

Pulsed-Field Gel Electrophoresis를 이용한 *Salmonella enterica* subspecies *enterica* bioserovar Pullorum의 분자유전학적 다양성에 관한 연구

우용구, 이수화, 이철현, 이오수, 김봉환*
국립수의과학검역원, 경북대학교 수의과대학*
(게재승인: 2003년 1월 6일)

Genetic Diversity of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* bioserovar Pullorum using the pulsed-field gel electrophoresis

Yong-Ku Woo, Su-Hwa Lee, Chul-Hyun Yi, O-Soo Lee, Bong-Hwan Kim*

National Veterinary Research and Quarantine Service, MAF, Korea

College of Veterinary Medicine, Kyungbook National University, Deagu, Korea*

(Accepted: January 6, 2003)

Abstract: Pullorum disease due to *Salmonella enterica* subspecies *enterica* bioserovar Pullorum (*S. pullorum*) is reported to be an endemic disease in domestic poultry flocks. The pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) subtyping method was used to assess the extent of genetic diversity and clonality of most of salmonella serotypes and other diverse bacterial species from animals and environmental samples in worldwide. Nowadays, PFGE has already been evaluated as a gold standards for molecular subtyping of salmonella serotypes compared with other molecular analysis methods. PFGE of *Xba*I digested chromosomal DNA from 23 strains of *S. pullorum* gave 5 distinctive pulsotypes (from SXPI to SXPV) with 5% confidence range of Dice coefficients, indicating that PFGE is very discriminative and that multiple clones of *S. pullorum* have been existed and diffused all of domestic poultry flocks industries since 1995. Two dominant pulsgroups (SXA & SXB) appeared as a major clones in this country, because they had consistently been recovered from diverse sources including both chicken organs and raw feed materials between 1995 and 1998. In addition, the matching percentage of PFGE profiles (PFP) among strains from both chickens and feed ingredients provides indirect evidence of the possible transmission of pullorum disease from contaminated raw feed ingredients for chicken production. In calculating of discrimination index (DI) for PFGE method by Simpson's index, DI was appeared as 0.917. Therefore, this index suggested that the present PFGE would seem to be a desirable and confident molecular typing method for *S. pullorum* strains. To our knowledge for pullorum disease, this is the first study to compare *S. pullorum* strains from chicken organs and feed samples using the PFGE.

Key words: *Salmonella pullorum*, PFGE, genetic diversity, chicken

* Corresponding author: Bong-Hwan Kim

College of Veterinary Medicine, Kyungbook National University, Deagu, Korea, E-mail: bhkim@knu.ac.kr

서 론

Salmonella enterica subspecies *enterica* bioserovar *Pullorum* (*S. pullorum*)은 1899년에 Rettger가 백색설사를 하는 병아리로부터 처음으로 분리하면서 세상에 알려지게 되었다. 하지만 이는 Klein 박사가 전염성의 장염으로 죽은 닭에서 *S. gallinarum*을 분리한지 11년(1888)이나 뒤늦은 일이었다. 미생물학자였던 Smith는 돼지콜레라에 감염된 돼지로부터 *Salmonella choleraesuis*를 분리하였지만 "The bacterium of swine plaque"라는 논문에서 실제로 *Salmonella*와 관련하여 참여하지도 않았지만 자기의 상관이라는 이유로 Daniel Elmer Salmon (1850~1914)을 주 저자로 발표하였던 이유로 1900년에 주 저자의 이름인 Salmon의 공적을 인정하여 *Salmonella*의 기록되었고 결과적으로 Smith가 분리한 *S. choleraesuis*는 type strain으로 자리잡게 된 아이러니한 역사를 갖고 있다¹.

김²의 보고에 따르면 우리 나라에서 추백리의 확인은 일제강점기(1924년)에 昆野杭太郎 씨가 일본의 에지현에서 한국으로 수입된 병아리 중 하리성질환을 나타낸 병아리에서 분리한 것으로 그 특성이 Rettger가 보고한 *S. pullorum*과 일치함을 확인하고, 조선총독부의 자료인 제3차 수역혈청제조소 연구보고서에서 "*Bacterium pullorum*과 동속군에 의한 병아리의 패혈증(黴敗血症)"이란 제목하의 기술자료가 지금까지 확인된 가장 오래된 자료이다. 昆野杭太郎씨는 당시 널리 사용되던 시험관내 응집반응법을 사용하여 추백리 보균계를 검색하였으며, Schaffer (1931)에 의해서 개발된 염색항원을 채택한 전혈평판응집 반응법을 국내에 도입하여 시험하였다는 기록도 전술한 자료에서 찾아볼 수 있었다. 따라서 우리 나라에서 추백리 검진업무의 역사는 무려 70년이란 역사를 자랑하고 있지만 아직까지 추백리 근절은 그 실효성을 거두지 못하고 있는 실정이다². 아울러 동 자료에서 昆野杭太郎 씨는 우리 나라 평안남도의 중화군(中和郡)에서 수역혈청제조소로 의뢰한 가검재료에서 *S. gallinarum*을 처음으로 분리하였으며, 이 사실을 제2차 수역혈청제조소의 연구보고서(1924)에서 "鷄疫(닭티푸스 유사증)"이란 제목으로 보고하여 우리 나라에서 가급티푸스의 역사를 입증해 주고 있다².

추백리는 주로 어린 병아리에서 패혈증을 일으키지만 성계에서는 별다른 증상 없이 내과하여 보균계로 남게 되며, 반면에 가급티푸스는 주로 성계에서 패혈증을 일으키며 가급에서 단계대의 세균성 질병이라는 것이 가장 흔히 알려져 있는 질병정의이지만, 간과해서는 안되는 것이 *S. pullorum*도 성계에서 발증을 하며, *S. gallinarum* 역시 어린 병아리에서 패혈증을 일으키고 있다는 사실

이다.

*S. pullorum*은 추백리의 병원체이면서 가축의 질병 중에서는 최초로 수직전파 되는 병원체라는 사실이 밝혀지면서, 질병근절 정책에 어려움이 있으며 또한 보균계 처리에 대한 중요성을 제시하였다. 그러나 우리 나라에서 추백리 근절을 위해서 정부에서는 양성계의 검출은 주력하였지만, 양성계의 살처분은 축주에게 맡겨져 왔던 탓에 추백리 근절정책의 효과를 보지 못하고 있는 실정이다. 물론 선진국이나 발생이 많지 않은 나라에서는 질병방역의 주체를 축주에게 맡겨서 약물을 투약하거나 검색을 실시하든지 간에 근절이 가능할 수 있는 접근방법일 것이지만, 우리와 같이 야외 농장에 많은 피해를 입히고 있을 정도로 질병이 만연된 나라에서는 국가의 보다 적극적인 개입이 중요한 것으로 인정되고 있다². 참고로 일본은 우리 나라 보다도 경제적으로도 앞서고 이 질병에 의한 피해도 심하지 않은 나라인데도 우리보다도 더욱 강력한 강제적인 살처분 시책을 채택하여 적용한 것으로 알고 있다. 따라서 강제성도 떨어지며 양성계의 살처분을 축주에게 맡겨 놓은 우리의 추백리 근절정책의 현실을 되새김질 해 보는 것이 필요한 실정이라고 간주된다.

Zimm 등 (1972)은 전장(electric field)을 제거한 후에 일단 최초방향으로 신장되었던 DNA 분자들은 전장의 힘에 의해서 방해를 받지 않은 원래의 상태로 되돌아가려고 이완되는 성질이 있으며, 이렇게 이완되는 비율은 DNA 분자의 길이에 비례한다는 사실을 밝혀냈다. Zimm의 제자였던 David Schwartz는 전술한 이론을 바탕으로 커다란 DNA분자를 분리하는데 있어서 크기에 의존된 이완현상을 연구하고, 그 결과 전장의 방향에 주기적인 변화를 주는 것은 gel내에서 DNA분자가 최초의 전장을 제거했을 때 이완되도록 야기하며, 새로운 전장의 방향에 따라 나란히 배열되어 신장되며 이 과정 또한 크기에 의존하고 있다는 사실을 밝혀냈다^{3,4}. 이와 같은 사실을 Schwartz는 Charles Cantor의 실험실에서 수백 kbp에 달하는 크기의 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*의 염색체 DNA를 전장의 변동(field switching)을 가하여 분리에 성공하여 자신의 이론을 실험으로 실험시켜 보였다. 따라서 Pulsed field라는 용어는 최소한 한 개 이상의 전장을 사용하여 전기영동을 수행하는 과정을 말하며, 이때 한 개 이상의 전장은 교대로 활성화가 되도록 제조한 전기영동장치들 Schwartz와 Cantor는 pulsed field gradient gel electrophoresis (PFGE; 1982)라는 용어로 처음 명하였다. 따라서 PFG 또는 PFGE라는 용어는 하나 이상의 전장을 사용하는 모든 전기영동장치에 적용이 되는 용어로 이해함이 바람직하다. 그러므로 단지 2개의 전장을

사용할 경우에는 적용되는 전장의 각도가 중요할 수밖에 없으며 PFGE의 유일한 예외인 FIGE (field inversion gel electrophoresis; 역전장전기영동장치)에서 사용되는 전장사이의 각도는 180°이다^{3,4}.

Schwartz와 Cantor가 개발한 최초의 PFGE 장치는 단지 2개의 전장을 사용했으며, 하나는 균질성이었고 나머지는 비균질성의 전장이었는데, 이 장치를 사용해서 분자량이 240 kb이상의 크기인 *Saccharomyces cerevisiae*의 염색체를 분리하는데 성공하였다. 이러한 성과는 기술적으로 실로 엄청난 돌파구를 개척한 것으로 agarose gel을 이용한 기존의 전기영동법을 사용해서 분리할 수 있는 분자량의 범위를 40배 이상으로 확대시키는 획기적인 변화였다. 이때 이후로 OFAGE (Orthogonal field alternation gel electrophoresis), TAFE (Transverse alternating field electrophoresis), FIGE, CHEF (Contour clamped homogeneous electric field) 등의 다양한 방식의 분석장치가 개발되었으며 그 중에서도 CHEF 방식의 경우 무려 7,000 kb 크기의 분자량의 DNA까지도 해석이 가능할 정도로 엄청난 발전을 가져왔으며, 이 방식은 전세계적으로 가장 많이 활용되고 있는 것으로 알려져 있다³.

PFGE (Pulsed-field gel electrophoresis)를 이용한 macro-restriction 기법은 현재까지는 *Salmonella* 속균의 유전자 수준의 molecular typing을 위한 gold standard로 인정받고 있는데 그 이유는 고도의 감별능력과 재현성을 바탕으로 다양한 역학적 자료와 높은 상관성을 보여주기 때문이라는 사실이다. 반면에 PFGE가 광범위한 실험실에서 손쉽게 활용되지 못하고 있는 것은 결과성적을 획득하기까지 3일 이상의 장시간이 소요되며, 잘 훈련된 전문 인력, 표준화된 실험방법, 고가의 장비와 시약, 그리고 DNA profile의 해석을 위한 전문분석 프로그램 등을 요구하고 있다는 것이 중요한 단점들로 작용하고 있기 때문이다⁴⁻⁷.

저자 등은 국내 닭에서 분리된 *S. pullorum*에 대하여 항생제내성양상 조사, 각종 생물화학적 특성 조사 및 인자혈청 등을 이용한 전국 양계장에서의 *S. pullorum*의 항원형의 분포양상 조사 등과 같은 표현형질상의 특성을 조사한 성적이 있다. 그리고 plasmid profile의 조사와 RAPD-PCR (P-1254)을 이용한 유전자 수준의 다양성분석 등의 molecular typing 기법들을 활용한 바도 있다^{8,9}. 알려진 바와 같이 표현형질상의 특성은 유전형질에 있어서 분명한 차이가 있다 할지라도 표현형질은 동일한 균주로 발현될 수 있기 때문이다. 항생제내성 양상은 동일한 균주이지만 유전형질에서는 전혀 다른 균주로 판정되는 경우와 또한 phage의 인식부위가 없는 균주에 대해서 phage typing을 실시한 경우 등과 같은 대표적인

사례에서 보듯이 표현형질상 특성조사의 경우 상당수의 균주들은 비교시험 자체를 할 수 없는 경우가 종종 발생된다. 마찬가지로 유전자 분석방법에서도 재현성이 낮은 경우 예로서 유전자 분석방법의 경우 plasmid가 없는 균주로 plasmid profiling을 할 경우나, 특정병원성 인자가 없는 균주로 그 유전자를 PCR로 증폭하고자 하는 등의 경우이다. 따라서 이러한 단점들을 해결하기 위해서는 보다 신뢰성과 재현성이 높은 분석기법이 필요한 실정이다.

이 연구에서는 *S. pullorum*의 분자유전학적인 특성을 파악하고자 유전자 분석기법 중에서 현재까지 황금률로 인정받고 있는 PFGE 기법을 적용하여, 우리 나라의 야외 농장에서 현재 문제가 되고 있는 추백리의 원인체인 *S. pullorum* 분리주의 유전자 수준에서의 다양성을 분석하고자 시도하였던 바, 그 성적을 알리고자 하였다.

재료 및 방법

공시균주

시험에 공시한 *S. pullorum* 분리주는 1995년부터 1998년 사이에 국내 가금에서 분리된 야외 분리주로서 생화학상 검사를 통하여 *Salmonella* 속균에 속하는 것을 확인하고 항혈청으로 serogroup D₁에 응집 양성반응을 나타내는 균주로서 특히 *S. gallinarum* 균주와 생화학적으로 감별되는 균주들을 시험에 공시하였으며, 또한 시판사료에서 분리된 균주도 동시에 공시하였다. 그리고 대조균주로는 *S. pullorum* ATCC 9120 등과 추백리-티푸스 진단액 제조에 사용되는 표준균주 (SP 4, 11, 296)도 함께 사용하였다.

PFGE (Pulsed field gel electrophoresis)

1) Agarose plug의 제작 및 restriction digestion

이 연구에서 사용한 기본적인 수행 방법들은 Birren과 Lai의 방법³에 따랐으며, 먼저 표현형질상의 특성이 확인된 *S. pullorum* 야외 균주는 BHI 육즙배지에 배양하였고, 균의 탁도를 610 nm에서 흡광도 (O.D)를 측정하여 O.D 0.570~0.820으로 조절된 균배양액을 12,000 rpm에서 5분간 원심으로 집균하여 1.5 ml의 microtube를 사용하여 400 ul의 균액으로 조절하였다. 그리고 여기에 25 ul의 Proteinase K (20 mg/ml)를 첨가하고 2-4회 inverting으로 혼합하고 TE buffer (0.01 M Tris-HCl, pH 8.0; 1 M NaCl, Bioneer, Korea)로서 1.0% PFGE grade agarose (Bio-Rad, USA)를 제조한 것을 동일량 (400 ul)을 한번에 하나의 샘플씩 plug mold를 사용하여 plug를 제조하였다. 제조된 plug는 50 ml tube로 옮기고 5 ml의 cell lysis

buffer (TE buffer, 1% Sarcosine, 0.1 mg Proteinase K/ml)를 첨가하여 반응시켰다. Orbital shaker water bath (150-200 rpm)를 사용하여 54°C에서 15분간 반응시킨 후에 Plug는 전술한 방법으로 4회 수세 (15~20분 간격)를 하며 54°C shaking water bath에서 배양하면서 1회는 증류수(D.W)로 하고 나머지 3회는 TE buffer로 수세하였다. 마지막 수세 후의 plug는 2 mm 넓이로 절단하여 1X restriction buffer를 포함하는 tube에 옮기고 실온에서 5분간 배양한 후에, 미리 배양한 buffer는 버리고 신선하게 제조한 200 ul의 제한효소 (*Xba*I, 40U, NEB, USA)와 buffer의 혼합액으로 채우고 37°C에서 24시간동안 배양하였다. 배양이 완료된 tube는 반응액을 제거하고 0.5x TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA, pH 8.3, Bio-Rad, USA)로 수세하고 다시 동일한 buffer로 채운 후, 실온에서 5분간 배양하였다.

2) PFGE 분석

*S. pullorum*의 DNA의 전기영동은 CHEF Mapper XA system (Bio-Rad, USA)을 사용하였으며, 소화처리 과정이 완료된 plug는 0.5x TBE buffer로 제조한 1.0% agarose gel (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad, USA)에 적재하고 나머지 빈 공간은 역시 동일한 1.0% agarose gel로서 밀봉하였다. 전기영동 조건으로 0.5x TBE buffer를 사용하였으며, buffer의 온도는 14°C로 유지하였고, 200 V (6 V/cm)에서 pulse time은 2초에서 40초의 범위로 설정하고 24시간동안 전기영동을 하였으며 marker로서는 lambda ladder (0.05~1 Mb)와 *Saccharomyces cerevisiae* (Bio-Rad, USA)를 동시에 사용하여 전기영동을 실시하였다. DNA 단편은 1 mg/ml ethidium bromide (Bioneer, Korea) 용액에서 20분간 염색시키고 이어서 증류수로서 30분간 탈색 처리한 후, UV 장치를 사용하여 DNA bands를 확인하고 사진 촬영하였다.

PFGE로 확인된 DNA fingerprint는 스캐너 (hp scanjet 3500c, USA)로 읽은 후 JPG file로 변환하여 Bio-1D2+ (vision 99, Vilber Lourmat, France) software를 사용하여 유전자 수준에서의 상동성을 분석하는 절차에 따랐으며, DNA band의 위치에 있어서는 5%의 허용범위 (tolerance)를 적용하였고 PFP를 비교하였고 개별 DNA band의 분자량을 marker lane에 근거하여 정상화하고, master lane과의 일치도 (matching)를 결정하여, Dice coefficient에 근거하여 균주간의 dendrogram을 작성하고 이 성적에 근거하여 균주간의 상동율 (similarity coefficient) 성적을 조사하고, UPGMA (unweighted pairgroup method with arithmetic averages) 방법으로 clustering을 실시하여 최종적으로 PFP를 결정하였다.

PFGE 분석법의 감별능력 (Discriminative ability)을 평가하기 위한 감별지수 (DI; Discriminatory index) 분석

Hunter와 Gaston²¹의 방법에 따라서 Simpsons' index에 근거한 아래의 공식에 따라서 이 연구에서 수행한 PFGE 기법의 성적에 대해서 통계학적 방법으로 객관적인 수치의 DI 값을 산출하였다. DI의 계산은 PFGE 성적 중에서 균주간의 유전학적인 상동성 (similarity coefficients) 성적에 근거한 dendrogram 성적을 기초로 하여 계산하였다. 결과판정에서 DI 값이 0.900 이상의 수치를 확보한 경우, 그 분석기법은 신뢰성이 높은 분석기법으로 간주하였지만, 반면에 DI 값이 0.900 이하이면 적용한 분석기법은 해당 균주 상호간을 효과적으로 감별할 수 없는 신뢰성이 미흡한 분석기법으로 평가하였다.

$$DI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \times \sum_{j=1}^S nj(nj-1)$$

< Where N is the total number of strains in the sample, S is the total number of types described, and nj is the number of strains belonging to the jth type. >

결 과

PFGE

이 연구에서 공시한 총 23주의 *S. pullorum* 균주의 chromosomal DNA에 대하여 RCRE인 *Xba*I을 선발하여 소화 처리한 후에 PFGE를 수행한 성적은 Fig. 1과 Fig. 2에서 나타낸 바와 같았다. 그림에서 보는 바와 같이 PFP는 전체적으로 16가지유형의 서로 다른 PFP로 나타났다. 따라서 동일한 PFP를 나타낸 균주는 12균주였으며, 많은 경우는 4종의 균주에서 적은 경우는 2종의 균주간에 동일한 PFP가 관찰되었다 (Fig. 1 및 2). 한편 Dice coefficient를 적용하고 5%의 허용한계 범위내에서 DNA fingerprint 성적을 바탕으로 dendrogram을 작성한 성적은 fig. 1에 나타낸 바와 같았다. 그리고 공시하였던 총 23주의 *S. pullorum* 균주의 DNA fingerprint를 근거로 유전학적 상관성의 비교조사에서, 공시균주 전체는 >60%의 유전학적인 일치율 성적을 보이면서 크게 2 가지 유형의 pulsogroup (SXPA 및 SXPB)으로 양분되는 양상으로 분석되었다. SXPA 그룹에는 모두 13주 (57.0%)가 포함

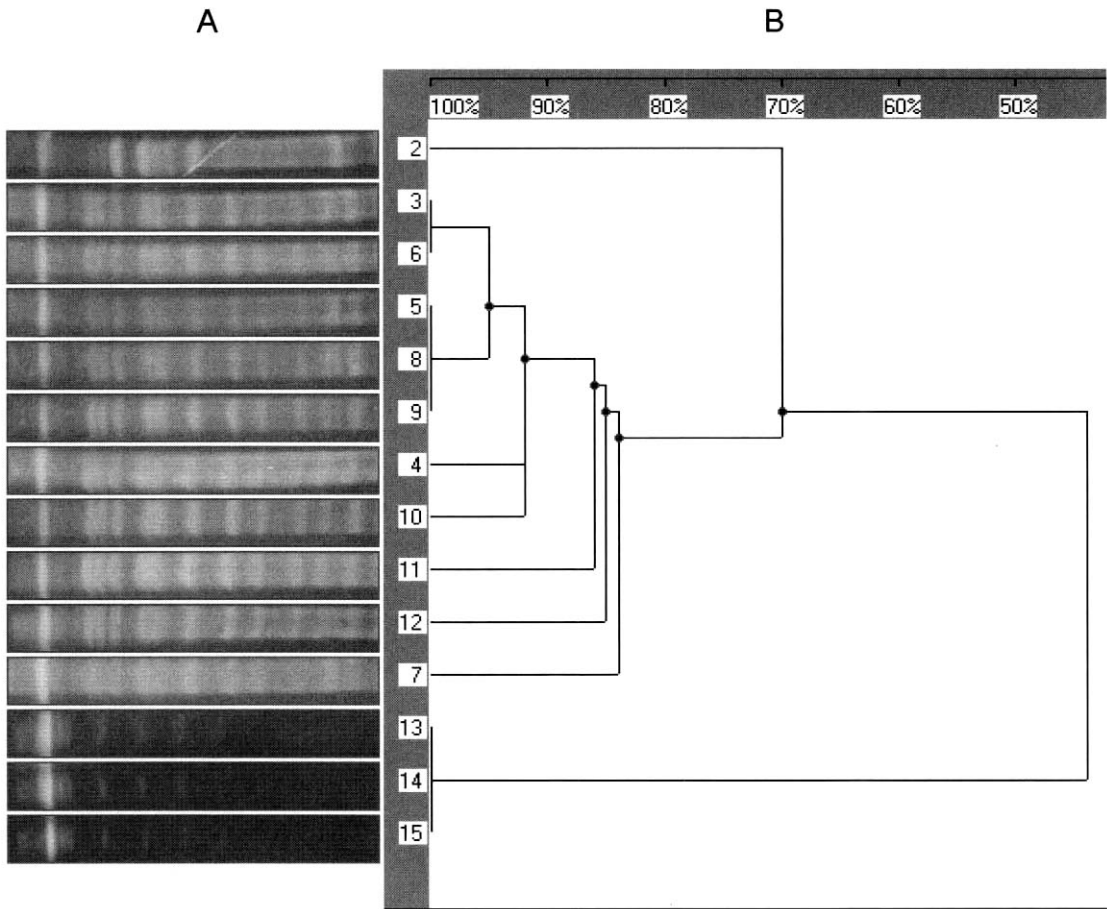


Fig. 1. (Panel A) PFGE restriction profiles of *XbaI* digested genomic DNA of *Salmonella pullorum* strains from domestic chickens and feed in Korea since 1995. Lane 2 and 12, representative *S. pullorum* strains tested in the present study; the spectrum of restriction fragments shown ranges between 700 kbp (to the left) and 10 kb (to the right) (molecular weight standard not included in this picture). **(Panel B)** Dendrogram based on the Dice coefficients (5% confidence) of pattern similarity coefficients by UPGMA method using the Bio-1D2+ software (Version 99, Vilber Lourmat, France).

되었으며, 반면에 **SXPB** 그룹에는 모두 10주 (44.0%)가 각각 포함되는 것으로 분류되었다. 특히 **SXPA pulsogroup**의 경우 사료성분에서 분리된 균주가 포함되었고, 또한 A-그룹에는 가금의 실질장기 (liver)에서 분리된 균주와 유전학적으로 100%의 상동율 성적을 보인 균주가 10주 (44.0%)나 포함되었는데, 결과적으로 이들의 오염원 또는 근원출처가 일치함을 제시하는 성적이며, 결국 동일한 clone에서 유래된 균주로 추측 가능하였다. 2개의 pulsogroup 중에서 **SXPA** 그룹에 속하는 균주들은 사료 성분유래 균주와 유전학적으로 80%의 상동율 성적을 보여 아마도 사료유래 균주에 의한 오염으로 추측 가능하였다. 반면에 두 번째 그룹 (**SXPB**)은 '95년부터 '98년

까지 분리된 균주가 포함되어 있었고, 유전학적으로 >70%의 상동율 성적으로 상호간에 관련성이 있는 것으로 분석되었지만, **SXPA** 그룹의 균주와는 유전학적으로 >60%의 관련성을 나타내어 균주 상호간에 유전자 수준에서의 관련성이 미약한 것으로 분석되었다.

마지막으로 clustering (군집형성) 분석을 통하여 균주 상호간의 유전학적인 일치율(matching) 조사 (Fig. 2)에서 사료성분에서 분리된 균주와 5%의 허용한계 범위내에서 일치율을 비교하였을 때, 사료성분 유래의 균주는 총 9개의 DNA band를 갖고 있었으며, 이 균주와 유전학적으로 가장 일치하는 균주는 모두 3균주로 확인되었는데, 사료성분유래 균주와 달리 모두 12개의 DNA band를 갖

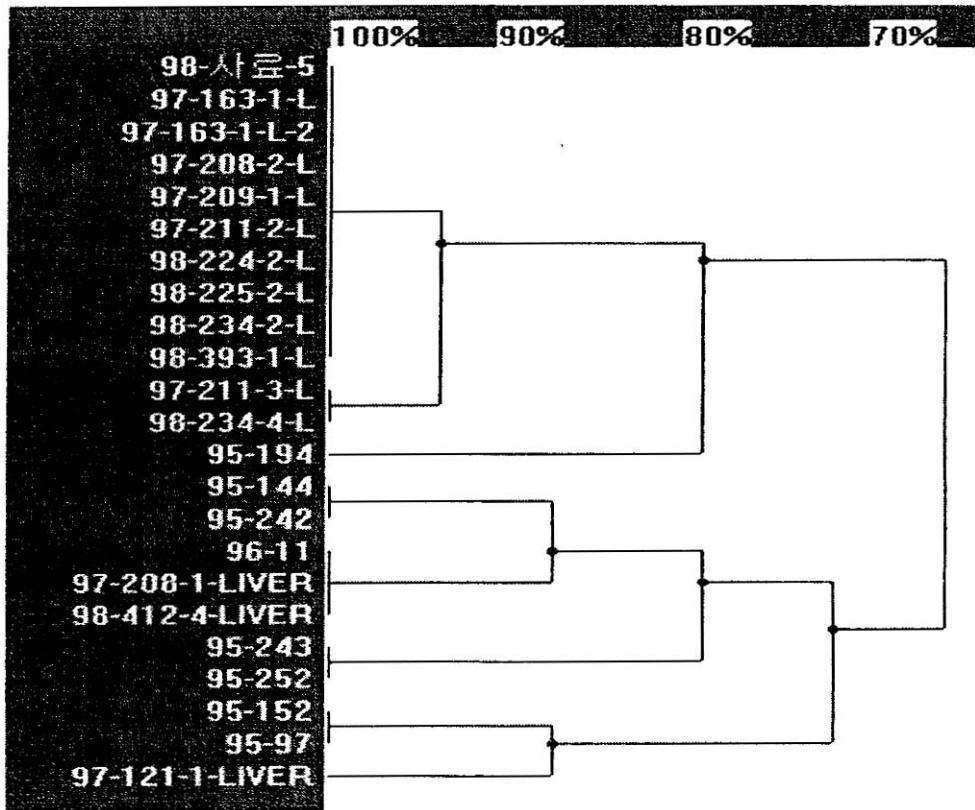


Fig. 2. Dendrogram patterns of a total of 23 *S. pullorum* strains evaluated in the present study based on the Dice coefficients (5% confidence) of pattern similarity coefficients by UPGMA method using the Bio-1D2+ software (Version 99, Vilber Lourmat, France).

고서 85%의 일치율 성적을 나타낸 균주로서 모두가 닭의 실질장기에서 분리된 SP-97-211-2-L 및 98-225-2-L과 98-234-2-L의 균주가 각각 포함되어 있었다. 그리고 총 23주의 균주들에 대해서 사료성분유래 균주와 일치율을 비교하였을 때, 30%~85%까지의 다양한 범주의 성적에서 유전학적인 일치율을 보였다 (Fig. 2).

PFGE 기법의 감별지수 분석

이 연구에서 국내 가금유래 *S. pullorum* 균주의 유전학적분석 목적으로 적용하였던 PFGE 기법이 과연 타당성 있는 바람직한 분석능력 (Discriminatory ability)을 발현하였는지를 평가하고자 DI 계산법에 따라서 통계학적이고 객관적인 수치로 분석을 하여 비교하였다. 계산공식에 필요한 변수들은 PFGE 성적 중에서 유전학적인 상동성과 일치율 조사 성적을 근거로 계산하였다. 계산결과 DI 값은 0.917로서 확인되었으며, 결국 0.917이란

DI 값이 의미하는 바는 이 연구에서 적용하였던 PFGE 기법이 *S. pullorum* 분리주 상호간의 유전학적 분석기법으로서 충분한 감별능력을 확보하고 있음을 의미하는 성적이었다.

고 찰

현재의 연구와 관련된 자료로서 국립수의과학검역원에서 1995년부터 1998년까지 병성감정으로 확인된 추백리의 검색상황을 보면 '95년도에 30건, '96년도에 16건, '97년도에 6건, 그리고 마지막으로 '98년도에 6건으로 총 58건이었다. 하지만 추백리는 야외 상황에서는 이미 1924년에 처음 국내에서 확인된 이후로 오늘에 이르기까지 지속적으로 만연되어 있는 질병이며 아직도 근절이 되지 않고 있는 질병이다. 하지만 법정전염병 (2종)이란 한계를 벗어나지 못하는 질병이므로 행정절차가 필요한 만큼 전술한 숫자는 현장의 실상을 그대로 반영

하고 있지 못한 것이 사실이며 그에 따라 신뢰도 높은 자료의 추출도 어려운 실정이다. 따라서 전술한 통계자료가 우리 나라의 추백리의 현상을 반영하고 있다고 생각하는 사람도 없을 것이다. 그러나 그나마 존재하는 자료는 전술한 통계자료이므로 인용하였고, 많은 수의 *S. pullorum*의 야외 분리주를 확보하기는 쉽지가 않은 실정이라 생각된다. 따라서 이 시험에서 '95년도부터 '98년까지 총 23주의 균주를 공시한 것은 결코 적은 숫자도 아니며 그렇다고 결코 많은 숫자도 아닌 것으로 간주되었다.

이 연구에서 사용한 CHEF 방식은 Chu 등 (1986)³에 의해서 개발된 전기영동 운영시스템으로서 균질성의 전장을 사용하여 커다란 DNA를 직선상의 DNA profile로 획득할 수 있도록 실현시킨 시스템이다. 이 시스템은 closed contour (차단된 구획)의 주위에 일정간격으로 배치시킨 많은 전극을 사용해서 균질성의 전장을 생산 해내는 원리를 적용한 방식이기 때문에 이름도 clamped homogeneous electric field electrophoresis (CHEF)로 명하였고, 최대의 장점은 많은 수의 DNA 표본을 직선상으로 해독할 수 있는 능력을 보유하였다는 점이며 현재 전세계적으로 가장 많이 활용되고 있는 분석장비로 알려져 있다³⁻⁵. 따라서 이 연구에서도 전세계적으로 가장 많이 사용되고 있는 CHEF mapper XA system (Bio-Rad, USA)을 사용하였다.

선인들의 연구에 따르면 *S. pullorum*과 *S. gallinarum*과 같이 가금이란 숙주에 대하여 고도로 적응능을 획득한 숙주특이 혈청형의 경우에는 가금 이외의 기타 동물이나 환경표본에서의 보균 및 생존능이나 또한 이들이 보균 매체로서 작용할 기회나 가능성은 매우 낮은 것으로 알려져 있다^{1,3,6}. 그러나 이 연구에서는 특이하게도 과거에 연도는 불명확하지만 시중판매중인 사료성분에서 분리된 균주 (사료유래 균주로 표기함)를 확보할 수 있었으며, 또한 이를 시험에 공시하였던 바 다행스럽게도 유전학적으로 유용한 정보를 확보할 수 있었다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 유전학적으로 '97년과 '98년도에 가금의 실질장기인 간 (liver)에서 분리된 균주들과 유전학적인 상동성에 있어서 5%의 한계범위에서 100%의 상동율 성적을 보였고, 일치율 (matching) 조사성적에서는 85%의 일치율 성적을 보여 동일한 clone에서 유래하였을 것으로 짐작케 하였다. 만일 사료유래의 *S. pullorum* 균주가 오염원으로 작용되었을 경우에는 동시다발적으로 많은 농가에 오염된 사료가 공급되고 그에 따라 동시다발적으로 많은 수의 닭과 농장에 병원체를 전파시킬 가능성을 배제할 수 없기 때문에 특히 사료성분이 오염될 경우에는 질병의 전파 및 확산을 더욱 증대시킬 수밖에 없기에, 사료성분 들에 대한 체계적인 조사연구도 *S.*

*pullorum*의 오염원의 추적조사를 위한 연구에 중요한 의미를 제공할 수 있을 것으로 사료되었다. 따라서 현재의 결과성적은 국내에서는 가금용 사료가 물론 연도와 출처는 불명하지만 유전학적인 분석성적에 근거할 경우 추백리의 주 오염원 중의 하나의 인자로 관여하였음을 짐작케 해주는 간접적인 증거가 아닌가 사료되었다. 이처럼 국내 처음으로 *S. pullorum* 균주에 대하여 PFGE 기법을 적용하여 유전자 수준에서의 분석을 시도하였던 바, 숨어 있던 유전학적인 정보를 제공해 줌으로써 추후로 근절이 어려운 다양한 세균성 질병의 분자유전학적 분석연구에 많은 도움이 될 수 있을 것으로 본다.

아울러 1995년이래 1998년까지 국내 양계장에서 유행하고 있는 *S. pullorum* 균주의 유전학적인 분석결과 사료성분유래 균주와 일치하는 균주들의 유전자 양상과 '95년부터 '98년까지 지속적으로 가금의 실질장기에서 분리되어 왔던 균주와 일치하는 유전자 양상으로 양분되었다. 따라서 이 성적이 제시하는 바는 '95년부터 '98년까지 국내 양계분야에서 발생된 추백리는 크게 2가지의 clone에서 유래된 균주에 의한 감염증이 지배적인 양상을 추측케 하는 성적으로 사료되었다. 그리고 현재의 연구 결과를 통해서 비록 *S. pullorum*이 숙주특이 혈청형이긴 하지만 가능성이 낮은 오염된 사료성분을 통해서도 질병이 전파 및 확산될 수 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 이상의 성적에 근거할 때 PFGE와 같이 효율적인 시험방법을 적용하여 야외에서 문제되고 있는 salmonellosis는 물론이며 기타의 근절이 힘든 세균성 질병에 대한 근원적인 오염원의 출처를 밝혀내기 위한 연구에도 충분히 활용될 수 있을 것으로 본다.

현재의 연구에서는 Bio-1D2+ software를 사용하였는데, Gerner-Smidt 등⁵에 따르면 Bio-Image software와 GelCompar system을 상호 비교하였던 바, GelCompar software가 다소 우수한 분석능력을 보였다고 하였다. 그러므로 PFGE의 결과성적에서와 같이 시야로 분석하기 어려울 정도로 많은 DNA band가 산출되기 때문에 전문 분석 프로그램이 필요할 수밖에 없는 실정이며, 그 결과 현재 다양한 종류의 분석프로그램이 존재하며 시판되고 있어 프로그램의 선택에도 다양한 정보의 획득이 필요한 실정이다. 따라서 전술한 성적은 연구성적의 분석에 사용한 software의 종류에 따라서도 다양한 성적이 도출될 수 있음을 제시한 것이다. 그리고 현재의 모든 프로그램들은 DNA band에 대해서 인위적인 marker의 설정과 기준 등을 설정하도록 되어 있기 때문에 연구자에 따라서도 동일한 DNA profile이지만 다양한 결과성적이 나올 수밖에 없다는 사실도 충분히 알 수 있었다. 따라서 표준 연구실이라면 최소 하나이상의 분석프로그램은

로 성적 상호간을 비교하는 과정도 꼭 필요한 것으로 본다.

PFGE를 이용한 macrorestriction 기법은 전기영동기법으로 커다란 DNA분자를 분석함에 있어서 기계적 및 물리적인 힘에 의해서 쉽게 절단되는 커다란 chromosomal DNA를 agarose gel내 (*in situ*)에 취입하여 다루는 방법들을 도입하여 전술한 단점을 보완함으로써 chromosomal DNA에 대한 접근에 있어서 새로운 혁명적인 진전을 가져오게 되었다^{3,10-12}. 비록 기존의 수평전기영동법으로도 고도의 전문가가 조심해서 취급할 경우 약 500 kb 크기까지의 DNA 분자도 용액상태로 해석은 가능하다고 하지만 일반 실험실에서는 DNA를 취급하는 과정 즉 피펫팅 과정이나 phenol 추출방식 등의 과정을 거치면서 커다란 DNA에 기계적 및 물리적 절단력 (shearing force)를 가할 수밖에 없기 때문에, 결국은 통상의 방법으로 500 kb이상의 DNA를 다루기는 불가능한 실정이다. 결국 모든 순수정제 과정동안에 기계적인 파괴작용을 최대한 막아야 하고 또한 DNA 분해효소 등에 의한 변성작용도 효과적으로 방어할 수 있어야 한다. 이를 해결하고자 선인들은 agarose gel내에 세포를 심어서 염색체 DNA 이외의 기타 성분들을 확산현상 (diffusion)을 이용하여 시간은 걸리지만 충분히 제거할 수 있었고, 그 결과 커다란 DNA 분자에는 영향을 미치지 않고서도 세포벽을 제거하고 불필요한 단백질성분과 지질성분 등을 효과적으로 제거하여 순수한 DNA만을 획득할 수 있었고, 또 *in situ* 상태에서 RCRE를 처리하여 chromosomal DNA를 부분적으로 절단도 가능하게 되었다. 이렇게 준비된 표본은 대단히 안정하여 심지어 수년간의 저장에서도 거의 변성이 없을 정도라고 알려져 있다^{3,13-15}.

한편 우리 나라에서는 “역전장전기영동장치”라는 잘못된 번역된 용어가 사용되고 있는데, 이는 바로 FIGE (Field inversion gel electrophoresis)만을 언급하는 용어일 뿐, PFGE에는 접합하지 않는 용어로서 연구자들의 혼돈을 초래하고 있다. FIGE는 PFGE와는 전혀 다른 운영방식과 개념이므로 굳이 우리말로 변환하여 사용하고자 한다면 원리원칙과 개념에 일치하도록 “다전장변동전기영동장치”로 번역함이 PFGE를 올바르게 해석한 것으로 본다.

한편 세균의 chromosomal DNA 자체는 agarose gel의 그물망 구조에 의한 저항효과 (sieving effect)를 받을 수밖에 없기 때문에, 그 크기를 감소시키기 위해서는 RCRE으로써 부분적인 소화처리가 필수적인 과정이다. 이런 이유 때문에 PFGE를 수행할 경우 우선 균종선택 후에는 선발된 균종에 적합한 RCRE를 선발하는 것이 무엇보다도 우선적이며 중요한 일이다³. Kaufmann과 Pitt¹¹

에 따르면 *Salmonella* 속균의 genomic DNA는 G+C%보다는 A+T%가 상대적으로 많기 때문에 RCRE의 선발은 A와 T의 염기서열을 주로 인식하여 염색체 DNA에 부분적인 절단을 가해줄 수 있는 G+C rich enzyme을 선발함이 바람직하다고 지적하였다. 그리고 현재까지 필자가 조사한 바 2002년도 현재까지 세계적으로 발표된 많은 문헌들 중에서 *Salmonella* 속균에 대하여 PFGE를 위한 RCRE로는 G+C rich enzyme인 *XbaI*, *SpeI* 및 *BlnI* 등이 가장 많았다^{4,7,13-18}. 또한 현재 가장 광범위하고 고도의 실용화 단계까지 성공한 미국의 경우 특히 PulseNet (National molecular subtyping network for foodborne diseases surveillance)의 표준메뉴얼에서도 *Salmonella* 속균의 분석을 위해 *XbaI*을 활용하고 있는 것으로 확인되었다⁷. 따라서 필자는 국내 관련분야의 경험이 미진한 실정인 만큼 선인들의 경험을 중시하고 지금까지 가장 많이 활용되고 있는 RCRE로 선발된 *XbaI*을 국내분리 *S. pullorum*의 chromosomal DNA를 절단하기 위한 1차적인 RCRE로서 선발하였으며 그 결과 유용한 정보를 획득할 수 있었다^{3,7}.

1984년에 Schwartz와 Cantor가 PFGE 개념을 도입한 이후로 급속히 확산 및 발전되기 시작한 PFGE 기법은 1996년에 미국에서는 인수공통질병 중에서 그 발생빈도나 피해측면에서 가장 문제가 되고 있는 salmonellosis에 대한 효율적인 접근을 위해서 CDC (질병예방 및 통제관리 센터)와 USDA 그리고 각주의 공중보건실험실이 공동으로 국가통합 조사시스템을 결성하고 총 6개의 세부조직을 두었다. 그 중의 하나로 FoodNet (Foodborne diseases active surveillance network) 이란 조사체계를 결성하였고, 이들 연구기관들은 공동체로서 획득한 정보와 균주 등을 서로 공유하면서 국가전체에서 발생하는 인수공통전염병의 발생에 효과적으로 대응하여 질병발생 예방과 발생된 질병의 원인추적 등을 위한 정보를 획득하고 있다. 대표적인 예로서 1996년에 발생한 *E. coli* O157:H7 사건에 대한 병원체의 출처에 대한 추적연구를 위해서 PFGE 기법을 도입하여 매개체인 햄버거를 찾아냈고 이어서 균주의 오염원이 소 (cattle)라는 사실도 밝혀냄으로써 PFGE 기법의 효능을 입증하게 되었다. 따라서 미국에서는 FoodNet 조직내에 인수공통세균 7종과 기생충 2종을 포함한 총 9종의 인수공통 병원체에 대해서 PFGE를 실시하고, 개별 연구소에서 획득한 유전정보를 CDC의 중앙통제센터의 주컴퓨터에 지속적으로 저장해 왔으며, 특정 병원균에 의한 질병이 발생될 경우 벽지의 지방연구소에서도 PFGE만을 수행한 후 정보통신망을 통하여 CDC의 주컴퓨터에 저장된 정보와 비교 분석을 통하여 문제의 병원체의 출처를 신속히 추적 및

확인하여 주요염원을 제거하여 동일한 질병을 사전에 예방할 수 있는 질병통제 체계를 구축하였는데 그것이 바로 PulseNet이다.^{10,11-18}

현재 우리 나라에서 PFGE 기법의 경우 산발적으로 개별 실험실내에서 나름대로 외국 저널에 근거하여 서로 다른 방법에 근거한 실험성적들이 다양하게 산출 및 발표되고 있는 실정이다. 이러한 이유 때문에 이 연구에서는 비록 기본방법은 CDC의 방법을 따랐지만 나름대로의 설정방법에 변용이 가해질 수밖에 없는 실정이므로, 국내분리 *S. pullorum* 균주에 대한 PFGE 기법의 신뢰도에 대한 의문이 충분히 제기될 수 있었다. 따라서 이 연구에서는 전문적인 의문점을 해결하고자 시험성적을 토대로 PFGE 기법의 감별능력을 Simpsons' index 기법을 도입하여 통계학적인 객관적인 수치로 분석하였다. 그 결과 0.917의 신뢰성 높은 DI 값을 얻을 수 있었다. 따라서 저자 등이 조건을 확립한 PFGE 기법은 *S. pullorum* 균주의 유전자 분석에 있어서 유용한 분석기법으로 입증되었다.

끝으로 미국의 PulseNet과 같이 우리 나라에서도 시급히 인의분야와 수의분야가 통합되는 국가통합 연구조직 체계의 확립이 우선적으로 필요하며, 인수공통 병원체에 대해서 우선적으로 접근을 시도하고, 추가로 국가적으로 문제로 대두되고 있는 다제내성 세균까지 확대해 나가야 할 필요가 있다. 또한 일선 시, 군에 있는 실험실도 통합조직 체계의 구축에 포함시켜 정보를 공유하여 지방에서도 신속히 발생질병에 대응할 수 있는 조직체계를 구성해야 할 필요가 있다고 본다.

참고문헌

- Katscher F. *Salmonella* or *Smithella*?, Nature, 388:320, 1997
- 김동성, 문재봉, 이남신, 등. 가축방역사, 제1편, 서울인쇄주식회사, 서울:100-197, 1966.
- Birren B and Lai E. Pulsed field gel electrophoresis, A practical guide. Academic Press, USA, 1993.
- Garaizar J, Lopez-Molina N, Laconcha I, et al. Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Appl and Environ Microbiol*, 66(12):5273-5281, 2000.
- Gener-Smidt P, Graves LM, Hunter S, et al. Computerized analysis of restriction fragment length polymorphism patterns: Comparative evaluation of two commercial software packages. *J Clin Microbiol*, 36(50):1318-1323, 1998.
- Hanninen ML, Perko-Makela P, Pitkala A, et al. A three-year study of *Campylobacter jejuni* genotypes in Humans with Domestically acquired infectious and in Chicken samples from the Helsinki Area. *J Clin Microbiol*, 38(50):1998-2000, 2000.
- Hudson CR, Quist C, Lee MD, et al. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in southeastern United States. *J Clin Microbiol*, 38(5):1860-1865, 2000.
- 우용구, 김봉환. 우리 나라의 닭에서 분리한 *Salmonella pullorum*과 *Salmonella gallinarum*의 항원형, *Kor J Vet Res*, 38(4):777-783, 1998.
- 우용구, 김홍집. 신경증상을 발현한 닭에서 분리한 *Salmonella enterica* bioserovar Pullorum의 분자유전학적 특성, *Kor J Vet Publ Hlth*, 25(3):165-178, 2001.
- Hunter PR and Gaston M. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol*, 26(11): 2465- 2466, 1988.
- Kaufmann ME and Pitt TL. Pulsed field gel electrophoresis of bacterial DNA. *Methods in practical laboratory bacteriology*. CRC press, USA:83-92, 1994.
- Kariuki S, Gilks C, Revathi G, et al. Genotypic analysis of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi, Kenya. *Emerging Infectious Diseases*, 6(6):649-651, 2000.
- Liebana EL, Gurs D, Garcia-Migura L, et al. Molecular typing of *Salmonella serotypes* prevalent in animals in England: Assessment of Methodology. *J Clin Microbiol*, 39(10):3609-3616, 2001.
- Montesinos I, Salido E, Delgado T, et al. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol*, 40(6):2119-2125, 2002.
- Nauerby B, Pedersen K, Dietz HH, et al. Comparison of Danish Isolates of *Salmonella enterica* serovar *enteritidis* PT9a and PT11 from Hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) and Humans by plasmid profiling and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 38(10):3631-3635, 2000.
- Ridley AM, Threlfall EJ and Rowe B. Genotypic

- characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 36(8):2314-2321, 1998.
17. Tamada Y, Nakaoka Y, Nishimori K, et al. Molecular typing and epidemiological study of *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* isolates from cattle by fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 39(3):1057-1066, 2001.
18. Thong KL, Goh YL, Radu S, et al. Genetic diversity of clinical and environmental strains of *Salmonella enterica* serotype *weltevreden* isolated in Malaysia. *J Clin Microbiol*, 40(7):2498-2503, 2002.