

## 경북지방 돼지유래 *salmonella* 속균의 약제내성과 plasmid profile

김규태, 김원일\*, 김상윤\*, 장영술, 김대원, 김봉환\*\*

경상북도가축위생시험소 서부지소, 북부지소\*, 경북대학교 수의과대학\*\*

### Antibiotic resistance and plasmid profile of *salmonella* spp isolated from swine in Kyoungbuk province

Kyoo-Tae Kim, Won-Il Kim\*, Sang-Youn Kim\*, Young-Sool Chang,  
Dae-Won Kim, Bong-Hwan Kim\*\*

Western branch, Northern branch\*, Kyoungbuk Veterinary Service Laboratory  
College of Veterinary Medicine, Kyoungpook National University\*\*

#### Abstract

This study was conducted to investigate the antibiotic resistance and plasmid profiles of 58 salmonella spp isolated from mesenteric lymphnodes of slaughter pigs in Kyoungbuk province during the period from September 1997 to June 1998.

The results obtained are as follow that all isolates were susceptible to amikacin, gentamicin, ciprofloxacin and enrofloxacin, and the majority of isolates were highly susceptible to norfloxacin, colistin, nalidixic acid and apramycin while they were moderately susceptible to kanamycin, cephalothin, chloramphenicol, ampicillin, trimethoprim and penicillin. The majority of isolates were over 90% resistant rates to lincomycin, sulfadimethoxine, vancomycin, methicillin and erythromycin.

The plasmid profiles of 58 *salmonella* spp are developed 1 to 4 fractions, 0.9 to 29.5 Kb molecular range sizes and 27 strains (46.5%) were showed plasmid profiles by agarose gel electrophoresis. *S derby* harbored 29.5 Kb and 7 Kb, and *S schwarzengrund* had 14 Kb and 0.9 Kb harboring sizes. Four of 10 *S agona* and 2 of 4 *S typhimurium* were harbored 3.1 Kb and 27.5 Kb, respectively. Thirty-five untypable strains are developed variable size fractions its showed small size plasmid profile less than 6 Kb and 22 (62.8%) of them had no detectable plasmids.

---

Key words : Swine, *Salmonella* spp, Antibiotic resistance, Plasmid profile

## 서 론

*Salmonella*속 균은 그람 음성의 통성 혐기성 세포내 기생세균으로서 1886년 Salmon과 Smith에 의해 처음으로 분리, 보고된 이래 현재 2,000여종의 혈청형이 알려져 있으며, 지역과 숙주에 따라 균형의 분포도 다르다<sup>1,2)</sup>. *salmonella*속 균중에서 사람 및 동물에 병원성을 나타내는 종류는 많지는 않으나 자연계에 널리 분포하여 감염의 기회가 많으므로 이 세균에 의한 피해는 크다. 전세계적으로 널리 분포하고 사람을 비롯하여 소, 말, 돼지, 개, 고양이, 가금 등 다양한 숙주에 감염됨으로써 장염, 패혈증, 유산, 폐렴 등의 증상을 나타내며 특히 환경이나 식품오염을 통하여 식중독을 일으키므로 공중보건학적으로 매우 중요시하고 있다<sup>3-5)</sup>.

항생제는 세균성감염증의 치료에 유용하게 사용되어져 왔으나 발육촉진을 위하여 사료에 혼합 투여하는 등 이들 약제의 오·남용으로 약제내성균을 선택적으로 증가시켜 세균성감염증의 치료 및 예방에 많은 문제점이 야기되고 있는 실정이다<sup>6,7)</sup>. 약제내성은 염색체 유전자의 변이에 의한 경우도 있지만 주로 R plasmid 유전자에 기인한다고 알려졌다<sup>8)</sup>. R plasmid는 항생제에 대한 내성을 발현시키는데 관여하는 유전인자로서 장내세균 뿐만 아니라 각종 세균에서 증명되었으며, 이들 세균의 감염증 치료에는 내성균의 문제를 고려해야 한다. 특히 R plasmid는 접합을 통하여 동종 또는 이종세균간에 전달될 수 있으므로 약제 내성세균의 증가에 중요한 역할을 한다<sup>9)</sup>. Levy 등<sup>10)</sup>은 항생제를 투여하는 동안 장내에서 R plasmid의 전달률은 증가한다고 보고하였으며, Hardy<sup>11)</sup>는 정상 세균총에 존재하던 R plasmid 보유 세균이 계속적인 항생제 사용으로 장내에서 우세한 형태로 자연계에 배출된다고 하였다. 지난 수십

년간 동물에서 *salmonella*속 균과 병원성 대장균에 의한 설사증을 예방하기 위하여 이들 병원균에 대하여 항균작용을 갖는 설파제 또는 테트라사이클린제와 같은 항생물질이 사료에 첨가되어 왔다<sup>11)</sup>. 그러나 현재 사료에 첨가된 항생물질은 *salmonella*속 균과 대장균을 포함한 많은 그람음성 장내세균의 감수성 균주에 대하여는 선택적 억압작용을 하는 반면 내성균주에 대하여는 선택적 증식작용을 하기 때문에 항생물질의 구강투여 또는 사료첨가가 금지되고 있으며 또한 사람과 동물에서 항생물질의 무분별한 남용은 항생제 내성문제외에도 균교대감염의 원인이 된다<sup>12)</sup>. 이와 같은 이유로 선진국에서는 1970년대 초부터 이미 사람이나 동물의 치료와 동물의 사료첨가제로 사용하는 항생물질에 관한 규제를 하고 있으며<sup>13)</sup>, 스웨덴에서는 1986년부터 질병예방이나 성장촉진의 목적으로 동물에 항생제를 투여하는 것을 법으로 금지하여 왔다<sup>14)</sup>. 근래에는 모든 국가에서 동물용 항생물질의 사료첨가가 금지되고 있으며 각종 항생물질 대신 설사를 일으키는 병원성 장내세균 특히 *salmonella*속 균과 대장균에 대하여 길항작용을 나타내는 비병원성 균주를 이용한 생균제 (probiotics)의 사용이 권장되고 있다<sup>15)</sup>.

또한 plasmid에는 R factor 이외에도 표현형질에 따라 항세균성 단백질인 colicin을 생성하는 col plasmid, 분해효소를 지배하는 metabolic plasmid, 독성물질을 생성하는 virulence plasmid 등이 있다<sup>11)</sup>. 이들 plasmid는 균체간 접합시의 전달성 유무에 따라 conjugative와 non-conjugative plasmid로 구분이 되고 conjugative plasmid는 F 및 I pili접합능에 따라 malespecific phage에 의해 용균되는 fertility inhibition<sup>-</sup>(Fi<sup>-</sup>)와 용균되지 않는 F<sup>-</sup>로 구분된다<sup>11,16)</sup>.

*Salmonella*속 균에 의한 감염시 감염원을 규명함에 있어서 분리균의 혈청형, 생물형, 약제

내성형, phage형 등의 혈청학적 생물학적성상을 조사하여 왔으나 최근에 유전학적방법으로 *salmonella*속 균이 보유하고 있는 plasmid를 분리하여 이들의 전기영동양상과 제한효소처리에 의한 DNA의 절단양상 등을 분석하여 분자생물학적 특성에 따라 역학관계를 규명하였다<sup>16,17)</sup>. *salmonella*속 균의 병원성에 관계되는 인자로는 lipopolysaccharide, adhesive pili, flagella, enterotoxin 등이 알려져 있으나, 최근에는 plasmid에 의해서도 병원성이 유발됨이 알려지고 있다. 특히 *salmonella*속 균중에서 *S typhimurium*, *S enteritidis*, *S dublin*, *S gallinarum*은 각각 공통적으로 60 megadalton (Md), 37 Md, 56 Md 및 85 Kb의 비교적 큰 plasmid를 보유하며, 이들 보유균종이 plasmid가 없는 동일균종보다 마우스에 대한 병원성이 강하고 정상혈청에 대한 저항성도 인정되고 있다<sup>16,17)</sup>. 최근 *S choleraesuis*의 50 Kb virulence plasmid를 없앤 효과적이고 안전한 비특이적인 변이체가 개발되었으며 세포와 단핵구에 대한 침투력 또한 없는 것으로 확인되어 효과적인 백신으로 사용할 수 있다<sup>18, 19)</sup>.

Brunner 등<sup>20)</sup>은 *S typhimurium*이 다양한 숙주에 감염함에도 불구하고 그들의 plasmid profile과 약제내성 유형은 쉽게 변하지 않고 안정하여 plasmid profile 분석법을 *S typhimurium*의 역학적 연구에 응용 할 수 있다고 하였다. Homeberg 등<sup>21)</sup>은 *salmonella* 분리주의 동정방법으로 plasmid profile 분석법, phage typing법 및 항생제 감수성검사 등을 실험하고 plasmid profile 분석과 phage typing법이 항생제 감수성 검사보다 특이적이라고 하였다. 최근 plasmid profiling, ribotyping, 변이된 *S typhimurium* insertion sequences(ISs) 200 제한효소에 의해 특이절단된 공통 probe인 16S + 23S rRNA를 이용한 진단법이 있으며 이러한 IS probe는 *salmonella*속 균의 진단에 특이성이

높아 공중보건학적 역학조사에 많이 이용되고 있다<sup>22-24)</sup>. 그러나 야외분리 *salmonella*속 균중에서 plasmid가 없거나 phage typing이 불가능할 경우에는 항생제 감수성 검사에 의존해야 한다.

본 실험에서는 경북지방 돼지유래의 *salmonella*속 균의 각종 항생제에 대한 내성균의 분포 및 약제 내성유형과 plasmid profile을 조사하는 모니터링을 통하여 농장의 사양관리개선, 식육 식품의 안전성을 확보하고 나아가서 소비자의 건강을 위협하는 요소들을 줄여줌으로서 국제경쟁력의 제고를 위한 기초적인 자료 제공의 목적으로 실험을 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시균주

1997년 9월부터 1998년 7월 사이 대구 및 경북지방 도축장에서 도축된 도축돈의 회맹결장 부 장관막림프절에서 분리한 *S agona* 10주, *S typhimurium* 4주, *S schwarzengrund* 4주, *S derby* 4주, *S ayinde* 1주, untypable 35주 등 58주를 공시하였다.

### 2. 항생제 감수성검사

항생제감수성검사는 Sahn 등<sup>25)</sup>의 방법을 응용하여 microbroth dilution method로 실시하였으며, 감수성 유무는 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)<sup>26)</sup>기준에 의하였다. 항생제 감수성검사에 사용한 약제는 Sigma 제품의 ampicillin(Am), amikacin (An), apramycin(Ap), chloramphenicol(C), cephalothin(Cf), ciprofloxacin(Cip), colistin(CI), dihydrostreptomycin(Ds), erythromycin(E), enrofloxacin(Enr), gentamicin(Gm), kanamycin(K), lincomycin(L), methicillin(Me), nalidixic acid(Na), norfloxacin(Nor), penicillin(P), sulfadimetho-

xine(Sm), tetracycline(Te), trimethoprim(Tmp), vancomycin(Va), ceftiofur(Xnl) 등 총 22종의 항생제를 사용하였다.

### 3. 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)의 측정

최소억제농도 측정은 microbroth dilution method에 의해 공시균주 4~5집락을 Mueller Hinton broth (Difco)에 37°C, 12~18시간 증균시킨 다음 혼탁도를 McFarland No. 0.5( $1.5 \times 10^8$ /ml)가 되게 멸균 생리식염수로 조정된 후 이것을 다시 멸균 생리식염수로 100배 희석하여 최종탁도를  $5 \times 10^5$ cfu/ml의 농도가 되게 하였다. 항생제는 512 µg/ml가 되게 하여 micro-

plate에 100µl씩 2배 계단희석을 하였으며 마지막 well의 100µl는 제거하였다. pH indicator로써 0.018% phenol red와 1% glucose를 첨가한 broth를 100µl씩 전 well에 분주하였으며 미리 희석한 균액 100µl를 전 well에 분주하여 37°C에서 12~18시간 배양하였다.

### 4. Plasmid DNA profile

Plasmid DNA profile을 조사하기 위하여 Sambrook 등<sup>27)</sup>의 alkaline lysis 방법으로 plasmid를 분리하였다. 공시균주 1개 집락을 3 ml LB broth에 접종하여 37°C, 12~18 시간 배양한 후 14,000 rpm에 1분간 원심하여 상청액을 제거하고 40µl의 TE buffer(1mM EDTA, 10mM

Table 1. Distribution of minimum inhibitory concentration for 58 *salmonella* spp isolated from mesenteric lymphnodes of slaughter pigs

| Drugs | Concentration(µg/ml) |      |     |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
|-------|----------------------|------|-----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|
|       | 0.125                | 0.25 | 0.5 | 1  | 2  | 4  | 8  | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | 512 |
| Cip   | 48                   | 3    | 5   | 2  |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
| Enr   | 39                   | 4    | 12  | 3  |    |    |    |    |    |    |     |     |     |
| Ap    |                      |      |     |    | 2  |    | 11 | 37 | 7  | 1  |     |     |     |
| An    |                      |      | 1   | 4  | 6  | 9  | 1  | 23 | 14 |    |     |     |     |
| Nor   | 17                   | 11   | 18  | 8  | 2  | 2  |    |    |    |    |     |     |     |
| Na    | 1                    |      |     | 1  | 5  | 28 | 12 | 2  | 5  | 1  | 1   |     | 2   |
| Cf    |                      |      |     | 1  | 8  | 14 | 16 | 9  | 2  | 1  | 3   |     | 4   |
| Gm    |                      |      | 4   | 11 | 35 | 7  | 1  |    |    |    |     |     |     |
| Cl    | 1                    | 8    | 4   | 17 | 12 | 7  | 5  |    | 1  |    |     | 1   | 2   |
| K     |                      |      |     |    |    | 9  | 22 | 21 | 2  |    |     | 3   | 1   |
| Tmp   | 17                   | 16   | 4   | 1  | 2  | 3  |    |    |    | 2  | 4   | 9   |     |
| C     |                      |      |     | 1  | 2  | 24 | 17 | 4  | 2  | 5  | 2   | 1   |     |
| Am    |                      |      | 2   | 15 | 13 | 13 | 2  | 1  | 1  |    | 1   | 2   | 8   |
| P     |                      |      |     |    |    |    |    | 13 | 15 | 10 | 6   | 3   | 11  |
| Te    | 2                    |      | 3   | 16 | 2  |    |    |    |    | 4  | 5   | 15  | 11  |
| Xnl   |                      | 1    | 1   | 12 | 15 | 11 | 2  |    | 7  | 9  |     |     |     |
| Ds    |                      |      | 4   | 1  |    | 6  | 11 | 15 | 5  | 7  | 1   | 1   | 7   |
| E     |                      |      |     |    |    |    |    | 1  | 2  |    | 18  | 12  | 25  |
| Me    | 1                    |      |     |    |    | 1  |    |    |    |    |     |     | 56  |
| Va    |                      |      |     |    |    |    | 1  |    |    |    | 1   | 28  | 28  |
| Sm    |                      |      |     |    |    |    |    |    |    | 1  |     |     | 57  |
| L     |                      |      |     | 1  |    |    |    |    |    |    | 1   | 2   | 54  |

Tris, pH 8.0)에 잘 부유한 후, 600 $\mu$ l lysis buffer(2 pellet of NaOH, 0.6g Tris, 37.2g Na<sub>2</sub> EDTA, 4.0g SDS in 100 ml H<sub>2</sub>O, pH 12.45)를 첨가하여 위아래로 뒤집어 주면서 잘 섞어준 후 항온수조에서 37°C 20분간 배양, 2M Tris(pH 7.0) 30 $\mu$ l를 섞은 후 10회 invert한 후 5M NaCl 160 $\mu$ l을 첨가한 후 10번 invert하고 1시간동안 wet ice bath에 방치한 다음 14,000rpm에서 7분간 원심한 후 상청액을 800  $\mu$ l의 absolute ethanol을 넣은 후 -70°C에 1시간 둔 후 14,000rpm에서 15분간 원심한 후 상청액을 제거하고 70% ethanol로 2번 세척하였다. 실온에서 10분 정도 건조시킨 후에 2~3 $\mu$ l의 RNase를 첨가한 30 $\mu$ l의 TE buffer에 부유하여 전기영동 재료로 사용하였다.

#### 5. Agarose gel electrophoresis

Agarose를 TBE (0.089M Tris-borate, 0.089M boric acid, 0.008M EDTA)으로 0.7% 되게 만든 gel에 plasmid DNA 10 $\mu$ l와 loading buffer(0.05% bromophenol blue, 8% sucrose) 혼합액을 각 well에 넣은 다음, horizontal apparatus에서 94V에서 100분 동안 전기영동시켰다. 전기영동 후 ethidium bromide 용액(5 $\mu$ g/ml)에 10분 염색하고 5분간 탈색하여 UV 램프에서 plasmid DNA를 확인하고 사진촬영을 하였다. 분자량 확인을 위한 marker는  $\lambda$  DNA EcoT14 fragment를 사용하였다.

### 결 과

#### 1. Results of MIC of *salmonella* isolates

경북지방 돼지유래 *salmonella*속 균 58주에 대한 항생제 감수성을 검사한 결과 Table 1에 서와 같은 최소억제농도(MIC) 분포를 나타내었 으며, Cip와 Enr은 1 $\mu$ g이하에서 Nor와 Tmp는 4 $\mu$ g 이하의 낮은 농도에서 감수성을 보인 반면, E, Me, Va, Sm과 L은 128 $\mu$ g이상의 높은 농도

에서도 내성을 나타내었다.

Table 2에서는 약제에 따른 내성균의 분포를 나타내었는데 분리된 58주의 *salmonella*속 균의 내성율은 L, Sm, Va, Me 및 E은 90%이상의 내성율을 보인 반면, Nor, Cl, Na 및 Ap은 10% 미만의 낮은 내성율을 나타내었으며, An, Gm, Cip, Enr 등에는 100% 감수성을 보였다.

분리된 혈청형별 약제에 대한 내성균의 분포 Table 3과 같이 전 분리균주 대부분이 L, Sm,

Table 2. Antimicrobial susceptibilities of 58 *salmonella* spp isolated from mesenteric lymphnodes of slaughter pigs

| Drugs               | No of resistant strains | Resistance rate(%) |
|---------------------|-------------------------|--------------------|
| Lincomycin          | 57                      | 98.3               |
| Sulfadimethoxine    | 57                      | 98.3               |
| Vancomycin          | 57                      | 98.3               |
| Methicillin         | 56                      | 96.5               |
| Erythromycin        | 55                      | 94.8               |
| Dihydrostreptomycin | 36                      | 62.1               |
| Tetracycline        | 31                      | 53.4               |
| Ceftiofur           | 29                      | 50.0               |
| Penicillin          | 20                      | 34.5               |
| Trimethoprim        | 15                      | 25.8               |
| Ampicillin          | 11                      | 18.9               |
| Chloramphenicol     | 10                      | 17.2               |
| Cephalothin         | 8                       | 13.8               |
| Kanamycin           | 6                       | 10.3               |
| Norfloxacin         | 4                       | 6.9                |
| Colistin            | 4                       | 6.9                |
| Nalidixic acid      | 4                       | 6.9                |
| Apramycin           | 1                       | 1.7                |
| Amikacin            | 0                       | 0                  |
| Gentamicin          | 0                       | 0                  |
| Enrofloxacin        | 0                       | 0                  |
| Ciprofloxacin       | 0                       | 0                  |

Table 3. Resistance of *salmonella* spp isolates to selected antimicrobial agents

| Antimicrobial agent<br>( $\geq \mu\text{g/ml}$ ) | Total | Serotypes    |                    |                       |              |               |                  |
|--|-------|--------------|--------------------|-----------------------|--------------|---------------|------------------|
|  |       | <i>Agona</i> | <i>Typhimurium</i> | <i>Schwarzengrund</i> | <i>Derby</i> | <i>Ayinde</i> | <i>Untypable</i> |
| Total  | 58    | 10           | 4                  | 4                     | 4            | 1             | 35               |
| Lincomycin (64)                                  | 57    | 10           | 4                  | 4                     | 3            | 1             | 35               |
| Sulfadimethoxine (256)                           | 57    | 10           | 4                  | 4                     | 4            | 1             | 34               |
| Vancomycin (128)                                 | 57    | 10           | 4                  | 4                     | 3            | 1             | 35               |
| Methicillin (64)                                 | 56    | 10           | 4                  | 4                     | 4            | 1             | 33               |
| Erythromycin (64)                                | 55    | 10           | 4                  | 4                     | 3            | 1             | 33               |
| Dihydrostreptomycin(16)                          | 36    | 5            | 4                  | 2                     | 1            |               | 24               |
| Tetracycline (128)                               | 31    | 1            |                    | 2                     | 3            | 1             | 24               |
| Ceftiofur (4)                                    | 29    | 4            | 3                  | 3                     |              | 1             | 18               |
| Penicillin (128)                                 | 20    | 2            |                    |                       | 1            |               | 17               |
| Trimethoprim (16)                                | 15    | 1            | 1                  |                       | 1            |               | 12               |
| Ampicillin (64)                                  | 11    |              |                    |                       |              |               | 11               |
| Chloramphenicol (32)                             | 10    |              | 1                  |                       |              |               | 9                |
| Cephalothin (64)                                 | 8     | 1            |                    |                       |              |               | 7                |
| Kanamycin (32)                                   | 6     | 1            |                    |                       |              |               | 5                |
| Norfloxacin (2)                                  | 4     |              |                    |                       |              |               | 4                |
| Colistin (32)                                    | 4     |              | 1                  |                       |              |               | 3                |
| Nalidixic acid (64)                              | 4     |              |                    | 1                     |              |               | 3                |
| Apramycin (64)                                   | 1     |              |                    |                       |              |               | 1                |

Table 4. Antibiotic resistance patterns of 58 *salmonella* spp isolated from mesenteric lymphnodes of slaughter

| Resistance drugs | No of isolates | Rate(%) |
|------------------|----------------|---------|
| 4 drugs          | 3              | 5.2     |
| 5 drugs          | 5              | 8.6     |
| 6 drugs          | 10             | 17.2    |
| 7 drugs          | 17             | 29.3    |
| 8 drugs          | 6              | 10.3    |
| 9 drugs          | 7              | 12.1    |
| Over 10 drugs    | 10             | 17.2    |

Va, Me 및 E에 내성을 띠고 있었으며, Ds와 Xnl은 *S agona*가 각각 5주, 4주가 내성을 보였고 *S typhimurium*은 75%이상의 내성율을 나타내었으며 *S schwarzengrund*에서도 50%이상의 높은

Table 5. Drug resistance patterns of 58 *salmonella* spp isolated from mesenteric lymphnodes of slaughter pig

| Resistance patterns     | No of isolates | Rate(%) |
|-------------------------|----------------|---------|
| Ds, E, Me, Su, L        |                |         |
| +Quinolones(Nor, Na)    | 8              | 13.8    |
| +Aminoglycosides        | 6              | 10.3    |
| +Cephalosporins(Xnl.Cf) | 29             | 50      |

Table 6. Plasmid profiles of *salmonella* spp isolated from mesenteric lymphnodes of slaughter pigs

| Serotype                 | Strain | Plasmid profile   | Serotypes | Strain                | Plasmid profile |
|--------------------------|--------|-------------------|-----------|-----------------------|-----------------|
| <i>S. schwarzengrund</i> | 25     | 14Kb 0.9Kb        | Untypable | 9                     | 6Kb             |
|                          | 26     | 14Kb 7.4Kb 0.9Kb  |           | 16                    | 4Kb             |
|                          | 27     | 14Kb 0.9Kb        |           | 19                    | 6Kb             |
| <i>S. agona</i>          | 49     | 3.1Kb             | 24        | 6Kb                   |                 |
|                          | 51     | 3.1Kb             | 31        | 5.3Kb                 |                 |
|                          | 52     | 3.1Kb             | 41        | 5.5Kb 1.6Kb           |                 |
|                          | 53     | 3.1Kb             | 43        | 6.4Kb                 |                 |
| <i>S. typhimurium</i>    | 73     | 27.5Kb            | 46        | 17.2Kb                |                 |
|                          | 74     | 27.5Kb            | 47        | 6.4Kb                 |                 |
|                          | 81     | 29.5Kb 2Kb        | 55        | 4Kb                   |                 |
| <i>S. derby</i>          | 42     | 29.5Kb 23.4Kb 7Kb | 56        | 4Kb                   |                 |
|                          | 44     | 29.5Kb 23.4Kb 7Kb | 71        | 6Kb 4.2Kb 3.2Kb 2.6Kb |                 |
|                          | 82     | 29.5Kb 7Kb 1.1Kb  | 72        | 3Kb                   |                 |
| <i>S. ayinde</i>         | 37     | 5.6Kb 1.6Kb       |           |                       |                 |

내성이 관찰되었다. 반면 Gm, An, Cip, Enr은 전 분리균주가 모두 감수성을 나타내었다.

도축돈의 장간막 림프절에서 분리한 58주의 *salmonella*속 균의 항생제 내성의 형태는 Table 4에서와 같으며 모든 균주가 4약제이상에서 내성을 보였고 10약제이상에서 내성을 보이는 균주가 10주 17.2%를 나타내었다.

분리된 58주의 *salmonella*속 균에 대한 항생제 내성의 패턴 형태는 Table 5에서와 같으며, 전 분리균주가 Ds, E, Me, Sm, L에 대부분 내성을 갖고 있었으며 이중 8주 13.8%가 quinolones계 항생제인 Nor, Na에 내성을 보였고, 29주 50%가 cephalosporins계 항생제인 Xnl, Cf에 내성을 보였다. 또한 이들중 6주는 aminoglycosides계 생제에서도 내성을 띠고 있었다.

## 2. Plasmid DNA profiles

*Salmonella*속 균 58주에 대한 plasmid 보유

상태를 분석하기 위하여 plasmid를 분리하여 전기영동한 결과는 Table 6과 같다. 58주로부터 분리한 plasmid를 분석한 결과는 혈청형별 차이는 인정되었지만 한 개에서 4개의 분획으로 전개되었으며 이들 분획의 범위는 0.9Kb-29.5Kb의 범위였고 27주 46.5%만이 plasmid가 관찰되었다. *S. schwarzengrund*는 14Kb, 0.9Kb를 공통적으로 가지고 있었으며 *S. agona* 10주중 4주에서 3.1Kb의 한 개의 분획만 관찰되었고 *S. derby*는 29.5Kb와 7Kb를 공통분획으로 관찰되었으며 *S. typhimurium* 2주가 27.5Kb의 공통분획을 가지고 있었으나 1개주는 29.5Kb, 2Kb 두 개의 분획이 보였다. Untypable 35주는 각각의 다양한 분획으로 전개가 되었으며 대부분이 6Kb내의 작은 plasmid가 보였으며 이중 22주 62.8%가 plasmid가 없었다.

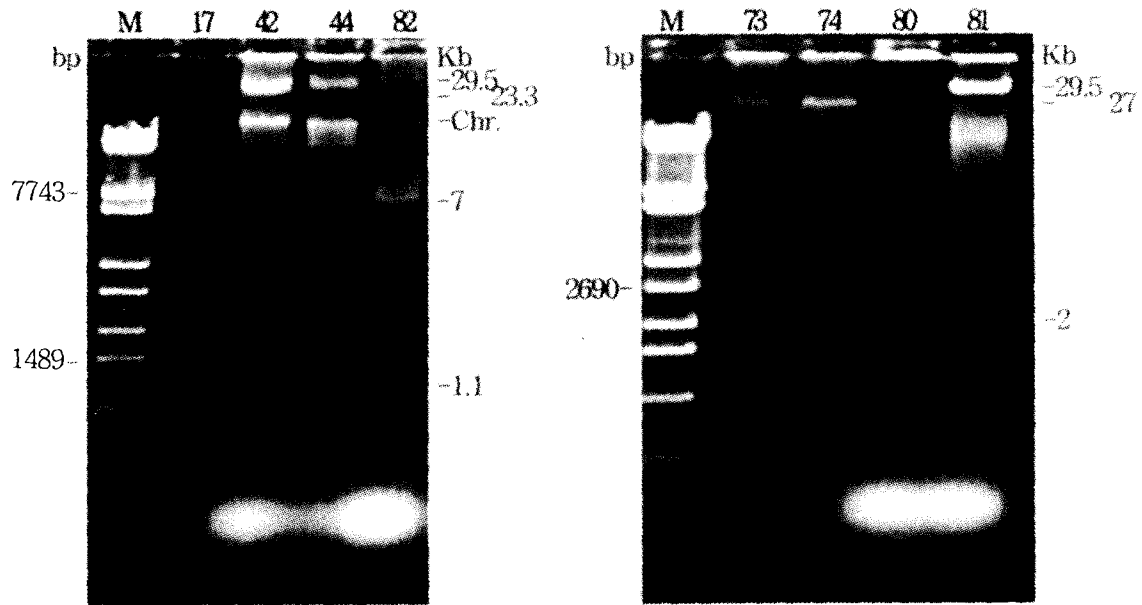


Fig 1. Plasmid profiles of *S. derby* and *S. typhimurium* from mesenteric lymphnodes of slaughter pigs. M :marker *S. derby*: 17-no plasmid, 42-29552bp 23418bp 7052bp, 44-29552bp 23418bp 7052bp, 82-29552bp 7052bp 1189bp, *S. typhimurium* : 73, 74-27507bp 80-no plasmid, 81-29552bp 2093bp.

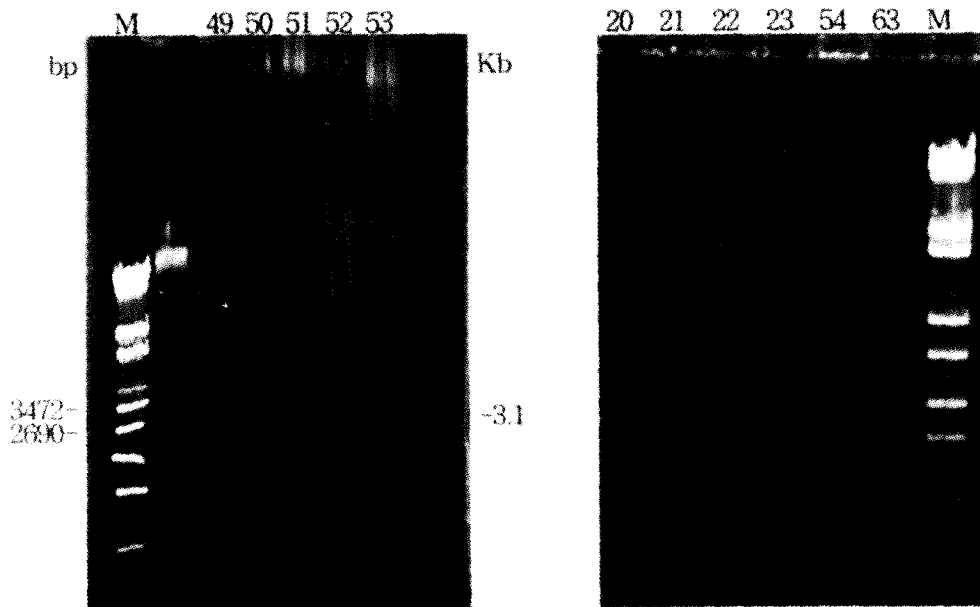


Fig 2. Plasmid profiles of *S. agona* from mesenteric lymphnodes of slaughter pigs M:marker, 49, 50, 51, 52, 53-3193bp 20, 21, 22, 54, 63-no plasmid.



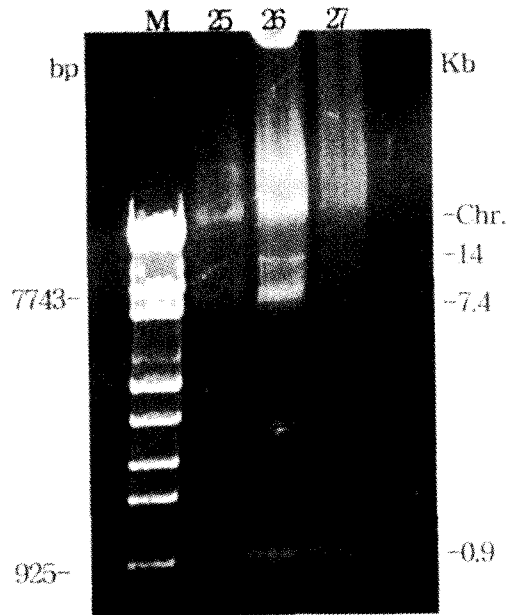


Fig 3. Plasmid profiles of *S. schwarzengrund* from mesenteric lymphnodes of slaughter pigs. M: marker, 25-14115bp 986bp, 26-14115bp 7475bp 986bp, 27-14115bp 986bp.

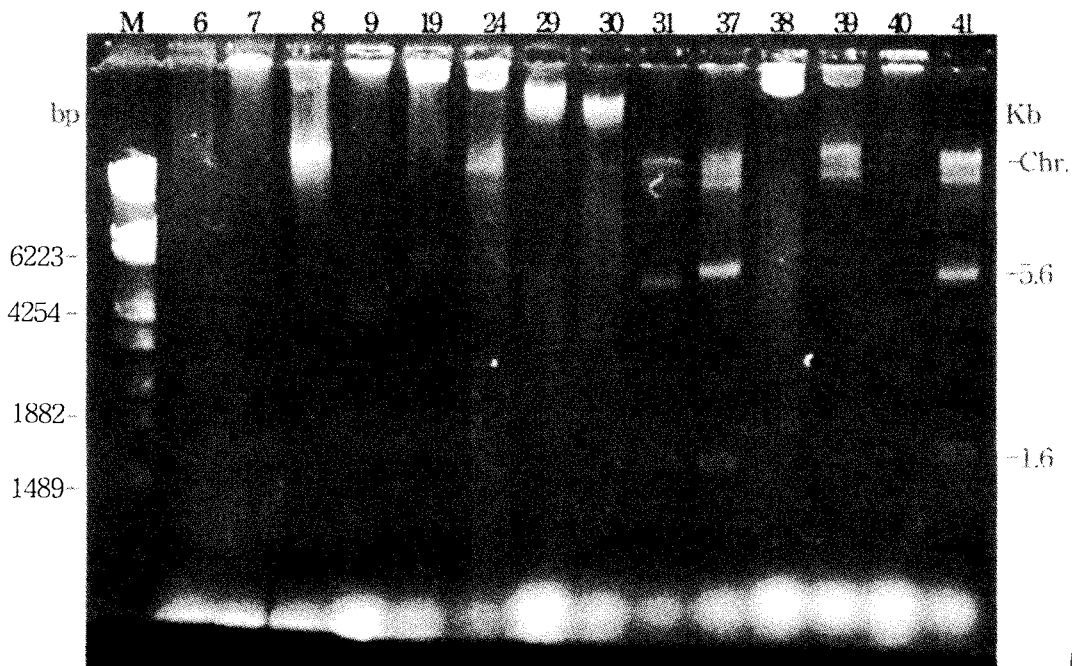


Fig 4. Plasmid profiles of *S. ayinde* and untypable from mesenteric lymphnodes of slaughter pigs. M: marker, *S. ayinde* 37-5647bp 1600bp, Untypable 9-4494bp, 19-6031bp, 24-6127bp, 31-5311bp 41-5551bp 1670bp, 6, 7, 8, 29, 30-no plasmid.

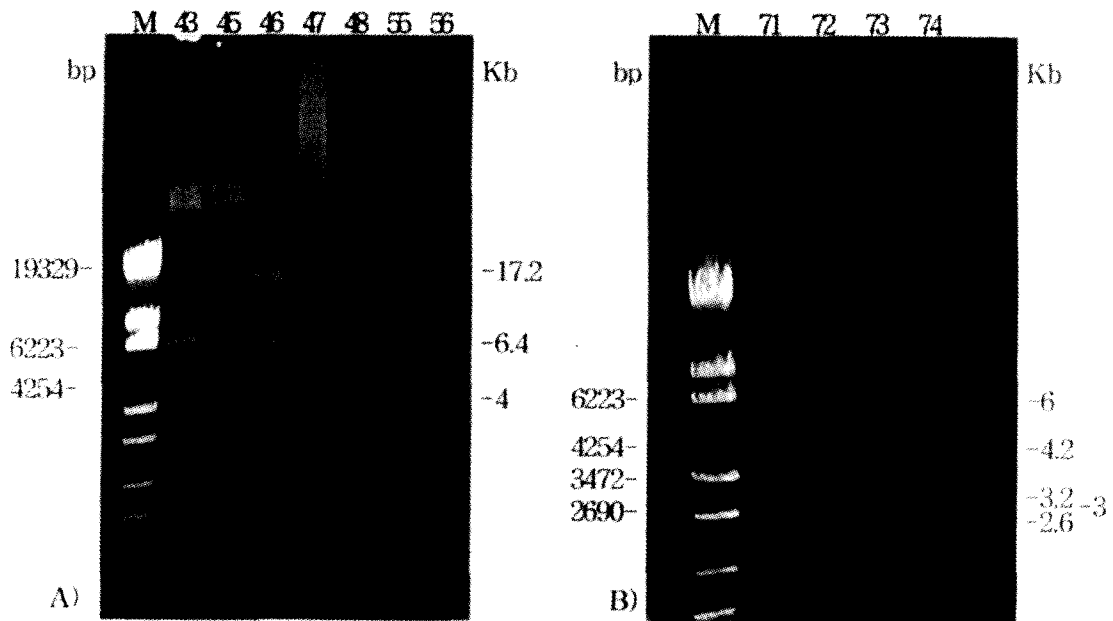


Fig 5. Plasmid profiles of untypable from mesenteric lymph nodes of slaughter pigs. M: marker A) 43-6426bp, 46-17269bp, 47-6426bp, 55,56-4070bp, 45,48-no plasmid, B) 71-6054bp 4224bp 3261bp 2651bp, 72-3051bp, 73,74-no plasmid.

## 고 찰

최근 각종 동물 또는 사람으로부터 분리한 *salmonella*속 균은 약제 내성균의 출현이 점차적으로 증가하는 추세에 있어<sup>28,29)</sup> 항생물질에 의한 치료 효과를 평가하는데 이 점을 고려하여야 한다. 그리고 지역에 따라 내성균의 출현율은 차이가 있으며 세균종류 또는 균 분리 유래에 따라서도 다르다.

본 실험에서는 *salmonella* 58주에 대해 실시한 22종의 항생제에 대한 감수성시험에서 L, E, Sm, Va, Me에 대해서는 100% 가까운 내성을 나타내었으며 Ds, Xnl, Te, P에서도 중등도의 내성을 띠었다. 반면 An, Gm, Ap, Cip, Enr에서는 높은 감수성을 나타내었으며 이는 Sato<sup>6)</sup>, Blackburn 등<sup>4)</sup>, Terakado 등<sup>30)</sup>에 의한 Te, S, Su에 내성을 보인다는 견해와 비슷한 양상을 나타내었으며, 국내에서 탁<sup>31)</sup>은 Te, S,

Am, C에 내성을 최 등<sup>7)</sup>, 정과 최<sup>32)</sup>는 Su, S, Te에 내성을 보인다는 견해와 유사한 결과를 보였다. 이들 약제는 동물치료와 사료 첨가제로 가장 많이 사용하는 것으로서 사람의 살모넬라증의 원인이 동물성 식품 또는 동물을 통한 감염으로 이루어진다는 것을 고려하면 동물에서의 내성균은 사람에게도 중요시된다.

22종의 항생제내성에 대한 약제내성의 수를 조사한 결과 58주중에서 전 분리균주가 4약제 이상에서 내성을 나타내었으며 이들중 10주 17.2%가 10약제이상에서 내성을 띠고 있었다. 항생제 내성약제에 대한 내성양상을 살펴보면 전 분리균주가 Ds, E, Me, Sm, L에 대부분 내성을 갖고 있었으며 이중 8주 13.8%가 quinolone계 항생제인 Nor, Na에 내성을 나타냈다. cephalosporins계 항생제인 Xnl, Cf에 29주 50%가 내성을 나타내었으며 이들중 6주

10.3%는 aminoglycosides계의 항생제에서도 내성을 띠고있어 이는 phosphotransferase, acetyltransferase, adenytransferase와 같은 특성화된 R plasmid 효소로 인해 하나의 aminoglycosides계 항생제에 내성이 생기면 다른 aminoglycosides계 항생제에도 교차내성이 생기므로 내성문제가 대두될 것으로 사료된다<sup>33)</sup>.

Sojka 등<sup>34)</sup>이 돼지유래에서 Gm에 내성을 띠는 *S typhimurium*을 처음 보고하였으며 Threlfall 등<sup>33)</sup>은 24.9%, Poppe<sup>33)</sup>등은 25.8%의 내성율을 보고하였으나 본 실험에서는 Gm 내성균주는 하나도 나타나지 않았다.

Poppe 등<sup>33)</sup>은 살모넬라증에는 quinolone계 항생제가 유효하다고 하였으나 norfloxacin에 내성인 균주가 4주가 있었으며, 최근 문제시되는 다제내성균주(R-type ACSSuT) *S typhimurium* DT 104로 의심되는 균주가 발견이 되지 않았으며 이 DT104는 열, 방부처리, 화학적소독제에도 저항성을 가진다<sup>36)</sup>. 스웨덴에서는 이러한 다제내성균주가 돼지에서 사람으로 확산되는 것을 방지하기 위해 성장촉진제로서 항생제 사용을 금지하고 있으며<sup>12)</sup>, 캐나다에서는 식육에 공하는 동물에 대해서는 chloramphenicol의 사용을 10여년 전부터 사용을 금지하여 왔음에도 불구하고 chloramphenicol에 내성을 가진 *salmonella*속 균의 분리가 증가한다는 견해<sup>33)</sup>와 본 실험에서도 chloramphenicol에 내성을 가진 *salmonella*속 균이 11주 18.9%가 나타나 앞으로 이 분야에 대한 폭넓은 연구가 이루어져야 한다고 생각된다.

*Salmonella* 감염증의 역학관계를 파악하기 위한 방법으로 *salmonella*속 균의 혈청형, 생물형, phage형 및 약제내성 양상 등을 조사하고 있으나 최근에는 이 속균이 보유하고 있는 plasmid DNA 분절형태 등을 분석함으로써 보다 정확히 역학적 의의를 추구하는 경향이 다<sup>7,16,37)</sup>. 이태리의 Nastasi 등<sup>38)</sup>은 ribotyping으로 *S typhimurium*의 감염을 추적하여 사람감

염의 주요원인은 돼지와 소에 의한 감염이라고 하였고 돼지에 분포된 ribotype이 사람유래와 유사한 분포를 나타낸다고 하여 돼지에서 *S typhimurium*에 의한 불현성감염과 이로 인한 식육오염이 중요시된다고 할 수 있다. O'bien 등<sup>39)</sup>은 사람 및 동물유래 *S typhimurium*으로부터 100Kb 9.2Kb 2.4Kb의 각각 동일한 plasmid를 분리함으로써 사람과 동물간의 전파가능성을 시사한 바 있고, Helmuth 등<sup>40)</sup>은 세계 여러국가에서 분리된 *salmonella*속 균의 7가지 혈청형에 대해 역학상황을 파악하기 위해 plasmid profile을 분석하였던 바 *S typhimurium*은 60Md, *S enteritidis*는 37Md, *S dublin*은 56Md, *S choleraesuis*는 30Md의 plasmid를 공통적으로 가지고 있음을 확인되었고, 일부 국가에서는 plasmid profile의 차이가 있음을 보고한 바 있다. 우리나라에서 최 등<sup>7)</sup>은 돼지 및 소 유래 *salmonella*속 균에서 분자량이 1.0~90Md, plasmid 수가 1~4개임을 보고하였고, 이 등<sup>41)</sup>은 사람유래 *salmonella*속 균에서 분자량이 1.8~70Md, plasmid수가 1~4개임을 보고한 바 있다. 박 등<sup>16)</sup>은 비둘기 및 수생조류 유래 *S typhimurium* var *copenhagen* 166주의 plasmid 보유상황을 조사한 바 plasmid 수가 4개 혹은 5개이었고, 분자량이 3.2~60Md이었으며, 60Md plasmid를 공통적으로 보유한다고 보고하였으며, 김 등<sup>42)</sup>은 가금유래 *S pullorum*, *S gallinarum*에서 분자량은 2.3~85Kb, plasmid수가 1~4개임을 보고한 바 있다. 최 등<sup>7)</sup>은 돼지 및 소 유래 *salmonella*속 균 8개 혈청형, 98주에 대하여 plasmid를 분석한 결과 plasmid수는 1~3개이었고, 분자량은 0.8~70Md으로 보고하였다. 본 연구에서는 *S typhimurium*이 27.5Kb plasmid를 보유하는 것과 29.5Kb 2Kb보유하는 균주가 있었고 *S agona*는 분리된 10주 중에서 4주가 3.1Kb의 plasmid를 보유하고 있었으며 *S schwarzen-*

*grund*는 분리균주 모두가 14Kb 0.9Kb에 공통 plasmid를 가지고 있었으며 *S derby*는 29.5Kb 23.4Kb 7Kb의 공통 plasmid를 가지고 있었으나 untypable 35주는 13주만 plasmid가 관찰되었으며 이들 plasmid는 1~4개의 분획으로 다양하였고 크기도 2.6Kb~17.2Kb까지 다양하게 관찰되었다.

Brunner 등<sup>20)</sup>은 *salmonella*의 역학적 연구에 plasmid profile과 항생제 감수성관계를 비교한 결과 plasmid의 종류가 달라도 약제내성은 같을 수 있다고 하였다. 본 실험에서도 다양한 plasmid profile이 관찰되었지만 약제내성은 분리균주 대부분이 비슷한 형태를 나타내었다. 약제내성형과 plasmid profile간의 관련성을 일정한 조건으로 조화시켜 설명할 수는 없으나 대체적으로 내성형이 같은 균은 plasmid profile도 같은 유형으로 나타난다는 것을 부인할 수는 없다.

## 결 론

경북지방에서 1997년 9월 1998년 7월사이 도축장에서 도축된 도축돈의 회맹결장부 장간막 림프절에서 분리한 *S agona* 10주, *S typhimurium* 4주, *S schwarzengrund* 4주, *S derby* 4주, *S ayinde* 1주, untypable 35주 등 58주의 *Salmonella*속 균에 대한 22종의 항생제에 대한 최소억제농도와 내성형태, 혈청형별 plasmid profile을 조사하였다.

1. 분리된 58주의 *salmonella*속 균은 Cip, Enr은 1 $\mu$ g이하에서 Nor, Tmp는 4 $\mu$ g이하의 낮은 농도에서 감수성을 보인 반면 E, Me, Va, Su, L은 128 $\mu$ g이상의 높은 농도에서도 내성을 나타내었다. 약제에 따른 내성균의 분포를 보면 내성율은 L, Sm, Va, Me, E은 90%이상의 내성율을 보인 반면, Nor, Cl, Na, Ap은 10%미만의 낮은

내성율을 나타내었으며 An, Gm, Cip, Enr은 100% 감수성을 보였다.

2. 혈청형별 약제에 대한 내성균의 분포는 전 분리균주 대부분이 L, Sm, Va, Me, E에 내성을 띠고 있었으며 Ds, Xnl은 *S agona*가 각각 5주, 4주가 내성을 보였고 *S typhimurium*은 75%이상의 내성율을 나타내었으며 *S schwarzengrund*에서도 50%이상의 높은 내성이 관찰되었다. 반면 Gm, An, Cip, Enr은 전 분리균주가 모두 감수성을 나타내었다.
3. 항생제 내성의 형태는 모든 균주가 4약제 이상에서 내성을 보였고, 10약제 이상에서 내성을 보인 균주가 10주 (17.2%)로 나타났다. 항생제 내성의 패턴은 전 분리균주가 Ds, E, Me, Sm, L에 대부분 내성을 갖고 있었으며 이중 8주 13.8%가 quinolones계 항생제인 Nor, Na에 내성을 보였고, 29주 50%가 cephalosporins계 항생제인 Xnl, Cf에 내성을 보였다. 또한 이들 중 6주는 aminoglycosides계 항생제에서도 내성을 띠고 있었다.
4. *Salmonella*속 균 58주에 대한 plasmid 보유상태를 분석하기 위하여 plasmid를 분리하여 전기영동한 결과는 혈청형별 차이는 인정되었지만, 한 개에서 4개의 분획으로 전개되었으며 이들 분획의 범위는 0.9Kb~29.5Kb의 범위였고 27주 46.5%만이 plasmid가 관찰되었다. *S schwarzengrund*는 14Kb, 0.9Kb를 공통적으로 가지고 있었으며 *S agona* 10주중 4주에서 3.1Kb의 한 개의 분획만 관찰되었고 *S derby*는 29.5Kb와 7Kb를 공통분획으로 관찰되었으며 *S typhimurium* 2주가 27.5Kb의 공통분획을 가지고 있었으나 1개주는 29.5Kb, 2Kb 두 개의 분획이 보였

다. Untypable 35주는 각각의 다양한 분획으로 전개가 되었으며 대부분이 6Kb내의 작은 plasmid가 보였으며 이중 22주 62.8%가 plasmid가 없었다.

### 참고문헌

- Ling J, Chau PY. 1984. Incidence of plasmids in multiply-resistant *Salmonella* isolates from diarrheal patients in Hong Kong from 1973-82. *Epidemiol Infect* 99 : 307~321.
- Brown DJ, Threlfall EJ, Rowe B. 1991. Instability of multiple drug resistance plasmids in *Salmonella typhimurium* isolated from poultry. *Epidemiol Infect* 106 : 247~257.
- Baker RC, Goff JP, Timoney JF. 1980. Prevalence of *Salmonella* on eggs from poultry farms in New York state. *Poult Sci* 59 : 289~292.
- Blackburn BO, Schlater LK, Swanson MR. 1984. Antibiotic resistance of members of the genus *Salmonella* isolated from chicken, turkeys, cattle and swine in the United States during October 1981 through September 1982. *Am J Vet Res* 45 : 1245~1249.
- Findlay CR. 1978. Epidemiological aspects of an outbreak of salmonellosis in Sheep. *Vet Rec* 103 : 113~114.
- Sato G, Kodama H. 1974. Appearance of R factor mediated drug resistance in *Salmonella typhimurium* excreted by carrier calves on a feedlot. *Jpn J Vet Sci* 22 : 72~79.
- 최원필, 이희석, 여상건 등. 1989. 소, 돼지에서 분리한 *Salmonella* 유래 R plasmid의 유전학적 및 분자생물학적 성상에 관한 연구. *대한수의학회지* 29(2) : 59~67.
- Datta NR. 1977. Factors in enterobacteriaceae. In R factor drug resistance plasmid edited by S. mitsuhashi. *University Park Press* Baltimore : 255~272.
- Watanabe T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol Rev* 27 : 87~115.
- Levy SB, FitzGerald GB, Maccone AB. 1976. Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature* 260 : 40~42.
- 최철순, 정영석, 김원용 등. 1999. *Salmonella*균과 대장균에 대하여 길항작용을 나타내는 *Bacillus* species의 분리. *한국수의공중보건학회지* 23(4) : 261~270.
- Bartlett JG. 1992. Antibiotic-associated diarrhea. *Clin Infect Dis* 15 : 573~580.
- Hardy K. 1981. Aspects of Microbiology 4. *Bacterial Plasmids*. NY : Cold Spring Harbor Laboratory : 1~120.
- Tronstad A. 1997. Swedish ban on antibiotic growth promoters in animal feed. *Pig J* 40 : 89~98.
- Graham DY, Evans DG. 1990. Prevention of diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherchia coli*. *Rev Infect Dis* 12 : S68.
- 박노찬, 최원필. 1990. 비둘기 및 수생조류 유래 *Salmonella typhimurium*의 생물학적 특성과 plasmid profile에 관한 연구. *대한수의학회지* 30(2) : 203~214.
- Tanabe M, Ishiguro N, Shinagawa M, et al. 1998. An epidemic of multiresistant *Salmonella typhimurium* with a characteristic plasmid profile among calves in

- Tokachi district. *Jpn J Vet Sci* 50 : 1025~1034.
18. Kramer TT, Roof MB, Matheson RR. 1992. Safety and efficacy of an attenuated strain of *Salmonella choleraesuis* for vaccination of swine. *Am J Vet Res* 53 : 444~448.
  19. Roof MB, Kramer TT, Roth JA, et al. 1992. Characterization of *Salmonella choleraesuis* isolate after repeated neutrophil exposure. *Am J Vet Res* 53 : 1328~1332.
  20. Brunner F, Margadant A, Peduzzi R, et al. 1983. The plasmid pattern as an epidemiologic tool for *Salmonella typhimurium* epidemics : Comparison with the lysotype. *J Infect Dis* 148 : 7~11.
  21. Homberg SD, Wachsmuth CK, Brenner FWH, et al. 1984. Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella typhimurium* isolates from outbreaks. *J Clin Microbiol* 19 : 100~104.
  22. Millemann Y, Lesage M, Chaslus-dancla E, et al. 1995. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. *J Clin Microbiol* 33(1) : 173~179.
  23. Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B. 1998. Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 36(8) : 2314~2321.
  24. Tassios PT, Markogiannakis A, Vato-poulos AC, et al. 1997. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella enteritidis* during a 7-year period in Greece. *J Clin Microbiol* 35(6) : 1316~1321.
  25. Sahn DF, Washington II JA. 1991. Antibacterial susceptibility tests : Dilution methods. In : Balows A, Hausler WJ Jr, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 5th ed. American Society for Microbiology. Washington DC : 1105~1116.
  26. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1988. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2 ed ; Tentative Standards. NCCLS Document M7-T2. Villanova. PA. NCCLS.
  27. Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory : 350~385.
  28. Borrego JJ, Castro D, Notario MJ, et al. 1992. Comparison of epidemiological markers of *Salmonella* strains isolated from different sources in Spain. *J Clin Microbiol* 30 : 3058~3064.
  29. Rodrigue DC, Cameron DN, Puhr ND, et al. 1992. Comparison of plasmid profiles, phage types, and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella enteritidis* isolates in the United States. *J Clin Microbiol* 30 : 854~857.
  30. Terakado N, Ohya T, Ueda H, et al. 1980. A survey on drug resistance and R plasmids in *Salmonella* isolated from domestic animals in Japan. *Jpn J Vet Sci* 42 : 543~550.
  31. 탁연빈. 1978. 대구시 도축장에서 처리된 돼지의 *Salmonella*속 균의 보균상황. 대한

- 수의학회지 18(1) : 15~18.
32. 정석찬, 최원필. 1986. 소 유래의 *Salmonella*속 균에 대하여. 대한수의학회지 26 : 79~85.
  33. Poppe C, Kolar JJ, Demczuk WHB, et al. 1995. Drug resistance and biochemical characteristics of *Salmonella* from turkeys. *Can J Vet Res* 59 : 241~248.
  34. Sojka, Rowe B, Ferguson JL, et al. 1983. Gentamicin resistant *Salmonella typhimurium*. *Vet Rec* 113 : 627~630.
  35. Threlfall EJ, Rowe B, Ward LR. 1993. A comparison of multiple drug resistance in Salmonellosis from human and food animals in England and Wales, 1981 and 1990. *Epidemiol Infect* 111 : 189~197.
  36. Alexander T. 1998. Zoonoses. *Proc. 15th IPVS Congress*, Birmingham, England. 1 : 167~174.
  37. Wray C. 1987. Differentiation of *Salmonella typhimurium* DT204 by plasmid profile and biotyping. *Vet Rec* 121 : 514~516.
  38. Nastasi A, Mammìna C, Villafrate MR. 1993. Epidemiology of *Salmonella typhimurium* : ribosomal DNA analysis of strains from human and animal sources. *Epidemiol Infect* 110(3) : 553~565.
  39. O'bien TF, Hopkins JD, Gilleece ES. 1982. Molecular epidemiology of antibiotic resistance in *Salmonella* from animals and human beings in the United States. *New Engl J Med* 307 : 1~6.
  40. Helmuth R, Stephan R, Bunge C, et al. 1985. Epidemiology of virulence associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infect Immun.* 48 : 175~182.
  41. 이복권, 김기상, 이영희 등. 1988. *Salmonella*속 균의 항균제 내성 및 R 플라스미드. 대한미생물학회지. 23 : 567~571.
  42. 김원용, 장영호, 박경운 등. 1995. 가금에서 분리한 *Salmonella*속 균의 항균물질에 대한 감수성 및 plasmid profile. 대한수의학회지 35(3) : 537~542.