

## 닭 도체에서 분리한 *Salmonella* spp의 특성 분석

이호원\*, 홍종해<sup>1</sup>, 정병열<sup>2</sup>

강원도 가축위생시험소 중부지소, 강원대학교 수의학부대학<sup>1</sup>, 국립수의과학검역원<sup>2</sup>  
(접수 2007. 8. 02, 게재승인 2007. 9. 21.)

### Characteristics of *Salmonella* spp isolated from poultry carcasses

Ho-Won Lee, Chong-Hae Hong<sup>1</sup>, Byeong-Yeal Jung<sup>2</sup>

Jungbu-branch, Gangwondo Veterinary Service Laboratory, 232-800; <sup>1</sup>College of Veterinary Medicine, Kangwon National University, 200-701; <sup>2</sup>National Veterinary Research and Quarantine Service, 430-824, Korea.

(Received 2 August 2007, accepted in revised form 21 September, 2007)

#### Abstract

*Salmonella* infections cause the diseases in poultry and some zoonotic *Salmonella* can be transmitted to human through poultry products, resulting in food-borne disease. This study was conducted to obtain some useful information for the control of salmonellosis in human. Twenty four *Salmonella* spp were isolated from poultry carcasses, and they were examined with several methods such as serotyping, antimicrobial resistance test and random amplified polymorphic DNA(RAPD) to identify their characteristics.

In serotyping test of 24 strains *S enteritidis* was 17 (70.8%), followed by *S schwarzengrund* 3 (12.5%), untyped strain 4 (16.7%). In the results of antimicrobial resistance test, 23 (95.8%) isolates were resistant to at least one antimicrobial agent, generating eight different resistance patterns. In RAPD analysis using URP-6 primer to differentiate *Salmonella* isolates within a serotype, 4 serogroups were divided into 10 RAPD types: 5 types in *S enteritidis*, 2 types in *S schwarzengrund* and 3 types in the remainder.

---

Key words: Poultry carcasses, *Salmonella* spp, RAPD, Resistance pattern.

---

\* Corresponding author

Phone : +82-33-332-6926, Fax +82-33-333-5302

E-mail : kw6340@hanmail.net

## 서 론

축산물은 사람의 식품으로써 중요한 일부분을 차지하고 있으며 또한 식중독균의 주요 매개체이기도 하다. 특히, 닭고기는 살모넬라균을 비롯한 식중독균의 주요한 전파 매개체로 알려져 있다<sup>1-5)</sup>. 살모넬라균은 식품매개 질병의 원인체로써 주로 가금류, 난류, 육류 및 유제품, ready-to-eat 식품에서 많이 발견되고 있다<sup>6-7)</sup>. 살모넬라균의 인체감염은 오염된 음식을 섭취하거나, 오염된 육류의 비위생적인 조리에서 기인하는 것으로 공중보건 및 식품위생에서 중요시 되고 있다<sup>8)</sup>. 특히 *Salmonella enteritidis* (SE)는 사람에게서 구토, 발열, 수양성 설사, 복통, 장염 등을 유발하는 식중독의 원인균으로 1980년대 이후 세계적으로 보고 사례가 증가해 왔다<sup>5, 6, 9)</sup>.

살모넬라균은 살아 있는 닭 또는 도체를 통해 도축장 및 가공처리장으로 유입되면, 작업라인을 따라 전파되어 최종 생산된 축산식품의 미생물적인 품질을 위태롭게 한다<sup>5)</sup>. 이러한 축산식품 매개 병원성 미생물 문제를 해결하기 위한 일환으로 농림부에서는 Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP)를 도입하여 2003년 7월 1일부터 모든 닭도축장에 의무적용하고 있으며(농림부 축산물위해요소중점관리기준, 1999), 닭도축장 HACCP 적용에 관한 연구가 진행되어 왔다<sup>10, 11)</sup>.

일반 가축에서와 마찬가지로 닭에서도 성장촉진제로 또는 질병을 예방하거나 치료할 목적으로 항균물질을 사용하여 왔다. 항균물질의 무분별한 사용은 살모넬라균과 다른 세균들 사이에 내성을 증가 시켰으며 이는 식품, 동물, 그리고 사람을 통해 전파된다<sup>5, 12)</sup>.

항생제 내성은 국민의 건강 및 생명과 직결되는 문제로서 사회적인 관심과 그 중요성이 점차 커지고 있다. 이에 수의·축산분야에서

는 국내 축산용 항생제 사용 실태조사와 동물 및 축산물에서의 항생제 내성균의 실태 파악을 통한 체계적인 항생제 관리 및 세부사용지침 확립이 필요하게 되었다<sup>2, 13-16)</sup>.

닭도축장은 공정상 열처리과정이 없으므로 한번 살모넬라균에 오염되면 작업환경 내에 상존하면서 생산제품의 안전성을 저하시킬 우려가 있다<sup>3, 5)</sup>. 따라서 도체에서 또는 작업환경에서 살모넬라균이 검출되면 오염원을 규명하여 제거하는 것이 근본적이고 가장 효과적인 관리방법이며 오염원 규명을 위해서는 오염의 출처를 추적해야 하는데, 작업환경의 오염 발생 가능 지점에서 조사대상 미생물을 검출하여 특성을 분석하고 분류하여야 한다<sup>17-19)</sup>.

살모넬라균의 subspecific typing은 식품유래, 수인성, 인수공통전염병, 그리고 사람사이에 전염되는 질병을 검사하고 조사하는데 기본적인이다<sup>17)</sup>. 세균의 subspecific typing의 방법으로 serotyping, phage typing, biotyping, plasmid profiling, multilocus enzyme electrophoresis, conventional restriction endonuclease analysis, ribotyping, 그리고 pulsed field gel electrophoresis(PFGE)가 있다<sup>17)</sup>. Serotyping 방법은 전문적인 기술과 시약이 구비된 실험실이 필요하다. 그러나 PCR fingerprinting은 재현성이 좋으며 수행이 단순하여 PCR을 갖춘 모든 실험실에서 혈청형적 구분이 가능하고 분자미생물학적인 역학조사에 유용하다<sup>20-22)</sup>. 살모넬라균의 특성 연구에는 어떤 특정한 한가지 실험방법만으로는 부족한데, 이는 살모넬라균이 어떤 혈청형이냐에 따라 구분력이 좋은 molecular typing의 선택이 필요하고 한 가지 molecular typing 방법 보다 여러 가지 방법을 같이 사용할 경우 더 좋은 결과를 보이기 때문이다<sup>1, 23)</sup>.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)는 생물학 등에서 많이 사용하는 방법으로 단일의 arbitrarily random primer를 이용하여 PCR 방법을 통해 template DNA로부터 genetic fingerprint를 얻고 이를 분

석하여 역학사항을 추정한다. 장점은 target organism의 DNA 염기서열이 필요하지 않으며 저렴하고 신속하게 살모넬라균을 혈청형 내의 수준으로 감별이 가능하다<sup>23-28</sup>. 단점으로는 분리된 균의 DNA polymorphism을 검출할 수 있는 적합한 primer를 찾아야 하는 점이 있다. universal rice primer(URP primer)는 비교적 높은 annealing temperature로 PCR을 실시하고 적은 수의 primer 만으로도 구분력이 좋은 결과를 얻을 수 있다고 보고되었다<sup>29, 30</sup>. 여러 나라에서 상기 기술한 실험방법 등을 이용하여 많은 역학적 특징들을 연구하고 있으며 살모넬라균에 의한 식중독 예방과 질병피해를 줄이기 위한 자료로 이용하고 있다<sup>4, 20, 22, 28, 31</sup>.

본 연구에서는 닭 도축장에서 분리된 *Salmonella* spp 24 균주별로 serotyping, 항균 물질 내성실험, 그리고 URP-6 primer를 이용한 RAPD분석을 실시하였으며 그 특성을 분석하여 닭도체에서 비롯되는 살모넬라균 식중독을 예방하고 재오염을 줄이는 자료로 이용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시료채취 및 살모넬라균주의 분리 동정

2004년 1월부터 2006년 4월까지 강원도 닭도축장에서 도축된 닭의 도체표면을 400ml의 buffered peptone water(BPW, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, England)로 세척한 후 세척액 중 40ml를 36°C에서 18~24시간 배양하고 이 배양액을 2종류의 살모넬라균 증균배지인 selenite cysteine broth(SC broth, Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, USA)에 1ml를 첨가하고 동시에 rappaport-vassiliadis R10 broth(RV broth, Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, USA)에 0.1ml를 첨가하여 각각 36°C 및 42°C에서 20~24시간 동안 배양하였다. 각각의 증균배양액을 살모넬

라균 선택배지인 bismuth sulfite agar(BS agar, Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, USA) 및 xylose lysin desoxycholate agar(XLD agar, Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, USA)배지에 도말한 후 36°C에서 20~24시간 배양한 후 평판별로 의심되는 집락(유당 비분해 및 황화수소 산생으로 검은색)을 선택하여 살모넬라균 특성검사를 실시하였다. 의심되는 집락에 대해 triple sugar iron agar(TSI agar, Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) 및 lysine iron agar(LI Agar, Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, USA)사면배지에 천자하여 37°C에서 20~24시간 배양한 후 살모넬라균으로 추정되는 균에 대해 nutrient agar(NA, Merck, Darmstadt, Germany)를 이용 순수분리 후 그람음성의 간균임을 확인하고, oxidase reagent(Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, USA)음성으로 *Salmonella* O antiserum poly(Becton Dickinson and Company, Sparks, USA)에 응집반응을 보인 균주를 VITEC GNI+ Card(bioMerieux Inc., DurhamNC, USA)를 이용하여 *Salmonella* spp임을 최종 동정하였다<sup>32</sup>.

### Chromosomal DNA의 준비

분리된 살모넬라균은 SC broth로 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양된 SC broth 1.5ml를 microcentrifuge tube에 옮기고 실온에서 12,000rpm으로 2분간 원심분리 하였다. 상층액은 제거하고 Gene-spin™ Viral DNA/RNA Extraction Kit(iNtRON Biotechnology)를 이용하여 chromosomal DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 실험전까지 -20°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

### *Salmonella*-specific PCR

*Salmonella* specific PCR에 사용한 primer

는 *S typhimurium*에서 유래된 *invA* gene을 검출할 수 있는 primer를 사용하였다<sup>26, 34</sup>. primer의 염기서열은 5' -ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT-3' 과 5' -AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT-3' 이며 Bioneer사(Korea)에서 제조한 것을 사용하였다.

PCR mixture의 구성은 10×PCR buffer (Promega), 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM, dNTPs, 20pM primer pairs, 1U *Taq* DNA polymerase(Promega), 5μl의 template DNA에 3차 증류수를 첨가하여 최종량이 50μl가 되게 하였다. 증폭은 thermal cycler (PTC-100, MJ reserch)를 이용하여 실시하였다. PCR cycle은 94℃에서 5분간 denaturation시킨 뒤 본 반응으로 94℃에서 1분간 denaturation, 56℃에서 30초 annealing, 72℃에서 2분간 polymerization을 35회 반복한 후 마지막으로 72℃에서 5분간 polymerization을 실시하였다.

PCR 산물은 1% agarose(Promega)에서 100V로 25분 동안 전기영동을 한 후 0.5μg/ml의 ethidium bromide가 희석된 Tris-boric-EDTA(TBE)로 염색하고 UV transilluminator (Seoulin Bioscience)를 이용하여 band를 관찰하였다.

## Serotyping

*Salmonella*-O and H antisera(Difco)를 이용하여 응집반응을 실시하였다. 균체표면항원(O antigen)의 동정은 고형배지에서 여러 개의 colony를 채취하여 평판응집반응으로 검사하였다. 편모항원(H antigen)의 검사는 시험관 시험법으로 phase I 항원을 검사하였고, Craigie tube method를 이용하여 phase-changing을 하여 Phase II 항원검사를 하였으며 Phase II 항원이 유도된 균주는 Phase II 양성 항혈청을 이용하여 시험관 시험법으로 검사하였다. 검사 후 최종적인 serotyping은 Kauffmann-White scheme에 따라 구분하였다<sup>35</sup>.

## 항균물질 내성 검사

항균물질 내성시험은 National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>36</sup>의 기준에 따라 디스크 확산법(disk diffusion method)을 이용하여 살모넬라균의 항균물질 내성을 시험하였다. 먼저 공시균주를 Tryptic Soy broth(TSB, Difco, Becton Dickinson and Company, Sparks, USA)에서 37℃, 16~24 시간배양한 후 표준탁도(McFarland No. 0.5)로 희석하고 멸균면봉을 사용하여 준비한 Mueller-Hinton medium(MHM, Difco, USA)에 균등하게 희석으로 도말한 다음 sensi-disc 8-phase self-tamping dispenser (BD, USA)를 사용하여 평판배지당 7~8종의 약제 disk를 적용한 후 37℃에서 24시간 배양하였다. 배양 후 disk 주위에 나타난 발육저지대를 caliper를 이용하여 측정하였고 소숫점 이하는 반올림 하였다. 해당 항균물질에 대한 저항성 또는 감수성 판정은 disk제조사에서 제시한 기준에 따랐다. 공시한 항균물질 제제는 BBL sensi-disc(BD, USA)제품인 amikacin(AN, 30μg), amoxicillin/clavulant acid (AmC 20/10μg), ampicillin(AM, 10μg), cefazolin(CZ, 30μg), colistin(CL, 10μg), gentamicin(GM, 10μg), kanamycin(K, 30μg), neomycin(N, 30μg), norfloxacin(NOR, 10μg), penicillin(P, 10U), polymyxin B(PB, 300 U), spectinomycin(SPT, 100μg), streptomycin(S, 10μg), tetracycline(Te, 30μg), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT, 1.25μg/23.75μg) 등 15종을 사용하였다.

## RAPD-PCR

RAPD-PCR은 URP-6 primer(Seoulin Bioscience)를 이용하여 *Salmonella* subspecies 간의 DNA를 fingerprint하였다. 이 primer는 높은 재현성과 DNA polymorphism의 구분성을 보여주었다<sup>29, 30</sup>.

PCR 반응은 3차증류수 14.5μl와 URP

Primer-6 1.5 $\mu$ l(Seoulin Bioscience, SS 4306)를 primix(Bioneer, Seoulin Bioscience)가 들어있는 용기에 각각 분주한 후, Template DNA를 4 $\mu$ l 주입하여 최종량이 20 $\mu$ l가 되게 하였다. 10회 pipetting하여 용기내의 용액을 희석하였다.

RAPD PCR cycle은 94 $^{\circ}$ C에서 4분간 denaturation시킨 뒤 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 polymerization을 35회 반복한 후 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 polymerization을 실시하였다.

PCR 산물 15 $\mu$ l를 1% agarose(Promega)에서 100V로 25분 동안 전기영동을 한 후 0.5  $\mu$ g/ml의 ethidium bromide가 희석된 TBE로

염색하고 UV transilluminator(Seoulin Bioscience)를 이용하여 band를 관찰하였다.

## 결 과

### *Salmonella*-specific PCR을 이용한 분리주의 확인

분리주, 양성 대조군 및 음성 대조군을 대상으로 *invA* gene을 검출할 수 있는 primer를 이용하여 *Salmonella*-specific PCR을 실시하였다. 24개의 살모넬라 분리주에서 모두 521bp DNA fragment 증폭산물이 관찰되어 혈청형에 관계없이 모든 분리주는 *invA* gene을 지니고 있는 것으로 확인되었다 (Fig 1).

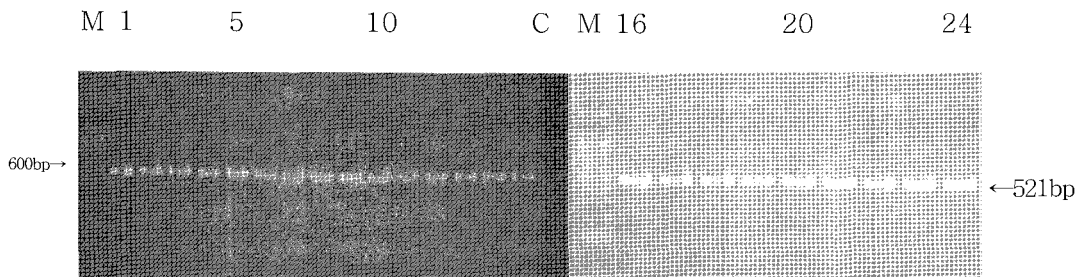


Fig 1. *Salmonella*-specific PCR of *Salmonella* isolates using primer set detecting *invA* gene. Lanes M, 100bp DNA marker; Lanes C, No DNA fragment; 1-24, *Salmonella* spp

### Serotyping 결과

분리된 24건의 살모넬라균주에 대한 혈청형을 분석한 결과 serogroup D1에 속하는 *S enteritidis*가 17주(70.8%), B에 속하는 *S schwarzengrund*가 3주(12.5%), 그리고 serogroup C1, C2, B 및 D1에 속하나 typing를 더 이상 진행할 수 없는 4주(16.7%)로 나타났다(Table 1).

### *Salmonella*균주의 항균물질에 대한 내성

분리된 살모넬라균주에 내성을 보인 항균물

질은 ampicillin(AM), penicillin(P), streptomycin(S), tetracycline(Te) 4종으로, 이 중 penicillin에 가장 많은 22균주(91.7%)가 내성을 나타내었고, tetracycline 9균주(37.5%), streptomycin 9균주(37.5%), 그리고 ampicillin에 6균주(25.0%)가 내성을 나타내었다.

내성 pattern은 8가지 유형으로 P에만 내성인 10균주, AM와 P에 내성인 1균주, P와 Te에 내성을 보인 3균주, S와 T에 내성을 보인 1균주, AM/P/S에 내성을 보인 3균주, P/S/Te에 내성을 보인 3균주, AM/P/S/Te에 내성을 보인 2균주, 그리고 사용한 15가지 항균물질에 내성을 보이지 않은 1균주였다 (Table 2, Table 3).

Table 1. *Salmonella* serogroups and serotypes isolated from poultry carcasses

Isolates No	O		H					Results
	poly	group	poly	phase1	bridge	phase2		
4-1	A	D1	B	m			<i>enteritidis</i>	
4-2	A	D1	B	G,m	m		<i>enteritidis</i>	
4-3	B	C2	C	k,		k	5	<i>blockley or haardt</i>
4-4	A	D1	B	G	m			<i>enteritidis</i>
4-5	A	D1	B	G	m			<i>enteritidis</i>
4-6	A	D1	B	G	m			<i>enteritidis</i>
5-1	A	B	A	d		d	G	Untypable
5-2	A	B	A	d		d	7	<i>schwarzengrund</i>
5-3	A	B	A	d		d	7	<i>schwarzengrund</i>
5-4	A	B	A	d		d	7	<i>schwarzengrund</i>
5-5	A	D1	B	G,m	m			<i>enteritidis</i>
5-6	A	D1	B	G,m	m			<i>enteritidis</i>
5-7	A	D1	B	G,m	m			<i>enteritidis</i>
5-8	A	D1	B	G,m	m			<i>enteritidis</i>
5-9	A	D1						Untypable
5-10	A	D1	B	G	m			<i>enteritidis</i>
5-11	A	D1	B	G	m			<i>enteritidis</i>
5-12	A	D1	B	G	m			<i>enteritidis</i>
5-13	A	D1	B	m				<i>enteritidis</i>
5-14	A	D1	B	G,m	m			<i>enteritidis</i>
6-1	A	D1	B	G,m	m			<i>enteritidis</i>
6-2	A	D1	B	G	m			<i>enteritidis</i>
6-3	A	D1	B	G,m	m			<i>enteritidis</i>
6-4	B	C1	B	G	f			<i>rissen or ardwick</i>

Table 2. Antimicrobial resistance of *Salmonella* strains isolated from poultry carcasses

Serovars	Number of strains tested	Number of resistant strains (%)														
		AN	AmC	AM	CZ	CL	GM	K	N	NOR	P	PB	SPT	S	Te	SXT
<i>S. enteritidis</i>	17			4(23.5)							16(94.1)			4(23.5)	4(23.5)	
<i>S. schwarzengrund</i>	3										2(66.7)			3(100.0)	3(100.0)	
Serogroup C1*	1										1(100.0)				1(100.0)	
Serogroup C2**	1			1(100.0)							1(100.0)					
UT ***	2			1(50.0)							2(100.0)			2(100.0)	1(50.0)	
Total	24			6(25.0)							22(91.7)			9(37.5)	9(37.5)	

AN: amikacin, AmC: amoxicillin, AM: ampicillin, CZ: cefazolin, CL: colistin, GM: gentamicin, K: kanamycin, N: neomycin, NOR: norfloxacin, P: penicillin, PB: polymyxin B, SPT: spectinomycin, S: streptomycin, Te: tetracycline, SXT: trimethoprim/sulfamethoxazole.

\*: Serogroup C1, *S. ardwick* or *rissen*, \*\*: Serogroup C2, *S. blockley* or *harardt*, \*\*\*: Untypable

Table 3. Distribution of antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* strains

Patterns*	<i>S. enteritidis</i>	<i>S. schwarzengrund</i>	Serogroup C1*	Serogroup C2**	UT***	Total
Susceptible	1					1
P	10					10
P-Te	2		1			3
S-Te		1				1
AM-P				1		1
P-S-Te		2			1	3
AM-P-S	2				1	3
AM-P-S-Te	2					2

\*: See footnote in Table 2.

RAPD 분석

URP-6 Primer를 이용하여 RAPD 분석한 결과 serotype별로 밴드가 확인되었다(Fig 2). BIO-PROFIL Bio- Windows Application

V10.02 프로그램 (Bio-Profil)을 이용하여 밴드를 구분하여 본 결과, serotype별로 특이한 band가 있었으며 또한 서로 유사한 band도 발견되었다. 특히 ⑥번과 ⑦번 band는 24주에서 공통으로 확인되었다 (Fig 3).

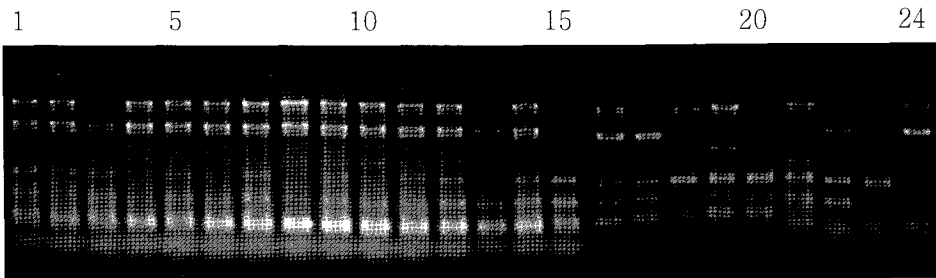


Fig 2. RAPD fingerprints of different *Salmonella* serotype with URP-6 primer. 1-17, *S. enteritidis*; 18-20, *S. schwarzengrund*; 21, Serogroup C1; 22, Serogroup C2; 23-24, Untypable

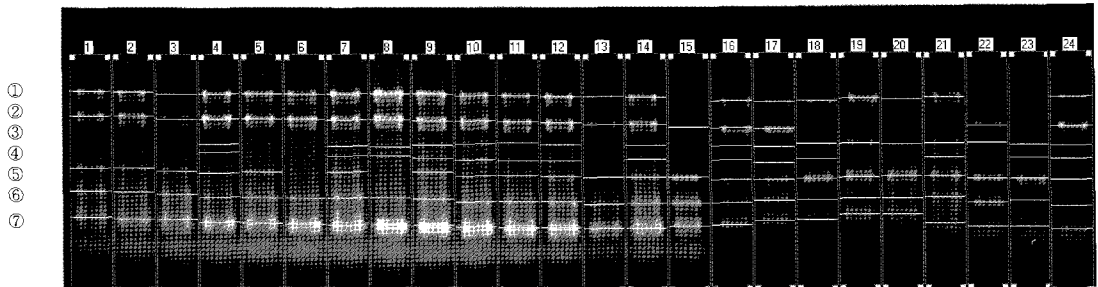


Fig 3. RAPD fingerprints of different *Salmonella* serotype via BIO-PROFIL. 1-17, *S. enteritidis*; 18-20, *S. schwarzengrund*; 21, Serogroup C1; 22, Serogroup C2; 23-24, Untypable.

Serotype *S enteritidis* 17주는 ①번부터 ⑦번까지 4~7개의 band가 존재하였으며 band의 위치와 개수에 따라 5가지 형으로 세분할 수 있었다. Serotype *S schwarzengrund* 3주 중 2주는 5개의 band로 위치도 일치하였으나 1주는 6개의 band가 나타남으로써 2개의 형으로 세분할 수 있었다. Serogroup C1에 속하나 serotyping을 정확

히 하지 못한 1주는 6개의 band가 존재하였으며, serogroup C2에 속하나 serotyping을 정확히 하지 못한 1주는 5개의 band가 나타났다. 특히 serotyping을 하지 못한 2개의 균주는 band가 5개, 7개로 서로 확연히 차이가 있었으며 그 중 serogroup D1에 속하는 1균주는 *S enteritidis*에서 나타난 RAPD type 중 한 가지 type과 유사하였다(Fig 3).

Table 4. Serotypes, resistance and RAPD types of isolated *Salmonella*

Serial No.	Serotypes		Resistance*		RAPD type
	Serogroups	Types	Antimicrobial drug	Patterns	
1	D1	<i>enteritidis</i>	AM, P, S	I	E-1
2	D1	<i>enteritidis</i>	P	II	E-1
3	D1	<i>enteritidis</i>	P	II	E-1
4	D1	<i>enteritidis</i>	P, Te	IV	E-2
5	D1	<i>enteritidis</i>	P, Te	IV	E-1
6	D1	<i>enteritidis</i>		VIII	E-3
7	D1	<i>enteritidis</i>	P	II	E-2
8	D1	<i>enteritidis</i>	P	II	E-4
9	D1	<i>enteritidis</i>	P	II	E-2
10	D1	<i>enteritidis</i>	AM, P, S	I	E-2
11	D1	<i>enteritidis</i>	P	II	E-2
12	D1	<i>enteritidis</i>	P	II	E-2
13	D1	<i>enteritidis</i>	AM, P, S, Te	VII	E-1
14	D1	<i>enteritidis</i>	P	II	E-2
15	D1	<i>enteritidis</i>	AM, P, S, Te	VII	E-5
16	D1	<i>enteritidis</i>	P	II	E-2
17	D1	<i>enteritidis</i>	P	II	E-2
18	B	<i>schwarzengrund</i>	P, S, Te	V	S-1
19	B	<i>schwarzengrund</i>	P, S, Te	V	S-2
20	B	<i>schwarzengrund</i>	S, Te	VI	S-2
21	C1	Untypable	P, Te	IV	UT-1
22	C2	Untypable	AM, P	III	UT-2
23	B	Untypable	P, S, Te	V	UT-3
24	D1	Untypable	AM, P, S	I	UT-4

\*: AM: ampicillin, P: penicillin, S: streptomycin, Te: tetracycline



## 고 찰

모든 동물, 동물의 환경, 또는 축산물은 병 원체에 의해 잠재적으로 오염되어 있을 수 있고 살모넬라균은 자연에 널리 퍼져 있으며 가축의 장내에, 야생의 포유류 및 조류에서 발견 된다<sup>37, 38</sup>. 또한 살모넬라균은 사람에게서 식중독을 일으키는 주요 원인체의 하나로 오염된 축산물이 주요 원인으로 전 세계적으로 식품의 안전성 관리를 위한 주요 연구대상이다<sup>4, 39</sup>.

살모넬라균을 분리 동정할 때 균 배양에 의한 검출법은 중균과정 등을 거쳐 선택배지에 도말하여 의심되는 집락에 대해 생화학적 성상을 확인하는데 최소한 2~3일은 소요된다. 그러나 PCR을 이용하면 특징적인 DNA 염기서열만을 증폭하므로 소량의 살모넬라균에 대해서도 몇시간 내에 특이적으로 빠르게 검출할 수 있다<sup>24-26</sup>. 본 연구에서도 여러 연구에서 보고한 상피세포를 침입하는 단백질을 생성할 수 있는 유전자가 암호화 된 *invA* gene을 이용한 *Salmonella*-specific PCR을 실시하였으며, 분리된 24개의 살모넬라균주 모두에서 521bp의 특이적 band를 관찰할 수 있었다<sup>26, 34</sup>. 닭도체에서의 정기적인 살모넬라균 모니터링에 *Salmonella*-specific PCR을 실용화 한다면 시간과 비용이 절약될 것이다.

살모넬라균은 닭으로부터 쉽게 오염이 되며 육계로부터 분리한 살모넬라균의 혈청형에서 *S. enteritidis*가 가장 많이 분리된다고 보고하였다<sup>2, 5, 8, 18, 23</sup>. 본 실험에서도 혈청형을 분석한 결과, 살모넬라균 24주에서 *S. enteritidis*가 17균주(70.8%)로 가장 많이 나타났다. 시료 채취의 년도 및 과정, 시료의 숫자와 냉동 및 냉장상태, 오염도, 가공처리장의 위생상태, 제품간의 교차오염 가능성, 그리고 검사방법에 따라 결과가 달라질 수 있으나 *S. enteritidis*가 식중독균의 주요 원인체임을 시사하며 식중독 발생과 함께 분리되는 *S. enteritidis* 숫자도 증가하고 있음을 말해 준다<sup>5</sup>.

최근 Food and Agriculture Organization (FAO) 등 국제기구에서는 인체용 항균물질

뿐만 아니라 농, 수산 및 축산에서 사용되는 다양한 항균물질로 인한 내성세균의 출현이 사람은 물론 농·수·축산 및 환경에까지 광범위한 피해를 줄 수 있다는 우려가 미국, 유럽 등 선진국을 비롯하여 전 세계적으로 확산되고 있다<sup>40-43</sup>.

본 연구에서 살모넬라균 23주(95.8%)는 1가지 이상의 항균물질에 내성이 있었으며 8가지 다른 내성패턴을 나타내었다(Table 2, Table 3). 항균물질에 내성을 나타낸 23균주 중 13균주가 2가지 이상의 항균물질에 내성을 나타내었다. 특히, *S. enteritidis* 17주 중에서 16주가 내성을 가지고 있었다. 남부 브라질 육계에서 분리된 살모넬라균에 대한 내성연구에서 88%의 균주가 1가지 이상의 항균물질에 내성을 보이고 8가지의 다른 내성패턴이 관찰된 것<sup>5</sup>과는 유사하였으나 내성을 나타내는 항균물질은 지역별 및 국가별로 차이가 있었다.

일본 Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring (JVARM)\_Program에서 소, 돼지, 그리고 가금에서 분리된 살모넬라균 82주에 대하여 20가지 항생제 내성을 검사한 결과 Am, dihydrostreptomycin, K, 그리고 oxytetracycline에 모든 serotype이 내성을 나타내었다고 보고하였으며<sup>44</sup>, 포르투갈에서 가금제품에서 분리된 살모넬라 60균주 중 75%가 1가지 이상의 항생물질에 내성을 나타내었다고 보고하였다<sup>46</sup>.

국내에서는 가금에서 분리된 *S. enteritidis* 64.7%가 2가지 이상 항생물질에 내성을 보였다<sup>47</sup>. 항균물질별 내성율의 차이는 실험에 사용한 항균물질이 같지 않으며, 국가와 지역별로 사용하는 약제가 다른 것에 따른 것으로 추정되지만 내성을 가진 살모넬라균이 많이 출현하는 추세임을 확인하여 준다.

앞으로 축산분야에서 높은 항생제 내성율이나 내성의 급격한 변화의 원인과 함께 이를 해결하기 위한 적극적인 조사연구가 필요하며 내성 패턴에 따라 오염원인을 분석하거나 오염경로 추적에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

검출된 살모넬라균의 특성분석에는 기존의 혈청형 분석과 함께 현재는 molecular typing 이 많이 활용되는데, molecular typing은 더욱 세분화된 분석을 가능하게 하므로 오염 특성에 따른 오염원 추적, 전파경로 등 역학적 조사연구에 유용하게 사용할 수 있다<sup>23-28</sup>. 적합한 primer를 찾기 위하여 많은 실험이 필요하지만 본 연구에서는 이전의 연구에서 살모넬라균에 대해 좋은 구분력을 보여준 URP-6 primer를 이용하여 4개의 serogroup의 살모넬라균을 RAPD typing한 결과 10개 RAPD type으로 구분할 수 있었다. 17주의 *S enteritidis*는 5개 RAPD type으로, 3주의 *S schwarzengrund*는 2개의 RAPD type으로 구분되었다. 이러한 결과로 볼 때 17주의 *S enteritidis*는 5곳의 다른 오염경로를 통하였음을 알 수 있었다. RAPD를 이용하면 동일한 serotype일지라도 세분화된 subtyping을 할 수 있으며, RAPD를 이용한 subtyping은 간단하고 빠른 방법이며 역학적인 조사에 유용한 방법이다.

본 연구에서는 닭 도체로부터 분리한 살모넬라균에 대하여 혈청형, 항균물질 내성, 그리고 RAPD PCR에 의한 molecular typing 등을 분석하였다. 항균물질 내성패턴을 살모넬라균의 subtyping에 적용하면 subtyping이 더욱 세분화 될 수 있음을 볼 수 있었다 (Table 4). 이러한 연구 방법과 결과가 닭도축장에서의 살모넬라균 오염을 예방하고 재오염을 방지함으로써 살모넬라균에 의한 식중독 등의 예방에 이용될 수 있기를 기대하며, 또한 HACCP에서 위해요소 분석에 활용하여 도움이 되기를 희망한다. 향후 닭사육농장과 닭고기를 원료로 하는 가공장을 대상으로 살모넬라균 분리주에 대한 더 많은 항균물질 내성분석과 유전학적 연구분석이 필요할 것이다.

## 결 론

닭 도체에서 분리한 살모넬라 24균주의 혈

청형 분석, 항균물질 내성검사, 그리고 RAPD 분석 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. *InvA* primer를 이용하여 *Salmonella*-specific PCR을 실시한 결과 모든 살모넬라균 24주에서 521bp 크기의 DNA fragment가 관찰되었다.
2. 살모넬라균 24균주에 대한 혈청형을 분석한 결과 *S enteritidis* 17주(70.8%), *S schwarzengrund* 3주(12.5%), 그리고 미동정 4주(16.7%)로 나타났다.
3. 15종의 항균물질 중에서 penicillin에 22균주(91.7%)가, tetracycline에 9균주(37.5%), streptomycin에 9균주(37.5%), 그리고 ampicillin에 6균주(25.0%) 순으로 내성을 나타내었다. 8종 내성유형을 볼 수 있었다.
4. URP-6 primer를 이용한 RAPD 분석 결과 4개의 serogroup 24균주는 10개의 RAPD type으로 구분되었으며 17주의 *S enteritidis*는 5개 type으로, 3주의 *S schwarzengrund*는 2개의 type으로 구분되었다.

## 참고문헌

1. Olsen JE, Skov MN, Angen O, et al. 1997. Genomic relationships between selected phage types of *Salmonella enterica* subsp *enterica* serotype *typhimurium* defined by ribotyping, *IS200* typing and PFGE. *Microbiology* 143: 1471-1479.
2. Malorny B, Schroeter A, Helmuth R. 1999. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2278-2282.
3. 이경환, 권혁무, 홍종해 등. 1999. 도계장과 돈육가공장에서 분리된 살모넬라 속의 특성 연구. 한국식품위생안전성학회지 14

- (1) : 97-103.
4. Lee YJ, Kim HJ, Park CK, et al. 2007. Characterization of *Salmonella* spp isolated from an integrated broiler chicken operation in Korea. *J Vet Med Sci* 69(4) : 399-404.
  5. Ribeiro AR, Kellermann A, Santos LR, Bessa MC, Nascimento VP, et al. 2007. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: Occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella enteritidis* isolates. *Braz J Microbiol* 38 : 296-299.
  6. Fernandes SA, Ghilardi ACR, Tavechio AT, et al. 2003. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 45(2).
  7. Nagal KB, Mandial RK, Katoch RC, et al. 2006. Occurrence of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Berta (*Salmonella* Berta) in bovine calves, in Himachal Pradesh, India. *Vet Arhiv* 76(2) : 153-157.
  8. 김호훈, 박미선, 강연호 등. 1998. 1997년도 한국에서 분리된 *Salmonella* 주의 역학적 특성. 한국수의공중보건학회지 22 : 253-260.
  9. 김윤지. 2004. 식품 안전성과 Risk Assessment(II): 닭고기에서 *Salmonella* 에 대한 Risk Assessment: FAO/WHO 자료를 중심으로. 식품기술 17(3) : 26-34.
  10. 김기석, 이영주, 모인필 등. 2002. 우육구. 닭 도축장내 위해요소 중점관리기준 적용에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지 26(1) : 39-54.
  11. 성명숙, 김기석, 탁연빈. 2002. 도계과정에서의 *Salmonella*속 균의 오염에 대하여. 한국수의공중보건학회지 26(3) : 195-205.
  12. NARMS. 2003. National antimicrobial resistance monitoring system. Enteric bacteria. 2003 Executive Report.
  13. FDA Task Force on Antimicrobial Resistance. 2000. Key Recommendations and Report.
  14. 하준일, 홍기성, 송시욱 등. 2003. 축산 및 수산분야의 항생물질 사용실태 조사. 한국수의공중보건학회지 20 : 205-217.
  15. 송시욱, 정석찬, 김성일 등. 2004. 2003년도 국내 도축장에서 분리한 세균의 항생제 감수성 조사 1. 도축장의 식육으로부터 분리한 *E. coli*의 항생제 감수성. 한국수의공중보건학회지 28(4) : 215-221.
  16. 이영주, 김애란, 정석찬 등. 2005. 닭 분변 유래 *E. coli* 및 *Salmonella* spp의 항생제 내성 패턴. 대한수의학회지 45 : 75-83.
  17. Johnson JR, Clabots C, Azar M, et al. 2001. Molecular analysis of a hospital cafeteria-associated salmonellosis outbreak using modified repetitive element PCR fingerprinting. *J Clin Microbiol* 39 : 3452-3460.
  18. Tsen HY, Lin JS. 2001. Analysis of the *Salmonella enteritidis* strains isolated from food-poisoning cases in Taiwan by pulsed field gel electrophoresis, plasmid profile and phage typing. *J Appl Microbiol* 91 : 72-79.
  19. Lu PL, Hwang IJ, Tung YL, et al. 2004. Molecular and epidemiologic analysis of a county-wide outbreak caused by *Salmonella enterica* subsp *enterica* serovar Enteritidis traced to a bakery. *BMC Infect Dis* 4 : 48.
  20. Shangkuan YH, Lin HC. 1998. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella typhi* and other *Salmonella* species. *J Appl Microbiol* 85 : 693-702.
  21. Johnson JR, Clabots C. 2000. Improved

- repetitive-element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures. *Clin Diagn Lab Immunol* 7 : 258-264.
22. Woo YK, Lee SH. 2006. Genetic diversity of multi-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* isolates from animals and humans. *J Microbiol* 44(1) : 106-112.
23. Betancor L, Schelotto F, Martinez A, et al. 2004. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. *J Clin Microbiol* 42(3) : 1155-1162.
24. Schrank IS, Mores MA, Costa JL, et al. 2001. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect *Salmonella* in poultry industry products and clinical samples. *Vet Microbiol* 82(1) : 45-53.
25. Whyte P, Mc Gill K, Collins JD, et al. 2002. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. *Vet Microbiol* 89 : 53-60.
26. Hong Y, Berrang ME, Liu T, et al. 2003. Rapid detection of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, and *Salmonella enterica* on poultry carcasses by using PCR-enzyme-linked immunosorbent assay. *Appl Environ Microbiol* 69(6) : 3492-3499.
27. 임형근, 이경희, 홍종해 등. 2003. *Salmonella* spp의 RAPD typing을 위한 primer의 분리력 비교. 한국식품위생안전성학회지 18(4) : 224-228.
28. Lee YJ, Kim BH, Kim KS. 2004. Analysis of *Salmonella gallinarum* isolates by randomly amplified polymorphic DNA. *Kor J Vet Publ Hlth* 28(1) : 1-5.
29. 이동석. 2001. *Salmonella gallinarum* 국내 분리주의 특성과 DNA Fingerprinting. 강원대학교 석사학위논문.
30. 최원중. 2003. 도축돈에서 분리한 살모넬라균의 혈청형 및 유전자형의 분포. 강원대학교 석사학위논문.
31. Chambers JR, Bisailion JR, Labbe Y, et al. 1998. *Salmonella* Prevalence in crops of Ontario and Quebec broiler chickens at slaughter. *Poult Sci* 77 : 1497-1501.
32. 축산물의 가공기준 및 성분규격. 2003. 국립수의과학검역원.
33. 국립수의과학검역원. 2003. 국가항생제내성안전관리사업보고서. 식품의약품안전청.
34. Guo L, Killefer J, Kenny PB, et al. 1999. Use of Arbitrary primed polymerase chain reaction to study *Salmonella* ecology in a turkey production environment. *Poult Sci* 78 : 24-31.
35. Ewing WH. 1986. Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4 eds. Elsevier, New York.
36. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard*. 2 eds. M31-A2, NCCLS, Wayne, Pa.
37. Kim SH, Chun SG, Lim OY, et al. 2004. Genomic relationship of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* DT104 isolates from Korea and the United States. *J Microbiol* 42(1) : 14-19.
38. Disease Control Newsletter. 2005.

- Minesota Department of Health* 33(2) : 13-20,
39. L Plym F, Wierup M. 2006. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev Sci Tech* 25(2) : 541-554.
  40. 국립수의과학검역원. 2003. 축산용 항생제 관리시스템 구축. 식약청 용역사업 보고서 : 1-117.
  41. 국립수의과학검역원. 2004. 국가항생제내성안전관리사업보고서. 식품의약품안전청.
  42. 국립수의과학검역원. 2004. FAO/OIE/WHO 합동 동물용 항균물질 안전사용 및 내성 관리 워크숍 자료집.
  43. WHO. 2004. Joint FAO/OIE/WHO 2nd Workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: Management options. Oslo, Norway, 15-18 March, 2004.
  44. 일본 농림수산성. 2003. 가축유래세균의 항균물질감수성 실태조사.
  45. Esaki H, Morioka A, Ishihara K, et al. 2004. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine, and poultry(2001-2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *J Antimicrob Chemother* 53 : 266-270.
  46. Antunes P, Reu C, Sousa JC, et al. 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol* 82(2) : 97-103.
  47. Chung YH, Kwon YI, Kim SH, et al. 2004. Antimicrobial susceptibilities and epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates in Korea by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *J Food Prot* 67(2) : 264-270.