

야생조류 항생제 내성균 실태조사

- ◇ 항생제 내성균 관리는 사람-동물-환경이 연결되어 있는 원헬스(One Health) 개념의 포괄적 관리가 필요
- ◇ 항생제 사용과 무관한 야생조류 조사로 환경 요인으로 인한 항생제 내성균 확산영향을 평가하고자 함

I

추진방향

- 항생제의 빈번한 사용과 부적절한 처방 및 남용은 항생제 내성균의 출현을 가속화시켜왔으며, 반려동물과 가축동물, 양식업 등에서 내성균이 발생하고 확산되면서 다양한 분야 및 학계에 문제로 대두되고 있음
- 특히, 항생제 내성을 획득한 가축 폐기물은 항생제 내성을 갖는 병원체와 내성 유전인자를 야외로 배출하여 야생생활을 하는 동물에게 병원성 및 항생제 내성을 전달할 수 있음
- 항생제 노출 기회가 적은 야생조류를 대상으로 서식지별 항생제 내성균을 조사하여 오염 실태를 파악하고 확산영향을 평가하고자 함

II

추진계획

- **검사대상** : 야생조류 배출분변 및 직장도말 400건
 - 갈매기, 철새 등 : 해안주변, 철새도래지(구읍벙터, 삼목선착장, 황산도 등)
 - 비둘기, 참새, 까치 : 도심 공원(자유공원, 인천대공원, 수봉공원 등)
 - 구조된 야생조류(야생동물구조관리센터 협업) : 황조롱이, 수리부엉이 등
- **수행기관** : 질병조사과, 야생동물구조관리센터
 - (질병조사과) 서식지별 야생조류 배출분변 확보 및 내성균 검사
 - (야생동물구조관리센터) 야생조류 직장도말 확보

□ 추진절차 :



□ 검사방법

○ 검체확보

- (3월~10월) 세균분리 특성상 하절기 진행이 유리, 기온이 올라가는 시기(봄) 부터 검체 확보 시작
- (1월~10월) 구조된 야생조류 직장도말 채취(수시)

해안가 및 철새도래지



도심공원



야생조류 직장도말



○ 항생제 내성균 스크리닝

- 증균배지(TSB)에 배양 후 항생제(supplement) 첨가 chrom 배지에 접종
- chrom 배지에서 배양된 균주 → 항생제 내성 후보균주로 선별

계 열	항생제	처리농도	비고
Quinolone 계	Ciprofloxacin	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
Polypeptide 계	supplement	-	Chromagar COL-APSE(상용배지)
Cephalosporin 계	supplement	-	Chromagar ESBL(상용배지)

○ 후보균주 내성유전자 검사

- 항생제별 내성유전자 검사 : PCR 후 염기서열 분석

계 열	내성유전자	비고
Quinolone 계	<i>gyrA</i>	Ciprofloxacin
Polypeptide 계	<i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i>	Colistin
Cephalosporin 계	TEM, SHV, CTX-M-1, 2, 9, 25 Group	ESBL

1) ESBL(Extended spectrum β -lactamase) : 광범위 베타-락탐계 항생제 분해효소

2) ciprofloxacin : 그람음성균, 양성균까지 항균력 있는 강력한 항생제

○ 유전형 분석 : 내성유전자 보유 균주 대상 MLST³⁾ 수행

- *E. coli* MLST : 7개의 housekeeping 유전자 *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*를 PCR로 증폭하고 염기서열을 분석하여 *E. coli* MLST database (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>) 와 비교 sequence type 확인
- *K. pneumoniae* MLST : 7개의 housekeeping 유전자 *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*를 PCR로 증폭하고 염기서열을 분석하여 *K. pneumoniae* MLST database(<https://bigsdb.pasteur.fr/>) 와 비교 sequence type 확인

○ 항생제 감수성 검사 : 10계열 15종 항생제 검사

1. **Quinolone 계** : Ciprofloxacin, Nalidixic Acid
2. **Carbapenem 계** : Imipenem
3. **Penicillin 계** : Ampicillin
4. **Tetracycline 계** : Tetracycline
5. **Aminoglycoside 계** : Gentamicin, Amikacin
6. **Cephalosporin 계** : Cefoxitin, Ceftazidime, Cefotaxime, Ceftriaxone
7. **Polypeptide 계** : Colistin
8. **Chloramphenicol 계** : Chloramphenicol
9. **Macrolide 계** : Azithromycin
10. **Sulfonamide 계** : Trimethoprim/Sulfamethoxazole

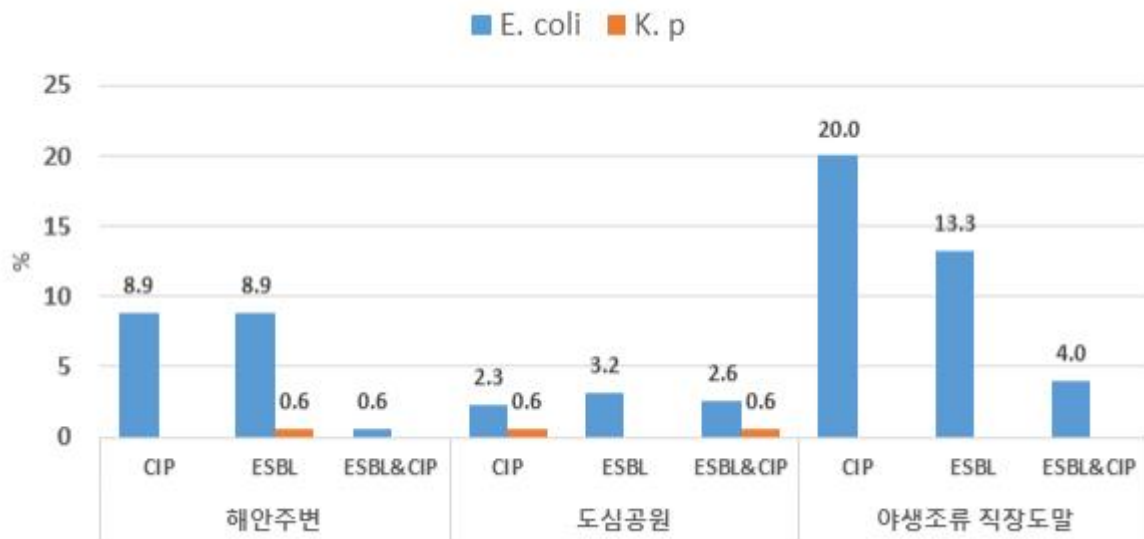
3) MLST(Multilocus sequence typing) : 세균 대사에 관여하는 주요 항존유전자(Housekeeping gene)를 증폭, 염기서열 분석 후 sequence types(ST) 확인으로 내성 세균간의 연관성분석 가능

III

검사결과

1. 서식지별 항생제 내성균 분리균주 : 총 400건 검사, 75건 검출(18.8%)

구 분		건수/검출(%)		계	균 종	CIP	ESBL	ESBL&CIP	Colistin
배출분변	해안 철새	325/47 (14.5%)	169/32 (18.9%)	31	<i>E. coli</i>	15	15	1	0
						(8.9%)	(8.9%)	(0.6%)	-
	도심 공원		156/15 (9.6%)	13	<i>K. pneumoniae</i>	0	1	0	0
						-	(0.6%)	-	-
		4				5	4	0	
									(2.6%)
2	<i>K. pneumoniae</i>	1	0	1	0				
		(0.6%)	-	(0.6%)	-				
야생조류 직장도말		75/28 (37.3%)	28	<i>E. coli</i>	15	10	3	0	
					(20.0%)	(13.3%)	(4.0%)	-	
					0	0	0	0	
계				75	35	31	9	0	



- 총 400건 검사 75건 검출(18.8%)로 CIP 35건, ESBL 31건, ESBL & CIP 9건, Colistin 0건
- *E. coli* 72건 18.0%, *K. pneumoniae* 3건 0.8% 검출되었으며, 대변 검체의 특성상 대장균이 우세하게 분리되었음
- Colistin은 다제내성 병원균(일명 Superbugs) 감염에 대한 최종적 억제 수단으로 사용되어온 항생제로 2018년 채소 1건, 축분 6건, 사람 대변 1건이 분리되었고, 2019년에는 축분에서 6건 분리된 바 있음

- *E. coli* 항생제별 내성률을 보면, CIP 내성률은 야생조류 직장도말 20.0%, 해안주변 · 철새서식지 8.9%, 도심공원 2.6%로 나왔으며, 베타락탐계(ESBL 생성균주) 내성률은 야생조류 직장도말 13.3%, 해안주변 · 철새서식지 8.9%, 도심공원 3.2% 검출되었음

(참고) 2010년, 2011년 네덜란드 서식 야생조류 직장도말에서 ESBL 생성 대장균이 15.7% 분리, 특히 수생 관련 종(물새, 갈매기 등)에서 ESBL 내성유전자가 광범위하게 퍼져있음

*「Characteristics of cefotaxime-resistant *Escherichia coli* from wild birds in the Netherlands」 Appl Environ Microbiol(2013)

(추가 조사중) 인천연안 해수, 갯벌, 어류에 대한 항생제 내성균 조사

- 검사대상 : 소래포구 해수, 갯벌, 어시장(소래포구, 연안부두) 유통 어류
- 검사결과
 - 총 37건 검사, ESBL 9건(24.3%), CIP 7건(18.9%) 검출
 - ESBL 내성유전자 : CTX-M-1 Group(CTX-M-32, CTX-M-55, CTX-M-15), CTX-M-9 Group(CTX-M-27, CTX-M-14), TEM, SHV-187 ⇒ 사람, 가축 유래 내성유전자와 동일
 - CIP 내성유전자 : S83L+D87N(4건), S83L+D87G(1건), S83I(1건), S83F+D87A(1건) ⇒ 조류검체보다 아미노산 변이 다양

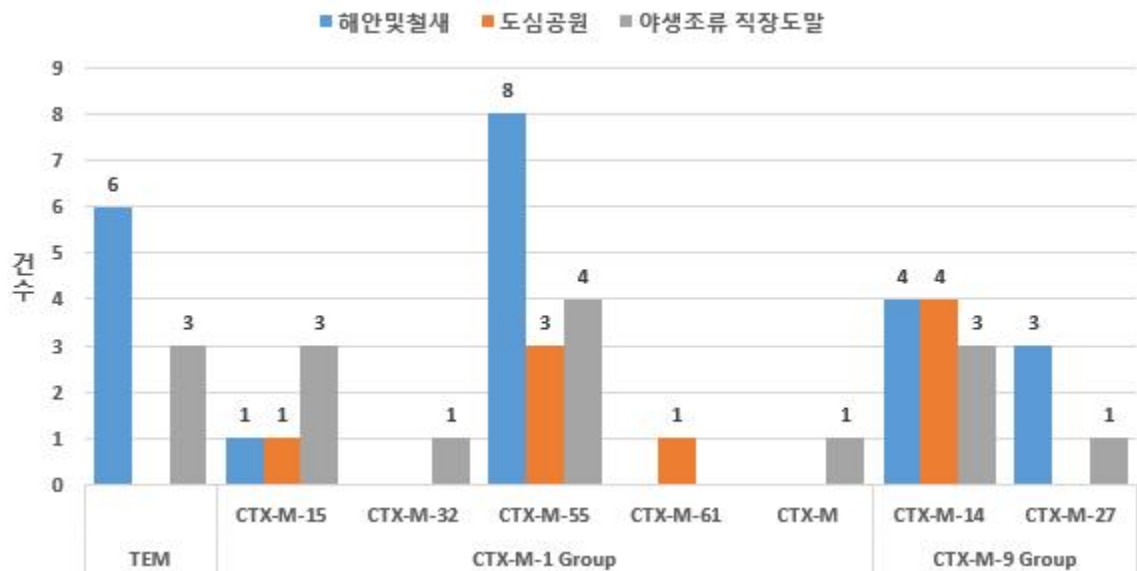
구분	건수	균 종	CIP	ESBL	Colistin
해 수	3	<i>E. coli</i>	2	2	0
		<i>K. pneumoniae</i>	0	1	0
갯 벌	3	<i>E. coli</i>	2	3	0
		<i>K. pneumoniae</i>	1	1	0
어 류	31	<i>E. coli</i>	1	2	0
		<i>K. pneumoniae</i>	1	0	0
계	37	-	7(18.9%)	9(24.3%)	0

2. *E. coli* 내성균주 특성 분석

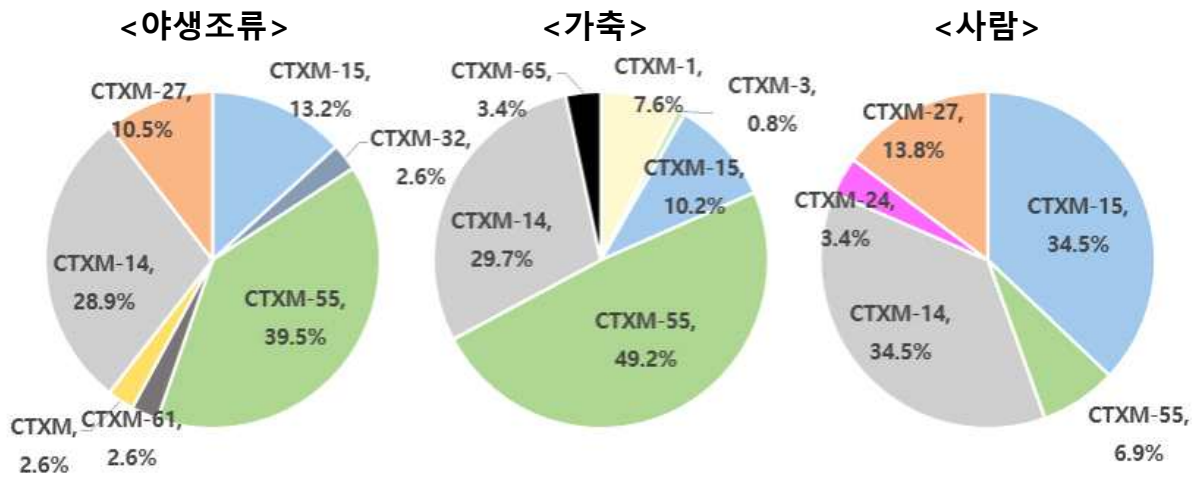
□ *E. coli*-ESBL 분리균주(n=38) 내성유전자 검사결과

구	분	균주	TEM	CTX-M-1 group				CTX-M-9 group		
				CTX-M-15	CTX-M-32	CTX-M-55	CTX-M-61	CTX-M	CTX-M-14	CTX-M-27
배출분변	해안·철새·도심공원	16	6	1	0	8	0	0	4	3
	야생조류·직장도말	9	0	1	0	3	1	0	4	0
야생조류·직장도말		13	3	3	1	4	0	1	3	1
계		38	9	5	1	15	1	1	11	4
검출률(%)			23.7	13.2	2.6	39.5	2.6	2.6	28.9	10.5

- ESBL 내성유전자 6종에 대한 유전자 검사 후 염기서열을 분석 하였고, SHV, CTX-M-2 Group, CTX-M-25 Group 유전자는 검출되지 않음
- CTX-M-1 Group 23건 > CTX-M-9 Group 15건 > TEM 9건 검출



□ *E. coli*-ESBL 분리균주 CTX-M Group 유전자 타입 비교



- (야생조류) CTX-M-55 39.5% > CTX-M-14 28.9% > CTX-M-15 13.2% 순으로
- (가축) CTX-M-55 49.2% > CTX-M-14 29.7% > CTX-M-15 10.2% 순으로, 사람 CTX-M-14, CTX-M-15 34.5% > CTX-M-27 13.8% > CTX-M-55 6.9% 순 확인
- ⇒ 야생조류-가축의 항생제 내성균 주요 유전자 타입의 분포가 매우 유사하며, CTX-M-27은 야생조류와 사람에서만 확인

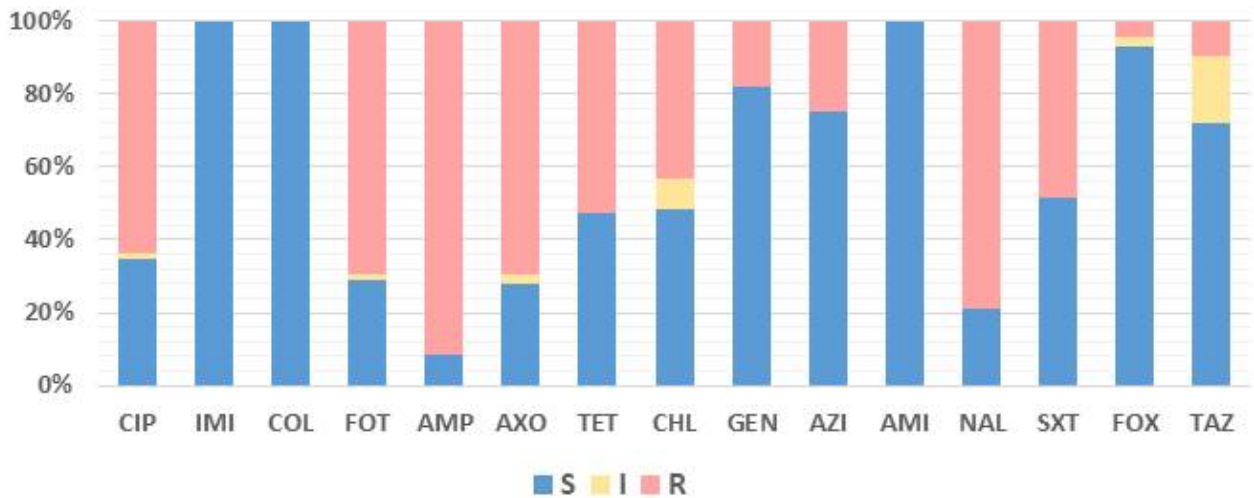
□ *E. coli*-CIP 분리균주(n=42) 내성유전자 검사결과

- CIP(fluoroquinolone계)의 주요 내성기전에 관여하는 유전자 *gyrA*의 염기서열을 분석하였고, 주요변이 부위로 알려진 codon 83, 87에 변이 확인
- S83L + D87N 37건, S83L + D87Y 4건으로 대부분 아미노산 2개 변이가 확인 되었고, 단일 아미노산 변이는 S83A 1건 해안주변·철새서식지에서 검출

구 분		균주	<i>gyrA</i> mutation		
			S83L + D87N	S83L + D87Y	S83A
배출 분변	해안및철새	16	15	0	1
	도심공원	8	4	4	0
야생조류 직장도말		18	18	0	0
계		42	37	4	1
검출률(%)			90.2	9.8	2.4

□ *E. coli* 내성균주(n=72) 대한 항생제 감수성 검사결과

* Resistant(R), Intermediate(I), Susceptible(S)



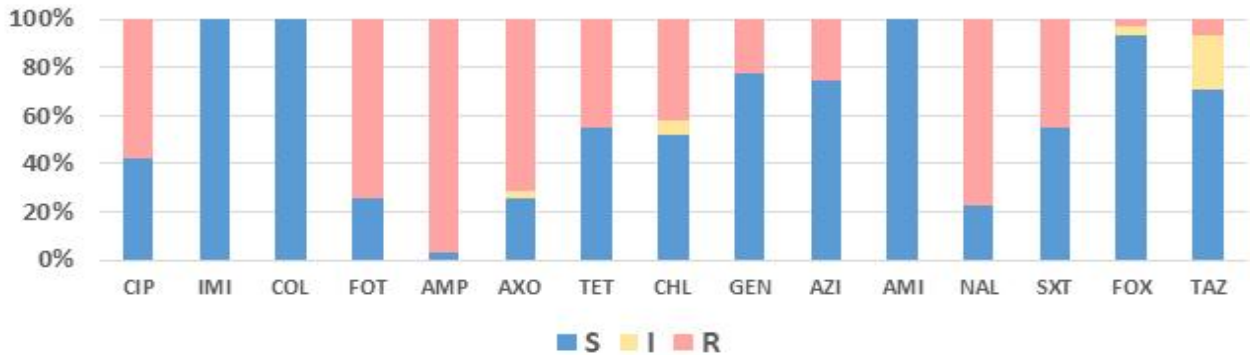
항생제		Resistant	비율(%)	Intermediate	비율(%)	Susceptible	비율(%)
Ciprofloxacin	CIP	46	63.9	1	1.4	25	34.7
Imipenem	IMI		0.0		0.0	72	100.0
Colistin	COL		0.0		0.0	72	100.0
Cefotaxime	FOT	50	69.4	1	1.4	21	29.2
Ampicillin	AMP	66	91.7		0.0	6	8.3
Ceftriaxone	AXO	50	69.4	2	2.8	20	27.8
Tetracycline	TET	38	52.8		0.0	34	47.2
Chloramphenicol	CHL	31	43.1	6	8.3	35	48.6
Gentamicin	GEN	18	25.0		0.0	54	75.0
Azithromycin	AZI	18	25.0		0.0	54	75.0
Amikacin	AMI		0.0		0.0	72	100.0
Nalidixic Acid	NAL	57	79.2		0.0	15	20.8
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	SXT	35	48.6		0.0	37	51.4
Cefoxitin	FOX	3	4.2	2	2.8	67	93.1
Ceftazidime	TAZ	7	9.7	13	18.1	52	72.2
계		419		25		636	

- Imipenem, Colistin, Amikacin 항생제 100% 감수성
- Ampicillin(91.7%)* > Nalidixic Acid(79.2%) > Cefotaxime, Ceftriaxone(69.4%) > Ciprofloxacin(63.9%) 순으로 높은 내성을 보임

* 2019년 축·수산물 항생제 중 penicillins계(Ampicillin)가 가장 많이 판매

□ *E. coli* 내성균주 서식지별 항생제 감수성 검사

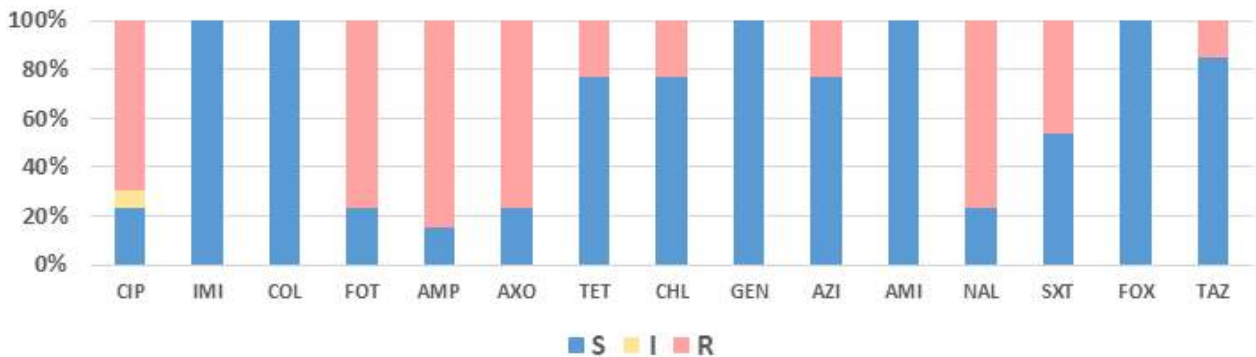
- 해안주변 · 철새서식지 내성균주(n=31) 항생제 감수성 검사



· Imipenem(IMI), Colistin(COL), Amikacin(AMI) 100% 감수성

· 내성률 Ampicillin(AMP) 96.8% > Nalidixic Acid(NAL) 77.4% > Cefotaxime(FOT) 74.2% 순

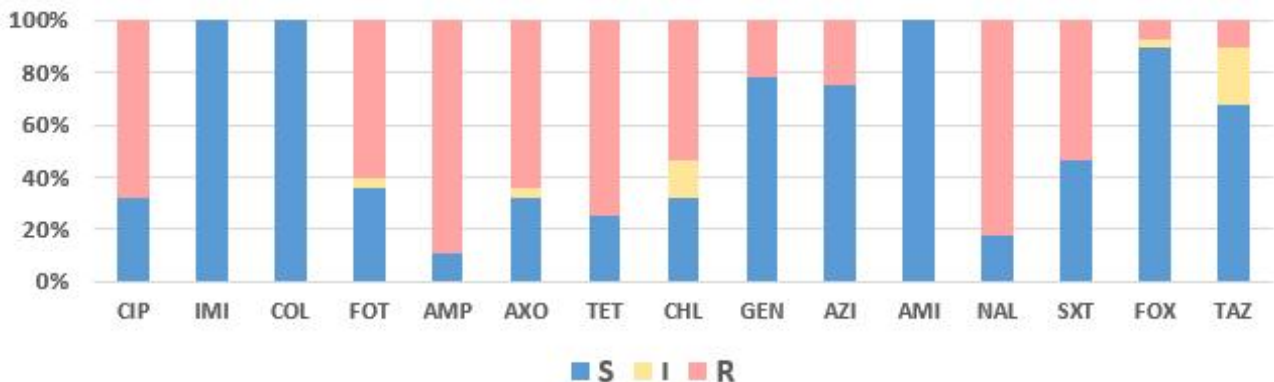
- 도심공원 내성균주(n=13) 항생제 감수성 검사



· Imipenem(IMI), Colistin(COL), Gentamicin(GEN), Amikacin(AMI), Cefoxitin(FOX) 100% 감수성

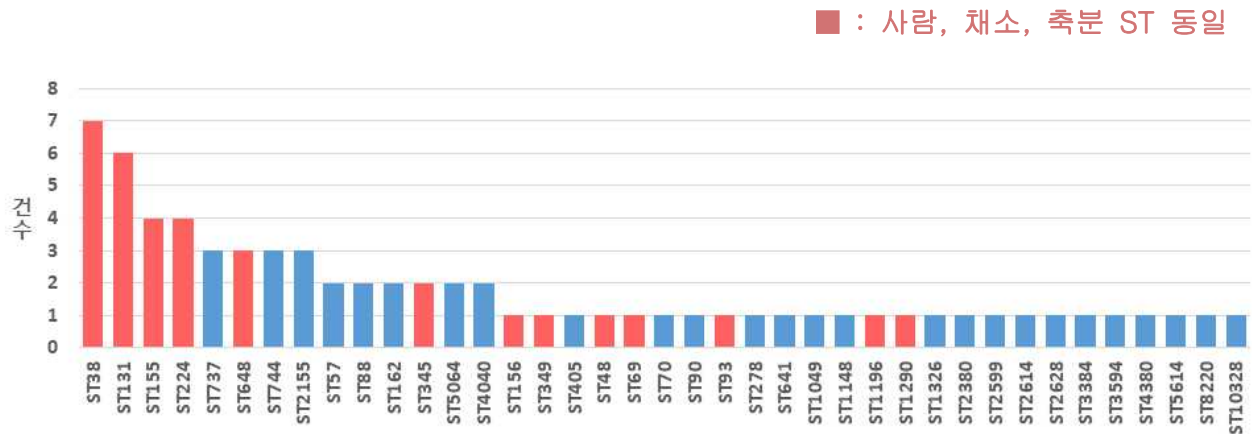
· 내성률 Ampicillin(AMP) 84.6% > Cefotaxime(FOT), Ceftriaxone(AXO), Nalidixic Acid(NAL) 76.9% > Ciprofloxacin(CIP) 69.2% 순

- 직장도말 내성균주(n=28) 항생제 감수성 검사



- Imipenem(IMI), Colistin(COL), Amikacin(AMI) 100% 감수성
- 내성률 Ampicillin(AMP) 89.3% > Nalidixic Acid(NAL) 82.1% > Tetracycline(TET) 75.0% 순

□ *E. coli* 내성균주(n=70) MLST 분석내역



- Sequence Type(ST) : ST38, ST131, ST155, ST224, ST737 등 총 39개 ST 확인
- ST38, ST131, ST155, ST224, ST648, ST345 외 7개 ST은 우리원 구축 자료인 사람, 채소, 축분에서 분리된 ST과 동일하며, 내성균의 순환 분포를 확인하였음

3. *K. pneumoniae* 내성균주 특성 분석

□ *K. pneumoniae* 내성균주 분리 현황

구 분		건수/검출(%)		계	CIP	ESBL	ESBL&CIP	Colistin
배출 분변	해안 철새	325/3 (0.9%)	169/1 (0.6%)	1	0	1(ST37)*	0	0
					-	(0.6%)	-	-
	도심 공원	156/2 (1.3%)	2	1(ST307)	0	1(ST307)	0	
				(0.6%)	-	(0.6%)	-	
야생조류 직장도말		75/0 (0.0%)	0	0	0	0	0	
				-	-	-	-	
계				3	1	1	1	0

* MLST 분석 결과 : Sequence type(ST)

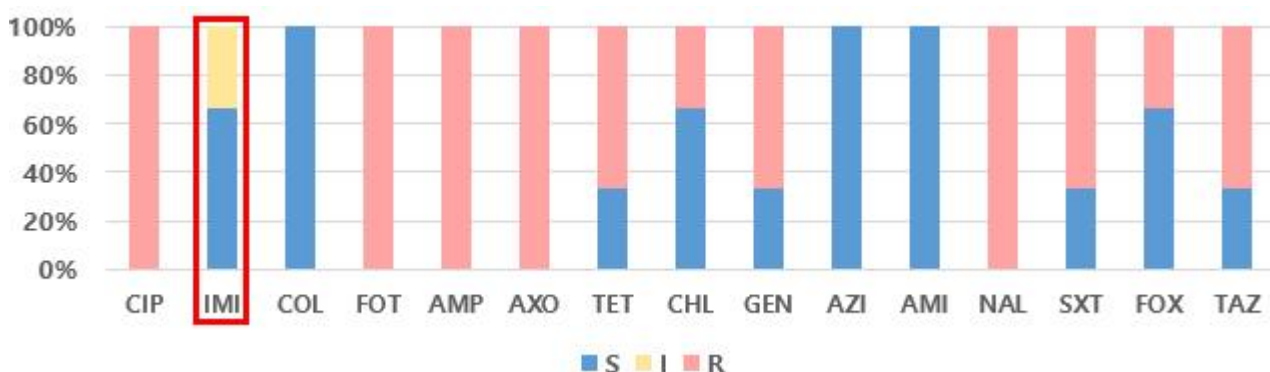
- (해안주변 · 철새서식지) ESBL 1건 분리, 내성유전자 TEM + SHV-11 보유
- (도심공원)
 - Ciprofloxacin(CIP) 1건 분리, codon 83 단일 아미노산 변이(S83I) 확인
 - ESBL & CIP 1건 분리, TEM + CTX-M 내성유전자 보유, codon 83 단일 아미

노산 변이(S83I) 확인

- (MLST 분석 결과) ST37 1건, ST307 2건 확인, ST307은 2014년 국내에서 처음 발생한 후, 2014년 14건에서 2015년에 82건으로 국내에 보고되었으며, 우리원 2019년 연구사업 결과 사람에서 분리된 카바페넴내성균주(CRE) 중 가장 많이 확인된 유전형임*

* 우리원은 「2019년 의료관련감염 CRE 역학 특성조사」를 수행하였고, 분석균주 460건 가운데 62.1%가 ST307 유전형으로 확인되었음

□ *K. pneumoniae* 내성균주에 대한 항생제 감수성 검사결과



- Colistin(COL), Azithromycin(AZI), Amikacin(AMI) 100% 감수성
- Ciprofloxacin(CIP), Cefotaxime(FOT), Ampicillin(AMP), Ceftriaxone(AXO), Nalidixic Acid(NAL) 100% 내성
- *E. coli*는 Imipenem(IMI) 항생제에 100% 감수성을 보였으나, *K. pneumoniae*는 중등내성 1건 확인 ⇒ 카바페넴중등내성균(CIE), KPC-2 카바페넴분해효소(CPE) 보유, 유전형 ST307로 확인되었음
- 우리원은 2018년 동물, 채소, 재배지 토양에서 카바페넴내성장내세균속균종(CRE)에 대한 조사를 실시하였고 검출되지 않아 CRE는 사람에서 주로 순환하고 있으며, 가축에서는 아직 문제가 되지 않고 있는 것으로 추측(단, 검체수 한계가 있어 계속적인 감시 필요)
- CRE는 환자 발생이 증가하면서 2017년 6월 3일 제3급감염병으로 지정하여 관리하고 있는 감염병으로 2017년 5,717명, 2018년 11,954명, 2019년 15,369명, 2020년 18,113명(감염병포털)으로 매년 환자수가 증가하고 있음
- 2020년 사람에서 분리된 CRE(확인진단 의뢰된 건)는 *K. pneumoniae*(65.0%) > *E. coli*(20.1%) > *K. oxytoca*(2.6%) > 기타 20종(12.3%) 순으로 *K. pneumoniae*가 우세하며, 본 연구에서도 우세종인 *K. pneumoniae*에서 확인되었음

IV

연구 결과

- 항생제 사용과 무관한 야생조류를 대상으로 환경요인으로 인한 항생제 내성균 오염실태를 파악하고, 사람-가축(분뇨) 유래 내성균과 역학적 유연관계를 분석하여 내성균의 확산영향을 조사하였음
- 서식지별 야생조류 분변의 항생제 내성균 오염실태 조사 결과 해안가(철새도래지 포함), 도심공원, 구조 야생조류 모두에서 내성균이 확인되었고, 이는 야생조류의 먹이 및 주위 환경이 항생제 내성으로 오염되어 있음을 보여주는 것이며,
- 가축(축분)과 야생조류 유래 ESBL 내성유전자의 타입 분포가 매우 유사한 점과 사람 유래 내성균의 주요 타입인 CTX-M-27이 야생조류에서만 높게 확인된 것으로 볼 때 야생조류가 가축과 사람의 생활 환경에 공통으로 노출되면서 내성유전자의 공유 기회가 많은 것으로 생각됨
- 항생제 감수성 조사로 페니실린계 항생제인 Ampicillin에 가장 높은 내성률 (91.7%)을 확인하였으며, 이는 해당 항생제가 국내 축·수산용으로 가장 많이 사용되어 지속적으로 노출되어왔기 때문으로 보이며, *K. pneumoniae* 내성균 가운데 카바페넴중등내성균(CIE)의 검출은 주로 사람에서만 순환하던 CRE가 지속적인 환자 수 증가 및 누적된 카바페넴 항생제 사용 등으로 야생조류 주변 환경에서도 검출된 것으로 추측되며, 추후 지속적인 감시가 필요함
- 역학적 기원 추정을 위해 MLST법을 사용 유전학적 분석을 실시하였고, 총 39가지 유형의 Sequence type(ST)이 확인되었으며, 그 가운데 13가지는 사람, 채소, 축분에서 분리된 내성균과 동일한 유형으로 내성균의 순환 분포 가능성을 확인하였음

V

결과 활용

- 보도자료 배포, 감염병컨퍼런스 학술포스터 발표 및 학술 논문 게재로 항생제 내성 정보 공유
- 국내 항생제 내성균 분포조사의 일환으로 항생제 내성관리대책 마련을 위한 기초 자료로 활용