

2008년~2009년 부산지역에서 분리된 살모넬라균의 특성 및 유전자형 분석

박성아[†] · 이승주 · 김성준 · 유평중
미생물분석과

Characterization and Genetic Investigation of *Salmonella* spp. Isolated From Diarrhea Patients at 2008~2009 years in Busan

Sung-Ah Park[†], Seung-Ju Lee, Seong-Joon Kim and Pyung-Jong Yoo

Microbiology Division

Abstract

From 2008 to 2009, we isolated 30 strains of *Salmonella* Enteritidis and 17 strains of *Salmonella* Typhimurium from diarrhea patient in Busan. Isolates were tested for antimicrobial susceptibility and typed by pulsed field gel electrophoresis(PFGE). The antimicrobial susceptibility for these isolates was tested using minimum inhibitory concentration(MIC) and determined for the following antimicrobial agents ; Ampicillin (AM), Amikacin (AN), Ampicillin/Sulbactam (SAM), Cephalothin (CF), Cefazolin (CZ), Cefoxitin (FOX), Cefotetan (CTT), Cefotaxime (CTX), Ciprofloxacin (CIP), Chloramphenicol (C), Gentamycin (GM), Imipenem (IPM), Nalidixic acid (NA), Tetracycline (TE), Ceftriaxone (CRO), Trimethprim/Sulfamethoxazole (SXT) and Amoxicillin/Clavulanic acid (AMC). All isolates of *Sal.* Enteritidis were susceptible to FOX, CTT, CIP, IPM, SXT and AMC, whereas most of *Sal.* Enteritidis isolates were resistant to NA, C and SAM. All isolates of *Sal.* Typhimurium were susceptible to CZ, FOX, CTT, CTX, CIP, IPM and TIC. Resistance of GM, NA, SAM, TE and AM were detected most *Sal.* Typhimurium. They were resistant to at least two antibiotic. PFGE analysis showed 10 different patterns in *Sal.* Enteritidis and 11 different patterns in *Sal.* Typhimurium. PFGE patterns showed similarity to antimicrobial susceptibility pattern.

Key words : *Salmonella* spp., PFGE, Antibiotics

서 론

*Salmonella*는 腸內細菌科에 속하는 그람음성간균이다. *Salmonella*균 屬에 속하는 수많은 혈청형들은 사람과 동물에 병원체로 작용하며¹⁾, 살모넬라 감염증의 임상양상은 위장관염, 장염, 균혈증, 만성보균상태 그리고 국소감염 등 다양한 증상을 보이고 있다. 이들 *Salmonella*균 속은 우리나라에서 토착화 양상을 보이며 국가 감시질환 대상병원체로 중요시 되고 있는데, 최근 살모넬라 병원체는 환자에서 다양한 혈청형이 분리되고 있으며, 식자제품의 수출입 및 국가간 여행의 자유화로 새로운 혈청형이 계속 나타나고 있다²⁾.

*Salmonella*균 屬에 감염될 경우 어린동물은 주로 설사를 동반한 전신증상으로 폐사하는 등 이환율과 치사율이 높은 반

면, 성숙한 동물은 대부분 불현성 감염으로 보균하게 되나 사람에게는 구토, 발열, 수양성 설사, 복통, 장염 등을 일으키는 식중독의 원인이 되어 공중보건학상 매우 중요하며, 특히 *Salmonella* Enteritidis와 *Salmonella* Typhimurium은 사람에게 있어 식품유래 살모넬라증의 주된 원인균이다³⁾.

2,500개 이상의 다양한 혈청형이 존재하지만 최근 5년간 발생한 식중독과 관련된 혈청형은 *Salmonella* Enteritidis와 *Salmonella* Typhimurium이 차지하고 있고, 혈청형에 따른 감염양상을 살펴보면 1996년 이전까지는 *Salmonella* Typhimurium의 분리율이 가장 높았고 *Salmonella* Enteritidis가 그 다음 순위였으나, 그 이후 그 구성비가 역전되어 2010년 현재까지 *Salmonella* Enteritidis의 분리율이 가장 높은 것으로 나타나고 있다^{1,4,5)}.

[†] Corresponding author. E.mail : stpure@korea.kr

Tel : +82-51-757-7502, Fax : +82-51-753-1424

살모넬라의 주요 오염원은 사람, 가축, 야생동물, 조류 및 설치류의 장관이다. 그 결과 살모넬라균은 토양과 물을 포함한 자연환경에 널리 분포하고 있으며, 자연환경에서 대개 증식하지 않지만 오랫동안 생존할 수 있다. 사람에게는 주로 식품, 물 및 환경을 통하여 전파된다. 살모넬라에 오염된 식품은 대개 정상적으로 보이며 냄새도 없기 때문에 식품제조와 유통단계에서 살모넬라에 오염되지 않도록 노력하는 것이 가장 중요하다^{2),3)}.

한편, 항생제 내성에 대한 위기감은 전 세계적으로 주요한 공중보건 문제로 대두되고 있으며, 특히 병원 내 감염에서 문제가 되고 있다⁶⁾. 감염병 전문가들은 특히 이용 가능한 항생제에 대한 저항성을 가진 균들이 전 세계적으로 병원 내에서 분리되기 때문에 관심을 가지고 있으며, 항생제 남용이 더 흔한 개발도상국에서 항생제 내성 정도는 더욱 높다^{7~9)}.

근래의 세균검사는 PFGE를 통한 역학분야에서의 병원성 세균간의 유연관계를 확인하여 원인적 연관성을 추적에 중점을 두는 추세이다. 이 방법은 전기장의 각도를 다양하게 지정함으로써 큰 size의 DNA를 분리할 수 있다. 세균의 Chromosomal DNA를 제한효소로 절단하여 전기영동을 수행한 후 나타나는 band 양성을 비교해 봄으로써 분리균주의 유사성을 밝힐 수 있다^{10~13)}.

본 연구에서는 2008년~2009년 부산시내 7개 종합병원 및 보건소 내원 설사환자 가검물에서 분리된 *Salmonella* Enteritidis와 *Salmonella* Typhimurium균주의 항생제 감수성검사를 실시하여 그 내성 실태를 분석 비교하고, 이들 균에 대한 PFGE를 실시하여 항생제 내성과 균주 간 유사성에 대해 조사하여 부산지역 이들 균종의 유행상황과 역학적 균주 감별법으로서의 이들 방법의 유용성을 확인하고자 하였다⁴⁾.

재료 및 방법

사용균주

표준균주로서 *E. coli* (ATCC 25822)를 사용하였으며, 실험에 사용한 균주는 2008년 ~ 2009년 부산시내 7개 종합병원 및 보건소 내원 설사환자 가검물에서 분리된 *Salmonella* Enteritidis와 *Salmonella* Typhimurium균주 47주를 대상으로 하였다.

균 분리 및 배양

설사환자에서 채취한 분변을 Tetrathionate Broth Base(TTB, Difco, USA) 5 mL에 접종하고 37°C에서 하룻밤 진탕배양 한 후 Xylose-Lysine Desoxycholate agar (XLD agar, Difco, USA) 배지 및 *Salmonella* Shigella agar (SS agar, Difco, USA)에 도말 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 전형적인 무색투명한 집락 또는 흑색 집락을 선별하여

Kligler Iron Agar (KIA, Difco, USA)에 접종한 후 사면이 적색이고 고층부가 흑색이며 Urease 시험에서 음성인 균을 살모넬라균으로 추정하였다. 살모넬라균으로 추정된 집락은 Tryptic soy agar (Difco)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양함으로써 순수 배양되었음을 확인하였다. 순수 배양된 균을 API 20E (bioMerieux, France)에 접종하여 37°C, 18시간 배양한 후 결과를 판독하여 살모넬라균임을 최종 확인하였다¹⁾. 모든 분리된 균주는 10 % glycerol을 넣은 TSB broth에서 -70 °C에서 보관하였으며 항생제 감수성시험은 분리 보관된 균주를 5% Sheep blood agar에 35°C 배양기(5% CO₂)에서 24시간 배양하여 이용하였다. 또한 균주의 분리율을 높이기 위해 혈액배지에 반복하여 계대하였다.

혈청형 분석

생화학적 동정에 의해 살모넬라로 확인된 균주에 대해서 살모넬라 진단용 항혈청을 이용하여 혈청형을 동정하였다. O군, Vi 항혈청은 국립보건원에서 공급받은 것을 사용하였으며 기타의 살모넬라 항혈청은 Difco (USA) 및 Denka Seiken (Japan)사의 살모넬라 검사용 항혈청을 사용하였다.

O항원 혈청형 분석을 위하여 균액에 항혈청을 떨어뜨려 혼합한 후 30초 이내에 응집을 일으키는 혈청형을 O혈청형으로 동정하였다. H항원 결정시험은 Motility GI (10 mL)에 천자 접종하여 37°C에서 16~18시간 배양한 후 배지의 윗 부분을 루프를 이용하여 버리고 아래로 자라 내려간 살모넬라균의 덩어리 일부를 Veal Infusion Broth (VIB, Difco, USA)에 접종하여 37°C에서 6~8시간 배양하여 0.6% formalin saline 동량을 배양액에 넣어 30분 동안 반응하여 균을 고정시키고 50°C 항온수조에서 1~2시간 정치 반응한 후 응집 여부를 확인해서 phase 1을 결정했다. phase 2 항원의 결정 시험은 이미 만들어 둔 Motility GI 배지를 끓는 물에 중탕하여 gel 상태로 만든 후, 45~50°C로 식히고 phase 1에서 먼저 확인된 항원의 항혈청 농축액 10 μL를 GI 배지 tube 사면에 떨어뜨리고, 잘 교반하여 고르게 섞어 균인 후 실험 균주를 접종하여 37°C에서 18시간 정도 배양한 후 배지 윗부분을 털어내고, phase 1 항원 결정 시험과 동일하게 수행하였다. Kauffmann White scheme에 의한 O 항원형, H 항원 phase 1 및 phase 2 항원형에 따라 *Sal.* Enteritidis 및 *Sal.* Typhimurium의 혈청형을 최종 확인했다⁴⁾.

항생제 감수성 시험

항생제에 대한 감수성은 식품의약품안전청에서 발간된 항생제 내성균 검사 표준 시험법 중 미생물자동화기기를 이용한 감수성 검사법(MIC test)에 따라 실시하였다¹⁶⁾. 시험에 사용된 기기는 BioMerieux사(France)의 Vitek II이며, 항생제 키트는 국립보건연구원과 bioMerieux사가 공동 개발한 AST-N169를 사용하였고, 항생제의 종류 및 내성 판단기준은

Table 1. Determination of susceptibility, intermediated resistance and resistance of bacteria to 17 antimicrobial agents by standard suggested by CLSI - MIC test

| Antimicrobial agents | Suceptibility | Intermediate | Resistance |
|------------------------------------|---------------|--------------|------------|
| Ampicillin(AM) | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 |
| Amikacin(AN) | ≤ 16 | 32 | ≥ 64 |
| Ampicillin/Sulbactam (SAM) | ≤ 8/4 | 16/8 | ≥ 32/16 |
| Cephalothin(CF) | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 |
| Cefazolin(CZ) | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 |
| Cefoxitin(FOX) | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 |
| Cefotetan(CTT) | ≤ 16 | 32 | ≥ 64 |
| Cefotaxime(CTX) | ≤ 8 | 16-32 | ≥ 64 |
| Ciprofloxacin(CIP) | ≤ 1 | 2 | ≥ 4 |
| Chloramphenicol(C) | ≤ 8 | 16 | ≥ 32 |
| Gentamycin(GM) | ≤ 4 | 8 | ≥ 16 |
| Imipenem(IPM) | ≤ 4 | 8 | ≥ 16 |
| Nalidixic acid(NA) | ≤ 16 | - | ≥ 32 |
| Tetracycline(TE) | ≤ 4 | 8 | ≥ 16 |
| Ceftriaxone(CRO) | ≤ 8 | 16-32 | ≥ 64 |
| Trimethprim/Sulfamethoxazole (SXT) | ≤ 2/38 | - | ≥ 4/76 |
| Amoxicillin/Clavulanic Acid(AMC) | ≤ 8/4 | 16/8 | ≥ 32/16 |

Table 1과 같이 2008년 CLSI 기준²²⁾에 따랐다. 시험방법은 Triptic soy agar (Difco, USA)에 접종하여 37℃에서 24시간 씩 2회 계대하여 순수 분리되었음을 확인한 후 3 ml의 saline에 균액을 0.6McF로 만들어 이 균액 145 μL를 취해 3 ml saline에 주입하고 잘 섞은 후 이 균액을 카드 실험에 사용하여 실험을 실시하였다. 본 실험에서는 총 17종의 항생제에 대해 분석이 이루어졌다.

PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

PFGE 시험방법은 질병관리본부 국립보건연구원에서 발간한 PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) 표준실험법¹⁷⁾, 이승주 등¹⁸⁾의 방법에 따랐다.

Agarose mold의 제조

실험균주는 BCYE 한천배지에서 72시간 이상 배양하여 사용하였고, molecular weight marker로는 *Salmonella serovar Braenderup* ATCC BAA-664를 사용하였다. 실험 시작에 앞서 멸균된 증류수, plug wash TE (Tris-EDTA) buffer (10 mM Tris pH 7.5 and 1 mM EDTA, pH 7.5)와 1.2% plug용 agarose (Seakem Gold, USA)를 준비하여 55℃ 향온수조에서 보관하였다. 먼저 폴리에틸렌 튜브(12×75 mm)에 cell suspension TE (Tris-EDTA) buffer (100 mM Tris pH 7.5 and 100 mM EDTA, pH 7.5) 2 mL를 넣고 면봉으로 균을 현탁하여 Vitek 탁도계로 15% ~ 20%의 투명도로 조

정하였다. 만들어진 균 현탁액 200 μL를 1.5 mL microcentrifuge tubes에 옮긴 다음, proteinase K (20 mg/mL) 10 μL를 넣고 잘 섞어주었다. 균 현탁액과 proteinase K가 들어있는 tube에 준비되어 있는 1.2% plug용 agarose mix 200 μL를 tube에 넣고, micropipette으로 천천히 4회 정도 섞은 후, 바로 plug mold (Bio-Rad, USA)에 넣었다. plug mold를 4℃에서 5분 정도 굳히고, 이 시간을 이용하여 ES Buffer (0.5 M EDTA, pH 8.0; 1% sodium-lauroyl sarcosine) 1.5 mL과 proteinase K 40 μL (20 mg/mL)를 2 mL microcentrifuge tube에 준비하였다.

제한효소 처리

응고한 plug를 꺼내서 ES buffer로 옮기고 55℃ 진탕 향온수조에서 2시간 처리하였다. Plug를 번호가 표시된 screen cap (Bio-Rad)에 각 검체별로 넣고, cap을 column형태로 조립한 다음, PVC 파이프를 만든 tube에 넣었다. 실험 전에 미리 55℃로 준비해둔 멸균 증류수를 PVC 파이프에 넣고 55℃ 진탕 향온수조에서 15분간 plug를 세척한 후 멸균 증류수를 제거하고 미리 55℃로 준비해둔 세척용 완충용액인 plug wash TE buffer를 넣어 55℃ 진탕 향온수조에서 30분 동안 5회 처리하였다. 세척이 끝난 plug를 에탄올로 닦은 면도칼을 이용하여 1 mm 두께로 자른 다음, 자른 2개의 절편을 1.5 mL microcentrifuge tube에 넣고, 남은 plug는 사용하지 않은 plug wash TE

buffer가 들어있는 2 mL microcentrifuge tube에 넣어 4°C에서 보관하였다. 1 mm 두께의 plug 절편이 들어 있는 1.5 mL microcentrifuge tube에 제한효소용 완충용액 (TaKaRa, Japan) 10 μ L, 제한효소 *Xba*I (NEB, 40 U/ μ L) 3 μ L, BSA (NEB) 1 μ L, 멸균 증류수 86 μ L를 넣고 50°C 항온수조에서 4시간 반응시켰으며, marker로 사용한 *Salmonella* serovar Braenderup ATCC BAA-664는 *Xba*I (NEB, 40 U/ μ L) 3 μ L, BSA (NEB) 1 μ L, 멸균 증류수 86 μ L를 넣고 37°C 항온수조에서 4시간 반응하였다.

전기영동

제한효소반응이 끝나면 반응용액을 제거하고, plug 절편이 들어있는 tube에 plug wash TE buffer를 200 μ L를 채워 넣는다. PFGE용 agarose를 사용하여 1% agarose 용액을 gel 크기에 맞추어 녹인 후, 55°C 항온수조에서 보관하고, 제한효소 처리가 끝난 plug 절편을 꺼내어서 agarose gel 성형용 comb의 끝 부위에 맞추어 올려놓은 후 여과지로 주변의 물기를 제거하고 상온에서 10분정도 건조시켰다. 절편의 건조가 끝나면 comb을 설치하고, 1% agarose 용액을 gel에 붓고 gel이 굳으면 comb를 뽑아내었다. Comb에 의해 만들어진 well은 agarose 용액을 부어서 채웠다. Gel을 전기영동 cell에 넣어 CHEF II Mapper PFGE (Bio-Rad, USA)를 이용하여 gradient 6.0 V/cm, included angle 120°, initial time 2.16 초, final time 63.8 초의 조건으로 14°C에서 18 시간 전기영동을 하였다. 전기영동이 완료되면 500 mL의 ethidium bromide 염색용액 (0.5 μ g/mL)에 gel을 넣어 30 분간 염색을 하고 증류수를 이용하여 1시간씩 2회 탈색을 하였다.

PFGE 결과는 각 균주의 DNA위치가 다른 절편의 수에 따라서 group을 결정하였고, BioNumerics software (Applied Maths, Belgium)를 이용하여 Dendrogram을 작성하여 균주간의 유연관계를 비교분석하였다.

결과 및 고찰

균주 분리현황

2008년에서 2009년까지 부산지역 설사환자 대변에서 검출된 살모넬라균 중 혈청형 시험에서 확정된 *Salmonella* Enteritidis 30건, *Salmonella* Typhimurium 17건에 대해 연구를 실시하였다. 연도별로는 2008년도에 20건, 2009년도에 27건의 균주가 분리되었으며, 2008년도는 설사질환에서 분리된 총 24건 중 83.3%를 차지하였고, 2009년도에는 32건 중 93.8%를 차지해 분리되는 대부분의 *Salmonella*속 균주가 이 두 종에 해당됨을 알 수 있다.

항생제 감수성 시험결과

Salmonella Enteritidis 30건에 대한 17종의 항생제에 대한 감수성 시험 결과 FOX, CTT, CIP, IPM, SXT, AMC 등 6종의 항생제에 대해서는 내성이 관찰되지 않았으며, AN, CF, CTX, GM, CRO에 대해 1건, CZ에 대해 2건, TE에 대해 4건의 내성이 관찰되었다. 또한, NA 12건, C, SAM 각 15건 등의 항생제 내성이 관찰되어 이들 3종에 대해서는 항생제로서의 감수성이 거의 없는 것으로 나타났다. 이 항생제 각각에 대한 감수성 실태는 Fig. 1과 같이 나타내었다.

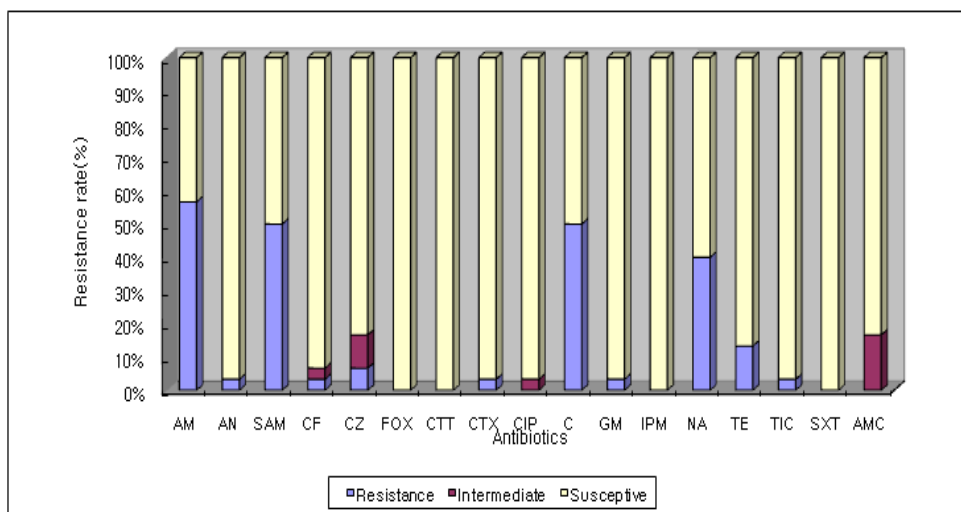


Fig. 1. *Salmonella* Enteritidis susceptibility ratio which follows in antibiotics type.

Table 2. *Salmonella* Enteritidis simultaneously resistance ratio which follows in antibiotics

| Multiplicity of Resistance | Pattern | No. of Isolates(%) | Total |
|----------------------------|---------------------------|--------------------|-----------|
| 0 | All susceptible | 2(6.7%) | 2(6.7%) |
| 1 | NA | 9(30.0%) | 11(36.7%) |
| | C | 1(3.3%) | |
| | TE | 1(3.3%) | |
| 2 | AM-SAM | 1(3.3%) | 1(3.3%) |
| 3 | AM-SAM-C | 12(40.0%) | 2(43.3%) |
| | AM-AN-C | 1(3.3%) | |
| 4 | AM-SAM-NA-TE | 1(3.3%) | 2(6.7%) |
| 6 | AM-SAM-CZ-C-NA-TE | 1(3.3%) | 1(3.3%) |
| 8 | AM-CF-CZ-CTX-GM-NA-TE-TIC | 1(3.3%) | 1(3.3%) |
| | | 30(100%) | 30(100%) |

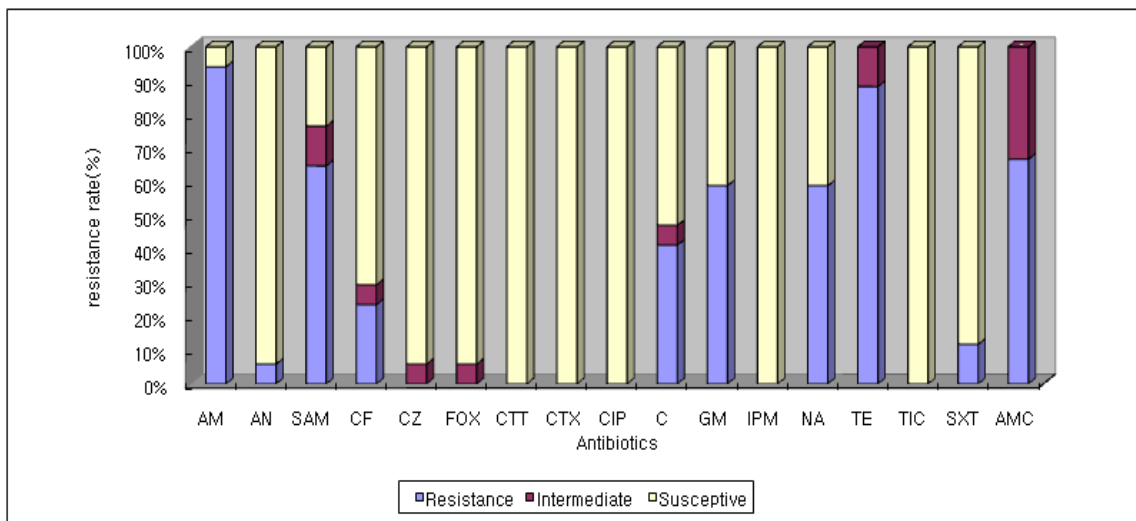


Fig. 2. *Salmonella* Typhimurium susceptibility ratio which follows in antibiotics type.

이들 항생제에 대한 다제 내성을 살펴보면 2종 이상의 항생제에 내성을 나타낸 균주는 모두 28건으로 각각을 살펴보면 11건의 균주가 NA 9건, C 1건, TE 1건 등의 항생제 내성을 나타내었고, AM-SAM 1건은 2종의 항생제에 다제 내성을 나타내었으며, AM-SAM-C는 12건, AM-AN-C 1건 3종의 항생제에 다제 내성을 보였다. AM-SAM-NA-TE의 4종 항생제에 내성을 보인 균주는 1건이었고, AM-SAM-CZ-C-NA-TE 6종의 항생제에 내성을 보인 균주도 1건 있었으며, 1건의 균주는 AM-CF-CZ-CTX-GM-NA-TE-TIC의 무려 8종의 항생제에 내성을 나타내어 항생제 내성 실태가 심각함을 나타내었다. 항생제 다제 내성 실태는 Table 2와 같다.

이들 항생제에 대한 다제 내성을 살펴보면 모든 균주가 2종

이상의 항생제에 내성을 나타내었으며, 각각을 살펴보면 3건의 균주가 AM-NA 1건, AM-TE 2건 등 2종의 항생제에 다제 내성을 나타내었고, 3종의 항생제에 내성을 보인 것은 C-NA-TE 1건 이었다. 4종의 항생제에 내성을 보인 균주는 3건으로 각각 AM-SAM-GM-TE 1건, AM-GM-NA-TE 1건, AM-AN-GM-TE 1건에 내성을 나타내었다. 또한 5종의 항생제에 내성을 나타낸 균주는 5건으로 각각 AM-SAM-GM-TE-SXT 2건, AM-SAM-C-GM-NA, AM-SAM-NA-TE-SXT 각 1건 이 이들 항생제에 다제 내성을 보였다. 또한, 6종의 항생제에 다제 내성을 보인 것은 2건으로 각각 AM-SAM-CF-NA-TE-AMC, AM-SAM-C-GM-NA-TE에 다제 내성을 나타내었다. 7종의 항생제에 다제 내성을 보인 것은 3건으로 AM-SAM-CF-C-GM-NA-TE

Table 3. *Salmonella* Typhimurium simultaneously resistance ratio which follows in antibiotics

| Multiplicity of Resistance | Pattern | No. of Isolates (%) | Total |
|----------------------------|----------------------|---------------------|----------|
| 2 | AM-TE | 2(11.8%) | 3(17.6%) |
| | AM-NA | 1(5.9%) | |
| 3 | C-NA-TE | 1(5.9%) | 1(11.8%) |
| 4 | AM-AN-GM-TE | 1(5.9%) | 3(23.5%) |
| | AM-GM-NA-TE | 1(5.9%) | |
| | AM-SAM-GM-TE | 1(5.9%) | |
| 5 | AM-SAM-GM-TE-SXT | 2(11.8%) | 5(29.4%) |
| | AM-SAM-C-TE-AMC | 1(5.9%) | |
| | AM-SAM-C-GM-NA | 1(5.9%) | |
| | AM-SAM-NA-TE-SXT | 1(5.9%) | |
| 6 | AM-SAM-CF-NA-TE-AMC | 1(5.9%) | 2(11.8%) |
| | AM-SAM-C-GM-NA-TE | 1(5.9%) | |
| 7 | AM-SAM-CF-C-GM-NA-TE | 3(17.6%) | 3(17.6%) |
| | | 17(100%) | 17(100%) |

에 대해 내성을 보였다. *Salmonella* Typhimurium의 경우 앞서 살펴 본 *Salmonella* Enteritidis보다 항생제 다제 내성 실태가 심각한 것으로 파악되어 이에 대한 대책이 시급하다 하겠다. *Salmonella* Typhimurium의 항생제 다제 내성 실태는 Table 3과 같다.

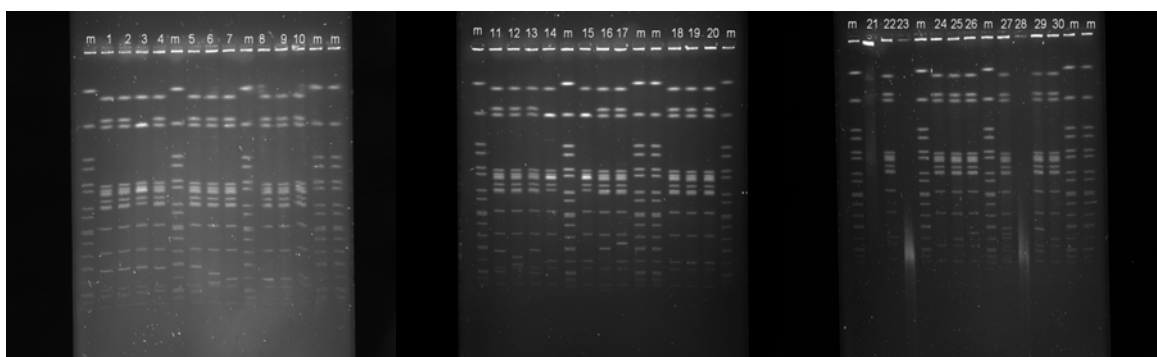
분리균주의 PFGE 패턴 분석

2008년부터 2009년까지 부산지역에서 분리된 47건의 *Salmonella* Enteritidis 및 Typhimurium에 대해 PFGE를 실시한 후 Pattern을 분류해 본 결과는 아래와 같다. *Salmonella* Enteritidis는 10개의 PFGE 유형이, *Salmonella* Typhimurium은 11개의 PFGE 유형이 확인되었다.

Salmonella Enteritidis

Salmonella Enteritidis를 PFGE 분석한 결과 사진은 Fig. 3과 같다. PFGE 결과 사진을 살펴 볼 때 이들 균주의 유전자형은 매우 유사함을 알 수 있다. 이 PFGE 결과를 BioNumerics software (Applied Maths, Belgium)를 이용하여 Dendrogram을 작성하여 균주간의 유연관계를 비교 분석한 결과는 Fig. 4와 같다.

30개의 *Salmonella* Enteritidis 균주는 총 10개의 PFGE 유형으로 나누어졌으며, 이는 앞서 살펴본 항생제 내성 검사 중 MIC 결과인 10개의 유형 분류와 매우 유사함을 알 수 있었다. PFGE 결과 균주간의 유사도는 96.8~83.8% 범위로 나타났다.

Fig. 3. PFGE image of *Salmonella* Enteritidis.

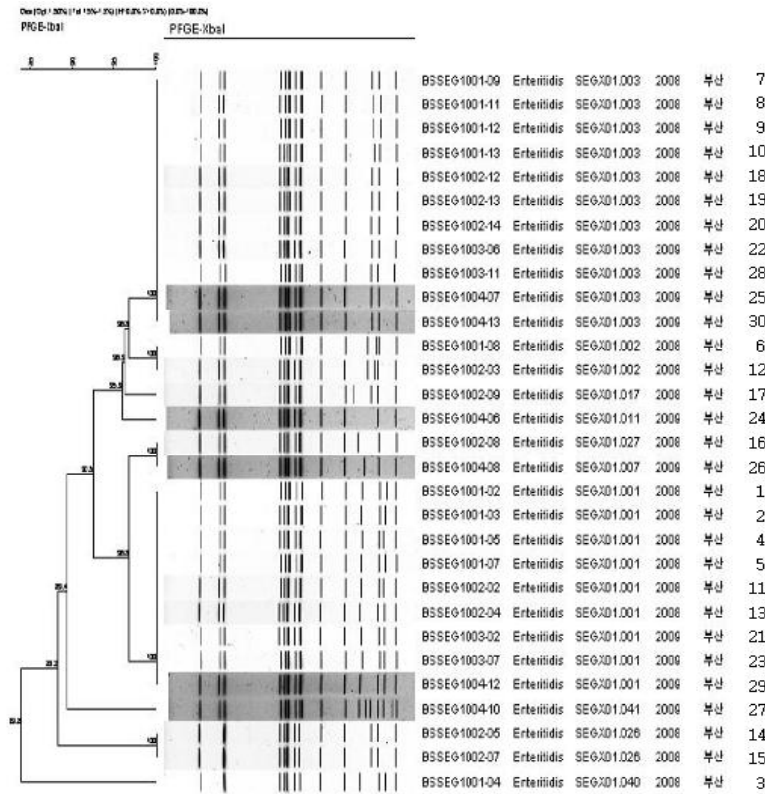


Fig. 4. PFGE analytical results of *Salmonella* Enteritidis.

***Salmonella* Typhimurium**

Salmonella Typhimurium을 PFGE 분석한 결과 사진은 Fig. 5와 같다. PFGE 결과 사진을 살펴 볼 때 이들 균주의 유전자형 유사도가 매우 높음을 알 수 있다. 이 PFGE 결과를 BioNumerics software (App.plied Maths, Belgium)를 이용하여 dendrogram을 작성하여 균주간의 유연관계를 비교분석

한 결과는 Fig. 6과 같다.

17개의 *Salmonella* Typhimurium 균주는 총 11개의 유형으로 나누어져 *Salmonella* Enteritidis보다 다양한 유형을 나타냈으며, 이 결과는 앞서서 살펴본 항생제 내성 검사 중 MIC 결과인 13개의 유형 분류와도 유사하게 보였고, PFGE 결과 균주간의 유사도는 97.3 ~ 68.0% 범위로 나타났다.

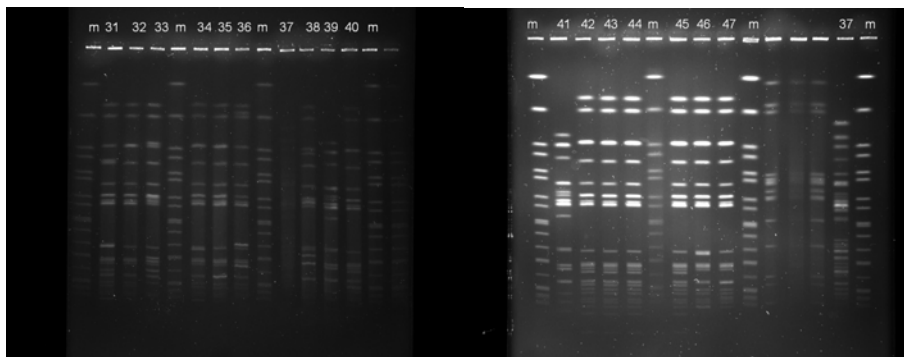


Fig. 5. PFGE image of *Salmonella* Typhimurium.

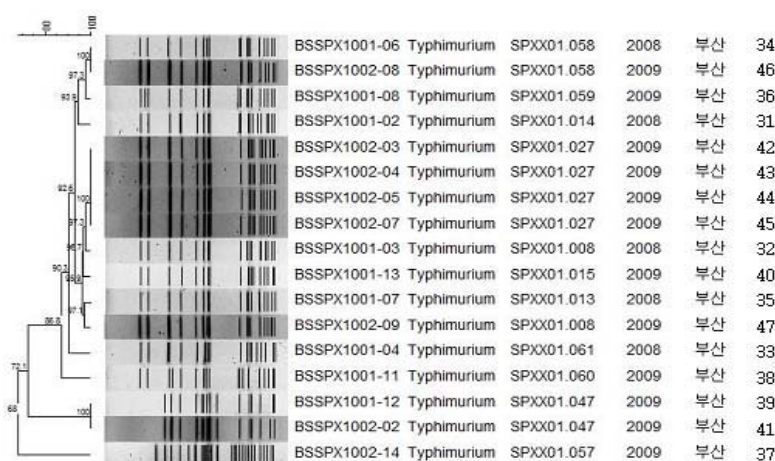


Fig. 6. PFGE analytical results of *Salmonella* Typhimurium.

고찰

수인성 설사질환의 주요원인체인 *Salmonella* spp.의 특성은 분리연도, 분리지역, 역학적 조건 등에 따라 다양하게 나타난다. 본 연구에서는 2008년부터 2009년까지 2년간 부산 지역에서 발생한 설사환자로부터 분리된 47주의 *Salmonella* Enteritidis 및 *Salmonella* Typhimurium에 대해 생화학적 성상, 혈청형, 항생제감수성, PFGE 검사를 실시하였다. 본 연구의 시작은 부산 지역 분리 *Salmonella* 들을 검사하는 과정에서 항생제 내성 pattern(Disk diffusion법)이 중복적뿔 생환나타 난다나타남에 유의 하여 이들 항생제내성과 PFGE간의 유사성을 밝혀, 이에 따라 부산지역 환자의 빠르고 적절한 치료가 이루어지게 하는 것이 목적이었다.

Salmonella Enteritidis 30건의 17종의 항생제에 대한 감수성 시험 결과 FOX, CTT, CIP, IPM, SXT, AMC 등 6종의 항생제에 대해서는 내성이 관찰되지 않았으며, NA 12건, C, SAM 각 15건 등의 항생제 내성이 관찰되어 이들 3종에 대해서는 항생제로서의 감수성이 거의 없는 것으로 나타났다.

또한, *Salmonella* Typhimurium 17건의 17종의 항생제에 대한 항생제 감수성 시험 결과 CZ, FOX, CTT, CTX, CIP, IPM, TIC 등 7종의 항생제에 대해서는 내성이 관찰되지 않았으며, SAM에 11건, TE에 15건, AM에 16건의 내성이 관찰되었다.

병원 임상에서 *Salmonella* 원인 설사에 있어서 NA, C, SAM, AM, TE 등의 항생제 사용은 거의 의미가 없음을 본 연구를 통해서 알 수 있었다.

FOX, CTT, CIP, IPM, SXT, AMC, CZ, CTX, TIC 등의 항생제에 대해선 감수성이 있는 것으로 나타났으나, 항생제

감수성을 평가 할 때 실험실적 시험과 임상에서의 결과가 반드시 일치하지 않는다는 점이 유의해야 할 요소일 것이다.

분리균주들에 대한 다제내성 패턴을 살펴본 결과 Enteritidis는 10종, Typhimurium은 13종의 pattern으로 분류할 수 있었으며, 이는 PFGE의 10종, 11종과 유사하며, 균주간 유사도를 살펴보면 *Salmonella* Enteritidis는 96.8 ~ 83.8%이며, *Salmoella* Typhimurium에서 97.8 ~ 68.0%로 나타났다. 이러한 결과는 유사도가 99% 이상일 때 동일균주, 95% 이상일 때 유사, 95%이하인 경우 유래가 다르다²¹⁾라고 하는 관점에서 볼 때 *Salmoella* Enteritidis, *Salmoella* Typhimurium 두 종 모두 대부분의 균주가 유래가 같다고 할 수 있겠다.

이들의 두 가지 항목의 관련성을 찾아보고자 PFGE 결과 및 항생제 내성 결과를 한 개의 표에 넣고 비교한 결과는 Fig. 7, Fig. 8과 같다.

Fig. 7의 *Salmoella*, Enteritidis 의 결과를 살펴보면 PFGE 분류와 항생제 내성 양상이 상당부분 유사함을 알 수 있었으나, SEGX01.003유형과 SEGX01.026 유형에서 차이를 나타내었다. 또한, 이번 PFGE 결과 부산지역에서 최초로 SEGX 01.040유형이 발견되었으나, 항생제내성에서는 유의할 만한 점이 없었다.

Fig. 8의 *Salmoella* Typhipurium의 항생제 다제내성 양상과 PFGE유형을 비교해서 살펴보면 Typhimurium의 경우는 두 항목 모두 다양한 양상을 보여 비교자체가 어려우나 Enteritidis에 비해 다양한 유형의 균주가 부산지역에 분포하고 있으며, 따라서 항생제 내성상태도 심각하다는 것을 알 수 있었다.

앞으로도 부산지역 분리균주에 대한 지속적인 분석을 통해 균주들의 유전자지도 및 내성양상을 파악해 가는 것은 과제라 할 것이다.

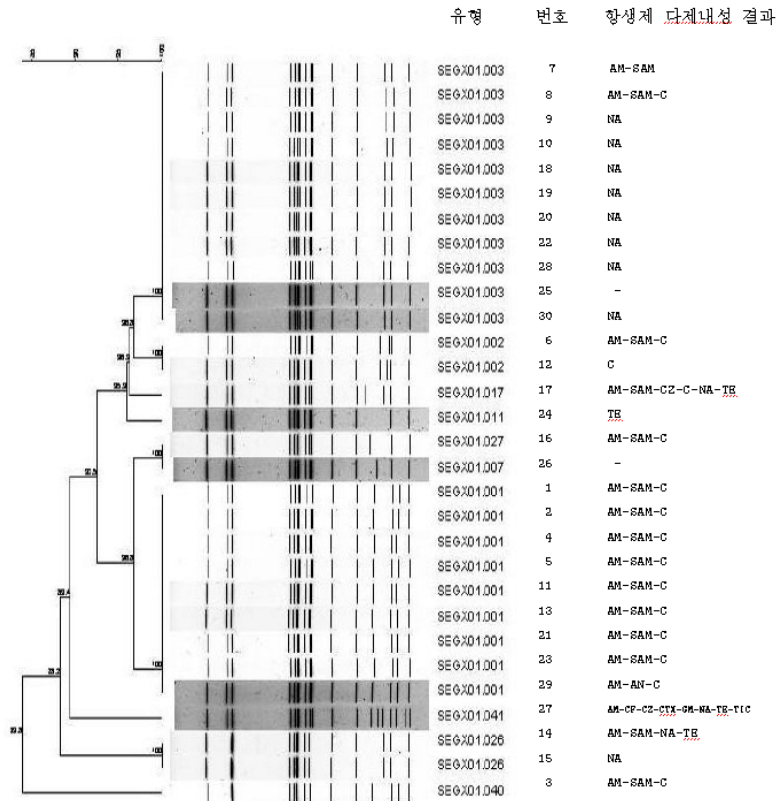


Fig. 7. Comparison of *Salmoella* Enteritidis PFGE result and antimicrobial susceptibility test result.

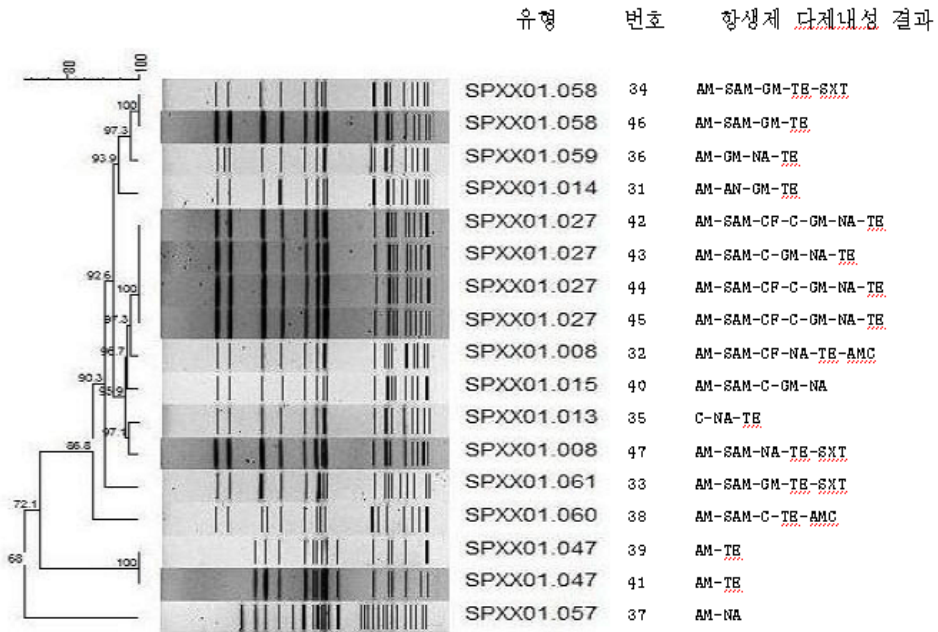


Fig. 8. Comparison of *Salmoella* Typhimurium PFGE result and antimicrobial susceptibility test result.

요 약

2008년부터 2009년까지 부산시내의 설사질환 환자에서 분리된 *Salmonella* Enteritidis 30건, *Salmonella* Typhimurium 17건의 분리균주를 검사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 연도별로는 2008년도에 20건, 2009년도에 27건의 균주가 분리되었으며, 전체 분리 건수 대비 두 종의 분리율이 2008년도에는 83.3%, 2009년도에는 93.8%로 대부분의 *Salmonella*屬 균주가 이에 해당되었다.
2. *Salmonella* Enteritidis 30건에 대한 17종의 항생제에 대한 감수성 시험 결과 FOX, CTT, CIP, IPM, SXT, AMC 등 6종의 항생제에 대해서는 내성이 관찰되지 않은 반면 NA 12건, C, SAM 각 15건 등의 항생제 내성이 관찰되어 이 3종에 대해서는 항생제로서의 감수성이 거의 없는 것으로 나타났다. 17종의 항생제에 대한 다제 내성을 살펴보면 2종이상의 항생제에 내성을 나타낸 균주는 모두 28건으로 각각을 살펴보면 11건의 균주가 NA 9건, C 1건, TE 1건 등의 항생제 내성을 나타내었고, AM-SAM 1건은 2종의 항생제에 다제 내성을 나타내었으며, AM-SAM-C는 12건, AM-AN-C 1건 3종의 항생제에 다제 내성을 보였다. AM-SAM-NA-TE의 4종 항생제에 내성을 보인 균주는 1건이었고, AM-SAM-CZ-C-NA-TE 6종의 항생제에 내성을 보인 균주도 1건 있었으며, 1건의 균주는 AM-CF-CZ-CTX-GM-NA-TE-TIC의 무려 8종의 항생제에 내성을 나타내었다.
3. *Salmonella* Typhimurium 17건에 대한 17종의 항생제에 대한 항생제 감수성 시험 결과 CZ, FOX, CTT, CTX, CIP, IPM, TIC 등 7종의 항생제에 대해서는 내성이 관찰되지 않았으나 GM과 NA에 10건, SAM에 11건, TE에 15건, AM에 16건의 내성이 관찰되었다. 다제 내성을 살펴보면 모든 균주가 2종이상의 항생제에 내성을 나타내었으며, 각각을 살펴보면 3건의 균주가 AM-NA 1건, AM-TE 2건 등 2종의 항생제에 다제 내성을 나타내었고, 3종의 항생제에 내성을 보인 것은 C-NA-TE 1건 이었다. 4종의 항생제에 내성을 보인 균주는 3건으로 각각 AM-SAM-GM-TE 1건, AM-GM-NA-TE 1건, AM-AN-GM-TE 1건 등이었다. 또한 5종의 항생제에 내성을 나타낸 균주는 5건으로 각각 AM-SAM-GM-TE-SXT 2건, AM-SAM-C-GM-NA, AM-SAM-NA-TE-SXT 각 1건의 항생제에 다제 내성을 보였다. 또한, 6종의 항생제에 다제 내성을 보인 것으로 각각 AM-SAM-CF-NA-TE-AMC, AM-SAM-C-GM-NA-TE에 다제 내성을 나타내었다. 7

종의 항생제에 다제 내성을 보인 균주도 3건으로 AM-SAM-CF-C-GM-NA-TE에 대해 내성을 보였다.

4. 위와 같은 결과로 미루어 볼 때 *Salmonella*屬 유래 설사 질환에 대해서는 NA, C, SAM, AM, TE 등의 항생제 사용을 자제하고 FOX, CTT, CIP, IPM, SXT, AMC, CZ, CTX, TIC 등의 항생제를 사용하는 것이 바람직한 것으로 보인다.
5. 30개의 *Salmonella* Enteritidis 균주는 총 10개의 PFGE 유형으로 나누어 졌으며, PFGE 결과 균주간의 유사도는 96.8 ~ 83.8% 범위로 나타났다. 이는 앞서서 살펴본 항생제 내성 검사 중 MIC 결과인 10개의 유형 분류와 매우 유사함을 알 수 있었다. 하지만 항생제내성 검사결과와 완전히 일치하지는 않았다.
6. 17개의 *Salmonella* Typhimurium 균주는 총 11개의 PFGE 유형으로 나누어져 *Salmonella* Enteritidis보다 다양한 유형을 나타냈으며, 이 결과는 앞서서 살펴본 항생제 내성 검사 중 MIC 결과인 13개의 유형 분류와도 유사하게 보였으나, 17주의 균주에 대한 결과임을 감안할 때 다양한 유전형과 내성을 가지고 있다고 보는 편이 타당하다 하겠다.

참 고 문 헌

1. 질병관리본부 국립보건연구원, 감염병 실험실진단 I 질환별 시험법, pp.61~62(2005).
2. 박석기 등, "서울시내 설사환자에서 분리한 살모넬라의 항생제 감수성의 연도별 변화추이", J. Fd Hyg. Safety 17(2), pp.61~70(2002).
3. Hui, Y.H., Gorham, J.R, Murrell, K.D. and Cliver, D.O. "Foeborne disease handbook diseases caused by bacteria. Vol 1, New York, Marcel Dekker, Inc.(1994)
4. 질병관리본부, 국립보건연구원 장내세균팀. 살모넬라균의 혈청형. pp.1~96(2007).
5. 장내세균과, 간염폴리오마바이러스과, 말라리아기생충과, 2009년 사업결과 및 2010년 사업계획서 수인성·식품매개질환 실험실 감시망 운영, 질병관리본부, pp.17~40(2010).
6. Richet, H.M., Mohammed, J., McDonald, L.C., and Jarvis, W. R. .Building communication networks: International network for the study and prevention of emerging antimicrobial resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 7, pp.319~322 (2001).

7. Gupta, A., Swarnkar, N. K., and Choudhary, S.P. Changing antibiotic sensitivity in enteric fever. *J. Trop. Pediatr.* 47, pp.369~371(2001).
8. Hakanen, A., Kotilainen, P., Huovinene, P., Helenius, H., and Siitonen, A. Reduced fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes in travelers returning from Southeast Asia. *Emerg. Infect. Dis.* 7, pp.996~1003(2001).
9. Isenbarger, D.W., Hoge, C.W., Srijan, A., Pitarangsi, C., Vithayasai, N., Bodhidatta, L., Hichey, K.W., and Cam, P.D. Comparative antibiotic resistance of diarrheal pathogens from Vietnam and Thailand, 1996-1999. *Emerg. Infect. Dis.* 8, pp.175~180(2002).
10. 방선재 등, "Salmonella othmarschen에 의한 집단식 중독사례의 분자역학적 분석", 한국환경보건학회지, 제 34권 제2호, pp.170~174(2008).
11. Kim, S.H., Lee, S.W., Kim, S. H., Kim, J. Y., Lee, H. Y., kang, Y.H., Park, M.s. and Lee, B. K., National Early Warning System Construction for Timely Surveillance of Food-borne Diseases, Center For Infection, Center for Infectious Diseases, National Institute of Health, Seoul, Korea, *Infection and Chemotherapy*, 38(6), pp.309~315(2006).
12. De Lapp,e, N., Dorna, G., Comnor, J.O., Mamina, C. and Cormican, M., "Use of pulsed - field gel electrophoresis of comparison of similar but distinuishable isolates of *Shigella sonnei* collected in Ireland and Italy", *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), pp.3808~3810(2006).
13. Ching, K. S., "The genetic corralation among Setotypes and PFGE patterns of *Streptococcus pneumoniae* isolated in Korea", *Korean Society of Environmental Health*, 30(1), pp.15~21(2004).
14. 설성용 등, "병원재료에서 분리한 *Stenotrophomanas maltophilia*의 항균제 내성 및 분자역학적 특성", *J Korean Soc. Microbiol.*, Vol. 35, No. 3, 2000, pp.239~240(2000).
15. 질병관리본부 국립보건연구원 "항균제 감수성 표준시험법" :pp.110~116(2008).
16. 식품의약품안전청 "항생제 내성균 검사 표준 시험법" :pp.133~137(2010).
17. 이복권 등 공저, PFGE(Pulsed Field Gel Electrophoresis) 표준시험법, 질병관리본부 국립보건연구원, pp.1~32(2008).
18. 이승주 등, "부산지역에서 최근 5년간 분리한 레지오넬라균에 대한 분자생물학적 특성연구", 부산광역시보건환경연구원보제19-1권, pp.28~33(2009).
19. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH and Swaminathan B: Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed -field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33(9):pp.2233~2239(1995).
20. 질병관리본부 국립보건연구원, 감염병 실험실진단 I 질환별 시험법, pp.63(2005).
21. BioMerieuxsa, diversilab Analysis Guide(ver. 3.4), pp.3~4
22. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventeenth Informational Supplement, Vol. 28 No.1, pp.98~101(2008).