

## Cytotoxic Distending Toxin Production, Genotypes and Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter jejuni* Isolates from Diarrhea Patients and Chickens

Shin-Moo Kim<sup>1\*</sup>, Eun-Cheol Kim<sup>2</sup>, Mi-Rae Choi<sup>1</sup>, Hyung-Ah So<sup>3</sup>, Eun-Sook Shim<sup>1</sup>, Eun-Sook Kim<sup>4,5,6</sup>, Seong-Chan Park<sup>2</sup>, Chi-Nam Seong<sup>2</sup> and Yunsop Chong<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science College, Iksan, Korea,

<sup>2</sup>Department of Biology, Sunchon National University, Sunchon, Korea, <sup>3</sup>Department of Microbiology, Jeonlabukdo Institute of Health & Environmental Research, Jeonju, Korea, <sup>4</sup>Vestibulocochlear Research Center

and <sup>5</sup>Department of Microbiology, Wonkwang University School of Medicine, Iksan, Korea,

<sup>6</sup>Division of Biological Sciences, Graduate School, Chonbuk National University, Jeonju, Korea,

<sup>7</sup>Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Received : November 7, 2008

Revised : December 11, 2008

Accepted : December 11, 2008

*Campylobacter jejuni* isolates from diarrhea patients and chickens in 2008 in Iksan, Korea were tested for biochemical characteristics, and for possession of genes *hipO*, mutated *gyrA*, and *cdtB*. Among the chickens tested 52% carried *C. jejuni*. All 28 patient isolates and 48 chicken isolates had typical biochemical characteristics, except for nalidixic acid resistance. All isolates from patients and chickens were resistant to ciprofloxacin, and had mutated *gyrA* gene indicating good correlation of the two tests. Analysis of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) pattern of *Sma*I-restricted DNA of 53 isolates showed 14 clusters. Twenty-eight patient isolates and two chicken isolates (57%) showed an identical pattern (cluster 9). Chicken isolates C37 and C48 (cluster 2), C31 and C33 (cluster 3), C29, C34, C35, and C36 (cluster 4), and C43, C44 (cluster 6) had identical patterns. All patient isolates, compared to 87% and 80% of chicken isolates, were susceptible to amikacin and chloramphenicol, respectively. Antibiotics with the lowest MIC<sub>90</sub> were imipenem, gentamicin, and erythromycin, whereas, those with the highest were ampicillin and tetracycline. In conclusion, *C. jejuni* carriage rate of chickens in Iksan, Korea, was high, all 28 isolates from patients and two from chickens were an identical clone, whereas isolates from patients and remaining chickens were different clones with only 62% similarity, all isolates had *hipO* and *cdtB* genes, and all isolates were resistant to ciprofloxacin.

**Key Words:** *Campylobacter jejuni*, Genotype, *cdtB*, Antimicrobial Susceptibility

### 서 론

*Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* (이하 *C. jejuni*)는 식품

매개 장염 원인균의 한 가지로 그 장염은 세계 여러 나라에서 발생되고 있으며, 외국에서는 이 세균의 분리빈도가 *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli* 및 *Shigella*보다도 높은 장염의 중요한 원인균이다 (3,13,41). *C. jejuni*는 각종 동물의 장관 내에 널리 분포하며, 특히 가금류인 닭, 칠면조 등은 보균율이 높고, 사람 감염의 중요한 병원체가 되며 주로 식품매개로 감염된다고 알려져 있고, 또한 항균제 감수성이 다소 차이가 있음이 보고되고 있다 (17,31,52). 이 세균 감염은 성인보다는 소아에 많다.

\*Corresponding author: Shin-Moo Kim. Department of Clinical Laboratory Science, Wonkwang Health Science College, Iksan 570-750, Korea.  
Phone: +82-63-840-1211, Fax: +82-63-840-1211  
e-mail: smkim1211@hanmail.net

\*\*This study was supported by research fund from Wonkwang Health Science College, 2008.

Fluoroquinolone은 쉬켈라증, 살모넬라증, 캄피로박터증, 콜레라, 원인불명 장염의 치료에 흔히 사용된다. 그러나 이 항균제의 캄피로박터증이나 장티푸스균 이외의 살모넬라증 치료 효과는 의문이 되고 있으며, 근년에는 캄피로박터증의 치료에 마크로라이드제가 추천되고 있다 (1). 또한 몇 나라에서는 *Campylobacter*의 fluoroquinolone 내성이 빠르게 퍼지고 있어서 이 세균에 의한 위중한 감염 시 치료에 문제점이 제기되고 있으며 (38), 1978년에 벨기에서는 *C. jejuni*의 quinolone 내성율이 6.3%임이 처음으로 보고하였다 (10,45,53). Quinolone 내성은 사람이나 동물에게 fluoroquinolone을 사용한 결과로 추정된다. *Campylobacter*의 균종 동정에는 hippurate 가수분해와 항균제 감수성 시험 등도 이용되지만, 분리된 *C. jejuni*가 nalidixic acid와 cephalothin에 내성이면 이를 *C. lari*와 감별하기 어렵고, *C. jejuni* 중에는 hippurate 음성균도 있어서 이들 성상만으로는 이 세균의 동정이 어렵다. 따라서 PCR에 의한 *hipO* 유전자의 검출이 이용되고 있다 (54). Fluoroquinolone은 *Campylobacter*, *E. coli* 및 다른 그람음성간균의 DNA gyrase와 topoquinolone II의 합성을 억제하여 항균작용을 나타낸다. *gyrA* 유전자가 변이되면 fluoroquinolone에 내성으로 변하므로 ciprofloxacin 내성 *C. jejuni* 감별을 위해 변이된 *gyrA* 유전자가 있는지를 시험할 수도 있다 (61).

*C. jejuni* 감염의 증상이 독력인자와 관련이 있는지 잘 알려지지 않았으나, 몇 가지 독력인자 즉, 담즙내성, 상피세포의 침입 및 cytolethal distending toxin (CDT) 생성 (22)이 장염을 유도하는데 중요하다고 생각되고 있다 (8).

한편 *Campylobacter* spp.의 감염경로와 예방을 위해서 역학적 연구에 *C. jejuni* 균주의 생물형, 혈청형, 파지형 등의 표현형 (20)과 유전자형으로 흔히 flagellin typing, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), ribotyping 및 random amplified polymorphic DNA (RAPD) 분석 등이 이용된다

(19,39,59). 또한 형별 분석에는 Lior의 hippurate 가수분해, DNA 가수분해, 신속 H<sub>2</sub>S 생성에 따라 4종으로 분류하는 생물형 (20)과 Penner (41,42)의 내열성 항원을 이용한 간접적혈구 응집반응, Lior (34)의 이열성 항원을 이용한 응집반응 등의 혈청형이 흔히 사용된다.

본 연구에서는 설사환자와 닭에서 분리된 *C. jejuni* 균주를 대상으로 생화학적 성상과 닭에서의 보균율을 시험하고 PCR로 *hipO*를 검출하여 그 균종이 *C. jejuni*인지 확인코자 하였으며, ciprofloxacin 내성 균주에서 변이된 *gyrA* 유전자가 검출되는지 검토하고, 또한 독력인자인 *cjcdtB* 유전자를 보유하고 있는지와 PFGE로 유전자형을 분석하고, 항균제 감수성을 규명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. *Campylobacter jejuni*의 분리

2008년 6월에 전북 익산지역의 92개의 닭 내장을 검체로 사용하였다. *C. jejuni*의 분리를 위해 *Campylobacter* preston agar (Oxoid, Basingstoke, UK)에 검체를 면봉으로 도말한 다음 42℃의 10% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양하여 원형 또는 퍼지는 회백색 집락을 분리하였다. 순수 분리된 세균은 미세산소성 시험, 그람염색, oxidase 시험, 30 µg의 nalidixic acid와 cephalothin 디스크 감수성 시험, hippurate 가수분해시험 및 PCR에 의한 *hipO* 유전자 검출로 균종을 동정하였다 (55).

인체로부터의 *Campylobacter jejuni* 분리는 2007년 6월에 전북지역 병원에 내원한 설사환자 변검체를 이용하여 위와 동일한 방법으로 분리 동정하였다. 분리된 균주는 10% CO<sub>2</sub>에 48시간 배양한 후 집락을 15% glycerol-brucella broth에 넣어 -70℃에 냉동 보관하였다가 실험에 사용하였다.

Table 1. Sequence of oligonucleotides used in this study

Target gene	Direction	Sequence (5' to 3')	PCR amplicon size (bp)
<i>hipO</i>	Forward	5'-ACTTCTTTATTGCTTGCTGC-3'	323
	Reverse	5'-GCCACAACAAGTAAAGAAGC-3'	
<i>gyrA</i>	Forward	5'-TTT TTA GCA AAG ATT CTG AT-3'	265
	Reverse	5'-CAA AGC ATC ATA AAC TGC AA-3'	
<i>cdtB</i>	Forward	5'-ATCCGCAGCCACAGAAAGCAAATG-3'	623
	Reverse	5'-GCGGTGGAGTATAGGTTTGTGTC-3'	

**Table 2.** Biochemical and genetic characteristics of *C. jejuni* isolates from patients and chickens

Source of isolation	Hippurate hydrolysis	Susceptibility		Detection of indicated genes by PCR		
		Cephalothin	Nalidixic acid	<i>hipO</i>	<i>gryA</i>	<i>cdtB</i>
Patient (n=28) <sup>a</sup>						
H0706-01	+	R	R	+	+	+
H0706-02	+	R	R	+	+	+
H0706-03	+	R	R	+	+	+
H0706-04	+	R	R	+	+	+
H0706-05	+	R	R	+	+	+
H0706-06	+	R	R	+	+	+
H0706-07	+	R	R	+	+	+
H0706-08	+	R	R	+	+	+
H0706-09	+	R	R	+	+	+
H0706-10	+	R	R	+	+	+
H0706-11	+	R	R	+	+	+
H0706-12	+	R	R	+	+	+
H0706-13	+	R	R	+	+	+
H0706-14	+	R	R	+	+	+
H0706-15	+	R	R	+	+	+
H0706-16	+	R	R	+	+	+
H0706-17	+	R	R	+	+	+
H0706-18	+	R	R	+	+	+
H0706-19	+	R	R	+	+	+
H0706-20	+	R	R	+	+	+
H0706-21	+	R	R	+	+	+
H0706-22	+	R	R	+	+	+
H0706-23	+	R	R	+	+	+
H0706-24	+	R	R	+	+	+
H0706-25	+	R	R	+	+	+
H0706-26	+	R	R	+	+	+
H0706-27	+	R	R	+	+	+
H0706-28	+	R	R	+	+	+
Chicken (n=26)						
C0808-29	+	R	R	+	+	+
C0808-30	+	R	R	+	+	+
C0808-31	+	R	R	+	+	+
C0808-32	+	R	R	+	+	+
C0808-33	+	R	R	+	+	+
C0808-34	+	R	R	+	+	+
C0808-35	+	R	R	+	+	+

Table 2. Continued

Source of isolation	Hippurate hydrolysis	Susceptibility		Detection of indicated genes by PCR		
		Cephalothin	Nalidixic acid	<i>hipO</i>	<i>gyrA</i>	<i>cdtB</i>
C0808-36	+	R	R	+	+	+
C0808-37	+	R	R	+	+	+
C0808-38	+	R	R	+	+	+
C0808-39	+	R	R	+	+	+
C0808-40	+	R	R	+	+	+
C0808-41	+	R	R	+	+	+
C0808-42	+	R	R	+	+	+
C0808-43	+	R	R	+	+	+
C0808-44	+	R	R	+	+	+
C0808-45	+	R	R	+	+	+
C0808-46	+	R	R	+	+	+
C0808-47	+	R	R	+	+	+
C0808-48	+	R	R	+	+	+
C0808-49	+	R	R	+	+	+
C0808-50	+	R	R	+	+	+
C0808-51	+	R	R	+	+	+
C0808-52	+	R	R	+	+	+
C0808-53	+	R	R	+	+	+
C0808-54	+	R	R	+	+	+

<sup>a</sup>The strains from patients were isolated in June, 2007 and those from chickens were in August 2008.

## 2. PCR에 의한 *hipO*, *gyrA* 및 *cdtB* 유전자 검출

*C. jejuni*의 동정을 위해서는 Wang 등 (55)의 방법에 따라 *hipO* 유전자를, ciprofloxacin 내성 *C. jejuni* (CRCJ) 주를 검출하기 위해서는 Zirnstein 등 (61)의 방법에 따라 *gyrA* 유전자 변이를, Dasanayake 등 (7)의 방법에 따라 CDT 유전자인 *cdtB*를 PCR법으로 검출하였다. 혈액한천배지에 접종하여 42℃의 10% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양한 집락을 증류수에 부유시켜 100℃에서 10분간 끓인 다음 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층을 PCR의 주형으로 사용하였다. 사용된 primer 염기서열은 Table 1과 같으며, Genotek Co. (Daejeon, Korea)에 의해 합성하였다.

Forward와 reverse primer 각각을 2 µl, PCR mastermix (dNTP, *Taq* polymerase, MgCl<sub>2</sub>) 4 µl, 8-MOP 12 µl, 주형 DNA 2 µl를 넣어 PCR 반응의 최종액을 20 µl로 하였다.

PCR 반응은 thermal cycler (GeneAmp PCT system, Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA)를 사용하였고, 위 3종류의

유전자 증폭은 94℃에서 5분간 pre-denaturation, 94℃에서 30초 denaturation, 57℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 1분간 extension의 조건으로 30회 반복한 다음, 72℃에서 5분간 post-extension을 시킨 후 4℃에서 중합반응을 종료시켰다. 반응 후 생성물은 cyber green 염색시약과 함께 2% agarose gel에서 전기영동하여 결과를 확인하였다.

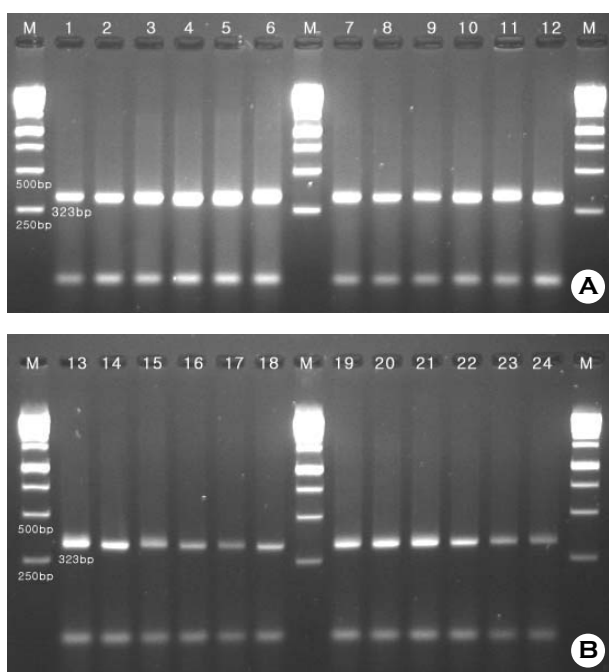
## 3. PFGE에 의한 유전자형 분석

*C. jejuni* 균주에 대한 PFGE의 분석은 PulseNet 방법 (19,48)으로 실험하였다. 순수 분리된 시험세균의 집락을 면봉으로 묻혀내어 3 ml의 cell suspension TE (100 mM Tris, pH 7.5, 100 mM EDTA, pH 7.5)에 넣고 20%의 투명도로 현탁시켰다. 현탁액 200 µl를 1.5 ml 시험관에 옮긴 다음, proteinase K (20 mg/ml) 10 µl를 넣어 잘 섞고 여기에 1.2% plug용 SeaKem Gold agarose (Cambrex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) 200 µl를 넣고 섞은 후 바로 plug mold에 넣었다. 굳은 plug를 cell lysis buffer (0.5 M EDTA,

pH 9.0; 1% sodium lauroylsarcosine)에 넣어 55°C의 진탕 항온수조에서 1시간 처리한 후 멸균 증류수가 들어있는 PVC 원통에 넣고 55°C 진탕 항온수조에서 15분 동안 세척한 후 세척용 완충용액인 Plug Wash BE buffer (10 mM Tris, pH 7.5, 1 mM EDTA, pH 7.5)를 넣어 55°C 진탕 항온수조에서 15분 동안 3회를 처리하였다. 세척이 끝난 plug를 1 mm 두께로 자른 다음 SmaI 제한효소 (Fermentas Life Sciences Inc, Hanover, MD, USA)로 37°C에서 4시간 처리하였다. 제한효소로 처리한 plug를 gel에 넣고 전기영동 cell (CHEF-DR III, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)에 넣어, initial time 6.76초, final time 38.35초, 전압 6 v/cm으로 조건으로 12.0°C에서 20시간 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 gel을 ethidium bromide 염색용액 (0.5 µg/ml)이 들어있는 증류수 500 ml에 넣어 30분간 염색하였다. 이어서 증류수로 30분간 탈색한 후 UV로 확인하였으며, DNA pattern은 Biometrics 프로그램 (Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 분석하였다.

#### 4. 항균제 감수성 시험

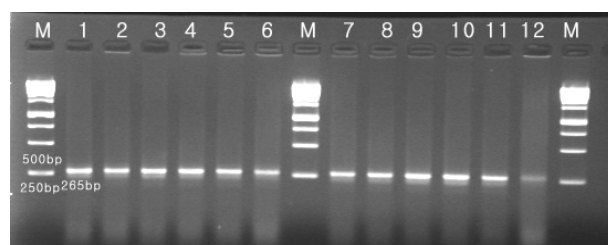
표준 디스크 확산법 (5)으로 시험하였으나 배지는



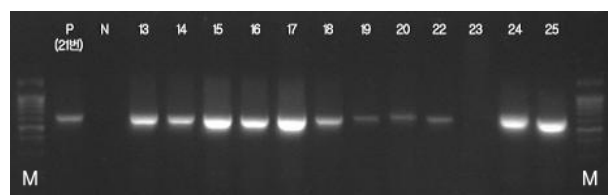
**Figure 1.** Agarose gel electrophoresis of PCR products generated by primer pairs for *hipO* gene for identification of *C. jejuni*. (A) Lane 1, to 12, *C. jejuni*; M, size marker. (B) Lane 13 to 24, *C. jejuni*; M, size marker.

5% 면양 혈액을 넣은 Muller-Hinton agar (MHA, Difco Laboratories, Sparks, MD, USA)를 사용하였다. 순수배양된 집락을 tryptic soy broth (TSB, Difco)에 부유하여 McFarland 0.5관 탁도로 맞추고, 이것을 면봉으로 배지 배지 표면에 고르게 바른 다음 디스크를 놓고 37°C 10% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 배양 후에 결과를 판독하였다. 정도 관리를 위해서 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923를 사용하였다. 디스크는 amikacin 30 µg, ampicillin 10 µg, cefotaxime 30 µg, cephalothin 30 µg, chloramphenicol 30 µg, ciprofloxacin 5 µg, erythromycin 15 µg, gentamicin 10 µg, imipenem 10 µg, kanamycin 30 µg, nalidixic acid 30 µg, tetracycline 30 µg, trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) 1.25/23.75 µg (Becton-Dickinson, Cockeysville, MD, USA)를 사용하였다.

한천희석법 (agar dilution method)은 CLSI (5) 표준방법을 따랐으며, 규정에 따라 녹인 항균제를 5% 혈액을 첨가한 MHA에 넣고 평판배지를 만들었다. 사용된 항균제는 ampicillin, cephalothin, clindamycin, erythromycin, gentamicin, nalidixic acid, ciprofloxacin, tetracycline, (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) 및 imipenem (Merk Sharp & Dohme, Rahway, NJ, USA)이었다. 순수배양된 실험 균주 집락을 TSB에 풀고 식염수로 McFarland 0.5관 탁도로 맞추어



**Figure 2.** Agarose gel electrophoresis of PCR products generated by primer pairs for mutated *gryA* gene for detection of ciprofloxacin-resistant *C. jejuni*. Lane 1 to 12, *C. jejuni*; M, size marker.



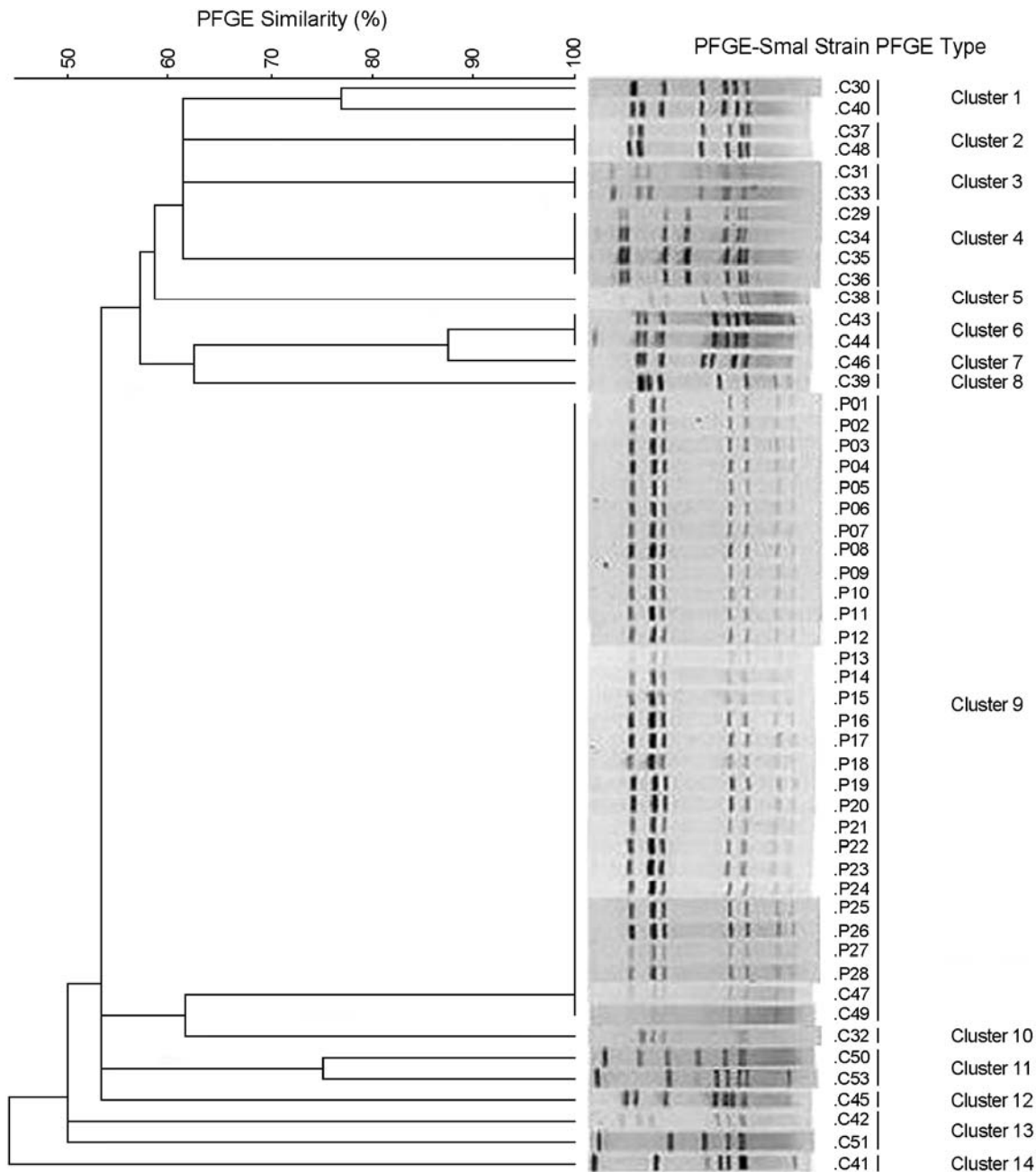
**Figure 3.** Agarose gel electrophoresis of PCR products generated by primer pairs for *cdtB* gene for detection of cytolethal distending toxin. Lane 13 to 25, *C. jejuni*; M, size marker.

직접 집락 부유액 (direct colony suspension)을 만들었다. Replicator를 써서 접종하고 10% CO<sub>2</sub> 배양기에서 37℃에 48시간 배양한 후에 관찰하여 증식을 완전히 억제시킨 최소의 항균제 농도를 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)로 하였다. 정도관리를 위해 *S. aureus* ATCC 25923과 *Escherichia coli* ATCC 25922를 동시에 시험하였다.

## 결 과

### 1. 닭에서의 *C. jejuni* 분리율

2008년 7월에 익산지역 닭의 장내용 92검체 중 48개 검체로부터 *C. jejuni*가 분리되어 52%의 검출율을 보였다. 이 중 26주와, 2007년 6월 익산지역 설사환자에서 분



**Figure 4.** PFGE of *Sma*I-restricted DNA from *C. jejuni* isolates from diarrhea patients and chickens the dendrogram was based on the unweighted-pair group method using arithmetic averages from the Dice coefficient.

리된 28주의 *C. jejuni*는 배양 성장과 생화학적 성장 및 *hipO* 유전자 검출 결과가 전형적이었으나, 모든 균주가 nalidixic acid에 내성을 보였다 (Table 2, Fig. 1).

2. 설사환자와 닭에서 분리된 균주의 생화학적 성장, ciprofloxacin 내성과 *gyrA* 및 *cjdtB* 검출

설사환자에서 분리된 *C. jejuni* 28주와 닭에서 분리된 26주 모두는 nalidixic acid와 ciprofloxacin에 내성을 보였고, nalidixic acid의 MIC<sub>50</sub>과 MIC<sub>90</sub>은 모두  $\geq 128$   $\mu\text{g/ml}$ 이었다. Ciprofloxacin의 MIC<sub>50</sub>과 MIC<sub>90</sub>은 설사환자 균주 모두에 대해서 16  $\mu\text{g/ml}$ 이었으나, 닭에서 분리된 균주에 대한 MIC<sub>50</sub>은 16  $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>90</sub>은 128  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 한편 시험된 모든 균주에서는 변이된 *gyrA* 유전자가 PCR법으로 검출되었다 (Table 2, Fig. 2). 또한 *cjdtB*가 모든 균주에서 검출되었다 (Table 2, Fig. 3).

3. PFGE 분석에 의한 유전자형 분석

*C. jejuni* 53 균주의 DNA를 SmaI 제한효소로 처리하여 PFGE를 시행하고 분석한 바 14 cluster로 분류되었다. 가장 많은 균주가 cluster 9 (57%)이었고, 설사환자 균주 28주 (P1-P28)와 닭 균주 2주 (C47, C49)의 PFGE형이 동일하였다. 한편 닭에서 분리된 cluster 2인 2주 (C37, C48), cluster 3인 2주 (C31, C33), cluster 4인 4주 (C29, C34, C35, C36), cluster 6인 2주 (C43, C44)는 각각 유사도가 100%이었다 (Fig. 4).

4. 항균제 감수성

디스크법 감수성 시험에서 환자 균주는 amikacin, gentamicin, cefotaxime, imipenem, chloramphenicol, erythromycin에는 모든 균주가 감수성이었으나, kanamycin에는 96%가 감수성이었다. Tetracycline에는 93%가 내성이었고, ampicillin, cephalothin, ciprofloxacin, nalidixic acid 및 co-trimoxazole에는 모두가 내성이었다.

닭에서 분리된 균주는 cefotaxime, imipenem, erythromycin, gentamicin에는 모두가 감수성이었으나, kanamycin에는 92%, amikacin에는 87%, chloramphenicol에는 80%, ampicillin과 co-trimoxazole에는 31% 이하의 균주만이 감수성이었다. Co-trimoxazole에는 96%가 내성을, ciprofloxacin, nalidixic acid 및 tetracycline에는 모든 균주가 내성을 보였다 (Table 3).

항균제의 MIC는 환자와 닭에서 분리한 *C. jejuni* 모든

**Table 3.** Disk diffusion antimicrobial susceptibility of 54 *C. jejuni* isolates from patients with diarrhea and chickens

Antimicrobial agents	Patients (N=28) <sup>a</sup>			Chickens (N=26)		
	S <sup>b</sup>	I	R	S	I	R
Amikacin	100	0	0	87	0	13
Ampicillin	0	0	100	31	0	69
Cefotaxime	100	0	0	100	0	0
Cephalothin	0	0	100	0	0	100
Chloramphenicol	100	0	0	80	4	16
Ciprofloxacin	0	0	100	0	0	100
Erythromycin	100	0	0	100	0	0
Gentamicin	100	0	0	100	0	0
Imipenem	100	0	0	100	0	0
Kanamycin	96	4	0	92	0	8
Nalidixic acid	0	0	100	0	0	100
Tetracycline	0	7	93	0	0	100
Co-trimoxazole	0	0	100	4	0	96

<sup>a</sup>No. of isolates tested.

<sup>b</sup>S, susceptible; I, intermediate; R, resistant.

균주에 대해 erythromycin 4  $\mu\text{g/ml}$ , gentamicin 2  $\mu\text{g/ml}$ , imipenem 2  $\mu\text{g/ml}$ 로 낮았다. Clindamycin의 MIC는 환자 균주 모두에 대해 2  $\mu\text{g/ml}$ 이었으나, 닭 분리 균주에 대한 MIC 범위는 2~128  $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>50</sub>은 2  $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>90</sub>은 32  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. Tetracycline의 MIC 범위는 환자 균주에 대해 32~64  $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>50</sub>과 MIC<sub>90</sub>은 각각 64  $\mu\text{g/ml}$ 이었고, 닭 균주에 대한 MIC 범위는 64~ $\geq 128$   $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>50</sub>과 MIC<sub>90</sub>은 각각  $\geq 128$   $\mu\text{g/ml}$ 이었다 (Table 4). 한천회석법 감수성 시험 결과에 breakpoint를 적용하여 해석한 바 (Table 4) ampicillin과 tetracycline을 제외하고는 디스크 확산법 결과 (Table 3)와 일치하였다.

## 고 찰

*C. jejuni*는 장염의 중요한 원인균 중 한 가지이며, 이 세균은 각종 야생동물 및 가축의 장관 내에 널리 분포하고, 특히 닭, 칠면조, 돼지, 개, 소, 고양이 등에서 보균율이 높으며, 특히 닭은 50~100%가 이 세균을 보균하고 있다. 충분히 가열 안한 육류, 살균 안한 우유, 및 오염된 음료수 등에 의해서 사람에게 감염됨이 알려져 있다. 이 세균은 공기 중 노출이나 건조, 낮은 pH, 가열에 대

**Table 4.** Agar dilution antimicrobial susceptibility of *C. jejuni* from patients with diarrhea and chickens

Source of isolates (No. tested)	Antimicrobial agent	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			% resistant
		Range	50%	90%	
Patients (28)	Ampicillin	128 ~ $\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	100
	Cephalothin	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	100
	Ciprofloxacin	8~32	16	16	100
	Clindamycin	2	2	2	0
	Erythromycin	$\leq 0.5 \sim 4$	1	4	0
	Gentamicin	$\leq 0.5 \sim 1$	$\geq 0.5$	2	0
	Imipenem	0.125	0.125	0.125	0
	Nalidixic acid	128 ~ $\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	100
	Tetracycline	32~64	64	64	100
Chicken (26)	Ampicillin	16 ~ $\geq 128$	128	$\geq 128$	96
	Cephalothin	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	100
	Ciprofloxacin	16 ~ $\geq 128$	16	128	100
	Clindamycin	2~128	2	32	46
	Erythromycin	$\leq 0.5 \sim 1$	$\leq 0.5$	1	0
	Gentamicin	1~2	2	2	0
	Imipenem	0.06~2	0.125	1	0
	Nalidixic acid	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	100
	Tetracycline	64 ~ $\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	100

한 저항성이 낮으며, 식품 중에서는 증식하기 어려우나, 500 정도의 적은 세균 수로도 장염을 일으킬 수 있으며, 여러 나라에서 세균성 식중독의 가장 빈번한 원인균으로 보고되어 있다 (40).

닭 검체에서의 *C. jejuni* 분리율은 본 연구에서 52%로, Kim 등 (26)의 66.3%나 Kim 등 (27)의 61%보다 낮았으나, Kim 등 (28)의 50.3%보다 높아서 닭이 *C. jejuni*의 감염원으로 중요함을 확인할 수 있었다.

*Campylobacter* 균종의 감별은 생화학적 성상으로는 쉽지 않다고 알려져 있다. *C. jejuni*는 hippurate 가수분해시험 양성임으로 다른 균종과 감별하는데, Dassanayake 등 (7)은 *C. jejuni*의 13%는 hippurate 분해 음성이라고 보고하였다.

*Campylobacter* 감염 치료에는 fluorofloxacin 중 특히 ciprofloxacin이 널리 사용되었다. 근년에 미국 등 여러 나라에서는 ciprofloxacin에 내성인 균주가 알려져 있다. Sánchez 등은 (50) 스페인에서 1988년에 분리한 균주 중에는 ciprofloxacin 내성균이 없었는데 1992년에는 49.5%

이었음을 보고하였으며, ciprofloxacin 내성은 변이된 *gyrA* 유전자 때문으로 알려졌다 (61). 따라서 *Campylobacter* 균종 감별과 ciprofloxacin 내성 시험에 여러 가지 유전자 검출방법이 보고되고 있으며, 본 연구에서는 Wang 등 (55)이 보고한 *hipO* 유전자와 Zimstein 등 (61)이 보고한 변이된 *gyrA* 유전자를 PCR로 검출한 바 환자와 닭 균주 모두가 양성으로, *C. jejuni* 동정과 ciprofloxacin 내성 균주의 검출에 이용할 수 있었다.

한편 몇 가지 독성인자 (virulence determinant)가 병원성 *Campylobacter* 균종에서 확인되었으나 질병에서의 세포독소의 중요성은 잘 알려지지 않았다 (57). CDT는 1988년 경에 사람이나 다른 검체에서 분리된 *Shigella*, *E. coli* 및 *C. jejuni*에서 처음으로 확인되었는데 (23,24), 열과 trypsin에 불안정한 세포독소이다. CDT의 유전자인 *cdtB*는 대부분의 *Campylobacter* 균종 (11)과 몇 가지 *E. coli* 혈청형에서 지난 10년 동안 발견되었다 (9,37). "CDT"라는 독소에 CHO, Vero, HeLa와 HEp-2 세포는 감수성이 있지만 Y-1 세포는 감수성이 없다. 이 독소는 세포 내에서 cAMP를



증가시켜서 CHO 세포를 신장시키고 2~5일간 배양 후에는 세포가 광범위하게 팽창되어, 사멸되는 것으로 알려져 있다. 이 팽창은 중독된 세포의 세포질뿐만 아니라 핵에서도 일어나 정상세포보다 2배 가량 커져서, 그 활성화와 형태학적 변화 때문에 "cytolethal distending toxin"라고 칭하였다. *cdtB*의 상동성과 CDT 활성은 장점막과 관련있는 *Helicobacter hepaticus* (4,29)와 최근에는 *Salmonella enterica* serovar Typhi에서 발견되었으며 (18), *cdtB* 유전자와 CDT 활성을 가진 다른 그람음성간균으로는 치주병원성인 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (2)와 성감염균인 *Haemophilus ducreyi*가 알려져 있다. 단지 *cdtB*만 발견되는 *Salmonella enterica* serovar Typhi를 제외하고는 모든 미생물에서의 CDT는 *cdtA* (30 kDa), *cdtB* (29 kDa), *cdtC* (21 kDa)에 의해서 encoding되는 polypeptide complex는 CdtA, CdtB, CdtC이다 (30,43,44).

Dassanayake 등은 (7) *cdtB* 유전자는 *C. jejuni*와 *C. coli* 모두에서 발견되었으나 CDT 활성은 *C. jejuni*에서만 나타난다고 하였다. 본 연구에서도 환자와 닭 균주인 *C. jejuni* 모두에서 *cdtB* 유전자가 검출되어서 독소생성 검출뿐 만아니라 *C. coli*와 감별하는 지표로도 사용할 수 있다고 추정되었다.

설사환자와 닭에서 분리한 *C. jejuni* 52주에 대하여 *Sma*I 제한효소로 처리한 유전자 DNA의 PFGE 분석에서 유전자형은 14가지 cluster로 분류되었으며, 이 중 cluster 9가 56%로 가장 많았으며, 또한 설사환자의 변에서 분리된 28주 (P1-P28)와 닭에서 분리된 2주 (C47과 C48)의 형이 동일하여 같은 클론으로 판단되며, 설사환자의 감염원이 닭으로 사료되었다. 한편 닭에서 분리된 cluster 2에 속한 2주, cluster 3인 2주, cluster 4인 4주, cluster 6인 2주는 각각 유사도가 100%로 역시 동일한 클론으로 추정되었다.

Fluoroquinolone이 개발된 초기에는 여러 균종에 대한 항균력이 대단히 높았고 (15,51), *Campylobacter* 장염 치료에 유용하게 사용되었다 (14). 그러나 fluoroquinolone이 널리 사용됨에 따라서 fluoroquinolone 내성 *Campylobacter* (fluoroquinolone-resistant *Campylobacter*, FRC) 균주가 점차 증가 추세로 보고되었다 (35,60). Sánchez 등은 스페인에서 1988년에 분리한 균주 중에는 FRC가 없었는데, 1992년에는 51.3%의 비율을 보고하였고, Gaunt와 Piddock (13)는 1991년 영국에서 분리된 *Campylobacter* 균주 가운데 ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* (CRC) 균주가 4.1%이었으며, CRC 75주 중에는 *C. jejuni*가 90.6%, *C. lari*가 8%

그리고 *C. coli*는 1.3%이었음을 보고하였고, Ruiz 등 (49)은 1990년 스페인 장염환자에서 분리된 *C. jejuni* 균주의 ampicillin과 ciprofloxacin 내성율이 각각 56%와 47.5%이었으나, 1994년에는 각각 76%와 88%로 거의 2배로 증가하였음을 보고하였다. Rautelin 등 (46)은 1980년에 핀란드 환자에서 분리된 *C. jejuni* 균주 가운데 CRC 균주가 없었으나, 1990년에는 9%로 증가하였음을 보고하였고, 네덜란드의 Jacobs-Reitsma (21)는 가금류 중에서 quinolone 내성 *Campylobacter* 균주가 29%이었음과 *Campylobacter*가 정착된 닭에 quinolone을 투여하면 quinolone 내성 *Campylobacter* 균주가 선택됨을 보고하였으나, quinolone 치료가 *Campylobacter* 정착과는 관계가 없다고 하였다 (46).

다른 그람음성간균과는 달리 nalidixic acid에 내성인 *C. jejuni*는 ciprofloxacin, norfloxacin 등에 교차내성이었음이 보고되었다 (16). 본 연구에서는 디스크 확산법과 한천회석법의 감수성 시험에서 환자나 닭 균주 모두가 nalidixic acid와 ciprofloxacin에 내성을 보였고, nalidixic acid의 MIC<sub>50</sub>와 MIC<sub>90</sub>은 각각  $\geq 128$   $\mu\text{g/ml}$ 이었다. Ciprofloxacin의 환자 균주에 대한 MIC 범위가 8~32  $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>50</sub>와 MIC<sub>90</sub>은 각각 16  $\mu\text{g/ml}$ 이었으나, 닭 균주에 대한 MIC 범위는 16~ $\geq 128$   $\mu\text{g/ml}$ , MIC<sub>50</sub>와 MIC<sub>90</sub>은 각각 16과 128  $\mu\text{g/ml}$ 이었다. 또한 ciprofloxacin 내성을 나타내게 하는 변이된 *gyrA* 유전자를 검출하는 시험도 모두가 양성을 보여서, nalidixic acid 디스크 시험은 *C. jejuni*와 *C. lari* 감별에 이용할 수 없으며, *Campylobacter* 감염 치료에 fluoroquinolone을 사용할 때에는 감수성 시험이 반드시 필요하다고 판단되었다.

한편 Li 등 (32)은 닭에서 분리한 *C. jejuni* 균주는 tetracycline, ciprofloxacin 및 nalidixic acid에 83% 이상, erythromycin과 clindamycin에 17% 이하가 내성임을 보고하였다.

본 연구에서 환자 균주는 amikacin, gentamicin, cefotaxime, imipenem, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin에는 모두가, kanamycin에는 96%가 감수성을 보였고, ampicillin, co-trimoxazole에는 모두가, tetracycline에는 93%가 내성이었다. 그러나 닭 균주는 cefotaxime, imipenem, erythromycin, gentamicin에는 모두가, kanamycin에는 92%, amikacin에는 87%, chloramphenicol에는 80%, ampicillin에는 31%, co-trimoxazole에는 4%가 감수성을, tetracycline에는 모두가, cotrimoxazole에는 96%, ampicillin에는 69%, clindamycin에

는 46%, chlramphenicol, amikacin, kanamycin에는 16% 이하가 내성이었다.

Reina (47)는 인도에서 분리한 *C. jejuni*의 ampicillin 내성율은 사람 분리주가 22.2%로 닭 분리주 6.7%보다 높았으나, tetracycline 내성율은 닭 균주가 13.3%로 사람 균주 6.7%보다 다소 높았다고 보고하였는데, 본 연구에서는 분리시기가 다르지만 ampicillin과 tetracycline에 대하여 환자나 닭 균주가 96% 이상의 높은 내성율을 보여 현저히 다른 경향이였다.

또한 본 연구에서 imipenem의 MIC<sub>90</sub>는 가장 낮았는데, 환자 균주에 대해서는 0.125 µg/ml, 닭 균주에 대해서는 1 µg/ml로 Kim 등 (27)의 보고와 비슷하였다.

*C. jejuni*의 clindamycin과 erythromycin 감수성에는 차이가 있으며 (47,56), *C. jejuni* 중증 감염인 경우 clindamycin 사용이 권장되고 있다 (36,56). 한편 *Campylobacter* 감염 치료에는 erythromycin이 권장되지만 이미 오래전부터 내성균이 알려지고 있다 (33,58). 즉, Vanhoof 등 (53)은 벨기에에서 1978년에 사람에서 분리된 *Campylobacter* 균주 중 8.4%가, 1980년에는 2.3%가, Walder (54)는 스웨덴에서 8%가, Karmali 등 (25)은 캐나다에서 0.5~1%가, 닭 균주의 경우 Kim 등 (26)은 25%가, Chong 등 (6)은 65.9%가 erythromycin에 내성이 있음을 보고하였으나, Wang 등 (56)은 MIC<sub>90</sub>이 4 µg/ml로 내성균이 없는 것으로 보고하였다.

본 연구의 결과에서는 *C. jejuni*에 대한 erythromycin은 MIC<sub>90</sub>이 환자 균주와 닭 균주에 대해서 각각 4와 1 µg/ml로 모두 감수성을 보여 이 세균에 대한 치료제로 erythromycin이 유효하다고 추정되었으나, 외국과 국내 연구에서도 내성균이 보고된 바 있으므로 *C. jejuni* 감염 치료시 항균제 감수성 시험으로 erythromycin 내성을 확인을 해야 할 것이다. 또한 tetracycline도 *Campylobacter* 감염에 치료제로 알려져 있으나, 세계 각 지역에서 높은 내성균이 보고되고 있으며 (40), 본 연구에서도 MIC<sub>90</sub>이 환자 균주에 대해서 64 µg/ml, 닭 균주에 대해서 ≥128 µg/ml로 모든 균주가 내성을 보여 이 지역 균주의 tetracycline 내성율이 매우 높음을 알 수 있었다.

본 연구에서 익산지역 환자와 닭에서 분리한 *C. jejuni*를 대상으로 닭에서의 분리율, 분리 균주의 생화학적 성상, PCR에 의한 *hipO*, 변이된 *gyrA*, 및 *cdtB* 유전자 검출, SmaI 처리 염색체 DNA의 PFGE에 의한 유전자형 및 항균제 감수성 시험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

2008년 7월에 시험한 닭에서의 *C. jejuni* 분리율은 52%이었다. 설사환자에서 2007년 6월에 분리한 *C. jejuni* 28주와 닭에서 분리한 *C. jejuni* 92주는 모두가 nalidixic acid에 내성인 것을 제외하고는 *C. jejuni*의 전형적인 생화학적 성상을 보였다. *hipO* 유전자, ciprofloxacin에 내성을 나타내는 변이 *gyrA* 유전자 및 *cdtB* 유전자가 모든 균주에서 검출되었다. *C. jejuni* 52 균주의 DNA를 SmaI 제한효소로 처리하여 PFGE를 시행하고 분석한 바 14가지 cluster로 구별되었다. 가장 많은 균주 (57%)가 cluster 9이었고, 설사환자 균주 28주 (P1-P28)와 닭 균주 2주 (C47, C49)의 PFGE형이 동일하였다. 한편 닭에서 분리된 cluster 2에 속한 2주 (C37, C48), cluster 3인 2주 (C31, C33), cluster 4인 4주 (C29, C34, C35, C36), cluster 6인 2주(C43, C44)는 각각 유사도가 100%이었다.

환자와 닭에서 분리된 모든 균주는 ciprofloxacin에 내성이었으며, MIC<sub>90</sub>는 환자균주에 대해서 16 µg/mL, 닭 균주에 대해서 128 µg/mL이었다.

환자에서 분리된 *C. jejuni* 균주는 모두가 amikacin과 chloramphenicol에 감수성이었으나, 닭에서 분리한 균주는 이들 항균제에 각각 87%와 80%만이 감수성이었다. 한편 환자균주는 모두가 ampicillin과 cotrimoxazole에 내성이었으나 닭 균주의 이들 항균제에 대한 내성율은 각각 69%와 96%로 낮았다. 낮은 MIC<sub>90</sub>을 보인 항균제는 imipenem, gentamicin, erythromycin이었으며, 가장 높은 MIC<sub>90</sub>을 보인 항균제는 ampicillin과 tetracycline이었다.

이상의 결과로 익산지역 닭의 *C. jejuni* 보균율은 높으며, 설사환자에서 분리된 28균주 (P1-P28)와 닭 분리 2주 (C47, C49)는 동일한 균주로 추정되며, 닭에서 분리된 다른 균주들은 설사환자 분리주와 유사도가 62% 이하로서 다른 클론으로 추정되었으며, 환자나 닭에서 분리된 *C. jejuni*는 모두 ciprofloxacin에 내성이며, 모든 균주는 *hipO*, *cdtB* 유전자를 보유하였다는 결론을 얻었다.

## 참 고 문 헌

- 1) Aarestrup FM, Wegener HC: The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes Infect* 1: 639-644, 1999.
- 2) Ahmed HJ, Svensson LA, Cope LD, Latimer JL, Hansen EJ, Ahlman K, Bayat-Turk J, Klammer D, Lagergrd T:

- Prevalence of *cdtABC* genes encoding cytolethal distending toxin among *Haemophilus ducreyi* and *Actinobacillus actinomycescomitans* strains. *J Med Microbiol* **50**: 860-864, 2001.
- 3) **Altekruse SF, Stern NJ, Fields PI, Swerdlow DL**: *Campylobacter jejuni* an emerging foodborne pathogen. *Emerg Infect Dis* **5**: 28-35, 1999.
  - 4) **Chien CC, Taylor NS, Ge Z, Schauer DB, Young VB, Fox JG**: Identification of *cdtB* homologues and cytolethal distending toxin activity in enterohepatic *Helicobacter* spp. *J Med Microbiol* **49**: 525-534, 2000.
  - 5) **Clinical and Laboratory Standards Institute**: Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. CLSI Document M45-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2006.
  - 6) **Chong Y, Yi KN, Lee SY**: Isolation rate of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from enteritis patients. *J Kor Soc Microbiol* **17**: 43-48, 1982.
  - 7) **Dassanayake RP, Zhou Y, Hinkley S, Stryker CJ, Plauche G, Borda JT, Sestak K, Duhamel GE**: Characterization of cytolethal distending toxin of *Campylobacter* species isolated from captive macaque monkeys. *J Clin Microbiol* **2**: 641-649, 2005.
  - 8) **Van Deun K, Haesebrouck F, Heyndrickx M, Favoreel H, Dewulf J, Ceelen L, Dumez L, Messens W, Leleu S, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F**: Virulence properties of *Campylobacter jejuni* isolates of poultry and human origin. *J Med Microbiol* **56**: 1284-1289, 2007.
  - 9) **Elwell C, Chao K, Patel K, Dreyfus L**: *Escherichia coli cdtB* mediates cytolethal distending toxin cell cycle arrest. *Infect Immun* **69**: 3418-3422, 2001.
  - 10) **Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B, Jansen WH, van der Reyden T, Mouton RP**: Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemother* **27**: 199-208, 1991.
  - 11) **Eyigor A, Dawson KA, Langlois BE, Pickett CL**: Detection of cytolethal distending toxin activity and *cdt* genes in *Campylobacter* spp. isolated from chicken carcasses. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1501-1505, 1999.
  - 12) **Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, Tauxe RV**: Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. pp 121-138. In *Campylobacter*, 2nd ed, Nachamkin I, Blaser MJ (Ed), ASM Press, Washington, D.C., 2000.
  - 13) **Gaunt PN, Piddock LJ**: Ciprofloxacin resistant *Campylobacter* spp. in humans: an epidemiological and laboratory study. *J Antimicrob Chemother* **37**: 747-757, 1996.
  - 14) **Goodman LJ, Trenholme GM, Kaplan RL, Segreti J, Hines D, Petrak R, Nelson JA, Mayer KW, Landau W, Parkhurst GW, et al**: Empiric antimicrobial therapy of domestically acquired acute diarrhea in urban adults. *Arch Intern Med* **150**: 541-546, 1990.
  - 15) **Goossens H, De Mol P, Coignau H, Levy J, Grados O, Ghysels G, Innocent H, Butzler JP**: Comparative *in vitro* activities of aztreonam, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, HR 810 (a new cephalosporin), RU28965 (a new macrolide), and other agents against enteropathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **27**: 388-392, 1985.
  - 16) **Gootz TD, Martin BA**: Characterization of high-level quinolone resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 840-845, 1991.
  - 17) **Grant IH, Richardson NJ, Bokkenheuser VD**: Broiler chickens as potential source of *Campylobacter* infections in humans. *J Clin Microbiol* **11**: 508-510, 1980.
  - 18) **Haghjoo E, Galn JE**: *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 4614-4619, 2004.
  - 19) **Han K, Jang SS, Choo E, Heu S, Ryu S**: Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea. *Int J Food Microbiol* **114**: 50-59, 2007.
  - 20) **Hébert GA GA, Hollis DG, Weaver RE, Lambert MA, Blaser MJ, Moss CW**: 30 years of Campylobacters: Biochemical characteristics and a biotyping proposal for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* **15**: 1065-1073, 1982.
  - 21) **Jacobs-Reitsma WF**: Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. *Vet Q* **19**: 113-117, 1997.
  - 22) **Johnson WM, Lior H**: Production of shiga toxin and a cytolethal distending toxin (CLDT) by serogroups of *Shigella* spp. *FEMS Microbiol Lett* **48**: 235-238, 1987.
  - 23) **Johnson WM, Lior H**: A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Escherichia coli* isolates from clinical material. *Microb Pathog* **4**: 103-113, 1988.
  - 24) **Johnson WM, Lior H**: A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp. *Microb Pathog* **4**: 115-126, 1988.

- 25) **Karmali MA, De Grandis S, Fleming PC:** Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* with special reference patterns of Canadian isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **19**: 593-597, 1981.
- 26) **Kim EC, Shim ES, Seong CN, Kim SM:** Isolation and antimicrobial susceptibility of quinolone-resistant *Campylobacter jejuni*. *Korean J Clin Lab Sci* **31**: 75-90, 1999.
- 27) **Kim SM, Chong SJ:** Prevalence and *in vitro* antimicrobial activity against *Campylobacter/coli* from chickens. *Korean J Clin Lab Sci* **28**: 20-28, 1996.
- 28) **Kim SM, Chong YS, Lee HH:** Studies on epidemiology of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* infection. *Korean J Microbiol* **21**: 170-176, 1983.
- 29) **Kostia S, Veijalainen P, Hirvi U, Hnninen ML:** Cytolethal distending toxin B gene (*cdtB*) homologues in taxa 2, 3 and 8 and in six canine isolates of *Helicobacter* sp. *lexispira*. *J Med Microbiol* **52**: 103-108, 2003.
- 30) **Lara-Tejero M, Galán JE:** Cytolethal distending toxin: limited damage as a strategy to modulate cellular functions. *Trends Microbiol* **10**: 147-152, 2002.
- 31) **Leuchtefeld NW, Wang WL:** *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* in turkey processing plant. *J Clin Microbiol* **13**: 266-268, 1981.
- 32) **Li CC, Chiu CH, Wu JL, Huang YC, Lin TY:** Antimicrobial susceptibilities of *Campylobacter jejuni* and *coli* by using E-test in Taiwan. *Scand J Infect Dis* **30**: 39-42, 1998.
- 33) **Lin J, Yan M, Sahin O, Pereira S, Chang YJ, Zhang, Q:** Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 1678-1686, 2007.
- 34) **Lior H, Woodward DL, Edgar JA, Laroche LJ, Gill P:** Serotyping of *Campylobacter jejuni* by slide agglutination based on heat-labile antigenic factors. *J Clin Microbiol* **15**: 761-768, 1982.
- 35) **McNulty CA:** The treatment of *Campylobacter* infections in man. *J Antimicrob Chemother* **19**: 281-284, 1987.
- 36) **Michel J, Rogol M, Dickman D:** Susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* to sixteen antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **23**: 796-797, 1983.
- 37) **Mooney A, Clyne M, Curran T, Doherty D, Kilmartin B, Bourke B:** *Campylobacter upsaliensis* exerts a cytolethal distending toxin effect on HeLa cells and T lymphocytes. *Microbiology* **147**: 735-743, 2001.
- 38) **Nachamkin I, Engberg J, Aarestrup FM:** Diagnosis and antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* spp.. pp 45-65. *In Campylobacter*, 2nd ed, Nachamkin I, Blaser MJ (Ed), ASM Press, Washington D.C., 2000.
- 39) **Newel DG, Frost JA, Duim B, Wagenaar JA, Madden RH, Van der Plas J, et al:** New developments in the subtyping of *Campylobacter* species. pp 27-44. *In Campylobacter*, 2nd ed, Nachamkin I, Blaser MJ (Ed), ASM Press, Washington DC, 2000.
- 40) **Pedersen K, Wedderkopp A:** Resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish broilers at farm level. *J Appl Microbiol* **94**: 111-119, 2003.
- 41) **Penner JL, Hennessy JN:** Passive hemagglutination technique for serotyping *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* on the basis of soluble heat stable antigen. *J Clin Microbiol* **12**: 732-737, 1980.
- 42) **Penner JL, Hennessy JN, Congi RV:** Serotyping of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* on the basis of thermostable antigens. *Eur J Clin Microbiol* **2**: 378-83, 1983.
- 43) **Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN, Zeytin H:** Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* sp. *cdtB* genes. *Infect Immun* **64**: 2070-2078, 1996.
- 44) **Pickett CL, Whitehouse CA:** The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol* **7**: 292-297, 1999.
- 45) **Piddock LJ:** Quinolone resistance and *Campylobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* **35**: 891-898, 1995.
- 46) **Rautelin H, Renkonen OV, Kosunen TU:** Emergence of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in subjects from Finland. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 2065-2069, 1991.
- 47) **Reina J, Ros MJ, Serra A:** Susceptibilities to 10 antimicrobial agents of 1220 *Campylobacter* strains isolated from 1987 to 1993 from feces of pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 2917-2920, 1994.
- 48) **Ribot EM, Fitzgerald C, Kubota K, Swaminathan B, Barrett TJ:** Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* **39**: 1889-1894, 2001.
- 49) **Ruiz J, Goi P, Marco F, Gallardo F, Mirelis B, Jimenez De Anta T, Vila J:** Increased resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni*: a genetic analysis of *gyrA* gene mutations in quinolone-resistant clinical isolates. *Microbiol Immunol* **142**: 223-226, 1998.
- 50) **Snchez R, Fernandez-Baca V, Daz MD, Muoz P, Rodriguez-**

- Crixems M, Bouza E:** Evolution of susceptibilities of *Campylobacter* spp. to quinolones and macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* **38**: 1879-1882, 1994.
- 51) **Segreti J, Nelson JA, Goodman LJ, Kaplan RL, Trenholme GM:** *In vitro* activities of lomefloxacin and temafloxacin against pathogens causing diarrhea. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 1385-1387, 1989.
- 52) **Vanhoof R, Goossens H, Coignau H, Stas G, Butzler JP:** Susceptibility pattern of *Campylobacter jejuni* from human and animal origin to different antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **21**: 990-992, 1982.
- 53) **Vanhoof R, Vanderlinden MP, Dierickx R, Lauwers S, Yourassowsky E, Butzler JP:** Susceptibility of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* to twenty nine antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **14**: 553-556, 1978.
- 54) **Walder M:** Susceptibility of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* to twenty antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **16**: 37-39, 1979.
- 55) **Wang G, Clark CG, Taylor TM, Punknell C, Barton C, Price L, Woodward DL, Rodgers FG:** Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microbiol* **40**: 4744-4747, 2002.
- 56) **Wang W-L L, Reller LB, Smallwood B, Luechtefeld NW, Blaser MJ:** Evaluation of transport media for *Campylobacter jejuni* in human fecal specimens. *J Clin Microbiol* **18**: 803-807, 1983.
- 57) **Wassenaar TM:** Toxin production by *Campylobacter* spp. *Clin Microbiol Rev* **10**: 466-476, 1997.
- 58) **Wiström J, Norrby SR:** Fluoroquinolones and bacterial enteritis, when and for whom? *J Antimicrob Chemother* **36**: 23-29, 1995.
- 59) **Wittwer M, Keller J, Wassenaar TM, Stephan R, Howald D, Regula G, Bissig-Choisat B:** Genetic diversity and antibiotic resistance patterns in a *Campylobacter* population isolated from poultry farms in Switzerland. *Appl Microbiol* **71**: 2840-2847, 2005.
- 60) **Zaman R:** *Campylobacter* enteritis in Saudi Arabia. *Epidemiol Infect* **108**: 51-58, 1992.
- 61) **Zirnstein G, Li Y, Swaminathan B, Angulo F:** Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* isolates: detection of *gyrA* resistance mutations by mismatch amplification mutation assay PCR and DNA sequence analysis. *J Clin Microbiol* **37**: 3276-3280, 1999.