

## *SefA* 유전자 PCR에 의한 *Salmonella* serogroup D1의 특이적 검출

전무형 · 김태중 · 장경수 · 강경임 · 김귀현 · 김기석\* · 유상식\*\* · 김현수 · 신광순 · 김철중

충남대학교 수의과대학  
국립수의과학검역원\* · 대전보건환경연구원\*\*  
(1999년 3월 3일 접수)

### Specific detection of *Salmonella* serogroup D1 by polymerase chain reaction(PCR) for *sefA* gene

Moo-hyung Jun, Tae-joong Kim, Kyung-soo Chang, Kyong-im Kang, Kui-hyun Kim, Ki-seok Kim\*, Sang-sik Yoo\*\*, Hyun-soo Kim, Kwang-soon Shin, Chul-joong Kim

College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Taejon  
National Veterinary Research and Quarantine Services, Anyang, Korea\*  
Taejon City Institute of Health and Environment, Taejon, Korea\*\*

(Received Mar 3, 1999)

**Abstract :** *Sal enteritidis* thin fimbriae, SEF14, were found to be restricted to the predominantly poultry-associated members of the *Salmonella* serogroup D1 that are considered as the important pathogens in poultry industry. *SefA* together with *sefB* and *sefC* encode the proteins involved in *SEF14* biosynthesis. In order to develop the rapid and specific detection methods for *Salmonella* serogroup D1, a PCR technique for the amplification of *sefA* gene was established, and its specificity and sensitivity were investigated with various microorganisms. The bacterial genomic DNA was extracted by colony-picking and rapid boiled-lysate technique. In comparison of Sef I and Sef II primers used in the PCR, Sef I primer for *sefA* gene of 513bp showed higher specificity than that of Sef II. The established PCR was as sensitive as to detect 1pg of *Sal enteritidis* DNA. When 73 strains in 28 genera including the reference strains and the field isolates of various *Salmonella* serotypes, *Bacillus subtilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *E coli*, *Listeria* spp., *Micrococcus luteus*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia* spp. were studied, the established PCR yielded specifically positive results with only *Salmonella* serogroup D1. The results suggested that the PCR for *sefA* gene could be a potential candidate among the specific detection methods for *Salmonella* serogroup D1.

**Key words :** PCR, *sefA*, *Salmonella* serogroup D1, avian salmonellosis.

---

본 연구는 농림기술관리센터의 농림특정연구과제(관리번호 : 297052-3) 지원사업비에 의하여 수행된 연구의 일부임.  
Address reprint requests to Dr. Moo-hyung Jun, College of Veterinary Medicine, Chungnam National University, Taejon 305-764, Republic of Korea.

## 서 론

*Salmonella* 균은 사람을 위시하여 소, 돼지, 가금 등 여러 동물에 감염되어 설사증과 패혈증을 포함한 다양한 임상증상을 유발하며<sup>1</sup> 숙주영역이 넓고 토양, 물 등 환경요인에 의한 오염과 전파가 이뤄질 수 있어 공중보건학적으로도 중요시 되고 있는 병원체이다<sup>1</sup>. *Salmonella* 균이 가지고 있는 somatic(O) 항원과 flagella(H) 항원을 기초로 한 분류법에 의해 현재까지 약 2,300 여종의 혈청형이 알려지고 있으며 이들 혈청형 중에 serogroup A, B, C1, C2, D1 및 D2에 속하는 균들은 다른 혈청형군에 비해 사람과 동물에서 더욱 높은 빈도로 질병을 일으킨다<sup>1,2</sup>.

가금에서는 serogroup D1에 속하는 *Sal pullorum*, *Sal gallinarum*, *Sal enteritidis* 그리고 *Sal typhimurium* 이 중요한 병원체로 간주되고 있으며 이 중 *Sal pullorum* 과 *Sal gallinarum* 은 추백리와 닭티프스를 유발하며 양계산업에 막대한 피해를 주고 있고 *Sal typhimurium*과 *Sal enteritidis* 는 paratyphoid salmonellosis를 일으키고 난계대전염을 하며 사람 식중독의 원인체로 보고되어 이들 균의 분자생물학적 진단과 예방기법 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>3</sup>.

*Salmonella* 감염증의 진단법으로 분변, 장기 가검체료에서 원인균 분리, 전혈 또는 혈청을 이용한 평판 및 시험관내 응집반응, agar gel precipitation 그리고 whole cell, LPS 및 OMP 항원을 이용한 ELISA 기법이 있으며<sup>3</sup> 최근에는 plasmid profile, PCR, Southern blot hybridization 기법을 이용한 분자생물학적 진단법이 개발되고 있다<sup>4-10</sup>.

*Salmonella* 균의 유전자는 chromosomal DNA 복제에 관여하는 *OriC*<sup>5</sup>, phosphate 결핍 환경에서 유도되는 균체 외막 단백질 유전자 *phoE*<sup>6,7</sup>, LPS O항원 합성과 관련된 *rfb*<sup>8-10</sup>, fimbria 항원 유전자인 *agf*<sup>11</sup>, *sef*<sup>12</sup>, plasmids에 암호된 병원성 발현유전자 *spvA*<sup>13</sup>, O항원 acetylation에 관련된 *oafA*<sup>14</sup>, 상피세포에 대한 부착과 침습에 관련된 *inv*<sup>15</sup>, fimbria 구조항원 유전자 *fim*<sup>16</sup>, tricarboxylate transport protein과 관련된 *tct*<sup>16</sup> 등이 있다. 이들 유전자 중 *phoE*, *OriC*, *rfb*, *fimA*는 PCR 기법에 의해 *Salmonella* 균 검출대상 유전자로 연구된 바 있다. 그러나 이들 유전자는 *Salmonella* 균과 그람음성 세균에 다양하게 분포되어 있어 균종과 혈청형간 특이성에 대한 문제가 항시 제기

되고 있다. *Sal enteritidis* 의 thin filamentous fimbriae를 암호하는 *SEF*<sup>14</sup> 유전자는 *sefA*, *sefB* 및 *sefC*의 3종류의 fimbrin-encoding gene으로 구성되며 이에 대한 염기구조가 보고된 바 있으며 이 중 *sefA*는 serogroup D1에만 특이하게 관찰된다고 보고된 바 있다<sup>12,17,18</sup>.

본 논문에서는 가금 Salmonellosis의 주요 원인체로 알려진 *Salmonella* serogroup D1에 속하는 *Sal pullorum*, *Sal gallinarum* 및 *Sal enteritidis* 를 신속하고 특이적으로 검출하기 위해 *sefA* 유전자를 증폭하는 PCR 기법을 확립하고 표준균주 및 야외분리균주에 대해 시험한 결과를 기술하였다.

## 재료 및 방법

공시균주 : *Salmonella* 표준균주로서 *Sal typhimurium*, *Sal enteritidis*, *Sal gallinarum*, *Sal pullorum*은 수의과학검역원, *Sal choleraesuis* (KCTC #2878), *Sal typhi* (KCTC #2425)는 생명공학연구소, *Sal virchow*, *Sal london* 은 국립보건원으로부터 분양받았다. 야외분리주로는 닭 가검체에서 분리한 *Sal typhimurium* 7주, *Sal enteritidis* 7주, *Sal gallinarum* 7주, *Sal pullorum* 6주, *Salmonella* serogroup C1, C2 각 3주, 기타 *Salmonella* 11주를 공시하였다. 기타 장내세균, 연쇄상구균 및 포도상구균 등은 본 실험실 및 대전보건환경연구원에서 보관중인 표준균주 또는 야외 분리주를 사용하였다(Table 2).

DNA 추출 : 세균의 genomic DNA 추출은 Welsh와 McClelland<sup>19</sup>의 rapid boiled-lysate 기법을 이용하였다. 즉, Nutrient agar 또는 MacConkey agar medium에 접종하여 37℃에서 15~18시간 배양하여 얻어진 세균의 집락 2개를 채취하여 50μl의 멸균증류수에 넣고 100℃에서 5분간 가열한 후 12,000×g에서 1분간 원침시킨 후 상층액 5μl를 취하여 PCR에 사용하였다.

Oligonucleotide primer 합성 : Doran *et al*<sup>12</sup>의 연구와 GenBank에서 제시된 *sefA* gene의 염기서열을 기초로 하여 Sef I 및 Sef II의 2종류의 primer sets를 바이오니아(Bioneer Corp., Korea)에 의뢰하여 합성하였다(Table 1).

Polymerase chain reaction (PCR) : PCR 반응은 검체 DNA 5μl에 10× reaction buffer[100mM Tris-HCl(pH 8.3), 500mM KCl, 0.1% gelatin(v/v)]5μl, 25mM MgCl<sub>2</sub> 10μl, 2.5 mM dNTP 4μl, sense 및 antisense primer 각 1μl씩, 멸균증류수 23μl를 첨가하여 automated thermal cycler(DNA ther-

**Table 1.** Nucleotide sequence of PCR primers for amplification of *Salmonella sefA* gene

Primers	Sequences	Nucleotide position(nt)	Expected product size
Sef I(S)	CGCGAATTC*ATGCGTAAATCAGCATCTGCA	1~24	513bp
Sef I(AS)	CGCGAATTC*GTTTTGATACTGCTGAACGTA	472~495	
Sef II(S)	GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC	3~26	488bp
Sef II(AS)	GATACTGCTGAACGTAGAAGG	470~490	

\* Underline : *EcoRI* site added to *sefA* gene for subcloning.

mal cycler 2400, Perkin Elmer Cetus Co.)로 94℃, 5분간 반응시킨 후 Taq DNA polymerase(Takara) 1μl(3 units)를 가하여 총량이 50μl가 되게 잘 혼합한 다음 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 5분간 반응하는 일련의 과정을 30회 반복하면서, extension time을 매회 5초씩 추가하였고 마지막 반응후 72℃에서 10분간 반응시켰다. PCR 산물의 전기영동분석은 ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel을 이용하여 실시하였고 image analyzer(Pharmacia)로 판독하여 분석하였다. 또한 시험목적에 따라 겔에서 PCR products를 잘라내어 시험관(1.5ml)에 넣고 Gene clean II kit(Bio 101 Inc., USA)를 이용하여 증폭된 DNA를 용출 정제하였다.

PCR의 감수성 : 확립된 PCR 기법의 민감성을 검사하기 위해 정제된 *Sal enteritidis*의 DNA를 UV spectrophotometer (Spectronic, USA)로 260nm에서 농도를 측정한 다음 10진 희석법에 의해 10μg부터 1fg까지 조정하여 PCR를 수행하였다.

PCR products의 특이성 : PCR 증폭산물이 target DNA인지 여부를 확인하기 위해 Doran *et al*<sup>12</sup>과 GenBank에서 제시된 *sefA*의 염기서열을 MacDNAsis ver 3.0(Hitachi software engineering America Ltd.)으로 분석하여 얻어진 결과를 참고하여 PCR 증폭산물을 *Bam*HI과 *Hae*III 효소로 절단하였다. 정제된 DNA 1μg당 1~2 unit의 제한효소를 혼합하여 37℃에서 2~4시간 반응시킨 후 전술한 방법과 2% agarose gel을 이용하여 전기영동분석을 하였다.

## 결 과

PCR의 감수성과 특이성 : 준비된 Sef I 및 Sef II primer sets를 이용하여 *Salmonella* serogroup D1인 *Sal enteritidis*, *Sal pullorum*, *Sal gallinarum*, *Salmonella* serogroup B인 *Sal typhimurium* 그리고 *E coli* 및 *Streptococcus* spp.를 대상으

로 PCR을 실시한 바 두 종의 primers 모두 *Salmonella* serogroup D1에 대해 특이하게 반응하여 Sef I은 513bp, Sef II는 488bp에서 증폭된 DNA fragments가 각각 관찰되었다(Fig 1). 그러나 Sef II는 특이성이 낮았고(Table 2) 공

**Fig 1.** Amplification pattern of *Salmonella* spp. by PCR using Sef I(A) and Sef II(B) primers for *sefA* gene.

A and B : Lane 1 : 1Kb DNA marker(Gibco BRL), Lane 2 : *Sal enteritidis*, Lane 3 : *Sal pullorum*, Lane 4 : *Sal gallinarum*, Lane 5 : *Sal typhimurium*, Lane 6 : *E coli*, Lane 7 : *Streptococcus* spp.

시균의 old cultures로 시험했을 경우 가양성 및 가음성 반응이 관찰되어 본 시험에서는 Sef I primer를 주로 사용하였다. *Sal enteritidis* DNA에 대한 Sef I primer를 이용

Table 2. Summary of the results of PCR for *sefA* gene

Microorganisms (No. of strains)	Primer sets	
	<i>Sef</i> I	<i>Sef</i> II
<i>Bacillus subtilis</i> (1)	-	nt
<i>Bordetella bronchiseptica</i> (1)	-	nt
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	-	nt
<i>E coli</i> (O:111) (1)	-	-
<i>E coli</i> (O:26) (1)	-	-
<i>E coli</i> (O:157, ATCC #43814) (1)	-	-
<i>E coli</i> (O:157, ATCC #43889) (1)	-	-
<i>E coli</i> (O:157H:7, ATCC #35750) (1)	-	-
<i>E coli</i> (K88ab) (1)	-	-
<i>E coli</i> (BE) (1)	-	-
<i>Listeria innocua</i> (1)	-	nt
<i>L ivanovii</i> (1)	-	nt
<i>L monocytogenes</i> (1)	-	nt
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC #9341) (1)	-	nt
<i>Micrococcus luteus</i> (ATCC #10240) (1)	-	nt
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	-	-
<i>Rhodococcus equi</i> (1)	-	-
<i>Serratia</i> spp (1)	-	-
<i>Sal cholerasuis</i> (1)	-	-
<i>Sal enteritidis</i> (1)	+	+
<i>Sal gallinarum</i> (1)	+	+
<i>Sal pullorum</i> (1)	+	+
<i>Sal typhi</i> (1)	+	+
<i>Sal london</i> (1)	-	-
<i>Sal typhimurium</i> (1)	-	-
<i>Sal virchow</i> (1)	-	-
<i>Sal enteritidis</i> isolates (7)	+	±~+
<i>Sal gallinarum</i> isolates (7)	±~+	-~+
<i>Sal pullorum</i> isolates (6)	+	-~+
<i>Sal typhimurium</i> isolates (7)	-	-
<i>Salmonella</i> spp isolates (11)	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	-	-
<i>Staph epidermidis</i> (1)	-	-
<i>Streptococcus agalactia</i> (1)	-	-
<i>Vibrio parahemolyticus</i> (1)	-	-
<i>Yersinia aldovae</i> (1)	-	-
<i>Y enterocolitica</i> (1)	-	-
<i>Y intermedia</i> (1)	-	-
<i>Y frederiksenii</i> (1)	-	-
<i>Y pseudotuberculosis</i> (1)	-	-

\*+ : positive signal, - : negative signal, nt : not tested.

한 PCR의 감수성을 시험한 바 DNA 10µg에서 1pg의 농도까지 513bp 크기의 DNA 밴드가 인정되었다(Fig 2).

Fig 2. Amplification pattern of *sefA* gene by PCR using *Sef* I primers. *Sal enteritidis* genomic DNA was tested by various concentrations.

Lane 1 : 1Kb DNA marker(Gibco BRL), Lane 2 : 10µg, Lane 3 : 1pg, Lane 4 : 100ng, Lane 5 : 10ng, Lane 6 : 1ng, Lane 7 : 100pg, Lane 8 : 10pg, Lane 9 : 1pg, Lane 10 : 100fg, Lane 11 : 10fg, Lane 12 : 1fg, Lane 13 : 1kb DNA marker(Gibco BRL).

PCR products가 *sefA* gene인지를 확인하기 위한 시험에서 *Sal enteritidis*, *Sal pullorum*, *Sal gallinarum* 및 *Sal typhi* 에서 증폭된 밴드는 모두 *Bam*HI에서는 156bp 및 357bp 그리고 *Hae*III에서는 173bp 및 340bp 크기로 절단되었으며(Fig 3) 이들은 기 분석된 *sefA* gene의 제한효소

Fig 3. Cleavage pattern of the PCR products amplified with *Sef* I primer digested with *Bam*HI and *Hae*III restriction endonucleases.

Lane 1 : 1Kb plus DNA marker(Gibco BRL), Lane 2 : *Sal enteritidis*/*Bam*HI, Lane 3 : *Sal gallinarum*/*Bam*HI, Lane 4 : *Sal pullorum*/*Bam*HI, Lane 5 : *Sal typhi*/*Bam*HI, Lane 6 : 1Kb DNA marker, Lane 7 : *Sal enteritidis*/*Hae*III, Lane 8 : *Sal gallinarum*/*Hae*III, Lane 9 : *Sal pullorum*/*Hae*III, Lane 10 : *Sal typhi*/*Hae*III.

절단패턴과 일치하였다.

본 시험 : 각종 세균에 대해 *Sef* I primer를 이용하여 확립된 PCR 기법으로 시험한 결과는 Table 2에서 요약된

바와 같다. 즉, *Salmonella* serogroup D1에 속하는 *Sal enteritidis*, *Sal pullorum*, *Sal gallinarum* 및 *Sal typhi*의 표준주 및 야외분리주(20주)는 양성반응을 나타내었고(Fig 4, Fig 6) *Bacillus subtilis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Citro-*

Fig 4. Amplification pattern of *SefA* gene for various *Salmonella* strains using *Sef I* primer.

Lane 1: *Sal enteritidis*, Lane 2: *Sal gallinarum*, Lane 3: *Sal pullorum*, Lane 4: *Sal typhimurium*, Lane 5: 1Kb DNA marker (Bioneer), Lane 6: *Sal cholerasuis*, Lane 7: *Sal london*, Lane 8: *Sal virchow*, Lane 9: *Sal typhi*.

*bacter freundii*, *E coli*, *Listeria* spp., *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus equi*, *Serratia* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Vibrio parahemolyticus* 및 *Yersinia* spp., 그리고 serogroup D1 이외의 *Salmonella* 균종은 모두 음성반응을 나타내었다(Fig 5).

## 고 찰

*Salmonella* 균은 약 2,300여종의 혈청형으로 분류되며 대부분의 균종은 사람과 동물에서 장염과 패혈증을 일으키며 인수공통전염병을 야기하는 중요한 병원체이다<sup>1</sup>. 닭에서는 serogroup D1에 속하는 *Sal pullorum*, *Sal gallinarum*, *Sal enteritidis*가 추백리, 닭티프스 등 심각한 질병을 일으켜 양계산업에 미치는 피해가 크다<sup>3</sup>. 그러나 이들 avian salmonellosis에 대한 효과적인 예방백신이 개발되어 있지 않으므로 방역대책으로 주로 혈청학적 검색 및 도태방법을 쓰고 있다<sup>3</sup>. 따라서 *Salmonella* serogroup D1에 대한 신속하고 특이적인 진단법의 개발은 avian salmonellosis에 기인된 피해를 줄이기 위해 매우 중요하다.

일반적으로 배양법에 의한 *Salmonella* 균의 분리와 동정은 많은 인력과 시간이 소요될 뿐만 아니라 *Salmonella* 균의 존재를 확인하는 데는 많은 제한이 있다<sup>6,9,10</sup>

Fig 5. Amplification patterns of various microorganisms besides *Salmonella* serogroup D1 using *Sef I* primer showing negative reactions.

A: Lane 1: *E coli*(O:111), Lane 2: *E coli*(O:26), Lane 3: 1Kb DNA marker(Bioneer), Lane 4: *E coli*(O:157, ATCC #43814), Lane 5: *E coli*(O:157, ATCC #43889), Lane 6: *E coli*(O:157 H:7, ATCC #35750).

B: Lane 1: *E coli*(K88ab), Lane 2: *E coli*(BE), Lane 3: *Serratia* spp, Lane 4: *Yersinia intermedia*, Lane 5: *Y frederiksenii*, Lane 6: 1Kb marker(Bioneer), Lane 7: *Y pseudotuberculosis*.

C: Lane 1: *Bacillus subtilis*, Lane 2: *Bordetella bronchiseptica*, Lane 3: *Citrobacter freundii*, Lane 4: *Listeria innocua*, Lane 5: *L ivanovii*, Lane 6: 1Kb DNA marker(Bioneer), Lane 7: *L monocytogenes*, Lane 8: *M luteus*(ATCC #9341), Lane 9: *M luteus*(ATCC #10240), Lane 10: *P aeruginosa*, Lane 11: *Rhodococcus equi*, Lane 12: 1Kb DNA marker(Bioneer), Lane 13: *Staph aureus*, Lane 14: *Staph epidermidis*, Lane 15: *Vibrio parahemolyticus*, Lane 16: *Yersinia aldovae*, Lane 17: *Y enterocolitica*.

가검재료에 오염된 소독제 및 항생제 등이 균의 증식을 방해하고 생체에 만성감염된 *Salmonella* 균은 적은 균수

**Fig 6.** Amplification pattern of *sefA* gene for the field isolates of *Salmonella* D1 serogroup. Arrows indicate the DNA fragments of 513bp.

**A :** Lane 1 : 1Kb DNA marker(Bioneer), Lane 2~8 : *Sal gallinarum* isolates 1~7.

**B :** Lane 1~6 : *Sal pullorum* isolates 1~6, Lane 7 : 1Kb DNA marker(Bioneer).

가 주기적으로 배설되며 사료, 물, 토양 등 환경에 오염된 *Salmonella* 균도 대개 소량으로 존재하기 때문에 배양법으로 분리할 경우 검출율은 매우 낮다. 그러므로 만성 감염된 닭이나 사료, 물, 양계장 주변에서 채취된 가검체로부터 보다 빠르고 특이하게 *Salmonella* 균을 검출하고 혈청형을 동정하기 위해 분자생물학적 기법을 응용한 진단법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

PCR 기법을 이용한 병원체의 검출법은 적절하게 표준화 되었을 때 가검체에 존재하는 균체 DNA를 특이하게 증폭 검출할 수 있으며 특이성과 감수성이 높고 짧은 시간내에 시험할 수 있다는 장점이 있어 많이 연구되고 있고 특히 검체내 소량의 병원체가 존재하여 배양에 의한 분리가 어려울 때 더욱 유용하게 이용할 수 있다고 지적된 바 있다<sup>7-11</sup>. 또한 PCR 법은 상태가 양호한 DNA 뿐만 아니라 분절되거나 변질된 DNA도 검출할 수 있으므로<sup>20</sup> 사료, 식품, 토양 및 임상가검물을 대상으로 여러 세균의 검출방법으로 개발된 바 있다<sup>8-10,16-18</sup>. 임상재료에서 병원성 미생물의 검출과 동정을 위해 PCR 기법을 활용할 경우 hemoglobin, bile salts, MgCl<sub>2</sub> 등과 같은 PCR 반응을 저해하는 물질의 혼입이 문제시 되는데 특히 tetrathionate broth와 Rappaport-vassiliadis broth에 존재하는 bile salts와 MgCl<sub>2</sub>가 PCR을 억제시키는 원인이 될 수 있다<sup>21-23</sup>. 이런 문제는 핵산의 direct chemical extract 법으로 감소시키거나 항생제를 처리한 세균의 immunomagnetic separation법으로 감소시킬 수 있으나<sup>21,24</sup> 술식이 복잡하고 많은 비용이 소요되어 임상적으로 응용하기에는 어려움이 있다. 따라서 PCR을 실시하기 전에 적절한 중균배양과정을 수행함으로써 PCR 반응 억제물질을 감소시키고 민감도를 증가시키는 방법이 적용되기도 한다

<sup>21</sup>. 본 연구에서는 고품배지상에 증식된 집락을 채취하여 Welsh와 McClelland<sup>19</sup>의 rapid boiled-lysate법을 응용하므로써 이와같은 제반문제를 감소시키고 소요시간을 단축시킬 수 있었다.

닭에서 장염과 패혈증을 유발하고 사람 식중독의 원인이 되는 *Salmonella* serogroup D1의 특이적 진단법에 대한 연구는 *Sal enteritidis*의 fimbriae 항원인 *SEF14* gene cluster와 이 항원합성의 전구물질인 *sefA*, *sefB* 및 *sefC* 항원의 유전자를 대상으로 Thorns *et al*<sup>17,27</sup>, Collins *et al*<sup>18</sup>, Doran *et al*<sup>11,12,16</sup>, Woodward와 Kirwan<sup>25</sup>, Turcotte와 Woodward<sup>26</sup> 등에 의해 수행되었다. Thorns *et al*<sup>17,27</sup>은 *Sal enteritidis*의 *SEF14*에 대한 단클론항체를 이용하여 ELISA 법과 latex agglutination 법으로 serogroup D1과 기타 혈청형군과의 감별을 시도하여 이 항원이 serogroup D1에 특이하게 존재하며 진단적 가치가 높은 것이라고 지적하였다. 또한 Turcotte와 Woodward<sup>26</sup>는 fimbriae 항원의 주요 구조단백을 encoding 하는 *sefA* gene을 클로닝하고 염기서열분석을 실시하였으며 *sefA* gene이 *Sal blegdam*, *Sal dublin*, *Sal enteritidis*, *Sal gallinarum*, *Sal moscow*, *Sal pullorum*, *Sal rostock*, *Sal seremban*, *Sal typhi*에 제한적으로 분포되어 있으며 *SEF14* 항원의 발현은 peptone-water를 사용한 균의 배양조건과 관계가 있다고 추론하였다. 최근 Doran *et al*<sup>12</sup>은 immunoassay, dot blot 및 colony hybridization, Western blotting 및 ELISA로 시험하여 *SEF14* fimbriae 항원은 *Sal enteritidis*, *Sal dublin*, *Sal gallinarum*, *Sal pullorum*, *Sal typhi* 및 *Sal berta* 등 serogroup D1에 제한적으로 존재한다고 보고하였고 *SEF14* fimbriae gene cluster에 연관되어 있는 *sefA*, *sefB* 및 *sefC* 가운데 *sefA*는 가끔유래 *Salmonella* D1 serogroup에 특이하게 존재한다

고 지적하였고 *sefA* gene의 염기서열 분석결과 매우 안정된 염기배열을 가졌다고 보고하였다. 본 연구에서는 Doran *et al*<sup>12</sup>이 구명한 *sefA*의 염기서열을 기초로 하여 Sef I 및 Sef II primers를 작성하여 PCR을 표준화하였고 민감성과 특이성을 확인하였다.

확립된 PCR 법으로 시험한 결과 공시한 균주중 serogroup D1에 속하는 *Sal gallinarum*, *Sal pullorum*, *Sal enteritidis*, *Sal typhi*에서만 PCR 양성반응이 관찰되었으며 serogroup D1 이외의 *Salmonella* 균, 장내세균, 포도상구균, 연쇄상구균 및 기타 세균에서는 모두 음성반응이 인정되어 Thoms *et al*<sup>17,27</sup> 및 Doran *et al*<sup>12</sup>이 제시한 논리와 일치하였다. 또한 닭에서 분리한 *Salmonella* 야외분리주를 대상으로 PCR를 실시한 결과(Table 2), Sef I에 비해 Sef II primer를 사용했을 때 음성반응이 많이 관찰되었으며 이런 결과가 두 primer의 구조적 차이에서 특이적으로 일어난 결과인지 또는 PCR 반응에 연관된 요인 즉, annealing temperature, [MgCl<sub>2</sub>] 등에 의해 야기된 것인지에 대해 본 시험결과로는 불확실하며 이에 대한 추가시험이 요망된다. 또한 PCR의 민감성과 특이성은 배양시간과 연관성이 있어 nutrient agar 또는 MacConkey agar에 형성된 old cultures의 집락을 이용하여 PCR을 실시할 경우 가양성 또는 가음성 반응이 출현한다는 사실이 예비 시험에서 관찰되었다. 본 시험에서는 세균의 분열이 왕성한 미세한 집락이 형성되기 시작한 시점인 15-18시간에 집락을 채취하여 PCR을 수행함으로써 특이성, 감수성 및 신속성을 높일 수 있었으며 rapid boiled-lysate 법으로 DNA를 추출함으로써 고형배지에 균점중에서부터 PCR결과 판독까지 20-24시간이 소요되어 시간이 단축된 방법이라 생각되었다.

본 연구에서 확립된 PCR 기법을 상용화시키기 위해서는 보다 많은 *Salmonella* 균종과 여러 종의 기타 세균에 대한 폭넓은 특이성 검정과 임상가검체와 오염된 환경재료에 대한 광범위한 적용시험을 수행해야 한다고 생각된다.

## 결 론

가금 *Salmonellosis*의 주요 원인체로 알려진 *Salmonella* serogroup D1에 속하는 *Sal pullorum*, *Sal gallinarum* 및 *Sal enteritidis*를 신속하고 특이적으로 검출하기 위해 *sefA* 유전자를 증폭하는 PCR 기법을 확립하고 표준균주 및

야외분리균주에 대해 일련의 시험을 수행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *SefA* gene 증폭을 위해 제조된 Sef I과 Sef II primers를 이용한 PCR에서 513bp 및 488bp 크기의 DNA 분절이 각각 관찰되었고 *Salmonella* serogroup D1에 대한 특이성은 Sef II 보다 Sef I primer가 높게 나타났다. Sef I primer를 이용하여 확립된 PCR의 감수성을 시험한 바 1pg의 *Sal enteritidis* DNA에서도 *sefA* gene이 증폭되었으며 증폭된 PCR products를 *Bam*HI과 *Hae*III로 처리하여 *sefA* gene임을 확인하였다.

2. 확립된 PCR 기법으로 *Salmonella* 표준균주 및 야외 분리균주, *E coli*, *Yersinia* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. 등 모두 28균종의 73균주에 대해 시험한 바 본 PCR 법은 *Salmonella* serogroup D1에 대해 특이하게 양성반응을 나타내었다.

3. 본 시험에서 응용한 집락채취법과 rapid boiled-lysate 기법을 이용한 PCR은 *Salmonella* serogroup D1 검출에서 신속하고 특이성이 높았다.

## 참 고 문 헌

1. Carter GR, Chengappa MM. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*, 4th ed, Lea and Febiger, Philadelphia:150-164, 1991.
2. Ewing WH. *Identification of Enterobacteriaceae*, 4th ed, Elsevier, NewYork:181-245, 1986.
3. Gast RK. *Salmonella* infection. In Calnek BW ed, *Diseases of Poultry*, 10th ed, Iowa State University Press, USA:81-96, 1997.
4. Luk JM, Lindberg AA, Reeve PR, *et al*. Comparison of three stool-processing methods for detection of *salmonella* serogroup B, C2 and D by PCR. *J Clin Microbiol*, 32:3072-3074, 1994.
5. Fluit AC, Widjojatomo MN, Box ATA, *et al*. Rapid detection of *Salmonella* in poultry with magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl Environ Microbiol*, 59:1342-1346, 1993.
6. 박두희, 김원용, 김철중 등. Polymerase chain reaction에 의한 *Salmonella* 속균의 검출. 대한수의학회지, 34:115-125, 1994.
7. Spierings G, Elders R, van Lith B, *et al*. Characteriza-

- tion of the *Salmonella typhimurium* *phoE* gene and development of *Salmonella*-specific DNA probes. *Gene*, 122:45-52, 1992.
8. Luk JM, Reeves PR, Lindberg AA, *et al.* Selective amplification of abequos and paratose synthase genes. (*rfb*) by PCR for identification of *salmonella* major serogroup(A, B, C2 and D). *J Clin Microbiol*, 31:2118-2123, 1993.
  9. 최경성, 박진호, 권오덕 등. 중합효소연쇄반응을 이용한 자동혈청형에 따른 Salmonellosis의 신속한 검출. 대한수의학회지, 38:763-770, 1998.
  10. 이성일, 정석찬, 문진산 등. 살모넬라 C1 serogroup 특이 *rfbM* 유전자 증폭과 염기서열 분석. 대한수의학회지, 36:109-118, 1996.
  11. Doran JL, Collinson SK, Burian J, *et al.* DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. *J Clin Microbiol*, 31:2263-2273, 1993.
  12. Doran JL, Collinson SK, Clouthier SC, *et al.* 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. Mahon J, Lax AJ. A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian feces of salmonellas carrying the *spvR* gene. *Epidemiol Infect*, 111:455-464, 1993.
  14. Slauch JM, Lee AA, Mahan MJ, *et al.* Molecular characterization of the *oafA* locus responsible for acetylation of *Salmonella typhimurium* O-antigen : *oafA* is a member of a family of integral membrane transacylases. *J Bacteriol*, 178:5904-5909, 1996.
  15. Galan 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.
  16. Doran JL, Collinson SK, Kay CM, *et al.* *fimA* and *tctC* based DNA diagnostics for *Salmonella*. *Mol Cell Probes*, 8:291-310, 1994.
  17. Thorns CJ, Bell MM, Sojka MG, *et al.* Development and application of enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of *Salmonella enteritidis* infections in chickens based on antibodies to SEF14 fimbrial antigen. *J Clin Microbiol*, 34:792-797, 1996.
  18. Collinson SK, Liu SL, Clouthier SC, *et al.* The location of four fimbriin-encoding genes, *agfA*, *fimA*, *sefA* and *sefD*, on the *Salmonella enteritidis* and/or *S typhimurium* *XbaI-BlnI* genomic restriction maps. *Gene*, 169:75-80, 1996.
  19. Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 18: 7213-7218, 1990.
  20. Cohen ND, Neiberghs HL, McGruder ED, *et al.* Genus-specific detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction(PCR). *J Vet Diagn Invest*, 5:368-371, 1993.
  21. 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.
  22. Higuchi R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In Erlich HA ed, *PCR technology*, Stockton Press, New York:31-38, 1989.
  23. Wilde J, Eiden J, Yolck R. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, 28:1300-1307, 1990.
  24. Widjoatomodjo MN, Fluit AC, Torensma R, *et al.* Evaluation of the magnetic immuno PCR assay(MIPA) for rapid detection of *Salmonella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 10:935-938, 1991.
  25. Woodward MJ, Kirwan SE. detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the polymerase chain reaction. *Vet Rec*, 138:411-413, 1996.
  26. Turcotte C, Woodward JJ. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene encoding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis*. *J Gen Microbiol*, 139:1477-1485, 1993.
  27. Thorns CJ, Sojka MG, McLaren IM, *et al.* Characterisation of monoclonal antibodies against a fimbrial structure of *Salmonella enteritidis* and certain other serogroup D salmonellae and their application as serotype reagents. *Res Vet Sci*, 53:300-308, 1992.