

대구·경북지역 오리 유래 *Salmonella*속 균의 혈청형, 항균제 내성 및 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*의 plasmid profiles, phage types 및 PFGE

조재근* · 강민수¹ · 김기석²

대구광역시보건환경연구원, ¹국립수의과학검역원, ²경북대학교수의과대학

(접수 2011. 6. 10; 수정 2011. 9. 9; 게재승인 2011. 9. 14)

Serotypes, antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and plasmid profiles, phage types, PFGE of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* isolated from ducks in Daegu-Gyeongbuk province

Jae-Keun Cho*, Min-Su Kang¹, Ki-Seuk Kim²

Metropolitan Health & Environmental Research Institute, Daegu 706-732, Korea

¹National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea

²College of Veterinary Medicine, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

(Received 10 June 2011; revised 9 September 2011; accepted 14 September 2011)

Abstract

Salmonella spp. is of increasing public health concern as causative pathogens of food poisoning. The aim of this study was to investigate the serotypes and antimicrobial resistance pattern of *Salmonella* spp. isolated from duck farms in Daegu-Gyeongbuk province. Also, *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* isolates were further examined for plasmid analysis, phage typing and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). A total of 34 *Salmonella* spp. (16.4%) were isolated from duck farms and ten serotypes were identified. The predominant serotypes were *S. Typhimurium* (23.5%) *S. Fyris* (17.6%) and *S. Haardt* (11.8%), *S. Agona* and *S. Enteritidis* (respectively 8.8%). Of 34 *Salmonella* isolates, 15 (44.1%) isolates were resistant to at least one antimicrobial agent and multiple resistance (resistance to more than 4 drugs) was observed in 9 strains (26.5%). The high resistance was found to streptomycin (32.4%), tetracycline (29.4%), ampicillin, kanamycin and nalidixic acid (respectively, 26.5%), all *Salmonella* isolates were susceptible to cefoxitin, cefotaxime, gentamicin, amikacin and ciprofloxacin. All *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* isolates were found to contain only one plasmid (ca. 54 or 55kb, respectively). Among the *S. Enteritidis* isolates, two phage types were found, PT32a and PT1c, respectively, one isolates did not react with any of the phages used. Whereas, all *S. Typhimurium* isolates were RDNC (reacts but does not conform). PFGE showed to be a useful typing method better than plasmid analysis and phage typing for discrimination of isolates especially, *S. Typhimurium* isolates. Our results indicated that the serotypes of *Salmonella* isolates are widely distributed in duck farms, further epidemiological studies should be carried out.

Key words : *Salmonella*, Antimicrobial resistance, Plasmid, Phage type, PFGE

*Corresponding author: Jae-Keun Cho, Tel. +82-53-760-1303, Fax. +82-53-760-1302, E-mail. thinking@daegu.go.kr

서 론

Salmonella 속 균은 자연계에 널리 분포되어 있고, 몇몇 숙주 특이성이 있는 균종을 제외하고는 사람과 동물에서 위장염이나 패혈증 등을 유발하는 인수공통병원체이다(Timoney 등, 1988). 이 균의 혈청형은 편모항원(H), 균체항원(O), 협막항원(Vi)의 다양성에 근거하여 Kauffmann-White scheme에 따라 현재까지 약 2,500여 종이 알려졌으며, 일부 혈청형은 지속적으로 높은 빈도로 분리되고 있고 혈청형의 분포 양상은 지리적 또는 분리시기에 따라 다양하게 나타날 수 있다(Ewing, 1986; Gast, 2008).

*Salmonella*속 균은 수십 년 동안 사람에서 식중독의 주요한 병원체로 인식됐으며, 이들 *Salmonella* 식중독의 원인균 중 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*이 가장 많은 부분을 차지하고 있다(van Duijkeren 등, 2002). Kessel 등(2001)은 1992년부터 1999년 사이 England와 Wales에서 발생한 식중독의 2% 정도가 오리의 소비와 관련이 있다고 보고하였으며, 사람으로의 *Salmonella* 감염은 주로 동물 유래 오염된 음식물의 섭취와 관련이 있다(Kimura 등, 2004).

항생제는 각종 세균성 감염증의 치료에 널리 사용됐으나 이들 약제의 무분별한 사용으로 인한 내성 균주의 출현 빈도는 전 세계적으로 증가 추세여서(Gatto 등, 2006) 사회적인 관심과 그 중요성이 커지고 있다(WHO, 2003). 국내에서는 2003년부터 국가항생제 내성안전관리 사업을 시작하여 사람, 축산, 어류, 환경으로부터 다양한 병원성 세균을 분리하여 내성균 양상을 조사하고 있다.

1980년대 초반까지만 하더라도 *S. Typhimurium*이 식중독의 가장 주된 병원체로 알려져 왔으나 1980년대 중반 이후부터 세계적인 경향으로 *S. Enteritidis*에 의한 식중독의 폭발적인 증가현상이 보고되고 있고(Rodrigue 등, 1990; Poppe 등, 1992), 이와 관련된 역학적 특성 조사 및 감염증의 예방대책에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. *Salmonella*속 균의 동정은 단지 혈청형의 동정만으로는 어떤 지역에서 역학적으로 특징적인 균주를 파악한다는 것은 거의 불가능하다. 따라서 체계적인 역학적 특성을 규명하기 위해서는 종 이하의 수준까지 분석할 수 있는 분석기법의 활용이 필수적이다. 혈청형과 더불어 plasmid profiling, phage typing과 pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) 등의 분자유전학적 방법들은 *S. Typhimurium*과 *S. Enteritidis*의 역학적 연구에 중요한 역할을 하고

있다(Anderson 등, 1977; Ward 등, 1987; Ridley 등, 1998). Plasmid profiling과 phage typing 자료는 가장 기초적이면서 범세계적으로 활용되고 있는 역학 자료의 하나이며 적은 비용과 고가의 장비 없이도 단 시간에 간단한 술식으로 감염증에 관련된 병원균의 역학적 특성을 분석할 수 있는 장점이 있으나 야외 분리 *Salmonella* 균종 중 plasmid가 없거나 phage typing이 불가능 할 경우 이들 방법을 이용하기는 어렵다. 그러나 PFGE는 염색체 전체의 유전자 양상을 파악하는 방법으로 DNA 정제 시간이 많이 걸리고 DNA를 분리하여 제한효소를 처리하는 과정까지의 비용이 많이 소요되는 단점이 있으나 유전자 분석 방법의 우수성을 평가하는 기준인 표현능, 재현성, 판별력이 가장 우수한 것으로 인정되고 있어 현재 가장 널리 사용되고 있다(Murase 등, 1995; Tenover 등, 1995; Guerra 등, 2000).

근년에 이르러 국내 오리 산업은 기호성의 증가와 요리 방법의 개발에 힘입어 지속적인 성장을 하고 있어 오리 사육은 향후 확대될 잠재력을 지니고 있고 오리의 소비로 인한 사람에게로 *Salmonella* 감염 또한 증가할 것으로 예상되지만 최근까지 국내에서 오리와 관련된 *Salmonella* 속 균의 특성에 관한 자료는 매우 드물다(우 등, 2000a; Yang 등, 2002).

이 연구에서는 대구·경북지역 오리농장에서 사육되고 있는 오리의 분변으로부터 *Salmonella*속 균을 분리하여 혈청형의 분포, 항균제의 내성 유형을 조사하였고, *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*에 대해서는 plasmid profiles, phage types 및 PFGE pattern을 분석하였다.

재료 및 방법

공시재료

2007년 3월부터 2008년 8월까지 대구·경북지역 오리농장 127개를 대상으로 총 207개의 시료를 채취하여 실험에 사용하였다. 분변 5개를 pooling하여 한 개의 시료로 만든 후 사육규모를 고려하여 농장 당 1~3개의 시료를 채취하였다.

*Salmonella*속 균의 분리 및 동정

*Salmonella*속 균 분리를 위하여 채취한 분변 5 g에 45 ml의 buffered peptone water (Merck, Germany)를 첨

가하여 37°C에서 18시간 1차 배양하였고, 증균액 0.1 ml를 10 ml Rappaport-vassiliadis broth (Merck, Germany)에 접종 후 42°C에서 18~24시간 배양하여 20 µg/ml novobiocin (Merck, Germany)이 첨가된 BPLS agar (Merck, Germany)와 Xylose lysine desoxycholate (Difco, USA) 배지에 도말한 후 37°C에서 20~24시간 배양하였다. 의심되는 집락은 VITEK 2 Compact (Bio-Merieux, France)를 이용하여 확인하였다. 또한 Difco (USA)와 Denka Seiken (Japan)에서 제조된 표준 항혈청을 사용하여 균체항원(O) 및 편모항원(H)에 대한 응집반응법으로 혈청형을 동정하였다.

항균제 감수성 시험

항균제 감수성 시험은 Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009)의 기준에 따라서 디스크 확산법으로 실시하였다. 사용한 항균제 디스크는 BBL sensi-disc (BD[®], USA) 제품인 ampicillin (AM), amoxicillin/clavulanic acid (AMC), amikacin (AN), cephalothin (CF), cefoxitin (FOX), cefotaxime (CTX), chloramphenicol (CM), ciprofloxacin (CIP), gentamicin (GM), kanamycin (KM), nalidixic acid (NA), streptomycin (SM), sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT) 및 tetracycline (TC) 등 14종이었다. 공시균을 Mueller-Hinton broth (Difco, USA)에 37°C에서 2~4시간 배양하여 균 농도를 McFarland No. 0.5로 조정 후 멸균면봉을 이용하여 Mueller-Hinton agar (Difco) 평판배지에 고르게 도포한 다음 항생제 디스크를 dispenser (Difco)로 접종한 다음 37°C에서 16~18시간 배양 후 균 억제대의 크기를 측정하였다. 항균제에 대한 내성 판정은 NCCLS (2003)의 기준을 따랐고 항균제 감수성 시험을 위한 표준균주로 *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

Plasmid profiles

Plasmid profile은 Kado와 Liu (1981)의 방법을 변형하여 plasmid를 분리하였다. 균체를 LB broth (Difco, USA) 5 ml에 접종하여 37°C에서 18시간 진탕 배양한 다음 배양액 1.5 ml을 원심하여 얻은 균체에 E buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0) 100 µl를 가하였다. 여기에 lysis buffer (3% SDS, 50 mM Tris, pH 12.46) 200 µl를 첨가하여 56°C 항온수조에서 30분 동안 배양한 후, 두 배 용량의 saturated phenol : chloroform:isoamyl-alcohol (25 : 24; 1) 200 µl를 가한 다음

13,000 rpm에서 15분간 원심 후 상청액을 얻었다. 분리한 plasmid는 0.8% agarose gel상에 loading하고 TBE buffer (Bioneer, Korea) 하에서 90V로 4시간 동안 전기영동을 실시하였다. Agarose gel은 0.5 µg/ml의 ethidium bromide (sigma, USA) 용액에 담근 후 10분간 염색 후 UV transilluminator (Biometra, Germany)를 사용하여 band의 유무를 확인하였다. Plasmid의 분자량 측정을 위한 marker로는 *E. coli* V517 균주를 사용하였다.

Phage typing

Serotyping에서 동정된 *S. Enteritidis* 3주와 *S. Typhimurium* 8주 등 총 11주를 대상으로 phage typing을 실시하였다. *S. Enteritidis*는 Ward 등(1987)의 방법에 따라 16종의 normal phage set을 이용하였고, *S. Typhimurium*은 Anderson 등(1977)의 방법에 따라 24종의 normal phage set과 5종의 additional phage를 사용하여 동정하였다. 분리균주를 nutrient broth (NB, Merck, Germany)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 균액을 nutrient agar plate (Merck, Germany)에 접종하고 표면의 물기를 건조했다. 또한, NB에서 사전 역가검정을 실시하여 상용시험 희석농도로 조정된 각 type의 phage 용액을 phage applicator로 접종하고 37°C에서 24시간 배양한 후 숙주세포가 각 type의 phage 용액에 의해서 특이적인 반응을 보인 용균양상을 phage형 표준 판독표에 따라 판독하였다. 표준 phage에 대해서 반응은 보이나 5종의 additional phage를 이용하여도 명확히 결정할 수 없는 균주는 RDNC (reacted but did not confirm)로 규정하였다. 시험에 사용된 phage와 type strain은 영국의 International Centre for Enteric Phage Typing (ICEPT), Central Public Health Laboratories (CPHL)에서 분양 받은 것을 사용하였다.

Pulsed-Field gel electrophoresis (PFGE)

PFGE 분석은 제한효소 *Xba*I (20,000 U, Roche, Bio-Rad, USA)을 사용하여 미국질병통제센터(CDC)에서 운영 중인 PFGE network인 'PulseNet'에서 사용되는 PFGE 표준실험법(CDC, 2004)에 따라 실시하였다. PFGE 분석을 위한 전기영동은 0.5×TBE buffer를 사용하여 CHEF-Mapper XA Chiller system (Bio-Rad, Hercules, Calif. USA)으로 6 v/cm, 120°, 15°C, ramped pulse time 2.16~63.8초의 조건으로 18시간 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후 gel은 ethidium bromide

Table 3. Multidrug resistance patterns of 34 *Salmonella* isolates isolated from ducks

No. of antibiotics	Resistance patterns	No. of isolates (%)
7	AM,AMC,CF,KM,SM,NA,TC	1
	Subtotal	1 (2.9)
6	AM,KM,SM,NA,TC,CM	1
	AM,AMC,KM,SM,NA,TC	1
	Subtotal	2 (5.9)
5	AM,KM,SM,NA,TC	1
	AM,AMC,KM,NA,TC	1
	Subtotal	2 (5.9)
4	AM,SM,SXT,CM	1
	AM-KM-NATC	1
	AM-KMC-SM-TC	1
	AM-AMC-SM-TC	1
	Subtotal	4 (11.8)
3	KM-SM-TC	2
	Subtotal	2 (5.9)
1	SM	1
	NA	3
	Subtotal	4 (11.8)
0	Subtotal	19 (55.8)
	Total	34 (100)

Table 4. Plasmid profiles, phage types, PFGE patterns and resistance patterns of the *S. Enteritidis* (n=3) and *S. Typhimurium* (n=8) strains isolated from ducks

No. of strains	Approximate plasmid size (Kb)	Phage type	PFGE pattern	Resistance pattern
SE-2	55	RDNC*	I	NA
SE-23	54	PT32a	II	AM-SM-SXT-CM
SE-31	55	PT1c	III	NA
ST-6	54	RDNC	IV	—
ST-7	54	RDNC	IV	—
ST-9	54	RDNC	V	—
ST-13	54	RDNC	V	—
ST-14	54	RDNC	IV	—
ST-15	54	RDNC	IV	—
ST-27	54	RDNC	V	—
ST-28	54	RDNC	VI	KM-SM-TC

*Reacts with phages but does not confirm.

내었다. 반면 AN, FOX, CTZ, CIP 및 GM에는 전주가 감수성이었다. 한편, 분리 균주별 항균제 내성양상을 보면 *S. Haardt*는 AM, AMC, CF, KM, SM, NA 및 TC 등의 항생제에 내성을 나타내었고 *S. Agona*는 AM, KM, SM, NA, TC, CM에 *S. Enteritidis*는 AM, SM, NA, SXT, CM에 *S. Typhimurium* var. *copenhagen*은 AM, AMC, SM, TC에 *S. Indiana*는 AM, KM, NA,TC

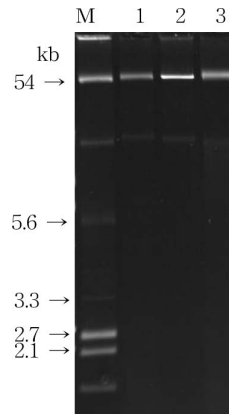


Fig. 1. Plasmid profiles of *S. Enteritidis*. Lane M: *E. coli* V517, lane 1: SE-2, lane 2: SE-23, lane 3: SE-31.

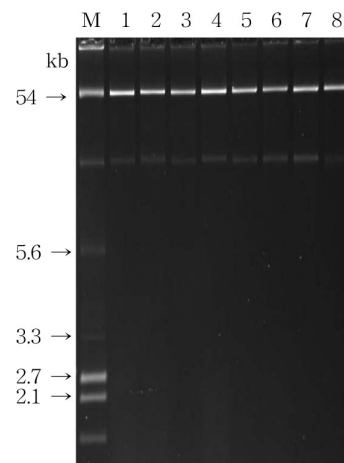


Fig. 2. Plasmid profiles of *S. Typhimurium*. Lane M: Lambda DNA/*Hind* III, lane 1: *E. coli* V517, lane 2: ST-6, lane 3: ST-7, lane 4: ST-9, lane 5: ST-13, lane 6: ST-14, lane 7: ST-15, lane 8: ST-27, lane 9: ST-28.

에 *S. Typhimurium*은 KM, SM, TC 등의 항생제에 내성을 보였다. 반면 *S. Fyris*, *S. Schwabach*, *S. Mbandaka*, *S. London*은 사용된 모든 항생제에 감수성을 나타내었다.

Plasmid profiles, phage typing 및 PFGE

분리된 *S. Enteritidis* 3주 및 *S. Typhimurium* 8주에 대한 plasmid profiles, phage typing 및 PFGE를 실시한 결과는 Table 4 및 Fig. 1~4와 같다. *S. Enteritidis* 3주에 대한 plasmid 양상을 분석한 결과 SE-31은 54 kb, SE-2와 SE-23은 두 균주 공히 55 kb 크기의 plasmid band를 한 개 보유하고 있었고(Table 4, Fig. 1), *S. Typhimurium*의 경우는 전주가 54 kb 크기의 plasmid band를 한 개만 보유하고 있었다(Table 4, Fig. 2). Phage typing 결과 *S. Enteritidis*는 3주 중 2주는 각각 PT32a와 PT1c로 확인되었고 나머지 1주는 phage와 반응은 일어나나 phage type이 확인되지 않은 RDNC로 나타났으며, *S. Typhimurium*은 전주가 RDNC로 확인되

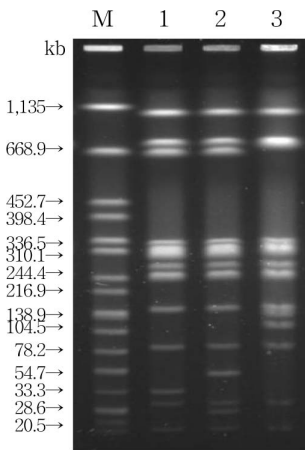


Fig. 3. PFGE patterns of *S. Enteritidis* digested with *XbaI*. Lane M: Marker (*S. Braenderup*), lane 1: SE-2, lane 2: SE-23, lane 3: SE-31.

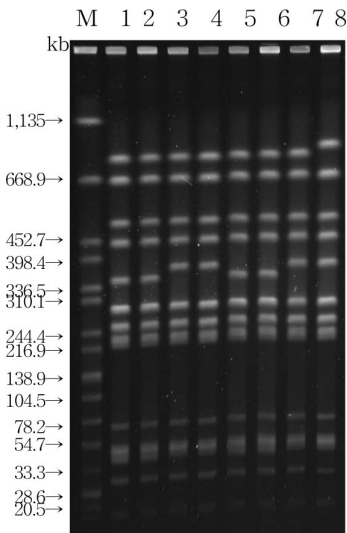


Fig. 4. PFGE patterns of *S. Typhimurium* digested with *XbaI*. Lane M: Marker (*S. Braenderup*), lane 1: ST-6, lane 2: ST-7, lane 3: ST-9, lane 4: ST-13, lane 5: ST-14, lane 6: ST-15, lane 7: ST-27, lane 8: ST-28.

었다(Table 4). 제한효소인 *XbaI*으로 처리하여 PFGE를 실시한 결과 *S. Enteritidis*는 서로 다른 3가지 PFGE pattern으로 구분되었고(Fig. 3) *S. Typhimurium* 또한 3가지의 다른 PFGE pattern으로 구분되었다(Fig. 4).

고 찰

가금류는 사람에서 *Salmonella* 감염의 중요한 보균자로 *Salmonella*에 감염된 가금류는 공중보건학적으로 중요한 문제로 대두하고 있다(Barrow, 1993). 이 연구에서는 대구경북지역에서 사육 중인 오리의 분변으로부터 *Salmonella*속 균을 분리하여 혈청형 및 항균제 내성 양상을 조사하였고 또한 분리된 *Salmonella*속 균 중 식중독균의 대표적인 혈청형인 *S. Typhimurium*과 *S. Enteritidis*에 대하여는 plasmid profile,

phage type 및 PFGE pattern을 분석하였다.

여러 연구자가 오리 유래 *Salmonella*속 균에서 *S. Typhimurium*이 가장 많이 분리됨을 보고하였고(Saitanu 등, 1994; Wray와 Wray, 2000; Tran 등, 2004; Ogasawara 등, 2008), 이번 조사에서도 *S. Typhimurium*이 가장 많이 분리되어 *S. Typhimurium*이 오리에서 가장 많이 분리되는 혈청형임을 알 수 있었다. 반면 Tsai와 Hsiang (2005)은 대만의 오리에서 *S. Potsdam*, *S. Dusseldorf* 및 *S. Indiana*, 우 등(2000a)은 국내 오리에서 *S. Enteritidis*, *S. meleagridis* 및 *S. Typhimurium*이 가장 흔히 분리되는 혈청형으로 보고하여 이번 조사의 결과와 다소 차이가 있었다. 이는 오리 유래 혈청형의 분포양상은 지리적 또는 분리시기에 따라서 다양하게 나타날 수 있음을 시사한다. 이번 실험의 결과 *S. Typhimurium*을 비롯하여 *S. Fyris*, *S. Haardt*, *S. Agona*, *S. Enteritidis*, *S. Mbandaka*, *S. Typhimurium* var. *copenhagen*, *S. Bredeney*, *S. Indiana*, *S. Schwabach* 및 *S. London* 등 다양한 혈청형이 오리에서 분리되었다.

동물에서 항생제 내성 *Salmonella*속 균의 출현은 급속히 증가하고 있는 추세에 있으며, 이들 내성균은 식품을 통하여 사람으로의 전파가 가능하다. 이 연구에서 *S. Agona*, *S. Bredeney*, *S. Enteritidis*, *S. Haardt*, *S. Indiana*, *S. Typhimurium* 및 *S. Typhimurium* var. *copenhagen* 등은 적어도 1종 이상의 약제에 내성을 보였고 *S. Fyris*, *S. London*, *S. Mbandaka* 및 *S. Schwabach*는 사용된 항생제 모두에서 감수성을 보여 항생제 내성은 혈청형에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다. *S. Typhimurium*에서 항생제 내성은 급속히 증가하고 있는 반면 *S. Enteritidis*는 사용된 많은 종류의 항생제에 감수성을 나타낸다고 보고 되고 있으나(Carlson 등, 1999), 이번 조사에서 *S. Typhimurium* 1주가 KM, SM, TC 등 3종의 약제에 내성을 보였을 뿐 나머지 균주는 모두 사용된 약제에 감수성을 나타내어 다소 차이가 있었다. 반면 *S. Haardt*의 경우 다른 혈청형에 비해 높은 다제 내성을 보였고 이에 관하여는 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다. 이번 조사에서 높은 내성은 SM, TC, KM, NA, AM 등과 같이 오래 전부터 사용된 항생제에서 볼 수 있었으며, AN, CF, FOX, CTX, CM, CIP, GM 및 SXT 같은 항생제에는 내성을 나타내지 않거나 비교적 낮은 내성률을 보였다. 최근까지 국내 오리에서 분리된 *Salmonella* 균의 항생제 내성양상에 관한 보고는 Yang 등(2002)이 오리에서 분리한 *S. Typhimurium* 1주에서 SM, sulfisoxazole 및 TC에 대한 내성을 보고

하였을 뿐 전무후무한 실정이어서 오리 유래 *Salmonella*속 균에서 항생제 내성양상을 비교하는 것은 불가능하였다. 따라서 이번 조사의 결과를 국내 닭 유래에서 분리된 *Salmonella*속 균의 항생제 내성양상과 비교해 볼 때 대부분 연구자들이 SM과 TC에 높은 내성을 보고하여(정 등, 2007; Cheong 등, 2007; 양 등, 2009), *Salmonella* 균의 항생제 내성양상은 닭과 오리에서 유사한 경향이였다. 한편 Tsai와 Hsiang (2005)은 대만의 오리 유래 *Salmonella*속 균에서 TC, Josamycin/Trimethoprim, SXT, doxycycline, amoxicillin 등에 높은 내성을 보고하여 TC에 대하여는 이번 조사와 유사하였으나 Josamycin/Trimethoprim, SXT, doxycycline, amoxicillin 등의 항생제에 대하여는 이번 조사의 결과와는 다소 차이가 있었다. 이는 실험에 사용한 항생물질의 종류 및 국가별로 사용하는 약제가 다른 것에 기인한 것으로 생각된다. 반면 Ogasawara 등(2008)은 베트남의 오리에서 oxytetracycline과 CM에 각각 4%의 내성률을 보고하였을 뿐 나머지 항생제에 대하여는 감수성을 보고하였다. 소, 돼지 닭 같은 식용동물에서 항생제에 대한 높은 내성은 질병의 치료 및 성장촉진을 위한 사료첨가제의 사용과 연관성이 있으나, 오리 유래에서 항생제 내성 *Salmonella* 균의 출현은 오리가 항균제에 오염된 먹이를 섭취하거나 일부 농장에서 닭과 오리를 함께 사육하고 있어 오리가 항생제가 첨가된 사료를 섭취하는 것과 연관성이 있을 거라고 생각된다.

Plasmid profiles, phage typing 및 항생제 내성 양상은 *Salmonella*속 균의 역학적 연구를 위해 사용되어지고 있다.

이번 조사에서 *S. Enteritidis*의 plasmid 양상을 비교해 볼 때 3주 모두 plasmid band의 수는 각각 1개로 같았으나 이들의 크기는 3주 중 2주는 동일하였고 나머지 1주는 다소 차이가 인정되었다. 반면 *S. Typhimurium*의 경우 전주가 동일한 크기의 plasmid를 한 개만 보유하고 있어 분리주간 역학적으로 서로 연관성이 있는 것으로 생각된다. Brunner 등(1983)은 *Salmonella*의 역학적 연구에 plasmid 양상과 항생제 감수성 관계를 비교한 결과 plasmid의 종류가 달라도 약제내성은 같을 수 있다고 하였으나 이번 연구에서는 plasmid의 양성이 같은 2주는 동일한 약제에 내성을 보였지만 plasmid의 양성이 다른 나머지 1주는 항생제 내성 양상에 있어서 다소 차이가 있어 상이한 결과를 얻었다.

S. Enteritidis PT4는 영국을 포함한 유럽, 일본 및

대만 등 세계 여러 나라에서 가장 유행하고 있는 phage type 이다(Ward 등, 1987; Threlfall 등, 1993; Terajima 등, 1998; Tsen과 Lin, 2001). Maré 등(2000)은 남아프리카공화국의 닭에서 PT4가 가장 많고 사람과 오리 등 가축에서는 PT34가 가장 분리 빈도가 높다고 보고하였다. 국내에서 우 등(2000b)은 1993년부터 1999년까지 동물과 사람에서 유래한 *S. Enteritidis*에서 PT4가 가장 많고 다음은 PT7, PT7a, PT1 순이라고 하였고, 오리 유래에서 PT1, PT4, PT7, PT7a 및 PT19를 보고하였다. 김 등(2001)은 돼지에서 PT4, Kim 등(2008)과 Kang 등(2009)은 닭과 사람에서 PT1과 PT21, Yang 등(2002)은 국내 동물에서 PT1이 가장 흔한 phage type이라고 보고하였다. 이번 조사에서 오리 유래 *S. Enteritidis*에서 PT32a와 PT1c가 분리되었으며 국내 오리에서 이들 phage type은 처음으로 확인되었다. 특히 PT1c는 NA를 제외한 대부분의 약제에 감수성을 보였으나, PT32c는 다제내성균으로 두 균주사이 phage type과 항생제 내성은 상당한 차이가 인정되었다. 반면 *S. Typhimurium*의 경우 전주가 RDNC로 확인되었으며, Yang 등(2002)도 오리 유래 *S. Typhimurium* 1주에서 RDNC를 보고한 바 있다. 사람과 동물유래 *S. Typhimurium*에서 전 세계적으로 가장 많이 분리되는 phage type은 DT104, DT193, U302 등이다(Carlson 등, 1999; van Duijkeren 등, 2002; 이 등, 2009; 질병관리본부, 2010). 이번 조사에서 적용한 시료수가 너무 적어 대구·경북지역에서 분리된 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*에서 유행하는 phage type은 확인할 수 없었으며 이를 확인하기 위해 더욱 많은 시료를 적용해야 될 것으로 생각되었다.

PFGE는 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*의 특성을 위한 역학적 도구로 가장 우수하여 genotyping 보다 더 나은 식별력을 나타낸다고 한다(Ridley 등, 1998; Guerra 등, 2002). Tenover 등(1995)은 PFGE pattern은 야외 분리주들 사이에서 역학적으로 연관되지 않는 주들을 구별할 수 있고, 점돌연변이, DNA 결손이나 삽입 시 PFGE pattern은 명확히 변화한다고 하였으며, DNA fragment가 2~3개 차이가 있을 때 밀접한 관련이 있고, 4~6개의 차이가 있을 때는 역학적으로 관련 가능성이 있고, 7개 이상 차이가 있을 때는 역학적으로 분명히 다르다고 하였다. 이번 연구에서도 *S. Enteritidis*는 3개의 서로 다른 PFGE pattern으로 구분되었으며 plasmid profile이 동일한 SE-2와 SE-31은 PFGE 결과 두 균주 간에 3개의 band 차이를 보여 역학적으로는 관련 가능성이 있을 것으로 생각된다. *S.*

Typhimurium의 경우 공시균 모두 plasmid profile은 동일하였고 phage type은 RDNC로 확인되어 분리주들 사이에서 차이를 발견할 수 없었으나 PFGE를 실시한 결과, 서로 다른 3개의 PFGE pattern으로 구분되었고 각각의 pattern은 서로 1~2개의 fragment 차이를 보여 역학적으로 밀접한 관련주들임을 알 수 있었다. 한편 Tassios 등(1999)은 PFGE는 *S. Typhimurium* 분리주들 사이에 clonal 관계와 역학적 동정에 성공적으로 사용될 수 있고 phage typing과 일치하거나 변별력이 있다고 하였다. 이번 연구에서도 *S. Enteritidis* 보다 *S. Typhimurium*의 역학조사에 있어 PFGE 분석법이 plasmid profile과 phage typing 보다 더 변별력이 있는 것으로 확인되었다.

이번 조사에서 대구경북지역 오리 사육농장에서 식중독의 대표적인 혈청형인 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium* 같은 다양한 혈청형의 *Salmonella* 균이 분포하고 있는 것으로 조사되었다. 향후 국내에서 오리 고기의 지속적인 소비 증가가 예상되며 오리고기의 섭취로 인한 *Salmonella* 식중독 발생건수 또한 증가할 수 있다. 이에 대한 대책으로 우선 국내 오리 사육농장을 대상으로 식중독의 주요 원인균인 *Salmonella* 균에 대한 감염실태 조사와 더불어 이들 분리주에 대하여는 PFGE 등의 분자유전학적 분석법을 활용한 광범위한 연구조사가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

2007년 3월부터 2008년 8월까지 대구경북지역 오리농장에서 사육중인 오리의 분변에서 *Salmonella*속 균을 분리하여 혈청형 및 항균제 내성양상을 조사하고 또한 분리된 *S. Enteritidis* 3주 및 *S. Typhimurium* 8주에 대하여는 plasmid profile, phage typing 및 PFGE 분석을 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

총 127개 농장 207건을 검사한 결과 21개 농장 (16.5%, 21/127 농장)에서 34주(16.4%)의 *Salmonella*속 균이 분리되었다.

34주의 *Salmonella* 분리주에 대한 serotyping 결과 *S. Typhimurium* 8주, *S. Fyris* 6주, *S. Haardt* 4주, *S. Agona*, *S. Enteritidis* 및 미동정이 각각 3주, *S. Mbandaka* 2주 *S. Typhimurium* var. *copenhagen*, *S. Bredeney*, *S. Indiana*, *S. Schwabach* 및 *S. London*이 각각 1주의 순으로 조사되었다.

항균제 감수성시험 결과 44.1% (15주)가 적어도 한

가지 이상의 약제에 내성을 나타내었고 분리균의 내성률은 SM (32.4%)에 가장 높았고 다음 TC (29.4%), AM, KM 및 NA (각각 26.5%) 순이었으며, AN, FOX, CTX, CIP 및 GM에 대해서는 모든 균주가 감수성이었다.

*S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*에 대한 plasmid profile을 실시한 결과 전주가 대략 54~55 kb 크기의 plasmid band를 한 개만 보유하고 있었고, phage typing에 의해 *S. Enteritidis* 2주에서 PT32a와 PT1c가 각각 1주씩 분리되었으며, PFGE 결과 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*은 각각 3개의 서로 다른 PFGE pattern으로 구분되었다.

참 고 문 헌

- 김상윤, 이희무, 김신, 홍현표, 권현일. 2001. 경북지역 가축에서 분리한 *Salmonella typhimurium*과 *S. enteritidis*의 phage typing 및 pulsed-field gel electrophoresis. 한국가축위생학회지 24: 243-253.
- 양하영, 이성모, 박은정, 김정희, 이정구. 2009. 인천지역 닭 도축장에서 분리된 *Salmonella* spp.의 항생제 내성 및 PFGE 패턴분석. 한국가축위생학회지 32: 325-334.
- 우용구, 박미선, 우승룡, 김봉환, 김재학. 2000b. 한국의 동물과 사람에서 분리한 *Salmonella enteritidis*의 phage types. 대한수의학회지 40: 515-524.
- 우용구, 이희수, 이영주, 강민수, 김봉환, 김재학. 2000a. 우리나라의 가금과 환경에서 분리한 *Salmonella* species의 특성. 대한수의학회지 40: 505-514.
- 이우원, 정병렬, 이강록, 이동수, 김용환. 2009. 소와 돼지유래 다제내성 *Salmonella*속 균의 분자유전학적 특성. 한국가축위생학회지 32: 61-75.
- 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: 51-56.
- 질병관리본부. 2010. 2009년도 우리나라 급성실사질환 유발 원인 세균의 분리현황 및 특성. Public health Weekly Report 3: 545-552.
- Anderson ES, Ward LR, Saxe MJ, de Sa JD. 1977. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. J Hyg(Lond) 78: 297-300.
- Barrow PA. 1993. *Salmonella* control-past, present and future. Avian Pathol 22: 651-669.
- Brunner F, Margadant A, Peduzzi R, Piffaretti JC. 1983. The plasmid pattern as an epidemiologic tool for *Salmonella typhimurium* epidemics: comparison with the lysotype. J Infect Dis 148: 7-11.
- Carlson SA, Bolton LF, Briggs CE, Hurd HS, Sharma VK, Fedorka-Cray PJ, Jones BD. 1999. Detection of multi-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 using multi-

- plex and fluorogenic PCR. *Mol Cell Probes* 13: 213-222.
- CDC, PulseNet. 2004. Standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, non-typhoidal *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). http://www.cdc.gov/pulsenet/protocols/ecoli_salmonella_shigella_protocols.pdf.
- Cheong HJ, Lee YJ, Hwang IS, Kee SY, Cheong HW, Song JY, Kim JM, Park YH, Jung JH, Kim WJ. 2007. Characteristics of non-typhoidal *Salmonella* isolates from human and broiler-chickens in southwestern Seoul, Korea. *J Korean Med Sci* 22: 773-778.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test, Approved standard, 10th ed. CLSI document M02-A10. Wayne, Pennsylvania.
- Ewing W. 1986. Edward and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th ed. pp. 27-45. Elsevier Science Publishing Co. New York.
- Gast RK. 2008. *Salmonella* infections. pp. 619-674. In: Saif YM, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Nolan L(ed.). *Disease of Poultry*. 12th ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa.
- Gatto AJ, Peters TM, Green J, Fisher IS, Gill ON, O'Brien SJ, Maguire C, Berghold C, Lederer I, Gerner-Smidt P, Torpdahl M, Siitonen A, Lukinmaa S, Tschäpe H, Prager R, Luzzi I, Dionisi AM, VAN DER Zwaluw WK, Heck M, Coia J, Brown D, Usera M, Echeita A, Threlfall EJ. 2006. Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 4 and *S. Typhimurium* definitive phage type 104 in nine European countries. 2000-2004: results of an international multi-centre study. *Epidemiol Infect* 134: 729-736.
- Guerra B, Schrörs P, Mendoza MC. 2000. Application of PFGE performed with *Xba*I to an epidemiological and phylogenetic study of *Salmonella* serotype typhimurium. Relations between genetic types and phage types. *New Microbiol* 23: 11-20.
- Kado CI, Liu ST. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 145: 1365-1373.
- Kang ZW, Jung JH, Kim SH, Lee BK, Lee DY, Kim YJ, Lee JY, Won HK, Kim EH, Hahn TW. 2009. Genotypic and phenotypic diversity of *Salmonella enteritidis* isolated from chickens and humans in Korea. *J Vet Med Sci* 71: 1433-1438.
- Kessel AS, Gillespie IA, O'Brien SJ, Adak GK, Humphrey TJ, Ward LR. 2001. General outbreaks of infectious intestinal disease linked with poultry, England and Wales, 1992-1999. *Commun Dis Public Health* 4: 171-177.
- Kim SH, Kim S, Chun SG, Park MS, Park JH, Lee BK. 2008. Phage types and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from humans and chickens. *J Microbiol* 46: 209-213.
- Kimura AC, Reddy V, Marcus R, Cieslak PR, Mohle-Boetani JC, Kassenborg HD, Segler SD, Hardnett FP, Barrett T, Swerdlow DL, Emerging Infections Program FoodNet Working Group. 2004. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in the United States: a case-control study in FoodNet sites. *Clin Infect Dis* 38 Suppl 3: S244-S252.
- Maré L, Van Der Walt ML, Dicks LM. 2000. Phage types of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated in South Africa from 1991-1995. *Onderstepoort J Vet Res* 67: 129-133.
- Murase T, Okitsu T, Suzuki R, Morozumi H, Matsushima A, Nakamura A, Yamai S. 1995. Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiologic tool for *Salmonella* infections. *Microbiol Immunol* 39: 673-676.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2003. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 8th informational supplement: approved standard M2-A8. NCCLS, Wayne, PA, USA.
- Ogasawara N, Tran TP, Ly TL, Nguyen TT, Iwata T, Okatani AT, Watanabe M, Taniguchi T, Hirota Y, Hayashidani H. 2008. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* from domestic animals, food and human in the Mekong Delta, Vietnam. *J Vet Med Sci* 70: 1159-1164.
- 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.
- Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B. 1998. Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 36: 2314-2321.
- Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B. 1990. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? *Epidemiol Infect* 105: 21-27.
- Saitanu K, Jerngklinchan J, Koowatananukul C. 1994. Incidence of salmonellae in duck eggs in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 25: 328-331.
- Tassios PT, Gazouli M, Tzelepi E, Milch H, Kozlova N, Sidorenko S, Legakis NJ, Tzouveleki LS. 1999. Spread of a *Salmonella typhimurium* clone resistant to expanded-spectrum cephalosporins in three European countries. *J Clin Microbiol* 37: 3774-3777.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33: 2233-2239.
- Terajima J, Nakamura A, Watanabe H. 1998. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* Enteritidis isolates in Japan by phage-typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol Infect* 120: 223-229.
- Threlfall EJ, Rowe B, Ward LR. 1993. A comparison of multiple drug resistance in salmonellas from humans and food animals in England and Wales, 1981 and 1990. *Epidemiol Infect* 111: 1-11.

- miol Infect 111: 189-197.
- Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. 1988. Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8th ed. pp. 74-86. Cornell University Press, Ithaca and London.
- Tran TP, Ly TL, Nguyen TT, Akiba M, Ogasawara N, Shinoda D, Okatani TA, Hayashidani H. 2004. Prevalence of *Salmonella* spp. in pigs, chickens and ducks in the Mekong Delta, Vietnam. J Vet Med Sci 66: 1011-1014.
- Tsai HJ, Hsiang PH. 2005. The prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* and *Campylobacter* in ducks in Taiwan. J Vet Med Sci 67: 7-12.
- Tsen HY, Lin JS. 2001. Analysis of *Salmonella* enteritidis strains isolated from food-poisoning cases in Taiwan by pulsed field gel electrophoresis, plasmid profile and phage typing. J Appl Microbiol 91: 72-79.
- van Duijkeren E, Wannet WJ, Houwers DJ, van Pelt W. 2002. Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. J Clin Microbiol 40: 3980-3985.
- Ward LR, de Sa JD, Rowe B. 1987. A phage-typing scheme for *Salmonella* enteritidis. Epidemiol Infect 99: 291-294.
- WHO. 2003. Joint FAO/OIE/WHO 2nd Workshop on Non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance, scientific assessment. Genova, 1-5 December.
- Wray C, Wray A. 2000. *Salmonella* in domestic animals. pp. 157-167. CABI Publishing. New York, USA.
- Yang SJ, Park KY, Kim SH, No KM, Besser TE, Yoo HS, Kim SH, Lee BK, Park YH. 2002. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. Vet Microbiol 86: 295-301.