

<Original Article>

돼지유래 *Salmonella* Schwarzengrund의 약제내성 유전자에 관한 연구

이우원¹ · 김상현² · 이승미¹ · 이강록¹ · 이기훈¹ · 김용환^{3*}

¹부산광역시 보건환경연구원 축산물위생검사소, ²한국생명공학연구원, ³경상대학교 수의과대학

Investigation on antimicrobial resistance genes of *Salmonella* Schwarzengrund isolated from pigs

Woo-Won Lee¹, Sang-Hyun Kim², Seung-Mi Lee¹, Gang-Rok Lee¹,
Gi-Heun Lee¹, Yong-Hwan Kim^{3*}

¹Veterinary Service Laboratory, Busan Metropolitan City Institute of Health and Environment, Busan 616-810, Korea

²Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

³College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

(Received 15 February 2012; revised 5 March 2012; accepted 12 March 2012)

Abstract

To detect the virulence genes (*invA* and *spvC*) and antimicrobial resistance genes, polymerase chain reaction (PCR) was carried out using total 67 strains of *S. Schwarzengrund* isolated from pigs. As results, *invA* was detected from all 67 strains of *S. Schwarzengrund*, however, *spvC* was not at all. All 12 strains with ampicillin resistance, 15 strains with chloramphenicol resistance, 9 strains with kanamycin resistance, 1 strain with sulfamethoxazole/trimethoprim resistance, and 66 (98.5%) of 67 strains with tetracycline resistance carried TEM (β -lactamase *bla*_{TEM}), *cmlA* (nonenzymatic chloramphenicol resistance), *aphA1-Iab* (aminoglycoside phosphotransferase), *sullI* (dihydropteroate synthase), and *tetA* (class A tetracycline resistance), respectively. All 63 strains with streptomycin resistance carried 3 aminoglycoside resistance genes, including *aadA* (aminoglycoside adenylyltransferase), *strA*, and *strB* (streptomycin phosphotransferase). With respect to prevalence of antibiotic resistance genes occurred in *S. Schwarzengrund*, genes for *strB* (46.0%); *strA* and *strB* (30.2%); *aadA*, *strA*, and *strB* (9.5%); *strA* (7.9%); *aadA* and *strB* (3.2%); and *aadA* (3.2%) were detected by PCR.

Key words : *S. Schwarzengrund*, Virulence PCR, Antimicrobial resistance, Integrase

서 론

*Salmonella*속 균은 그람음성의 통성 혐기성 세포 내 기생세균으로서 사람과 동물을 비롯하여 자연계에 널리 분포하고 있다. 이들 균에 감염되면 설사, 쇠약, 발열 및 패혈증 등의 전신성 증상을 일으키며, 특이성이 있는 몇몇 균종을 제외한 대부분의 균 속이

인수공통전염병의 원인세균으로 알려졌다(Edwards와 Galton, 1967).

항생제는 각종 세균성 감염증의 치료와 가축의 발육촉진을 목적으로 사용함으로써 항생제 오·남용에 의한 약제내성균이 선택적으로 증가하여 세균성 감염증의 치료 및 예방에 많은 문제점을 일으키고 있다(Chen 등, 2004; Gebreyes와 Altier, 2002). 살모넬라 감염증의 역학적 연구는 serotype, 생물형, 약제내성형 그리고 phage type 등의 조사를 비롯하여 근년에는

*Corresponding author: Yong-Hwan Kim, Tel. +82-55-751-5820,
Fax. +82-55-751-5803, E-mail. yho157@nongae.gsnu.ac.kr

plasmid profile과 polymerase chain reaction (PCR) 기법을 기초로 한 분자유전학적 분석 및 제한효소 처리에 의한 DNA의 절단 양상 등을 분석하여 역학관계를 규명하고 있다(Gahring 등, 1990). 증가추세에 있는 약제내성 *Salmonella*속 균의 역학적 분석은 분자생물학의 발전과 함께 다각도로 진행되고 있다.

다양한 세균의 역학적 분석기법으로 활용되고 있는 분자유전학적 기법은 약제내성 *Salmonella*속 균, 특히 *S. Typhimurium* DT104의 특성 규명에도 이용되고 있다. 서로 다른 약제내성유전자를 가지고 integron을 구성하고 있는 *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) 다제내성 부위는 *S. Typhimurium* DT104, *S. Agona*, *S. Albany*, *S. Meleagridis* 그리고 *S. Newport*의 염색체 유전자에서 발견되며, *S. Typhimurium* U302, DT120, *S. Agona*, *S. Albany* 그리고 *S. Newport*에서 다제내성 *S. Typhimurium* DT104에서 검출되는 약제내성유전자와 유사한 내성유전자가 검출되었다(Randall 등, 2004). 최근에는 *S. Typhimurium* DT104 다제내성 profile이 싱가포르의 열대어로부터 *S. Patatyphi* B에 존재하는 SGI1내에서 검출되었다. 이들 자료에 의한 결과는 다른 *Salmonella*속 균의 serotype에서도 다제내성률이 증가하고 있음을 보여주고 있다(Randall 등, 2004).

PCR 기법을 이용하여 다제내성 ACSSuT *S. Typhimurium* DT104에 대한 연구는 물론 *Salmonella*속 균의 다른 serotype에 대해서도 약제내성유전자의 연구, 즉 β -lactams 계열인 ampicillin과 amoxicillin 내성유전자(TEM과 PSE-1), chloramphenicol 내성유전자(*cat1*, *cat2*, *cat3*, *cmlA* 그리고 *catB*), florfenicol 내성유전자(*flo*), streptomycin 내성유전자(*aadA*, *aadB*, *strA* 그리고 *strB*), sulfonamides 내성유전자(*sulA*, *sulB*, *sulI*, *sulII* 그리고 *sulIII*), tetracycline 내성유전자(*tetA*, *tetB*, *tetG* 그리고 *tetR*), integron capture, mobile gene 그리고 약제내성과 관계있는 *int* 유전자 등 약제내성 관련 유전자를 검색하는 등 연구가 활발하게 수행되고 있다(Chen 등, 2004; Randall 등, 2004; Pezzella 등, 2004; Gebreyes와 Altier, 2002; Carlson 등, 1999). 또한, 장점막 침습성에 관련된 virulence gene인 *invA*와 숙주 세포 내에서 *Salmonella*속 균의 성장을 증가시키고 숙주 면역체계와 상호작용하는 *spvC*에 관한 연구도 많이 이루어지고 있다(Khan 등, 2000; Bolton 등, 1999; Chiu와 Ou, 1996; Swamy 등, 1996).

그러나 국내에서 *Salmonella*속 균의 약제내성유전자에 대한 연구실적을 보면 이 등(2009b)이 소와 돼

지유래 β -lactams (ampicillin과 amoxicillin) 내성 *S. Typhimurium* 49주 중 47주에서 TEM 유전자를 검출 보고한 바 있고, Yang 등(2001)이 돼지로부터 분리한 ampicillin 내성 *S. Typhimurium* 4주, *S. Enteritidis* 2주에서 TEM 유전자를, 김(2000)은 돼지유래 ampicillin 내성 *S. Typhimurium* 2주에서 PSE-1 유전자를 검출한 바 있으나 *Salmonella*속 균의 약제내성유전자에 대한 연구는 유럽, 미국 및 캐나다 등과 비교해 볼 때 매우 미미한 실정일 뿐만 아니라, 약제내성유전자 검출 또한, β -lactamase에 한정되어 있다.

따라서 이 실험에서는 *Salmonella*속 균에 대한 역학조사의 일환으로 이 등(2009a)이 소와 돼지에서 분리한 34종의 serotype 457주 중 분리율이 3위이고 약제내성률이 두 번째로 높은 *S. Schwarzengrund* 67주에 대해서 PCR 기법을 이용하여 virulence gene인 *invA*와 *spvC*, ACKSSuT 내성 관련 유전자 그리고 내성 유전자 카세트에 알려진 *int* 검출을 시도하였다.

재료 및 방법

공시균주

공시균주는 이 등(2009a)이 2000년 12월부터 2001년 11월까지 부산지역 도축장에 출하된 소의 맹장내용물(799건), 맹장림프절(965건)과 돼지 맹장내용물(1,118건) 그리고 회맹결장림프절(2,732건)에서 총 5,614건의 시료에서 분리한 34종의 serotype 457주 중 돼지에서 분리한 67주의 *S. Schwarzengrund*를 사용하였다.

PCR

PCR은 이 등(2009a)이 돼지에서 분리한 *S. Schwarzengrund* 67주에 대해서 실시하였다. PCR에 사용된 표준균주는 미국 워싱턴 주립대학교에서 분양받은 *S. Typhimurium* WSU 2562와 2664 (내성유형 ACKSSuT, phage type DT104) 그리고 미국 코넬대학교에서 분양받은 *S. Typhimurium* Cornell 7 (내성유형 ACSSuT, phage type DT104)을 사용하였다. 공시된 균주로부터 genomic DNA 추출은 이 등(2009b)의 방법에 따라 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 사용하였다. PCR에 사용된 oligonucleotide primer의 염기서열, 증폭산물의 크기 그리고 온도는 Table 1

Table 1. Synthetic oligonucleotides used as primers for PCR

Antimicrobials	Primer (gene)	Sequence (5'→3')	Size (bp)	Tm (°C)	Reference							
	<i>invA</i> F	ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT	244	56	Chiu and Ou (1996)							
	<i>invA</i> R	AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT										
	<i>spvC</i> F	ACT CCT TGC ACA ACC AAA TGC GGA	571	56		Chiu and Ou (1996)						
	<i>spvC</i> R	TGT CTT CTG CAT TTC GCC ACC ATCA										
	Ampicillin	<i>int</i> F	CCT CCC GCA CGA TGA TC	280			56	Bolton et al (1999)				
		<i>int</i> R	TCC ACG CAT CGT CAG GC									
TEM F		GCA CGA GTG GGT TAC ATC GA	310	56	Carlson et al (1999)							
TEM R		GGT CCT CCG ATC GTT GTC AG										
PSE-1 F		TTT GGT TCC GCG CTA TCTG	150	56		Carlson et al (1999)						
PSE-1 R		TAC TCC GAG CAC CAA ATC CG										
Chloramphenicol	<i>cat1</i> F	CTT GTC GCC TTG CGT ATA AT	508	55			Chen et al (2004)					
	<i>cat1</i> R	ATC CCA ATG GCA TCG TAA AG										
	<i>cat2</i> F	AAC GGC ATG ATG AAC CTG AA	547	55	Chen et al (2004)							
	<i>cat2</i> R	ATC CCA ATG GCA TCG TAA AG										
	<i>cat3</i> F	ATC GGC ATC GTT TAC CAT GT	531	55		Chen et al (2004)						
	<i>cat3</i> R	ATC CCC TTC TTG CTG ATA TT										
	<i>cmlA</i> F	CGC CAC GGT GTT GTT GTT AT	394	55				Chen et al (2004)				
	<i>cmlA</i> R	GCG ACC TGC GTA AAT GTC AC										
	<i>cmlB</i> F	ACT CGG CAT GGA CAT GTA CT	840	55					Chen et al (2004)			
	<i>cmlB</i> R	ACG GAC TGC GGA ATC CAT AG										
	<i>flo</i> F	CTG AGG GTG TCG TCA TCT AC	673	55						Chen et al (2004)		
	<i>flo</i> R	GCT CCG ACA ATG CTG ACT AT										
	Kanamycin	<i>aphA1-Iab</i> F	AAA CGT CTT GCT CGA GGC	500							53	Gebreyes and Altier (2002)
		<i>aphA1-Iab</i> R	CAA ACC GTT ATT CAT TCG TGA									
Streptomycin	<i>aadA</i> F	GTG GAT GGC GGC CTG AAG CC	528	53			Gebreyes and Altier (2002)					
	<i>aadA</i> R	AAT GCC CAG TCG GCA GCG										
	<i>strA</i> F	CTT GGT GAT AAC GGC AAT TC	548	53	Gebreyes and Altier (2002)							
	<i>strA</i> R	CCA ATC GCA GAT AGA AGG C										
	<i>strB</i> F	ATC GTC AAG GGA TTG AAA CC	509	53		Gebreyes and Altier (2002)						
	<i>strB</i> R	GGA TCG TAG AAC ATA TTG GC										
Sulfonamides	<i>sulA</i> F	CAC TGC CAC AAG CCG TAA	360	53			Gebreyes and Altier (2002)					
	<i>sulA</i> R	GTC CGC CTC AGC AAT ATC										
	<i>sull</i> F	TCA CCG AGG ACT CCT TCT TC	331	55	Chen et al (2004)							
	<i>sull</i> R	CAG TCC GCC TCA GCA ATA TC										
	<i>sullI</i> F	CCT GTT TCG TCC GAC ACA GA	435	55		Chen et al (2004)						
	<i>sullI</i> R	GAA GCG CAG CCG CAA TTC AT										
Tetracycline	<i>tetA</i> F	GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC	210	53			Gebreyes and Altier (2002)					
	<i>tetA</i> R	CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG										
	<i>tetB</i> F	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	659	53	Gebreyes and Altier (2002)							
	<i>tetB</i> R	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG										
	<i>tetG</i> F	CAG CTT TCG GAT TCT TAC GG	844	53		Gebreyes and Altier (2002)						
	<i>tetG</i> R	GAT TGG TGA GGC TCG TTA GC										

에서와 같이 *invA* 등 21종을 Bioneer (Korea)에 합성 의뢰하여 사용하였고 증폭은 T-gradient (Biometra, Germany)를 이용하였다.

invA, *spvC* 및 약제내성 관련 유전자

invA, *spvC* 및 약제내성 관련 유전자 검출을 위한 PCR은 이 등(2009b), Chen 등(2004) 그리고 Gebreyes

와 Altier (2002)의 방법을 수정 보완하여 10× PCR buffer 2.5 μl, 각 10 mM dNTP 0.5 μl, template DNA 1 μl, 20 pM primer 0.5 μl, *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan)를 포함하여 최종량이 25 μl가 되게 하였다. PCR은 95°C에서 2분간 denaturation시킨 후, 95°C에서 20초, 53°C, 55°C 또는 56°C에서 40초, 72°C에서 1분 조건으로 총 35 cycle을 수행한 다음 72°C에서 5분간 extension시켰다(Table 1).

증폭산물의 확인

PCR에 의해서 증폭된 산물은 이 등(2009b)의 방법에 준하여 loading buffer (30% glycerol, 50 mM EDTA, 0.025% bromophenol blue in 50 mM Tris · HCl, pH 8.5) 와 2 : 1로 혼합하여 2.0% agarose (Sigma, USA) gel상에 loading하고 TBE buffer (40 mM Tris, 20 mM boric acid, 1 mM EDTA; Invitrogen) 하에서 120~140 volt로 약 1시간 동안 전기영동을 실시하였다. Agarose (Sigma, USA) gel을 0.5 µl/ml의 ethidium bromide (Gibco, USA) 용액으로 염색시킨 후 UV transilluminator (Hofer, USA) 를 사용하여 DNA산물 확인하였다. Marker로는 ØX174 DNA/*Hinf* I Markers (Promega, USA)를 사용하였다.

결 과

PCR에 의한 유전자의 검출률

***invA*와 *spvC* 유전자:** 돼지에서 분리한 *S. Schwarzengrund* 67주에 대하여 virulence gene (*invA*와 *spvC*)을

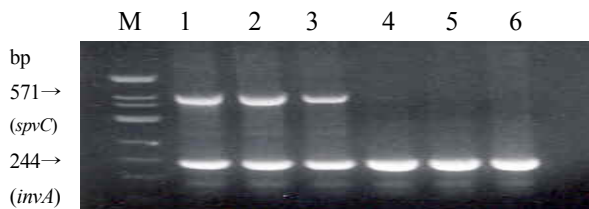


Fig. 1. Duplex PCR products amplified from *S. Schwarzengrund* strains using two pairs of primers (*invA* and *spvC*). M: ØX174 DNA/*Hinf*I Markers (Promega), lane 1: WSU 2562, lane 2: WSU 2664, lane 3: Cornell 7, lane 4~6: *S. Schwarzengrund* strains.

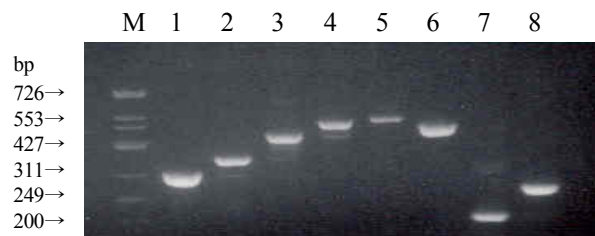


Fig. 2. PCR amplification of antimicrobial resistance genes from 3 strains of resistance type ACKST *S. Schwarzengrund*. M: ØX174 DNA/*Hinf*I Markers (Promega), lane 1: TEM (310 bp), lane 2: *cmlA* (394 bp), lane 3: *aphA1-Iab* (500 bp), lane 4: *aadA* (528 bp), lane 5: *strA* (548 bp), lane 6: *strB* (509 bp), lane 7: *tetA* (210 bp), lane 8: *int* (280 bp).

검출하고자 duplex PCR을 실시한 결과 *invA* 유전자는 모든 균주에서 검출되었으나 *spvC* 유전자는 모든 균주에서 검출되지 않았다.

약제내성 관련 유전자

약제내성유전자별 *S. Schwarzengrund*의 균주 수: *S. Schwarzengrund* 67주에 대하여 각각의 약제내성 관련 유전자를 검출한 결과 TEM 유전자 등 9종의 내성유전자가 검출되었고, 약제내성유전자별 *S. Schwarzengrund*의 균주 수는 *tetA* 유전자는 66주에서 검출되어 가장 높은 검출률을 보였으며, streptomycin 내성 관련 유전자는 *strB* 56주, *strA* 30주 그리고 *aadA* 10주가 검출되었다. 또한, 약제내성과 관련 있는 *int* 유전자도 15주에서 검출되었다(Fig. 1~3).

***S. Schwarzengrund* 균주별 약제내성유전자의 검출:** ACKSSuT 약제에 대하여 내성을 나타내는 *S. Schwarzengrund* 균주별 약제내성유전자의 검출 결과는 Table 2에서와 같이 ACKSSu에 대하여 내성을 나타내는 모든 균주에서 각각의 약제에 대한 내성 유전자가 검출되었는데, 검출된 유전자는 ampicillin 내성 12주에서 TEM, chloramphenicol 내성 15주에서 *cmlA*, kanamycin 내성 9주에서 *aphA1-Iab*, sulfamethoxazole/trimethoprim 내성 1주에서 *sulIII*가 검출되었으며, streptomycin 내성은 63주에서 6종의 유전자 검출형으로 나타났는데, 그 중 *strB* 단독 검출이 29주(46.0%)로써 가장 높은 검출률을 나타내었고, *strA*와 *strB*가 19주(30.2%), *aadA*, *strA* 그리고 *strB* 검출형은 6주(9.5%) 등으로 나타났다. 또한, tetracycline 내성 67주 중 66주(98.5%)에서 *tetA*가 검출되었으며, *int*는 15주에서 검출되었는데, 이는 chloramphenicol 내성 15주 모두에서 검출되었다(Fig. 1~3).



Fig. 3. PCR amplification of antimicrobial resistance genes from 1 strain of resistance type ACSSuT *S. Schwarzengrund*. M: ØX174 DNA/*Hinf*I Markers (Promega), lane 1: TEM (310 bp), lane 2: *cmlA* (394 bp), lane 3: *aadA* (528 bp), lane 5: *sulIII* (435 bp), lane 6: *tetA* (210 bp), lane 7: *int* (280 bp).

Table 2. PCR results for resistance genes occurred in 67 strains of *S. Schwarzengrund*

Antimicrobials	No. of resistant strains	Number of strains carrying antimicrobial resistance genes (%)											
		TEM	<i>cmlA</i>	<i>aphA1-I ab</i>	<i>aadA</i>	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>aadA, strB</i>	<i>strA, strB</i>	<i>aadA, strA, strB</i>	<i>sullI</i>	<i>tetA</i>	<i>int</i>
Ampicillin	12	12 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11 (91.7)
Chloramphenicol	15	-	15 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15 (100)
Kanamycin	9	-	-	9 (100)	-	-	-	-	-	-	-	-	9 (100)
Streptomycin	63	-	-	-	2 (3.2)	5 (7.9)	29 (46.0)	2 (3.2)	19 (30.2)	6 (9.5)	-	-	13 (20.6)
Sulfamethoxazole/ trimethoprim	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (100)	-	1 (100)
Tetracycline	67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	66 (98.5)	15 (22.4)

Table 3. Antimicrobial resistance pattern and gene profiles of 67 *S. Schwarzengrund*

Serotype	No. of strains	Resistance pattern*	Resistance gene profiles
<i>S. Schwarzengrund</i>	1	T	-
<i>S. Schwarzengrund</i>	1	T	<i>tetA</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	5	ST	<i>strA, tetA</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	27	ST	<i>strB, tetA</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	16	ST	<i>strA, strB, tetA</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	1	ST	<i>aadA, strA, strB, tetA</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	1	AST	TEM, <i>strA, strB, tetA</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	1	ACT	TEM, <i>cmlA, tetA, int</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	1	CST	<i>cmlA, aadA, tetA, int</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	2	CST	<i>cmlA, aadA, strA, strB, tetA, int</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	1	CST	<i>cmlA, strA, strB, tetA, int</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	1	ACKT	TEM, <i>cmlA, aphA1-I ab, tetA, int</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	2	ACKST	TEM, <i>cmlA, aphA1-I ab, aadA, strB, tetA, int</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	3	ACKST	TEM, <i>cmlA, aphA1-I ab, aadA, strA, strB, tetA, int</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	2	ACKST	TEM, <i>cmlA, aphA1-I ab, strB, tetA, int</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	1	ACKST	TEM, <i>cmlA, aphA1-I ab, strA, strB, tetA, int</i>
<i>S. Schwarzengrund</i>	1	ACSSuT	TEM, <i>cmlA, aadA, sullI, tetA, int</i>
<i>S. Typhimurium</i> DT104	3	ACKSSuT	TEM, PSE-1, <i>cmlA, flo, aphA1-I ab, aadA, sullI, tetG, int</i>

*A: ampicillin, C: chloramphenicol, K: kanamycin, S: streptomycin, Su: sulfamethoxazole/ trimethoprim, T: tetracycline.

약제내성유형별 내성유전자 profile: 약제내성유형과 내성유전자 profile과의 관계는 Table 3에서와 같이 16종의 내성유전자 profile로 나타났고, ST 내성유형이면서 *strB*와 *tetA* profile 균주가 27주(40.3%)로 가장 높게 분포되었으며, ST 내성유형이면서 *strA, strB* 그리고 *tetA* 내성유전자 profile 균주가 16주(23.9%) 순으로 높게 나타났다. *S. Typhimurium* DT104 표준균주에서만 검출된 유전자는 ampicillin 내성 유전자인 PSE-1, chloramphenicol 내성에서 *flo* 유전자가 있었고, *S. Schwarzengrund*에서는 sulfamethoxazole 내성에서 *sullI*,

tetracycline 내성에서 *tetA*가 검출됐지만 표준균주에서는 각각 *sullI, tetG*가 검출되었으며, *S. Schwarzengrund*에서만 검출된 유전자는 streptomycin 내성에서 *strA*와 *strB*이었다(Fig. 1~4).

고찰

살모넬라 감염증의 역학적 연구는 serotype, 생물형, 약제내성형, phage type, plasmid profile, PCR 기법을

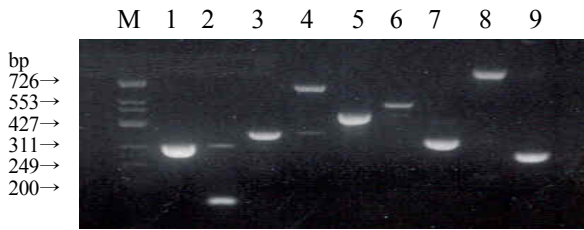


Fig. 4. PCR amplification of antimicrobial resistance genes from 3 strains of resistance type ACKSSuT *S. Typhimurium* DT104. M: ØX174 DNA/*Hinf*I Markers (Promega), lane 1: TEM (310 bp), lane 2: PSE-1 (150 bp), lane 3: *cmlA* (394 bp), lane 4: *flo* (673 bp), lane 5: *aphA1-Iab* (500 bp), lane 6: *aadA* (528 bp), lane 7: *sull* (331 bp), lane 8: *tetG* (844 bp), lane 9: *int* (280 bp).

기초로 한 분자유전학적 분석 그리고 제한효소 처리에 의한 DNA의 절단 양상 등을 분석하여 역학관계를 규명하고 있으며, 증가추세에 있는 약제내성 *Salmonella*속 균의 역학적 분석은 분자생물학의 발전과 함께 다각도로 진행되고 있다. 다양한 세균의 역학적 분석기법으로 활용되고 있는 분자유전학적 기법은 약제내성 *Salmonella*속 균의 특성 규명에도 이용되고 있다 (Gahring 등, 1990; Randall 등, 2004).

이 등(2009a)이 소와 돼지에서 분리한 34종의 serotype 457주 중 돼지에서 분리한 *S. Schwarzengrund* 67주에 대한 약제내성유형은 모든 균주가 2제 이상 약제에 대하여 내성을 나타내었고, 2제 내성에서 12제 내성까지 17종류의 다양한 형태로 나타났다. 이들 중 DST 3제 내성형 25주(37.3%)와 DPST 4제내성형 19주(28.4%)가 비교적 높은 분포를 나타내었고, 6제 이상의 내성형은 11주(16.4%)였다. 선택적으로 특정 항균제에 대한 결과에서 ACKSSuT에 대한 내성은 각각 tetracycline 내성 67주(100%), streptomycin 내성 63주(94.0%), chloramphenicol 내성 15주(22.3%), ampicillin 내성 12주(17.9%), kanamycin 내성 9주(13.4%), sulfamethoxazole/trimethoprim 내성 1주(0.1%)이었다. ACSSuT 다제내성형이 1주이었고, ACKST 이상의 다제내성형은 9주(13.4%)로 나타났다(이, 2009).

이 등(2009a)이 보고한 바로는 돼지유래 *Salmonella*속 균의 항균제 내성률은 tetracycline (68.7%), streptomycin (52.3%), chloramphenicol (15.8%), ampicillin (15.3%), sulfamethoxazole/trimethoprim (11.5%) 그리고 kanamycin (3.6%)이었다. 돼지에서 분리한 *S. Schwarzengrund* 67주는 DST 내성형 25주(37.3%)와 DPST 내성형 19주 (28.4%)가 비교적 높은 분포를 나타내었고, 6제 이상의 내성형은 11주(16.4%)로서 *S. Typhimurium*보다

는 내성률과 내성형 분포율이 낮았으나 다른 serotype과 비교해 볼 때 비교적 높게 나타났다(이 등, 2009a).

이 연구에서는 PCR 기법을 이용하여 *S. Schwarzengrund* 67주에서 virulence gene인 *invA*와 *spvC*, 약제내성 관련 유전자를 검색한 결과 *invA*는 모든 균주에서 검출되었으나 *spvC*는 모든 균주에서 검출되지 않았다. ACKSSuT 약제에 대하여 내성을 나타내는 *S. Schwarzengrund* 균주별 약제내성유전자의 검출 결과는 ACKSSuT에 대하여 내성을 나타내는 모든 균주에서 각각의 약제에 대한 내성유전자가 검출되었다. Ampicillin 내성 12주 중 12주(100%)에서 TEM, chloramphenicol 내성 15주 중 15주(100%)에서 *cmlA*, kanamycin 내성 9주 중 9주(100%)에서 *aphA1-Iab*, sulfamethoxazole/trimethoprim 내성 1주 (100%)에서 *sull*가 검출되었으며, streptomycin 내성은 63주 중 63주(100%)에서 6종의 유전자 검출형으로 나타났는데, 그 중 *strB* 단독 검출이 29주(46.0%)로 가장 높은 검출률을 나타내었고, *strA*와 *strB*가 19주(30.2%), *aadA*, *strA* 그리고 *strB* 검출형은 6주(9.5%) 등으로 나타났다. 또한, tetracycline 내성 67주 중 66주(98.5%)에서 *tetA*가 검출되었으며, *int*는 15주에서 검출되었는데, 이는 chloramphenicol 내성 15주 모두에서 검출되었다.

Khan 등(2000)은 *S. Typhimurium* 32주에서 *invA* 100%, *spvC* 97%와 *int* 94% 검출되었다고 하였고, Swamy 등(1996)에 의하면 245주의 *Salmonella* 분리주에서 *invA* 유전자가 100% 검출되었고, *spvC* 유전자의 검출률은 15.1%에 불과하다고 하였다. Bolton 등(1999)은 *Salmonella* 분리주에서 유전자의 검출률은 *invA* 98%, *S. Typhimurium*에서 *spvC*와 *int*는 각각 88%와 87%, *S. Typhimurium*을 제외한 다른 serotype에서 *spvC*와 *int*는 각각 18%와 82%라고 하였으며, 특히 다제내성 *S. Typhimurium*과 chloramphenicol에 대하여 내성을 나타내는 *S. Typhimurium*이 아닌 다른 serotype에서 *int*는 각각 100%와 82% 검출되었다고 보고하였다.

국내에서는 정 등(2003)이 전남지역의 돼지에서 분리한 *S. Typhimurium*에서 *invA* 88.0%, *spvC* 28.9%가 검출되었다고 하였고, 이 등(2009b)은 *S. Typhimurium* 138주에서 *invA* 100%, *spvC* 24.6% 그리고 *int* 84.1%가 검출되었다고 보고하였다.

이 실험에서 *invA*는 모든 균주에서 검출되어 외국의 Khan 등(2000), Bolton 등(1999) 그리고 Swamy 등(1996)과 우리나라의 이 등(2009b)이 보고한 결과와 유사하였고, 정 등(2003)이 보고한 결과보다 높게 나

타났다. *int*는 chloramphenicol 내성 15주 모두에서 검출되어 Bolton 등(1999)의 결과보다는 다소 높았다. *spvC*는 검출되지 않았고 *int*의 검출률은 22.4%로 나타나 외국과 우리나라의 결과보다 훨씬 낮았다. *spvC*와 *int* 유전자의 검출률이 낮은 것은 외국의 경우 주로 다제내성인 *S. Typhimurium* DT104를 중심으로 조사하였고, 우리나라도 병원성과 다제내성률이 높은 *S. Typhimurium*을 대상으로 조사한 것과 관련된 것으로 추측된다.

국내의 약제내성 관련 유전자 검출에 관한 연구에서는 이 등(2009b)이 소와 돼지유래 β -lactams (ampicillin과 amoxicillin) 내성 *S. Typhimurium* 49주(AAcSSuT 내성 44주와 ACST 내성 5주) 중 47주에서 TEM을 검출 보고하였고, Yang 등(2001)은 돼지에서 분리한 ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT104 2주와 tetracycline과 chloramphenicol 내성 *S. Typhimurium*에서 PSE-1과 *cml/tetR* 유전자는 검출되지 않았지만, *Salmonella*속 균 6주(ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT104 2주, ampicillin 내성 *S. Typhimurium* 3주 중 2주 그리고 ampicillin 내성 *S. Enteritidis* 4주 중 2주)에서 TEM이 검출되었다고 하였으며, 김(2000)은 CGNaSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT104 (1주), CSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* (4주) 그리고 ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* (2주)에서 *cml/tetR*은 검출되지 않았지만, ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* (2주)에서 PSE-1이 검출되었다고 하였다.

이번 실험에서 사용한 67주의 AKSSuT *S. Schwarzengrund*에서 주로 TEM, *cmlA*, *aphA1-Iab*, *strA*와/또는 *strB*, *sulIII* 그리고 *tetA*가 검출되어 미국의 Gebreyes와 Altier (2002)가 AKSSuT 내성 *S. Typhimurium* U302 1주에서 TEM, *aphA1-Iab*, *strAB* 그리고 *tetA*가 검출되었다는 결과와 아주 유사하였고, 영국의 Randall 등(2004)이 ASSuT 내성 *S. Typhimurium* DT193에서 주로 TEM, *strA*, *sulIII* 및 *tetA*가 검출되었다는 결과와 *S. Typhimurium*이 아닌 다른 serotype에서는 주로 TEM, *cat1*, *strA*, *sulIII* 그리고 *tetA*가 검출되었다는 결과 및 Chen 등(2004)이 대만유래 *Salmonella*속 균에서 주로 TEM-1, *cat1*과/또는 *cat2*, *aadA1*, *sulIII* 그리고 *tetA*가 검출되었다는 결과와 다소 유사하였다.

위의 연구자들이 보고한 내성 관련 유전자 검출의 결과와 이번 연구에서의 결과가 부분적으로 차이가 나는 것은 국가 간의 지역적 차이도 있을 수 있지만 주로 연구자들이 사용한 primer의 종류와 관련이 깊을

것으로 추측된다. 왜냐하면, Gebreyes와 Altier (2002)는 chloramphenicol 내성 유전자 검출을 위한 primer를 사용하지 않았고, sulfonamides 내성 유전자의 경우는 *sul1*만 사용하였다. Randall 등(2004)은 chloramphenicol 내성 유전자 검출에 *cmlA*와 *cmlB*를 사용하지 않았으며, streptomycin 내성 유전자 검출에 *strB*를 사용하지 않았기 때문이다. 이 연구에서는 chloramphenicol 내성균에서 *cmlA*가 검출되어 대만 유래 균에서 *cat1*과/또는 *cat2*가 검출된 것과 차이를 나타내었고(Chen 등, 2004), Pezzella 등(2004) 그리고 Llanes 등(1999)의 결과와도 차이를 나타내었다. 또한, streptomycin 내성균에서 검출된 *aadA*는 아마도 *aadA1*과 관련이 있을 것으로 추측되며 향후 이에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다. 따라서 우리나라 돼지유래 *S. Schwarzengrund*에서 주로 검출된 TEM, *cmlA*, *aphA1-Iab*, *strA* 와/또는 *strB*, *sulIII* 그리고 *tetA*는 plasmid와 관련이 있을 것으로 추측된다.

결 론

돼지유래 *S. Schwarzengrund* 67주에서 PCR 기법을 이용하여 virulence gene인 *invA*와 *spvC*, ACKSSuT 내성 관련 유전자 그리고 내성 유전자 카세트에 알려진 *int* 유전자를 검출하여 분자유전학적 특성을 조사한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

*S. Schwarzengrund*에서 virulence gene인 *invA*와 *spvC* 유전자를 검색한 결과 *invA* 유전자는 모든 균주에서 검출되었으나 *spvC* 유전자는 모든 균주에서 검출되지 않았다. ACKSSuT 약제에 대하여 내성을 나타내는 *S. Schwarzengrund* 균주별 약제내성유전자의 검출 결과는 ampicillin 내성 12주 모두에서 TEM, chloramphenicol 내성 15주 모두에서 *cmlA*, kanamycin 내성 9주 모두에서 *aphA1-Iab*, sulfamethoxazole/trimethoprim 내성 1주에서 *sulIII*가 검출되었으며, streptomycin 내성은 63주 중 63 (100%)주에서 6종의 유전자 검출형으로 나타났는데, 그 중 *strB* 단독 검출이 29주(46.0%)로 가장 높은 검출률을 나타내었고, *strA*와 *strB*가 19주(30.2%), *aadA*, *strA* 그리고 *strB* 검출형은 6주(9.5%) 등으로 나타났다. 또한, tetracycline 내성 67주 중 66주(98.5%)에서 *tetA*가 검출되었으며, mobile gene인 *int*는 chloramphenicol 내성 15주 모두에서 검출되었다.

참 고 문 헌

- 김상윤. 2000. 경북지역 가축에서 분리된 *Salmonella* 속균의 역학적 특성 및 병원성. 안동대학교 대학원 박사학위 논문.
- 이우원, 정병열, 이강록, 이동수, 김용환. 2009a. 소와 돼지유래 *Salmonella*속 균의 혈청형 및 약제감수성. 한국가축위생학회지 32: 45-49.
- 이우원, 정병열, 이강록, 이동수, 김용환. 2009b. 소와 돼지유래 다제내성 *Salmonella*속 균의 분자유전자학적 특성. 한국가축위생학회지 32: 61-76.
- 정대영, 박종태, 고흥범. 2003. 전남지역 도축장에서 분리된 *Salmonella* Typhimurium의 병원성에 관한 연구. 한국가축위생학회지 26: 39-50.
- Bolton LF, Kelley LC, Lee MD, Fedorka-Cray PJ, Maurer JJ. 1999. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. J Clin Microbiol 37: 1348-1351.
- Carlson SA, Bolton LF, Briggs CE, Hurd HS, Sharma VK, Fedorka-Cray, Jones BD. 1999. Detection of multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 by multiplex and fluoregenic PCR. Molecular Cellular Probes 13: 213-222.
- Chen S, Zhao S, White DG, Schroeder CM, Lu R, Yang H, McDermott PF, Ayers S. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from reptail meats. Appl Environ Microbiol 70: 1-7.
- Chiu CH, Ou JT. 1996. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. J Clin Microbiol 34:2619-2622.
- Edwards PR, Galton MM. 1967. Salmonellosis. Adv Vet Sci 11: 1-63.
- Gahring LC, Heffron F, Finlay BB, Falkow S. 1990. Invasion and replication of *Salmonella* Typhimurium in animal cells. Infect Immun 58: 443-448.
- Gebreyes WA, Altier C. 2002. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. J Clin Microbiol 40: 2813-2822.
- Khan AA, Nawaz MS, Khan SA, Cerniglia CE. 2000. Detection of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Microbiol Lett 182: 355-360.
- Llanes C, Kirchgessner V, Plesiat P. 1999. Propagation of TEM- and PSE-type β -lactamase among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. Antimicrob Agents Chemother 43: 2430-2436.
- Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale E, Luzzi I, Carattoli A. 2004. Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. Antimicrob Agents Chemother 48: 903-908.
- Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJV, Woodward MJ. 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. J Antimicrob Chemother 53: 208-216.
- Swamy SC, Barnhart HM, Lee MD, Dreesen DW. 1996. Virulence determinants *invA* and *spvC* in *Salmonella* isolated from poultry products, wastewater, and human sources. Appl Environ Microbiol 62: 3768-3771.
- Yang SJ, Park KY, Seo KS, Besser TE, Yoo HS, Noh KM, Kim HK, Kim SH, Lee BK, Kook YH, Park YH. 2001. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis identified by multiplex PCR from animals. J Vet Sci 2: 181-188.