

서울지역 소아에서 분리된 Nontyphoid *Salmonella*의 항생제 내성과 Integron의 특징

진영희^{1*} · 김진아¹ · 정지현¹ · 전수진¹ · 이재규¹ · 오영희¹ · 한기영¹ · 이영기²

¹서울시보건환경연구원 역학조사팀, ²단국대학교 보건복지 대학원 공중보건학과

Characterization of Antimicrobial Resistance Patterns and Integrons of Nontyphoid *Salmonella* Isolates from Infants in Seoul

Young-hee Jin^{1*}, Jin-ah Kim¹, Ji-hun Jung¹, Soo-jin Jeon¹, Jae-kyoo Lee¹, Young-hee Oh¹, Ki-young Han¹, and Young-ki Lee²

¹Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Seoul 137-734, Republic of Korea

²Department of Public Health, Graduate School of Public Health & Social Welfare, Dankook University, Cheonan 330-716, Republic of Korea

(Received August 30, 2010/Accepted October 12, 2010)

A total of 105 nontyphoid *Salmonella* isolated from infants in Seoul from 2003 to 2009 was investigated for their serotype, antimicrobial resistance, characterization of integron, and the patterns of Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Eighteen serotypes were detected in 105 isolates, and the two most common serotypes were *S. Enteritidis* (47.6%) and *Montevideo* (15.2%). Among the *Salmonella* serovars, a high level of antimicrobial resistance was found to ampicillin (60%), tetracycline (46.7%), streptomycin (35.2%) and nalidixic acid (28.6%). In the multi-drug resistance patterns, the predominant patterns were only nalidixic acid (15.7%), ampicillin-ampicillin/sulbactam-tetracycline (14.5%), and ampicillin-streptomycin-chloramphenicol-tetracycline (10.8%). PCR and DNA sequencing analysis revealed the presence of class 1 integron in 20 isolates (19%). Of the class 1 integron positive isolates 20% harboured the integron-associated gene cassettes : *aadA2*, *blaP1*, *dfr17-aadA5*, *dfrA12-aadA2*, and *aadA7*. PFGE was carried out to examine the genetic relatedness among *S. Enteritidis* isolates. Except for three strains, fifty strains were divided by three pulsotypes.

Keywords: antimicrobial resistance, gene cassette, integron, nontyphoid *Salmonella*, PFGE

*Salmonella enterica*에 의해 발생하는 비티푸스성 살모넬라 증은 전 세계적으로 발생하는 매우 중요한 식품 매개성 감염질환으로 우리나라에서도 해마다 많은 환자가 발생되고 있다. *Salmonella*는 급성패혈증, 심한 위장염 증상과 발열, 구토를 동반하는 식품유래의 식중독균이며, 원인식품으로는 감염된 가금류의 고기나 계란, 돼지고기를 이용한 음식에 의해서 발생빈도가 높게 나타난다(3, 6, 11). 비록 살모넬라증의 치사율은 낮지만 발생률은 높아 경제적으로나 역학적 및 보건학적 측면에서 매우 중요하다.

*Salmonella enterica*의 2,300여 종의 혈청형 중에서 *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* (*S. Enteritidis*)와 *S. Typhimurium*은 사람에게 있어 식품 유래 살모넬라증의 주된 원인균으로 알려

져 있으며 이들 균에도 항생제에 대한 내성균의 출현이 문제가 되고 있다(24). 건강한 성인에서 단순한 위장관염의 경우 자연 치유가 가능하지만 영·유아에게는 치명적일 수 있어 항생제 치료를 요하는데 전통적으로 오랫동안 사용되어 온 항생제는 amoxicillin, ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, fluoroquinolone, cefotaxime, cefoperazone, ceftriaxone 등이다. 하지만 최근에는 이러한 항생제에 내성을 가지는 균들로 인하여 항생제 선택에 어려움을 겪고 있다(10). 항생제 내성문제는 사람과 가축의 치료제, 식용동물의 성장촉진제 및 농업분야 등, 항생제의 광범위한 사용으로 야기되며 특히 최근에는 *Salmonella* 균과 같은 인수공통 병원성 세균의 인체감염 빈도의 증가로 인한 이들 세균들의 다제 내성에 관심이 고조되고 있다(18).

*Salmonella*를 비롯한 여러 장내세균들은 plasmid, transposon, integron과 같은 유전자 이동기전을 통해 항생제 내성을 획득

* For correspondence. E-mail: cuttyjin94@seoul.go.kr; Tel: +82-2-570-3460; Fax: +82-2-570-3418

할 수 있다. 특히 integron은 하나 이상의 내성유전자가 gene cassette의 형태로 존재하여 다제 내성(multidrug-resistance: MDR)을 나타낼 수 있으며, transposon이나 plasmid와 결합하여 내성이 없는 다른 장내세균에게 전달되어 수평적 의미의 내성균 증가를 유발할 수 있다(22). 따라서 integron의 분포와 특징에 대한 연구는 그람 음성 세균에서의 항균제 내성의 출현과 전파를 추적하는데 있어 매우 중요하다.

이에 본 연구는 2003년부터 2009년까지 서울지역 소아 환자에서 분리된 nontyphoid *Salmonella*의 혈청형을 조사하고 항생제 내성 및 항생제 내성과 관련 있는 integron의 보유여부와 특성을 알아보았다. 그리고 분리빈도가 높은 혈청형에 대해서 분리군주 간의 역학적인 연관성을 알아보기 위해 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)를 실시하여 유연관계를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

시험균주

2003년부터 2009년까지 서울시보건환경연구원에 의뢰된 6세 이하 소아 설사환자 검체에서 분리된 nontyphoid *Salmonella* 105주를 실험에 이용하였다. MacConkey agar에서 무색투명하게 자란 colony 중 KIA에서 K/A, H₂S 생성균주에 대하여 API 20E kit (bioMerieux Co., France)에 의한 생화학적 동정을 실시한 후 O항원은 슬라이드 응집법으로, H항원은 시험관 응집법으로 결정하였다. 사용한 O항혈청과 H항혈청은 국립보건연구원(KNIH, Korea)과 Difco (USA)사 제품을 사용하였다.

항균제 감수성 시험

항균제 감수성 시험은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 방법에 따라 디스크 확산법으로 실시하였다(5). 실험에 사용한 10종의 항균제는 ampicillin (AM), ampicillin/sulbactam (SAM), cephalothin (CF), cefotaxime (CTX), nalidixic acid (NA), ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (C), gentamicin (GM), tetracycline (TE), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT)이었다.

Integron 보유 확인 및 gene cassette 분석

White 등(26)의 방법에 따라 가열법으로 DNA를 추출하여 integrase 유전자에 대한 PCR을 시행하였다. Integron 보유 확인을 위한 PCR primer로는 hep 35 (5'-TGG GGG TYA ARG ATB TKG ATT T-3')와 hep 36 (5'-CAR CAC ATG CGT RAT RAT-3')를 사용하였고, PCR product는 Labopass™ PCR purification kit (COSMO Genetech, Korea)를 이용하여 정제하였다. Integron의 유형분류를 위하여 정제한 PCR 증폭산물을 제한효소인 *Hinf*I (TaKaRa, Japan)를 이용하여 Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 검사를 시행하였다.

Class 1 integron의 gene cassette 분석을 위한 PCR primer는 White 등(26)의 방법에 따라 hep 58 (5'-TCATGGCTTG TTATGACTGT-3')과 hep 59 (5'-GTAGGGCTTATTATGCA

CGC-3')를 사용하였다. 증폭된 PCR product는 gel extraction kit (QIAGEN, UK)를 이용하여 정제하였고, COSMO Genetech 사(Korea)에 sequencing을 의뢰하였다. 염기서열 결과는 NCBI의 GenBank와 비교분석하였다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

표준화된 PulseNet protocol (21)에 따라 다음과 같이 실시하였다. Tryptic soy agar (TSA) 배지에 18-24시간 배양한 균주를 cell suspension TE buffer (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 7.5)에 현탁하여 탁도를 15-20%가 되게 조정할 후, 균 현탁액 200 µl에 1.2% agarose solution을 동량 첨가하여 4°C에서 5분간 굳혀서 agarose plug을 만들었다. 굳힌 plug을 proteinase K (20 mg/ml stock) 40 µl, ES buffer (0.5 M EDTA, 1% sodium lauroyl sarcosine) 1.5 ml에 옮겨 55°C 진탕 항온수조에서 1시간 동안 처리한 후 Plug wash TE buffer (100 mM Tris, 1 mM EDTA)로 20분간 4차례 세척하였다. 세척이 끝난 plug는 1 mm 두께로 자른 다음, *Xba*I이 첨가된 반응 혼합액에 넣어 37°C 항온수조에서 2시간 동안 반응시켰다. 제한효소 반응이 끝나면 반응용액을 제거하고, plug를 gel 성형용 comb 끝 부위에 맞춰 놓은 다음 1% agarose를 gel 성형틀에 부어 굳힌 다음 전기영동을 실시하였다. 전기영동은 CHEF Mapper PFGE system (BioRad, USA)을 이용하여 gradient 6.0 V/cm, Included angle=120°, Int. Tm 2.16 sec, Fin. Tm 63.8 sec의 조건으로 14°C에서 18시간 진행하였고, Ethidium bromide (0.5 µg/ml) 용액에 gel을 넣어 10분간 염색 후 증류수에 탈색하여 Gel doc (BioRad)으로 밴드를 확인하였다. PFGE 결과분석은 BioNumerics software version 5.1 (Applied Maths, Belgium)을 이용하였고, 밴드패턴은 1.5% tolerance Dice coefficient로 dendrogram을 작성하여 분석하였다.

결과

대상균주의 혈청형

2003년부터 2009년까지 7년간 서울지역 소아 설사환자에서 분리된 nontyphoid *salmonella*는 총 105주였다. 분리된 균주의 혈청형은 18종이었으며 분리빈도를 보면 혈청형 Enteritidis가 50주(47.6%)로 가장 많았고, 그 다음이 Montevideo 16주(15.2%)였다. 혈청형 Typhimurium과 Hillingdon이 각각 7주(6.7%)였고, London과 Bareilly가 4주(3.8%), 그 외 혈청형은 1-2주 분리되었다(Table 1).

항균제 내성 및 다제내성 유형

분리된 *Salmonella* 균의 혈청형별 항균제 내성률은 Table 2와 같다. 혈청형별 내성률이 조금씩 달랐는데 혈청형 Enteritidis의 경우 ampicillin의 내성률이 66%로 가장 높았고, streptomycin 44%, tetracycline과 nalidixic acid는 각각 34%, 32%의 내성률을 보였다. Ciprofloxacin과 cefotaxime에 내성을 보이는 균주가 각각 1주 있었다. 혈청형 Montevideo는 ampicillin과 tetracycline의 내성을 보이는 균주가 전체 16주 중 13주로

Table 1. Serotypes of nontyphoid *Salmonella* isolated in Seoul (2003-2009)

Serotypes	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	Total (%)
<i>S. Agona</i>		1						1(0.9)
<i>S. Allerton</i>				1				1(0.9)
<i>S. Bareilly</i>				1	2	1		4(3.8)
<i>S. Borismorbificans</i>	1							1(0.9)
<i>S. Branderup</i>				1		1		2(1.9)
<i>S. Enteritidis</i>	8	3	2	8	20	4	5	50(47.6)
<i>S. Haardt</i>				1	1			2(1.9)
<i>S. Hillingdon</i>				5	1		1	7(6.7)
<i>S. 1,4,[5],12:i-</i>						1		1(0.9)
<i>S. Infantis</i>						1	1	2(1.9)
<i>S. Lekke</i>				1				1(0.9)
<i>S. London</i>		1	3					4(3.8)
<i>S. Montevideo</i>		1	5	8	2			16(15.2)
<i>S. Ohio</i>				1				1(0.9)
<i>S. Othmarschen</i>		2						2(1.9)
<i>S. Panama</i>					1	1		2(1.9)
<i>S. Richmond</i>					1			1(0.9)
<i>S. Typhimurium</i>	2	1		2	1	1		7(6.7)
	11	9	10	29	29	10	7	105

81.3%의 높은 내성률을 보였고 ampicillin/sulbactam이 다른 혈청형에 비해 68.7%의 높은 내성률을 보였다. 혈청형 Typhimurium은 tetracycline의 내성률이 100%로 검사한 7주 모두 내성을 보였고, ampicillin, streptomycin이 각각 71.4%, trimethoprim/sulfamethoxazole이 57.1%의 비교적 높은 내성률을 보였다. 혈청형 Hillingdon은 다른 혈청형에 비해 nalidixic acid의 내성률이 71.4%로 비교적 높았다. 기타 혈청형은 ampicillin과 tetracycline이 각각 40%의 내성률을 보였고 streptomycin과 nalidixic acid가 각각 24%, 20%의 내성률을 보였는데 전체 *Salmonella*의 내성률은 ampicillin이 60%로 가장 높았고, tetracycline과 streptomycin이 각각 46.7%, 35.2%의 내성률을 보였고, cefotaxime과 ciprofloxacin, gentamicin, trimethoprim/sulfamethoxazole은 10% 미만의 낮은 내성률을 보였다.

분리균의 항균제 내성유형은 총 29종이었으며, 총 10종의 항균제에 대해서 1종에서부터 최고 9종의 항균제에 대해 내성을 나타내는 다양한 내성형을 나타내었다. 총 105주에서 22주는 10종의 항균제에 대해 감수성을 보였으며, 내성을 보인 균

주의 내성유형을 살펴보면 Table 3과 같이 혈청형 Enteritidis의 경우 AM과 NA에 단일내성을 보이는 균주가 21주로 42%를 차지하였고, AM-S-C-TE형이 7주(14%), AM-S-TE형이 6주(12%)를 차지하였다. 혈청형 Enteritidis의 경우 7제 및 9제 내성균도 각각 1주 확인되었다. 기타 혈청형의 경우 좀 더 다양한 유형이 확인되었는데, AM-SAM-TE형이 12주(21.8%)로 가장 많이 차지하였는데 이 중 혈청형 Montevideo가 9주를 차지하였다(결과 미제시). 그 다음으로는 NA 단일형과 AM-NA-TE형이 각각 3주 확인되었다.

Integron 보유 현황 및 gene cassette 분석

전체 105주에 대하여 integrase 검출을 위한 PCR을 수행한 결과 20주가 양성이었고, integrase 유형 분류를 위해 RFLP를 한 결과 20주 모두 class 1 integron을 보유하고 있었다(Table 4). Class 1을 보유한 20주 중에서는 혈청형 Montevideo가 8주로 가장 많은 비율을 차지하였고, 그 다음으로는 혈청형 Typhimurium이 4주, 분리균 중 가장 많은 비율을 차지한 Enteritidis

Table 2. Antimicrobial resistance rates of *Salmonella* serotypes isolates in Seoul

Serotype	Percent resistance within serotype to antimicrobial agents									
	AM	SAM	S	C	CTX	CIP	GM	NA	TE	SXT
<i>S. Enteritidis</i> (n=50)	66	4	44	28	2	2	4	32	34	6
<i>S. Montevideo</i> (n=16)	81.3	68.7	0	0	0	0	0	12.5	81.3	0
<i>S. Typhimurium</i> (n=7)	71.4	28.6	71.4	42.9	14.3	0	0	28.6	100	57.1
<i>S. Hillingdon</i> (n=7)	28.6	28.6	42.9	28.6	0	0	0	71.4	28.6	0
Other serotypes (n=25)	40	12	24	12	4	0	0	20	40	8
Total (n=105)	60	19	35.2	21.9	2.9	0.9	1.9	28.6	46.7	8.6

AM, Ampicillin; SAM, Ampicillin/Sulbactam; S, Streptomycin; C, Chloramphenicol; CTX, Cefotaxime; CIP, Ciprofloxacin; GM, Gentamycin; NA, Nalidixic acid; TE, Tetracycline; SXT, Sulfamethoxazole/Trimethoprim

Table 3. Multiple antimicrobial resistance patterns of nontyphoid *Salmonella* isolated in Seoul

Group	Resistance patterns	Serotypes		No. of isolates (%)
		<i>S. Enteritidis</i> (n=50)	Other serotype (n=55)	
R1	AM	11		11(13.3)
R2	NA	10	3	13(15.7)
R3	S	1		1(1.2)
R4	AM-C	2		2(2.4)
R5	AM-CTX		1	1(1.2)
R6	AM-NA	1		1(1.2)
R7	AM-TE		2	2(2.4)
R8	S-NA	2	1	3(3.6)
R9	AM-S-C	2		2(2.4)
R10	AM-S-TE	6		6(7.2)
R11	AM-SAM-NA		1	1(1.2)
R12	AM-SAM-TE		12	12(14.5)
R13	AM-NA-TE		3	3(3.6)
R14	S-C-TE		1	1(1.2)
R15	S-NA-TE		1	1(1.2)
R16	S-TE-SXT		1	1(1.2)
R17	AM-S-C-TE	7	2	9(10.8)
R18	AM-S-TE-SXT		1	1(1.2)
R19	AM-S-NA-TE	1	1	2(2.4)
R20	AM-SAM-NA-TE		1	1(1.2)
R21	AM-SAM-S-C-TE		1	1(1.2)
R22	AM-S-C-TE-SXT		1	1(1.2)
R23	AM-S-NA-TE-SXT		1	1(1.2)
R24	AM-SAM-S-C-NA-TE		1	1(1.2)
R25	AM-SAM-S-C-TE-SXT	1		1(1.2)
R26	AM-SAM-S-NA-TE-SXT		1	1(1.2)
R27	AM-SAM-S-C-CTX-TE-SXT		1	1(1.2)
R28	AM-S-CTX-GM-NA-TE-SXT	1		1(1.2)
R29	AM-SAM-S-C-CIP-GM-NA-TE-SXT	1		1(1.2)
	Total	46	37	83(100.0)

AM, Ampicillin; SAM, Ampicillin/Sulbactam; S, Streptomycin; C, Chloramphenicol; CTX, Cefotaxime; CIP, Ciprofloxacin; GM, Gentamycin; NA, Nalidixic acid; TE, Tetracycline; SXT, Sulfamethoxazole/Trimethoprim

는 단지 1주만 integron을 보유하였다. 이들 integron 보유균에 대해 gene cassette를 분석한 결과는 Table 4와 같이 4주에서 2주만 gene cassette가 확인되었다. Gene cassette가 확인된 4주 중 2주는 혈청형 Typhimurium이었는데 1주는 2003년에 분리된 균주로 1,000 bp와 1,200 bp 크기의 PCR band가 확인되어 염기서열을 분석한 결과 *aadA2*와 *blaP1*의 유전자로 확인되었다. 나머지 1주는 2007년에 분리된 균주로 integron size는 1,900 bp로 *dfrA12-aadA2*로 확인되었다. 2007년에 분리된 혈청형 Panama는 *dfrA17-aadA5*의 gene cassette를 2008년에 분리된 혈청형 Infantis는 *aadA7*의 gene cassette를 보유하여 서로 다른 cassette gene을 보유한 것으로 확인되었다.

PFGE 분석

Nontyphoid *Salmonella* 105주 중에서 가장 많은 비율을 차지한 *S. Enteritidis* 50주에 대하여 균주 간의 유사도를 알아보

고자 PFGE를 실시하였다. 분석 dendrogram은 Fig. 1과 같고, 유사도를 기준으로 크게 A (n=2주), B (n=34주), C (n=14) 세 그룹으로 나눌 수 있었다. A 그룹은 2007년에 분리된 9주 내성균과 2009년에 분리된 S-NA 내성균으로 유전자 패턴이 나머지 균주와는 확연히 구분되었고 이 두 균주 간에도 64.9%의 유사도를 보였다. B그룹은 가장 큰 그룹으로 전체 유사도는 90.4%였고, 세부적으로는 3개의 소그룹으로 구분되었다. B1 그룹은 그룹 내의 유사도 100%로 2003, 2006, 2007, 2008, 2009년에 분리된 균 16주로 구성되었고 항생제 내성은 nalidixic acid 내성인 균주가 가장 많은 것으로 확인되었다. B2 그룹 또한 그룹 내의 유사도 100%로 2004, 2006, 2007, 2008년에 분리된 13주로 구성되었고 항생제 내성은 ampicillin에 내성인 균주가 많은 것으로 확인 되었다. B3 그룹은 그룹 내의 유사도 90.4%로 2003, 2008, 2009년에 분리된 5주로 구성되었고 세부적으로는 B3그룹이 B1, B2에 비해 유사도가 상대적으로 낮

Table 4. Distribution of class 1 integron gene cassette and antimicrobial resistance patterns in nontyphoid *Salmonella* isolates in Seoul

No	Strain	Year	Resistance patterns	Integron size (bp)	Gene cassette
1	<i>S. Typhimurium</i>	2003	AM-SAM-S-C-CTX-TE-SXT	1,000	<i>aadA2</i>
2	<i>S. Othmarschen</i>	2004	AM-SAM-TE	1,200	<i>blaP1</i>
3	<i>S. Othmarschen</i>	2004	AM-SAM-TE		
4	<i>S. Typhimurium</i>	2004	AM-NA-TE		
5	<i>S. London</i>	2005	-		
6	<i>S. Montevideo</i>	2005	-		
7	<i>S. Montevideo</i>	2005	-		
8	<i>S. Allerton</i>	2006	-		
9	<i>S. Enteritidis</i>	2006	-		
10	<i>S. Montevideo</i>	2006	AM-SAM-TE		
11	<i>S. Montevideo</i>	2006	AM-SAM-TE		
12	<i>S. Montevideo</i>	2006	AM-SAM-TE		
13	<i>S. Montevideo</i>	2006	AM-SAM-TE		
14	<i>S. Montevideo</i>	2006	AM-SAM-TE		
15	<i>S. Typhimurium</i>	2006	AM-SAM-TE		
16	<i>S. Panama</i>	2007	AM-SAM-S-NA-TE- SXT	1,600	<i>dfr17-aadA5</i>
17	<i>S. Typhimurium</i>	2007	S-TE-SXT	1,900	<i>dfrA12-aadA2</i>
18	<i>S. Montevideo</i>	2007	AM-SAM-TE		
19	<i>S. Infantis</i>	2008	AM-S-C-TE	1,200	<i>aadA7</i>
20	<i>S. 1,4,[5],12:i:-</i>	2008	AM-NA-TE		

AM, Ampicillin; SAM, Ampicillin/Sulbactam; S, Streptomycin; C, Chloramphenicol; CTX, Cefotaxime; CIP, Ciprofloxacin; GM, Gentamycin; NA, Nalidixic acid; TE, Tetracycline; SXT, Sulfamethoxazole/Trimethoprim

은 균주들로 구성되었다. C그룹은 1균주를 제외하고는 모두 ampicillin에 내성이고 AM-S-C-TE 내성형인 균주가 대다수를 이루었는데, 2004년에 분리된 1균주는 10종의 항생제에 모두 감수성을 보여 나머지 C그룹과는 유전자 패턴에 차이가 있었다. 혈청형 Enteritidis 전체 50주의 유사도는 확연히 구분되는 A그룹으로 인해 47.2%의 낮은 유사도를 보였다.

고찰

2002년부터 2010년 5월까지 국내 식중독 원인균별 발생현황을 보면 세균 원인체 중에서 병원성대장균 다음으로 살모넬라에 의한 식중독 발생건수가 가장 많은 것으로 보고되었다(8). 본 연구는 소아에서 분리된 살모넬라균에 대한 혈청형 분포와 항생제 내성에 관한 연구를 수행하였다.

혈청형은 총 19종으로 Enteritidis가 47.6%로 가장 많이 분리되었고, 그 다음은 Montevideo 15.2%, Typhimurium, Hillingdon이 각각 7%였다. 이는 유 등(24)이 2001년부터 2004년까지 광주지역 소아에서 분리한 살모넬라의 혈청형이 Typhimurium 32.2%, Enteritidis 29.6%, London 7% 순 이었다는 결과와는 차이가 있었다. 그러나 국내 조 등(4)이 보고한 2004년부터 2006년까지 전국적으로 수행한 EnterNet Korea 사업 결과 *S. Enteritidis*가 41%, *S. Typhimurium* 18%, *S. Bardo* 11%였다고 하였는데 본 연구결과와 비교적 유사하였다. 국외의 경우 일본(12), 스페인(9), 프랑스(2)에서도 역시 Enteritidis가 가장 많이 분리되는 것으로 보고하여 지역에 따라 조금씩 차이는 있

으나 nontyphoid *Salmonella* 중에 Enteritidis가 가장 많이 분리되는 것은 전 세계적인 경향을 알 수 있었다. 본 연구에서 두 번째로 많이 분리된 Montevideo의 경우 2003년부터 2009년까지 전반적으로 걸쳐서 분리된 것이 아니라 2005, 2006년에 편중되어 분리된 경향이 있고 이들 균에 대한 PFGE 결과 10종의 항생제에 모두 감수성인 2005년 분리균 3주를 제외하고 나머지 균주는 전체 95.3%의 유사도를 보여 유전자형이 유사한 균주로 확인이 되었다(결과 미제시). 또한 조 등(4)의 결과를 보면 우리나라에서 비슷한 시기에 분리된 살모넬라 중 *S. Montevideo*의 분리율이 낮은 점으로 보아 2006년도에 서울지역에서 소규모 유행이 있었음을 짐작할 수 있는데 이에 대해서는 좀 더 확인이 필요할 것으로 생각된다. 환자에서 분리된 살모넬라의 항균제에 대한 내성 증가가 문제가 되고 있는데, 특히 *S. Typhimurium*은 다른 혈청형에 비해 항균제에 대한 내성도가 매우 높은 것으로 알려져 있다. 본 연구에서도 10종에 대한 항균제 내성을 조사한 결과 *S. Typhimurium*이 가장 내성률이 높은 혈청형으로 확인되었다. Typhimurim 7주 모두 3제 이상의 내성유형을 나타내었고 2003년에 분리된 1주는 7제 내성을 보였는데, tetracycline, ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole에 대한 내성이 높았고 nalidixic acid에도 28.6%의 내성률을 보였다. 이 결과는 국내의 손 등(25)의 연구와는 거의 유사하였으나 우르과이(15), 슬로바키아(16), 헝가리(19), 영국(23)에서 보고한 결과와 비교해보면 국내 분리주가 항생제 내성률이 훨씬 높아 국내의 항생제 내성관리가 적극적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다. 또한 Typhimurium의

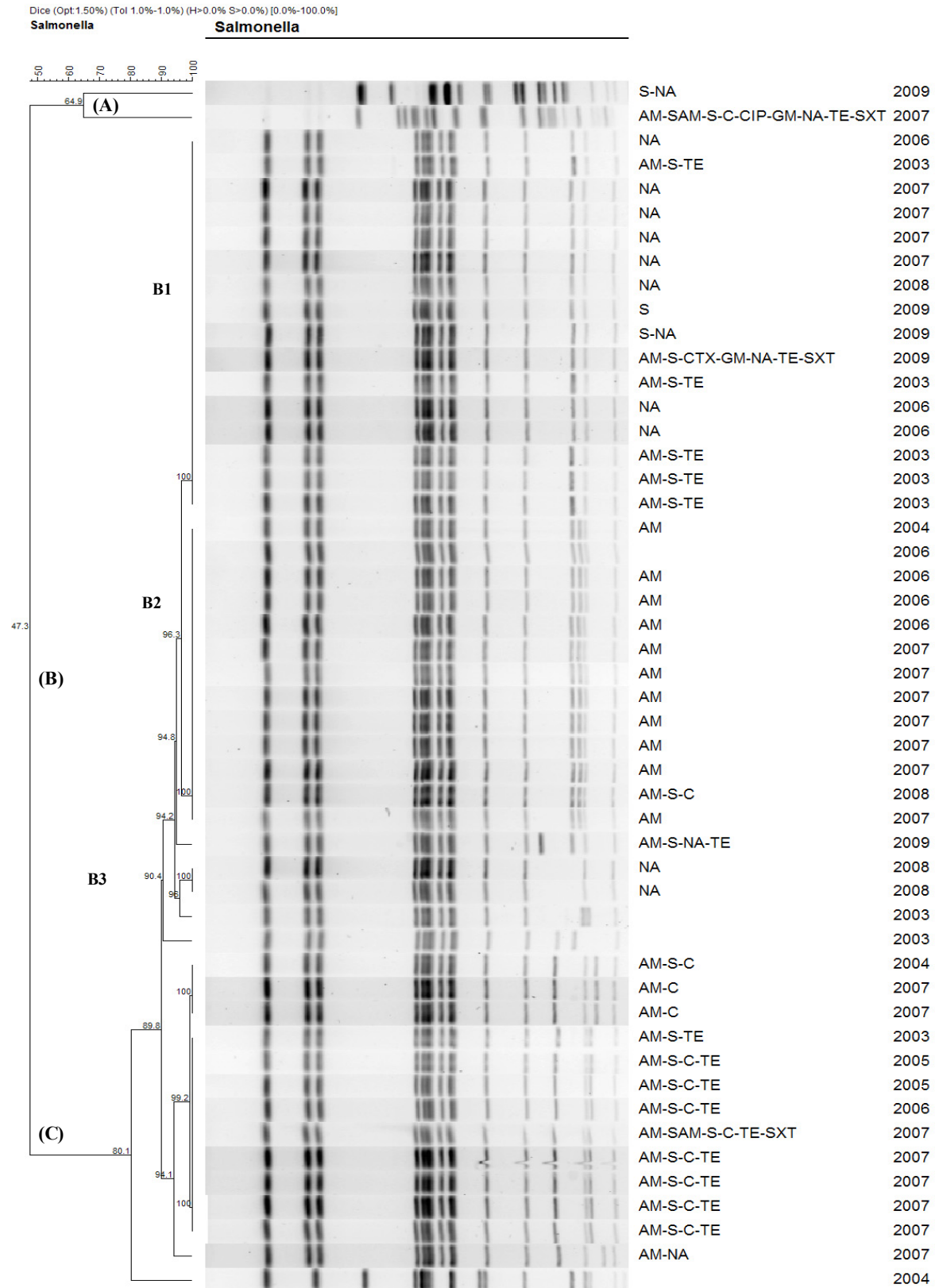


Fig. 1. Dendrogram showing the clustering of PFGE patterns after *Xba*I digestion for *S. Enteritidis* isolates.

경우 phage 형에 따라 항균제 내성 정도의 차이가 있어 추가로 phage typing도 필요할 것으로 여겨진다. Enteritidis의 경우 ampicillin에 대한 내성이 66%로 가장 높았고 streptomycin 44%, tetracycline 34%, nalidixic acid 32% 순이었는데 이는 박 등(20)이 2001년부터 2005년까지 서울지역 식중독 환자에서 분리한 *S. Enteritidis*의 항생제 내성 양상과 비교했을 때 내성을 보이는 항생제 항목은 거의 유사하나 항생제 내성률은 조금 더 높았다. 조 등(4)은 EnterNet Korea 사업 결과 *Salmonella* 속의 항생제 내성률이 ampicillin 40%, tetracycline 39%, nalidixic acid 23%, chloramphenicol 14%였고, 권 등(13)의 국가항생제내성안전관리사업 연구보고서에 따르면 설사환자에서 분리된 살모넬라의 항생제 내성률이 ampicillin 50%, tetracycline 40%이고 축산물에서 분리된 살모넬라는 nalidixic acid 74%, tetracycline 67%, streptomycin 67%라고 보고하였다. 이러한 결과와 비교해보면 본 연구가 소아에서 분리되었음에도 불구하고 항생제 내성률이 국내 평균보다 다소 높음을 알 수 있었다. 살모넬라의 경우 인수공통전염병으로 동물과 인체에서 분리된 균주의 항균제 내성에서의 차이는 사람과 동물에 사용하는 항생제 차이에 의한 것과 동물에서 사료첨가제로 사용한 항생제 종류에 따라 내성에 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(20). 이러한 점에서 살모넬라는 다른 인체 병원균 보다 항생제 내성관리를 더욱 효율적으로 해야 할 것으로 여겨진다.

Integron은 각각이 보유하고 있는 integrase에 따라 세 종류로 구분되는데 이 중에서 class 1 integron은 그람음성 병원균에 널리 분포하는 것으로 알려져 있다(7). 본 연구에서는 전체 105주 중 20주(19%)에서 class 1 integron이 확인되었는데 대부분의 살모넬라는 class 1 integron을 보유하는 것으로 알려져 있으나 일부 혈청형에서 class 2 integron도 보유하고 있는 것이 보고되었다(17). Class 1 integron의 gene cassette 부분을 확인한 결과 20주 중에서 혈청형 Typhimurium 2주와 Infantis, Panama가 각 1주씩 확인되었고, 나머지 16주는 integron내 gene cassette를 가지고 있지 않았다. 유 등(24)의 결과에 의하면 소아에서 분리된 살모넬라 115주 중 62.6%에서 integron이 검출이 되었으며 이 중 86%가 gene cassette가 확인 되었다고 하였는데, 본 연구결과보다 integron 보유율이 훨씬 높았다. 그러나 이 등(14)의 결과에 의하면 임상 검체 261주 중 21주(8%)에서 integron이 검출되었고 그 중 12주(57%)에서 gene cassette가 확인되었다고 하였고, 손 등(25)의 결과에 의하면 *S. Typhimurium* 17주 중 3주가 integron을 보유하였는데 지역별 균주별로 차이가 있는 것인지 진단검사의 방법상의 문제로 인한 것인지 확인이 필요할 것으로 생각된다. 보유한 gene cassette는 streptomycin과 spectinomycin의 내성 유전자인 *aadA2*와 ampicillin에 내성 유전자인 *blaP1*, trimethoprim에 내성인 *dfrA12*와 *aadA2*, *dfrA17-aadA5*, 그리고 *aadA7* 유전자였다. 이들 내성유전자를 보유한 균주는 모두 ampicillin이나 streptomycin 그리고 trimethoprim에 내성을 보였다. *BlaP1* 및 *aadA2* 유전자가 있는 1,000 bp와 1,200 bp 크기의 integron은 43 kb의 *S. enterica* genomic island 1 (SGI1)에 동시에 존재하는 것으로 알려져 있고(1), *dfrA12-aadA2*와 *dfrA17-aadA5* gene

cassette는 살모넬라 속과 *E. coli*를 비롯한 다른 장내세균을 대상으로 한 연구에서 흔히 보고되고 있다(14, 17, 19, 25, 26). 이러한 결과들로 볼 때 integron내 gene cassette는 integron을 보유한 다른 균으로 쉽게 전파가능하기 때문에 본 연구에서 integron 보유균 중 80%의 비율을 차지한 gene cassette 비보유균에 대해서도 주의가 요구된다. 본 연구 결과에서 integron에 의한 항생제 내성에 대한 관여도는 상대적으로 낮지만 integron내에는 여러 내성유전자를 삽입할 가능성이 있기 때문에 지속적으로 확인할 필요성이 있다.

균주 간의 역학관계를 파악하고자 가장 높은 비율로 분리된 *S. Enteritidis*에 대해 PFGE 분석을 한 결과 크게 3그룹으로 나뉘었다. 정확히 일치하지는 않지만 비교적 항생제 내성패턴과 유사한 유전자 패턴을 보였고, 전체 50주 중에서 3주를 제외하고는 89.8%의 비교적 유연관계가 높은 균주임을 알 수 있었다. 이 결과로 볼 때 서울지역 소아 설사환자에서 분리된 *S. Enteritidis*는 유사한 유전자형을 가진 균주에 의한 확산으로 생각되며, 유연관계가 떨어지는 3주에 대해서는 해외 유입균인지 아니면 기존 균주의 새로운 변이형인지 등에 대해서 추가적인 역학조사가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 성인에 비해 항생제 노출기회가 적은 소아에서 분리된 균주 임에도 불구하고 고도내성을 보이는 균주나 integron을 보유한 균주에 대해서는 앞으로도 지속적인 모니터링을 통해 국가적인 차원에서 관리가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

적요

2003년부터 2009년까지 서울지역 소아에서 분리된 nontyphoid *Salmonella* 105주에 대해서 혈청형, 항생제 내성양상, integron의 특징과 PFGE를 수행하였다. 혈청형은 총 18종으로 *S. Enteritidis*가 가장 많이 분리되었고, 그 다음은 Montevide였다. 항균제 내성은 혈청형별로 차이가 있었으나 전체 살모넬라에 대해서 10종의 항균제에 대한 내성률은 ampicillin이 60%로 가장 높았으며, tetracycline 46.7%, streptomycin 35.2%, nalidixic acid 28.6% 순이었다. 다제내성 유형을 알아본 결과 nalidixic acid 단독 내성이 15.7%로 가장 많았고, ampicillin-ampicillin/sulbactam-tetracycline형이 14.5%, ampicillin-streptomycin-chloramphenicol-tetracycline형이 10.8%였다. Integron에 대한 연구 결과 integron 보유율은 19%로 20주에서 class 1 integron을 가지고 있었고 gene cassette는 20%만 확인이 되었다. 확인된 gene cassette는 *aadA2*, *blaP1*과 *dfrA12-aadA2*, *dfr17-aadA5*, *aadA7*이었다. 연도별 분리균의 유연관계를 확인하고자 가장 분리율이 높은 *S. Enteritidis* 50주에 대해서 PFGE를 수행한 결과 3가지 Pulsotype으로 나뉘어졌다. 3주를 제외한 모든 균주는 similarity 89.8%의 비교적 유연관계가 높은 균임을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Boyd, D., G.A. Peters, A. Cloeckert, K.S. Boumedine, E.

- Chaslus-Dancla, H. Imberechts, and M.R. Mulvey. 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.* 183, 5725-5732.
2. Cailhol, J., R. Lailier, P. Bouvet, S. La Vieille, F. Gauchard, P. Sanders, and A. Brisabois. 2005. Trends in antimicrobial resistance phenotypes in non-typhoid *Salmonella* from human and poultry origins in France. *Epidemiol. Infect.* 134, 171-178.
 3. Chalker, R.B. and M.J. Blaser. 1988. A review of human salmonellosis. III. Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. *Rev. Infect. Dis.* 10, 111-124.
 4. Cho, S.H., H.H. Shin, Y.H. Choi, M.S. Park, and B.K. Lee. 2008. Enteric bacteria isolated from acute diarrheal patients in the Republic of Korea between the year 2004 and 2006. *J. Microbiol.* 46, 325-330.
 5. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard-Ninth Edition : M2-A9. Wayne, PA, USA.
 6. D'Aoust, J.Y. 1991. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 12, 17-40.
 7. Fluit, A.C. and F.J. Schmitz. 2004. Resistance integrons and super-integrons. *ESCMID.* 10, 272-288.
 8. Foodborne disease Statistics System. Korea Food & Drug Administration. Available: <http://e-stat.kfda.go.kr>
 9. Hernandez, T., C. Rodriguez-Alvarez, M.P. Arevalo, A. Torres, A. Sierra, and A. Arias. 2002. Antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serovar isolated from chicken in Spain. *J. Chemother.* 14, 346-350.
 10. Hwang, K.W., B.Y. Oh, J.H. Kim, M.H. Kim, J.S., E.J. Lee, N.K. Cho, J.M. Go, and Y.H. Kim. 2009. Antimicrobial resistance and multidrug resistance patterns of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from diarrhea patients, Incheon. *Kor. J. Microbiol.* 45, 99-104.
 11. Jung, B.G. 2000. P. thesis. Andong National University, Andong, Korea.
 12. Kusunoki, J., A. Kai, Y. Yanagawa, M. Takahashi, M. Shingki, H. Obata, T. Itho, K. Ohota, Y. Kudoh, and A. Nakamura. 1996. Characterization of *Salmonella* ser. Enteritidis phage type 34 isolated from food poisoning outbreaks in Tokyo by epidemiological marker. *Kansenshogaku Zasshi* 70, 702-709.
 13. Kwon, K.S., I.G. Hwang, H.S. Kwak, Y.S. Kang, M.G. Kim, J.A. Han, G.Y. Lee, Y.H. Koh, J.H. Cho, J.W. Lee, K.H. Kim, J.S. Lee, Y.J. Choy, and G.J. Woo. 2006. Analysis and monitoring of antimicrobial resistant food borne bacteria. *Annual Report of NARMP.* 4, 13-29.
 14. Lee, J.E. 2006. M. thesis. Ulsan University, Ulsan, Korea.
 15. Macedo-vinas, M., N.F. Cordeiro, I. Bado, S. Herrera-Leon, M. Vola, L. Robino, R. Gonzalez-Sanz, S. Mateos, F. Schelotto, G. Algorta, J.A. Ayala, A. Echeita, and R. Vignoli. 2009. Surveillance of antibiotic resistance evolution and detection of class 1 and 2 integrons in human isolates of multi-resistant *Salmonella* Typhimurium obtained in Uruguay between 1976 and 2000. *Int. J. Antimicrob. Agents* 13, 342-348.
 16. Majtan, V., L. Majtanova, and L. Kovac. 2004. Analysis of integrons in human isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in the Slovak Republic. *FEMS Microbiol. Lett.* 239, 25-31.
 17. Molla, B., A. Miko, K. Pries, G. Hildebrandt, J. Kleer, A. Schroeter, and R. Helmuth. 2007. Class 1 integrons and resistance gene cassettes among multidrug resistant *Salmonella* serovars isolated from slaughter animals and foods of animal origin in Ethiopia. *Acta Tropica.* 103, 142-149.
 18. Moss, P.J. and M.W. McKendrick. 1997. Bacterial gastroenteritis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 10, 402-407.
 19. Nogrady, N., I. Gado, T. Akos, and J. Paszti. 2005. Antibiotic resistance and class 1 integron patterns of non-typhoidal human *Salmonella* serotypes isolated in Hungary in 2002 and 2003. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 126-132.
 20. Park, S.G., M.S. Kim, and Y.K. Lee. 2006. Trend of antimicrobial susceptibility and multiple drug resistance patterns of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from foodborne patients in Seoul between 2001 and 2005. *J. Fd Hyg. Safety.* 21, 23-30.
 21. PFGE Standard Protocol. 2008. Korea Center For Disease Control & Prevention. National Institute of Health, Korea.
 22. Ploy, M.C., T. Lambert, J.P. Couty, and F. Dnis. 2000. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin. Chem. Lab. Med.* 38, 483-487.
 23. Randall, L.P., S.W. Cooles, M.K. Osborn, L.J.V. Piddock, and M.J. Woodward. 2004. 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, 208-216.
 24. Ryu, N.E. 2006. D. thesis. Chonam National University, Gwangju, Korea.
 25. Sohn, C.K., J.A. Lee, D.Y. Lee, W. Hun, and J.K. Jung. 2006. Structural analysis of class 1 integron gene cassette and assessment of genetic relationships by PFGE of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Gyeongbuk area. *Kor. J. Microbiol.* 42, 12-18.
 26. White, P.A., C.J. McIver, Y.M. Deng, and W.D. Rawlinson. 2000. Characterization of two new gene cassettes, aadA5 and dfrA17. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 265-269.