

동물에서 분리된 *Salmonella*균의 병원성 관련 Plasmid에 관한 연구

최 원 필·정 석 찬
경북대학교 수의과대학
(1992년 2월 13일 접수)

Virulence-associated plasmids of *Salmonella* spp. isolated from animals in Korea

Won-pil Choi, Suk-chan Jung
College of Veterinary Medicine, Kyungbuk National University
(Received Feb 13, 1992)

Abstract : This paper dealt with plasmid DNA profile in 98 *Salmonella*(S) isolated from pigs and cattle sources in Taegu, Gyeongbook and Gyeongnam during the period from 1984 to 1987. Also we were studied for restriction enzyme analysis of the plasmid DNA, and mouse infection, Sereny test and normal serum resistance test in guinea pig for *S. typhimurium* and *S. enteritidis* harbored or cured 60 megadalton(Md) plasmid and 36 Md plasmid, respectively.

Of the 13 *Salmonella* isolated from cattle, 7 *Salmonella* harbored one or more plasmids and molecular sizes of the large plasmids were 60 Md for *S. typhimurium* and 36 Md for *S. enteritidis*.

Of the 85 *Salmonella* isolated from pigs, 47 *Salmonella* were confirmed as being one or more plasmids, and all the *S. typhimurium* stains harbored 60 Md plasmid.

In enzyme digestion with 8 types of restriction endonuclease for 60 Md plasmid DNA of *S. typhimurium*, cleavage patterns were varied to enzymes, and the DNA was segmented into 4 to 15 fragments.

In restriction enzyme analysis of 36 Md plasmid DNA obtained from four strains of *S. enteritidis*, the DNA showed the same cleavage patterns obtained with Eco RI, Hind III and Bam H I, and was segmented into 3 to 5 fragments.

In virulence for mice by measuring the 50% lethal dose (LD₅₀), the LD₅₀ values obtained for 60 Md virulence-associated plasmid harbored strains of *S. typhimurium* and 36 Md virulence-associated plasmid of *S. enteritidis* were up to 10⁴-fold lower than the values obtained for the plasmid-cured strains of the same serotype. Only the plasmid harbored strains were resistant to the bactericidal activity of 90% guinea pig serum, and only they gave positive responses in sereny test. We suggested that their plasmid DNA might be associated with virulence for mice.

Key words : *Salmonella*, plasmids, pathogenicity.

서 론

Salmonella(S) 속균은 주요 혈청형이 현재 100여종이

알려져 있으며 사람 및 동물에서 식중독, 급성 위장염, 패혈증 등을 일으키는 원인균이고 각종 동물의 분변과 육, 우유 및 유제품 등의 식품으로부터 흔히 분리되고

* 이 논문은 1990년도 문교부지원 학술진흥재단의 지방대학 육성연구비에 의하여 연구되었음.

있어서 본균 감염증의 역학상황은 증대한 관심사가 되어왔다. 특히 동물은 사람의 주요 감염원이 되고 있어서 공중위생학적인 측면에서도 매우 중요시되고 있다.¹
~5

Salmonella 감염증의 역학상황을 분석함에 있어서 혈청형, 생물형, phage형 및 약제내성형 등의 혈청학적 및 생화학적 성상이 조사되어져 왔으나^{5~9} 근년에 와서는 plasmid DNA를 분리하여 이들의 전기영동 양상과 제한효소 처리에 의한 DNA의 절단양상 등을 분석하여 분자생물학적 특성에 따라 역학관계를 규명하고 있는 경향이다.^{10~15}

최근 여러 연구자들에 의해 *Salmonella* 속균, *Escherichia coli*, *Yersinia* 속균 및 *Shigella* 속균 등 여러 장내세균에서 약제내성 뿐만 아니라 장 침입능, 독소 산생능이 plasmid DNA의 유전정보에 의한다고 알려져 있다.^{16~25}

특히 *Salmonella* 속균의 병원성 관련 plasmid에 관한 연구에서는 *S typhimurium*의 60 megadalton(Md) plasmid, *S enteritidis*의 36 Md plasmid, *S dublin*의 50 Md plasmid 보유 유무와 마우스에 대한 병원성과 관계가 있음이 인정되고 있다.^{10, 26~31}

한편 우리나라에서는 최 등^{5, 9, 15}이 소 및 돼지에서 분리한 *Salmonella* 속균의 혈청형 동정과 plasmid profile에 관하여 보고한 바 있고 또한 large plasmid가 병원성과 관련이 있을 것으로 시사한 바 있으나 이들 plasmid DNA의 병원성에 관한 유전학적 및 분자생물학적 연구에는 미치지 못하고 있는 실정이다. 따라서 이 실험에서는 소 및 돼지에서 분리한 *Salmonella* 속균 유래 plasmid DNA의 profile, 제한효소 처리에 의한 보다 세밀한 DNA의 분절양상을 분석하고 혈청 저항성, sereny시험 및 마우스 감염시험을 실시하여 plasmid와 병원성의 상호관계를 규명함으로써 이들 감염증의 예방 및 치료를 위한 역학적 연구와 유전공학의 기초자료에 기여코자 한다.

재료 및 방법

공시균주: 본 실험에 사용한 균주는 1984년부터 1987년까지 대구, 경북 및 경남지역의 소 및 돼지로부터 분리 동정한 *S typhimurium* 15주, *S enteritidis* 5주, *S derby* 30주, *S infantis* 18주, *S anatum* 1주, *S montevideo* 1주, *S bareilly* 6주, *S bredney* 8주, *S paratyphi* B 6주, *S thompson* 4주 및 *S senftenberg* 4주 등이며 이들 균의 혈청형, 약제내성 양상 및 전달성 plasmid는 최 등^{5, 9}에 의해 이미 보고된 바 있다.

생화학적 및 혈청학적 검사: *Salmonella* 속균의 성상확

인시험은 Ewing¹의 방법에 따라 생화학적 성상검사와 균체(O) 편도(H) 인자혈청을 사용하여 slide 및 tube 응집반응을 실시하였다.

Plasmid DNA 분리: plasmid DNA의 profile를 조사하기 위하여 Maniatis 등³²의 Alkaline lysis 방법으로 plasmid를 분리하였다. 각 균주를 luria bertani(LB) broth 5ml로 37°C, 1야 진탕 배양하여 15,000rpm으로 5분간 원심분리한후 침전된 균체를 GET용액(50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris-Cl, pH 8.0), 4mg Lysozyme, 200 μ l Lysing solution(0.2N NaOH, 1% sodium dodecyl sulfate), 150 μ l potassium acetate 용액(5M potassium acetate, glacial acetic acid, pH 4.8)을 차례로 가하고 원심분리하여 상청액과 동량의 phenol/chloroform으로 처리, 원심분리하였다. 원심상청액에 2배량의 ethanol을 가하고 -70°C에서 정치한후 원심침전하여 전기영동의 재료로 사용하였다.

전기영동: 분리된 plasmid DNA의 전기영동은 agarose를 TBE용액(0.089M Tris-HCl, 0.89M boric acid, 2.5mM EDTA, pH 7.2)으로 0.7%로 만든 gel에서 80~100V, 3시간 내지 4시간 전개하였으며 전개가 끝난 gel은 ethidium bromide(0.5 μ g/ml)로 염색한후 자외선 조사하에서 확인하고 poraroid type 667 film으로 사진촬영하였다.

Electroelusion: 전기영동후 자외선 illuminator상에서 DNA band를 확인하고 원하는 DNA band를 절단한 다음, gel 절편을 dialysis bag에 넣고 0.5X TBE buffer로 채운후 100V에서 약 3시간 전기영동을 실시하여 2분간 역전압을 가한 다음 buffer를 회수하였다. gel로부터 회수된 DNA용액은 plasmid DNA 분리방법에서와 같이 phenol을 처리하고 ethanol로 침전시킨후 TE buffer에 plasmid DNA를 녹여 제한효소 처리재료로 사용하였다.

제한효소 처리: 제한효소는 BamH I, Bgl II, EcoR I, Hind III, Hha I, Bal I, Sal I 및 Pst I (Bethesda Research Laboratories, Inc.)등을 사용하였고, 반응조건은 공급회사의 사용지침에 따라 실시하였다.

Plasmid curing: plasmid curing은 Jones 등의 방법³³에 따라 60 Md plasmid 보유 *S typhimurium* 및 36 Md보유 *S enteritidis* 균주에 대해 ethidium bromide 또는 novobiocin 등을 처리하여 plasmid curing 균주를 선별하였다.

마우스 감염시험: *S typhimurium* 및 *S enteritidis* 균주의 큰 plasmid 보유 유무와 마우스에 대한 병원성의 상호관계를 조사하기 위하여 Helmuth 등의 방법¹⁰에 준하여 마우스 감염시험을 실시하였다. 60 Md plasmid 보유 *S typhimurium* 및 36 Md 보유 *S enteritidis* 균주와 plasmid curing

균주를 각각 TSB 배지에 37°C, 1야 진탕 배양하여 원심침전후 0.85% NaCl로 10²~10⁹배로 희석시켜 구강으로 접종하고 4주간 관찰하면서 LD₅₀을 측정하였다.

Sereny 시험 : *S typhimurium* 및 *S enteritidis* 균주와 plasmid curing 균주의 마우스에 대한 sereny 시험은 Helmuth 등의 방법¹⁰에 따라 각 균주를 37°C에서 1야 배양후 5일 이내에 각 결막염 발생유무로서 판정하였다.

혈청 저항성 검사 : 혈청 저항성 검사는 Helmuth 등의 방법¹⁰에 따라 기니피그의 혈청을 분리하여 응집되지 않음을 확인한 다음 여과하여 사용하였다. 공시균주를 LB broth에 37°C, 1야 배양하여 PBS(phosphate buffered saline) 용액으로 1,000배 희석한 다음 희석균액 0.1ml와 혈청 0.9ml를 혼합한후 37°C에서 배양하여 3시간제에 적당량을 취하여 계단희석하고, LB평판배지에 도말배양하였다. 판정은 배양후 0시간의 혼합균액의 집락수를 기준으로 3시간에서의 집락수를 비교하여 백분율로 환산하였으며 그 수치가 100이상일때 혈청저항성으로 판정하였다.

결 과

1984년부터 1987년까지 돼지 및 소로부터 분리된 *Salmonella* 속균 98주에 대해 IMViC, phenylalanine deaminase, KCN, malonate, gelatin, H₂S 및 motility 시험과 maltose, sucrose, mannitol, glucose, dulcitol, inositol, salicin, rhamnose, adonitol, trehalose 분해능 등의 성상검사를 실시하여 *Salmonella* 속균임을 확인하였고 또한 O 및 H 인자 혈청을 이용하여 *Salmonella* 혈청형을 확인하였다.

돼지 및 소 유래 *Salmonella* 속균 98주에 대하여 plasmid의 보유상황을 조사하기 위하여 plasmid를 분리 및 전기영동을 실시한 결과는 Table 1과 같다. 소 유래 *Salmonella* 속균의 plasmid 보유상황을 보면 *S typhimurium* 등 6종의 13균주중 7주에서 1개 이상의 plasmid를 보유하고 있었고, *S typhimurium*은 병원성과 관련이 있을 것으로 추측되는 약 60 Md의 큰 plasmid를 보유하고 있었다(Fig 1). *S enteritidis* 5주중 4주가 약 36 Md의 큰 plasmid를 보유하고 있었으며 *S derby* 3주중 1주가 약 2.7 Md의 plasmid를, *S monteideo* 1주가 약 70 Md의 plasmid를 보유하고 있었다. *S infantis* 2주 및 *S anatum* 1주는 plasmid를 관찰할 수 없었다.

돼지 유래 *Salmonella* 속균의 plasmid 보유상황은 *S typhimurium* 등 8종의 85균주중 47주가 1개 이상의 plasmid를 보유하고 있었고, *S typhimurium* 14주 전 주가 약 60 Md의 큰 plasmid를 공통적으로 보유하고 있었으며, 2주는 약 10 및 2.5 Md의 plasmid를 보유하고 있었다(Fig 2).

1 2 3 4 5 6 7 8

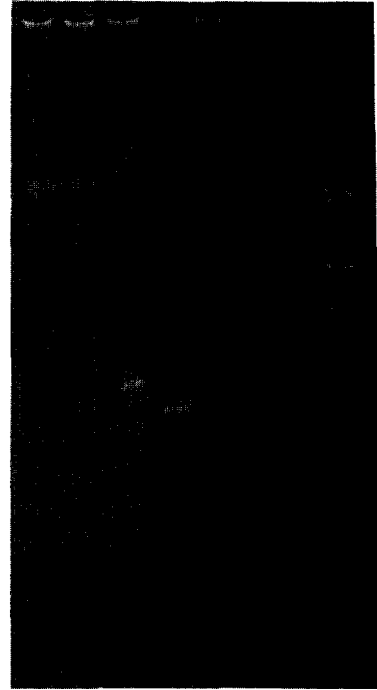


Fig 1. Plasmid profile of *Salmonella* isolated from cattle. Lanes : 1, *S typhimurium*; 2, *S monteideo*; 3, *S enteritidis*; 4, *S derby*; 5 through 7, *S enteritidis*; 8, λ DNA/Hind III

Table 1. Distribution of plasmid DNA in *Salmonella* isolated from swine and cattle

Source	Salmonella species	Mass of plasmid(Md)	No. of strains (No. of plasmid content strain)
Cattle	<i>S typhimurium</i>	60	1(1)
	<i>S enteritidis</i>	36	5(4)
	<i>S derby</i>	2.7	3(1)
	<i>S monteideo</i>	70	1(1)
	<i>S infantis</i>	-	2(0)
	<i>S anatum</i>	-	1(0)
	Subtotal		
Swine	<i>S typhimurium</i>	60, 10, 2.5	14(14)
	<i>S derby</i>	50, 2.7, 1.0	27(20)
	<i>S breadney</i>	2.5, 0.8	8(8)
	<i>S paratyphi B</i>	2.5	6(3)
	<i>S thompson</i>	2.5	4(2)
	<i>S infantis</i>	-	16(0)
	<i>S bareilly</i>	-	6(0)
	<i>S senftenberg</i>	-	4(0)
	Subtotal		
Total			98(54)

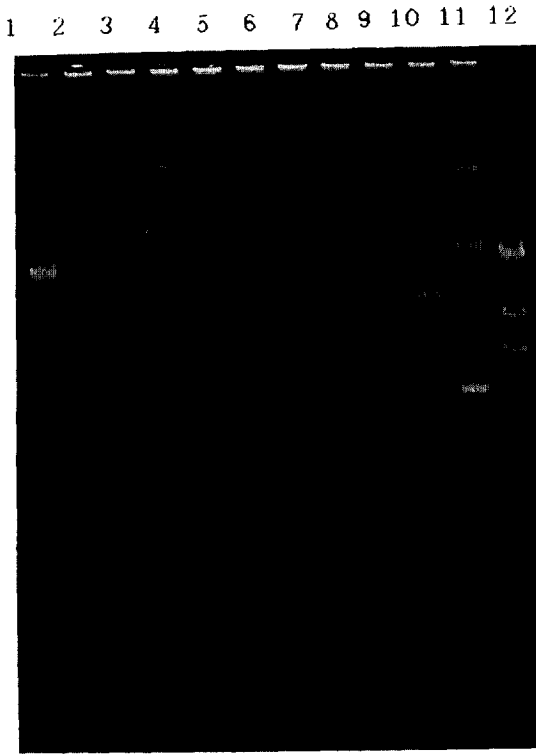


Fig 2. Plasmid profile of *Salmonella typhimurium* isolated from swine.
Lanes : 1 through 11, *S typhimurium*; 12, λ DNA/Hind III.

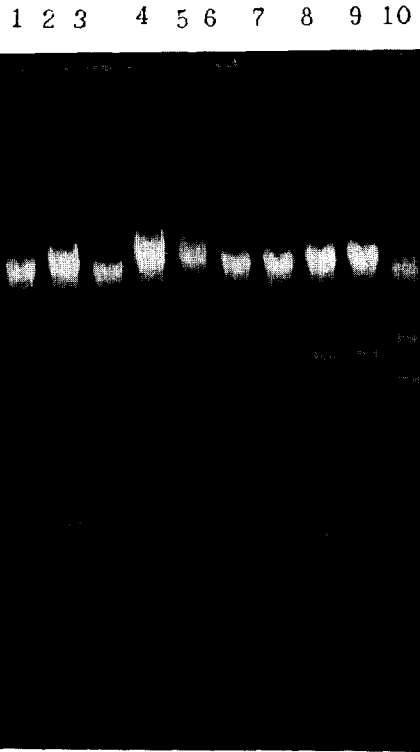


Fig 3. Plasmid profile of *Salmonella derby* isolated from swine.
Lanes : 1 through 9, *S derby*; 10, λ DNA/Hind III.

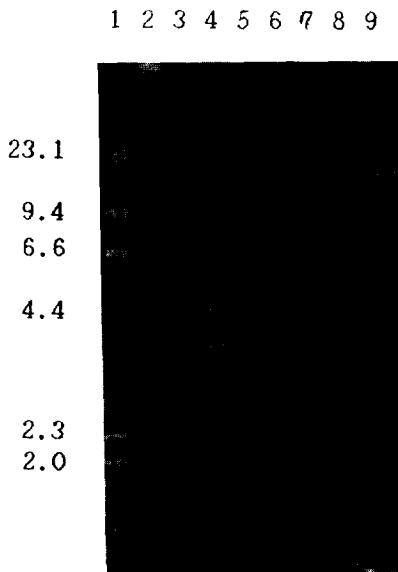


Fig 4. Restriction analysis of 60 Md plasmid DNA from *Salmonella typhimurium*.
Lane : 1, DNA/Hind III; 2, 60 Md plasmid; 3, BamH I; 4, Bal I; 5, EcoR I; 6, Hha I; 7, Hind III; 8, Pst I; 9, Sal I.

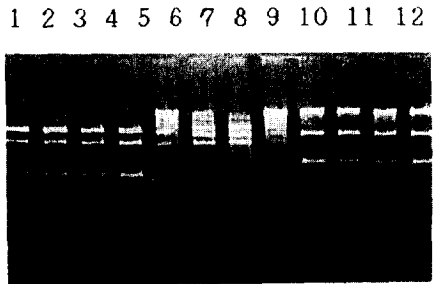


Fig 5. Restriction analysis of 36 Md plasmid DNA from *Salmonella enteritidis*.
Lane : 1, through 4, EcoR I; 5 through 8, Hing III; 9 through 12, BamH I.

Table 2. Virulence properties of plasmid-carrying and plasmid-free *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* for mouse

Serotype	Plasmid size (Md)	LD ₅₀ (CFU/ml)	Sereny test *	% resistance in 90% serum
<i>S typhi-</i>	60	10 ⁴	++	160
<i>murium</i>	-	>10 ⁸	+	<1
<i>S enteritidis</i>	36	10 ⁵	++	250
	-	>10 ⁹	-	<1

* : -, no reaction; +, inflammation; ++, keratoconjunctivitis

*S. derby*는 27균주중 20균주가 약 50, 2.7 또는 1.0 Md 이하의 plasmid를 보유하고 있었고 plasmid 양상은 3가지 형태로 나타났다(Fig 3).

S. bredney 8주는 2.5 및 0.8 Md의 plasmid를, *S. paratyphi* B 6주중 3주와 *S. thompson* 4주중 2주는 약 2.5 Md의 plasmid를 보유하고 있었다. *S. infantis* 16주, *S. bareilly* 6주 및 *S. senftenberg* 4주 등은 plasmid를 전혀 관찰할 수 없었다.

한편 *S. typhimurium*의 약 60 Md 및 *S. enteritidis*의 약 36 Md plasmid에 대해서는 전기영동후 electroelution을 실시하여 제한효소 처리에 의한 DNA 분절양상은 Fig 4 및 Fig 5와 같다. *S. typhimurium*의 60 Md plasmid DNA에 대한 제한효소처리에서 BamH I에서는 4개 이상 분절되었고, Bal I에서는 15개 이상, EcoR I에서는 6개 이상, Hha I에서는 4개 이상, Hind III에서는 9개 이상, Pst I에서는 13개 이상, Sal I에서는 9개 이상으로 다양한 DNA 분절양상을 나타내었다.

*S. enteritidis*의 36 Md plasmid에 대한 제한효소처리에서 EcoR I에서는 4개 이상의 분절, Hind III에서는 5개 이상, BamH I에서는 3개 이상의 분절로 나타났으며 균주간의 DNA분절 양상의 차이는 인정되지 않았다(Fig 5).

*S. typhimurium*의 60 Md plasmid 및 *S. enteritidis*의 36 Md plasmid 보유 유무와 병원성과의 상호관계를 규명하기 위하여 이들 plasmid 보유균주와 plasmid curing균주에 대해 마우스 감염시험, sereny시험 및 기니피그 혈청 저항 검사를 실시한 결과는 Table 2와 같다. 60 Md plasmid 보유 *S. typhimurium* 및 36 Md 보유 *S. enteritidis* 균주는 마우스 구강점접시 LD₅₀은 각각 10⁴CFU/ml 및 10⁵CFU/ml이었으나 plasmid curing 균주는 각 10⁸CFU/ml 및 10⁹CFU/ml 이상이었다. 또한 plasmid 보유균주는 sereny시험에서 각결막염이 인정되었고, 혈청 저항성이었던 반면 plasmid curing균주는 각결막염이 인정되지 않았고, 혈청 감수성으로 나타나 *S. typhimurium*의 60 Md plasmid 및 *S. enteritidis*의 36 Md plasmid 보유균주는 병원성과 관계가 있음이 인정되었다.

고 찰

*Salmonella*감염증의 역학관계를 파악하기 위한 방법으로 *Salmonella*균의 혈청형, 생물형, phage형 및 약제내성 양상 등을 조사하고 있으나⁵⁻⁹ 최근에는 이 속균이 보유하고 있는 plasmid profile, 제한효소 처리에 의한 plasmid DNA 분절양상 등을 분석함으로써 보다 정확한 역학적 의의를 추구하는 경향이다.¹⁰⁻¹⁵

O'bien 등⁸은 사람 및 동물유래 *S. typhimurium*으로부터

100, 9.2, 2.4 Kb의 각각 동일한 plasmid를 분리함으로써 사람과 동물간에 전파가능성을 시사한 바 있고, Hel-muth 등¹⁰은 세계 여러국가에서 분리된 *Salmonella*속균의 7가지 혈청형에 대해 역학상황을 파악하기 위해 plasmid profile을 분석하였던 바 *S. typhimurium*은 60 Md, *S. enteritidis*는 37 Md, *S. dublin*은 56 Md, *S. cholerae suis*는 30 Md의 plasmid를 공통적으로 가지고 있음이 확인되었고 일부 국가에서는 plasmid 양상의 차이가 있음을 보고한 바 있다.

우리나라에서 최 등¹⁵은 돼지 및 소 유래 *Salmonella*속균에서 분자량이 1.0~90 Md, plasmid수가 1~4개임을 보고하였고, 이 등⁴은 사람유래 *Salmonella*속균에서 분자량이 1.8~70 Md, plasmid수가 1~4개임을 보고한 바 있다. 또한 박 등¹⁴은 비둘기 및 수생조류유래 *S. typhimurium* var copenhagen 166주의 plasmid 보유상황을 조사한 바 plasmid수가 4개 혹은 5개이었고, 분자량이 3.2~60 Md이었으며, 60 Md plasmid가 공통적으로 보유하고 있음을 보고하였다.

이 연구에서 돼지 및 소 유래 *Salmonella*속균 8개 혈청형, 98주에 대하여 plasmid를 분석한 결과 plasmid수는 1~3개 이었고, 분자량은 0.8~70 Md으로 선인들의 보고^{4, 8, 10, 14, 15}와 유사하였고, *S. typhimurium*은 소 유래 1주 및 돼지 유래 14주 모두가 60 Md plasmid를 공통적으로 보유하고 있었으며 *S. enteritidis* 5주중 4주가 36 Md의 plasmid를 보유하고 있었다.

*Salmonella*감염증의 역학상황을 분석하기 위해 실시되고 있는 생물형, phage형 및 plasmid profile 등의 비교에 관한 연구에서 Brunner 등⁶은 plasmid profile이 생물형 및 약제내성형보다 효과적임을 보고한 바 있고, Wray 등¹³은 동일한 phage형인 *S. typhimurium* DT 204C로부터 생물형이 2개형, plasmid 양상이 7개형으로 분류되고 있어서 plasmid profile을 분석하는 것이 보다 유용함을 보고하였다.

이 연구에서는 *S. typhimurium*은 60 Md plasmid를 보유하는 것과 60 Md와 10 Md, 2.5 Md를 보유하고 있는 균주가 있었고, *S. enteritidis*는 36 Md plasmid만을 보유하고 있었으며, *S. derby*는 27주중 20주가 50, 2.7 또는 1.0 Md plasmid를 보유하고 있었고, plasmid pattern은 3가지 형태로 나타났다. 한편 *S. infantis*, *S. anatum*, *S. bareilly* 및 *S. senftenberg* 등의 균주는 plasmid를 전혀 관찰할 수 없었다. plasmids가 인정된 *Salmonella*에 있어서 혈청형 및 균주간 plasmid양상의 차이는 인정되었으나 공시균주가 주로 영남지역 유래 *Salmonella*속균 이어서 세밀한 역학적 분석은 어려웠고 광범한 지역일 경우에는 유용할 것으로 추측된다.

제한효소처리에 의한 plasmid DNA의 분석은 Kapperud 등¹¹은 *S typhimurium*의 plasmid profile 분석 및 phage typing이 제한효소분석법보다 효율적임을 보고하였고, Nakamura 등²⁹은 *S enteritidis*의 36 Md plasmid DNA의 제한효소분석에서 균주간간에 차이가 인정되지 않음을 보고한 바 있다. 또한 Volone 및 Chikami³⁴는 *S dublin*의 plasmid에 대한 EcoR I 제한효소처리에 4.1 Kb 부분의 유전자가 병원성 결정기라고 보고한 바 있으며 Helmut 등¹⁰은 *Salmonella*속균의 혈청형간에 plasmid DNA는 크기와 제한효소 절단양상이 서로 다르나 병원성에 관계되는 부분의 plasmid는 상당한 동질성을 나타낸다고 하였다. Woodward 등¹²은 *S dublin*, *S typhimurium* 및 *S enteritidis*균 사이의 병원성 관련 plasmid는 약 10 Md를 공유한다고 보고한 바 있다.

이 연구에서 경남, 경북 및 대구지역의 소 및 돼지 유래 *S typhimurium*의 60 Md plasmid 및 *S enteritidis*의 36 Md plasmid에 대한 제한효소처리에 따른 DNA분절양상에 있어서 *S typhimurium*의 plasmid는 각종 제한효소에 따라 다양한 분절양상을 보였고, *S enteritidis*의 plasmid는 균주간 DNA분절양상의 차이는 인정되지 않았다. 이는 상기 선인들의 보고^{11, 29}와 일치하였으며 따라서 제한효소처리에 의한 *Salmonella*감염증의 역학적 분석은 생물형, phage형 및 plasmid profile 등과 병행하여 광범위한 지역을 대상으로 하는 것이 효과적일 것으로 생각된다. 또한 앞으로 이들 병원성관련 plasmid와 단백질산생과의 관계도 규명하여야 할 것으로 사료된다.

*Salmonella*속균의 병원성에 관계되는 인자로는 lipopolysaccharide, adhesive pili, flagella, enterotoxin 등이 알려져 있으나¹⁻³, 최근에는 plasmid에 의해서도 병원성이 유발됨이 알려지고 있다.^{10, 26, 27, 29, 31}

*Salmonella*속균의 plasmid에 기인하는 병원성에 관하여 Jones 등³³은 60 Md plasmid를 보유한 *S typhimurium*이 마우스에 대해 병원성이 강하고, 장부착성 및 침입성과 관계가 있고, cryptic plasmid를 curing한 균주가 병원성이 10,000배 저하됨을 보고한 이래 여러 연구자들^{12, 18, 27, 28}에 의해 60 Md 병원성 관련 plasmid에 관한 보고가 되고 있다.

Helmut 등¹⁰은 60 Md plasmid를 보유한 *S typhimurium* 및 37 Md를 보유한 *S enteritidis*균이 sereny시험에서 각결막염을 유발하고, 기니피혈청에 대한 저항성이 있음을 보고하였고, Hackett 등^{35, 36}은 cryptic plasmid를 보유한 *S typhimurium*균이 사람혈청에 대한 저항성임을 보고한 바 있다. 또한 Nakamura 등²⁹은 36 Md plasmid를 보유한 *S enteritidis*가, Barrow 등¹⁷은 85 Kb plasmid를 보유한 *S gallinarum*, Terakado 등³¹은 50 Md plasmid를 보유한 *S*

*dublin*이 병원성이 있음을 보고하고 있다.

이 실험에서도 60 Md plasmid 보유 *S typhimurium* 및 36 Md 보유 *S enteritidis*균주는 마우스에 대해 병원성이 강하고, sereny시험에서 각결막염을 유발하였으며, 기니피혈청에 대해 저항성이 있었으나 이들 plasmid를 curing한 균주는 마우스에 대한 병원성, 각결막염유발 및 기니피혈청 저항성이 인정되지 않았다.

이상의 결과를 보아 *S typhimurium*의 60 Md plasmid 및 *S enteritidis*의 36 Md plasmid는 병원성과 관련이 있음이 인정되었고, 앞으로 가축에 있어서 *Salmonella*속균의 plasmid profile에 의한 역학적 규명은 전국적인 조사가 계속 수행되어야 할 것으로 생각된다. 아울러 제 외국^{26, 30, 37, 38}에서와 같이 *Salmonella*감염증을 신속하게 진단하거나 분리동정하는데 유용하게 이용될 수 있는 병원성관련 plasmid DNA의 probe작성에 관한 연구가 활발히 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

1984년부터 1987년까지 대구, 경북 및 경남지역의 소 및 돼지로 부터 분리한 *Salmonella*(S) 속균 98주의 plasmid profile, 제한효소 처리에 의한 plasmid DNA 분절양상을 분석하고 혈청 저항성, sereny시험 및 마우스 감염시험을 실시하여 plasmid와 병원성과의 관계를 조사하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

소 유래 *Salmonella*속균의 plasmid 보유상황은 13주중 7주에서 1개이상의 plasmid를 가지고 있었고, *S typhimurium* 1주는 60 megadalton(Md) plasmid 및 *S enteritidis* 5주중 4주는 36Md plasmid를 보유하고 있었다.

돼지 유래 *Salmonella*속균의 plasmid보유상황은 85주중 47주가 1개이상의 plasmid를 가지고 있었고 *S typhimurium* 14주 모두는 60Md plasmid를 공통적으로 보유하고 있었다.

*S typhimurium*의 60 Md plasmid를 분리하여 EcoR I 등 8종의 제한효소 처리에 의한 DNA분절양상은 각 효소에 따라 4~15개이상으로 다양하게 나타났다.

*S enteritidis*의 36 Md plasmid는 EcoR I 등 3종의 제한효소 처리에 의한 DNA분절양상은 3~5개이상으로 나타났다, 균주간 분절양상의 차이는 인정되지 않았다.

60 Md plasmid를 보유한 *S typhimurium* 및 36 Md plasmid를 보유한 *S enteritidis*균주는 마우스에 대해 병원성이 강하고, sereny시험에서 각결막염을 유발하였으며 기니피혈청저항성이 있었으나 이들 plasmid curing균주는 마우스에 대한 병원성, 각결막염 및 기니피혈청저항성이 인정되지 않았다. 따라서 이들 plasmid DNA는 병원성과 관련이 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Ewing WH. Edwards and Ewings identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. *Elsevier* 1986 ; 182~318.
2. Gillespie JH, Timoney JF. Hagan and Brunners infectious diseases of domestic animals, 7th ed, Cornell University Press, Ithaca and London 1981 ; 84~93.
3. Linton AH. Guidelines on prevention and control of Salmonellosis. *WHO, Geneva* 1983 ; 10~128.
4. 이복권, 김기상, 이영희 등. *Salmonella*속군의 항균제 내성 및 R plasmid. *대한미생물학회지* 1988 ; 23 : 567.
5. 최원필, 이희석, 여상근 등. 양돈장에 있어서 *Salmonella* 감염증의 역학적 연구. I. 발생 및 오염상황, 혈청형과 *Salmonella typhimurium*의 생물형. *대한수의학회지* 1986 ; 26(1) : 49~59.
6. Brunner F, Margadant A, Peduzzi R, et al. The plasmid patterns as an epidemiologic tool for *Salmonella typhimurium* epidemics : comparison with the lysotype. *J Infect Dis* 1983 ; 148 : 7~11.
7. Duguid JP, Anderson ES, Alfredson GA, et al. A new biotyping scheme for *Salmonella typhimurium* and its phylogenetic significance. *J Med Microbiol* 1974 ; 8 : 149~168.
8. O'bien TF, Hopkins JD, Gilleece ES. Molecular epidemiology of antibiotic resistance in *Salmonella* from animals and human beings in the United States. *New Engl J Med* 1982 ; 307 : 1~6.
9. 최원필, 이희석, 여상근 등. 양돈장에 있어서 *Salmonella* 감염증의 역학적 연구. II. *Salmonella*속군의 약제내성 및 전달성 R plasmid. *대한수의학회지* 1986 ; 26(2) : 229~235.
10. Helmuth R, Stephan R, Bunge C, et al. Epidemiology of virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. *Infect Immun* 1985 ; 48 : 175~182.
11. Kapperud G, Lassen J, Dommarsnes K, et al. Comparison of epidemiological marker methods for identification of *Salmonella typhimurium* isolates from an outbreak caused by contaminated chocolate. *J Clin Microbiol* 1989 ; 27(9) : 2019~2024.
12. Woodward MJ, McLaren I, Wray C. Distribution of virulence plasmids within *Salmonellae*. *J General Microbiol* 1989 ; 135 : 503~511.
13. Wray C. et al. Differentiation of *Salmonella typhimurium* DT 204c by plasmid profile and biotyping. *Vet Record* 1987 ; 121 : 514~516.
14. 박노찬, 최원필. 비둘기 및 수생조류 유래 *Salmonella typhimurium*의 생물학적 특성과 plasmid profile에 관한 연구. *대한수의학회지* 1990 ; 30(2) : 203~214.
15. 최원필, 이희석, 여상근 등. 우 및 돈에서 분리한 *Salmonella* 유래주 R plasmid의 유전학적 및 분자생물학적 성상에 관한 연구. II. R plasmid의 비적합성 및 plasmid profile. *대한수의학회지* 1989 ; 29(2) : 59~67.
16. Aehtman M, Mercer A, Kusecek B, et al. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K 1 isolates. *Infect Immun* 1983 ; 39(1) : 315~335.
17. Barrow PA, Simpson JM, Lovell MA, et al. Contribution of *Salmonella gallinarum* large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect Immun* 1987 ; 55(2) : 388~392.
18. Barrow P, Lovell MA. Functional homology of virulence plasmids in *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum*, and *S typhimurium*. *Infect Immun* 1989 ; 57(10) : 3136~3141.
19. Gahring LC, Heffron F, Finlay BB, et al. Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect Immun* 1990 ; 58 : 443~448.
20. Kayaprpic J, Robins-Browne RM, Davey RB. Differentiation between virulent and avirulent *Yersinia enterocolitica* isolates by using congo red agar. *J Clin Microbiol* 1983 ; 18(3) : 486~490.
21. Silva MLM, Scaletsky ICS, Reis MHL, et al. Plasmid coding for drug resistance and production of heat labile and heat-stable toxins harbored by and *Escherichia coli* strain of human origin. *Infect Immun* 1983 ; 39(2) : 970~973.
22. Smith HW, Halls S. The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* the controls enterotoxin production. *J Gen Microbiol* 1968 ; 52 : 319~334.
23. Silva RM, Saadi S, Mass WK. A basic replicon of virulence-associated plasmids of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* IS homologous with a basic replicon in plasmids of IncF groups. *Infect Immun* 1988 ; 56(4) : 836~842.
24. Tanaka M, Nakamura M, Ito O, et al. Virulence-associated plasmids of *Yersinia enterocolitica* isolated in Japan. *Jpn J Vet Sci* 1984 ; 46(6) : 945~949.

25. 최원필, 이현준, 정석찬. 국내 돼지와 개에서 분리된 *Yersinia* 속균의 병독성 관련 plasmid. 대한수의학회지 1989 ; 29(2) : 69~73.
26. Chikami GK, Fierer J, Guiney KG. Plasmid-mediated Virulence in *Salmonella dublin* demonstrated by use of a Tn5-oriT construct. *Infect Immun* 1984 ; 50(2) : 420~424.
27. Gulig PA, Curtiss III R. Plasmid associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 1987 ; 55 : 2891~2901.
28. McDonough PL, Jacobson RH, Timoney JF. Virulence determinants of *Salmonella typhimurium* from animal sources. *Am J Vet Res* 1989 ; 50 : 662~670.
29. Nakamura M, Sato Ohya T, Suzuki S. Possible relationship of a 36-megadalton *Salmonella enteritidis* plasmid, to virulence in mice. *Infect Immun* 1985 ; 47(3) : 831~833.
30. Suzuki S, Ohmal K, Nakamura M, et al. Demonstration of the correlation of a 36-megadelton Salmonella serovar enteritidis plasmid to virulence in mice by reintroduction of the plasmid. *Jpn J Vet Sci* 1989 ; 51(1) : 203~205.
31. Terakado N, Sekizaki T, Hashimoto K, et al. Correlation between the presence of fifty megadaton plasmid in *Salmoneila dublin* and virulence for mice. *Infect Immun* 1983 ; 41(1) : 443~444.
32. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning, 1st ed, cold spring harbor 1982 ; 365~373.
33. Jones GW, Rabert KK, Svinarich DK, et al. Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella typhimurium* with autonomous 60-megadalton plasmids. *Infect Immun* 1982 ; 38(2) : 476~486.
34. Valone SE, Chikami GK. Characterization of three proteins expressed form the virulence region of plasmid p SCL 2 in *Salmonella dublin*. *Infect Immun* 1991 ; 59(10) : 3511~3517.
35. Hackett J, Kotlarski I, Mathan V, et al. The colonization of peyer's patches by a strain of *Salmonella typhimurium* cured of the cryptic plasmid. *J Infect Dis* 1986 ; 153 : 1119~1125.
36. Hackett J. et al. Mediation of serum resistance in *Salmonella typhimurium* by an 11-kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasmid. *J Infect Dis* 1987 ; 155 : 540~548.
37. Gulig PA, Curtiss III R. Cloning and transposon insertion mutagenesis of virulence of genes of the 100-kilobase plasmid of *Salmonella typhimurium* *Infect Immun* 1988 ; 56 : 3262~3271.
38. Scholl DR, et al. linical application of novel sample processing technology for the identification of *Salmonellae* by using DNA probes. *J Clin Microbiol* 1990 ; 28 : 237~241.