

< Original Article >

닭 도축장에서 분리한 nalidixic acid 내성 *Salmonella* 균의 *gyrA* 유전자 돌연변이

조재근^{1*} · 손규희² · 김경희¹ · 김정미¹ · 박대현¹ · 이정우¹
대구광역시보건환경연구원¹, 경북대학교 수의과대학²

Mutation in *gyrA* gene of nalidixic acid-resistant *Salmonella* isolates isolated from poultry slaughterhouse

Jae-Keun Cho^{1*}, Kyu-Hee Son², Kyung-Hee Kim¹, Jeong-Mi Kim¹, Dae-Hyun Park¹, Jung-Woo Lee¹

¹Metropolitan Health & Environmental Research Institute, Daegu 42183, Korea
²College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

(Received 9 September 2019; revised 18 September 2019; accepted 19 September 2019)

Abstract

The objective of this study was to identify mutations in the quinolone resistance determining region (QRDR) of the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes, and the presence of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes: *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-lb-cr* and *qepA* in 40 nalidixic acid-resistant (NA^R) *Salmonella* isolates isolated from poultry slaughterhouse. The MIC of NA and ciprofloxacin for 40 NA^R *Salmonella* isolates was 128~512 µg/mL and <0.125~0.25 µg/mL, respectively. The *Salmonella* isolates were resistant to NA (100%), gentamicin (5.0%) and ampicillin (2.5%). All NA^R *Salmonella* isolates represented point mutation in codons Aspartic acid(Asp)-87 (90%) and Serine(Ser)-83 (10%) of QRDR of *gyrA* gene: Asp87→glycine, Ser83→tyrosine. No mutations were observed in QRDR of the *gyrB*, *parC* and *parE* gene. Moreover PMQR genes was not found in any of the tested isolates. Our findings showed that DNA gyrase is the primary target of quinolone resistance and a single mutation in codon Asp87 and Ser83 of the *gyrA* gene can confer resistance to NA and reduced susceptibility ciprofloxacin in *Salmonella* isolates.

Key words : *Salmonella*, *gyrA*, Nalidixic acid, Ciprofloxacin, PMQR

서 론

*Salmonella*속 균은 사람과 동물에 감염되어 장염, 패혈증, 유산, 폐렴 등의 증상을 일으키며 식중독의 중요한 원인균으로 공중보건학적으로 매우 중요시 되고 있다(Timoney 등, 1988). Quinolone계 항생제는 1962년 nalidixic acid (NA)의 형태로 처음 임상에 도입된 이후 요로감염증 치료에 사용되었다(Wolfson와 Hooper, 1989). 이후 약효가 개선된 fluoroquinolone은 광범위 합성 항균제로 사람과 동물의 질병 치료뿐 아니라 식용동물

의 성장촉진제로 널리 사용되어 왔으나 이들 약제의 과도한 사용은 quinolone 내성과 fluoroquinolone에 감수성이 감소된 *Salmonella* 균의 출현을 증가시켰다(Stevenson 등, 2007; Tamang 등, 2011).

Salmonella 균에서 quinolone계 항생제 내성은 이 약제의 표적부위인 DNA gyrase (*gyrA*와 *gyrB*)와 DNA topoisomerase IV (*parC*와 *parE*) 유전자의 일부인 퀴놀론 내성 결정부위(QRDR)의 점 돌연변이, 세포막 단백질인 porin의 구조변화 또는 능동적 약물 유출펌프에 기인하는 것으로 알려져 있다(Piddock, 2002). 특히 DNA gyrase의 돌연변이는 QRDR이라고 불리는 아미노산 67번과 106번 사이에서 주로 일어나며 이중 codon 83

*Corresponding author: Jae-Keun Cho, Tel. +82-53-760-1300, Fax. +82-53-760-1302, E-mail. salmonella00@korea.kr

변(Ser83)과 codon 87번(Asp87)에서의 변이가 가장 많이 관찰되고 있다(Eaves 등, 2004; Giraud 등, 2006). 최근 plasmid 상에 존재하는 내성 유전자(PMQR)에 의한 내성 기전이 *Salmonella*에서 알려지고 있다. PMQR 유전자로는 *qnr* 그룹에 속하는 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* 등과 항생제의 변형에 관여하는 *aac(6')-lb-cr* 및 능동적 약물 유출펌프 유전자인 *qepA* 등이 알려져 있다(Sjölund-Karlsson 등, 2010; Rodríguez-Martínez 등, 2011; Ferrari 등, 2013). 최근까지 국내 닭에서 분리된 *Salmonella* 균에서 quinolone계 항생제의 내성에 관한 연구는 주로 사람에서 분리된 세균을 대상으로 이루어졌을 뿐 가축으로부터 분리된 세균을 대상으로 한 연구는 드물다(Bae 등, 2013a; Kim 등, 2013).

이 연구는 닭 도축장에서 분리된 NA에 내성을 보인 *Salmonella* 균을 대상으로 항생제 내성, *gyrA*, *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자의 QRDR에서 돌연변이 양상과 PMQR 유전자인 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-lb-c* 및 *qepA* 유전의 분포상황을 알아보기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

Salmonella 균의 분리 및 동정

2017년 4월부터 2018년 4월까지 대구시 관내 닭 도축장으로 출하한 닭을 대상으로 농장 당 20개씩 총 48개 농장에서 960개의 맹장시료 채취하여 실험에 공시하였다. 우선 *Salmonella* 균의 분리를 위해 맹장 내용물 1 g을 BPW에 첨가하여 37°C 24시간 배양한 후 배양액 100 µL을 tetrathionate broth (Merck, Germany) 넣고 다시 37°C 24시간 배양하였다. 배양액은 20 µg/mL novobiocin (Merck, Germany)이 첨가된 BPLS agar (Merck, Germany)와 Xylose lysine desoxychocolate agar (Merck, Germany)에 도말한 후 37°C에서 20~24시간 배양하였다. 의심되는 집락에 대해서는 PCR을 이용한 *invA* 유전자의 존재 유무로 *Salmonella* 균을 확인하였다(Rahn 등, 1992).

항생제 감수성 시험

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013)의 기준에 따라 nalidixic acid (NA)와 ciprofloxacin (CIP)에 대한 최소발육억제농도(MIC)는 평판희석법으로, ampicillin (10 µg), amoxicillin-clavulanic acid

(20/10 µg), cefazolin (30 µg), cefoxitin (30 µg), cefixime (5 µg), cefepime (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), gentamicin (10 µg), tetracycline (30 µg), levofloxacin (5 µg), moxifloxacin (30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg) 및 chloramphenicol (30 µg) 등 14종의 항생제(Oxoid, UK)에 대해서는 디스크 확산법으로 실시하였다. 항생제 감수성 시험을 위한 표준균주로 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

DNA 분리

공시균에 대한 genomic DNA의 추출은 boiling법으로 실시하였다. 즉 공시균을 tryptic soy broth (Oxoid, UK)에 접종하여 37°C에서 18~24시간 진탕 배양하여 얻은 균 부유액 1.0 mL를 13,000 rpm에서 2분간 원심 분리한 후 상층 액을 제거한 다음 멸균 증류수 0.5 mL로 재 부유하였다. 균 부유액은 끓는 물에 10분 동안 가열한 다음 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 template DNA로 사용하였다.

Quinolone 내성 유전자의 검출

NA에 내성을 나타낸 *Salmonella* 균을 대상으로 quinolone 내성 유전자의 보유 유무를 조사하였다. 사용된 primer는 Table 1과 같다. QRDR에 위치한 *gyrA*, *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자의 증폭은 Kim 등(2013)의 방법에 따라 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 (주)Biofact (Korea)에 염기서열 분석을 의뢰하였으며 결정된 각각의 염기서열은 NCBI에서 제공하는 BLAST 프로그램을 이용하여 표준균주와 비교분석하였다. PMQR 인자인 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-lb-cr* 및 *qepA* 유전자의 검출은 Cho 등(2019)의 방법에 준하여 실시하였다. PCR 반응은 Maxime PCR PreMix (*i*-StarTag, Intron, Korea)에 각각의 10 pmol primer 1 µL와 template DNA 1 µL를 넣은 후 멸균된 증류수를 첨가하여 최종 반응량이 20 µL 되게 하여 Tprofessional Thermal Cycler (Biometra, Germany)를 이용하여 수행하였다. PCR 반응조건은 초기 denaturation 후, denaturation, annealing, extension 과정을 반복하고 최종 extension을 실시 하였다. 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에서 100 V로 30분간 전기영동을 실시한 후 UV transilluminator (Biometra, Germany)를 이용하여 확인하였다.

Table 1. Nucleotide sequence of oligonucleotide primers used in this study

Primer name	Sequence (5' to 3')	Annealing temp. (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>invA</i> -F	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	55	284	Rahn et al, 1992
<i>invA</i> -R	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC			
<i>qnrA</i> -F	ATTTCTCACGCCAGGATTIG	55	574	Cho et al, 2019
<i>qnrA</i> -R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC			
<i>qnrB</i> -F	CGACCTKAGCGGCACTGAAT	55	513	Cho et al, 2019
<i>qnrB</i> -R	GAGCAACGAYGCCTGGTAGYTG			
<i>qnrS</i> -F	ACTGCAAGTTCATTGAACAG	53	431	Cho et al, 2019
<i>qnrS</i> -R	GATCTAAACCGTCGAGTTCG			
<i>qepA</i> -F	AACTGCTTGAGCCCGTAGAT	58	596	Cho et al, 2019
<i>qepA</i> -R	GTCTACGCCATGGACCTCAC			
AAC(6)- <i>lb-cr</i> -F	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA	53	482	Cho et al, 2019
AAC(6)- <i>lb-cr</i> -R	CTCGAATGCCTGGCGTGTTT			
<i>gyrA</i> -F	ACGTACTIONAGGCAATGACTGG	60	1,150	Kim et al, 2013
<i>gyrA</i> -R	AGAAGTCGCCGTCGATAGAAC			
<i>gyrB</i> -F	CAGACTGCCAGGAACGCGAT	52	885	Kim et al, 2013
<i>gyrB</i> -R	biotin-AGCCAAGTGCGGTGATAAGA			
<i>parC</i> -F	TGTATGCGATGTCTGAACTG	65	702	Kim et al, 2013
<i>parC</i> -R	biotin-CTCAATAGCAGCTCGGAATA			
<i>parE</i> -F	TACCGAGCTGTTCTTGTGG	53	1,807	Kim et al, 2013
<i>parE</i> -R	biotin-GGCAATGTGCAGACCATCAG			

결 과

대구 관내 닭 도축장으로 출하한 닭을 대상으로 농장 당 20개씩 총 48개 농장에서 960개의 맹장시료를 채취하여 PCR을 이용한 *invA* 유전자의 존재 유무로 *Salmonella* 균의 동정을 실시한 결과 19개 농장(40.0%)에서 46주(5.0%)의 *Salmonella* 균을 분리하였다(Fig. 1). 시료의 중복을 피하기 위해 분리된 *Salmonella* 46주 중 40주(농장 당 최대 5개의 균주만 사용)만을 실험에 사용하였다(Table 2).

40주의 *Salmonella* 균을 대상으로 NA와 CIP에 대한 MIC를 측정된 결과 NA에 대한 MIC는 128~512 µg/mL로 100% (40주) 내성을 나타내었고, CIP에 대한 MIC는 ≤0.125~0.25 µg/mL로 100% (40주) 감수성을 나타내었다. CLSI 기준(2013)에 준하여 MIC 값이 NA는 32 µg/mL 이상, CIP는 1 µg/mL 이상이면 내성으로 판정하였다. NA에 내성을 보인 *Salmonella* 40주를 대상으로 ampicillin 등 14종의 약제에 대해 항생제 감수성 시험을 실시한 결과 ampicillin에 1주(2.5%), gentamicin에 2주(5%)가 내성을 나타내었을 뿐 나머지 균주는 사용된 모든 항생제에 감수성을 나타내었다. DNA gyrase와 DNA topoisomerase IV의 QRDR 영역 염기서열의 돌연변이 여부를 확인하기 위해 *gyrA*, *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자를 PCR 증폭 후 DNA 염기서열을 분석한 결과 36주(90%)는 *gyrA*의 Asp87에서 aspartic

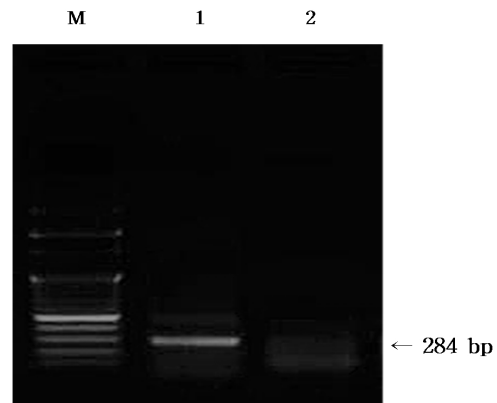


Fig. 1. Polymerase chain reaction amplification of *invA* gene for identification of *Salmonella* species. Lane M, 100 bp ladder; lane 1, *invA* gene; lane 2, Negative control.

acid가 glycine(D87G)으로 나머지 4주(10%)는 *gyrA*의 Ser83에서 serine이 tyrosine(S83Y)으로의 돌연변이가 일어났다(Fig. 2). 반면 *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자는 검출되지 않았다. Plasmid 상에 있다고 알려진 PMQR 인자인 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)-lb-cr* 및 *qepA* 유전자의 존재를 확인하기 위해 PCR 반응을 실시한 결과 이들 유전자는 모든 균주(40주)에서 검출되지 않았다(Table 2).

Table 2. Distribution of the quinolone resistance determinants of 40 nalidixic acid-resistant *Salmonella* isolates

Isolates	MIC* (µg/mL)		Amino acid substitution [†] in				PMQR genes [‡]	Antimicrobial resistance pattern [§]
	NA	CIP	GyrA	GyrB	ParC	ParE		
SPC-1-2	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-11-1	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-11-2	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-15-2	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-18-2	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-20-3	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-20-12	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-21-8	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-23-20	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-27-1	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-29-1	128	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-29-7	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-29-8	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-29-10	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-29-20	128	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-31-19	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-32-2	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-32-4	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-32-16	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-34-5	128	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-34-10	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-34-20	128	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-36-1	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-36-2	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-36-10	128	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-37-1	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-37-15	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-38-5	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-38-6	128	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	GM
SPC-38-14	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-38-20	128	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-40-15	128	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-41-4	128	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	AM
SPC-41-7	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-42-3	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	GM
SPC-43-2	512	0.25	S83Y	wt	wt	wt	ND	-
SPC-43-4	256	<0.125	D87G	wt	wt	wt	ND	-
SPC-43-5	512	0.25	S83Y	wt	wt	wt	ND	-
SPC-43-6	512	0.25	S83Y	wt	wt	wt	ND	-
SPC-43-10	512	0.25	S83Y	wt	wt	wt	ND	-

*NA, nalidixic acid; CIP, ciprofloxacin.

[†]D, aspartic acid; G, glycine; S, serine; Y, tyrosine; wt, wild type.[‡]PMQR, plasmid-mediated quinolone resistance (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr* and *qepA*); ND, not detected.[§]GM, gentamicin; AM, ampicillin.

	83	87	
Sbjct	194 YVLGNDWNKAYKKSARVVGDVIGKYHPHGD	SAVYD	NTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSI 15
D87G	194 YVLGNDWNKAYKKSARVVGDVIGKYHPHGD	SAVYG	TIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGSI 15
S83Y	173 LGNDWNKAYKKSARVVGDVIGKYHPHG	YAVYD	DTIVRMAQPFSRLRYMLVDGQGNFGS 3

Fig. 2. Nucleotide sequences of QRDR of *gyrA* gene in nalidixic acid-resistant *Salmonella* isolates.

고 찰

대부분 *Salmonella*속 균은 상피세포의 침습성에 관계하는 독력 인자인 *invA* 유전자를 보유하고 있으며 이 유전자를 이용한 PCR법은 *Salmonella*의 동정을 위해 사용되고 있다(Chiu와 Ou, 1996). 이번 조사에서 *Salmonella* 균의 동정은 PCR법으로 실시하였다. 도축장으로 출하된 닭의 맹장 내용물에서 46주(5.0%)의 *Salmonella* 균이 분리되었다. 이는 국내 도축장에서 Yang 등(2009)의 7.3% (총배설강 5.9%, 맹장 8.6%)의 분리율과는 비슷하였으나, Bae 등(2013b)의 도체에서 42.7%의 성적보다는 낮았다. 이러한 분리율의 차이는 지리적, 시료 채취부위 및 분리시기에 따라서 다양하게 나타날 수 있다. 한편 Zhu 등(2017)은 중국의 닭 도축장에서 30.1% (맹장 내용물 48%, 도체 18.8%, 절단육 31.3% 및 냉동 닭 14.0%)의 분리율을 보고하였다. 이번 조사에서 분리된 균에 대한 혈청형은 동정하지 않았지만 이전 연구자들(Yang 등, 2009; Bae 등, 2013b; Lee 등, 2016)의 결과를 종합해 볼 때 현재 국내에서 유행하는 *Salmonella* 혈청형은 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*이다. 가축과 축산물에서 분리한 *Salmonella* 균의 혈청형과 항생제 내성 자료는 사람에서 *Salmonella* 균의 오염을 추적하고 가축에서의 *Salmonella* 균을 관리하는데 필요하다. 이번 연구에서 분리된 *Salmonella* 균에 대한 혈청형의 동정이 추가적으로 이루어져야 될 것으로 생각된다.

Bae 등(2013a)은 NA에 내성인 *Salmonella* 균주의 MIC 값은 512 µg/mL 이상이었으나 CIP에 대한 MIC 값은 0.5 µg/m 이하라고 보고하였다. 이번 연구에서도 *Salmonella* 40주에 대한 NA의 MIC 값은 128~512 µg/mL로 고도내성을 나타내었고, CIP의 MIC 값은 0.125~0.25 µg/mL로 모두 감수성을 보여 유사한 결과를 얻었다. 한편 NA나 oxolinic acid 같은 quinolone계 항생제에 내성이 생긴 *Salmonella* 균들은 CIP 같은 fluoroquinolone계 항균제에 감수성이 감소하거나 내성이 있을 수 있다(Oteo 등, 2000). 국내에서 분리된 *Salmonella* 균에서 quinolone 항생제인 NA에 대한 내성률은 1995~1996년에 1.8%, 2000~2002년에 21.8%, 2006~2008년에 50~68%로 점점 증가 추세에 있다(Choi 등 2005; Chung 등, 2012). 이번 조사에서 모든 균주가 NA에 내성을 나타내어 NA에 대한 높은 내성률은 이전 연구자들의 결과와 일치하였다(Lee 등, 2008; Yang 등, 2009). Yang 등(2009)은 ampicillin에 5.4%, tetracycline에 16.2%의 내성률을 제외하고는 사용된 모든 항

생제에 감수성을 보고하여 이번 연구의 결과와 비교 시 tetracycline에 낮은 내성률을 제외하고는 유사한 양상을 나타내었다. 또한 Im 등(2015)은 산란계 농장에서 ampicillin 4.0%, tetracycline 1.0% 및 gentamicin 1.0% 그리고 나머지 항생제에 대해서는 모두 감수성을 보고하여 유사하였다. 반면 Kim 등(2011)의 건강한 닭에서 ampicillin에 51.1%, gentamicin에 17.0%, tetracycline에 44.7%, chloramphenicol에 21.3%의 내성률을 보고하여 이번 연구에서 상당히 낮았다. 이는 항생제 사용량의 차이에 기인하는 것으로 생각된다.

이번 연구에서 NA에 내성을 보인 *Salmonella* 40주 모두 *gyrA* 유전자의 QRDR 영역인 Asp87 또는 Ser83에서 돌연변이가 확인되었다. *GyrA* 유전자의 Ser83과 Asp87에서 돌연변이는 이전 사람과 동물에서 분리된 *Salmonella*에서 가장 흔히 보고되고 있다(Eaves 등, 2004; de Souza 등, 2011; Ferrari 등, 2013; Ngoi와 Thong, 2014). 또한 *gyrA* 유전자에서 돌연변이는 Ser83에서 보다 Asp87에서 더 많이 관찰되어 이전 연구자들의 결과와 일치하였다(de Souza 등, 2011; Bae 등 2013a). 반면 Griggs 등(1996)은 Ser83에서 돌연변이가 더 많이 일어난다고 보고하였고, Ferrari 등(2013)은 Asp87와 Ser83에서 돌연변이는 비슷하게 일어난다고 하였다. 한편 Giraud 등(2006)은 Asp87와 Ser83에서의 돌연변이 빈도는 *Salmonella* 혈청형에 따라 차이가 있어 *S. Newport*, *S. Virchow* 및 *S. Typhimurium*은 Ser83에서, *S. Hadar*와 *S. Kottbus*는 Asp87에서 많이 일어난다고 하였다. 이번 연구에서 확인된 *gyrA* 유전자의 Asp87에서 glycine 및 Ser83에서 tyrosine으로의 돌연변이 뿐만 아니라 다른 형태의 아미노산 변이 또한 보고되고 있다(Eaves 등, 2004; Lee 등, 2008; Bae 등, 2013a; Ferrari 등, 2013; Campioni 등, 2017).

Ser83에서 돌연변이주는 CIP에 대한 MIC 값이 0.13 µg/mL로 Asp87에서 0.061 µg/mL 보다 높아 Ser83에서 돌연변이는 fluoroquinolone 내성에 중요한 영향을 미친다고 하였다(Piddock 등, 1998; Giraud 등, 2006). 이번 연구에서도 Ser83에서 NA와 CIP에 대한 MIC 값은 Asp87에서 보다 높았다. 일반적으로 NA에 내성을 가진 *Salmonella* 균들은 CIP에 감소된 감수성을 보여 왔으며 *gyrA* 유전자의 QRDR에 하나의 점 돌연변이를 갖는다. 반면 CIP에 내성을 갖는 균들은 *gyrA* 유전자의 QRDR에 두 개의 점 돌연변이를 갖고 있는 것으로 알려져 있다(Oteo 등, 2000). *Salmonella* 균에서 *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자의 QRDR에서 돌연변이는 드물며 이들 유전자에서 변이는 NA가 내성을

획득하는데 큰 영향을 미치지 않는다고 하였다(Ngoi와 Thong, 2014; Campioni 등, 2017) 이번 연구에서도 *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자에서 돌연변이는 확인되지 않았다.

Kim 등(2013)은 국내 닭에서 분리된 *Salmonella* 185주에서 *qnrB* 2주와 *qnrS* 4주를 보고하였고, Chung 등(2012)은 NA에 내성인 임상균주 57주와 비임상 균주 58주 중 임상균주에서 *qnrS* 2주, Tamang 등(2011)은 국내 식용동물에서 분리된 *Salmonella*에서 *aac(6)-Ib-cr* 4주를 보고하였다, Sjölund- Karlsson 등(2010)은 미국의 임상 검체에서 분리된 비장티푸스성 *Salmonella* 2,165주와 비임상 검체에서 분리된 2,235주 중 임상 검체에서 분리된 6주에서만 PMQR 유전자가 검출되었고 이중 *qnrS*가 3주, *qnrB*가 2주, *aac(6)-Ib-cr*이 1주였다고 보고했다. 이와 같이 국내외에서 분리된 *Salmonella*에서 PMQR 유전자는 아직까지는 매우 드물다. 이번 연구에서 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)-Ib-cr* 및 *qepA* 유전자는 모든 균주에서 검출되지 않았다(Guo 등, 2018).

이상의 결과 닭 도축장에서 분리한 *Salmonella* 균에서 DNA gyrase는 quinolone 내성의 주표적이며 *gyrA* 유전자의 QRDR 영역인 Ser83과 Asp87 부위의 점 돌연변이가 NA에 증가된 내성 및 CIP에 감소된 감수성과 관련이 있음을 확인하였다(Pidcock, 1999).

결론

2017년 4월부터 2018년 4월까지 대구시 관내 닭 도축장으로 출하한 닭의 맹장내용물에서 분리한 NA 내성 *Salmonella* 균을 대상으로 *gyrA*, *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자의 QRDR에서의 돌연변이 양상 및 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)-Ib-cr* 및 *qepA* 유전자의 분포상황을 조사한 결과는 다음과 같다. 총 48개 농장 960개의 시료 중 *Salmonella* 균은 19개 농장(40.0%)에서 46주(5.0%)가 분리되었다. 임의 선정된 *Salmonella* 40주의 NA와 CIP에 대한 MIC는 각각 128~512 µg/mL 및 <0.125~0.25 µg/mL로 NA에는 40주 모두 내성을 나타내었고, CIP에는 모든 균주가 감수성을 보였다. NA에 내성을 보인 *Salmonella* 40주는 ampicillin에 2.5%, gentamicin에 5.0%의 내성률을 나타내었으나, 나머지 항생제에는 모두 감수성을 나타내었다. NA 내성을 나타낸 *Salmonella* 40주 중 36주(90%)는 *gyrA* 유전자의 Asp87에서 aspartic acid가 glycine으로, 6주(10%)는 Ser83

에서 serine이 tyrosine으로의 점 돌연변이가 확인되었다. 반면 *gyrB*, *parC* 및 *parE* 유전자에서 돌연변이는 확인되지 않았다. 더욱이 *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6)-Ib-cr* 및 *qepA* 유전자는 모든 균주에서 검출되지 않았다. 이상의 결과 *gyrA* 유전자의 Ser83과 Asp87에서 점 돌연변이는 NA에 내성 및 CIP에 감소된 감수성과 관련이 있음을 알 수 있었다.

REFERENCES

- Bae DH, Baek HJ, Jeong SJ, Lee YJ. 2013a. Amino acid substitutions in *gyrA* and *parC* associated with quinolone resistance in nalidixic acid-resistant *Salmonella* isolates. *Ir Vet J* 66: 23.
- Bae DH, Dessie HK, Baek HJ, Kim SG, Lee HS, Lee YJ. 2013b. Prevalence and characteristics of *Salmonella* spp. isolated from poultry slaughterhouses in Korea. *J Vet Med Sci* 75: 1193-1200.
- Campioni F, Souza RA, Martins VV, Stehling EG, Bergamini AMM, Falcão JP. 2017. Prevalence of *gyrA* mutations in nalidixic acid-resistant strains of *Salmonella* Enteritidis isolated from humans, food, chickens, and the farm environment in Brazil. *Microb Drug Resist* 23: 421-428.
- Chiu CH, Ou JT. 1996. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol* 34: 2619-2622.
- Cho JK, Kim JM, Kim HD, Kim KH, Lim HS, Yang CY. 2019. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from companion animals. *Korean J Vet Serv* 42: 17-24.
- Choi SH, Woo JH, Lee JE, Park SJ, Choo EJ, Kwak YG, Kim MN, Choi MS, Lee NY, Lee BK, Kim NJ, Jeong JY, Ryu J, Kim YS. 2005. Increasing incidence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella* enterica isolates in Korea and mechanisms involved in quinolone resistance. *J Antimicrob Chemother* 56: 1111-1114.
- Chung HS, Lee HM, Lee YS, Yong DE, Jeong SH, Lee BK, Jung SC, Lim SK, Lee KW, Chong YS. 2012. A Korean nationwide surveillance study for non-typhoidal *Salmonella* isolated in humans and food animals from 2006 to 2008: extended-spectrum β-lactamase, plasmid-mediated AmpC β-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes *Korean J Clin Microbiol* 15: 14-20.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacterial isolated from animals; approved standard. fourth edition and supplement, CLSI document VET01-A4 (standard) and VET01-S2 (supplement), in Clinical and Laboratory Standards Institute (Wayne, PA).

- de Souza RB, Magnani M, Ferrari RG, Kottwitz LB, Sartori D, Tognim MC, de Oliveira TC. 2011. Detection of quinolone-resistance mutations in *Salmonella* spp. strains of epidemic and poultry origin. *Braz J Microbiol* 42: 211-215.
- Eaves DJ, Randall L, Gray DT, Buckley A, Woodward MJ, White AP, Piddock LJ. 2004. Prevalence of mutations within the quinolone resistance-determining region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and association with antibiotic resistance in quinolone-resistant *Salmonella* enterica. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4012-4015.
- Ferrari R, Galiana A, Cremades R, Rodríguez JC, Magnani M, Tognim MC, Oliveira TC, Royo G. 2013. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and mutations in the topoisomerase genes of *Salmonella* enterica strains from Brazil. *Braz J Microbiol* 44: 651-656.
- Giraud E, Baucheron S, Cloeckaert A. 2006. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect* 8: 1937-1944.
- Griggs DJ, Gensberg K, Piddock LJ. 1996. Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 1009-1013.
- Guo X, Wang H, Cheng Y, Zhang W, Luo Q, Wen G, Wang G, Shao H, Zhang T. 2018. Quinolone resistance phenotype and genetic characterization of *Salmonella* enterica serovar Pullorum isolates in China, during 2011 to 2016. *BMC Microbiol* 18: 225.
- Im MC, Jeong SJ, Kwon YK, Jeong OM, Kang MS, Lee YJ. 2015. Prevalence and characteristics of *Salmonella* spp. isolated from commercial layer farms in Korea. *Poult Sci* 94: 1691-1698.
- Kim JH, Cho JK, Kim KS. 2013. Prevalence and characterization of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Salmonella* isolated from poultry in Korea. *Avian Pathol* 42: 221-229.
- Kim SR, Nam HM, Jang GC, Kim AR, Kang MS, Chae MH, Jung SC, Kang DJ, Kim JG. 2011. Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolates from food animals and raw meats in Korea during 2010. *Kor J Vet Publ Hlth* 35: 246-254.
- Lee K, Lee M, Lim J, Jung J, Park Y, Lee Y. 2008. Contamination of chicken meat with *Salmonella* enterica serovar Haardt with nalidixic acid resistance and reduced fluoroquinolone susceptibility. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1853-1857.
- Lee SK, Choi D, Kim HS, Kim DH, Seo KH. 2016. Prevalence, seasonal occurrence, and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolates recovered from chicken carcasses sampled at major poultry processing plants of South Korea. *Foodborne Pathog Dis* 13: 544-550.
- Ngoi ST, Thong KL. 2014. High resolution melting analysis for rapid mutation screening in gyrase and Topoisomerase IV genes in quinolone-resistant *Salmonella* enterica. *Biomed Res Int* 2014: 718084. doi: 10.1155/2014/718084.
- Oteo J, Aracil B, Alós JI, Gómez-Garcés JL. 2000. High rate of resistance to nalidixic acid in *Salmonella* enterica: its role as a marker of resistance to fluoroquinolones. *Clin Microbiol Infect* 6: 273-276.
- Piddock LJ, Ricci V, McLaren I, Griggs DJ. 1998. Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic acid-resistant *Salmonella* serotypes isolated from animals in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 41: 635-641.
- Piddock LJ. 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs* 58(S2): 11-18.
- Piddock LJ. 2002. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol Rev* 26: 3-16.
- Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles CL. 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes* 6:271-279.
- Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. 2011. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* 17: 149-182.
- Sjölund-Karlsson M, Howie R, Rickert R, Krueger A, Tran TT, Zhao S, Ball T, Haro J, Pecic G, Joyce K, Fedorka-Cray PJ, Whichard JM, McDermott PF. 2010. Plasmid-mediated quinolone resistance among non-typhi *Salmonella* enterica isolates, USA. *Emerg Infect Dis* 16: 1789-1791.
- Stevenson JE, Gay K, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM, Angulo FJ. 2007. Increase in nalidixic acid resistance among non-Typhi *Salmonella* enterica isolates in the United States from 1996 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 195-197.
- Tamang MD, Nam HM, Kim A, Lee HS, Kim TS, Kim MJ, Jang GC, Jung SC, Lim SK. 2011. Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected non-typhoid *Salmonella* isolated from food animals and humans in Korea. *Foodborne Pathog Dis* 8: 1199-1206.
- Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. 1988. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals. 8th ed. pp. 74-86. Cornell University Press, Ithaca and London.
- Wolfson JS, Hooper DC. 1989. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 2: 378-424.
- Yang HY, Lee SM, Eark EJ, Kim JH, Lee JG. 2009. Analysis of antimicrobial resistance and PFGE patterns of *Salmonella* spp. isolated from chickens at slaughterhouse in Incheon area. *Korean J Vet Serv* 32: 325-334.
- Zhu Y, Lai H, Zou L, Yin S, Wang C, Han X, Xia X, Hu K, He L, Zhou K, Chen S, Ao X, Liu S. 2017. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. *Int J Food Microbiol* 259: 43-51.