

## PCR을 이용한 *salmonella enteritidis*의 특이적 검출

조미영, 여용구, 김영섭, 이정학, 이병동

서울시보건환경연구원 축산물부 인수공통전염병팀

### Specific detection of *salmonella enteritidis* using polymerase chain reaction method

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

Zoonosis Team, Livestock Product Division  
Seoul Metropolitan Health and Environment Research Institute

#### 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 virulence A(*spv A*) gene of *S enteritidis*. With the primers, 351 bp DNA products were amplified from *S enteritidis* but not from other B, D, C1 serogroup *Salmonella* spp. It was sensitive to detect up to 40  $\mu$ g of template DNA by agarose gel electrophoresis. This PCR assay is very rapid and specific method and less time consuming than the standard bacteriological methods.

Key words : *Salmonella* species, Polymerase chain reaction(PCR), Electrophoresis

#### 서 론

*Salmonella enterica* serotype *enteritidis*는 1980년대 중반이후 foodborne disease의 원인으로 폭발적인 증가현상을 보이고 있다. 최근 10년간 미국 및 유럽국가에서도 공중보건을 위협하는 가장 중요한 식중독 원인균으로 보고되

었으며<sup>1,2)</sup>, 우리나라에서도 1997년 국립보건원의 자료에 의하면 1년간 환자로부터의 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 보고되었으며<sup>3)</sup> 1999년 경기도에서도 농장가검물 및 사람에서

*S enteritidis*가 가장 많이 분리되었다<sup>4)</sup>. 이와 같은 식중독을 예방하기 위해 가검물이나 식품에서 *S enteritidis*의 오염이나 감염을 신속하고 빠르게 진단하는 방법은 매우 중요하다고 하겠다.

*S enteritidis*를 진단하기 위해서는 먼저 *Salmonella*속 균의 분리 및 동정이 선행되어야 하며, 또 lipopolysaccharide(O 항원)와 flagella protein(H 항원)에 기인한 2,200여 혈청형 구분을 위한 검사가 수행되어야 한다. 고전적 배양 방법이 많은 시간과 복잡한 절차가 요구되어 최근에는 *salmonella*속 균을 신속하고 정확하게 분리하기 위하여 선택성이 높은 Rambach agar를 이용하거나<sup>5,6)</sup>, MUCAP test 시약<sup>7)</sup>, C<sub>8</sub> esterase test 시약<sup>5)</sup> 등을 이용하는 방법들이 보고되었다. 혈청형을 구분하기 위해서는 일반적으로 항원에 대한 인자 혈청을 이용한 응집 반응을 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<sup>8,9,10)</sup>.

이러한 문제점을 해결하고자 *salmonella*의 유전자를 이용한 연구가 활발히 진행되었다. 그 중 phosphate가 결핍된 환경에서 발현되는 균체외막 단백질 발현유전자인 *phoE*<sup>3,11,12)</sup>, LPS O 항원의 합성과 관련된 *rfb*<sup>13,14,15,16)</sup>, fimbria 항원유전자인 *sef*<sup>17,18,19)</sup>, 상피세포에 대한 부착과 침습에 관련된 *inv* 유전자<sup>9,20)</sup> 등에

대해 PCR 법을 사용하여 *salmonella*속 균을 신속하고 특이적으로 검출하고자 한 연구가 많이 보고되었다.

*S enteritidis*를 특이적이며 민감하고 빠르게 검출하기 위한 연구가 1996년 Lampel 등<sup>2)</sup>에 의해 보고되었는데, *salmonella*속 균의 plasmid에 암호화된 병원성 발현유전자인 *spvA* gene이 뉴클레오타이드 수준에서 매우 동일하며 *enteritidis*와 다른 *salmonella*와는 단지 13개의 뉴클레오타이드만이 다르다는 것에 착안하여 mismatch amplication 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.

## 재료 및 방법

### 공시균주

PCR을 위해 사용된 표준균주는 국립수의과 학검역원에서 분양받아 사용하였으며, *S enteritidis* 야외분리주는 본 실험실에 보관중인 균주를 사용하였다(Table 1).

### Genomic DNA 추출

*Salmonella*와 기타 균종의 genomic DNA의

Table 1. Bacterial strains used in this 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 monocytognes</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

분리는 Lampel 등<sup>2)</sup>의 방법에 준하여 추출하였다. *Salmonella*와 기타 균종을 tryptic soy agar(Difco) plate에 접종시켜 37°C에서 18시간 배양한 후 하나의 집락을 선택하여 0.5M NaOH 25 $\mu$ l에 부유시켜 vortex를 이용하여 잘 섞어준 후 실온에서 30분간 방치하였다. 여기에 1M tris buffer(pH 7.4) 25 $\mu$ l와 DW 450 $\mu$ l를 넣어준 후 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

#### Primer의 합성

*S enteritidis*에 특이적인 primer는 Lampel 등<sup>2)</sup>에 의해서 보고된 유전정보에 의하여 597 (5'-GCAGACATTATCAGTCTTCAGG-3')과 598(5'-TCAGGT TCGTGCCATTGTC-AA-3') primer를 TaKaRa Biomedical (주)에 합성 의뢰하여 사용하였다.

#### PCR 방법

597 및 598 primer를 이용한 PCR 방법의 확립은 Lampel 등<sup>2)</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. PCR mixture는 1 $\times$ PCR buffer(TaKaRa), 200 $\mu$ M each deoxynucleotide triphosphate (TaKaRa), 1 $\mu$ M each primer, 3.0 unit의 *Taq* DNA polymerase(*rTaq*, TaKaRa)를 사용하였으며 template로서 2 $\mu$ l의 세균 lysate를 넣어 총 50 $\mu$ l가 되도록 사용하였다.

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

#### PCR 방법의 특이성 조사

Primer의 특이성을 조사하기 위해 *S enteritidis* 표준균주 및 야외분리주와 *salmonella* D group 내의 다른 균주, *salmonella* C1, B group의 균주 및 *E coli* O157:H7, *L monocytogenes*,

*staphylococcus aureus*의 DNA을 분리하여 동일한 조건에서 PCR 반응을 실시한 다음 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 *S enteritidis*의 특이증폭산물인 351 bp의 DNA 절편을 확인하였다.

#### PCR 방법의 민감성 조사

PCR 방법의 민감성을 조사하기 위하여 *S enteritidis*를 tryptic soy broth(Difco)에 접종하여 37°C에서 18시간 배양하여 증균한 후 1ml을 ependorf tube에 취하여 1,000g에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 pellet을 50 $\mu$ l의 PBS에 부유한 뒤 5 $\mu$ l의 lysis solution (50mg/ml proteinase K, 0.1M EDTA, pH 8.0; 0.2 M Tris-HCl, pH 8.0)을 넣어 60°C에서 1시간 반응시킨 뒤, 100°C에서 5분간 끓였다. PCR법을 위하여 2 $\mu$ l를 template로 사용하였으며 *S enteritidis* lysate를 4,000ng에서부터 10진 단계희석방식으로 4pg까지 희석하여 PCR법의 검출한계를 조사하였다. PCR 증폭산물은 1.2% agarose에서 15 $\mu$ l를 loading하여 확인하였다.

## 결 과

#### PCR 기법의 특이성

*Salmonella*의 bacterial cell lysate를 이용하여 597 및 598 primer를 이용하여 PCR을 진행한 결과는 Fig 1과 같다. *S enteritidis* 표준균주 및 야외분리주는 모두 351bp에서 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *salmonella*속 균 및 다른 세균에 대해서 동일한 조건에서 PCR을 수행하였으나 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다.

#### 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).

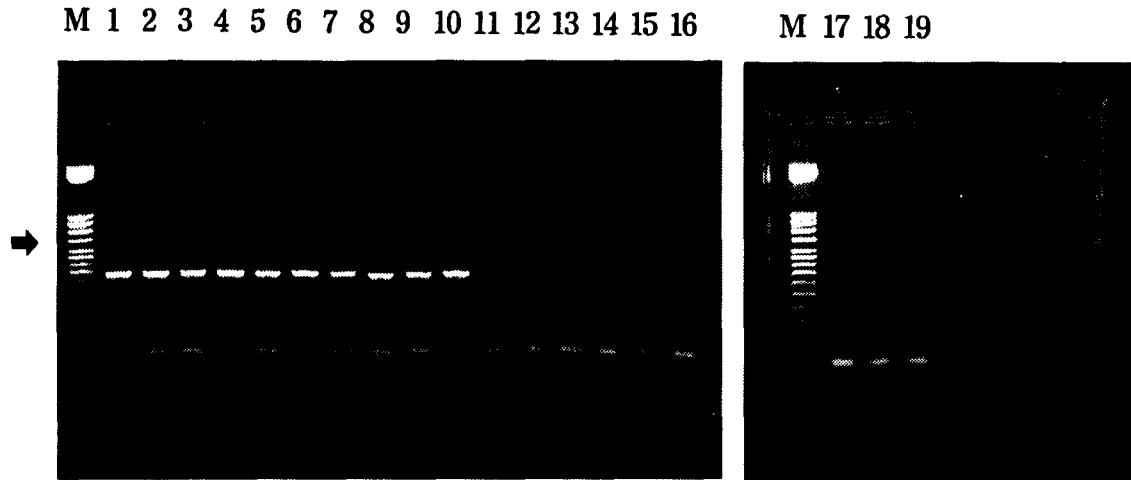


Fig 1. DNA products amplified from *salmonella* species by 597, 598 PCR assay. M. 50 bp step ladder, 1. *S. enteritidis*, 2-10. *S. enteritidis* field isolates. 11. *S. typhimurium*, 12. *S. pullorum*, 13. *S. gallinarum*, 14. *S. dublin*, 15. *S. cholerasuis*, 16. *E. coli* O157:H7, 17. *E. coli*, 18. *Listeria monocytogenes*, 19. *Staphylococcus aureus*.

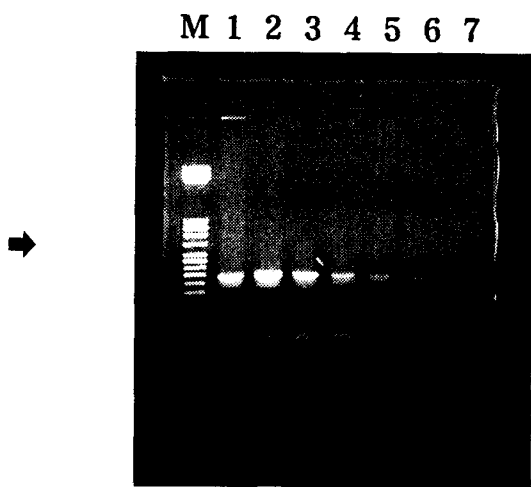


Fig 2. Detection limit of amplified DNA of *S. enteritidis* by 597, 598 PCR assay. M. 50 bp step ladder, Lanes 1-7 : serially diluted *S. enteritidis* DNA, concentration of 4,000 ng, 400 ng, 40 ng, 4 ng, 400 pg, 40 pg and 4 pg. Arrow indicated the limitation of 351 bp PCR products.

## 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 방법이다<sup>21)</sup>.

Nguyen 등<sup>8)</sup>은 *salmonella*-specific *Hind*III 단편을 포함하는 primer를 이용하여 또, Cohen 등<sup>22)</sup>은 genus-specific primer를 사용하여 모든 group의 *salmonella*를 검출할 수 있는 PCR법을 보고하였다. Woodward와 Kirman<sup>10)</sup>은 *sefA* 유전자를 이용하여 계란에서 *S. enteritidis*를 특이적으로 검출할 수 있는 PCR 진단법을 보고하였고, Gaan 등<sup>20)</sup> 및 Stone 등<sup>9)</sup>도 *invA* 유전자를 이용한 PCR법을 보고하였다. Fadl 등<sup>1)</sup>은 사람과 조류 유래의 *S. enteritidis*를 검출할 수 있는 PCR법을 보고하였는데 이 기법을 이용하였을 때 *S. enteritidis*의 phage type이 같

으면 DNA band pattern이 같아 역학조사에 유용하게 사용할 수 있음을 제시하였다. Kongmuang 등<sup>16)</sup>도 *rfbJ*, *rfbS* gene을 이용하여 *salmonella* B, C2, D serogroup의 검출을 보고한 바 있다.

국내에서도 *salmonella*속 균에 대해 많은 PCR 진단법들이 개발되었다. 1994년 박 등<sup>11)</sup>과 1995년 김 등<sup>3)</sup>이 *phoE* 유전자를 이용하여 *salmonella* B, D 혈청형의 검출을 보고하였으며 1996년 안 등<sup>13)</sup>이 *rfbS* 유전자에 기초하여 *salmonella* A, D group 검색을 위한 PCR기법을 보고하였다. 1996년 이 등<sup>14)</sup>이 돼지의 *salmonella* 감염증의 주요병원체로 알려진 C1-serogroup에 특이적인 *rfbM* 유전자 및 1997년 우 등<sup>23)</sup>은 *salmonella*의 전 group을 검출할 수 있는 primer를 보고하였다.

본 실험에서는 *S enteritidis*에만 특이적인 *spvA* 유전자를 이용하여 식중독균으로서의 우위를 차지하고 있는 원인균을 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 40 pg까지의 *salmonella* genomic DNA를 검출할 수 있었는데 이는 Nguyen 등<sup>8)</sup>이 모든 *Salmonella*에 특이적인 2.0kb의 PCR product를 EtBr이나 southern blot hybridization을 사용하였을 때 330fg까지 검출이 가능하였다고 보고한 것과 Stone 등<sup>9)</sup>이 정제된 chromosomal DNA를 사용했을 경우 300fg까지 검출 가능하였다고 보고한 것보다 10배정도 낮으나 NKW primer를 이용한 우 등<sup>23)</sup>의 민감도와는 유사하며, 1996년 안 등<sup>13)</sup>이 보고한 100pg의 민감도 보다는 높은 결과를 보였다.

또, Luk<sup>24)</sup>과 Widjoatomodjo 등<sup>25)</sup> 및 Woodward와 Kirman<sup>10)</sup>은 임상가검물을 PCR의 재료로 이용하였을 때 분변내의 bilirubin이나 bile salt에 의해 PCR 반응이 저해되는 문제점을 해결하고자 immunomagnetic immuno PCR assay법을 이용하여 *salmonella*를 검출하는데 좋은 성과를 거두었으나 이는 비용이 많

이 드는 단점이 있다. Stone 등<sup>9)</sup>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. 본 실험에서는 집락 채취법을 사용하여 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 동정하는 데 유용하게 응용될 수 있을 것으로 사료되며, 앞으로 실제 가검물 검사에 응용하기 위해 가검물에서 *S enteritidis* 항원을 검출할 수 있는 PCR 반응의 특이성에 대한 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

*Salmonella*속 균중 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 19 종의 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.

### 참고문헌

1. Fadl AA, Nguyen AV, Khan MI. 1995. Analysis of *Salmonella enteritidis* isolates by arbitrarily primed PCR. *J Clin Microbiol* 33(4) : 987~989.
2. Lampel KA, Keasler SP, Hanes DE. 1996. Specific detection of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* using the polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* 116 : 137~145.
3. 김원용, 장영효, 김철중 등. 1995. Polymerization chain reaction과 southern hybridization을 이용한 *Salmonella* 속균의 신속한 검출. *대한수의학회지* 35(3) : 531~536.
4. 강정복, 조규홍, 용금찬 등. 1999. 관내 취약 지역에서 분리되는 *Salmonella* 균속의 특성에 관한 연구. *경기도보건환경연구원보* 11 : 164~172.
5. Freydiere A, Gille Y. 1991. Detection of *Salmonella* by using Rambach agar and a C8 esterase spot test. *J Clin Microbiol* 29 : 2357~2359.
6. Gruenewald R, Henderson RW, Yappow S. 1991. Use of Rambach propylene glycol containing agar for identification. *J Clin Microbiol* 29 : 2354~2356.
7. Olssen M, Wollinder SA. 1991. Identification of *Salmonella* with the 4-methylumbelliferoyl caprilate Fluorescence test. *J Clin Microbiol* 29 : 2631~2632.
8. Nguyen AV, Khanv MI, Lu Z. 1994. Amplication of *Salmonella* chromosomal DNA using polymerase chain reaction. *Avian Dis* 38 : 119~126.
9. Stone GG, Oberst RD, Hays MP, et al. 1994. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J Clin Microbiol* 32(7) : 1742~1749.
10. Woodward MJ, Kirwan SES. 1996. Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the polymerase chain reaction. *Vet Rec* 138 : 411~413.
11. 박두희, 김원용, 김철중 등. 1994. Polymerase chain reaction에 의한 *Salmonella* 속균의 검출. *대한수의학회지* 34 : 115~125.
12. Spierings G, Elders R, van Lith B. 1992. Characterization of the *Salmonella typhimurium phoE* gene and development of *Salmonella*-specific DNA probes. *Gene* 122 : 45~52.
13. 안종삼, 정석찬, 김종만 등. 1996. *Salmonella* A 및 D Group의 특이적 검사를 위한 rfbS 염기서열 분석에 기초한 PCR 기법의 적용. *대한미생물학회지* 31(2) : 155~163.
14. 이성일, 정석찬, 문진산 등. 1996. 살모넬라 C1 serogroup 특이 rfbM 유전자 증폭과 염기서열 분석. *대한수의학회지* 36(1) : 109~118.
15. Luk JM, Reeves PR, Lindberg AA. 1993. Selective amplification of abequose and paratose synthase genes(rfb) by PCR for identification of *Salmonella* major serogroup(A, B, C2 and D). *J Clin Microbiol* 31 : 2118~2123.
16. Kongmuang U, Luk JMC, Lindberg AA. 1994. Comparison of three stool-processing methods for detection of *Salmonella* serogroups B, C2, and D by PCR. *J Clin Microbiol* 32(12) : 3072~3074.
17. 전무형, 김태중, 장경수 등. 1999. SefA 유전자 PCR에 의한 *Salmonella* serogroup D<sub>1</sub>의 특이적 검출. *대한수의학회지* 39(3) : 523~530.

18. Turcotte C, Woodward MJ. 1993. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene encoding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis*. *J Gen Microbiol* 139 : 1477~1485.
19. Doran JL, Collinson SK, Clouthier SC. 1996. Diagnostic potential of sefA DNA probes to *Salmonella enteritidis* and certain other O-serogroup D1 *Salmonella* serovars. *Mol Cell Probes* 10 : 233~246.
20. Gaan JE, Ginocchio C, Costeas P. 1992. 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.
21. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 : 487~491.
22. Cohen ND, McGruder ED, Neibergs HL, et al. 1994. 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 Sci* 73 : 354~357.
23. 우용구, 현방훈, 정석찬 등. 1997. *Salmonella* 속균의 신속검출을 위한 PCR 진단법 개발. *수의과학연구논문집* 39(2) : 66~75.
24. Luk JMC. 1995. Detection of *Salmonella* species in fecal samples by immunomagnetic separation and PCR. *J Clin Microbiol* 33 : 1046~1047.
25. Widjoatmodjo MN, Fluit ADC, Torensma R, et al. 1992. The magnetic immuno polymerase chain reactin assay for direct detection of *Salmonellae* in fecal samples. *J Clin Microbiol* 30(12) : 3195~3199.