

# Multiplex PCR 기법을 이용한 *Salmonella* Enteritidis와 *S. Typhimurium*의 특이적 검출에 관한 연구

이우원\* · 이승미 · 이강록 · 이동수 · 박호국

부산광역시 보건환경연구원

(접수 2009. 5. 30, 게재승인 2009. 6. 23)

## Identification of *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium* by multiplex polymerase chain reaction

Woo-Won Lee\*, Seung-Mi Lee, Gang-Rok Lee, Dong-Soo Lee, Ho-Kuk Park

Busan Metropolitan City Institute of Health and Environment, Busan 616-810, Korea

(Received 30 May 2009, accepted in revised from 23 June 2009)

### Abstract

*Salmonella* species are the most important etiologic agents of food-borne acute gastroenteritis. The most common serotypes isolated from humans are *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (*S. Typhimurium*) and *S. Enteritidis*. Traditional detection methods for *Salmonella* are based on cultures using selective media and characterization of suspicious colonies by biochemical and serological tests. These methods are generally time-consuming and not so highly sensitive. Recently, the polymerase chain reaction (PCR) has been used as a highly sensitive, specific, and rapid test for the presence of pathogenic bacteria. In this study, a multiplex PCR (m-PCR) was used to detect *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*. We selected m-PCR target genes, which were the *spv* (virulence plasmid specific for *S. Enteritidis*) and *sefA* (*S. Enteritidis* fimbrial antigen) genes, *fliC* (H1-i antigen specific for *S. Typhimurium*) and a randomly cloned sequence specific for the genus *Salmonella*. With m-PCR, random sequence was detected from all strains of *Salmonella* spp, *spv* and *sefA* were detected from all strains of *S. Enteritidis* (100%), and *fliC* was detected from all strains of *S. Typhimurium* (100%). This assay indicate that the specificity of the m-PCR make them potentially valuable tools for detection of *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis*.

**Key words** : Multiplex polymerase chain reaction, Virulence plasmid, Fimbrial antigen

### 서 론

*Salmonella*속 균은 그람음성의 통성 혐기성 세포내 기생세균으로서 사람과 동물을 비롯하여 자연계에 널리 분포하고 있다. 이들 균에 감염되면 설사, 쇠약, 발열 및 패혈증 등의 전신성 증상을 일으키며, 특이성이 있는 몇몇 균종을 제외한 대부분의 균 속이 인수공통

접염병의 원인세균으로 알려져 있다(이, 2005; Edwards와 Galton, 1967).

*Salmonella enterica*는 수십 년 동안 사람에서 식중독의 주요 병원체로 인식되어 왔으며, 주로 동물유래 균으로 오염된 음식물 섭취를 통하여 감염된 것으로 알려져 있다(Baggesen 등, 2000). 살모넬라감염증은 사람에서 가장 흔한 식품매개 질병으로서 미국에서 발생하는 식중독의 약 30%를 차지하며, 국내에서도 식중독 원인세균 중 가장 높은 분포를 나타내고 있다(이,

\* Corresponding author: Woo-Won Lee, Tel. +82-51-331-0095, Fax. +82-51-338-8266, E-mail. leewoow@korea.kr



2005; Taitt 등, 2004).

*Salmonella enterica* serotype Enteritidis (*S. Enteritidis*)는 1980년대 중반 이후 사람에서 식품매개를 통한 질병이 증가되고 있다. 이 균은 사람과 동물에 감염하여 주로 급성장염을 일으키며, 오염된 계란이나 식품을 통하여 폭발적인 식중독 발생을 일으키고 있다. 특히 NSC (National *Salmonella* Center)는 이 균을 1997년 이후부터 살모넬라감염증에서 가장 많이 분리되는 serotype (50%)으로 보고하고 있다(Betancor 등, 2004).

*S. Typhimurium*은 전 세계에 널리 분포하고 있는 균종으로, 사람을 비롯하여 소, 말, 양, 개, 가금, 설치류 및 조류 등 다양한 숙주에 감염되어 장염, 패혈증, 유산 및 폐렴 등을 일으키며, 사람에서 식품을 매개로 한 식중독 발생이 많아 공중보건학적으로 매우 중요시되고 있다(Duijkeren 등, 2002; Rabsch 등, 2002). 소의 살모넬라감염증에는 75종 이상의 serotype이 관련되어 위장염, 패혈증, 수막염, 관절염, 폐렴, 유산, 유량감소 및 발육지연 등을 일으키고(Beane과 Griffin, 1990), 돼지에서는 *S. Choleraesuis*와 *S. Typhisuis*에 의한 급성·열성패혈증과 *S. Typhimurium* 등에 의한 급·만성위장염을 유발하여 경제적인 피해가 큰 것으로 알려져 있다(Beane과 Griffin, 1990; Smith 등, 1994).

*S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 진단하기 위해서는 먼저 *Salmonella*속 균의 분리 및 동정이 선행되어야 한다. 또한 lipopolysaccharide(LPS, O항원)와 flagella antigen(H 항원)을 이용하여 2,500여 혈청형 구분을 위한 검사가 이루어져야 한다(Soumet 등, 1999a; Soumet 등, 1999b). 전통적인 배양방법이 많은 시간과 복잡한 절차가 요구되어 최근에는 *Salmonella*속 균을 신속하고 정확하게 분리하기 위하여 선택성이 높은 Rambach agar를 이용하거나(Freydiere와 Gille, 1991) MUCAP test 시약 등을 이용하기도 한다(Olsen과 Wollinder, 1991). 혈청형을 동정하기 위해서는 항원에 대한 인자 혈청을 이용한 응집반응법이 이용되고 있고, 다른 방법으로 whole cell, LPS 및 outer membrane protein(OMP) 항원을 이용한 ELISA 기법은 유용하고 시간을 절약할 수 있으나 다른 균종과의 교차반응으로 인한 위양성 반응이 흔하여 특이성에서 문제 시 되고 있다. 이러한 문제점을 해결하고자 근년에는 plasmid profile, 중합효소연쇄반응(PCR), southern blot hybridization 기법을 기초로 한 분자유전학적 분석 및 제한효소 처리에 의한 DNA의 절단 양상 등을 분석하여 역학

관계를 규명하고 있다(Rajashekara 등, 2000; Soumet 등, 1999a; Soumet 등, 1999b; Turcotte와 Woodward, 1993; Widjoatmodjo 등, 1991; Wood 등, 1994; Woodward와 Kirwan, 1996).

*Salmonella*속 균의 유전자는 chromosomal DNA 복제에 관여하는 유전자인 *oriC*(Widjoatmodjo 등, 1991), phosphate 결핍 환경에서 유도되는 균체 외막 단백질 발현 유전자인 *phoE*(김 등, 1995; 박 등, 1994), LPS O항원 합성과 관련된 *rfb*(Clouthier 등, 1993; Fitzgerald 등, 2003), fimbria 항원 유전자인 *agf*(Rajashekara 등, 2000), *sef*(Woodward와 Kirwan, 1996; ), plasmid에 암호된 병원성 발현유전자인 *spv*(Mahon과 Lax, 1993), 상피세포에 대한 부착과 침습에 관련된 *inv*(Galan 등, 1992), fimbria 구조항원 유전자인 *fim*(Rajashekara 등, 2000) 등에 대해 PCR 기법을 이용하여 *Salmonella*속 균을 신속하고 특이적으로 검출하여 보고된 바 있다. 그러나 이들 유전자는 *Salmonella*속 균과 그람음성 세균에 다양하게 분포되어 있어 균종과 혈청형간 특이성에 대한 문제가 항상 제기되고 있다.

*S. Enteritidis*의 thin filamentous fimbria를 암호하는 *sef* 유전자는 *sefA*, *sefB* 및 *sefC*의 3종류로 구성되어 있으며 이에 대한 염기구조가 보고된 바 있으며(Clouthier 등, 1993), 이 중 *sefA*는 serogroup D<sub>1</sub>에만 특이하게 관찰된다고 보고된 바 있다(Woodward와 Kirwan, 1996). 또한 *S. Enteritidis*만을 특이적으로 검출할 수 있는 plasmid에 암호된 병원성 발현유전자인 *spv*(Wood 등 1994)와 *S. Typhimurium*을 특이적으로 검출하기 위한 phase-1(H1) 항원(H:i) 유전자인 *fliC*(Soumet 등, 1999a; Soumet 등, 1999b) 및 *Salmonella*속 균을 특이적으로 검출하기 위한 random primer (ST11-ST15) (Aabo 등, 1993)를 사용하여 multiplex PCR 기법으로 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 특이적으로 감별진단 보고한 바 있다(Soumet 등, 1999a; Soumet 등, 1999b; Turcotte와 Woodward, 1993; Joys, 1985).

국내에서의 연구실정을 보면 PCR 기법으로 *Salmonella*속 균을 특이적으로 검출하기 위하여 상피세포에 대한 부착과 침습에 관련된 *inv* 유전자를 검출 보고하였고(이, 2005), phosphate 결핍 환경에서 유도되는 균체 외막 단백질 발현 유전자인 *phoE* 유전자를 검출하였으며(김 등, 1995; 박 등, 1994), *S. Enteritidis*만을 특이적으로 검출하기 위하여 fimbria를 암호하는 *sefA* 유전자(전 등, 1999) 및 plasmid에 암호된 병원성 발현유전자인 *spv* 유전자를 검출 보고(조 등, 2000)한 바 있으나



이들은 주로 *Salmonella*속 균을 특이적으로 검출하거나 *S. Enteritidis*만을 특이적으로 검출하는데 한정되어 있다.

본 실험에서는 사람에서 주요 식중독균으로 알려진 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 신속하고 특이적으로 검출하기 위하여 이들 *Salmonella* specific random primer, *sefA*, *spv*, *fliC* 유전자를 동시에 증폭하는 multiplex PCR 기법을 확립하고자 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 공시균주

공시균주는 2005년 이(2005)가 소와 돼지에서 분리한 *Salmonella*속 균 34종의 serotype 457주중 *S. Typhimurium* (*S. Typhimurium* variant copenhagen 포함) 54주, *S. Enteritidis* 20주, *Salmonella* serogroup B (*S. Agona*, *S. Derby* 및 *S. Schwarzengrund* 각 5주), *C<sub>1</sub>* (*S. Ardwick*, *S. Mbandaka* 및 *S. Rissen* 각 5주), *E<sub>1</sub>* (*S. Westhampton* 1주), *E<sub>4</sub>* (*S. Senftenberg* 1주), *L* (*S. Ruiru* 5주) 등 111주를 공시하였다. 기타 대조균주로는 본 연구원에서 보관중인 대장균 및 포도상구균을 사용하였다.

### Multiplex polymerase chain reaction (m-PCR)

#### DNA 추출

공시된 균주로부터 genomic DNA 추출은 이(2005)의 방법에 따라 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA)를 사용하였다.

### Oligonucleotide primer의 합성

m-PCR에 사용된 oligonucleotide primer의 염기서열, 증폭산물의 크기 및 온도는 Table 1에서와 같이 ran-

dom sequence (ST11-ST15) 등 5종을 Genomine (Korea)에 합성 의뢰하여 사용하였다.

### m-PCR에 의한 유전자의 검출

m-PCR 수행은 T-gradient (Biometra, Germany)를 이용하였다.

### Random sequence, *fliC* 및 *spv* 유전자

Random sequence, *fliC* (Fli15-Typ04) 및 *spv* 유전자의 동시 검출을 위한 m-PCR은 Soumet 등(1999)의 방법을 약간 수정 보완하여 10×PCR buffer 2.5μl, 10 mM dNTP 2.5μl, template DNA 1μl, 20 pM primer 각 0.5μl, *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan) 0.2μl를 포함하여 최종량이 25μl가 되게 하였다. PCR은 94°C에서 5분간 denaturation시킨 후, 94°C에서 20초, 55°C에서 40초, 72°C에서 1분 조건으로 총 35 cycle을 수행한 다음 72°C에서 10분간 extension시켰다.

### Random sequence, *fliC* 및 *sefA* 유전자

Random sequence, *fliC* (Fli15-Tym) 및 *sefA* 유전자 검출을 위한 m-PCR은 Soumet 등(1999)의 방법을 약간 수정 보완하여 10×PCR buffer 2.5μl, 10mM dNTP 2.5μl, template DNA 1μl, 20 pM primer 각 0.5μl, *Taq* polymerase (TaKaRa, Japan) 0.2μl를 포함하여 최종량이 25μl가 되게 하였다. PCR은 94°C에서 5분간 denaturation시킨 후, 94°C에서 20초, 56°C에서 40초, 72°C에서 1분 조건으로 총 35 cycle을 수행한 다음 72°C에서 10분간 extension시켰다.

### 증폭산물의 확인

PCR에 의해서 증폭된 산물은 이(2005)의 방법에 준하여 loading buffer (30% glycerol, 50mM EDTA,

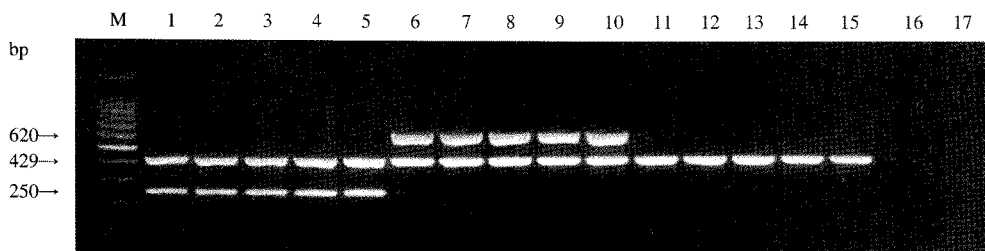
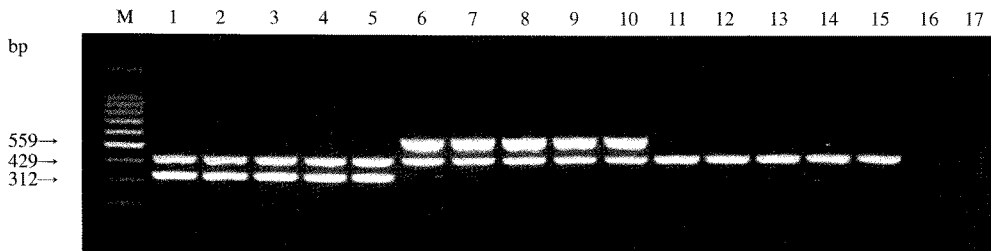
**Table 1.** Synthetic oligonucleotides used as primers for PCR

| Target gene     | Primer | Sequence (5'-3')                  | Size (bp) | Tm (°C)  | Reference            |
|-----------------|--------|-----------------------------------|-----------|----------|----------------------|
| Random sequence | ST11   | GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA   | 429       | 55 or 56 | Soumet et al. (1999) |
|                 | ST15   | GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G |           |          |                      |
| <i>FliC</i>     | Fli15  | CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T     | 620       | 55       | Soumet et al. (1999) |
|                 | Typ04  | ACT GGT AAA GAT GGC T             |           |          |                      |
| <i>spv</i>      | S1     | GCC GTA CAC GAG CTT ATA GA        | 250       | 55       | Soumet et al. (1999) |
|                 | S4     | ACC TAC AGG GGC ACA ATA AC        |           |          |                      |
| <i>FliC</i>     | Fli15  | CGG TGT TGC CCA GGT TGG TAA T     | 559       | 56       | Soumet et al. (1999) |
|                 | Tym    | ACT CCT GCT GGC GGT GCG ACT T     |           |          |                      |
| <i>sefA</i>     | sef167 | AGG TTC AGG CAG CGG TTA CT        | 312       | 56       | Soumet et al. (1999) |
|                 | sef478 | GGG ACA TTT AGC GTT TCT TG        |           |          |                      |



**Table 2.** Evaluation of the specificity of m-PCR using three primer pairs on different bacterial strains

| Strains                  | Serogroup      | No. of strains | Positive result by m-PCR with amplified products of |       |       |       |       |
|--------------------------|----------------|----------------|---|-------|-------|-------|-------|
|                          |                |                | 429bp   | 620bp | 250bp | 559bp | 312bp |
| <i>S. Enteritidis</i>    | D <sub>1</sub> | 20             | 20  | 0     | 20    | 0     | 20    |
| <i>S. Typhimurium</i>    | B              | 54             | 54  | 54    | 0     | 54    | 0     |
| <i>S. Agona</i>          | B              | 5              | 5   | 0     | 0     | 0     | 0     |
| <i>S. Derby</i>          | B              | 5              | 5   | 0     | 0     | 0     | 0     |
| <i>S. Schwarzengrund</i> | B              | 5              | 5   | 0     | 0     | 0     | 0     |
| <i>S. Ardwick</i>        | C <sub>1</sub> | 5              | 5   | 0     | 0     | 0     | 0     |
| <i>S. Mbandaka</i>       | C <sub>1</sub> | 5              | 5   | 0     | 0     | 0     | 0     |
| <i>S. Rissen</i>         | C <sub>1</sub> | 5              | 5   | 0     | 0     | 0     | 0     |
| <i>S. Westhampton</i>    | E <sub>1</sub> | 1              | 1   | 0     | 0     | 0     | 0     |
| <i>S. Senftenberg</i>    | E <sub>4</sub> | 1              | 1   | 0     | 0     | 0     | 0     |
| <i>S. Ruiru</i>          | L              | 5              | 5   | 0     | 0     | 0     | 0     |
| <i>E. coli</i>           | —              | 2              | 0   | 0     | 0     | 0     | 0     |
| <i>Sta. aureus</i>       | —              | 2              | 0   | 0     | 0     | 0     | 0     |
| Total                    |                | 113            | 540   | 54    | 20    | 54    | 20    |

**Fig. 1.** Multiplex PCR products amplified from *Salmonella* strains using three pairs of primers (random sequence, *fljC* and *spv*). M; 100bp DNA Ladder (Promega), lane 1~5; *S. Enteritidis*, lane 6~10; *S. Typhimurium*, lane 11; *S. Agona*, lane 12; *S. Derby*, lane 13; *S. Ardwick*, lane 14; *S. Westhampton*, lane 15; *S. Ruiru*, lane 16; *E. coli*, lane 17; *Staphylococcus aureus*.**Fig. 2.** Multiplex PCR products amplified from *Salmonella* strains using three pairs of primers (random sequence, *fljC* and *sefA*). M; 100bp DNA Ladder (Promega), lane 1~5; *S. Enteritidis*, lane 6~10; *S. Typhimurium*, lane 11; *S. Agona*, lane 12; *S. Schwarzengrund*, lane 13; *S. Mbandaka*, lane 14; *S. Rissen*, lane 15; *S. Senftenberg*, lane 16; *E. coli*, lane 17; *Staphylococcus aureus*.

0.025% bromophenol blue in 50mM Tris · HCl, pH 8.5)와 2 : 1로 혼합하여 2.0% agarose (Sigma, USA) gel상에 loading하고 TBE buffer (40mM Tris, 20mM boric acid, 1mM EDTA; Invitrogen) 하에서 120~140 volt로 약 1시간 동안 전기영동을 실시하였다. Agarose (Sigma, USA) gel을 0.5µg/ml의 ethidium bromide (Gibco,

USA) 용액으로 염색시킨 후 UV transilluminator (Hoefer, USA)를 사용하여 DNA 산물을 확인하였다. Marker로는 100bp DNA Ladder(Promega, USA)를 사용하였다.



## 결 과

### m-PCR의 특이성

공시균주로부터 genomic DNA를 추출한 다음 각각의 3종 primer sets (random sequence, *fliC*, *spv* 및 random sequence, *fliC*, *sefA*)를 이용하여 m-PCR을 수행한 결과는 Table 1, Fig. 1 및 Fig. 2와 같다. 먼저 random sequence, *fliC* 및 *spv* primer sets를 이용하여 m-PCR 결과 random sequence (ST11-ST15)는 모든 *Salmonella*속 균에 대하여 429bp에서 특이적인 증폭산물이 나타났으나 *Salmonella*속 균이 아닌 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다. *fliC* (Fli15-Typ04)는 *S. Typhimurium* 54균주 모두에서 620bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았으며, 또한 *spv*(S1-S4)는 *S. Enteritidis* 20균주 모두에서만 250bp의 특이적인 증폭산물이 나타났다.

Random sequence, *fliC* 및 *sefA*를 이용하여 m-PCR을 수행한 결과 *fliC* (Fli15-Tym)는 *S. Typhimurium* 54균주 모두에서 559bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았고, *sefA* (*sef*167-*sef*478)는 *S. Enteritidis* 20균주 모두에서 312bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다.

## 고 찰

살모넬라감염증의 역학적 연구는 serotype, 생물형, 약제내성형, phage type의 조사 등으로 이루어지고 있으나 이들을 파악하는 것만으로는 미흡한 실정이므로 최근에는 plasmid profile, 중합효소연쇄반응(PCR), southern blot hybridization 기법을 기초로 한 분자유전학적 분석 및 제한효소 처리에 의한 DNA의 절단 양상 등을 분석하여 역학관계를 규명하고 있다(Rajashekara 등, 2000; Smith 등, 1994; Soumet 등, 1999a; Soumet 등, 1999b; Taitt 등, 2004; Tansel 등, 2003; Turcotte와 Woodward, 1993; Widjoatmodjo 등, 1991).

*Salmonella*속 균의 유전자는 chromosomal DNA 복

제에 관여하는 유전자인 *oriC*, phosphate 결핍 환경에서 유도되는 균체 외막 단백질 유전자인 *phoE*, LPS O항원 합성과 관련된 *rfb*, fimbria 항원 유전자인 *agf*, *sef*, plasmid에 암호된 병원성 발현유전자인 *spv*, 상피세포에 대한 부착과 침습에 관련된 *inv*, fimbria 구조항원 유전자인 *fim* 등에 대해 PCR 기법을 이용하여 *Salmonella*속 균을 신속하고 특이적으로 검출하는 연구가 다각도로 진행되고 있다(김, 1995; 박, 1994; 이, 2005; Clouthier 등, 1993; Galan 등, 1992; Fitzgerald 등, 2003; Mahon과 Lax, 1993; Rajashekara 등, 2000; Widjoatmodjo 등, 1991; Woodward와 Kirwan, 1996). 또한 *S. Enteritidis*를 특이적으로 검출하기 위한 *spv*, *sefA* 유전자와 *S. Typhimurium*을 특이적으로 검출하기 위한 phase-1 항원(H:i) 유전자인 *fliC* 및 *Salmonella*속 균 random primer (ST11-ST15)를 사용하여 m-PCR 기법으로 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 특이적으로 감별진단 보고한 바 있다(Soumet 등, 1999a; Soumet 등, 1999b).

본 실험에서는 사람에서 주요 식중독균으로 알려진 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 신속하고 특이적으로 검출하기 위하여 이들 *Salmonella* specific random primer, *sefA*, *spv*, *fliC* 유전자를 동시에 증폭하는 m-PCR 기법을 이용한 결과 random sequence는 모든 *Salmonella*속 균에 대하여 429bp에서 특이적인 증폭산물이 나타났으나 *Salmonella*속 균이 아닌 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다. *fliC* (Fli15-Typ04) 및 *fliC* (Fli15-Tym)는 *S. Typhimurium* 54균주 모두에서 각각 620bp 및 559bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다. 또한 *spv* (S1-S4) 및 *sefA* (*sef*167-*sef*478)는 *S. Enteritidis* 20균주 모두에서만 각각 250bp 및 312bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다.

이는 Soumet 등(Soumet 등, 1999a; Soumet 등, 1999b)이 random sequence는 모든 *Salmonella*속 균에 대해서만 429bp에서 특이적인 증폭산물이 나타났고, *fliC* (Fli15-Typ04) 및 *fliC* (Fli15-Tym)는 *S. Typhimurium* 5균주 및 36균주 모두에서 각각 620bp와 559bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았으며, *spv* (S1-S4) 및 *sefA*



(sef167-sef478)는 *S. Enteritidis* 6균주 및 12균주 모두에서만 각각 250bp 및 312bp의 특이적인 증폭산물이 나타났다고 보고한 결과와 일치하였다. 또한 Lim 등(2003)이 *fliC* 유전자는 *S. Typhimurium* 38균주 모두에서 특이적인 증폭산물이 나타났다고 보고한 성적과도 일치하였으며, 조 등(2000)이 *S. Enteritidis*에서 *spv* 유전자를 검출 보고한 것과 전 등(1999)이 *Salmonella* serogroup D<sub>1</sub>에서 *sefA* 유전자를 검출 보고한 성적과도 유사하였다.

그러나 Wood 등(1994)이 *spv* 유전자는 *S. Enteritidis*에서 단지 30%만이 검출되었다고 보고한 성적보다는 훨씬 높았고, Pan과 Liu(2002)가 *spv* 유전자는 *S. Enteritidis* 27균주 중 25균주(92.6%)에서 검출되었다고 보고한 성적보다는 다소 높았으며, *sefA* 유전자는 27균주 중 27균주(100%) 모두에서 검출되었다고 보고한 성적과는 일치하였다.

본 실험에서의 결과로 미루어 볼 때 사람에서 주요 식중독균으로 알려진 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 검출하기 위하여 *Salmonella* specific random primer, *sefA*, *spv*, *fliC* 유전자를 동시에 증폭하는 multiplex PCR 기법이 신속하고 특이적으로 나타나 향후 본 혈청형을 진단하는데 매우 유용할 것으로 판단된다.

## 결 론

사람의 주요 식중독균으로 알려진 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 신속하고 특이적으로 검출하기 위하여 *Salmonella* specific random primer, *sefA*, *spv*, *fliC* 유전자를 동시에 증폭하는 multiplex PCR 기법을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

*Salmonella* specific random primer (ST11-ST15)는 모든 *Salmonella*속 균에 대하여 429bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 *Salmonella*속 균이 아닌 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다.

*fliC* (Fli15-Typ04) 및 *fliC* (Fli15-Tym)는 *S. Typhimurium* 54균주 모두에서 각각 620bp 및 559bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella* serogroup (B, C<sub>1</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>4</sub> 및 L) 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않았다.

*spv* (S1-S4) 및 *sefA* (sef167-sef478)는 *S. Enteritidis* 20균주 모두에서만 각각 250bp 및 312bp의 특이적인 증폭산물이 나타났으나 이를 제외한 다른 *Salmonella*

속 균 및 다른 세균에서는 어떠한 증폭산물도 나타나지 않아 *S. Enteritidis*에 대해서만 특이적인 양성반응을 보였다.

## 참 고 문 헌

- 김원용, 장영효, 박경윤, 김철중, 신광순, 박용하. 1995. Polymerase chain reaction과 Southern hybridization을 이용한 *Salmonella*속 균의 신속한 검출. 대한수의학회지. 35(3): 531-536.
- 박두희, 김원용, 김철중, 마점술. 1994. Polymerase chain reaction에 의한 *Salmonella* 속균의 검출. 대한수의학회지. 34(1): 115-125.
- 이우원. 2005. 가축유래 다제내성 *Salmonella* 속균의 유전자 및 단백질에 관한 연구. 경상대학교 대학원 박사학위 논문.
- 전무형, 김태중, 장경수, 강경임, 김귀현, 김기석, 유상식, 김현수, 신광순, 김철중. 1999. *SefA* 유전자 PCR에 의한 *Salmonella* serogroup D<sub>1</sub>의 특이적 검출. 대한수의학회지. 39(3): 523-530.
- 조미영, 여용구, 김영섭, 이정학, 이병동. 2000. PCR을 이용한 *Salmonella enteritidis*의 특이적 검출. 한국가축위생학회지. 23(3): 227-233.
- Aabo S, Rasmussen OF, Rossen L, Sørensen PD, Olsen JE. 1993. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes* 7: 171-178.
- Baggesen DL, Sandvang D, Aarestrup F. 2000. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and the United States. *J Clin Microbiol* 38(4): 1581-1586.
- Bean NH, Griffin PM. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: Pathogen, vehicles and trends. *J Food Prot* 53(9): 804-817.
- Betancor L, Schelotto F, Martinez A, Pereira M, Algorta G, Rodríguez MA, Vignoli R, Chabalgoity JA. 2004. 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* 42(3): 1155-1162.
- Clouthier SC, Müller KH, Doran JL, Collinson SK, Kay WW. 1993. Characterization of three fimbrial genes, *sef-ABC*, of *Salmonella enteritidis*. *J Bacteriol* 175(9): 2523-2533.
- van Duikeren E, Wannet WJ, Houwers DJ, van Pelt W. 2002. Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in the Netherlands from 1984 to 2001. *J Clin Microbiol* 40(11): 3980-3985.
- Edwards PR, Galton MM. 1967. Salmonellosis. *Adv Vet Sci* 11: 1-63.
- Fitzgerald C, Sherwood R, Gheesling LL, Brenner FW, Fields PI. 2003. Molecular analysis of the O antigen gene



- cluster of *Salmonella enterica* serogroup O:6, 14 and development of a serogroup-specific PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 69(10): 6099-6105.
- Freydiere A, Gille Y. 1991. Detection of *Salmonella* by using Rambach agar and a C8 esterase spot test. *J Clin Microbiol* 29: 2357-2359.
- Galan JE, Ginocchio C, Costeas P. 1992. Molecular and functional characterization of *Salmonella* the invasion gene *invA*: homology of *invA* to members of a new protein family. *J Bacteriol* 174: 4338-4349.
- Joys TM. 1985. The covalent structure of the phase-1 flagellar filament protein of *Salmonella* Typhimurium and its comparison with others flagellins. *J Biol Chem* 260: 15758-15761.
- Lim YH, Hirose K, Izumiya H, Arakawa E, Takahashi H, Terajima J, Itoh K, Tamura K, Kim SI, Watanabe H. 2003. Multiplex polymerase chain reaction assay for selective detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Jpn J Infect Dis* 56(4): 151-155.
- Mahon J, Lax AJ. 1993. A quantitative polymerase chain reaction method for the detection in avian feces of salmonella carrying the *spvR* gene. *Epidemiol Infect* 111: 455-464.
- Olsen M, Wollinder SA. 1991. Identification of *Salmonella* with the 4-methylumbelloferoyl caprilate fluorescence test. *J Clin Microbiol* 29: 2631-2632.
- Pan TM, Liu YJ. 2002. Identification of *Salmonella enteritidis* isolates by polymerase chain reaction and multiplex polymerase chain reaction. *J Microbiol Immunol Infect* 35: 147-151.
- Rabsch W, Andrews HL, Kingsley RA, Prager R, Tschäpe H, Adams LG, Bäumler AJ. 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun* 70(5): 2249-2255.
- Rajashekara G, Munir S, Alexeyev MF, Halvorson DA, Wells CL, Nagaraja KV. 2000. Pathogenic role of SEF14, SEF17, and SEF21 fimbriae in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection of chickens. *Appl Environ Microbiol* 66(4): 1759-1763.
- Smith BP, Da Roden L, Thurmond MC, Dilling GW, Konrad H, Pelton JA, Picanso JP. 1994. Prevalence of *Salmonellae* in cattle and in the environment on California dairies. *J Am Vet Med Assoc* 205(3): 467-471.
- Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G, Colin P. 1999. Evaluation of a Multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Lett Appl Microbiol* 28(2): 113-117.
- Soumet C, Ermel G, Rose V, Rose N, Drouin P, Salvat G, Colin P. 1999. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. *Lett Appl Microbiol* 29(1): 1-6.
- Taitt CR, Shubin YS, Angel R, Ligler FS. 2004. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by using a rapid, array-based immunosensor. *Appl Environ Microbiol* 70(1): 152-158.
- Tansel O, Ekuklu G, Otkun M, Otkun MT, Akata F, Tuğrul M. 2003. A food-borne outbreak caused by *Salmonella* Enteritidis. *Yonsei Med J* 44(2): 198-202.
- Turcotte C, Woodward MJ. 1993. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene coding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella* Enteritidis. *J Gener Microbiol* 139: 1477-1485.
- Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Keller BH, Verhoef J. 1991. Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 10: 935-938.
- Wood MW, Mahon J, Lax AJ. 1994. Development of a probe and PCR primers specific to virulence plasmid of *Salmonella* Enteritidis. *Molecu and Cellu Probes* 8: 473-479.
- Woodward MJ, Kirwan SES. 1996. Detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs by the polymerase chain reaction. *Vet Rec* 138: 411-413.