



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

**Investigation of
Antibiotic Resistance Gene Transmission
among Cephalosporin-resistant *Escherichia coli*
in Close Contact Environments**

정 유 진

제주대학교 일반대학원

생명공학부 분자생명공학전공

2023년 8월

Investigation of Antibiotic Resistance Gene Transmission among Cephalosporin-Resistant *Escherichia coli* in Close Contact Environments

A Thesis submitted to the graduate school of
Jeju National University in partial fulfillment of
the requirements for the degree of Master of Science
under the supervision of Professor Hyo-yeon Lee

The thesis for the degree of Master of Science
by Yujin Jeong
has been approved by the dissertation committee.

2023. 06.

Chair
Member
Member

Changsook Kim
Hoyeon Lee
Tatsuya Unno



목차

목차	p. 1
LIST OF FIGURES	p. 2
LIST OF TABLES	p. 3
국문 요약	pp. 4~5
Introduction	pp. 6~8
Material & Method	p. 9
<i>Escherichia coli</i> 균주 정보	p. 9
항생제 감수성 테스트	p. 9
PFGE를 이용한 molecular typing 과 plasmid profiling	pp. 9~10
DNA 추출 및 whole genome sequencing	pp. 10~11
WGS 데이터 분석	pp. 11~12
Result & Discussion	p. 13
Antibiotics susceptibility test 결과 분석	pp. 13~14
항생제 내성 <i>E. coli</i> 의 bacteria typing	pp. 15~18
항생제 내성 <i>E. coli</i> 의 plasmid prediction	pp. 19~22
Plasmid mobility 조사	pp. 23~25
항생제 내성 유전자 분포 조사	pp. 26~28
이동성 항생제 내성 유전자 조사	pp. 29~43
Conclusion	p. 44
Acknowledgment	p. 45
Reference	pp. 46~48
Supplementary Information	pp. 49~52
Abstract	pp. 53~54
감사의 글	p. 55

LIST OF FIGURES

Figure 1A. Frequency of antibiotic-resistant bacteria by region (%)	p. 14
Figure 1B. Frequency of multidrug resistance of bacteria by region	p. 14
Figure 2A. PFGE patterns of <i>Xba</i> I-digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing <i>E. coli</i> strains isolated from Gyeongsang region	p. 17
Figure 2B. PFGE patterns of <i>Xba</i> I-digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing <i>E. coli</i> strains isolated from Seoul region	p. 17
Figure 2C. PFGE patterns of <i>Xba</i> I-digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing <i>E. coli</i> strains isolated from Jeolla region	p. 18
Figure 2D. PFGE patterns of <i>Xba</i> I-digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing <i>E. coli</i> strains isolated from Gangwon, Gyeonggi, and Chungcheong region	p. 18
Figure 3A. PFGE patterns of S1 nuclease digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing <i>E. coli</i> strains isolated from Gyeongsang region	p. 21
Figure 3B. PFGE patterns of S1 nuclease digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing <i>E. coli</i> strains isolated from Seoul region	p. 21
Figure 3C. PFGE patterns of S1 nuclease digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing <i>E. coli</i> strains isolated from Jeolla region	p. 22
Figure 3D. PFGE patterns of S1 nuclease digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing <i>E. coli</i> strains isolated from Gangwon, Gyeonggi, and Chungcheong region	p. 22
Figure 4. Plasmid contig size based on plasmid mobility	p. 25
Figure 5. Number of contigs predicted to be plasmid	p. 25
Figure 6. Antibiotic class and resistance mechanism of detected antibiotic resistance genes	p. 27
Figure 7. Antibiotic resistance genes and antibiotic class detected more than 115 times	p. 27
Figure 8. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group I in Gangwon region	p. 34
Figure 9. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group C in Gyeonggi region	p. 36
Figure 10A. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group F in Gyeongsang region	p. 37
Figure 10B. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group G in Gyeongsang region	p. 37
Figure 11A. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group L in Seoul region	p. 39
Figure 11B. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group M in Seoul region	p. 39
Figure 11C. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group N in Seoul region	p. 39
Figure 11D. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group O in Seoul region	p. 39
Figure 11E. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group Q in Seoul region	p. 39
Figure 12A. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group A in Jeolla region	p. 42
Figure 12B. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group E in Jeolla region	p. 42
Figure 12C. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group H in Jeolla region	p. 43
Figure 12D. Synteny of mARG region including <i>sul2</i> , <i>TEM-1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>floR</i> , <i>QnrS1</i> gene in group J in Jeolla region	p. 43
Figure S1. Heatmap of antibiotic resistance patterns of ESBL-producing <i>E. coli</i>	p. 49

LIST OF TABLES

Table 1. Top 16 genes detected 115 times or less	p. 28
Table 2. mARG profile of ESBL-producing <i>E. coli</i> found in Gangwon region..	p. 33
Table 3. mARG profile of ESBL-producing <i>E. coli</i> found in Gyeonggi and Gyeongsang region	p. 35
Table 4. mARG profile of ESBL-producing <i>E. coli</i> found in Seoul region	p. 38
Table 5. mARG profile of ESBL-producing <i>E. coli</i> found in Jeolla region ..	pp. 40~41
Table S1. Information of ESBL-producing <i>E. coli</i>	pp. 50~52

밀접접촉 환경 내 세팔로스포린 내성 대장균의 항생제 내성 유전자 전파 조사

정 유 진

생명공학부 분자생명공학전공
제주대학교 일반대학원
제주대학교

요약

항생제는 박테리아의 성장을 저해하거나 박테리아를 사멸시키기 위해 널리 사용되고 있다. 일부 박테리아는 항생제를 변형시키거나 분해, 배출하고 항생제 표적을 변형시켜 항생제에 내성을 지닌다. 항생제 내성균으로 인한 감염은 치료가 어려우며, 항생제 내성균 및 항생제 내성 유전자(antibiotics resistance gene (ARG))는 강력한 전파력을 가져 인간을 위협하고 있다. 항생제 내성 유전자는 plasmid, integron, transposon 등의 다양한 mobile genetic element (MGE)를 통해 다른 박테리아로 전파된다. 그렇기 때문에 최근 인간, 동물, 환경을 아우르는 One health 관점에서의 항생제 내성 모니터링이 강조되고 있다. 본 연구는 한국에 위치한 20 곳의 농장 및 동물 병원에서 동물, 인간, 환경에서 분리된 extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)을 생성하는 *E. coli* 128 균주를 대상으로 항생제 내성 전파에 대해 조사하였다.

Aztreonam 외 7개의 항생제를 사용하여 Antibiotic susceptibility test (AST)를 진행하였으며, *Xba*I restriction enzyme과 S1 nuclease를 사용하여 Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PGFE)를 진행하였다. 또한 Illumina platform의 Hiseq과 Oxford nanopore technology (ONT) platform의 MinION을 이용해 hybrid sequencing을 진행하였다. Whole genome sequencing data를 가지고 ARG와 MGE, plasmid prediction, plasmid mobility를 조사하였다. 항생제 내성 패턴의 경우 서울 지역을 제외하고 동일한 그룹에 속하는 샘플들끼리 클러스터링 되는 경향이 존재했으며 일부 지역의 경우 그룹 간의 유사한 항생제 내성 패턴을 보이기도 했다. 그룹 내의 샘플 사이에서 항생제 내성균이 전파된 것으로 예측되거나 mobile ARG cassette가 plasmid를 통해 공유되는 것을 확인하였다. 동물, 인간, 환경 간에 공유되는 것이 확인됨에 따라 항생제 내성에 대한 지속적인 관심과 모니터링이 필요하다.

Introduction

항생제는 질병을 예방하고 치료하기 위해 사람을 포함한 동물에게 널리 사용되고 있다. 일반적으로 항생제는 박테리아의 DNA와 RNA, 단백질, 세포벽의 합성 등을 저해해 균의 성장을 방해하거나 균이 사멸하도록 한다[1]. 항생제에 민감하여 사멸하는 균들도 있지만, 일부의 박테리아는 항생제를 변형시키거나 분해 및 배출하고, 항생제 표적을 수정하거나 보호하여 항생제에 저항한다[2]. 항생제 내성 유전자(Antibiotics resistance gene (ARG))는 약 3,000년 전에 형성되었을 것으로 추측되는 영구동토층에서도 발견되며, 항생제 내성은 인간이 항생제를 사용하기 이전부터 자연에서 발생했다는 것을 입증한다[3]. 하지만 항생제가 개발되고 항생제의 사용이 증가하면서 자연스럽게 항생제 내성균과 ARG의 출현 빈도 또한 증가했다[4]. 또한 항생제에 의한 selective pressure로 항생제에 내성을 보이는 박테리아만 살아남고 그 결과 내성균이 환경에서 우점하게 된다[5]. 이로 인해 박테리아로 인한 감염병의 치료가 힘들거나 불가능한 경우가 발생하고 있다.

Penicillin, cephalosporin, monobactam, cabapenam과 같은 β -lactam계 항생제는 전 세계적으로 가장 자주 처방되는 항생제 중 하나이다[6]. 세계보건기구(world health organization: WHO)에서는 penicillin, cephalosporin, carbapenam을 극히 중요한 항생제(critically important antimicrobials (CIAs))로 분류하여 이들 항생제 내성에 대한 관리를 촉구하고 있다[7]. 현재 병원과 지역사회에서 β -lactam계 항생제에 광범위한 저항성을 보이는 extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) 생성 균이 발견되고 있어 큰 우려를 낳고 있다[8-10].

항생제 내성이 위협적인 이유 중 하나는 강력한 전파력 때문이다. 항생제 내성 유전자는 plasmid, insertion sequence, integron, transposon 등의 다양한 mobile genetic element (MGE)를 통해 다른 박테리아로 전파된다[11]. Plasmid는 다른 세균에 쉽게 전파될 수 있는 MGE이며, 항생제 내성 유전자뿐만

아니라 독성 유전자 혹은 기타 적응 인자 등을 이동시킬 수 있고, 다른 MGE와의 조합으로 구성될 수도 있다[12]. 이에 대한 관심으로 동물과 밀접 접촉하는 인간 사이에서 plasmid에 의해 항생제 내성 유전자가 전파됐다는 보고가 지속되고 있다[13, 14]. 동물에게 처리한 항생제는 내성균을 촉발한다. He et al. (2016)은 동물이 배설한 분뇨를 통해 항생제 내성균이 환경으로 유출되어 항생제 내성 전파가 일어난 사례를 보고했다[15]. 이러한 위험성으로 최근 인간, 동물, 환경을 아우르는 One health 관점에서의 항생제 내성 모니터링이 강조되고 있다[16].

항생제 내성 전파를 조사하는 방법으로 항생제 감수성 테스트(Antibiotic susceptibility test; AST)와 pulsed-field gel electrophoresis (PGFE), whole genome sequencing (WGS) 등이 있다[17]. 기존에는 배양 기반의 분석을 주로 시행하였지만, 최근에 NGS 기술의 발전으로 DNA sequence를 분석함으로써 bacteria typing을 포함한 유전체 전체의 분석이 가능하다[18-20]. Bacteria typing을 통해 미생물의 taxonomy identification, 항생제 내성 및 병원성 유전자의 검출 등이 가능하다[21, 22]. 또한 ARG와 MGE에 대한 검출도 가능하다.

농림축산식품부에서 주관한 국가 항생제 사용 및 내성 모니터링 조사 결과에 따르면, 항생제가 가장 많이 판매되는 가축은 돼지이며 가장 적게 판매되는 가축은 소이다[23](Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, et al., 2021). 돼지의 경우 2017년 536톤, 2019년도 507톤, 2021년도 555톤이 가축용 항생제로 판매되었으며, penicillin 계 항생제와 tetracycline계 항생제가 가장 많이 처방됐다[23]. 소의 경우 2017년도 89톤, 2019년도 98톤, 2021년도 97톤 판매되었으며, 주로 처방되는 항생제는 penicillin 계, aminoglycoside 계, tetracycline 계이다. 반려동물에 속하는 개에 대해서는 항생제 내성균에 대한 조사는 시행되었지만, 항생제 판매량은 조사되지 않았다.

한국에서 인간에게 처방된 항생제 사용량의 조사는 건강보험심사평가원에서 운영하는 HIRA 빅데이터 개방 포털(<https://opendata.hira.or.kr/home.do>)을 참조하였다. 의약품 사용 통계에 따르면 처방된 항생제(약효 분류 코드 611~619)는 2020년도 17억 개, 2021년도 17억 개, 2022년도 24억 개이다.

한국은 많은 양의 항생제를 인간, 가축, 반려동물에게 사용하고 있다. 항생제 내성균에 의한 피해를 줄이기 위해 항생제 내성의 전파를 조사할 필요성이 있다.

본 연구에서는 인간, 돼지, 소, 개, 환경 유래 ESBL 생성 *Escherichia coli*를 대상으로 AST와 PGFE, WGS을 수행하여 이들 사이의 항생제 내성의 전파를 조사하는 것을 목적으로 했다. 항생제 내성 패턴과 plasmid profile 및 ARG 분포 조사를 통해 항생제 전파를 밝힘으로써 항생제 내성 모니터링 연구에 도움이 되고자 했다.

Material & Method

Escherichia coli 균주 정보

본 연구는 국립보건연구원 다제내성균 병원체 자원 전문은행에서 병원체자원을 분양받아 수행했다(Table S1). ESBL 생성 *E. coli*는 한국의 다양한 지역(강원도 (n = 18), 경기도 (n = 6), 경상도 (n = 24), 서울 (n = 29), 전라도 (n = 48), 충청도 (n=3))에서 분리되었으며, 사람, 돼지, 소, 개, 환경으로부터 유래했다. 분리된 장소에 따라 그룹을 나누어 총 20개의 그룹으로 구성됐다. 샘플 이름, 분양 번호, 분리 지역 등 균주에 대한 상세 정보는 Table S1. 에 정리되어 있다.

항생제 감수성 테스트

AST는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S27에 따라 disk diffusion 방식으로 수행됐다[24]. 분양받은 *E. coli* isolates를 ampicillin (32µg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)이 함유된 MacConkey agar (Difco™, NJ, USA)에 접종하여 37°C에서 18-24h overnight 배양했다. 이후 single colony를 Mueller Hinton broth(Difco™, USA)에 접종하여 37°C에서 18-24h overnight 배양했다. 배양액을 Mueller Hinton agar (Difco™, USA) plate에 spreading 후 Antimicrobial Susceptibility discs (aztreonam: 30µg/ml, cefoxitin: 30µg/ml, gentamicin: 10µg/ml, nalidixic acid: 30µg/ml, trimethoprim/sulfamethoxazole: 1.25/23.75µg/ml, tetracycline: 30µg/ml, chloramphenicol: 30µg/ml, nitrofurantoin: 300µg/ml) (Oxoid™, USA)를 배치하여 37°C에서 배양했다. 이후 버니어 캘리퍼스를 이용하여 inhibition zones의 크기를 측정했다. AST 패턴 비교를 위해 susceptible, intermediate, resistant를 0, 1, 2로 환산하여, Euclidean 거리를 기반으로 hierarchical clustering을 수행했다.

PFGE를 이용한 molecular typing 과 plasmid profiling

모든 샘플의 PFGE는 CDC PulseNet protocol의 방법에 따라 실시됐다[25].

샘플들을 Muller Hinton 한천 플레이트에 37°C로 14-18 시간동안 배양했으며, 배양된 균을 1% suspension buffer에 희석하여 O.D. 값이 0.8-1이 되도록 조절했다. 이후, 샘플 별로 각각 1:1의 비율로 1 % SeaKem Gold Agarose (Lonza, 50150)와 섞어서 플러그를 만들었다. 플러그의 lysis, washing 과정을 거친 후 효소를 처리했다. 본 실험에서는 molecular typing과 plasmid profiling을 위해서 *Xba*I 제한효소(Takara, 1093A)와 S1 nuclease (Thermo Scientific, EN0321)를 사용했으며, 각각의 플러그에 효소를 처리해준 후 37°C, 실온으로 1시간 반응시켰다[26, 27]. 효소 처리를 마친 플러그를 1% SeaKem Gold Agarose에 loading 했으며, CHEF-DRII system (Bio-rad, 1703615)으로 실험했다.

PFGE condition을 조절하여 두 단계로 나누어 진행했다. 제1단계 PFGE는 initial pulse가 6초, final pulse가 36초였으며 6V/cm의 전압에서 48.5-1,000kb ladder (Bio-rad, 1703635)를 이용하여 진행했다. 제2단계 PFGE는 initial pulse가 1초, final pulse가 3초였으며 6V/cm의 전압에서 8.3-48.5 kb ladder (Bio-rad, 1703707)를 이용하여 진행했다. 겔 사진은 겔 도큐멘테이션 시스템(CANNON, UNOK-8000HS)과 UV Transilluminator (Major science, MUV21-312)를 이용해서 시각화했다. PFGE 밴드들은 8,300bp 부터 7,500bp 씩 증하도록 하여 구간을 나누어 밴드들을 행렬 형태의 데이터로 가공했다. 이후 Euclidean 거리를 기반으로 hierarchical clustering을 수행했다

DNA 추출 및 whole genome sequencing

모든 샘플을 ampicillin(32µg/ml)이 함유된 MacConkey 한천 플레이트에 37°C에서 18-24 시간동안 배양했다. Single colony는 Mueller Hinton 한천 플레이트에 37°C에서 14-18시간 동안 배양됐다. 배양된 균으로부터 Genomic DNA extraction kit (BIONEER, K-3032)를 이용해서 Genomic DNA를 추출했다. 추출된 DNA의 농도와 quality는 Qubit fluorometer (Invitrogen, CA, USA)를 이용해서 측정했다. WGS를 위해 Illumina 플랫폼의 Hiseq과 Oxford nanopore technology (ONT) 플랫폼의 MinION을 사용했다. xGen DNA Library Prep EZ Kit (IDTDNA, 10009821)를 이용해 Illumine-Hiseq 라이브러리를 제작했으며

Macrogen Inc. (Seoul, Korea)에 의뢰하여 HiSeqXten (350bp × 2)으로 시퀀싱했다.

ONT MinION 라이브러리는 Nanopore Native Barcoding Kit (NANOPORE Tech, SQK-NBD112.24), NEBNext FFPE DNA Repair Mix (Biolabs, M6630L), NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module (Bio labs, E7546L), Blunt/TA Ligase Master Mix (Biolabs, M0367L), NEBNext® Quick Ligation Module (Biolabs, E6056L) and NEBNext® Quick Ligation Module (Biolabs, E6056L)를 사용했으며 Nanopore protocol (NANOPORE Tech, NBE_9065_v109_revS_14Aug2019)에 제시된 방법으로 실험했다. 제작한 라이브러리는 MinION 시퀀싱 장치에 loading 되었으며 시퀀싱 장치로써 flow cell R9.4.1 (NANOPORE Tech, FLO-MIN106D)이 사용됐다. Flow cell 사용 전에 활성 상태의 pore 수(> 900)가 충분한지에 관해서 확인했다. 두 가지 종류의 WGS 라이브러리 제작에 있어서 모두 HiAccuBead (AccuGene, Incheon, Korea)를 사용하여 purification을 진행했다.

WGS 데이터 분석

MinION을 통해 생성된 long read 시퀀스의 basecalling은 guppy (ONT, UK)의 high accuracy mode로 진행했다. Hybrid-assembly는 microPIPE [28]를 이용하여 진행되었으며 입력 데이터로써 Illumina-Hiseq 과 ONT-MinION 시퀀스를 모두 사용했다. In-silico bacteria typing을 위해 chromosome contig를 대상으로 mlst (Seemann T, mlst Github <https://github.com/tseemann/mlst>)를 진행했다. Prophage 부위를 검출하기 위해 DBSCAN-SWA를 이용했다[29].

Plasmid contig를 예측하기 위해 Plasclass [30], Plasforest [31], plasmidfinder [32]를 사용하였으며, Plasclass의 plasmid 예측값이 0.75 이상이며 동시에 Plasforest 또는 plasmidfinder에서 plasmid로 예측된 contig를 선별했다. Plasmid의 type 및 이동성을 조사하기 위해 MOB-suite [33]의 mob_typer 기능을 이용했다.

ARG annotation을 위해 시퀀스를 Prodigal [34]을 사용해 유전자 부위를

예측하여 amino acid 서열로 변환했다. ARG를 검출하기 위해 comprehensive antibiotic resistance database (CARD) [35]와 DIAMOND [36]를 이용해 identity 95, subject-cover 40으로 하여 blastp를 진행했다. MGE annotation을 위해 MobileElementFinder [37]를 이용했다. 이후 ARG와 함께 5000 bp이내에 MGE가 위치하는 mobile ARG (mARG) 부위의 시퀀스를 추출하기 위해 In-house 스크립트를 사용했다. 염기서열의 유사도를 바탕으로 계통수를 확인하기 위해 mARG 시퀀스를 mafft [38]를 이용해 align 하였으며, FastTree [39]를 이용해 newick 파일을 만들었다. Prokka [40]를 통해 genome annotaion을 진행하였고, Easyfig [41]를 통해 시각화를 진행했다.

Result & Discussion

Antibiotics susceptibility test 결과 분석

돼지와 사람, 환경 사이 항생제 내성의 전파 여부를 파악하기 위해 AST를 진행했다. 전국적으로 가장 내성 빈도가 높았던 항생제는 Aztreonam으로 128개의 샘플 중 74.8%에서 내성을 보였으며, 그다음으로 tetracycline 67.6%, Trimethoprim/Sulfamethoxazole 50% 순으로 항생제 내성 빈도가 높았다. 또한, 평균적으로 3.4개의 항생제에 내성을 나타내었다.

지역 수준에서, 강원도 그룹은 평균적으로 4.2개의 항생제에 내성을 보이며 다른 지역에 비해 가장 높은 다제내성을 보여주었다(Figure 1A, 1B). 경기도의 경우 모든 샘플에서 aztreonam 내성을 보였으며 다른 지역에 비해 nitrofurantoin이 높게 나타나는 특징이 있다. 경상도의 경우 평균 2.2개의 항생제에 내성을 보이며 전 지역에서 가장 낮은 다제내성을 보여준다.

그룹 A와 J같이 일부 지역에서는 다른 그룹의 간에 유사한 AST 패턴이 관측됐다. 또한, 서울 지역을 제외하고 동일 그룹 내의 샘플들은 서로 유사한 항생제 내성 패턴을 보였다(Figure. S1). 또한 환경 유래 샘플은 인간, 동물 유래 샘플에 비해 항생제 내성이 적게 나타나 항생제 내성을 잃는 방향으로 변이했을 가능성이 있다.

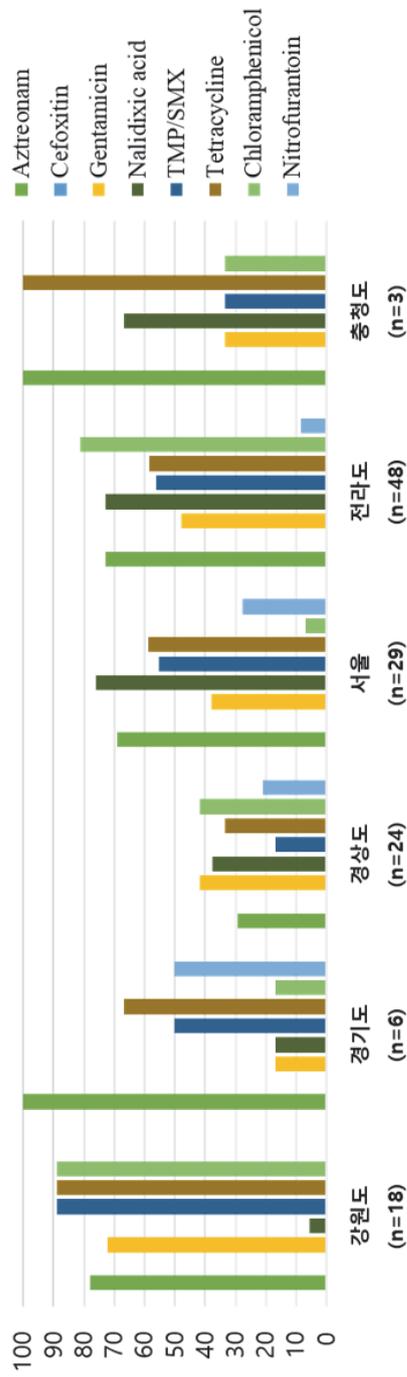


Figure 1A. Frequency of antibiotic-resistant bacteria by region (%)

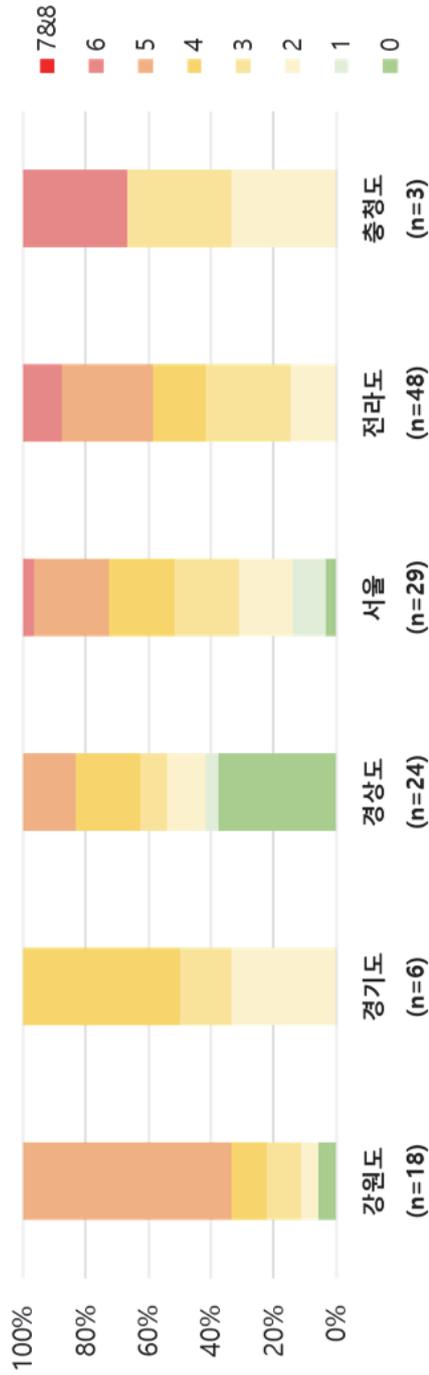


Figure 1B. Frequency of multidrug resistance of bacteria by region

항생제 내성 *E. coli*의 bacteria typing

분리된 균주들의 유전적 유사성을 확인하기 위해 *Xba*I 제한효소 이용한 PFGE와 in-silico 상에서 MLST를 진행했다. 20개의 그룹 중 경상도에 있는 농장은 F와 G이며 *Xba*I 패턴과 sequence type (ST) 은 Figure 2A에 나타냈다. 농장 F의 경우 *Xba*I cluster 1-4에 나누어 분포하며 ST는 58, 101, 410, 641로 총 4종류로 나타났다. 농장 G의 경우 모든 샘플이 ST 117번에 해당하지만 *Xba*I의 패턴에서 돼지에서 분리된 샘플들은 *Xba*I cluster 3에, 환경에서 분리된 GE1은 cluster 4에 속하는 것으로 나타났다. 환경 시료인 GE1은 그룹 내 다른 샘플들과 달리 aztreonam에 대한 내성이 없으며 AST cluster 1에 속했다(Figure S1). Genotype이 다르므로 phenotype인 항생제 내성 역시 다르게 나타났을 가능성이 있다.

서울의 동물 병원에서 분리된 그룹은 그룹 L부터 T까지 총 9개이며, Figure 2B에 나타냈다. 다른 지역과 달리 서울은 그룹 당 샘플 수가 적으며, *Xba*I에서도 일부를 제외하고 그룹끼리 클러스터링 되지 않는 모습을 보여준다. *Xba*I 패턴이 일치한 샘플은 SH1-SH2, OD1-OD2, PH1-PH2이다. 반면 그룹 N, M, O, S와 같이 그룹 내에서 같은 ST를 가지는 경우가 있다. 그러나 대부분의 경우 항생제 내성 패턴은 불일치했다.

전라도 지역의 농장은 A, D, E, H, J, K 4개의 그룹이 속하며 Figure 2C에 나타냈다. 그룹 A의 경우 *Xba*I cluster는 다르게 나타났지만, 돼지 유래 샘플은 모두 ST 10이었으며, 환경 유래 샘플인 AE1은 ST 101 이었다. 그룹 D의 경우 주로 *Xba*I cluster 3에 속했으며 ST 10인 경우가 많았다. DE1, DF7, DF9는 따로 떨어져 있는 모습을 보여준다. AST에서도 DF1-6, DF8은 함께 AST cluster 7에 속했지만, DE1은 가장 내성이 적었으며, DF7과 DF9는 다른 패턴을 보여주었다. 농장 E의 경우 모든 샘플들이 ST 2731이며 환경 샘플인 EE1, EE2와 ES1은 다른 *Xba*I cluster에 속했다. 그룹 H의 경우 모든 샘플이 ST 10562였으며, 환경 샘플인 HE1이 혼자 다른 *Xba*I cluster에 속했다. 그룹 J는 모두 ST 10이며 JH5 혼자 다른 *Xba*I cluster에 속했다. 그룹 K의 경우 음식에서 유래된 샘플들은 ST 648과 *Xba*I cluster 2에 속하였고, 환경 유래인 KE1은 ST 93이었으며 음식 유래 샘플들과 다른 *Xba*I 패턴을 보였다.

강원도, 경기도, 충청도의 경우 단일 그룹으로 구성되어 있어 Figure 2D에 함께 나타냈다. 강원도에 위치한 농장 I는 주로 ST 10, 224, 847로 구성되어 있으며, 환경 유래인 IE1을 제외하고 *Xba*I cluster 1과 2에 위치해 있다. 경기도의 C 농장은 주로 *Xba*I cluster 3과 4에 속하며 다양한 ST을 보여준다. 충청도 B 농장은 서로 다른 *Xba*I cluster와 ST를 보여준다.

다수의 그룹에서 환경 샘플은 동물 샘플과 같은 ST를 지녔음에도 다른 *Xba*I 패턴을 보여주는 경향이 나타났다. 이는 유전적 변이가 일어났음을 의미한다.

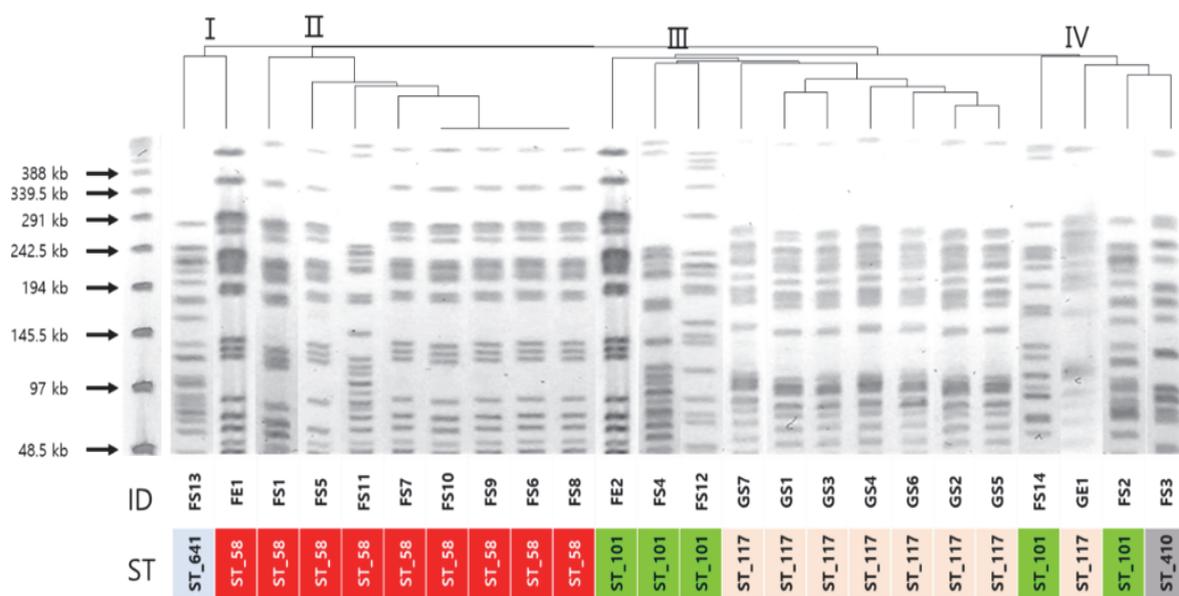


Figure 2A. PFGE patterns of *Xba*I-digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing *E. coli* strains isolated from Gyeongsang region

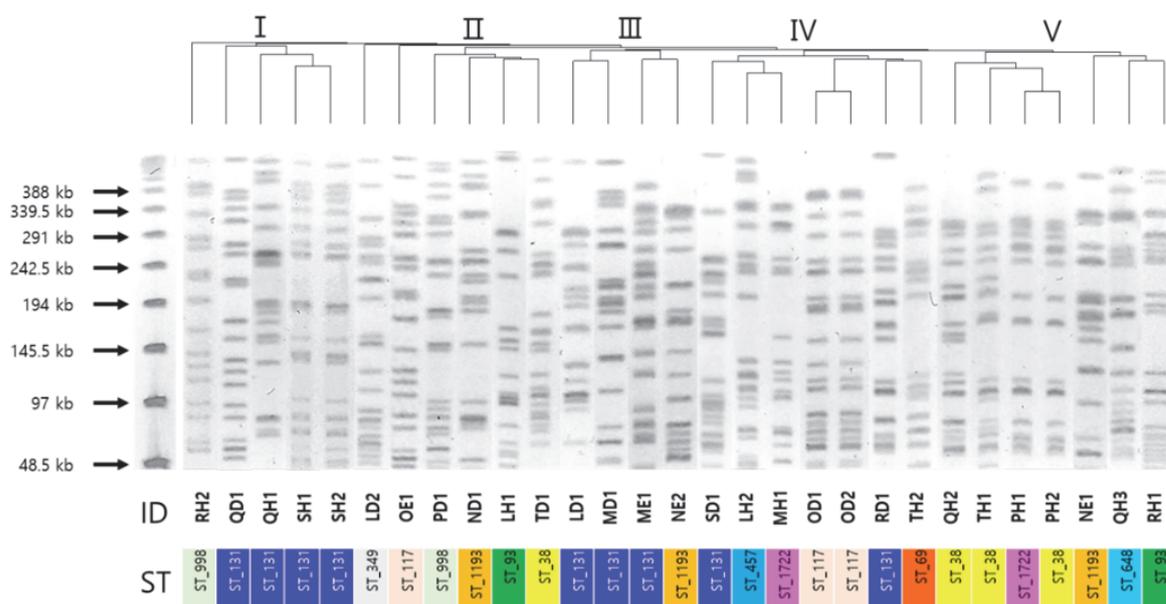


Figure 2B. PFGE patterns of *Xba*I-digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing *E. coli* strains isolated from Seoul region

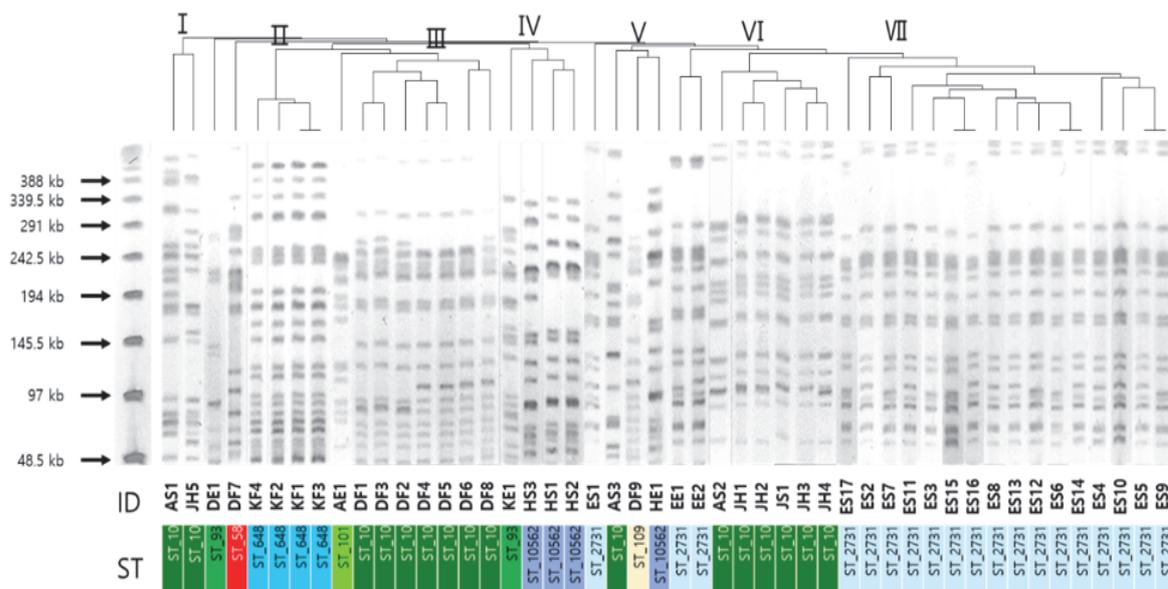


Figure 2C. PFGE patterns of *Xba*I-digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing *E. coli* strains isolated from Jeolla region

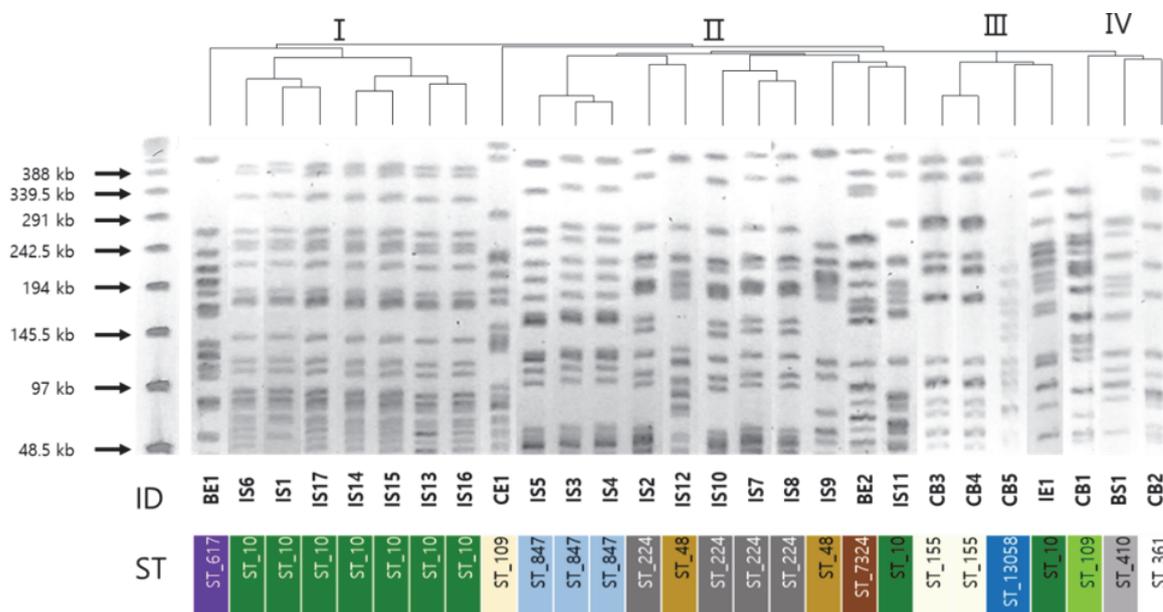


Figure 2D. PFGE patterns of *Xba*I-digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing *E. coli* strains isolated from Gangwon, Gyeonggi, and Chungcheong region

항생제 내성 *E. coli*의 plasmid prediction

Plasmid의 크기와 분포를 확인하기 위해 S1 nuclease를 이용한 PFGE와 WGS 데이터에 대해 in-silico 상에서 plasmid prediction을 진행했다. 경상도에 위치한 농장은 S1 PFGE의 패턴을 클러스터링 하였을 때, 그룹 F와 G가 나누어지는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3A). 대부분의 항생제에 감수성을 보였던 그룹 F의 경우 평균 플라스미드로 예측되는 contig 수는 4.4개로 타 그룹 대비 많은 것으로 나타났다. 주로 약 25 kb, 75 kb, 165 kb 크기의 플라스미드를 보유하고 있었다. 그룹 G의 경우 평균 2.6개의 플라스미드를 지녔으며 주로 약 98 kb와 105 kb 크기의 플라스미드를 보유한 것이 특징이다.

서울에서 S1 PFGE 결과는 *Xba*I PFGE 결과와 달리 하나의 샘플을 제외하고 나머지 샘플들이 다섯 개의 S1 cluster에 속하는 것으로 보인다(Figure 3B). 이는 그룹 내 다른 strain 사이에서도 플라스미드가 공유되는 것을 의미한다. 그룹 N과 O의 경우 그룹 내에서 S1 PFGE 패턴이 일치하는 모습을 보여주었다. 또한, 대다수의 그룹에서 샘플들 사이에 유사한 크기의 플라스미드 밴드가 나타나는 것으로 보아 일부의 플라스미드가 그룹 내 공유되는 것으로 보인다. 플라스미드로 예측되는 contig 수는 그룹 P에서 평균 0.3개로 가장 적었고 그룹 O에서 평균 5.3개로 가장 많았다.

전라도 지역의 경우 S1 cluster가 6개로 나뉘었다(Figure 3C). 그룹 A는 주로 S1 cluster 6에 속하며 환경 샘플인 AE1은 150 kb 부근의 플라스미드가 없고 cluster 5에 속한다. 그룹 D는 주로 cluster 2에 속하며, *Xba*I 패턴과 마찬가지로 DE1, DF7, DF9는 따로 다른 S1 cluster에 속해 있었다. 그룹 E는 cluster 3과 4에 속해 있으며 98 kb와 150 kb 일부의 경우 60 kb의 플라스미드를 지닌 것이 특징이다. H는 cluster5에 속해있으며 23kb의 플라스미드를 지니고 있다. 그룹 J는 모두 cluster 6에 속하며, 150 kb와 98kb, 68 kb과 함께 20 kb~55 kb 사이의 많은 플라스미드를 지녔다는 특징이 있다. 그러나 플라스미드로 예측되는 contig는 평균 2.5개로 실제 S1 PFGE 결과와는 상이했다. 그룹 K의 경우 음식 유래 샘플들은 cluster 1에 속하며, 환경 유래 샘플인 KE1은 cluster 4에 속했다.

강원도, 경기도, 충청도 샘플을 포함한 단일 그룹을 그룹화했다(Figure 3D). 그룹 I의 경우 255 kb의 플라스미드를 보유하는 경우가 있었고 100 kb 이하에서

다양한 크기의 플라스미드가 발견됐다. S1 cluster 1-3에 분포하였으며, 평균 플라스미드 수는 3.5개이다. 그룹 B와 C는 평균 플라스미드의 수가 2개 이하로 plasmid 수가 적은 편에 속하며, 두 그룹은 S1 cluster3에 속했다.

몇몇의 경우에서 WGS을 통한 plasmid typing은 실제 S1 PFGE 결과와 차이를 보였다. 정확도가 높다고 평가되는 hybrid sequencing 기법을 사용하였음에도 이러한 차이가 나타나는 것은 WGS의 한계인 낮은 sequencing accuracy 혹은 낮은 assembly quality와 같은 문제로 인해 read 들이 완벽한 genome으로 assembly 되기는 쉽지 않기 때문으로 보인다[42].

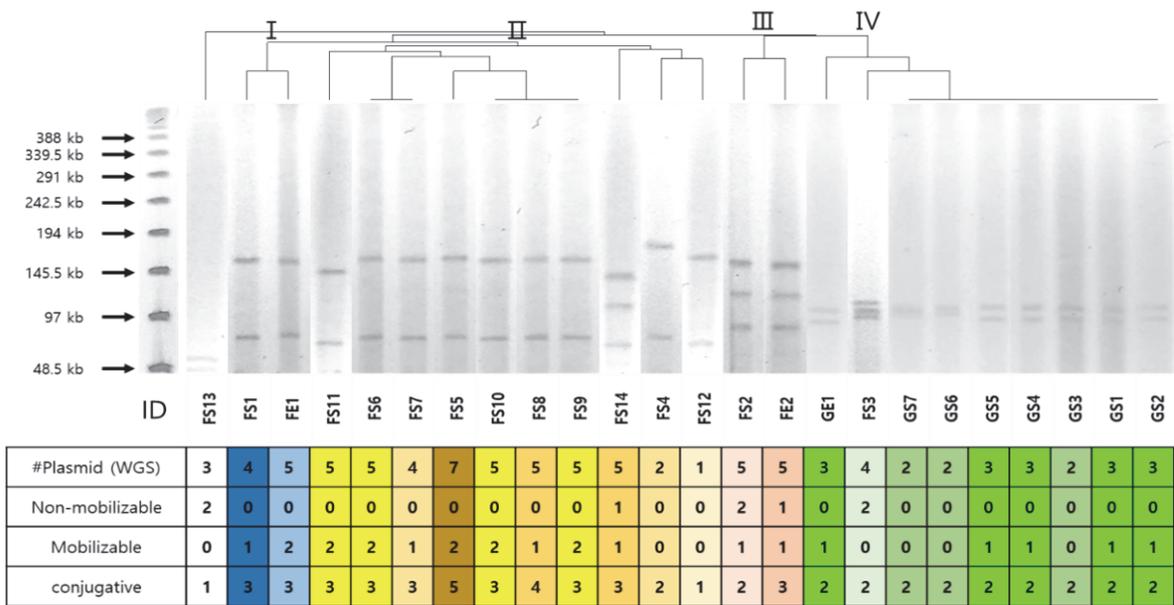


Figure 3A. PFGE patterns of S1 nuclease digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing *E. coli* strains isolated from Gyeongsang region

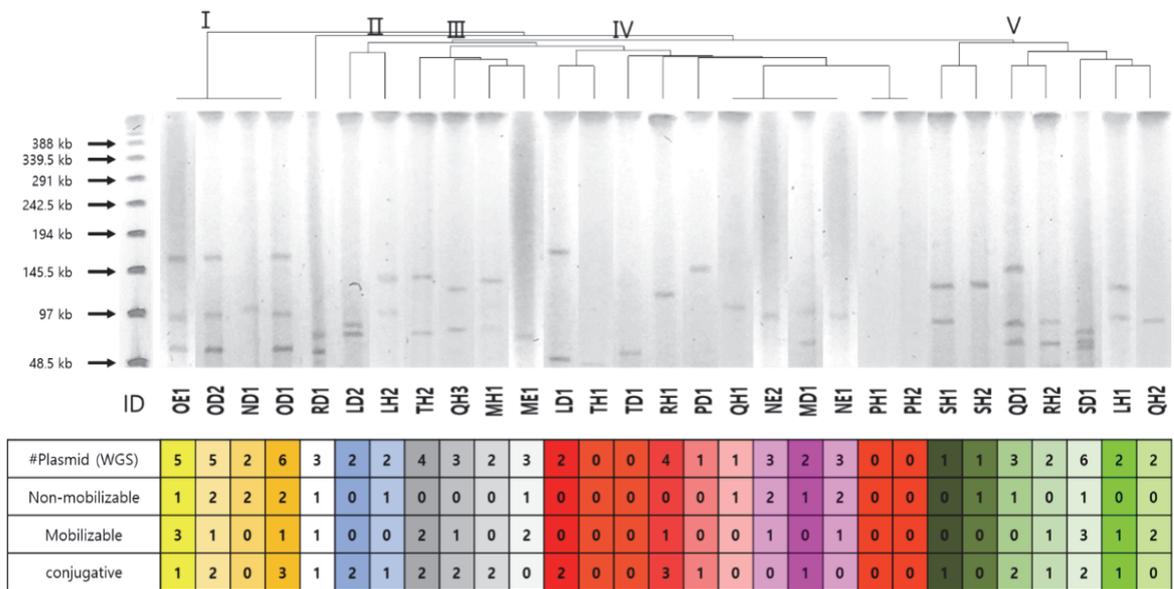


Figure 3B. PFGE patterns of S1 nuclease digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing *E. coli* strains isolated from Seoul region

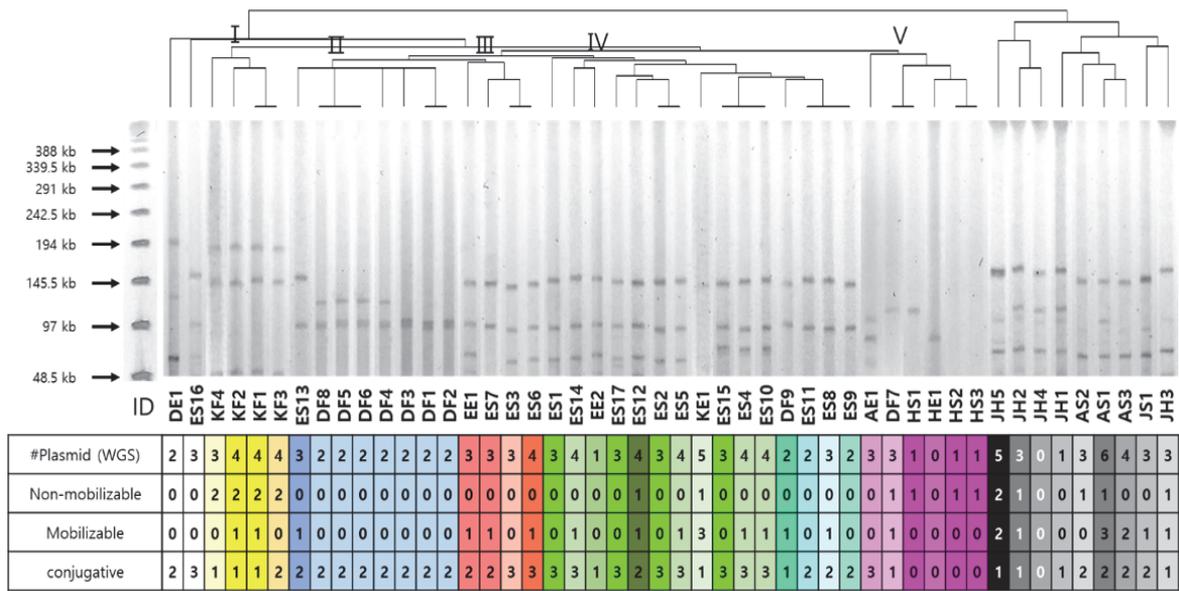


Figure 3C. PFGE patterns of S1 nuclease digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing *E. coli* strains isolated from Jeolla region

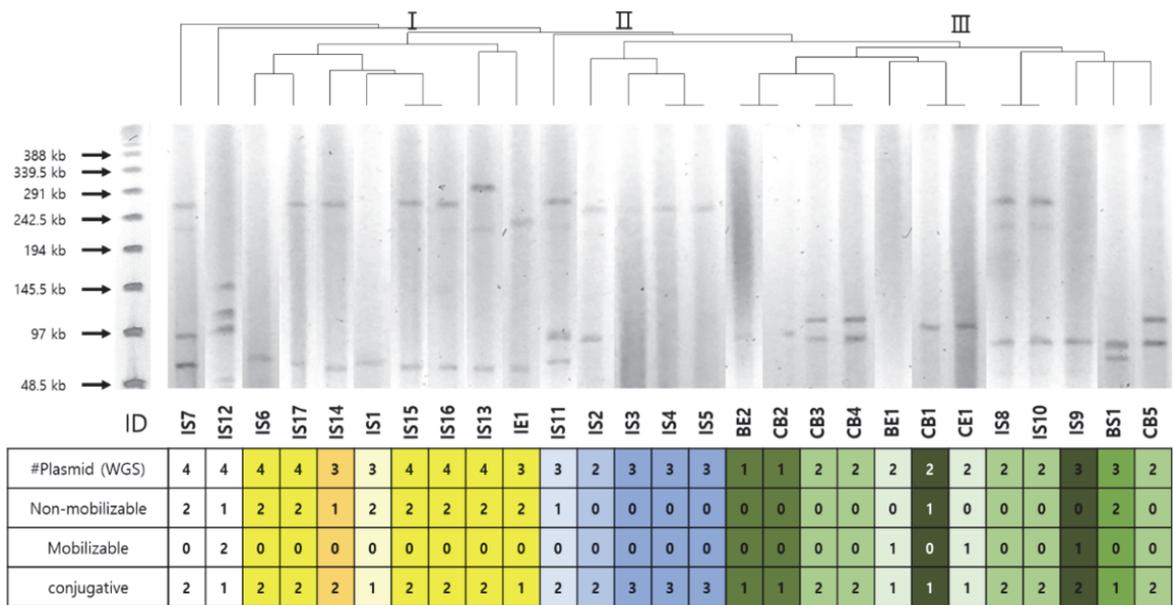


Figure 3D. PFGE patterns of S1 nuclease digested genomic DNA and sequence type of ESBL producing *E. coli* strains isolated from Gangwon, Gyeonggi, and Chungcheong region

Plasmid mobility 조사

본 연구에서 718개의 contig 중 플라스미드로 예측된 contig는 모두 370개였다. Plasmid의 mobility를 조사하였을 때, non-mobilizable plasmid 69개, mobilizable plasmid 78개, conjugative plasmid는 223개가 검출됐다. Non-mobilizable plasmid의 경우 평균 contig 크기는 49.9 kb였으며, 표준편차는 52818.7, 중앙값은 31.8 kb으로 다른 mobility 유형에 비해 비교적 다양한 크기에 걸쳐 분포했다(Figure 4). Mobilizable plasmid의 contig 크기는 평균 18.7 kb, 표준편차 30743.6, 중앙값은 6.6kb로 다른 유형에 비해 주로 작은 사이즈를 지닌 것을 확인했다. Conjugative plasmid의 경우 평균 117.1 kb, 표준편차 52534, 중앙값 106 kb 이며 비교적 큰 크기로 구성된 것을 확인했다. Chris Smillie at al. 이 연구한 플라스미드의 크기와 mobility 사이의 연관성과 일치하는 모습을 보여준다[43]. 이들의 조사에서 Proteobacteria의 플라스미드의 이동성이 non-mobilizable 49 %, mobilizable 23 %, conjugative 28 %의 비율을 보여주었지만, 이번 결과에서는 19 %, 21 %, 60 %로 conjugative plasmid의 비율이 높게 나타났다. 이는 ARG와 같은 박테리아의 생존에 추가적으로 필요한 유전자들이 플라스미드에 분포하며 conjugation을 통해 빈번하게 플라스미드를 공유하는 것과 관련이 있을 수 있다.

Non-mobilizable plasmid를 통한 ARG 전파도 주의해야 한다. “Non-mobilizable” 임에도 conjugation 외의 과정을 통해 다른 박테리아로 전달이 가능하기 때문이다. Non-mobilizable plasmid는 작은 size를 지녔기 때문에 transduction 과 자연적으로 일어나는 transformation 에 유리하다[43].

지역 수준에서 보았을 때, 강원도는 평균 1.1개의 non-mobilizable plasmid와 2개의 conjugative plasmid를 지닌 것으로 보인다(Figure 5). 경기도의 경우 평균 1.8개의 plasmid로 가장 적은 플라스미드를 보유한 것으로 나타났다. AST 결과에서 가장 낮은 내성을 보여주었던 경상도가 평균 3.8개의 플라스미드를 보유한 것으로 보인다. 서울의 경우 conjugative plasmid의 비율이 가장 낮게 나타났다. 서울과 전라도, 충청도는 평균 2.4, 2.8, 2개의 플라스미드를 보유한 것으로 예측된다.

Chromosome에서 검출된 ARG는 5496개, non-mobilizable plasmid은 218개,

mobilizable 39개, conjugative plasmid 820 개였다. 115회 이상 검출되었던 ARG는 모두 chromosome에 위치했다. Non-mobilizable plasmid에서 자주 검출된 ARG는 tet(A) 30.4 %, TEM-1 27.5 %, sul2, APH(3'')-Ia 18.8 %이다. Mobilizable plasmid에서 TEM-1 7.7 % tet(A), APH(6)-Id, floR은 6.4 %로 나타났다. Conjugative plasmid는 다른 유형들보다 ARG를 보유한 경우가 많았으며, 주로 보유한 ARG는 sul2, CTX-M-14, TEM-1, APH(3'')-Ib이다.

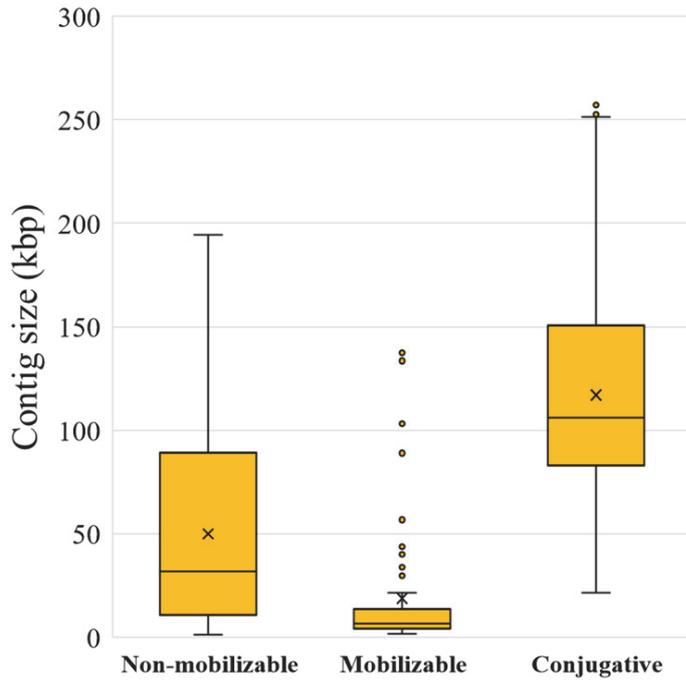


Figure 4. Plasmid contig size based on plasmid mobility

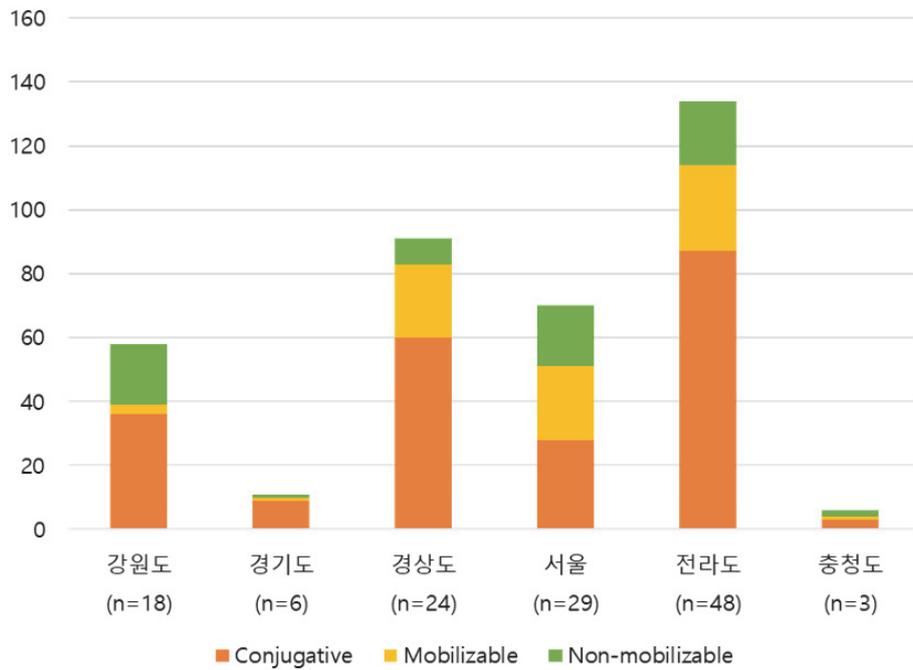


Figure 5. Number of contigs predicted to be plasmid

항생제 내성 유전자 분포 조사

본 연구에서 100종류의 ARG가 6,573개 발견됐다. 많이 검출되는 ARG는 여러 항생제에 내성을 갖게 하는 multi drug resistance (MDR) 계열로 2,917 회 검출되었으며, 그다음으로 aminoglycoside 계, peptide 계, fluoroquinolone 계 항생제 내성 유전자가 뒤를 이었다(**Figure 6**). 검출된 ARG의 항생제 내성 기작 중 항생제를 배출하는 efflux pump 계열 유전자가 4,971개로 가장 많이 나타났으며, antibiotic inactivation, antibiotic target alteration이 뒤를 이었다. 모든 그룹에서 공통적으로 가장 많이 나타난 ARG는 YojI로 총 129회 검출되었으며, 115회 이상 검출된 ARG는 모두 36개였다(**Figure 7**). 이들은 지역과 상관없이 대다수의 균주에서 발견되었기 때문에 항생제 내성 전파 조사에는 부적합하다. 마찬가지로 모든 균주에서 드물게 발견되는 내성 유전자도 발견 빈도가 낮아 내성 전파 조사에는 부적합 하다. 114회 이하로 검출된 ARG 상위 16개 중 6개를 선발하여 ARG 전파를 조사했다(**Table 1**). 선발된 ARG는 sul2, TEM-1, tet(A), APH(6)-Id, floR, QnrS1이다.

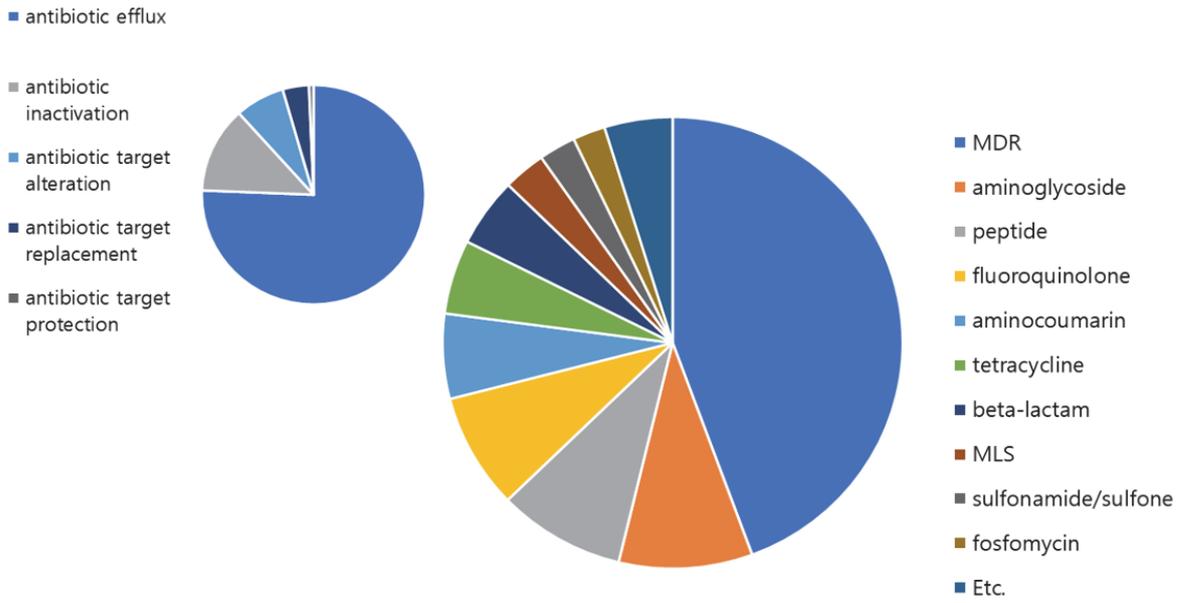


Figure 6. Antibiotic class and resistance mechanism of detected antibiotic resistance genes



Figure 7. Antibiotic resistance genes and antibiotic class detected more than 115 times

Table 1. Top 16 genes detected 115 times or less.

ARG	Detection frequency	Drug class	Mechanism
<i>evgS</i>	114	MDR	antibiotic efflux
<i>mdtO</i>	105	MDR	antibiotic efflux
<i>sul2</i>	103	sulfonamide/sulfone	antibiotic target replacement
<i>mdtM</i>	102	MDR	antibiotic efflux
<i>gadX</i>	88	MDR	antibiotic efflux
<i>Ecol_emrE</i>	85	MLS	antibiotic efflux
<i>TEM-1</i>	82	beta-lactam	antibiotic inactivation
<i>Ugd</i>	78	peptide	antibiotic target alteration
<i>tet(A)</i>	75	tetracycline	antibiotic efflux
<i>APH(6)-Id</i>	73	aminoglycoside	antibiotic inactivation
<i>APH(3'')-Ib</i>	72	aminoglycoside	antibiotic inactivation
<i>CTX-M-14</i>	66	beta-lactam	antibiotic inactivation
<i>floR</i>	64	phenicol	antibiotic efflux
<i>qacEdelta1</i>	44	MDR	antibiotic efflux
<i>EC-14</i>	43	beta-lactam	antibiotic inactivation
<i>QmrS1</i>	42	fluoroquinolone	antibiotic target protection

이동성 항생제 내성 유전자 조사

20개의 그룹 중 그룹 D, P를 제외한 18 그룹에서 93종류의 mARG cassette가 발견됐다. 그중 두 개 이상의 샘플에서 발견된 mARG cassette는 83개였다.

강원도 지역의 그룹 I에서는 18 종의 mARG cassette가 발견됐으며 모두 prophage가 의심되는 contig 상에 위치하였다(Table 2). 주로 *cmlA1, aadA2, dfrA12, QnrS1, tet(A)*와 *floR, QnrS1, tet(A)*, *CTX-M-65, floR, sul2, APH(4)-Ia, AAC(3)-IVa, mef(B), sul3* 그리고 *APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, tet(B)* 으로 네 가지 형태의 mARG cassette가 나타났다. Chromosome 상 동일한 mARG를 갖고 동일한 ST를 보인 IE1, IS1, 6, 13-17은 clonal isolate 일 확률이 높으며 돼지와 환경 간 항생제 내성균이 전파되었다고 볼 수 있다.

경기도에 위치한 농장 C의 경우, 4개의 샘플에서 5 종의 mARG cassette가 발견되었으며, 모두 conjugative plasmid에 위치했다(Table 3). 대표적인 ARG cassette로 *dfrA14, APH(3')-Ia, tet(A)*와 *APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, sul2*가 공통적으로 나타났다. CB3과 CD4는 동일한 *XbaI* 패턴과, ST 및 plasmid profile을 가져 clonal isolates 일 가능성이 있다. 다만 CB3의 경우 CB4와 달리 IS26, *aadA, sul3, IS26, dfrA14, IS26, APH(3')-Ia, IS26, tet(A), IS26, CTX-M-55, ISEc9*를 지닌 conjugative plasmid를 보유한다. IS26, *dfrA14, IS26, APH(3')-Ia, IS26, tet(A)*를 지니는 conjugative plasmid는 CB1, CE1, CB3 사이에서 공유되는데, CE1의 conjugative plasmid가 전달된 후 IS26가 breakpoint로 작용해 *aadA, sul3* gene이 삽입되거나 CB3의 plasmid가 CE1으로 공유된 후 *aadA, sul3* gene을 잃은 것으로 보인다. ARG 전달의 방향은 확인할 수 없지만 소와 환경 사이에서 유전자의 공유가 발생한 것은 확인하였다.

경상도의 경우, F group에서 7개의 mARG cassette에서 공통적으로 나타나는 ARG cassette는 없었다(Table 3). FS3과 FS13은 동일한 *XbaI* 패턴과, ST 및 plasmid profile 모두 그룹 내 다른 샘플들이 불일치하는 모습을 보여주었다. 이들이 chromosome과 non-mobilizable plasmid에 지닌 mARG는 다른 샘플에서 발견되지 않았기 때문에 해당 mARG는 전파하지 않은 것으로 보인다. FS4의 conjugative plasmid에 위치한 mARG과 FS12의 chromosome에 위치한 mARG가 동일한데 이는 conjugation에 의해 plasmid가 전달된 후 chromosome과 일부

통합되었을 가능성이 있다. 다른 가능성으로, FS12는 S1 PFGE 결과와 달리 WGS 상에서 plasmid contig가 하나만 검출되었기 때문에 assembly 시의 오류로 genome이 잘못 조립되었을 가능성도 존재한다. 또한 ST 101인 샘플은 *ISEc8, IS30, ISEc37, IS26, IS5075, sul2, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, TEM-1, Tn2*를 coding 하는 conjugative plasmid를, ST 58인 샘플은 *IS26, APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, sul2, IS26, TEM-1, IS26, dfrA5*을 coding 하는 conjugative plasmid를 공유하는 것으로 보인다. 그룹 G의 경우 모든 샘플이 동일한 *XbaI* 패턴과, ST 및 plasmid profile을 보여주어 항생제 내성 유전자가 수직적으로 전파되었을 것으로 여겨진다. Chromosome 상에 위치한 mARG cassette는 IS5가 삽입된 것을 제외하고 전반적으로 일치하는 모습을 보여주었으며, plasmid 역시 GS7의 conjugative plasmid에 *ISEc9*가 결실을 제외하고 동일한 모습을 보여준다. 이는 환경과 돼지 사이에서 항생제 내성균이 공유되고 있음을 시사한다.

서울 지역의 경우 모든 mARG가 prophage로 의심되는 contig 상에 위치했다(Table 4). 그룹 L의 경우, 공통적으로 나타난 mARG cassette는 *APH(6)-Id, ISKpn19, QnrS1, IS26*로 LD1과 LH1 사이에서 공유된다. IS5075과 IS26의 바깥쪽의 유전자 배열은 서로 다르기 때문에 두 개의 IS 사이에 위치한 유전자는 phage에 의해 전달되었을 가능성이 있다. 그룹 M의 경우 *IS26, dfrA17, aadA5, qacEdelta1, sul1, IS6100, Mrx, mphA, IS26, sul2, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id* 이 MD1과 MH1 사이에서 공유됐다. 그룹 N은 *XbaI* 패턴은 다르지만 ST는 동일하고 모두 non-mobilizable plasmid에 mARG cassette를 지녔다는 공통점이 있다. NE1과 ND1 은 *TEM-1, IS26, AAC(3)-IId, IS26, dfrA17, aadA5, qacEdelta1, sul1, IS6100, Mrx, mphA, IS26, sul2, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, tet(A), IS26, IS26*을 가지고 있고, NE2은 하나의 plasmid 안에 *TEM-1, IS26, AAC(3)-IId, IS26, dfrA17, aadA5, qacEdelta1, sul1, IS6100, Mrx, mphA, IS26* 및 *APH(6)-Id, tet(A), IS26, IS26*을 두 부위에 보유하고 있다. NE2가 synteny 상에서 차이가 나타나는 것은 assembly 오류에 의한 결과이거나 translocation이 일어났을 것으로 의심된다. 그룹 O의 경우 모두 ST117이며 chromosome에 mobile *sul2* 유전자를 가지고 있다. 이 역시 항생제 내성균이 공유되는 것을 의심할 수 있다. 그룹 Q의 경우 NE2의 경우와 같이 QH1의 non-mobilizable plasmid의 두 군데에 위치한 *ISKpn8, IS26, AAC(3)-IId, IS26*과

*APH(6)-Id,tet(A),IS26*이 QD1의 non-mobilizable plasmid에서 발견됐다. 다만 전반적으로 서열 유사도가 높았던 NE2의 경우와 달리 QH1에서는 일부 유전자에 대해서만 서열 유전자가 높았기 때문에 integration보다는 IS 부위에 의한 삽입 혹은 치환이 일어났을 가능성이 높다. 그룹 S와 T의 경우 인간 사이에서만 동일한 mARG 가 나타났다.

전라도 지역의 그룹 A는 AS1과 AS3의 mobilizable plasmid은 거의 동일한 genome context를 보여준다(Table 5). 몇몇의 ARG *TEM-1, sul2, tet(A), floR, APH(6)-Id, APH(3'')-Ia* 등이 MGE와 함께 위치하였으나, 그룹 내에서 전파되는 것으로 판단하기에 힘들다. 돼지 사이에서는 일부 mARG가 공유되나, 환경과 돼지 사이에서는 mARG의 공유가 발견되지 않았다. 그룹 E는 ES12를 제외하고 모두 conjugative plasmid에 위치하며 *tet(A), TEM-1, APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, sul2, dfrA14, Ecol_catIII*로 구성된 mARG cassette와 *FosA3, CTX-M-14, floR, sul2*로 구성된 cassette, *AAC(3)-Via,aadA23,QnrS1* cassette가 그룹 내에서 공유되고 있었다. 두 번째와 세 번째 cassette의 경우 대부분 prophage가 위치한 plasmid에 위치했다. 이들은 *XbaI* 패턴과 ST이 거의 동일하고 plasmid profile도 유사하기 때문에 수직적 유전자 전달이 의심된다. 그룹 H의 경우 *XbaI* 패턴과, ST이 동일하며 plasmid profile 이 유사하다. 또한, H 그룹 샘플들은 chromosome에 prophage 부위와 mARG *IS26,ermB,IS26,TEM-1,IS102,CTX-M-14,ISEc9,QnrS1,ISKpn19,mphA, IS26*를 coding 하고 있으며 이는 clonal isolates일 가능성을 암시한다. 다만 plasmid 에서는 약간의 차이를 보이는데 HS2와 HS3의 non-mobilizable plasmid에 위치한 mARG cassette는 거의 유사하며 HS1에서는 일부분만 일치하는 모습을 보인다. 그룹 J는 mARG가 발견된 모든 plasmid가 prophage 형태이며, *XbaI* 패턴과 ST 이 동일하고 plasmid profile 이 유사하다. JS1과 JH5 사이에서 *ISVsa3,floR,tet(A),APH(6)-Id,APH(3'')-Ib,sul2,TEM-1,IS26*가, JH1과 JH2 사이에서는 *IS26,tet(A),APH(6)-Id,APH(3'')-Ib,sul2,IS26mphA,Mrx,IS6100*가 공유됐다. 돼지와 사람 사이의 항생제 내성균의 전파 혹은 항생제 내성을 지닌 plasmid의 공유로 볼 수 있다. 그룹 K의 경우 *XbaI* 패턴과, ST 및 plasmid profile이 동일하여 clonal isolate로 여겨지고, mARG 또한 KF1-4의 non-mobilizable plasmid에서 동일하게 나타났다. 식품과 환경 사이에서 내성균이 공유되는 것으로 보인다.

마지막으로, 충청도의 경우 BS1의 conjugative plasmid와 non-mobilizable plasmid 사이에서 *folR*, *ISVsa3*가 공유되는 것으로 나타났다. 지역 별로 그룹 수가 다르며 그룹 안의 샘플들의 구성(인간, 환경 등)이 다양해 그룹 간 비교는 불가능 하였다. 하지만, mARG가 돼지와 환경, 돼지와 사람, 개와 사람 사이에서 공유되거나 항생제 내성균 자체가 다른 source(환경, 사람 등) 사이에서도 발견되었다. 또한 대다수의 mARG가 conjugative plasmid 위에서 발견되었다. Conjugative plasmid는 conjugation을 통해 다른 균주로 빈번히 전파 가능하며, conjugative plasmid가 만드는 competence pilus을 사용해 환경에 있는 free DNA를 transformation으로 습득 한다[44]. 이는 균주가 환경에 있는 ARG를 습득할 수 있고, ARG의 습득을 가속화하여 mARG cassette에 추가할 수 있다는 것을 암시한다. 따라서 ARG와 항생제 내성균의 출현을 경계하며 농장 및 병원에서 항생제 내성 모니터링을 지속하여야 한다.

Table 2. mARG profile of ESBL-producing *E. coli* found in Gangwon region

ID	Mobility	mARG context
IS2	Conjugative	<i>cmlA1, aadA2, dfrA12, IS26, QmrSI, ISKpn19, IS26</i>
IE1 IS6,13-17	Conjugative	<i>cmlA1, aadA2, dfrA12, IS26, QmrSI, ISKpn19, tet(A)</i>
IS14,15	Non-mobilizable	ISSen9, IS903, <i>tet(A)</i> , ISKpn19, <i>QmrSI, IS26, IS26, floR, IS26, ISSen15</i>
IS16	Non-mobilizable	ISSen9, IS903, ISKpn19, <i>QmrSI, IS26, IS26, floR, IS26, ISSen15</i>
IS13	Non-mobilizable	IS903, <i>tet(A)</i> , ISKpn19, <i>QmrSI, IS26, IS26, floR, IS26, IS26</i>
IS1	Non-mobilizable	ISSen9, IS903, <i>tet(A)</i> , ISKpn19, <i>QmrSI, IS26, IS26, floR, IS26, IS26</i>
IS17	Non-mobilizable	ISSen9, IS903, <i>tet(A)</i> , ISKpn19, <i>QmrSI, IS26, IS26, IS26, IS26</i>
IE1	Non-mobilizable	ISSen9, IS903, <i>tet(A)</i> , ISKpn19, <i>IS26, IS26, floR, IS26, IS26</i>
IS3-5,7,8,10,11 IS13,17	Conjugative Conjugative	<i>tet(A), IS26, ISKpn19, QmrSI, IS26, dfrA12, aadA2, cmlA1</i>
IS3-5,7,8,10,11 IS12	Conjugative Non-mobilizable	<i>tet(A), IS26, ISKpn19, QmrSI, IS26, IS102, CTX-M-65, IS26, IS26, IS2, ISKpn26, IS421</i>
IS7	Conjugative	<i>CTX-M-65, IS102, Tn6196, IS1006, floR, ISVsa3, sul2, ISAbal, ISEc59, APH(4)-Ia, AAC(3)-IVa, IS26, mef(B), sul3</i>
IS5	Conjugative	ISSen15, <i>CTX-M-65, IS102, Tn6196, IS1006, floR, ISVsa3, sul2, ISAbal, ISEc59, APH(4)-Ia, AAC(3)-IVa, IS26, mef(B), sul3</i>
IE1, IS1-4,6,8,10,11 ,13-17	Conjugative	IS26, <i>CTX-M-65, IS102, Tn6196, IS1006, floR, ISVsa3, sul2, ISAbal, ISEc59, APH(4)-Ia, AAC(3)-IVa, IS26, mef(B), sul3</i>
IS11	Non-mobilizable	<i>APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, IS1133, ISVsa5, tet(B), IS26</i>
IE1 IS1,6,13-17	Chromosome	<i>APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, ISKpn72, tet(B), Tn2, TEM-I, IS1133, Tn6082, ISSen9</i>
IS9	Chromosome	IS102, <i>tet(B), ISVsa5, IS1133, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, IS26, IS26</i>
IS6	Non-mobilizable	ISSen9, IS903, ISKpn19, <i>IS26, IS26, floR, IS26, IS26</i>
IS11	Conjugative	<i>IS26, sul3, IS26, TEM-I</i>

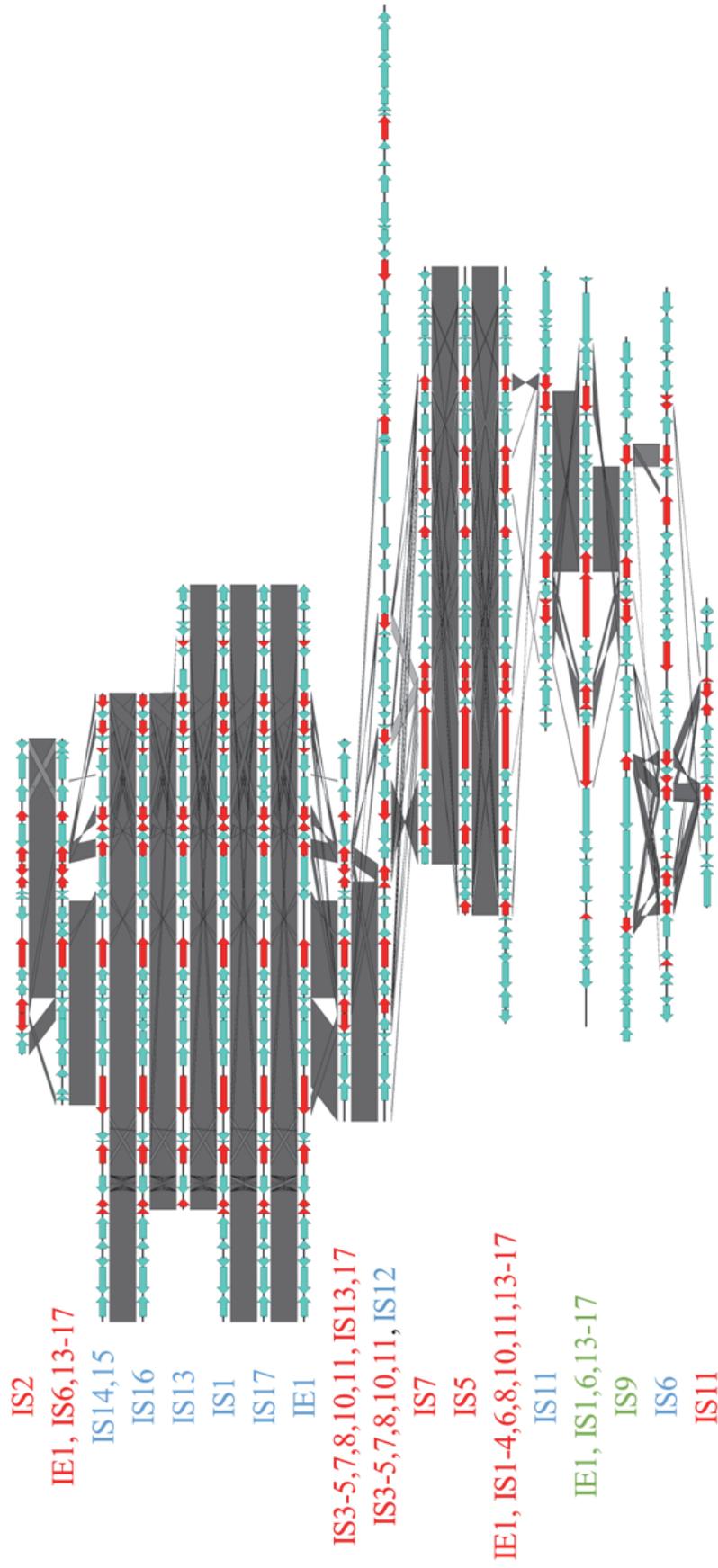


Figure 8. Synteny of mARG region including sul2, TEM-1, tet(A), APH(6)-Id, floR, QmrS1 gene in group I in Gangwon region

Table 3. mARG profile of ESBL-producing *E. coli* found in Gyeonggi and Gyeongsang region

Region	ID	Mobility	mARG context
Gyeonggi	CB1	Conjugative	IS26, <i>dfrA14</i> ,IS26, <i>APH(3')-Ia</i> ,IS26, <i>tet(A)</i>
	CE1	Conjugative	IS26, <i>dfrA14</i> ,IS26, <i>APH(3')-Ia</i> ,IS26, <i>tet(A)</i> ,IS26, <i>CTX-M-55</i> ,IS <i>Ec9</i>
	CB3	Conjugative	IS26, <i>aadA</i> , <i>sul3</i> ,IS26, <i>dfrA14</i> ,IS26, <i>APH(3')-Ia</i> ,IS26, <i>tet(A)</i> ,IS26, <i>CTX-M-55</i> ,IS <i>Ec9</i>
	CB5	Conjugative	IS26, <i>linG</i> , <i>aadA23</i> ,IS26, <i>TEM-1</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>APH(3'')-Ib</i> , <i>sul2</i> ,IS5075,IS26, <i>dfrA14</i> ,IS26, <i>Ecol_catII</i> , <i>APH(3')-Ia</i> ,IS26, <i>CTX-M-55</i> ,IS <i>Ec9</i>
	CB3, 4	Conjugative	IS26, <i>APH(6)-Id</i> , <i>APH(3'')-Ib</i> , <i>sul2</i> ,IS26, <i>TEM-1</i> ,IS26
	FS13	Chromosome	IS26, <i>sul1</i> , <i>qacEdelta1</i> , <i>aadA2</i> , <i>dfrA12</i> ,IS26, <i>sul2</i> ,IS <i>Vsa3</i> ,IS26,IS26, <i>tet(A)</i> ,IS26
	FS3	Chromosome	IS26,IS <i>Aba1</i> , <i>sul2</i> ,IS <i>Vsa3</i> , <i>floR</i>
	FS3	Non-mobilizable	<i>TEM-1</i> ,IS26, <i>AAC(3)-IIId</i> ,IS26, <i>linG</i> , <i>aadA17</i>
	FS13	Non-mobilizable	IS <i>Sen9</i> ,IS903, <i>Tn4656</i> , <i>QnrS1</i> , <i>Tn2</i> , <i>TEM-1</i> ,IS26,IS <i>Sen9</i> , <i>aadA</i> ,IS <i>Vsa3</i> , <i>floR</i> , <i>tet(A)</i> , <i>Tn2</i> , <i>TEM-1</i>
	FS4 FS12	Conjugative Chromosome	IS <i>Ec8</i> ,IS30,IS <i>Ec37</i> , <i>tet(A)</i> ,IS26,IS26
Gyeongsang	FE1 FS1,5-11	Conjugative	IS <i>Ec8</i> ,IS30,IS <i>Ec37</i> ,IS26,IS5075, <i>sul2</i> , <i>APH(3'')-Ib</i> , <i>APH(6)-Id</i> , <i>TEM-1</i> , <i>Tn2</i>
	FE2 FS2,14	Conjugative	IS26, <i>APH(6)-Id</i> , <i>APH(3'')-Ib</i> , <i>sul2</i> ,IS26, <i>TEM-1</i> ,IS26, <i>dfrA5</i>
	GS2,5,7	Chromosome	<i>APH(6)-Id</i> , <i>APH(3'')-Ib</i> , <i>sul2</i> ,IS <i>Vsa5</i> ,IS <i>Ec30</i> ,IS5
	GE1 GS1,3,4,6	Chromosome	<i>APH(6)-Id</i> , <i>APH(3'')-Ib</i> , <i>sul2</i> ,IS <i>Vsa5</i> ,IS <i>Ec30</i>
	GS7	Conjugative	<i>TEM-1</i> ,IS <i>Cfr1</i> , <i>AAC(3)-IIId</i> ,IS26,IS102, <i>CTX-M-14</i>
	GE1 GS1-6	Conjugative	<i>TEM-1</i> ,IS <i>Cfr1</i> , <i>AAC(3)-IIId</i> ,IS26,IS102, <i>CTX-M-14</i> ,IS <i>Ec9</i>

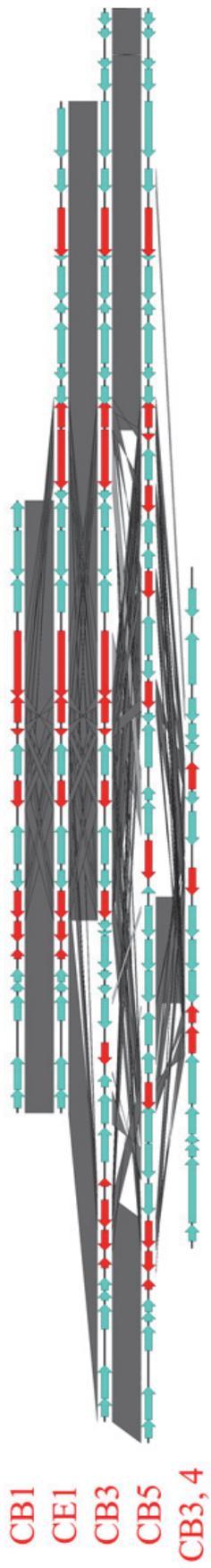


Figure 9. Synteny of mARG region including sul2, TEM-1, tet(A), APH(6)-Id, floR, QnrS1 gene in group C in Gyeonggi region

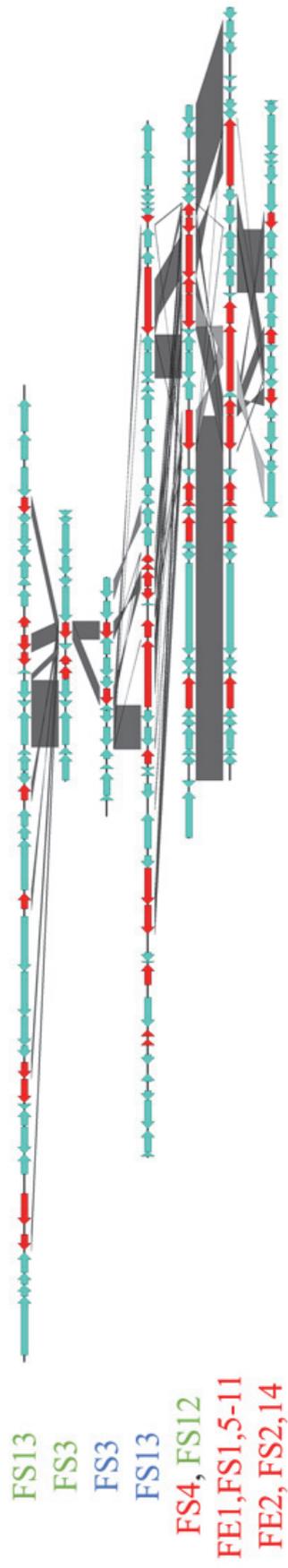


Figure 10A. Synteny of mARG region including sul2, TEM-1, tet(A), APH(6)-Id, floR, QnrS1 gene in group F in Gyeongsang region

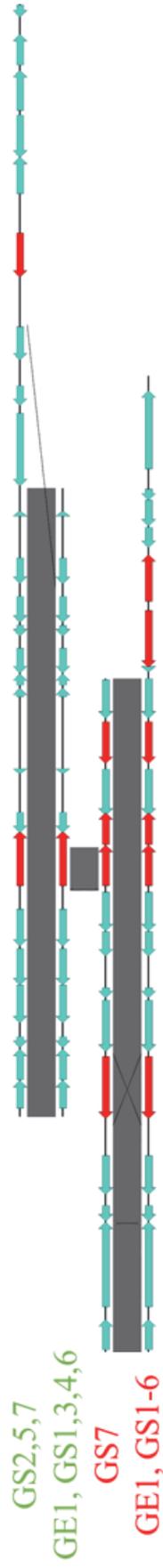


Figure 10B. Synteny of mARG region including sul2, TEM-1, tet(A), APH(6)-Id, floR, QnrS1 gene in group G in Gyeongsang region

Table 4 mARG profile of ESBL-producing *E. coli* found in Seoul region

ID	Mobility	mARG context
LD1	Conjugative	ISSen9,ISSm1, Tn5403, tet(A), IS26, mphA, Mrx, IS6100, sul1, qacEdelta1, aadA5, dfr-A17, IS26
LH2	Conjugative	IS26, AAC(3)-Ile, IS26, floR, ISVsa3, aadA, sul3, IS26, APH(3')-Ia, IS26, aadA23, linG, IS26, tet(A), IS26, CTX-M-55, ISec9
LD1	Conjugative	ISSen15, IS5075, sul2, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, ISKpn19, QnrSI, IS26
LH1	Mobilizable	IS26, IS5075, APH(6)-Id, ISKpn19, QnrSI, IS26
MD1	Non-mobilizable	IS26, dfr-A17, aadA5, qacEdelta1, sul1, IS6100, Mrx, mphA, IS26, sul2, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, tet(A), IS26, ISSen9
MH1	Conjugative	IS26, dfr-A17, aadA5, qacEdelta1, sul1, IS6100, Mrx, mphA, IS26, sul2, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id
NE2	Non-mobilizable	TEM-1, IS26, AAC(3)-IId, IS26, dfr-A17, aadA5, qacEdelta1, sul1, IS6100, Mrx, mphA, IS26
NE1 ND1	Non-mobilizable	TEM-1, IS26, AAC(3)-IId, IS26, dfr-A17, aadA5, qacEdelta1, sul1, IS6100, Mrx, mphA, IS26, sul2, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, tet(A), IS26, IS26
NE2	Non-mobilizable	APH(6)-Id, tet(A), IS26, IS26
OD1	Chromosome	IS2, IS5, sul2, ISKpn72, tet(B), IS2, IS5, sul2
OE1 OD2	Chromosome	IS2, IS5, sul2
QH1	Non-mobilizable	ISKpn8, IS26, AAC(3)-IId, IS26, TEM-1, ISSen9, IS5, ISSen9
QD1	Non-mobilizable	ISSen9, IS26, ISSen8, IS26, AAC(3)-IId, IS26, IS6100, Mrx, mphA, IS26, sul2, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, tet(A), IS26, TEM-1, IS26, ISSbo1, ISSen9, IS5
QH1	Non-mobilizable	APH(6)-Id, tet(A), IS26, ISSen9, ISec52

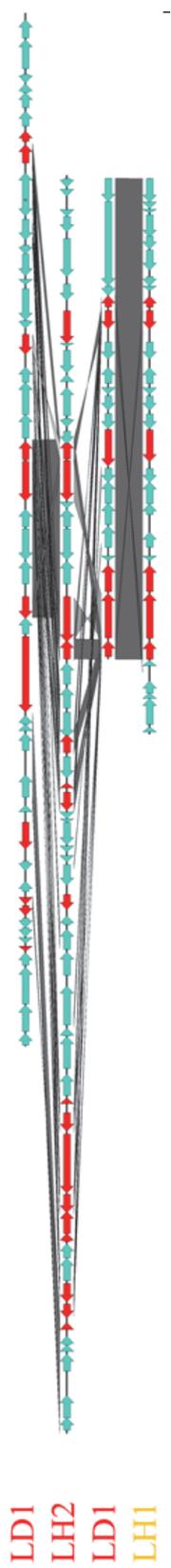


Figure 11A. Synteny of mARG region including sul2, TEM-1, tet(A), APH(6)-Id, floR, QnrS1 gene in group L in Seoul region

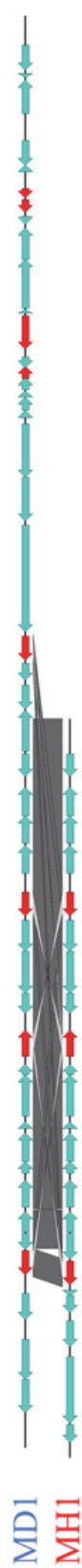


Figure 11B. Synteny of mARG region including sul2, TEM-1, tet(A), APH(6)-Id, floR, QnrS1 gene in group M in Seoul region

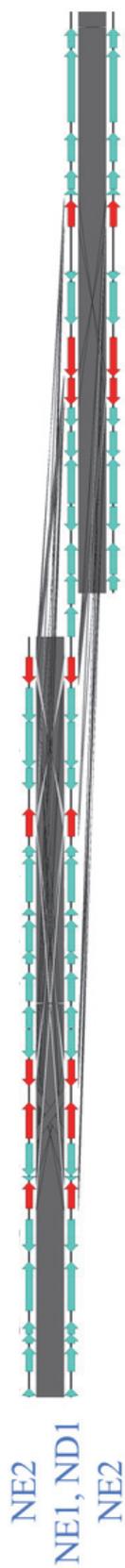


Figure 11C. Synteny of mARG region including sul2, TEM-1, tet(A), APH(6)-Id, floR, QnrS1 gene in group N in Seoul region

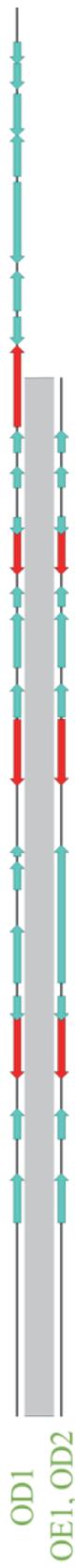


Figure 11D. Synteny of mARG region including sul2, TEM-1, tet(A), APH(6)-Id, floR, QnrS1 gene in group O in Seoul region

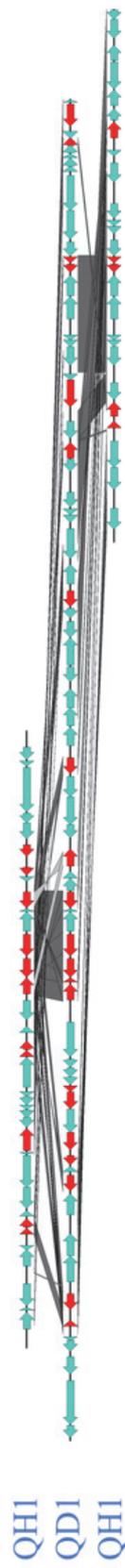


Figure 11E. Synteny of mARG region including sul2, TEM-1, tet(A), APH(6)-Id, floR, QnrS1 gene in group Q in Seoul region

Table 5 mARG profile of ESBL-producing *E. coli* found in Jeolla region

ID	Mobility	mARG context
AS2	Non-mobilizable	ISSen15, TEM-1, sul2
AS3	Mobilizable	<i>tet(A)</i> , <i>floR</i> , IS <i>Vsa3</i> , IS26, IS903, ISSen9, ISSen8, IS26, TEM-1, sul2, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id
AS1	Mobilizable	IS903, IS903, ISSen9, ISSen8, IS26, TEM-1, sul2, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, <i>tet(A)</i> , <i>floR</i> , IS <i>Vsa3</i> , IS26
AE1	Conjugative	IS26, <i>floR</i> , IS1006, Tn6196, IS26, APH(3'')-Ia, APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, ISKpn72, <i>tet(B)</i> , IS26, sul2, ISSbo1
AS1	Non-mobilizable	IS26, ISSen9, ISSen9, Tn801, TEM-1
HS1	Non-mobilizable	<i>aadA2</i> , <i>dfrA12</i> , Tn6196, IS1006, <i>floR</i> , IS <i>Vsa3</i> , sul2, IS <i>Aba1</i> , IS26, TEM-1
HS2	Non-mobilizable	IS26, IS1006, <i>floR</i> , IS <i>Vsa3</i> , sul2, IS <i>Aba1</i> , IS26
HS3	Non-mobilizable	IS1006, <i>floR</i> , IS <i>Vsa3</i> , sul2, IS <i>Aba1</i> , IS26, TEM-1
HE1 HS1-3	Chromosome	IS26, <i>ErmB</i> , IS26, TEM-1, IS102, CTX-M-14, ISEc9, <i>QnrS1</i> , ISKpn19, <i>mphA</i> , IS26
JH5	Mobilizable	ISSen8, ISSen9, IS903, IS26, IS <i>Vsa3</i> , <i>floR</i> , <i>tet(A)</i> , APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, sul2, TEM-1, IS26
JS1	Mobilizable	ISSen8, IS26, TEM-1, sul2, APH(3'')-Ib, APH(6)-Id, <i>tet(A)</i> , <i>floR</i> , IS <i>Vsa3</i> , IS26, IS903, ISSen9
JH1	Conjugative	IS26, <i>tet(A)</i> , APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, sul2, IS26 <i>mphA</i> , <i>Mrx</i> , IS6100, sul1, <i>qacEdelta1</i> , IS26, ISSen9
JH2	Non-mobilizable	IS5, ISSen9, ISSbo1, IS26, TEM-1, IS26, <i>tet(A)</i> , APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, sul2, IS26, <i>mphA</i> , <i>Mrx</i> , IS6100, IS26, ISSen8, IS26, IS26, IS26, ISSen9
KF1-4	Non-mobilizable	TEM-1, ISSen9

ES8	Conjugative	<i>tet(4)</i> , IS26, ISSen9, IS26
EE2	Conjugative	<i>tet(4)</i> , IS26, ISSen9, IS26, TEM-1, APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, sul2, IS26
ES14	Conjugative	<i>tet(4)</i> , IS26, ISSen9, IS26, TEM-1, APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, sul2, IS5075, IS26, dfrA14
ES16	Conjugative	<i>tet(4)</i> , IS26, ISSen9, IS26, TEM-1, APH(3'')-Ib, IS5075, IS26, dfrA14, IS26, Ecol_catII, IS26, ISSen9
ES1,2,4,5,10,11,13	Conjugative	<i>tet(4)</i> , IS26, ISSen9, IS26, TEM-1, APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, sul2, S5075, IS26, dfrA14, IS26, Ecol_catII, IS26, IS26, ISSen9
ES17	Conjugative	IS26, ISSen9, IS26, TEM-1, APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, IS5075, IS26, dfrA14, IS26, Ecol_catII, IS26, ISSen9
ES3,6,7,12,15 EE1	Conjugative	IS26, ISSen9, IS26, TEM-1, APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, sul2, IS5075, IS26, dfrA14, IS26, Ecol_catII, IS26, ISSen9
ES8	Conjugative	TEM-1, APH(6)-Id, APH(3'')-Ib, sul2, IS5075, IS26, dfrA14, IS26, Ecol_catII, IS26, ISSen9
EE2	Conjugative	IS26, FosA3, CTX-M-14, IS26, floR, ISVsa3, sul2, IS5075, IS26, ISSen9
ES9	Conjugative	IS26, FosA3, CTX-M-14, IS26, floR, ISVsa3, sul2
ES8	Conjugative	IS26, FosA3, CTX-M-14, IS26, floR, ISVsa3, IS26
ES1-7,9-17 EE1	Conjugative	IS26, FosA3, CTX-M-14, IS26, floR, ISVsa3, sul2, IS26
ES5,6,10,14,16,17	Conjugative	IS26, AAC(3)-Via, aadA23, IS26, QnrSI, ISKpn19
ES1, 3	Conjugative	AAC(3)-Via, aadA23, IS26, QnrSI, ISKpn19
ES2	Conjugative	AAC(3)-Via, aadA23, IS26, QnrSI, ISKpn19
ES12	Non-mobilizable	AAC(3)-Via, aadA23, IS26, QnrSI, IS26
ES4,15	Conjugative	QnrSI, IS26, aadA23, AAC(3)-Via, IS26

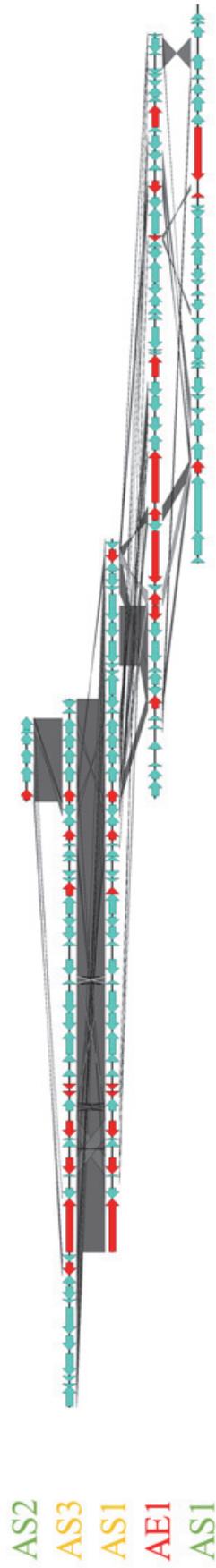


Figure 12A. Synteny of mARG region including *sul2*, *TEM-1*, *tet(A)*, *APH(6)-Id*, *floR*, *QnrS1* gene in group A in Jeolla region

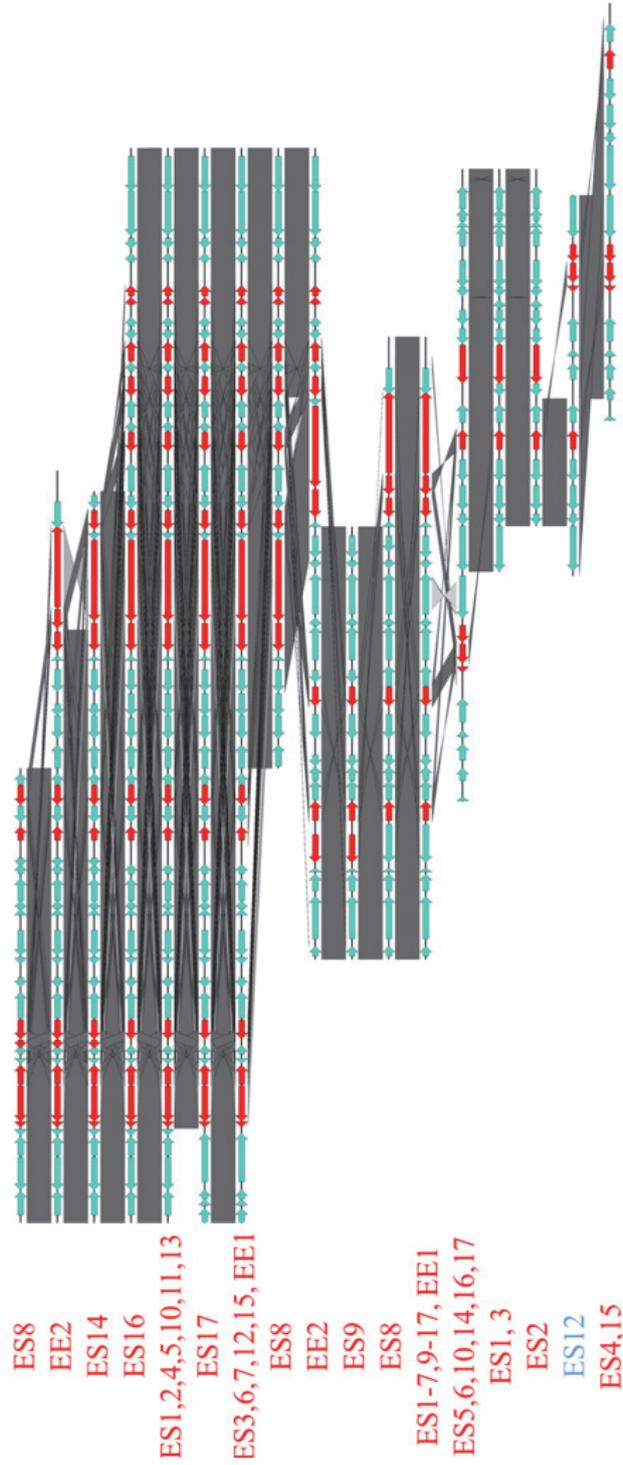


Figure 12B. Synteny of mARG region including *sul2*, *TEM-1*, *tet(A)*, *APH(6)-Id*, *floR*, *QnrS1* gene in group E in Jeolla region

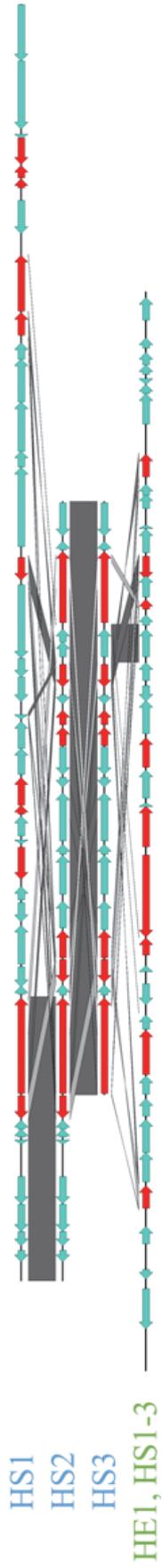


Figure 12C. Synteny of mARG region including *sul2*, *TEM-1*, *tet(A)*, *APH(6)-Id*, *floR*, *QnrS1* gene in group H in Jeolla region

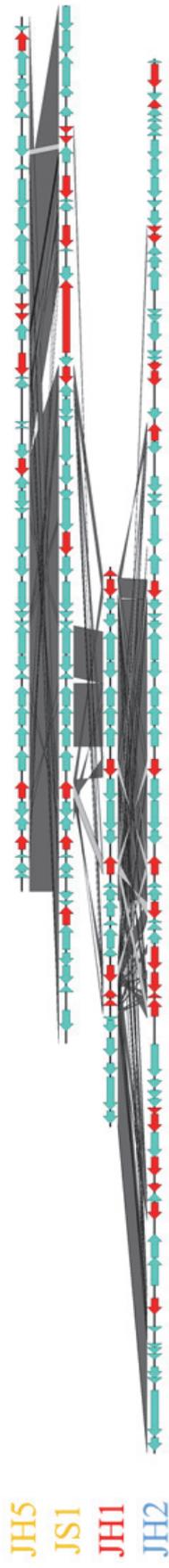


Figure 12D. Synteny of mARG region including *sul2*, *TEM-1*, *tet(A)*, *APH(6)-Id*, *floR*, *QnrS1* gene in group J in Jeolla region

Conclusion

대한민국 소재의 농장 및 동물 병원 20 곳에서 분리된 128개의 ESBL-producing *E. coli* 분양 균주에 대하여 AST와 PFGE 및 WGS를 진행하여 항생제 내성 조사와 bacteria typing, plasmid profiling을 수행하였다. 항생제 내성 패턴의 경우 서울 지역을 제외하고 동일한 그룹에 속하는 샘플들끼리 그룹화되는 경향이 존재했으며 일부 지역의 경우 그룹 간의 유사한 항생제 내성 패턴을 보이기도 했다. Plasmid mobility 분석에서, 기존의 알려진 Proteobacteria 조사 결과와 달리 항생제 내성을 보이는 *E. coli*의 경우 conjugative plasmid의 비중이 2배 이상 높게 나타났다. 그룹 E, H, K 와 같이 일부 그룹의 경우 그룹 내에서 동일한 *Xba*I PFGE 패턴과 ST, S1 PFGE 패턴을 보여주는 경우가 존재했다. 이들은 공통 조상에서 분화된 것으로 여겨지며, genome 중 일부가 translocation 되거나 IS와 같은 MGE가 삽입된 것을 확인하였다. 또한 chromosome과 plasmid 사이, plasmid와 plasmid 사이에서 mARG cassette가 공유되고 있음을 확인하였다. 다만 JH1의 conjugative plasmid와 JH2의 non-mobilizable plasmid와 같이 IS 둘러싸인 ARG cassette가 공유된 것은 알지만 어떻게 박테리아 간에 transposone이 작동하는지, 혹은 phage에 의해 옮겨갔는지 명확하게 해석하기 쉽지 않다. NE1의 plasmid가 2개의 plasmid가 cointegrate 된 후 전파된 것인지, NE2에서 plasmid가 2개로 분리된 것인지 단순 assembly 오류인지 확인하는 것은 어렵다. 문제를 해결하기 위해서 contig 수준의 genome 비교가 필요할 것으로 사료된다. 또한 항생제 내성 유전자 및 항생제 내성균이 동물, 인간, 환경 간에 전파되는 것이 확인됨에 따라 지속적인 모니터링이 필요하다.

Acknowledgment

이 연구는 2020년도 질병관리청의 재원으로 OneHealth ‘항생제내성균 포털시스템 구축을 위한 다분야유래 항생제 내성 유전체데이터 통합분석’의 지원을 받아 수행된 연구임(2020-ER5408-00). 본 연구는 국립보건연구원 다제내성균 병원체자원전문은행에서 제공한 병원체자원(NCCP NMS1179 외 127 균주)을 이용하여 수행했다.

Reference

1. Kohanski, M.A., D.J. Dwyer, and J.J. Collins, How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 2010. 8(6): p. 423-435.
2. Peterson, E. and P. Kaur, Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in microbiology*, 2018. 9: p. 2928.
3. D'Costa, V.M., et al., Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 2011. 477(7365): p. 457-461.
4. Malik, B. and S. Bhattacharyya, Antibiotic drug-resistance as a complex system driven by socio-economic growth and antibiotic misuse. *Scientific reports*, 2019. 9(1): p. 1-12.
5. Mulvey, M.R. and A.E. Simor, Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? *Cmaj*, 2009. 180(4): p. 408-415.
6. Bush, K. and P.A. Bradford, β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2016. 6(8): p. a025247.
7. Organization, W.H., Critically important antimicrobials for human medicine. 2019.
8. Goyal, D., et al. Risk factors for community-acquired extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae infections—A retrospective study of symptomatic urinary tract infections. in *Open forum infectious diseases*. 2019. Oxford University Press US.
9. Tornberg-Belanger, S.N., et al., Antimicrobial resistance including Extended Spectrum Beta Lactamases (ESBL) among *E. coli* isolated from kenyan children at hospital discharge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2022. 16(3): p. e0010283.
10. Widodo, A., M.H. Effendi, and A.R. Khairullah, Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* from livestock. *Sys Rev Pharm*, 2020. 11(7): p. 382-392.
11. Partridge, S.R., et al., Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 2018. 31(4): p. e00088-17.
12. Coluzzi, C., et al., Evolution of plasmid mobility: origin and fate of conjugative and nonconjugative plasmids. *Molecular Biology and Evolution*, 2022. 39(6): p. msac115.
13. Zhao, Y., et al., Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2021. 51(19): p. 2159-2196.
14. Khezri, A., E. Avershina, and R. Ahmad, Plasmid identification

and plasmid-mediated antimicrobial gene detection in Norwegian isolates. *Microorganisms*, 2020. 9(1): p. 52.

15. He, L.-Y., et al., Discharge of swine wastes risks water quality and food safety: antibiotics and antibiotic resistance genes from swine sources to the receiving environments. *Environment international*, 2016. 92: p. 210-219.

16. Hernando-Amado, S., et al., Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature microbiology*, 2019. 4(9): p. 1432-1442.

17. Lee, K., D.-W. Kim, and C.-J. Cha, Overview of bioinformatic methods for analysis of antibiotic resistome from genome and metagenome data. *Journal of Microbiology*, 2021. 59: p. 270-280.

18. Ng, P.C. and E.F.J.G.v. Kirkness, Whole genome sequencing. 2010: p. 215-226.

19. Larsen, M.V., et al., Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. 2012. 50(4): p. 1355-1361.

20. Gupta, S.K., J.-M.J.A.a. Rolain, and chemotherapy, Reply to "Comparison of the web tools ARG-ANNOT and ResFinder for detection of resistance genes in bacteria". 2014. 58(8): p. 4987-4987.

21. Salipante, S.J., et al., Application of whole-genome sequencing for bacterial strain typing in molecular epidemiology. 2015. 53(4): p. 1072-1079.

22. Cooper, J.E. and E.J.J.T.i.m. Feil, Multilocus sequence typing-what is resolved? 2004. 12(8): p. 373-377.

23. <2021년+국가항생제내성+모니터링+보고서(최종본).pdf>.

24. Clinical and L.S. Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2017, Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, PA. p. 106-112.

25. PulseNet, C.J.C.D.C.P.A., Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157: H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri. 2017. 157: p. 1-16.

26. Barton, B.M., G.P. Harding, and A.J.J.A.b. Zuccarelli, A general method for detecting and sizing large plasmids. 1995. 226(2): p. 235-240.

27. Gaul, S.B., et al., Use of pulsed-field gel electrophoresis of conserved *Xba*I fragments for identification of swine Salmonella serotypes. 2007. 45(2): p. 472-476.

28. Murigneux, V., et al., MicroPIPE: Validating an end-to-end workflow for high-quality complete bacterial genome construction. 2021. 22(1): p. 1-15.

29. Gan, R., et al., DBSCAN-SWA: an integrated tool for rapid prophage detection and annotation. *Frontiers in Genetics*, 2022. 13: p. 885048.

30. Pellow, D., I. Mizrahi, and R. Shamir, PlasClass improves plasmid

- sequence classification. *PLoS computational biology*, 2020. 16(4): p. e1007781.
31. Pradier, L., et al., PlasForest: a homology-based random forest classifier for plasmid detection in genomic datasets. *BMC bioinformatics*, 2021. 22(1): p. 1-17.
 32. Carattoli, A., et al., In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2014. 58(7): p. 3895-3903.
 33. Robertson, J. and J.H. Nash, MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microbial genomics*, 2018. 4(8).
 34. Hyatt, D., et al., Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC bioinformatics*, 2010. 11(1): p. 1-11.
 35. Alcock, B.P., et al., CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, 2020. 48(D1): p. D517-D525.
 36. Buchfink, B., K. Reuter, and H.-G. Drost, Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nature methods*, 2021. 18(4): p. 366-368.
 37. Johansson, M.H., et al., Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2021. 76(1): p. 101-109.
 38. Katoh, K. and D.M. Standley, MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 2013. 30(4): p. 772-780.
 39. Price, M.N., P.S. Dehal, and A.P. Arkin, FastTree 2—approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PloS one*, 2010. 5(3): p. e9490.
 40. Seemann, T., Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 2014. 30(14): p. 2068-2069.
 41. Sullivan, M.J., N.K. Petty, and S.A. Beatson, Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*, 2011. 27(7): p. 1009-1010.
 42. Juraschek, K., et al., Outcome of different sequencing and assembly approaches on the detection of plasmids and localization of antimicrobial resistance genes in commensal *Escherichia coli*. 2021. 9(3): p. 598.
 43. Smillie, C., et al., Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010. 74(3): p. 434-452.
 44. Ellison, Courtney K., et al., Retraction of DNA-bound type IV competence pili initiates DNA uptake during natural transformation in *Vibrio cholerae*. *Nature microbiology* 3.7 (2018): 773-780.

Supplementary Information

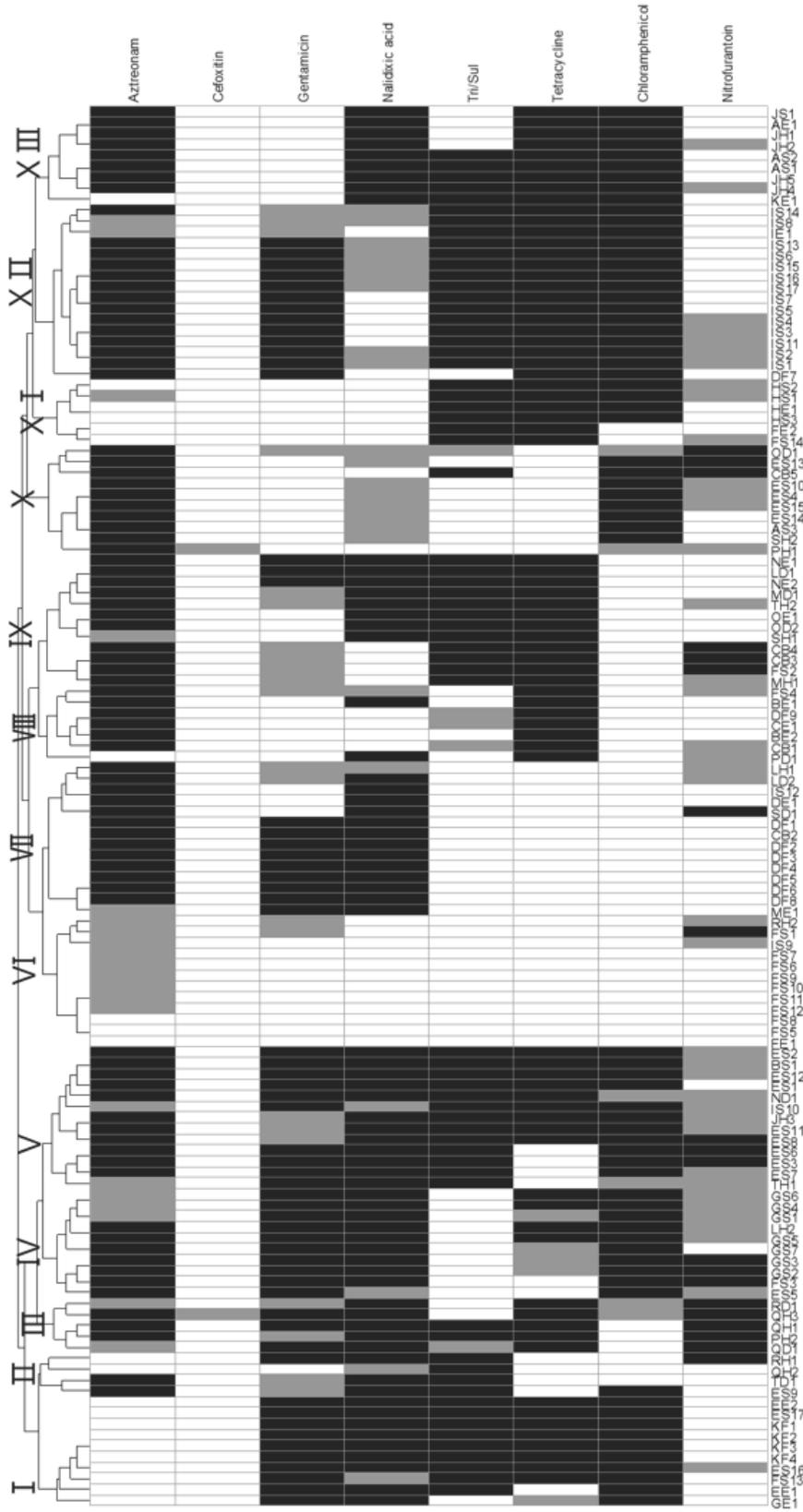


Figure S1. Heatmap of antibiotic resistance patterns of ESBL-producing *E. coli*

Table S1. Information of ESBL-producing *E. coli*

ID	NCCP no.	Group	분리 지역	분리 장소	Source	검체유래
AE1	NMS1191	A	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
AS1	NMS1186	A	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
AS2	NMS1189	A	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
AS3	NMS1190	A	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
BE1	NMS1193	B	충청도	돼지 농장	환경	돼지
BE2	NMS1196	B	충청도	돼지 농장	환경	돼지
BS1	NMS1192	B	충청도	돼지 농장	돼지	돼지
CB1	NMS1244	C	경기도	소 농장	소	소
CB2	NMS1247	C	경기도	소 농장	소	소
CB3	NMS1248	C	경기도	소 농장	소	소
CB4	NMS1249	C	경기도	소 농장	소	소
CB5	NMS1250	C	경기도	소 농장	소	소
CE1	NMS1246	C	경기도	소 농장	환경	소
DE1	NMS1261	D	전라도	소 유통	환경	소
DF1	NMS1262	D	전라도	소 유통	식품	소
DF2	NMS1263	D	전라도	소 유통	식품	소
DF3	NMS1264	D	전라도	소 유통	식품	소
DF4	NMS1265	D	전라도	소 유통	식품	소
DF5	NMS1266	D	전라도	소 유통	식품	소
DF6	NMS1267	D	전라도	소 유통	식품	소
DF7	NMS1268	D	전라도	소 유통	식품	소
DF8	NMS1269	D	전라도	소 유통	식품	소
DF9	NMS1270	D	전라도	소 유통	식품	소
EE1	NMS1294	E	전라도	돼지 농장	환경	돼지
EE2	NMS1295	E	전라도	돼지 농장	환경	돼지
ES1	NMS1275	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES10	NMS1285	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES11	NMS1286	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES12	NMS1287	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES13	NMS1288	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES14	NMS1289	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES15	NMS1290	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES16	NMS1291	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES17	NMS1292	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES2	NMS1276	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES3	NMS1277	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES4	NMS1278	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES5	NMS1279	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES6	NMS1280	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES7	NMS1281	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
ES8	NMS1282	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지

ES9	NMS1283	E	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
FE1	NMS1311	F	경상도	돼지 농장	환경	돼지
FE2	NMS1312	F	경상도	돼지 농장	환경	돼지
FS1	NMS1307	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS10	NMS1302	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS11	NMS1303	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS12	NMS1304	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS13	NMS1305	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS14	NMS1306	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS2	NMS1308	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS3	NMS1309	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS4	NMS1310	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS5	NMS1297	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS6	NMS1298	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS7	NMS1299	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS8	NMS1300	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
FS9	NMS1301	F	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
GE1	NMS1320	G	경상도	돼지 농장	환경	돼지
GS1	NMS1313	G	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
GS2	NMS1314	G	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
GS3	NMS1315	G	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
GS4	NMS1316	G	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
GS5	NMS1317	G	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
GS6	NMS1318	G	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
GS7	NMS1319	G	경상도	돼지 농장	돼지	돼지
HE1	NMS1324	H	전라도	돼지 농장	환경	돼지
HS1	NMS1321	H	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
HS2	NMS1322	H	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
HS3	NMS1323	H	전라도	돼지 농장	돼지	돼지
IE1	NMS1369	I	강원도	돼지 농장	환경	돼지
IS1	NMS1349	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS10	NMS1358	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS11	NMS1359	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS12	NMS1360	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS13	NMS1362	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS14	NMS1363	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS15	NMS1364	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS16	NMS1365	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS17	NMS1367	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS2	NMS1350	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS3	NMS1351	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS4	NMS1352	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS5	NMS1353	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지
IS6	NMS1354	I	강원도	돼지 농장	돼지	돼지

IS7	NMS1355	I	강원도	돼지	농장	돼지	돼지
IS8	NMS1356	I	강원도	돼지	농장	돼지	돼지
IS9	NMS1357	I	강원도	돼지	농장	돼지	돼지
JH1	NMS1179	J	전라도	돼지	농장	사람	돼지
JH2	NMS1180	J	전라도	돼지	농장	사람	돼지
JH3	NMS1181	J	전라도	돼지	농장	사람	돼지
JH4	NMS1182	J	전라도	돼지	농장	사람	돼지
JH5	NMS1184	J	전라도	돼지	농장	사람	돼지
JS1	NMS1187	J	전라도	돼지	농장	돼지	돼지
KE1	NMS1329	K	전라도	소	유통	환경	소
KF1	NMS1325	K	전라도	소	유통	식품	소
KF2	NMS1326	K	전라도	소	유통	식품	소
KF3	NMS1327	K	전라도	소	유통	식품	소
KF4	NMS1328	K	전라도	소	유통	식품	소
LD1	NMS1131	L	서울	동물	병원	개	개
LD2	NMS1132	L	서울	동물	병원	개	개
LH1	NMS1133	L	서울	동물	병원	사람	개
LH2	NMS1134	L	서울	동물	병원	사람	개
MD1	NMS1139	M	서울	동물	병원	개	개
ME1	NMS1137	M	서울	동물	병원	환경	개
MH1	NMS1138	M	서울	동물	병원	사람	개
ND1	NMS1140	N	서울	동물	병원	개	개
NE1	NMS1141	N	서울	동물	병원	환경	개
NE2	NMS1142	N	서울	동물	병원	환경	개
OD1	NMS1143	O	서울	동물	병원	개	개
OD2	NMS1144	O	서울	동물	병원	개	개
OE1	NMS1145	O	서울	동물	병원	환경	개
PD1	NMS1146	P	서울	동물	병원	개	개
PH1	NMS1147	P	서울	동물	병원	사람	개
PH2	NMS1148	P	서울	동물	병원	사람	개
QD1	NMS1150	Q	서울	동물	병원	개	개
QH1	NMS1149	Q	서울	동물	병원	사람	개
QH2	NMS1151	Q	서울	동물	병원	사람	개
QH3	NMS1152	Q	서울	동물	병원	사람	개
RD1	NMS1164	R	서울	동물	병원	개	개
RH1	NMS1165	R	서울	동물	병원	사람	개
RH2	NMS1166	R	서울	동물	병원	사람	개
SD1	NMS1169	S	서울	동물	병원	개	개
SH1	NMS1170	S	서울	동물	병원	사람	개
SH2	NMS1171	S	서울	동물	병원	사람	개
TD1	NMS1157	T	서울	동물	병원	개	개
TH1	NMS1155	T	서울	동물	병원	사람	개
TH2	NMS1156	T	서울	동물	병원	사람	개

**Investigation of antibiotic resistance gene transmission among
cephalosporin-resistant *Escherichia coli*
in close contact environments**

Yujin Jeong

Department of Biotechnology
The Graduate School
Jeju National University

Abstract

Antibiotics are widely used to inhibit the growth of bacteria or to kill bacteria. Some bacteria get resistance to antibiotics by modifying, degrading or excreting the antibiotics and target modification. Infections caused by antibiotic-resistant bacteria are difficult to treat, and antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance gene (ARG) threaten humans with powerful transmission. Antibiotic resistance genes are transmitted to other bacteria through various mobile genetic elements (MGEs) such as plasmids, insertion sequences, integrons, and transposons. Therefore, recent emphasis has been placed on antibiotic resistance monitoring from the

viewpoint of one health that encompasses humans, animals, and the environment. Therefore, surveillance of antibiotic resistance is emphasized in terms of One-health. In this study, we investigated the antibiotic resistance dissemination of 128 strains *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) isolated from animals, humans, and the environment in 20 farms and veterinary hospitals in Korea. Antibiotic susceptibility test (AST) was performed using seven antibiotics including Aztreonam, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PGFE) was performed using *Xba*I restriction enzyme and S1 nuclease. In addition, generated data from Hiseq on the Illumina platform and MinION on the Oxford nanopore technology (ONT) platform were used for hybrid sequencing. ARG and MGE, plasmid prediction, and plasmid mobility were investigated with whole genome sequencing data. In the case of antibiotic resistance patterns, samples belonging to the same group were clustered except for the Seoul area. In some area samples, similar patterns were appeared among some groups. As it is predicted that antibiotic-resistant bacteria are transmitted from a common ancestor or the mobile ARG cassette is shared between animals, humans, and the environment, continuous attention and monitoring of antibiotic resistance is required. According to the prediction that antibiotic resistant genes are disseminated from same ancestor or confirmation of mobile ARG cassette sharing between animals, human, environment, surveillance of antibiotic resistance is required.

감사의 글

이 논문을 작성하기까지 많은 분들의 도움이 있었습니다. 먼저, 학부 시절과 석사 과정 기간 동안 연구 내외로 많은 가르침을 주셨던 운노 타쓰야 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 친히 미생물 실험과 분석 법, 리눅스 사용법, 논문 작성법 등을 가르쳐 주시고 부족한 영어 능력을 키우기 위해 귀찮음을 무릅쓰고 영어 쓰기와 말하기를 지도해 주셨습니다. 운노 교수님의 사랑과 관심으로 부족하나마 석사 과정을 마칠 수 있었습니다. 또한, 지도 교수님인 이효연 교수님, 그리고 흔쾌히 졸업논문 심사를 맡아주신 김창숙 교수님께 감사드립니다. 교수님들의 응원과 지도로 논문을 마무리할 수 있었습니다.

연구실에 속해있는 동안 많은 것을 배웠습니다. 모든 것에 서툴렀던 저를 도와주시고 가르쳐 주셨던 연구실 분들에게 감사를 표합니다. 학위 과정 동안 많은 인연들 덕분에 즐겁게 실험을 했던 것 같습니다. 먼저 연구실 생활 기간 동안 든든하게 받쳐주시며, 동물 실험과 논문 해석, 기기 관리법을 알려주신 김정만 박사님, 데이터 분석과 통계를 가르쳐 주신 송호경 박사님, 친절하게 실험을 알려준 Dr. Singh Vineet, Dr. Raza Shahbaz, Dr. Farooq Adeel 에게 감사드립니다. 또한 직접적으로 실험을 알려주시며 실험실에 적응하도록 잘 챙겨주신 고광표, 조혜준, 김지연 선생님들께 감사합니다. 또 실험 외적으로도 많이 조언해 주시며 즐거운 연구실 생활을 함께 했던 전다빈 선생님, 실험실에서 같이 밤새 실험하고, 문제가 있을 땐 함께 고민하고 해결해 나갔던 실험실 소울메이트인 이선우 선생님께 감사의 말을 전합니다. 덕분에 유쾌한 생활을 할 수 있었던 정지원 선생님, Bhandari Aprajita, Azka Tauqeer, 또 많은 실험을 도와주신 현수진, 김민우 선생님께 감사의 말을 전합니다. 덕분에 학위를 무사히 마칠 수 있었던 것 같습니다.

졸업할 수 있도록 편의를 봐주신 한국생명공학연구원의 바이오평가센터 식구들, 이주석 박사님, 권연주 선생님께 감사합니다. 또한 꿈을 지지하고 응원해 준 우리 가족에게 고맙고 감사합니다.

이 논문을 도와주신 모든 분들께 감사의 글을 바칩니다.