

최근 5년 동안 국내에서 분리된 *Shigella sonnei*의 항균제 내성 유형과 내성유전자형 분석

허완 · 이상조 · 권기석¹ · 장종욱¹ · 이종복^{1,*}

경상북도 보건환경연구원, ¹안동대학교 자원환경학전공

2000-2004년 국내에서 분리된 *S. sonnei* 135주를 선별하여 16종의 항균제 내성 유형, *bla*_{TEM}, *sulII*, *tetA*, *strA* 등의 내성유전자형을 PCR 등의 방법으로 항생제내성 표현형과 유전자형의 유연관계를 파악하였다. 균주들의 생화학적 성상은 전형적인 이질성 세균의 특성을 나타내었으며, biotyping에서는 g type이 58.5% (79주), a type이 40.0% (54주), e type이 1.5% (2주)로 나타났다. 항균제 16종의 항균제 내성 패턴은 AN, CIP, C, GM 등의 약제에는 감수성을 보였으나, SXT 약제에는 95.6% (129주), TE 약제에는 93.3% (126주), SM에는 90.4% (122주) 등의 순으로 내성을 나타내었다. 두 가지 이상 약제 내성균이 97.8% (132주), 그 중에서 R28 (AM, SAM, TE, TIC, SXT, K, SM, AmC : 8제 약제 내성) 형이 31.1% (42주)를 차지하였으며, 33가지 형태의 다양한 내성 패턴을 나타내었다. *bla*_{TEM}, *sulII*, *tetA* 및 *strA* 등의 내성유전자 분포에서는 Disk diffusion법에서 내성을 보인 경우에는 모두 각각의 유전자 증폭산물이 검출되었다.

Key words □ antibiotic resistance gene, antibiotic resistance pattern, *Shigella sonnei*

세균성 이질은 *Shigella* spp.에 의해 경구로 감염되는 제 1군 법정 전염병의 원인균이다. 그람음성 간균으로 편모가 없으므로 운동성이 없고, 통성 혐기성 균이며 포자를 형성하지 않는다(25). 이 균의 전파경로로 물과 식품을 매개로 하거나, 대인 접촉을 통해 감염이 가능하고, 10^2 - 10^3 정도의 적은 양으로 감염된다(19). 24-48 시간 정도의 잠복기를 거치며, 치료하지 않을 경우 성인은 평균 7일간 증상이 지속되고, 대변으로부터 30일간 균 배출이 지속된다. 항균제에 내성율이 높고, 전파력이 강하여 2차 이환율이 30-50%로 높아서 역학적으로 질병관리가 어려운 전염병이다(20, 38). *Shigella dysenteriae*는 Shiga (41)에 의해 최초로 보고되었고, lipopolysaccharide (LPS)의 항원성에 따라서 *S. flexneri* (serogroup B), *S. boydii* (serogroup C)와 *S. sonnei* (serogroup D)가 보고되었다. 이들은 다시 혈청형에 따라 *S. dysenteriae*는 12개, *S. flexneri*는 8개, *S. boydii*는 18개로 나누어지며, *S. sonnei*는 1개의 혈청군으로 되어있다(14). *S. dysenteriae*에 감염되었을 때 가장 중증이고, *S. sonnei*에 감염된 경우에는 증상이 경미하여 건강한 성인은 자연 치유가 가능하지만 영·유아에게는 치명적일 수 있다(35). 항균제가 널리 사용됨에 따라 약제에 내성을 갖는 이질균이 나타나기 시작하였으며, chloramphenicol (CM), ampicillin (AM), streptomycin (SM), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), tetracycline (TE) 등의 다제 내성을 갖는 이질균이 많이 분리되고 있다(4, 16). *Shigella* 속의 병원성은 매우 복잡하면서도 가장 혼란 과정이 결장의 상피세포에 정착하고 침입하는 형태로 나타

나 상피세포와 점막하 조직에서 생존, 증식하여 결장의 상피세포 괴사, 장 염증 등과 관련된 enterotoxin, cytotoxin 등의 독소인자가 관련되어 있다(21, 24, 31, 40, 42, 44). 국내에서는 1930-1940년대에 *S. dysenteriae*가 대다수였던 것에 비해 1980년대까지는 *S. flexneri*에 의한 환자 발생 사례가 주종을 이루었고, 1991년 이후부터 *S. sonnei*가 세균성 이질의 주요 원인균으로 바뀌어 지고 있는데 이것은 역학적으로 주목할 만한 일이다(2, 28). 1992년 이후 세균성이질 환자 발생은 감소 추세를 보이다가 1998년 전국적으로 906명이 발생하였고, 1999년 1,781명, 2000년에도 유행이 계속되어 2,462명이 발생하였다. 특히 2000년 5월에서 8월까지 제주에서 853명이 발생하여 단일 지역으로서는 최대의 집단 유행을 보였고, 2003년에는 1,117명의 환자가 산발 또는 집단적으로 발생하였다(5). 최근의 발생 유형은 학교급식의 위생적 관리와 공중보건의 개선에도 불구하고 유행이 계속되고 있어, 질병유행 원인 규명과 적절한 방역대책 수립을 위해서는 분자 역학적 분석을 통하여 그들의 특성을 면밀히 검토할 필요성이 요구된다(32).

따라서 본 연구는 2000-2004년까지 이들 집단 환자 발생지역 및 동일한 시기에 국내에서 수집된 *S. sonnei* 분리균주를 선별하여 병원체의 특성 파악과 각종 항균제에 대한 내성 패턴, 내성유전자의 분포 등에 대한 연구를 실시하여, 분리균주의 유전형 특성과 균주간의 상호간의 유연관계를 비교하고, 집단 발생 상호간의 연계성과 전염병 관리와 식중독 발생 예방에 기여하고자 본 연구를 수행하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-54-820-6062, Fax: 82-54-820-6252
E-mail: bio91@andong.ac.kr

Table 1. Synthetic oligonucleotide used in this study

Target gene		DNA sequence of primer (5' → 3')	Location within gene	PCR product (bp)	Accession no. & Reference
<i>bla</i> _{TEM}	F	gca cga gtg ggt tac atc ga	118-137	310	DQ221255 Hu <i>et al.</i> , 2005
	R	ggg cct ccg atc gtt gtc ag	409-428		
<i>suII</i>	F	caa gcc tat gcc ttg tgc cgt	6053-6073	247	AF497970 Kwak <i>et al.</i> , 2002
	R	tca agg aca agg cgg ttg cgt	6280-6300		
<i>strA</i>	F	ctt ggt gat aac ggc aat tc	6892-6911	547	AF497970 Kwak <i>et al.</i> , 2002
	R	cca atc gca gat aga agg c	7421-7439		
<i>tetA</i>	F	tgc tgt cga cta cgc cat cat	1308-1328	672	AF502943 Hartman <i>et al.</i> , 2003
	R	cat gat cgg gaa cgc cat cca	1970-1980		

F : Forward, R : Reverse

재료 및 방법

시험균주

시험에 사용된 균주는 2000년부터 2004년까지 보건환경연구원과 질병관리본부와의 항생제(16종) 내성검사 결과 내성빈도가 높은 유전자를 표적으로 국내에서 분리된 *S. sonnei* 중에서 제주 63주, 경남·부산 23주, 전남·전북 17주, 경기·서울 17주 등 총 135주를 질병관리본부로부터 분양받아 시험 대상균주로 선정하였다. 대조균주로서 *S. dysenteriae* ATCC 9391, *S. flexneri* ATCC 9403, *S. boydii* ATCC 9905, *S. sonnei* ATCC 9290 및 *S. sonnei* CDC F2356 (PFGE standard marker strain) 균주는 질병관리본부로부터 분양받아 사용하였다.

생화학 및 생물학적 특성 조사

모든 균주는 MacConkey Agar 배지에서 35°C 18-24시간 동안 배양시킨 후, 유당 비분해성인 무색의 colony를 선택하여 KIA 사면배지에 접종하고 35°C에서 18-24시간 배양하였다. KIA 사면배지의 성상이 *Shigella*로 의심되는 균을 선별하여 *Shigella* O 항혈청으로 Slide 응집반응을 실시하여 혈청형을 확인 한 후, 순수 분리된 집락을 취하여 API 20E kit (Bio Merieux Co., USA)를 사용하여 37°C에서 48시간 동안 배양한 후 API analytical profile index의 동정용 software를 이용하여 동정하였다(18). Biotyping은 Nastasi 등(1993)의 방법에 따라 Ortho-Nitro-Phenyl-Galactoside (ONPG) 시험, rhamnose 및 xylose의 발효 유무에 따라서 생물형을 분류하였다.

항균제 감수성 시험

항균제 감수성 시험은 NCCLS의 디스크 확산법에 준하여 시험하였다(25). Ampicillin (AM), amikacin (AN), ampicillin/sulbactam (SAM), cephalothin (CF), ciprofloxacin (CIP), chloramphenicol (C), gentamicin (GM), nalidixic acid (NA), tetracycline (TE), ticarcillin (TIC), sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT) cefoxitin (FOX), ceftriaxone (CRO), kanamycin (K), streptomycin (SM), amoxicillin/clavulanic acid (AMC) 등 16종류의 항균제 디스크(BBL, USA)를 사용하여, 35°C에서 16-18시간 배양 후 균

Table 2. Biochemical characteristics of *S. sonnei* isolated in Korea (2000~2004).

Test or substrate	<i>S. sonnei</i> (n=135)	
	Sign*	%
Hydrogen sulfide	-	0
Indole	-	0
Methy red	+	100
Voges-proskauer	-	0
Citrate simmon's	-	0
KCN	-	0
Motility	-	0
Lysine decarboxylase	-	0
Arginine dihydrolase	-	0
Ornithine decarboxylase	+	100
Urease	-	0
Malonate	-	0
Phenylalanine diamine	-	0
Gelatin hydrolyase	+	0
Gas form glucose	+	100
ONPG	+	100
Acid form glucose	+	100
lactose	-	0
sucrose	-	0
mannitol	+	100
dulcitol	-	0
inositol	-	0
sorbitol	-	0
rhamnose	-	1.5
melibiose	-	15.6
arabinose	+	100
raffinose	-	0

+ : positive, - : negative

억제대(inhibition zone)의 크기를 측정하여 감수성 여부를 판정하였다. 대조균주로서 *E. coli* ATCC 25922를 이용하여 항균제 역가를 확인하였고, 시험조건 및 판독 결과는 NCCLS (2004) 방법에 따랐다.

항균제 내성유전자 (*bla*_{TEM}, *suII*, *tetA*, *strA*) 검색

분리된 균주 중 TEM type의 β -lactamase 및 tetracycline, streptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim에 내성을 나타낸 균주를 대상으로 *bla*_{TEM}, *suII*, *tetA* 및 *strA* 유전자를 동시에 검출하기 위하여 multiplex PCR을 이용하였다. 이들 유전자의 염기서열은 Table 1과 같으며, primer는 Genotech Co. (Daejeon Korea)에 합성 의뢰하였다. 시험균의 DNA를 추출하기 위하여 TSB에 12시간 배양 후 배양액을 원심분리(10,000 rpm, 10분) 하였다. 균체를 증류수에 현탁하여 약 10^9 CFU ($OD_{595} = 0.6$) 되도록 조정하여 95°C에서 10분간 가열하고, 10,000 rpm, 10분간 원심분리하여 상층액을 template DNA로 이용하였다. PCR 반응조건은 Premixture (1 U *Taq* DNA polymerase, 250 μ M dNTP mixture, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, Bioneer Co. Chungwon, Korea) 10 μ L, primer pair 각 1.0 μ L (20 pmol/ μ L, Table 3)에 template DNA 5 μ L를 넣어 살균증류수로 최종용량을 20 μ L로 조정하였다. 94°C에서 3분 동안 예비 가열한 후, 94°C에서 45초 변성, 56°C에서 1분 재결합, 72°C에서 1분 신장, 30 회 증폭하였다. 증폭산물의 결과를 확인하기 위하여 5 μ L의 증폭산물과 DNA molecular weight marker (100 bp ladder, Bioneer Co. Chungwon, Korea)를 1.5%

Table 3. Biotypes of *S. sonnei* isolated in Korea (2000-2004)

Biotypes	ONPG	Rhamnose	Xylose	No. of strains (%) (n=135)
a	+	+	-	54 (40.0)
d	-	+	+	0
e	+	+	+	2 (1.5)
f	-	-	-	0
g	+	-	-	79 (58.5)

agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide (EtBr) 용액으로 염색하여 확인하였다.

결 과

생화학 및 생물학적 특성 조사

생화학적 특성은 Table 2와 같다. MacConkey Agar에서는 무색의 집락으로서 KIA 사면배지에서는 K/A, H_2S 를 생성하지 않았고, indole, methyl red, voges-proskauer, simmon's citrate (IMViC test) test에서는 -, +, -, - 반응을 나타내었으며, lysine decarboxylase 음성, arginine dihydrolase 음성, ornithine decarboxylase 양성반응을 보였다. urease 음성반응을 보이는 등 전형적인 *S. sonnei* 성상을 나타내었다. 당 이용능 시험에서는 glucose, mannitol, arabinose는 양성을 lactose, sucrose, dulcitol, inositol, sorbitol, raffinose 등에는 음성반응을 나타내었다.

Table 4. Distribution of antimicrobial agents resistance rates (%) of *S. sonnei* isolates in 2000-2004

Antimicrobial agents (μg)		2000 (n=73)		2001 (n=12)		2002 (n=20)		2003 (n=24)		2004 (n=6)		Total (n=135)	
AM	10	74.0	(54)	75.0	(9)	30.0	(6)	75.0	(18)	33.2	(2)	65.9	(89)
AN	30	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
SAM	10/10	61.6	(45)	75.0	(9)	15.0	(3)	0	(0)	0	(0)	42.2	(57)
CF	30	4.1	(3)	0	(0)	23.3	(7)	50.0	(12)	16.7	(1)	17.0	(23)
CIP	5	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
C	30	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
GM	10	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
NA	30	19.2	(14)	33.3	(4)	100	(20)	4.2	(1)	33.3	(2)	30.4	(41)
TE	30	97.3	(71)	91.7	(11)	90.0	(18)	83.3	(20)	100	(6)	93.3	(126)
TIC	75	75.3	(55)	50.0	(6)	15.0	(3)	70.8	(17)	33.3	(2)	61.5	(83)
SXT	23.75/1.25	98.6	(72)	100	(12)	90.0	(18)	91.7	(22)	83.3	(5)	95.6	(129)
CRO	30	0	(0)	8.3	(1)	10.0	(2)	0	(0)	0	(0)	2.2	(3)
FOX	30	0	(0)	8.3	(1)	10.0	(2)	0	(0)	0	(0)	2.2	(3)
K	30	69.9	(51)	66.7	(8)	5.0	(1)	70.8	(17)	33.3	(2)	58.5	(79)
SM	10	87.7	(64)	83.3	(10)	95.0	(19)	95.8	(23)	100	(6)	90.4	(122)
AmC	20/10	65.8	(48)	58.3	(7)	15.0	(3)	8.3	(2)	0	(0)	44.4	(60)

AM : Ampicillin, AN : Amikacin, SAM : Ampicillin/Sulbactam, CF : Cephalothin, CIP : Ciprofloxacin, C : Chloramphenicol, GM : Gentamicin, NA : Nalidixic acid, TE : Tetracycline, TIC : Ticarcillin SXT : Sulfamethoxazole/ Trimethoprim, CRO : Ceftriaxone, FOX : Cefoxitin, K : Kanamycin, SM : Streptomycin, AmC : Amoxicillin/ Clavulanic acid

Table 5. Distribution of antimicrobial agents resistance pattern of *S. sonnei* isolates in 2000-2004

	No. of agents Resistance	Drug resistance pattern	No. of strains isolated in					No. of isolates
			2000	2001	2002	2003	2004	
1	R 1	SM	1			2		3
2	R 2	NA, SM			1			1
	R 3	TE, SM					1	1
	R 4	TE, SXT	1					1
3	R 5	AM, TE, SXT				1		1
	R 6	TE, SXT, SM	7			2	1	10
	R 7	NA, TE, SXT		2				2
	R 8	CF, SXT, SM				1		1
4	R 9	NA, TE, SXT, SM	8	1	11	1	1	22
	R10	AM, TE, TIC, SXT	1					1
5	R11	CF, NA, TE, SXT, SM	1		2		1	4
	R12	AM, NA, TE, SXT, SM			1			1
6	R13	NA, TE, TIC, SXT, K, SM	1					1
	R14	AM, TE, TIC, SXT, K, SM	1			6	2	9
	R15	AM, CF, NA, TE, SXT, SM			1			1
	R16	AM, SAM, TE, SXT, K, SM,		2				2
	R17	AM, TE, TIC, SXT, K, AmC	2					2
	R18	AM, NA, TE, TIC, SXT, SM,	2					2
7	R19	AM, CF, TE, TIC, SXT, K, SM				9		9
	R20	AM, NA, TE, TIC, SXT, K, SM	2					2
	R21	AM, CF, TIC, SXT, K, SM, AmC				1		1
	R22	SAM, TE, TIC, SXT, K, SM, AmC	1					1
	R23	AM, CF, NA, TE, TIC, SXT, AmC			1			1
	R24	AM, SAM, TE, TIC, SXT, K, AmC	4					4
	R25	AM, SAM, TIC, SXT, K, SM, AmC	1	1				2
	R26	AM, SAM, TE, TIC, SXT, SM, AmC	1					1
8	R27	AM, CF, TE, TIC, SXT, K, SM, AmC	1			1		2
	R28	AM, SAM, TE, TIC, SXT, K, SM, AmC	37	5				42
	R29	AM, SAM, CF, NA, CRO, FOX, SM, AmC			1			1
9	R30	AM, SAM, CF, NA, TE, TIC, SXT, K, SM			1			1
	R31	AM, SAM, CF, TE, TIC, SXT, K, SM, AmC	1					1
10	R32	AM, SAM, CF, NA, TE, SXT, CRO, FOX, SM, AmC		1				1
11	R33	AM, SAM, CF, NA, TE, TIC, SXT, CRO, FOX, SM, AmC			1			1
Total number of isolates			72	12	20	24	6	135

AM : Ampicillin, SAM : Ampicillin/Sulbactam, CF : Cephalothin, CIP : Ciprofloxacin, GM : Gentamicin, NA : Nalidixic acid, TE : Tetracycline, TIC : Ticarcillin SXT : Sulfamethoxazole/Trimethoprim, CRO : Ceftriaxone, FOX : Cefoxitin, K : Kanamycin, SM : Streptomycin, AmC : Amoxicillin/ Clavulanic acid

Biotyping 결과 135주의 *S. sonnei*의 중 g type이 79주 (58.5%), a type이 54주 (40.0%), e type이 2주 (1.5%) 이었다(Table 3).

항균제 내성균의 분포

135주에 대한 각 항균제 내성분석 결과는 Table 4와 같다. 내

성 획득률이 가장 높았던 약제는 SXT 약제로 129주(95.6%)가 내성을 보였고, TE에는 126주(93.3%), SM 약제에는 122주 (90.4%) 순으로 높은 내성을 나타내었다. AM 약제에는 89주 (65.9%), TIC, K 약제에는 각각 83주(61.5%) 79주(58.5%)로 나타나 각각의 약제에 따라서는 많은 차이를 보였다. 반면, AN

CIP, C, GM 등의 약제에는 분리주 모두에서 감수성을 보였다. CRO, FOX 약제에 대해서는 각각 3주(2.2%)가 내성을 보여 낮은 내성률을 나타내었다.

항균제 내성 유형

내성 유형에 있어서는 Table 5에서 보는 바와 같이 모두 33개의 내성 유형을 나타내었다. 1제 내성균은 3주(2.2%)이고, 2제 이상의 다제 내성균이 132주(97.8%)로 대부분을 차지하였다. 가

장 분리 빈도가 높은 유형은 R28 (AM, SAM, TE, TIC, SXT, K, SM, AmC : 8제 약제 내성)형이 31.1% (42/135주)를 차지하였다. R9 (NA, TE, SXT, SM : 4제 약제 내성)형이 22주 (16.3%), R6 (TE, SXT, SM : 3제 약제 내성)형이 10주(7.4%), R19 (AM, CF, TE, TIC, SXT, K, SM : 7제 약제 내성) 및 R9 (AM, TE, SXT, SM : 4제 약제 내성)형이 각각 9주(6.3%)로 나타났다. 그 외의 낮은 빈도로 다양한 내성 유형을 나타내었다. 연도별로는 2000년에는 R28형이 50.7% (37/73주)가 집중적으로

Table 6. Antimicrobial resistance and PCR product patterns of *S. sonnei*

Strain no.	Date	Region Isolated		Drug resistance pattern				PCR amplicon		
19	2000	JJ	R01				SM	<i>suII</i> , <i>strA</i>		
102	2002	GN	R02				SM, NA	<i>suII</i> , <i>strA</i>		
135	2004	S	R03		TE		SM	<i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
30	2000	JJ	R04		TE, SXT,			<i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
129	2003	DG	R05	AM,	TE, SXT,			<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
46	2000	GG	R06		TE, SXT,	SM		<i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
84	2001	O	R07		TE, SXT,		NA	<i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
111	2003	O	R08		SXT,	SM, CF		<i>suII</i> , <i>strA</i>		
87	2002	S	R09		TE, SXT,	SM, NA		<i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
28	2000	GN	R10	AM,	TE, SXT,		TIC	<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
101	2002	DG	R11		TE, SXT,	SM, CF, NA		<i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
93	2002	O	R12	AM,	TE, SXT,	SM, NA		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
1	2000	GG	R13		TE, SXT,	SM NA, TIC, K		<i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
106	2003	GN	R14	AM,	TE, SXT,	SM, TIC, K		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
95	2002	O	R15	AM,	TE, SXT,	SM, CF, NA		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
63	2001	JJ	R16	AM,	TE, SXT,	SM, SAM, K		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
27	2000	JJ	R17	AM,	TE, SXT,		TIC K, AmC	<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
40	2000	JN	R18	AM,	TE, SXT,	SM, NA, TIC		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
107	2003	GN	R19	AM,	TE, SXT,	SM, CF, TIC, K		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
60	2000	JN	R20	AM,	TE, SXT,	SM, NA, TIC, K		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
125	2003	GB	R21	AM,	SXT,	SM, CF, TIC, K, AmC		<i>bla</i> _{TEM} , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
38	2000	JJ	R22		TE, SXT,	SM, SAM, TIC, K, AmC		<i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
104	2002	GN	R23	AM,	TE, SXT,		CF, NA, TIC, AmC	<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
14	2000	JJ	R24	AM,	TE, SXT,		SAM, TIC, K, AmC	<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
80	2001	JJ	R25	AM,	SXT,	SM, SAM, TIC, K, AmC		<i>bla</i> _{TEM} , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
33	2000	JJ	R26	AM,	TE, SXT,	SM, SAM, TIC, AmC		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
9	2000	JJ	R27	AM,	TE, SXT,	SM, CF, TIC, K, AmC		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
22	2000	JJ	R28	AM,	TE, SXT,	SM, SAM, TIC, K, AmC		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
97	2002	GN	R29	AM,		SM, SAM, CF, NA, CRO, FOX, AmC		<i>bla</i> _{TEM} , <i>strA</i>		
90	2000	JJ	R30	AM,	TE, SXT,	SM, SAM, CF, NA, TIC, K,		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
8	2000	BS	R31	AM,	TE, SXT,	SM, SAM, CF, TIC, K, AmC		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
82	2001	GN	R32	AM,	TE, SXT,	SM, SAM, CF, NA, CRO, FOX, AmC		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		
105	2002	GN	R33	AM,	TE, SXT,	SM, SAM, CF, NA, TIC, CRO, FOX, AmC		<i>bla</i> _{TEM} , <i>tetA</i> , <i>suII</i> , <i>strA</i>		

JJ : Jeju, JN : Jeonnam, JB : Jeonbuk, GN : Gyeongnam, BS : Busan, GB : Gyeongbuk, DG : Deagu, GG : Gyeonggi, S : Seoul, IC : Incheon, CB : Chungbuk, CN : Chungnam, O : the others

분리되었고, 2002년에는 R9형이 55.0% (11/20주)이었고, 2003년에는 R19형이 39.1% (9/23주)로서 가장 많이 분리되었다.

항균제 내성유전자(*bla*_{TEM}, *sul*II, *tet*A 및 *str*A) 분포

분리된 균주 중 Disk diffusion 법에서 각각 다른 약제에 내성 패턴을 보인 R1-R33형에 대하여 TEM type의 β -lactamase, sulfamethoxazole/trimethoprim, tetracycline 및 streptomycin의 내성유전자를 보유 유무를 검색하기 위해, *bla*_{TEM}, *sul*II, *tet*A 및 *str*A 유전자에 시험한 결과는 Fig. 1과 같이 조사되어졌다. 이들 균주들 중에서 Disk diffusion 법에서 내성을 보인 경우에는 각각의 약제에 *bla*_{TEM}, *sul*II, *tet*A 및 *str*A 유전자의 증폭산물이 모두 검출되었다. 또한 Disk diffusion법에서 streptomycin 약제에 내성을 보이지 않는 R4, R5, R7, R13형에서도 *str*A 유전자의 증폭산물이 검출되었으며 sulfamethoxazole/trimethoprim 약제에 내성을 보이지 않는 R1, R3, R10 형에서도 *sul*II 유전자의 증폭산물이 검출되었다.

고 찰

Shigella 속에 의한 감염은 생활수준이 향상됨에도 불구하고 지구온난화 등의 기상이변과 무역 증가 등으로 인한 사람과 식품의 이동영역의 확대로 집단 발생의 형태로 계속 일어나고 있다(5). 우리나라의 경우 법정 전염병 1군으로 중시되고 있으며, 계절에 관계없이 연중 발생하여 풍토병화되는 경향을 보이고 있다(3). 특히 세균성 이질로 인한 사망자 수는 세계적으로 110만 명 정도로 추정되는데 그 중 2/3가 5세 이하의 소아이다(39). 원인 병원체인 *Shigella* 속은 과거에는 주로 여름철에 많이 발생하였으나 최근에는 기후와 계절에 관계없이 연중 고루 발생하는 경향이 있다(11). 최근 구미 및 아시아 지역에서 *S. sonnei*에 의

한 식중독 발생이 증가하는 경향을 나타내며 세균성이질의 86%가 *S. sonnei*, 12%가 *S. flexneri* 균으로 나타났다(12, 25). 국내에서도 1995년도 이후로 학교 집단급식이 실시된 후로 *Shigella* spp.에 의한 대규모의 설사 증상을 나타내는 집단 환자가 발생하고 있다(8, 9, 22). *S. sonnei* 균들을 정확히 진단하고, 분리되는 균주의 생화학적 및 혈청학적인 변이를 면밀히 관찰하는 것은 이 균의 신속한 진단 동정과 변이주의 동정 유무에 매우 중요하다(34). 특히 *S. sonnei* 균은 다른 혈청형의 *Shigella* 균종과는 달리 한가지 혈청형만 존재하므로 장내세균에서 전통적으로 널리 사용되어오는 혈청형별 분류가 불가능하여 불완전하나마 집단발병 또는 산발적 발생에서 분리된 균주의 역학조사를 위하여 개별 균주의 생물형도 많이 이용되고 있다(45). 본 연구에서는 실험한 135주의 *S. sonnei* 경우 생화학적인 특징은 lysine decarboxylase 음성, arginine dihydrolase 음성, ornithine decarboxylase 양성반응 및 urease 음성반응을 보이는 등 전형적인 *S. sonnei* 성상을 보였다. 생물형 분석에서 g type이 58.5% (79주)이었고, a type이 40.0% (54주)로 나타났는데, 이러한 결과는 손 등(7)의 1998년 경북지역에서 분리균에서 a, g type이 각각 93.3%와 6.7% 정도 나타났던 결과와는 상이한 경향을 보였으나, Bogaerts 등(15)의 1983년부터 1993년까지 Rwanda의 Kigali에서 분리된 *S. sonnei* 262주 중에서 49%에서 biotype a와 50%에서 biotype g로 나타났다는 보고와 유사한 경향을 보였다. 이러한 고전적인 감별 방법은 짧은 기간 내에 동일지역이나 다른 지역에서 유행에서 분리된 균 간의 역학적 연관관계 규명에는 유용하나, 장기간에 있어 지역적으로 관련성이 없는 곳에서의 분리된 균 간의 유연관계 분석에는 한계가 있을 것으로 사료된다. *Shigella* 속에 의한 감염은 항균제 치료가 필요한 급성 설사질환의 하나이지만 다른 균들에 비하여 내성율이 높다. 1940년대 초에 penicillin이 임상

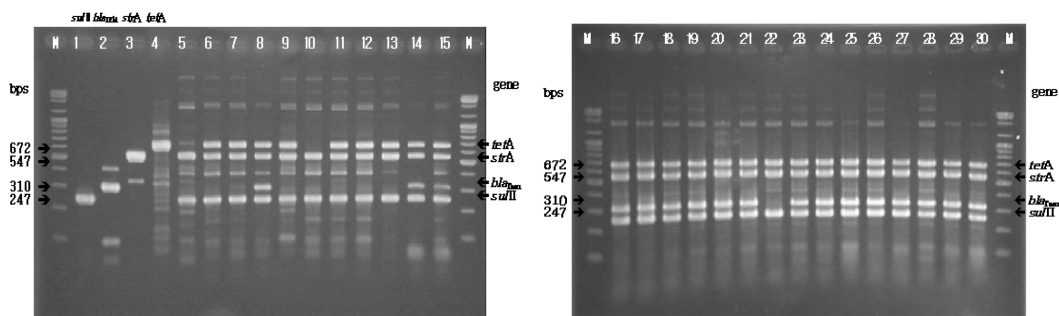


Fig. 1. Multiplex-PCR assay detects the *bla*_{TEM}, *tet*A, *sul*II and *str*A gene of *S. sonnei* strains were isolated in Korea. Lane M : 100 bps DNA ladder, lane 1 : the products for detection of the gene *sul*II gene (247 bps), lane 2 : the products for detection of the *bla*_{TEM} gene (310 bps), lane 3 : the products for detection of the *str*A gene (547 bps), lane 4 : the products for detection of the *tet*A gene (672 bps) are shown. lane 5 : antimicrobial drugs resistance pattern of R1 (JJ 19; 2000-1106), lane 6 : R3 (S 135; 2004-13537), lane 7 : R4 (JJ 30; 2000-1671), lane 8 : R5 (DG 129; 2003-2739), lane 9 : R6 (GG 46; 2000-2839), lane 10 : R8 (O 111; 2003-444), lane 11 : R9 (S 87; 2002-151), lane 12 : R11 (DG 101; 2002-1117), lane 13 : R13 (GG 01; 2000-214), lane 14 : R14 (GN 106; 2003-145), lane 15 : R15 (O 95; 2002-743). lane 16 : Antimicrobial drugs resistance pattern of R15 (O 95; 2002-743), lane 17 : R16 (JJ 63; 2000-4680), lane 18 : R17 (JJ 27; 2000-1520), lane 19 : R18 (JN 40; 2000-2125), lane 20 : R19 (GN 107; 2003-160), lane 21 : R20 (JN 60; 2000-4301), lane 22 : R22 (JJ 38; 2000-2007), lane 23 : R23 (GN 104; 2002-1584), lane 24 : R26 (JJ 33; 2000-1807), lane 25 : R27 (JJ 9; 2000-699), lane 26 : R28 (JJ 22; 2000-1253), lane 27 : R30 (JJ 90; 2002-255), lane 28 : R31 (BS 8; 2000-646), lane 29 : R32 (GN 82; 2001-2849), lane 30 : R33 (GN 105; 2002-1586)

cephalosporin 제제, 12종의 tetracycline, 10여종의 aminoglycoside, 3종의 monobactam, 3종의 carbapenem, 9종의 macrolide, 2종의 glycopeptides, 2종의 streptogramin 등 실로 많은 종류의 항균제가 개발되어 감염성 질환의 치료에 획기적인 전환점이 되었다. 그러나 항균제 사용의 남용과 오용에 의해 내성균이 출현함으로써 감염성 질환으로 또 다시 위협을 받고 있고, 개발도상국에서는 중요한 문제가 되고 있다(36). 특히, 우리나라에서는 의사의 지시나 내성패턴에 대한 조사 없이 자가 치료를 하거나 항균제를 남용하므로서 비전형적인 증상이나 이상경과가 많아 조기진단과 적절한 치료가 지연되고 그 결과 내성균의 출현과 증가를 초래하였다(10). 이들 균들은 다른 장내 감염균들 보다 항균제 내성율이 높고, 다제내성 문제 뿐만 아니라 다양한 형태의 복합 내성균의 출현이 빈번하여 항균제를 오용하거나 남용하는 개발도상국에서는 중요한 문제가 되고 있다(26). 또한 이러한 항균제 내성균의 출현은 또 다른 형태나 계열의 복합항균제 내성균의 출현을 예고하는 것이기도 하다(43). 병원균의 항균제에 대한 내성은 항균제의 사용 빈도를 반영하므로 분리된 균의 지역적, 시기적 차이를 나타내기도 한다(6, 33). 본 연구에서 사용된 균주의 항균제 내성의 특징은 SXT 약제에 대하여 95.6%의 내성을 보여, 내성율이 가장 높았고, TE 약제에는 93.3%, SM 약제에는 90.4% 순으로 내성을 보였다. 이러한 결과는 Jeong 등(27)의 1980년부터 2000년까지 20년간 국내에서 분리된 *S. sonnei*에 대한 항균제 내성 검사 결과 SXT 약제에 대하여 94-100%의 내성을 보였다는 결과와 거의 동일한 결과를 나타내었다. 연도별로는 CF 약제의 경우에는 2000년 4.1%, 2002년 23.3%, 2003년 50.0%로서 약제 내성율이 점차 증가하는 경향을 보였으나, SAM 및 AmC 약제의 경우에는 점차적으로 감소하는 경향을 보였다. NA 약제의 경우에는 2000년 19.2%, 2001년 33.3%, 2002년 100%, 2003년 4.2%로서 큰 변화를 보였다. 각종 항균제에 내성을 나타내는 분리 주에 대한 내성유전자 보유 실태에서는 Disk diffusion 법에서 AM, SXT, TE, SM 등의 약제에 내성을 보이는 균주는 모두 *Bla_{TEM}*, *strA*, *tetA* 및 *sulII* 등의 각각의 유전자 증폭산물이 검출되었고, SXT 및 SM 약제에 내성을 보이지 않는 경우에도 *strA* 및 *sulII* 등의 유전자 증폭산물이 검출되었다(Table 6). 항균제 내성균이 증가하는 것은 특정한 균주에서 내성 plasmid의 전달 또는 다양한 균주를 통한 다양한 plasmid의 전달의 결과라 할 수 있으며, 그러한 결과를 균주가 항균제에 내성을 갖게 되는 것은 그 항균제의 작용부위를 변화시키거나, 항균제의 불활성화, 세포내 침입억제, 효소치환 등이 있다. *Shigella* spp.는 염색체외에도 2-10개의 다양한 plasmid를 가지고 있으며, 이들의 작은 plasmids는 항균제 내성인자 등의 기능과 관련된 유전인자를 지니고 있다(29). 이들은 배양과정에서 소실되거나 유전자 첨가나 결실 등을 통해 변화가 일어나기도 하며, 특히, 임상치료를 목적으로 사용하는 항균제의 남용으로 장관내의 정상 상재균 일부가 내성유전자를 획득하고, 이들 다약제 내성인자 발현은 conjugative plasmid 즉, 비염색체성 유전물질인 resistant plasmid (R-factor)와 연관되어 conjugation을 통하여 이루어지기도 하며(17), transposon 등에 의하여 전이되기도 한다. 이들 내성 균주

를 근본적으로 해결하기 위해서는 R-plasmid에 의한 약제내성 발생기전의 유전학적, 분자생물학적 규명이 지속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 김순천, 김개환, 박형철, 전두영. 1992. 한국에서 세균성 이질 발병에 대한 보고. 한국역학회지 14, 184-190.
2. 김정순. 1991. 역학각론-전염병 139-142.
3. 김호훈, 이명원, 이영희, 김기상, 유천권, 정태화, 김동찬. 1990. 한국에서 분리된 *Shigella* 군속에 대한 역학적 특성 및 추이 (1981~1990). 국립보건원보 27, 85-91.
4. 박현수. 1990. 환자 가검물에서 분리한 *Shigella flexneri*의 약제내성 및 내성인자. 전남대학교. 학위논문(박사).
5. 질병관리본부. 1960 - 2004. 전염병통계 (전염병정보망).
6. 설성용, 신행섭, 조동택. 1995. Trimethoprim내성 *Shigella*의 분자역학적 분석. 대한미생물학회지 30, 611-625.
7. 손창규, 허완, 이도영, 임시규, 이제욱, 김병천, 박완. 1999. 1998년 경상북도지역에서 분리된 *Shigella flexneri*의 세균학적특성. 한국역학회지 21, 227-233.
8. 이복권, 강연호, 김성한, 전정훈, 김호훈. 1999. 1998년 분리된 이질균의 역학적 특성. 제7회 기초의학학술대회 발표 17-18.
9. 이광호, 차창룡, 석종성. 1982. 이질균의 항생제내성과 균 간 전달. 서울의대학술지 23, 292-298.
10. 전도기. 1970. 이질균의 종류 및 우리나라에서 발생 빈도. 대한의학회지 13, 704.
11. 전정훈, 김성한, 김준영, 강연호, 이복권. 2001. 국내에서 분리된 *Shigella sonnei* 균에 대한 PFGE를 이용한 molecular typing. 국립보건원보 38, 5-17.
12. 조명준. 1970. 임상병리과에서 분리한 병원성균의 항생제에 관한 감수성 연구. 한일병원임상지 1, 91.
13. Alexander, W.A., A.B. Hartman, E.V. Oaks, and M.M. Venkatesan. 1996. Construction and characterization of *virG* (*icsA*)-deleted *Escherichia coli* K12-*Shigella flexneri* hybrid vaccine strain. Vaccine 14, 1053-1061.
14. Bernard, R. and J.G. Roger. 1984. *Shigella castellanii* and *chalmers*: *Bergey's manual systematic bacteriology*. vol.1. Williams & Wilkins. 423-427.
15. Bogaerts, J., J. Verhaegen, J.P. Munyabikali, B. Mukantabana, P. Lwmmens, J. Vandeven, and J. Vandepitte. 1997. Antimicrobial resistance and serotypes of *Shigella* isolates in Kigali, Rwanda (1983 to 1993): increasing frequency of multiple resistance. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 165-171.
16. Choi, K.S., W.K. Jung, S.H. Lee, and D.T. Cho. 1989. Molecular epidemiology of *Shigella* R plasmids. *J. Korean Soc. Microbiol.* 24, 36-42.
17. Davies, J.E. and R. Rownd. 1972. Transmissible multiple drug resistance in *enterobacteriaceae*. *Science* 1, 758-768.
18. David, R.B. and R.W. Castenhol. 2001. *Bergey's manual systematic bacteriology*. Springer. press 2nd ed. New York.
19. DuPont, H.L., M.M. Levine, R.B. Hornick, and S.B. Formal. 1989. Inoculum size in Shigellosis and implications for expected mode of transmission. *J. Infect. Dis.* 159, 1126-1128.
20. Falkow, S. 1998. The evolution of pathogenicity in *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Second Edition ASM Press. 2723-2729.
21. Frankel, G, L. Riley, J.A. Giron, J. Valmassoi, A. Friedmann, N.

- Strockbine, S. Falkow, and G.K. Schoolnik. 1990. Detection of *Shigella* in feces using DNA amplification. *J. Infect. Dis.* 161, 1252-1256.
22. Gueraant, R.L., L.J. Strausbaugh, R.P. Wenzel, B.H. Harmony, and M.H. Sande, 1977. Nosocomial blood stream infections caused by gentamycin-resistant gram negative bacilli. *Am. J. Med.* 62, 894-901.
 23. Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Bio.* 166, 557-580.
 24. Hartman, A.B., M. Venkatesan, E.V. Oaks, and J.M. Buysse. 1990. Sequence and molecular characterization of a multicopy invasion plasmid antigen H, *ipaH* of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.* 172, 1905-1915.
 25. Holt, J.G., N.R. Kreig, H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. 187-188. The Williams & Wilkins co. Baltimore.
 26. Hossain, A. 1994. Effect of antibiotics on serum bactericidal action on *Plesiomonas shigelloides* by normal human serum. *Bangladesh Med. Res. Counc. Bull.* 20, 117-122.
 27. Jeong, Y.S., J.C. Lee, H.Y. Kang, H.S. Yu, E.Y. Lee, C.H. Choi, S.H. Tae, Y.C. Lee, D.T. Cho, and S.Y. Seol. 2000. Epidemiology of nalidixic acid resistance and TEM-1- and TEM-52-mediated ampicillin resistance of *Shigella sonnei* isolates obtained in Korea between 1980 and 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3719-3723.
 28. Kim, H.H., M.W. Lee, Y.H. Shin, Y.H. Kang, C.K. Yoo, M.S. Kim, Y.M. Ha, and K. Pyeom. 1995. Epidemiological characteristics and trend of *Shigella* spp. isolated in Korea (1991-1995). *The report of National Institute of Health* 32, 33-41.
 29. Litwin, C.M., R.B. Leonard, K.C. Carrol, W.K. Drummond, and A.T. Pavia. 1997. Characterization of endemic strains of *shigella sonnei* by use of plasmid DNA analysis and pulsed-field gel electrophoresis to patterns of transmission. *J. Infect. Dis.* 175, 864-870.
 30. Livermore, D.M. 1995. β -Lactamase in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557-584.
 31. Maurelli, A.T., B. Blackmon, and R. Curtiss III. 1984. Temperature- dependent expression of virulence gene *Shigella* species. *Infect. Immun.* 43, 195-201.
 32. Matusmoto, M., Y. Suzuki, M. Saito, N. Ishikawa, and M. Ohta. 1998. Epidemiologic study *Shigella sonnei* from sequential outbreak and sporadic cases using different typing techniques. *Microbiol. Immunol.* 42, 259-264.
 33. McGowan, Jr. J.E. 1983. Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use. *Rev. Infect. Dis.* 5, 1033-1048.
 34. Nastasi, A., S. Pignato, C. Mammina, and G.M. Gimmanco. 1993. rRNA gene restriction pattern and biotype of *Shigella sonnei*. *Epidemiol. Infection* 70, 23-30.
 35. Navia, M.M., J. Ruzi, A. Ribera, M.T. Anta, and J. Vila. 1999. Analysis of the mechanisms of quinolone resistance in clinical isolates of *Citrobacter freundii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 44, 743-748.
 36. Navia, M.M., L. Capitano, J. Ruiz, M. Vargas, H. Urassa, D. Schellemborg, J. Gascon, and J. Vila. 1999. Typing and characterization of mechanisms of resistance of *Shigella* spp. isolated from feces of children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3113-3117.
 37. NCCLS. 2004. MIC testing supplemental tables. M100-S10 (M7). *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, Villanova, Pa, USA
 38. Sansonetti, P.J., D.J. Kopecko, and S.B. Formal. 1981. *Shigella sonnei* plasmids ; evidence that a large plasmid is necessary for virulence. *Infect. Immun.* 34, 75-83.
 39. Sack, D.A., AT. Hoque, A. Huq, and M. Etheridge. 1994. Is protection against Shigellosis induced by natural infection with *Plesiomonas shigelloides* *Lancet* 343, 1413-1415.
 40. Schuch, R. and A.T. Maurelli. 1997. Virulence plasmid instability in *Shigella flexneri* 2a is induced by virulence gene expression. *Infect. Immun.* 65, 3686-3692.
 41. Shiga, K. 1898. Ueber den Dysenterebacillus (*Bacillus dysenteriae*). *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektinskr. Hyg. Abt. I Orig.* 24, 817-828.
 42. Sethabutr, O., M. Venkatesan, S. Yam, L.W. Pang, B.L. Smoak, W.K. Sang, P. Echeverria, D.N. Taylor, and D.W. Isenbarger. 2000. Detection of PCR products of the *ipaH* gene from *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by enzyme linked immunosorbent assay. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 11-16.
 43. Tauxe, R.R., D. Puh, J.G. Wells, N. Hargrette-Bean, and B.A. Black. 1990. Antimicrobial resistance of *Shigella* isolates in the USA: the importance of international travelers. *J. Infect. Dis.* 162, 1107-1111.
 44. Venkatesan, M.M., J.M. Buysse, and D.J. Kopecko. 1989. Use of *Shigella flexneri ipaC* and *ipaH* gene sequences for the general identification of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 7, 2687-2691.
 45. Wolfgang, K.J., P.W. Hilda, A.C. Bernard, and M.W. Zinsser. 1988. *Microbiology* 9th ed. 473-475.

(Received January 18, 2007/Accepted March 15, 2007)

ABSTRACT : Antimicrobial Resistance Patterns and Resistance genes assay of *Shigella sonnei* Isolated in Korea for Five Years

Wan Huh, Sang-Jo Lee, Gi-Seok Kwon¹, Jong-Ok Jang¹ and Jung-Bok Lee^{1,*} (Gyeong Sang Buk-Do Institute of Health and Environment, Daegu 702-702, Korea, ¹School of Biore-source Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea)

This study has been carried out for investigating the relatedness of representative 135 *Shigella sonnei* strains isolated from 2000 to 2004 by using biotyping and antimicrobial resistance. All strains showed typical biochemical characteristics of *Shigella* strain. Among 135 strains, 79 (58.5%) strains were biotype “g”, 54 (40.0%) strains were biotype “a” and 2 (1.5%) strains were biotype “e”. The results of susceptibility test against 16 antimicrobial agents were like this. Most of strains were susceptible to AN, CIP, C and GM. 129 (95.6%) strains were resistant to SXT, 126 (93.3%) strains were resistant to TE and 122 (90.4%) strains were resistant to SM. One hundred thirty two (97.8%) strains were resistant to more than two antimicrobial agents. R28 type (antimicrobial resistance patterns 28: resistant to AM, SAM, TE, TIC, SXT, K, SM and AmC) were 42 strains (31.1%). The other strains were showed 33 kinds of R patterns. The results of *bla*_{TEM}, *suII*, *tetA* and *strA* gene detection were coincided with phenotype of antimicrobial resistance by disk diffusion method. But some strains which had *suII* and *strA* genes were not showed the resistance against SXT and SM.