

인천지역 닭 도축장에서 분리된 *Salmonella* spp.의 항생제 내성 및 PFGE 패턴분석

양하영* · 이성모 · 박은정 · 김정희 · 이정구

인천광역시보건환경연구원

(접수 2009. 12. 1, 게재승인 2009. 12. 23)

Analysis of antimicrobial resistance and PFGE patterns of *Salmonella* spp. isolated from chickens at slaughterhouse in Incheon area

Ha-Young Yang*, Sung-Mo Lee, Eun-Jeong Park, Jung-Hee Kim, Jung-Goo Lee

Incheon Metropolitan City Institute of Health & Environment, Incheon 400-102, Korea

(Received 1 December 2009, accepted in revised form 23 December 2009)

Abstract

Salmonella spp. are the important pathogens both economically and clinically in animals as well as human. Some of them have highly zoonotic potentials even though they are asymptomatic in animals. Therefore, the prevalence of *Salmonella* spp. in animals is highly concerned for human health. The present study was carried out to investigate the prevalence, antimicrobial resistance and PFGE patterns of *Salmonella* spp. isolated from chickens at slaughterhouse in Incheon area. The overall isolation rate of *Salmonella* spp. from cloaca and cecum specimens was 7.3 % (37/510). Thirty seven isolates of *Salmonella* spp. were identified to 5 serotypes; *S. Enteritidis*, *S. Newport*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, and *S. Derby* with prevalence of 46.0%, 40.5%, 8.1%, 2.7%, and 2.7%, respectively. Resistance to nalidixic acid was found in 97.3% of *Salmonella* spp. isolated, followed by streptomycin (16.2%), tetracycline (16.2%), ampicillin (5.4%). Only 6 isolates (16.2%) showed resistance to more than two antimicrobials. In PFGE analysis of chicken and human isolates with *Xba* I, *S. Enteritidis* isolates from chicken showed very high similarity over 82.8% and also the similarity was very high in the comparison with human isolates. However, the higher similarity (100%) was observed among chicken isolates of *S. Typhimurium*. These results suggest the close genetic relatedness of *Salmonella* spp. isolated from chickens with human.

Key words : *Salmonella* spp, PFGE, Antimicrobial resistance, Chicken

서 론

Salmonella 속균은 1885년 미국의 의사인 Daniel Elmer Salmon이 돼지에서 *S. Cholerasuis*를 처음 분리, 보고한 후 현재까지 약 2,500여종의 혈청형이 동정 보

고되었으며, 장내세균 중 유일하게 O항원 및 2가지 형태의 H항원(phase 1, 2)을 가지는 세균이다. *Salmonella* 속균은 크게 *S. enterica*와 *S. bongori* 두가지 종으로 분류되고 *S. enterica*는 다시 6개의 subspecies로 나뉘는데 이 중 subspecies I에 전체 혈청형의 60%가 속한다 (FDA/CFSAN, 2008; 질병관리본부, 2007).

Salmonella 속균은 가축 및 사람에서 중요한 병원체

*Corresponding author: Ha-Young Yang, Tel. +82-32-440-5573,
Fax. +82-32-440-5582, E-mail. hayone@korea.kr

로 작용하며 가금에서는 *S. Pullorum*에 의한 추백리, *S. Gallinarum*에 의한 가금티푸스 등 경제적 질병을 일으키고, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* 등 기타 혈청형은 가금파라티푸스의 원인이 된다. 사람에서는 *S. Typhi*가 장티푸스, *S. Paratyphi*가 파라티푸스를, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg* 등의 기타 *Salmonella* 속균이 살모넬라 감염증, 즉 식중독을 일으키는데 면역이 저하된 사람은 치명적 위험을 야기하기도 하여 공중보건학적으로도 매우 중요한 병원체이다(Gast와 Beard, 1990; David, 2004). 살모넬라 감염증은 미국과 유럽에서 수인성 식품매개질환 중 가장 많은 부분을 차지하였고(Michael 등, 2006; European Food Safety Authority, 2007) 우리나라는 2008년 기준 수인성 식품매개질환 중 노로바이러스에 이어 두 번째로 많이 발생하였으며(질병관리본부, 2009b) *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium* 등은 도축장, 농장 및 야생의 가금에서 계속 분리되고 있다(김 등, 2003; 성 등, 2002; 우 등, 2000; 윤 등, 2003).

한편 축산농가에서 발육촉진, 질병관리를 위해 배합 사료 및 음수에 사용하는 항생제의 양이 많아지면서 항생제 오·남용이 문제가 되고 있는 가운데(박 등, 2003; FDA, 2003) 미국, 일본 등 선진국에서는 국가차원의 체계적인 항생제 모니터링 사업이 수행되고 있으며(NARMS, 2003; National Veterinary Assay Laboratory, 2003), 국내에서도 2003년 식약청 주관의 “국가 항생제 안전관리사업” 및 2008년 농림수산식품부 주관의 “축산 항생제 내성균 감시체계 구축 사업”이 시작(이 등, 2005; 정 등, 2007)되어 현재 시·도 축산물 위생검사기관에서 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA), vancomycin resistant *Enterococci* (VRE), *S. Typhimurium* DT104 등 주요 내성균을 모니터링 하기 위한 검사가 진행되고 있다.

근래에 사람이나 가축에서 세균성 전염병이나 식중독 등의 감염병이 유행 시 역학적 원인을 찾기 위하여 plasmid analysis, phage typing, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) 등의 분자유전학적 방법들을 사용하고 있으며 특히 *Salmonella* 속균의 경우 혈청형 이하 유전자 수준의 molecular typing (DNA fingerprinting) 방법으로 PFGE가 가장 널리 사용되고 있다(Garaizar 등, 2000; Tenover, 1997; 김 등, 2001a). PFGE는 유전자 분석을 통해 감염병의 감염경로를 추적하여 초기에 유행을 인지하고 확산을 방지하는데 유용하게 사용되

고 있으며 PFGE와 관련하여 PulseNet이란 명칭으로 세계적인 네트워크를 구축하여 국가간 감염질환에 대한 정보를 교류하고 있다(질병관리본부, 2009a).

본 연구에서는 인천지역 닭 도축장에서 도축되는 닭 유래의 *Salmonella* spp.의 검출을 및 항생제 내성 패턴을 분석하여 HACCP관리에 활용하고자 하였고 사람과 닭 유래의 *S. Enteritidis* 및 *S. Typhimurium*에 대한 PFGE 패턴을 비교·분석하여 *Salmonella* 속균의 역학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

시료 채취

2008년 3월부터 10월까지 인천 관내 닭 도축장에 출하된 닭을 대상으로 총배설장 swab 및 맹장 각 255건씩 510건을 시료로 사용하였다. 총배설장 swab은 buffered peptone water (BPW) 수송배지인 E. swab (3M, USA)을 사용, 계류장에서 임의 채취하였고 맹장은 내장검사대에서 임의로 적출, 실험실로 이송하여 그 내용물을 무균적으로 채취하였다.

균 분리·동정

균 분리·동정은 축산물의 가공기준 및 성분규격의 규정에 따라서 실시하였다(국립수의과학검역원, 2008). 즉, 채취한 E. swab은 바로 37°C에서 24시간 배양하였고 맹장내용물은 BPW (BD, USA)에 첨가하여 역시 37°C 24시간 배양하였다. 이후 증균배지인 Tetrathionate (TT) broth (Oxoid, UK), Rappaport vassiliadis (RV) broth (Merck, Germany) 및 선택배지인 Xylose lysine desoxychocolate (XLD) agar (Merck, Germany), Rambach agar (CHROMagar, France)에 배양, 선택배지에서 전형적인 집락을 선택하여 Tryptic soy agar (TSA, Merck, Germany)에 순수배양하고 Triple sugar iron (TSI, Merck, Germany) 사면배지에 천자배양, MUCAP test 등 추가 생화학시험을 실시하였다.

Salmonella 속균으로 의심되는 시료에 대해 VITEK 2 Compact (BioMérieux, France)를 이용하여 균을 동정함과 동시에 *Salmonella* spp. real-time PCR Kit (Kogene, Korea)를 사용하여 ABI PRISM 7000 Sequence Detection Systems (AB, USA) 상에서의 증폭을 확인한 후 *Salmonella* 속균으로 최종 동정하였다.

Serotyping

최종 동정한 균주를 가지고 Ewing의 방법 및 질병관리본부의 기준에 준하여 O항원 및 H항원 결정시험을 하였으며(Ewing 등, 1986; 질병관리본부, 2007) 항혈청은 Becton, Dickinson and Company (BD, USA)의 제품을 사용하였다.

TSA에 계대한 균주를 이용하여 O항원 진단용 항혈청 그룹 Poly, A, B, C1, C2, D1, D2, E, Vi를 가지고 그룹을 결정하고 각 그룹의 single factor를 이용하여 최종 O그룹을 결정하는 슬라이드 응집반응 시험을 실시하였다.

H항원 결정을 위해 시험관 응집 반응 시험을 Phase 1과 Phase 2로 나누어 진행하였다. Phase 1 결정을 위하여 Motility GI medium (BD, USA), Veal infusion (VI) broth (Oxoid, UK)에 배양 한 후 0.6% formalized saline을 첨가하여 항원으로 사용하였으며 제조한 항원과 Spicer-Edwards (1, 2, 3, 4), L-Complex, 1-Complex, EN-Complex 등 7개의 항혈청을 이용하여 응집여부를 확인한 후 항원형을 결정하였다. Phase 2 결정을 위하여 Motility GI medium에 Phase 1에서 결정된 항원의 항혈청을 넣어 잘 교반하여 균하고 균주를 접종하여 흡수시험을 실시하였다. 흡수시험 후 더 이상 균이 자라지 않으면 실험을 종료하였고 편모가 바뀌어 아래로 자란 균은 Phase 1과 동일(Spicer-Edwards 제외)하게 실험을 수행한 후 응집여부에 따라 항원형을 판독하였다.

결정된 O항원과 H항원(Phase 1·2)을 종합한 후 Kauffmann-White scheme 및 Grimont 등(2007)의 방법에 기초하여 혈청형을 최종 확정하였다.

항생제 감수성 검사

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 검사기준과 가축 및 식육 중 항생제 내성균 검사 요령에 의한 디스크 확산법(Disc diffusion method)을 이용하여 *Salmonella* spp.의 항생제 감수성 검사를 실시하였다(CLSI, 2002; 국립수의과학검역원, 2009).

먼저 실험균주를 Tryptic soy broth (TSB, BD, USA)에 접종하고 37°C 2~8시간 동안 배양한 후 0.5 McFarland 탁도가 되도록 희석하였다. 탁도를 조정하고 Mueller-Hinton agar (MHA, pH 7.2, Merck, Germany)에 도말한 다음 sensi-disc dispenser (BD, USA)를 사용하여 억제 disc를 붙인 후 37°C 16~18시간 배

양하였다. 배양 후 disc를 포함한 억제대의 지름을 caliper를 이용하여 측정하였고 CLSI의 기준에 맞추어 해당 항균제에 대한 내성(R), 중간내성(I), 감수성(S)으로 판정하였다.

항생제 종류는 BD BBL™ sensi-disc (BD, USA)제품인 amoxicillin/clavulanic acid (AmC, 20/10µg), ampicillin (AM, 10µg), apramycin (AP, 15µg), cefepime (FEP, 30µg), ceftiofur (XNL, 30µg), cephalothin (CF, 30µg), chloramphenicol (C, 30µg), ciprofloxacin (CIP, 5µg), enrofloxacin (ENO, 5µg), florfenicol (FFC, 30µg), gentamicin (GM, 10µg), nalidixic acid (NA, 30µg), neomycin (N, 30µg), streptomycin (S, 10µg), tetracycline (TE, 30µg), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT, 1.25/23.75µg) 등 16종을 사용하였다.

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) 및 DNA band patterns 분석

분리된 *Salmonella* spp. 중에서 주요 식중독 원인균인 *S. Enteritidis* 및 *S. Typhimurium*에 대한 molecular typing을 위해 PFGE를 실시하였다. PFGE 분석은 미국 질병통제예방센터(CDC) 'PulseNet'의 *Salmonella* serotypes 실험법 및 질병관리본부 PFGE 표준실험법을 기준으로 하였다(CDC, 2004; 질병관리본부, 2008).

먼저 시험균주와 국립보건연구원에서 분양받은 marker (*Salmonella* Braenderup ATCC BAA-664주)를 TSA에 배양한 다음 Cell suspension TE buffer (100mM Tris, 100mM EDTA, pH 8.0)에 Vitek colorimeter (BioMérieux, France)를 이용하여 15~20% transmittance로 균을 희석시켰다. 이후 균현탁액, proteinase K (Qiagen, 20mg/ml Netherlands), TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)를 사용한 1.2% SeaKem gold agarose (Lonza, Switzerland)를 이용하여 plug를 제조하였다.

제조한 plug에 Cell lysis buffer(50mM Tris, 50mM EDTA, pH 8.0+1% sodium-lauroylsarcosine)와 proteinase K (20mg/ml)를 첨가하여 반응 시킨 후 멸균증류수 및 plug wash TE buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0)를 이용하여 세척을 하였다.

이후 plug를 1~2mm로 절단하여 사용자지침에 따라 처리한 *Xba* I (40U, Roche, Germany) 반응액에 옮겨 반응시킨 후 반응액을 제거하고 TE buffer를 분주하여 보관하였다.

제한효소 처리한 plug slices를 comb에 올려 놓고 0.5X TBE buffer를 사용한 1.0% SeaKem gold agarose를 분주하여 굳힌 후 CHEF Mapper XA System (BIO-RAD, USA)의 chamber에 0.5X TBE buffer를 채우고 Two-State, 6V/cm, 120°, 14°C, switch time 2.16~63.8초의 조건으로 19시간 동안 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 ethidium bromide (0.5µg/ml)로 30분간 염색하고 멸균증류수로 20분 동안 탈색하였다.

BioDocAnalyze (Biometra, Germany)로 gel을 촬영하였고 Fingerprinting II Informatix software (BIO-RAD, USA)를 이용하여 유전적 유사성(Similarity Coefficient)을 분석하였다. 개별 DNA band의 분자량은 marker의 분자량에 기초하여 normalization하였고 DNA band의 위치 허용범위(tolerance)는 1%를 적용하였다. 균주 간 유전적 상관관계는 DNA band 형태를 기초로 한 dice방식으로 분석하였고 clustering 적용은 UPGMA (Unweighted pair group method of arithmetic averages)의 형식으로 PFGE profile을 분류하였다.

결 과

인천 지역 닭 도축장 출하 닭에서의 살모넬라 검출율

2008년 3월부터 10월까지 인천 관내 닭 도축장에 출하된 닭을 대상으로 510건(49농가)을 검사한 결과 총 12농가(24.5%) 37건(7.3%)에서 *Salmonella* spp.가 검

Table 1. Isolation rates of *Salmonella* spp. by organs

Organs	No. of farms		No. of samples	
	Tested (%)	Isolates (%)	Tested (%)	Isolates (%)
Cloaca			255	15
	49 (100.0)	12 (24.5)	(50.0)	(5.9)
Cecum			255	22
			(50.0)	(8.6)
Total	49 (100.0)	12 (24.5)	510 (100.0)	37 (7.3)

Table 2. Isolation rates of *Salmonella* spp. by chicken breeds

Breeds	No. of farms		No. of samples	
	Tested (%)	Isolates (%)	Tested (%)	Isolates (%)
Broiler	19 (38.8)	7 (36.8)	200 (39.2)	20 (10.0)
	30 (61.2)	5 (16.7)	310 (60.8)	17 (5.5)
Dual-purpose	49 (100.0)	12 (24.5)	510 (100.0)	37 (7.3)

출되었고 총배설장에서 15주(5.9%), 맹장에서 22주(8.6%)가 분리되어 총배설장보다 맹장에서 높은 검출율을 나타냈다(Table 1).

품종별로 삼계, 육계 등 broiler(육용종)에서 20주(10.0%), 토종닭 등 dual purpose(난육겸용종)에서 17주(5.5%)가 검출되어 broiler에서 다소 높은 검출율을 보였다(Table 2).

살모넬라 혈청형의 분포

37주의 *Salmonella* 분리주에 대한 serotyping 결과 *S. Enteritidis* 17주(46.0%), *S. Newport* 15주(40.5%), *S. Typhimurium* 3주(8.1%), *S. Derby* 1주(2.7%), *S. Gallinarum* 1주(2.7%)의 순으로 조사되었으며(Table 3), 한 농장에서 하나 이상의 혈청형이 분리되는 경우도 있었다. 각 분리주에 대한 항혈청 검사 결과 및 혈청형은 Table 4와 같다.

항생제 감수성

항생제 감수성 시험 결과는 Table 5와 같다. Nalidixic acid의 경우 36주(97.3%)에서 내성을 나타냈으며 streptomycin과 tetracycline이 각 6주(16.2%), ampicillin이 2주(5.4%)에서 내성을 보였다. 상기 4종의 항생제 외에는 내성을 나타내는 종류는 없었으나 ceftiofur의 경우 18주(48.6%)에서 중간내성을 나타냈다.

균주별 내성을 나타낸 항생제 종류를 보면 *S. Typhimurium*이 streptomycin, tetracycline, nalidixic acid 등 3종, *S. Derby*가 streptomycin, tetracycline 등 2종, *S. Newport* 및 *S. Gallinarum*이 nalidixic acid 1종, *S. Enteritidis*가 ampicillin, streptomycin, tetracycline, nalidixic acid 등 4종인 것으로 나타났다(Table 6).

한 가지 약제에 내성을 보인 균주가 31주(83.8%), 2개 이상의 약제에 내성을 보인 균주가 6주(16.2%)로 나타났으며 균주별 내성패턴을 분석한 결과 NA 단일 내성 패턴은 *S. Newport*, *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis*, S-TE 2제내성 패턴은 *S. Derby*, S-TE-NA 3제내성 패

Table 3. Serotypes of *Salmonella* spp. isolated from chickens

Groups	Serotypes	No. of farms (%)	No. of isolates (%)
B	Typhimurium	2 (13.3)	3 (8.1)
	Derby	1 (6.7)	1 (2.7)
C1	Newport	3(20.0)	15 (40.5)
D1	Gallinarum	1(6.7)	1 (2.7)
	Enteritidis	8 (53.3)	17 (46.0)
Total		15 (100.0)	37 (100.0)

Table 4. Individual serotypes of *Salmonella* spp. isolated from chickens

Serial No.	Samples			O Antigen		H Antigen				Phase2 results	Sorotypes
	Dates	Breeds	Organs	Groups	Phase1						
					Spicer-Edwards				Results		
				1	2	3	4				
1	3/12	Broiler	Cloaca	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
2	3/12	Broiler	Cloaca	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
3	3/12	Broiler	Cloaca	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
4	3/12	Broiler	Cecum	B	+				i	1 (1, 2)	Typhimurium
5	3/12	Broiler	Cecum	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
6	3/12	Broiler	Cecum	B	+				i	1 (1, 2)	Typhimurium
7	3/12	Dual purpose	Cecum	B	+				i	1 (1, 2)	Typhimurium
8	4/14	Broiler	Cecum	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
9	5/6	Broiler	Cloaca	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
10	6/2	Dual purpose	Cecum	B	+			+	G (f, g)	-	Derby
11	6/30	Dual purpose	Cloaca	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
12	6/30	Dual purpose	Cloaca	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
13	6/30	Dual purpose	Cloaca	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
14	6/30	Dual purpose	Cloaca	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
15	6/30	Dual purpose	Cloaca	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
16	6/30	Dual purpose	Cloaca	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
17	6/30	Dual purpose	Cloaca	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
18	6/30	Dual purpose	Cloaca	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
19	6/30	Dual purpose	Cloaca	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
20	6/30	Dual purpose	Cecum	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
21	6/30	Dual purpose	Cecum	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
22	6/30	Dual purpose	Cecum	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
23	6/30	Dual purpose	Cecum	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
24	6/30	Dual purpose	Cecum	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
25	6/30	Broiler	Cecum	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
26	7/14	Broiler	Cecum	D1					-	-	Gallinarum
27	7/14	Broiler	Cecum	C2	+		+		eh	1 (1, 2)	Newport
28	7/14	Broiler	Cecum	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
29	7/14	Broiler	Cloaca	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
30	7/14	Broiler	Cloaca	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
31	7/14	Broiler	Cecum	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
32	7/14	Broiler	Cecum	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
33	7/14	Broiler	Cecum	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
34	7/14	Broiler	Cecum	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
35	7/14	Broiler	Cecum	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
36	7/14	Dual purpose	Cecum	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis
37	9/29	Broiler	Cecum	D1	+			+	G (g, m)	-	Enteritidis

턴은 *S. Typhimurium*, AM-S-TE-NA 4제내성 패턴은 *S. Enteritidis*에서 나타났다. 이와 같이 *S. Enteritidis*를 제외하고 균주별로 1가지 내성패턴을 보였으며 *S. Enteritidis*도 2가지 내성패턴을 보여 균주별로 거의 일정한 내성패턴을 가지는 것으로 조사되었다(Table 7).

PFGE를 이용한 닭 및 사람 유래 *Salmonella* spp. 분리주의 비교

본 연구에서 검출된 *S. Enteritidis* 17주, *S. Typhimurium* 3주와 2009년 사람에서 분리한 *S. Enteritidis* 5주, *S. Typhimurium* 5주를 제한효소 *Xba* I으로 처리한 후 PFGE 분석 결과는 각각 Fig. 1, 2와 같다.

S. Enteritidis band patterns 분석

17주의 *S. Enteritidis*를 분석한 결과 15~1,200kb에서 13~16개의 band를 보였으며, 총 8개의 유전형으로 구분이 되었다. 유전적 유사성은 100.0~82.8%로 대부분 균주가 유전적·역학적 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 또한, 사람 유래의 5주를 추가하여 분석한 결과 총 10개의 유전형으로 구분이 되었으며 100.0~80.0% 유전적 유사성을 보여 사람 유래의 *S. Enteritidis*도 닭 유래의 균주들과 상당한 유사성을 가진 것으로 나타났다(Fig. 3).

Table 5. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* spp. isolated from chickens (n=37)

Antimicrobials	No. of isolates (%)		
	Resistant	Intermediate	Susceptible
Ampicillin	2 (5.4)	0 (0.0)	35 (94.6)
Amoxicillin/clavulanic acid	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (100.0)
Cephalothin	0 (0.0)	2 (5.4)	35 (94.6)
Cefepime	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (100.0)
Ceftiofur	0 (0.0)	18 (48.6)	19 (51.4)
Gentamicin	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (100.0)
Apramycin	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (100.0)
Neomycin	0 (0.0)	1 (2.7)	36 (97.3)
Streptomycin	6 (16.2)	3 (8.1)	28 (75.7)
Tetracycline	6 (16.2)	0 (0.0)	31 (83.8)
Ciprofloxacin	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (100.0)
Enrofloxacin	0 (0.0)	4 (10.8)	33 (89.2)
Nalidixic acid	36 (97.3)	0 (0.0)	1 (2.7)
Trimethoprim/sulfamethoxazole	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (100.0)
Chloramphenicol	0 (0.0)	0 (0.0)	37 (100.0)
Florfenico	10 (0.0)	0 (0.0)	37 (100.0)

Table 6. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from chickens

Serotypes	No. of isolates	No. of resistant isolates															
		AM	AmC	CF	FEP	XNL	GM	AP	N	S	TE	CIP	ENO	NA	C	SXT	FFC
Typhimurium	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	3	0	0	
Derby	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
Newport	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	
Gallinarum	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
Enteritidis	17	2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	17	0	0	
Total	37	2	0	0	0	0	0	0	0	6	6	0	0	36	0	0	

AM: ampicillin, AmC: amoxicillin/clavulanic acid, CF: cephalothin, FEP: cefepime, XNL: ceftiofur, GM: gentamicin, N: neomycin, AP: apramycin, S: streptomycin, TE: tetracycline, CIP: ciprofloxacin, ENO: enrofloxacin, NA: nalidixic acid, C: chloramphenicol, SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole, FFC: florfenicol

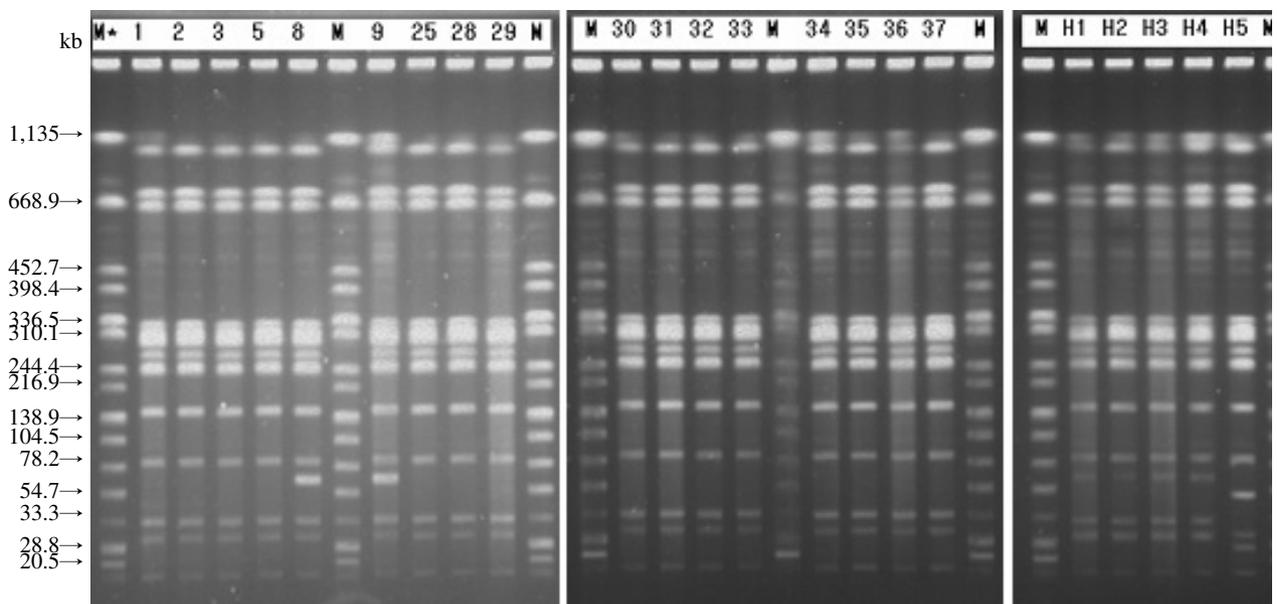
**Fig. 1.** PFGE profiles of *S. Enteritidis* isolated from chickens and human after digestion with *Xba* I. Lane M: marker (*S. Braenderup*), Each number in lanes indicated the isolate numbers from chickens and H1 to H5 from human.

Table 7. Antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* spp. isolated from chickens

Patterns	Serotypes					Subtotal (%)
	Typhimurium	Derby	Newport	Gallinarum	Enteritidis	
NA (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	15 (100.0)	1 (100.0)	15 (88.2)	31 (83.8)
S-TE (%)	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.7)
S-TE-NA (%)	3 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (8.1)
AM-S-TE-NA (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (11.8)	2 (5.4)
Total (%)	3 (100.0)	1 (100.0)	15 (100.0)	1 (100.0)	17 (100.0)	37 (100.0)

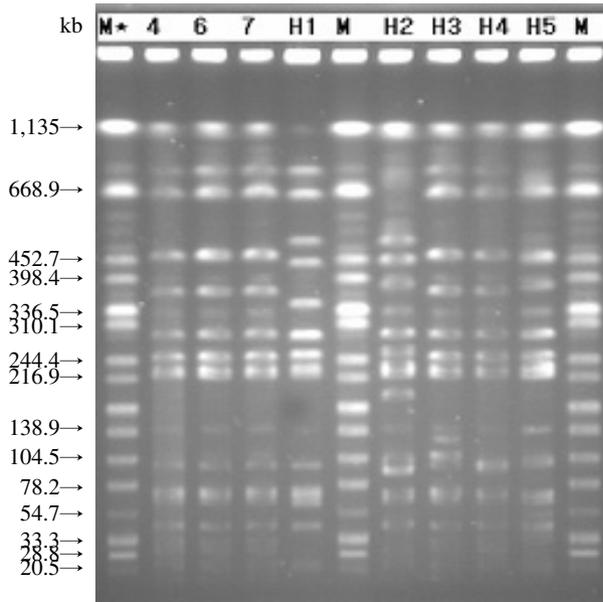


Fig. 2. PFGE profiles of *S. Typhimurium* isolated from chickens and human after digestion with *Xba* I. Lane M: marker (*S. Braenderup*). Each number in lanes indicated the isolate numbers from chicken and H1 to H5 from human.

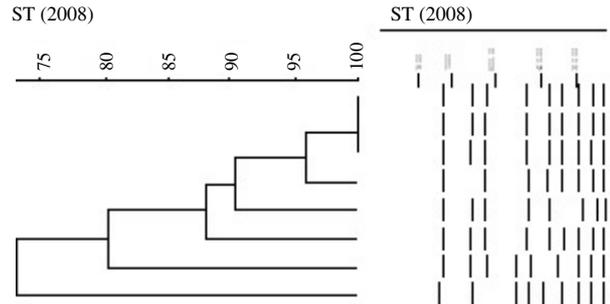


Fig. 4. Relatedness of *S. Typhimurium* isolated from chickens and human by PFGE analysis with *Xba* I.

S. Typhimurium band patterns 분석

3주의 닭 유래 *S. Typhimurium*과 5주의 사람 유래 *S. Typhimurium*을 분석한 결과 15~1,200kb에서 11~13개의 band를 가지는 총 6개의 유전형으로 구분이 되었다. 유전적 유사성은 100.0~69.2%로 나타났으며 닭 유래의 *S. Typhimurium* 3주는 100% 일치하였고 사람 유래의 *S. Typhimurium*은 각기 다른 5개의 유전형으로 분리되었으나 이중 4주는 닭 유래의 *S. Typhimurium*과 80% 이상의 유전적 유사성을 보였다(Fig. 4).

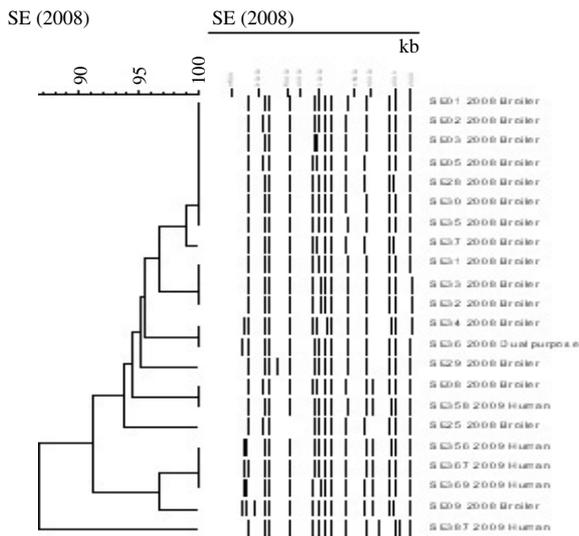


Fig. 3. Relatedness of *S. Enteritidis* isolated from chickens and human by PFGE analysis with *Xba* I.

고 찰

현재 국내에서 양계농장이 의무적으로 HACCP 인증을 받아야 하는 것은 아니지만, 산란계 및 육계농장이 HACCP 적용 농장으로 인증받기 위해서는 사육시설 점검, HACCP 계획서 개발, 관리기준의 작성 및 검증 등 여러 까다로운 선행 조건을 만족해야 하는데 *S. Enteritidis*의 경우 HACCP 위해요소인 동시에 식중독 원인균으로서 농장 환경에서 검출되어서는 안되며 초생추 입추 및 성계 출하 시 가축방역기관에 검사를 받도록 되어있다. *S. Pullorum*, *S. Gallinarum*, *S. Typhimurium* 역시 HACCP 적용농장의 관리 대상에 들어가

며 HACCP팀장, 관리수의사 및 가축방역기관과의 긴밀한 협조가 필요한 원인체이다(축산물 HACCP기준원, 2009a; 축산물 HACCP 기준원, 2009b). 이렇듯 *Salmonella* spp.는 농장의 HACCP 인증과 관련하여 매우 중요한 원인체이며 HACCP 인증을 떠나서라도 농장 및 식육의 위생관리를 위해서는 검출되지 말아야 할 병원체이므로 체계적인 검사와 관리가 이루어져야 한다.

국내 *Salmonella* spp.의 농장 및 도축장 감염실태 조사는 그동안 꾸준히 이루어져 왔으며 앞으로도 가축전염병의 차단방역 및 사람의 식중독 발생 양상 분석을 위해서 계속 실시할 필요가 있다. 또한, 유행양상과 분리 혈청형 등은 다소 차이가 있지만 현재는 글로벌 시대인 만큼 외국의 *Salmonella* spp.의 동향에 대해서도 지속적인 관심을 기울여야 할 것이다.

본 연구에서 양계 농장의 *Salmonella* spp. 감염율의 경우 김 등(2001b)의 연구와는 비슷하였고 우 등(2000)의 보고보다는 낮았다. 가금분변 관련 시료에서의 *Salmonella* spp. 검출율은 김 등(2002), 윤 등(2003)의 보고와는 유사하였으나, 황 등(2004), 성 등(2002), 김과 탁(1998), 이 등(2005), 우 등(2000), 김 등(2001b)의 국내 보고와는 차이가 있었다. 닭 품종별 검출율에서도 Broiler의 경우, 이 등(2005), 우 등(2000)의 국내 다른 보고와 다소간의 차이가 있었다.

유럽, 일본, 미국 등의 보고를 보면 식중독과 관련하여 *S. Enteritidis*가 가장 유행하고 있고(Henzler 등, 1994; Mitarai와 Yoshitake, 1995; Poppe 등, 1992; Rodrigue, 1990) 이번 연구결과에서도 *S. Enteritidis*, *S. Newport*, *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Gallinarum* 등 5종의 혈청형 중 *S. Enteritidis*가 46%로 가장 많이 검출되었다. 다른 연구자의 보고(김 등, 2003; 성 등, 2002; 우 등, 2000; 이 등, 2007; 정 등, 2007; 황 등, 2004)에서도 검출율의 차이는 보였지만 *S. Enteritidis*가 가장 많이 분리되어 우리나라에서도 유행하는 혈청형인 것을 알 수 있었다. 한편 김과 탁(1998)의 연구에서는 *Salmonella* Kentucky가 36.0%, 이 등(2005), 김 등(2001b)은 *S. Gallinarum*이 57.1%, 33.9%로 보고되어 본 연구와는 차이가 있었다.

Salmonella spp.의 내성양상은 크게 높지 않았다. 1세대 quinolone계열인 nalidixic acid (NA)에서 97.3%, aminoglycosides계열인 streptomycin (S)에서 16.2%, tetracycline계열의 tetracycline (TE)에서 16.2%, penicillin계열의 ampicillin (AM)에서 5.4%가 내성을 나타

내어 NA에서는 아주 높은 내성을 보였고 S와 TE에서도 약간의 내성도를 나타냈다. Cephalosporin계열 항생제에서의 내성양상은 없었으며 1세대 quinolone계열에서는 높은 내성을 보인 반면 2세대 quinolone이상의 계열(ciprofloxacin, enrofloxacin)에서의 내성양상은 없었다. 닭과 관련한 국내의 내성도 조사에서 성 등(2002)은 NA (56.9%), AM (38.9%), S (34.7%), TE (27.8%), carbenicillin (CB, 27.8%), 정 등(2007)은 S (42.7%), TE (41.3%), AM (12.0%), 이 등(2005)은 erythromycin (E, 64.3%), S (57.1%), TE (57.1%), AM (50.0%), 박 등(1994)은 S (67.0%), TE (33.0%), CB (19.0%), 이 등(2007)은 penicillin (P, 91.7%), S (37.5%), TE (37.5%), AM (25.0%)에서 높은 내성양상을 보고해 본 연구와 양상은 비슷하나 비율 및 약제종류에 있어서는 다소 차이를 보였으며 공통적으로 S와 TE에 비교적 높은 내성을 보였다. 이는 현재 농장에서 광범위 항생제인 S와 TE를 많이 사용하고 있음을 보여주는 예이며 항생제 오·남용에 관한 홍보 및 지도가 필요하다고 하겠다.

이번 조사에서는 문제 내성균인 *S. Typhimurium* DT104 5제 내성(AM-C-S-TE-SXT)균은 없었으며 패턴양상을 보면 NA 단일 내성 83.8%, S-TE-NA 3제 내성 8.1%, AM-S-TE-NA 4제 내성 5.4%, S-TE 2제 내성 2.7% 순의 양상을 보였다. 한편 다른 연구와의 내성 패턴 양상 비교는 검사약제와 검사 대상 불일치 등의 이유로 비교하기가 어려웠다.

PFGE의 분석에 있어서 DNA band의 위치 허용범위를 1%로 적용하여 보다 세밀한 분석을 하였으며 다양한 제한효소를 이용하여 PFGE 분석을 실시할 수 있으나, 본 연구에서는 *Xba* I을 이용하여 처리하였다. *S. Enteritidis*의 경우 15~1,200kb에서 13~16개의 band를, *S. Typhimurium*의 경우 15~1,200kb에서 11~13개의 band를 보였으며 이는 김 등(2001a)의 결과와 유사했다. 유전적 유사성에 있어서 *S. Enteritidis*는 사람 유래 포함하여 100.0~80.0% 유사성을 나타내 이번 연구 결과만으로 추정하건데 전국적으로 일정한 유행 양상을 보이는 것을 알 수 있었다. *S. Typhimurium*는 닭 유래의 분리주의 경우 100% 일치한 것으로 보아 근원이 같은 것으로 추정되고 사람 유래의 경우도 5주 중 4주는 닭 유래의 것과 80% 이상의 유사성을 보여 역시 비슷한 유행양상을 가진 것으로 분석됐다.

PFGE는 현재 질병관리본부의 식중독의 역학조사에 매우 유용하게 사용(질병관리본부, 2009)되고 있으며

식중독 유행 양상 판단에 있어서도 좋은 수단으로 여겨지고 있다. 문제는 PFGE 자료 축적인 바 *S. Enteritidis* 및 *S. Typhimurium*은 앞서 말해 왔듯이 사람의 식중독 원인균이기 때문에 가금이나 기타 경제 가축에서 분리되는 *S. Enteritidis* 및 *S. Typhimurium*에 대해서 꾸준한 PFGE 분석을 통하여 식중독 유행 양상에 지표로 사용되어야 할 것이다.

끝으로 본 연구를 진행하면서 *Salmonella* spp. 및 기타 세균의 연구에 있어서 농가 지도 및 정보 공유를 위해 항생제 감수성 검사 약제 통일, PFGE 검사법 및 분석법의 표준화 등이 필요하다는 것을 깨달았으며 또한 이를 위해서는 상위기관 및 지방 가축방역기관(축산물 위생검사기관)의 상호 협조체계 아래 많은 정보의 교류가 필요할 것이다. 현재 진행되고 있는 축산항생제 내성균 검사 등을 통해 검사법의 표준화가 이루어지길 바라며 이를 통해 보다 많은 연구 결과가 축적되어 수의학분야의 발전에 이바지했으면 하는 바람이다.

결 론

2008년 3월부터 10월까지 인천 관내 닭 도축장에 출하된 닭의 총배설장 swab 및 맹장내용물을 채취하여 *Salmonella* spp.의 검출율, serotypes, 항생제 내성도, PFGE 패턴을 분석한 결과는 다음과 같다.

1. 총 49농가 510건을 검사한 결과 12농가(24.5%) 37건(7.3%)에서 *Salmonella* spp.가 검출되었고 맹장에서 22주(8.6%), 총배설장에서 15주(5.9%)가 분리되었다.

2. 37주의 *Salmonella* 분리주에 대한 serotyping 결과 *S. Enteritidis* 17주(46.0%), *S. Newport* 15주(40.5%), *S. Typhimurium* 3주(8.1%), *S. Derby* 1주(2.7%), *S. Gallinarum* 1주(2.7%)의 순으로 조사되었다.

3. 항생제 감수성 시험 결과 nalidixic acid의 경우 36주(97.3%)에서 내성을 나타냈으며 streptomycin과 tetracycline이 각 6주(16.2%), ampicillin이 2주(5.4%)에서 내성을 보였다. 또한, 내성패턴을 분석한 결과 NA 단일내성 패턴은 *S. Newport*, *S. Gallinarum*, *S. Enteritidis*에서, S-TE 2제내성 패턴은 *S. Derby*에서, S-TE-NA 3제내성 패턴은 *S. Typhimurium*에서, AM-S-TE-NA 4제내성 패턴은 *S. Enteritidis*에서 나타났다.

4. *Xba* I을 제한효소로 사용하여 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*에 대한 PFGE를 실시한 결과 22주(닭 17

주, 사람 5주)의 *S. Enteritidis*는 13~16개의 band를 가진 총 10개의 유전형으로 구분이 되었으며 100.0~80.0% 유전적 유사성을 보여 사람 유래의 *S. Enteritidis*도 닭 유래의 균주들과 상당한 유사성을 가진 것으로 나타났다. 또한, *S. Typhimurium*의 경우 8주(닭 3주, 사람 5주)를 분석한 결과 11~13개의 밴드를 가지는 총 6개의 유전형으로 구분이 되었다. 유전적 유사성은 100.0~69.2%로 나타났으며 닭 유래의 *S. Typhimurium* 3주는 100% 일치하였고 사람 유래의 *S. Typhimurium*은 각기 다른 5개의 유전형으로 분리되었으나 이중 4주는 닭 유래의 *S. Typhimurium*과 80% 이상의 유전적 유사성을 보였다.

이상의 결과로 닭 및 사람 유래의 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*의 경우 각각 유전적 연관성이 매우 높았으며 또한 전국적으로 일정한 유행양상을 보이는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 국립수의과학검역원. 2009. 가축 및 식육 중 항생제 내성균 검사요령.
- 국립수의과학검역원. 2008. 축산물의 가공기준 및 성분규격.
- 김규태, 김정화, 우정희, 장영술, 김대원, 김봉환. 2002. 경북서부지방 가축에서 분리된 *Salmonella* 속균의 생물화학적 특성 및 혈청형. 한국가축위생학회지 25(3): 259-273.
- 김규태, 정병렬, 김봉환. 2003. 경북지역 가축에서 분리한 *Salmonella* 속균의 혈청형 분포 및 약제 감수성. 한국수의공중보건학회지 27(1): 47-52.
- 김능희, 탁연빈. 1998. 대구지역 도계장에서 처리된 도계육의 *Salmonella* 오염에 관하여. 한국수의공중보건학회지 22(4): 365-372.
- 김상윤, 이희무, 김신, 홍현표, 권현일. 2001a. 경북지역 가축에서 분리된 *Salmonella* Typhimurium과 *S. Enteritidis*의 phage typing 및 pulsed-field gel electrophoresis. 한국가축위생학회지 24(3): 243-253.
- 김상윤, 이희무, 김신, 홍현표, 권현일. 2001b. 경북지역 가축에서 *Salmonella*속 균 감염증에 대한 역학적 특성. 한국가축위생학회지 24(1): 51-68.
- 박경윤, 예재길, 박석기. 1994. 가금류에서 분리한 *Salmonella*속균의 특성. 한국수의공중보건학회지 18: 107-116.
- 박종명, 정석찬, 신형철, 하준일, 홍기성, 송시욱, 민영식, 이기욱, 임경중. 2003. 축산 및 수산분야의 항생물질 사용실태 조사. 한국수의공중보건학회지 27(4): 205-217.
- 성명숙, 김기석, 탁연빈. 2002. 도계과정에서의 *Salmonella*

- 속 균의 오염에 대하여. 한국수의공중보건학회지 26(3): 195-205.
- 우용구, 이희수, 이영주, 강민수, 김봉환, 김재학. 2000. 우리나라의 가금과 환경에서 분리한 *Salmonella* species의 특성. 대한수의학회지 40(3): 505-514.
- 윤가리, 이영주, 김기석, 탁연빈. 2003. 대구지역 야생조류로부터 분리한 *Salmonella*속 균의 생물화학적 특성과 Plasmid Profile. 한국수의공중보건학회지 27(2): 59-67.
- 이영주, 김애란, 정석찬, 송시욱, 김재홍. 2005. 닭 분변유래 *E. coli* 및 *Salmonella* spp.의 항생제 내성패턴. 대한수의학회지 45(1): 75-83.
- 이호원, 홍종해, 정병열. 2007. 닭 도체에서 분리한 *Salmonella* spp.의 특성 분석. 한국가축위생학회지 30(3): 339-351.
- 정석찬, 송시욱, 김성일, 정명은, 김계희, 이지연, 임숙경. 2007. 국내 도축장에서 분리한 세균의 항생제 감수성 조사(2. 도축장의 식육으로부터 분리한 *Salmonella* 균의 항생제 감수성). 한국수의공중보건학회지 31(1): 51-56.
- 질병관리본부. 2007. 살모넬라균의 혈청형.
- 질병관리본부. 2008. PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) 표준실험법.
- 질병관리본부. 2009a. Public health Weekly Report 2(2): 681-686.
- 질병관리본부. 2009b. Public health Weekly Report 2(3): 697-702.
- 축산물HACCP기준원. 2009a. 육계사육단계 HACCP 운용지침 및 적용모델.
- 축산물HACCP기준원. 2009b. 산란계사육단계 HACCP 운용지침 및 적용모델.
- 황월무, 이성모, 황현순, 한정희. 2004. 인천지역 도축장에서 생산된 닭고기의 미생물 오염도 조사. 한국수의공중보건학회지 28(2): 59-65.
- CDC (Pulsenet). 2004. One-Day (24-28 h) Standardized Laboratory Protocol for Molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 2nd ed.
- David LH. 2004. Control of Communicable Diseases Manual. 18th ed. American Public Health Association.
- European Food Safety Authority. 2007. The Community Summary Report on Trends and Source of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial resistance and Foodborne outbreaks in the European Union in 2006.
- Ewing WH. 1986. Edward and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. Elsevier Science Publishing Co, New York: 181-318
- FDA. 2003. Center for drug evaluation and research. Antimicrobial Resistance.
- FDA/CFR. 2008. Food Safety A to Z Reference Guide-*Salmonella*.
- Garaizar J, Lopez-Molina N, Laconcha I, Lau Baggesen D, Rementeria A, Vivanco A, Audicana A, Perales I. 2000. Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR and pulsed field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Appl Environ Microbiol* 66(12): 5273-5281.
- Gast RK, Beard CW. 1990. Isolation of *Salmonella* Enteritidis from internal organs of experimentally infected hens. *Avian Dis* 34: 991-993.
- Grimont P.A.D, Weill F-X. 2007. ANTIGENIC FORMULAE OF THE SALMONELLA SEROVARS. 9th ed. Institut Pasteur.
- Henzler DJ, Ebel E, Sanders J, Kradel D, Mason J. 1994. *Salmonella* Enteritidis in eggs from commercial chicken layer flocks implicated in human outbreaks. *Avian Dis* 38: 37-43.
- Michael L, John P, Rachel W, Christopher B. 2006. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks-United States (1998-2002). 55: 1-34.
- Mitarai Y, Yoshitake M. 1995. Outbreaks of *Salmonella* Enteritidis infection in broiler chickens. *J Jpn Soc Poult Dis* 31: 92-99.
- NARMS. 2003. National Antimicrobial Resistance Monitoring System-Enteric Bacteria. USA.
- National Veterinary Assay Laboratory. 2003. The Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System. Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. Japan.
- Poppe C, Johnson RP, Forsberg CM, Irwin RJ. 1992. *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* in laying hens and eggs from flocks with *Salmonella* in their environment. *Can J Vet Res* 56: 226-232.
- Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B. 1990. International increase in *Salmonella* Enteritidis: A new pandemic? *Epidemiol Infect* 105: 21-27.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. 1997. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacteria infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Host Epidemiol* 18(6): 426-439.