humans, swine, and chicken broilers. *Can J Vet Res* 2006;70:81-6.
 - 27) Nielsen EM, Engberg J, Madsen M. Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* from Danish patients, poultry, cattle and swine. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1997;19:47-56.
 - 28) Alter T, Gaull F, Kasimir S, Gürtler M, Fehlhaber K. Distribution and genetic characterization of porcine *Campylobacter coli* isolates. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2005;118: 214-9.
 - 29) Dassanayake RP, Zhou Y, Hinkley S, Stryker CJ, Plauche G, Borda JT, et al. Characterization of cytolethal distending toxin of *Campylobacter* species isolated from captive macaque monkeys. *J Clin Microbiol* 2005;43:641-9.
 - 30) Swartz MN. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. *Clin Infect Dis* 2002;34:S111-22.
 - 31) Davies P, Morrow M, Funk J, Deen J. Erythromycin resistance of *Campylobacter* isolates from pigs. *Vet Rec* 1996;139:244.
 - 32) Moore JE, Madden RH, Kerr JR, Wilson TS, Murphy PG. Erythromycin-resistant thermophilic *Campylobacter* species isolated from pigs. *Vet Rec* 1996;138:306-7.
 - 33) Ishihara K, Kira T, Ogikubo K, Morioka A, Kojima A, Kijima-Tanaka M, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter* isolated from food-producing animals on farms (1999~2001): results from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Int J Antimicrob Agents* 2004;24:261-7.
 - 34) Kim SM, Kim EC, Choi MR, So HA, Shim ES, Kim ES, et al. Cytolethal distending toxin production, genotypes and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolates from diarrhea patients and chickens. *J Bacteriol Virol* 2008;38:207-19.
 - 35) Boonmar S, Sangsuk L, Suthivarakom K, Padungtod P, Morita Y. Serotypes and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from humans and animals in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005;36:130-4.
 - 36) Segreti J, Nelson JA, Goodman LJ, Kaplan RL, Trenholme GM. *In vitro* activities of lomefloxacin and temafloxacin against pathogens causing diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1385-7.
 - 37) Goodman LJ, Trenholme GM, Kaplan RL, Segreti J, Hines D, Petrak R, et al. Empiric antimicrobial therapy of domestically acquired acute diarrhea in urban adults. *Arch Intern Med* 1990;150:541-6.
 - 38) Zaman R. *Campylobacter* enteritis in Saudi Arabia. *Epidemiol Infect* 1992;108:51-8.