

## 소와 돼지유래 다제내성 *Salmonella* 속 균의 분자유전학적 특성

이우원\* · 정병열<sup>1</sup> · 이강록 · 이동수 · 김용환<sup>2</sup>

부산광역시 보건환경연구원 축산물위생검사소, <sup>1</sup>국립수의과학검역원,  
<sup>2</sup>경상대학교 수의과대학

(접수 2009. 3. 3, 게재승인 2009. 3. 20)

## Molecular genetic characterization of multiple antimicrobial resistant *Salmonella* spp. isolated from pigs and cattle

Woo-Won Lee\*, Byeong-Yeal Jung<sup>1</sup>, Gang-Rok Lee, Dong-Soo Lee, Yong-Hwan Kim<sup>2</sup>

Veterinary Service Laboratory, Busan Metropolitan City Institute of Health and Environment, Busan 616-810, Korea

<sup>1</sup>National Veterinary Research & Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

(Received 3 March 2009, accepted in revised from 20 March 2009)

### Abstract

At the present study, it was aimed to explore the molecular genetic characterization of multiple antimicrobial resistant *Salmonella* spp. isolates from pigs and cattle. A total of 138 *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) isolates were typed with phage, among them, 83.3% of *S. Typhimurium* tested could divide into a 10 phage types. Definitive type 193 (DT193) (25.4%) and DT195 (24.6%) were exhibited as the dominant types. DT104 and U302 were found from pigs and cattle. On the other hand, *S. Enteritidis* had 6 phage types, of them, phage type 21 (PT21) and PT11b were the popular types. In the plasmid profiles, 135 of *S. Typhimurium* isolates were exhibited 1 to 6 plasmid bands which molecular weight ranged from 90 to 2kb. 35 isolates (25.4%) harbored a 90kb plasmid which is thought to be the serotype specific virulence plasmid. Two of twenty five *S. Enteritidis* had common plasmids at 2 and 1.5kb. With multiplex polymerase chain reaction, virulence genes (*invA* and *spvC*) were detected from all *Salmonella* spp. from 167 of *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* and chloramphenicol resistant *S. Schwarzengrund*, but some drug resistant genes, such as PSE-1, *cmltR* and *flo* were not determined but other drug resistant genes, for example TEM and *int* were found. The detection rates of *spvC*, TEM and *int* gene was 35.3%, 29.3% and 72.5%, respectively. The TEM gene was highly popular in *S. Typhimurium*, which was detected from ampicillin and amoxicillin resistant strains as 95.9%. *int* gene was able to detect from all the isolates identified as multi-drug resistant (MDR), particularly DT193 was thought as the most prevalent virulence and multidrug resistance isolate. The major plasmid profile and drug resistance pattern of DT193 were 90, 40, 10.5, 6.3, 3.0kb and ACCbDNaPSSuT, respectively. MDR was commonly found in other phage types, particularly DT104, U302 and DT203.

**Key words** : Definitive type, Phage type, Plasmid, MDR, Virulence gene

\*Corresponding author: Woo-Won Lee, Tel. +82-51-331-0095,  
Fax. +82-51-338-8266, E-mail. leewoow@korea.kr

## 서 론

살모넬라감염증의 역학적 연구는 serotype, 생물형, 약제내성형, phage type 등의 조사를 비롯하여 근년에는 plasmid profile, PCR기법을 기초로 한 분자유전학적 분석 및 제한효소 처리에 의한 DNA의 절단 양상 등을 분석하여 역학관계를 규명하고 있다(Gahring 등, 1990).

면역이란 개념이 의학계에 도입되면서 발달한 serotyping은 오랫동안 미생물의 역학적 연구에 사용되어 왔으나 살모넬라 균종에 의한 질병발생이 증가하면서 serotyping만으로는 역학적인 관련성을 규명하는 데에는 한계가 있었고 이를 보완하기 위하여 bacteriophage typing scheme (PTS)이 개발되었다(Anderson 등, 1977). 특히 PTS는 균의 특성이나 전파경로의 추적 등 역학적으로 세균을 종 이하 수준까지 분류할 수 있고, 세균 속주가 특정 phage에 감염되어 균이 사멸되어 나타나는 plaque 또는 lysis 양상 등을 이용하여 판별하는 기법이다. *S. Typhimurium*의 PTS 기법은 1977년 Anderson 등에 의해서 시작되었고, Ward 등(1987)이 10종의 typing phage를 이용하여 PTS 기법을 정립하면서 전 세계적으로 널리 이용되고 있다(Gebreyes 등, 2004; Nygard 등, 2004); Rychlik 등, 2000).

그러나 이 방법만으로 살모넬라감염증의 역학적인 관련성을 완전히 분석할 수는 없기 때문에 증가추세에 있는 약제내성 *Salmonella*속 균의 역학적 분석은 분자생물학의 발전과 함께 다각도로 진행되고 있다. CDC (The Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA)에서는 *Salmonella*속 균의 약제내성 감시체계를 수립하였으며, National *Salmonella* Antimicrobial Resistance Monitoring System Study에서 1996년에 CDC가 발표한 자료에 의하면 3,903주의 *Salmonella* 분리균주 중 976주(25%)가 *S. Typhimurium*이었고, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfonamides 및 tetracycline의 5제 내성형인 ACSSuT가 1990년에 7% 수준이었던 것이 약 28%(275 of 976)로 증가하였다. 또 다른 두 연구자의 약제내성 조사에서도 유사한 다제내성 *Salmonella* 속 균의 증가를 보고하였고 (Bolton 등, 1999; Khan 등, 2000), 이러한 약제내성 유전자의 획득은 plasmid, transposon, integronmediated mechanism에 의한다고 하였다(Baggesen 등, 2000; Briggs와 Fratamico, 1999; Chen 등, 2004). Plasmid

DNA는 *Salmonella*속 균을 포함한 여러 장내세균에서 약제내성 뿐만 아니라 장관부착능, 장관침입능, 독소생성능 등의 유전정보를 암호화하고 있다(Gahring 등, 1990). *Salmonella*속 균의 virulence plasmid는 serotype에 따라 50~94kb 범위의 plasmid에 의하며, *S. Choleraesuis*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin* 및 *S. Typhimurium*의 virulence plasmid는 각각 50, 60, 80 및 94kb의 plasmid와 관련이 있음이 확인되었다(Haneda 등, 2001). 또한 *Salmonella*속 균의 R-plasmid에 관한 연구에서 *S. Typhimurium* PT179의 ampicillin과 tetracycline에 대한 내성은 60Md plasmid와 관계하고, sulfamethoxazole/ trimethoprim에 대한 내성은 8.7, 5.2 및 2.1Md과 관련이 있다(Anderson, 1980). Jelesic 등 (2003)에 의하면 38Md을 보유한 *S. Enteritidis*는 모든 항생제에 대하여 감수성이었고, *S. Typhimurium*의 경우 50Md의 plasmid를 보유한 균주가 모든 항생제에 대해서 감수성을 나타내며, streptomycin 내성균주는 50Md과 1.7Md의 plasmid를, 다제내성균주는 50~1.4 Md 크기의 4~7개의 plasmid를 가지고 있다.

일반적으로 사람의 살모넬라감염증은 1950년대까지 *S. Typhi*에 의한 typhoid fever가 주종을 이루었으나 그 이후로 nontyphoid *S. Typhimurium*에 의한 살모넬라감염증의 발생이 증가하였다. 이것은 식용 동물인 닭, 소, 돼지 등이 *Salmonella*속 균에 감염되어 보균자가 됨으로써 식육을 매개로 한 감염이 주종을 이루었기 때문이다(Murray 등, 1999). 이와 같은 살모넬라감염증의 역학적 연구기법이 다양화됨에 따라 유럽의 여러 나라와 미국에서 사람의 nontyphoid salmonellosis에 대한 serotype과 phage type이 변화된 것으로 관찰되었다(Murray 등, 1999). Serotype의 변화는 계란과 관련된 *S. Enteritidis*의 감염증이 현저하게 증가하였고, phage type의 변화는 다제내성 *S. Typhimurium* phage type의 증가, 특히 *S. Typhimurium* DT104(내성유형 ACSSuT)의 출현과 급속한 확산에 기인된 것으로 알려져 있다(Duijkeren 등, 2002). *S. Typhimurium* DT104는 1984년 영국에서 처음으로 분리되었고, 그 이후 이탈리아, 독일, 덴마크 등 유럽과 미국, 캐나다 등으로 급속히 확산되었으며, 닭, 면양, 돼지, 말 등 여러 동물과 사람에서 폭발적으로 분리되고 있다(Gebreyes 등, 2004; Gorman과 Adley 등, 2004). 또 다른 *S. Typhimurium*의 중요한 phage type 중의 하나는 내성유형이 *S. Typhimurium* DT104와 유사한 다제내성 PT193이다. 이 type은 1980년대부터 1990년 초기에 오염된 돼지

고기 가공품을 통하여 이탈리아와 영국 등에 유행하였으며, 최근 미국의 돼지에서 많이 분리되고 있다 (Duijkeren 등, 2003; Gebreyes, 2002; Nastasi와 Mammina, 2000; Threfall 등, 2003). 당시에 분리된 다제내성 *S. Typhimurium*의 주요 phage type은 DT193과 DT204 이었고, *S. Enteritidis* phage type은 PT4와 PT8이었다 (Baggesen 등, 2000).

다양한 세균의 역학적 분석기법으로 활용되고 있는 PCR 기법은 *Salmonella*속 균에서도 이용되고 있으며, 그 중 장점막 침습성에 관련된 virulence gene인 *invA*와 숙주 세포내에서 *Salmonella*속 균의 성장을 증가시키고 숙주 면역체계와 상호작용하는 *spvC*에 관한 연구가 많이 이루어지고 있다 (Bolton 등, 1999; Chiu와 Ou, 1996). 또한 최근 다제내성 ACSSuT *S. Typhimurium* DT104에 대한 연구가 활발해지면서 PCR 기법을 이용한 chloramphenicol (*cat1*, *cat2*, *cml*), tetracycline (*tetA*, *tetG*), streptomycin (*aadA*, *aadB*, *strAB*),  $\beta$ -lactams (PSE-1, TEM), sulfonamides (*sul*) 및 florfenicol (*flo*) 등의 내성유전자, integron capture, mobile gene 및 약제내성에 관계하는 *int* gene 등 약제내성 관련 유전인자를 검색하는 연구가 활발하게 수행되고 있다 (Bolton 등, 1999; Carlson 등, 1999; Chen 등, 2004; Chiu와 Ou, 1996; Gebreyes 등, 2002; Khan 등, 2000; Randall 등, 2004; Swamy 등, 1996). 그러나 국내에서의 연구실정을 보면 phage typing과 plasmid profile에 이용한 소와 돼지유래 *S. Typhimurium*에 대한 공시균주 수가 매우 적고 (김, 2000; 최 등, 1992; 김 등, 1995), *S. Enteritidis*의 경우는 가금에 한정되어 있다 (우 등, 2000). 또한 ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT104와 다른 phage type의 다제내성 *S. Typhimurium*에 대한 연구는 유럽, 미국 등과 비교해 볼 때 매우 미미한 실정이다.

본 실험에서는 도축된 소와 돼지의 맹장내용물과 림프절에서 분리한 *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* 및 chloramphenicol에 대하여 내성을 보이는 *S. Schwarzengrund*를 대상으로 다제내성 *Salmonella*속 균의 분자유전학적 특성을 규명하고자 plasmid profile과 phage typing을 실시하는 한편, multiplex PCR을 이용하여 virulence gene (*invA*와 *spvC*), *Salmonella* specific gene (*SipB/C*) 및 약제내성 관련 유전자 (TEM, PSE-1, *cml tetR*, *flo* 및 *int* gene)를 검출하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

공시균주는 2000년 12월부터 2001년 11월까지 부산 지역 도축장에서 도축된 소와 돼지의 맹장내용물과 림프절에서 분리한 *S. Typhimurium* 138주와 *S. Enteritidis* 25주 및 chloramphenicol 내성 *S. Schwarzengrund* 4주를 사용하였다.

### Phage typing

Serotyping에서 동정된 *S. Typhimurium* 138주와 *S. Enteritidis* 25주에 대하여 phage typing을 실시하였다. *S. Typhimurium*의 phage typing은 Anderson 등(1977)의 방법에 따라 24종의 normal phage set와 5종의 additional phage를 이용하여 동정하였으며, *S. Enteritidis*의 phage typing은 Ward 등(1987)의 방법에 준하여 16종의 normal phage set를 사용하였다. 분리균주를 nutrient broth (NB, Difco, USA)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 균액을 nutrient agar plate (NA, Difco, USA)에 접종하고 표면의 물기를 건조시켰다. 또한 NB에서 사전 역가검정을 실시하여 RTD (routine test dilution)로 조정된 각 type의 phage 용액을 phage applicator로 접종하고 37°C에서 24시간 배양하여 판독하였다.

판독은 숙주세포가 각 type의 phage 용액에 의해서 특이적인 반응을 보인 용균 양상을 phage형 표준 판독 표에 따라 판독하였다. 표준파지에 대해서 반응은 보이나 5종의 additional phage를 이용하여도 명확히 결정할 수 없는 균주는 RDNC (reacts with phages but does not confirm)로 규정하였다. 시험에 사용된 phage와 type strain은 영국의 International Centre for Enteric Phage Typing (ICEPT), Central Public Health Laboratories (CPHL)에서 분양 받아 사용하였다.

### Plasmid DNA 분리

*Salmonella*속 균의 plasmid profile은 Sambrook 등 (1989)의 alkaline lysis method로 plasmid를 분리하였다. 균체를 LB broth (Difco, USA) 5ml에 접종하여 37°C에서 18시간 진탕 배양한 다음, 배양액 1.5ml을 원심하여 얻은 균체에 solution I (50mM glucose, 10mM EDTA, 25mM Tris · Cl, pH 9.0, 4mg/ml lysozyme) 100 $\mu$ l를 가하여 실온에 5분간 방치하였다. 여기에 solution II

(0.2 N NaOH, 1% SDS) 200 $\mu$ l를 가하여 얼음 속에 5분간 방치한 다음, solution III (3 M potassium acetate, pH 4.8) 150 $\mu$ l를 첨가하여 다시 얼음 속에 10분간 방치한 후 원심 분리하여 상청액을 얻었다. 여기에 동량의 TE saturated phenol/chloroform을 가하고 원심 분리하여 상청액을 취한 다음 두 배 용량의 cold ethanol을 가하여 실온에서 10분간 방치한 후 원심 분리하여 DNA를 침전시켰다. DNA pellet은 70% ethanol로 세척하고 TE buffer (pH 8.0) 50 $\mu$ l로 용해하였다. *Salmonella*로부터 분리한 plasmid는 Mayer (1988)의 방법에 준하여 loading buffer (30% glycerol, 50mM EDTA, 0.025% bromophenol blue in 50mM Tris · HCl, pH 8.5)와 2 : 1로 혼합하여 agarose gel (Difco, USA)상에 loading하고 TBE buffer (40mM Tris, 20mM boric acid, 1 mM EDTA; Invitrogen) 하에서 80~100 volt로 3~5시간 동안 전기영동을 실시하였다. Agarose (Sigma, USA) gel을 0.5 $\mu$ g/ml의 ethidium bromide (Gibco, USA) 용액에 담근 후 UV transilluminator (Hoefer, USA)를 사용하여 plasmid를 확인하였다.

### Multiplex polymerase chain reaction (PCR)

Multiplex PCR은 본 실험에서 분리한 *S. Typhimurium* (138주), *S. Enteritidis* (25주) 및 chloramphenicol 내성 *S. Schwarzengrund* (4주)에 대해서 실시하였다. PCR에 사용된 표준균주는 미국 워싱턴 주립대학교에서 분양 받은 *S. Typhimurium* WSU 2562, 2657 및 2664(내성유형 ACSSuT, DT104)와 미국 코넬대학교에서 분양 받은 *S. Typhimurium* Cornell 7(내성유형 ACSSuT, DT104)을 사용하였다.

### DNA 추출

공시된 균주로부터 chromosomal DNA추출은 Chen 등(2004)의 방법에 따라 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 사용하여 추출하였다.

### Oligonucleotide primer의 합성

PCR에 사용된 oligonucleotide primer의 염기서열과 증폭산물의 크기는 Table 1에서와 같이 *invA*와 *spvC*, *SipB/C*, *cml/tetR*, PSE-1, TEM, *flo* 및 *int*를 Bioneer (Korea)에 합성 의뢰하여 사용하였다.

### Multiplex PCR에 의한 gene의 검출

Multiplex PCR 수행은 T-gradient (Biometra, Germany)와 GeneAmp PCR system 2700 (AB, USA)을 이용하였다.

***invA*와 *spvC* gene:** Multiplex PCR은 Chiu와 Ou (1996)의 방법을 수정 보완하여 10 $\times$ PCR buffer 2.5 $\mu$ l, 10mM dNTP 2.5 $\mu$ l, template DNA 1 $\mu$ l, 20pM primer 각 0.5 $\mu$ l, Taq polymerase (Promega, USA) 0.2 $\mu$ l를 포함하여 최종량이 25 $\mu$ l가 되게 하였다. PCR은 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 denaturation시킨 후, 95 $^{\circ}$ C에서 20초, 56 $^{\circ}$ C에서 40초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 조건으로 총 30cycle을 수행한 후 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 extension시켰다.

***SipB/C*, *cml/tetR*, PSE-1 및 TEM gene:** Multiplex PCR은 Carlson 등(1999)의 방법을 수정 보완하여 10 $\times$ PCR buffer 2.5 $\mu$ l, 각 10mM dNTP 0.5 $\mu$ l, template DNA 1 $\mu$ l, 20pM primer 각각 0.5 $\mu$ l (*SipB/C*는 0.25 $\mu$ l),

**Table 1.** Synthetic oligonucleotides used as primers for PCR

Primer (gene)	Sequence (5'-3')	Size (bp)	Reference
<i>invA</i>	ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT	244	Chiu and Ou (1996)
<i>spvC</i>	ACT CCT TGC ACA ACC AAA TGC GGA TGT CTT CTG CAT TTC GCC ACC ATCA	571	Chiu and Ou (1996)
<i>SipB/C</i>	ACA GCA AAA TGC GGA TGC TT GCG CGC TCA GTG TAG GAC TC	250	Carlson et al. (1999)
<i>cml/tet</i>	RCGC TCC TTC GAT CCC GT GCT GCG TTC ATC TAC AAC AGAT	280	Carlson et al. (1999)
PSE-1	TTT GGT TCC GCG CTA TCTG TAC TCC GAG CAC CAA ATC CG	150	Carlson et al. (1999)
TEM	GCA CGA GTG GGT TAC ATC GA GGT CCT CCG ATC GTT GTC AG	310	Carlson et al. (1999)
<i>flo</i>	AAT CAC GGG CCA CGC TGT ATC CGC CGT CAT TCT TCA CCT TC	215	Bolton et al. (1999)
<i>int</i>	CCT CCC GCA CGA TGA TC TCC ACG CAT CGT CAG GC	280	Bolton et al. (1999)

Taq poly-merase (SolGent, Korea) 0.2 $\mu$ l, 1  $\times$  band doctor를 포함하여 최종량이 25 $\mu$ l가 되게 하였다. PCR은 95°C에서 2분간 denaturation시킨 후, 95°C에서 20초, 52°C에서 40초, 72°C에서 1분 조건으로 총 35cycle을 수행한 후 72°C에서 5분간 extension시켰다.

**flo와 int gene:** Multiplex PCR은 Bolton 등(1999)의 방법을 수정 보완하여 10  $\times$  PCR buffer 2.5 $\mu$ l, 각 10mM dNTP 0.5 $\mu$ l, template DNA 1 $\mu$ l, 20 pM primer 각각 0.5 $\mu$ l, Taq polymerase (SolGent, Korea) 0.2 $\mu$ l를 포함하여 최종량이 25 $\mu$ l가 되게 하였다. PCR은 95°C에서 2분간 denaturation시킨 후, 95°C에서 20초, 56°C에서 40초, 72°C에서 1분 조건으로 총 35cycle을 수행한 후 72°C에서 5분간 extension시켰다.

PCR에 의해서 증폭된 산물은 2.0% agarose (Sigma, USA) gel을 사용하여 120~140 volt에서 1~2시간 동안 TBE buffer (40mM Tris, 20mM boric acid, 1mM EDTA; Invitrogen)로 전기영동 하였고, EtBr (Gibco, USA)로 염색시킨 후 UV transilluminator (Hoefer, USA)를 사용하여 DNA를 확인하였다. Marker로는 100bp DNA Ladder (Promega, USA),  $\Phi$  X 174 DNA/*Hinf*I Markers (Promega, USA)를 사용하였다.

## 결 과

### Phage typing

**S. Typhimurium:** *S. Typhimurium* 138주에 대한

phage typing 결과 Table 2와 같이 10종류의 phage type으로 동정되었다. 소와 돼지에서 DT193이 35주(25.4%)로 가장 높은 분포를 나타내었고, 다음 DT195 (24.6%), DT194(10.1%), DT203(8.7%) 및 U302(4.4%) 순이었다. 또한 phage와 반응은 일어나나 phage type이 확인되지 않는 RDNC type이 4주였다.

돼지유래균에서 DT195가 34주(25.7%), DT193이 31주(23.5%)가 분리되어 비교적 높은 분포를 나타내었고, DT194(14주), DT203(12주), U302(5주), DT104와 DT46A(각 3주), DT22, U288variant 및 U308(각 1주)이 분리되었다. 소유래균에서는 DT193이 4주(66.7%)로 가장 많았고, U302와 U308은 각 1주였다.

**S. Enteritidis:** *S. Enteritidis* 25주에 대한 phage typing 결과는 Table 3과 같이 6종류의 phage type으로 동정되었다. 돼지유래균에서 PT21이 6주(24.0%)로 가장 높은 분포를 나타내었고, 다음 PT11b(5주), PT1(3주), PT3과 PT33(각 2주) 및 PT35(1주) 순이었다. 소 유래균에서는 *S. Enteritidis*가 분리되지 않았다.

### Plasmid profiles

*S. Typhimurium* 138주에 대한 plasmid profile과 phage type 및 약제내성유형과의 상호관계를 비교 검토한 결과 Table 4와 Fig. 1에서 보는 바와 같이 plasmid profile은 90~2.0kb 크기의 15종의 profile로 분류되었고, 135주가 1~6개의 band를 보유하고 있었다. plasmid profile은 90, 40, 10.5, 6.3, 3.0 profile이 34주(24.6%)로 가장 높은 분포를 나타내었고, 이들 중 가장

**Table 2.** Phage types of 138 *S. Typhimurium* isolates from pigs and cattle

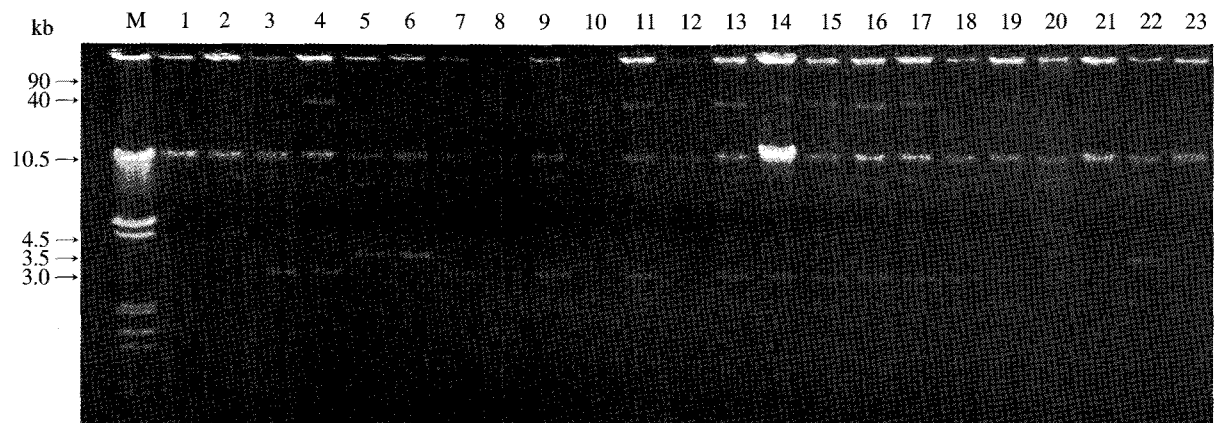
Animal	No. of isolates with <i>S. Typhimurium</i> phage type												Total (%)
	DT 22	DT 46A	DT 104	DT 193	DT 194	DT 195	DT 203	DT 288v	DT U302	DT U308	RD NC*	UT**	
Pig	1	3	3	31 (23.5)	14	34 (25.7)	12	1	5	1	4	23	132 (95.7)
Cattle	0	0	0	4 (66.7)	0	0	0	0	1	1	0	0	6 (4.4)
Total	1	3	3	35 (25.4)	14 (10.1)	34 (24.6)	12 (8.7)	1	6 (4.4)	2	4	23	138 (100)

\*Reacts with phages but does not confirm, \*\*Untypable

**Table 3.** Phage types of 25 *S. Enteritidis* isolates from pigs

Animal	No. of isolates with <i>S. Enteritidis</i> phage type							Total (%)
	PT1	PT3	PT11b	PT21	PT33	PT35	UT*	
Pig	3	2	5	6 (24.0)	2	1	6	25 (100)

\*Untypable



**Fig. 1.** Plasmid profiles of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*. [M;  $\lambda$  DNA/EcoRI+HindIII (Promega), lane 1~22: *S. Typhimurium* plasmid, lane 23: *S. Enteritidis* plasmid].

**Table 4.** Relationship between plasmid profiles, phage types and resistance patterns of 138 *S. Typhimurium* isolates from pigs and cattle

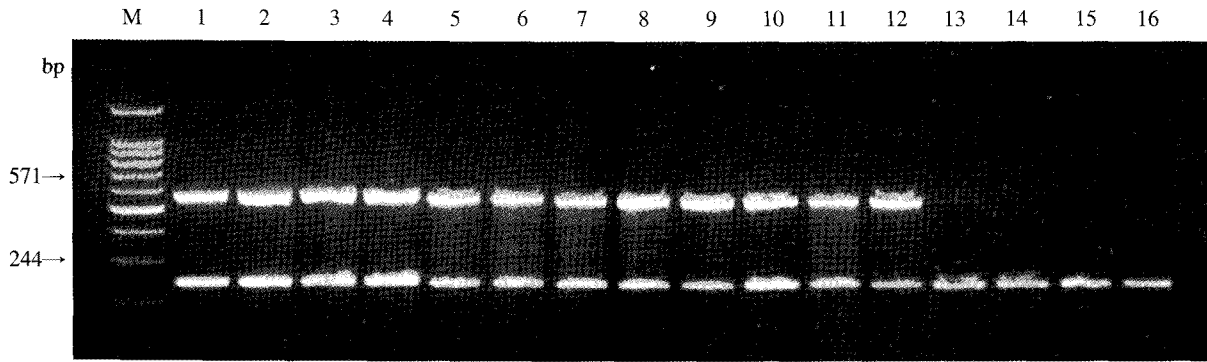
Plasmid profile (kb)	No. of isolates	Dominant phage type and resistance pattern with plasmid profile (No. of isolates)	
		Major phage type	Major resistance pattern*
90, 40, 10.5, 6.3, 3.0	34	DT193 (19)	ACCbDNA PSSuT (32)
40, 10.5, 6.3, 4.5, 3.0	28	DT195 (24)	D(An, Cb, N, Na, P)ST (28)
40, 10.5, 6.3, 3.0	19	DT203 (6)	ACCbDNA PSSuT (9)
40, 10.5, 8.1, 3.5	18	DT193 (7), UT (7)	D(Cb, N, Na, P)ST (18)
40, 10.5, 3.5	11	UT*** (8)	D(Na, P)ST (10)
40, 6.3	5	DT195 (3)	DST (5)
40, 10.5, 6.3, 2.0	4	DT194 (3)	ACbDPST (2)
40, 10.5	4	DT203 (2)	D(P)ST (4)
40, 10.5, 8.1, 3.3	3	DT193 (2)	D(P)ST (2)
10.5, 3.0, 2.5	3	DT46A (3)	DT (3)
10.5, 3.0	2	DT193 (1), DT194 (1)	CDPST (1)
40, 12, 10.5, 6.3, 4.5, 3.0	1	DT195	DST (1)
40, 10.5, 8.1, 3.5, 2.2	1	UT	DPST (1)
7.0, 5.0, 3.3, 2.8, 2.0	1	UT	DT (1)
90	1	DT193	DST (1)
ND**	3	UT (2)	P (1)
Total	138		

\*The resistance pattern means that the bacteria were resistant to all antibiotics out of parenthesis and simultaneously susceptible or resistant to more than one antibiotic into the parenthesis; \*\*Not detected; \*\*\*Untypable

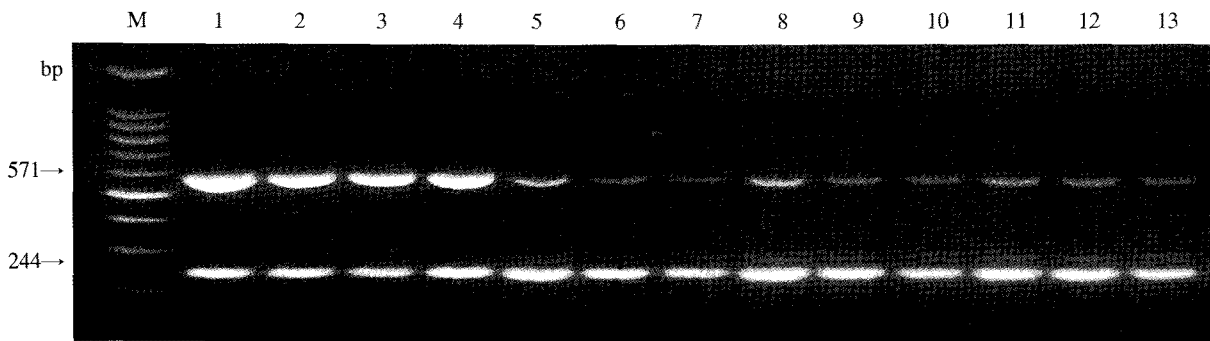
**Table 5.** Summary of PCR on virulence, *Salmonella* specific and antimicrobial resistant genes of 167 *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* and *S. Schwarzengrund* isolates

Isolate	No. (%) of isolates with gene							
	<i>invA</i>	<i>spvC</i>	<i>SipB/C</i>	<i>cml/tetR</i>	PSE-1	TEM	<i>flo</i>	<i>int</i>
<i>S. Typhimurium</i>	138 (100)	34 (24.6)	138 (100)	0	0	47 (34.1)	0	116 (84.1)
<i>S. Enteritidis</i>	25 (100)	25 (100)	25 (100)	0	0	0	0	0
<i>S. Schwarzengrund</i> *	4 (100)	0	4 (100)	0	0	2 (50.0)	0	4 (100)
Total	167 (100)	59 (35.3)	167 (100)	0	0	49 (29.3)	0	121 (72.5)

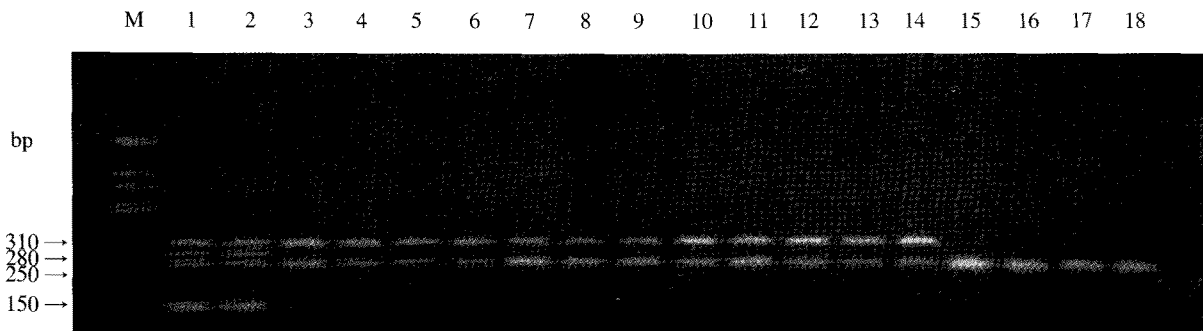
\*Chloramphenicol resistant isolates



**Fig. 2.** Multiplex PCR products amplified from *S. Typhimurium* isolates using two pairs of primers (*invA* and *spvC*). [M; 100bp DNA Ladder (Promega), lane 1; WSU2562, lane 2; WSU 2657, lane 3; WSU2664, lane 4; Cornel 7, lane 5~12; *S. Typhimurium* SN174, SN180, SN187, SN250, SN307, SNC309, SNC310, CN25, lane 13~16; SN164, SN282, SN315, CN27].



**Fig. 3.** Multiplex PCR products amplified from *S. Enteritidis* isolates using two pairs of primers (*invA* and *spvC*). [M; 100bp DNA Ladder, lane 1; WSU2562, lane 2; WSU 2657, lane 3; WSU2664, lane 4; Cornel 7, lane 5~13; *S. Enteritidis*].



**Fig. 4.** Multiplex PCR products amplified from *S. Typhimurium* isolates using four pairs of primers (*SipB/C*, *cml/tetR*, PSE-1 and TEM). [M;  $\Phi$  X 174 DNA/*Hinf* I Markers (Promega), lane 1; WSU2562, lane 2 WSU 2664, lane 3~11; *S. Typhimurium* SN163, SN164, SN178, SN180, SN248, SN252, SC48, CNC16, CN27, lane 12~14; *S. Typhimurium* DT104, SN282, SN309, SN310), lane 15~18; SN75, SN296, SC16, CN18].

많이 분리된 phage type은 DT193(55.9%)이었으며, 대부분의 균주(94.1%)가 ACCbDNaPSSuT의 다제내성 균주로 확인되었다. 다음으로 40, 10.5, 6.3, 4.5, 3.0 profile이 28주(20.3%)로서 가장 많이 분리된 phage type은 DT195(85.7%)이었고, 주요 약제내성유형은

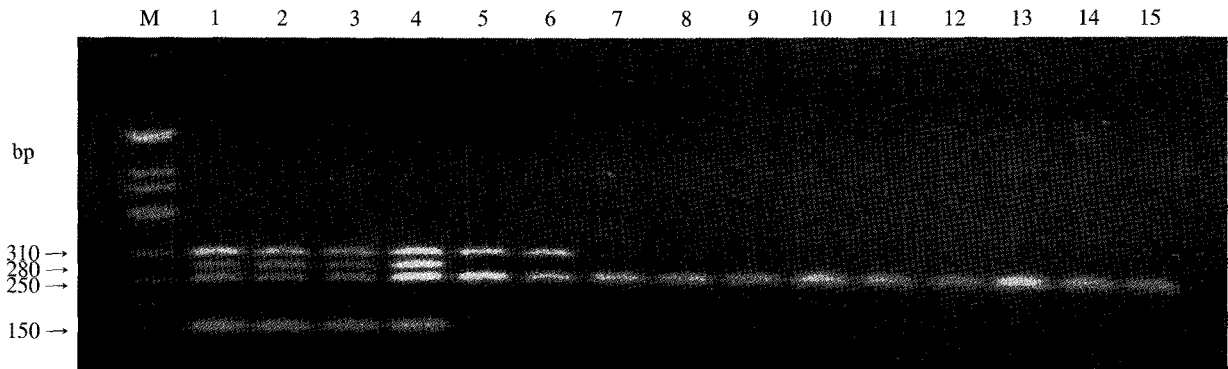
DST 3제내성유형을 보이면서 An, Cb, N, Na, 또는 P 중 1개 또는 그이상의 항생제에 내성을 보이는 D (An,Cb,N,Na,P) ST 내성형으로 나타났으며, 나머지 3주에서는 plasmid가 분리되지 않았다. 한편 *S. Enteritidis* 25주에 대한 plasmid profile은 2주에서 2.0과

1.5kb 크기의 plasmid band가 확인되었지만 chloramphenicol 내성균주인 *S. Schwarzengrund* 4주에서는 plasmid가 분리되지 않았다.

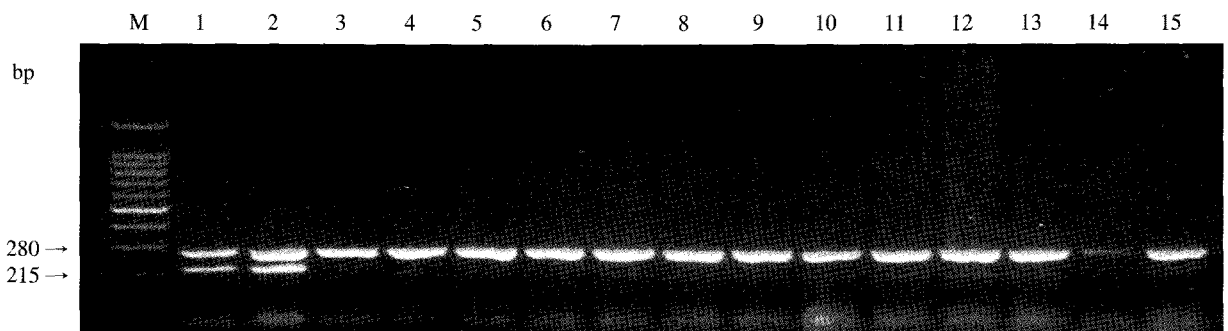
### Multiplex PCR에 의한 gene의 검출을

#### 분리주별 검출을

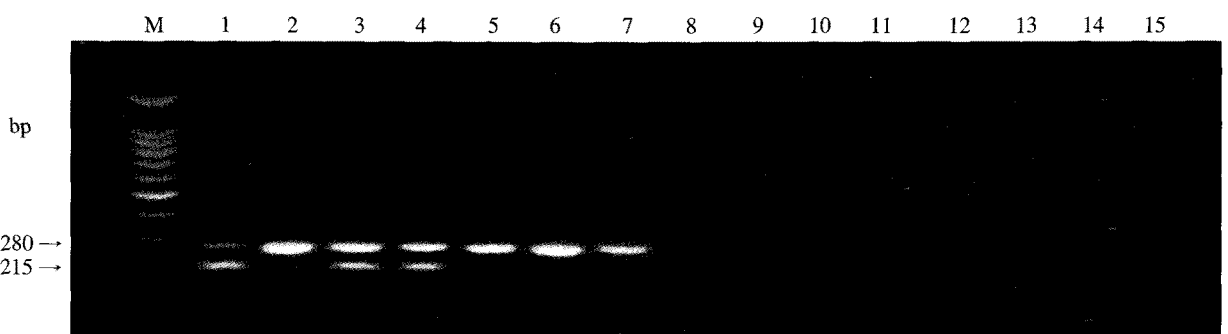
*S. Typhimurium* 138주와 *S. Enteritidis* 25주 및 chloramphenicol 내성 *S. Schwarzengrund* 4주에 대하여 virulence gene (*invA*와 *spvC*), *Salmonella* specific gene



**Fig. 5.** Multiplex PCR products amplified from *S. Schwarzengrund* and *S. Enteritidis* isolates using four pairs of primers (*SipB/C*, *cml/tetR*, PSE-1 and TEM). [M:  $\Phi$  X 174 DNA/*Hinf* I Markers, lane 1: WSU2562, lane 2: WSU2657, lane 3: WSU2664, lane 4: Cornell 7, lane 5~7: *S. Schwarzengrund*, lane 7~15: *S. Enteritidis*].



**Fig. 6.** Multiplex PCR products amplified from *S. Typhimurium* isolates using two pairs of primers (*flo* and *int*). [M: 100bp DNA Ladder (Promega), lane 1: WSU2562, lane 2: WSU2664, lane 3~15: *S. Typhimurium* SN164, SN167, SN174, SN248, SN257, SN261, SN282, SN309, SN310, CN26, SC48, SC45, CN27].



**Fig. 7.** Multiplex PCR products amplified from *S. Typhimurium*, *S. Schwarzengrund* and *S. Enteritidis* isolates using two pairs of primers (*flo* and *int*). [M; 100 bp DNA Ladder (Promega), lane 1; WSU2562, lane 2; WSU2657, lane 3; WSU2664, lane 4; Cornell 7, lane 5~6; *S. Typhimurium* SN332, CN28, lane 7; *S. Schwarzengrund*, lane 8~15; *S. Enteritidis*].



(*SipB/C*) 및 약제내성 관련 유전자(TEM, PSE-1, *cml/tetR*, *flo* 및 *int*)를 검출하고자 multiplex PCR을 실시한 결과는 Table 5와 Fig. 3~7에서와 같이 *invA*와 *SipB/C* gene은 모든 균주에서 검출되었으나 *cml/tetR*, PSE-1 및 *flo* gene은 모든 균주에서 검출되지 않았다. *S. Typhimurium*에서 *spvC*, TEM 및 *int* gene의 검출율은 각각 24.6%, 34.1% 및 84.1%이었고, *S. Typhimurium*에서는 *spvC* gene이 100% 검출되었지만 TEM과 *int* gene은 검출되지 않았다. 또한 chloramphenicol 내성 *S. Schwarzengrund*에서 *spvC* gene은 검출되지 않았으며, TEM과 *int* gene은 각각 2주와 4주에서 검출되었다.

**Phage type별 검출율**

*S. Typhimurium* 138주에 대하여 phage type에 따른 gene의 검출빈도를 조사한 결과 Table 6과 9에서와 같았다. 소와 돼지에서 많이 분리되는 phage type DT193에서 *spvC*, TEM 및 *int* gene의 검출율은 각각 25.7%, 65.7% 및 97.1%로서 높은 분리빈도를 나타내었다. DT104, U302 및 DT203에서도 *spvC*, TEM 및 *int* gene의 검출율이 높은 것으로 조사되었다.

**Plasmid profile별 검출율**

Plasmid profile의 분리빈도가 비교적 높게 나타난 7종류의 profile별 *S. Typhimurium* 119주에 대한 gene의 검출율은 Table 7과 9에서와 같이 *int* 85.7%, TEM 36.1% 및 *spvC* 20.2% 이었다. 특히 TEM과 *int* gene의 경우 plasmid profile 90, 40, 10.5, 6.3, 3.0(각 94.1%와 100%)과 profile 40, 10.5, 6.3, 3.0(각 57.9%와 100%)에서 현저하게 높은 분리빈도를 나타내었다.

**내성형별 검출율**

*S. Typhimurium*의 약제내성형의 종류에 따른 gene의 검출율은 Table 8과 9에서와 같이 TEM 및 *int* gene이 A(Ac,An,Cf)CCbDNaPSSuT 내성형(각 95.5%와 100%)과 ACb(C)DPST 내성형(각 100%)으로서 현저하게 높은 분리빈도를 나타내었다. 특히 TEM gene이 β-lactam 계열인 ampicillin과 amoxicillin 내성 49주 중 47주(95.9%)에서 검출되었다.

**Table 6.** PCR results for *spvC*, TEM and *int* genes in *S. Typhimurium* phage types

Phage type	No. of isolates	No. (%) of isolates with gene		
		<i>spvC</i>	TEM	<i>int</i>
DT22	1	1	0	1
DT46A	3	3	0	0
DT104	3	2	3 (100)	3 (100)
DT193	35	9 (25.7)	23 (65.7)	34 (97.1)
DT194	14	2	7 (50.0)	14 (100)
DT195	34	6	2	21 (61.8)
DT203	12	1	8 (66.7)	12 (100)
DT288var	1	0	0	1
DT U302	6	1	4 (66.7)	6 (100)
DT U308	2	2	0	1
RDNC*	4	1	0	3
UT**	23	6	0	20
Total	138 (100)	34 (24.6)	47 (34.1)	116 (84.1)

\*Reacts with phages but does not confirm \*\*Untypable

**Table 7.** PCR results for *spvC*, TEM and *int* genes in *S. Typhimurium* isolates with different plasmid profiles

Plasmid profile	No. of isolates	No. (%) of isolates with gene		
		<i>spvC</i>	TEM	<i>int</i>
40, 6.3	5	2	0	4
40, 10.5	4	1	0	3
40, 10.5, 3.5	11	3	0	9 (81.8)
40, 10.5, 6.3, 3.0	19	2	11 (57.9)	19 (100)
40, 10.5, 8.1, 3.5	18	6 (33.3)	0	16 (88.9)
40, 10.5, 6.3, 4.5, 3.0	28	3	0	17 (60.7)
90, 40, 10.5, 6.3, 3.0	34	7	32 (94.1)	34 (100)
Total	119	24 (20.2)	43 (36.1)	102 (85.7)

**Table 8.** PCR results for *spvC*, TEM and *int* genes in *S. Typhimurium* isolates showing different resistance patterns

Resistance pattern*	No. of isolates	No. (%) of isolates with gene		
		<i>spvC</i>	TEM	<i>int</i>
A(Ac,An,Cf)CCbDNaPSSuT	44	7	42 (95.5)	44 (100)
ACb(C)DPST	5	0	5 (100)	5 (100)
C(Cb)DNa(P)S(Su)T	4	3	0	4
CD(P)ST	4	1	0	4
DNa(P,Su)ST	8	1	0	8
D(Cb,N)PST	26	0	0	20
D(An,Cb)ST	40	15	0	28
DT	4	4	0	0
Susceptible(P)	3	3	0	3
Total	138	34	47	116

\*The resistance pattern means that the bacteria were resistant to all antibiotics out of parenthesis and simultaneously susceptible or resistant to more than one antibiotic into the parenthesis

**고 찰**

살모넬라감염증의 역학적 조사는 serotyping과 약제

내성유형을 파악하는 것만으로는 미흡하다. 균의 특성이나 전파경로를 추적하는 등 역학적으로 세균을 종이하 수준까지 분류하는 phage typing 기법(PTS)이 도

**Table 9.** Phage types, plasmid profiles and genotypes for multidrug resistant *S. Typhimurium* isolates

Isolates	Phage type	Resistance pattern	Plasmid type	Genotype identified
SN166	DT193	AAnCCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN164	DT193	ACCbDfDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN163	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN168	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN172	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN173	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN176	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN180	T193A	CCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN183	DT193	ACCbDNaPSSuT	II	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN185	DT193	ACCbDNaPSSuT	II	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , <i>int</i>
SN188	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN248	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN249	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN252	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN253	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN257	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN307	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN332	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
CN25	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
CN27	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
CN28	DT193	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN171	DT194	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN177	DT194	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN178	DT194	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN187	DT194	ACCbDNaPSSuT	IV	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , <i>int</i>
SN315	DT194	ACCbDNaPSSuT	III	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN167	DT195	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN170	DT195	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN169	DT203	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN174	DT203	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN179	DT203	ACCbDNaPSSuT	II	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN256	DT203	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN259	DT203	ACCbDNaPSSuT	II	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN260	DT203	ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN319	DT203	ACCbDNaPSSuT	II	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN334	DT193	ACCbDNaPSSuT	II	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SNC309	DT104	BACCbDNaPSSuT	II	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SNC310	DT104	BACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SNC282	DT104	B1ACCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN261	U302A	CCbDNaPSSuT	II	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN262	U302A	CCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
CN26	U302A	CCbDNaPSSuT	I	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SC48	DT193A	CCbDPST	V	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN313	DT194A	CbDPST	II	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN314	DT194A	CbDPST	III	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN316	DT194A	CbDPST	III	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN312	U302A	CbDPS	TII	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
CNC16	DT193	AnAcCbCfDNaPSSuT	II	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , TEM, <i>int</i>
SN250	DT195	CDNaPSSuT	III	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , <i>int</i>
SN247	DT193	CDNaSSuT	II	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , <i>int</i>
SNC311	U288v.	CbDNaPST	II	<i>invA</i> , <i>SipB/C</i> , <i>int</i>
SN194	DT193	DNaPSSuT	VI	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , <i>int</i>
WSU2562	DT104	ACSSuT	Not typed	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , <i>cml/tetR</i> , PSE-1, TEM, <i>flo</i> , <i>int</i>
WSU2657	DT104	ACSSuT	Not typed	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , <i>cml/tetR</i> , PSE-1, TEM, <i>flo</i> , <i>int</i>
WSU2664	DT104	ACSSuT	Not typed	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , <i>cml/tetR</i> , PSE-1, TEM, <i>flo</i> , <i>int</i>
Cornell7	DT104	ACSSuT	Not typed	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>SipB/C</i> , <i>cml/tetR</i> , PSE-1, TEM, <i>flo</i> , <i>int</i>

SN: *S. Typhimurium* isolated from swine lymphnode, SC: *S. Typhimurium* isolated from swine cecal content, SNC: *S. Typhimurium* var Copenhagen isolated from swine lymphnode, CN: *S. Typhimurium* isolated from cattle lymphnode, CNC: *S. Typhimurium* var Copenhagen isolated from cattle lymph node, WSU: Washington State University, Cornell: Cornell University. I; 90, 40, 10.5, 6.3, 3.0kb, II; 40, 10.5, 6.3, 3.0kb, III; 40, 10.5, 6.3, 2.0kb, IV; 40, 10.5, 3.5kb, V; 40, 10.5, 8.1, 3.3kb. VI: 10, 3.0kb

입되어 현재까지도 역학적 연구에 많이 활용되고 있다. 이 PTS 기법은 1977년 Anderson 등이 *S. Typhimurium*에 적용한 것이 시초이며, Ward 등(1987)은 10종의 typing phage를 이용하여 PTS 기법을 정립하면서 전 세계적으로 널리 이용되고 있다. 우리나라에서는 소와 돼지유래 *S. Typhimurium*에 대한 phage typing은 김(2000)이 조사한 바 있으나 사용한 균주의 수가 적었으며, *S. Enteritidis*의 경우는 가금유래균주에서만 보고되었다(우 등, 2000; 김, 2000).

본 실험에서 소와 돼지에서 분리된 *S. Typhimurium* 138주에 대한 phage type은 10종류가 분리되었고, 이 중 DT193(25.4%)이 가장 높은 분포를 나타내었으며, DT195(24.6%), DT194(10.1%), DT203(8.7%) 및 U302(4.4%) 순으로 나타났다.

Threlfall 등(1993)은 1981년부터 1990년까지 영국의 소와 돼지에서 분리된 *S. Typhimurium*은 DT193이 가장 높은 분포를 나타내었다고 하였고, Nastasi와 Mammina (2000)가 1992~1997년 사이에 이탈리아의 가축에서 분리한 다제내성 *S. Typhimurium*은 52.5%였으며, 이 중 가장 많이 분리되는 phage type은 DT193이었다. 근년 Carlson 등(2000)은 미국의 동물에서 분리된 다제내성 *S. Typhimurium* 432주의 phage type 분포조사에서 DT104가 가장 높은 율로 분리되었고, U302, DT193, DT208 순이라고 보고하였다. Davies 등(2004)에 의하면 1999~2000년간에 영국의 소, 돼지 및 양유래균에서 DT104(21.9%)가 가장 많이 분리되었고, 다음 DT193(18.7%), DT208(13.3%) 및 U302(13.3%) 순이었다. Gebreyes 등(2004)은 미국의 돼지유래 *S. Typhimurium* 484주(*S. Typhimurium* var Copenhagen 328주 포함)에서 DT104, DT193, DT21, DT208, DT12, U302, DT169 및 DT120 순으로 8종의 phage type이 분리되었다고 하였다. 또한 Izumiya 등(2001)은 일본의 사람과 동물에서 분리된 *S. Typhimurium* 221주의 phage type은 DT104(44.8%), PT193 (10.9%), U302(7.2%), PT194(6.8%) 순이었고, ACSSuT 내성형보다 많은 항생제에 내성을 나타내는 DT193 12주 중 7주가 ACSSuTKSxTmG 내성형이라고 하였다. 김(2000)에 의하면 동물유래 *S. Typhimurium* 45주에 대한 phage typing 결과 DT197, U302 및 DT202 등 8종이 분리되었다.

본 연구에서 조사된 결과는 김(2000)의 성적과는 큰 차이가 있었으나, Threlfall 등(1993), Nastasi와 Mammina (2000), Izumiya 등(2001)의 성적과는 유사하였

다. 이상 여러 연구자들의 결과를 종합해 볼 때 DT104가 가장 높은 분포를 나타내었고 다음이 DT193이었으나, 본 시험에서는 DT193이 가장 많았고 다음이 DT195, DT194로 차이를 나타내었다. 특히 외국에서는 다제내성 ACSSuT *S. Typhimurium* DT104와 U302가 주로 분리되는 것과는 큰 차이를 나타내었다. 이와 같은 결과는 지역에 따라서 유행하는 phage type이 다양한 것으로 파악할 수 있다.

김(2000)은 돼지에서 CGNaSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT104 1주, Yang 등(2001)은 돼지에서 ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT104 2주를 분리 보고한 바 있다. 약제내성유형을 보면, 김(2000)이 분리 보고한 균주는 ampicillin, carbenicillin 및 nalidixic acid에는 감수성이었으나 gentamicin에는 내성을 보였고, Yang 등(2001)이 보고한 균주는 nalidixic acid에 감수성이었다. 본 실험에서는 *S. Typhimurium* DT104가 3주 분리되었는데, 이것은 ACCbDNaPSSuT 내성형으로 김(2000)과 Yang 등(2001)의 성적과는 차이를 나타내었다. 또한 유럽과 미국에서 많이 분리되는 *S. Typhimurium* DT104와 유사한 다제내성유형인 DT193이 가장 높은 빈도로 분리되고 있는 것은 흥미로운 일이라 할 수 있겠으며, 더욱이 U302도 동정되어 향후 이에 대한 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 판단된다.

돼지유래 *S. Enteritidis* 25주에 대한 phage type은 PT21이 6주(21.0%), PT11b(5주), PT1(3주), PT3과 PT33(각 2주) 및 PT35(1주)로 총 6종이 분리되었다. *S. Enteritidis*는 유럽에서 식품 매개 살모넬라감염증의 약 80%를 차지하며, 1990년대 이후 전 세계적으로 식품매개성질병의 증가 현상이 보고되고 있다. 이는 사람과 동물에 감염하여 주로 급성장염을 일으키며, 오염된 계란이나 식품을 통하여 폭발적인 식중독 발생을 일으킨 것에 연유하고 있다(Nygaard 등, 2004; Tansel 등, 2003). 특히 1997년 이후 *S. Enteritidis*는 살모넬라 감염증 중 가장 많이 분리되는 serotype (50%이상)으로 NSC(National Salmonella Center)는 보고하고 있다(Betancor 등, 2004). *S. Enteritidis*의 phage type 분포에서 PT4는 서부유럽과 아프리카에서(Cieslik 등, 2001; Mare 등, 2000; Smith-Palmer 등, 2003), PT8은 북미와 유럽의 몇몇 나라에서 높은 분포를 나타내고 있으며(Majtanova, 2004; Nygaard 등, 2004), 최근 유럽 일부지역에서 발생하는 살모넬라감염증에서 흔히 분리되는 phage type은 PT6, PT21 및 PT14b 등으로 알려져 있다

(Kowalczyk-Pecka 등, 2003; Rychlik 등, 2000; Nygard 등, 2004).

우 등(2000)은 사람과 동물에서 유래한 *S. Enteritidis*의 phage type은 PT4(52.2%)가 가장 많고 다음 PT7과 PT7a var(20.8%), PT1(4.1%) 순이라고 보고하였다. 김(2000)은 소와 돼지에서 분리한 22주의 *S. Enteritidis*를 phage typing한 결과 PT4가 13주(59.1%)로 가장 분리빈도가 높았고 다음 PT1(2주), PT9b(1주) 및 PT21(1주)이었다. 외국의 경우 Mare 등(2000)은 남아프리카 공화국의 닭에서는 PT4가 가장 많고, 사람, 산양, 오리, 돼지, 계란 및 토끼에서는 PT34가 가장 분리빈도가 높았다고 하였고, Smith-Palmer 등(2003)은 스코틀랜드에서 1990~2001년까지 사람과 동물에서 PT4의 분리율이 높았다고 하였으며, Cieslik 등(2001)은 폴란드에서 분리한 140주 중 89%가 PT4라고 하였다. 또한 Ang-Kucuker 등(2000)은 터키에서 22주의 *S. Enteritidis* phage typing에서 PT4가 가장 많았고, PT6a(18.2%), PT1(13.6%), PT8(4.5%) 순이라고 하였다. Majtanova(2004)는 슬로바키아에서 2000~2003년까지 사람에서 분리한 *S. Enteritidis*를 phage typing한 결과 PT8이 가장 많고, 다음은 PT4와 PT13a이며, PT15, PT5, PT25 및 PT14b는 2003년에 처음으로 분리된 type이라고 하였다. Kowalczyk-Pecka 등(2003)은 Lublin 지역에서 분리한 *S. Enteritidis*에서 분리빈도가 높은 phage type은 PT6(40.2%)과 PT7(29.5%)이라고 하였고, Rychlik 등(2000)은 체코에서 분리한 균에서 PT21과 PT14b가 많이 분리되며, 약제감수성시험 결과 54주중 4주가 ampicillin, cefotaxime, cefuroxime 및 cotrimoxazole에 내성을 나타내었다고 하였으며, Nygard 등(2004)은 노르웨이에서 동부유럽지역 여행자를 대상으로 분리한 균에서 PT14b가 가장 많이 분리된다고 하였다.

본 연구에서 phage typing한 결과 PT21이 가장 높은 빈도로 분리되고 대부분의 약제에 대하여 높은 감수성을 보였던 것은 Rychlik 등(2000)의 성적과는 비슷하였지만, 다른 연구자들의 성적과는 다른 양상을 나타내었다. 특히 국내에서 김(2000)과 우 등(2000)이 보고한 돼지와 닭유래균에서 분리빈도가 높다고 하는 PT4 및 PT8은 본 시험에서는 전혀 분리되지 않았다. 이와 같은 phage type의 종류와 분리빈도는 조사지역 및 국가, 동물의 종류 등 분리균의 유래에 따라 차이가 클 것으로 보이며, 향후 이에 대한 보다 많은 가축유래균주를 대상으로 하여 조사할 필요가 있을 것으로 사료

된다.

한편, *S. Typhimurium*의 plasmid를 조사한 결과 대부분의 균주가 90~2.0kb 범위의 1~6개의 band를 보유하고 있었고, 15종류의 서로 다른 profile을 나타내었으며, 90, 40, 10.5, 6.3, 3.0(24.6%)과 40, 10.5, 6.3, 4.5, 3.0(20.3%) profile이 높은 빈도를 나타내었다. *S. Enteritidis*에 대한 plasmid profile은 2주에서 2.0과 1.5 kb의 plasmid가 분리되었고, chloramphenicol 내성 *S. Schwarzengrund* 4주에서는 plasmid가 분리되지 않았다.

최와 정(1992) *S. Typhimurium*의 plasmid profile에서 60, 10, 2.5Md 크기의 plasmid를, 김 등(1995)은 4주 중 2주에서 120, 94, 8.1kb와 94kb의 plasmid를 보유하고 있다고 하였다. Millemann 등(1995)은 조류유래 56주의 *S. Typhimurium*에 대한 plasmid 조사에서 모든 균주가 115~2kb 범위의 1~5개의 plasmid를 보유하여 8종의 plasmid profile이 분리되었다고 하였고, 55주가 serotype specific virulence plasmid인 90kb의 plasmid를 보유하고 있다고 하였다. 또한 *S. Enteritidis* 14주에 대한 plasmid 보유 조사에서 모든 균주가 serotype specific virulence plasmid인 54kb의 plasmid를 보유하고, 4주에서는 50과 3.8kb의 plasmid를 추가로 보유하고 있다고 하였다. Ng 등(1999)은 *S. Typhimurium* DT104에 대한 plasmid 조사에서 plasmid 수가 1~5개로, 분자량은 60~1.4Md이며, 60Md plasmid를 공통적으로 보유하고, kanamycin 내성균주는 2.0Md의 plasmid를 가지고 있었다고 하였다.

본 실험에서는 *S. Typhimurium*의 serotype specific virulence plasmid인 94kb 크기의 plasmid의 분리빈도가 25.4%에 불과하였고, *S. Enteritidis*에서는 분리되지 않아 차이를 보였으나, 작은 크기의 plasmid를 공통적으로 보유하고 있는 것은 Millemann 등(1995)과 Ng 등(1999)의 성적과 유사하였다.

최근 연구에 따르면 다제내성 ACSSuT *S. Typhimurium* DT104는 염색체상에 약제내성 유전자를 갖고 있는 것으로 나타났다. 유전자 배열은 주로 내성 유전자들의 전달을 촉진시킬 수 있는 mobile(이동성) DNA cassette인 2개의 integron으로 구성되어 있으며, 이는 주로 streptomycin, tetracycline 및 sulfamethoxazole resistance gene(각 *aadA2*, *tetR*, *tetA* 및 *sulI*)을 포함하고 있으며, *Salmonella* 속 균에서 일반적으로 발견되지 않는  $\beta$ -lactams (PSE-1과 TEM)와 chloramphenicol (*cmI*) 내성 유전자도 함께 가지고 있다고 하였다(Car-

Ison 등, 1999).

본 연구에서는 virulence gene, ampicillin과 chloramphenicol에 대한 내성 유전자를 검출하기 위하여 ampicillin 내성 유전자인 PSE-1과 TEM gene, chloramphenicol 내성 유전자인 *cmlA*-like gene, *tetR* gene은 *cmlA*-like gene에 나란히 존재하기 때문에 *cmlA/tetR* gene을 사용하였다. 특히 PSE-1과 *cmlA* gene은 다른 다제내성균에서도 발견되기 때문에 *Salmonella* 속 균에만 나타나는 *Salmonella* specific gene인 *SipB/C*도 함께 사용하였다(Carlson 등, 1999). 또한 ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT104는 대부분 florfenicol에 내성을 나타내기 때문에 florfenicol 내성 유전자인 *flo* gene과 integron capture, mobile gene 및 약제내성과 관련 있는 *int* gene을 사용하였으며(Bolton 등, 1999), virulence gene인 장점막 침습성과 관련 있는 *invA* gene과 숙주 세포내에서 *Salmonella*속 균의 성장을 증가시키고 숙주 면역체제와 상호작용하는 *spvC* gene을 사용하였다(Chiu와 Ou, 1996).

그 결과 167주의 *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* 및 *S. Schwarzengrund*에서 *invA*와 *SipB/C* gene은 모든 균주에서 검출되었으나, *cml/tetR*, PSE-1 및 *flo* gene은 전혀 검출되지 않았고, *spvC* gene, TEM gene 및 *int* gene의 검출율은 각각 35.3%, 29.3% 및 72.5% 이었다. 또한 소와 돼지에서 분리된 *S. Typhimurium*에 대하여 phage type, plasmid profile 및 약제내성유형과의 상호관계를 조사한 결과 가장 분리빈도가 높은 phage type은 DT193이었고, 주요 plasmid profile은 90, 40, 10.5, 6.3, 3.0 유형이었고, 주요 약제내성유형은 A(Ac, An, Cf) CCbDNaPSSuT 내성형이었으며, *spvC*, TEM 및 *int* gene이 가장 높은 빈도로 분리되어 이들 균주는 병원성과 다제내성이 가장 강한 것으로 인정되었다.

또한 유럽과 미국 등에서 다제내성을 나타내는 DT104와 U302에서도 90, 40, 10.5, 6.3, 3.0 또는 40, 10.5, 6.3, 3.0 profile과 내성유형 ACCbDNaPSSuT가 분리되어 병원성과 약제내성이 높은 것으로 인정되었다. 국내에서 처음으로 동정된 DT203은 plasmid profile 및 약제내성유형이 유럽과 미국 등에서 분리되는 다제내성 DT200 및 DT204와 유사한 유형을 나타내어 향후 이에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 판단된다.

Swamy 등(1996)에 의하면 245주의 *Salmonella* 분리주에서 *invA* gene이 100% 검출되었고, *spvC* gene의 검출율은 15.1%에 불과하다고 하였다. Bolton 등(1999)

은 *S. Typhimurium*에서 gene의 검출율은 *invA* 98%, *spvC* 88%, *int* 86% 및 *flo* 56.9%라고 하였고, Khan 등(2000)은 *invA* 100%, *spvC* 97% 및 *int* 94%라고 하였으며, 이들 중 22주의 ACSSuT *S. Typhimurium* DT104에서는 *invA*, *spvC*, *int* 및 *flo* gene이 모두 검출된다고 보고하였다. 국내에서는 정 등(2003)이 전남지역의 돼지에서 분리한 *S. Typhimurium*에서 *invA* 88.0%, *spvC* 28.9%라고 보고하였다.

본 실험에서의 virulence gene의 분리빈도는 정 등(2003)과 Swamy 등(2000)이 보고한 성적에 비하여 높게 나타났으며, *invA* gene은 모든 공시균주에서 검출되어 외국에서 보고한 성적과 유사하였으나 *spvC*와 *int* gene의 검출율은 Bolton 등(1999)과 Khan 등(2000)의 성적보다 훨씬 낮았다. *spvC*와 *int* gene의 검출율이 외국에서 보고된 성적에 비하여 낮은 것은 외국의 경우 조사대상을 주로 다제내성인 DT104를 선택한 것과 관련된 것으로 추측된다.

약제내성 관련 유전자 검출에 관한 연구에서 Yang 등(2001)은 돼지에서 분리한 ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT104 2주와 tetracycline과 chloramphenicol 내성 *S. Typhimurium*에서 PSE-1과 *cml/tetR* gene은 검출되지 않았지만, ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT104(2주), ampicillin 내성 *S. Typhimurium* (3주 중 2주) 및 ampicillin 내성 *S. Enteritidis*(4주 중 2주)에서 TEM gene이 검출되었다고 하였고, 김(2000)은 CGNaSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT104(1주), CSSuT 내성형의 *S. Typhimurium*(4주) 및 ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium*(2주)에서 *cml/tetR* gene은 검출되지 않았지만, ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium*(2주)에서 PSE-1 gene이 검출되었다고 하였다. Llanes 등(1999)은 96주의 amoxicillin 내성 *Salmonella* 속 균에서 TEM-1(54주), PSE-1(40주), TEM-2와 PSE-1(1주) 및 OXA-4(1주) gene을 검출하였다.

본 실험에서 분리된 DT104 3주 모두에서 TEM gene이 검출되었고, 다른 phage type의 ampicillin과 amoxicillin 내성 *S. Typhimurium* 46주 중 44주(95.7%)에서 TEM gene이 검출되었으며, ampicillin 내성 *S. Schwarzengrund* 2주 모두에서도 TEM gene이 검출되어 Yang 등(2001)의 성적에 비하여 훨씬 검출율이 높았고, Llanes 등(1999)의 성적과 유사하였다. 이상의 여러 연구자들의 성적을 통해서 볼 때 ampicillin 내성균주이면서 TEM 또는 PSE-1 gene이 검출되지 않은 균주가 있었는데, 이는 아마도 다른  $\beta$ -lactams 내성 유전자를

보유하고 있을 것으로 추측된다. 본 실험에서는 chloramphenicol 내성균주인데도 *cml/tetR* gene이 검출되지 않았던 것은 Yang 등(2001)과 김(2000)의 성적과 일치하였지만, Khan 등(2000)과 Carlson 등(1999)의 보고와는 차이가 있었다. 이는 국내에서 분리한 ACSSuT *S. Typhimurium* DT104와 chloramphenicol 내성 *S. Typhimurium*이 미국에서 분리되는 chloramphenicol 내성균주와는 유전적 차이가 있거나, *cat1* 등과 같은 chloramphenicol 내성 유전자를 보유하고 있을 것으로 생각된다. 또한 다제내성을 나타내는 모든 균주에서 integron capture, mobile gene 및 약제내성과 관련 있는 *int* gene이 검출되었다. 이와 같은 결과는 우리나라 소와 돼지에서 분리된 ampicillin과 amoxicillin 내성의 *S. Typhimurium*은 대부분 TEM gene을 보유하고 있는 것으로 추측할 수 있으며, 균의 다제내성과 *int* gene과의 상호관계가 깊은 것으로 판단된다. 따라서 소와 돼지에서 분리된 *S. Typhimurium*중 ampicillin, amoxicillin 및 chloramphenicol에 대하여 내성을 나타내면서도 내성 관련 유전자가 검출되지 않은 균주에 대하여는 향후 재검토해야 할 필요성을 갖게 한다.

외국에서는 serotype, phage type 및 약제내성유형 등의 상호관계를 검토할 목적으로 수개에서 수십 종류의 primer를 이용하여 약제내성과 관련된 유전자 검출을 시도하고 있다. Threlfall 등(2003)은 DT104가 가장 강한 약제내성을 나타내었고, 돼지유래균주에서는 다제내성 DT208이 가장 분리율이 높다고 하였다. Duijkeren 등(2003)은 1980년부터 1990년 초에는 소유래균에서 ACKSuT 형의 다제내성 *S. Typhimurium* DT200, DT204 및 DT193의 분리율이 높았기 때문에 약제내성이 강하다고 하였고, 1이 시기에는 사람, 돼지 및 닭유래 *S. Typhimurium*은 감수성이었지만, 1996년 이후 ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT104가 분리되면서부터 사람, 돼지, 닭 및 소에서 내성균이 증가한 것으로 보고하고 있다. 또한 kanamycin 내성율이 1984~1989년에 46%이던 것이 1996~2001년에 0.9%로 크게 감소되었다. 이는 ACKSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT200, DT204 및 DT193의 분리율이 높았던 것이 ACSSuT 내성형의 *S. Typhimurium* DT104로 바뀌었기 때문이라고 하였다.

Gebreyes 등(2002)은 미국의 돼지로부터 분리한 484주의 *S. Typhimurium* (*S. Typhimurium* var Copenhagen 328주 포함)에서 다제내성 ACSSuT type의 약 37%가 DT104로서 가장 분리율이 높은 phage type이

었고, AKSSuT type의 약 16%가 DT193이라고 하였다. 또한 PCR 기법을 이용한 다제내성 관련 유전자를 검사한 결과 DT104에서는 PSE-1, *aadA* 및 *tetG* gene이, DT193에서는 TEM, *strAB* 및 *tetB* gene이 검출됨으로써 보유하는 약제내성 인자가 서로 다르다고 하였고, 다제내성 gene의 존재 부위는 DT104는 chromosome, DT193은 plasmid라고 하였다. 이와 같은 결과에서 AKSSuT 내성형의 DT193은 ACSSuT 내성형의 DT104와 유사한 식품 매개 질병을 일으키는 중요한 원인체라는 것을 의미하고, 이는 표현형 및 유전형적으로 서로 유사하며, 역학적으로도 관련이 있다고 하였다. Randall 등(2004)은 다제내성 *S. Typhimurium*에 대한 약제내성 유전자 검출에서 *S. Typhimurium* DT104의 경우는 주로 *aadA2*, PSE-1, *floR*, *sul1* 및 *tetG*가 검출된 반면, DT193에서는 *aph-IA*, TEM, *strA*, *sul2* 및 *tetA*가 검출되어 서로 다른 약제내성 유전자를 보유하고 있다고 하였다.

본 실험에서 소와 돼지에서 분리된 *S. Typhimurium*의 주요 phage type은 DT193으로서 주로 다제내성유형인 A(Ac,An,Cf)CCbDNaPSSuT로 나타났다. 이는 1980~1990년대까지 외국에서 다제내성을 나타내었던 주요 phage type과 같았으며, 유럽, 미국 및 캐나다 등에서 주로 분리되는 ACSSuT 내성형의 DT104와 유사한 식품 매개 질병을 일으키는 중요한 원인체이므로 국내에서 분리된 DT193은 공중보건학적으로 중요한 의미를 갖는다고 볼 수 있다.

## 결 론

도축된 소와 돼지의 맹장내용물과 림프절에서 분리한 다제내성 *S. Typhimurium*과 *S. Enteritidis*에 대한 역학적 및 분자유전학적 특성을 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

*S. Typhimurium*에 대한 phage type, plasmid profile 및 약제내성유형과의 상호관계를 조사한 결과 10종의 phage type이 확인되었고, 이 중 분리빈도가 높은 것은 DT193(25.4%)과 DT195(24.6%)이었으며, 가장 높은 빈도의 약제내성유형은 A(Ac,An,Cf)CCbDNaPSSuT형이었다. 또한 ACCbDNaPSSuT DT104, DT203 및 U302도 분리되었으며, 특히 DT203은 돼지에서 12주로 국내에서 처음 분리된 phage type이었다. *S. Enteritidis*에서는 6종의 phage type이 확인되었고, PT21

(21.0%)과 PT11b(20%)가 비교적 높은 분리율을 나타내었다.

*S. Typhimurium*에서 90~2.0kb 범위의 15종류 profile이 확인되었고, 1~6개의 plasmid band를 보유하고 있었으며, 90, 40, 10.5, 6.3, 3.0 profile이 가장 높은 분포를 나타내었다. *S. Enteritidis*(2주)에서 2.0과 1.5kb 두개의 plasmid가 분리되었고, chloramphenicol 내성 *S. Schwarzengrund*균주에서는 plasmid가 분리되지 않았다.

*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* 및 chloramphenicol 내성 *S. Schwarzengrund*에 대한 multiplex PCR 결과 *invA*와 *SipB/C* gene은 모든 균주에서 검출되었으나, *cml/tetR*, *PSE-1* 및 *flo* gene은 검출되지 않았고, *spvC*, TEM 및 *int* gene은 각각 35.3%, 29.3% 및 72.5%가 분리되었다.

## 참 고 문 헌

- 김상윤. 2000. 경북지역 가축에서 분리된 *Salmonella* 속균의 역학적 특성 및 병원성. 안동대학교 대학원 박사학위 논문.
- 김원용, 장영효, 박경윤 등. 1995. 가금에서 분리한 *Salmonella* 속균의 항균물질에 대한 감수성 및 plasmid profile. 대한수의학회지 35(3): 537-542.
- 우용구, 박미선, 우승룡 등. 2000. 한국의 동물과 사람에서 분리한 *Salmonella enteritidis*의 Phage types. 대한수의학회지 40(3): 515-524.
- 정대영, 박종태, 고흥범. 2003. 전남지역 도축장에서 분리된 *Salmonella typhimurium*의 병원성에 관한 연구. 한국가축위생학회지 26(1): 39-50.
- 최원필, 정석찬. 1992. 동물에서 분리된 *Salmonella*균의 병원성 관련 Plasmid에 관한 연구. 대한수의학회지 32(3): 369-376.
- Anderson DM, 1980. Plasmid studies of *Salmonella typhimurium* phage type 179 resistant to ampicillin, tetracycline, sulfonamides and trimethoprim. *J Hyg Camb* 85: 293-300.
- Anderson ES, Ward LR, De Sa MJ, et al. 1977. Bacteriophage typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J Hyg* 78: 297-300.
- Ang-Kucuker M, Tolun V, Helmuth R, et al. 2000. Phage types, antibiotic susceptibilities and plasmid profiles of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains isolated in Istanbul, Turkey. *Clin Microbiol Insect* 6(11): 593-599.
- Baggesen DL, Sandvang D, Aarestrup F. 2000. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J Clin Microbiol* 38(4): 1581-1586.
- 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.
- Bolton LF, Kelley LC, Lee MD, et al. 1999. Detection of multi-drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *J Clin Microbiol* 37(5): 1348-1351.
- Briggs CE and Fratamico PM. 1999. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 43(4): 846-849.
- Carlson SA, Bolton LF, Briggs CE, et al. 1999. Detection of multiresistant *Salmonella typhimurium* DT104 by multiplex and fluoregenic PCR. *Mol Cell Probes* 13: 213-222.
- Carlson SA, Browning M, Kathleen E, et al. 2000. Identification of diminished tissue culture invasiveness among multiple antibiotic resistant *Salmonella typhimurium*. *Microb Pathog* 28(1): 37-44.
- Chen S, Zhao S, White DG, et al. 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from reptail meats. *Appl Environ Microbiol* 70(1): 1-7.
- Chiu CH and Ou JT. 1996. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol* 34(10): 2619-2622.
- Cieslik A, Brown D, Paciorek J, et al. 2001. Phage types, plasmid profiles and chromosomal restriction profiles of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis (*Salmonella enteritidis*) isolated in Poland in 1999-2000. *Med Dosw Mikrobiol* 53(2): 185-196.
- Davies RH, Dalziel R, Gibbens JC, et al. 2004. National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999-2000). *J Appl Microbiol* 96(4): 750-760.
- Duijkeren EV, Wannet WJB, Houwers DJ, et al. 2002. Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. *J Clin Microbiol* 40(11): 3980-3985.
- Duijkeren EV, Wannet WJB, Houwers DJ, et al. 2003. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. *J Clin Microbiol* 41(8): 3574-3578.
- Gahring LC, Heffron F, Finlay BB, et al. 1990. Invasion and replication of *Salmonella typhimurium* in animal cells. *Infect Immun*. 58: 443-448.

- Gebreyes WA, Craig Altier. 2002. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol* 40(8): 2813-2822.
- Gebreyes WA, Davies PR, Turkson PK, et al. 2004. Characterization of antimicrobial-resistant phenotypes and genotypes among *Salmonella enterica* recovered from pigs on farms, from transport trucks, and from pigs after slaughter. *J Food Prot* 67(4): 698-705.
- Gebreyes WA, Thakur S, Davies PR, et al. 2004. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997-2000. *J Antimicrob Chemother* 53(6): 997-1003.
- Gorman R, Adley CC. 2004. Characterization *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from human, food, and animal sources in the Republic of Ireland. *J Clin Microbiol* 42(5): 2314-2316.
- Haneda T, Okada N, Nakazawa N, et al. 2001. Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. *Infect Immun* 69(4): 2612-2620.
- Izumiya H, Terajima J, Matsushita S, et al. 2001. Characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Japan. *J Clin Microbiol* 39(7): 2700-2703.
- Jelesic Z, Kulauzov M, Kozoderovic G. 2000. Analysis of the plasmid profile of various *Salmonella* serotypes. *Med Pregl* 53(11-12): 564-567.
- Khan AA, Nawaz MS, Khan SA, et al. 2000. Detection of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 182: 355-360.
- Kowalczyk-Pecka D, Wernicki A, Puchalski A. 2003. Antimicrobial susceptibility and phage types of *Salmonella enteritidis* strains isolated in the Lublin area. *Przegl Epidemiol* 57(1): 201-209.
- Llanes C, Kirchgessner V, Plesiat P. 1999. Propagation of TEM- and PSE-type  $\beta$ -lactamase among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. *Antimicrob Agent Chemother* 43(10): 2430-2436.
- Majtanova L. 2004. Occurrence of phage types of non-typhoid *Salmonella* serovar in the Slovak Republic 2000-2003. *Epidemiol Mikrobiol Immunol* 53(2): 70-73.
- Mare L, Van Der Walt ML, Dicks LM. 2000. Phage types of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated in South Africa from 1991-1995. *Onderstepoort J Vet Res* 67(2): 129-133.
- Mayer LW. 1988. Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and intracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Rev* 1: 228-243.
- Millemann Y, Lesage MC, Chaslus-Dancla E, et al. 1995. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. *J Clin Microbiol* 33(1): 173-179.
- Murray PR, Pfaller MA, Tenouer FC, et al. 1999. *Manual of clinical microbiology*. 7 eds. ASM Press: 467-471.
- Nastasi, Mammina C. 2000. Surveillance of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in southern Italy in the years 1992-1997. *Eur J Epidemiol* 16(2): 135-139.
- Ng LK, Mulvey MR, Martin I, et al. 1999. Genetic characterization of antimicrobial resistance in Canadian isolates of *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob. Agents Chemother* 43(12): 3018-3021.
- Nygard K, Jong BD, Guerin PJ, et al. 2004. Emergence of new *Salmonella* Enteritidis phage types in Europe Surveillance of infections in returning travellers. *BMC Med* 2: 32.
- Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, et al. 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother* 53: 208-216.
- Rychlik I, Svestkova A, Karpiskova R. 2000. Subdivision of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage types PT14b and PT21 by plasmid profiling. *Vet Microbiol* 74(3): 217-225.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2 eds. SCH Laboratory Press: 1.21-1.51.
- Smith-Palmer A, Stewart WC, Mather H, et al. 2003. Epidemiology of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium in animals and people in Scotland between 1990 and 2001. *Vet Rec* 153(17): 517-520.
- Swamy SC, Barnhart HM, Lee MD, et al. 1996. Virulence determinants *invA* and *spvC* in *Salmonella* isolated from poultry products, wastewater, and human sources. *Appl Environ Microbiol* 62(10): 3768-3771.
- Tansel O, Ekuclu G, Otkun M, et al. 2003. A food-borne outbreak caused by *Salmonella* Enteritidis. *Yonsei Med J* 44(2): 198-202.
- 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.
- Threlfall EJ, Teale CJ, Davies RH, et al. 2003. A comparison of antimicrobial susceptibilities in nontyphoidal *Salmonella* from humans and food animals in England and Wales in 2000. *Microb Drug Resist* 9(2): 183-189.
- Ward LR, De Sa JDH, Rowe B. 1987. A phage typing scheme for *S enteritidis*. *Epidemiol Infect* 99: 291-294.
- Yang SJ, Park KY, Seo KS, et al. 2001. Multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* identified by multiplex PCR from animals. *J Vet Sci* 2(3): 181-188.