부산광역시 보건환경연구원보 제14권(I), 112~120, 2004
Rep. Busan Inst. Health & Environ, Vol.14, 112~120, 2004

국내 분리 *Salmonella typhimurium*의 파지형별 분포와 분자유전학적 연구

축산물위생검사소

이 우 원

Phage types and plasmid profiles of *Salmonella typhimurium* isolated from swine and bovine

Veterinary Service Laboratory

Woo-Won Lee

Abstract

The present study was conducted to investigate plasmid profiles and the phage type(PT) of 138 *Salmonella typhimurium*(ST) isolated from swine and bovine origin in slaughterhouse. A total of 138 ST strains were plasmid profiled and 95.7%(132/138) of ST isolates tested could discriminated as 3~5 different plasmid bands including 90Kb plasmid. A total of 138 ST strains were phage typed and 83.3%(115/138)of ST isolates tested could discriminated as a 10 STPTs including the RNDC(reacts with phages but does not confirm) by 24 standard phages and 5 additional phages. In analysing of pahge types swine and bovine ST isolates, PT 195(25.4%) was the most prevalent swine and bovine. The PTs were typed in order of PT 193(24.7%), PT 194(10.2%) and PT 203(8.7%). In addition, PT 46A, U 288var, U 302 and U 308 were also found from swine and bovine.

Key words : slaughterhouse, *S. typhimurium* phage type, RNDC.

서 론

*Salmonella*속 균은 자연계에 널리 분포되어 거의 모든 척추동물에서 분리되며, 사람을 비롯한 많은 종류의 동물에서 각종질병의 원인이 된다[5]. 이들 균은 그람음성의 통성 혐기성 세포내 기생세균으로서 1886년 Salmon과 Smith에 의해 처음으로 분리, 보고된 이래 항원구조에 따라 2,400여종 이상의 혈청형이 밝혀져 있으며[12], 그 중 분리율이 비교적 높은 것은 200여종으로 알려져 있다. 특히 이 속균의 보균동물이 사람에 대한 감염원이 되고 있어 환경이나 식품오염을 통하여 식중독을 일으키므로 공중보건상 대단히 중요시되고 있다[4,6,10].

Salmonella 감염증은 설사, 쇠약, 발열 및 패혈증 등을 일으키는 전신성 질병이며 몇몇 숙주 특이성이 있는 균종을 제외하고는 거의 모든 포유동물에 감염을 일으키는 인수공통전염병이다. *Salmonella*속 균은 일반적으로 숙주에 대한 적응성에 따라 숙주 특이성 그룹과 숙주 비특이성 그룹으로 대별하고 있다. *Salmonella typhi*와 *S. paratyphi*는 사람에, *S. dubulin*은 소에, *S. cholerasuis*는 돼지에, *S. pullorum*과 *S. gallinarium*은 닭에 각각 친화성이 있는 균종이며, *S. typhimurium*과 S. derby 등은 거의 대부분의 동물에 친화성을 나타내고 있어 비특이성 균종으로 분류된다.

Salmonella 감염증의 역학양상을 분석함에 있어 혈청형, 생물형, 약제내성형, 파지형 등의 혈청학적 및 생화학적 성상이 조사되고 있으며[8], 근년에는 plasmid profile, PCR기법을 기초로 한 분자유전학적 분석 및 제한효소 처리에 의한 DNA의 절단 양상 등을 분석하여 역학관계를 규명하고 있다. 특히 최근 연구자들에 의해 살모넬라 속균, 대장균 등 여러 장내세균에서 약제내성 뿐 아니라 장부착능, 장침입능, 독소산생능이 plasmid DNA의 유전정보에 의한다고 알려져 있다[7].

한편 살모넬라 감염증의 역학적 특성을 밝혀내기 위한 방법 중의 하나인 bacteriophage(phage) typing scheme(PTS)은 균의 특성이나 전파경로의 추적 등 역학적으로 세균을 종(species)이하 수준까지 분류하는데 이용되는 기법이다. 이는 세균 숙주에 대해서 알려진 특정 phages에 대한 감수성이나 감염되어 균을 사멸시키고 나타나는 plaque 또는 lysis 양상이 다양한 특성을 이용하여 판별하는 기법이다. 특히 살모넬라 균종에 의한 사람에서의 질병발생이 증가하면서 혈청형 동정으로는 역학적인 규명에 불충분하였고 PTS는 이를 보완할 수 있는 역학적 연구에 많은 도움을 주는 결과를 제공하여 왔다.

*S. typhimurium*의 PTS 기법은 1977년 Anderson 및 Linda Ward 등[1]에 의해서 시작되었고, Linda Ward 등[13]이 10종의 typing phage를 이용하여 PTS 기법을 정립하면서 전세계적으로 널리 이용되었다. 그 이후 새로운 파지와 표준형의 균종이 계속적으로 발견되면서 지금까지 *S. enteritidis*의 경우 16종의 파지와 75종의 표준형 균

종이, *S. typhimurium*의 경우는 더 많아서 36종의 파지와 200종이상의 표준형 균종이 발표되어 이들 균종에 대한 파지타이핑을 통하여 역학적인 연구에 활용되고 있다.

따라서 이 실험에서는 도축우 및 도축돈의 장내용물과 장간막림프절에서 분리한 *S. typhimurium* 138주를 대상으로 plasmid DNA profiles과 phage typing을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 공시균주

공시균주는 도축우 및 도축돈의 장내용물과 장간막림프절에서 분리한 *S. typhimurium* 138주를 공시균주로 사용하였다.

2. Plsmid의 분리

*Salmonella*속 균의 plasmid profiles에 관하여 조사할 목적으로 Birboim과 Doly[2]의 alkaline lysis method로 plasmid를 분리하였다. 균체를 LB borth 5mL에 접종하여 37℃에서 18시간동안 진탕 배양한 다음, 배양액 1.5mL을 원심하여 얻은 균체에 solution I(50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-Cl, pH 9.0, 4mg/mL lysozyme) 100μL를 가하여 실온에서 5분간 방치하였다. 여기에 solution II(0.2N NaOH, 1% SDS) 200μL를 가하여 얼음 속에 5분간 방치한 다음, solution III(3M Potassium acetate, pH 4.8) 150μL를 넣고 다시 얼음 속에 10분간 방치한 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액에 동량의 TE saturated phenol/chloroform을 가하고 원심하여 상등액을 취한 다음 두배용량의 cold ethanol을 가하여 실온에서 10분간 방치한 후 원심분리하여 DNA를 침전하였다. DNA pellet은 70% ethanol로 세척하고 TE buffer (pH 8.0) 50μL로 용해하였다. *Salomnella*로부터 분리한 plasmid는 Mayer et al[9]의 방법에 준하여 loading buffer(30% glycerol, 50mM EDTA, 0.025% bromophenol blue in 50mM TrisHCl, pH 8.5)와 2:1로 혼합하여 agarose gel(Gibco)상에 잠적하고 TBE (89mM Trise base, 89mM boric acid, 2mM EDTA, pH 8.0)하에서 80～100V로 3～4시간동안 전기영동을 실시하였다. Agarose gel은 0.5μg/mL의 ethidium bromide 용액에 담근후 파장 254nm의 ultraviolet ray를 사용하여 DNA를 확인하였다.

3. Phage typing

Serotyping에서 *S. typhimurium*으로 동정된 138주를 대상으로 phage typing을 실시하였다. Anderson 등[1]의 방법에 따라 24종의 normal phage set와 5종의 additional phage를 이용하여 동정하였다. 순수배양된 분리주를 nutrient broth(NB)에 접종하여 배양하고, 군수를 조정한 후 nutrient agar plate(NA)에 접종하여 표면의 물기를 건조시켰다. 그리고 NB에서 사전 역가검정을 실시하여 RTD(routine test dilution)로 조정된 각 형의 phage액을 phage applicator로 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 판독하였다.

판독은 숙주세포에 대하여 각 형의

phage액에 의해 특이적으로 일어난 용균 양상을 phage형 표준 판독표에 따라 판독하였다. 24종의 표준파지에 대해서 반응은 보이나 5종의 additional phage를 이용하여도 명확히 결정할 수 없는 균주는 RNDC(reacts with phages but does not confirm)로 규정하였다.

결과 및 고찰

1. Plasmid profiles

실험에 사용한 *S. typhimurium* 138균주 중 6주는 plasmid를 가지고 있지 않았다. plasmid를 보유하고 있는 132균주는 그림 1～3에서와 같이 3～5개의 plasmid DNA를 가지고 있었다. 병원성과 관련이 있는 것으로 보고된 바 있는 90 Kb 크기의 plasmid가 관찰되었다.

2. 파지형별 분포

실험에 사용한 *S. typhimurium* 138균주의 파지형을 조사한 결과는 Table 1에서와 같이 10종의 phage type이 동정되었다. 총 138주의 분리균주 중 35주가 PT 195로 확인되어 25.4%로 가장 높은 분포율을 나타내었고, PT 193이 34주, PT 194가 14주 순서로 분포되었다. 24종의 표준파지에 대해서 반응은 보이나 5종의 additional phage를 이용하여도 명확히 결정할 수 없어 RNDC (reacts with phages but does not confirm)로 규정한 균주는 7주로 나타났고, 표준파지와 additional phage를 이용하여도 구별할 수 없는 미동정 균주가 23주였다.

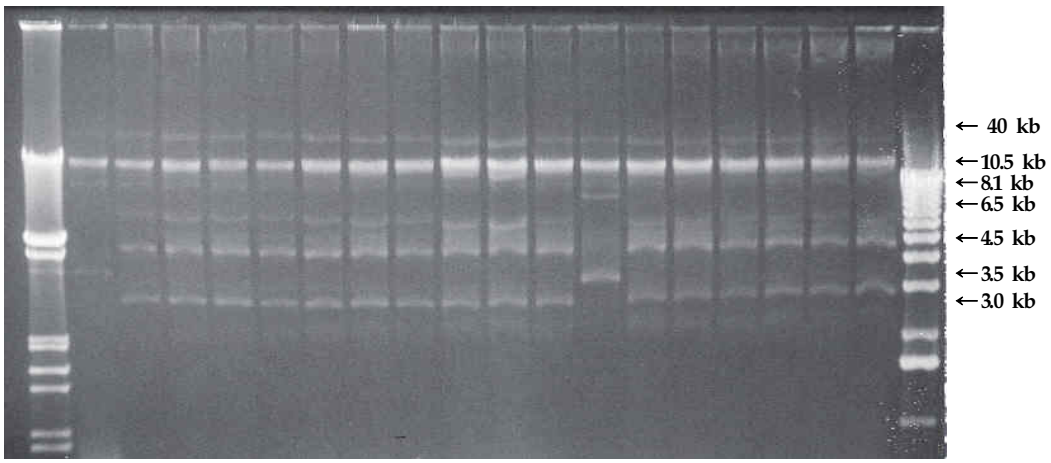

Fig. 1. Plasmid profiles of *S. typhimurium* isolated from swine and bovine. M1: λ DNA/EcoR I + Hind Ⅲ marker, M2: 1kb plus DNA ladder, 1～18: *S. typhimurium*

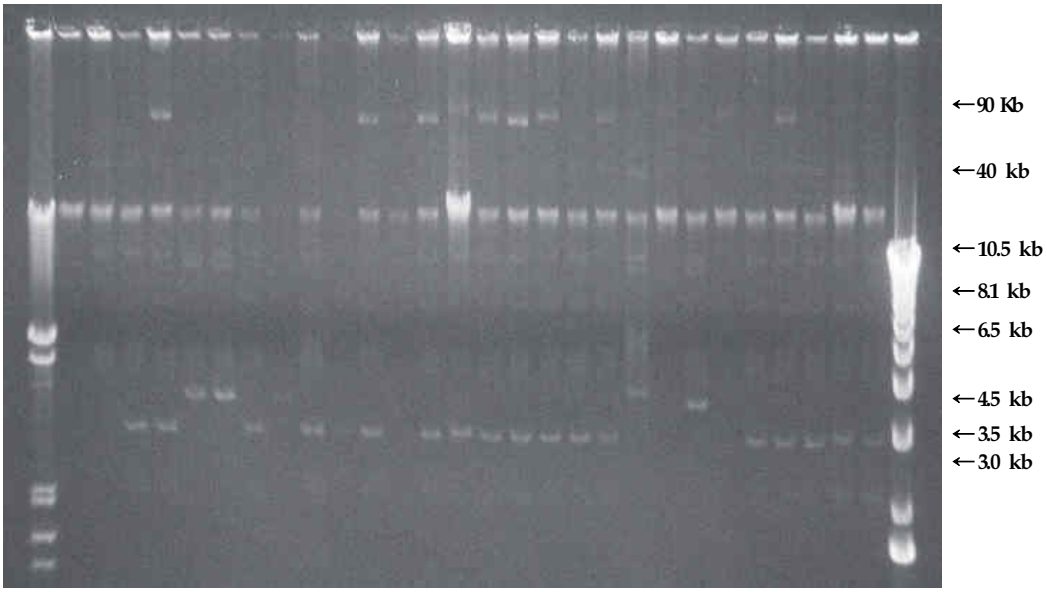

Fig. 2. Plasmid profiles of *S. typhimurium* isolated from swine and bovine. M1: λ DNA/EcoR I + Hind Ⅲ marker, M2: 1kb plus DNA ladder, 1～28: *S. typhimurium*

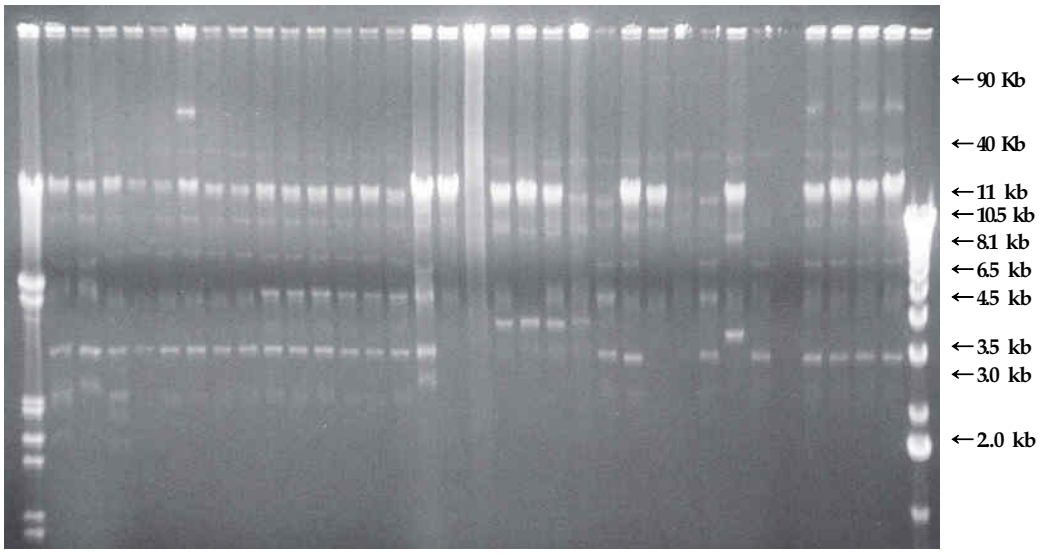

Fig. 3. Plasmid profiles of *S. typhimurium* isolated from swine and bovine. M1: λ DNA/EcoR I + Hind Ⅲ marker, M2: 1kb plus DNA ladder, 1～33: *S. typhimurium*

Table 1. Phage types of *S. typhimurium* isolated from swine and bovine

Animals	Phage types of *S. typhimurium*											Total
	PT22	PT46A	PT193	PT194	PT195	PT203	U288var	U302	U308	RNDC*	Untypable	
Swine	1	3	30	14	35	12	1	5	1	7	23	132
Bovine	-	-	4	-	-	-	-	1	1	-	-	6
Total (%)	1	3	34 (24.7)	14 (10.2)	35 (25.4)	12 (8.7)	1	6	2	7	23	138

* Reacts with phages but does not confirm to a recognized pattern

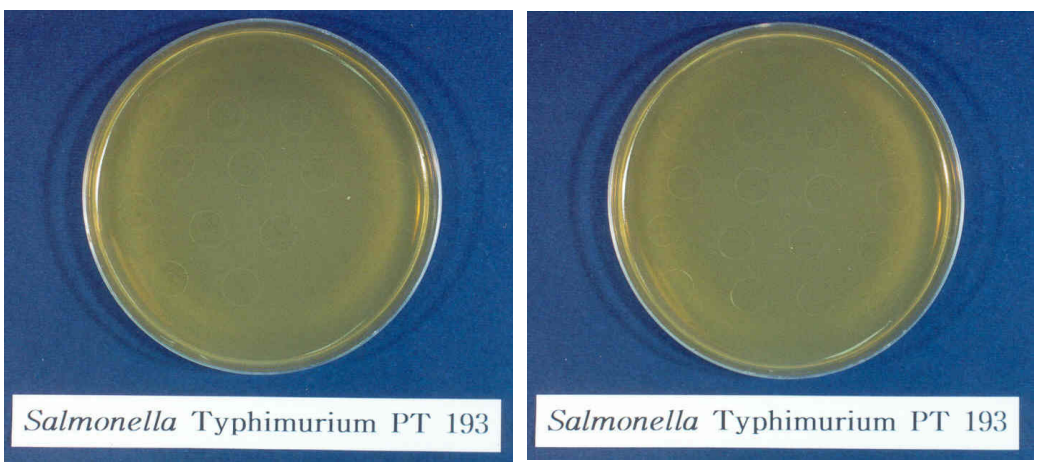

Fig. 4. Phage type of *S. typhimurium* PT 193 on nutrient agar

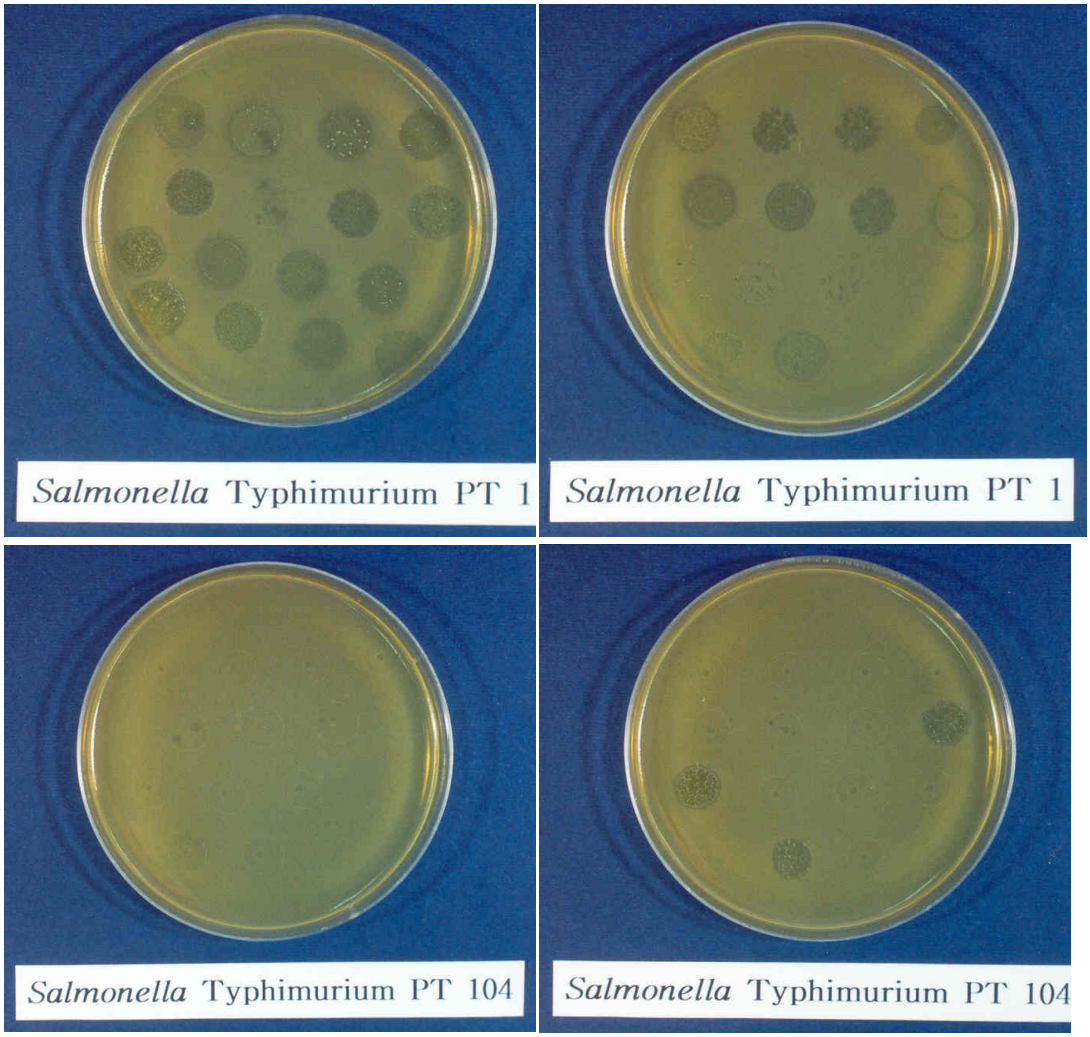

Fig. 5. Phage type controls of STPT 1 and STPT 104 on nutrient agar

Murray(1994)[11]는 1987년부터 1992년까지 Australia에서 동물 및 사람유래 *S. typhimurium*에서 11종의 PT를 확인하였고, 사람과 소, 양에서는 PT 9, 돼지에서는 PT 141, 닭에서는 PT 135가 가장 대표형이라고 보고하였다. Threlfall 등[12](1993)은 1981년부터 1990년까지 영국의 사람과 동물에서 분리된 *S. typhimurium* 중에서 사람에서는 PT 204C, 소와 돼지에서는 PT 193 그리고 닭에서는 PT 8이 가장 대표형이라고 보고하였으며, Carlson 등[3](2000)은 1998년도 미국의 동물에서 분리된 *S. typhimurium*의 다제내성균 432주 중 DT 104가 가장 많고, U 302, PT 193, PT 208 순이었다고

보고하였다. 우리나라에서도 김(2000)[14]이 경북지역 동물에서 분리한 45주의 *S. typhimurium*에 대한 phage typing 결과 8종의 PT를 확인하였고, PT 197, U 302 및 PT 202 순이었다고 보고하였다. 본 연구에서는 Murray와 김(2000)의 보고와는 다소 차이가 있었으나 Carlson 등[3]과 Threlfall 등[12]의 보고와는 유사하였다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 지역과 국가별로 유행하는 phage type이 다양하다는 것을 알 수 있었다.

결 론

살모넬라균증 예방의 기초자료로 이용하고자 야외 분리 *S. typhimurium* 138균주를 대상으로 plasmid profiles 및 파지형별 분포를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *S. typhimurium* 138균주 중 6주는 plasmid를 보유하지 않았고, 132균주는 3～5개의 plasmid DNA를 가지고 있었으며 다수의 균주에서 병원성과 관련이 있는 90Kb 크기의 plasmid가 관찰되었다.
2. *S. typhimurium* 138균주의 파지형을 조사한 결과 35주가 PT195로 확인되어 25.4%로 가장 높은 분포율을 나타내었고, PT193이 34주, PT194가 14 순서로 분포되었다.

참 고 문 헌

1. Anderson ES, Ward LR, De Sa JDH, JDH. 1977. Bacteriophagetyping designations of *S. typhimurium.* J Hyg. 78:297～300.
2. Birnboim HC, Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recomnant plasmid DNA. Nucleic Acids Res, 7:1513.
3. Carson SA, Browing M, Kathleen E, Jones FBD. 2000. Identification of diminished tissue culture invasiveness among multiple antibiotic resistant *S. typhimurium.* Microb Pathog, 28:37～44.
4. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. 1990. Microbiology. 4th ed, Harpes and Row Publishers, 576～579.
5. Edward P.R. and Galton M.M.:1967. *Salmonellosis*. Adv. Vet. Sci. 11:1～63.
6. EL-Glazzar P.E. and Martin E.H.:1994. *Salmonellae, Salmonellosis,* and Dairy Foods: A Review. J. Dairy Sci. 75:2327～2343.
7. Gahring LC, Heffron F, Finlay BB, et al. 1990. Invasion and replication of *S. typhimurium* in animal cells. Infect Immun. 58:443～448.
8. Helmuth R, Stephan R, Bunge C, et al. 1985. Epidemiology of virulence associated plasmids and outer membrane

protein patterns within seven common *Salmonella serotypes*. Infect Immun. 48:175～182.

9. Mayer LW. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and intracing the transmission of antibiotic resistance. 1988. Clin Microbiol Rev, 1:228～243.
10. Murray PR, Pfalier MA, Tenouer FC, Yolken RH. 1999. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. ASM Press, 46 7～471.
11. Murray CJ. 1994. *Salmonella* serovars and phage types in humans and animals in Australia 1987～1992. Australian Vet J, 71(3):78～81.
12. Threlfall EJ, Rowe B, Ward B. 1993. A comparison of multiple drug resistance in *Salmonella* from humans and food animals in England and Wales, 1981 and 1990. Epidemiol Infect, 111:189～197.
13. Ward LR, De Sa Rowe B. 1987. A phage typing scheme for *S. enteritidis*. Epideiol Infect. 99:291～294.
14. 김상윤. 2000. 경북지역 가축에서 분리된 *Salmonella* 속균의 역학적 특성 및 병원성. 경북대학교 대학원 박사학위 논문.