

Real-time PCR을 이용한 살모넬라 검출에 대한 연구

이우원[†] · 정경태 · 이강록 · 이기훈
축산물위생검사소

Detection of *Salmonella* by Real-Time Polymerase Chain Reaction

Lee Woo-won[†], Chung Gyung-tae, Lee Gang-rok, Lee Gi-heun
Veterinary Service Laboratory

Abstract

Salmonella enterica serotype Enteritidis (*S. Enteritidis*) and *S. Typhimurium* are the major causative agents of food-borne illness worldwide. Traditional detection methods for *Salmonella* are generally time-consuming and not so highly sensitive. Currently, a rapid detection system using multiplex real-time 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 real-time PCR was used to detect *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. We selected multiplex real-time PCR target genes, which were the *invA*, *proto6e* and inner membrane protein. The specificity of the multiplex real-time PCR assay, using 57 bacteria including 51 *Salmonella* isolates and 6 non-*Salmonella*, was 100 %, 100 % and 100 % for *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*, respectively. This assay indicates that the specificity of the multiplex real-time PCR makes them potentially valuable tools for detection of *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*.

Key Words : *Salmonella*, food-borne illness, multiplex real-time PCR.

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 균속이 인수공통점염병의 원인세균으로 알려져 있다^{1,2)}. *Salmonella enterica*는 수십 년 동안 사람에서 식중독의 주요 병원체로 인식되어 왔으며, 주로 동물유래균으로 오염된 음식물 섭취를 통하여 감염된 것으로 알려져 있다³⁾. 살모넬라감염증은 사람에서 가장 흔한 식품매개 질병으로서 미국에서 발생하는 식중독의 약 30 %를 차지하며, 국내에서도 식중독 원인세균 중

가장 높은 분포를 나타내고 있다⁴⁾.

Salmonella spp. 중 *Salmonella enterica* serotype Enteritidis (*S. Enteritidis*)는 사람과 동물에 감염하여 주로 급성장염을 일으키고, 오염된 계란이나 식품을 통하여 폭발적인 식중독 발생을 일으키고 있으며^{5,6)}, *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, *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*은 사람에서 식품을 매개로 한 살모넬라감염증의 가장 중요한 원인체로서 공중보건학적으로 매우 중요시되고 있다^{7,8)}.

*S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 진단하기 위해서는 먼저 *Salmonella*속 균의 분리 및 동정이 선행되어

[†] Corresponding author. E-mail : leewoow@korea.kr
Tel : +82-51-330-6142, Fax : +82-51-330-6149

야 한다. 또한 lipopolysaccharide (LPS, O항원)와 flagella antigen (H 항원)을 이용하여 2,500여 혈청형 구분을 위한 검사가 이루어져야 한다^{9,10}. 전통적인 배양 방법은 많은 시간과 복잡한 절차가 요구된다¹¹. 혈청형을 동정하기 위해서는 항원에 대한 인자 혈청을 이용한 응집 반응법이 이용되고 있고, 다른 방법으로 whole cell, LPS 및 OMP 항원을 이용한 ELISA 기법은 유용하고 시간을 절약할 수 있으나 다른 균종과의 교차반응으로 인한 위양성 반응이 흔하여 특이성에서 문제 시 되고 있다¹².

Salmonella spp.를 비롯한 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*의 신속한 진단을 위해서 최근에는 plasmid profile, polymerase chain reaction (PCR), southern blot hybridization 기법을 기초로 한 분자유전학적 분석 및 제한효소 처리에 의한 DNA의 절단 양상을 분석하여 역학관계를 규명하고 있다^{13~15}. 특히 중합효소연쇄반응법(PCR)을 기반으로 개발되어진 진단기법들은 검체내 소수의 균이 존재하더라도 진단이 가능하고 신속한 결과를 얻을 수 있어 조기진단에 널리 이용되고 있으며 민감도와 특이도가 높아 이용이 확대되고 있다. 더불어 PCR보다 민감도와 특이성이 높은 것으로 알려진 real-time PCR이 개발되어 진단방법으로 연구되고 있는데, 일반 PCR과 달리 real-time PCR은 증폭결과를 실시간으로 그래프를 통해 확인할 수 있어 더 신속하고 민감도가 더 높은 진단방법으로 알려져 있다^{16~18}. Single real-time PCR 기법은 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 비롯한 주요 *Salmonella* spp. 특이적으로 검출하기 위하여 적용되었으나^{16,19,20}, multiplex real-time PCR 기법은 이들 병원균의 검출을 위해서 적용된 예는 흔하지 않다.

이에 본 연구에서는 *Salmonella* spp., *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*의 동시 검출을 위한 multiplex real-time PCR 검사법 개발을 시도하였다.

재료 및 방법

공시균주

공시균주는 2005년 이²¹가 소와 돼지에서 분리한 *Salmonella*속 균 34종의 serotype 457주 중 *S. Enteritidis* 10주, *S. Typhimurium* 25주, *Salmonella* serogroup B (*S. Agona*, *S. Derby* 및 *S. Schwarzengrund* 각 2주), *C*₁ (*S. Ardwick*, *S. mbandaka* 및 *S. Rissen* 각

2주), *E*₁ (*S. Westhampton* 1주), *E*₄ (*S. Senftenberg* 1주), *L* (*S. Ruiru* 2주) 등 51주를 공시하였다. 기타 대조 균주로는 본 연구원에서 보관 중인 *E. coli*, *Staphylococcus aureus* 및 *Listeria monocytogenes*를 대조균으로 사용하였다.

Multiplex real-time PCR

1. DNA 추출

DNA 추출을 위해 공시 균주들을 tryptic soy broth (Merk, Germany)에서 37 °C, 18 시간 ~ 24시간 배양 후, 배양액 2 mL을 microcentrifuge tube에 옮긴 다음 8,000 rpm으로 2분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 상층액이 제거된 침전물에서 genomic DNA를 추출하기 위해 PowerPrep™ Bacterial DNA Extraction Kit (Kogenebiotech, Korea)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

2. Primer와 probe

본 연구에 사용된 primer와 probe의 정보는 표 1에서와 같이 primer는 Bioneer(Korea)에 합성 의뢰하여 사용하였고, probe는 ThermoFisher(USA)에 주문하여 사용하였다. Primer와 probe 디자인은 각각 target에 특이적인 유전자를 사용하여 디자인하였다. *Salmonella* spp.는 병원성 인자 중 invasion에 관련된 *invA* 유전자를 target으로 하여 primer와 probe를 디자인하였고 probe의 형광물질은 VIC으로 설계하였다. *S. Enteritidis*는 편모와 관련된 *prot6e* 유전자를 target으로 하여 probe 형광물질을 FAM으로 설계하였고 *S. Typhimurium*은 항원에 관련된 *viaB* 유전자를 target으로 하여 probe의 형광물질을 Cy5로 설계함으로써 multiplex real-time PCR 반응에서 형광신호 간에 교차가 발생하지 않도록 하였다.

3. Multiplex real-time PCR 반응 조건

Real-time PCR 반응액은 총 20 μL로 반응을 수행하였다. 각각의 primer와 probe의 최종 농도는 500 nM, 100 nM이 되도록 혼합하였다. 2X Real-time PCR master mix 10 μL, 각각의 primer 및 probe는 각각 100 uM, 20 uM로 희석한 후 3개 set의 primer, probe 각각 0.1 μL씩 사용하였다. D.W 4.1 μL를 첨가하여 총 volume 15 μL로 고정한 후 10 ng/μL로 희석한 template를 5 μL 첨가하여 총 50 ng의 DNA가 PCR 반응에 사용되도록 하였다.

Real-time thermal cycler는 7500 Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 사용하였다. 반응조건은 50 °C에서 2분, 95 °C에서 10분 predenaturation 시킨 후, 95 °C에서 15초 denaturation, 60 °C에서 60 초 annealing&extension 주기를 40회 반복하였다. 증폭결과는 7500 software (Applied Biosystems, USA) 프로그램을 이용하여 확인하였다²²⁾.

결과 및 고찰

Multiplex real-time PCR 특이도

공시 균주로부터 DNA를 추출한 다음 primer와 probe를 이용하여 multiplex real-time PCR의 특이도를 확인한 결과 표 2에서와 같이 *Salmonella* spp., *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*에 특이적인 primer와 probe는 모두 해당 균에만 반응하였고, 다른 세균에서는

Table 1. Description of primers and probes used in this study real-time PCR

Name	Target gene	Oligo type	Sequence (5' - 3')	Size (bp)	Accession number (NCBI)
<i>Salmonella</i> spp.	invA	Forward	GAA TCC TCA GTT TTT CAA CGT TTC	138	HF937208
		Reverse	CGA ATT GCC CGA ACG TGG CGA		
		Probe(VIC/MGBNFQ)	CGT CTG GCA TTA TCG ATC AG		
<i>S. Enteritidis</i>	prot6e	Forward	GGC TGG AGA ATG GCG GAC	99	CP008927
		Reverse	CCG GAC GAA GCT CAC ACC		
		Probe(FAM/MGBNFQ)	CAA AAA GTG ATG CCT		
<i>S. Typhimurium</i>	viaB	Forward	AGA TAG CAA TAA TTT GGT TAT ATT ACC CTG A	90	CP006048
		Reverse	CTG TTA TTA ATT TTT ACC GTG ATA GTG TTG T		
		Probe(Cy5/BHQ)	AGC CGT TAG ATA TTC TCA TCA TTA AAG		

Table 2. Specificity of multiplex real-time PCR for identification of *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*

Strains	Serogroup	No. of strains	Result by multiplex real-time PCR		
			<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>
<i>S. Enteritidis</i>	D ₁	10	+	+	-
<i>S. Typhimurium</i>	B	25	+	-	+
<i>S. Agona</i>	B	2	+	-	-
<i>S. Derby</i>	B	2	+	-	-
<i>S. Schwarzengrund</i>	B	2	+	-	-
<i>S. Ardwick</i>	C ₁	2	+	-	-
<i>S. Mbandaka</i>	C ₁	2	+	-	-
<i>S. Rissen</i>	C ₁	2	+	-	-
<i>S. Westhampton</i>	E ₁	1	+	-	-
<i>S. Senftenberg</i>	E ₄	1	+	-	-
<i>S. Ruiru</i>	L	2	+	-	-
<i>E. coli</i>	-	2	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	2	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	2	-	-	-

교차반응이 관찰되지 않았다. 이는 Hadjinicolaou 등²³⁾이 환경 재료와 임상 시료에서 *S. Typhimurium*과 *S. Enteritidis* 분리를 위한 real-time PCR 기법을 이용한 결과 및 Pochop 등²⁴⁾이 우유와 식육에서, Lee 등²⁵⁾이 식육에서 *Salmonella* spp., *S. Typhimurium*과 *S. Enteritidis* 분리를 위하여 real-time PCR 기법을 이용하여 연구 보고한 결과와 유사하였다.

민감도

민감도 확인을 위해 표 1에서 제시한 target gene을 플라스미드 형태로 클로닝하여 각각의 민감도를 확인하였다. 플라스미드의 최고 농도는 10^5 copies로 제작하고 순차적으로 10배씩 희석하여 1 copy 까지 희석하여 민감도를 확인하였다. 그림 1 ~ 그림 3까지 검출 민감도의 정확

성 확인 위해 3회 반복하여 민감도를 확인하였다. 세 종류 모두 10^1 까지 검출 되는 것을 확인하였다.(그림 1 ~ 그림 3) 이는 Fey 등²⁶⁾이 *S. Typhimurium*의 검출을 위한 real-time PCR의 검출한계는 $(0.54 \pm 0.09) \log_{10}$ CFU/mL, Seo 등¹⁹⁾은 *S. Enteritidis*의 검출을 위한 real-time PCR의 검출한계는 $(0.65 \pm 0.07) \log_{10}$ CFU/mL 이라고 보고한 성적보다는 민감도가 낮았다.

또한 *Salmonella* spp., *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*의 동시 검출을 위한 multiplex real-time PCR 결과에서도 민감도의 감소 없이 각각의 real-time PCR 결과와 동등한 결과를 확인하였다.(그림 4)

표 3은 각 종류별로 농도에 따른 C_T 값(cycle threshold)의 변화를 표기한 내용이다.

세 종류의 시스템 모두 검출한계는 10 copies 까지 검

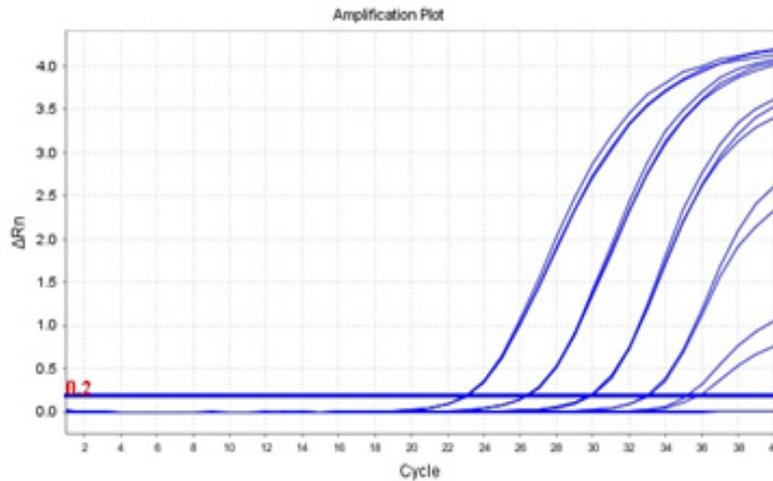


Fig. 1. Sensitivity of real-time PCR for detection of *Salmonella* spp.

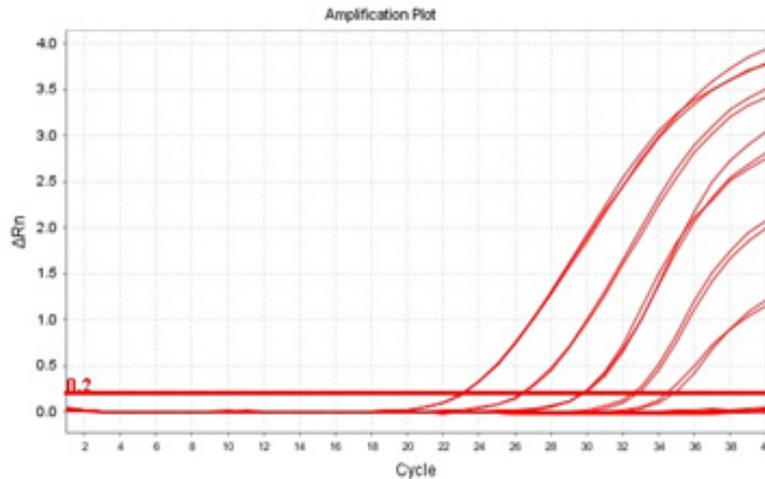


Fig. 2. Sensitivity of real-time PCR for detection of *S. Enteritidis*.

출한계를 확인하였다.

본 연구에서 도입한 real-time PCR 기법은 일반 PCR과 비교하였을 때 결과를 확인하기 위하여 agarose gel에 loading하고 PCR product를 염색하는 과정을 생략함으로써 검출시간을 단축할 수 있었다. 뿐만 아니라 probe라는 형광표지 DNA 절편을 이용함으로써 각각의 target에 대한 민감도와 특이성을 향상시킬 수 있었다. 이와 같은 검사법의 응용으로 *Salmonella* spp., *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*의 구별이 한 번의 반응으로 가능함을 확인하여 검사시간의 단축 및 검사의 편리성을 확대하였다. 향후 시료에서 직접 혈청형을 검출하는 연구가 되었으면 한다.

Table 3. Results obtained from real-time PCR for detection of *Salmonella* spp., *S. Enteritidis*, and *S. Typhimurium*

Copies	C _T values obtained by multiplex real-time PCR		
	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>
10 ⁵	23.1	23.1	22.9
10 ⁴	26.5	26.4	26.1
10 ³	29.9	29.8	29.5
10 ²	33.1	32.6	32.8
10 ¹	35.8	34.7	35.5
10 ⁰	Undetermined	Undetermined	Undetermined

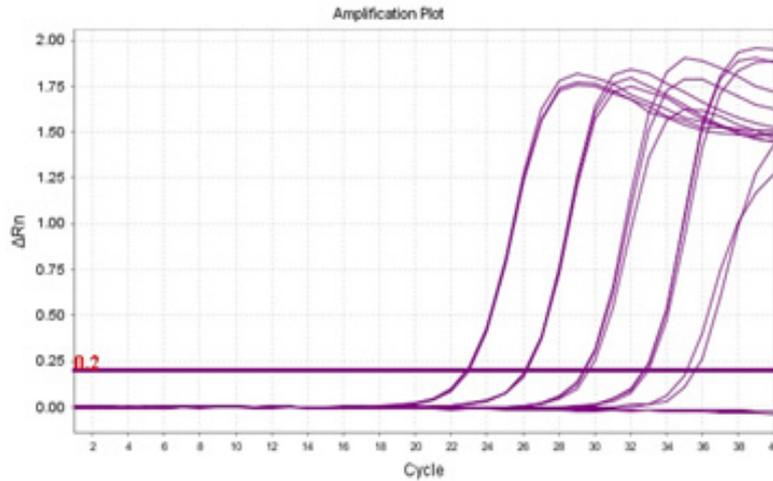


Fig. 3. Sensitivity of real-time PCR for detection of *S. Typhimurium*.

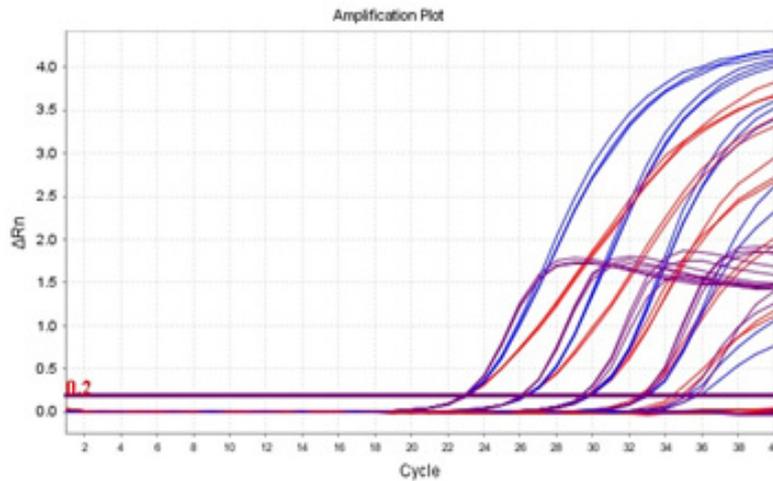


Fig. 4. Sensitivity of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*.

결론

사람의 주요 식중독균으로 알려진 *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*을 비롯한 *Salmonella* spp.의 multiplex real-time PCR 검사법을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Multiplex real-time PCR의 특이도를 확인한 결과 *Salmonella* spp., *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*에 특이적인 primer와 probe는 해당균에만 반응하였고, 다른 세균에서는 교차반응이 관찰되지 않았고, 각각의 target에 대한 검출 민감도를 확인한 결과 10¹까지 검출되는 것을 확인하였다.
2. 본 연구에서 싱글플렉스와 멀티플렉스 반응에서 민감도의 변화 없이 동등한 결과를 나타내었다. 이와 같은 검사법의 응용으로 *Salmonella* spp., *S. Enteritidis*와 *S. Typhimurium*의 구별이 가능함을 확인하여 검사의 편리성을 확대하였다.

참고문헌

1. Edwards PR and Galton MM, "Salmonellosis", *Adv Vet Sci*, 11, pp.1~63(1967).
2. 이우원, 정병열, 이강록, 이동수, 김용환, "소와 돼지 유래 살모넬라속균의 약제내성유전자의 특성에 관한 연구", *한국가축위생학회지*, 32(3), pp.227~239(2009).
3. Baggesen DL, Sandvang D and Aarestrup F, "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), pp.1581~1586(2000).
4. Taitt CR, Shubin YS, Angel R and Ligler FS, "Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by using a rapid, array-based immunosensor", *Appl Environ Microbiol*, 70(1), pp.152~158(2004).
5. Nygard K, Jong BD, Guerin PJ, Anderson Y, Olsson A and Giesecke J, "Emergence of new *Salmonella* Enteritidis phage types in Europe Surveillance of infections in returning travellers", *BMC Medicine*, 2, p.32(2004).
6. Tansel O, Ekuklu G, Otkun M, Tatman-Oktun M, Akata F and Tugrul M, "A food-borne outbreak caused by *Salmonella* Enteritidis", *Yonsei Med J*, 44(2), pp.198~202(2003).
7. Duijkeren EV, Wannet WJB, Houwers DJ and Pelt WV, "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), pp.3980~3985(2002).
8. Rabsch W, Andrews HL, Kingsley RA, Prager R, Tschape H, Adams LG and Baumler LJ, "*Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants", *Infect Immun*, 70(5), pp.2249~2255(2002).
9. Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G and Colin P, "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, pp.113~117(1999).
10. Soumet C, Ermel G, Rose N, Rose V, Drouin P, Salvat G and Colin P, "Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses", *Lett Appl Microbiol*, 29, pp.1~6(1999).
11. Olsen M and Wollinder SA, "Identification of *Salmonella* with the 4-methylumbelloferoyl caprylate Fluorescence test", *J Clin Microbiol*, 29, pp.2631~2632(1991).
12. Widjoatmodjo MN, Fluit AC, Torensma R, Keller BHI and Verhoef J, "Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*", *Europ J of Clin Microbiol and Inf Dis*, 10, pp.935~938(1991).
13. Rajashekara G, Munir S, Alexeyev MF, Halvorson DA, Wells CL and Nagaraja KV, "Pathogenic role of SEF14, SEF17, and SEF21 fimbriae in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection of chickens", *Appl and Environ Microbiol*, 66(4), pp.1759~1763(2000).

14. Turcotte C and Woodward MJ, "Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene coding the SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella* Enteritidis", *J Gener Microbiol*, 139, pp.1477~1485(1993).
15. Woodward MJ and Kirwan SES, "Detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs by the polymerase chain reaction", *Vet Rec*, 138, pp.411~413(1996).
16. Hein I, Flekna G, Krassnig M, Wagner M, "Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project", *J Microbiol Methods*, 66, pp.538~547(2006).
17. Holicka J, Guy RA, Kapoor A, Shepherd D, Horgen PA, "A rapid (one day), sensitive real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef", *Can J Microbiol*, 52, pp.992~998(2006).
18. Rossmanith P, Krassnig M, Wagner M, Hein I, "Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene", *Res Microbiol*, 157, pp.763~771(2006).
19. Seo KH, Valentin-Bon IE, Brackett RE, Holt PS, "Rapid, specific detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR", *J Food Prot*, 67, pp.864~869(2004).
20. Szmolka A, Kaszanyitzky E, Nagy B, "Improved diagnostic and by real-time PCR in rapid screening for *Salmonella* in the poultry food chain", *Acta Vet Hung*, 54, pp.297~312(2006).
21. 이우원, 정병열, 이강록, 이동수, 김용환, "소와 돼지 유래 *Salmonella*속 균의 혈청형 및 약제감수성", *한국가축위생학회지*, 32(1), pp.49~59(2009).
22. Bedir O, Kilic A, Atabek E, Kuskucu AM, Turhan V, Basustaoglu AC, "Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* spp. by multiplex real-time PCR (TaqMan) assay", *Pol J Microbiol*, 59(3), pp.167~73(2010).
23. Hadjinicolaou AV, Demetriou VL, Emmanuel MA, Kakoyiannis CK, Kostrikis LG, "Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in environmental and clinical samples", *BMC Microbiol*, 9, p.97(2009).
24. Pochop J, Kacaniova M, Hleba L, Lejkova J, Fikselova M, Kunova S, Kluz M, "The StepOne real-time polymerase chain reaction detection of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* ser. Typhimurium and Enteritidis in milk and meat", *J Environ Sci and Heal part B*, 46, pp.697~702(2011).
25. Lee SH, Jung BY, Rayamahji N, Lee HS, Jeon WJ, Choi KS, Kweon CH, Yoo HS, "A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serova Typhimurium and Enteritidis in meats", *J Vet Sci*, 10(1), pp.43~51(2009).
26. Fey A, Eicher S, Flavier S, Christen R, Hofle MG, Guzman CA, "Establishment of a real-time PCR-based approach for accurate quantification of bacterial RNA targets in water, using *Salmonella* as a model organism", *Appl Environ Microbiol*, 70, pp.3618~3623(2004).