



돼지와 양돈장 및 농장 관계자 간에 발생하는 항생제 내성 유전자 전파 조사를 위한 플라스미드 염기서열 분석

정유진¹, 이선우¹, 유정식², 이동훈^{3*}, 운노타쓰야^{3*}

¹제주대학교 생명자원과학대학 생명공학부, ²질병관리청 국립보건연구원 감염병연구센터 약제내성연구과,
³충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Plasmid Sequence Data Analysis to Investigate Antibiotic Resistance Gene Transfer among Swine, Swine Farm and Their Owners

Yujin Jeong¹, Sunwoo Lee¹, Jung Sik Yoo², Dong-Hun Lee^{3*} and Tatsuya Unno^{3*} (¹Faculty of Biotechnology, College of Applied Life Sciences, Jeju National University, Jeju 63243, Korea, ²Division of Antimicrobial Resistance Research, National Institute of Infectious Disease, National Institute of Health, Korea Disease Control and Prevention Agency, Cheongju 28159, Korea, ³Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea)

Received: 26 October 2023/ Revised: 01 November 2023/ Accepted: 07 November 2023

Copyright © 2023 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Yujin Jeong
<https://orcid.org/0009-0007-9796-2810>

Sunwoo Lee
<https://orcid.org/0009-0005-0123-1294>

Jung Sik Yoo
<https://orcid.org/0000-0001-8145-5039>

Dong-Hun Lee
<https://orcid.org/0000-0001-7839-3201>

Tatsuya Unno
<https://orcid.org/0000-0003-2373-2100>

Abstract

Antibiotics either kill or inhibit the growth of bacteria. However, antibiotic-resistant bacteria are difficult to treat with antibiotics. Infections caused by such bacteria often lead to severe diseases. Antibiotic resistance genes (ARG) can be horizontally transmitted across different bacterial species, necessitating a comprehensive understanding of how ARGs spread across various environments. In this study, we analyzed the plasmid sequences

of 33 extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from pigs, farms, and their owners. We conducted an antibiotic susceptibility test (AST) with aztreonam and seven other antibiotics, as well as whole genome sequencing (WGS) of the strains using MinION. Our results demonstrated that the plasmids that did not harbor ARGs were mostly non-conjugative, whereas the plasmids that harbored ARGs were conjugative. The arrangement of these ARGs exhibited a pattern of organization featuring a series of ARG cassettes, some of which were identical across the isolates collected from different sources. Therefore, this study suggests that the sets of ARG cassettes on plasmids were mostly shared between pigs and their owners. Hence, enhanced surveillance of ARG should be im-

*Corresponding author: Dong-Hun Lee
Phone: +82-43-261-3261; Fax: +82-43-264-9600;

E-mail: donghun@chungk.ac.kr

*Co-Corresponding author: Tatsuya Unno
Phone: +82-43-261-2304; Fax: +82-43-264-9600;
E-mail: tatsu@cbnu.ac.kr

plemented in farm environments to proactively mitigate the risk of antibiotic-resistant bacterial infections.

Key words: Antibiotic resistant bacteria, Antibiotic resistance gene, One health, Plasmid, Transmission

서 론

항생제는 주로 박테리아에 의한 질병의 치료와 예방을 목적으로 인간과 동물에게 처방된다. 항생제를 사용할 경우, 항생제에 감수성을 가진 박테리아는 사멸하지만 selective pressure에 의해 항생제 내성균과 항생제 내성 유전자(antibiotic resistance gene; ARG)의 출현은 증가하게 된다[1]. 항생제 내성은 전세계적인 문제이며, 항생제 내성의 위험성은 꾸준히 주목받고 있다[2-5]. 과거에는 동물의 성장 촉진을 목적으로 항생제가 널리 사용됐으나[6], 국내에서는 2011년부터 사료와 배합하여 사용하는 항생제의 사용이 금지되고 있다[7].

동물의 분변은 항생제 내성균과 ARG가 빈번히 발견되는 hotspot 중 하나이다[8,9]. 동물이 섭취한 항생제 중 일부는 체내에서 분해되지 않고 분변을 통해 배출되며[10], 항생제 내성균과 ARG 또한 동물의 분변에서 발견되곤 한다[11]. 동물의 분변은 농경에서 비료로 사용되며, 토양에 분변 비료를 처리했을 때 토양에서 ARG의 검출량이 증가했다는 보고가 있다[12]. 또한 분변에 잔류하는 항생제는 토양으로 전달될 뿐만 아니라, 지하수 혹은 식물에도 도달할 수 있다[13]. 앞선 과정을 통해 동물로부터 유래한 항생제와 ARG가 식품에 남아있게 되면 먹이 사슬을 통해 인간이 비의도적으로 이를 섭취할 수 있다[14,15].

ARG는 horizontal gene transfer (HGT)를 통해 여러 박테리아 사이에서 전파된다. 대표적인 HGT 메커니즘으로 물리적인 접촉 상황에서 plasmid 전체가 전달되는 conjugation, bacteriophage에 의해 유전자가 전달되는 transduction, 외부 유전자가 도입되는 transformation, 소포 상태로 DNA가 운반되는 vesiculation이 있다[16]. 이 중 conjugation은 ARG의 전파에 가장 크게 관여하는 것으로 여겨진다[17]. Conjugation은 일반적으로 동일한 genus 사이에서 빈번하게 발생 하지만, 서로 다른 kingdom 간에서도 conjugation이 일어난다고 알려져 있다[18,19]. 항생제의 사용은 박테리아 사이에서 일어나는 conjugation을 가속화하고, conjugation은 ARG를 전파시키기 때문에 plasmid에 의한 ARG 전파에 관심을 기울여야 한다[20].

세계보건기구는 Critically Important Antimicrobials (CIA)를 지정해 항생제 오용을 경고했다. 그러나, 일부 연구에서 여전히 CIAs가 돼지에게 일반적으로 사용되고 있음을 말했다[21]. 본 연구에서는 인간, 돼지, 농장에서 분리된 *Escherichia coli*를 대상으로 antibiotic susceptibility test (AST)를 통해 항생제 내성 표현형을 확인하고, whole genome sequencing (WGS)을 통해 ARG를 운반하는 plasmid의 분포를 조사했다. 항생제 사용량이 타 가축 대비 많은 돼지 농장

을 대상으로 항생제 내성 패턴과 ARG 분포 조사를 함으로써 항생제 내성 전파를 밝히고자 했다.

재료 및 방법

Escherichia coli 군주 정보

본 연구는 국립보건연구원 다체내성균 병원체자원전문은행에서 병원체자원을 분양 받아 수행되었다(Table S1). 전라도에 위치해 있는 4곳의 돼지 농장으로부터 분리된 33개의 extended-spectrum beta-lactamases 생성 *E. coli* 군주를 분양받았다. 이 중 인간 분변 유래 군주가 5개, 돼지의 항문 및 분변 유래 군주가 24개, 축사 환경 유래 군주가 4개였다.

Antimicrobial Susceptibility Test

AST는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100-S27에 따라 disk diffusion 방식으로 수행됐다[22]. 분양 받은 *E. coli* 군주를 ampicillin (32 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)이 함유된 MacConkey agar (Difco™, NJ, USA)에 접종하여 37°C에서 18-24 h overnight 배양했다. 이후 single colony를 Mueller Hinton broth (Difco™, NJ, USA)에 접종하여 37°C에서 18-24 h 동안 overnight 배양했다. 배양액을 Mueller Hinton agar (Difco™, NJ, USA) plate에 spreading 후 Antimicrobial Susceptibility discs (aztreonam: 30 µg/ml, cefoxitin: 30 µg/ml, gentamicin: 10 µg/ml, nalidixic acid: 30 µg/ml, trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP-SMX): 1.25/23.75 µg/ml, tetracycline: 30 µg/ml, chloramphenicol: 30 µg/ml, nitrofurantoin: 300 µg/ml) (Oxoid™, Hampshire, USA)를 배지 위에 배치하여 37°C에서 배양했다. 이후 버너 캘리퍼스를 이용하여 inhibition zones의 지름을 측정했다. AST 패턴 비교를 위해 susceptible, intermediate, resistant를 0, 1, 2로 환산하여 Euclidean 거리를 기반으로 hierarchical clustering을 수행했다[23].

Whole Genome Sequencing 준비

분양 받은 *E. coli* 군주를 ampicillin (32 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, USA)이 함유된 MacConkey agar (Difco™, NJ, USA)에 접종하여 37°C에서 18-24 h overnight 배양했다. 이후 single colony를 Mueller Hinton agar (Difco™, NJ, USA)에 접종하여 37°C에서 18-24 h overnight 배양했다. 각 배양액으로부터 Genomic DNA extraction kit (BIONEER, Daejeon, K-3032, Korea)를 이용해서 genomic DNA를 추출했다. DNA의 농도와 quality는 Qubit fluorometer (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 측정했다. MinION 라이브러리는 Oxford nanopore technology (ONT)에서 제공하는 Nanopore protocol (ONT, Oxford, NBE_9065_v109_revS_14Aug2019, Oxford, UK)에 따라 Nanopore Native Barcoding Kit (ONT, Oxford, SQK-NBD112.24, UK), NEBNext FFPE DNA Repair Mix

Table S1. Information of antibiotic resistant *E. coli* used in this study

ID	Sources	Farms	NCCP	ID	Sources	Farms	NCCP
HA1	Human	A	NMS1179	SC6	Swine	C	NMS1280
HA2	Human	A	NMS1180	SC7	Swine	C	NMS1281
HA3	Human	A	NMS1181	SC8	Swine	C	NMS1282
HA4	Human	A	NMS1182	SC9	Swine	C	NMS1283
HA5	Human	A	NMS1184	SC10	Swine	C	NMS1285
SA1	Swine	A	NMS1187	SC11	Swine	C	NMS1286
EB1	Environment	B	NMS1191	SC12	Swine	C	NMS1287
SB1	Swine	B	NMS1186	SC13	Swine	C	NMS1288
SB2	Swine	B	NMS1189	SC14	Swine	C	NMS1289
SB3	Swine	B	NMS1190	SC15	Swine	C	NMS1290
EC1	Environment	C	NMS1294	SC16	Swine	C	NMS1291
EC2	Environment	C	NMS1295	SC17	Swine	C	NMS1292
SC1	Swine	C	NMS1275	ED1	Environment	D	NMS1324
SC2	Swine	C	NMS1276	SD1	Swine	D	NMS1321
SC3	Swine	C	NMS1277	SD2	Swine	D	NMS1322
SC4	Swine	C	NMS1278	SD3	Swine	D	NMS1323
SC5	Swine	C	NMS1279				

NCCP is IDs used in the “Specialized Bank for multidrug resistant pathogens” operated by Korea disease control and prevention agency (KDCA).

(New England Biolabs, M6630L, MA, USA), NEBNNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module (New England Biolabs, E7546L, MA, USA), Blunt/TA Ligase Master Mix (New England Biolabs, M0367L, MA, USA), NEBNNext® Quick Ligation Module (New England Biolabs, E6056L, MA, USA), NEBNNext® Quick Ligation Module (New England Biolabs, E6056L, MA, USA)을 사용하여 제작했다. 제작한 라이브러리를 flow cell R9.4.1 (ONT, FLO-MIN106D, Oxford, UK)에 loading 하였으며, MinION Mk1B (ONT, Oxford, UK)를 이용하여 sequencing을 진행했다.

WGS 데이터 분석

Fast5 파일의 base-calling과 demultiplexing은 guppy (ONT, Oxford, UK)를 이용해 진행했다. 생성된 fastq 파일 내 adapter는 Porechop (<https://github.com/rrwick/Porechop>)을 통해 제거했으며, Filtlong (<https://github.com/rrwick/Filtlong>)을 통해 1000 bp 미만의 read를 제거했다. Seqtk [24]를 이용해 data를 fasta 형태로 변환하였으며, Flye [25]를 이용해 de-novo assembly를 진행했다. Plasmidcontig를 예측하기 위해 Plasclass [26]를 사용하였으며, plasmid 예측 값이 0.9 이상인 contig를 plasmid로 선별했다. Plasmid의 replicon type 및 이동성(mobility)을 조사하기 위해 MOB-suite [27]의 mob_typer 기능을 이용했다. Plasmid 위에 위치한 ARG를 확인하기 위해 우선 Prodigal [28]을 사용해 유전자 부위를 예측했으며, 해당 부위를 대상으

로 DIAMOND [29]를 이용해 ARG annotation을 진행했다. ARG annotation에는 comprehensive antibiotic resistance database (CARD) 데이터베이스를 [30] 활용했으며, identity cut-off를 95, subject-cover cut-off를 90으로 하여 blastp를 진행했다. 이후 ARG를 보유한 plasmid contig들의 synteny 비교를 위해 Prokka [31]를 이용하여 genome annotation을 진행한 후 Easyfig [32]를 통해 시각화했다.

결과 및 고찰

균주 간 항생제 내성 패턴 비교

AST 결과를 기반으로 hierarchical clustering을 수행한 결과, 항생제 내성 패턴이 4개의 cluster로 구분됐다(Fig. 1). Cluster 1과 Cluster 2는 SB3을 제외하고 모두 C 농장 유래 균으로 구성되었으며, Cluster 3은 D 농장 유래 균으로 구성됐다. Cluster 4는 농장 A, B, C 유래 균주로 구성됐다.

돼지 유래 균주와 다른 source (인간 혹은 환경) 유래 균주 간 동일한 항생제 내성 패턴을 보여주는 균주들이 있는지 조사한 결과, 농장 A의 인간 유래 균주(HA1)와 돼지 유래 균주(SA1) 사이에서 동일한 항생제 내성 패턴이 발견됐다. 이는 항생제 내성균 혹은 ARG가 이종 간에 전파되었을 수 있음을 보여준다. 분리된 곳이 다른 군들 사이에서 동일한 항생제 내성 패턴이 나타난 것은 동일한 균이거나 항생제 내성 유전자를 공유하였다고 유추할 수 있지만, AST 결과만으로 확정 지을 수는 없다. 하나의 항생제에 대해서 다양한 항생제 내성 유전자가 존재하기 때문에, 다른 곳에서 분리된 내성균들이 동일

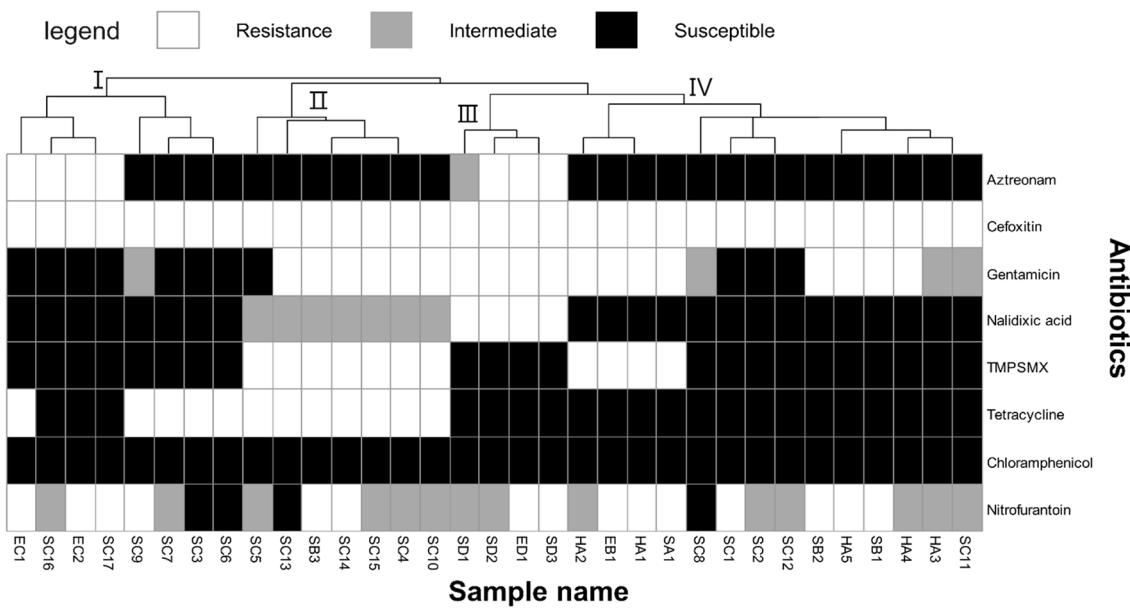


Fig. 1. Heatmap analysis with antibiotic susceptibility test results.

한 항생제에 내성을 보여주더라도 균들은 서로 다른 항생제 내성 유전자를 보유했을 수 있다. 농장 B 내에서는 source 간 동일한 항생제 내성 패턴이 발견되지 않았지만, “HA1, SA1, EB1” 및 “HA5, SB1, SB2”와 같이 농장 A 유래 균주와 농장 B 유래 균주 사이에서 항생제 내성 패턴이 동일한 경우가 여러 번 발견됐다. 이는 지역 내 다른 농장 사이에서 항생제 내성균 혹은 ARG가 공유되었을 수 있음을 보여준다. 하지만, 지역 내의 돼지 농장들이 유사한 항생제를 사용하여 선택적 압력(selective pressure)을 가했다면 유사한 항생제 내성 패턴이 유발될 수 있으므로 이 역시 동일 균이나 ARG가 공유되고 있다고 단정지울 수는 없다. 농장 C와 D 유래 균주는 돼지 유래 균주와 환경 유래 균주 사이에서 동일한 항생제 내성 패턴이 발견됐다. 농장 C 유래 균주의 경우 환경 유래 샘플(EC2)과 돼지 유래 샘플(SC16, SC17) 사이에서 동일한 항생제 내성 패턴이 나타났으며, 농장 D 유래 균주는 환경 유래 균주인 ED1과 돼지 유래 균주인 SD3 사이에서 동일한 항생제 패턴이 나타났다.

WGS를 통한 plasmid와 ARG 조사

WGS 결과, assembly를 통해 조립된 contig는 모두 208 개였으며, 이 중 plasmid contig로 확인된 것은 142개였다 (Table S2). Plasmid contig를 대상으로 ARG annotation을 진행한 결과, ARG를 보유한 plasmid는 71개였다. Plasmid의 이동성을 조사했을 때, ARG를 지니지 않은 plasmid의 경우 non-mobilizable, mobilizable, conjugative plasmid가 각각 29, 28, 14개로 확인됐다. ARG가 검출되지 않은 plasmid의 경우 conjugative plasmid의 수가 다른 유형의 plasmid에 비해 절반 이하로 적었지만, ARG를 지닌 plasmid의 경우 non-mobilizable, mobilizable, conjugative plasmid가 각각 10, 15, 46개로 conjugative plasmid

의 수가 다른 유형의 plasmid에 비해 세 배 이상 많았다. ARG는 plasmid의 mobility와 관련성이 있는 것으로 나타났다(Chisq test, $p=0.011$). ARG를 지닌 plasmid에서 conjugative plasmid의 비율이 더 높게 나타나는 것은 항생제의 selective pressure에 의해 촉진되는 conjugation의 결과로 균들 사이에서 conjugative plasmid가 빈번히 공유되기 때문일 수 있다.

Plasmid contig에서 발견된 ARG는 37종이었으며, 총 348회 검출됐다. Drug class 중 aminoglycoside가 가장 많이 검출되었으며(94 회), 그 다음으로 beta-lactam (66회)과 phenicol (54회)이 많이 검출됐다(Fig. 2). 가장 빈번하게 검출된 ARG는 sul2였으며, 그 다음으로 APH(6)-Id, floR이 많이 검출됐다. ARG가 plasmid에 위치할 경우 chromosome에 위치하고 있는 경우에 비해 ARG가 다른 균으로 전파될 가능성이 더 높기 때문에 항생제 내성 전파에서 plasmid에 위치한 ARG를 조사하는 것은 중요하다. 또한 ARG가 plasmid에 위치할 경우 chromosome에 위치한 경우에 비해 ARG의 발현량이 높으며 이에 따라 항생제 내성균이 더 높은 내성을 나타내게 된다고 알려져 있다[33].

ARG 검출 결과, HA4의 plasmid contig에서는 ARG가 발견되지 않아 이후 분석에서 제외했다. ARG cluster에서 농장 A와 B 유래 균주들은 cluster 1과 3에 나누어 분포하며, 지리적으로 다른 곳에 위치한 농장 임에도 유사한 ARG 패턴을 보였다. 이 두 농장 유래 균주들은 앞선 AST 분석 결과에서도 비슷한 패턴을 보였다(Fig. 1). 이러한 결과를 토대로 지역 내 항생제 내성균이 전파되었거나 conjugation에 의해 plasmid가 전파되었을 수 있음을 알 수 있다. 농장 C 유래 균주의 경우 AST 결과에서 3개의 cluster에 나누어 분포했던 것과 달리, ARG 결과의 경우 모든 균주가 cluster 4로 배정되며 ARG 패턴들이 유사하게 나타났다. 농장 C 유래 균주들

Table S2. Numbers of contigs of ESBL-producing *E. coli*

ID	# Total contig	# Plasmid contig	# ARG contig	# Conjugative plasmid	# Mobilizable plasmid	# Non-mobilizable plasmid
EB1	4	3	2	2	0	0
EC1	4	3	2	1	1	0
EC2	3	2	1	1	0	0
ED1	2	1	1	0	0	1
HA1	2	1	1	0	1	0
HA2	18	7	2	0	0	2
HA3	2	1	1	0	1	0
HA4	2	1	0	0	0	0
HA5	14	8	2	0	1	1
SA1	11	8	2	1	1	0
SB1	16	12	4	0	1	3
SB2	10	6	2	1	1	0
SB3	10	5	2	1	1	0
SC1	5	5	3	2	1	0
SC2	6	5	3	3	0	0
SC3	6	5	3	3	0	0
SC4	6	5	3	2	1	0
SC5	7	6	3	3	0	0
SC6	7	6	3	3	0	0
SC7	3	2	2	2	0	0
SC8	4	3	2	2	0	0
SC9	3	2	2	2	0	0
SC10	7	6	3	3	0	0
SC11	4	3	2	2	0	0
SC12	6	5	3	3	0	0
SC13	3	2	2	2	0	0
SC14	6	5	3	2	1	0
SC15	7	6	3	3	0	0
SC16	9	7	3	2	1	0
SC17	10	8	3	0	3	0
SD1	5	1	1	0	0	1
SD2	3	1	1	0	0	1
SD3	3	1	1	0	0	1

은 샘플 당 평균 11.7개의 ARG를 지녔으며, 그룹 내에서 공통적으로 발견되는 ARG는 sul2, folR, APH(6)-Id, CTX-M-14, FosA3 등이었다. 농장 D 유래 균주들의 경우 항생제 내성 표현형은 유사하게 나타났지만 유전형은 다르게 나타났다. AST에서 모든 샘플이 AST cluster 3에 위치하며 비슷한 항생제 내성 패턴을 보였던 것과 달리, ARG 패턴에서는 SD1 샘플이 다른 샘플들과 구분됐다. SD1 샘플의 경우 ARG cluster 3에 위치했으며 13개의 ARG를 가지고 있었다. SD1 을 제외한 D 농장 샘플들은 ARG cluster 2에 위치했으며 검출된 ARG가 1-3개로 타 그룹 대비 적었다.

본 연구에서는 돼지와 다른 source 사이에서 ARG가 공유되는 것을 확인했다. Van et al.은 돼지와 인간 사이 ARG 전파에 대해 연구했으며, 돼지, 돼지 농가 관계자, 돼지 도축업자의 대변에서 돼지와 직접적인 접촉이 없는 대조군 대비 항생제 내성균이 더 많이 분리되고 ARG 또한 더 많이 검출되었다고 보고했다[34]. 일부 연구들은 돼지와 직접 접촉하지 않더라도 환경을 매개로 ARG가 전파될 수 있음을 보여준다. 예를 들어, Yang et al.은 돼지 분뇨 및 농장 폐수를 통해 돼지에서 환경으로 ARG가 전달될 수 있음을 밝혔다[9]. 돼지로부터 유래한 ARG는 분뇨를 통해 양식 어류 혹은 식물로 전파될 수

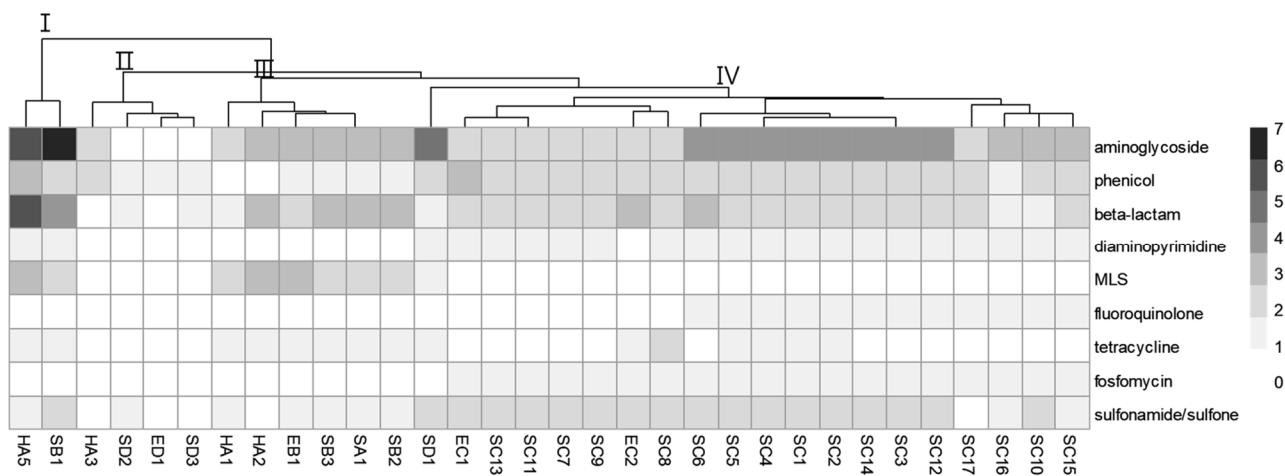


Fig. 2. Heatmap of ARG located in plasmid contig on drug class level. The legend indicates the number of ARGs detected corresponding to each drug class.

있을 뿐만 아니라[35], 돼지고기로 확산될 수 있고, 궁극적으로 이를 섭취하는 인간에게 전파될 수 있기 때문에 항생제의 무분별한 사용을 주의해야 한다[36,37].

Plasmid에서 발견된 ARG cassette 분석

71개의 plasmid가 보유한 ARG의 배열을 정리했을 때 반복적으로 나타나는 ARG의 배열이 있었으며, 이를 9개의 ARG cassette로 정리했다(Table 1). Plasmid 71개 중 3개의 plasmid에서 발견된 ARG 배열들은 다른 균주에서 발견되지 않아(unique) ARG cassette에서 제외됐다. 농장 A와 B 유래의 10개 샘플 중에서 6개 샘플이 “floR, tet(A), APH(6)-Id, APH(3')-Ib”로 구성된 ARG cassette 1 또는 “CTX-M-15, TEM-34, mphA, Mrx”로 구성된 ARG cassette 2를 지니고 있었다. 농장 C 그룹 유래 모든 균주는 ARG cassette 5가 포함된다.

함된 plasmid를 가지고 있었으며, EC2를 제외한 균주들은 cassette 6이 포함된 plasmid도 지니고 있었다. ARG cassette 3과 4는 ANT(3')-IIa 와 aadA22를 제외한 ARG의 배열이 동일한데, C농장 유래 균주 중 12개는 이 두 cassette 중 하나를 지닌 plasmid를 추가로 보유했다. 또한 한 개의 plasmid에 두 개의 ARG cassette가 존재하는 경우도 있었다. 농장 D의 경우, SD1을 제외한 균주들의 plasmid는 “floR, TEM-206”로 구성된 ARG cassette 7을 지녔다. Replicon type이 같고 plasmid 크기가 유사한 plasmid들 사이에서 ARG cassette가 빈번히 공유된 것으로 보이나, ARG cassette 8과 같이 plasmid의 크기와 replicon type이 다른 별개의 plasmid들 사이에서도 ARG cassette가 공유되기도 했다. 서로 다른 plasmid 사이에서도 ARG cassette가 공유되는 것으로 보아 ARG가 특정 배열을 유지하며 HGT에 의해 다른 균으로 전

Table 1. Distribution of plasmid mobility by source of ARG carrying plasmid

ARG_cluster	Replicon type	Mobility	Plasmid size	Contig ID
Cluster_1, 2	IncFII, IncFIIA	Conjugative	70882, 76200	SC4, 15
			56447-60417	SC1-3, 5, 6, 12, 14, 16
Cluster_3	IncFII, IncFIIA	Non-mobilizable	74879	HA5
		Conjugative	74967	SB3
		Conjugative	49448, 49373	SA1, SB2
Cluster_4	IncR	Mobilizable	40016-40025	SA1, SB1-3
Cluster_5	IncFII, IncFIIA, IncFIB	Conjugative	156162-156164	SC8, 11, 13
			150625-150673	EC1, SC7, 9
			136674-144518	SC1-6, 10, 12, 14-16
Cluster_6	IncI1	Conjugative	104793-105710	SC2, 3, 5-13, 15
		Mobilizable	105040-105620	EC1, SC1, 4, 14, 16, 17
Cluster_7	IncX1	Non-mobilizable	31809-31817	ED1, SD2, 3

Cluster 1-7 correspond to the ARG cluster “QnrS1, aadA22, AAC(3)-Via”, “QnrS1, ANT(3')-IIa, AAC(3)-Via”, “CTX-M-15, TEM-34, mphA, Mrx”, “floR, tet(A), APH(6)-Id, APH(3')-Ib”, “Ecol_catII, dfrA14, sul2, APH(3')-Ib, APH(6)-Id”, “sul2, floR, CTX-M-14, FosA3”, and “floR, TEM-206” respectively.

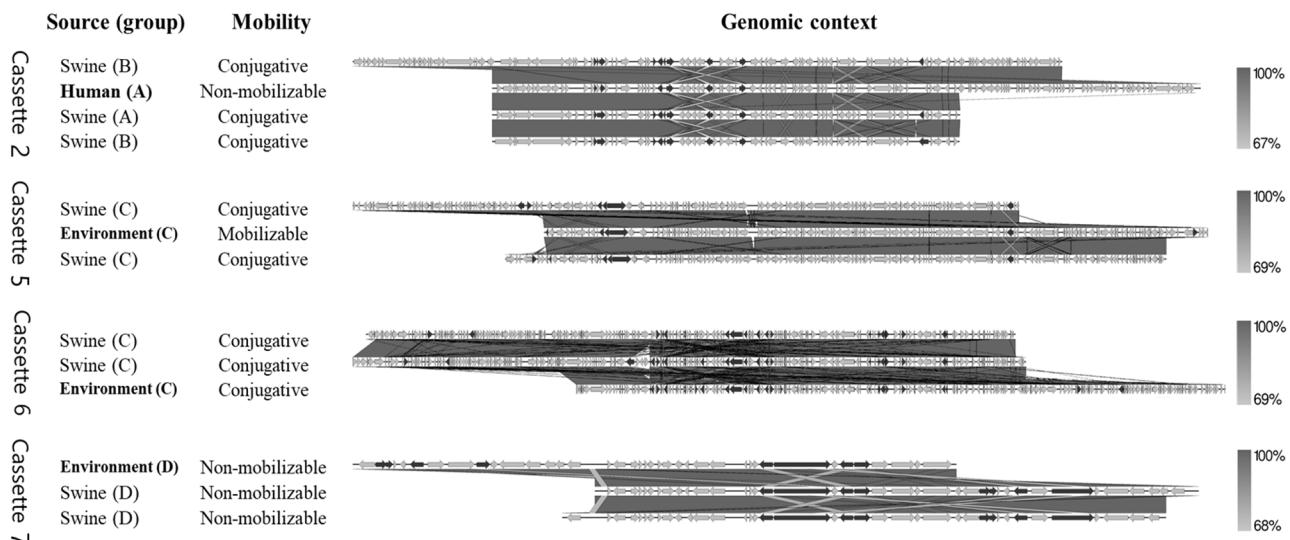


Fig. 3. Synteny analysis of ARG Cassette carrying plasmid shared between different sources. Each synteny result represents the plasmid genome with ARG cassette 2, 5-7. The arrow represents each gene, and the black arrow represents the transposase-related gene. The legend located on the right indicates the similarity between sequences.

파되는 것으로 보인다.

71개의 plasmid 중 ARG cassette와 replicon type이 동일하며 plasmid size가 1 kb 미만으로 차이나 샘플들 간 공유되는 것으로 의심되는 plasmid는 56개였다. 동일 농장의 돼지 유래 균주 사이에서 공유가 의심되는 plasmid가 가장 많았으며, 서로 다른 source 혹은 농장 간 plasmid가 공유되는 경우도 관찰됐다. 서로 다른 source 사이에서 ARG cassette가 유사하게 나타난 샘플들을 대상으로 plasmid의 genome context를 비교하기 위해 synteny 분석을 진행한 결과, 다른 source 사이에서도 plasmid의 유전자 배치가 유사한 것을 확인했다(Fig. 3). A농장의 돼지와 B농장의 돼지, A 농장의 사람에서 분리된 *E. coli* 균주 사이에서 plasmid가 공유된 것으로 추정된다. 농장 C와 D의 경우 각 농장의 돼지와 환경 사이에서 plasmid가 공유된 것으로 나타났다. 농장 D에서 분리된 *E. coli*들은 공통적으로 ARG cassette 7을 지닌 non-mobilizable plasmid를 지녔기 때문에 공통 조상으로부터 유래된 clonal isolates일 가능성이 있다. 농장 A-D에서 인간, 돼지, 환경 간 ARG를 지닌 plasmid가 공유된 것을 확인했는데, 이들이 conjugation을 통해 plasmid를 공유하는 것인지, clonal spread인지 판단하기 위해서는 core genome Multi Locus Sequence Typing 등의 추가 분석이 필요할 것으로 보인다[38].

본 연구의 결과로 서로 다른 농장 및 source 유래 *E. coli* 균주의 plasmid 사이에서 ARG cassette가 공유된 것은 확인하였지만, 균주가 수집된 농장에 대한 정확한 지리 정보가 없기 때문에 실제로 전파가 일어났다고 확신할 수는 없다. 또한, 어떤 HGT 기작에 의해 전파된 것인지 명확하게 구분하기는 쉽지 않다. Clonal spread가 아니라면 대다수의 경우 conjugative plasmid에 의해 ARG가 공유되었을 것으로 예상되며, 일부 non-mobilizable plasmid에서도 ARG가 공유된 것을

확인했다. “Non-mobilizable”임에도 conjugation 외의 과정을 통해 다른 박테리아로 전달했을 것으로 예상된다. Non-mobilizable plasmid는 일반적으로 작은 size를 지녔기 때문에 transduction과 자연적으로 일어나는 transformation에 유리하다고 알려져 있다[39]. Mobilizable plasmid의 경우 host가 conjugative plasmid를 함께 보유할 경우 conjugation이 일어날 수 있기 때문에 mobilizable plasmid에서 발견되는 ARG 역시 전파 가능하다.

동일한 그룹의 균주들 사이에서 ARG 패턴이 동일해도 AST 결과가 불일치하는 경우가 확인됐다. 예를 들어 C 농장의 균주들은 동일한 plasmid를 보유했음에도 다른 항생제 내성 표현형을 보였다. SC1-5는 각각 ARG cassette 3, 5, 6이 위치한 plasmid 3개를 지녔지만, SC1-3에서는 AST 결과에서 6개의 항생제에 내성을, SC4, 5는 AST 결과에서 2-3개의 항생제에 내성을 보였다. 기존 연구에서도 유전형과 표현형이 불일치하는 경우가 보고된 바 있다[40,41]. ARG가 존재하지만 발현에 문제가 있는 경우 항생제 내성이 발현되지 않을 수 있다[42]. ARG가 발견되지 않았음에도 불구하고 항생제 내성이 발현된 것은 본 연구에서 제외되었던 chromosome에 위치한 ARG 때문일 수 있으며, 아직까지 밝혀지지 않은 ARG가 존재하기 때문일 수도 있다. WGS를 통해 유전형으로 표현형을 예측하려는 연구가 지속되고 있지만, 이와 같이 항생제 내성은 복합적으로 작용하기 때문에 ARG를 통한 항생제 내성 표현형 예측의 정확성을 높이기 위해 추가 연구가 필요하다.

본 연구에서는 돼지 농장에서 분리된 *E. coli*를 대상으로 AST와 WGS 분석을 진행해 ARG가 동물, 인간, 환경 간에 공유된 것을 확인했으며, 서로 다른 농장 사이에서도 ARG가 공유되고 있는 것을 확인했다. 항생제 내성균으로 인한 피해는 치명적이기 때문에 지속적으로 항생제 내성을 모니터링하며 항생제 내성 전파를 제어할 수단을 연구할 필요성이 있다.

Note

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgement

This work was supported by the research program funded by the Korea Disease Control and Prevention Agency (2020-ER5408-00). The pathogen resources (NCCP NMS1179 and 32 other strains) for this study were provided by the National Institute of Health Multidrug Resistant Bacteria Specialized Pathogen Resources Bank in Korea. This work was supported by a funding for the academic research program of Chungbuk National University in 2023.

References

- Malik B, Bhattacharyya S (2019) Antibiotic drug-resistance as a complex system driven by socio-economic growth and antibiotic misuse. *Scientific Reports*, 9(1), 9788. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46078-y>.
- Gould I (1999) A review of the role of antibiotic policies in the control of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(4), 459-465. <https://doi.org/10.1093/jac/43.4.459>.
- Baquero F, Martínez JL, Cantón R (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3), 260-265. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>.
- Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, Nisar MA, Alvi RF, Aslam MA et al. (2018) Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and Drug Resistance*, 1645-1658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S173867>.
- Larsson DJ, Flach CF (2022) Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257-269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>.
- Dibner J, Richards JD (2005) Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*, 84(4), 634-643. <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.634>.
- Lim SK, Lee JE, Lee HS, Nam HM, Moon DC, Jang GC, Park YJ, Jung YG, Jung SC et al. (2014). Trends in antimicrobial sales for livestock and fisheries in Korea during 2003-2012. *Korean Journal of Veterinary Research*, 54(2), 81-86. <https://doi.org/10.14405/kjvr.2014.54.2.81>.
- Kunhikannan S, Thomas CJ, Franks AE, Mahadevaiah S, Kumar S, Petrovski S (2021) Environmental hotspots for antibiotic resistance genes. *Microbiologyopen*, 10 (3), e1197. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1197>.
- Yang F, Han B, Gu Y, Zhang K (2020) Swine liquid manure: A hotspot of mobile genetic elements and antibiotic resistance genes. *Scientific Reports*, 10(1), 15037. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72149-6>.
- Massé DI, Cata Saady NM, Gilbert Y (2014) Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: An overview. *Animals*, 4(2), 146-163. <https://doi.org/10.3390/ani4020146>.
- He Y, Yuan Q, Mathieu J, Stadler L, Senehi N, Sun R, Alvarez PJ (2020) Antibiotic resistance genes from livestock waste: Occurrence, dissemination, and treatment. *NPJ Clean Water*, 3(1), 4. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0051-0>.
- Zhao X, Wang J, Zhu L, Wang J (2019) Field-based evidence for enrichment of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in manure-amended vegetable soils. *Science of the Total Environment*, 654, 906-913. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.446>.
- Jechalke S, Heuer H, Siemens J, Amelung W, Smalla K (2014) Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends in Microbiology*, 22(9), 536-545. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.05.005>.
- Ghimpeteanu OM, Pogurschi EN, Popa DC, Dragomir N, Drăgătoiu T, Mihai OD, Petcu CD (2022) Antibiotic use in livestock and residues in food—A public health threat: A review. *Foods*, 11(10), 1430. <https://doi.org/10.3390/foods11101430>.
- Chen J, Ying GG, Deng WJ (2019) Antibiotic residues in food: Extraction, analysis, and human health concerns. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(27), 7569-7586. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01334>.
- Jiang Q, Feng M, Ye C, Yu X (2022) Effects and relevant mechanisms of non-antibiotic factors on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in water environments: A review. *Science of The Total Environment*, 806, 150568. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150568>.
- Von Wintersdorff CJ, Penders J, Van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, Van Alphen L B, Savelkoul PH, Wolfs PF (2016) Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, 7, 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>.
- Christie PJ, Vogel JP (2000) Bacterial type IV secre-

- tion: Conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends in Microbiology*, 8(8), 354-360.
[https://doi.org/10.1016/S0906_842X\(00\)01792_3](https://doi.org/10.1016/S0906_842X(00)01792_3).
19. Cochrane RR, Shrestha A, Severo de Almeida MM, Agyare-Tabbi M, Brumwell SL, Hamadache S, Meaney JS, Nucifora DP, Say HH et al. (2022) Superior conjugative plasmids delivered by bacteria to diverse fungi. *BioDesign Research*, 2022, 9802168.
<https://doi.org/10.34133/2022/9802168>.
20. Xiao X, Zeng F, Li R, Liu Y, Wang Z (2022) Subinhibitory concentration of colistin promotes the conjugation frequencies of mcr-1-and bla NDM-5-positive plasmids. *Microbiology Spectrum*, 10(2), e02160-21.
<https://doi.org/10.1128/spectrum.02160-21>.
21. Lekagul A, Tangcharoensathien V, Yeung S (2019) Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Veterinary and Animal Science*, 7, 100058. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100058>.
22. Clinical & Institute LS (2017) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, pp. 106-112, Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, USA.
23. Ward Jr JH (1963) Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association*, 58(301), 236-244.
<https://doi.org/10.1080/01621459.1963.10500845>.
24. Shen W, Le S, Li Y, Hu F (2016) SeqKit: A cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation. *PloS One*, 11(10), e0163962.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>.
25. Kolmogorov M, Yuan J, Lin Y, Pevzner PA (2019) Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*, 37(5), 540-546.
<https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8>.
26. Pellow D, Mizrahi I, Shamir R (2020) PlasClass improves plasmid sequence classification. *PLoS Computational Biology*, 16(4), e1007781.
<https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007781>.
27. Robertson J, Nash JH (2018) MOB-suite: Software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microbial Genomics*, 4(8), e000206. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000206>.
28. Hyatt D, Chen GL, LoCascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ (2010) Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 1-11.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>.
29. Buchfink B, Reuter K, Drost HG (2021) Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nature Methods*, 18(4), 366-368.
<https://doi.org/10.1038/s41592-021-01101-x>.
30. Alcock BP, Raphenya AR, Lau TT, Tsang KK, Boucharde M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen ALV, Cheng AA et al. (2020) CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D517-D525.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>.
31. Seemann T (2014) Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
32. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA (2011) Easyfig: A genome comparison visualizer. *Bioinformatics*, 27(7), 1009-1010.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039>.
33. San Millan A, Escudero JA, Gifford DR, Mazel D, MacLean RC (2016) Multicopy plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria. *Nature Ecology & Evolution*, 1(1), 0010.
<https://doi.org/10.1038/s41559-016-0010>.
34. Van Gompel L, Luiken RE, Hansen RB, Munk P, Bouwknegt M, Heres L, Greve GD, Scherpenisse P, Jongerius-Gortemaker BG et al. (2020) Description and determinants of the faecal resistome and microbiome of farmers and slaughterhouse workers: A metagenome-wide cross-sectional study. *Environment International*, 143, 105939.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105939>.
35. Chang Q, Wang W, Regev-Yochay G, Lipsitch M, Hanage WP (2015) Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be?. *Evolutionary Applications*, 8(3), 240-247.
<https://doi.org/10.1111/eva.12185>.
36. Gao FZ, He LY, He LX, Zou HY, Zhang M, Wu DL, Liu YS, Shi YJ, Bai H et al. (2020) Untreated swine wastes changed antibiotic resistance and microbial community in the soils and impacted abundances of antibiotic resistance genes in the vegetables. *Science of the Total Environment*, 741, 140482.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140482>.
37. Monger XC, Gilbert AA, Saucier L, Vincent AT (2021) Antibiotic resistance: From pig to meat. *Antibiotics*, 10(10), 1209.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics10101209>.
38. Blanc DS, Magalhães B, Koenig, I, Senn L, Grandbastien B (2020) Comparison of whole genome (wg-) and core genome (cg-) MLST (BioNumericsTM) versus SNP

- variant calling for epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in Microbiology, 11, 1729. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01729>.
39. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F (2010) Mobility of plasmids. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 74(3), 434-452. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00020-10>.
40. Ruppé E, Cherkaoui A, Lazarevic V, Emonet S, Schrenzel J (2017) Establishing genotype-to-phenotype relationships in bacteria causing hospital-acquired pneumonia: A prelude to the application of clinical metagenomics. Antibiotics, 6(4), 30. <https://doi.org/10.3390/antibiotics6040030>.
41. González-Santamarina B, García-Soto S, Dang-Xuan S, Abdel-Gilil MY, Meemken D, Fries R, Tomaso H (2021) Genomic characterization of multidrug-resistant salmonella serovars derby and rissen from the pig value chain in Vietnam. Frontiers in Veterinary Science, 8, 705044. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.705044>.
42. Moran RA, Anantham S, Holt KE, Hall RM (2017) Prediction of antibiotic resistance from antibiotic resistance genes detected in antibiotic-resistant commensal *Escherichia coli* using PCR or WGS. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 72(3), 700-704. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw511>.