

중합효소연쇄반응을 이용한 자돈 혈청형에 따른 Salmonellosis의 신속한 검출

최경성 · 박진호 · 권오덕 · 이주목

전북대학교 수의과대학
(1998년 5월 7일 접수)

Rapid detection of salmonellosis on serovar type of piglet with the polymerase chain reaction

Kyoung-seong Choi, Jin-ho Park, Oh-deog Kwon, Joo-mook Lee

College of Veterinary Medicine Chonbuk National University

(Received May 7, 1998)

Abstracts : *Salmonella typhimurium* is a causative agent of diarrhea, fever, gastroenteritis, septicemia and sudden death in piglet. The currently used methods such as IFA, ELISA, DNA hybridization assay is needed a long-time and difficult to detect the organism in carrier animal or contaminated sample with other agents. However, it is important to detect rapidly and sensitively *S typhimurium* in piglet with other infectious pathogens to minimize an economic loss.

Two sets of PCR primer, *rfbJ* forward primer(5'-AGAATATGTAATTGTCAG-3') and reverse primer(5'-TAACCGTTTCAGTAGTTC-3') were designed to amplify a 882 bp fragment of *Salmonella* serovar type B gene. The target genomic DNA for PCR was extracted from the cultivated materials with various enrichment periods in a nonselective enrichment agar and broth with clinical specimens.

The PCR is carried out here made it possible to detect the gene from two hours. Also, the amplified fragment with PCR was cloned into pGEM-T vector and digested with restrict enzyme, and sequenced for the identification of *Salmonella* serotype B *rfbJ* gene.

Duplicated cultivation agar-broth followed by PCR were performed to develop a rapid and sensitive detection of *S typhimurium* based on serovar type. This duplicated cultivation-PCR method provides a sensitive and rapid diagnostic tool to detect *Salmonella* from infected piglet with improved sensitivity.

Key words : *S typhimurium*, *rfbJ* Gene, PCR, duplicated cultivation, sequencing.

서 론

Salmonella sp.는 발열, 구토, 설사를 포함하는 위장염, 패혈증 그리고 갑작스런 폐사 등의 임상증상을 일으키는 인수공통전염병의 병원체이다^{1,2}. 이중 이유후의 어린 자돈이 *S typhimurium*에 감염되면 황백색에서 녹색의 악취나는 설사를 일으켜 폐사하게 되고, 이를 회복하는 경우에는 지속적으로 균을 배설하는 보균상태의 위축돈으로 남아 있게 된다³. 현재 국내에서는 가검물로부터 *Salmonella* sp.를 분리 및 동정하기 위하여 선택배지를 이용한 전형적인 배양방법이나 생화학적 방법, 혈청형에 따른 monoclonal antibody를 이용한 항원·항체반응 등을 이용하여 왔다⁴⁻⁶. 그러나 이러한 방법은 진단 및 동정하는데 많은 시간이 소모되며, 가검물내에 소량이 함유되어 있거나 다른 병원균과 혼합되어 있으면 명확한 분리동정이 어렵게 되는 단점이 있었다⁷.

Salmonella sp.의 outer membrane에는 lipid A, core polysaccharide 그리고 repeating polysaccharide unit(O-antigen)로 구성되어진 lipopolysaccharide(LPS)가 존재하는데, 이중 O-antigen은 혈청형에 따라 A, B, C, D 등의 group으로 분류되고 있으며, 대식세포의 탐식작용에 저항성을 증가시키는 등 병원성에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨져 있다⁸. 최근에는 이 O-antigen내에 4개의 hexoses (abequose, mannose, rhamnose, galactose)로 반복되어 구성되는 polysaccharide를 생합성하기 위하여 요구되는 enzyme의 encoding 유전자를 혈청형에 따라 분석한 결과, 이들 유전자가 strain LT2의 *rfb* gene 안에 존재하는 것을 밝힌 바 있다⁸⁻¹⁰. 또한 Luk *et al*^{12,13}은 분석된 *rfbJ* gene의 sequence를 토대로 하여 혈청형에 따른 각각의 특이 primer를 제작한 후 중합효소연쇄반응을 실시하여 *Salmonella* sp.를 혈청형에 따라 진단한 바 있다^{11,12}. 또한 Widjojoatmodjo *et al*¹⁴은 가검물에서 특히 feces에서 target DNA를 바로 추출한 후 중합효소연쇄반응을 수행하면 잔존하여 있는 bilirubin 등과 같은 방해인자로 인하여 효과적인 진단이 이루어지지 않는다고 지적하였고, 이를 극복하기 위하여 1차적으로 monoclonal antibody가 coating 되어 있는 magnetic bead를 사용하여 target DNA를 추출하여 중합효소연쇄반응을 실시한 바 있다^{13,14}. 그러나 이와같은 방법에는 특수한 조작기술과 시약을 필요로 하며, 가검물내에 검출하고자 하는 병원체가 소량

으로 함유되어 있으면 검출율이 떨어지는 것은 부동의 사실이다.

국내에서는 Salmonellosis를 진단하기 위하여 선택배지를 이용한 증균방법이나 생화학적 방법, 항원항체반응을 이용한 방법 등을 사용하여 왔으며, 최근에 들어 중합효소연쇄반응법을 적용하여 진단하였으나^{15,16}, *Salmonella* sp.를 혈청형에 따라 분류하여 검출하지는 않았다.

본 연구는 이유후의 자돈에서 다발하고 있는 Salmonellosis를 효소중합연쇄반응으로 혈청형에 따라 신속하게 검출하기 위하여 *Salmonella* sp. serotype B *rfbJ* gene의 sequence⁸⁻¹⁰를 근거로 하여 혈청형에 따른 각각의 primer를 제작하였고, 가검물의 duplicative 배양과 중합효소연쇄반응을 병용하여 수행하였다. 또한 중합효소연쇄반응의 특이성과 야외변이주 등을 확인하기 위하여 증폭된 유전자 산물의 cloning을 통한 제한효소 절단 및 염기서열의 분석을 실시하였다¹⁷⁻¹⁹.

재료 및 방법

S typhimurium* : *S typhimurium의 표준균주는 한국과학기술원 생명공학연구소 유전자은행(KCTC)에서 공시받아 Luria-Bertani broth에서 12시간동안 진탕배양하여 증균시켜 사용하였다. 또한 Salmonellosis가 발생하고 있던 전라북도 양돈농가에서 사육중인 자돈의 가검물(분변, 장, 장내용물, 간, 비장)을 Brilliant green agar, Eosin-methylene blue agar(EMB), MacConkey agar, Nutrient agar (NA), *Salmonella*-*Shigella* agar 그리고 Xylose-lysine desoxycholate agar(DIFCO Co, USA) 등의 *Salmonella* 선택배지에서 배양하여 colony를 취한 후 이를 다시 LB broth (DIFCO Co, USA)에서 증균시켜 본 실험의 야외균주로 공시하였다.

Target genomic DNA extraction : 중합효소연쇄반응에 사용할 target genomic DNA는 Sambrook의 방법에 준하여 각각의 시간대별로 증균된 배양액에서 추출하였다²¹. 먼저 배양액을 원심분리하여 침전균체를 회수한 후 proteinase K, phenol 등이 혼합되어 있는 DNA 추출액(Insta-Gene matrix, BioRad Co.)을 200 μ l 첨가하여 56 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응하였다. 그리고 이 반응액을 100 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 DNA를 변성시킨 후 12,000rpm에서 3분동안 원심분리를 하여 상층에 존재하는 DNA를 회수하였

Table 1. Properties and nucleotide sequence of PCR primers for amplification of *Salmonella rfbJ* genes

Target genes	Primer	Nucleotide sequence	Position	Expected product size
<i>rfbJ</i> (B)	Forward	5'-AGAATATGTAATTGTCAG-3'	15-32	882bp
	Reverse	5'-TAACCGITTCAGTAGTTC-3'	897-880	
<i>rfbJ</i> (C2)	Forward	5'-ATGCTTGATGTGAATAAG-3'	1-18	820bp
	Reverse	5'-CTAATCGAGTCAAGAAAG-3'	820-803	
<i>rfbS</i> (D)	Forward	5'-TCACGACTTACATCCTAC-3'	40-57	720bp
	Reverse	5'-CTGCTATATCAGCACAAC-3'	760-743	

다. 회수된 DNA의 농도를 결정하기 위하여 UV/spectrophotometer를 이용하여 260nm에서 측정하였다²¹.

Oligonucleotide primer synthesis : *Salmonella* sp.를 혈청형에 따라 중합효소연쇄반응으로 검출하고자 *rfbJ* sequence를 토대로 하여 Oligonucleotide Primer 3쌍을 합성(DNA intern. INC.)하였고, high-performance liquid chromatography (HPLC)로 정제하였다¹³. 합성된 primer는 100 μ mol/ μ l 농도로 조정된 후 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 필요에 따라 희석하여 실험에 사용하였다(Table 1).

Polymerase chain reaction : 중합효소연쇄반응의 혼합액은 10 \times buffer(10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001%(w/v) gelatin)와 100 μ M dNTPs, 각각의 1.0 μ M primer, 1.5IU Taq DNA polymerase, template를 혼합한 후 D.W를 첨가하여 최종혼합물이 50 μ l가 되게 하였다. 반응조건으로는 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 predenaturation을 실시하였고, denaturation, annealing 그리고 polymerization을 각각 94 $^{\circ}$ C에서 1분, 45 $^{\circ}$ C에서 1분, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 30 cycle을 수행하였다. 그리고 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 polymerization을 실시하였다²². 유전자 증폭기로는 DNA thermal cycler(Perkin-Elmer Co, USA)를 사용하였다.

한편 *Salmonella* sp.를 혈청형에 따라 한번에 검출하기 위하여 *rfbJ* gene를 토대로 제작된 각각의 primer를 혼합하여 multiplex-PCR을 실시하였다.

Analysis of amplified DNA : 중합효소연쇄반응으로 증폭된 유전자 산물의 size를 확인하기 위해서 반응액 15 μ l를 1.3% agarose gel에서 120 voltage로 30분간 전기영동을 실시하였다. 그리고 Ethidium Bromide(0.5 μ g/ml)로 염색을 하였고, UV transilluminator로 관찰하였다. 증폭된 DNA의 크기를 확인하기 위하여 PCR marker(Promega Co.)를 molecular size marker로 사용하였다.

Table 2. M-13 primers used for sequencing of cloned *rfbJ* gene

Primer	Nucleotide sequence
Forward	5'-GGTTTCCCAGTCACGAC-3'
Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Duplicative cultivation for PCR : 설사증을 일으키는 자돈의 가검물로부터 신속하게 *S typhimurium*을 검출하기 위하여 duplicative cultivation을 통한 PCR을 수행하였다. 먼저 가검물을 NA와 EMB 등의 agar에 1차 배양을 하였고, *Salmonella* sp.의 형태를 나타내는 colony를 LB broth에 접종하여 진탕배양하였다. 또한 시간대별로 배양액에서 target genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행하였고, PCR로 *S typhimurium*의 검출이 가능한 최소시간을 측정하여 보았다.

Construction of pGEM-*rfbJ* plasmid DNA : 증폭된 *rfbJ* gene의 염기서열을 확인하기 위하여 cloning을 통한 제한효소 절단 및 염기서열을 분석하였다. 먼저 중합효소연쇄반응을 수행한 반응액 30 μ l를 1.3% agarose gel에서 전기영동한 후 DNA를 추출하여 정제하였다. 이어서 회수된 *rfbJ* gene DNA를 T4 DNA ligase, pGEM TA easy vector(InVitrogen Inc.) 그리고 10 \times ligation buffer(Tris-HCl 300mM, MgCl₂ 100mM, DTT 100mM, ATP 10mM)와 혼합한 후 4 $^{\circ}$ C에서 12시간동안 cloning을 하여 pGEM-*rfbJ* plasmid DNA를 구축하였다.

Enzyme restriction and sequencing : Clone된 pGEM-*rfbJ* plasmid DNA를 top 10F⁺ *E coli* strain에 transformation을 실시한 후 ampicillin(50mg/ml)이 첨가된 LB broth에서 37 $^{\circ}$ C, overnight shaking incubation하여 증균시켰다. Plasmid

DNA는 alkaline lysis 방법에 준하여 Phenol : Chloroform : Isoamyl alcohol(25 : 24 : 1)을 처리하여 추출하였고, *Sal* I 및 *Nco*I 제한효소로 plasmid DNA를 절단하여 insert DNA의 size를 확인하였다.

염기서열 분석은 Sanger²⁵의 Dideoxy chain termination 방법에 준하여 실시하였으며²³, sequencing primer는 M-13 forward와 reverse primer(Promega Co.)를 사용하였다(Table 2). 즉, single strand plasmid DNA, CyclistTM Exo-Pfu DNA sequencing Kit(Stratagene)의 반응액 그리고 ³⁵[P]-dATP를 혼합하여 sequencing reaction을 실시한 후 그 염기서열을 분석하였다. 상기의 방법으로 *S typhimurium rfbJ* gene의 야외균주와 표준균주의 염기서열을 각각 분석하였고, 효소중합연쇄반응에 의하여 증폭된 DNA가 *rfbJ* gene임을 확인하였다.

결 과

Specificity of PCR : 합성한 *rfbJ* gene primer의 특이성을 확인하기 위하여 *S typhimurium* (serotype B)을 포함하여 *S heidelberg*, *S choleraesuis*, *S enteritidis* 그리고 Enterobacteriae (*E coli*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*) 으로부터 추출한 genomic DNA를 사용하여 각각 PCR을 실시하였다. 그 결과 다른 기타의 균에서는 PCR 증폭이 이루어지지 않았지만 *S typhimurium*에서는 예상대로 882bp의 증폭된 DNA가 관찰되었다(Fig 1). 이 결과 *rfbJ*

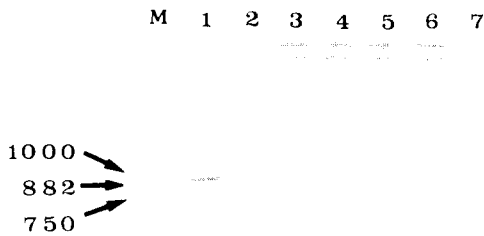


Fig 1. Specificity of PCR for *Salmonella typhimurium* using *rfbJ* primers.

M : PCR marker.
 Lane 1 : *S typhimurium*, Lane 2 : *S heidelberg*
 Lane 3 : *S choleraesuis*, Lane 4 : *S enteritidis*
 Lane 5 : *Escherichia coli*, Lane 6 : *S heidelberg*
 Lane 7 : *Yersinia enterocolitica*

forward, reverse primer는 *Salmonella* serotype B group에만 특이적으로 반응하는 것을 알 수 있었다.

또한 *Salmonella* sp.의 선택배지와 PCR과의 상관성을 알아보기 위하여 *S typhimurium* 표준균주를 Brilliant green agar, Eosin-methylene blue agar, MacConkey agar, Salmonella-Shigella agar 그리고 Xylose-lysine desoxycholate agar에 각각 배양한 후 생성된 colony를 취하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 다른 선택배지보다는 MacConkey agar에서 *S typhimurium*을 배양했을 때에 PCR이 미약하게 반응하는 것을 볼 수 있었다(Fig 2).

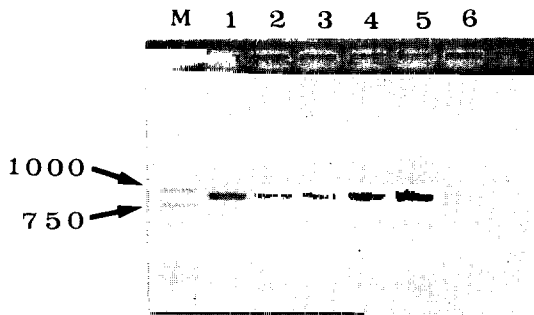


Fig 2. Sensitivity of the PCR for *S typhimurium* cultured in various kinds of media.

M : PCR Marker.
 Lane 1 : Positive control, Lane 2 : Xylose-Lysine-desoxycholate agar
 Lane 3 : Eosin-methylene blue agar Lane 4 : Brilliant-green agar
 Lane 5 : Salmonella-Shigella agar Lane 6 : MacConkey agar

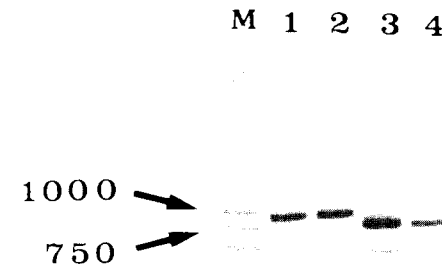


Fig 3. Multiplex-PCR for *Salmonella* serovars.

M : PCR marker.
 Lane 1 : Positive control, Lane 2 : *S typhimurium*
 Lane 3 : *S choleraesuis*, Lane 4 : *S enteritidis*

Table 3. PCR of *S typhimurium* cultured from field specimens on NA and Emb agar

No.	Feces		Intestine		PCR
	NA	EMB	NA	EMB	
1			+	+	+
2			+	+	+
3			+	+	+
4	-	±			-
5	-	±			-
6	-	-			-
7	-	-			-
8	-	±			+
9			+	+	+
10	-	±			+

Multiplex-PCR : *Salmonella* sp.를 혈청형별로 검출하기 위하여 *S typhimurium*, *S choleraesuis* 그리고 *S enteritidis*의 genomic DNA를 각각 추출한 후 혈청형에 따른 각각의 primer를 혼합하여 multiplex-PCR을 실시하였다. 그 결과 *S typhimurium*은 882bp, *S choleraesuis*는 820bp, *S enteritidis*는 720bp의 각각의 예상된 증폭산물을 나타내어 *Salmonella* sp.를 혈청형에 따라 검출할 수가 있었다(Fig 3).

Duplicative cultivation for PCR : 설사증을 일으키는 자돈으로부터 신속하게 *S typhimurium*을 검출하기 위하여 가검물을 duplicative cultivation을 한 후 PCR을 수행하였다. 먼저 가검물을 NA와 EMB 등의 agar에 1차 배양을 하였고, 이때 *S typhimurium*의 형태로 나타나는 colony를 LB

broth에 2차 배양하여 증균시켰다. Target genomic DNA는 시간대별로 취하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 agar에서는 5시간부터 colony가 형성되기 시작하였고, 이 colony를 broth에 2차로 접종하여 증균시켰을 때에는 2시간부터 즉, 가검물을 배양한지 7시간만에 PCR로 *S typhimurium* (serotype B)을 검출할 수 있었다(Table 1, Fig 4).

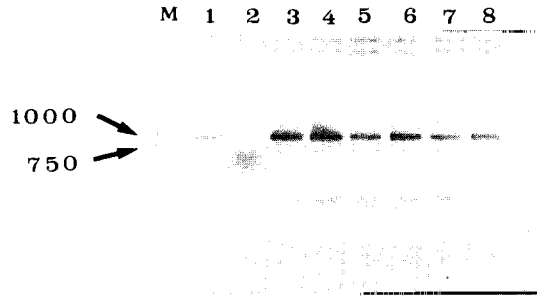


Fig 4-2. PCR of field cultured at different time period in LB broth.

Lane 1 : Positive control, Lane 2 : 1 hr, Lane 3 : 2 hrs,
Lane 4 : 3 hrs, Lane 5 : 4 hrs, Lane 6 : 5 hrs,
Lane 7 : 6 hrs, Lane 8 : 7 hrs

증폭유전자의 제한효소절단 및 염기서열 분석 : PCR 증폭된 DNA를 elution 하여 pGEM TA-vector에 cloning을 실시하였고, 이 clone의 plasmid DNA를 추출하여 *Sal*1 및 *Nco*1 제한효소로 절단하여 본 결과 증폭된 DNA가 clone 되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig 5). 또한

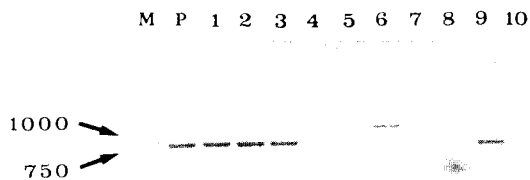


Fig 4-1. PCR of *S typhimurium* isolated from field samples cultured on NA and EMB agar.

M : PCR marker, Lane P : Positive control
Lane 1~3, 9 : Stamples of intestine fluid from dead piglet
Lane 4~8, 10 : Feces

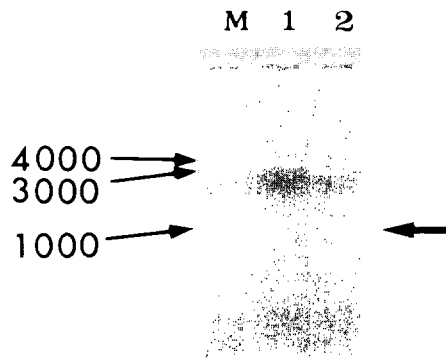


Fig 5. Restriction endonuclease analysis of pGEM-*rtfJ* plasmid with *sal*1 and *Nco*1.

M : 1kb marker, Lane 1 : pGEM-*rtfJ* plasmid DNA
Lane 2 : Enzyme restriction with *sal*1 and *Nco*1

<i>rfbJ</i> gene	TGACCTTTTT	GAAGAATAI	GTAATTGTCA	GTGGGGCTTC	CGGCTTTATT	GSTAAGCATT	60
amplicon		AGAATAT	GTAATTGTCA	GTGGGGCTTC	CGGCTTTATT	GSTAAGCATT	
<i>rfbJ</i> gene	TACTCGAAGC	GCTAAAAAAA	TCGGGGATT	CAGTTGTGCG	AATCACTCGA	GATGTAATAA	120
amplicon	TACTCGAAGC	GCTAAAAAAA	TCGGGGATT	CAGTTGTGCG	AATCACTCGA	GATGTNATAA	
<i>rfbJ</i> gene	AAAATAATAG	TAATGCATTA	GCTAATGTTA	GATGGTGCAG	TTGGGATAAT	ATCGAATTAT	180
amplicon	AAAATAATAG	TAATGCATTA	GCTAATGTTA	GATGGTGCAG	TTGGGATAAT	ATCGAATTAT	
<i>rfbJ</i> gene	TAGTCGAGGA	GTTATCAATT	GATTCTGCAT	TAATTGGTAT	CAITCATTTG	GCAACAGAAT	240
amplicon	TAGTCGAGGA	GTTATCAATT	GATTCTGCAT	TAATTGGTAT	CAITCATTTG	GCAACAGAAT	
<i>rfbJ</i> gene	ATGGGCATAA	AACATCATCT	CTCATAAATA	TTGAAGATGC	AAATGTTATA	AAACCATTAA	300
amplicon	ATNGGCATAAA	ACATCATCT	CTCATAAATA	TTGAAGATGC	NAATGTTNTA	AAACCATTAA	
<i>rfbJ</i> gene	AGCTTCTTGA	TTTGGCAATA	AAATATCCGG	CGGATATCCT	TTTAAATACA	GATAGTTTTT	360
amplicon	AGCTTCTTGA	TTTGGCAATA	AAATATCCGG	CNGATNTCCT	TTTAAATACA	GATAGTTTTT	
<i>rfbJ</i> gene	TTGCCAAGAA	AGATTTTAAI	TATCAACATA	TGCGGCCTTA	TATAATTACT	AAAAGACACT	420
amplicon	TTTGCNAAGA	ANATTTTAAI	TTTCAAAATA	TGCGCCCTTA	TATAANAANT	AAAAGACACT	
<i>rfbJ</i> gene	TTGATGAAAT	TGGGCATTAT	TATGCTAATA	TGCATGACAT	TTCATTTGTA	AACATGCGAT	480
amplicon	TNGATGAAAT	TGGGCATTAT	TATGCTAATA	TGCATGACAT	TTCATTTGTA	AACATGCGAT	
<i>rfbJ</i> gene	TAGAGCATGT	ATATGGGCCCT	GGGGATGGTG	AAAATAAATT	TATTCCATAC	ATTATCGACT	540
amplicon	TAGAGCATGT	ATATGGGCCCT	GGGGATGGTG	AAAATAAATT	TATTCCATAC	ATTATCGACT	
<i>rfbJ</i> gene	GCTTAAATAA	AAAACAGAGT	TGCGTGAAT	GTACAACAGG	CGAACAGATA	AGAGACTTTA	600
amplicon	GCTTAAATAA	AAAACAGAGT	TGCGTGAAT	GTACAACAGG	CGAACAGATA	AGAGACTTTA	
<i>rfbJ</i> gene	TTTTTGTAGA	TGATGTGGTA	AATGCTTATT	TAACTATATT	AGAAAATAGA	AAAGAAGTAC	660
amplicon	TTTTTGTAGA	TGATGTGGTA	AATGCTTATT	TAACTATATT	AGAAAATAGA	AAAGAAGTAC	
<i>rfbJ</i> gene	CITCATATAC	TGAGTATCAA	GITGGAACCTG	GTGCTGGGGT	AAGTTTGA AAA	GATTTTCTGG	720
amplicon	CITCATATAC	TGAGTATCAA	GITGGAACCTG	GTGCTGGGGT	AAGTTTGA AAA	GATTTTCTGG	
<i>rfbJ</i> gene	TTTATTTGCA	AAATACTATG	ATGCCAGGTT	CATCGAGTAT	ATTTGAATTT	GGTGCATAG	780
amplicon	TTTATTTGCA	AAATACTATG	ATGCCAGGTT	CATCGAGTAT	ATTTGAATTT	GGTGCATAG	
<i>rfbJ</i> gene	AGCAAAGAGA	TAATGAAATA	ATGTTCTCTG	TAGCAAATAA	TAAAAATTTA	AAAGCAATGG	840
amplicon	AGCAAAGAGA	TAATGAAATA	ATGTTNCTG	TAGCAAATAA	TAAAAATTTA	AAAGCAATGG	
<i>rfbJ</i> gene	GCTGGAAACC	AAATTTGGAT	TATAAAAAAG	GAATTGAAGA	ACTACTGAAA	CGGTTA	
amplicon	GCTGGAAACC	AAATTTGGAT	TATAAAAAAG	GAATTGAAGA	ACTACTGAAA	CGGTTA	

Fig 6. Sequence alignment of the *Salmonella enterica* serotype B *rfbJ* gene(GeneBank Accession No. X56793) and amplicon.

Sanger의 Dideoxy chain termination법²⁷에 준한 DNA sequencing으로 염기서열을 분석한 결과(Fig 6) 증폭된 유전자가 *S typhimurium* serotype B *rfbJ* gene임을 확인할 수 있었다.

고 찰

현재 국내에서는 Salmonellosis를 일차적으로 야외 가

검물에서 병원체를 배양하여 동정하는 것에 기초를 두어 진단하고 있다. 그러나 전형적인 배양방법, 생화학적 방법 또는 면역학적 방법에 의한 진단 및 동정에는 많은 노력과 시간이 걸리며, 전형적인 반응이 나타나지 않으면 명확하게 검출하지 못하는 단점을 가지고 있었다⁴⁶. 그러므로 기존의 진단방법의 단점을 보완하면서 신속하고 정확하게 검출하기 위한 진단법이 절실히 요구되고

있는 실정이다.

최근에 세계적으로는 중합효소연쇄반응을 이용한 *Salmonellosis*의 진단법이 활발히 연구되고 있는데^{11-14,17-20} 가검물을 이용하여 신속하게 전염성 질병을 진단할 수 있다는 장점때문에 기존의 진단법을 대체해나가고 있다. 또한 매우 적은 양을 가지고도 검출하고자 하는 병원체의 특이 부위 유전자만을 증폭하는 민감성 때문에 임상증상을 나타내지 않는 보균동물을 검사할 때나 생화학적검사 등과 같은 기존의 검사에서 양성반응이 명확하게 나타나지 않을 때에 매우 유용하게 사용되고 있다. 그러나 가검물에서 target genomic DNA를 분리할 때에 hemoglobin, MgCl₂ 그리고 bile salts와 같은 PCR을 저해하는 인자를 제거하는 것이 매우 중요한 문제점으로 부각되고 있다. 또한 Widjoatmodjo *et al*¹⁴은 PCR의 효율성을 높이기 위하여 monoclonal antibody가 coating 되어 있는 magnetic bead로 target genomic DNA를 추출한 바 있다^{13,14}. 그러나 이와같은 방법 또한 가검물내에 적은 양의 병원체가 존재하면 효과적으로 target genomic DNA를 추출하지 못할 수 있다. 따라서 이러한 문제점을 최소화 하기 위하여 duplicative cultivation을 통한 PCR을 실시하였다. 이 방법은 가검물내에 존재하는 PCR 억제 인자를 제거할 수 있으며, 검출하고자 하는 병원체를 증균시켜줄 수 있으므로 PCR의 효율성을 극대화 할 수 있었다. 또한 PCR을 수행하는데에 요구되는 최소배양시간을 알아본 결과 가검물의 정제를 위한 1차 배양이 5시간, 증균을 위한 2차 배양이 2시간, 즉, 총 7시간의 증균 시간만이 요구되므로 *Salmonellosis*의 진단을 신속하게 할 수 있었다.

그리고 야외가검물에서 *Salmonella* sp.를 혈청검사로 검출하기 위하여 serotype B, C2, D 각각의 primer와 template DNA를 혼합하여 multiplex-PCR을 수행한 결과, 혈청형에 따라 각각의 예상 size DNA가 증폭되는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 자돈의 *Salmonellosis*를 일으키는 *S choleraesuis* 등의 또다른 병원체와도 혈청형에 따라 감별진단할 수 있었다.

이 연구는 DNA 검출과 PCR 반응 및 반응산물의 확인까지의 전과정에 소요되는 시간을 최대한으로 단축시키기 위하여 broth 증균배양과 PCR-based procedures를 이용하여 분변(rectal swabs)으로부터 *S typhimurium* 을 신속하게 검출하고자 하였다.

결 론

자돈의 *S typhimurium* 을 혈청형에 따라 신속하고 명확하게 검출하고자 duplicative cultivation을 통한 중합효소연쇄반응을 수행하였고, 증폭된 유전자의 제한효소절단 및 염기서열분석을 실시하였다. 그 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 중합효소연쇄반응을 이용하여 882bp의 *S typhimurium rfbJ gene*이 증폭되는 것을 관찰할 수 있었으며, 기타의 다른 장내세균에서는 증폭산물을 관찰할 수 없었다.
2. Mltiplux-PCR을 수행하였던 결과, *Salmonella* sp.를 혈청형에 따라 각각 검출할 수 있었다.
3. 진단의 정확성과 효율성을 증가시키기 위하여 duplicative cultivation을 통한 PCR을 수행하였던 바, 가검물내의 *S typhimurium* 야외균주를 신속하게 검출할 수 있었다.
4. 중합효소연쇄반응의 특이성을 알아보기 위하여 증폭된 DNA의 cloning을 통한 제한효소절단 및 염기서열을 분석한 결과, 증폭산물이 *S typhimurium serotype B rfbJ gene*임을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Carter GR, Chengappa MM. In Essential of veterinary bacteriology and mycology, Enterobacteriaceae. *Lea and Febiger, Philadelphia*, 150-164, 1991.
2. Smith BP. *Salmonellosis*. In ; Large animal internal medicine. 818-822, 1990.
3. World Health Organization. *Salmonellosis control : The role of animal and product hygiene; report of a WHO committe. WHO Technical Report Series*, No. 774, 1988.
4. Roszak DB, Colwell RR. Survival Strategies of Bacteria in the Natural Environment. *Microbiological Review*, 51:365-379, 1987.
5. Curiale MS, Klatt MJ, Bartlett CL. Colometric deoxyribonucleic acid hybridization assay for rapid screening of *salmonella* in foods: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*, 73:248-256, 1991.

6. Knight IT, Kaspar CW, Colwell RR, *et al.* Direct Detection of *Salmonella* spp. in Estuaries by Using a DNA Probe. *Appl Environ Microbiol*, 56:1059-1066, 1990.
7. Fricker CR. The isolation of salmonellae and campylobacters. *J Appl Bacteriol*, 63:99-116, 1987.
8. John MCL, Lindberg AA. Anti-*Salmonella* lipopolysaccharide monoclonal antibody characterization of *Salmonella* BO-, CO-, DO-, and EO- specific clones and their diagnostic usefulness. *J Clin Microbiol*, 29:2424-2433, 1991.
9. Jiang XM, Santiago NF, Lee SJ, *et al.* Structure and Sequence of the *rfb* (O antigen) gene cluster of *Salmonella* serovar *typhimurium* (strain LT2). *Mol Microbiol*, 5:695-713, 1991.
10. Sanderson KE, Roth JR. Linkage map of *Salmonella typhimurium* edition VII. *Micro Rev*, 52:485-532, 1988.
11. Makela PH, Stocker BA. Genetics of lipopolysaccharide In handbook of endotoxin Vol 1. *Elsevier Science Publisher*, 59-137, 1984.
12. Luk JM, Lindberg AA, *et al.* Comparison of Three Stool-Processing Methods for Detection of *Salmonella* Serogroups B, C2 and D by PCR. *J Clin Microbiol*, 32:3072-3074, 1994.
13. Luk JM, Reeves PR, Lindberg AA, *et al.* Selective Amplification of Abequose and Paratose Synthase Genes(*rfb*) by Polymerase Chain Reaction for Identification of *Salmonella* Major Serogroups(A, B, C2 and D). *J Clin Microbiol*, 31:2118-2123, 1993.
14. Widjoatmodjo MN, Fluit AC, *et al.* The Magnetic Immuno Polymerase Chain Reaction Assay for Direct Detection of *Salmonellae* in Fecal Samples. *J Clin Microbiol*, 30:3195-3199, 1992.
15. Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Keller BHI, *et al.* Evaluation of the Magnetic Immuno PCR Assat for Rapid Detection of Salmonlla. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 10:935-938, 1991.
16. 박두희, 김정용, 김철중, 마점술. Polymerization chain reaction에 의한 *Salmonella* 속균의 검출. *대한수의학회지*, 34:115-125, 1994.
17. 김원용, 장영효, 박경윤, 김철중, 신광순, 박용하. Polymeriazation chain reaction과 Southern hybridization 을 이용한 *Salmonella* 속균의 신속한 검출. *대한수의학회지*, 35:531-536, 1995.
18. 이성일, 정석찬, 문진산 등. 살모넬라 CI serogoup 특히 *rfbM* 유전자 증폭과 염기서열 분석. *대한수의학회지*, 36:109-118, 1996.
19. Stone GG, Oberst RD, Hays MP, *et al.* Detection of *Salmonella* Serovars from Clinical Samples by Enrichment Broth Cultivation-PCR Procedure. *J Clin Microbiol*, 32:1742-1749, 1994.
20. Stone GG, Obest RD, Hays MP, *et al.* Combined PCR-Oligonucleotide Ligation Assay for Rapid Detection of *Salmonella* Serovars. *J Clin Microbiol*, 33:2888-2893, 1995.
21. Stone GG, Obest RD, Hays MP, *et al.* Detection of *Salmonella typhimurium* from Rectal Swabs of Experimentally Infected Beagles by Short Cultivation and PCR-Hybridization. *J Clin Microbiol*, 33:1292-1295, 1995.
22. Cohen ND, Neibergs HL, McGruder ED, *et al.* Genus-specific detection of salmonellase using the polymerase chain reaction(PCR). *J Vet Diagn Invest*, 5:368-371, 1993.
23. Sambrook J, Fritch EF. Molecular cloning. Although manual. 2nd. ed. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1.3-9.58, 1981.
24. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, *et al.* Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239:487-491, 1988.
25. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain termination inhibitor. *Pro Natl Acad Sci*, 74:5463-5467, 1977.