The Korean Journal of Microbiology, Vol. 38, No. 4, December 2002, p. 299-305
Copyright©2002, The Microbiological Society of Korea

식중독환자에서 분리한 *Salmonella* Enteritidis 다제내성 플라스미드의 내성유전자 집락의 구조해석

정서연 · 손창규[1] · 곽경탁 · 김병천 · 박 완*

경북대학교 자연과학대학 미생물학과, [1]경상북도 보건환경연구원

2001년 경북지역의 설사환자로부터 분리된, *Salmonella* Enteritidis SY9 균주로부터 ampicillin, chloramphenicol, sulfonamide, streptomycin, tetracycline에 내성을 가지는 40 kb plasmid를 분리하였다. pCAST2 라고 명명한 이 다제내성 plasmid로부터 sulfonamide, streptomycin, tetracycline 내성유전자를 가지는 약 7 kb의 *Sac*I 단편을 클로닝하였다. 이 7 kb 단편 염기서열의 내성유전자의 구조는 *sulII-strA-strB-tetR-tetA*의 집락으로 기존에 보고되지 않은 새로운 유전자 배열을 나타내었다. 본 연구에서는 내성유전자 집락을 검출할 수 있는 primer를 제작하여 PCR 분석을 통해서 이들 구조를 탐지할 수 있는 방법을 제시하였다. 또한 PCR 분석을 통한 구조 비교로, 이 집락이 2002년 8월에 경북지역에서 산발적으로 발생한 *Salmonella* 균주에서도 발견됨을 확인하였다.

Key words □ **pCAST2, PCR, *Salmonella* Enteritidis, *sulII-strA-strB-tetR-tetA* cluster**

다양한 종류의 항생물질이 세균감염증의 치료에 다량 사용됨에 따라, 약제 내성세균의 출현 및 분포 확대, 세균 교대현상 등의 문제점이 발생되고 있다(4). 이 중 항생제 내성균은 전 세계적으로 증가하고 있으며, 빠르게 확산되고 있다. 특히 임상적으로 유용한 항생제에 내성을 가지는 병원성 세균의 출현은 각종 세균성 질병의 치료에 있어서 약제 선택의 어려움의 원인이 되고 있으며, 내성균이 가지고 있는 내성유전자의 발생은 항생제 사용량의 증가에 의한 것으로 보인다(7).

살모넬라 균은 동물이나 사람의 장관 내에 감염되어 설사, 구토, 탈수 증상을 일으키는 대표적인 장내세균으로, 국내에서도 약 100 여종의 혈청형들이 사람, 동물 및 식품으로부터 빈번히 분리되고 있다(2). 살모넬라 균에서 내성유전자 집락의 존재와 다른 병원균으로의 다제내성 plasmid 이동으로 인해, 이들 균에 의한 감염증은 세계적으로 매우 중시되고 있다(9). 특히 전이성 plasmid는 접합 등으로 유전자를 수평 전달함으로써 세균 집단 내에 있어서 약제 내성 유전자를 확산시키고 있다(22). 또한 plasmid 내의 integron 구조와 더불어 transposon의 삽입은 DNA 상의 유전자의 재배열을 일으키고 하나의 plasmid 상에 복수의 내성유전자가 모임으로써 복합내성 R plasmid가 형성되는 것으로 추정되고 있으며, R plasmid는 살모넬라 속 균에서 항생제 내성균의 출현에 관계되어 사람과 동물의 치료에 어려움을 주고 있다(3,9,11,13).

본 연구는 경북지역의 설사 환자로부터 분리한 *Salmonella* Enteritidis SY9 균주로부터 다제내성 플라스미드를 분리하고 이 플라스미드상에 존재하는 내성유전자의 집락구조를 밝히고, PCR에 의한 이들 내성유전자의 집락구조의 존재를 검출한 결과를 보고한다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 053-950-5376, Fax: 053-955-5522
E-mail: celllife@knu.ac.kr

재료 및 방법

사용균주, plasmid 및 배지

본 실험에 사용된 균주와 plasmid는 Table 1과 같다. 균주는 37°C, LB 배지에서 배양하였으며, 항생제 감수성 시험의 경우 Mueller-Hinton agar (Difco, Detroit, USA) 배지를 사용하였다. Plasmid의 선별 등 필요한 경우에는 항생물질 ampicillin, chloramphenicol, sulfonamide, rifampin은 각각 50 *mg/l*를, streptomycin 30 *mg/l*, tetracycline 12.5 *mg/l*를 배지에 첨가하였다.

항생제 감수성 검사

항생제는 ampicillin, STX(sulfamethoxazole/trimethoprim), kanamycin, tetracycline, streptomycin, nalidixic acid, ampicillin sulbactam, chloramphenicol, gentamycin, amikacin, amoxicillin, clavulanic acid, cephalothin, cefozitin, ciprofoxacin, ceftriaxone, ticacillin 등 총 16 종을 사용하여, 희석법과 디스크 확산법으로 항생제에 대한 감수성 검사를 실시하였다. 검사방법 및 내성균의 판정은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (19)에 따랐다.

항생제내성 전달능 시험

대수증식기 중기 정도까지 배양한 공여균과 수용균을 1 : 4 내지 1 : 10의 비율로 혼합하여 37°C에서 5 시간 이상 서서히 교반하며 배양한 후 혼합배양액 일정량을 항생제가 함유된 LB 선

Table 1. Bacterial strains and plasmid used in this study

Strain or plamid		Relevant marker[a]	Year, Source[b]	Ref
Strain				
Salmonella				
SY 6	*Salmonella* Enteritidis	ACSSuT	2001, Gumi	this study
SY 7	*Salmonella* Enteritidis	ACSSuT	2001, Gumi	this study
SY 9	*Salmonella* Enteritidis	ACSSuT	2001, Gumi	this study
SY 15	*Salmonella* Enteritidis	ACSSuT	2001, Gumi	this study
SY 22	*Salmonella* Enteritidis	ACSSuT	2002, Ullung	this study
SY 25	*Salmonella* Paratyphi A	ACSSuT	2002, Pohang	this study
SY 31	*Salmonella* Typhimurium	SSuT	2002, Pohang	this study
SY 32	*Salmonella* Typhimurium	ASSuT	2002, Pohang	this study
SY 33	*Salmonella* Enteritidis	SSuT	2002, Youngduk	this study
SY 35	*Salmonella* Paratyphi B	ACSSuT	2002, Gyeongju	this study
SY 36	*Salmonella* Paratyphi B	ACSSuT	2002, Gyeongju	this study
SY 37	*Salmonella* Typhimurium	ASSuT	2002, Youngduk	this study
SY 40	*Salmonella* Typhimurium	SSuT	2002, Youngduk	this study
E. coli				
RG488	recipient strain for mating	Ri		
DH5α	recA1 endA1 gyrA96 *thi*-1 hsdR17 supE44 relA-1 Φ 80 lacZ $\triangle$ M15			20
Plasmid				
pUC19	Cloning vector			20
pCAST2	a 40 kb multi drug resistance plasmid isolated from SY 9			this study
pSY7K	pUC19 with 7 kb *Sac*I fragment pCAST2			this study
pT5K4	pUC19 with 4.7 kb *Sac*I fragment pSY7K			this study

[a]Abbreviation: A, ampicillin; C, chloramphenicol; S, streptomycin; Su, sulfonamide; T, tetracycline; Ri, rifampin
[b]Year and source of isolated strain from clinical patient.

택배지에 도말하여 37°C에서 하룻밤 배양 후 나타나는 집락을 분리하였다.

형질전환 및 DNA 조작

Plasmid DNA의 분리, DNA 조작 및 형질전환 등은 대체로 Sambrook 등(21)의 방법에 따랐으며, 필요에 따라 Qiagen (Hilden, Germany) plasmid purification kit을 사용하여 plasmid를 분리하였으며, 제한효소, DNA 연결효소, alkaline phosphatase 등은 공급사의 지시에 따라 사용하였다.

DNA 염기서열 결정

염기서열 결정은 Automatic DNA sequencer (ABI3700, Applied Biosystems, Foster City, USA)를 사용하여 primer walking method (18)에 따라 수행하였다. 염기서열 분석은 GenBank의 database를 이용하여 NCBI BLAST (8)와 DNASIS (version 2.6)를 사용하였다.

PCR 반응

항생제 내성 유전자 cluster의 탐지를 위하여, 내성유전자의 염기서열로부터 합성한 primer (Bioneer, Changwon, Korea)를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR반응은 전체 20 μl가 되게 1 U Taq DNA polymerase, 10 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1.5 mM $MgCl_2$, 주형 DNA, 10 pmol의 primer를 넣고 수행하였다. 이 때 주형 DNA는 Table 1의 살모넬라 균주로부터 분리한 plasmid DNA를 이용하였다. PCR 반응조건은 초기변성 시간을

Table 2. Gene products with sequence similarity to the antibiotic resistance gene cluster in 7 kb *Sac*I fragment in pCAST2

Coding region	*Gene*	Length (bp)	*Function*
711-1400	Orf1	690	Putative transposase in *E. coli*
2088-2903	*sulII*	816	dihydropteroate synthase
2964-3767	*strA*	804	streptomycin phosphotransferase
3767-4603	*strB*	837	streptomycin phosphotransferase
4925-5578 (–)[a]	*tetR*	654	tetracycline resistance repressor
5657-6856	*tetA*	1200	tetracycline resistance protein

[a]Gene encoded on the minus strand is indicated with (–)

Table 3. Primers used for PCR

Gene cluster	Fragment	Expected size (bp)	Primer	Nucleotid sequence (5'-3')	Position[a]	Tm[b]
sul II- strA	A	406	sul 1 (+)[c]	CAGGTGGAGCTGACTTCAT	2806-2824	59
			strA2 (−)[d]	GTTATCACCAAGCATGCAC	3193-3212	
strA - strB	B	305	strA1 (+)	CCTATTCAATGTATTGGGGA	3693-3702	57
			strB2 (−)	ATCAGATTGTTCTCACGACC	3979-3998	
strB - tetR	C	631	strB1 (+)	GCCAATATGTTCTACGATCC	4369-4389	59
			tetR2 (−)	GGTGATTGTCGATGGATT	4983-5000	
tetR - tetA	D	549	tetR1 (+)	GTTCCTGAAGTGCCAGTAAA	5411-5430	57
			tetA2 (−)	CGATATAGAGAACCCAAAGG	5941-5960	
sulII-strA-strB	E	1192	sul 1 (+)	CAGGTGGAGCTGACTTCAT	2806-2824	55
			strB2 (−)	ATCAGATTGTTCTCACGACC	3979-3998	
strA-strB-tetR	F	1307	strA1 (+)	CCTATTCAATGTATTGGGGA	3693-3702	55
			tetR2 (−)	GGTGATTGTCGATGGATT	4983-5000	
strB-tetR-tetA	G	1591	strB1 (+)	GCCAATATGTTCTACGATCC	4369-4389	55
			tetA2 (−)	CGATATAGAGAACCCAAAGG	5941-5960	

[a]Position of nucleotide sequence in accession no. AF542061
[b]Annealing temperature in PCR reaction
[c]Oligonucleotides corresponding to the forward primer
[d]Oligonucleotides corresponding to the reverse primer

94°C에서 2 분간 1 회 실시한 후, 변성반응은 94°C에서 1 분, 결합 반응은 각각의 primer에 따라 55~59°C에서 1 분, 중합반응은 72°C에서 2 분간하여 30 주기를 반복하였다. 30 주기 이후 마지막 중합반응은 72°C에서 15 분간 연장하여 1 회 반응시켰다. PCR 수행시 사용된 primer와 결합반응 온도는 Table 3과 같다. 각각의 증폭되어진 DNA는 1.2% agarose gel 상에서 전기영동으로 확인하였고 이때 size marker로는 100 bp ladder를 사용하였다.

항생제 내성 유전자 집락의 염기서열 등록번호

Salmonella Enteritidis 다제내성 plasmid의 내성 유전자 집락 *sulII-strA-strB-tetR-tetA* 영역 7 kb의 염기서열은 EMBL database에 accession no. AF542061로 등록되었다.

결과 및 고찰

Salmonella Enteritidis SY9 균주로부터 다제내성 plasmid의 분리

2001, 2002년도 경상북도 지역에서 발생한 식중독 환자로부터 분리된 *Salmonella* 균들 중에서 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamide, tetracycline에 내성을 나타내는 다제내성 균주 *Salmonella* Enteritidis SY9를 선택하여 이들 다제내성 유전자의 구조를 해명하고자 했다. 다제내성유전자의 경우 대개 plasmid에 위치하는 경우가 많기 때문에 먼저 이 균주의 plasmid 양상을 살펴보았다. 이 균주는 Fig. 1에서 보는 것처럼 복수의 plasmid를 갖고 있었다. 그래서 이들 다제내성 유전자가 한 plasmid 위에 있는지, 또는 복수의 plasmid 위에 단독 혹은 짝을 지어 존재하는지 규명하기 위하여 SY9 균주에서 분리한 plasmid를 *E. coli* DH5α에 형질전환하여 각각의 항생제 단독 또는 몇 가지 항생제의 조합으로 형질전환주를 선별하였다. 그 결과 복수의 항생제 조합으로 선택된 형질전환주는 물론, 각각 단독의 항생제로 선택된 형질전환주들도 모두 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamide, tetracycline에 대해 내성을 나타내었다. 즉 이들 다제내성 유전자는 복수의 plasmid 위에 산재해 있지 않고 한 plasmid 위에 존재함을 확인하였다. 이들 형질전환

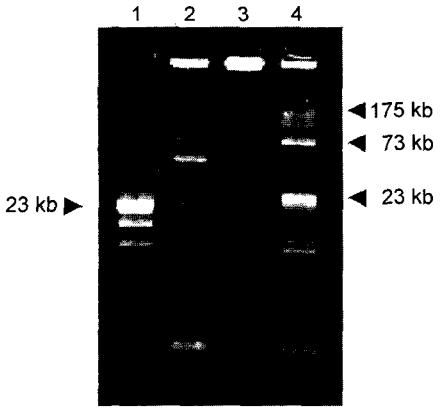

Fig. 1. Multi-drug resistance plasmid, pCAST2, isolated from *Salmonella* Enteritidis SY9. λ*Hin*dIII and KE327(6) were usde as size marker. Lanes: 1, λ*Hin*dIII; 2, SY9 plasmid; 3, pCAST2; 4, KE327.

주는 약 40 kb 크기의 plasmid를 갖고 있었으며(Fig. 1), 이 다제내성 plasmid를 pCAST2라 명명하였다.

접합에 의한 내성유전자의 전달

Plasmid성 다제내성 유전자를 지니고 있는 SY9 균주의 다제내성 유전자가 접합에 의해 전달되는지를 조사하기 위하여 rifampin 내성 *E. coli* RG488 균주를 수용균으로 하여 SY9 균주와 접합시킨 결과, rifampin과 다제내성 항생제를 함유한 선택배지에서 증식한 transconjugant를 분리할 수 있었다. 이들 transconjugant의 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamide, tetracycline 에 대한 최소생육억제농도를 측정한 결과 공여균과 동일하였다(자료 미제시). 또, 독립적으로 분리한 10 개 이상의 transconjugant 의 plasmid 양상을 조사한 결과 모두 공여균 SY9 균주와 동일하였다. 즉, 40 kb의 다제내성 plasmid pCAST2 뿐만 아니라 나머지 다른 plasmid들도 함께 전달되는 것을 알 수 있었다. 이에 *E. coli* DH5α의 pCAST2 형질전환주(Fig. 1, lane 3)를 사용하여 pCAST2의 전달능을 조사한 결과 pCAST2의 전달능은 확인할 수 없었다(자료 미제시). 아마 pCAST2는 전달성(self-transmissible) plasmid는 아니고 가동성(mobilizable) plasmid일 것으로 생각되나 이는 앞으로 더 규명해 보아야 알 수 있을 것이다. 비록 pCAST2 자체는 전달능이 없다고 해도 SY9의 전달양상을 보면, pCAST2는 전달능을 지니고 있는 것과 마찬가지로 생각되며, 다제내성 유전자의 확산 전파에 중요하게 관여하고 있을 가능성을 생각해 볼 수 있을 것이다.

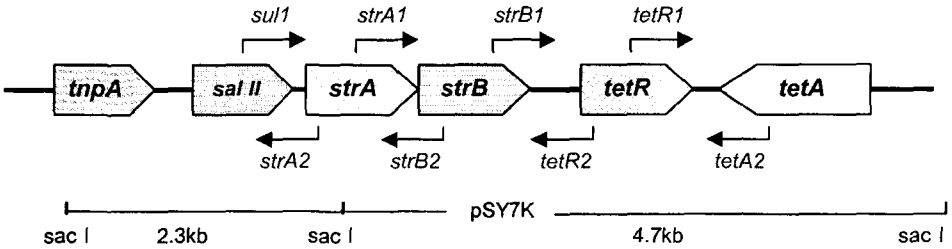

Fig. 2. Organization of the antibiotic resistance gene cluster and schematic presentation of primer binding sites within the genes *sulII*, *strA*, *strB*, *tetR* and *tetA* in 7 kb *Sac*I fragment of pCAST2. Arrows indicate primers used PCR for detection of antibiotic resistance gene cluster.

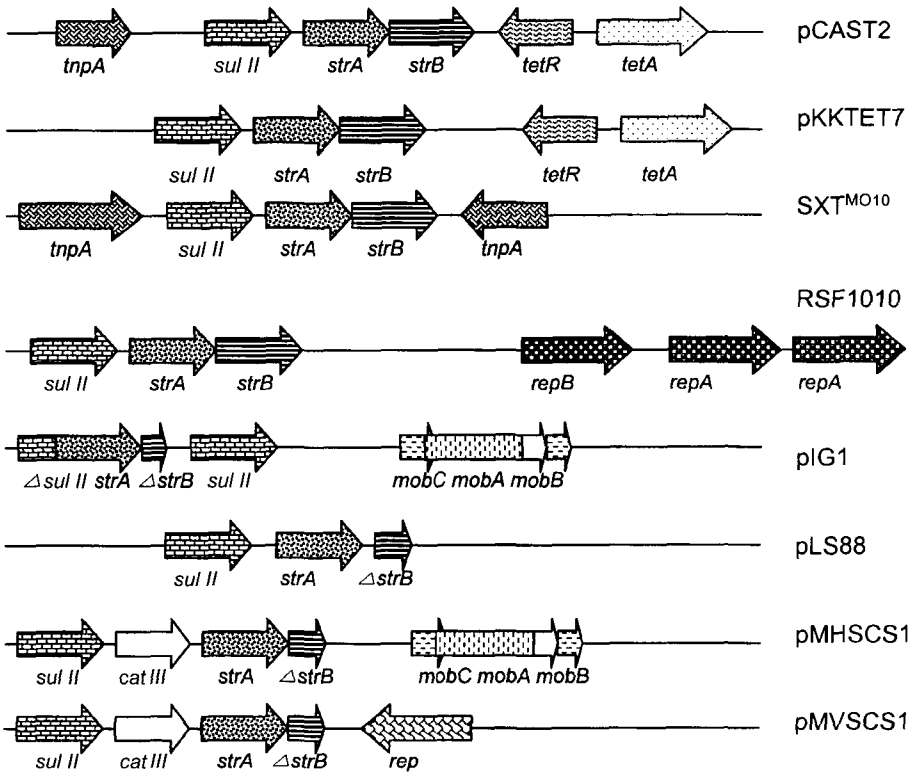

Fig. 3. Comparative analysis of structural organization of multi drug plasmids. The reading frame for genes involved in plasmid mobilization (*mobA*, *mobB*, *mobC*), plasmid replication (*repA*, *repB*, *repC*), transposase (*tnpA*), sulfonamide resistance (*sulII*), streptomycin resistance (*strA*, *strB*), tetracycline resistance (*tetA*), tetracycline repression (*tetR*) and chloramphenicol resistance (*catAIII*) are shown as arrows with the direction of transcription indicated. The prefix △ indicated trucated genes. Accession no. of each plasmid: pKKTET7, AF497970; SXTMO10, AY034138; RSF1010, M28829; pIG1, U57647; pLS88, L23118; pMHSCS1, AJ249249; pMVSCS1, AJ319822.

항생제내성 유전자의 cloning

다제내성 plasmid pCAST2를 제한효소 *Sac*I으로 처리하여 pUC19 vector에 연결하고 *E. coli* DH5α에 형질전환하여 각각의 항생제를 첨가한 선택배지에 도말하여 형질전환체를 선발한 결과, streptomycin, sulfonamide, tetracycline에 대해 동시에 내성을 가지는 재조합 plasmid를 분리하고, pSY7K로 명명하였다. pSY7K plasmid는 *Sac*I에 의해 4.7 kb와 2.3 kb로 절단되는 7 kb의 pCAST2 단편을 갖고 있었다(Fig. 2).

항생제 내성유전자 집락의 염기서열분석 및 구조

pCAST2의 7 kb *Sac*I 단편의 염기서열 분석을 통해 sulfonamide, streptomycin, tetracycline의 내성에 관여하는 *sulII*, *strA*, *strB*, *tetR*, *tetA* 유전자가 putative transposase와 함께 6개의 ORF가 하나의 집락 형태로 배열되어 있음이 확인되었다(Fig. 2, Table 2). *sulII-strA-strB-tetR-tetA* gene cluster의 구조는 기존에 보고된 *Shigella sonnei* plasmid pKKTET7 (1) 외에는 아직까지 확인할 수 없었고, pKKTET7 gene cluster와도 약간의 차이를 보여주고 있다. pKKTET7 에서는 *tnpA* 유전자를 확인할 수 없었고(Fig. 3), *tetR*, *tetA* 유전자의 구조와, 유전자와 유전자 사이의 염기서열도 조금씩 상이하였다(자료 미제시). 그리고 *Vibrio cholerae* strain MO10 SXT element antibiotic resistance gene (16), *Mannheimia varigena* plasmid pMVSCS1 (17), *Pasteurella multocida* plasmid pIG1 (12), Enterobacterial plasmid RSF1010 (20,23), *Haemophilus ducreyi* plasmid pLS88 (14) 등의 대부분은

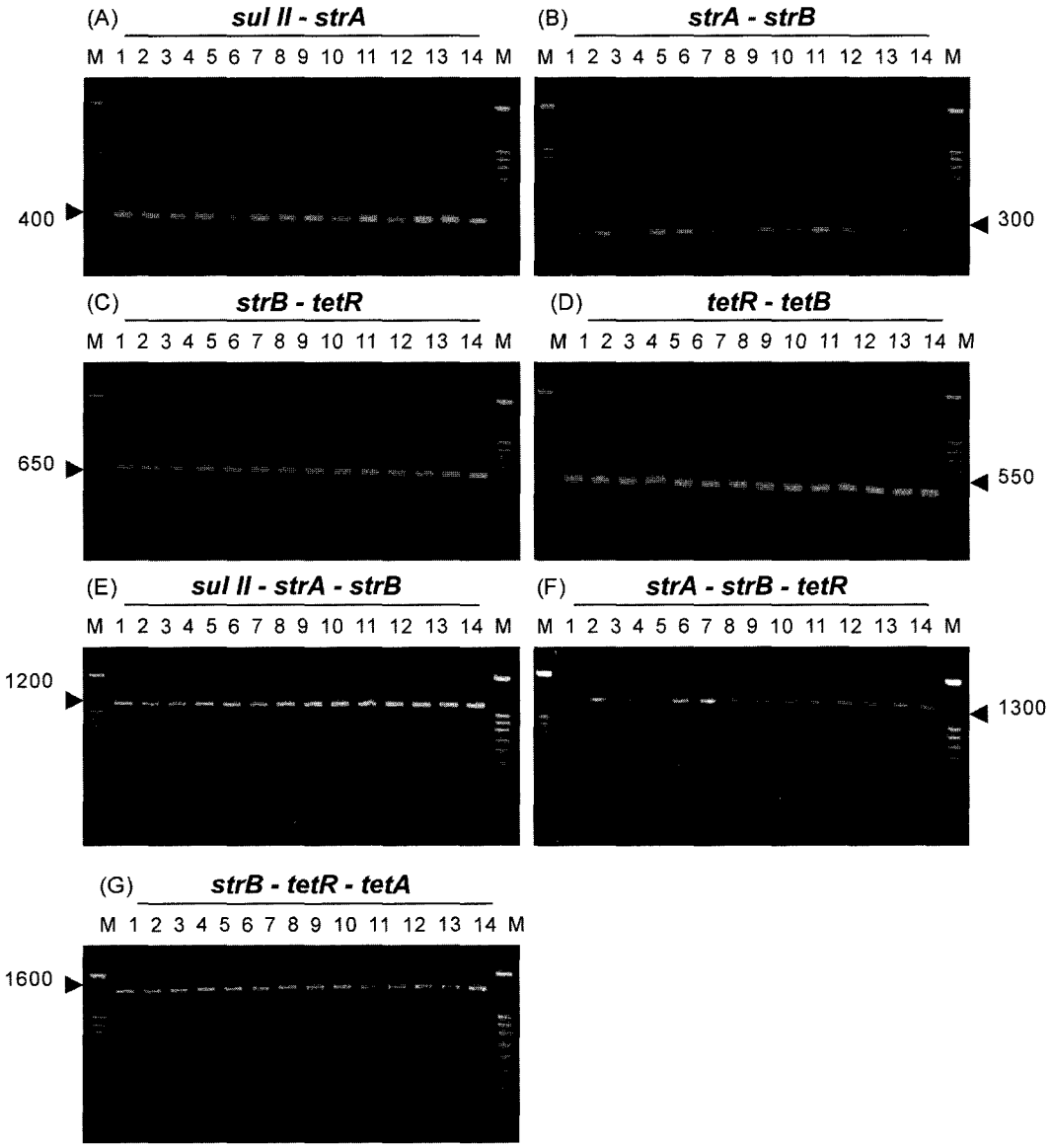

Fig. 4. PCR amplications generating fragment A, B, C, D, E, F, and G. Amplicons obtained with primers *sul1-strA2* (A), *strA1-strB2* (B), *strB1-tetR2* (C), *tetR1-tetA2* (D), *sul1-strB2* (E), *strA1-tetR2* (F) and *strB1-tetA2* (G). Plasmid DNAs isolated from following strains were used as templates. Lanes: 1, pSY7K; 2, SY6; 3, SY7; 4, SY9; 5, SY15; 6, SY22; 7, SY25; 8, SY31; 9, SY32; 10, SY33; 11, SY35; 12, SY36; 13, SY37; 14, SY40; M, sizemarter (100 bp ladder).

tetR-tetA 유전자를 제외한 *sulII-strA-strB*의 구조를 보여주었다 (Fig. 3). 이들 내성 유전자의 집락은 살모넬라 균주에서 보편적으로 사용하는 sulfonamide, streptomycin, tetracycline, ampicillin, chloramphenicol 등의 항생제의 사용(10)에 따라 pCAST2가 가지고 있는 5 개의 내성 유전자들이 함께 선택되어지고 또한 함께 움직일 수 있는 가능성을 제공해주는 것과 함께 Gram negative bacteria에 널리 퍼져 있는 내성유전자의 새로운 배열을 나타내고 있다. 즉 putative transposase와 함께 *sulII*, *strA*, *strB*, *tetR*, *tetA* 유전자로 이루어진 집락은 이것이 첫 보고로 생각되며, 다제내성 유전자의 다양한 진화과정을 살펴볼 수 있는 하나의 좋은 예가 될 수 있으리라 생각한다.

sulII 유전자의 상류에 있는 putative transposase의 영역은 *Shigella flexneri*의 virulence plasmid pWR501 IS1328 transposase와 61%의 유사성이 있었다(26). Sulfonamide의 내성에 관여하는 *sulII* 유전자는 816 bp, streptomycin에 내성에 관여하는 유전자는 *strA*와 *strB* 유전자로 각각 804 bp, 837 bp로 이루어져 있었다. 그리고 *strA* 유전자의 종결코돈과 *strB*의 개시코돈의 한 염기가 겹쳐져 있어, 기존에 보고(24,25)되어진 유전자의 구조와 같아 보존성이 높게 나타났다. *strB* 유전자 하류에는 tetracycline resistance repression에 관여하는 *tetR* 유전자와 tetracycline의 내성에 관여하는 *tetA* 유전자가 있었고 *tetR* 유전자의 경우, *E. coli*의 *tetR* 유전자(accession no. AJ307714)와 비교했을 때 C 말단 부위에 아미노산 8 개가 결실되어 있었다.

PCR에 의한 *sulII-strA-strB-tetR-tetA* gene cluster의 탐지

특정 유전자의 존재 또는 유전자의 배열은 균주의 분류, 동정 확인에 중요한 수단으로 이용될 수 있다. 따라서 다발적으로 발생하는 집단 식중독의 경우, 원인균의 추정, 분포, 감염 및 전파 경로의 추적 등 역학조사시 이는 중요한 지표의 하나로 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 이 경우 개개 유전자의 존재여부를 확인하는 것보다 유전자 상호간의 배열관계를 조사하면 더욱 분명하고 유용한 자료로 이용될 수 있다. 이에 다제내성 유전자 집락의 염기서열 분석 자료를 근거로 내성유전자의 상호 배열관계를 확인할 수 있는 primer (Fig. 2, Table 3)를 제작하여, 2001, 2002 년도에 경북지역에서 분리한 sulfonamide, streptomycin, tetracycline에 내성을 나타내는 12 종의 살모넬라 균주를 대상으로, 이들의 내성유전자의 구조가 *sulII-strA-strB-tetR-tetA* gene cluster 로 존재하는지 확인해 보기 위해서 PCR 을 수행하였다.

Fig. 4에서 보는 것처럼 각각의 primer로 PCR을 수행한 결과 실험에 사용한 모든 균주가 SY9 균주와 동일한 양상을 나타냈다. 이를 통해서 분리 연도, 분리 지역, 항생제 내성, 혈청형이 상이한 *Salmonella* 균주가 *sulII-strA-strB-tetR-tetA* 구조의 유전자 집락을 가지고 있음을 PCR로 확인할 수 있었다. 이번에 처음 보고한 다제내성 유전자의 이런 구조는 비교적 널리 존재하고 있음을 나타내고 있으며, 앞으로 더 많은 수의 다양한 균주를 대상으로 실험하면 이 유전자 구조의 분포에 대한 정보를 얻을 수 있으리라 생각된다. 실제 1997 년부터 1999 년까지 국내 보건 검사망을 통해 분리된 63균주의 *Salmonella* Typhimurium DT 104 균 전부, 또 1983 년부터 1999 년까지 국내 동물에서 분리된 *Salmonella* Typhimurium 균주의 다수도 sulfonamide, streptomycin, tetracycline에 내성을 보이고 있어(5,27), 이들도 *sulII-strA-strB-tetR-tetA* 구조의 유전자 집락을 가지고 있을 가능성을 생각해 볼 수 있을 것이다.

지난 수십 년 동안 여러 병원균으로부터 수많은 내성 유전자들이 밝혀졌고, 이렇게 밝혀진 유전자의 염기서열을 바탕으로 각각의 유전자로부터 특이적인 primer나 probe로 PCR과 hybridization에 의한 내성유전자를 확인 할 수 있는 방법이 개발되어왔다(15). 본 연구에서는 *Salmonella* Enteritidis SY9 균주로부터 *sulII-strA-strB-tetR-tetA* 유전자 집락의 구조를 처음 밝히고, PCR을 통해서 이들 구조를 탐지할 수 있는 방법을 제시하였다. 이는 다발적으로 발생한 집단 식중독 균주들이 가지고 있는 유전적인 정보의 분석을 통해서 분자역학적인 연구를 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. 곽경탁. 2002. 경북대학교 석사 학위 논문
2. 김원용, 장영호, 박경윤, 김철중, 신광순, 박용하. 1995. 가금에서 분리한 *Salmonella* 속 균의 항균물질에 대한 감수성 및 plasmid profile. *Korean. J. Vet. Res.* 35, 537-542.
3. 김은희, 김치경, 이호주, Akoi Takashi. 1994. *Pasteurella Piscicida*의 전이성 R Plasmid 가 갖는 약제내성 유전자의 구조에 대하여. 한국미생물생명공학회. (춘계학술발표대회 프로그램) 85-88.
4. 마점술. 1988. 항생제 및 약품에 대한 내성세균의 문제. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed.* 12, 58-68.
5. 박미선, 강연호, 이상조, 송철용, 이복권. 2002. 국내에서 처음으로 분리된 다제내성 *Salmonella* Typhimurium definitive phage type (DT) 104 균의 특성. 감염 34, 1-8
6. 방성혁, 이유철, 설성용, 조동택. 1987. 분자량 측정을 위한 reference plasmid 보유균주의 이용. 대한 미생물학회지. 22, 267-274.
7. 이연희. 2001. 항생제 내성세균의 문제점. 제 83차 대한미생물학회 학술대회 초록집. 109-116.
8. Altschul, S.F., T.L Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search program. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
9. Anthony, M.G. 1996. Multidrug resistance in enteric and other Gram negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 139, 1-10.
10. Bolton, L.B., L.C. Kelley, M.D. Lee, and P.J. Fedorka-Cray. 1999. Detection of multidrug Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium DT104 based on gene which confers cross resistance to florfenicol and chloramphenicol. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1348-1351.
11. Briggs, C.E., and P.M. Fratamico. 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella Typhimurium* DT104. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43, 846-849.
12. Chang, Y.F., D.P. Ma, H.Q. Bai, R. Young, D.K. Struck, S.J. Shin, and D.H. Lein. 1992. Characterization of plasmids with antimicrobial resistant genes in *Pasteurella haemolytica. DNA Sequence* 3, 89-97.

13. Davis, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264, 375-381.
14. Dixon, L.G., W.L. Albritton, and P.J. Willson. 1994. An analysis of the complete nucleotide sequence of the *Haemophilus ducreyi* broad-host-range plasmid pLS88. *Plasmid* 32, 228-232.
15. Frech, G. and S. Schwarz. 2000. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. enterica serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probe. *J. Appl. Microbiol.* 99, 633-641.
16. Hochhut, B., Y. Lotfi, D. Mazel, S.M. Faruque, R. Woodgate, and M.K. Waldor. 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2991-3000.
17. Kehrenberg, C. and S. Schwarz, 2002. Nucleotide sequence and organization of plasmid pMVSCS1 from *Mannheimia varigena*: Identification of a multiresistance gene cluster. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 383-386.
18. Kotler, L, I. Sobolev, and L. Ulanovsky. 1994. DNA sequencing: modular primers for automated walking. *Biotechniques* 17, 554-559.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 6th ed. Approved Standard NCCLS document M2-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. USA.
20. Radstrom, P. and G. Swedberg. 1988. A relative of the broad host range plasmid RSF1010 dectecd in *Erwinia amylovora. J. Appl. Microbiol.* 63, 4604-4607.
21. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual 2nd ed. Cold Spring Habor Laboratory, New York
22. Schmieger, H. and P. Schickmajier. 1999. Transduction of multiple drug resistance *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 251-256.
23. Scholz, P., Haring, V., Wittmann-Liebold, B., Ashman, K., Bagdasarian, M. and Scherzinger, E. 1989. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* 75, 271-288.
24. Sundin, G.W. 2000. Examination of base pair variants of the *strA-strB* streptomycin resistance genes from bacterial pathogens of human, animals and plants. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 848-849.
25. Sundin, G.W. 2002. Distinct Recent Lineages of the *strA-strB* streptomycin-resistance genes in clinical and environmental bacteria. *Curr. Microbiol.* 45, 63-69.
26. Venkatesan, M.M., M.B. Goldberg, D.J. Rose, E.J. Grotbeck, V. Burland, and F.R. Blattner. 2001. Complete DNA Sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri. Infect. Immun.* 69, 3271-3285.
27. Yang, S.J., K.Y. Park, S.H. Kim, K.M. No, T.E. Besser, H.S.Yoo, S.H Kim, B.K. Lee, and Y.H. Park. 2002. Antimicrobial resistance in *Salmonella entrrica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea : comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Vet. Microbiol.* 86, 295-301

(Received October 10, 2002/Accepted December 4, 2002)

ABSTRACT : Organization of Antibiotic Resistance Gene Cluster of Multi-Drug Plasmid in Clinically Isolated *Salmonella* Enteritidis Strain

Seo-Youn Jung, Chang-Kyu Son[1], Kyung-Tak Kwak, Byung-chun Kim, and Wan Park*
(Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea, [1]Kyungsangbuk-do Institute of Health and Environment, Taegu 702-702, Korea)

Clinically isolated *Salmonella* Enteritidis strain has a multi drug resistance plasmid, which confers ampicillin, chloramphe-nicol, sulfonamide, streptomycin and tetracycline, named pCAST2. We cloned a 7 kb *Sac*I fragment of pCAST2 which has sulfonamide, streptomycin and tetracycline resistance genes. The 7 kb *Sac*I fragment showed the organization of *sulII-strA-strB-tetR-tetA* gene cluster which is different from the other clusters reported previously. In this study, we presented the method to detect this cluster by PCR analysis and showed that this cluster was found in *Salmonella* strains occurred sporadically at Kyungpook province in 2002.