

## 가금에서 분리한 *Salmonella*속 균의 항균물질에 대한 감수성 및 plasmid profile

김원용 · 장영호 · 박경윤\* · 김철중\*\* · 신광순\*\* · 박용하

한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자은행  
바이엘코리아(주) 동물약품사업부  
충남대학교 수의과대학\*\*  
(1995년 5월 4일 접수)

### Antimicrobial drug susceptibility and plasmid profiles of *Salmonella* species isolated from poultry

Won-yong Kim, Young-hyo Chang, Kyoung-yoon Park\*, Chul-joong Kim\*\*,  
Kwang-soon Shin\*\*, Yong-ha, Park

Korean Collection for Type Cultures  
Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST  
Bayer Korea Ltd Animal Health Division\*  
College of Veterinary Medicine, Chungnam National University\*\*  
(Received May 4, 1995)

**Abstract :** In this study, we aim to find the presence of virulence-related plasmid in *Salmonella* isolates from poultry, and the difference between *S pullorum* and *S gallinarum* on the plasmid profile and antibiotics resistance. We used seventeen isolates of *Salmonella* spp that were isolated from poultry. Thirteen isolates, *S typhimurium*(ST), *S pullorum*(SP) and *S gallinarum*(SG), contained virulence -related plasmids. These are 95Kd plasmid in ST and 85Kd plasmid in SP and SG. Three(1/4 of ST, 1/1 of SE, and 1/9 of SP) isolates have no detectable plasmids. The isolates of ST have relatively variable plasmid profile but the isolates of *S pullorum* except No 12(additional 3.0Kb plasmid) have common 85Kb, 8.1Kb, 4.0Kb and 2.3Kb plasmid and two of three isolates of *S gallinarum* have common 85Kb, 4.0Kb and 2.3Kb plasmid but the rest has only 85Kb plasmid. Interestingly, all of the isolates of SP have 8.1Kb plasmid, and same size of plasmid is also found in one of ST isolates.

All of the isolates have the resistance to penicillin, chloramphenicol, rifampicin, streptomycin, sulfamethazine and some isolates show the resistance to ampicillin and tetracycline. There is no relatedness between plasmid profile and antibiotics resistance and no differences between SP and SG in antibiotics resistance. Therefore further differentiation of each isolates by restriction enzyme assay and, if possible, characterization of each plasmid, especially, 8.1Kb plasmid in SP and ST, may be necessary.

**Key words :** plasmid profile, *Salmonella* spp, antibiotic resistance

## 서 론

*Salmonella*속 균은 사람과 가축에서 장염을 일으키는 그람음성의 장내세균으로 특히 가금에서는 어린 병아리에서 백색설사로 인한 높은 폐사를 초래하며, 성계에서 가금 티푸스를 초래하여 많은 경제적인 피해를 주는 것으로 알려져 있다.

*Salmonella*속 균에는 plasmid가 있으며, 이들은 전신성 감염 및 마우스에 대한 병원성, 항균제 내성, restriction/modification system 등과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>4,7,9,11,15,16,20</sup>. *Salmonella*속 균에서 항균물질에 대한 내성균의 출현은 항균제의 부분별한 남용으로 발생하며, 이는 R plasmid가 관계되어 사람과 동물의 치료에 어려움을 주고 있다. 또한 병원성 관련 plasmid의 profile과 제한 효소로 절단한 후 전기영동하여 얻는 분획의 양상은 분리주간의 유전적인 차이를 비교하는데 의미가 있으며, 분자역학적인 의미를 가지고 있는 것으로 보고되고 있다<sup>10,12,13,14</sup>. 본 연구에서는 가금에서 분리한 *Salmonella*속 균의 항균물질에 대한 내성 양상을 조사하고 국내 분리 *S pullorum*과 *S gallinarum*이 갖고 있는 plasmid를 분리하여 외국에서 보고된 이들의 plasmid profile과의 차이를 비교하여 계군에 주로 감염되는 *Salmonella*속 균의 분자역학적인 연구를 위한 기본 정보를 얻고자 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

세균주 : (주)바이엘 코리아에 1989년부터 1993년까지 병성감정 의뢰된 가금에서 분리한 *Salmonella*속 균 중 *S typhimurium* 4주, *S enteritidis* 1주, *S pullorum* 9주, 그리고 *S gallinarum* 3주 등 총 17주를 분양 받아 실험에 사용하였다.

배양 : 동결건조한 균주를 LB-broth로 부유하여 tryptic soy agar에서 평판 배양한 후 단독집락을 취하고 5ml의 LB-broth에서 37°C, 18시간 배양하였다. 배양액 중 1ml을 취하여 glycerol을 15%되게 첨가하고 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였으며, 나머지 배양액은 plasmid의 추출에 사용하였다.

항균물질에 대한 감수성 시험 : 총 17주의 *Salmonella*속 균주에 대하여 MacLowry et al의 방법에 준하여 평판 회석법으로 penicillin(PC), ampicillin(AP), streptomycin(SM), gentamycin(GM), chloramphenicol(CM), tetracycline(TC), rifampicin(RF) 및 sulfamethazine(SU)

등 8종의 항균물질에 대한 감수성을 검사하였다. 감수성 시험은 시험균주를 미리 10ml의 tryptic soy broth에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 멸균 생리식염수로  $1 \times 10^6$ /ml되도록 희석한 균액일정량을 각종 항균물질 첨가 평판배지에 접종하고 37°C, 18시간 배양하였다. 감수성의 판정은 세균집락의 형성유무로 하였으며, 항균물질에 대한 최소발육억제농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 구하였다. 내성균의 판정은 National Committee for Clinical Laboratory Standards의 판정기준에 따랐다<sup>1</sup>.

Plasmid의 분리 : *Salmonella*속 균의 plasmid profile에 관하여 조사할 목적으로 Birnboim과 Doly의 alkaline lysis method<sup>2</sup>로 plasmid를 분리하였다. 균체를 LB broth 5ml에 접종하여 37°C에서 18시간동안 진탕 배양한 다음, 배양액 1.5ml을 원심하여 얻은 균체에 solution I(50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-Cl, pH 8.0, 4mg/ml lysozyme) 100 $\mu$ l를 가하여 실온에서 5분간 방치하였다. 여기에 solution II(0.2N NaOH, 1% SDS) 200 $\mu$ l를 가하여 얼음속에 5분간 방치한 다음, solution III(3M Potassium acetate, pH 4.8) 150 $\mu$ l를 넣고 다시 얼음속에 10분간 방치한 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액에 동량의 TE saturated phenol/chloroform을 가하고 원심하여 상등액을 취한 다음 두배용량의 cold ethanol을 가하여 실온에서 10분간 방치한후 원심분리하여 DNA를 침전하였다. DNA pellet은 70% ethanol로 세척하고 TE buffer (pH 8.0) 50 $\mu$ l로 용해하였다.

*Salmonella*로부터 분리한 plasmid는 Meyer et al의 방법에 준하여 loading buffer(30% glycerol, 50mM EDTA, 0.025% bromophenol blue in 50mM Tris-HCl, pH 8.5)와 2:1로 혼합하여 agarose gel(BRL)상에 잠적하고 TBE(89mM Tris base, 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH 8.0)하에서 100V로 4시간동안 전기영동을 실시하였다. Agarose gel은 0.5 $\mu$ g/ml의 ethidium bromide 용액에 담근후 파장 254nm의 ultraviolet ray를 사용하여 DNA를 확인하였다.

## 결 과

항균물질에 대한 감수성 : 총 17주의 *Salmonella*속 균에 대하여 PC, AP, SM, GM, CM, TC, RF 및 SU 등 8종의 항균물질에 대한 감수성 검사를 실시하여 Table 1과 같은 성적을 얻었다.

Table 1. Antimicrobial drug susceptibility of *Salmonella* spp

| Strain          | Susceptive | Resistant            |
|-----------------|------------|----------------------|
| 1(92-1429, ST)  | GM         | PC CM RF SM SU AP TC |
| 2(93-712, ST)   | GM         | PC CM RF SM SU AP TC |
| 3(93-309, SP)   | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |
| 4(89-179, ST)   | AP GM TC   | PC CM RF SM SU AP    |
| 5(92-1153, SG)  | AP GM      | PC CM RF SM SU TC    |
| 6(93-123, SP)   | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |
| 7(93-216, ST)   | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |
| 8(93-526, SP)   | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |
| 9(93-414, SP)   | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |
| 10(93-120, SP)  | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |
| 11(92-1214, SP) | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |
| 12(92-1171, SP) | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |
| 13(93-1320, SG) | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |
| 14(SE)          | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |
| 15(93-384, SP)  | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |
| 16(93-1245, SG) | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |
| 17(93-1410, SP) | AP GM TC   | PC CM RF SM SU       |

Plasmid profile : 실험에 사용한 17균주 중 ST 2주, SP 1주, SE 1주는 plasmid를 전혀 가지고 있지 않았다 (Table 2, 3 및 4). plasmid를 가지고 있는 나머지 균주는 모두 병원성과 관련이 있는 것으로 보고된 바 있는 85Kb 및 96Kb 크기의 plasmid가 각각 SP, SG와 ST에서 관찰되었으며, 이외 SP는 모두 ST(92-1429)가 가지고 있는 8.1Kb의 plasmid를 가지고 있어 SG와 구분이 되었다(Fig 1).

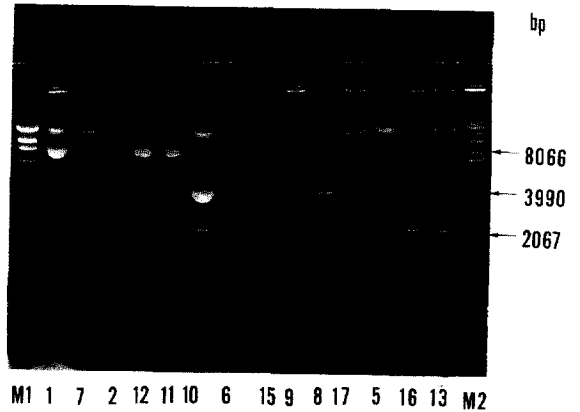


Table 2. Plasmid profiles of *Samonella typhimurium* isolates

| Strain  | Plasmid | profile     |
|---------|---------|-------------|
| 92-1429 | 120kb   | 94kb 8.1kb  |
| 93-216  |         | 94kb        |
| 93-712  |         | 6.0kb 3.0kb |

Fig 1. Plasmid profiles of *Salmonella* spp isolated from poultry M1:  $\lambda$  Hind III, M2: Supercoiled DNA maker, 1, 7, 2: *S typhimurim*, 12, 11, 10, 6, 15, 9, 8, 17: *S pullorum*, 5, 16, 13: *S gallinarum*

**Table 3.** Plasmid profiles of *Samonella pullorum* isolates

| Strain     | Plasmid profile              |
|------------|------------------------------|
| 12 92-1171 | 85kb 8.1kb 4.0kb 3.0kb 2.3kb |
| 11 92-1214 | 85kb 8.1kb 4.0kb 2.3kb       |
| 10 93-120  | 85kb 8.1kb 4.0kb 2.3kb       |
| 6 93-123   | 85kb 8.1kb 4.0kb 2.3kb       |
| 3 93-309   | 85kb 8.1kb 4.0kb 2.3kb       |
| 15 93-384  | 85kb 8.1kb 4.0kb 2.3kb       |
| 9 93-414   | 85kb 8.1kb 4.0kb 2.3kb       |
| 8 93-526   | 85kb 8.1kb 4.0kb 2.3kb       |
| 17 93-1410 | 85kb 8.1kb 4.0kb 2.3kb       |

**Table 4.** Plasmid profiles of *Samonella gallinarum* isolates

| Strain  | Plasmid profile  |
|---------|------------------|
| 92-1153 | 85kb             |
| 93-1245 | 85kb 4.0kb 2.3kb |
| 93-1320 | 85kb 4.0kb 2.3kb |

## 고 찰

지금까지의 세균감염증에 대한 역학적인 연구에는 일반적으로 혈청형, 생물형, 약제내성 및 일부 세균의 경우 phage형 등이 기초가 되었으나, 1980년대에 들어서면서 각 균이 보유하고 있는 plasmid의 제한효소 처리에 의한 분획의 양상을 역학적인 연구에 적용하는 예가 늘어나고 있다. 특히 *Salmonella*속 균에 대한 이러한 연구는 매우 활발하게 이루어지고 있다. O'bien et al<sup>15</sup>은 사람 및 동물유래 *S typhimurium*으로부터 100, 9.2, 2.4Kb의 각각 동일한 plasmid를 분리함으로써 사람과 동물간의 전파가능성을 시사한 바 있고, Helmuth et al<sup>16</sup>은 세계 여러국가에서 분리된 *Salmonella*속 균의 7가지 혈청형에 대해 역학상황을 파악하기 위해 plasmid profile을 분석하여 *S typhimurium*은 60Md, *S enteritidis*는 37Md, *S dublin*은 56Md, *S cholerae suis*는 30Md의 plasmid를 공통적으로 가지고 있음을 확인하였고 일부, 국가에서는 plasmid 양상의 차이가 있음

을 보고하였다.

우리나라에서 최 등<sup>17</sup>은 돼지 및 소 유래 균에서 분자량이 1.0-90Md, plasmid 수가 1-4개임을 보고한 바 있고, 박 등<sup>18</sup>은 비둘기 및 수생조류 유래 *S typhimurium* var *copenhagen*166 주의 plasmid 보유상황을 조사한 바 plasmid 수가 4개 혹은 5개이었고, 분자량이 3.2-60Md이었으며, 60Md plasmid를 공통적으로 보유하고 있음을 보고하였다. 최 등<sup>19</sup>은 1984년부터 1987년까지 대구, 경북, 경남지역의 돼지 및 소 유래 *Salmonella*군 8개 혈청형, 98주에 대하여 plasmid를 분석한 결과 plasmid수는 1-3개이었고, 분자량은 0.8-70Md으로 이전 연구자들이 결과와 일치함을 보고하였다.

가금 유래 *Salmonella*속 균, 즉 *S typhimurium* 4주, *S pullorum* 9주, *S gallinarum* 3주, *S enteritidis* 1주에 대하여 plasmid profile을 조사한 결과 2.3Kb-12Kb plasmid를 하나 또는 네개 가지며, SP는 SG이 가지고 있지 않은 8.1Kb의 plasmid를 가지고 있어 구분이 가능하였다. ST의 경우 한 균주, SE한 균주, SP한 균주는 plasmid를 전혀 가지고 있지않았다. 실험에 사용한 균주의 수가 적었으므로 지역간, 분리주간의 차이를 알아 내는데는 적합하지 않았으며, 많은 균주의 확보와 다양한 지역에 대한 조사가 요망된다.

Schroeder et al이 *Salmonella*의 항생제 내성과 전달에 관련된 인자로서 plasmid를 주목한 이후 각 항생제들의 내성과 관련된 plasmid에 관한 많은 연구가 수행되었다. Anderson<sup>7</sup>은 *S typhimurium* phage type 179의 ampicillin, tetracycline, sulphonamides와 trimethoprim에 대한 내성연구를 통해 ampicillin과 tetracycline내성이 60Md plasmid와 관련이 있음을 감수성 *E coli*를 transformation시킴으로써 증명하였으며, sulphonamides와 trimethoprim에 대한 내성은 작은 8.7Md, 5.2Md, 2.1Md과 관련이 있는 것으로 보고하였다. 본 실험에서는 ampicillin, gentamycin, tetracycline, penicillin, chloramphenicol, rifampicin, streptomycin 및 sulfamethazine 등 8개의 약제를 사용하여 내성을 조사하였는데, 모두 penicillin, chloramphenicol, rifampicin, streptomycin, sulfamethazine에 내성을 보였으며, *S typhimurium*중 두 균주가 ampicillin과 tetracycline에 모두 내성을 가지고 있었고, 한 균주는 ampicillin에 대한 내성을 가지고 있었고, *S gallinarum*중 한 균주는 tetracycline에 대한 내성을 가지고 있었다.

Terakado et al<sup>4</sup>과 Chikami et al<sup>5</sup>은 *S dublin*의 75kb plasmid, Nakamura et al<sup>6</sup>은 *S enteritidis*의 54Kb plasmid, Barrow et al<sup>8</sup>은 *S pullorum*과 *S gallinarum*의

85kb plasmid가 병원성과 관련이 있음을 밝혔으며, Anderson<sup>7</sup>은 *S typhimurium* phage type 179의 항생제 내성과 plasmid profile과의 상관관계에 관해 보고 하였고, Whiley et al<sup>20</sup>은 *S typhimurium*에서 restriction 및 modification system과 관련된 plasmid에 의한 phage type의 전환을 보고한 바 기준에 밝혀져있는 표현형과 plasmid profile, 특정 plasmid의 제한효소 처리에 의한 분획의 양상과의 상호 연관성을 밝히고, 각 plasmid의 산물과 그의 생물학적 기능을 밝히는 연구 또한 활발하게 진행되고 있다.

본 실험은 이러한 일련의 연구과정의 한 단계로서 실행하였고, 향후 특정 plasmid의 제한효소 처리후 전기영동상의 절편 이동상에 의한 분자역학적인 연구 및 각 plasmid의 특성을 규명할 필요가 있는 것으로 사료된다.

## 결 론

*Salmonella*속 균중 plasmid를 가지고 있는 모든 분리주가 병원성과 관련이 있는 큰 plasmid를 가지고 있었으며, 외국의 보고와는 달리 *S pullorum*분리주는 *S typhimurium*가 가지고 있는 8.1kb의 plasmid를 가지고 있어 *S gallinarum*과는 차이를 보였다.

17개 국내 가금 분리주중 *S typhimurium*는 두 균주, *S pullorum*는 한 균주는 plasmid를 가지고 있지 않았다.

앞으로 국내 SP분리주에서 발견된 8.1Kb와 병원성 관련 plasmid의 restriction enzyme assay 및 각 plasmid에 대한 characterization에 관한 실험이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Thornsbery C, Anhalt J, Barry AL, et al. Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, NCCLS. *Villanova* 1985; 581-587.
2. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7: 1513.
3. Meyers JA, Sanchez D, Elwell LP, et al. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J Bacteriol* 1976; 127-1529.
4. Terakado N, Sekizaki T, Hashimoto K, et al. Correlation of a fifty-megadalton plasmid in *Salmonella dublin* and virulence for mice. *Infection and Immunity* 1983; 41: 443-444.
5. Chikami GK, Fierer J, Guiney DG. Plasmid-mediated virulence in *Salmonella dublin* demonstrated by use of a Tn5-oriT construct. *Infection and Immunity* 1985; 350: 420-424.
6. Nakamura M, Sato S, Ohya T, et al. Possible relationship of a 36-megadalton *Salmonella enteritidis* plasmid to virulence in mice. *Infection and Immunity* 1985; 47: 831-833.
7. Anderson DM. Plasmid studies of *Salmonella typhimurium* phage type 179 resistant to ampicillin, tetracycline, sulphonamides and trimethoprim. *J Hyg camb* 1980; 85: 293-300.
8. Barrow PA, Simpson JM, Lovell MA, et al. Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infection and Immunity* 1987; 55: 38-392.
9. Handfield TL, Monson MH, Wachsmuth IK. An outbreak of antibiotic resistant *Salmonella enteritidis* in Liberia, West Africa. *J Infec Dis* 1985; 151: 790-795.
10. Mayer LW. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and intracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 1988; 1: 228-243.
11. Rodrique DC, Cameron DN, Puhr ND, et al. Comparison of plasmid profiles, phage types, and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella enteritidis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 845-857.
12. Shales D, Currie-McCumber DA. Plasmid and lysis in molecular epidemiology: a summary and future directions. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 738-746.
13. Wachsmuth K. Molecular epidemiology of bacterial infection: example of methodology and of investigations of outbreak. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 682-692.
14. Christensen JP, Olsen JE, Hansen HC, et al.

- Characterization of *Salmonella enterica serovar gallinarum biovars gallinarum and pullorum* by plasmid profiling and biochemical analysis. *Avian Pathology* 1992; 21: 461-470.
15. O'bien TF, Hopkins JD, Gilleece ES. Molecular epidemiology of antibiotic resistance in *Salmonella* from animals and human beings in the United States. *New Engl J Med* 1982; 307: 1-6.
  16. Helmuth R, Stephan R, Bunge C, et al. Epidemiology of virulence-associated plasmid and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infection and Immunity* 1985; 48: 175-182.
  17. 최원필, 이희석, 여상근 등. 우 및 돈에서 분리한 *Salmonella* 유래주의 유전학적 및 분자생물학적 성상에 관한 연구. R plasmid의 비적합성 및 plasmid profile. *대한수의학회지*. 1989; 29(2): 59-67.
  18. 박노찬, 최원필. 비둘기 및 수생조류 유래 *Salmonella typhimurium*의 생물학적 특성과 plasmid profile에 관한 연구. *대한수의학회지*. 1990; 30(2): 203-214.
  19. 최원필, 정석찬. 동물에서 분리된 *Salmonella* 균의 병원성 관련 plasmid에 관한 연구. 1992; 32(3): 369-376.
  20. Whiley, Susan J, et al. Plasmid profile analysis of a *Salmonellosis* outbreak and identification of a restriction and modification and modification system. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54(6): 1591-1594.