

## 경기도내에서 분리한 캄필로박터 제주니균의 유전적특성 및 항생제내성 연구

허은선\* · 박포현 · 김종화 · 손종성 · 윤희정 · 이에은 · 최연숙 · 윤미혜 · 이정복

경기도보건환경연구원 미생물팀

### Genetic Properties and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* Isolates from Diarrhea Patients in Gyeonggi-do

Eun-Seon Hur\*, Po-Hyun Park, Jong-Hwa Kim, Jong-Sung Son, Hee-Jeong Yun, Yea-Eun Lee,  
Yun-Sook Choi, Mi-Hye Yoon, and Jong-Bok Lee

Team of Microbiology, Gyeonggi Institute of Health and Environment, Suwon 440-290, Republic of Korea

(Received May 6, 2013 / Accepted July 4, 2013)

*Campylobacter jejuni* is one of important food-borne pathogens causing human gastroenteritis. We isolated 42 strains of *C. jejuni* from diarrhea patients and 4 food-poisoning outbreaks in 2010, Gyeonggi-do. In this study, 42 strains were tested for genetic characteristics, the serotype distribution and antimicrobial resistant rate. The presence of *hipO* (100%), *cdtB* (100%), and mutated *gyrA* (95.2%) genes was detected in *C. jejuni* by polymerase chain reaction (PCR). Detection of mutated *gyrA* gene correlated with ciprofloxacin resistance. Forty isolates had mutated *gyrA* gene and were actually resistant to ciprofloxacin. Furthermore, comparing the *gyrA* DNA sequence data, ciprofloxacin-resistant isolates had a mutation of the DNA sequence from ACA (threonine) to ATA (isoleucine). But 41 strains (97.6%) of patient isolates were susceptible to erythromycin and azithromycin. A total of 35.7% among 42 *C. jejuni* isolates were identified into 4 different serotypes. The serotype distribution of *C. jejuni* strains were shown to be HS2(B), HS3(C), HS4(D), HS19(O). To investigate the genotypes of *C. jejuni* isolated in Gyeonggi province, repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR) analysis and SmaI-digested pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) profile analysis were performed. From the PFGE analysis of 42 *C. jejuni* strains, 12 clusters of PFGE profile were obtained. On the other hand, 11 clusters of rep-PCR profile were obtained from 42 strains of *C. jejuni*.

**Keywords:** *Campylobacter jejuni*, *gyrA*, antimicrobial susceptibility, PFGE, rep-PCR

*Campylobacter jejuni*는 설사, 복통 등의 증상을 일으키는 식품 매개 장염의 중요한 원인균으로 이미 외국에서는 살모넬라, 병원성 대장균에 의한 식중독보다 *C. jejuni*에 의한 식중독이 더 많이 발생하는 것으로 보고되고 있다(Altekruse *et al.*, 1999). *C. jejuni*는 양쪽 끝에 하나씩 극성 편모를 가지고 있는 그람음성의 나선형 간균이며, 5-10% 산소에서 주로 증식하는 미호기성균으로 대부분 42°C에서 잘 증식하기 때문에 thermophilic *Campylobacter*로 분류된다. 또한 공기 중 노출이나, 건조, 가열, pH 등에 감수성이 있고 500-800개의 소량의 균으로도 식중독을 일으킬 수 있으며, 성인보다는 유아, 어린이 및 면역력이 낮은 사람에게 감염률이 높다(Altekruse *et al.*, 1999). *C. jejuni*는 주로 가금류, 소 돼지 등에 많이 분포하고, 특히 닭 등의 가금류의 경우 보균률은 50-100% 정도로 매우 높다(Zhao *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2010). *C. jejuni*에 의한 식중독은 여름철에 가장 빈번하게 발생하며 원

인으로는 조리가 덜 되거나, 오염된 닭고기 섭취와 관련된 경우가 많다.

*C. jejuni*에 감염되면 보통 2-5일 후 증상이 발생하고 전형적으로 5-8일간 지속된다. 임상증상으로는 설사, 구토, 발열, 메스꺼움 등 다양한 증상을 보이며, 일부 면역체계가 무너진 경우에는 Guillan-Barré 증후군 및 Reiter 증후군 등의 더욱 심각한 질병으로 이어질 수 있다. 1978년 벨기에에서 *C. jejuni*의 quinolone 내성율이 6.3%임을 처음 보고하였고(Vanhoof *et al.*, 1978; Endtz *et al.*, 1991; Piddock, 1995) 이후 현재 캄필로박터균 치료제로 fluoroquinolone계 항생제가 많이 사용되고 있다. 그러나 fluoroquinolone계 항생제 사용이 증가함에 따라 이 항생제에 내성을 가진 *Campylobacter* 균주가 증가하고 있다(Zaman *et al.*, 1992). Gaunt와 Piddock가 분리된 *Campylobacter* 균주 가운데 fluoroquinolone계 항생제인 ciprofloxacin에 의한 내성균주가 4.1%임을 보고하였고(Gaunt and Piddock, 1996), 몇몇 나라에서는 *Campylobacter*균의 fluoroquinolone계 내성이 빠르게 증가하여 이 세균에 의한 위중한 감염의 치료에 문제점이 제기되고 있다

\*For correspondence. E-mail: hifla@gg.go.kr; Tel.: +82-31-250-2548; Fax: +82-31-250-2605

**Table 1.** Sequence of primers used in this study

| Target                            | PCR product size (bp) | Sequence (5'→3')                              |
|-----------------------------------|-----------------------|---|
| <i>hipO</i>                       | 323                   | Forward 5'-ACT TCT TTA TTG CTT GCT GC-3'      |
|                                   |                       | Reverse 5'-GCC ACA ACA AGT AAA GAA GC-3'      |
| <i>cdtB</i>                       | 623                   | Forward 5'-ATC CGC AGC CAC AGA AAG CAA ATG-3' |
|                                   |                       | Reverse 5'-GCG GTG GAG TAT AGG TTT GTT GTC-3' |
| Mutated <i>gyrA</i>               | 265                   | Forward 5'-TTT TTA GCA AAG ATT CTG AT-3'      |
|                                   |                       | Reverse 5'-CAA AGC ATC ATA AAC TGC AA-3'      |
| Positive <i>gyrA</i>              | 368                   | Forward 5'-TTT TTA GCA AAG ATT CTG AT-3'      |
|                                   |                       | Reverse 5'-CAG TAT AAC GCA TCG CAG CG-3'      |
| Sequencing primer ( <i>gyrA</i> ) |                       | Forward 5'-TTA TTA TAG GTC GTG CTT TG-3'      |
|                                   |                       | Reverse 5'-TAG AAG GTA AAA CAT CAG GTT-3'     |

(Snchez *et al.*, 1994; Gaunt and Piddock, 1996). 현재는 Fluoroquinolone계 항생제에 대한 내성 균주의 증가로 erythromycin, azithromycin 등의 매크로라이드제가 대신 사용되고 있다(Aarestrup and Wegener, 1999). Fluoroquinolone계 항생제는 *Campylobacter* 등의 그람 음성균의 DNA gyrase와 topoquinolone 합성을 억제하여 항균작용을 나타내는데 *gyrA* 유전자의 돌연변이 여부로 fluoroquinolone계 항생제인 ciprofloxacin에 내성을 확인할 수도 있다(Charvalos *et al.*, 1996; Zirnstein *et al.*, 1999).

또한 *Campylobacter* 균종에는 *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus* 등 다양한 종류가 존재하고 이 중 식중독 원인균으로 중요한 균은 *C. jejuni*이다. *C. jejuni*를 동정하기 위해서 주로 hippurate 가수분해와 항균제 감수성 시험 등을 이용하지만 그 구분이 명확하지 않아 PCR에 의한 *hipO* 유전자 검출이 사용되고 있다(Walder, 1979). *C. jejuni* 균을 동정하는 다른 방법으로는 독력인자의 유무를 확인하는 것이다. 장염을 유발하는 독력인자는 명확하게 밝혀지지 않았지만 최근의 연구에 의하면 상피세포에 부착, 침입하는 능력, cytolethal distending toxin (CDT) 생성이 관여한다는 보고가 있다(Kim *et al.*, 2008). CDT 독소는 *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*로 이루어져 있고, 그 중에서 *C. jejuni*에 의한 독성에 *cdtB*가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Purdy *et al.*, 2000; Dassanayake *et al.*, 2005). 방글라데시 지역에서 분리한 *C. jejuni*의 97.5%에서 *cdtB* 유전자가 검출되었고, 우리나라 전북 지역에서 분리한 균의 경우 *cdtB* 유전자가 100% 검출되었다(Kim *et al.*, 2008; Talukder *et al.*, 2008; Lindmark *et al.*, 2009).

*C. jejuni*를 typing하는 방법에는 혈청형, 파지형 등의 표현형을 분석하는 방법과 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), ribotyping, multilocus sequence typing (MLST), repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (rep-PCR) 등의 유전형을 분석하는 방법이 있다.

본 연구에서는 경기도내 병원을 내원한 설사환자와 식중독 outbreak에서 분리된 *C. jejuni* 균주를 대상으로 *C. jejuni*에 특이적인 *hipO* 유전자, 중요 독력인자인 *cdtB* 유전자를 확인하였고, *gyrA* 유전자를 PCR과 sequencing 방법으로 확인하여 ciprofloxacin에 대한 내성과의 관련성도 연구하였다. 또한 *C. jejuni*의 heat-stable 항원을 이용해 혈청형을 분석하였다. 더불어 PFGE와 rep-PCR을 통해 분리된 *C. jejuni* 균의 유전형을 분

석하여 이들 사이에 유전적 상관성을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### *Campylobacter jejuni*의 분리 및 동정

2010년 경기도지역 병원(고대안산 병원, 동수원 병원, 성빈센트 병원, 분당차병원)을 내원한 설사환자 검체(급성설사 질환 실험실 감시사업)에서 분리된 10균주와 4건의 식중독 outbreak에서 분리된 32균주 등 전체 42균주를 연구에 사용하였다. *C. jejuni*의 분리를 위해 modified Charcoal Cefoperazone Desoxycholate Agar (Oxoid, UK) 평판배지에 검체를 도말한 후 Campygen (Oxoid)를 첨가하여 42°C에서 48시간 미호기 배양한 다음 원형 또는 불규칙한 형태의 회백색 집락을 순수 분리하였다. 분리된 집락은 *Campylobacter* triplex PCR kit (Kogene, Korea), catalase (BD, USA), API campy (bioMérieux, France)를 사용해 최종 동정하였다. 분리된 균주는 0.2% yeast extract, 20% glycerol, 5% FBS를 첨가한 Brain Heart Infusion (Oxoid) 배지에 넣어 -70°C deep freezer에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

### DNA 추출 및 *hipO*, *cdtB*, *gyrA* 유전자 검출

분리 동정된 *C. jejuni* 균을 혈액 한천 배지에 도말한 후 42°C에서 미호기성으로 48시간 배양하였다. 순수 배양한 집락을 200 µl 멸균 증류수에 부유시켜 100°C에서 10분간 끓인 다음 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 PCR 주형으로 사용하였다. *hipO*, *cdtB*, *gyrA* 유전자에 대한 primer 염기서열은 Table 1과 같으며, Bioneer (Korea)에 의해 합성되었다. 유전자의 PCR 반응은 추출한 주형 DNA 2 µl, forward와 reverse primer (20 pmole/µl) 각각 1 µl, PCR mastermix (Bioneer)를 사용하여 최종 20 µl가 되게 하였다. *hipO*와 *cdtB* 유전자의 PCR 조건은 94°C에서 5분간 pre-denaturation한 후 94°C에서 30초간 denaturation, 57°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 조건으로 30 cycle 반복한 다음 72°C에서 5분간 post-extension하였다. Mutated *gyrA*와 positive *gyrA* 유전자의 경우 94°C에서 3분간 pre-denaturation한 후 94°C에서 30초간 denaturation, 50°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 20초간 extension 조건으로 30 cycle 반복한 다음 72°C에서 5분간 post-extension하였다. PCR

**Table 2.** Rep-PCR condition

|                      | Rep-PCR protocol |
|----------------------|------------------|
| Initial denaturation | 94°C 2 min       |
| Repeat cycle:        | 35 cycles        |
| Denaturation         | 94°C 30 sec      |
| Annealing            | 50°C 30 sec      |
| Extension            | 70°C 90 sec      |
| Final extension      | 70°C 3 min       |

반응 후 생성물은 cyber green 염색시약이 포함된 2% agasose gel 상에서 전기 영동하여 결과를 확인하였다.

#### Genomic DNA 추출과 mutated *gyrA* 유전자 염기서열 분석

*C. jejuni* 균을 혈액 한천 배지에 도말한 후, 42°C에서 미호기 성으로 48시간 배양한 균의 genomic DNA를 QiAmp DNA mini kit (Qiagen, Germany)를 사용해 추출하였다. Ciprofloxacin 내성과 관련된 *gyrA* 유전자의 돌연변이 여부를 확인하기 위해 Table 1의 *gyrA* sequencing primer를 사용하여 염기서열 분석을 의뢰하였다(Solgent, Korea).

#### 항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 표준 디스크 확산법으로 실험하였다. 5% sheep blood를 포함한 Muller-Hinton agar (Oxoid)를 사용하였다. 혈액 배지에서 42°C, 48시간 동안 순수 배양한 균을 TSB (Oxoid)에 부유하여 MacFarland 0.5로 맞추고 배지에 고르게 도말하였다. 37°C에서 미호기 상태로 48시간 동안 배양 후 억제환의 크기를 측정하여 내성유무를 판독하였다. 정도 관리를 위하여 *E. coli* ATCC 25922 균주를 함께 실험하였다. 사용된 항생제 디스크는 Nalidixic acid (30 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Erythromycin (15 µg), Azithromycin (15 µg), Cephalothin (30 µg), Imipenem (10 µg), Chloramphenicol (30 µg), Tetracycline (30 µg)을 사용하였다 (Oxoid).

#### 혈청형 시험

*C. jejuni*에 대한 혈청형은 *Campylobacter antisera* (Denka seiken, Japan)를 사용하여 passive hemagglutination (PHA)법으로 실시하였다. 혈액 한천배지에서 42°C, 48시간 순수 분리한 *C. jejuni*의 heat-stable antigen을 제조사의 실험방법으로 추출하여 항원액을 준비하고 fixed chick red blood cells과 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응시켜 감작세포를 제조하였다. Microplate well (V bottom) plate에 각각의 항혈청 1방울씩 첨가하고, 각 well에 감작세포를 25 µl를 넣어 잘 혼합한 후 습윤상자에 넣어 30분간 반응시킨 후 응집유무를 판독하였다.

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

*C. jejuni*의 PFGE 분석은 표준화된 국가 실험실망인 PulseNet 방법으로 실험하였다. 순수 분리된 균을 면봉으로 문혀낸 다음, 2 ml의 cell suspension TE (100 mM Tris; pH 7.5 and 100 mM EDTA; pH 8.0)에 넣어 VITEK colorimeter (bioMérieux)를 사용하여 20%의 투명도로 현탁시켰다. 현탁액 200 µl를 1.5 ml tube

**Table 3.** Outbreak cases of food-borne gastroenteritis by *C. jejuni*

| Outbreak cases | Region      | No. of <i>C. jejuni</i> | Month |
|----------------|-------------|-------------------------|-------|
| EnterNet       | Gyeonggi-do | 10 (23.8%)              | 4-8   |
| Case 1         | Gimpo       | 12 (28.6%)              | 11    |
| Case 2         | Siheung     | 6 (14.3%)               | 7     |
| Case 3         | Suwon       | 2 (4.8%)                | 8     |
| Case 4         | Gwangmyeong | 12 (28.6%)              | 8     |

에 넣고 1.2% plug용 seakem gold agarose 200 µl를 넣어 가볍게 섞은 후 바로 plug mold에 넣어 굳혔다. 2 ml tube에 ES buffer (0.5 M EDTA; pH 8.0, 1% sodium-lauroyl-sarcosine)와 proteinase K (20 mg/ml) 40 µl가 첨가된 lysis solution 1.5 ml에 잘 굳은 plug를 넣고 55°C 진탕 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨다. Plug wash TE buffer (10 mM Tris; pH 7.5 and 1 mM EDTA; pH 8.0)를 밀폐된 용기나 PVC tube에 넣고 55°C 진탕 항온수조(150-175 rpm)에서 20분 동안 plug를 세척한다. 위의 과정을 5회 실시한 후 세척이 끝난 plug를 1 mm 두께로 잘라 40 U/µl *Sma*I 제한효소(Roche, USA)를 이용하여 37°C에서 2시간 30분 동안 반응시킨다. 제한효소를 처리한 plug gel을 전기영동 장치(CHEF DR3, Bio-Rad)를 사용해 initial time 6.76 sec, final time 38.35 sec, 전압 6 v/cm, 120°C, 18시간 동안 전기 영동하였다. 전기영동이 완료되면 cyber gold 염색시약(Invitrogen, USA)에 gel을 넣어 30분간 염색을 한다. 염색이 끝나면 증류수를 이용하여 1시간동안 탈색을 시킨 후 UV로 확인하였다. 확인된 사진은 Bionumerics 프로그램을 이용하여 분석하였다.

#### Repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR)

순수 배양한 *C. jejuni*의 genomic DNA를 MoBio Ultra clean Microbial DNA isolation kit (MoBio Laboratories, USA)를 사용하여 추출하였다. 추출한 DNA 2 µl, rep-PCR MM1 18 µl, GenAmp 10X PCR buffer 2.5 µl, primer mix 2.0 µl, ampliTaq DNA Polymerase 0.5 µl를 혼합해 rep-PCR (Campylobacter kit, bioMérieux)을 실시하였다. PCR 증폭은 validation된 personal thermal cycler (Biometra, Germany)로 수행되었고, PCR 반응 조건은 Table 2와 같다. 증폭된 PCR 산물을 micro-fluidic chips에 주입하여 전기영동한 후 Caliper Labchip Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)로 분석하였다. Diversilab Web interface software를 사용해 *C. jejuni*의 rep-PCR profiles을 98% cutoff로 하여 유전적 연관성을 확인하였다.

## 결과 및 고찰

#### 경기도내 *Campylobacter jejuni*의 분리 경향

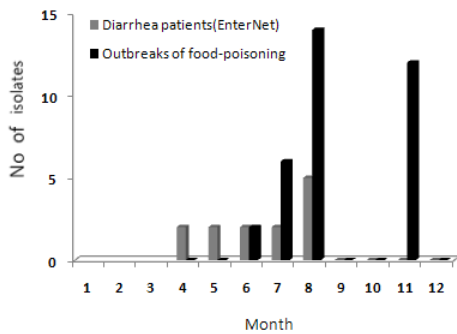
2010년 경기도내에서 분리된 *C. jejuni*의 균주는 총 42주로 도내 4개의 종합병원 설사환자(급성설사 질환 실험실 감시사업)를 대상으로 10균주, 4건의 식중독 outbreak를 통해 분리된 균주가 32균주였다(Table 3). mCCDA 선택배지상에서 원형 또는 불규칙한 형태의 회색 집락을 특징이 유전자 PCR, catalase 양성, API campy 실험을 통해 분리 동정하였다. 월별로 살펴보면 8월

**Table 4.** Frequency of drugs resistance in 42 *C. jejuni* isolated from patients with diarrhea

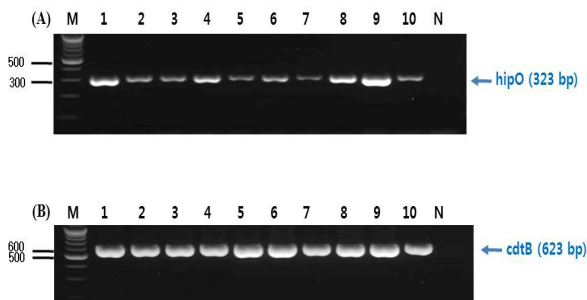
| Antimicrobial drugs | Conc. (µg/ml) | No. of resistance strains (N=42) |
|---------------------|---------------|----------------------------------|
| Nalidixic acid      | 30            | 40 (95.2%)                       |
| Ciprofloxacin       | 5             | 40 (95.2%)                       |
| Erythromycin        | 15            | 1 (2.4%)                         |
| Azithromycin        | 15            | 1 (2.4%)                         |
| Cephalothin         | 30            | 42 (100%)                        |
| Imipenem            | 10            | 1 (2.4%)                         |
| Chloramphenicol     | 30            | 0 (0.0%)                         |
| Tetracycline        | 30            | 29 (69%)                         |

에 가장 높은 분리율(40.4%)을 보였고 6-8월까지 66%가 분리되어 주로 여름철에 집중적으로 분리됨을 알 수 있었다. 또한 11월에도 11건의 *C. jejuni* 균이 분리되었는데, 급식으로 나온 삼계탕을 먹고 학교에서 집단으로 식중독이 발생한 case에서 모두 분리되었다(Fig. 1).

질병관리본부(CDC) 자료를 살펴보면 매년 *C. jejuni*의 분리율이 높아지고 있다. 실제 2007-2009년 평균치보다 2009년과 2010년에 분리율이 더 높게 나타나 식중독 원인균으로 *C. jejuni*가 점점 더 중요해지고 있다. 또한 6-8월 사이 온도가 높은 여름철에 분리율이 높았으며, 이는 서울지역(Lee *et al.*, 2002), 부산



**Fig. 1.** Prevalence of *C. jejuni* in stool sample from diarrhea patients by month.



**Fig. 2.** Electrophoresis of PCR products for the *hipO* (A) and *cdtB* gene (B). Lanes: 1 to 10, *C. jejuni*; M, size marker; N, negative control.

지역(Park *et al.*, 2007) 설사환자로부터 분리한 *C. jejuni*의 분리경향과 동일하였다. *C. jejuni*에 의한 식중독 발생시 원인 식품을 살펴보면 치킨, 삼계탕, 닭 육회 등 닭고기 음식이 대부분이었다. 국내에서 닭의 *C. jejuni* 균 분리율은 Kim 등이(2008) 52%로 보고하였고, 일반적으로 *C. jejuni*균의 보급률이 50-100%로 매우 높다고 알려진바, 덜 익히거나 오염된 닭고기가 이 균에 의한 감염원으로 매우 중요함을 알 수 있다. 따라서 이들 식품의 위생적 처리가 무엇보다 중요하다고 하겠다.

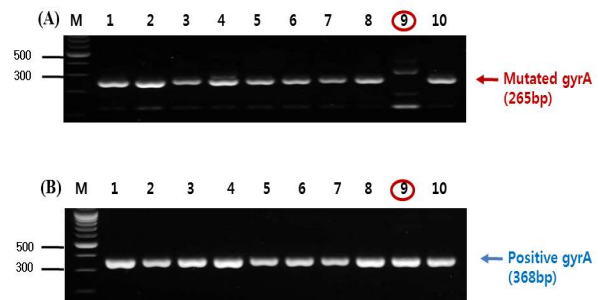
**설사환자에서 분리된 균주의 hipO, cdtB 유전자 검출**

분리된 42균주 모두가 선택 배지 상에서 전형적인 집락이었으며 생화학 테스트 결과 *C. jejuni*로 확인되었으나, *hipO* 종특이 유전자 검출 여부를 통해 최종적으로 확인, 동정하였다(Wang *et al.*, 2002). 또한 *C. jejuni*의 독성 여부를 확인하기 위해 세포를 비정상적으로 팽창시키는 CDT (cytolethal distending toxin)의 독소 유전자인 *cdtB*의 존재 여부를 PCR로 확인하였다. CDT는 1988년경 *Shigella*, *E. coli*, *C. jejuni*에서 처음으로 확인되었다(Johnson and Lior, 1988). 대부분의 미생물에서 CDT는 *cdtA* (30 kDa), *cdtB* (29 kDa), *cdtC* (21 kDa)로 구성되며 그 중 *cdtB* 유전자는 *C. jejuni*와 *C. coli* 모두에서 발견되었으나, CDT 활성은 *C. jejuni*에서만 나타난다고 하였다(Dassanayake *et al.*, 2005).

실험결과 설사질환 감시사업과 식중독 outbreak에서 분리한 42균주 모두에서 *C. jejuni*에 특이적인 *hipO* 유전자와 독소 유전자인 *cdtB*가 100% 검출되었다(Fig. 2 and Table 5).

**C. jejuni의 fluoroquinolone계 항생제 내성과 연관된 gyrA 유전자 돌연변이 검출 및 gyrA 유전자 염기서열 분석**

*C. jejuni*의 치료제로 쓰이는 fluoroquinolone계 항생제인 ciprofloxacin 내성은 Ruiz 등(1998)에 의하면 스페인 장염환자에서 분리한 *C. jejuni*의 경우 1990년 47.5%에서 1994년 88%로 두 배 가까이 증가하였고, 국내의 경우 Park 등(2007)은 2005년 환자 검체에서 분리한 균주에서 37%, Kim 등(2008)에 의하면 2007년 환자에서 분리한 균주 모두(100%)에서 내성을 보였다고 보고하였다. 이러한 *C. jejuni*의 ciprofloxacin에 대한 높은 내성율은 *gyrA* 유전자 변이 때문이라고 알려졌다(Zirnstein *et al.*, 1999).



**Fig. 3.** Electrophoresis of PCR products for the mutated *gyrA* gene (A) and wild-type *gyrA* gene (B). Lanes: 1 to 10, *C. jejuni*; M, size marker.

따라서 ciprofloxacin 내성과 관련 있는 *gyrA* 유전자의 돌연변이를 PCR로 확인하였다. 그 결과 42균주 중 40균주(95.2%)에서 *gyrA* 돌연변이 유전자가 검출되었다. 반면 positive *gyrA* 유전자는

42균주 모두에서 정상적으로 확인되었다(Fig. 3 and Table 5).

또한 ciprofloxacin에 내성을 나타내는 균주에서 *C. jejuni*의 QRDR (quinolone resistance determining region) 부위의 아미

**Table 5.** Biochemical and genetic characteristics of *C. jejuni* from patients with diarrhea

| Number of isolation | Outbreak cases | <i>hipO</i> gene | <i>cdtB</i> gene | mutated <i>gyrA</i> gene | GyrA QRDR DNA sequence | Susceptibility |               |
|---------------------|----------------|------------------|------------------|--------------------------|------------------------|----------------|---------------|
|                     |                |                  |                  |                          |                        | Nalidixic acid | Ciprofloxacin |
| 1                   | EnterNet       | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 2                   | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 3                   | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 4                   | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 5                   | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 6                   | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 7                   | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 8                   | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 9                   | "              | +                | +                | -                        | ACA                    | S              | S             |
| 10                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 11                  | case 1         | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 12                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 13                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 14                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 15                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 16                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 17                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 18                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 19                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 20                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 21                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 22                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 23                  | case 2         | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 24                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 25                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 26                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 27                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 28                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 29                  | case 3         | +                | +                | -                        | ACA                    | S              | S             |
| 30                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 31                  | case 4         | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 32                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 33                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 34                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 35                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 36                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 37                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 38                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 39                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 40                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 41                  | "              | +                | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |
| 42                  | "              |                  | +                | +                        | ATA                    | R              | R             |

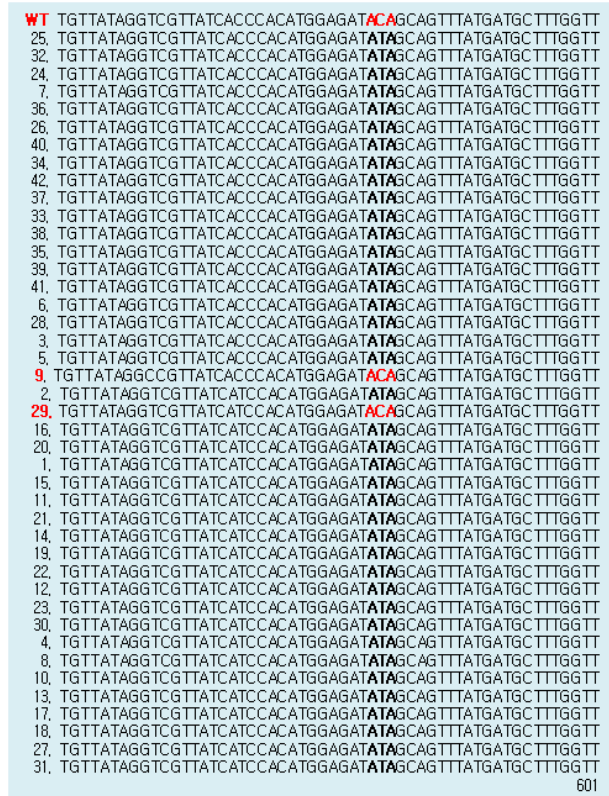
**Table 6.** Serotype distribution of *C. jejuni* isolates from diarrhea patients

| Serotype<br>(Penner's No)       | No. of strains<br>(N=42) |
|---------------------------------|--------------------------|
| HS2 (B)                         | 3 (7.1%)                 |
| HS3 (C)                         | 1 (2.4%)                 |
| HS4 (D) complex (4/13/16/43/50) | 5 (11.9%)                |
| HS19 (O)                        | 6 (14.3%)                |
| Untypable                       | 27 (64.3%)               |
| Total                           | 42 (100%)                |

노산 서열이 트레오닌에서 이소루신으로 변이 되어있다고 보고한(Zirnstein *et al.*, 1999) 바 PCR 결과 검출된 *gyrA* 유전자의 돌연변이 여부를 실제로 확인하기 위해 염기서열을 분석하였다. 그 결과 fluoroquinolone계 항생제인 ciprofloxacin 내성과 관련된 *C. jejuni*의 *gyrA* QRDR 단백질의 86번 아미노산 코돈 부위가 ACA (트레오닌)에서 ATA (이소루신)로 변이되어 있음을 확인하였다(Fig. 4). *gyrA* 돌연변이 PCR 결과와 마찬가지로 설사질환 감시사업 분리균주 9번과 수원시 식중독(case 3) 분리균주 29번만 wild type *C. jejuni*와 염기서열이 같았고, 나머지 40균주(95.2%)에서 돌연변이가 확인되었다(Fig. 4 and Table 5).

**항균제 감수성 특성**

도내 병원을 대상으로 하는 급성 설사질환 실험실 감시사업



**Fig. 4.** Comparison of *C. jejuni gyrA* QRDR DNA sequences. Sequence WT is a portion of the *gyrA* QRDR of *C. jejuni* UA580 (GenBank no. L04566).

과 식중독 outbreak에서 분리한 42균주의 *C. jejuni*에 대해 항균제 내성 정도를 확인하였다. *C. jejuni*의 치료제로 쓰이는 nalidixic acid, ciprofloxacin, erythromycin, azithromycin과 그밖에 cephalothin, imipenem, chloramphenicol, tetracycline 등 8종류의 항균제를 사용하여 디스크 확산법으로 실험하였다(Table 4).

Quinolone계 항생제인 nalidixic acid와 fluoroquinolone계 항생제인 ciprofloxacin의 경우 전체 42균주 중 40균주(95.2%)가 내성을 보였다(Table 4). 분리된 *C. jejuni* 대부분이 이들 항생제에 높은 내성을 보였고, 감수성을 나타내는 균주는 설사질환 감시 사업 분리 균주 9번과 수원시 식중독(case 3) 분리 균주 29번이었다(Table 5). 이 2균주는 *gyrA* 돌연변이 유전자 PCR 결과 돌연변이 유전자가 검출되지 않았고, *gyrA* DNA 염기서열 분석 결과 정상 유전자를 가진 균주와 일치하였다(Table 5).

따라서 *C. jejuni*의 *gyrA* 유전자가 ACA (트레오닌)에서 ATA (이소루신)로 돌연변이 되면 nalidixic acid와 ciprofloxacin 항균제에 내성을 보임을 알 수 있다. 이는 다른 그람 음성균과는 달리 nalidixic acid에 내성인 *C. jejuni* 균주의 경우 ciprofloxacin에 교차 내성을 보이기 때문이다(Gootz and Martin, 1991).

그러나 이외에 *C. jejuni*에 치료제로 쓰이는 macrolide계 항균제인 erythromycin, azithromycin에는 41균주(97.6%)가 감수성을 보였다(Table 4). 아직까지 erythromycin과 azithromycin이 치료제로 유효함을 알 수 있었으나, 내성균주가 1균주 발견되어 *C. jejuni* 감염 치료 시 이들 항균제에 대한 내성 여부도 확인이 필요할 것으로 생각된다. 이는 부산(Park *et al.*, 2007)과 전북 지역(Kim *et al.*, 2008)에서 분리된 *C. jejuni*의 경우 erythromycin에 대해 모두 감수성을 나타낸 것과는 다른 결과로 질병관리본부에 문의한 결과 우리나라에서 분리된 *C. jejuni*에서 드물게 erythromycin에 내성을 나타내는 균주가 발견된다(not published data)고 하였다.

그밖에 cephalothin에는 100%, tetracycline에는 69%가 내성인 반면 imipenem에는 97.6%, chloramphenicol에는 100% 감수성이었다(Table 4). 이는 우리나라 전북지역과 부산지역에서 분리된 *C. jejuni* 항생제 내성 특징처럼 cephalothin과 tetracycline (51.9%~93%)에는 높은 내성을, imipenem과 chloramphenicol에는 높은 감수성을 보이는 결과와 비슷하다(Park *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008).

**혈청형 분포**

분리된 *C. jejuni* 균주의 heat-stable (HS) antigen을 추출한 다음 PHA법으로 실험한 결과 42균주 중 15균주(37.5%)에서 4종의 혈청형이 확인되었으며 그 분포는 Table 6과 같다. 확인된 혈청형은 HS2(B), HS3(C), HS4(D), HS19(O)형이며, 이 중 가장 많이 분포된 혈청형은 HS19(O)형으로 14.3%였다. 그러나 전체 42균주 중 27균주(64.3%)에서는 혈청형이 확인되지 않았는데, 혈청형 실험에 사용된 *Campylobacter antisera* (Denka Seiken) 이외에 혈청형이 존재할 수 있으며 PHA법의 감도상 문제일 수도 있어 좀 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

우리나라의 경우 Park 등(2007)에 의하면 부산지역 설사환자에서 분리한 *C. jejuni*에서 HS1/44(A), HS2(B), HS4(D),

HS19(O), HS21(P)형이 분리된다고 보고하였고, 40.7%에서는 혈청형을 확인할 수 없다고 보고하였다. 또한 전라북도지역 설사환자에서 분리된 균주의 경우 HS4(D)가 가장 많이 분리되었고, 그 다음은 HS2(B)형이 검출되었으며 47.5%는 혈청형을 확인할 수 없다고 보고하는 등 위의 방법으로 혈청형을 확인할 수 없는 경우가 많았다(Choi et al., 2008). Takahashi 등(2005)은 일본의 경우 Guillain-Barre syndrome 환자에서 주로 HS19(O)형이 분리된다고 보고하였다. *C. jejuni*의 혈청형은 분리지역에 따라 다양한 종류가 보고되고 있으나, 본 연구에서 분리된 균주의 경우 기존에 우리나라에서 보고되는 혈청형 분석 결과와 유사하였다.

**PFGE (pulsed-field gel electrophoresis)에 의한 *C. jejuni* 유전형 분석**

전체 분리된 42균주의 *C. jejuni* DNA를 *Sma*I 제한효소로 처리한 후 PFGE 실험법으로 유전형을 분석한 결과 12개의 cluster로 분류되었다(Fig. 5). 설사질환 감시사업을 통해 분리된 10균주는 전체 6개의 cluster로 분류되어 다양한 유전형을 가진 균이 발견되었다. 4개의 식중독 outbreak에서 분리된 균주의 유전형을 살펴보면 김포시 식중독(case 1)에서 분리된 12균주는 cluster 5로 모두 같은 유전형이었고, 시흥시 식중독(case 2)에서 분리된 6균주는 cluster 1, 8, 12로 3가지 다른 유전형이 확인되었다.

또한 수원시 식중독(case 3)은 2균주가 각각 다른 유전형(cluster 10, 11)을 가지고 있었고, 광명시 식중독(case 4)은 cluster 3, 9로 2가지 유전형을 가진 균이 확인되었다. 즉 두 가지 이상의 유전형을 가진 *C. jejuni*에 의해 식중독이 발생하였음을 알 수 있다.

**Rep-PCR (repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction)에 의한 *C. jejuni*의 유전형 분석**

분리된 *C. jejuni* 42균주의 유전형을 rep-PCR을 통해 확인해 보았다. Rep-PCR은 증폭된 product의 size와 density 둘 다 고려하므로 98% 이상 유사도가 있을 때 같은 유전형을 가진 균으로 판단하였는데, 그 결과 11개의 cluster로 분류되었다(Fig. 6).

김포시 식중독(case 1)의 경우 PFGE 결과와 마찬가지로 분리된 12균주가 모두 동일한 유전형(cluster 10)으로 확인되었고, 광명시 식중독(case 4)의 경우도 분리된 12균주가 cluster 7, 9의 두 가지의 유전형으로 확인되었다. 그에 반해 시흥시(case 2)와 수원시(case 3) 식중독의 경우는 PFGE와는 다르게 각각 2가지(cluster 1, 4)와 1가지(cluster 1)로 확인되었다. 즉 rep-PCR을 통한 *C. jejuni*의 유전형 분석은 PFGE와 완전히 일치하지 않았으며 차이점이 있음이 기존의 보고처럼 확인되었다(Wilson et al., 2009). 그러나 rep-PCR 역시 분리된 균주의 유전형을 확인하고 이들의 유전적 연관성을 살펴보면 유용하며, scatterplot 형태를 통해서도 연관성을 한눈에 확인할 수 있는 장점이 있다.

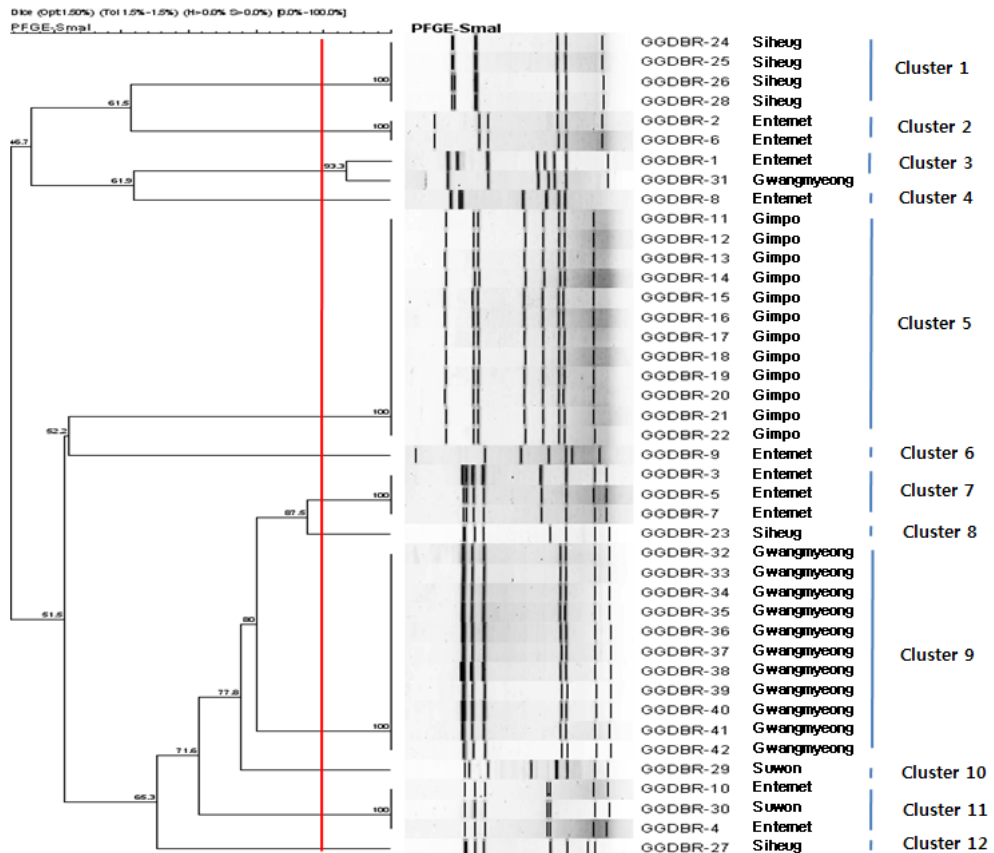


Fig. 5. UPGMA dendrogram of *Sma*I PFGE patterns from 42 *C. jejuni* isolates from diarrhea patients.

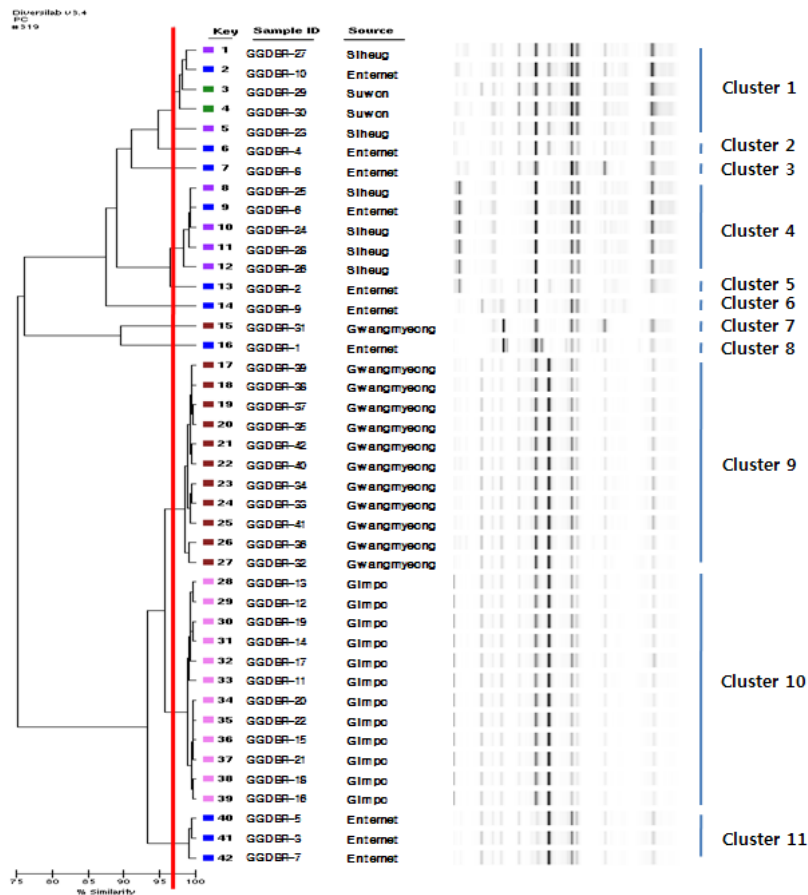


Fig. 6. Rep-PCR result of 42 *C. jejuni* isolates from diarrhea patients.

적요

*Campylobacter jejuni*는 사람에서 매우 중요한 식중독 원인균의 하나이며, 2010년 경기도내 병원을 내원한 설사 환자와 4번의 식중독 outbreak에서 42균주를 분리하였다. 본 연구에서는 분리된 *C. jejuni* 42균주의 유전적 특성과 혈청형, 항균제 내성을 분석하였다. *hipO* 종특이 유전자(100%), *cdtB* 독소 유전자(100%)가 검출되었고, *gyrA* 돌연변이 유전자(95.2%)가 PCR 실험결과 검출되었다. *gyrA* 돌연변이 유전자는 ciprofloxacin 내성과 연관이 깊으며, 디스크 확산법에 의해 실험한 결과 *gyrA* 돌연변이 유전자가 검출된 40균주(95.2%)에서 실제 ciprofloxacin에 대해 내성을 보였다. 분리된 42균주 *C. jejuni*에 대한 *gyrA* 유전자의 염기서열을 분석한 결과 ciprofloxacin에 내성을 가진 40균주에서 아미노산 서열이 ACA (트레오닌)에서 ATA (이소루신)으로 돌연변이 되어있음을 확인하였다. 하지만 대체 치료제인 erythromycin과 azithromycin에 대해서는 97.6% (41균주) 감수성을 보였다. 또한 *C. jejuni*의 혈청형을 분석한 결과 4가지 타입으로 분류되었는데, HS2(B), HS3(C), HS4(D), HS19(O)로 확인되었다. 도내에서 분리한 *C. jejuni* 42균주의 유전형용 rep-PCR과 PFGE로 확인한 결과 PFGE에 의해서는 12 cluster, rep-PCR에 의해서는 11 cluster의 유전형으로 구분되었다.

참고문헌

Aarestrup, F.M. and Wegener, H.C. 1999. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes Infect.* 1, 639-644.

Altekruse, S.F., Stern, N.J., Fields, P.I., and Swerdlow, D.L. 1999. *Campylobacter jejuni*-an emerging foodborne pathogen. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 28-35.

Charvalos, E., Peteinaki, E., Spyridaki, I., Manetas, S., and Tselentis, Y. 1996. Detection of ciprofloxacin resistance mutations in *Campylobacter jejuni gyrA* by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism and direct DNA sequencing. *J. Clin. Lab. Anal.* 10, 129-133.

Choi, K.M., Lee, J.H., Park, Y.K., Kim, N.R., Soo, H.A., Jang, Y.M., Kim, C.H., Na, S.E., Lim, S.C., and Park, M.Y. 2008. Genomic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from poultry, bovine and human in Jeonbuk province. The report of Jeollabukdo institute of Health & Environment Research, 99-119.

Dassanayake, R.P., Zhou, Y., Hinkley, S., Stryker, C.J., Plache, G., Borda, J.T., Sestak, K., and Duhamel, G.E. 2005. Characterization of cytolethal distending toxin of *Campylobacter* species isolated from captive macaque monkeys. *J. Clin. Microbiol.* 43, 641-649.

Endtz, H.P., Ruijs, G.J., van Klingeren, B., Jansen, W.H., van der Reyden,



- T., and Mouton, R.P. 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J. Antimicrob. Chemother.* **27**, 199–208.
- Gaunt, P.N. and Piddock, L.J. 1996. Ciprofloxacin resistant *Campylobacter* spp. in humans: an epidemiological and laboratory study. *J. Antimicrob. Chemother.* **37**, 747–757.
- Gootz, T.D. and Martin, B.A. 1991. Characterization of high-level quinolone resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 840–845.
- Johnson, W.M. and Lior, H. 1988. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb. Pathog.* **4**, 115–126.
- Kim, J.M., Hong, J., Bae, W., Koo, H.C., Kim, S.H., and Park, Y.H. 2010. Prevalence, antibiograms, and transferable tet(O) plasmid of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from raw chicken, pork, and human clinical cases in Korea. *J. Food Prot.* **73**, 1430–1437.
- Kim, S.M., Kim, E.C., Choi, M.R., So, H.A., Shim, E.S., Kim, E.S., Park, S.C., Seong, C.N., and Chong, Y. 2008. Cytolethal distending toxin production, genotypes and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolates from diarrhea patients and chickens. *J. Bacteriol. Virol.* **38**, 207–219.
- Lee, J.K., Kim, K.Y., Koo, M.S., Yong, D.E., and Kim, E.C. 2002. Detection of *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR and patterns of pulsed-field gel electrophoresis. *Kor. J. Clin. Microbiol.* **5**, 35–41.
- Lindmark, B., Rompikuntal, P.K., Vaitkevicius, K., Song, T., Mizunoe, Y., Uhlin, B.E., Guerry, P., and Wai, S.N. 2009. Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiol.* **9**, 220.
- Park, E.H., Kim, J.A., Choi, S.H., Bin, J.H., Cheigh, H.S., Suk, D.H., Lee, S.C., and Kim, Y.H. 2007. Isolation and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter Jejuni* from diarrhea patients. *J. Life Sci.* **17**, 811–815.
- Piddock, L.J. 1995. Quinolone resistance and *Campylobacter* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **36**, 891–898.
- Purdy, D., Buswell, C.M., Hodgson, A.E., McAlpine, K., Henderson, I., and Leach, S.A. 2000. Characterisation of cytolethal distending toxin (CDT) mutants of *Campylobacter jejuni*. *J. Med. Microbiol.* **49**, 473–479.
- Ruiz, J., Goni, P., Marco, F., Gallardo, F., Mirelis, B., Jimenez De Anta, T., and Vila, J. 1998. Increased resistance to quinolones *Campylobacter jejuni*: a genetic analysis of *gyrA* gene mutations in quinolone-resistant clinical isolates. *Microbiol. Immunol.* **42**, 223–226.
- Sanchez, R., Fernandez-Baca, V., Daz, M.D., Muoz, P., Rodriguez-Crixems, M., and Bouza, E. 1994. Evolution of susceptibilities of *Campylobacter* spp. to quinolones and macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1879–1882.
- Takahashi, M., Koga, M., Yokoyama, K., and Yuki, N. 2005. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barre and Fisher syndromes in Japan. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 335–339.
- Talukder, K.A., Aslam, M., Islam, Z., Azmi, L.J., Dutta, D.K., Hossain, S., Nur, E.K.A., Nair, G.B., Cravioto, A., and Sack, D.A. 2008. Prevalence of virulence genes and cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* isolates from diarrheal patients in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 1485–1488.
- Vanhoof, R., Vanderlinden, M.P., Dierickx, R., Lauwers, S., Yourassowsky, E., and Butzler, J.P. 1978. Susceptibility of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* to twenty nine antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**, 553–556.
- Walder, M. 1979. Susceptibility of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* to twenty antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 37–39.
- Wang, G., Clark, C.G., Taylor, T.M., Pucknell, C., Barton, C., Price, L., Woodward, D.L., and Rodgers, F.G. 2002. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis*, and *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 4744–4747.
- Wilson, M.K., Lane, A.B., Law, B.F., Miller, W.G., Joens, L.A., Konkell, M.E., and White, B.A. 2009. Analysis of the pan genome of *Campylobacter jejuni* isolates recovered from poultry by pulsed-field gel electrophoresis, multilocus sequence typing (MLST), and repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR) reveals different discriminatory capabilities. *Microb. Ecol.* **58**, 843–855.
- Zaman, R. 1992. *Campylobacter enteritis* in Saudi Arabia. *Epidemiol. Infect.* **108**, 51–58.
- Zhao, C., Ge, B., De Villena, J., Sudler, R., Yeh, E., Zhao, S., White, D.G., Wagner, D., and Meng, J. 2001. Prevalence of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, and *Salmonella serovars* in retail chicken, turkey, pork, and beef from the Greater Washington, D.C., area. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5431–5436.
- Zirnstien, G., Li, Y., Swaminathan, B., and Angulo, F. 1999. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 3276–3280.