

PCR을 이용한 *Salmonella enteritidis*의 특이적 검출

인수공통전염병팀

조미영 · 여용구 · 김영섭 · 이정학 · 김영수 · 이병동

Specific detection of *Salmonella enteritidis* using Polymerase Chain Reaction Method

Zoonosis Team

Mi-Yeong Jo, Yong-Gu Yeo, Young-Sub Kim, Jung-Hak Lee, Young-Soo Kim,
and Byung-Dong Lee

Abstract

Salmonella enteritidis is the most prevalent etiologic agents of foodborne acute gastroenteritis. Direct isolation and identification of *S. enteritidis* are time consuming work and not so highly sensitive. This study was conducted to develop for the specific detection of *S. enteritidis* using polymerase chain reaction(PCR). PCR primers were selected to amplify a 351-base pair(bp) DNA fragment from the salmonella plasmid virulenceA(spv A) gene of *S. enteritidis*. With the primers, 351bp DNA products were amplified from *S. enteritidis* but not from other B,D, C1 serogroup Salmonella spp.. It was sensitive to detect up to 40pg of template DNA by agarose gel electrophoresis.

We suggest that this PCR assay would be very rapid and specific method and less time consuming than the standard bacteriological methods.

서 론

Salmonella enterica serotype Enteritidis는 1980년대중반이후 foodborne disease의 원인으로 폭발적인 증가현상을 보이고 있다. 최근 10년간 미국 및 유럽국가에서도 공중보건을 위협하는 가장 중요한 식중독 원인균으로 보고되었으며^{9,18)}, 우리나라에서도 1997년 국립보건원의 자료에 의하면 1년간 환자로부

터의 가검물에서 *S. enteritidis* 364주, *S. typhimurium* 207주, *S. typhi* 108주의 순으로 분리되어 식중독을 일으키는 *S. enteritidis*와 *S. typhimurium*이 전체의 68.6%를 차지하였다고 보고 되었으며²⁾ 1999년 경기도에서도 농장가검물 및 사람에서 *S. enteritidis*가 가장 많이 분리되었다¹⁾. 이와같은 식중독을 예방하기 위해 가검물이나 식품에서 *S. enteritidis*의 오염이나 감염을 신속하고 빠르게 진단하는 방법은 매우 중요하다고 하겠다.

*S. enteritidis*를 진단하기 위해서는 먼저 *Salmonella*속군의 분리 및 동정이 선행되어야 하며, 또 lipopolysaccharide(O 항원)와 flagella protein(H 항원)에 의한 2,200여 혈청형 구분을 위한 검사가 수행되어야 한다. 고전적 배양방법이 많은 시간과 복잡한 절차가 요구되어 최근에는 *Salmonella* 속군을 신속하고 정확하게 분리하기 위하여 선택성이 높은 Rambachagar를 이용하거나^{13,16)}, MUCAP test 시약²³⁾, C8 esterase test 시약¹³⁾ 등을 이용하는 방법들이 보고되었다. 혈청형을 구분하기 위해서는 일반적으로 항원에 대한 인자 혈청을 이용한 응집반응을 사용하고 있으며 다른 대체적인 방법으로 FA, ELISA 등을 이용했을 때 유용하고 또 시간을 절약할 수 있었으나 다른 세균종과의 교차반응으로 인한 위양성 반응이 흔하여 특이성에서 문제가 되고 있다^{10,15,20)}.

이러한 문제점을 해결하고자 *Salmonella*의 유전자를 이용한 연구가 활발히 진행되었다. 그 중 phosphate가 결핍된 환경에서 발현되는 균체외막 단백질 발현유전자인 *phoE*^{2,4,25)}, LPSO 항원의 합성과 관련된 *rfb5*,^{7,19,26)} fimbria 항원 유전자인 *sef*^{8,11,12)}, 상피세포에 대한 부착과 침습에 관련된 *inv*유전자^{14,15)} 등에 대해 PCR 법을 사용하여 *Salmonella* 속군을 신속하고 특이적으로 검출하고자 한 연구가 많이 보고되었다.

*S. enteritidis*를 특이적이며 민감하고 빠르게 검출하기 위한 연구가 1996년 Lampel 등¹⁸⁾에 의해 보고되었는데, *Salmonella*속군의 plasmid에 암호화된 병원성 발현유전자인 *spvA* gene이 뉴클레오타이드 수준에서 매우 동일하며 Enteritidis와 다른 *Salmone*

llae와는 단지 13개의 뉴클레오타이드만이 다르다는 것에 착안하여 Mismatch amplification mutation assay(MAMA)을 이용하여 *S. enteritidis*만을 특이적으로 검출할 수 있는 primer를 개발하여 보고하였다.

이 실험은 이 primer를 이용하여 *S. enteritidis*를 특이적이고 신속하게 검출할 수 있는 PCR기법을 확립하고자 실시하였다.

재 료 및 방 법

1. 공시균주

PCR을 위해 사용된 표준균주는 국립수의과학검역원에서 분양받아 사용하였으며, *S. enteritidis* 야외 분리주는 본 실험실에 보관중인균주를 사용하였다 (Table 1).

2. Genomic DNA 추출

*Salmonella*와 기타 균종의 genomic DNA의 분리는 Lampel 등¹⁸⁾의 방법에 준하여 추출하였다. *Salmonella*와 기타 균종을 Tryptic Soy Agar (Difco, Co) plate에 접종시켜 37℃에서 18시간 배양한 후 하나의 집락을 선택하여 0.5M NaOH 25μl에 부유시켜 vortex를 이용하여 잘 섞어준 후 실온에서 30분간 방치하였다. 여기에 1M Tris buffer(pH 7.4) 25μl와 DW 450μl를 넣어준 후 사용할때까지 20℃에 보관하였다.

3. Primer의 합성

*S. enteritidis*에 특이적인 primer는 Lampel 등

Table 1. Bacterial strains used in the present study

Bacterial strains	Source	Bacterial strains	Source
<i>S. enteritidis</i>	NVRQS*	<i>E. coli</i> O157:H7	NVRQS
<i>S. typhimurium</i>	"	<i>E. coli</i>	"
<i>S. pullorum</i>	"	<i>Listeria monocytogenes</i>	"
<i>S. gallinarum</i>	"	<i>Staphylococcus aureus</i>	"
<i>S. dublin</i>	"	<i>S. enteritidis</i> field isolate (8 strain)	SIHE(chicken)
<i>S. cholerasuis</i>	"	<i>S. enteritidis</i> field isolate (1 strain)	SIHE(meat)

* NVRQS : National veterinary research and quarantine service

¹⁸⁾에 의해서 보고된 유전정보에 의하여 597(5'-GCA-GACATTATCAGTCTTCAGG-3')과 598(5'-TCAGGT-TCGTGCCATTGTCAA-3') primer를 녹십자양행(주)에 합성의뢰하여 사용하였다.

4. PCR 방법

597 및 598 primer를 이용한 PCR 방법의 확립은 Lampel 등¹⁸⁾의 방법에 준하여 실시하였다. PCR mixture는 1×PCR buffer(TaKaRa), 200uM each deoxynucleotide triphosphate(TaKaRa), 1uM each primer, 3.0unit의 TaqDNA Polymerase(rTaq, TaKaRa)를 사용하였으며 template로서 2μl의 세균 lysate를 넣어 총 50μl가 되도록 사용하였다.

PCR 조건은 94℃에서 1.5분, 64℃에서 1.5분, 72℃에서 1.5분씩 총 30cycle을 TaKaRa Thermal cycler MP에서 수행하였다. 50bp step ladder (Sigma, Co)를 분자량 마커로 사용하였으며 1.2% agarosegel(FMC)에서 40분간 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide(Sigma Co.)로 염색하여 PCR 증폭산물을 transilluminator(Vilber Lourmat, France)를 이용하여 확인하였다.

5. PCR 방법의 특이성 조사

Primer의 특이성을 조사하기 위해 *S. enteritidis* 표준균주 및 야외분리주와 Salmonella D group내의 다른 균주, Salmonella C1, B group의 균주 및 *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*의 DNA를 분리하여 동일한 조건에서 PCR 반응을 실시한 다음 1.2% agarosegel에서 전기영동하여 *S. enteritidis*의 특이증폭산물인 351bp의 DNA 절편을 확인하였다.

6. PCR 방법의 민감성 조사

PCR 방법의 민감성을 조사하기 위하여 *S. enteritidis*를 tryptic soy broth(Difco)에 접종하여 37℃에서 18시간 배양하여 증균한 후 1ml을 eppendorf tube에 취하여 1000g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 pellet을 50μl의 PBS에 부유한 뒤 5μl의 lysis solution(50mg/ml ProteinaseK; 0.1M EDTA, pH 8.0; 0.2M Tris-HCl, pH 8.0)을 넣어

60℃에서 1시간 반응시킨 뒤, 100℃에서 5분간 끓였다. PCR법을 위하여 2μl를 template로 사용하였으며 *S. enteritidis* lysate를 4000ng에서부터 10진 단계희석방식으로 4pg까지 희석하여 PCR법의 검출한계를 조사하였다. PCR 증폭산물은 1.2% agarose에서 15μl를 loading하여 확인하였다.

결 과

1. PCR 기법의 특이성

Salmonella의 bacterial celllysate를 이용하여 597 및 598 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과는 Fig. 1과 같다. *S. enteritidis* 표준균주 및 야외분리주는 모두 351bp에서 특이적인 증폭산물이 나타났다. 그러나 이를 제외한 다른 Salmonella 속균 및 다른 세균에서는 동일한 조건에서 PCR을 수행하였으나 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다.

2. PCR 기법의 민감성

PCR 기법의 민감성을 조사하기 위하여 *S. enteritidis*의 bacterial cell lysate의 DNA량을 정량한 후 10배씩 단계희석하여 PCR을 수행한 결과 검출할 수 있는 최소의 DNA 검출량은 40pg이었음을 확인하였다(Fig. 2).

고 찰

최근 병원성 미생물의 오염 및 감염 진단에 있어서 PCR 진단법은 신속하고 특이적이며 민감한 방법으로 각광 받아왔다. PCR을 이용한 DNA의 증폭은 병원성 미생물의 농도가 낮거나 죽어서 일반적인 증균 및 선택배지를 이용한 방법으로 균의 분리가 어려운 경우 직접 가검물에서 병원체의 존재를 확인하는 것이 가능한 매우 유용한 방법이다²⁴⁾.

Anh 등¹⁰⁾은 Salmonella-specific Hind III 단편을 포함하는 primer를 이용하여 또, Noah 등²²⁾은 genus-specific primer를 사용하여 모든 group의 Salmonella를 검출할 수 있는 PCR법을 보고하였다. Woodward와 Kirman¹⁹⁾은 *sefA* 유전자를 이용하여 계란에서 *S. enteritidis*를 특이적으로 검출할 수 있는 PCR 진단법을 보고하였고, Gaan 등¹⁴⁾ 및

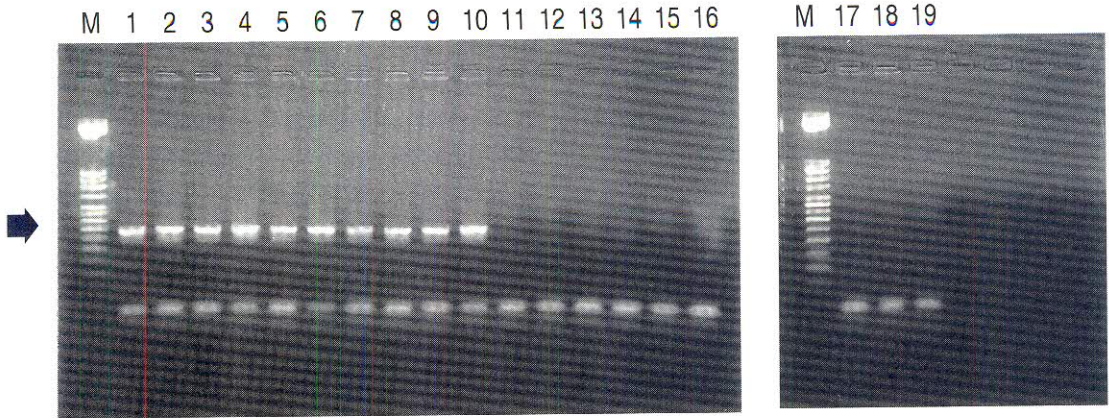


Fig 1. DNA products amplified from Salmonella species by 597,598 PCR assay. M. 50bp stepladder, 1. *S. enteritidis*, 2~10. *S. enteritidis* field isolates, 11. *S. typhimurium*, 12. *S. pullorum*, 13. *S. gallinarum*, 14. *S. dublin*, 15. *S. cholerasuis*, 16. *E. coli* O157:H7, 17. *E. coli*, 18. *Listeria monocytogenes*, 19. *Staphylococcus aureus*. Arrow indicates the limitation of 351bp PCR products.

Gregory 등¹⁵⁾도 *invA* 유전자를 이용한 PCR법을 보고하였다. Fadl 등⁹⁾은 사람과 조류 유래의 *S. enteritidis*를 검출할 수 있는 PCR법을 보고하였는데 이기법을 이용하였을 때 *S. enteritidis*의 phage type이 같으면 DNA band pattern이 같아 역학조사에 유용하게 사용할 수 있음을 제시하였다. Urirat 등²⁶⁾도 *rfbJ*, *rfbS* gene을 이용하여 *Salmonella*

B, C2, D serogroup의 검출을 보고한 바 있다.

국내에서도 *Salmonella* 속군에 대해 많은 PCR 진단법들이 개발되었다. 1994년 박 등⁴⁾과 1995년 김 등²⁾이 *phoE* 유전자를 이용하여 *Salmonella* B, D 혈청형의 검출을 보고하였으며 1996년 안 등⁵⁾이 *rfbS* 유전자에 기초하여 *Salmonella* A, D group 검출을 위한 PCR 기법을 보고하였다. 1996년 이 등⁷⁾이 돼지의 *Salmonella* 감염증의 주요 병원체로 알려진 C1-serogroup에 특이적인 *rfbM* 유전자 및 1997년 우 등⁶⁾은 *Salmonella*의 전 group을 검출할 수 있는 primer를 보고하였다.

본 실험에서는 *S. enteritidis*에만 특이적인 *spvA* 유전자를 이용하여 식중독균으로서의 우위를 차지하고 있는 원인 균을 신속하게 검출하고자 하였다. 실험에 사용된 *S. enteritidis* 표준균주 및 야외분리주를 제외하고 어떠한 세균에서도 증폭된 산물이 나타나지 않아 primer의 특이성이 입증할 수 있었다.

민감도에 있어서 이 primer를 이용하여 40pg까지의 *Salmonella* genomic DNA를 검출할 수 있었는데 이는 Anh 등¹⁰⁾이 모든 *Salmonella*에 특이적인 2.0kb의 PCR product를 EtBr이나 southern blot hybridization을 사용하였을 때 330fg까지 검출이 가능하였다고 보고한 것과, Gregory 등¹⁵⁾이 정제된 chromosomal DNA를 사용했을 경우 300fg까지 검출가능했다고 보고한 것보다 10배정도 떨어지나

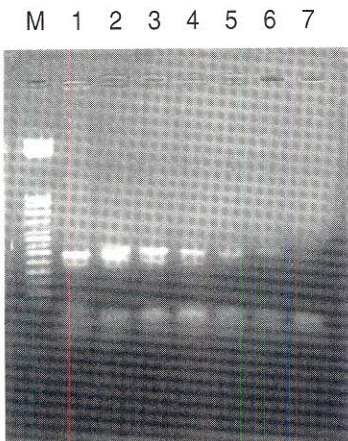


Fig 2. Detection limit of amplified DNA of *S. enteritidis* by 597,598 PCR assay. M. 50bp stepladder, Lanes 1~7: serially diluted *S. enteritidis* DNA, concentration of 4000ng, 400ng, 40ng, 4ng, 400pg, 40pg, 4pg. Arrow indicates the limitation of 351bp PCR products.

NKW primer를 이용한 우 등⁶⁾의 민감도와는 유사하며, 1996년 안 등⁵⁾이 보고한 100pg의 민감도보다는 높은 결과를 보였다.

또, Jonh¹⁷⁾과 Widjoatomodjo 등²¹⁾ 및 Woodward와 Kirman²⁰⁾은 임상가검물을 PCR의 재료로 이용하였을 때 분변내의 bilirubin이나 bile salt에 의해 PCR 반응이 저해되는 문제점을 해결하고자 immunomagneticimmuno PCR assay법을 이용하여 *Salmonella*를 검출하는데 좋은 성과를 거두었으나 이는 비용이 많이 드는 단점이 있다. Gregory 등¹⁵⁾은 임상 재료에서의 위와 같은 문제점을 해결하기 위해 PCR을 실시하기 전에 brain heart infusion broth나 selenite-cystine broth와 같은 배지에서 적절한 증균배양 과정을 거침으로서 PCR 반응억제물질을 감소시켰다고 보고하였다. 본실험에서 사용한 집락 채취법은 DNA를 추출하는 데 있어 phenol 추출법 및 기타 다른 방법에 의한 경우보다 저비용으로 신속한 결과를 볼 수 있었다.

이상의 결과로 미루어볼 때 본 실험에서 사용된 PCR 방법은 앞으로 *S. enteritidis*를 신속하게 동정하는데 유용하게 응용될 수 있을 것으로 사료되며, 앞으로 실제 가검물 검사에 응용하기 위해 가검물에서 *S. enteritidis* 항원을 검출할 수 있는 PCR 반응의 특성에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

Salmonella 속군 중 사람의 식중독 원인균으로 우위를 차지하고 있는 *S. enteritidis*를 신속하고 특이적으로 검출하기 위해 *spvA* 유전자를 증폭하는 PCR 기법을 확립하고 표준균주 및 야외분리주에 대해 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *SpvA* gene 증폭을 위해 제조된 597, 598 primers를 이용한 PCR에서 *S. enteritidis*에 특이적인 351bp 크기의 DNA 분절을 확인할 수 있었다.
2. 확립된 PCR 기법으로 *S. enteritidis* 표준균주 및 야외분리주, D group내의 다른 *Salmonella* 균주 및 B, C1 group의 *Salmonella* 균주들, *E. coli* O157:H7, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* 등 모두

19종의 균주에 대해 실험한 바 본 PCR 법은 *S. enteritidis*에 대해서만 특이적으로 양성반응을 보였다.

3. 본 시험에서 응용한 집락채취법으로 추출한 genomic DNA를 이용한 PCR 실험시 결과를 신속하게 볼 수 있었으며, 민감도는 40pg까지 검출이 가능하였다.

참 고 문 헌

1. 강정복, 조규홍, 용금찬, 최옥경, 이명진, 윤기복, 김윤성. 관내 취약지역에서 분리되는 *Salmonella* 균속의 특성에 관한 연구. 경기도보건환경연구원보 11:164-172(1999)
2. 김원용, 장영효, 김철중, 신광순, 박용하. Polymerization chain reaction과 southern hybridization을 이용한 *Salmonella* 속군의 신속한 검출. 대한수의학회지 35(3): 531-536(1995)
3. 김호훈, 박미선, 강연호, 김성한, 유재연, 정병곤, 이복권. 1997년도 한국에서 분리된 *Salmonella* 주의 역학적 특성. 한국수의공중보건학회지 22(3): 253-260(1998)
4. 박두희, 김원용, 김철중, 마점술. Polymerase chain reaction에 의한 *Salmonella* 속군의 검출. 대한수의학회지. 34: 115-125 (1994)
5. 안종삼, 정석찬, 김종만, 박우호, 우승룡, 조윤상, 이상운, 우희중. *Salmonella* A 및 D Group의 특이적 검출을 위한 *rfsB* 염기서열 분석에 기초한 PCR 기법의 적용. 대한미생물학회지. 31(2): 155-163 (1996)
6. 우용구, 현방훈, 정석찬, 김봉환. *Salmonella* 속군의 신속검출을 위한 PCR 진단법 개발. 수의과학연구논문집. 39(2): 66-75 (1997)
7. 이성일, 정석찬, 문진산, 박우호, 이준화, 김병수, 백병걸. 살모넬라 C1 serogroup 특이 *rfsM* 유전자 증폭과 염기서열 분석. 대한수의학회지 36(1) 109-118(1996)
8. 전무형, 김태중, 장경수, 강경임, 김귀현, 김기석, 유상식, 김현수, 신광순, 김철중. SefA 유전자 PCR에 의한 *Salmonella* serogroup D₁의 특이

- 적 검출. 대한수의학회지 39(3) 523-530 (1999)
9. A. A. Fadl, A.V. Nguyen and M.I. Khan.: Analysis of *Salmonella enteritidis* Isolates by Arbitrarily Primed PCR. *J Clin Microbiol.* 33(4): 987-989 (1995)
 10. Anh V. Nguyen, Mazhar I. Khan, and Zhigiang Lu : Amplication of *Salmonella* chromosomal DNA using polymerase chain reaction. *Avian Disease.* 38: 119-126 (1994)
 11. Claude Turcotte and Martin J. Woodward. : Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene encoding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis*. *J Gen Microbiol.* 139: 1477-14851 (1993)
 12. Doran JL, Collinson SK, Clouthier SC: Diagnostic potential of *sefA* DNA probes to *Salmonella enteritidis* and certain other O-serogroup D1 *Salmonella* serovars. *Mol Cell Probes.* 10: 233-246 (1996)
 13. Freydiere A. and Gille Y : Detection of *Salmonella* by using Rambach agar and a C8 esterase spot test. *J Clin Microbiol.* 29: 2357-2359 (1991)
 14. Gaan JE, Ginocchio C, Costeas P. : Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. *J Bacteriol.* 174: 4338-4349 (1992)
 15. Gregory G. Stone, Richard D. Oberst, Michael P. Hays, Scott McVey and M. M. Chengappa. : Detection of *Salmonella* Serovars from Clinical Samples by Enrichment Broth Cultivation-PCR Procedure. *J Clin Microbiol.* 32(7): 1742-1749 (1994)
 16. Gruenewald R., Henderson R. W. and Yappow S. : Use of Rambach propylene Glycol containing agar for identification. *J Clin Microbiol.* 29: 2354-2356 (1991)
 17. John M. C. Luk. : Detection of *Salmonella* Species in Fecal Samples by Immunomagnetic Separation and PCR. *J Clin Microbiol.* 33: 1046-1047 (1995)
 18. K.A. Lampel, S. P. Keasler and D.E. Hanes. : Specific detection of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis using the Polymerase Chain Reaction. *Epidemiol Infect.* 116: 137-145 (1996)
 19. Luk JM, Reeves PR, Lindberg AA. : Selective amplification of *abeQ* and *parA* genes (*rfaB*) by PCR for identification of *Salmonella* major serogroups (A, B, C2 and D). *J Clin Microbiol.* 31: 2118-2123 (1993)
 20. M. J. Woodward and S. E. S. Kirwan. : Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the polymerase chain reaction. *The Veterinary Record.* 138: 411-413 (1996)
 21. Myra N. Widjojoatmodjo, AD C. Fluit, Ruurd Torensma, Geert P. H. T. Verdonk and Jan Verhoef. : The Magnetic Immuno Polymerase Chain Reaction Assay for Direct Detection of *Salmonellae* in Fecal Samples. *J Clin Microbiol.* 30(12): 3195-3199 (1992)
 22. Noah D. Cohen, Edward D. McGruder, Holly L. Neibergs, Robert W. Behle, Deeanne E. Wallis and B. M. Hargis. : Detection of *Salmonella enteritidis* in Feces from Poultry Using Booster Polymerase Chain Reaction and Oligonucleotide Primers Specific for All Members of the Genus *Salmonella*. *Poultry Science.* 73: 354-357 (1994)
 23. Olssen M., Syk A. and Wollinder : Identification of *Salmonella* with the 4-methylumbelliferoyl caprylate Fluorescence test. *J Clin Microbiol.* 29: 2631-2632 (1991)
 24. Randall K. Saiki, David H. Gelfand, Susanne Stoffel, Stephen J. Scharf, Russell Higuchi, Glenn T. Horn, Kary B. Mullis, Henry A. Erich. : Primer-Directed

- Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. 239: 487-491 (1988)
25. Spierings G, Elders R, van Lith B.: Characterization of the *Salmonella typhimurium* *phoE* gene and development of *Salmonella*-specific DNA probes. *Gene* 122:45-52 (1992)
26. Urirat Kongmuang, John M. C. Luk and ALF A. Lindberg. : Comparison of Three Stool-Processing Methods for Detection of *Salmonella* Serogroups B, C2, and D by PCR. *J Clin Microbiol*. 32(12): 3072-3074 (1994)