

경북지역에서 분리된 *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium의 Class I Integron Gene Cassette 특성과 PFGE 유형분석

손창규* · 이정아¹ · 이도영 · 허완 · 정종교
경상북도보건환경연구원 미생물과, ¹경북가축위생시험소

2003년부터 2004년까지 경북지역에서 발생한 설사환자로부터 17주, 돼지로부터 18주 등 총 35주의 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium이 분리되었고, 분리된 균주를 대상으로 항균제 내성양상, class I integron 특성 및 pulse-field gel electrophoresis 유형(PFGE 유형; pulsotype)이 조사되었다. 35주 모두가 한 가지 이상의 항균제에 내성을 나타내었고, 돼지로부터 분리된 대부분의 균주는 ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole/trimethoprim, tetracyclin, nalidixic acid에 내성을 나타내었다. 35주를 대상으로 class I, II 및 III integron gene cassette를 검색한 결과, 설사환자로부터 분리된 17주 중 3주가 dhfrX-orfF-aadA2 integron gene cassette를 보유하고, 돼지로부터 분리된 18주 중 11주가 dhfrX-orfF-aadA2 integron gene cassette를, 1주가 aadA2 integron을 보유하고 있었다. 그러나 35주 모두가 class 2 integron gene cassette와 class 3 integron gene cassette는 보유하고 있지 않은 것으로 나타났다. 35주의 PFGE 유형은 5가지로 분류되었으며, 31주가 pulsotype A로 나머지 4주는 pulsotype B, C, D, E형으로 각각 나뉘어졌다. 이러한 결과로 볼 때 경북지역에서 사람과 돼지에서 S. enterica serovar Typhimurium에 의한 살모넬라증은 몇 종류 유행주의 전파에 의한 것임을 보여준다. dhfrX-orfF-aadA2 integron gene cassette를 보유한 13주가 pulsotype A, dhfrX-orfF-aadA2 integron gene cassette를 보유한 1주가 pulsotype B, aadA2 integron을 보유한 1주가 pulsotype E, integron을 보유하고 있지 않은 15주가 pulsotype A로 나타났다.

Key words □ antibiotic resistance pattern, class I integron, pfge pattern (pulsotype), *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

사람과 가축의 치료제, 식용동물의 성장촉진제 및 농업분야 등, 항균제의 광범위한 사용으로 미생물의 항균제 내성이 급격하게 증가하고 있으며, 특히 최근에는 인수공통 병원성 세균의 인체 감염 빈도의 증가로 인한 이들 세균들의 다제 내성(multidrug-resistance)에 대한 관심이 고조되고 있다. 병원성 미생물들 중에서 *Salmonella* 균 속은 인수공통 감염의 대표적인 병원성세균이다(1). *Salmonella* 균 속중 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. enterica* serovar Typhimurium)의 경우 설사환자와 가축으로부터 많이 분리되고 있으며, 이들 분리된 균들은 ampicillin (Ap), chloramphenicol (Cm), streptomycin (Sm), sulfonamides (Su), tetracycline (Te)등의 여러 가지 항균제에 대한 내성 많이 보고되고 있다(2, 3). 세균의 수평적 항균제 내성 전달 기전은 plasmid, transposon, integron gene cassette등 전달성 유전자에 의한 것으로 알려져 있으며, 이러한 수평적 기전으로 인한 항균제 내성 유전자의 확산은 세균에서의 빠른 내성 증가와 새로운 조합의 복합내성균 출현의 원인으로 보고되고 있다(4, 5).

전달성 내성 관련 유전자들 중 integron은 한 종류 또는 그 이상의 내성 관련 유전자를 보유하는 이동 가능 유전자 집단

(mobile gene cassette)이다. 일반적으로 class I integron의 경우 5'말단 불변영역(5' conserved sequence; 5'CS)과 3'말단 불변영역(3' conserved sequence; 3'CS)의 중간에 가변영역이 존재하고, 이 가변영역 내에 존재하는 att I 위치에 다양하게 삽입된 내성관련 유전자 집단이 존재 한다(6). 이 유전자 집단은 5' 불변영역 부위에 존재하는 Int I 유전자의 산물인 integrase에 의해 다른 유전자 상에서 특이위치에서의 삽입과 절단을 가능하게 한다. 따라서 삽입 혹은 절단된 유전자의 순서에 따라 다양한 형태와 수의 integron이 존재하게 되고(7), 삽입된 내성 유전자의 종류와 수에 따라 여러 가지 조합형의 다제 내성균 출현이 가능하게 된다(4, 5). Integron은 각각이 보유하고 있는 integrase에 따라 세 종류로 구분되고, 그 중 class I integron이 다양한 병원성 세균들에서 광범위하게 분포하며 *Salmonella* 속에서 beta-lactam계, aminoglycoside계, trimethoprim, chloramphenicol등의 항균제와 방부제나 소독제에 이용되는 4가 암모늄 혼합물에 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다(8, 9, 10). 이러한 특징으로 인하여 class I integron은 다양한 균종들에서 다제 내성균 출현에 가장 많은 연관성이 있는 것으로 보고되고 있다(11, 12, 13). 본 연구는 2003년부터 2004년 사이에 경북지역에서 발생한 설사환자와 돼지의 장기로부터 분리된 *S. enterica* serovar Typhimurium의 항균제 내성, integron의 분포와 특성 및 pulse-field gel electrophoresis를 이용하여 분리 균주들 간의 pulsotype을 분석하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 053-602-5321, Fax: 053-943-0242
E-mail: changkyuson@hanmail.net

재료 및 방법

균주의 분리 및 동정

2003년부터 2004년 사이에 경북 지역에서 발생한 설사환자의 분변으로부터 분리한 *S. enterica* serovar Typhimurium 17주와 경북지역에서 사육되는 돼지의 장기로부터 분리한 *S. enterica* serovar Typhimurium 18주를 실험에 이용하였다(Table 1). 분리균은 Ewing 등의 방법(14)에 따라 생화학적 동정을 실시한 후 O항원은 슬라이드 응집법으로, H항원은 시험관 응집법으로 결정하였으며, O항형은 국립보건원 (KNIH, Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였고, H항형은 Difco (Difco, Detroit, USA)사의 제품을 사용하였다.

항균제 내성시험

디스크 확산법을 이용하였고, 항균제 디스크는 BBL (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.)사의 ampicillin (AM, 10 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), gentamicin (GM, 10 µg), kanamycin (K, 30 µg), nalidixic acid (NA, 30 µg), streptomycin (S, 10 µg), tetracycline (TE, 30 µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT, 1.25/23.73 µg), ticarcillin (TIC, 75 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), ampicillin/sulbactam (SAM, 10/10 µg) 등을 사용하였으며, 실험방법 및 결과판정은 National Committee Clinical Laboratory Standards (NCCLS) 기준(15) 및 제조사의 지시에 따랐다.

플라스미드 특성과 integron의 위치확인

플라스미드의 분리는 QIAGEN plasmid purification Midi kit (QIAGEN, CA., USA)를 이용하여 분리하였고, 실험방법은 제조사의 지시에 따랐다. 분리한 플라스미드는 1.0% agarose gel 상에서 100V, 1시간 전기영동 후 ethidium bromide (0.1 µg/ml)로 10분간 염색하여 자외선 조사 하에서 관찰하였다. 유전자상에서 integron의 존재위치를 확인하기 위하여, 플라스미드를 양전하로 하전된 nylon membrane에 전이시킨 후 Sambrook 등(16)의 방법에 따라 DNA hybridization을 실시하였고, probe제작은 random labelling kit (Bethesda Research Lab. Inc., Gaithersburg, Md.)를 이용하여 [α^{32} P]dCTP로 표지하였다.

Integron 유전자의 PCR 증폭, 염기서열 분석

Integron 유전자를 탐지하기 위하여 Tosini 등(17)의 방법을 이용하였다(Table 2). PCR 반응은 전체가 20 µl가 되게, 1U Taq

Table 1. Isolates of *S. enterica* serovar Typhimurium used in this study

Strains ^a	Year ^b	Source ^c	Area ^d	Ref.
H1	2003	human stool	Pohang	this study
H2	2003	human stool	Pohang	
H3	2003	human stool	Gyeongsan	"
H4	2003	human stool	Andong	"
H5	2003	human stool	Yeongcheon	"
H6	2003	human stool	Yeongju	"
H7	2003	human stool	Yeongdeok	"
H8	2003	human stool	Andong	"
H9	2003	human stool	Yecheon	"
H10	2003	human stool	Cheongsong	"
H11	2004	human stool	Cheongsong	"
H12	2004	human stool	Gyeongju	"
H13	2004	human stool	Gyeongju	"
H14	2004	human stool	Yeongdeok	"
H15	2004	human stool	Yeongdeok	"
H16	2004	human stool	Uiseong	"
H17	2004	human stool	Uiseong	"
P1	2003	pig liver	Yeongcheon	"
P2	2003	pig liver	Yeongcheon	"
P3	2003	pig mesentery lymphoid	Gunwi	"
P4	2003	pig small intestine	Koryong	"
P5	2003	pig colon	Koryong	"
P6	2003	pig mesentery lymphoid	Cheongdo	"
P7	2003	pig mesentery lymphoid	Seongju	"
P8	2003	pig mesentery lymphoid	Gyeongsan	"
P9	2003	pig liver	Gunwi	"
P10	2004	pig liver	Gumi	"
P11	2004	pig liver	Yecheon	"
P12	2004	pig mesentery lymphoid	Bonghwa	"
P13	2004	pig mesentery lymphoid	Chilgok	"
P14	2004	pig spleen	Andong	"
P15	2004	pig colon	Youngcheon	"
P16	2004	pig colon	Cheongdo	"
P17	2004	pig spleen	Mungyeong	"
P18	2004	pig mesentery lymphoid	Uiseong	"

^aAbbreviation: H, human; P, pig.

^{b,c,d}Year, source and area of isolated strains

polymerase, 10 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1.5 mM MgCl₂, 주형 DNA 및 각각의 primer를 10 pmole씩 넣고 수행하였다. 주형 DNA는 시험균주를 증류수에 현탁하고, 현탁액을

Table 2. Primers used for the detection of class I, II and III integron gene cassettes

Primer	DNA sequence (5'-3')	Position in submitted sequence	Accession no.
5'CS	5'-GGCATCCAAGCAGCAAGC-3'	1190-1206	M73819
3'CS	5'-AAGCAGACTTGACCTGAT-3'	1342-1326	M73819
int I 2F	5'-ATGCTAACAGTCCATTTTAAATCTA-3'	1914-1886	AJ002782
int I 2R	5'-AAATCTTTAACCCGAAACGC-3'	1475-1495	AJ002782
int I 3F	5'-GTGGCGCAGGGTGTGGAC-3'	194-211	D50438
int I 3R	5'-ACAGACCGAGAAGGCTTATG-3'	959-938	D50438

100°C, 20분간 가열하여 7,000 rpm에서 5분 원심분리한 후 상등액에 포함된 것을 사용하였다. PCR반응의 조건은 초기 변성시간을 95°C, 5분간 1회 실시한 후 변성반응은 94°C에서 30초, 결합반응은 59°C에서 30초, 중합반응은 72°C에서 2분 30초간 35주기를 반복하였다. 35주기반복 이후 마지막 중합반응은 72°C에서 7분간 연장하여 1회 반응시켰다. 증폭되어진 DNA는 1.0% agarose gel상에서 전기영동하여 ethidium bromide(0.1 µl/ml)에 10분간 염색한 후 자외선 조사 하에서 확인하였고, 분자량 측정용 표준품은 100 bp ladder (Bioneer, Chungwon, Korea)를 사용하였다. 염기서열의 결정은 Automatic DNA sequencer (ABI 3700, Applied Biosystem, Foster, USA)를 사용하여 primer walking method (18)에 따라 수행하였다. 염기서열 분석은 GenBank의 database를 이용하여 NCBI BLAST(19)와 DNASIS (version 2.6)를 사용하였다.

Pulse field gel electrophoresis (PFGE)

Gautom의 방법(20)을 변형하여 실시하였다. 대상균을 tryptic soy agar (Oxoid, Hampshire, UK)에 접종한 후 37°C, 20시간 배양한 후 1.5 ml의 현탁액 (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 7.5)에 균을 현탁하여, Vitek DR100 colorimeter (HACH, Colo., USA)를 이용하여 12~15 % 투광도로 균 농도를 조정하였다. 현탁된 균액 200 µl를 proteinase K (20 mg/ml) 10 µl와 미리 준비된 1.2 %의 seakem gold agarose (BMA, ME, USA) 200 µl와 섞어 plug mold에 분주하여 4°C에서 5분간 굳혔다. 굳은 plug mold를 1.5 ml의 ES 완충액 (0.5 M EDTA, pH 9.0, 1% sodium-lauroyl-sarcosine)과 40 µl의 proteinase K 혼합액에 담귀 55°C에서 1시간 반응 시키고, plug mold를 screen cap에 옮긴 후, plug wash TE buffer로 세척하였다. plug mold의 세척은 55°C 항온수조에 미리 놓아두었던 증류수로 15분간 1회 세척 한 후, 55°C로 데워진 plug wash TE buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 7.5)로 15분씩 3회 세척하였다. 세척이 끝난 plug mold를 1 mm 정도의 두께로 절단 후, Xba I제한효소 (Takara, Otsu, Shiga, Japan)로 37°C, 2시간 반응시켰다. 제한효소 처리된 plug mold를 1.0%의 seakem gold agarose로 gel을 제작하고 CHEF DRIII system(Bio-lad, Hercules, Calif.)을 이용하여 0.5X TBE (Tris-borate-EDTA), 6V/cm, 120°, 14°C, switch time 2.1초 ~63.8초, 18시간 전기영동 하였다. 전기영동 후 ethidium bromide (0.5 µg/ml)에 30분간 염색하고, 증류수에 30분씩 3회 탈색시켜, Gel Doc 2000 image analyzer를 이용하여 관찰하고, Molecular Analyst Fingerprinting Plus Software (Bio-lad, Hercules, Calif.)프로그램을 이용하여 PFGE 유형을 분석하였다.

결과 및 고찰

약제내성 및 integron의 분포

공시된 35주의 *S. enterica* serovar Typhimurium의 약제내성 결과 및 integron의 분포는 Table 3과 같으며, 증폭된 class I integron의 분포는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 총 13가지의 약제

내성 유형을 나타내었다. 모든 균주가 1종 이상의 약제에 내성을 나타내었으며, tetracycline에는 34주가 내성을 나타내었다. 사람에서 분리된 17주의 경우 9주 (28.6 %)가 2제 이상의 약제에 내성을 나타내었고, 6주 (17.1 %)가 3제 이상에 내성을 나타내었다. 사람에서 분리된 다제내성 균주의 경우, 주로 tetracycline, nalidixic acid, streptomycin, sulfamethoxazole, trimethoprim 등에 내성을 나타내었다. 돼지에서 분리된 18주의 경우, 18주 모두가 2제 이상의 약제에 내성을 나타내었고, 18주 중 17주는 tetracycline, streptomycine에 내성을 보였다. 또한 15주가 3제 이상의 약제에 내성을 나타내었으며, 12주가 tetracycline, streptomycine, ticacilline, sulfamethoxazole, trimethoprim, nalidixic acid등 5제 이상의 약제에 내성을 나타내어, 가축에서 분리된 *S. enterica* serovar Typhimurium의 약제내성 및 다제 내성 정도가 심각한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *Salmonella* 균속이 streptomycine, sulfonamide, tetracycline등의 약제에 대하여 내성이 높다는 보고(22, 21)와 유사하였으며, aminoglycosides계열의 항생제 중 다른 항생제에 비해 streptomycine의 높은 내성을 보고(22)와 동일하였다. Class I integron gene cassette의 분포는 사람에서 분리된 공시균 17주 중 3주가 2,000 bp 크기의 class I integron gene cassette 을 보유하였다(lane1~lane3). 돼지로부터 분리된 18주 중에서 ampicillin, nalidixic acid, streptomycin, tetracycline, ticacilline에 내성을 나타내는 1주에서는 1,000 bp의 class I integron gene cassette (lane5) 증폭산물을, 5제이상의 약제내성을 나타내는 균 11주에서 2,000 bp의 class I integron gene cassette을 얻어 총 12주가 class I integron gene cassette (lane4, lane5~lane15)를 보유하였다(Fig. 1). 그러나 35주의 실험 균주에서 class 2 integron gene cassette과 class 3 integron gene cassette 유전자 증폭 산물은 관찰되지 않았다. 2,000 bp 크기의 class I integron gene cassette 유전자가 검출된 균주들의 약제내성 양상은 5제 이상의 약제에 내성을 나타내었으며, class I integron gene cassette 유전자가 검출된 모든 균주는 streptomycin, sulfamethoxazole, trimethoprim, tetracycline에 내성을 나타내었다(Table 3).

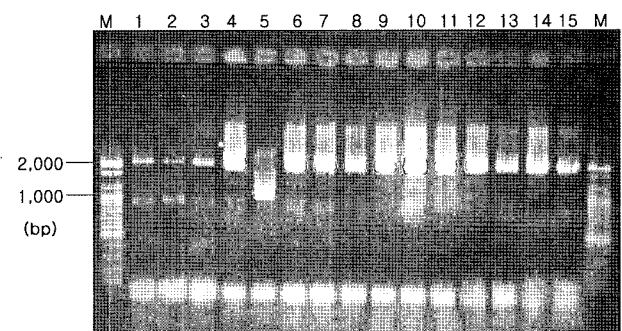


Fig. 1. Amplified class I integron gene cassette from representative strains of *S. enterica* serovar Typhimurium isolates. M: 100 bp ladder as size markers, lane1 to lane3: products from strains isolated from diarrhetic patients, lane4 to lane15: products from strains isolated from diseased pigs.

Table 3. Distribution of class I integron gene cassette gene and resistance patterns of 35 strains of *S. enterica* serovar Typhimurium

Strain	Resistance pattern ^a	IntI gene	Size(kb)
H1	NA, S, TE	-	-
H2	NA, TE	-	-
H3	NA, S, SXT, TE, TIC	Int I 1	2
H4	S, TE	-	-
H5	TE	-	-
H6	SXT, TE,	-	-
H7	TE	-	-
H8	AM, S, SXT, TE, TIC	Int I 1	2
H9	NA, S, TE	-	-
H10	TE	-	-
H11	C, GM, S, TE,	-	-
H12	NA	-	-
H13	K, NA, S, SXT, TE	Int I 1	2
H14	TE,	-	-
H15	C, TE	-	-
H16	TE	-	-
H17	TE	-	-
P1	S, TE	-	-
P2	S, TE	-	-
P3	AM, C, S, SXT, SAM, TE, NA, TIC, GM	Int I 1	2
P4	AM, NA, S, TE, TIC	Int I 1	1
P5	AM, C, S, SXT, SAM, TE, NA, TIC, GM	Int I 1	2
P6	NA, S, TE	-	-
P7	AM, S, SXT, TE, NA, TIC	Int I 1	2
P8	AM, S, SXT, TE, NA, TIC	Int I 1	2
P9	AM, C, S, SXT, SAM, TE, NA, TIC	Int I 1	2
P10	S, TE	-	-
P11	AM, C, S, SXT, TE, NA, TIC	Int I 1	2
P12	AM, C, S, SXT, TE, NA, TIC	Int I 1	2
P13	C, S, NA	-	-
P14	AM, C, S, SXT, TE, NA, TIC	Int I 1	2
P15	AM, C, S, SXT, TE, NA, TIC	Int I 1	2
P16	AM, C, S, SXT, TE, NA	Int I 1	2
P17	S, NA, TE	-	-
P18	AM, C, S, SXT, TE., NA	Int I 1	2

^aAbbreviation: TE, tetracyclin; S, streptomycin; Tic, ticacillin; GM, gentamicin; Am, ampicillin; C, chloramphenicol; NA, nalidixic acid; SAM, ampicillin/sulbactam; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim

Class I integron gene cassette의 특성

증폭된 class I integron gene cassette 유전자의 염기배열(자료 미제시)을 근거로 구조를 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 돼지에서 분리된 균주로부터 증폭된 1,000 bp 크기의 integron 1건, 2,000 bp 크기의 integron gene cassette 1건을 대상으로 염기서열을 분석한 결과, 1,000 bp 크기의 integron이 streptomycin과 spectinomycin의 내성과 관련 있는 aminoglycoside 3' adenytransferase 효소관련 산물을 만드는 aadA2 유전자로 분석되었다. 2,000 bp 크기의 경우 dhfrXII-orfF-aadA2 조합체로 dihydrofolate reductase 와 aminoglycoside 3' adenytransferase 효소관련 산물을 만들며, streptomycin, spectinomycin 및 trimethoprim 내성 관련 유전자

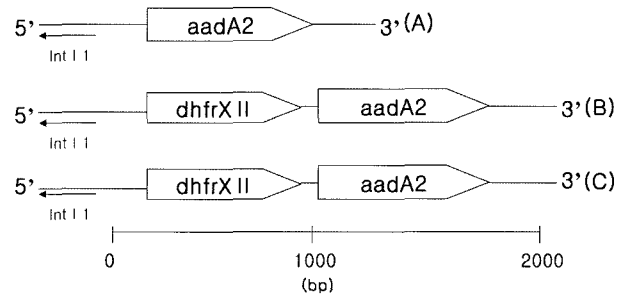


Fig. 2. Structural organizations of class I integron gene cassette of *S. enterica* serovar Typhimurium isolated from diarrheic patients and diseased pigs in Gyeongbuk area. A and C integron gene cassettes: two strains isolated from diseased pigs, B integron gene cassette: one strain isolated from diarrheic patient.

집합체로 분석되었다. 사람 유래의 균주로부터 증폭된 2,000 bp 크기의 산물 중 1건을 분석한 결과 dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette으로 분석되었고, 5'가변영역 부분에 dhfrXII 유전자가, 3' 가변영역 부분에 aadA2 유전자가 위치하였다. 이러한 형태의 integron gene cassette는 살모넬라균 속과 다른 장내세균을 대상으로 한 연구에서 흔히 보고되고 있다(23, 24, 25, 26). 본 연구에서 분석된 integron gene cassette의 경우에도 대부분의 내성관련 유전자 integron gene cassette이 특정부위의 재조합에 필수적인 5'말단과 3'말단에 고유한 GTTRRRY(R: purine, Y: pyrimidine)유전자배열을 가지고 있는 것으로 나타났다(10). dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette은 dhfrXII 유전자와 aadA2 유전자가 재조합된 형태로 trimethoprim과 aminoglycoside를 포함한 다양한 항균제 내성에 관여하며, dhfr 유전자의 경우 dihydrofolate reductase의 활성을 방해하여 dihydrofolate가 tetrahydrofolate로의 전이를 억제하여 내성을 나타내게 한다. 최근 20년간 국내에서의 class I integron gene cassette 분포의 중요한 변화는 1980년 초반에 대장균에서 aminoglycosides계 내성관련 class I integron gene cassette이 우세하게 발견된 것이고, 1982년에 dhfrA12, dhfrA17 integron들이 발견된 이후로 최근까지 dhfr integron의 분포 비율이 증가하는 추세이며, 1980년대까지 한 종(single cassette)의 integron이 대부분이었으나, 1990년대 이후로는 대부분이 두가지 이상의 내성관련 유전자가 결합된 형태의 class I integron gene cassette라는 점이다(27). dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette의 경우 대장균에서 가장 흔히 발견되는 내성관련 유전자군으로 보고되어 있으며(27), 특히 국내에서 분리된 대장균의 integron gene cassette 변화는 dhfrXII-orfF-aadA2 형태의 integron gene cassette이 1983년 이후부터 나타났고, 환자에서 분리된 대장균들의 dhfrXII-orfF-aadA2 형 integron gene cassette 보유율이 48%임이 보고된 바 있다(27). 이러한 결과는 본 연구에서 35종의 *S. enterica* serovar Typhimurium에서 42.8%(15/35)가 dhfrXII-orfF-aadA2 형태의 integron gene cassette를 확인할 수 있었던 것과 비슷한 결과이다. 따라서 이러한 조합형의 integron gene cassette이 다른 혈청형의 살모넬라균에서도 높은 빈도로 존재할 가능성이 있는 것으로 추측되며, 항

후 새로운 재조합 integron gene cassette에 의한 다제내성균의 출현을 예측하기 위하여 살모넬라균 외에 다른 장내세균속에 대한 조사가 필요할 것으로 판단된다. 가축에서 분리된 균주에서 이러한 조합형의 integron gene cassette이 높게 나타나는 것은 성장촉진제로써 사료효율성 향상을 위한 사료내 첨가 및 치료목적으로 tetracycline과 streptomycin을 많이 사용되기 때문으로 알려져 있고(23) 또한 기존에 보고된 바(26, 27, 28)와 같이 streptomycin의 경우 가축에서 주로 사용되는 약제임과, 사람의 *Salmonella* 균에 의한 식중독의 중 약 15%는 돼지에서 기인하며, 돼지고기 오염의 70%는 *Salmonella* 감염돈에서 비롯된 것으로 알려진 것(29)으로 볼때 사람에서 분리된 균에서의 dhfrXII-orfF-aadA2 형태의 integron gene cassette의 검출은 가축유래의 균을 매개로하여 사람으로 전파된 것으로 추측된다.

Class I integron gene cassette의 위치확인

돼지로부터 분리된 aadA2 integron을 보유하고 있는 1주의 *S. enterica* serovar Typhimurium과 dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette를 보유하고 있는 2주의 *S. enterica* serovar Typhimurium 및 사람에서 분리된 1주의 *S. enterica* serovar Typhimurium을 선정하여 균주에 함유되어 있는 플라스미드를 분리한 후 southern hybridization을 실시하여 aadA2 integron과 dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette의 유전자상에서의 위치를 확인하였다(Fig. 3). Fig. 3의 A사진에 나타난 바와 같이 균이 분리된 시기나 분리원의 차이에 따라 플라스미드 양상은 다소 다르게 나타났다. Southern hybridization결과 aadA2 유전자의 경우 50 kb 정도 크기의 플라스미드에 존재하는 것을 알 수 있었고(B)(10, 23), dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette의 경

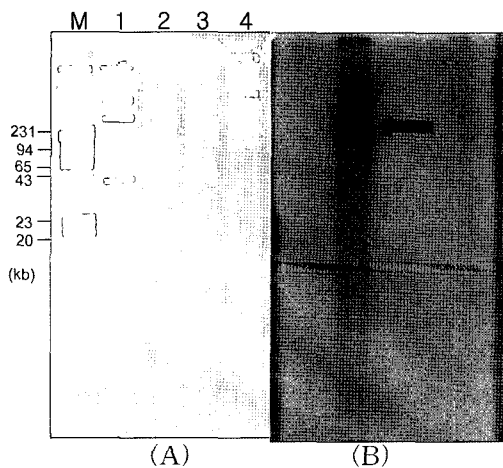


Fig. 3. Results of plasmid profile (A) and southern hybridization (B). M: λ Hind III size markers, lane1: strain containing aadA2 integron isolated from diseased pig, lane2 to lane3: strains containing dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette isolated from diseased pigs, lane4: strain containing dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette isolated from diarrheic patient. Arrow indicates the position of aadA2 integron on plasmid.

우 분리원의 차이와는 관계없이 선택된 3주 모두가 플라스미드와는 결합하지 않아 이들 균들이 보유하는 dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette의 경우 염색체상에 존재하는 것으로 추정된다. 이러한 결과는 dhfrXII-orfF-aadA2 형태의 조합된 integron gene cassette가 염색체상에 위치한다고 보고와 동일하였다(27, 28, 30).

Pulse-field gel electrophoresis(PFGE) profiles

분리된 균주들 간의 유전적 연관성을 알아보기 위하여 PFGE를 실시한 결과는 Fig. 4와 같으며, pulsotype을 근거로 균주들 간의 유전적 연관관계를 분석한 결과는 Fig. 5와 같다.

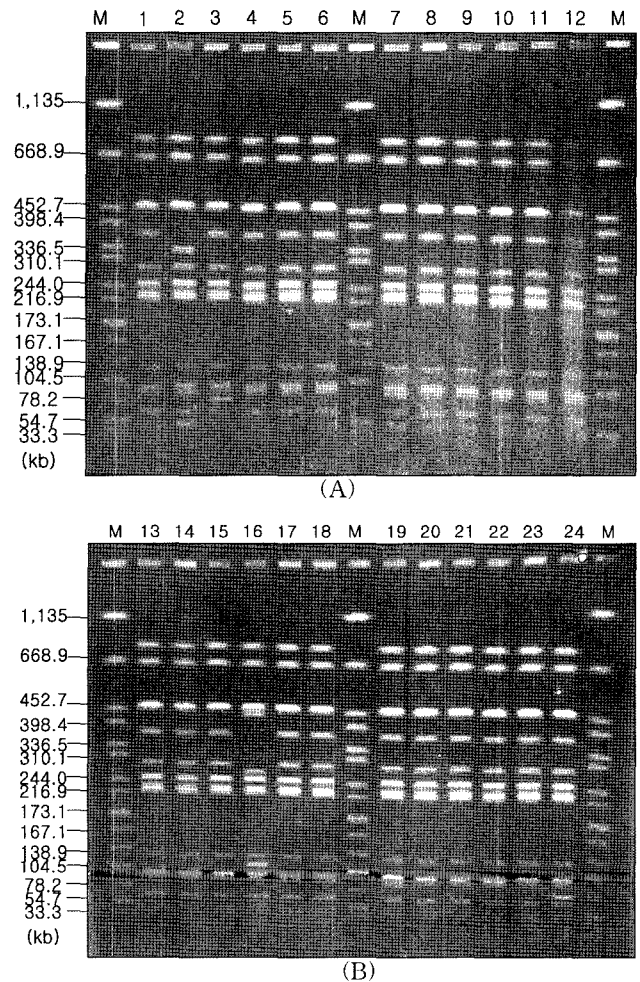


Fig. 4. PFGE patterns of XbaI-cleaved genomic DNA of *S. enterica* serovar Typhimurium isolated from diarrheic patients (A) and diseased pigs (B). M: molecular size marker, *S. enterica* serovar Brandrup H9812, lane1 to lane6 (H1 to H6); strains isolated from diarrheic patients in 2003, lane7 to lane12 (H7 to H12); strains isolated from diarrheic patients in 2004, lane13 to lane18 (P1 to P6); strains isolated from diseased pigs in 2003, lane19 to lane24 (P7 to P12); strains isolated from diseased pigs in 2004. PFGE patterns of H13 to H17 strains and P13 to P18 strains were the same those of H1 sample (data not shown).

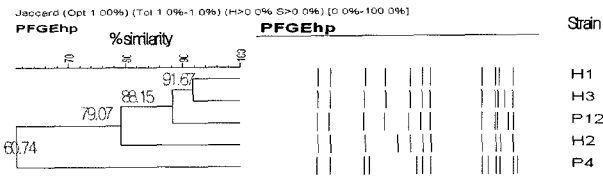


Fig. 5. Dendrogram of tested strains based on the above PFGE patterns. The percent similarity among PFGE types are shown at the top of the figure; scale at 100 means identical. The strains tested by PFGE but not shown this dendrogram means the same PFGE pattern of H1 strain (pulsotype A).

본 실험조건에서 전기영동 하여 생성된 유전자 단편들 중에서 33.3 kb 이상의 크기의 단편 유형을 분석한 결과, pulsotype은 5 가지로 구별되었다. 사람의 분변에서 분리된 17주는 pulsotype A, B, D 3가지 유형으로 구별되었으며, pulsotype A형이 15주 (83%), B형 1주, C형이 1주로 나타났고, 돼지로부터 분리된 18 주의 경우에는 pulsotype A형이 16주(88%), D형이 1주, E형이 1주로 나타났다. 따라서 2003년부터 2004년까지 경북지역에서 분리된 35주의 *S. enterica* serovar Typhimurium의 유전형은 A유형이 절대적으로 우세하였고, 분리 시기나 분리원, 항균제 내성 양상에 따른 pulsotype의 특징은 정확히 알 수는 없었다. 그러나 Tenover (31)등이 제시한 연관성 분석법에 따르면, 35주 중 31주는 A형으로 pulsotype이 동일하여 하나의 클론으로부터 유래하였음을 알 수 있었다. Pulsotype B형(lane 3; H3), C형(lane 24; P12)의 경우 pulsotype A형과 연관 가능성이 매우 높은 것으로 나타났으며, pulsotype D형(lane2; H2)의 경우도 pulsotype A형과 연관관계가 있는 것으로 나타났다. 그러나 pulsotype E형(lane 16; P4)의 경우에는 pulsotype A형과 연관관계가 없는 것으로 나타났다. 따라서 지난 2년간 경북지역에서 분리된 *S. enterica* serovar Typhimurium의 경우 각각의 균주가 역학적 연관성이 없음에도 불구하고 pulsotype E형 1주를 제외한 모든 균주가 유전적 연관관계가 있는 것으로 나타나, pulsotype A형의 균주들이 도내에서 *S. enterica* serovar Typhimurium에 의한 살모넬라증의 유행 주입을 알 수 있었다(27). Pulsotype과 class I integron gene cassette 관계는 aadA2 integron만을 보유한 P4균주의 경우 pulsotype E로 나타나 나머지 34 균주 간에 유연관계가 전혀 없는 독립적인 유래의 균인 것으로 나타났다. dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette을 보유한 14주의 경우, pulsotype B(lane 3; H3)를 제외한 13주가 pulsotype A로 나타났으며, dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette을 보유하였지만, pulsotype B로 나타난 H3균주의 경우도 pulsotype A의 균주들과 연관가능성이 매우 높은 것으로 나타났다. 그러나 사람 유래 11주와 돼지 유래 4주 등, 총 15주의 경우 dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette을 보유하지는 않았지만 pulsotype A로 나타나, dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette 보유 유, 무에 따른 pulsotype의 차이를 나타내지는 않았다. pulsotype B (H3)를 제외한 13주가 pulsotype A로 나타났으며, dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette을 보유하였지만 pulsotype B로 나타난 H3 균주의 경우

도 pulsotype A의 균주들과 연관가능성이 매우 높은 것을 알 수 있다. 그러나 사람유래의 11주와 돼지유래 4주 총 15주의 경우 dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette를 보유하지는 않았지만 pulsotype A로 나타나, dhfrXII-orfF-aadA2 integron gene cassette 보유 유, 무에 따른 pulsotype의 차이를 나타내지 않아 이에 대한 연구는 좀더 진행되어야 될 것으로 생각된다.

참고문헌

- Moss, P.J., and M.W. McKendrick. 1997. Bacterial gastroenteritis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 10, 402-407.
- Hampton, M.D., E.J. Threlfall, J.A. Frost, L.R. Ward, and B. Rowe. 1995. *Salmonella* DT193: Differentiation of an epidemic phage type by antibiogram, plasmid profile, plasmid finger print and *Salmonella* plasmid virulence(spv) gene probe. *J. Appl. Bacteriol.* 78, 402-408.
- Law, J.C., M. Angus, G. Hopkin, D. Munro, and S.C. Rankin. 1997. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolates and investigation of strain with transferable apramycin resistance. *Epidemiol. Infect.* 118, 97-103.
- Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotic and the dissemination of resistance gene. *Science* 264, 375-382.
- Lavesque, C., L. Pyche, C. Larose, and P.H. Roy. 1995. PCR mapping of integron gen reveal several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobe. Agent Chemother.* 39, 185-191.
- Hall, R.M., and C.M. Collis. 1995. Mobile gene cassette and integrons: capture and spread of genes by site specific recombination. *Mol. Microbiol.* 15, 593-600.
- Collis, C.M., and R.M. Hall. 1992. Site specific deletion and rearrangement of integron inserted genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J. Bacteriol.* 174, 1574-1585.
- Hall, R.M. 1997. Mobile gene cassette and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found symp.* 207, 192-202.
- Fluit, A.C., and F.J. Schmitz. 1982. ClassI integron gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 761-770.
- White, D.G., Zhao, S., MaDermott, P.F., Ayers, S., Friedman, S., Sherwood, J., Breider-Foley, M., and Nolan, L.K. 2003. Characterization of integron mediated antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from diseased swine. *The Canadian J. of Vet. Res.* 67, 39-47.
- Kazama, H., K. Kizu, M. Iwasaki, H. Hamashima, M. Sasatsu, and T. Arai. 1995. Isolation of a new integron that include a streptomycin resistance gene from R plasmid of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 134, 137-141.
- Recchia, G.D., and R.M. Hall. 1995. Gene cassette: a new class of mobile element. *Microbiology* 141, 3015-3027.
- Martinez-Freijo, P., A.C. Fluit, F.J. Schmitz, J. Verhoev, and M.E. Jones. 1999. Many class I integrons comprise stable structure occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from wide spread geographic regions in Europe. *Antimicrobe. Agent Chemother.* 43, 686-689.
- Ewing, W.H. 1986. Identification of Enterobacteriaceae, Elsevier, 4th ed. New york, p.108-318.
- National Committee Clinical Laboratory Standards. 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 6th ed. Approved Standard NCCLS document M2-A6, National Commit-

- tee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. USA.
16. Sambrook, J.E., F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
 17. Tosini, F., P. Visca, I. Luzzi, A.M. Dionisi, C. Pezzella, A. Petrucca, and A. carattoli. 2000. class I integron -borne multiple-antibiotic resistance and inclM plasmid in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrobe. Agent Chemother.* 42, 3053-3058.
 18. Kotler, L., Sobolev, I., and Ulanovsky, L. 1994. DNA sequencing: modular primers for automated walking. *Biotechniques* 17, 554-559.
 19. 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 Acid Res.* 25, 3389-3402.
 20. Gautom, R. 1997. Rapid PFGE protocol for typing of *E. coli* O157:H7 and other gram negative organism in one day. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2977-2980.
 21. Cruchaga, S., Echeita A., Aladuena A., Garcina-Pena J., Frias N., and Usera M.A. in 1998. Antimicrobial resistance in *Salmonella* from humen, food and animals in Spain *J. Antimicro. Chemother.* 47, 315-321.
 22. Jung B. Y., Park K. M., and Kim B. H. 2004. Antimicrobial susceptibility patterns of *Salmonella Typhimurium* isolated from diseased pigs. *Kor. J. Vet. Pub. Hlth.* 28(2), 109-211.
 23. Adrine, P.V., C.J. Thomson, K.P. Klugman, and S.G.B. Amyes. 2000. New gene cassette for trimethoprim resistance, dfr13, and streptomycin-spectinomycin resistance, aadA4, inserted on a class I integron. *Antimicrobe. Agent Chemother.* 44, 355-361.
 24. Bito, A., and M. Susani. 1994. Revised analysis of aadA2 gene of plasmid PSa. *Antimicrobe. Agent Chemother.* 38, 1172-1175.
 25. Peters, E.D., M.A. Leverstein, A.T.A. Box, J. Verhoef, and A.C. Fluit. 2001. Novel gene cassette and integron. *Antimicrobe. Agent Chemother.* 45, 2961-2964.
 26. Levesque, C., L. Pyche, C. Larose, and P.H. Roy. 1995. PCR mapping of integron reveal several novel combinations of resistance genes. *Antimicrobe. Agent Chemother.* 39, 185-191.
 27. H.S. Yu, J.C. Lee, H.Y. Kang, D.W. Ro, J.Y. Chung, Y.S. Jeong, S.H. Tae, C.H. Choi, E.Y. Lee, S.Y. Seol, Y.C. Lee, and D.T. Cho. 2003. Change in gene cassettes of class I integron among *Escherichia coli* isolates from urine specimen collected in Korea during the last two decades. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5429-5433.
 28. Guerra, B., S. Soto, S. Cal, and M. C. Mendoza. 2000. Antimicrobial resistance and spread of class I integron among *Salmonella* serotypes. *Antimicrobe. Agent Chemother.* 44, 2166-2169.
 29. Borch E., Nesbakken T., and Christensen S. 1996. Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 9-25.
 30. J.Y. Oh, H.S. Yu, S.K. Kim, S.Y. Seol, D.T. Cho, and J.C. Lee. 2003. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and integron carriage among *Shigella sonnei* isolated from southwestern Korea during epidemic period. *J. Clin. Microbiol.* 41, 421-423.
 31. Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulse-field gel electrophoresis: criteria for bacteria strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233-2239.

(Received November 29, 2005/Accepted March 24, 2006)

ABSTRACT: Structural Analysis of Class I Integron Gene Cassette and Assessment of Genetic Relationships by PFGE of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolated in Gyeongbuk Area

Chang-Kyu Sohn*, Jung-A Lee¹, Do-Young Lee, Wan Hun, and Jung-Kyo Jung (Microbiology Section, Gyeongsangbuk-Do Health and Environment Institute, Daegu 702-702, Korea, ¹Gyeongbuk Veterinary Service Laboratory, Daegu 702-210, Korea)

Thirty five *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains were isolated from diarrheic patients and pigs in Gyeongbuk area from 2003 to 2004. All 35 strains (17 strains from diarrheic patients and 18 from pigs) were resistant to more than one drug and most of strains isolated from pigs were resistant to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole-trimethoprim, tetracyclin and nalidixic acid. Each isolate was also screened for the presence of class I, II and III integron gene cassettes. Among 35 strains, 3 out of 17 strains isolated from diarrheic patients, carried dhfrX-orfF-aadA2 integron gene cassette and among 18 strains isolated from diseased pigs, 11 strains carried dhfrX-orfF-aadA2 integron gene cassette and 1 strain carried aadA2 integron only. But any class II and class III integron gene cassette were not detected in 35 strains. Thirty five strains were divided by five pulsotypes. Thirty one strains out of thirty five were pulsotype A. Among the remaining 4 strains, one each strain belonged to pulsotype B, C, D and pulsotype E. This data of pulsotypes showed that the widespread of pulsotype A, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in human and pigs in Gyeongbuk area may have been caused by the dissemination of a few epidemic strains in this area. Thirteen strains contain dhfrX-orfF-aadA2 integron gene cassette showed pulsotype A and one strain contains dhfrX-orfF-aadA2 integron gene cassette showed pulsotype B. One strain contains aadA2 integron showed pulsotype E. But fifteen strains do not contain any integron showed pulsotype A.