大韓獸醫學會誌(2010) 第50卷 第3號
Korean J Vet Res(2010) 50(3) : 239~246

<원 저>

국내 가금 유래 병원성 대장균의 분자역학적 분석

성명숙 · 김진현 · 김기석*
경북대학교 수의과대학
(게재승인: 2010년 8월 18일)

Molecular epidemiologic analysis of pathogenic *Escherichia coli* isolated from poultry in Korea

Myung-Suk Sung, Jin-Hyun Kim, Ki-Seuk Kim[1,*]
College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
(Accepted: August 18, 2010)

Abstract : Among 203 avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from poultry with colibacillosis in korea, 14 isolates were selected from total 68 isolates transferred R plasmid and classified into 5 groups on the basis of antimicrobial minimal inhibitory concentration (MIC) pattern, farm source and O serotype. An association between clonal origin and R plasmid of them was investigated by R plasmid profile, restriction endonuclease analysis and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). The strains that showed the same or very similar antimicrobial MIC pattern, but different farm source and O serotype, revealed different PFGE pattern, which seemed to be different clonal origin. And the strains that showed the same MIC pattern and O serotype, revealed different PFGE pattern, seemed to be originated from different clone. Also the strains showing the same MIC pattern and farm source, but different O serotype, revealed to be different clonal origin. The strains that showed the same or similar MIC pattern, farm source, and O serotype, revealed identical or similar PFGE pattern, which seemed to belong to be one clone. Meanwhile, horizontal transfer of R plasmid seems to be common in APEC with regardless of O serotype and clone of the strains. These results indicate that rapid and accurate epidemiological survey of APEC can be possible by the combination of O serotyping, plasmid profiling and PFGE analysis following the classification of them into groups of antimicrobial drug resistance pattern.

Keywords : avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), molecular epidemiological analysis, O serotype, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), restriction endonuclease analysis (REA)

서 론

대장균은 사람에 있어서는 설사증, 뇨로감염증, 패혈증 및 뇌막염 등의 질환을 유발하며 [34], 가축에서는 경구감염으로 인한 장염을 주로 일으키는 한편, 가금에서는 호흡기도를 통한 장관외 감염으로 급성 패혈증, 기낭염, 심낭염 및 간포막염 등의 전신 감염증을 주로 일으킨다 [19, 31, 39]. 가금에서 대장균증은 마이코플라즈마병과 복합감염 또는 전염성 F낭병 및 닭 전염성 빈혈증 등의 감염에 의해 면역이 억제되었을 경우나 암모니아 가스에 노출되었을 시 2차적으로 쉽게 발병하여 높은 폐사율을 나타냄으로 농가에 심각한 경제적 손실을 초래하여 전 세계적으로 중요시 되고 있는 질병이다 [19, 31, 39].

세계적으로 사람과 가축에 있어서 문제가 되고 있는 병원성 대장균 및 살모넬라 등 장내세균의 유전학적 연관성 및 전파 경로 등을 파악하는 역학조사는 계속 이루어지고 있으며, 이러한 역학조사는 질병 발생의 방지

*Corresponding author: Ki-Seuk Kim
College of Veterinary medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
[Tel: +82-53-950-5962, Fax: +82-53-950-5955, E-mail: kimkiseuk@knu.ac.kr]

및 치료를 위해 매우 중요한 것으로 알려져 있다 [17, 18, 26-28, 30, 33-35, 38].

대장균을 포함한 그람음성균의 역학조사 방법으로 과거에는 혈청형, 파지형 및 항균제 내성형 등 표현형의 특징을 기초로 하는 전통적인 방법이 주로 이용되어왔으나, 이러한 방법은 균주의 유전정보를 바탕으로 하고 있지 않기 때문에 종종 균주 사이에 감별이 불가능한 경우가 나타나게 되었다 [27]. 한편, plasmid 분석은 대부분의 실험실에서 비교적 수행하기가 쉬워 세균감염증을 일으키는 원인균의 특성 및 균주 감별 등의 연구기법으로 사용되어져 왔으나, plasmid의 불안정성 때문에 단독 사용 시 역학조사에서 큰 의미를 두기 어려운 실정이다 [9, 29].

이러한 단점들을 극복하기 위하여 1990년 이후에는 균주간의 감별력과 실험실에서의 활용도가 크게 향상된 ribotyping, polymerase chain reaction(PCR), restriction endonuclease analysis(REA), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 등의 분자생물학적 분석방법이 그람음성균의 역학조사에 가치가 있는 것으로 알려져 왔다 [9, 15-17, 26-28, 30, 32, 35, 36, 38]. 이들 중 REA는 항균제 내성의 표현형을 동일하게 나타내는 R plasmid들의 동일성 여부를 파악하기 위해 R plasmid DNA 염기서열상의 G-A-A-T-T-C palindrome 부위를 선택적으로 자르는 제한효소 *Eco*R I 등을 이용하여 plasmid DNA 절편을 비교분석하는 방법으로서 R plasmid가 한 균에서 다른 균으로 전달되어 균의 내성화를 초래할 경우 그 기원을 추적하는 중요한 연구방법 중의 하나로 유용하게 사용되고 있다 [20, 29]. 또한 PFGE는 최근 장내세균의 균주 감별에 이용되는 분자역학적인 분석방법으로 균주에 따라 매우 특이적이어서 유행성 질병의 역학조사에서 세균의 전파를 모니터링 하는데 있어서 가장 좋은 결과를 보여주고 있는 것으로 알려져 있다 [25, 27, 38].

최근 세계적으로 가금 병원성 대장균에 대한 역학조사가 분자생물학적 방법으로 이루어지고 있는 추세이나 [26], 국내에서는 생물학적 특성 [4, 6, 13, 14], 혈청형 [2, 4, 13], 항균제 감수성 및 내성전달 [1-3, 5, 8, 12] 등 전통적인 방법이 주가 되어 실시되어 왔으며, 최근까지 분자생물학적 방법을 이용한 조사는 거의 없는 실정이다 [7].

따라서 본 연구에서는 가금 농장에서 대장균 감염 증상을 나타내는 가금으로부터 분리한 병원성 대장균을 대상으로 전통적 방법의 O group 혈청형 및 항균제 감수성 검사와 분자생물학적 방법의 PFGE와 R plasmid 양상 및 REA 결과 등을 비교 분석하여 가금 병원성 대장균의 클론 유래 및 R plasmid와의 연관성을 조사하였던 바, 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시험균

가금 사육 농장으로부터 경북대학교 조류질병학 연구실에 병성감정 의뢰되어 가금 대장균증으로 진단된 가금의 실질장기로부터 세균을 분리한 후, 성 등 [12, 13]에 의해 생화학적 성상검사와 O 혈청형 조사를 통하여 대장균으로 동정된 203주를 대상으로 R plasmid를 전달한 68주 중 이들 균주의 transconjugants의 Cm, Tc, Sm, Su, Ap, Tp, Km 및 Gm 등 8종 항균제에 대한 최소억제농도(minimal inhibitory concentration; MIC)가 동일하거나 매우 유사한 균주를 MIC 유형별로 분류하고, 이들 균주의 분리원(분리지역, 농장, 품종)과 O 혈청형 등을 기초로 하여 선발한 14주를 5개 group으로 분류하였다 (Table 1). Group I은 균 분리 농장과 O 혈청형이 각각 다른 4주, Group II는 균 분리 농장은 다르지만 O 혈청형이 같은 3주, Group III와 V는 각각 한 농장에서 분리된 균으로 O 혈청형이 다른 2주, Group IV는 한 농장에서 분리된 균으로 O 혈청형이 같은 3주였다.

Plasmid DNA의 분리 및 제한효소 처리

Plasmid DNA의 분리는 Birnboim과 Doly [21]의 방법에 따라 실시하였다. 37°C에서 20시간 진탕 배양한 균액을 1.5 mL 취하여 12,000 rpm으로 5분간 원심 후 침전물을 100 μL의 lysis buffer[50 mM dextrose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris(pH 8.0)]에 부유시켰다. 실온에서 5분간 정치시킨 후 200 μL의 alkali SDS 용액(0.2 N NaOH, 1% SDS)을 첨가하여 5분간 얼음에 냉각시켰다. 150 μL의 high salt 용액(3 M sodium acetate, pH 4.8)을 첨가한 후 5분간 얼음에 방치하여 단백과 고분자량의 RNA 및 염색체 DNA를 침전시켰다. 10분간 원심한 후 상층액을 회수하여 동량의 phenol/chlorform/Isoamylalchohol로 처리한 다음 다시 10분간 원심한 후 상층액을 회수하여 800 μL의 ethanol을 첨가하여 5분간 실온에 방치시켜 DNA를 침전시켰다. 원심 후 침사 DNA를 70% ethanol 1 mL로 세척하고 진공건조 후 RNase(4 μg/mL) 50 μL가 첨가된 TE buffer를 첨가하여 37°C 수조에서 30분간 반응시켜 RNA를 제거하였다. 0.7% agarose gel을 제작하여 수평형 영동장치(Mupid; Advance, Japan)를 이용하여 100 V에서 60분간 전기영동시켰다.

Plasmid의 제한효소 처리를 위해 증류수로 녹인 plasmid DNA에 제한효소 *Eco*R I(TaKaRa, Japan)이 7.5 unit/μg로 첨가된 buffer C(TaKaRa, Japan)를 넣어 37°C에서 60분간 반응시켰다. 0.7% agarose gel를 제작하여 89 mM Tris, 89 mM boric acid 및 2 mM EDTA를 함유하는 buffer에서 수평형 영동장치를 이용하여 50 V에서

Table 1. Epidemiologic characteristics of the avian pathogenic *Escherichia coli* isolates

Group	Location	Farm	Breed	Strain	O Sero-type	Antibiogram	Transconjugant									Pattern type		
							Plasmid	Minimum inhibitory concentration								Plasmid profile	REFP of plasmid	PFGE
								Cm	Tc	Sm	Su	Ap	Tp	Km	Gm	Transcon-jugant		
I	Bonghwa	1	Duck	VE21	90	CmTcSmSuApTp	pVE211	>512	128	512	>512	>512	>512	4	<1	T1	R1	A
	Jincheun	2	Broiler	VE26	NT*	CmTcSmSuApTpNa	pVE261	128	256	256	>512	>512	>512	4	<1	T2	R2	B
	Uiseong	3	Broiler	VE43	161	CmTcSmSuApTpNa	pVE431	256	256	256	>512	>512	>512	4	<1	T2	R2	C
	Bonghwa	4	Layer	VE188	141	CmTcSmSuApTpKmGmNa	pVE1881	256	256	256	>512	>512	>512	4	<1	T3	R3	D1
II	Bonghwa	4	Layer	VE189	141	TcSmSuKmGmNa	pVE1891	4	128	256	>512	4	<1	256	128	T4	R4	D2
	Yeoju	5	Layer	VE203	141	TcSmSuKmGmNa	pVE2031	4	128	256	>512	4	<1	256	128	T4	R4	E1
				VE204	141	TcSmSuKmGmNa	pVE2041	4	128	256	>512	4	<1	256	128	T4	R4	E2
III	Andong	6	Broiler	VE164	15	TcSmSuApTpCiNa	pVE1641	4	128	512	16	>512	<1	4	<1	T5	R5	F
				VE166	78	TcSmSuApTpCiNa	pVE1661	4	128	512	16	>512	<1	4	<1	T5	R5	G
IV	Bonghwa	7	Duck	VE136	78	TcSmApTpKmNa	pVE1361	4	64	4	16	4	<1	>512	<1	T6	R6	H
				VE138	78	TcSmApTpKmNa	pVE1381	4	64	4	16	4	<1	>512	<1	T6	R7	H
				VE139	78	TcSmApTpKmNa	pVE1391	4	64	4	16	4	<1	>512	<1	T6	R7	H
V	Yeoju	8	Broiler	VE183	NT*	SmSuGmCiNa	pVE1831	4	<1	128	16	4	<1	16	256	T7	R8	NT†
				VE185	141	SmSuGmCiNa	pVE1851	4	<1	128	16	4	<1	16	256	T8	R9	NT†

*Non-typeable, †Not tested. REFP: restriction endonuclease fragment pattern, PFGE: pulsed-field gel electrophoresis.

1시간 전기영동 시켰다.

PFGE

PFGE는 Gautom [27]의 방법에 따라 실시하였다. Luria bertani broth에서 하룻밤 배양한 균액을 SE buffer(75 mM NaCl, pH 8.0; 25 mM EDTA, pH 8.0)로 세척한 다음 2% InCert agarose(CAMBREX, USA)와 1 : 1(v/v)로 혼합하여 agarose plug를 제작하였다. Plug를 lysis buffer에 옮긴 후 55°C water bath에서 20시간 반응시킨 후, TE buffer(10 mM Tris, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0)로 4회 세척하였다. 세척된 plug를 제한효소 *Xba* I(Roche, Germany)으로 37°C에서 20시간 처리하여 genomic DNA를 절단하였다. 1% SeaKem gold agarose(CAMBREX, USA)에 plug를 부착하여 0.5 × TBE buffer에서 CHEF-DR III system(Bio-Rad, USA)을 이용하여 initial pulse 5초, final pulse 40초, 6 V/cm, 각도 120°의 조건으로 12°C에서 20시간 전기영동하였다.

결 과

가금 병원성 대장균에 대한 clone의 유래 및 R plasmid와의 연관성을 알아보기 위해 transconjugant의 항균제에 대한 MIC 유형, 이들 균주의 분리원과 O 혈청형 등을 기초로 하여 R plasmid 및 PFGE 성적을 분석한 결과는 다음과 같다.

R plasmid profile 및 restriction endonuclease fragment pattern(REFP) 분석

공시균 14주가 보유하고 있는 R plasmid의 동일 여부를 확인하기 위해 transconjugant의 R plasmid DNA를 분리하여 전기 영동한 결과 8개의 양상으로 나타났다(Fig. 1). Group I에 속한 4주중 pVE261과 pVE431에서 같은 양상(T2형)의 밴드가 나타났으며, Group II에 속한 3주(pVE1891, pVE2031, pVE2041), Group III에 속한 2주(pVE1641, pVE1661) 및 Group IV에 속한 3주(pVE1361, pVE1381, pVE1391)에서는 각각 T4형, T5형 및 T6형으로 동일한 양상의 밴드가 나타났다. 또한 Group V에 속한 2주(pVE1831, pVE1851)에서는 각각 T7 및 T8형으로 상이한 양상의 밴드가 나타났다.

동일한 양상의 transconjugant R plasmid DNA를 제한효소 *Eco*R I으로 절단한 후 전기 영동하여 DNA 분획상을 비교한 REFP는 Fig. 2와 같으며, 이들 DNA 분획상의 유형이 같은 경우 동일한 plasmid를 보유하고 있는 것으로 추정하였다. T2형, T4형 및 T5형을 나타낸 transconjugant의 R plasmid DNA의 REFP는 각각 R2형, R4형 및 R5형으로 동일하게 나타나 Group I의 VE26과 VE43, Group II의 VE189, VE203과 VE204, Group III의 VE164와 VE166은 각각 같은 R plasmid를 공유하고 있는 것으로 추정할 수 있었다. T6형을 나타낸 transconjugants의 R plasmid의 REFP는 각각 R6형 및 R7형으로 나타나 VE138과 VE139는 같은 R plasmid를 공유하고 있는 것으로 추정할 수 있으나, VE136은 이들과 다른 plasmid를 보유하고 있는 것으로 나타났다.

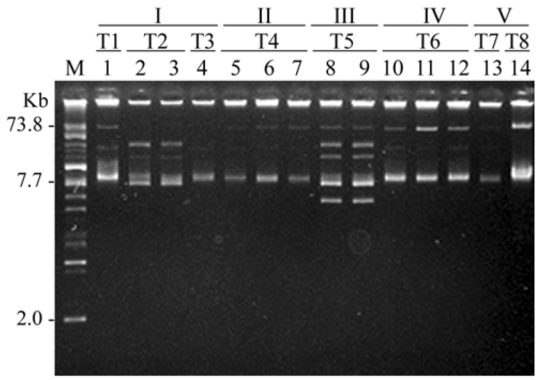

Fig. 1. Plasmid profiles of transconjugants showing identical or nearly identical minimum inhibitory concentration patterns. Lane M: KE327, Lane 1: pVE211, Lane 2: pVE261, Lane 3: pVE431, Lane 4: pVE1881, Lane 5: pVE1891, Lane 6: pVE2031, Lane 7: pVE2041, Lane 8: pVE1641, Lane 9: pVE1661, Lane 10: pVE1361, Lane 11: pVE1381, Lane 12: pVE1391, Lane 13: pVE1831, Lane 14: pVE1851. I to V, T1 to T8: See Table 1.

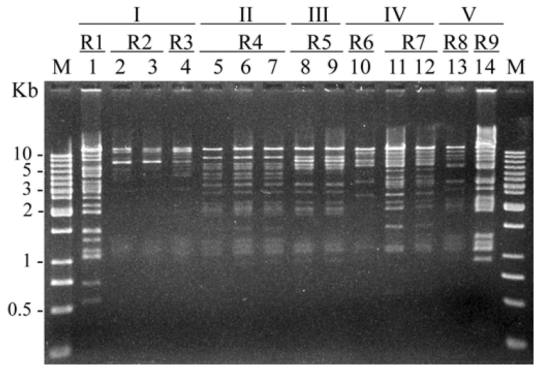

Fig. 2. Restriction endonuclease fragment pattern of R plasmids extracted from transconjugants by *Eco*R I. Lane M: 1 Kb DNA ladder, Lane 1: pVE211, Lane 2: pVE261, Lane 3: pVE431, Lane 4: pVE1881, Lane 5: pVE1891, Lane 6: pVE2031, Lane 7: pVE2041, Lane 8: pVE1641, Lane 9: pVE1661, Lane 10: pVE1361, Lane 11: pVE1381, Lane 12: pVE1391, Lane 13: pVE1831, Lane 14: pVE1851. I to V and R1 to R9: See Table 1.

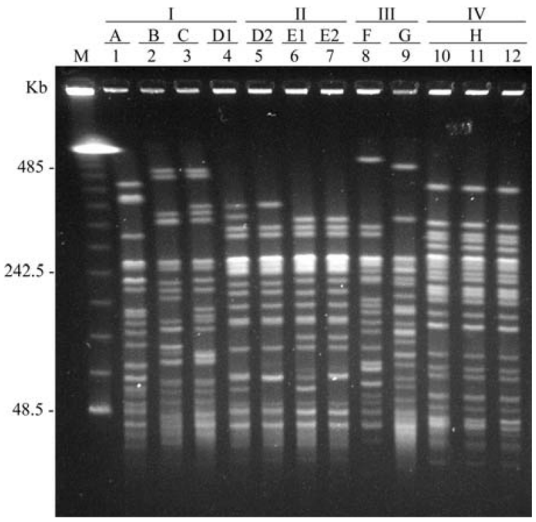

Fig. 3. Pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Xba* I-digested genomic DNAs of *E. coli* isolates from poultry. Lane M: lambda ladder, Lane 1: VE21, Lane 2: VE26, Lane 3: VE43, Lane 4: VE188, Lane 5: VE189, Lane 6: VE203, Lane 7: VE204, Lane 8: VE164, Lane 9: VE166, Lane 10: VE136, Lane 11: VE138, Lane 12: VE139. I to IV, A to H: See Table 1.

PFGE 분석

공시균의 PFGE 결과는 Fig. 3에서와 같이 Group I의 4균주는 모두 다른 양상(A, B, C, D형)을 나타내어 각각 다른 clone으로부터 유래한 균임을 알 수 있었다. Group II의 3균주중 한 농장내에서 분리된 VE203과 VE204는 3밴드 이하의 차이를 보이는 유사한 양상(E1형과 E2형)을 나타내어 계통발생학적으로 동일한 clone으로부터 유래한 균주로 추정되었으나, 다른 농장의 VE189는 양상이 매우 달라(D2형) 다른 clone으로부터 유래된 균주로 확인되었다. Group III의 2균주는 서로 다른 양상(F형, G형)을 나타내어 서로 다른 clone으로부터 유래되었고, Group IV의 3균주는 모두 같은 양상(H형)으로 나타남에 따라 동일한 clone으로부터 유래한 균으로 추정되었다. Group V의 2균주는 공시한 제한효소 *Xba* I으로 genomic DNA가 절단되지 않아 clone 유래를 비교하지 못하였다.

혈청형, 항균제 내성, R plasmid analysis 및 PFGE 사이의 연관성

상기 REFP 및 PFGE 결과를 분리 농장, 혈청형 및 항균제 내성과 관련하여 정리한 결과는 Table 1에서와 같다. Group I에서 transconjugants의 MIC 유형은 동일하거나 유사하였지만, 서로 다른 농장에서 분리되었고 혈청형이 다른 균주로 PFGE 양상도 각각 다르게 나타남에 따라 4균주 모두 서로 다른 clone으로부터 유래한 균주로 확인되었다. 한편, 이들 균주 중 VE26과 VE43의 R plasmid에 대한 REFP가 동일하여 두 균주는 동일한 R plasmid를 보유하고 있을 것으로 추정되었다.

Group II에서는 transconjugants의 MIC 유형과 혈청형이 같으나 균 분리 농장이 다른 경우 PFGE 양상도 다르게 나타나 서로 다른 clone으로부터 유래한 균이었으나(VE189, VE203), 균 분리 농장이 같은 경우에는 PFGE 양상이 3 밴드 이하의 차이를 보이는 유사한 양상을 나타내어 동일한 clone으로부터 유래한 균주임을 알 수 있었다(VE203, VE204). 한편, 이들 3균주의 R plasmid의 REFP가 동일하게 나타나므로 모두 동일한 R plasmid를 공유하고 있는 것으로 추정되었다.

Group III에서는 한 농장 내에서 분리된 균으로 transconjugants의 MIC 유형은 같으나 혈청형이 다른 경우 PFGE 양상도 달라 각각 다른 clone으로부터 유래한 균주였으나, 동일한 R plasmid를 보유하고 있는 것으로 추정되었다.

Group IV에서는 한 농장 내에서 분리된 균으로 transconjugants의 MIC 유형과 혈청형이 동일한 경우 PFGE 양상도 같아 동일한 clone으로부터 유래한 균주로 추정되나, R plasmid의 REFP에서는 R6과 R7로 약간의 차이를 보였다(VE136, VE138). 이는 R plasmid가 복제 또는 다른 균으로 이동할 때 유전자의 일부가 삭제되거나 다른 plasmid의 유전자와 재조합이 일어날 수 있어 다소간의 변화가 있었던 것으로 추측된다.

Group V에서는 한 농장 내에서 분리된 균으로 PFGE를 비교할 수는 없었으나, 혈청형이 달라 서로 다른 clone으로부터 유래된 균주로 추정되며, REFP도 서로 달라 plasmid의 전달은 없었던 것으로 확인되었다.

고 찰

가금 농장의 병원성 대장균 감염을 효과적으로 방제하기 위해 여러 가지 방법을 이용한 역학조사가 진행되어 왔으며, 최근 독일의 Ewers 등 [26]은 혈청형 분석을 보충하는 PCR, DNA hybridization 및 PFGE 등 분자생물학적 방법을 이용한 역학조사를 통하여 가금 병원성 대장균 전파 방지를 위한 기초 자료를 제공하였다.

대부분의 세균이 보유하고 있는 plasmid 양상은 한정된 시간과 지역내에서 대개 일정한 것으로 보고된 바 [22, 23], plasmid를 분석하여 균주를 감별하는 방법이 대장균 [10, 11, 24, 37] 및 *Salmonella* [9, 18] 등 장내세균의 역학조사에 유용하게 이용되고 있다. 특히 Baggesen 등 [18]과 설 등 [9]은 항생제 감수성 결과와 plasmid

profile이 동일한 균주를 선별하여 이들 균주를 대상으로 PFGE 등을 실시한 결과 특정 clone에서 유래된 *Salmonella* typhimurium이 일정 지역 내의 여러 돼지 농장에서 오염원으로 작용하는 것을 확인하였다. 본 연구에서도 가금 병원성 대장균을 대상으로 항균제 내성유형이 동일한 균주를 선별하여 R plasmid 및 PFGE를 분석한 결과 Group I의 VE26과 VE43, Group II의 VE189과 VE203 균주가 동일한 R plasmid를 보유하고 있으나 서로 다른 clone으로부터 유래된 균으로 확인되어 돼지 농장의 *Salmonella* typhimurium과는 달리 가금 농장간에 병원성 대장균의 전파는 발견할 수 없었다.

Group I의 VE26과 VE43 균주는 각각 충북 진천과 경북 의성지역에 있는 육계농장에서 분리된 균이며, 이들 두 균주가 분리된 계군은 서로 다른 지역의 종계장에서 생산된 종란을 이용하여 비슷한 시기에 동일한 부화장을 경유하여 부화시킨 계군이다. 따라서 두 균주에서 확인된 동일한 R plasmid는 이들 계군의 여러 병아리들 사이에 공유하고 있던 대장균에서 유래된 R plasmid를 보유하고 있는 것으로 추측된다. 이들 R plasmid의 최종적인 동일성 여부는 DNA hybridization 또는 유전자의 염기서열 분석 등을 추가로 실시하여 확인되어져야 하겠지만, 부화장이 특정 R plasmid의 전파원으로 작용하여 각 농장 내에서 확산되는 것으로 추측됨에 따라 부화장별로 특정 병원균의 오염과 내성 유전자를 동반하는 plasmid의 감시가 필요하다고 생각된다. 한편, Group II의 VE189와 VE203 균주에 대해서는 농가 정보가 부족하여 어떤 경로를 통하여 R plasmid가 전달되었는지 정확히 알 수는 없었다.

이러한 R plamid의 전달은 농장간의 균주 사이에서 뿐만 아니라, Group III(VE164, VE166)에서와 같이 한 농장내에서 다른 clone으로부터 유래된 균주 사이에서도 나타났다. 따라서 R plasmid의 수평적 이동은 농장간 또는 농장내 균주 사이에서 쉽게 일어나는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 질병 치료에 중요한 영향을 미치는 항균제 내성인자의 전달과 관련되므로 가금의 대장균증 치료에 어려움을 초래할 뿐 아니라, 가금 유래균에서 사람 유래균으로 내성인자가 전달될 경우 사람의 세균성 질병 치료에 어려움을 초래할 우려가 있는 것으로 사료된다.

한편, 설 등 [11]은 대학병원의 임상가검물에서 분리한 *Enterobacter* spp.의 역학조사를 위해 항균제 내성형, 생물형 및 plasmid profile이 동일한 *Enterobacter* (*E.*) *cloacae* 10주를 선택하여 이들 균주에서 분리한 plasmid를 제한효소 처리한 후 분획상을 확인한 결과 거의 동일한 분획상을 나타내어 동일한 균주로 판명하였다. 따라서 동일한 *E. cloacae*가 한 대학병원 내에서 유행하는 것이 확인되었고, 그 외 대부분의 *Enterobacter* spp.는 형별방법에 따라 다양한 결과를 나타내어 대개의 감염은 개개의 균주에 의한 것으로 확인되었다. 본 연구 결과에서도 Group II(VE203, VE204), Group IV(VE136, VE138, VE139)에서와 같이 가금 병원성 대장균이 한 농장내에서 내성유형과 R plasmid 양상이 유사하거나 동일한 경우 동일 clone에서 유래된 병원성 대장균이 가금 대장균증의 감염원으로 작용하고 있는 것을 확인함으로 설 등 [11]의 결과와 거의 일치하는 것을 알 수 있었다.

Ewers 등 [26]은 가금 병원성 대장균중 가장 일반적인 혈청형으로 알려져 있는 O1, O2, O78을 대상으로 PFGE pattern을 분석한 결과 특정 혈청형이 특정 PFGE pattern을 나타내는 그룹에 다수가 속하게 됨으로 O 혈청형과 PFGE pattern은 서로 상관성이 있는 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 O 혈청형이 동일한 경우 농장별로 PFGE 양상이 거의 유사하거나 동일하게 나타남으로(Group II의 VE203 및 VE204, Group IV의 VE136, VE138, VE139) Ewers 등 [26]의 결과와 매우 유사한 것으로 나타난 바, 한 농장 내에서 혈청형과 내성유형이 동일하면 동일한 clone으로부터 유래된 균주로 보아도 무난할 것을 사료된다.

Tabatabaei 등 [37]은 임상증상이 있는 닭에서 분리한 대장균에 대하여 plasmid profile이 항생제 내성 유형과 혈청형 보다 균 감별에 유용하다고 보고하였으나, 본 실험에서는 항균제 내성양상 및 혈청형, R plasmid가 동일하거나 유사한 경우에도 PFGE 유형이 달라(Group II의 VE189와 VE203) PFGE 결과에 의한 균주 감별 효과는 약제 내성, 혈청형 및 plasmid 분석 보다 우수한 것을 알 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 보면 가금 병원성 대장균의 역학조사를 위해 항균제 내성 결과를 이용하여 일차적으로 균주를 선별하고 선별된 균주를 대상으로 O 혈청형, R plasmid 및 PFGE 분석을 동시에 응용하면 농가간의 가금 병원성 대장균 및 R plasmid의 전파 등에 관한 역학조사를 보다 효과적이고 신속 정확하게 할 수 있는 것으로 나타났다.

결 론

가금 병원성 대장균에 대한 클론의 유래 및 R plasmid와의 상관성을 알아보기 위하여 국내 대장균 감염계로부터 분리한 203주를 대상으로 R plasmid를 전달한 68주 중 이들 균주의 항균제 MIC유형, 분리원 및 O 혈청형 등을 기초로 하여 14주를 선발하여 5개 그룹으로 분류하고 R plasmid profile, REA 및 PFGE를 실시하였다.

항균제 내성유형은 동일 또는 유사하나 분리농장과 O 혈청형이 다른 균주는 PFGE 양상이 각각 달라 서로 다

른 클론으로부터 유래하였으며, 항균제 내성유형과 O 혈청형은 같으나 분리농장이 다른 균주의 경우 PFGE 양상이 다르게 나타나 클론의 유래가 다른 것으로 확인되었다. 또한 항균제 내성유형과 분리농장은 동일하나 O 혈청형이 서로 다른 균주 역시 각각 다른 클론으로부터 유래한 것으로 확인되었다. 한편으로 항균제 내성유형, O 혈청형 및 분리농장이 같은 경우 동일한 클론으로부터 유래한 것으로 알 수 있었다.

R plasmid는 농장간이나 또는 동일 농장 내의 균주 간에 형청형 및 클론 유래와 상관없이 수평전달이 되었다.

이상의 시험 결과 항균제 내성유형을 이용하여 일차적으로 균주를 그룹 선별한 다음, 선별된 균주를 대상으로 O 혈청형, R plasmid 및 PFGE 분석을 동시에 응용할 경우 농장 간에 가금 병원성 대장균 및 R plasmid의 전파 등에 관하여 보다 효율적이고 신속 정확한 역학조사가 가능할 것으로 나타났다.

참고문헌

1. **김기석, 김상희, 남궁선.** 닭 대장균의 항균성약제 감수성 및 인공 감염계에 있어서의 Oxolinic acid의 치료 효과. 한국수의공중보건학회지 1989, **13**, 63-70.
2. **김기석, 남궁선.** 닭 대장균의 특성에 관한 연구: I. 혈청형 및 항균성 약제 내성. 한국수의공중보건학회지 1987, **11**, 13-20.
3. **김기석, 남궁선.** 닭 대장균의 특성에 관한 연구: II. 약제내성 양상, 전달성 R Plasmid의 분포 및 비적합성군, Colicin 산생 및 Col Plasmid의 전달, 혈구응집능. 한국수의공중보건학회지 1988, **12**, 63-83.
4. **김기석, 탁연빈.** 계유래 병원성 대장균에 관한 연구: 1. 대장균감염 병계로 부터 분리한 대장균의 생화학적성상 및 혈청형 조사. 한국수의공중보건학회지 1983, **7**, 113-120.
5. **김기석, 탁연빈.** 닭 유래 병원성 대장균에 관한 연구: 2. 대장균감염 병계로부터 분리한 대장균의 항균성 약제내성 및 전달성 내성인자(R plasmid). 한국수의공중보건학회지 1984, **8**, 1-10.
6. **김기석, 탁연빈.** 계유래 병원성 대장균에 관한 연구: 3. 대장균감염 병계로부터 분리한 Citrate 양성 대장균의 생화학적 성상 및 Citrate 이용능의 전달. 한국수의공중보건학회지 1984, **8**, 15-19.
7. **김기석, 탁연빈.** 닭 대장균의 특성에 관한 연구: 4. 대장균감염 병계로부터 분리한 대장균의 R plasmid 분리 및 성상조사. 한국수의공중보건학회지 1984, **8,** 21-24.
8. **김종만, 진남섭, 김종완, 진영화, 이희수, 권창희, 우승룡, 이해천, 박종명, 김재학, 이재진**. 가축의 설사변에서 분리한 대장균과 살모넬라균의 항균물질 감수성과 마우스에서의 치료효과. 대한수의학회지 1997, **37,** 389-403.
9. **설성용, 김기영, 정영숙, 강희영, 유학선, 김봉환, 조동택, 이유철, 이제철.** 1998년부터 2000년 사이 경북지역 농장의 돼지로부터 분리한 *Salmonella enterica* serovar typhimurium의 역학조사. J Bacteriol Virol 2005, **35**, 87-92.
10. **설성용, 김정민, 문충렬, 이유철, 이제철, 이상화, 조동택.** 분자유전적 분석에 의한 대장균의 역학조사. 대한미생물학회지 1994, **29**, 129-145.
11. **설설용, 신기식, 신행섭, 장희경, 이유철, 조동택.** 병원재료에서 분리한 *Enterobacter*의 분자역학적 분석. 대한미생물학회지 1997, **32,** 487-501.
12. **성명숙, 김진현, 조재근, 설성용, 김기석.** 가금 유래 병원성 대장균의 항균제 내성 및 R plasmid 전달 양상. 대한수의학회지 2008, **48,** 275-285.
13. **성명숙, 김진현, 하종수, 조재근, 설성용, 김기석.** 가금 유래 병원성대장균의 생화학적 성상 및 혈청형. 대한수의학회지 2008, **48,** 145-151.
14. **우용구, 김기석, 김봉환**. 닭에서 분리한 *Escherichia coli*의 생물화학적 및 배양 특성. 대한수의학회지 1990, **30**, 421-425.
15. **우용구, 이수화, 이철현, 이오수, 김봉환.** Pulsed-Field Gel Electrophoresis를 이용한 *Salmonella enterinca* subspecies *enterica* bioserovar Pullorum의 분자유전학적 다양성에 관한 연구. 대한수의학회지 2003, **43**, 77-86.
16. **하경임, 서성일, 박종욱, 서민호.** 대장균의 R plasmid의 특성과 항균제 내성. 대한미생물학회지 1990, **25**, 19-26.
17. **Avery SM, Liebana E, Reid CA, Woodward MJ, Buncic S.** Combined use of two genetic fingerprinting methods, pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping, for characterization of *Escherichia coli* O157 isolates from food animals, retail meats, and cases of human disease. J Clin Microbiol 2002, **40**, 2806-2812.
18. **Baggesen DL, Sandvang D, Aarestrup FM.** Characterization of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. J Clin Microbiol 2000, **38**, 1581-1586.
19. **Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Mcdougald LR Saif YM (eds.)**. Diseases of poultry. 10th ed. pp. 131-141, Mosby-Wolfe, Iowa, 1997.
20. **Bezanson GS, Khakhria R, Pagnutti D.** Plasmid profiles of value in differentiating *Salmonella muenster* isolates. J Clin Microbiol 1983, **17**, 1159-1160.
21. **Birnboim HC, Doly J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979, **7**, 1513-1523.
22. **Brunner F**, **Margadant A**, **Peduzzi R**, **Piffaretti JC.** The plasmid pattern as an epidemiologic tool for *Salmonella* typhimurium epidemics: comparison with the lysotype. J Infect Dis 1983, **148**, 7-11.
23. **Casalino M, Comanducci A, Nicoletti M, Maimone**

F. Stability of plasmid content in *Salmonella* wien in late phases of the epidemic history. Antimicrob Agents Chemother 1984, **25**, 499-501.

24. **Chaslus-Dancla E, Pohl P, Meurisse M, Marin M, Lafont JP.** High genetic homology between plasmids of human and animal origins conferring resistance to the aminoglycosides gentamicin and apramycin. Antimicrob Agents Chemother 1991, **35**, 590-593.
25. **Davis MA, Hancock DD, Besser TE, Call DR.** Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis as a tool for determining the degree of genetic relatedness between strains of *Escherichia coli* O157:H7. J Clin Microbiol 2003, **41**, 1843-1849.
26. **Ewers C, Janßen T, Kießling S, Philipp HC, Wieler LH.** Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. Vet Microbiol 2004, **104**, 91-101.
27. **Gautom RK.** Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. J Clin Microbiol 1997, **35**, 2977-2980.
28. **Hartman AB, Essiet II, Isenbarger DW, Lindler LE.** Epidemiology of tetracycline resistance determinants in *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*: characterization and dissemination of tet(A)-1. J Clin Microbiol 2003, **41**, 1023-1032.
29. **Holmberg SD, Wachsmuth IK, Hickman-Brenner FW, Cohen ML.** Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella* typhimurium isolates from outbreaks. J Clin Microbiol 1984, **19**, 100-104.
30. **Johnson JR, Stell AL, O'Bryan TT, Kuskowski M, Nowicki B, Johnson C, Maslow JN, Kaul A, Kavle J, Prats G.** Global molecular epidemiology of the O15:K52:H1 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* clonal group: evidence of distribution beyond Europe. J Clin Microbiol 2002, **40**, 1913-1923.
31. **Kahn CM, Line S.** The Merck Veterinary Manual. 9th ed. pp. 2221-2222, Merck & Co, New Jersey, 2005.
32. **Kim HH, Park MS, Kang YH, Yu JY, Kim SH, Shin YH, Kim MH, Lee BK.** Epidemiological Characteristics of *Salmonella* strains isolated recently in Korea. J Korean Soc Microbiol 1999, **34**, 595-598.
33. **Mayer LW.** Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev 1988, **1**, 228-243.
34. **Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Strockbine NA.** *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds.). Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. pp. 670-687, ASM press, Washington DC, 2007.
35. **Preston MA, Johnson W, Khakhria R, Borczyk A.** Epidemiologic subtyping of *Escherichia coli* serogroup O157 strains isolated in Ontario by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microbiol 2000, **38**, 2366-2368.
36. **Rivera MJ, Rivera N, Castillo J, Rubio MC, Gómez-Lus R.** Molecular and epidemiological study of *Salmonella* clinical isolates. J Clin Microbiol 1991, **29**, 927-932.
37. **Tabatabaei RR, Nasirian A.** Comparison of plasmid profile analysis, serotyping and antimicrobial resistance patterns of *E. coli* isolated from poultry in Tehran. Food Sci Biotechnol 2004, **13**, 100-103.
38. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 1995, **33**, 2233-2239.
39. **Timoney JF, Gillespie JH, Scoot FW, Barlough JE.** Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8th ed. pp. 61-71, Cornell University Press, Ithaca, 1992.