creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000236527

2008年 8月

박사학위논문

광주지역에서 분리된 *Salmonella enterica*의 특성에 관한 연구

조선대학교 대학원

식품의약학과

하 동 룡

광주지역에서 분리된 *Salmonella enterica*의 특성에 관한 연구

Characterization of *Salmonella enterica* Isolated from Diarrheal Patients in Gwangju Area between 2001 and 2007

2008 년 8 월 25일

조선대학교 대학원

식품의학과

하 동 룡

광주지역에서 분리된 *Salmonella enterica*의 특성에 관한 연구

지도교수 이 명 렬

이 논문을 이학박사학위신청 논문으로 제출함.

2008 년 월

조선대학교 대학원

식품의약학과

하 동 룡

하동룡의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 농학박사 인

위 원 전남대학교 의학박사 인

위 원 전남대학교 수의학박사 인

위 원 식품의약품안전청 수의학박사 인

위 원 조선대학교 약학박사 인

2008년 6월

조선대학교 대학원

목 차

List of Figures ····· iv

List of Tables ····· iii

Abstract ····· vi

제*1*장. 서 론 ····· 1

제*2*장. 재료 및 방법 ····· 8

제1절. 실험대상 ····· 8

제2절. *Salmonella* 균주의 분리 및 혈청학적 동정 ····· 8

1. 가검물 전처리 ····· 8

2. *Salmonella* 균주의 분리 ····· 8

3. 혈청학적 동정 ····· 9

제3절. 항균제 감수성 검사 ····· 10

제4절. *Salmonella* Typhimurium Plasmid 분리 및 분석 ··· 11

제5절. 다제내성 유전자 분석을 위한 PCR 반응 ····· 11

제6절. 분리된 *Salmonella* 혈청형의 병원성에 관한 연구 ·· 15

1. 분리된 *Salmonella* 혈청형의 세포독성 시험 ····· 15

2. 중합효소 연쇄반응(PCR)에 의한 용혈독소(Cytolysin A) 유전자의 검출 ····· 16

3. 용혈독소(Cytolysin A) 생성능 시험 ····· 16

제3장. 결과 및 고찰 ····· 17

제1절. 광주지역에서 발생한 설사환자에서의 *Salmonella* 분리 빈도 ····· 17

제2절. *Salmonella enterica* 혈청형별 분리 빈도 ····· 20

제3절. *Salmonella enterica* 혈청형별 항균제 내성양상 ····· 25

1. 항균제 내성 양상 ····· 25

2. 연도별 각 혈청형의 내성빈도 ····· 28

3. 항균제 다제내성 양상 ····· 33

제4절. *Salmonella enterica*의 항균제 내성관련 유전자 분석 ····· 40

1. *Salmonella* Typhimurium의 Plasmid DNA 분석 ····· 40

2. 중합효소연쇄반응(PCR)에 의한 다제내성 균주에서 Class 1 integron의 검출 과 항균제 내성 ····· 43

제5절. 분리된 *Salmonella* 혈청형의 병원성 ····· 51

1. HeLa 세포주에 대한 독성 ····· 51

2. Cytolysin A 유전자 검출 ····· 55

3. 혈액배지에서의 용혈대 관찰 ····· 56

제4장. 요약 ····· 60

참고문헌 ····· 63

List of Tables

Table 1. PCR primers used for identification and characterization of integrons and gene cassettes in *Salmonella enterica* serovars. 14

Table 2. Prevalence of diarrheal patients by *Salmonella enterica* in Gwangju for 7 years..... 19

Table 3. Serovars of *Salmonella enterica* isolated in seven years period. 23

Table 4. Percent antimicrobial resistance values of *Salmonella enterica* serovars. 27

Table 5. Proportion (%) of isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis showing resistance to a panel of antimicrobial agents..... 30

Table 6. Proportion (%) of isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium showing resistance to a panel of antimicrobial agents..... 31

Table 7. Proportion (%) of isolates of *Salmonella enterica* serovars showing resistance to a panel of antimicrobial agents..... 32

Table 8. Multiple resistance pattern of each *Salmonella enterica* serovar isolates. 36

Table 9. Multiple resistance patten of other serotypes of *Salmonella enterica*. 38

Table 10. Plasmid profile and antibiotics resistance pattern of *Salmonella* Typhimurium isolates. 43

Table 11. Integron patterns of *Salmonella enterica* isolates. ····· 48
Table 12. Serovars, antibiogram and integron genotypes of multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. ····· 49
Table 13. Detection of ClyA gene by PCR for *Salmonella enterica* strains of 21 different serovars. ····· 58

List of Figures

Fig. 1. Association between integron structure and PCR products ····· 13

Fig. 2. Prevalence of *Salmonella enterica* serovars in Gwangju city during 2001 - 2007 year ····· 24

Fig. 3. Frequence of multiple drug resistance of each serovar of *Salmonella enterica* isolates ····· 35

Fig. 4. Prevalence of resistant *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and Typhimurium isolated at years to more than three antimicrobial agents.....39

Fig. 5. Plasmid profiles of selected *Salmonella* Typhimurium isolates (1-37). Lane M, supercoiled DNA ladder ····· 42

Fig. 6. Examples of PCR products of *Salmonella enterica* isolates by using the primers in-F and in-R (lanes 1-18). Lane M, 100 bp ladder ····· 47

Fig. 7. Examples of PCR products of *Salmonella enterica* isloates by using primers in-F and blaP1-B (A), blaP1-F and blaP1-B (B), in-F and aadA-B (C), and qacE■1-F and sul1-B (D) ····· 50

Fig. 8. Cytotoxicity of bacterial cells and culture supernatants treatment to HeLa cells ····· 53

Fig. 9. Cytotoxicity by bacterial culture supernatants of *Salmonella enterica* serovar Brandenbur, Indiana, Panama, Schwarzengrund and Typhimurium ····· 54

Fig. 10. PCR analysis of 1.4 kb clyA DNA regions of *Salmonella enterica* of various serovars from clinical specimens ····· 57

Fig. 11. Phenotyphic expression of ClyA by *Salmonella enterica* serovars on the blood agar ····· 59

ABSTRACT

Characterization of *Salmonella enterica* Isolated from Diarrheal Patients in Gwangju Area between 2001 and 2007

Ha, Dong Ryong
Advisor: Prof. Lee Myung Yul
Department of Food and Drugs
Graduate School of Chosun University

From January 2001 to December 2007, the serotype of *Salmonella enterica* isolated from diarrhea patients in the Gwangju area consisted of 30 types, There were 99 strains of Enteritidis (42.9%) and showed the highest isolation frequency followed by 61 strains (26.4%) of Typhimurium.

The pattern of antibiotics resistance is a trend Which is increasing, the frequency of bacteria resistant to TE was 47.4% which was highest, followed by the order of 45.7% of AM as well as TIC, SAM was 27.6%, NA was 22.8%, and CM was 21.6%. The serotype Typhimurium to TE was 82.2% and most bacteria showed the resistance, to AM and TIC were approximately 50%, and the frequency of resistance to CM, SAM, and GM was high. The serotype Enteritidis was 59.6% the penicillins antibiotic AM and TIC was 59.6%, SAM was 40.4% and the frequency of antibiotics resistance was higher than other serotypes, and resistance to CIT and

SXT was not detected. Concerning other serotypes, to TE was 41.7% and the frequency of antibiotic resistance was highest followed by the order of 27.6% SAM, 23.6% AM, and the frequency of antibiotic resistance to all antibiotics was relatively low. In addition, in the multidrug resistance pattern, higher than 68% of Typhimurium, and approximately 65% of Enteritidis showed resistance to more than two types of antibiotics. Particularly, the frequency of multidrug resistance of Typhimurium to 3-8 antibiotics was approximately 52% and it was higher than other serotypes. In addition, regarding other serotypes, Blockley, Brandenburg, Haardt, Panama, Paratyphi B, Rissen, and Saintpaul showed multidrug resistance. Overall, antibiotics that showed resistance simultaneously were AM, SAM, TIE and TE of which resistance was relatively high in each serotype.

The plasmid DNA of 37 strains of the serotype Typhimurium with high antibiotics resistance and multidrug resistance were analyzed and the results showed that all strains contained more than one plasmid 2 kb-22.9 kb in size and generally 4-6 plasmids, nonetheless, the correlation of the pattern of antibiotic resistance to the Plasmid DNA pattern could not be detected. In multidrug resistant strains analyzed by polymerase chain reaction, 72 strains containing the Class 1 Integron were isolated, and among them, 60 strains contained an integron showing one 1,200 bp amplification product, There were 3 bacterial strains containing 1,000 bp and 1,200 bp, There were 3 bacterial strains, containing 1,200 bp and 1,600 bp, 4 strains of bacteria etc. showing 1,200 bp and 2,000 bp contained an ingegron with more than 2 amplification products. Among bacteria resistant to more than 4 types of antibiotics, bacteria with more than two types of

integron were observed only in the serotype Paratyphi B. Particularly, 1,200 and 1,600 bp integron showed resistance to AM, GM, KM, TIC, and TE, and the characteristic was that bacteria with 1,200 as well as 2,000 bp integron showed resistance to NA and SXT.

Among the resistant gene cassette within integron, β-lactamase gene and blaP1 (pse1) gene were not detected at all except in 2 strains of the serotype Paratyphi B, and 2 strains of the blaP1 positive serotype Paratyphi B were resistant to SAM. Among bacteria resistant to AM or TIC, *etc.*, on bacteria negative for PCR using the Primer in-F and blaP1-B, PCR using blaP!-F and blaP1-B primer was performed and 420 bp amplification products were observed. PCR was performed using the primer qacE Δ1-F and sul1-B, and 1,130 bp amplification products were shown, and in some bacteria, 800 bp amplification products were observed. It is necessary that in future, more studies on the examination of different several resistant genes within the integron and their structure are required.

As cytotoxicity to HeLa cells, treated cells with bacteria, more than 20 % of cells died, and particularly, When treated with the serotype Panama, approximately more than 80 % died. When treated with cell culture supernatant, cytotoxicity was not be observed in most cases, nonetheless, When treated with the culture supernatant of the serotype Brandenburg, Indiana, Panama and Schwarzengrund, more than 30% cells died. The cytotoxicity to HeLa cells was thought to be due to Cly A production. Such result suggests for the first time that NTS inducing diseases within the intestinal tract could produce toxin with cytotoxicity. It is thought that in future, studies investigating the characteristics of bacteria with

cytotoxicity should be investigated more comprehensively.

제1장. 서 론

급성 설사와 여행자 설사에 포함되는 감염성 설사질환을 동반한 위장관염은 공중보건학적인 측면에서 중요한 질환이며, 전 세계적으로 호흡기질환에 이어 두 번째로 영·유아기의 주요한 질환이 되고 있다(24, 37).

이러한 감염성 설사질환의 원인체로는 *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio* spp. (*Cholerae* nonO1, O139, *Parahemolyticus*), *Escherichia coli* (ETEC/ EPEC/ EHEC/ EIEC 등), *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia* spp. 등 세균성질환과 rotaviruses, noroviruses, astroviruses, adenoviruses 등 바이러스성질환이 원인이 되고 있다 (2, 10). 병원성 미생물에 의해서 일어나는 설사는 위생수준과 음용수, 음식물 또는 위생시설의 질적 수준, 생활양식의 형태에 관계없이 전 세계의 모든 사람들, 특히 어린이들의 건강에 영향을 많이 미치며, 개선된 위생환경과 치료를 통해 설사로 인한 사망자 수는 점차 감소되고 있으나, 개발도상국가에서는 여전히 높은 사망률을 유지하고 있다 (3). 이와 같이 설사를 동반한 위장관질환은 그 질병으로 인한 사망률뿐만 아니라 경제적인 비용에 있어서도 중요한 문제를 야기하고 있다. 더욱이 세균에 의한 위장관질환은 그 전염성 때문에 공중보건 측면에서 중요한 관리대상이 되고 있음에도 불구하고 아직까지도 세균성 병원체에 의한 위장관질환이 많이 발생하고 있는 실정이다.

이 중 *Salmonella* spp.은 세균성 설사질환의 가장 빈번한 원인균으로써 자연계에 널리 분포되어 거의 모든 척추동물에서 분리되며, 사람을 비롯한 많은 종류의 동물에서 각종 질병의 원인이 된다. 뿐만 아니라 *Salmonella enterica* 에 의해 발생되는 비장티프스성 salmonellosis는 전 세계적으로 발생하는 매우 중요한 식품매개성 감염성질환으로써 오염된 음식이나 물, 기구 등 다양한 전염원에 의해 사람이나 동물에 질병을 일으키며, 우리나라에서도 계절에 관계

없이 해마다 많은 환자가 발생되고 있다 (9, 74, 77).

Salmonella spp.의 임상증상은 12 ~ 36시간의 잠복기를 거쳐 발열, 두통, 복통, 설사, 구토 등 위장관 증상으로 인한 탈수가 일어나고 유아나 고령자는 중증이 될 수 있으며, 급성증상은 1 ~ 2일 만에 사라지나 식욕부진과 설사는 7일간 지속되기도 한다. 때로는 급성장염으로 시작되어 패혈증이나 농양, 관절염, 담낭염, 심낭염, 폐렴, 농피증, 신우신염 등을 초래하며, 유아나 고령자, 면역억제 환자가 사망하는 일은 있지만 대단히 드물다. 그리고 만성 보균상태 등 다양한 증상을 보이고 있으며, 이들은 사람과 동물에서 교차 감염되어 질병을 일으키거나 전파되고 특히 *Salmonella enterica* subsp Typhi (이하 *S.* Typhi), *Salmonella enterica* subsp Paratyphi A, B, C (이하 *S.* Paratyphi) 등은 법정 제 1군 전염병으로 지정되어 관리되고 있다. 이와 같은 살모넬라균속 중, 환자에서 가장 빈번히 검출되는 혈청형인 *Salmonella enterica* subsp Typhimurium (이하 *S.* Typhimurium)과 *Salmonella enterica* subsp Enteritidis (이하 *S.* Enteritidis)는 전 세계적으로 식중독 원인균으로써 그 중요성이 새로이 인식되고 있으며, 국내에서도 식중독 원인균으로써 많은 비중을 차지하고 있다. (53)

살모넬라균속은 *Salmonella enterica*와 *Salmonella bongori* 두개의 종으로 분류되며, *Salmonella enterica*는 *S. enterica* subsp. *enterica, S. enterica* subsp. *salamae, S. enterica* subsp. *arizonae, S. enterica* subsp. *diarizona, S. enterica* subsp. *houtenae* 그리고 *S. enterica* subsp. *indica*의 6개의 아종으로 나뉘어진다. *S. bongori*는 이전에는 *S. enterica* subsp. *bongori*로 명명되었으나 현재는 독립적으로 분류되고 있다 (73).

*Salmonella*속 균의 생화학적 성상 및 배양상의 특성을 살펴보면 대부분의 살모넬라속 균은 유당을 발효시키지 않으며, 운동성이 있고 무기황과 thiosulfate로 유화수소를 생성하고 *S.* Typhi를 제외하고 모든 균주들은 포도

당으로부터 gas를 생성한다. 또한 다른 장내세균에 비해 비교적 고농도의 담즙에 잘 견디는 능력을 가지고 있다. (8)

Salmonella spp.는 그람음성의 통성 무산소성 세포내 기생세균으로서 1886년 Salmon과 Smith에 의해 처음으로 분리 보고된 이래, 현재까지 2,300개 이상의 혈청형이 보고되고 있다. 이러한 혈청형은 항원구조에 의해 결정되는데, 살모넬라의 세포벽에는 lipopolysaccharide로 되어 있는 균체항원 (O)이 있고 운동성과 관련이 있는 편모항원 (H)이 있으며, 이들 항원의 조합에 의해 이루어진다. 균체항원 (O)은 다른 장내세균의 균체항원 (O)과 비슷하나 편모항원 (H)은 이상성 (diphasic)이라는 점에서 있어서 다른 장내세균과는 다르다. 특이적인 제 1상 항원은 단지 몇몇의 균종들 만이 가지고 있으며 동형의 항혈청에게만 반응한다. 그러나 비특이적인 제 2상 항원은 보다 많은 균종들을 가지고 있으며, 이형의 항혈청과도 반응한다 (8).

*Salmonella*속 균의 역학적인 상황을 살펴보면, 위장관계 감염 세균성 병원체 가운데 장티프스 및 살모넬라 병원체는 우리나라에서 토착화되어 있고 국가 감시질환 대상 병원체로 중요시되고 있다. 장티프스균의 병원소는 오직 사람으로 만성 보균자가 될 수 있으며, 장티프스 보균자의 색출과 환자의 관리를 철저히 하면 장티프스 감염을 효율적으로 예방할 수 있는 질환이다. 이외의 살모넬라균은 가금류, 돼지, 거북, 개, 고양이 등의 애완동물과 설치류 등 가축 및 야생동물 모두를 병원소로 가지고 있다. 인간의 경우 만성보균의 사례가 드물지만 동물과 조류에서는 보균율이 높다 (75).

따라서 감염된 동물에서 유래한 음식 또는 감염된 동물이나 인간의 분변에 오염된 음식물에 있는 병원체를 섭취함으로써 흔히 감염사례가 발생한다. 즉 불충분하게 조리되었거나 조리되지 않은 계란, 계란 함유식품 등에 의한 사례가 흔히 보고되고 있으며, 설사증상이 있는 사람과 사람사이의 분변-경구 전파 역시 중요하다 (74).

혈청형에 따른 감염양상을 살펴보면 1980년 이전에는 장티프스의 분리율이 높았으나, 식생활 및 생활환경의 개선으로 인해 장티프스의 발생은 감소하였다. 그 이후 1996년까지는 *S.* Typhimurium의 분리율이 가장 높았고 *S.* Enteritidis가 그 다음 순위였으나, 2003년에는 그 구성비가 역전되어 *S.* Enteritidis가 가장 분리율이 높은 것으로 나타났다. 최근 살모넬라 병원체는 종래의 발생양상과는 달리 다양한 추세를 보이며 새로운 혈청형이 높은 빈도를 보이고 있다. 국립보건연구원 살모넬라센터의 통계에 의하면, 2000 ~ 2003년 기간동안 모두 104가지 혈청형의 살모넬라가 분리된 것으로 나타났다. 또한 혈청형별, 연령별로 살펴보면 *S.* Typhi나 *S.* Paratyphi A와 같은 제 1군 법정전염병의 경우 40 ~ 49세 연령층에서 분리빈도가 높았으며, *S.* Enteritidis와 *S.* Typhimurium의 경우 4세 이하의 연령군에서 분리빈도가 높았다 (9, 33).

*Salmonella*속 균은 일반적으로 숙주에 대한 적응성에 따라 숙주 특이성 그룹과 숙주 비특이성 그룹으로 나뉘고 있다. *S.* Typhi와 *S.* Paratyphi는 사람에, *S.* Dubulin은 소에, *S.* Cholerasuis는 돼지에, *S.* Pullorum과 *S.* Gallinarium은 닭에 각각 친화성이 있는 혈청형이며, *S.* Typhimurium과 *S.* Derby 등은 거의 대부분의 동물에 나타내고 있어 비특이성 균종으로 분류된다 (47, 57).

비록 salmonellosis의 치사율은 낮은 편이나, 높은 발생률에 의해 경제적으로나 역학적 및 보건학적 측면에서 매우 중요한 감염질환이다 (4, 56). *Salmonella* spp.감염원을 추적하기 위한 역학적인 분석에서 혈청형 및 분자생물학적 방법이 많이 사용되고 있으며, 특히 혈청형은 동일 기간 및 동일 지역에서 발생한 *Salmonella* 감염의 역학적 분석에서 주로 사용되고 있다 (43, 58).

세균성 설사질환의 원인균 분리 및 동정은 그 원인체가 자랄 수 있는 특성

에 맞게 증균배지와 선택배지를 이용하여 분리하였고, 분리된 균의 생화학적, 생물학적 및 혈청학적 특성에 따라 동정해 왔다. 그러나 최근 식품에서 야기되는 세균성 설사질환이 증가함에 따라 그 원인식품 또는 매개체 및 감염경로가 명확하지 않아 방역조치 및 예방에 많은 어려움이 있어 왔다. 이러한 어려움을 해결하고 이 병원체에 의한 감염의 동정과 혈청형보다 더 자세히 분류하기 위하여 분자생물학적인 방법이 많이 사용되고 있다. 따라서 최근에는 plasmid 분석, ribotyping, pulse-field gel electrophoresis, random amplified polymorphic DNA 분석법과 같은 방법이 유용하게 이용되고 있다.

최근 환자에서 분리되는 *Salmonella*에서 항균제에 대한 내성은 전 세계적으로 심각한 문제를 초래하고 있다. 미국에서는 1980년대에는 한 가지 이상의 항균제에 대한 내성을 가진 균주의 분리율이 16%이었으나 1990년대에는 31%로 증가하였으며 (35), 영국에서도 비슷한 분리율을 보고하고 있다 (64). 최근 국내에서도 항생제에 대한 높은 내성률을 보이며 특히 혈청형 Typhimurium과 Enteritidis에서 tetracycline, streptomycin 및 sulfisozazole에 대한 내성률이 매우 높다고 보고되고 있다 (70).

plasmid와 transposon과 같은 이동성 유전자에 의해 세균간의 항생제 내성 유전자가 전달되어 내성균이 증가한다. 최근 항균제에 대한 내성전달에서 integron이란 유전자군 (gene cassettes)의 역할에 대해 잘 알려져 있다 (12, 13, 54). 현재에는 9 종류 이상의 integron이 알려져 있으며 그 특성이 밝혀지고 있다 (14, 25). Class I integron은 5′-CS 및 3′-CS의 2개의 conserved segments와 항균제 내성 유전자군으로 구성된 internal variable region으로 구성되어 있다 (26, 61). 5′-CS에는 gene cassette의 특정 부위를 절단하고 삽입하는데 필요한 type 1 integrase에 대한 *intI1* 유전자가 존재한다 (12). 또한 5′-CS에는 유전자 재조합에 필요한 *attI1* 유전자가 있다. 3′-CS에는 ammonium compounds와 sulfonamide에 대한 내성 유전자인 *qacE*[redacted]*1* 및 *sul1*

가 있다. 그러나 항상 3′-CS가 존재하지는 않는다 (51). Class 1 integron이 그람음성 세균간의 항균제 내성 전달물질로서 가장 중요한 것으로 알려졌으며, 특히 장내세균에서 다제내성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으며 (28, 30), 특히 *S.* Typhimurium에서도 매우 중요한 역할을 한다 (57, 65).

병원성 세균은 감염증이 진행되는데 있어 중요한 역할을 하는 숙주세포에 직·간접적으로 손상을 초래하는 독성물질을 생성한다 (20). 특히 장염관련 질환을 일으키는 *Salmonella* (non-typhoidal salmonella, 이하 NTS)는 장관내 점막상피세포에 부착하여 침입하고 독소를 생성한다 (19, 33, 34). 그러나 NTS는 배양된 세포에 대해 세포독성을 나타내지 않는다 (29, 55, 67). 대부분의 대장균은 배양 대식세포에 세포독성을 나타내는 용혈독소 (Cytolysin A, 이하 Cly A)를 생성하는데, Cly A는 34 kDa의 단백으로서 숙주세포의 세포막에 구멍을 형성하여 용혈작용을 갖는다 (17, 38, 42, 45, 46, 66). 최근 *Salmonella*에서도 기능과 단백 크기, 염기서열 등이 거의 동일한 용혈독소가 검출되었는데 특히 사람에게 전신감염을 일으키는 혈청형 Typhi와 Paratyphi A에서만 있다고 보고되었으나 (47), 인체에 전신성 질환을 일으키지 않고 장관관련 질환만을 일으키는 NTS의 세포독성에 관련된 연구는 거의 없는 실정이다. 단지 NTS 감염증의 병인기전에 있어 내독소와 외독소의 역할만 알려져 있다.

Salmonella 혈청형과 항균제 내성양상 및 내성유전자의 특성은 새로운 감염증 환자 특히 집단 식중독이 발생할 경우 감염원의 추적과 감염경로를 파악하는데 있어 분자역학적으로 매우 중요하다. 뿐만 아니라 환자의 치료에 기초자료로 활용되고 항균제에 대한 다제내성균의 출현을 감소시키기 위한 기초자료로 활용될 수 있다. 그러나 현재까지 광주지역에서 발생하는 설사환자의 원인균 특히 *Salmonella* 속 균에 의한 발생빈도 및 혈청형과 항균제 내성양상에 대한 보고가 전무한 실정이다. 따라서 이 연구의 목적은 광주지역에서 분리되

는 *Salmonella*의 유행양상과 항균제 내성특성 그리고 각 혈청형의 생물학적 특성을 조사하고자 하였다. 본 연구를 수행하기 위하여 2001년부터 2007년까지 매주 1회 이상 광주지역 종합병원의 진단검사의학과와 소아과를 순회하여 수행한 설사질환실험실 감시사업에서 의뢰된 환자의 분변에서 분리된 *Salmonella enterica*의 각 혈청형별 분리빈도와 항균제에 대한 내성양상을 조사하였다. 또한 항균제에 대해 다제내성을 나타낸 *Salmonella enterica*의 각 혈청형별 균주에서 class 1 integron을 중합효소연쇄반응으로 검출하여 integron과 다제내성과의 상관관계를 조사하였다. 그리고 광주지역에서 발생하는 *Salmonella*속 균의 혈청형과 항균제 내성유전자의 특성을 파악하여 질병의 감염원인 추적과 감염경로를 조사하는데 기초자료로 활용하고자 하였다. 또한 복통, 설사 및 구토 등 집단 식중독의 원인이 되고 있는 살모넬라속 균의 인체 감염에 대한 병원성을 파악하기 위해 Hela 세포주를 이용한 세포독성 유무 조사하였고 독성과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 Cly A의 유전자 존재 유무와 관계가 있는지를 조사하였다.

제2장. 재료 및 방법

제1절 실험대상

2001년 1월부터 2007년 12월까지 7년 동안 광주지역 종합병원의 진단검사의학과 및 소아과에 설사를 주 증상으로 내원 및 입원한 환자의 대변을 4℃에 보관하도록 하여, 채취된 대변을 환자의 인적사항에 대한 기록지와 함께 매주 수집하여 냉장을 유지한 채, 실험실로 운반 즉시 실험을 수행하였다. 또한 이 기간 중 발생한 식중독 및 전염병으로 의심되어 보건소에 신고된 환자의 경우, 신고된 즉시 역학조사서와 함께 직장채변 또는 대변을 채취하여 냉장을 유지한 후, 실험실에 운반 즉시 실험에 이용하였다.

제2절 *Salmonella* 균주의 분리 및 혈청학적 동정

1. 가검물 전처리

수집된 대변을 bead를 넣은 시험관에 0.01 M phosphate buffered saline (PBS : pH 7.2)으로 10%가 되게 균질화를 시킨 후, 감염병 실험실 진단지침(73)에 준하여 직접 도말배양법과 증균배양을 병행하여 실시하였다.

2. *Salmonella* 균주의 분리

균질화된 대변은 MacConkey agar와 SS (*Salmonella Shigella* agar) 평판배지에 직접 도말하였고 한편으로 증균배양은 살모넬라만을 선택적으로 분리하는데 이용되는 tetrathionate broth (Difco, USA) 5 mL에 균질화된 대변 0.5 mL을 접종하여 37℃에서 18시간 배양하였다. 배양된 평판배지에서 lactose를 분해하지 않은 무색집락을 선택하여 감별배지인 KIA (Kligler Iron Agar,

Difco, USA) 사면배지에 접종한 후, 37℃에서 18시간 배양하였다. 장티푸스의 경우는 감별배지의 성상이 alkaline slant/acid butt, H_2S 양성, 파라티푸스는 감별배지의 성상이 alkaline slant/acid butt, H_2S 양성, gas 양성 또는 alkaline slant/acid butt, gas 양성 그리고 기타 살모넬라의 경우는 감별배지의 성상이 alkaline slant/acid butt, H_2S 양성, gas 양성을 나타내는 균주에 대해 *Salmonella* 균으로 추정하였다. 분리 균주의 생화학적 동정은 *Salmonella* 균으로 추정된 균주에 대하여, Bergey's manual에 따라 IMViC 시험, 당분해능 시험, 아미노산 탈탄산시험 등을 실시하고 최종적으로 API 20E kit (BioMerieux, France)를 사용하여 *Salmonella* spp.로 확인하였다.

3. 혈청학적 동정

생화학적으로 *Salmonella* spp.로 확인된 균주에 대하여 균체항원 (O group)은 국립보건연구원에서 분양받은 진단혈청과 편모항원 (H group)시험은 Difco사 제품을 이용하여 실시하였다. 즉 분리된 균주를 Brain Heart Infusion medium (BHI agar, Difco, USA)에서 37℃에서 18~24시간동안 순수배양한 후, *Salmonella* O Antisera (poly, Vi, A, B, C, D, E)와 슬라이드 응집시험을 실시하였다.

균체항원 (O group)이 확인된 균주에 대해서 편모항원 (H group) 검사를 수행하였다. 즉 살모넬라균의 운동성을 높이기 위해 Motility GI medium (Difco, USA)에 분리된 균주를 접종하여 37℃에서 18시간 배양하였다. 2차적으로 시험관 하부의 운동성이 강한 균을 취하여 veal infusion broth (Difco, USA)에 다시 37℃에서 18시간 배양한 후, 동량의 0.6% formalin-saline을 가하여 실온에 1시간 정치시켜 균을 고정하였다. *Salmonella* H항원 typing은 먼저 phase I 실험을 수행하기 위해 spicer-edwards antiserum 중 1, 2, 3, 4와 L-complex, EN-complex, 1-complex를 멸균된 0.85% NaCl saline을 이용하여

각각 1:250의 비율로 희석하여 준비하였다. 고정된 균액 500 uL와 4부 시험관에 희석된 각각의 항혈청을 동량 가하여 혼합한 후, 50℃ 항온수조에서 1시간 이상 반응시켜 응집여부를 확인하였다. Phase Ⅰ시험을 수행 후, phase Ⅱ가 확인이 되지 않은 경우, phase Ⅰ에서 확인된 항혈청과 멸균된 0.85% NaCl saline thioglycollate solution을 동량을 혼합한 다음 0.85% NaCl saline으로 10배 희석하였다. 멸균된 Motility GI medium (Difco, USA)을 중탕시킨 후 10배 희석된 항혈청 400 uL를 잘 섞어서 굳힌다. 굳혀진 Motility GI medium (Difco, USA)에 phase Ⅰ이 확인된 동일한 균을 접종하여 이후 phase Ⅰ의 실험과 동일한 순서로 수행하였다.

제3절 항균제 감수성 검사

분리균주에 대한 항균제 감수성 시험은 디스크 확산법에 의하여 실시하였다. 대조균주로는 *Escherichia coli* ATCC 25922를 사용하였으며, 사용된 항균제 디스크는 ampicillin (Am, 10 ug), amikacin (An, 30 ug), ciprofloxacin (Cip 5 ug), ampicillin/sulbactam (Sam, Am10 ug/sulbactam 10 ug), cephalothin (Cf 30 ug), chloramphenicol (CM, 30 ug), trimethoprim/sulfamethoxazole (Sxt 25 ug), gentamicin (Gm 10 ug), nalidixic acid (Na 30 ug), tetracycline (Te 30ug), ticarcillin (Tic, 75 ug) 등 총 11종을 사용하였다. brain heart infusion medium에서 배양된 균을 müller hinton broth (Difco, USA)에 접종하여 37℃에서 6시간 배양하였다. 배양된 균액의 농도를 MacFarland scale No. 0.5가 되도록 0.85% NaCl saline으로 희석하여 muller hinton medium (Difco, USA)에 고루 도말한 다음, 항균제 디스크를 30 ㎜간격으로 위치시키고 37℃에서 18시간 배양하여, zone reader로 발육 억제대를 측정하였으며, 감수성은 National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS) 기준에 의해 판정하였다.

제4절 *Salmonella Typhimurium Plasmid* 분리 및 분석

Plasmid 분리는 Kado와 Liu (1981)의 방법에 준하여 실시하였는데 그 방법은 다음과 같다. 균을 5 mL tripticase soy broth (Difco, USA)에 접종하여 37°C에서 18시간 진탕 배양한 후 12,000 xg에서 1분간 원심하여 상청액을 버리고 세균침사를 모았다. 세균을 200 uL의 TE buffer (10 mM Tris base, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 현탁시키고 400 uL의 lysis mixture (3% SDS, 50 mM Tris base, pH 12.0)를 가하여 4°C에서 5분간 용해시킨 후, phenol/chloroform/isoamyl alcohol 혼합액 (25:24:1)을 600 uL 첨가하였다. 15회 정도 부드럽게 흔들어 혼합하고 4°C에서 12,000 xg으로 10분간 원심한 후, plasmid가 함유된 상청액을 회수하여 전기영동을 실시하였다. plasmid 분석을 위하여 1% agarose gel에 전기영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 분석하였다. DNA 분자량를 측정하기 위하여 Supercoiled DNA ladder (Gibco BRL)를 표준으로 하였으며, 분자량의 계산은 BioGene version 99.04 프로그램 (Vilber Lourmat Co., Marne La Vallee, France)을 이용하였다.

제5절 다제내성 유전자 분석을 위한 *PCR* 반응

Fig. 1은 class 1 integron의 일반적인 구조이다. 다제내성을 갖는 유전자를 분석하기 위해서 PCR template로 사용한 *Salmonella* spp.의 DNA는 Luria-Bertani (LB) broth에서 배양한 균액을 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer에 1/10로 희석하여 10분간 boiling한 후 12,000 xg 3분간으로 원심하여 얻은 상청액을 보관하였다가 사용하였다. PCR 반응은 eppendorf thermal cycler로 증폭하였다. 반응액은 20 mL가 되도록 하며 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 100 pM의 primers, 1 U의 polymerase에 3-5 ml의 DNA template를 첨가하였다. 각각의 integron 유전자형 분석에 사용된 primer는 Le´vesque 등 (1995)과 Dalsgaard 등 (2000)의 방법에 따

라 동일하게 하였다 (Table 1). Class 1 integron을 분석하기 위한 primer in-F과 in-B를 사용한 PCR과 qacE■1-F와 sul1-B 그리고 in-F와 addA-B를 이용한 PCR 반응은 94°C에서 먼저 5분간 denaturation을 시킨 후 94°C에서 30초, annealing은 58°C에서 30초, extension은 72°C에서 1분간 30회 반응시키고 마지막으로 72°C에서 10분간 extension을 실시하고 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 증폭여부를 확인하였다. Integron내의 β-lactamase 유전자를 검출하기 위한 in-F와 blaP1-B를 이용한 PCR 반응은 52°C에서 annealing을 실시하였으며, blaP1-F와 blaP1-B을 이용한 PCR은 55°C에서 annealing을 실시하였다.

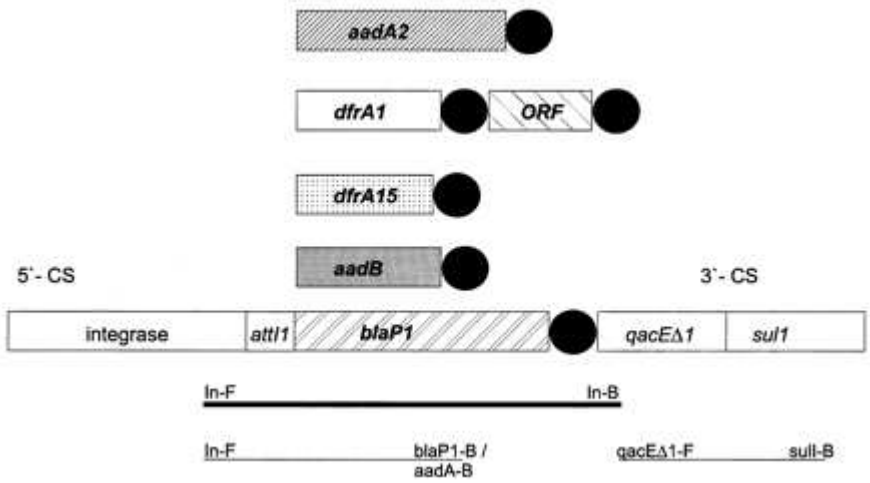

Fig. 1. Association between integron structure and PCR products. The lines below the integron structure represent amplicons, and the bold line represents the sequenced amplicons. The primers above the PCR products are described in Table 1. attI1 is the attenuation site, and *qacE*[redacted]*1* and *sul1* encode resistance to disinfectants and sulfonamides, respectively. The individual gene cassettes are drawn to scale. The recombination site (59-bp element) is shown as a dark circle.

Table 1. PCR primers used for identification and characterization of integrons and gene cassettes in *Salmonella enterica* serovars

Primer	Sequence	Position of Primer	Reference
in-F	GGCATCCAAGCAGCAAGC	1416→1433	15
in-B	AAGCAGACTTGACCTGAT	4831→4814	15
attI1-F	CGGGCATCCAAGCAGCAAGCGC	1414→1435	15
qacE[redacted]1-F	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	211→230	56
sul1-B	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC	1360→1341	62
blaP1-F	CGCTTCCCGTTAACAAGTAC	348→367	72
blaP1-B	CTGGTTCATTTCAGATAGCG	767→748	72
aadA-B	ATTGCCCAGTCGGCAGCG	1933→1916	32

제6절 분리된 *Salmonella* 혈청형의 병원성에 관한 연구

1. 분리된 *Salmonella* 혈청형의 세포독성시험

CytoTox nonradioactive cytotoxicity assay kit가 cytotoxicity indicator로 cytosolic lactate dehydrogenase (LDH) 측정하는데 사용되었다. 먼저 24-well tray에 1×10^5 cells/mL의 HeLa 세포주를 5% CO_2에서 37℃에서 2시간 배양하였다. 배양된 세포를 serum-free MEM (minimum essential medium) 1 mL로 세척하였다. LB 배지에서 5시간 계대 배양된 각 혈청형의 균주를 3,000 xg로 5분간 원심 분리하여 모은 후, PBS로 세척하여 600 nm에서 흡광도가 1.0 (약 $1X10^9$ cell/ml)이 되도록 serum-free MEM로 희석하였다. 세균과 세포의 비율이 10:1이 되도록 조정된 세균을 배양된 HeLa세포에 접종하여, 5% CO_2의 조건에서 4시간 동안 배양한 후 원심 분리하여 상청액을 얻었다. 50 uL의 상청액을 96-well로 옮겨 동량의 LDH substrate 혼합물을 섞는다. 어두운 상온에서 30분간 방치한 후, 반응 정지용액으로 반응을 중지시키고 파장 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로 세포를 완전히 용해시키는 10% triton X-100을 사용하였다. 세균이 생성한 독성물질을 함유한 상청액으로 세포독성에 미치는 영향을 조사하기 위해서, MEM 배지에서 24시간 배양한 후, 원심 분리하여 상징액을 얻은 다음 0.2 μm의 filter에 여과하여 사용하였다. 여과된 상청액을 MEM 배지와 동량으로 혼합한 후 HeLa 세포를 4시간 동안 배양하였다. 사진 촬영을 위해 4시간 처리한 HeLa 세포주를 PBS로 세척한 이후, ethidium bromide를 첨가하여 형광현미경으로 관찰하고 사진을 촬영하였다.

2. 중합효소연쇄반응 (PCR)에 의한 용혈독소 (Cytolysin A) 유전자의 검출

인체감염 시 세포독성과 관련이 깊은 용혈독소 Cly A 유전자를 검출하기 위한 primer는 Oscarsson 등 (2002)이 *S.* Typhi의 Cly A 유전자 검출에 사용하였던 Sal 1 (CTCGTCAGCCCGGTAACGAC)과 Sal 6 (CGGTACCG ATATCACCGATG)을 사용하였다. 배양된 시험균을 원심분리한 후, 0.2 mL의 증류수에 다시 부유시키고 100°C에서 10분간 가열하였다. 균액을 원심 분리하여 상징액 3 uL를 중합효소연쇄반응 (PCR)을 위한 DNA template로 사용하였다. PCR 반응은 Eppendorf thermal cycler로 증폭하였다. 반응액은 20 ul가 되도록 하며 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 4 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 1 μM의 primers, 1 U의 polymerase에 2 uL의 DNA template를 첨가하였다. PCR 반응은 94°C에서 먼저 5분간 denaturation 시킨 후 94°C, 45°C, 72°C에서 각각 45초간 30회 반응시키고 마지막으로 72°C에서 5분간 extension을 실시하여 2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 증폭여부를 확인하였다

3. 용혈소 (Cly A) 생성능 시험

분리균주의 용혈소 생성능을 검사하기 위해서 배양된 세균을 5% sheep blood가 함유된 한천배지에 도말한 후, 37°C에서 24시간 배양하고 4°C 냉장고에 1-2일간 보관한 다음, 세균집락 주변에 용혈작용에 의한 투명대가 형성되면 양성으로 판정하였다.

제3장 결과 및 고찰

제1절 광주지역에서 발생한 설사환자에서의 *Salmonella* 분리 빈도

2001년 1월부터 2007년 12월까지 7년간 광주광역시 보건환경연구원 미생물과에 의뢰된 22,422명의 설사질환 환자의 분변검체로부터 *S. enterica*의 분리율를 조사한 결과, 232주의 균주가 분리되어 설사질환 환자의 1.0%가 *Salmonella*에 의한 감염증임을 알 수 있었다 (Table 2). 연도별 *Salmonella*의 분리율을 살펴보면, 2001년도에 2.1%로 가장 높았으며 2002년도에는 0.8%, 2003년에는 1.1%, 2004년에는 0.6%, 2005년에는 0.5%로 감소하는 추세를 보였다. 그러나 2006년에는 0.9%, 2007년에는 1.3%로 증가하는 경향을 보였다. 검체수가 2001년도에 1,919 개에서 해마다 증가하여 2007년도에는 4,623 개로 증가하였는데 이는 설사환자의 증가에도 원인이 있었지만 적극적인 검체의 수집에 의한 결과이기도 한다.

병원성 미생물에 의해서 일어나는 설사는 위생수준과 음용수, 음식물 또는 위생시설의 질적 수준, 생활양식의 형태에 관계없이 전 세계의 모든 사람들, 특히 어린이들의 건강에 많은 영향을 미치며, 개선된 위생환경과 치료를 통해 설사로 인한 사망자 수는 점차 감소되고 있으나, 개발도상국가에서는 여전히 높은 사망률을 유지하고 있다 (3). 이러한 감염성 설사질환의 원인체로는 *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, 대장균 (ETEC/ EPEC/ EHEC/ EIEC 등), *Campylobacter*, *Staphylococcus aureas*, *Yersinia* 등 세균성질환과 rotaviruses, noroviruses, astroviruses, adenoviruses 등 바이러스성질환이 원인이 되고 있다 (2, 10). 설사를 동반한 위장관질환은

그 질병으로 인한 사망률뿐만 아니라 경제적인 비용에 있어서도 중요한 문제를 야기하고 있다. 더욱이 세균에 의한 위장관질환은 그 전염성 때문에 공중보건 측면에서 중요한 관리대상이 되고 있음에도 불구하고 아직까지도 세균성 병원체에 의한 위 장관질환이 많이 발생하고 있는 실정이다. 국내의 경우, 2005년 식약청에서 발표한 자료에 의하면 8,143명의 설사환자에서 채취한 검체에서 *Clostridium* 균종이 9.3%로 가장 높은 분리율를 보였으며, 다음으로는 대장균 5.5%, 포도상구균 4.8%, *Bacillus* 3.0%, *Salmonella*는 1.4%의 분리율를 보였다. 본 연구에서 7년간 22,422명의 설사질환 환자의 분변검체로부터 *S. enterica*의 분리율를 조사한 결과 232주(1.0%)의 균주가 분리되어 식약청의 자료와 유사하였다. 이상의 결과는 국내에서 발생하는 설사를 동반한 위장관염의 원인은 약 1%가 *Salmonella* 감염증에 의한 것임을 알 수 있었다. 특히 *Salmonella*는 집단식중독을 발생시킬 가능성이 높으므로 환자의 발생 예방과 감시체계를 갖추어야 할 것이다.

Table 2. Prevalence of diarrheal patients by *Salmonella enterica* in Gwangju for 7 years

Year	No of Sample	Salmonella Isolates	
		n	%
2001	1,919	41	2.1
2002	2,879	24	0.8
2003	2,905	33	1.1
2004	2,680	17	0.6
2005	3,415	18	0.5
2006	4,001	37	0.9
2007	4,623	62	1.3
Total	22,422	232	1.0

제2절 *Salmonella enterica* 혈청형별 분리 빈도

*Salmonella*에 의한 집단 식중독의 증가와 함께 다수 항균제에 대한 내성이 증가하고 있어 분리 균주들에 대한 특성 조사와 함께 역학관계의 규명이 중요해 지고 있다. *Salmonella*는 주로 장염을 수반하는 감염을 일으키는 장병원성 세균으로서 2,300가지 이상의 혈청형이 알려져 있으며, 환자에서 가장 빈번히 검출되는 혈청형은 주로 *S.* Typhimurium 및 *S.* Enteritidis가 자주 보고되고 있다 (53). 비장티프스성 salmonellosis는 식품 매개성 감염질환으로서 전 세계적으로 해마다 많은 환자가 발생되고 있다 (9, 74, 77). 그러나 국내에서는 환자에서 분리되는 *Salmonella*의 혈청형의 빈도에 대한 보고가 전혀 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 2001년 1월부터 2007년 12월까지 7년간 분리된 *S. enterica*는 총 232주이었는데 연도별 *Salmonella enterica*의 분리는 2001년 41주, 2002년 24주, 2003년 33주, 2004년 17주, 2005년 18주, 2006년 37주, 2007년도에 62주였으며, 2007년도에 가장 많이 분리되었다. 이들 분리균주의 혈청형을 조사한 결과 총 30종류이었으며, 분리빈도를 보면 Enteritidis가 99주 (42.9%)로 가장 높았고, Typhimurium 61주 (26.4%), London 10주 (4.3%), Braenderup와 Rissen이 각각 6주 (2.6%), Paratyphi B 5주 (2.2%), Bardo, Hadar, Infantis, Potsdam, Virchow는 각각 4주 (1.7%)이었으며, 그 외 혈청형은 1-3주 분리되었다 (Table 3). 2001년 분리균주 41주 중 Typhimurium 17주 (41.5%), Enteritidis 14주 (34.1%), Lodon 3주 (7.3%) 및 기타 7주 (17.1%)이었다. 2002년 분리균주 24주 중 Enteritidis 9주 (37.5%), Typhimurium 6주 (25.0%) London 4주 (16.7%) Paratyphi B 2주 (8.3%), 기타 3주 (12.5%)순이었다. 2003년 분리균주 33주 중 Enteritidis 10주 (30.3%), Typhimurium 9주 (27.3%), Bardo, Braenderup

이 각 2주 (6.1%), 기타 10주 (30.3%)순이었다. 2004년 분리균주 17주 중 Typhimurium 5주 (29.4%), Hadar 3주 (17.6%), Bardo, Postdam이 각 2주 (11.8%), 기타 5주 (29.4%)순이었다. 2005년 분리균주 18주 중 Enteritidis 11주 (61.1%), Typhimurium 3주 (16.7%), London 2주 (11.1%), 기타 2주 (11.1%)순이었다. 2006년 분리균주 37주 중 Enteritidis 23주 (62.2%)로 가장 많았으며, Typhimurium 5주 (13.5%), Typhi, Rissen이 각 2주 (5.4%), 기타 5주 (13.5%)순이었다. 2007년 62주 중 Enteritidis 31주 (50.0%), Typhimurium 16주 (25.8%), Virchow 4주 (6.5%), Infantis 3주 (4.8%), Braenderup 2주 (3.2%), 기타 6주 (9.7%)순이었다 (Table 3). 국내에서는 환자에서 분리되는 빈도에 관한 결과는 없으며, Chung 등 (2003)이 1993년부터 2001년까지 식품에서 *Salmonella*를 분리하여 혈청형을 조사했던 결과, *S.* Enteritidis가 29.3%로 가장 많이 분리되었고 다음으로는 *S.* Virginia (14.6%), *S.* Haart (12.2%)가 분리되었다고 보고하였다. 또한 이우원 등 (2001)은 돼지와 소에서 분리된 *Salmonella* 혈청형의 분리빈도를 조사한 결과 소에서 분리된 36주 중 Ruiru가 11주로 가장 빈도가 높았고 Typhimurium과 London이 각각 6주, Brandenburg 3주, Newport 2주, Schwarzengrund, Agona, Jos, Rissen, Ohlstedt가 각각 1주이었다. 또한 돼지에서는 289균주의 34종 혈청형이 분리되었으며, Typhimurium이 89주 (31%)로 가장 빈도가 높았고 다음으로는 Derby (17%), Schwarzengrund (15%), Enteritidis (6%), Mbandaka (5.5%)순이었다. 이와 같은 보고와 본 연구에서의 결과를 비교 분석하면 광주지역의 설사환자에서 분리된 균주는 동물이나 식품에서 유래된 것임을 알 수 있었다. 각 혈청형의 연도별 분리빈도에서의 특징은 혈청형 Enteritidis은 2001년도부터 2003년까지는 30 ~ 40%의 분리율를 보이다가 2004년에는 5% 이내로 감소하였으나 2005년도부터는 다시 50 ~ 60%

로 증가하는 경향을 보였다. 혈청형 Typhimurium은 2001년도에 약 40% 이상 분리되었다가 점차적으로 감소하는 경향을 보였으나 2007년도에 다시 증가하였으며, Arizonae, Montevideo, Saintpaul, Victoria 등 매년 새로운 혈청형이 분리되었다. (Fig 2) 이와 같은 결과는 최근 동남아를 비롯한 해외여행자들에 의해 국내에 유입된 혈청형일 가능성이 높다 (18). 이상의 결과에서 새로운 혈청형이 어디에서 유래하여 위장관염을 일으켰는지 역학조사가 이루어져야 할 것이다.

Table 3. Serovars of *Salmonella enterica* isolates in seven year period

Serotype	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Total
Agona			1					1
Albert	1							1
Arizonae						1		1
Bardo			2	2				4
Blockley			1			1		2
Braenderup		1	2	1			2	6
Brandenburg	1							1
Derby	1							1
Enteritidis	14	9	10	1	11	23	31	99
Essen			1			1		2
Hadar	1			3				4
Haardt					1			1
Indiana		1						1
Infantis						1	3	4
Kedougou			1					1
London	3	4	1		2			10
Mbandaka				1				1
Montevideo							1	1
Panama	1			1				2
ParatyphiB	1	2	1				1	5
Postdam	1		1	2				4
Rissen		1	1	1		2	1	6
Saintpaul						1		1
Schleissheim			1					1
Schwarzengrund			1		1			2
Stanley							1	1
Typhi						2	1	3
Typhimurium	17	6	9	5	3	5	16	61
Victoria							1	1
Virchow							4	4
Total	41	24	33	17	18	37	62	232

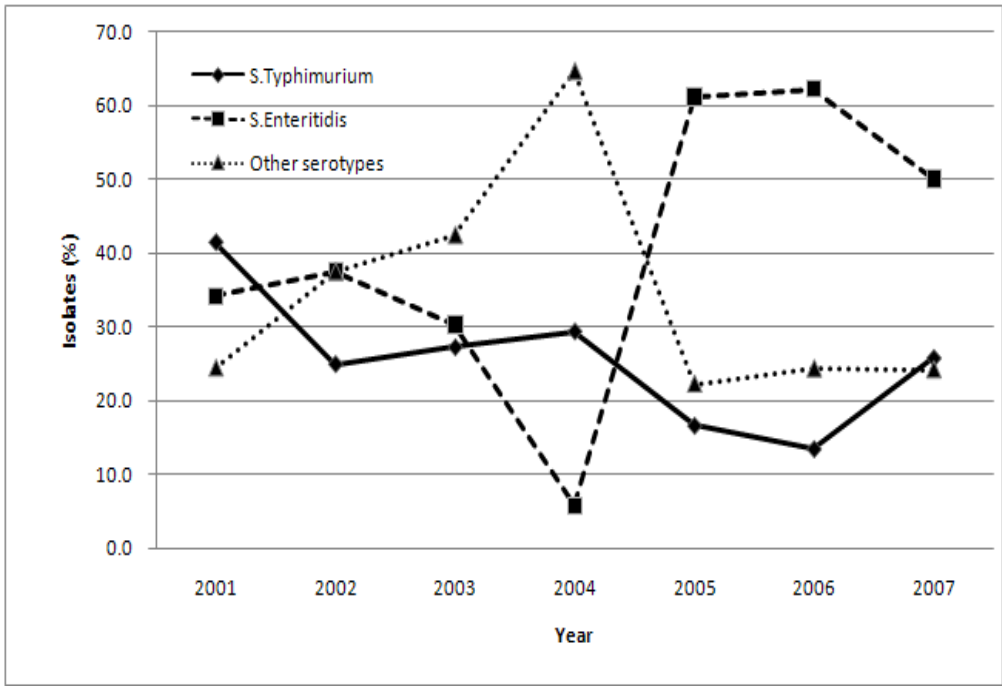

Fig. 2. Prevalence of *Salmonella enterica* serovars in Gwangju city during 2001 - 2007 year.

제3절 *Salmonella enterica* 혈청형별 항균제 내성양상

1. 항균제 내성양상

분리된 각 혈청형의 각 항균제에 대한 내성빈도는 Table 4와 같다. 7년 동안 분리된 232주의 항균제에 대한 내성도는 11종의 항균제 중 tetracycline (TE)에 대한 내성균 빈도가 47.4%로 가장 높았으며, ampicillin (AM), ticarcillin (TIC) 45.7%, ampicilin/sulbactam (SAM) 27.6%, nalidixic acid (NA) 22.8%, chloramphenicol (CM) 21.6%, gentamicin (GM) 9.1%, trimethoprim/sulfamethoxazol (SXT) 5.6%, cephalotin (CF) 4.3%, amikacin (AK) 2.2%, ciprofloxacin (CIP) 0.4% 순이었다.

환자에서 분리되는 *Salmonella*에 있어 항균제 내성의 증가는 전 세계적인 추세이다. 특히 *S.* Typhimurium은 다른 혈청형에 비해 항균제에 대한 내성도가 매우 높은 편이다. 본 연구에서도 혈청형 Typhimurium은 다른 혈청형에 비해 각종 항균제에 대해 비교적 많은 내성률을 보였다. 특히 TE에 대해 82.2%로 대부분의 균주가 내성을 보였으며, 다음으로는 AM과 TIC에 대해 약 50%, CM 31.1%, SAM 24.6%, GM 23%, NA 16.4%, SXT 14.8%, CF 6.6%의 순이었다. AN과 CIP에 대해서는 내성균이 없었다. 오 등 (2005)의 보고에서도 서울지역에서 분리한 *S.* Typhimurium의 경우 TE, streptomycin (SM) 및 SXT 등의 항균제에 높은 내성률을 보여 본 연구 결과와 유사하였다. 혈청형 Enteritidis은 AM과 TIC에 대해 59.6%가 내성을 보였고, SAM 40.4%, TE과 NA 30.3%, CM 24.2%, CF 5.1%이었으며, CIP과 SXT에 대한 내성은 없었다. 기타 혈청형은 TE에 대해 41.7%로 내성빈도가 가장 높았으며, 다음으로 SAM 27.6%, AM 23.6%, TIC 22%, NA 18.1% 순으로 내성빈도를 보였다.

Randall 등 (2004)의 보고를 살펴보면, 영국에서 분리된 *Salmonella*의 경우 혈청형 Typhimurium은 AM, CM, SM, TE, sulfadiazine 등 각종 항균제에 높은 내성률을 보였으나, Enteritidis 및 기타 혈청형은 대부분의 항균제에 감수성을 보여 국내에서 분리된 균주가 보다 더 높은 항균제 내성도를 보였다. 본 연구에서 특징은 혈청형 Enteritidis는 penicillin계 항균제인 AM, TIC와 SAM에 대해 내성빈도가 다른 혈청형 보다 더 높았으며, 혈청형 Typhimurium은 단백합성을 억제하는 CM, GM 및 TE에 대한 내성빈도가 높았다. 기타 혈청형은 모든 항균제에 대한 내성빈도가 낮았다. 본 연구에서 분리된 232주의 항균제에 대한 내성도는 TE에 대한 내성균 빈도가 47.4%로 가장 높았으며, 다음으로는 AM 및 TIC에 대해 45.7%, SAM에 대해서는 27.6%, NA 22.8%, CM 21.6%의 순으로 높았다. 이 등 (2001)이 소와 돼지에서 분리된 325주의 *Salmonella*의 항균제에 대한 내성균의 빈도에서는 TE에 대해서는 67.1%의 균주가 내성을 보여 본 연구에서 보다 높은 편이었으나, AM에 대한 빈도는 16.9%으로 낮았다. Meakins 등 (2008)의 보고에서 2000년부터 2004년까지 유럽에서 분리된 NTS의 항균제에 대한 내성균의 빈도에서 SXT 25-30%, TE 16-26%, AM 19-22%, CM 8-14%, NA 12-20%로 본 연구 결과보다 낮았다. 이와 같은 결과는 항균제에 높은 내성을 보이는 동물유래 식품에 오염된 식품 매개에 의한 것으로 추정된다.

Table 4. Percent antimicrobial resistance values of *Salmonella enterica* serovars

Antibiotics	No (%) of Antimicrobial Resistance			
	Enteritidis (n=99)	Typhimurium (n=61)	Other Serotype (n=72)	Total (n=232)
Ampicillin	57 (59.6)	32 (49.2)	17 (23.6)	106 (45.7)
Amikacin	3 (3.0)	0 (0.0)	2 (2.8)	5 (2.2)
Ampicillin/ Sulbactam	40 (40.4)	15 (24.6)	9 (27.6)	64 (27.6)
Cephalotin	5 (5.1)	4 (6.6)	1 (1.4)	10 (4.3)
Ciprofloxacin	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.4)	1 (0.4)
Chloramphenicol	24 (24.2)	19 (31.1)	7 (9.7)	50 (21.6)
Gentamicin	3 (3.0)	14 (23.0)	4 (5.6)	21 (9.1)
Nalidixic acid	30 (30.3)	10 (16.4)	13 (18.1)	53 (22.8)
Tetracycline	30 (30.3)	50 (82.2)	30 (41.7)	110 (47.4)
Ticarcillin	59 (59.6)	31 (50.8)	16 (22.2)	106 (45.7)
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0 (0.0)	9 (14.8)	4 (5.6)	13 (5.6)

2. 연도별 각 혈청형의 내성빈도

분리된 각 혈청형의 항균제 내성빈도를 연도별로 조사하기 위해 2년 단위로 그룹을 지어 조사한 결과 Table 5~7과 같은 결과를 얻었다. 혈청형 Enteritidis의 경우 (Table 5), AM와 TIC에 대한 내성균의 빈도가 2001-2002년에는 34.8%이었으나 2003년 이후에 분리된 균주에서는 63.6% ~ 70.6%로 증가하는 경향을 보였으며, SAM에 내성빈도는 2001-2004에는 4.3% 이하였으나 2005년 이후에는 58.1% ~ 61.8%로 크게 증가하였다. 그러나 TE에 내성빈도는 2001 ~ 2002년에 47.8%에서 점차로 감소하는 경향을 보였다.

혈청형 Typhimurium의 경우 (Table 6) AM에 대한 내성균의 빈도가 2001 ~ 2002에는 34.8%이었으나 점차 증가하는 경향을 보여 2005 ~ 2006년에는 75.0%, 2007년에는 62.5%이었으며, TIC에 대한 내성균의 빈도가 2001 ~ 2002년에는 39.1%에서 2005 ~ 2006년에는 75%로 증가하였다. 또한 2001 ~ 2004년에 분리된 균주는 SAM에 대해 모두 감수성을 보였으나, 2005년 이후에 분리된 균주에서는 56.3% ~ 75%의 내성빈도를 보였다. GM에 대한 내성빈도에서도 2001 ~ 2002년에 분리된 균주에서는 17.4%이었으나 2005 ~ 2006년에 분리된 균주에서는 50%, 2007년에 분리된 균주에서는 31.3%로 증가하였다. 기타 혈청형의 년도 별 내성균의 빈도에서는 특징적인 경향을 관찰할 수 없었으며, 항균제에 내성이 높은 혈청형의 분리에 따라 내성 빈도가 달랐다 (Table 7).

항균제 내성빈도를 년도 별로 조사하기 위해 2년 단위로 그룹을 지어 조사한 결과 혈청형 Enteritidis와 Typhimurium의 경우 AM, SAM, GM과 TIC에 대한 내성균의 빈도가 2004년도 이전에 분리된 균주에 비해 2006년도 이후에 분리된 균주에서 높았다. 또한 2001년도에서 2004년도까

지 분리된 균주에서는 4가지 이상의 약제에 대해 내성을 갖는 균주는 28% 미만이었지만 2005년도 이후에 분리된 균주에서는 약 50%정도가 다제내성을 가지고 있었다. 세균의 약제내성을 조절하는 유전정보는 세균 염색체와 염색체외 Plasmid DNA의 두 곳에 위치한다. 내성은 이들 부위로부터 유전물질의 전달에 의해 내성세포에서 감수성 세포로 형질전환, 접합 또는 형질도입을 통해 전달될 수 있다. R인자는 항 미생물제와 중금속에 대한 내성에 관여하는 유전자를 가지는 플라스미드이다. 항 미생물 내성을 담당하는 플라스미드 유전자는 많은 경우, 항 미생물 약제를 파괴할 수 있는 효소의 형성을 조절한다 (59). 항균제 내성의 중요한 원인은 항균제의 과다사용을 포함한 부적절한 사용이다 (23). 혈청형 Enteritidis와 Typhimurium은 해마다 주된 식중독 원인균으로써 항균제 치료에 노출되어 약제내성균만이 생존하여 꾸준히 감염을 일으키기 때문에 점차적으로 항균제에 대한 내성도가 높아지는 것으로 생각된다. WHO는 적절한 항균제 사용을 위한 전략은 치료효과를 극대화 할 수 있으면서 항균제로 인한 독성과 내성발현을 최소화하는 비용과 효과적 사용이라고 정의하고, 적절한 항균제 사용을 위해 내성 감시체계가 필요하다고 제안하고 있다. 항균제의 과다사용을 줄이고 합리적 사용을 촉진하기 위해서는 정확한 실태파악이 우선적으로 요구되고 있다. 따라서 본 연구의 결과는 항균제 내성에 대한 정보를 제공하고, 그 심각성을 인식시켜 환자 및 동물 치료 약제의 선정 기준을 제시할 수 있을 것이다.

Table 5. Proportion (%) of isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis showing resistance to a panel of antimicrobial agents

Antibiotics	2001-2002 (n=23)	2003-2004 (n=11)	2005-2006 (n=34)	2007 (n=31)
Ampicillin	34.8	63.6	70.6	64.5
Amikacin	0.0	0.0	2.9	0.0
Sulbactam	4.3	0.0	61.8	58.1
Cephalotin	0.0	9.1	2.9	0.0
Chloramphenicol	21.7	9.1	20.6	32.3
Ciprofloxacin	0.0	0.0	0.0	0.0
Gentamycin	0.0	9.1	5.9	0.0
Nalidixic acid	8.7	45.5	41.2	19.4
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	0.0	0.0	0.0	0.0
Ticarcillin	34.8	63.6	70.6	64.5
Tetracycline	47.8	45.5	23.5	22.6

Table 6. Proportion (%) of isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium showing resistance to a panel of antimicrobial agents

Antibiotics	2001-2002 (n=23)	2003-2004 (n=14)	2005-2006 (n=8)	2007 (n=16)
Ampicillin	34.8	42.9	75.0	62.5
Amikacin	0.0	0.0	0.0	0.0
Sulbactam	0.0	0.0	75.0	56.3
Cephalotin	4.3	0.0	25.0	12.5
Chloramphenicol	30.4	7.1	50.0	50.0
Ciprofloxacin	0.0	0.0	0.0	0.0
Gentamycin	17.4	14.3	50.0	31.3
Nalidixic acid	21.7	21.4	37.5	37.5
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	21.7	14.3	25.0	25.0
Ticarcillin	39.1	35.7	75.0	56.3
Tetracycline	91.3	64.3	100.0	75.0

Table 7. Proportion (%) of isolates of *Salmonella enterica* serovars showing resistance to a panel of antimicrobial agents

Antibiotics	2001-2002 (n=19)	2003-2004 (n=25)	2005-2006 (n=13)	2007 (n=15)
Ampicillin	42.1	8.0	30.8	20.0
Amikacin	0.0	0.0	15.4	0.0
Sulbactam	10.5	0.0	30.8	20.0
Cephalotin	0.0	0.0	7.7	0.0
Chloramphenicol	21.1	0.0	7.7	13.3
Ciprofloxacin	0.0	4.0	0.0	0.0
Gentamycin	5.3	0.0	23.1	0.0
Nalidixic acid	5.3	20.0	38.5	13.3
Trimethoprim/ Sulfamethoxazol	10.5	0.0	7.7	6.7
Ticarcillin	42.1	4.0	30.8	20.0
Tetracycline	52.6	36.0	46.2	26.7

3. 다제내성 양상

한 가지 이상의 항생제에 대해 내성을 가진 *Salmonella* 균주의 다제내성 양상을 분석한 결과는(Table 8 및 Fig. 3)과 같다. 혈청형 Enteritidis의 경우 80%이상이 한 가지 이상의 약제에 내성을 보였으며, 약 65%에서 두 가지 이상의 항균제에 다제내성을 보였다. Typhimurium은 85% 이상이 한 가지 이상에 내성이 있었으며, 특히 두 가지 이상의 약제에 68% 이상의 균주가 약제에 내성을 보여 오 등 (2005)의 보고에서 서울지역에서 분리된 균주에서 57%의 경우 보다 그 빈도가 높았다. 또한 3-8가지 항균제에 대한 다제내성 빈도도 약 52% 이상으로 다른 혈청형에 비해 다제내성도가 매우 높았다. 그러나 혈청형 Enteritidis와 Typhimurium을 제외한 기타 혈청형은 55% 정도만이 한 가지 이상의 약제에 내성을 보였으며 세 가지 이상의 약제에 내성을 보인 균주는 20% 정도로 혈청형 Enteritidis와 Typhimurium에 비해 낮았다. 5가지 이상의 항균제에 내성을 갖는 균주는 혈청형 Typhimurium에서 20주 (34%)로 가장 많았으나 혈청형 Enteritidis에서는 11주 (11%)로 낮았으며, 기타 혈청형에서는 10주 (13%)이었다.

혈청형 Enteritidis에서 가장 높은 빈도를 보인 다제내성형은 AM-SAM-TIC에 대한 내성과 AM-SAM-CM-TIC에 대한 내성으로서 10주 (10.1%)에서 관찰되었으며, 다음으로는 AM-TIC에 대한 내성이 6주 (6.1%), AM-CM-TIC-TE, AM-SAM-NA-TIC 및 AM-SAM-TIC-TE에 대한 내성을 갖는 균주가 각각 5주 (5.1%)에서 관찰되었다. 혈청형 Typhimurium에서는 CM-TE에 대한 내성균이 6주 (9.8%)로 가장 많았으며 다음으로는 NA-TE, AM-TIC-TE와 AM-SAM-CM-GM-TIC-TE에 대해 내성을 갖는 균주가 각각 3주 (4.9%)이었다. 기타 혈청형에서는 AM-SAM-CM-TIC-TE에 대한 내성균이 4주 (5.6%)이었는데 이 중 3주

는 혈청형이 Paratyphi B이었다.

혈청형 Enteritidis와 Typhimurium의 다제내성도를 분리된 연도별로 정리한 결과 Fig. 4와 같은 결과를 보였다. 2001년도에서 2004년도까지 분리된 균주에서는 4가지 이상의 약제에 대해 내성을 갖는 균주는 28% 미만이었지만 2005년도 이후에 분리된 균주에서는 약 50% 정도가 다제내성을 가지고 있었다. 두 혈청형 모두 비슷한 경향을 보였다.

본 연구의 결과는 Threlfall 등 (2003)이 유럽지역에서 분리된 각 혈청형의 내성도를 비교한 보고에 비해 다제내성도가 높았다. 전체적으로 동시에 내성을 보이는 항균제는 각 혈청형에서 비교적 내성률이 높았던 AM, SAM, TIC 및 TE이었다. 특히 동일 penicillin계 항균제인 AM과 TIC 두 가지 항균제에 내성을 보인 균주가 가장 많았다. 혈청형 Enteritidis와 Typhimurium을 제외한 28가지의 혈청형은 전반적으로 낮은 다제내성도를 보였으나 Blockley, Brandenburg, Haardt, Panama, Paratyphi B, Rissen, Saintpaul 및 Victoria에서 높은 다제내성을 가지고 있었다 (Table 9). 특히 혈청형 saintpaul은 AM-SAM-GM-NA-TIC-TE-SXT의 7가지 약제에 내성을 보였다.

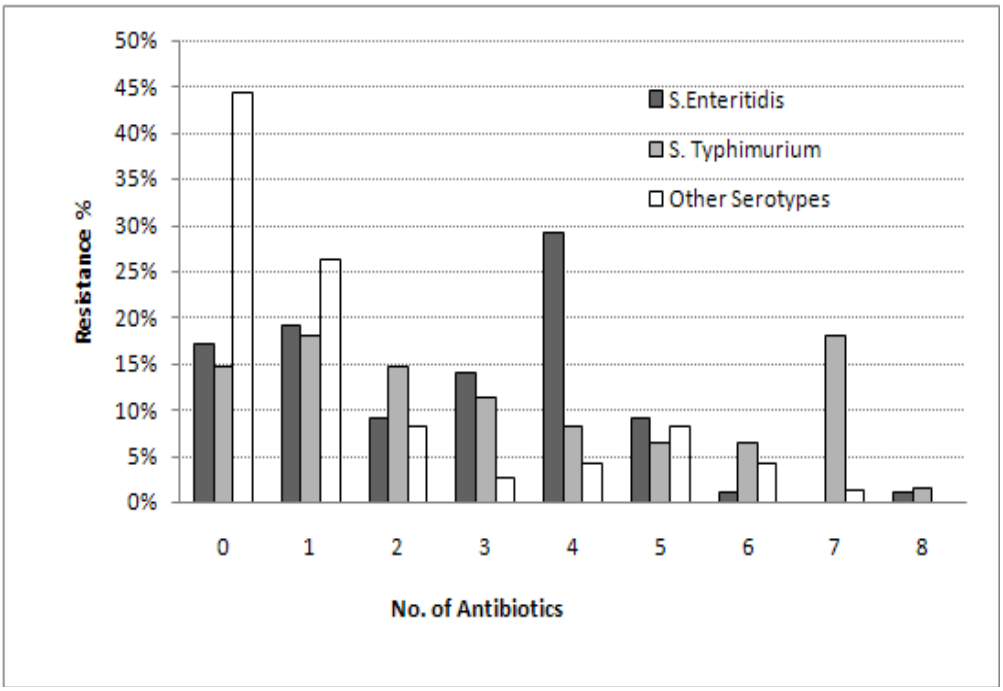

Fig. 3. Frequence of multiple drug resistance of each serovar of *Salmonella enterica* isolates.

Table 8. Multiple resistance pattern of each *Salmonella enterica* serovar isolates

No. of Antibiotics	Resistance Patterns	Enteritidis	Typhimuri-um	Other Serotype
0		17 (17.2)	9 (14.8)	32 (44.4)
1	Am		1 (1.6)	
	An			1 (1.4)
	Cip			1 (1.4)
	Na	14 (14.1)		4 (5.6)
	Te	5 (5.1)	10 (16.4)	13 (18.1)
2	AmTic	6 (6.1)		2 (2.8)
	AmTe			1 (1.4)
	AnNa	1 (1.0)		
	SamNa	1 (1.0)		
	SamTe	1 (1.0)		
	CmTe		6 (9.8)	
	NaTe		3 (4.9)	2 (2.8)
	GmNa			1 (1.4)
3	AmCmTic	1 (1.0)		
	AmNaTic	1 (1.0)	1 (1.6)	
	AmSamTic	10 (10.1)		
	AmTicTe	2 (2.0)	3 (4.9)	1 (1.4)
	AnGmNa			1 (1.4)
	CmTicTe		1 (1.6)	
	GmNaTe		1 (1.6)	
	NaTeSxt		1 (1.6)	
4	AmCmTicTe	5 (5.1)		
	AmGmTicTe		2 (3.3)	
	AmNaTicTe	3 (3.0)		1 (1.4)
	AmSamCmTic	10 (10.1)		
	AmSamNaTic	5 (5.1)		
	AmSamTicTe	5 (5.1)	1 (1.6)	1 (1.4)
	AnCfGmNa	1 (1.0)		

	AmSxtTicTe		2 (3.3)	1 (1.4)
5	AmCmNaTicTe		1 (1.6)	
	AmCfCmTicTe	2 (2.0)		
	AmCmTicTeSxt		1 (1.6)	
	AmCmGmTicTe	1 (1.0)		1 (1.4)
	AmNaSxtTicTe		1 (1.6)	
	AmSamCmTicTe	2 (2.0)	1 (1.6)	4 (5.6)
	AmSamCipCmTic	1 (1.0)		
	AmSamNaTicTe	3 (3.0)		1 (1.4)
6	AmSamCmTicTeSxt			1 (1.4)
	AmSamCfNaTicTe			1 (1.4)
	AmGmNaSxtTicTe		1 (1.6)	
	AmSamCmNaTicTe	1 (1.0)	1 (1.6)	
	AmSamGmNaTicTe		1 (1.6)	
	AmSamCfGmTicTe		1 (1.6)	
	AmCmNaSxtTicTe			1 (1.4)
	AmSamCmTicTeSxt		2 (3.3)	
	AmSamCmGmTicTe		3 (4.9)	
7	AmCfGmNaSxtTicTe		1 (1.6)	
	AmCmGmNaSxtTicTe		1 (1.6)	
	AmSamGmNaSxtTicTe		1 (1.6)	1 (1.4)
	AmSamCmGmNaTicTe		1 (1.6)	
	AmSamCfCmGmTicTe		1 (1.6)	
	AmSamCfCmNaTicTe		1 (1.6)	
8	AmAnSamCfCmGmTicTe	1 (1.0)		
	AmSamCmGmNaTicTeSxt		1 (1.6)	
	Total	99	61	72

Table 9. Multiple resistance pattern of other serotypes of *Salmonella enterica*

Serotypes	Resistance Pattern
S. Blockley	AmSamNaTicTe
S. Blockley	AmKmNaTicTe
S. Brandengurg	AmSxtTicTe
S. Haardt	AmSamCfNaTicTe
S. Panama	AmCmNaSxtTicTe
S. Paratyphi B	AmSamCmTicTe
S. Paratyphi B	AmSamCmTicTe
S. Patatyphi B	AmSamCmTicTe
S. Rissen	AmCmGmKmTicTe
S. Rissen	AmSamCmTicTe
S. Rissen	AmSamTicTe
S. Saintpaul	AmSamGmNaTicTeSxt
S. Victoria	AmSamCmTicTeSxt

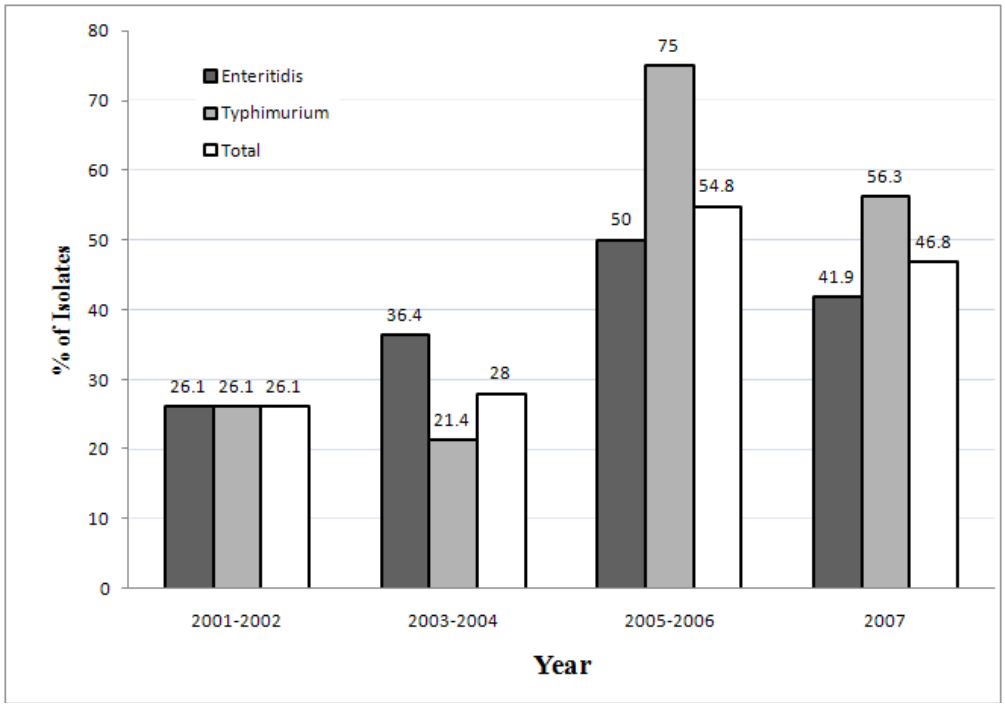

Fig. 4. Prevalence of resistant *S. enterica* serovar Enteritidis and Typhimurium isolated at years to more than three antimicrobial agents.

제4절 *Salmonella enterica*의 항균제 내성관련 유전자 분석

1. *Salmonella Typhimurium*의 *Plasmid DNA* 분석

2001년부터 2004년까지 분리된 항균제에 높은 내성과 다제내성을 가지고 있는 혈청형 Typhimurium 37주의 Plasmid DNA를 분석하여 항균제 내성양상과 비교한 결과 Fig. 5과 Table 10의 결과를 얻었다. 모든 균주에서 22.9 kb에서 2 kb 크기의 plasmid를 한개 이상 대개 4~6개를 보유하고 있었다. 대부분의 균주에서 관찰되는 plasmid는 22.9, 15.6, 11.7, 5.6, 4.6 kb 이었다. 22.9, 15.6, 5.6, 4.6 kb의 plasmid를 동시에 보유하고 있는 유형이 11주 (29.7%)로 가장 많았다. 항균제의 내성양상과 Plasmid DNA pattern과의 상관관계는 볼 수 없었다.

혈청형 Typhimurium은 대부분 90-kb의 plasmid를 보유하고 있으나 (49) 본 연구에서는 plasmid 분리 방법에서 대형 plasmid를 분리할 수 없었다. 그러나 모든 균주에서 22.9 kb에서 2 kb 크기의 plasmid를 한개 이상 보유하고 있었으며, 대부분은 4-6개의 plasmid를 보유하고 있었다. 항균제의 내성양상과 plasmid와는 상관관계를 관찰할 수 없어 Majtan 등 (2004)의 보고와 유사하였다.

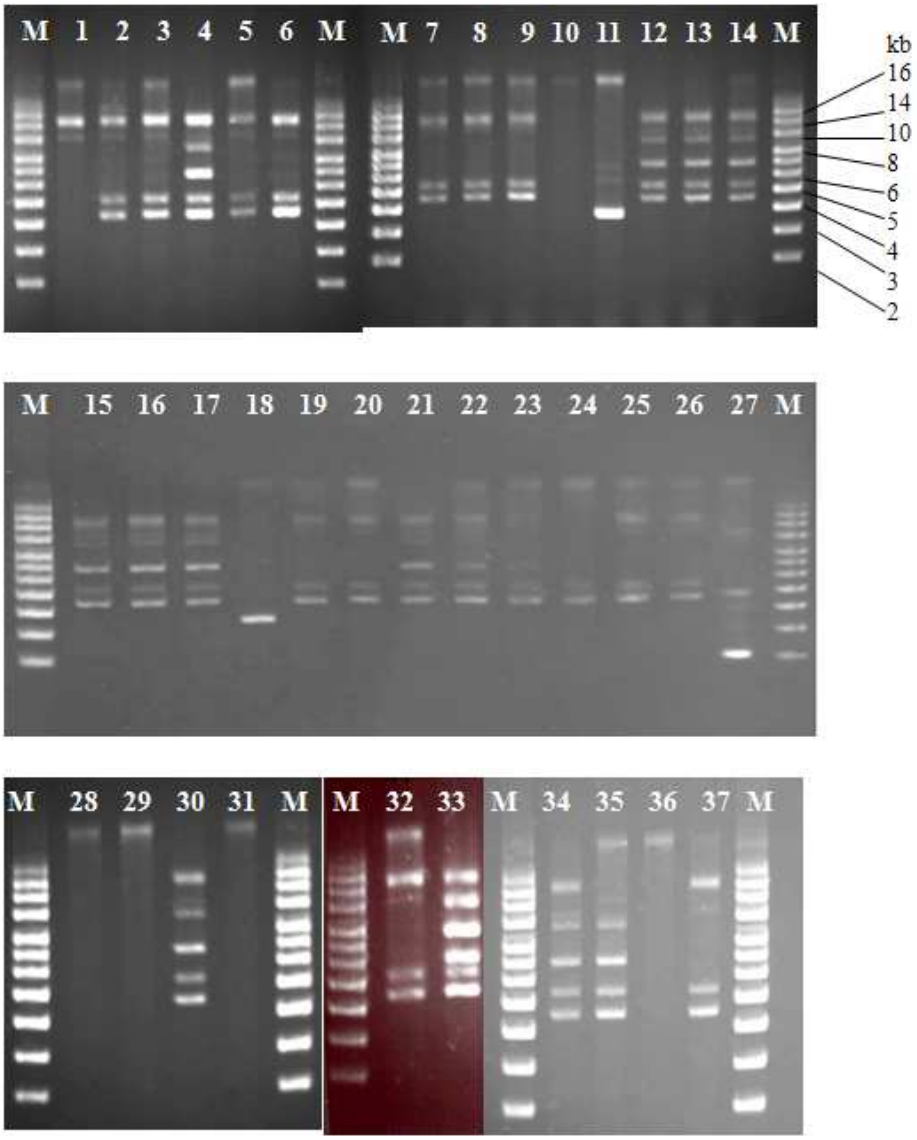

Fig. 5. Plasmid profiles of selected *S.* Typhimurium isolates (1-37). Lane M, supercoiled DNA ladder.

Table 10. Plasmid profile and antibiotic resistance pattern of *Salmonella* Typhimurium isolates

Plasmid Size (kb)	Resistance Patterns	No. of Strains
22.9	-	2
	AmGmTicTe	1
	AmTicTe	1
22.9, 7.8, 6.6, 3.8	-	1
22.9, 6.6, 5.6, 4.6	AmGmTicTe	1
22.9, 5.6, 4.6	CmTicTe	1
22.9, 3.8	AmTicTe	1
	AmNaTic	1
22.9, 15.6, 6.6, 5.6, 4.6	AmGmTicTe	1
22.9, 15.6, 5.6, 4.6	-	1
	Te	1
	AmCmNaTicTe	1
	AmSxtTicTe	1
	AmCfGmNaSxtTicTe	1
	AmCmGmNaSxtTicTe	1
	AmGmNaSxtTicTe	1
22.9, 15.6, 11.7, 7.8, 5.6, 4.6	AmSxtTicTe	1
22.9, 15.6	Te	1
22.9, 11.7, 7.8, 5.6, 4.6	AmTicTe	1
22.9, 11.7, 4.6, 2	NaTe	1
15.6, 5.6, 4.6	-	1
	CmTe	1
	GmNaTe	1
	AmNaSxtTicTe	1
15.6, 11.7, 7.8, 6.6, 5.6, 4.6	-	1
	Te	1
15.6, 11.7, 7.8, 5.6, 4.6	Te	5
15.6, 11.7, 6.6, 5.6, 4.6	CmTe	3
	Am	1
	AmCfCmTicTe	1
Total		37

2. 중합효소 연쇄반응 (*PCR*)에 의한 다제내성 균주에서 *Class 1 integron*의 검출과 항균제 내성

2001년부터 2004년까지 분리된 115주의 분리균주 중 항균제에 내성을 가지고 있는 균주에서 class 1 integron의 유무를 파악하기 위해 중합효소 연쇄반응을 실시한 결과 72주 (62.6%)에서 integron이 검출되었다 (Fig. 6). 60주 (52.2%)에서 1,200 bp의 한 개의 증폭산물을 보이는 integron을 가지고 있었으며, 1,000 또는 1,600 bp의 한개의 증폭산물을 가진 균주는 각각 1주이었다. 10주 (8.7%)에서는 1,000과 1,200 bp (3주), 1,200와 1,600 bp (3주), 1,200와 2,000 bp (4주)의 2개의 증폭산물을 갖는 integron을 보유하고 있었다 (Table 11). 본 연구에서 integron을 가진 72주의 균주 중 60주 (83.3%)에서 1,200 bp의 증폭산물를 보이는 integron을 가장 많이 가지고 있어 Majtán 등 (2004)의 보고와 유사하였다. Nogrady 등 (2005)의 보고에서 Typhimurium을 제외한 다른 혈청형에서는 대부분 1,000 bp의 크기의 증폭산물을 보였으나 본 연구에서는 대부분 1,200 bp크기의 integron을 보유하고 있었다.

*Salmonella*를 비롯한 그람음성 세균의 항균제 내성은 integron이나 extra-integron에 존재하는 여러 내성유전자에 의해 코딩되며 integron은 transposon이나 conjugative plasmid와 연관되어 다른 균주로 이동될 수 있다 (21, 27). 가장 많이 알려진 class 1 integron은 다양한 세균에 존재하며 β-lactam계, aminoglycoside계, erythromycin 등 여러 항균제에 대한 내성 유전자를 gene-cassette의 형태로 보유하고 있다 (48). 즉, 플라스미드가 β-lactamases 유전자를 가짐으로 Penicillin류, Cephalosporin류에 대한 내성을 나타낸다. 플라스미드가 chloramphenicol을 파괴하는 효소 (acetyltransferase), 여러 가지 aminoglycoside류를 acetylate, adenylylate, phosphorylate하는 효소, tetracycline류의 세포막을 통한 능동수송을 결정

하는 효소 등을 지정한다. 이런 내성유전자를 포함한 integron의 균주간 이동은 내성균주의 확산을 유발할 우려가 있으며 유럽과 미주 지역에 발생한 *Salmonella* Typhimurium DT104가 대표적인 예이다 (57, 71).

blaP1(*pse1*) 및 *aadA2* 유전자가 있는 1,000과 1200 bp 크기의 integron은 43 kb의 *S. enterica* genomic island 1 (SGI1)에 동시에 존재하며, 1,000 또는 1,200 bp의 integron을 하나를 가진 균주에서는 부분적으로 SGI1이 결손되어 있다고 한다 (7). Majtán 등 (2004)과 Nogrady 등 (2005)의 보고에서 대부분의 Typhimurium은 1,000 및 1200 bp의 증폭산물를 보이는 2개의 integron을 동시에 보유한 균주가 대부분이었으나 본 연구에서는 8주에서만 2종류의 integron을 가지고 있었다. 특히 1,200 및 1,600 bp의 integron은 AM, GM, KM, TIC, TE의 내성양상을 보였으며, 1,200 및 2,000 bp의 integron을 가진 균주는 NA 및 SXT에 대한 내성을 가진 것이 특징적이었다.

네 가지 이상의 항균제에 내성을 갖는 균주에서 두 가지 이상의 integron을 갖는 균주는 혈청형 Paratyphi B의 2주를 제외하고 혈청형 Typhimurium에서만 관찰되었다 (Table 12). 특히 1,200 및 1,600 bp의 integron은 AM, GM, KM, TE에 내성을 보였으며, 1,200 및 2,000 bp의 integron을 가진 균주는 NA 및 SXT에 대한 내성을 가진 것이 특징적이었다. Integron 내의 내성유전자 cassette 중 β-lactamase 유전자인 *blaP1* (*pse1*), aminoglycoside 내성유전자인 *aadA2* 및 sulfonamide 내성유전자 *sul1*을 중합효소 연쇄반응 방법에 의해 분석한 결과 Fig. 7과 Table 12과 같은 결과를 보였다. Primer in-F와 blaP1-B를 이용하여 PCR를 실시한 결과 762 bp의 증폭산물을 보였는데 혈청형 Paratyphi B 2주에서만 양성이었으며 (Fig. 7-A), 그 외 모든 균주에서 증폭되지 않았다. *blaP1* 양성인 혈청형 Paratyphi B 2주는 SAM에 내성을 가지고 있었다. AM이나

TIC등에 내성을 갖는 균주를 Primer in-F와 blaP1-B를 이용한 PCR에서 음성인 균주를 blaP1-F와 blaP1-B primer를 이용하여 PCR를 실시한 결과 420 bp의 증폭산물이 관찰되었다 (Fig. 7-B). Aminoglycoside 내성유전자를 증폭하기 위하여 primer in-F와 aadA-B 를 이용하여 PCR를 실시한 결과 760 bp 크기의 증폭산물을 모든 균주에서 관찰할 수 있었다 (Fig. 7-C). 위 결과를 확인하기 위하여 attI1-F 및 aadA-B 를 이용하여 PCR를 재실시한 결과 약 700 bp의 증폭산물을 확인하였다 (data not shown). Primer qacE■1-F 및 sul1-B를 이용하여 PCR를 실시한 결과 1,130 bp의 증폭산물을 보였으며 일부 균주에서 800 bp의 증폭산물이 관찰되었다 (Fig. 7-D). Nogrady 등 (2005)은 1,000 또는 1,200 bp의 integron을 가진 Typhimurium의 대부분의 균주에서 *blaP1* (*pse1*) 및 *aadA2* 유전자가 검출되었으나 본 실험에서는 *blaP1* (*pse1*) 유전자가 일체 검출되지 않았다. 그러나 primer blaP1-F과 blaP1-B를 이용하여 PCR를 실시한 결과 430 bp의 증폭산물이 관찰되었는데 이 유전자는 plasmid 상에 존재하는 것으로 생각된다. Primer qacE■1-F 및 sul1-B를 이용하여 PCR를 실시한 결과 1,130 bp의 증폭산물을 보였으며 일부 균주에서 800 bp의 증폭산물이 관찰되어 오 등 (2005)의 보고와 유사하였다. 1.6 kb integron은 *addA*와 trimethoprim에 대한 내성에 관련된 dihydrofolate reductase의 유전자 (*dhfr1*)가 검출되며 (44), 2.0 kb의 integron에서는 aadA 및과 β-lactamase 유전자인 *oxa30*이 검출된다고 보고되고 있다 (22). 그러나 본 연구에서는 *oxa30* 및 *dhfr1*에 대한 검사를 실시하지 못하였다. 따라서 차후의 연구에서 integron에 있는 다른 내성 유전자에 대한 조사 및 구조에 대해 자세히 실시할 예정이다. 이와 같은 연구 결과는 내성기전과 분자 역학적 조사체계를 구축하는데 기초자료로 활용될 수 있을 것이며, 전파경로와 감염요인 등을 조사하고 전파를 효과적으로 제어하는

목적으로도 활용될 수 있을 것이다. 또한 우리나라의 가축 분리주와 외국에서 분리된 균주간의 항균제 내성 유전자의 상호 유전적 관련성을 조사할 수 있는 기반을 확립하는데 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 기타 설사질환을 유발하는 균종에서의 항균제 내성 유전자와의 상호 연관성을 조사하는데 기초 자료로 활용할 수 있을 것이다.

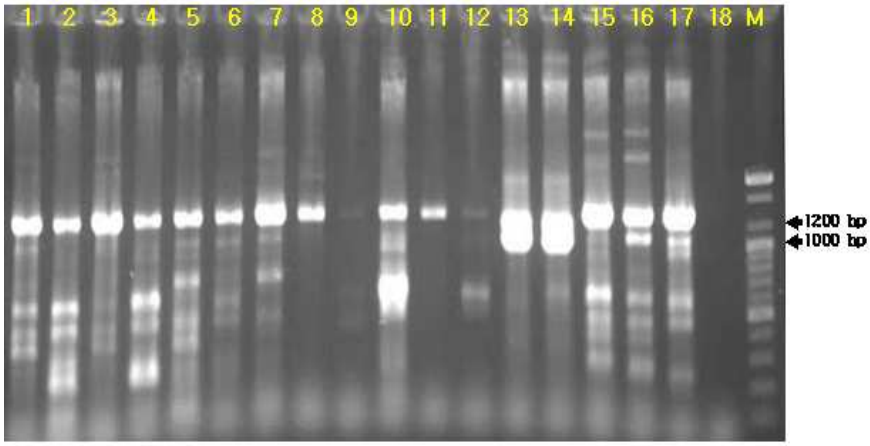

Fig. 6. Examples of PCR products of *Salmonella enterica* isolates by using the primers in-F and in-R (lanes 1-18). Lane M, 100 bp ladder.

Table 11. Integron patterns of *Salmonella enterica* isolates

IP	Amplicons (bp)	No. of Strains			Total
		Enteritidis	Typhimurium	Other serovars	
1	1000			1	1
2	1200	18	24	18	60
3	1600			1	1
4	1000, 1200		1	2	3
5	1200, 1600		3		3
6	1200, 2000		4		4
Total		18	32	22	72

Table 12. Serovars, antibiogram and integron genotypes of multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates

Serovars	Antibiogram	Integron size(bp)	qacE-sul1	Inserted cassette(s)
Blockley	AmKmNaTicTe	1200	+	aadA
Brandenburg	**AmSxtTicTe**	**1600**	**800**	**aadA**
Enteritidis	AmCmTicTe	1200	+	aadA
Enteritidis	AmCmTicTe	1200	+	aadA
Enteritidis	**AmCrCmTicTe**	**1200**	**+**	**aadA**
Enteritidis	**AmKmNaTicTe**	**1200**	**+**	**aadA**
London	AmTicTe	1200	+	aadA
Panama	AmCmNaSxtTicTe	1200	800	aadA
Paratyphi B	**AmSamCmTicTe**	**1000,1200**	**800**	**aadA, blaP1**
Paratyphi B	**AmSamCmTicTe**	**1000,1200**	**800**	**aadA, blaP1**
Rissen	AmCmGmKmTicTe	1200	+	aadA
Typhimurium	**AmCmNaTicTe**	**1200**	**+**	**aadA**
Typhimurium	AmCrCmTicTe	1200	+	aadA
Typhimurium	AmGmKmTicTe	1200	+	aadA
Typhimurium	AmGmTicTe	1200	+	aadA
Typhimurium	AmGmTicTe	1200	+	aadA
Typhimurium	AmKmTicTe	1200	+	aadA
Typhimurium	AmSxtTicTe	1200	+	aadA
Typhimurium	AmSxtTicTe	1200	+	aadA
Typhimurium	**GmNaTe**	**1000,1200**	**+**	**aadA**
Typhimurium	AmGmKmTicTe	1200,1600	800	aadA
Typhimurium	AmGmKmTicTe	1200,1600	+	aadA
Typhimurium	AmGmKmTicTe	1200,1600	800	aadA
Typhimurium	**AmCmGmNaSxtTicTe**	**1200,2000**	**+**	**aadA**
Typhimurium	AmCrGmNaSxtTicTe	1200,2000	+	aadA
Typhimurium	AmGmNaSxtTicTe	1200,2000	+	aadA
Typhimurium	AmNaSxtTicTe	1200,2000	+	aadA

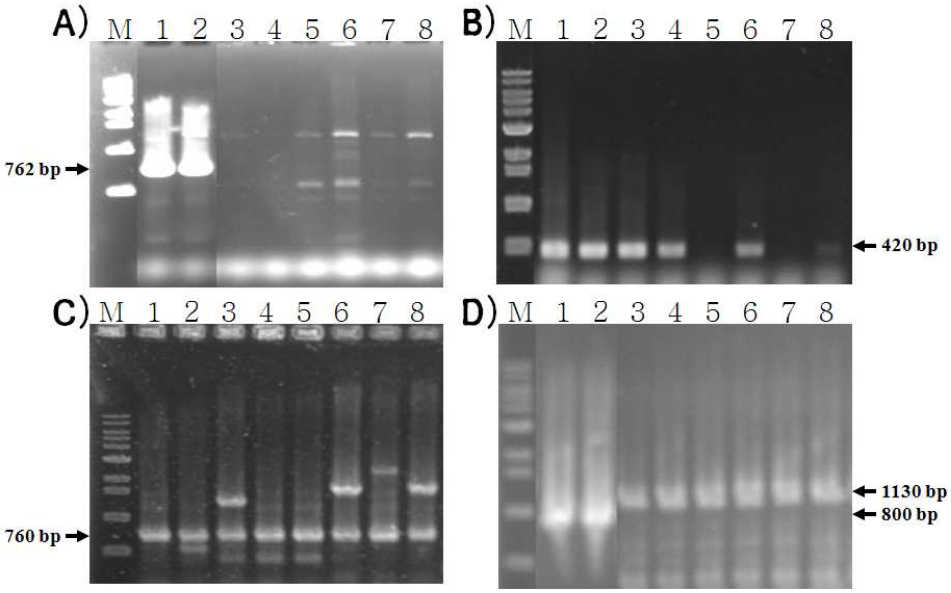

Fig. 7. Examples of PCR products of *Salmonella enterica* isloates by using primers in-F and blaP1-B (A), blaP1-F and blaP1-B (B), in-F and aadA-B (C), and qacE[redacted]1-F and sul1-B (D). Lanes: M, 1-kb ladder standard; 1, *S.* Paratyphi B; 2, *S.* Paratyphi B; 3, *S.* Brandenburg; 4, *S.* Enteritidis; 5, *S.* Enteritidis; 6-8, *S.* Typhimurium.

제5절 분리된 *Salmonella* 혈청형의 병원성

1. *HeLa* 세포주에 대한 독성

분리된 *Salmonella enterica*의 각 혈청형의 생물학적 특성 중 세균감염 시 세포에 미치는 영향을 조사하기 위해 HeLa 세포주에 대한 세포 독성능을 조사하여 Fig. 8과 같은 결과를 얻었다. 자궁 내 상피세포에서 유래된 HeLa 세포주에 대한 각종 *Salmonella* 혈청형의 균주와 균배양액을 처리한 결과, 세포에 세균을 처치 시 20%이상의 세포가 사멸되었으며, 특히 혈청형 Panama 처치 시에는 약 80%의 세포사멸이 있었으며 다음으로는 Indiana 균주를 처치 시에는 55%이상의 세포가 사멸되었다. 세균배양액을 처리 시에 대부분 세포독성을 관찰할 수 없었으나 혈청형 Brandenburg, Indiana, Panama, Schwarzengrund 배양액을 처리 시 30% 이상의 세포가 사멸되었으며 혈청형 Essen과 Hadar의 균배양액을 처리 시에는 약 20%의 세포가 사멸되었다. Fig. 9은 세균배양액을 4시간 처리한 후 ethidium bromide로 염색하여 형광현미경으로 관찰한 결과이다. 혈청형 Typhimurium으로 처리 시에 사멸된 세포가 관찰되지 않았으나 혈청형 Brandenburg, Indiana, Panama, Schwarzengrund 배양액으로 처리 시에는 사멸된 세포가 관찰되었다.

병원성 세균은 감염증이 진행되는데 있어 중요한 역할를 하는 숙주세포에 직간접적으로 손상을 초래하는 독성물질을 생성한다 (20). 특히 장염 관련 질환을 일으키는 NTS는 장관 내 점막상피세포에 부착하여 침입하고 독소를 생성한다 (19, 33, 34). 그러나 NTS는 배양된 세포에 대해 세포독성을 나타내지 않는다고 보고되고 있다 (29, 55, 67). Malik 등(1995)은 식품이나 동물에서 분리된 혈청형 Typhimurium, Nchanga, Newport, Virchow, Bovismorbificans, Seftenberg, Weltevreden과 Indiana 균주를

MDBK 또는 Vero 세포주에 감염 시 세포독성을 보인다고 보고하였으나 세균배양액 단독처리에 대한보고는 없었다.

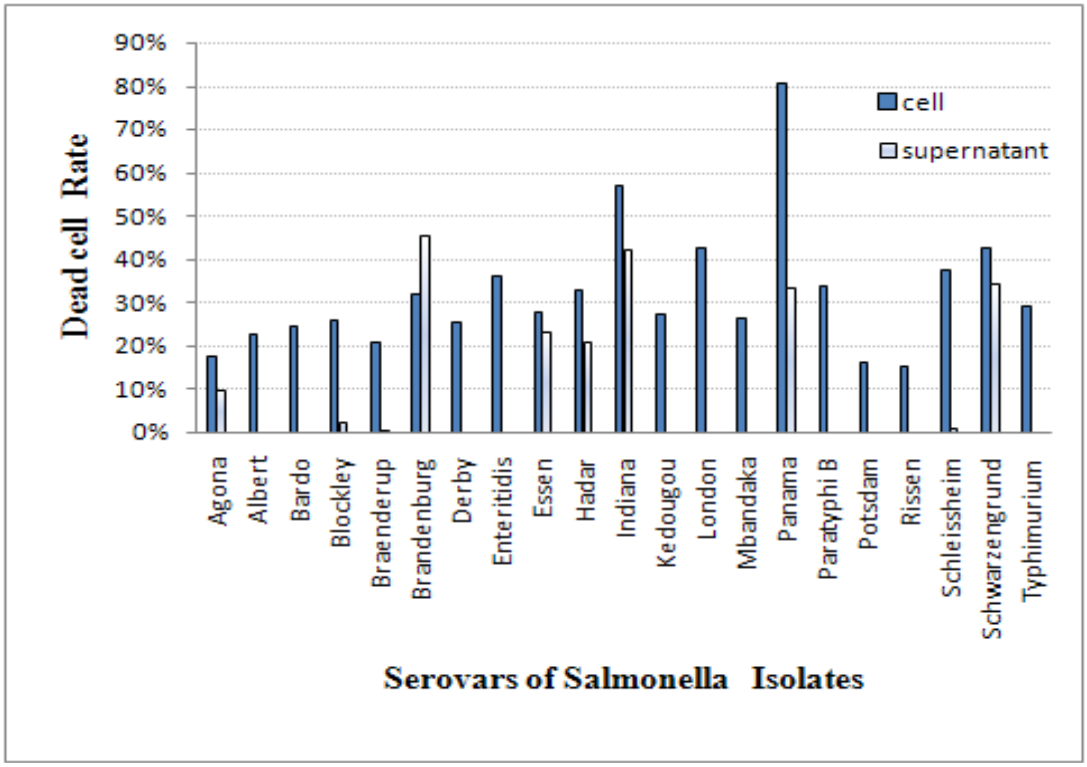

Fig. 8. Cytotoxicity of bacterial cells and culture supernatants treatment to HeLa cells. HeLa cells were infected at an MOI of 10:1 or culture supernatants and LDH assays were carried after 4 hours incubation.

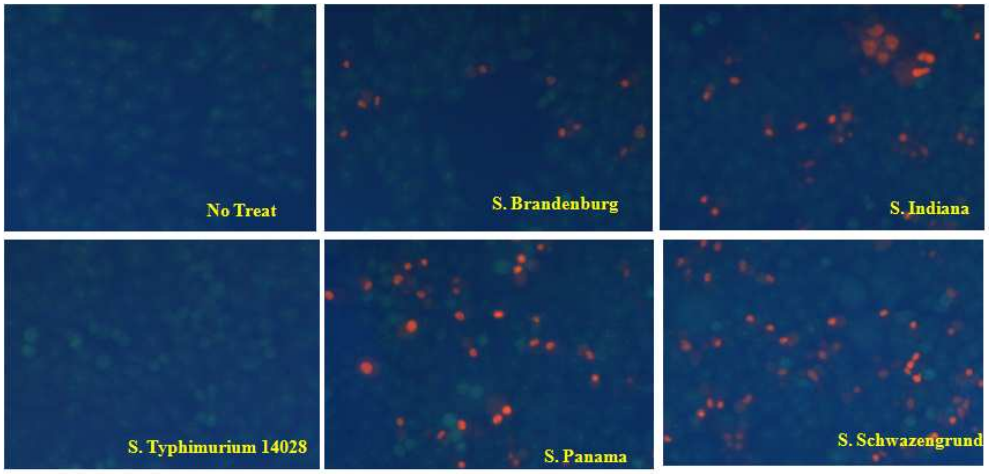

Fig. 9. Cytotoxicity by bacterial culture supernatants of *Salmonella enterica* serovar Brandenbur, Indiana, Panama, Schwarzengrund and Typhimurium. Sterile supernatants from MEM broth cultures of the strains were added to cells, as indicated. As control, non-inoculated MEM broth was used. After 4 h of treatment, cell viability was determined using the staining with ethidium bromide. The nuclei of dead cell were stained ethidium bromide.

2. *Cytolysin A* 유전자 검출

2001년부터 2004년까지 분리된 21종의 *Salmonella enterica* 각 혈청형 115 균주내의 용혈독소 유전자 Cly A의 존재 유무를 검사하기 위해 PCR를 실시한 결과 Fig. 10과 Table 13의 결과를 얻었다. Fig. 10에서 1.4 kb의 Cly A 증폭산물이 혈청형 Typhi와 Brandenburg, Indiana, Panama, Schwarzengrund에서 관찰이 되었다. 그러나 기타 다른 혈청에서는 증폭산물이 관찰되지 않았다. 대부분의 그람양성 및 그람음성 병원성세균은 숙주세포를 용해시키며 세균의 독력인자로서 중요한 역할을 하는 독소 또는 용혈소를 생성한다. 그람음성 세균에서 생성되는 외독소 중 연구가 가장 많이 된 것은 RTX계 독소이다 (68). 특히 요병원성 대장균 (uropathogenic *E. coli*)에서 생성되는 Hly A 용혈소가 대표적이다. Hly A는 동물실험모델에서 대장균의 독성을 증가시킨다 (69). 이 독소의 정확한 작용기전은 밝혀져 있지 않으나 숙주의 탐식세포의 기능을 약화시킬 것으로 생각되고 있다 (5, 6, 69). 또한 대부분의 대장균은 배양 대식세포에 세포독성을 나타내는 용혈독소 Cly A을 생성하는데, Cly A는 34 kDa의 단백으로서 숙주세포의 세포막에 구멍을 형성하여 용혈작용을 갖는다 (17, 38, 42, 45, 46, 66). 최근 *Salmonella*에서도 기능과 단백 크기, 염기서열 등이 거의 동일한 용혈독소가 검출되었는데 특히 사람에게 전신감염을 일으키는 혈청형 Typhi와 Paratyphi A에서만 있다고 보고되었으나, 인체에 전신성 질환을 일으키지 못하지만 장관관련 질환 특히 설사를 유발하는 NTS는 세포독성과 관련된 독소를 생성하지 못하는 것으로 알려져 있다 (47). 그러나 최근 Agrawal 등 (2005)은 혈청형 Gallinarum을 혈액배지에 배양한 결과 용혈대가 관찰되어 용혈소를 생성한다고 보고하였다. 또한 Singh과 Sharma (1998)은 혈청형 Weltevreden의 균배양액이 세포독성을 보여 여기에서 세포독성을 갖는 독소를 분리 보고한 바 있다. 본

연구에서 혈청형 Brandenburg, Indiana, Panama 및 Schwarzengrund 균 배양액으로 처리시에는 HeLa 세포의 사멸이 유도된 이유가 혈청형 Typhi와 Paratyphy A와 같이 Cly A 생성에 의한 것인지 확인하기 위하여 PCR 방법으로 21가지의 혈청형 115주에서 Cly A의 유전자를 증폭한 결과 Typhi와 동일한 증폭산물이 관찰되었다. 그러나 다른 17종류의 혈청형에서는 증폭산물이 관찰되지 않았다.

3. 혈액배지에서의 용혈대 관찰

각 혈청형의 용혈소 (Cly A)의 생성능을 관찰하기 위하여 혈액배지에 도말하여 24시간 배양하고 뚜렷한 용혈대를 관찰하기 위하여 냉장고에 1-2일간 보관한 후 용혈대를 관찰한 결과 양성 대조균인 혈청형 Typhi와 PCR에 의해 Cly A 유전자를 가진 것으로 알려진 혈청형 Brandenburg, Indiana, Panama, Schwarzengrund에서 용혈대가 관찰이 되었다 (Fig. 11). 그러나 혈청형 Typhimurium을 비롯한 다른 혈청형에서는 용혈대가 관찰되지 않았다. 따라서 혈청형 Brandenburg, Indiana, Panama 및 Schwarzengrund 균배양액에 의한 HeLa 세포에 대한 세포독성은 Cly A의 생성에 의한 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 장관 내에서만 질환을 일으키는 NTS에서도 세포독성을 갖는 독소를 생성할 수 있다는 것을 처음으로 보고하는 것이다. 앞으로 이들 세포독성을 나타내는 균주의 특성과 Cly A의 병인과정에서의 역할, Cly A 유전자의 발현조절 등에 대해 보다 더 깊이 연구가 이루어지면 이들 균주에 의한 질병형성 과정을 이해하는데 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

Fig. 10. PCR analysis of 1.4 kb *clyA* DNA regions of *Salmonella enterica* of various serovars from clinical specimens. Lanes 1 to 21 strains listed in Table 1; lane 22, *S.* Typhi lane 23, *S.* Typhimurium ATCC 14028s. Positive results obtained from PCR were *S.* Brandenburg (lane 6), *S.* Indiana (lane 11), *S.* Panama (lane 15), *S.* Schwarzengrund (lane 20), and *S.* Typhi (lane 22).

Table 13. Detection of Cly A gene by PCR for *Salmonella enterica* strains of 21 different serovars

Serotype	No. of tested	No. of positives
Agona	1	0
Albert	1	0
Bardo	4	0
Blockley	1	0
Braenderup	4	0
Brandenburg	1	1
Derby	1	0
Enteritidis	34	0
Essen	1	0
Hadar	4	0
Indiana	1	1
Kedougou	1	0
London	8	0
Mbandaka	1	0
Panama	2	2
Paratyphi B	4	0
Potsdam	4	0
Rissen	3	0
Schleissheim	1	0
Schwarzengrund	1	1
Typhimurium	37	0
Total	115	5

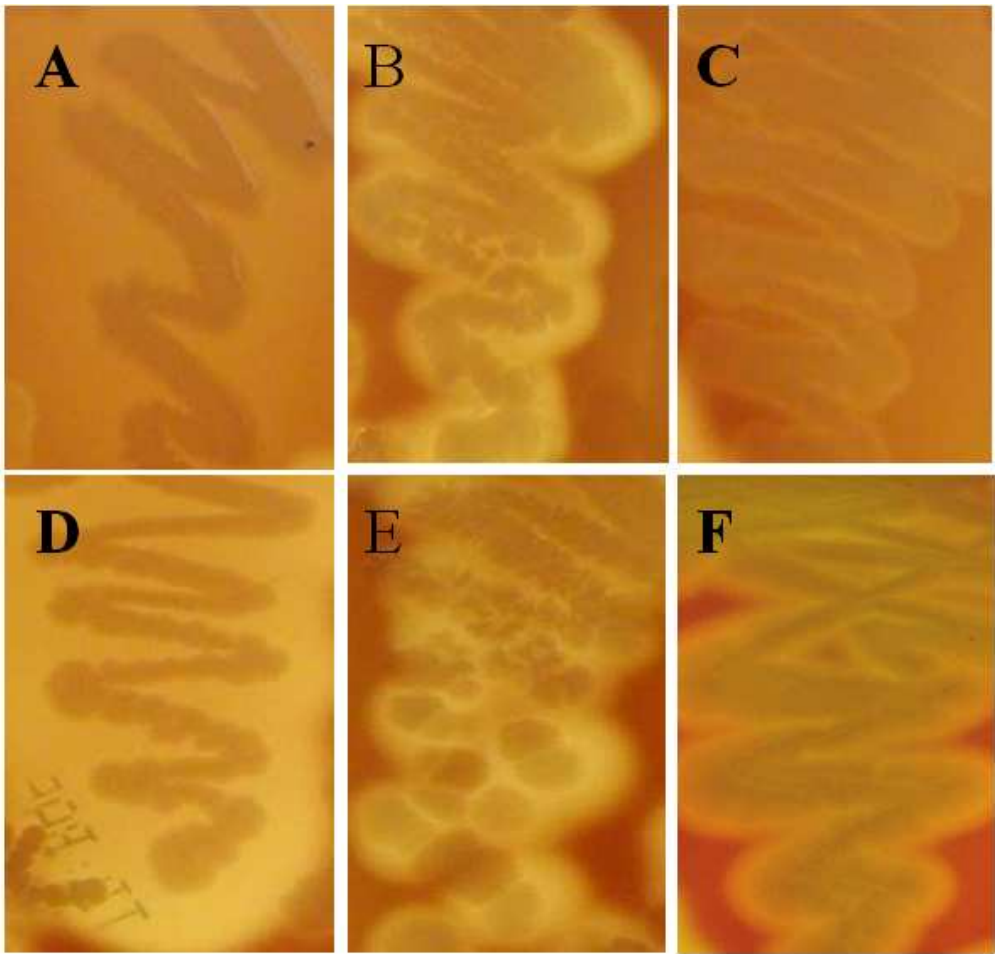

Fig. 11. Phenotyphic expression of Cly A by *Salmonella enterica* serovars on the blood agar. A, serovar Typhimurium; B, serovar Typhi; C, serovar Brandenburg; D, serovar Indiana; E, serovar Panama; F, serovar Schwarzengrund.

제4장 요 약

2001년 1월부터 2007년 12월까지 7년간 광주지역 설사환자에서 분리한 총 232주의 *Salmonella enterica*의 혈청형은 30종류 이었다 이 중 Enteritidis가 99주 (42.9%)로 가장 높은 분리빈도를 보였고, Typhimurium이 61주 (26.4%)로 그 다음이었다.

항균제 내성양상은 점차적으로 증가하는 추세이며 TE에 대한 내성균 빈도가 47.4%로 가장 높았으며, 다음으로 AM 및 TIC가 45.7%, SAM이 27.6%, NA 22.8%, CM 21.6%순으로 높았다. 혈청형 Typhimurium은 특히 TE에 대해 82.2%로 대부분의 균주가 내성을 보였고, AM과 TIC에 대해 약 50%, CM, SAM, 및 GM에 대한 내성빈도가 높았다. 혈청형 Enteritidis는 penicillin계 항균제인 AM과 TIC에 대해 59.6%, SAM 40.4%로 내성 빈도가 다른 혈청보다 높았으며 CIT, SXT에 대한 내성은 없었다. 기타 혈청형은 TE에 대해 41.7%로 내성빈도 가장 높았으며 SAM 27.6%, AM 23.6% 순이었으며 모든 항균제에 대한 내성빈도가 비교적 낮았다 또한 다제내성 양상에서는 Typhimurium은 68% 이상, Enteritidis는 약 65%에서 두 가지 이상의 항균제에 내성을 보였다. 특히 Typhimurium은 3~8가지 항균제에 대한 다재내성 빈도도 약 52%로 다른 혈청형에 비해 높았다. 그리고 기타 혈청형은 Blockley, Brandenburg, Haardt, Panama, Paratyphi B, Rissen, Saintpaul에서 높은 다제내성을 가지고 있었다. 전체적으로 동시에 내성을 보이는 항균제는 각 혈청형에서 비교적 내성이 높았던 AM, SAM, TIE 및 TE였다.

항균제에 높은 내성과 다제내성을 가지고 있는 혈청형 Typhimurium 37주에 대한 Plasmid DNA를 분석한 결과 모든 균주에서 22.9 kb에서 2 kb 크기의 plasmid를 한개 이상 대개 4~6개를 보유하고 있었으나 항균

제 내성양상과 Plasmid DNA patten과의 상관관계를 볼 수 없었다. 중합효소 연쇄반응에 의한 다제내성 균주에서 Class 1 Integron을 가진 72주의 균주를 검출하였는데 그 중 60주에서 1,200 bp의 한 개의 증폭산물을 보이는 integron을 보유하고 있었으며, 1,000 bp와 1,200 bp를 가진 균주는 3주, 1,200 bp 와 1,600 bp를 가진 균주는 3주 1,200 bp와 2,000 bp를 가진 균주는 4주 등 2개의 증폭산물을 갖는 integron을 보유하고 있었다. 네 가지 이상의 항균제에 내성을 갖는 균주에서 두 가지 이상의 integron을 갖는 균주는 혈청형 Paratyphi B의 2주를 제외하고 혈청형 Typhimurium에서만 관찰되었다 특히 1,200 및 1,600 bp의 integron은 AM, GM, KM, TIC, TE에 내성을 보였으며, 1,200 및 2,000 bp의 integron을 가진 균주는 NA 및 SXT에 대한 내성을 가진 것이 특징적이었다. Integron 내의 내성유전자 cassette 중 β-lactamase 유전자인 blaP1 (pse1) 유전자가 혈청형 Paratyphi B 2주를 제외하고 일체 검출되지 않았고, blaP1 양성인 혈청형 Paratyphi B 2주는 SAM에 내성을 가지고 있었다. AM이나 TIC등에 내성을 갖는 균주를 Primer in-F와 blaP1-B를 이용한 PCR에서 음성인 균주를 blaP1-F와 blaP1-B primer를 이용하여 PCR를 실시한 결과 420 bp의 증폭산물이 관찰되었다. Primer qacE■1-F 및 sul1-B를 이용하여 PCR을 실시한 결과 1,130 bp의 증폭산물을 보였으며 일부 균주에서 800 bp의 증폭산물이 관찰되었다. 향후 integron에 있는 다른 여러 내성 유전자에 대한 조사 및 구조에 대한 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

HeLa 세포에 대한 세포 독성능은 세포에 세균처치 시 20% 이상의 세포가 사멸되었으며, 특히 혈청형 Panama 처치 시에는 약 80% 이상이 사멸되었다. 세포배양액을 처리 시에는 대부분에서 세포독성을 관찰할 수 없었으나 혈청형 Brandenburg, Indiana, Panama 및 Schwarzengrund 균

배양액 처리 시 30% 이상의 세포가 사멸되었다. HeLa 세포에 대한 세포독성은 Cly A의 생성에 의한 것으로 생각된다. 이와 같은 결과는 장관내에서만 질환을 일으키는 NTS에서도 세포독성을 갖는 독소를 생성할 수 있다는 것을 처음으로 보고하는 것이다. 앞으로 이들 세포독성을 나타내는 균주의 특성을 보다 더 깊이 연구해야 할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Agrawal RK, Singh BR, Babu N, Chandra M. 2005. Novel haemolysins of *Salmonella enterica* spp. enterica serovar Gallinarum. *Indian J Exp Biol.* 43:626-30.

2. Albert MJ, Faruque ASG, Faruque SM, Sack RB, Mahalanbis D. 1999. Case-Control study of enteropathogens associated with childhood diarrhea in Dhaka, Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 37:3458-3464.

3. Bern C, Martines J, Zoysa I, Glass RI. 1992. The magnitude of the global problem of diarrheal disease:a ten-year up-date. *Bull WHO.* 70:705-714.

4. Blaha T. 1989. Applied Veterinary Epidemiology, Development in Animal and Veterinary Science. 2nd ed. The Netherlands: *Elsevier Science Publishers,* 343 pp,

5. Bhakdi S, Mackman N, Nicaud JM, Holland IB. 1986. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect Immun.* 52:63-9.

6. Bhakdi S, Mackman N, Menestrina G, Gray L, Hugo F, Seeger W, Holland IB. 1988. The hemolysin of *Escherichia coli. Eur J Epidemiol.* 4:135-43.

7. Boyd D, Peters GA, Cloeckaert A, Boumedine KS, Chaslus-Dancla E, Imberechts H, Mulvey MR. 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J Bacteriol.* 183:5725-5732.

8. Center for Disease Control and Prevention. 2001. The changing epidemio of Salmonella: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. *J Clin Miorobil.* 183:753-761

9. Chalker RB and Blaser MJ. 1988. A review of human salmonellosis. III. Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. Rev. *Infect. Dis.* 10:111-124.

10. Chiou CS, Hsu SY, Chiu SI, Wang TK, Chao CS. 2000. *Vibrio parahemolyticus* serovar O3 : K6 as cause of unusually high incidence of food borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *J Clin Microbiol.* 38:4621-4625.

11 Chung YH, Kim SY, and Chang YH. 2003. Prevalence and antibiotic susceptibility of Salmonella isolated from foods in Korea from 1993 to 2001.*J Food Prot.* 66:1154-1157.

12. Collis, C. M., Grammaticopoulos, G., Briton, J., Stokes, H. W., and

Hall, R. M. 1993. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol. Microbiol.* 9:41-52.

13. Collis, C. M., and Hall, R. M. 1995. Expression of antibiotic genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 155-162.

14. Collis, C. M., Kim, M. J., Stokes, H. W., and Hall, R. M. 2002. Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-be site. *Mol. Microbiol.* 46: 1415-1427.

15. Collis, C. M., and R. M. Hall. 1992. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J. Bacteriol.* 174:1574-1585.

16. Dalsgaard A, Forslund A, Serichantalergs O, Sandvang D. 2000. Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-serotype strains isolated in Thailand. *Antimicrob Agents Chemother*. 44:1315-1321.

17. del Castillo, F. J., S. C. Leal, F. Moreno, and I. del Castillo. 1997. The *Escherichia coli* K-12 sheA gene encodes a 34-kDa secreted haemolysin. *Mol Microbiol* 25:107-15.

18. Ekdahl K, de Jong B, Wollin R, Andersson Y. 2005. Travel-associated non-typhoidal salmonellosis: geographical and seasonal differences and serotype distribution. *Clin Microbiol Infect.* 11:138-144.

19. Finkelstein RA, Marchlewicz BA, McDonald RJ, Boesman FM. 1983 Isolation and characterization of a cholera related enterotoxin from *Salmonella typhimurium*. *FEMS Microbiol Lett*. 17 : 239-41.

20. Finlay, B. B., and S. Falkow. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 61:136-69.

21. Fluit AC, Schmitz FJ. 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18:761-770.

22. Gebreyes WA, Thakur S, Davies PR, Funk JA, Altier C. 2004. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997-2000. *J Antimicrob Chemother.* 53:997-1003.

23. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M; 2005. ESAC Project Group. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study.*Lancet*. 365:579-87.

24. Guerrant RL. 1998. Why America must care about tropical medicine; threats to global health and security from tropical infectious disease. *Am J Trop Med Hyg,* 59:3-16.

25. Hall, R. M. 1997. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. Ciba Found. *Symp.* 207:192-202.

26. Hall, R. M., and C. M. Collis. 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* 15:593-600.

27. Hamada K, Oshima K, Tsuji H. 2003. Drug resistance genes encoded in integrons and in extra-integrons: their distribution and lateral transfer among pathogenic Enterobacteriaceae including enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovars typhimurium and infantis. *Jpn J Infect Dis.* 56:123-126.

28. Hannecart-Pokorni, E., F. Depuydt, L. D. Wit, E. V. Bossuyt, J. Content, and R. Vanhoof. 1997. Characterization of the 6-*N*-aminoglycoside acetyltransferase gene *aac(6')-I1* associated with a *sulI*-type integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:314-318.

29. Jiwa SFH. 1981. Probing for enterotoxigenicity among the salmonella: evaluation of biological assays. *J Clin Microbiol.* 14 : 463-72.

30. Jones, M. E., E. Peters, A.-M. Weersink, A. Fluit, and J. Verhoef. 1997. Widespread occurrence of integrons causing multiple antibiotic resistance in bacteria. *Lancet.* 349:1742-1743.

31. Kado CI and Liu ST. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 143:1365-1373.

32. Kazama, H., K. Kizu, M. Iwasaki, H. Hamashima, M. Sasatsu, and T. Arai. 1995. Isolation and structure of a new integron that includes a streptomycin resistance gene from the R plasmid of Pseudomonas aeroginosa. *FEMS Microbiol. Lett.* 134:137-141.

33. Koo FCW, Peterson JW, Houston CW, Monila NC. 1984. Pathogenesis of experimental salmonellosis : Inhibition of protein synthesis by cytotoxin. *Infect Immun.* 43 : 93-100.

34. Koupal LR, Deibel RH. 1975. Assay, characterization and localization of an enterotoxin produced by salmonella. *Infect Immun.* 11 : 14-22.

35. Lee, L. A., N. D. Puhr, E. K. Maloney, N. H. Bean, and R. V.

Tauxe. 1994. Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in the United States, 1989-1990. *J. Infect. Dis.* 170:128-134.

36. Le´vesque, C., Piche, L., Larose, C. and Roy, P.H. (1995) PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother*. 39, 185-191.

37. Lopman BA, Brown DW, Koopmans M. 2002. Human caliciviruses in Europe. *J Clin virol.* 24:137-160.

38. Ludwig, A., S. Bauer, R. Benz, B. Bergmann, and W. Goebel. 1999. Analysis of the SlyA-controlled expression, subcellular localization and pore-forming activity of a 34 kDa haemolysin (ClyA) from *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* 31:557-67.

39. Malik P, Sharma VD, Chandra R. 1995 . Cytotoxigenicity in Salmonella serovars. *Indian J Exp Biol.* 33:177-81.

40. Majtán V, Majtanova L, Kovac L. 2004. Analysis of integrons in human isolates of *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolated in the Slovak Republic. *FEMS Microbiol Lett*. 239:25-31.

41. Meakins S, Fisher IS, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschape H, Cormican M, Luzzi I, Schneider F, Wannett W, Coia J, Echeita A, Threlfall EJ; 2008. Enter-net participants.Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe

2000-2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network.Microb Drug Resist. 14:31-5.

42. Minion, F. C., and K. J. Jarvill-Taylor 1994. Analysis of membrane-associated activities in mycoplasmas. Keystone Symposium for Molecular Events in Microbial Pathogenesis, Sante Fe, NM. Abstract published in J. Cell. Biochem. *Supple*. 18A:69.

43. Mitchell L. and Tauxe R.V. 1986. Drug-Resistant Salmonella in the United States: an epidemiologic perspective. *Science* 234:964-969.

44. Nogrady N, Gado I, Toth A, Paszti J. 2005. Antibiotic resistance and class 1 integron patterns of non-typhoidal human *Salmonella* serotypes isolated in Hungary in 2002 and 2003. Int J A*ntimicrob Agents.* 26:126-132.

45. Oscarsson, J., Y. Mizunoe, B. E. Uhlin, and D. J. Haydon. 1996. Induction of haemolytic activity in *Escherichia coli* by the slyA gene product. *Mol Microbiol*. 20:191-9.

46. Oscarsson, J., Y. Mizunoe, L. Li, X. H. Lai, A. Wieslander, and B. E. Uhlin. 1999. Molecular analysis of the cytolytic protein ClyA (SheA) from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 32:1226-38.

47. Oscarsson, J., M. Westermark, S. Lofdahl, B. Olsen, H. Palmgren,

Y. Mizunoe, S. N. Wai, and B. E. Uhlin. 2002. Characterization of a pore-forming cytotoxin expressed by Salmonella enterica serovars Typhi and Paratyphi A. *Infect Immun.* 70:5759-69.

48. Ploy MC, Lambert T, Couty JP, Denis F. 2000. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. *Clin Chem Lab Med.* 38:483-487.

49. Poppe, C., McFadden, K.A., Brouwer, A.M. and Demczuk, W. 1993. Characterization of *Salmonella enteritidis* strains. *Can. J. Vet. Res.* 57:176-184.

50. Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJ, 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.

51. Recchia, G. D., and R. M. Hall. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology.* 141:3015-3027.

52. Reed LJ and Muench H. 1938. A simple method of estimating the 50% endpoints. *Am. J. Hyg.* 27:493-497.

53. Rodrigue DC, Tauxe RV, and Rowe B. 1990. International increase in *S. enteritidis*: a new pandemic? *Epidemiol. Infect.* 105:21-27.

54. Rowe-Magnus, D. A., and Mazel, D. 2001. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 4:565-569.

55. Rumeu MT, Suarez MA, Morales S, Rotger R. 1997. Enterotoxin and cytotoxin production by *Salmonella enteritidis* strains isolated from gastroenteritis outbreaks. *J Appl Microbiol.* 82 : 19-31.

56. Sakai T. and Chalermchaikit T. 1996. The major sources of *Salmonella enteritidis* in Thailand. Int *J Food Microbiology.* 31:173-180.

57. Sandvang, D., F. M. Aarestrup, and L. B. Jensen. 1997. Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. FEMS Microbiol. *Lett.* 157:177-181

58. Schutze GE, Flick EL, Stefanova R, Spencer HJ, Lensing SY, Berry DA, Cave MD. 2004. Molecular epidemiologic surveillance of salmonellosis in Arkansas. *South Med J.* 97:583-587.

59. Sharma R, Sharma CL, Kapoor B. 2005. Antibacterial resistance: current problems and possible solutions.*Indian J Med Sci.* 59:120-9.

60. Singh Y, Sharma VD. 1998. Isolation and characterization of Salmonella enterica Weltevreden cytotoxin. *Indian J Exp Biol.* 36:298-303.

61. Stokes, H. W., and R. M. Hall. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3:1669-1683

62. Sundström, L., P. Radstro¨m, G. Swedberg, and O. Sko¨ld. 1988. Site-specific recombination promotes linkage between tremethoprim and sulphonamide resistance genes. Sequence characterization of dhfrV and sulI and a recombination active locus of Tn21. *Mol. Gen. Genet.* 213:191-201.

63. Threlfall, E. J., L. R. Ward, J. A. Skinner, and B. Rowe. 1997. Increase in multiple antibiotic resistance in nontyphoidal salmonellas from humans in England and Wales: a comparison of data for 1994 and 1996. *Microb. Drug Resist.* 3:263-266.

64. Threlfall EJ, Fisher IS, Berghold C, Gerner-Smidt P, Tschape H, Cormican M, Luzzi I, Schnieder F, Wannet W, Machado J, Edwards G. 2003. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill.* 8:41-45.

65. Tosini, F., P. Visca, I. Luzzi, A. M. Dionisi, C. Pezzella, A. Petrucca, and A. Carattoli. 1998. Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids

in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:3053-3058.

66. Wallace, A. J., T. J. Stillman, A. Atkins, S. J. Jamieson, P. A. Bullough, J. Green, and P. J. Artymiuk. 2000. *E. coli* hemolysin E (HlyE, ClyA, SheA): X-ray crystal structure of the toxin and observation of membrane pores by electron microscopy. *Cell* 100:265-76.

67. Wallis TS, Starkey WG, Stephen J, Haddon SJ, Osborne MP, Candy DCA. 1986. Enterotoxin production by *Salmonella typhimurium* strains of different virulence. *J Med Microbiol.* 21 : 19-23.

68. Welch RA. 1991. Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol.* 5:521-8.

69. Welch RA, Dellinger EP, Minshew B, Falkow S. 1981. Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature.* 17;294:665-7.

70. 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.

71. Zhao S, Fedorka-Cray PJ, Friedman S, McDermott PF, Walker RD, Qaiyumi S, Foley SL, Hubert SK, Ayers S, English L, Dargatz DA, Salamone B, White DG. 2005. Characterization of *Salmonella* Typhimurium of animal origin obtained from the National Antimicrobial Resistance Monitoring System. *Foodborne Pathog Dis.* 2:169-181.

72. Zuhlsdorf, M. T., and B. Wiedemann. 1992. Tn21-specific structures in gramnegative bacteria from clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36: 1915-1921.

73. 국립보건연구원. 감염병실험실진단 질환별시험법. 이노맥스, 2005.

74. 양성천, 배미옥, 김선희, 정재근, 하동룡, 원영준, 정선식, 류필열. 2003. 1999년 광주지역 식품매개감염증의 유행적 발생에서 분리된 *Salmonella enterica* serotype Enteritidis 균주의 plasmid DNA 및 random amplified polymorphic DNA 분석. 감염. 35:289-297.

75. 오영희, 송미옥, 김무상, 박석기, 이영기. 2005. Multiplex-PCR을 이용한 서울시내 식중독 환자에서 분리한 *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium의 항생제 내성유전자의 검출. *J. Bacteriol. Virol.* 35:183-190.

76. 이우원, 노은미, 정경태, 강신영, 이강록. 2001. 동물유래 Salmonella 속 균의 분리동정 및 분자생물형에 관한 연구. 부산광역시 보건환경연구원보 11:213-225.

77. 한국식품의약안정청. 식중독 발생 현황 통계. 2003년 12월 31일.

78. 식품의약품안전청. 항생제 내성 FoodNet 구축, 2005

저작물 이용 허락서

학 과	식품의약학과	학 번	20057544	과 정	박 사
성 명	한글 : 하 동룡 한문 : 河 東龍 영문 : HA DONGRYONG				
주 소	광주광역시 남구 봉선동 금호아파트 203-1204호				
연락처	E-MAIL : drha57@naver.com				
논문제목	한글 : 광주지역에서 분리된 *Salmonella enterica*의 특성에 관한 연구				
	영문 : Characterization of *Salmonella enterica* Isolated from Diarrheal Patients in Gwangju Area between 2001 and 2007				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대( )

2008 년 8 월 일

저작자: 하 동 룡 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하