

動物에서의 thermophilic *Campylobacter*의 分布 및
分離細菌의 藥劑耐性 傳達에 關한 研究
II. *Campylobacter*의 plasmid profile 및 藥劑耐性 傳達

김 용 환 · 마 점 술
경상대학교 수의과대학 · 서울대학교 수의과대학
(1989. 1. 31 접수)

Distribution of Thermophilic *Campylobacters* in animals and transfer of drug resistance factor of isolates to related bacteria

II. Plasmid profile and transfer of drug resistance of isolated *Campylobacter*

Yong-hwan Kim, Jurn-sool Mah*
College of Veterinary Medicine Gyeongsang National University
College of Veterinary Medicine, Seoul National University*
(Received Jan 31, 1989)

Abstract: To investigate the epidemiological trait of intestinal diseases of animals caused by thermophilic *Campylobacter spp.*, isolation of etiological agent was carried out and the profiles of plasmids and the transfer of resistance plasmid in the isolated *Campylobacter spp.* were examined.

The results were as follows.

1. A total of 110 isolates of *C jejuni* and *C coli* were subjected to the test for the presence of plasmid DNA. Of the isolates examined, 60% of the isolates were noted to harbor plasmid DNA. Plasmid occurrence rate from pigs, chickens and cattle were 76.2%, 61.7% and 37.7%, respectively. The plasmids of a large molecular weight, ranging from 36 Md to 86Md, were identified with the strains of tetracycline resistant.
2. Transfer frequency of tetracycline resistant plasmids was higher in the case of the filter mating method than in the broth mating method by the factor of 10~1,000.
3. Tetracycline resistant plasmids of *C jejuni* were transferrable to *C jejuni* and *C coli* by conjugation. In a low frequency, the transfer of tetracycline plasmid was also possible to *Vibrio parahemolyticus*. However, it was impossible to transfer to *Streptococcus fecalis*, *E coli* and *Vibrio cholerae*.
4. Tetracycline resistant plasmids of *C jejuni* were impossible to transfer to *Campylobacter spp.* and related bacteria by transformation.

Key word: plasmid occurrence rate, conjugation, transformation.

서 론

Campylobacter 속군의 유래는 1913년 McFadyean과 Stockman¹이 유산된 면양으로부터 분리하여 미호기성 *Vibrio*속군이라고 명명한 이래 1946년 Levy²가 위장염을 일으킨 환자로부터 분리하였을 때까지 *Vibrio*속군으로 분류하였다. 그 이후 King³은 이 세균의 생화학적 특성과 항원성이 *Vibrio*속군과는 전혀 다른 균임을 확인하고 유사 *Vibrio*균이라고 분류하였으나, Veron과 Chatelain⁴ 및 Smibert⁵는 DNA의 G+C함량이 *Vibrio* 속군과는 차이가 있음을 밝히고 *Campylobacter* 속군으로 명명하였다.

*Campylobacter*속군은 현재까지 17종으로 분류하고 있으며, catalase 반응에 따라 2 group으로 나누고 있다. 즉, catalase 양성군에는 *C fetus* subsp. *fetus*, *C fetus* subsp. *venerealis*, *C jejuni*, *C coli*, *C laridis*, *C pylori*, *C hyointestinalis*, *C cryaerophilia*, *C nio-rofigillis*, aerotolerant *Campylobacter* subsp., free-living *Campylobacter* subsp. 등 11종이 있고, catalase 음성군에는 *C sputorum* subsp. *sputorum*, *C sputorum* subsp. *bubulus*, *C sputorum* subsp. *mucosalis*, *C concisus*, *C cinaedi*, *C fennelliae* 등 6종이 있다.^{6~13}

*Campylobacter*속군의 plasmid보유율에 관하여서는 Austin과 Trust¹⁴가 18%로 보고한 이후, Bopp et al¹⁵은 환자 유래균에서 57.3%, Munroe et al¹⁶은 동물 유래균에서 53.8%, Tenover et al¹⁷은 사람과 동물에서 유래한 균 전체의 평균 보유율은 53%라고 하였다.

Campylobacter 속군의 약제내성전달에 관하여 Taylor et al¹⁸은 *C jejuni*와 *C fetus*의 Tc 내성유전자는 plasmid가 보유하고 있으며, 전달이 가능하고 그 크기는 42Kb 또는 42~100Kb로 알려져 있다.^{17,19}

내성인자의 전달은 conjugation에 의하며, 전달 빈도는 10^{-3} ~ 10^{-9} 범위로 알려져 있다.^{17,20,21}

Campylobacter 속군의 Tc 내성은 conjugation과 transformation에 의하여 *E coli*를 비롯한 다른 장내세균으로 전달이 되지 않는 것으로 알려져 있다. 그 이유로서 이들 세균간에는 plasmid에 대한 endonuclease의 recognition pattern이 동질성이 없기 때문이라고 하였다.^{17,20}

Taylor²²는 제한효소처리에 의하여 *C jejuni* Tc내성 plasmid의 gene map을 만들어 Tc내성 결정기를 확인하고, cosmid vector와 hybridization시킨 후, *E coli*에 transfection시켜 clone화 하였다. 그러나 *C jejuni*의 Tc내성인자가 conjugation이나 transformation에 의한 방법으로는 *E coli* 및 다른 장내세균으로 전달되

지 않는 이유는 이들 속주세포내에서는 plasmid의 유지 및 복제가 잘 되지 않기 때문이라고 하였다.

국내에서는 *Campylobacter* 속군의 plasmid에 관하여 보고된 바 없다.

본 연구에서는 분리균에 대한 plasmid보유율 및 유형을 조사하는 한편 약제내성과의 관련성을 비교검토하고, 분리균의 약제내성 전달성을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 : 전보에서와 같이 분리동정한 *C jejuni* 97주와 *C coli* 13주로부터 plasmid를 분리하여 보유율 및 유형을 조사하였다.

Plasmid의 분리 : Plasmid의 분리는 Birnboim과 Doly,²³ Bradbury,¹⁹ Taylor¹⁸의 방법에 준하여 alkaline SDS (sodium dodecyl sulfate)법을 보완 실시하였다. *Campylobacter*속군은 혈액천편판배지에서 48시간 배양한 것을, *Vibrio parahemolyticus*는 brain-heart infusion broth에서 16~18시간 배양한 것을 사용하였다. 세균부유액 각 1.5ml를 microfuge tube에 옮기고 12,000rpm으로 1분간 원심분리하여 침전시킨 균체를 SET buffer(20% sucrose, 50mM Tris-(HCl, pH7.6 및 50mM EDTA) 150 μ l에 부유시킨 후 RNase bffer (RNase A 10mg/ml, 0.1M sodium acetate 및 0.3mM EDTA) 5 μ l와 lysozyme sol.(lysozyme 5mg/ml, 10 mM Tris-HCl, pH7.6 및 10mM NaCl) 50 μ l를 가하고 철저히 혼합하여 ice bath에서 10분간 정치하였다. 여기에 lytic mixture(1% SDS 및 0.2N NaOH) 350 μ l를 가하여 혼합하고 ice bath에서 10분간 정치한 다음 3M sodium acetate 250 μ l를 가한 후 ice bath에서 30분간 정치하였다.

이와 같이 처리한 것을 4°C에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리하여 세균의 잔해물과 chromosomal DNA를 침전시키고 plasmid를 함유한 상층액을 다른 microfuge tube에 옮겼다. 여기에 각 300 μ l의 phenol-chloroform 용액을 가하여 4°C에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 회수하는 방법을 반복, 실시하여 잔여 단백질을 제거하였다.

이와 같이 분리한 plasmid는 70% ethanol로 수회 원심세척하고 진공건조시켜 plasmid pellet을 만들었다.

순수분리한 plasmid를 15 μ l의 TE buffer(10mM Tris-Hcl 및 1mM EDTA, pH8.0)에 용해하고, 0.25% BPB용액(0.25% bromphenol blue, 0.25% xylene cyanol 및 40% sucrose 수용액) 5 μ l를 가한 현탁액을 0.7% agarose gel 상에서 120mA로 3시간 전기영동하여 plasmid를 검정하였다.

Table 1. Donor and recipient strains used for the conjugation test of drug resistant factor

Strains	Species	Antibiotic resistance	Origin
Donor			
ATCC33251	<i>C jejuni</i>	Tc 125	ATCC, human isolate
S43	<i>C jejuni</i>	Tc 150	Korea, swine isolate
Ch79	<i>C jejuni</i>	Tc 125	Korea, chicken isolate
Recipient			
WP 1	<i>V parahemolyticus</i>	Ap 200	Japan, human isolate
WP 28	<i>V parahemolyticus</i>	Ap 200	Japan, human isolate
MY 73-13	<i>V parahemolyticus</i>	Ap 200	Japan, human isolate
SM 218	<i>V cholerae</i>	Ap 200	Japan, human isolate
	<i>Streptococcus fecalis</i>	NA, Sm150	Japan, human isolate
ML 1410	<i>E coli</i>	NA 200	Japan, human isolate
SD 2	<i>C jejuni</i>	NA 250	Canada, human isolate
St 29	<i>C coli</i>	Sm 150	Canada, human isolate

내성인자의 전달시험 : Donor 균주는 항생제 감수성 시험에서 Tc에 대한 MIC(minimal inhibitory concentration)가 100 μ g/ml 이상이고 Ap, Sm 및 NA에 대한 MIC는 1 μ g/ml 이하인 감수성 균주로서, 38Md 단일분획의 plasmid를 보유한 *C jejuni* S43(돼지 유래균)과 Ch79(닭 유래균)를 사용하였다. 대조균주로는 ATCC33251(ATCC제공)을 사용하였다. recipient 균주는 Tc에 대한 MIC가 1 μ g/ml이하이고 plasmid를 보유하지 않은 *C jejuni* SD2(Taylor씨 제공, Alberta 대학), *C coli*29(Park씨 제공, Bureau of Microbial Hazard of Health Protection Branch, Ottawa), *V cholerae*, *V parahemolyticus*, *Streptococcus fecalis* (Toshio Miwatani씨 제공, Osaka 대학) 및 *E coli* ML1410(한국과학기술원)을 사용하였으며, 이들 세균의 자세한 것은 표 1과 같다.

Conjugation에 의한 전달시험 : 전달시험방법은 donor 및 recipient로 사용한 각 *Campylobacter* 및 *Streptococcus* 균주는 혈액천편평판배지에 18~24시간 배양한 것을 *Vibrio* 및 *E coli* 균주는 16~18시간 배양한 것을, mating broth에 10⁹ cfu/ml 수준으로 부유시켰다.

Donor 및 recipient를 1 : 4 비율로 혼합한 다음 filter mating에서는 nitrocellulose filter(Millipore Co HA type 0.22 μ m)에 200 μ l를 적하하여 혈액천편평판배지 위에서 배양하였다. Broth mating은 donor 및 recipient 혼합액 1ml를 시험관에 분주하고 여기에 동량의 신선한 배지를 가하여 미호기조건으로, *Campylobacter* 동종간은 42°C에서 다른 균종간은 37°C에서 24~48시간

배양하였다.

Transformation에 의한 전달시험 : Recipient로 사용한 균배양액을 0°C ice bath에서 20분간 정치하여 냉각시킨후 30ml를 취하여 4,500rpm으로 10분간 원심침전한 다음 0~4°C의 100mM CaCl₂용액으로 2회반복 처리하여 집균하였다.

침전세균을 원래량의 1/20에 해당하는 100mM CaCl₂ 용액에 부유시켜, 그 0.2ml에 donor plasmid DNA 0.1ml를 가하여 reaction mixture로 하였다. 이 reaction mixture를 0°C에서 45분간 ice incubation시키고, 42°C에서 4분간 heat shock를 준 다음 0°C에서 30분간 ice incubation시켰다.

이와같이 처리한 reaction mixture에 신선한 동일배지 2.7ml를 가하여 37°C에서 100분간 gene expression 시킨후 0.1ml를 선택배지에 접종하여 transformation frequency를 산출하였다.

Tc 내성 plasmid의 전달빈도 및 전달확인시험 : Tc 내성 plasmid의 전달빈도는 Tc 및 각 균주에 대한 감수성 항생제를 첨가한 선택배지에 donor 및 recipient를 conjugation시킨 배양액 및 transformation시킨 배지 0.1ml를 접종하여 conjugant 및 transformant를 선별하여 전달빈도를 조사하였다. Tc 내성전달 여부를 확인하기 위하여 선별한 conjugant 및 transformant를 Tc 및 각 세균에 대한 감수성 항생제를 첨가한 선택배지에 접종하였다. 선택배지는 Tc 100 μ g/ml 및 Ap 150 μ g/ml, Sm100 μ g/ml 또는 NA 200 μ g/ml를 첨가한 평판배지이며 이 선택배지에서 증식한 세균을 내성이 전달된 것으로 간주하였다. Tc 내성인자의 전달확인

Table 2. Plasmid occurrence rate of *C jejuni* and *C coli* isolated from animals

Source of animals	Total (%)	Plasmid occurrence rate (%)	
		<i>C jejuni</i>	<i>C coli</i>
Cattle	15/40(37.5)	14/36(38.9)	1/4(25.0)
Pigs	40/52(76.2)	34/45(75.5)	6/7(85.7)
Chickens	11/18(61.1)	10/16(62.5)	1/2(50.0)
Total	66/110(60.0)	58/97(59.8)	8/13(61.3)

strains with plasmid/No. of strains tested

시험으로서는 donor, conjugant 및 transformant의 Tc에 대한 MIC를 측정하는 한편 plasmid를 분리하여 agarose gel 전기영동으로 plasmid 분획의 동질성을 확인하였다.

결 과

분리한 *Campylobacter*의 plasmid 보유율 : 분리한 *Campylobacter*균 중 110주에 대하여 plasmid의 보유율을 조사하기 위하여 이들 세균으로부터 plasmid를 순수분리하였다. plasmid는 110주 중 66주로부터 분리되어 60%의 보유율을 보였다. 동물 유래별로 보면 돼지 유래균은 52주 중 42주로부터 분리되어 76.2%로서 가장 높은 보유율을 보였으며, 닭 유래균 18주 중 61.1%, 소 유래균 40주 중 37.5%의 순이었다. 균종별 보유율은 *C jejuni*는 59.8%, *C coli*는 61.3%로서 거의 비슷한 보유율을 보였다(표 2).

분리한 *Campylobacter*의 plasmid 유형 : *C jejuni* 및 *C coli* 66주로부터 분리한 plasmid를 agarose-gel 전기영동으로 plasmid 유형을 조사한 결과는 표 9, 10, 11 및 12와 그림 1a, 1b 및 1c와 같다.

소유래 *C jejuni* 및 *C coli* 15주로부터 분리한 plasmid의 분자량은 0.7~86Md의 범위로 다양하였으며, 그 유형은 3.7Md과 같은 단일분획에서부터 86, 36, 33, 10 및 4, 3과 같은 5종류의 다 분획을 보유한 균도 있었다(표 3).

돼지유래 *C jejuni* 34주의 plasmid 분자량은 1.3~78Md의 범위로 다양하였고, 단일 분획에서부터 10종류의 다분획을 보유하고 있었으며, 소 및 닭 유래균주에서 보다 plasmid의 분획수가 많은 것으로 나타났다(표 4). 돼지유래 *C coli* 6주는 분자량이 1.8~48Md의 범위였으며, 단일분획에서부터 4종류의 다분획까지 보유하고 있었다(표 5).

닭 유래 *C jejuni* 및 *C coli* 11주의 plasmid는 분자

Table 3. Drug resistance patterns and patterns of *C jejuni* and *C coli* isolated from cattle

Isolates	Resistance patterns	Plasmid patterns (Md)
C 10	Ap Cep Sm Tc	70, 36
C 16	Ap Cep Sm Tc	86, 36, 33, 10, 4, 3
C 44	Ap Cep Sm Tc	44, 4, 2, 2
C 56	Ap Cep Sm Tc	38, 41, 3, 6, 0, 7
C 76	Ap Cep Sm Tc	44, 4, 8
C 85	Ap Cep Sm Tc	70, 2
C 71	Ap Ce ^d Tc	38, 4, 1, 3, 6, 0, 7
C 81	Cep Sm Tc	38, 3, 9, 3, 4
C 94	Cep Sm Tc	86, 5, 8, 2, 8
C 12*	Ap Cep	4, 2, 3, 2
C 105	Cep Na	3, 7
C 3	Cep Sm	4, 2, 2
C 98	Cep Sm	70, 3, 9, 3, 4
C 86	Cep Tc	7, 30, 35
C 43	Cep Tc	38

* *C coli*

량이 1.9~82Md의 범위로서 단일분획에서부터 4종류의 다분획을 보유하고 있었으며, 단일분획을 보유한

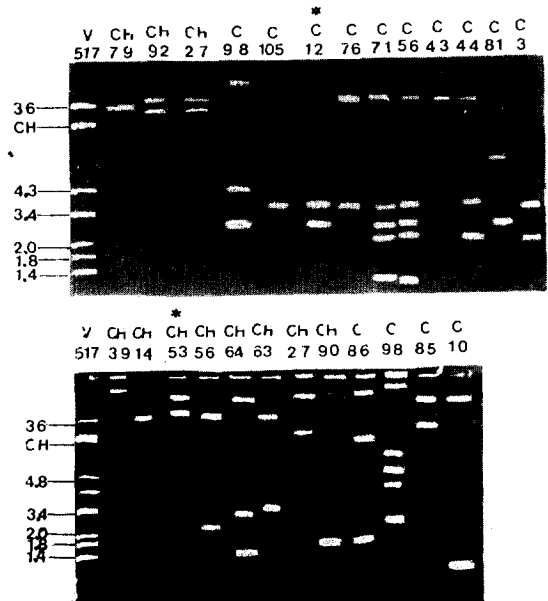


Fig 1a Agarose gel electrophoretic pattern of plasmid DNA of *C jejuni* and *C coli* isolated from cattle and chickens. V517 : MW marker.

Table 4. Drug resistance patterns and plasmid patterns of *C jejuni* isolated from pigs

Isolates	Resistance patterns	Plasmid patterns (Md)
S25	Ap Cep Sm Tc	48, 6, 3.2, 2.8, 2.6
S29	Ap Cep Sm Tc	78, 36, 4.6, 3.6, 3.4, 3.2, 2.8, 2.6, 2.1
S39	Ap Cep Sm Tc	58, 20
S44	Ap Cep Sm Tc	44, 3.4, 3.2, 2.4, 2
S45	Ap Cep Sm Tc	44, 2
S58	Ap Cep Sm Tc	58, 15
S59	Ap Cep Sm Tc	38
S60	Ap Cep Sm Tc	38, 3.2
S74	Ap Cep Sm Tc	44, 4.8, 3.2, 2
S85	Ap Cep Sm Tc	38
S98	Ap Cep Sm Tc	44, 2
S7	Ap Cep Tc	48, 38, 28, 4.6, 3.7, 2.6
S56	Ap Cep Tc	58, 30, 3.2, 2.4
S64	Ap Cep Tc	44, 25
S21	Ap Cep Sm	3.5, 2.5, 2.2
S26	Ap Cep Sm	2.8, 2.2
S53	Ap Cep Sm	2.6, 1.8
S57	Ap Cep Sm	74, 7.7
S210	Ap Cep Sm	38
S12	Cep Sm Tc	38, 27, 2.8, 2.2, 1.4
S13	Cep Sm Tc	44, 2.8
S34	Ap Cep	76, 36, 3.6, 3.2, 2.8, 2
S3	Cep Sm	1.8
S22	Cep Sm	2.4, 2.2
S41	Cep Sm	44, 3.4, 3.2, 2.4, 2
S49	Cep Sm	44
S256	Cep Sm	4.8, 2.8
S42	Cep Tc	38, 15, 2.7, 2
S43	Cep Tc	38
S89	Cep Tc	56, 3.6, 2
S10	Cep	36
S15	Cep	27, 15, 2.8
S35	Cep	14, 3.7, 2
S37	Cep	23

균주의 분포는 소 및 돼지 유래균보다 많았다(표 6).

분자량의 크기와 분획수로서는 약제내성 유형과의 관계를 구별할 수 없었으나, Tc 내성균에서는 대부분이 38~86Md을 가진 plasmid를 보유하고 있다.

Table 5. Drug resistance patterns and plasmid patterns of *C coli* isolated from pigs

Isolates	Resistance patterns	Plasmid patterns (Md)
S87	Ap Cep Sm Tc	40
S30	Ap Cep Sm	4.1, 3.4, 2.2, 1.8
S40	Ap Cep	14, 2.8, 1.9
S19	Cep Sm	48, 35, 2
S8	Cep Tc	42, 2.5, 2
S17	Cep	3.3

Table 6. Drug resistance patterns and plasmid patterns of *C jejuni* and *C coli* isolated from chickens

Isolates	Resistance patterns	Plasmid patterns (Md)
Ch27	Ap Cep Sm Tc	46, 25
Ch39	Ap Cep Sm Tc	82
Ch53*	Ap Cep Tc	58
Ch92	Ap Cep Tc	38, 25
Ch22	Cep Sm Tc	70, 4.2, 4
Ch63	Cep Sm Tc	38, 3.5
Ch64	Cep Sm Tc	44, 4.2, 2.2, 1.9
Ch14	Ap Cep	42
Ch79	Cep Tc	38
Ch56	Sm Tc	44, 3.2
Ch90	Cep	2.6

* *C coli*

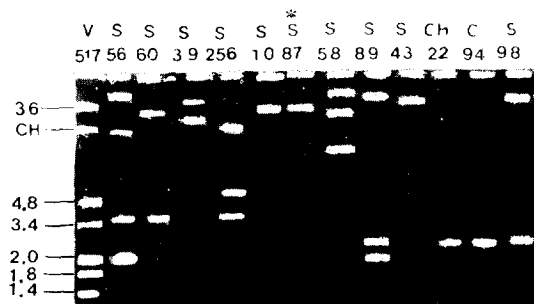


Fig 1b. Agarose gel electrophoretic pattern of plasmid DNA of *C jejuni* and *C coli* isolated from animals. V517: MW marker.

Mating방법 및 배양시간에 따른 Tc내성 전달성: Broth 및 filter mating의 방법에 의하여 Tc내성 *C jejuni* 2 주(A TCC 33251, S 43)를 donor로 하여 Tc

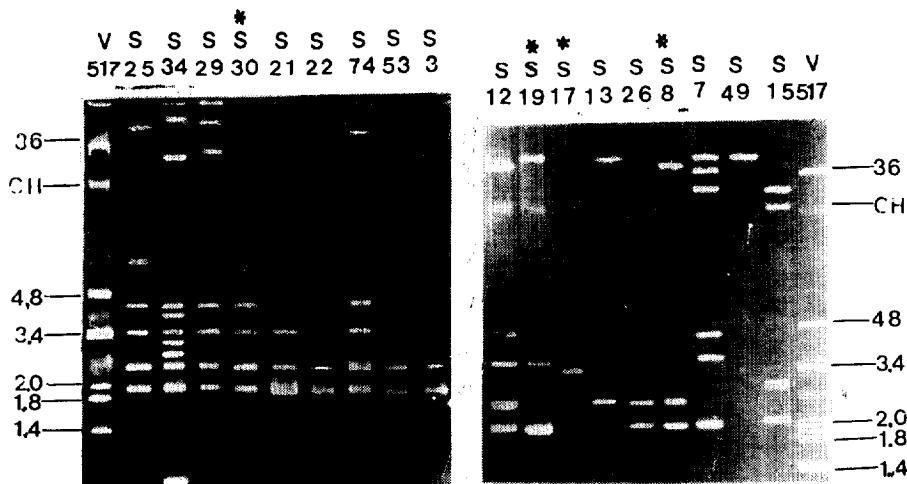


Fig 1c. Agarose gel electrophoretic pattern of plasmid DNA of *C jejuni* and *C coli* isolated from pigs. V517 : MW marker.

내성인자가 없는 *C jejuni* SD2에 전달시험한 결과 broth mating에서는 mating 후 24시간에 10^{-8} ~ 10^{-9} 빈도를 전달하였으며, 48시간 후에는 10^{-7} ~ 10^{-8} 의 빈도로 전달하였다. filter mating에서는 mating 후 48시간에 10^{-5} ~ 10^{-6} 빈도로 전달하였다.

이와같은 전달빈도는 broth mating에서 보다 filter mating이 10~1,000배로 전달빈도가 높았다(표 7).

이러한 결과로 Tc내성 전달시험은 모두 filter mating 방법으로 실시하였다.

동물 균종 및 균종간의 Tc내성 전달성 : Tc 내성인자를 보유한 분리균 *C jejuni* S43 및 Ch79, 대조균 *C jejuni* ATCC 33251을 donor로 하고, Tc 내성인자가 없는 *C jejuni* SD2 및 *C coli* 29를 recipient로 하여 filter mating법으로 conjugation에 의한 전달시험을 실시한 결과 donor와 동일균종인 *C jejuni* SD2에의 전달빈도는 10^{-4} ~ 10^{-6} 의 범위였고, *C coli* 29에는 10^{-4}

~ 10^{-5} 의 범위로 전달하였다(표 8).

Tc내성인자를 보유한 분리균 *C jejuni* S43 및 Ch79, 대조균 *C jejuni* ATCC 33251을 donor로 하고 타균종인 *Vibrio parahemolyticus* 3주(WPI, MY73-13, WP 28), *Streptococcus fecalis*, *E coli* 및 *Vibrio cholerae*를 recipient로 하여 filter mating법으로 conjugation에 의하여 전달시험을 실시한 결과는 표 9와 같다. Tc 내성전달은 *Vibrio parahemolyticus*에는 10^{-8} ~ 10^{-9} 의 낮은 빈도로 내성을 전달하였으나, *Streptococcus fecalis*, *E coli* 및 *Vibrio cholerae*에는 전달되지 않았다.

Transformation에 의한 전달성 : 분리균 *C jejuni* S43 및 대조균 *C jejuni* ATCC 33251을 donor로 하여 plasmid DNA를 분리하고 *C jejuni* SD2, *C coli* 29, *Vibrio parahemolyticus*, *Streptococcus fecalis* 및 *E coli*를 recipient로 사용하여 transformation 시험을 실시하였다.

Table 7. Intraspecies transfers of tetracycline resistance in *C jejuni* by broth and filter mating methods

Mating methods	Donors	Transfer frequency	
		24hrs	48hrs
Broth mating	ATCC33251	1.4×10^{-8}	2.1×10^{-7}
	S43	3.2×10^{-9}	1.4×10^{-8}
Filter mating	ATCC33251	4.5×10^{-7}	2.7×10^{-6}
	S43	8.7×10^{-6}	3.5×10^{-5}

Recipient : *C jejuni* SD2

Table 8. Intra and interspecies transfer of tetracycline resistance between *Campylobacter* strains

Donors (<i>C jejuni</i>)	M. Wt(Md) of plasmid	Frequency of transfer to	
		<i>C jejuni</i> SD2	<i>C coli</i> 29
ATCC33251	38	1.2×10^{-6}	2.3×10^{-5}
S43	38	3.3×10^{-5}	1.8×10^{-4}
Ch79	38	2.4×10^{-4}	1.2×10^{-4}

Table 9. Transfer of tetracycline resistance of *C jejuni* to other recipient species

Donor (<i>C jejuni</i>)	Frequency of transfer to					
	Wp1*	MY73-13*	WP28*	<i>St fecalis</i>	<i>E coli</i>	<i>V cholerae</i>
ATCC33251	1.2×10^{-9}	2.1×10^{-9}	1.4×10^{-9}	$<10^{-9}$	$<10^{-9}$	$<10^{-9}$
S43	2.3×10^{-6}	1.5×10^{-6}	1.4×10^{-8}	$<10^{-9}$	$<10^{-9}$	$<10^{-9}$
Ch79	3.2×10^{-6}	4.2×10^{-6}	2.1×10^{-9}	$<10^{-9}$	$<10^{-9}$	$<10^{-9}$

* : *Vibrio parahemolyticus*

CaCl₂ 및 plasmid DNA 첨가량, heat shock 처리 시간, ice incubation 시간 등의 조건을 달리한 실험에서도 transformation에 의하여서는 타균속 및 동일균속간으로도 Tc내성이 전달되지 않았다.

Tc 내성 전달 확인 : Donor의 Tc 내성 plasmid가 recipient로 전달하였는지 여부를 확인하기 위하여 전달 후에 conjugant를 Tc(100µg/ml) 및 각 균주에 대한 감수성 항생제를 첨가한 배지에 배양하여 Tc 내성을 전달받았음을 증명하였다. 즉 *C jejuni* S43, Ch79 및 대조균 *C jejuni* ATCC33251을 donor로 하고 *C jejuni* SD2를 recipient로 한 Tc내성 전달시험에서 내성전달 후의 conjugant는 Tc 100µg/ml와 NA200µg/ml를 첨가한 선택배지에서 증식하였다. *C jejuni* S43,

Ch79 및 대조균 *C jejuni* ATCC33251을 donor로 하고 *C coli*29를 recipient로 한 내성전달시험에서 내성전달 후의 conjugant는 Tc 100µg/ml와 Sm 100µg/ml를 첨가한 선택배지에서 증식하였다.

C jejuni S43과 Ch79 및 대조균 *C jejuni* ATCC33251을 donor로 하고 다른 균속인 *Vibrio parahemolyticus* WP 1, MY73-13 및 WP28을 recipient로한 Tc내성 전달시험에서 내성전달후의 conjugant는 Tc 100µg/ml와 Ap 150µg/ml를 첨가한 선택배지에서 증식하여 내성인자가 전달되었음을 확인하였다.

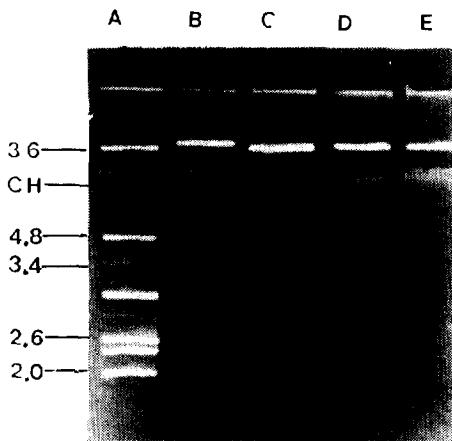


Fig 2. Agarose gel(0.7%) electrophoretic pattern of donors and conjugated *Campylobacters* plasmid DNA.

- A : *E coli* V517 MW marker
- B : *C jejuni* ATCC33251 Tc resistant DNA of *C jejuni* (donor)
- C : Conjugated plasmid DNA of *C jejuni* SD2 with *C jejuni* ATCC33251
- D : S43 isolated Tc resistant DNA of *C jejuni* (donor)
- E : Conjugated plasmid DNA of *C jejuni* SD2 with S43 isolate

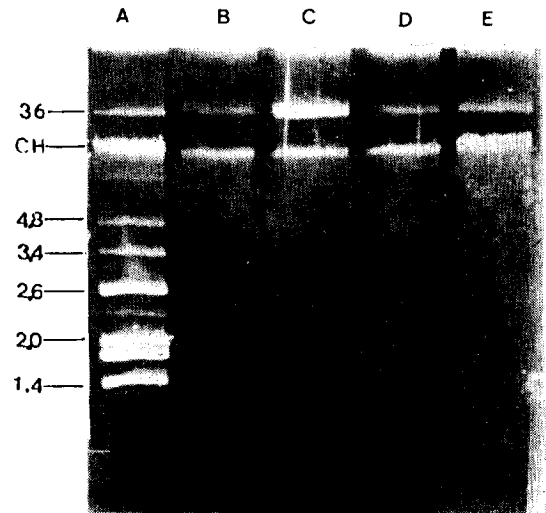


Fig 3. Agarose gel(0.7%) electrophoretic pattern of donors and conjugated *Vibrio parahemolyticus* plasmid DNA.

- A : *E coli* V517, MW marker
- B : Tc resistant plasmid DNA of donor *C jejuni*(Ch29)
- C : Conjugated plasmid DNA of *V parahemolyticus* WP1 with *C jejuni* Ch79 isolate
- D : Tc resistant plasmid DNA of donor *C jejuni*(S43)
- E : Conjugated plasmid DNA of *V parahemolyticus* WP28 with *C jejuni* S43 isolate

Tc 내성을 전달받은 균의 plasmid를 분리하여 전기영동을 실시한 결과 conjugant로부터 donor가 보유하고 있었던 38Md의 plasmid가 분리되었으므로 Tc 내성이 전달되었음은 확인하였다(그림 2, 3).

고 찰

Plasmid의 분리 결정 : 본 시험에서는 동물에서 분리한 *C jejuni* 및 *C coli* 110균주 중 66주의 균으로부터 plasmid를 분리하였다. 분리율은 돼지 유래균이 76.2%로 가장 높았고, 닭 61.1% 및 소 37.5%의 순이었으며, 균종별로는 *C jejuni*가 59.8%, *C coli*가 61.3%이었다.

Campylobacter 속균의 plasmid 보유율에 관하여는 Austin과 Trust¹⁴가 사람 및 환경 유래균의 plasmid 보유율은 19%로서 분자량의 크기는 5~77Md의 범위라고 보고한 것이 처음이다.

*C jejuni*의 plasmid 보유율에 관하여 Tenover et al¹⁷은 사람과 동물로부터 분리한 균에서 32%, Bopp 등¹⁵이 환자 유래균은 57.5%, Bradbury와 Munroe²⁴는 돼지 등의 동물 유래균은 53.8%로 보고한 것과 비교하면 본 실험에서의 60%보다는 약간 낮다. 그러나 Bradbury와 Munroe²⁴가 건강한 돼지 유래균 73.8%, 닭 유래균 75.8%, 소 유래균은 31.2%라고 하는 성적과는 비슷한 경향이었다(표 2).

약제내성을 나타내는 *C jejuni* 58주 및 *C coli* 6주로부터 plasmid를 분리하여 그 분자량을 측정 한 결과 *C jejuni*의 plasmid는 단일 분획으로부터 다분획까지 다양하게 나타났으며, 분자량은 소 유래균의 plasmid는 0.7~86Md. 돼지 유래균은 1.3~78Md. 닭 유래균은 1.9~82Md의 범위였다(표 3, 4, 5 및 6과 그림 1a, 1b, 및 1c).

Bradbury 등¹⁸은 *Campylobacter*의 plasmid 유형 조사에서 plasmid 보유율은 33%이었으며, 분자량은 1.6~70Md의 범위로서 대부분의 균주가 2~6종의 plasmid를 보유하고 있다고 하였다. 이와 같은 plasmid의 유형은 혈청학적으로 동정하기 어려운 균주를 plasmid의 특성으로서 형별하는데 적용할 수 있다고 하였다. Tenover 등¹⁷은 사람과 동물 유래균의 plasmid 분자량은 2~162Kb의 범위라고 하였으며, 그 중 Tc 내성균의 plasmid는 42~100Kb의 범위라 하였다. Bopp 등¹⁵에 의하면 환자로부터 유래한 균주에서 37Md의 plasmid를 보유한 균주는 모두가 Tc 내성균이었다고 하였다. Bradbury와 Munroe²⁴는 돼지, 소 및 닭 유래균으로부터 분리한 plasmid의 분자량은 1~86Md의 범위로 다양하고 plasmid를 보유한 균은 보유하지 않은

균보다 Ap, Tc 및 Gm에 대하여는 내성율이 높았다. 특히 닭에서 유래한 균이 보유한 plasmid는 분자량이 30~39Md의 범위로서 Tc내성과 관련된다고 하였다. Tc내성 plasmid의 크기에 관하여 Taylor 등¹⁸은 42~49Kb의 범위로, Tenover 등²¹ Taylor 등²⁰ 및 Bopp 등¹⁵은 38Md으로 보고 하였으나, Tenover,¹⁷은 42~100Kb의 범위라고 하였다.

본 실험에서 항생제에 대한 내성균주가 보유한 plasmid의 유형을 조사한 결과 Tc내성균주는 대부분이 38~86Md 범위의 plasmid를 보유하고 있었으며, 38Md의 plasmid를 보유한 것만도 36.4%이었다. 그러므로 이것은 이들 연구자들에 의한 Tc 내성 plasmid 크기의 범위에 해당하였다. 항생제별 내성인자를 plasmid의 크기와 관련시켜 구별하기에는 어려우나 Tc 내성 plasmid의 크기에 관하여는 38Md 내외라는 것이 증명되어 있다. 그러나 그 이상의 크기를 가지고 있는 것도 보고되어 있다.^{15,17}

약제내성 전달 : Tc 내성 전달시험에서 plasmid의 선정은 Tc 내성 plasmid의 크기가 38~86Md의 범위라는 것을 고려하여 38Md 이상의 plasmid를 보유한 균주 중에서 38Md의 단일 분획만을 보유한 균주를 donor균으로 선택하였다.

Conjugation에 의한 filter mating법과 broth mating법으로 *C jejuni*의 약제 내성전달 효과를 알고자 Tc 내성 plasmid를 보유한 *C jejuni*를 donor로 하고 Tc 감수성의 plasmid가 없는 *C jejuni*를 recipient로 하여 전달시험을 실시한 결과 Tc 내성 plasmid의 전달은 filter mating법이 broth mating법에서 보다는 높은 빈도로 전달하였다. 이것은 Taylo 등¹⁸이 filter mating법이 전달성이 높았다고 하는 성적과 같았다.

Tc 내성 전달확인 시험에서 전달후의 conjugant는 donor의 Tc에 대한 MIC 100 μ g/ml와 같은 정도의 Tc 내성을 발현하였으며, Tc 내성이 전달된 세균의 plasmid를 분리하여 전기영동을 실시한 결과에서도 conjugant로부터 donor가 보유하고 있었던 38Md의 plasmid가 검출됨으로써 Tc 내성을 전달하였다는 것을 확인할 수 있었다. *C jejuni*가 보유한 Tc 내성 plasmid의 전달가능성을 규명하기 위하여 *Campylobacter* 속균 간 또는 다른 균종간에 conjugation에 의한 filter mating법으로 전달시험을 실시한 결과 *C jejuni*와 *C jejuni*간에는 10⁻⁴~10⁻⁶의 빈도로, *C jejuni*와 *C coli*간에는 10⁻⁴~10⁻⁵의 빈도로 내성을 전달하여 동일 균속간에는 전달빈도의 차이가 없었다(표 7 및 8).

이와 같은 결과는 Tenover 등¹⁷이 Tc내성 plasmid의 분자량이 42~100Kb의 것을 conjugation에 의한

결론

전달시험을 실시한 결과에서 $10^{-4} \sim 10^{-3}$ 의 빈도로 전달하였다는 것과, Kotarski 등²⁵이 개에서 분리한 Tc 및 Km 내성주의 plasmid가 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 의 빈도로 전달되었다는 성적과 유사하며, Taylor 등¹⁸이 *C jejuni*와 *C fetus*간에는 내성전달 빈도의 차이가 없었다고 하는 성적과도 비슷하다.

Tc 내성 plasmid를 보유한 *C jejuni*와 균속이 다른 *Vibrio parahemolyticus*, *V cholerae*, *E coli* 및 *Streptococcus fecalis*간의 전달시험을 실시한 결과 *V parahemolyticus*에는 $10^{-8} \sim 10^{-9}$ 의 낮은 빈도로 전달하였으나 다른 균속에는 전달하지 않았다(표 9).

Taylor 등¹⁸에 의하면 *C jejuni*의 Tc 내성 plasmid는 conjugation 및 transformation으로서 *E coli*에 전달하지 못하며, Taylor 등²⁰은 hybridization에 의하여 *C jejuni*와 *E coli*간에는 Tc 내성 결정기에 동질성이 없기 때문에 Tc 내성 plasmid는 전달하지 못한다고 하였다. 그러나 Taylor 등²²은 *C jejuni*의 Tc 내성 결정기와 *Streptococcus M* 결정기는 endonuclease Hind III, Hinc II 및 Acc I의 인지부위가 같은 곳이 있음을 확인하였다. Lambert 등²⁶은 hybridization에 의하여 다제내성 *C coli* (BM2509)의 plasmid pIP1433 *Streptococcus* plasmid M의 endonuclease에 대한 결정기간에는 동질성이 있으며, *Streptococcus*의 Km내성 plasmid는 염색체 DNA로 translocation할 수 있다는 것을 증명하였다. 이 결과에 따라 *C jejuni*에서의 Km내성균의 출현은 gram 양성균의 plasmid 혹은 염색체 DNA 유전인자의 접촉에 의한다고 하였다. *C jejuni*의 Tc 내성 plasmid를 primer plasmid(cosmid vector pIP)와 hybridization시켜 *E coli*에 cloning함으로써 Tc내성을 발현하였다고 한다. 그러나 *Campylobacter*의 plasmid는 다른 gram 음성 균내에서는 복제나 유지가 잘 되지 않기 때문에 이들 세균은 Tc plasmid 전달시험에서 recipient로 사용하기에는 좋지 않은 것으로 생각하였다.

이상과 같은 성적으로 마무어 일반적으로 *C jejuni*의 Tc 내성 plasmid는 다른 균속으로 전달하지 못한다는 것을 증명하였다.^{17,18} 그러나 본 실험에서는 균속이 다른 *V parahemolyticus*에도 낮은 빈도로 Tc 내성 plasmid의 전달이 가능하였다. 그 이용로서는 *Vibrio* 속균의 균체성분 및 생화학적 특성이 *Campylobacter*와 유사한 점이 많고 *V parahemolyticus*는 *C jejuni*와 같이 42°C의 미호기성 조건에서 잘 증식하는 등의 공통적인 특성을 들 수 있으나 구체적인 기전에 관하여는 더 추시하여야 할 것으로 생각한다.

Transformation에 의한 *C jejuni*의 약제내성 전달 가능성을 규명하기 위하여 Tc 내성 plasmid를 보유한 *C jejuni*를 donor로 하여 plasmid DNA를 분리하고, Tc 감수성의 plasmid가 없는 동일균속 및 타균속으로 transformation 시험을 실시한 결과 Tc 내성이 전달되지 않았다. 이러한 결과는 Taylor 등²⁰이 *C jejuni*의 Tc 내성전달은 cell to cell contact에 의하여 transformation 범으로는 전달되지 않는다고 한 성적과 일치하였다.

1. 분리한 *C jejuni* 및 *C coli*의 plasmid 보유율은 약 60%이었으며, 세균 유래별로는 돼지 유래 세균 76.2%, 닭 유래 세균 61.6% 및 한우 유래 세균 37.7%의 순으로 plasmid를 보유하고 있었다. 각 plasmid의 분자량은 1~86Md으로 다양하였으나, tetracycline 내성균주에서는 분자량 36~86Md의 비교적 큰 plasmid를 보유하고 있었다.

2. Filter mating법과 broth mating법을 이용하여 tetracycline내성 plasmid의 전달빈도를 비교한 결과 filter mating에 의한 것이 전달빈도가 다소 높았으며, mating 시간은 24시간 보다 48시간 처리한 것이 전달율이 높았다.

3. Tetracycline내성 *C jejuni*를 donor로 하여 동일 균종 및 타균종간에 conjugation에 의한 plasmid의 전달시험에서 *C jejuni*에는 $10^{-4} \sim 10^{-6}$ 의 빈도로, *C coli*에는 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 의 빈도로 tetracycline 내성을 전달하였으며, *Vibrio parahemolyticus*에는 $10^{-6} \sim 10^{-9}$ 정도의 낮은 빈도로 tetracycline 내성을 전달하였다. 그러나 *Streptococcus fecalis*, *E coli*, *Vibrio cholerae* 등은 내성을 전달하지 못하였다.

4. Tetracycline 내성 *C jejuni*를 donor로 하여 동일균종 및 타균종간에 transformation에 의한 plasmid 전달시험에서, 타균종 및 동일균종간으로도 tetracycline 내성을 전달하지 못하였다.

참고 문헌

1. McFadyean J, Stockman S. Abortion in sheep. In report of the departmental committee appointed by the board of agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion. Appendix V part 3rd 7157, XII Board of Agriculture and Fisheries, London, 1913;101~137.
2. Levy A J. A gastroenteritis outbreak probably due to a bovine strain of *Vibrio*. *Yale J Biol*

- Med* 1946;18:243~258.
3. King EO. Human infection with *vibrio fetus* and a closely related *Vibrio*. *J Infect Dis* 1957; 101:119~128.
 4. Veron M, Chatelain R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Veron and designation of the neotype strain for species, *Campylobacter fetus*(Smith and Taylor) Sebald and Veron. *J Syst Bacteriol* 1973;23:124~134.
 5. Simbert RM. *Campylobacter* in *Bergey's manual of determinative bacteriology* 8th ed. Baltimore: Williams & Willkins, 1974;207.
 6. Butzler JP. *Campylobacter infection in man and animal*. Boca Raton Florida: CRC press, 1984; 1~246.
 7. Benjamin JS, Leaper S, Owen RJ, et al. Description of *Campylobacter laridis*, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter*(NARTC) group. *Current Microbiol* 1983;8:231~238.
 8. Krakowka S, Morgan DR, Kraft WG, et al. Establishment of gastric *Campylobacter pylori* infection in the neonatal gnotobiotic piglet. *Infect Immun* 1987;55:2786~2796.
 9. Gebhart CJ, Ward GE, Chang K, et al. *Campylobacter hyointestinalis* (new species) isolated from swine with lesions of proliferative ileitis. *Am J Vet Res* 1983;44:361~367.
 10. Neill SD, Campbell JN, O'Brien JJ, et al. Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp Nov *Int J Syst Bacteriol* 1985;35: 342~356.
 11. Roop RM II, Simbert RM, Johnson JL, et al. *Campylobacter mucosalis*(Lawsonn, Leaver, Pettigrew, and Rowland 1981) comb nov: Emended description. *Int J Syst Bacteriol* 1985;35:189~192.
 12. Tanner ACR. Characterization of *Wolinella* spp, *Campylobacter concisus*, *Bacteroides gracilis* and *Eikenella corrodens* by polyacrylamide gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1986;24:562~565.
 13. Totten PA, Fennel CL, Tenover FC, et al. *Campylobacter cinaedi* (spp nov.) and *Campylobacter fenlliae* (spp nov): Two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual man. *J Infect Dis* 1985;151:131~139.
 14. Austin RA, Trust TJ. Detection of plasmids in the related group of the genus *Campylobacter* *FEMS Microbiol lett* 1980;8:201~204.
 15. Bopp CA, Birkness KA, Wachsuth IK, et al. In vitro antimicrobial susceptibility, plasmid analysis, and serotyping of epidemic associated *Campylobacter jejuni* *J Clin Microbiol* 1985; 21:4~7.
 16. Mnnroe DL, Prescott JF, Penner JL. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* serotypes isolated from chickens, cattle and pigs. *J Clin Microbiol* 1983;18:877~881.
 17. Tenover FC, Williams S, Gordon KP, et al. Survey of plasmid and resistance factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chmother* 1985;27:37~41.
 18. Taylor DE, De Grandis S, Kamali MA, et al. Transmissible plasmids from *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981;19: 831~835.
 19. Bradbury WC, Marko MA, Hennessy JN, et al. Occurrence of plasmid DNA in serologically defined strains of *Campylobacter coli*. *Infect Immun* 1983;40:460~463.
 20. Taylor DE, Garner RS, Allan BJ. Characterization of tetracycline resistance plasmid from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;24:930~935.
 21. Tenover FC, Bronsdon MA, Cordon KP, et al. Isolation of plasmids encoding tetracycline resistance from *Campylobacter jejuni* strains isolated from simians. *Antimicrob Agents Chemother* 1983;23:320~322.
 22. Taylor DE. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Campylobacter jejuni*: Expression in *Escherichia coli* and identification of homology with streptococcal class M determinant. *J Bacteriol* 1968;1037~1039.
 23. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* 1979;7:1513~1523.

24. Bradbury WC, Munroe DL. Occurrence of plasmid and antibiotic resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy and diarrheic animal. *J Clin Microbiol* 1983;22:339~346.
25. Kotlarski SF, Merriwenether TL, Tkalcevic BT, et al. Genetic studies of kanamycin resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:225~230.
26. Lambert T, Gebraud G, Tricu-cuot P, et al. Structure relationship between the gene encoding 3-aminoglycoside phosphotransferase in *Campylobacter* and in gram positive cocci. *Ann Inst Pauster(Paris)* 1985;136:136~150.