

## 축산물유래 *Listeria monocytogenes*의 RAPD typing

이철현<sup>1</sup> · 손원근<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>국립수의과학검역원

<sup>2</sup>제주대학교 수의과대학 및 수의과학연구소

(게재승인: 2009년 11월 25일)

## Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolates from animal products

Chul-hyun Lee<sup>1</sup>, Won-geun Son<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-757, Korea,

<sup>2</sup>College of Veterinary Medicine and Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

(Accepted: November 25, 2009)

**Abstract :** This study investigated the epidemiology of *Listeria (L.) monocytogenes*, a food-borne pathogen. The epidemiology of food-borne pathogens is of great importance for clarifying bacterial origin and preventing bacterial contamination and infection. This work examined 68 *L. monocytogenes* strains, including 11 reference strains and 57 isolates from imported US beef, domestic meats (beef, pork, chicken meat), raw milk, and milk plants. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) techniques were optimized to develop a standard molecular epidemiological analysis of *L. monocytogenes*. There was great genetic variability among the isolates, which produced 24 and 34 RAPD patterns with primer HLWL85 and HLWL74, respectively. The discriminatory power of the RAPD methods with HLWL85 and HLWL74 primer were very high (DI = 0.957; S ≥ 80%, S ≥ 95%). Some RAPD types were specific to origin. A few RAPD types were specific for *L. monocytogenes* strains belonging to a particular serotype. Using the HLWL85 primer, the strains isolated from milk plants could be distinguished from the other strains. And using the HLWL74 primer, the strains isolated from imported beef (US) could be distinguished completely from the other strains.

**Key words :** *Listeria monocytogenes*, molecular epidemiology, RAPD typing

### 서 론

*Listeria(L.) monocytogenes*는 1980년대 중반부터 북미 지역과 유럽에서 대규모의 리스테리아 감염증이 연이어 발생함에 따라 국제사회의 관심이 집중되었고 [10], 모두 식품을 매개로한 식중독발생 사례로 밝혀짐으로써 신종의 식중독세균으로 등장하게 되었다 [5]. 식품의 소비양상이 패스트푸드, 단체급식 등으로 매우 다양해지고 우유 및 육류가공품의 대량생산과 더불어 냉장기술의 발달로 식품을 장기간 보관하거나 장거리수송이 가

능해짐에 따라 질병발생도 과거와는 다른 양상으로 발생할 가능성이 매우 높아져 왔다. 따라서 리스테리아감염증의 주요 원인 식품으로 알려져 있는 각종 동물성식품과 환경재료로부터 원인균을 분리하고 그 역학적 특성을 면밀히 분석하여 식중독발생에 대한 대책을 강구하는 것이 식품위생분야에서는 매우 중요한 과제이다.

식중독발생에 대한 역학적 조사는 환자와 식품에서 분리된 균주의 형별을 조사하여 환자와 식품의 관련성을 분석하는 분석역학을 통하여 이루어지고 있다 [5]. *L. monocytogenes*에 대한 역학적 연구에 있어 일반적으로

\*Corresponding author: Won-geun Son  
College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea  
[Tel: +82-64-754-3373, Fax: +82-64-756-3354, E-mail: wonson@jeju.ac.kr]

혈청형 분석 [23]이 표준 형별법으로 널리 이용되고 있고 phage 형별법도 제한적으로 이용되고 있다 [3]. 그러나 이들 결과는 질병발생에 대한 기초 자료로 유용하게 활용할 뿐이며 변별력이 낮아서 원인체와 질병발생의 개연성을 밝히는 데는 부족한 점이 많다 [6, 13, 28]. 1990년 이후 분자생물학적 기술에 기초한 리스테리아의 형별법 중 random amplification polymorphic DNA (RAPD) 기법은 새로운 분석기법으로서 널리 활용될 수 있는 가능성이 매우 높은 것으로 인정받고 있다 [6]. 이 기법은 다른 유전자분석 기법에 비하여 많은 장점이 있는데 우선 PCR을 기반으로 하므로 고가의 특수 장비가 불필요하며, 고도로 훈련된 기술이 없이도 조작이 가능하고 비교적 쉽고 신속하게 분석하며 [6], 비용이 적게 들 뿐만 아니라 [14] 변별력이 우수하다는 것이다 [4]. 이와 함께 pulsed field gel electrophoresis 역시 molecular typing에서 'gold-standard'라 불릴 만큼 우수한 변별력을 가진 기법으로 알려져 있지만, 분석 장비가 너무 고가이고 완전한 세팅이 어려울 뿐만 아니라 많은 시간과 비용이 들고 실험자의 기술적인 편차에 따라 결과의 차이가 커서 오히려 RAPD가 활용도면에서 전도가 더 밝은 것으로 보고하고 있다 [6, 15, 22]. 현재 외국에서는 RAPD 기법 개선을 위한 다각적인 연구가 수행되어 상당한 성과를 얻고 있으며 [17], 이를 이용하여 축산식품은 물론, 전 식품을 연구대상으로 확대하고 있는 추세이다 [2]. 국내에서는 RAPD typing 기법을 이용한 *L. monocytogenes*

에 대한 기초적인 연구가 일부 수행되고 있지만, 다양한 축산물에서 유래한 균에 대한 기초 자료의 확보나 기법의 표준화를 위한 연구는 거의 찾아볼 수 없다. 더구나 각종 축산물이 여러 나라에서 대량으로 수입되어 국내 시장을 잠식하고 있는 현실을 감안할 때 국내 분리균주와 수입축산물에서 유래한 균주의 분자 역학적 특성을 파악하는 것은 리스테리아증의 집단 발생을 방지하는 차원에서 매우 중요한 일일 것이다.

이 연구에서는 미국산 수입쇠고기, 국내산 쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 원유 및 유가공장에서 분리한 *L. monocytogenes*에 대한 분자 역학적 특성을 검토할 목적으로 HLWL85와 HLWL74 primer를 이용하여 RAPD기법을 표준화하고 분리균주의 유래 및 serotype에 따른 분자수준의 특성을 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

*L. monocytogenes*는 축산물 및 작업장에서 분리한 57 균주(수입 쇠고기유래 13균주, 국내산 쇠고기 9균주, 돼지고기 8균주, 닭고기 10균주, 원유 7균주 및 유가공장 10균주)와 *L. monocytogenes* Scott A 균주를 포함한 표준균주 11균주(Health and Welfare Canada에서 분양)로서 총 68균주를 사용하였다(Table 1). 모든 균주는 Tryptic soy broth(Difco Lab, USA)에 접종하여 37°C에서 24시

**Table 1.** *Listeria (L.)* strains used in study

No.	Serial	Species	Reference/Isolates	Serotype	Source	Origin
1		<i>L. monocytogenes</i>	Scott A	4b	human	Canada
2		<i>L. monocytogenes</i>	#410	1/2a	NK	Canada
3		<i>L. monocytogenes</i>	#503	1/2b	NK	Canada
4		<i>L. monocytogenes</i>	#12	1/2c	NK	Canada
5		<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19113	3a	human	Denmark
6		<i>L. monocytogenes</i>		3b	NK	USA
7		<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19117	4d	sheep	USA
8		<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19118	4e	chicken	England
9		<i>L. monocytogenes</i>	EGD	1/2a	patient	Canada
10		<i>L. monocytogenes</i>	BDF 415	3c	patient	Canada
11		<i>L. monocytogenes</i>	R		NK	Canada
20-28		<i>L. monocytogenes</i>	isolates*	1/2a, 4b	beef	Korea 1997
29-36		<i>L. monocytogenes</i>	isolates*	1/2a, 3b, 4b	pork	Korea 1997
37-46		<i>L. monocytogenes</i>	isolates*	1/2b, 3b, 4b, 1/2c	chicken	Korea 1997
47-53		<i>L. monocytogenes</i>	isolates*	1/2b, 4b	raw milk	Korea 2001
54-63		<i>L. monocytogenes</i>	isolates*	4c, 1/2b, 1/2c	milk plant	Korea 2001
64-76		<i>L. monocytogenes</i>	isolates*	4b, 3b, 1/2b	imported beef	Korea 1997-2000

NK, not known; \*Each strain # of *L. monocytogenes* isolates was described at Figs. 2 and 4.

간 배양하고, 30%의 glycerol을 혼합하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하면서 시험에 사용할 때는 Tryptic soy agar(Difco, USA)에 3회 계대배양하고 다시 5% 면양 혈액이 첨가된 sheep blood agar 평판에 희석 접종하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양하여 사용하였다.

### Serotyping

공시한 *L. monocytogenes*의 serotype 분류는 Denka Seiken(Japan)에서 제조된 *Listeria* O antisera(I/II, I, IV, V/VI, VI, VII, VIII, IX)와 *Listeria* H antisera(A, AB, C, D)를 사용하여 Seeliger와 Hohne [23]의 방법에 따라 평판 및 시험관내 응집반응을 실시하였다.

### DNA 추출

세균의 염색체 DNA의 추출은 QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen GmbH, Germany)를 사용하였으며, 최종 DNA 용출액의 DNA 농도는 spectrophotometer(ND-1000; Nanodrop Technologies, USA)로 측정하였다.

### Primers

RAPD fingerprinting 분석에 사용된 primer와 염기서열은 Table 2와 같으며, 바이오니아(Bioneer, Korea)에서 합성하여 사용하였다.

### RAPD-PCR

효율적인 RAPD 분석을 위하여 HLWL85와 HLWL74 primer를 이용한 2종의 RAPD fingerprinting 기법을 동일한 조건으로 설정하였다. 먼저 PCR mixture는 국내외 전문회사 제품들을 구입, 각각의 primer들에 대한 예비 시험을 통하여 polymorphic DNA 밴드의 다양성, 재현성 등으로 RAPD typing에 가장 적합한 것으로 인정된 Multiplex PCR kit(Qiagen, Germany)를 선정하여 사용하였다. 총량 25  $\mu\text{L}$ 를 기준으로 각각의 PCR tube에 20 pM primer 2  $\mu\text{L}$ 와 Template DNA 2  $\mu\text{L}$ (15 ng/  $\mu\text{L}$ )를 넣어 Thermocycler(GeneAmp PCR system 9700; ABS, USA)에서 DNA를 증폭시켰다.

PCR 프로그램은 Vogel 등 [25]의 방법을 참고하여 먼저 HotStarTaq DNA polymerase의 활성화를 위한 전단계로서  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 가열한 후,  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 1분간 denaturation,  $35^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 annealing 그리고  $72^{\circ}\text{C}$ 에서

1분간 extension으로 총 45 cycle로 반복하고 마지막으로  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 extension을 실시하여  $4^{\circ}\text{C}$ 에 보존하였다.

### 전기영동 및 image capture

PCR 증폭이 끝난 후 전기영동장치(sub cell GT; Bio-Rad Lab, USA)에 이온성분이 제거된 증류수로 희석한  $\times 1$  Tris-acetate-EDTA electrophoresis buffer( $\times 50$  DNA Typing grade; Gibco, USA)를 준비하고 2% agarose gel(type I) 각 well 당 PCR products를 20  $\mu\text{L}$ 씩 loading 하고 gel의 좌우 측면 well에는 DNA 사이즈 마커(1 kb plus ladder; Invitrogen, USA)를 loading하여 90 V(3 V/cm)에서 2~3시간 전기영동하였다. 전기영동한 gel을 1.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ (DW)의 EtBr 용액에 담아 20분간 염색한 다음 증류수로 30분간 탈색하였다. 다음 gel image 장비(Gel Doc 2000 system; Bio-Rad Lab, USA)를 사용하여 image를 capture한 후 TIF 파일 포맷으로 저장하여 image 분석에 사용하였다.

### Dendrogram 작성 및 genetic code 부여

저장된 파일을 전문 DNA fingerprinting software인 GelCompar II(version 3.0; Applied Maths, Belgium)를 사용하여 기본적으로 convert된 이미지를 만들고 densitometric curve filter는 median filter로 설정한 다음 linear tone curve로 background를 제거한 후 standard DNA marker 등록과 DNA band normalization 등의 image 처리 과정을 거쳤다. 각 균주의 polymorphic DNA profile은 band-matching Dice coefficient로 유전학적 similarity를 산출하였다. 그리고 unweighted pair group method using arithmetic averages algorithm에 따라 rooted 방식의 dendrogram을 작성하였다.

Dendrogram에 나열된 모든 균주에는 본 연구에서 고안된 4단계의 genetic code를 부여하였다. 첫째단계는 아라비아 숫자를, 둘째단계는 알파벳 대문자, 셋째단계는 알파벳 소문자, 그리고 넷째단계는 다시 아라비아 숫자로 표시하였다. 이들 4단계는 각각 70, 80, 90, 95%의 similarity를 기준으로 하였을 때 해당하는 DNA type을 나타낸다. 그러나 각 단계에서 어떤 DNA type에 속하는 균주가 하나 이외에 relative genetic similarity(%)가 높은 쪽으로 더 이상 존재하지 않는다면 이하의 단계는 아라비아 숫자 '0'으로 표시하였다.

**Table 2.** Primers used for random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting in *Listeria* isolates

Primer	Sequence (5'-3')	Reference
HLWL85	ACAACCTGCTC (10 mer)	[26]
HLWL74	ACGTATCTGC (10 mer)	[18]

### DNA fingerprint 분석

DNA fingerprint에 의한 균주의 grouping은 relative genetic similarity(%)를 기준으로 실시하였다. 즉 dendrogram 상에 수직선을 긋고 수직선과 수평선이 만나는 모든 점을 하나의 RAPD type으로 인정하였다. RAPD type 검

출의 기준은 relative genetic similarity(%)가 각각 70, 80, 90 및 95% 중에서 변별지수(Discriminatory index, DI) 값이 0.95 이상이면서 그에 가장 가까운 것으로 하였다.

**변별지수의 산출**

2종의 RAPD 분석기법의 변별력을 수치화하기 위하여 Hunter와 Gaston [11]의 방법에 따라 다음 공식으로 DI를 산출하였다.

$$D.I. = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1)$$

N은 시험에 사용된 전체 균주의 수이고 S는 DNA type의 수이며 n<sub>j</sub>는 각 type에 속하는 균주수를 의미한다.

**결 과**

**변별지수**

변별지수(DI)는 Table 3과 같이 HLWL85가 HLWL74에 비하여 높게 나타났다. Similarity(S)와 DI 값의 상관관계는 S = 95%에서의 HLWL74와 HLWL85의 DI 값은 각각 0.957과 0.988이었고, S = 70%에서는 각각 0.739와 0.878로 similarity가 높을수록 DI 값도 높아졌으며, 두 방법간에 DI 값의 편차는 similarity가 낮을수록 커졌다.

**Table 3.** Comparison of discriminative ability among HLWL85 and HLWL74 primer used to RAPD typing of *L. monocytogenes*

Methods	% of relative genetic similarity			
	70	80	90	95
HLWL85	0.878*	<u>0.957</u>	0.980	0.988
HLWL74	0.739	0.837	0.934	<u>0.957</u>

\*Discriminatory index, DI.

**Table 4.** Distribution of RAPD types determined with HLWL85 primer in *L. monocytogenes* isolates from different sources

Origin	No. of isolates with following RAPD types														No. of other single types		
	2A	3A	3B	3C	4A	4B	5A	6A	8A	8B	8C	8D	9A	9B		11A	14A
Beef; USA(n = 13)	1				1						6			1	3		1
Beef(n = 9)					1	5	1		1							1	0
Pork(n = 8)								1	3			3					1
Chicken(n = 10)							1	2	1	1							4
Raw milk(n = 7)							1	1						2			3
Milk plant(n = 10)	1			2									5				2
Ref. strains(n = 11)		2	2		1	1				4						1	0
Total(n = 68)	2	2	2	2	3	6	3	4	5	5	6	3	5	3	5	4	8

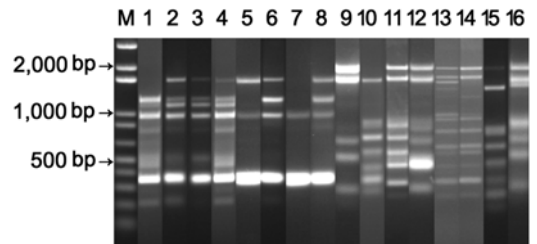
Similarity: 80%, DI = 0.957.

**DNA fingerprinting에 의한 RAPD typing**

RAPD typing은 Table 3의 결과에 따라 DI 값이 0.95 정도를 기준으로 하여 HLWL85는 similarity 80%, HLWL74는 95% 이상에서 형성된 cluster와 cluster에 속하지 않는 단독균주만을 DNA type으로 인정하였다. 단 DNA type의 유래별 특성을 파악하기 위하여 하나의 RAPD type에 2개 균주 이상이 나타난 경우에만 Figs. 1과 3 그리고 Tables 4와 5에서 분석하였다.

**HLWL85 primer에 의한 RAPD type**

축산물 유래 *L. monocytogenes* 분리주 57균주와 reference 균주 11주를 HLWL85 primer로 RAPD band pattern을 조사한 결과 모두 24개의 RAPD type이었다 (Fig. 2, Table 4). Polymorphic DNA fragment는 200~2,000 bp 사이에서 형성되었고 그 수는 2~12개로 다양하게 나



**Fig. 1.** Representative random amplified polymorphic DNA (RAPD) patterns obtained from *Listeria (L.) monocytogenes* isolates with HLWL85 primer. Lanes: M, molecular size marker (1 kb plus ladder); 1, *L. monocytogenes* #45 (type 2A); 2, *L. monocytogenes* EGD (type 3A); 3, *L. monocytogenes* #12 (type 3B); 4, *L. monocytogenes* #MP0106 (type 3C); 5, *L. monocytogenes* #B1 (type 4A); 6, *L. monocytogenes* #B32 (type 4B); 7, *L. monocytogenes* #C44 (type 5A); 8, *L. monocytogenes* #P5 (type 6A); 9, 8A, 8B, 8C, 8D, 9A, 9B, 11A, 14A. similarity; S ≤ 80%.

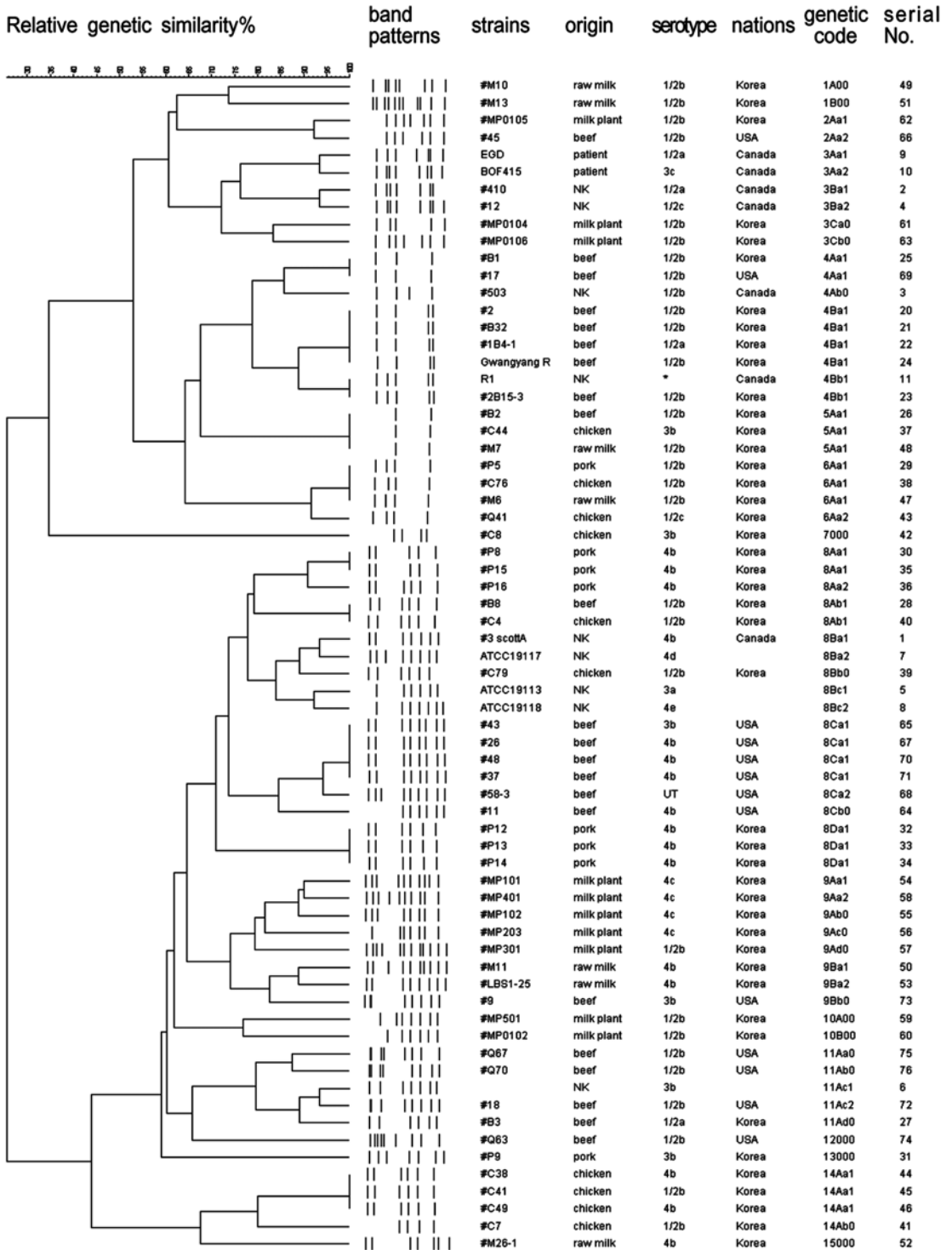


Fig. 2. Dendrogram for 68 *L. monocytogenes* isolates analyzed by RAPD with HLWL85 primer. The dendrogram was constructed with GelCompar II (Applied Maths) software by using the Dice correlation and cluster analysis by the unweighted pair group method using arithmetic averages (UPGMA). Percentages of similarity are shown above the dendrogram. 1-11, reference strains.

**Table 5.** Distribution of RAPD types determined with HLWL74 primer in *L. monocytogenes* isolates from different sources

Origin	No. of isolates with following RAPD types										No. of other single types	
	1Ba1	2Aa1	4Aa1	5Aa1	5Aa2	5Ac1	5Ad1	5Ba1	6Aa1	8Aa1		9Aa1
Beef; USA (n = 13)						5				3		5
Beef (n = 9)		1			1				2		2	3
Pork (n = 8)			2	1			3					2
Chicken (n = 10)				1				2			2	5
Raw milk (n = 7)	3			1			1					2
Milk plant (n = 10)				2	4						2	2
Ref. strains (n = 11)		1		1	2						3	4
Total (n = 68)	3	2	2	6	7	5	4	2	2	3	9	23

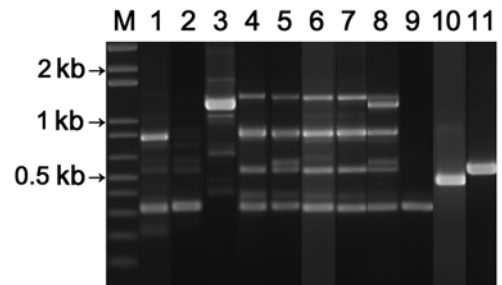
Similarity: 95%, DI = 0.957.

타났다(Fig. 1). 두 균주 이상이 cluster를 형성한 16개 RAPD type 중 7개가 각각의 유래별 특성을 가진 특이적인 type이었다. 미국산 수입쇠고기 유래의 13균주는 6개의 DNA type을 보유하였고, 이들 중 수입쇠고기 유래 균주만이 가지고 있는 특이적인 RAPD type은 8C type(n = 6)이었다(Table 4). 국내산 쇠고기 유래 9균주에서는 총 5개의 RAPD type이 있었고 4B type이 56% (5/9균주) 이었다. 돼지고기 유래 8균주는 4개의 DNA type이 있었으며, 8D type을 보인 3균주(38%)가 다른 축종 유래 균주와 구별되는 특이적인 type 이었다. 닭고기 유래균은 6개의 RAPD type을 가졌고, 이 중 14A type(n = 4)이 특이적이었다(Fig. 2). 원유 유래 7균주에서 6개의 RAPD type이 관찰되었으나 원유 유래 균주만의 특이적인 cluster는 없었다. 그러나 similarity 74% 수준에서는 특이적인 cluster(1A00~1B00)를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 유가공장 유래균은 10균주에서는 4개의 RAPD type이 나타났으나 3균주가 각각 다른 3개의 RAPD type을 나타내었고 3C와 9A type은 유가공장 유래균주 특유의 type(70%)이었다. Reference 균주는 11균주에서 6개의 RAPD type이 분리되었고 이 중 3A와 3B type이 각각 2균주 씩 관찰되어 국내 분리주와 구분되는 type이었다.

Fig. 2에서 두개의 1차 level cluster 중 위쪽의 첫번째 cluster(genetic code 1A00~7000)에는 혈청형 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3b 및 3c의 균주만이 포함되었고 4b 등 혈청형 4에 속하는 균주는 아래쪽 cluster(genetic code 8Aa1~15000)에만 존재함이 관찰되었다. RAPD type은 2A, 3C, 4A 및 4B는 혈청형 1/2b 균주에서만 나타났고, 8D type은 혈청형 4b 균주에서만 나타났다.

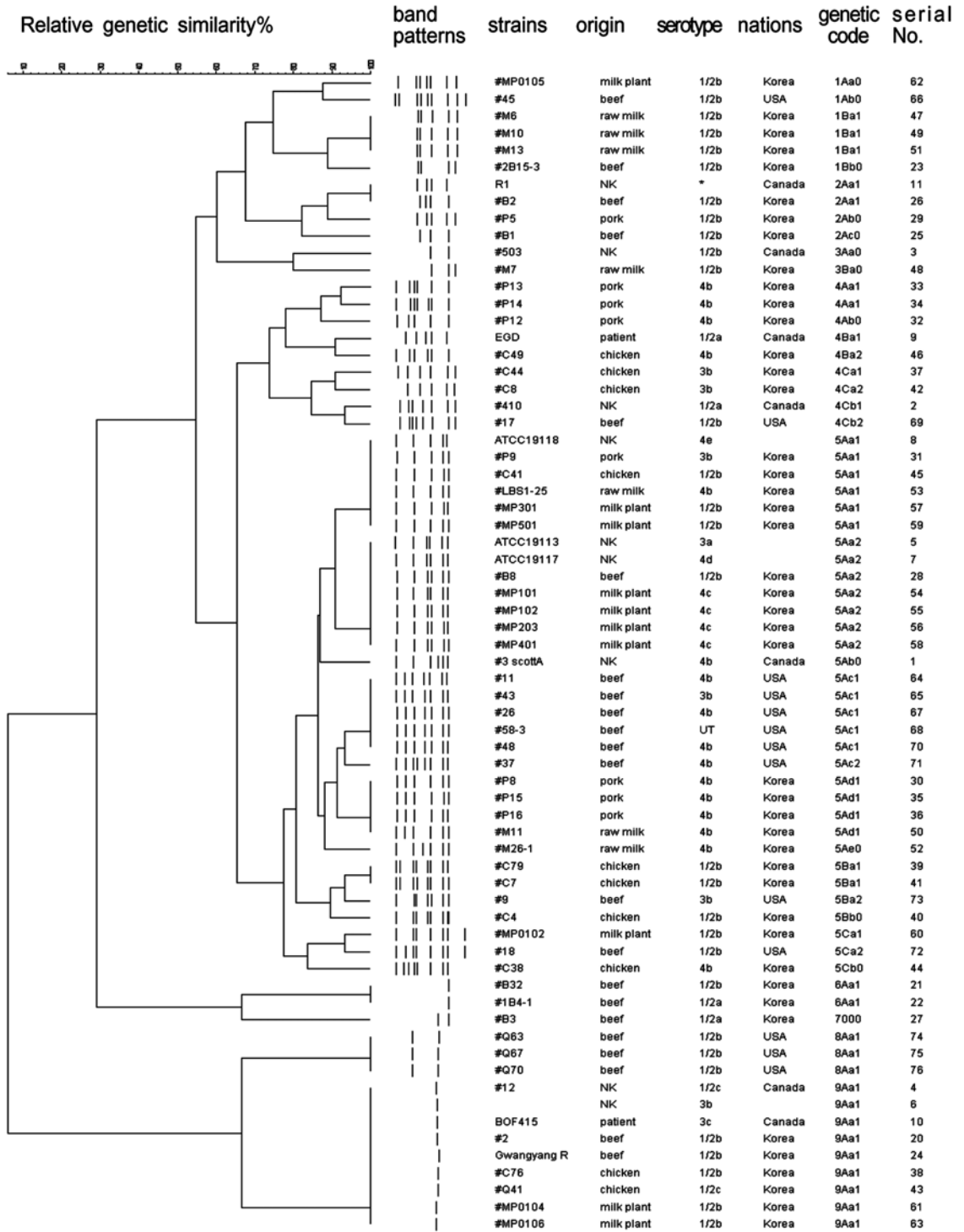
#### HLWL74 primer에 의한 RAPD type

HLWL74 primer로 공시된 *L. monocytogenes* 68균주의 RAPD type을 조사한 결과 모두 34개의 RAPD type이었



**Fig. 3.** Representative RAPD patterns obtained from *L. monocytogenes* isolates with HLWL74 primer. Lanes 1-11, types, 1Ba1, 2Aa1, 4Aa1, 5Aa1, 5Aa2, 5Ac1, 5Ad1, 5Ba1, 6Aa1, 8Aa1, Aa1. similarity; S  $\geq$  95%.

으며, 두 균주 이상이 cluster를 이룬 것은 11개 type이었고 나머지 23개는 각각 하나의 type만을 나타내었다(Fig. 4, Table 5). Polymorphic DNA fragment는 200~2,000 bp사이에서 형성되었고 그 수는 1~9개였다(Fig. 3). Table 5에서는 균주의 유래에 관계없이 2균주 이상이 동일한 type을 나타내는 것들을 비교하였다. 미국산 쇠고기 유래 13균주는 7개의 RAPD type을 나타내었으나 5균주는 각각 다른 5개의 type을 보였고, 5Ac1 type에 5균주, 8Aa1 type에 3균주가 각각 포함되어 유전학적으로 100% 일치하였으며 이 2 type은 미국산 쇠고기 유래균에서만 관찰되었다. 국내산 쇠고기 유래 9균주는 7개의 RAPD type을 나타내었으나, 3균주는 각각다른 3개의 type을 보였고, cluster에 포함된 4개의 type 중 6Aa1 type에 해당하는 2균주는 다른 축산물 유래균주에서는 관찰되지 않았다. 돼지고기 유래균주는 5종의 RAPD type을 나타내었으며 그중 2균주는 각각 다른 2개의 RAPD type을 보였고, cluster에 포함된 3개의 type 중에서 4Aa1 type에 해당하는 2균주가 특이적 type이었다. 닭고기 유래의 균주는 8개의 type을 나타내었으나, 5균주가 각각 다른



**Fig. 4.** Dendrogram for 68 *L. monocytogenes* isolates analyzed by RAPD with HLWL74 primer. The dendrogram was constructed with GelCompar II (Applied Maths) software by using the Dice correlation and cluster analysis by the UPGMA. Percentages of similarity are shown above the dendrogram.

RAPD type을 나타내었고 나머지 5균주는 3종의 cluster에 포함되었으며, 5Ba1에 해당하는 2균주가 특이적이었다. 원유 유래 7균주에서 5종의 RAPD type이 나타났으며 1Ba1 type을 보인 3균주가 특이적이었다. 유가공장 유래 균주는 5개의 RAPD type이 나타났고 5Aa2 type이 4균주로서 가장 많았으나 특이적인 type은 없었다. 그리고 reference 균주는 11균주가 8개의 RAPD type으로 분류되었다(Table 5). Fig. 4의 dendrogram으로부터  $S \geq 60\%$  수준에서 일차로 4개의 큰 cluster를 나누어 보았을 때, 첫 번째 cluster(genetic code 1Aa0~3Ba0)는 serotype 1/2b 균주로만 형성된 특이적인 cluster이었다. 그리고 4b, 4c 등 혈청형 4에 속하는 균주들은 두 번째 cluster(genetic code 4Aa1~5Cb0)에만 분포하였다. 세 번째 cluster는 1/2b 1균주와 1/2a 2균주가 모인 작은 cluster였고, 네 번째 cluster(genetic code 8Aa1~9Aa1)에는 1/2b, 1/2c, 3b, 3c의 serotype 균주만이 포함되었으며 이들의 유전학적 상동성은 최소 70%에서 100%이었다. 그리고 serotype 1/2b에 특이적인 RAPD type들은 1Ba1이었고, 1/2c에 특이적인 type은 9Aa1이었으며, 4b에 특이적인 것은 4Aa1과 5Ad1 type이었다.

## 고 찰

*L. monocytogenes*에 대한 분자역학연구에서 가장 유망한 기술의 하나는 PCR을 기반으로 한 RAPD fingerprinting 또는 arbitrary primed PCR이다 [22, 25]. 그러나 RAPD는 PCR을 기반으로 하는 까닭에 비특이적인 밴드형성과 재현성의 문제 [27] 그리고 결과에 있어서 실험실간의 편차가 너무 큰 점 [20, 21, 27]은 해결해야 할 과제로 남아 있다.

본 연구에서는 Hunter와 Gaston [11]의 방법에 따라 각 분석기법의 DI 값을 산출하였다. DI 값은 세균의 typing 방법에 대한 변별력을 수치화한 것으로 대부분의 연구자들은 객관적인 성적표로서 DI 값을 산출하여 보고하고 있으나 DI 값의 parameter 중에서 'type의 수'는 연구자에 따라 다르게 판단할 수 있는 부분이 있기 때문에 주의가 요한다 [27]. 본 연구에 사용된 RAPD primer의 알려진 PCR 조건은 연구자에 따라 다소 달랐지만 [2, 8, 26], Vogel 등 [25]이 primer별로 PCR 조건을 비교시험했던 성적을 참고하여 2종의 primer 모두에 적용할 수 있는 간단하면서도 효율성이 높은 PCR 조건을 설정하였다. 따라서 하나의 PCR 기기로 한번에 2종의 RAPD fingerprinting을 수행할 수 있었다. 또한 RAPD의 재현성 [20, 25]과 변별능력 향상을 위하여 DNA 추출 방법과 PCR mixture 조성을 표준화하고 분석과정에서 최적화된 기준(DI = 0.95)을 설정하여 유래별로 균주들

의 RAPD type을 분석한 결과 두가지 방법에서 다소 변별력의 차이는 있었지만 우수한 성적을 얻을 수 있었다.

HLWL85 primer를 이용한 RAPD 분석의 결과에서 DI = 0.957( $S \geq 80$ )의 높은 변별력을 확인할 수 있었다. 이 결과는 Delgado 등 [8]과 Aguado 등 [1, 2] 그리고 Fonnesbech, Vogel 등 [9, 25]의 성적에 비하여 polymorphic DNA band의 다양성이나 변별력이 월등한 것이었다. HLWL85-RAPD 분석법으로 유가공장 유래균 10균주 중 9개 균주가 다른 축산물 유래 균주와 구별되는 특이적인 type을 가지고 있음을 알 수 있었고 한개 균주만이 미국산 수입쇠고기에서 유래 한 균주와 90%이상의 높은 similarity를 나타내었다. 또한 국내산 쇠고기 유래 균주와 미국산 수입쇠고기 유래 균주가 쇠고기 유래라는 점에서는 같지만 유전자 차원에서는 유사성이 높지 않은 것으로 파악할 수 있었다. 닭고기 유래 균주는 다른 축산물 유래 균주들과 높은 similarity로 폭넓게 typing 되어 유전학적 다양성이 타 축종 유래균주에 비하여 높은 것으로 생각되었다.

HLWL74 primer를 이용한 RAPD 분석결과는 HLWL85와 비교할 때 변별력이 다소 낮았지만 다른 연구자들의 성적 [1, 2, 7, 10, 26]에 비하면 월등하게 높았으며, 특히 미국산 수입쇠고기 유래 13균주 모두가 다른 축종 유래균주와 구별되었다. 그러나 유가공장 유래의 8개 균주가 다른 축종과 혼재된 cluster를 형성하여 HLWL85의 결과와는 차이가 있었다. Aguado 등 [1]은 50균주에서 6개 type을, Byun 등 [7]은 54균주에서 6개 type을 구분하여 두 결과가 서로 비슷하였다. 또한 Byun 등은 200 bp~1kb에서 DNA band가 형성되었다고 하였지만 본 연구에서는 200 bp~2kb 사이에서 다양한 band가 형성되었고 68균주에서 34개의 RAPD type을 확인할 수 있었다. HLWL74는 100%의 유전학적 상동성을 가진 group이 다수 존재하고 그 일부에 많은 균주가 몰려있는 경향이 있었으나 HLWL85에서는 고른 분포를 보였다(Figs. 2 and 4). 또한 *L. monocytogenes* ATCC 19113과 ATCC 19117 두 표준균주는 HLWL85에서는 similarity 83%로 grouping되었으며, HLWL74에서는 100%의 유사성을 나타내었다. 이와 같이 두 RAPD typing tool이 가진 변별력은 우수하였지만 그 결과가 반드시 일치하지는 않았다.

*L. monocytogenes*의 13개 serotype 중 임상적으로 중요한 것은 1/2a, 1/2b 및 4b이며, 이들은 사람의 감염증례에서 95%이상을 차지한다 [19]. 이 중 4b는 리스테리아증 발병예의 40%나 된다 [24]. serotype과 DNA type 간의 상관성은 다른 연구자들의 보고 [8, 12, 19]에서와 마찬가지로 완벽하게 연관되지 않았지만 부분적으로는 특이적인 type이 존재하였다. HLWL85의 경우 1차 level cluster가 크게 두 개로 구분되었고(Fig. 2), 혈청형 4에



속하는 균주가 어느 한 쪽에서만 clustering 되었다. HLWL74에서도 dendrogram의 구조는 달랐지만 특정의 큰 cluster에는 혈청형 4에 속하는 균주가 전혀 포함되지 않는 경향은 동일하였다(Fig. 4). 이러한 경향은 Mereghetti 등 [19]의 ribotyping 성적에서도 확인할 수 있었다. 이것은 유전학적 유사성이 높은 cluster에서는 표현형질의 하나인 serotype을 결정하는 site가 유전자 전체의 특징인 DNA type 결정에 미치는 영향이 미약하지만 유전학적 유사성이 낮은 1~2차 level cluster에서는 표현형질의 특징이 유전자 전체의 특징에 반영되는 것으로 해석된다.

## 결 론

본 연구는 축산물 유래 및 유가공장에서 분리한 *L. monocytogenes* 57균주와 11주의 표준균주에 대한 분자역학적 특성을 연구할 목적으로 HLWL85와 HLWL74 primer를 이용하여 RAPD 기법을 표준화시키고, 이 기법을 이용하여 세균의 유래 및 serotype에 따른 유전자 수준의 특성을 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

HLWL85와 HLWL74 primer의 변별력은 공히 다른 연구자들의 결과에 비하여 월등히 높았으며(DI = 0.957; S ≥ 80%, S ≥ 95%) 그 중 HLWL85가 보다 우수하였다. Serotype과 RAPD type간에 완전한 연관성은 없었으나 부분적으로 특이적인 type이 존재하였다. HLWL85 primer에 의한 RAPD 분석결과 68균주에서 24개의 RAPD type을 발견할 수 있었으며 polymorphic DNA는 2-12개의 fragment로 형성되었다. 특히 HLWL85에서 유가공장 유래 균주는 다른 축산물 유래 균주와 뚜렷이 구별되었다. HLWL74 primer에 의한 RAPD 분석결과 34개의 RAPD type을 발견하였고 DNA band 수는 1~9개 이었다. 또한 미국산 수입쇠고기 유래의 균주들을 특이적으로 구별할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Aguado V, Vitas AI, García-Jalon I. Random amplified polymorphic DNA typing applied to the study of cross-contamination by *Listeria monocytogenes* in processed food products. J Food Prot 2001, **64**, 716-720.
2. Aguado V, Vitas AI, García-Jalón I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. Int J Food Microbiol 2004, **90**, 341-347.
3. Bannerman E, Boerlin P, Bille J. Typing of *Listeria monocytogenes* by monocin and phage receptors. Int J Food Microbiol 1996, **31**, 245-262.
4. Betancor L, Schelotto F, Martínez A, Pereira M, Algorta G, Rodríguez MA, Vignoli R, Chabalgoity JA. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. J Clin Microbiol 2004, **42**, 1155-1162.
5. Bille J, Rocourt J. WHO International Multicenter *Listeria monocytogenes* subtyping study-rationale and set-up of the study. Int J Food Microbiol 1996, **32**, 251-262.
6. Boerlin P, Bannerman E, Ischer F, Rocourt J, Bille J. Typing *Listeria monocytogenes*: a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods. Res Microbiol 1995, **146**, 35-49.
7. Byun SK, Jung SC, Yoo HS. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. Int J Food Microbiol 2001, **69**, 227-235.
8. Delgado da Silva MC, Destro MT, Hofer E, Tibana A. Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. Int J Food Microbiol 2001, **63**, 275-280.
9. Fønnesbech Vogel B, Huss HH, Ojeniyi B, Ahrens P, Gram L. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. Appl Environ Microbiol 2001, **67**, 2586-2595.
10. Giovannacci I, Ragimbeau C, Queguiner S, Salvat G, Venduvre JL, Carlier V, Ermel G. *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants. Use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. Int J Food Microbiol 1999, **53**, 127-140.
11. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. J Clin Microbiol 1988, **26**, 2465-2466.
12. Inoue S, Katagiri K, Terao M, Maruyama T. RAPD- and *actA* gene-typing of *Listeria monocytogenes* isolates of human listeriosis, the intestinal contents of cows and beef. Microbiol Immunol 2001, **45**, 127-133.
13. Lawrence LM, Gilmour A. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from

- the poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 1995, **61**, 2139-2144.
14. **Leal NC, Sobreira M, Leal-Balbino TC, de Almeida AM, de Silva MJ, Mello DM, Seki LM, Hofer E.** Evaluation of a RAPD-based typing scheme in a molecular epidemiology study of *Vibrio cholerae* O1, Brazil. *J Appl Microbiol* 2004, **96**, 447-454.
  15. **Lopes VC, Velayudhan BT, Halvorson DA, Lauer DC, Gast RK, Nagaraja KV.** Comparison of methods for differentiation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 isolates. *Am J Vet Res* 2004, **65**, 538-543.
  16. **Martinez I, Friis TJ, Seppola M.** Requirements for the application of protein sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and randomly amplified polymorphic DNA analyses to product speciation. *Electrophoresis* 2001, **22**, 1526-1533.
  17. **Martinez I, Rørvik LM, Brox V, Lassen J, Seppola M, Gram L, Fønnesbech-Vogel B.** Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. *Int J Food Microbiol* 2003, **84**, 285-297.
  18. **Mazurier SI, Wernars K.** Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. *Res Microbiol* 1992, **143**, 499-505.
  19. **Mereghetti L, Lanotte P, Savoye-Marczuk V, Marquet-Van Der Mee N, Audurier A, Quentin R.** Combined ribotyping and random multiprimer DNA analysis to probe the population structure of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**, 2849-2857.
  20. **Micheli MR, Bova R, Pascale E, D'Ambrosio E.** Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Res* 1994, **22**, 1921-1922.
  21. **Penner GA, Bush A, Wise R, Kim W, Domier L, Kasha K, Laroche A, Scoles G, Molnar SJ, Fedak G.** Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories. *PCR Methods Appl* 1993, **2**, 341-345.
  22. **Quintaes BR, Leal NC, Reis EM, Hofer E.** Optimization of randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction for molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004, **37**, 143-147.
  23. **Seeliger HPR, Hohne K.** Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Bergan T, Norris JR (eds.) *Methods in Microbiology*. pp. 31-49, Academic Press, London, 1979.
  24. **Tran HL, Kathariou S.** Restriction fragment length polymorphisms detected with novel DNA probes differentiate among diverse lineages of serogroup 4 *Listeria monocytogenes* and identify four distinct lineages in serotype 4b. *Appl Environ Microbiol* 2002, **68**, 59-64.
  25. **Vogel BF, Jørgensen LV, Ojeniyi B, Huss HH, Gram L.** Diversity of *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon produced in different smokehouses as assessed by Random Amplified Polymorphic DNA analyses. *Int J Food Microbiol* 2001, **65**, 83-92.
  26. **Wagner M, Maderner A, Brandl E.** Development of a multiple primer RAPD assay as a tool for phylogenetic analysis in *Listeria* spp. strains isolated from milkproduct associated epidemics, sporadic cases of listeriosis and dairy environments. *Int J Food Microbiol* 1999, **52**, 29-37.
  27. **Wernars K, Boerlin P, Audurier A, Russell EG, Curtis GD, Herman L, van der Mee-Marquet N.** The WHO multicenter study on *Listeria monocytogenes* subtyping: random amplification of polymorphic DNA (RAPD). *Int J Food Microbiol* 1996, **32**, 325-341.
  28. **Zhang W, Jayarao BM, Knabel SJ.** Multi-virulence-locus sequence typing of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**, 913-920.