

Genomic Characteristics and Identification of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A Using Multiplex PCR

Ji-Young Moon¹, Yung-Bu Kim¹, Chulhun L. Chang²

Departments of ¹Microbiology and Immunology, ²Clinical Pathology, College of Medicine, Pusan National University, Busan, Korea

Background: *Salmonella enterica* serovars often have a broad host range and cause some gastrointestinal and systemic diseases. The diagnosis of typhoid fever or paratyphoid fever is made by ordinary culture methods and biochemical tests. However, a more rapid and alternative method of diagnosing these diseases is in need since the classical diagnostic method requires several days for a result. Some researchers have already reported serovar Typhi detection methods with PCR using the *fliC-d* gene and the Vi capsular antigen gene.

Methods: Thirty-six *Salmonella* strains isolated at Pusan National University Hospital from 1997 to 2004 were used for a rapid identification of *S. enterica* serovars Typhi and Paratyphi A with multiplex PCR that uses the O (*rfbE*, *rfbS*), H (*fliC-d*, *fliC-a*), and Vi (*viaB*) antigen genes. To further characterize these *Salmonella* strains, we used PCR to detect genes (*invA* and en-

terotoxin) for proposed virulence factors and performed antimicrobial susceptibility testing, serotyping and pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological characteristics.

Results: Most strains were resistant to ampicillin. By PCR, *tyv*, *prt*, *fliC-d* and *viaB* genes were detected in serovar Typhi, whereas only *fliC-a* and *prt* genes were found in serovar Paratyphi A. In addition, *invA* and enterotoxin genes were detected in both strains.

Conclusion: This method enabled us to identify and differentiate serovars Typhi and Paratyphi A by only a single PCR assay. That is, clinically important human pathogens were more rapidly and specifically detected and identified with multiplex PCR. (Korean J Clin Microbiol 2007;10:6-13)

Key Words: *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi, Multiplex PCR, Genotype

서 론

장관계 감염 세균성 병원균 가운데 장티푸스 및 살모넬라증 원인균은 우리나라에서 토착화되어 있고 국가 감시질환 대상 병원체로 중요시되고 있으며 경제, 사회적 여건이 향상됨에도 불구하고 대규모 공급의 현대 식품 산업의 출현과 자유로운 해외여행 및 국제무역의 자유화 등으로 살모넬라균에 의한 감염이 증가 추세를 보이고 있다. 2001년부터 2005년까지 서울시내 식중독 환자에서 분리된 살모넬라균의 분포는 Enteritidis가 41.2%, Typhi 24.2%, Typhimurium 8.5%였으며 연도별로는 2002년에 가장 많은 살모넬라균이 분리 동정되었으며, 점차 감소하다가 2005년에 다시 증가하고 있다고 보고되었으며[1], 2004년부터 2년간의 국내에서 유행하는 살모넬라의 혈청형은 Enteritidis가 49%, Typhimurium과 장티푸스의 원인병원체인

Typhi가 각각 15.8%와 7.9%를 차지하였으며, 이들 3가지 혈청형이 차지하는 빈도는 모두 72.7%로 보고하였다[2]. 특히 Typhi는 세계적으로 중부아시아와 동남아시아에서 유행하며 우리나라에서도 높은 빈도로 나타나는 혈청형이었지만 최근 들어 우리나라에서 장티푸스 환자의 발생이 줄어드는 추세에 있어 분리건수도 함께 줄어들고 있다[3]. 그러나 Park 등[1]의 보고에 따르면 국내에서는 다른 국가에서보다 Typhi 및 Paratyphi의 분리율이 높았으며 Paratyphi는 2002년에 30주로 다른 해의 10배 이상이 검출되어 매우 특별한 유행을 나타내었고, 특히 Typhi의 경우 2001년을 제외하고는 매년 일정한 군수가 검출되는 것으로 보아 풍토성인 것으로 생각된다. 또한 과거 10년 전에는 분리빈도가 미미했던 Paratyphi A는 9번째로 분리빈도가 높아졌고 최근에는 Paratyphi A의 quinolone계 항생제 내성률도 높아지고 있는 것으로 보고되었다[4].

최근 집단급식소에서의 대규모 집단발생으로 환자발생이 급격히 증가하고 있지만 살모넬라균을 검출하기 위한 전통적인 방법은 일반적으로 증식배양, 선택배양 및 생화학적 성상 실험이나 혈청학적 검사를 이용하여 분리하고 동정되므로 최소한 2~5일이 소요되어 조기에 검출하여 식중독을 차단하는 데 많

Received 4 July, 2006, Accepted 20 September, 2006

Correspondence: Yung Bu Kim, Department of Microbiology and Immunology, College of Medicine, Pusan National University, 10, Ami-dong 1-ga, Seo-gu, Busan 602-739, Korea. (Tel) 82-51-240-7712, (Fax) 82-51-243-2259, (E-mail) ybkim@pusan.ac.kr

은 어려움이 있으며[5,6], 현재 우리나라에서는 열성질환의 원인적 규명도 없이 항균제가 남용되어 장티푸스의 임상상 및 경과가 변형되는 수가 많고, 장티푸스를 진단하는 방법들도 특징적인 임상조건 외에 혈청검사, 세균배양검사 등이 이용되고 있다. 혈청형을 결정하는 실험의 경우 혈청 실험에 소요되는 배지들과 O 항혈청, H 항혈청의 종류가 많고 편모의 종류에 따라 6~8일 정도의 시일이 소요되기도 하며 Widal 반응검사를 대체할 혈청검사 방법들도 연구되었으나 예민도, 특이도 또는 실제 활용도의 측면에서 실용화되기 어렵다[7,8]. 이러한 문제점을 고려할 때 기존의 진단법을 보완하여 신속하게 검출할 수 있는 새로운 진단기법의 도입이 필요하다. 최근 분자 생물학의 기술발전에 따라 선진국에서는 중요 살모넬라 병원체에 대한 항생제 내성, phage형 뿐만 아니라 혈청형 진단에 있어서도 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)[9,10]을 이용하여 표적 유전자를 검출함으로써 신속하게 균을 분리 동정하거나 ribotyping 및 pulse-field gel electrophoresis (PFGE)[4,11, 12]법을 이용한 분자생물학적 역학지표의 개발이 활발히 추진되고 있으며, 특히 산발적 혹은 집단적으로 발생한 장티푸스의 역학적 조사에서 phage typing 외에 ribotyping나 PFGE, random amplified polymorphic DNA (RAPD) 등이 감염원의 규명과 전파경로의 추적에 유용하다고 보고하였다[3,13-17]. 따라서 장티푸스를 조기에 빠르고 정확하게 진단할 수 있는 새로운 진단기법의 필요성이 제기되면서 유전자 기법을 이용한 살모넬라균의 혈청형 동정은 물론 병원성 인자 및 분자 생물학적 역학 연구가 현 실정에 절실하다고 할 수 있다.

본 연구에서는 임상가검물에서 분리한 *Salmonella enterica*

serovar Typhi와 Paratyphi A의 신속한 혈청형 동정을 위하여 살모넬라균의 특이적인 항원의 구조를 이용한 multiplex PCR법을 실시하고, 병원인자의 검출, antibiogram 양성, RAPD 및 PFGE법을 이용한 genomic DNA 형별을 실시하여 분자생물학적 역학지표를 작성함으로써 감염원 추적 및 예방관리에 적극 활용될 수 있고 감염환자에 대한 감시체계를 구축하여 합리적인 질병 관리 방안을 마련하고자 한다.

재료 및 방법

1. 균주

1997년부터 2004년까지 8년에 걸쳐서 부산대학교병원 진단검사의학과에서 혈액, 소변 및 대변 등의 임상검체에서 분리한 serovar Typhi 23균주와 serovar Paratyphi A 13균주를 시험균주로 사용하였다.

2. PCR법에 의한 균 분리 동정 및 병원인자의 검출

Serovar Typhi와 Paratyphi A의 신속한 혈청형 동정 확인을 위하여 O (*rfbE*, *rfbS*), H (*fliC-d*, *fliC-a*) 그리고 Vi (*viaB*) 항원 유전자를 이용하여 multiplex PCR법을 실시하였으며, 각각의 항원 유전자의 검출용 primer는 Table 1과 같이 oligonucleotides를 합성하여 사용하였다[18]. 또한 살모넬라균의 병원인자 *invA* 유전자의 검출을 위한 primer로는 Primer set SIN-1, SIN-2 (TaKaRa Biomedicals, Otsu, Japan) 그리고 살모넬라균의 enterotoxin 유전자의 검출을 위한 primer로는 STN-1, STN-2 (TaKaRa Biochemical)를 사용하여 PCR은 아래의 방법

Table 1. Primers for multiplex PCR amplification of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A

Target gene	Primer pair	Length (bp)	Amplified fragment size (bp)	Source
<i>tyv</i> (<i>rfbE</i>)				
tyv-s	5'-GAG GAA GGG AAA TGA AGC TTT T-3'	22	615	M29682
tyv-as	5'-TAG CAA ACT GTC TCC CAC CAT AC-3'	23		M29682
<i>prt</i> (<i>rfbS</i>)				
parat-s	5'-CTT GCT ATG GAA GAC ATA ACG AAC C-3'	25	258	M29682
parat-as	5'-CGT CTC CAT CAA AAG CTC CAT AGA-3'	24		M29682
<i>viaB</i>				
vi-s	5'-GTT ATT TCA GCA TAA GGA G-3'	19	439	D14156
vi-as	5'-CTT CCA TAC CAC TTT CCG-3'	18		D14156
<i>fliC</i>				
fliCcom-s	5'-AAT CAA CAA CAA CCT GCA GCG-3'	21	750 (489)* 329	L21912
fliCd-as	5'-GCA TAG CCA CCA TCA ATA ACC-3'	21		L21912
fliCa-as	5'-TAG TGC TTA ATG TAG CCG AAG G-3'	22		X03393
fliCcom-fliCd-as				
fliCcom-fliCa-as				

*Number in parentheses represents size of PCR product of H : j gene.

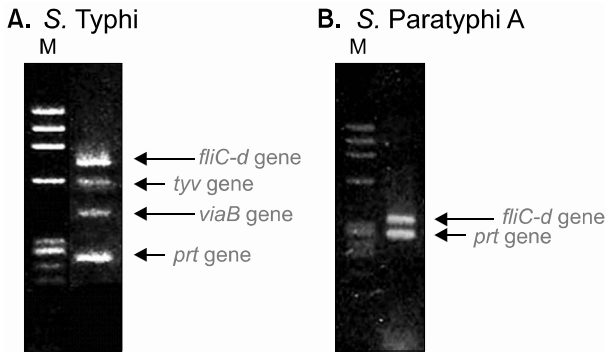


Fig. 1. Identification of *Salmonella* serovar Typhi (A) and Paratyphi A (B) by multiplex PCR. The PCR products were separated by 2% agarose gel electrophoresis. Lane M: phage ϕ X174 DNA digested with *Hae*III (molecular size marker).

에 준하여 실시하였다. 실험균주는 DNA 추출은 실시하지 않고 가열법으로 LB broth 5 mL에 접종하여 37°C, 18시간 진탕 배양한 균액을 95°C에서 10분간 가열하고, 상청액을 -20°C 냉동고에 보존해 두었다가 실험에 사용하였다. O (*rfbE*, *rfbS*), H (*fliC-d*, *fliC-a*) 그리고 Vi (*viaB*) 항원 유전자의 검출을 위한 증폭과정은 다음과 같다. 즉, 열변성 95°C, 30초간 실시하고, 60초간 55°C에서 annealing과정, 90초간 72°C 신장과정을 25 cycles로 하여 thermal cycler (PTC-100, MJ Research Inc., Waltham, MA, USA)에서 실시하였고, 살모넬라균의 병원인자 *invA*와 enterotoxin 유전자의 검출을 위한 증폭과정은 TaKaRa manual에 따라 94°C, 5분간 예비가열한 후, 열변성 94°C, 30초간 실시하고, 30초간 55°C에서 annealing과정, 30초간 72°C 신장과정을 20 cycles을 실시하였다. 각각의 PCR 증폭산물 10 μ L와 분자량 표지자(ϕ X174 *Hae*III digested: TaKaRa Biomedicals)를 2% agarose gel에 전기영동하고, DNA 단편은 UV하에서 ethidium bromide (EtBr) 염색하여 위치를 확인하였다.

3. 항생제 감수성 시험

항생제 감수성 시험은 ampicillin (Am), carbenicillin (Cb), cefoxitin (Cfx), chloramphenicol (C), nalidixic acid (Na), tetracycline (Te), trimethoprim/sulfameth oxazole (TMP/SMX) 등 7종류에 대하여 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)의 방법에 따라 디스크 확산법을 실시하였다[19].

4. Genomic DNA의 유전자형별

(1) AP-PCR을 이용한 random amplified polymorphic DNA (RAPD)법: 염색체 DNA의 분리는 실험균주를 LB 한천평판배지에서 37°C 24시간 배양한 후 1개의 집락만을 선택하여 Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하고, primers는 RAPD Analysis Primer Set (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)의 6종류 pri-

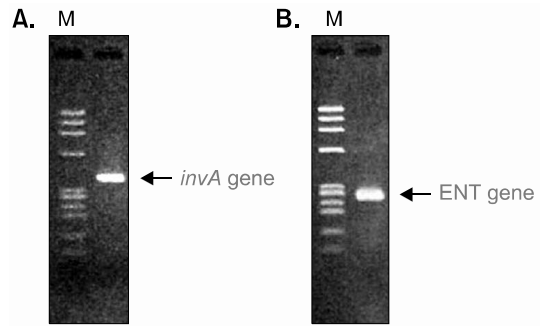


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products targeting *invA* (A) and enterotoxin (B) genes. Sizes of *invA* gene and enterotoxin gene PCR products were 378 bp and 264 bp, respectively. Lane M: phage ϕ X174 DNA digested with *Hae*III (molecular size marker).

mers 즉, primer 1 (5'-GGTGCGGGAA-3'), primer 2 (5'-GTT-TCGCTCC-3'), primer 3 (5'-GTAGACCCGT -3'), primer 4 (5'-AAGAGCCCGT-3'), primer 5 (5'-AACGCGCAAC-3'), primer 6 (5'-CCCGTCAGCA-3')들을 사용하였다. 증폭과정은 95°C 4분간 예비가열한 후, 열변성 95°C 1분간 실시하고 36°C에서 1분간 annealing과정 72°C 2분간 신장과정을 45 cycles 실시하였다. 분자량 표지자로 phage ϕ X174 *Hae*III digested (TaKaRa Biomedicals)와 phage λ DNA *Hind*III digested를 사용하였으며, 1.5% agarose gel에서 전기영동하고, DNA 단편은 UV하에서 EtBr 염색하여 확인하였다[20].

(2) Pulsed-field gel electrophoresis법: 염색체 DNA의 분리는 GenePath Universal Module (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)와 GenePath Kit (Bio-Rad)를 이용하여 Bio-Rad manual에 따라 plug mold를 제조하고 제한효소 *Xba*I을 처리하였다. PFGE는 CHEF-DR III system (Bio-Rad)을 사용하였고 1.0% pulsed-field certified agarose gel에 initial pulse 5초, final pulse 45초, 6 V/cm의 조건으로 14°C에서 22시간 전기 영동하여 확인하였다.

결 과

1. PCR법에 의한 균 분리 동정 및 병원인자의 검출

Serovars Typhi와 Paratyphi A의 신속한 혈청형 동정 확인을 위하여 모든 실험균주를 대상으로 동시에 multiplex PCR법을 실시한 결과는 Table 2와 같았다. Serovar Typhi의 경우 *tyv*, *prt*, *fliC-d*와 *viaB* 유전자가 모두 검출되는 반면 serovar Paratyphi A의 경우 *fliC-a*와 *prt* 유전자만이 관찰되었고(Fig. 1), 중요한 병원인자인 *invA*와 enterotoxin 유전자는 모든 균주들이 각각 378 bp와 264 bp에서 양성으로 확인되었다(Fig. 2).

Table 2. Distribution of *Salmonella* serovar Typhi and Paratyphi A isolates by antibiogram, multiplex PCR, virulence factors, RAPD, and PFGE

Strain No.	Antibiogram		Multiplex PCR				Virulence factors			RAPD	PFGE	
			<i>tyv</i>	<i>fliC-d</i>	<i>viaB</i>	<i>fliC-a</i>	<i>prt</i>	<i>invA</i>	ENT			
1	S. Typhi	AmCfxCNaTe	I	+	+	+	-	+	+	+	A	I
2	"	AmCfxNa	II	+	+	+	-	+	+	+	B	II
3	"	Am	VI	+	+	+	-	+	+	+	B	III-a
4	"	Am	VI	+	+	+	-	+	+	+	B	IV-a
5	"	Am	VI	+	+	+	-	+	+	+	B	V-a
6	"	Am	VI	+	+	+	-	+	+	+	B	V-b
7	"	AmCfx	IV	+	+	+	-	+	+	+	B	IV
8	"	AmCfxCNaTe	III	+	+	+	-	+	+	+	A	V-c
9	"	AmCfx	IV	+	+	+	-	+	+	+	B	VI
10	"	AmCfx	IV	+	+	+	-	+	+	+	B	V-c
11	"	AmCfx	IV	+	+	+	-	+	+	+	B	III-b
12	"	AmCfx	IV	+	+	+	-	+	+	+	B	III-c
13	"	AmCfx	IV	+	+	+	-	+	+	+	B	VII
14	"	AmCfx	IV	+	+	+	-	+	+	+	B	V-a
15	"	Am	VI	+	+	+	-	+	+	+	B	VIII
16	"	Am	VI	+	+	+	-	+	+	+	B	IX
17	"	Am	VI	+	+	+	-	+	+	+	B	V-a
18	"	Am	VI	+	+	+	-	+	+	+	B	V-b
19	"	AmCfx	IV	+	+	+	-	+	+	+	B	v-a
20	"	AmNa	V	+	+	+	-	+	+	+	B	X
21	"	Am	VI	+	+	+	-	+	+	+	B	XI
22	"	Am	VI	+	+	+	-	+	+	+	B	III-b
23	"	Am	VI	+	+	+	-	+	+	+	B	III-b
24	S. Paratyphi A	Am	VI	-	-	-	+	+	+	+	a	I-a
25	"	AmNa	V	-	-	-	+	+	+	+	a	I-b
26	"	AmNa	V	-	-	-	+	+	+	+	a	I-b
27	"	AmNa	V	-	-	-	+	+	+	+	a	I-b
28	"	AmNa	V	-	-	-	+	+	+	+	a	I-b
29	"	AmNa	V	-	-	-	+	+	+	+	a	I-b
30	"	Am	VI	-	-	-	+	+	+	+	a	I-a
31	"	AmNa	V	-	-	-	+	+	+	+	a	I-b
32	"	AmNa	V	-	-	-	+	+	+	+	a	I-b
33	"	AmNa	V	-	-	-	+	+	+	+	a	I-b
34	"	AmNa	V	-	-	-	+	+	+	+	a	I-b
35	"	AmNa	V	-	-	-	+	+	+	+	a	I-b
36	"	Am	VI	-	-	-	+	+	+	+	a	I-a

2. 항생제 감수성 시험

총 7종류의 약제감수성 실험 결과 I~VI형의 6종류로 분류할 수 있었다(Table 2). 그 중 VI형(Am)이 14 균주(38.9%)로 가장 많았으며 V형(AmNa)이 11균주(30.6%), IV형(AmCfx)이 8균주(22.2%) 그리고 나머지 I형(AmCfxCNaTe), II형(AmCfxCNaTe), III형(AmCfxNa)은 각각 1균주(2.8%)씩 나타났다. 따라서 사용균주 모두가 Am에 내성을 나타내었으며, 4가지 이상의 약제에서 내성을 나타낸 균주는 2균주에 불과하였고 대부분의 균주들이 1~2개의 약제에만 내성을 나타내었다.

3. Genomic DNA의 유전자 형별

Salmonella 36균주의 RAPD 및 PFGE 형별의 결과는 Table 2와 같다. 6종류의 primers로서 RAPD법을 실시한 결과 대부분 동일한 유전자형별로 serovar Typhi 23균주는 2종류의 유전자형별로 분류할 수 있었고, serovar Paratyphi A 13균주는 모두 동일한 형별을 나타내었다. PFGE법의 실험 결과는 serovar Typhi와 Paratyphi A를 제한효소 *XbaI*에 의한 DNA절편 양식으로 유사성을 비교하여 I형, II형 및 III형으로 임의로 형별하였다. DNA절편은 약 13~16개로 크기는 40 kb에서 500 kb에

분포하였으며 절편의 수와 크기에 따라서 serovar Typhi는 11가지(I~XI)의 유전자형별로 분류하였고 그 중 III, IV, V형의 경우 각각 3가지 아형(subtype)으로 세분화하였으며 serovar Paratyphi A는 하나의 동일한 형별로 나타났고 이 중 3군주만이 아형, 즉 I~a로 분류하였다.

고 찰

살모넬라균은 식중독을 일으키는 대표적인 병원성 미생물로서 1군 법정 전염병에 해당하는 장티푸스와 파라티푸스의 원인균으로 기타 살모넬라종을 유발하고, 1885년 Salmon 등에 의해 처음으로 보고된 이래 지속적으로 수많은 혈청형의 균이 분리되고 있는 세균으로 현재까지 2,000종 이상이 알려져 있으며, 이 중에서 100여 종이 사람과 동물 그리고 식품에서 빈번히 분리되고 있다[21,22]. 살모넬라균은 균체 표면항원 성분 중 serogroup의 특성을 부여하는 성분인 lipopolysaccharide에 해당하는 균체(O)항원과 flagella protein에 해당하는 편모(H)항원의 다형성에 근거하여 혈청형을 결정할 수 있음이 보고되었다 [23,24]. 특히 대부분의 임상 식중독 분리균주의 90% 이상이 *S. enterica* subspecies *enterica*의 혈청형에 속하며 이들 중에서 capsule (Vi)항원을 가지고 있는 균은 *S. Typhi*, *S. Dublin* 그리고 *S. Paratyphi C*뿐이며 분리과정이나 계대배양 중에 Vi 항원이 손실되는 V-W 변이를 일으킬 수 있다[25]. 따라서 살모넬라균의 분리 동정은 일반적으로 임상 검사실에서 실시하는 생화학적인 성장 실험이나 혈청학적 검사의 경우 혈청형을 결정하는 실험과정이 많기 때문에 시간이 오래 걸리며, 혈청 실험에 소요되는 배지들과 혈청형의 종류가 많고, 가격이 비싸기 때문에 경제적이지 않다. 또한 잦은 배양을 통하여 다른 미생물이나 곰팡이의 오염에 노출될 수 있다는 실험상의 단점이 있으므로 이러한 기존의 혈청형 진단방법의 문제점을 보완한 신속한 살모넬라균의 혈청형 동정이 필요하다. 특히 살모넬라균에 의한 식품매개질환은 감염이 발생할 경우 빠른 혈청형 결정이 필수적이며, 집단감염이 발생하였을 경우 원인균을 몇 시간만이라도 신속하게 확인 동정하는 것이 매우 중요하며, 최근 선진국에서는 PCR법을 이용한 표적 유전자를 검출함으로써 보다 신속하고 정확한 살모넬라균의 분리 동정이 시도되고 있다[26]. 특히 *S. Typhi*의 O 항원은 주세포벽 항원으로 다른 salmonella와는 물론 계통발생학적으로 근접한 *Citrobacter*, *Escherichia*, *Shigella* 등의 균체항원에 대하여 특이성이 떨어지나, Vi 항원은 병독성이 있는 모든 *S. Typhi*의 균주에 존재하므로 비교적 *S. Typhi*에 특이한 구조라 볼 수 있다. 또한 H 항원의 경우 편모 사상체의 구조 단백질 flagellin에 H₁ (*fliC*)과 H₂ (*fliB*)의 두 가지 유전자좌가 존재하고 이에 의한 상변이(phase variation)가 일어나는데[27], 대부분의 살모넬라균이 H₁과 H₂ 편모항원을 보유하므로 편모 자체가 *S. Typhi*의 특이한 구조는 아니지만 *S.*

*Typhi*는 phase 1 (H₁) 항원만을 가지며 이를 d항원으로 명명되고 있으며, *S. Typhi*와 가장 유사한 구조를 갖는 것으로 알려진 *S. muenchen*을 대상으로 하여 d항원의 핵산 배열을 규명하여 이후 *S. Typhi* 편모항원의 특이한 구조가 밝혀졌다[26,28]. 최초로 *S. Typhi*에 대하여 알려진 구조 및 유전자 배열을 이용하여 분자생물학적 방법으로 검출하려고 시도한 것은 Vi 항원의 유전자 배열을 찾는 DNA probing으로 이를 페루와 인도네시아에서 분리된 *S. Typhi* 균주의 확인에 이용한 결과, 이 DNA probe가 *S. Typhi*의 동정에 매우 높은 예민도와 특이도가 있음을 보고하였으며, 그 후 같은 DNA probe를 이용하여 장티푸스 환자의 혈액에서 *S. Typhi*를 검출하는 데 성공하였다[29-31]. 이러한 연구 결과 Vi DNA probe를 이용하면 세균배양의 과정을 거치지 않고 비교적 빠른 시간 내에 *S. Typhi*의 존재 여부를 증명할 수 있음을 알 수 있으나 DNA probing의 일반적인 단점, 즉 기술적인 과정이 쉽지 않고 DNA의 증폭이 이루어지는 것이 아니므로 균혈증의 정도가 낮은 장티푸스의 경우 검사의 예민도를 높이기 위해 검체 내 균농도의 조치가 필요하다는 점들이 지적되면서 이러한 단점을 개선하기 위해 PCR을 이용하고 있으며 최근 균혈증의 정도가 낮은 장티푸스의 새로운 진단기법으로 많이 응용되고 있다. 본 연구에서는 *S. Typhi*의 O 항원의 합성에 관여하는 tyvelose epimerase (*tyv*)와 paratose synthase (*prt*) 유전자, H 항원(*fliC-d*, *fliC-a*)과 Vi 항원(*viaB*)의 유전자의 primers를 디자인하여 multiplex PCR법으로 분리 동정을 실시하였다. 특히 *prt*와 *tyv* 유전자는 serovar Typhi와 Paratyphi A에 모두 존재하지만 serovar Paratyphi A의 *tyv* 유전자는 CDP-Tyvelose epimerase를 코드화하여 CDP-paratose를 CDP-tyvelose에 변환시키는 데 있어 frameshift 돌연변이를 일으켜 1 bp가 삭제되어 CDP-tyvelose epimerase를 활발히 생산하지 않고, *tyv* 유전자의 codon 4를 stop codon으로 전환시킨다[32]. 따라서 *tyv* 유전자는 serovar Paratyphi A에서는 검출되지 않고 serovar Typhi에 특이적인 primer를 디자인하기 위하여 위의 삭제된 부분을 사용하였다. 그 결과 *S. Typhi*의 경우 *prt*, *tyv*, *viaB*, *fliC-d* 유전자의 4개 band를 보이는 반면, *S. Paratyphi A*의 경우 *prt*와 *fliC-a* 유전자의 2개 band만을 나타내어 특이적 구별이 가능하였고, 주요 병원인자인 *invA*와 enterotoxin에서는 모두 양성으로 나타났다.

장티푸스의 감염원과 감염경로의 조사에서 분리균주들의 항생제 내성 양상, 생화학적 성장, phage typing, plasmid 분석 등의 고전적 지표들이 오래 전부터 사용되어 왔으나, 최근 분자생물학적 기법의 발달로 ribotyping, restriction endonuclease analysis, RAPD 및 PFGE 방법들이 개발되어 사용되고 있으며 [33-37], 이 중에서도 PFGE 방법은 고도의 감별능력과 재현성을 바탕으로 다양한 역학적 자료와 높은 상관성을 보여주며 개개의 균주에 대한 변별력이 가장 우수한 것으로 평가되고 있으며, RAPD는 특정 항체와 높은 순도의 DNA를 요구하지 않음

며 많은 시료를 빠른 시간내에 처리할 수 있으면서도 PFGE와 비슷한 변별력을 가지고 있어 이미 여러 가지 병원균의 역학 조사와 계통 조사에 활용되고 있다[38,39]. 본 실험에서 *XbaI*을 이용한 PFGE와 6종류의 primer를 사용한 RAPD법과 비교해 볼 때에 대부분 동일한 형별을 나타내는 RAPD에 비해 PFGE가 좀더 높은 변별력을 보였다. 또한 serovar Paratyphi A의 경우 항균제내성과 PFGE 형별이 유전학적 상관관계가 있음을 보여주는 반면 serovar Typhi의 경우 항균제내성의 형별과 PFGE 및 RAPD 형별은 서로 다른 양상을 나타내어 완벽한 감별력을 보여주지 못하였다. 최근에 장염비브리오 및 병원성 장내세균에서 균주 감별을 목적으로 다양한 분자유전적인 방법들을 비교 검토하였으나, 본 실험에서와 마찬가지로 일괄성이 있는 결과를 얻지 못하였다[40-42]. PFGE 형별은 역학적인 지표로서 분자역학적 해석이 널리 실시되고 집단발생 사례에서 이용되고 있으며 가족간의 감염상황을 추적할 수 있고, 전국 규모의 식중독 발생에서 PFGE 형별에 의한 역학 해석과 공통의 식품을 매개로 하는 전국적 규모의 산발적인 발생의 추적 등 그 유용성이 확인되고 있다[43]. 그러나 PFGE 형별은 감염원, 감염경로를 규명하기 위해 유효한 수단이지만 많은 비용과 5~7일간의 장시간이 소요되고 일반 임상미생물 실험실에서 실시하기는 어렵다는 단점이 있으며 RAPD는 재현성의 문제에 대한 primer의 선택, 적합한 PCR 조건의 설정, 균주의 DNA 순도 등을 검토하여야 하지만, 2~3일 내의 단시간에 많은 균주의 유사성을 간편하게 조사할 수 있었고 특히 집단 감염 사례에서 유효한 방법으로 평가되고 있다. 따라서 계속적으로 새로운 방법이 개발 연구되어야 할 것으로 사료되며, 살모넬라균의 분포상황, 역학적인 연구 및 분자유전학적인 검출법에 대한 연구가 필요한 우리나라의 경우 본 연구의 multiplex PCR법을 이용하여 장티푸스와 파라티푸스를 조기에 빠르고 정확하게 진단함으로써, 앞으로 PCR법이 신속한 살모넬라균의 혈청형 동정에 새로운 진단기법으로 응용될 수 있음을 시사하였고, 향후 혈액 및 대변 검체를 통한 보건자의 검색 등에도 폭넓게 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 2005년도 부산대학교 의학연구소 연구비(2005-40)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

1. Park SG, Kim MS, Lee YK. Trend of antimicrobial susceptibility and multiple drug resistance patterns of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from foodborne patients in Seoul between 2001 and 2005. *J Fd Hyg Safety* 2006;21:23-30.
2. Kim SH, Kim SH, Chun SG, Choi ES, Salmonella Surveillance

Group, Lee BK. Prevalence of *Salmonella serovars* isolated from domestic residents and overseas travelers in Korea, 2004~2005. *J Bacteriol Virol* 2006;36:69-72.

3. Yoo S, Pai H, Byeon JH, Kang YH, Kim S, Lee BK. Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype typhi infections in Korea for recent 9 years: trends of antimicrobial resistance. *J Korean Med Sci* 2004;19:15-20.
4. Kim S, Lim OY, Kim SH, Kim JY, Kang YH, Lee BK. Pulsed-field gel electrophoresis and mutation typing of *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A isolated from outbreak and sporadic cases, 1998~2002, Korea. *J Microbiol Biotechnol* 2003;13:155-8.
5. Olsen JE, Aabo S, Hill W, Notermans S, Wernars K, Granum PE, et al. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int J Food Microbiol* 1995;28:1-78.
6. Alvarez J, Sota M, Vivanco AB, Perales I, Cisterna R, Rementeria A, et al. Development of a multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *J Clin Microbiol* 2004;42:1734-8.
7. Edelman R and Levine MM. Summary of an international workshop of typhoid fever. *Rev Infect Dis* 1986;8:329-49.
8. Park SG, Park SK, Jung JH. Antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. isolated from diarrhoea patients in Seoul from 1996 to 2001. Report of S.I.H.E. 2002;38:17-30.
9. Song JH. Detection of *Salmonella typhi* by polymerase chain reaction. *Korean J Infect Dis* 1991;23:251-6.
10. Zhu Q, Lim CK, Chan YN. Detection of *Salmonella typhi* by polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* 1996;80:244-51.
11. Woo YK, Lee SH, Yi CH, Lee OS, Kim BH. Genetic diversity of *Salmonella enterica* subspecies enterica bioserovar Pullorum using the pulsed-field gel electrophoresis. *Korean J Vet Res* 2003;43:77-86.
12. Ridley AM, Threlfall EJ, Rowe B. Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1998;36:2314-21.
13. Fica AE, Prat-Miranda S, Fernandez-Ricci A, D'Ottone K, Cabello FC. Epidemic typhoid in Chile: analysis by molecular and conventional methods of *Salmonella typhi* strain diversity in epidemic (1977 and 1981) and non-epidemic (1990) years. *J Clin Microbiol* 1996;34:1701-7.
14. Xercavins M, Llovet T, Navarro F, Morera MA, More J, Bella F, et al. Epidemiology of an unusually prolonged outbreak of typhoid fever in Terrassa, Spain. *Clin Infect Dis* 1997;24:506-10.
15. Navarro F, Llovet T, Echeita MA, Coll P, Aladuena A, Usera MA, et al. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar typhi. *J Clin Microbiol* 1996;34:2831-4.
16. Shin YH, Yoo JS, Park MS, Kang YH, Lee BK, Kim HH. Pulsed-field gel electrophoresis pattern, phage type and drug susceptibility of *Salmonella typhi* isolates from an outbreak in Pusan City in 1996. *Korean J Infect Dis* 1997;29:201-8.
17. Thong KL, Goh YL, Radu S, Noorzaleha S, Yasin R, Koh YT, et al. Genetic diversity of clinical and environmental strains of *Salmonella enterica* serotype Weltevreden isolated in Malaysia. *J Clin Microbiol* 2002;40:2498-503.
18. Hirose K, Itoh K, Nakajima H, Kurazono T, Yamaguchi M, Moriya K, et al. Selective amplification of *tyv* (*rjfbE*), *pri* (*rjfbS*), *viaB*, and *fljC* genes by multiplex PCR for identification of *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A. *J Clin Microbiol* 2002;40:633-6.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards

- for antimicrobial susceptibility testing; sixteenth informational supplement. CLSI document M100-S16. Wayne, PA; CLSI, 2006.
20. Kim YB. Studies on virulence factors and application of arbitrarily-primed polymerase chain reaction analysis to epidemiological of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol Virol* 2001;31:123-31.
 21. Holt JG, Krieg NR, et al. eds. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed, Maryland; Williams & Wilkins, 1994;186-7.
 22. Gillespie JH, Timoney JF, et al. eds. *Hagan and Bruner's Infections Disease of Domestic Animals*. 8th ed, Ithaca, New York; Cornell University Press, 1988:84.
 23. Fabricant J and Calnek BW. Avian disease. *Cornell Vet* 1985;75:124-9.
 24. Kwang J, Littledike ET, Keen JE. Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Lett Appl Microbiol* 1996;22:46-51.
 25. Kim SH, Kim SH, Lee SH, Kang YH, Lee BK. Rapid serological identification for monophasic *Salmonella* serovars with a *hin* gene-specific polymerase chain reaction. *J Bacteriol Virol* 2005;5:291-7.
 26. Frankel G, Newton SM, Schoolnik GK, Stocker BA. Unique sequences in region VI of the flagellin gene of *Salmonella typhi*. *Mol Microbiol* 1989;3:1379-83.
 27. Iino T, Komeda Y, Kutsukake K, Macnab RM, Matsumura P, Parkinson JS, et al. New unified nomenclature for the flagellar genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* 1988;52:533-5.
 28. Wei LN and Joys TM. Covalent structure of three phase-1 flagellar filament proteins of *Salmonella*. *J Mol Biol* 1985;186:791-803.
 29. Rubin FA, Kopecko DJ, Noon KF, Baron LS. Development of a DNA probe to detect *Salmonella typhi*. *J Clin Microbiol* 1985;22:600-5.
 30. Rubin FA, Kopecko DJ, Sack RB, Sudermono P, Yi A, Maurta D, et al. Evaluation of a DNA probe for identifying *Salmonella typhi* in Peruvian and Indonesian bacterial isolates. *J Infect Dis* 1988;157:1051-3.
 31. Rubin FA, McWhirter PD, Punjabi NH, Lane E, Sudermono P, Pulungsih SP, et al. Use of a DNA probe to detect *Salmonella typhi* in the blood of patients with typhoid fever. *J Clin Microbiol* 1989;27:1112-4.
 32. Hashimoto Y, Itho Y, Fujinaga Y, Khan AQ, Sultana F, Miyake M, et al. Development of nested PCR based on the *ViaB* sequence to detect *Salmonella typhi*. *J Clin Microbiol* 1995;33:775-7.
 33. Esteban E, Snipes K, Hird D, Kasten R, Kinde H. Use of ribotyping for characterization of *Salmonella serotypes*. *J Clin Microbiol* 1993;31:233-7.
 34. Nastasi A, Mammina C, Villafrate MR. rDNA fingerprinting as a tool in epidemiological analysis of *Salmonella typhi* infections. *Epidemiol Infect* 1991;107:565-76.
 35. Thong KL, Ngeow YF, Altwegg M, Navaratnam P, Pang T. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *J Clin Microbiol* 1995;33:1070-4.
 36. Lin AW, Usera MA, Barrett TJ, Goldsby RA. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J Clin Microbiol* 1996;34:870-6.
 37. Thong KL, Puthuchery S, Yassin RM, Sudarmono P, Padmidewi M, Soewandjojo E, et al. Analysis of *Salmonella typhi* isolates from Southeast Asia by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1995;33:1938-41.
 38. Mare L, Dick LM, van der Walt ML. Characterization of south african isolates of *Salmonella enteritidis* by phage typing, numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. *Int J Food Microbiol* 2001;64:237-45.
 39. Bender JB, Hedberg CW, Boxrud DJ, Besser JM, Wicklund JH, Smith KE, et al. Use of molecular subtyping in surveillance for *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *N Engl J Med* 2001;344:189-95.
 40. Liu PY, Lau Y, Hu BS, Shyr JM, Shi ZY, Tsai WS, et al. Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods. *J Clin Microbiol* 1995;33:1779-83.
 41. Soldati I and Piffaretti JC. Molecular typing of *Shigella* strains using pulsed field gel electrophoresis and genome hybridization with insertion sequences. *Res Microbiol* 1991;142:489-98.
 42. Liverna E, Garcia-Migura L, Breslin MF, Davies RH, Woodward MJ. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype enteritidis from english poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. *J Clin Microbiol* 2001;39:154-61.
 43. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijns M, van de Lee T, Hornes M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995;23:4407-14.

=국문초록=

Salmonella enterica serovars Typhi와 Paratyphi A의 Multiplex PCR을 이용한 동정 및 유전자 특성

¹부산대학교 의과대학 미생물학 및 면역학교실, ²진단검사의학교실

문지영¹, 김영부¹, 장철훈²

배경: *Salmonella enterica* serovars는 다양한 숙주에서 위장관 및 전신질환을 일으킨다. 장티푸스나 파라티푸스의 진단법으로 일반적인 배양법과 생화학적 검사들이 이용되고 있지만 전통적인 진단법은 많은 시일이 소요되어 장티푸스를 조기에 빠르고 정확하게 진단할 수 있는 새로운 진단기법의 필요하다. 최근 일부 연구에서 이미 serovar Typhi의 검출에 *fliC-d* 유전자, Vi 항원 유전자에 의한 PCR법이 사용되고 있다.

방법: 1997년부터 2004년까지 8년에 걸쳐서 부산대학교병원 진단검사의학과에서 분리한 *S. Typhi* 23균주와 *S. Paratyphi A* 13균주를 대상으로 신속한 혈청형 동정 확인을 위하여 O (*rfbE*, *rfbS*), H (*fliC-d*, *fliC-a*) 그리고 Vi (*viaB*) 항원 유전자를 이용한 multiplex PCR법을 실시하고, 병원인자의 검출, antibiogram 양상과 RAPD 및 PFGE법을 이용한 genomic DNA 형별을 통하여 분자생물학적 역학분석을 실시하였다.

결과: 대부분의 *Salmonella* 균주가 ampicillin에서 내성을 나타내었으며, PCR 결과 serovar Typhi의 경우 *tyv*, *pri*, *fliC-d*와 *viaB* 유전자가 모두 검출되는 반면 serovar Paratyphi A의 경우 *fliC-a*와 *pri* 유전자만이 관찰되었고 중요한 병원인자인 *invA*와 enterotoxin 유전자는 모든 균주에서 양성으로 확인되었다.

결론: 이상의 결과로 multiplex PCR법을 이용하면 임상적으로 중요한 *S. Typhi* 및 *S. Paratyphi A* 혈청형을 보다 신속하고 정확하게 동정하는 데 적극 활용할 수 있을 것이다. [대한임상미생물학회지 2007;10:6-13]

교신저자 : 김영부, 602-739, 부산광역시 서구 아미동 1가 10
부산대학교 의과대학 미생물학교실
Tel: 051-240-7712, Fax: 051-243-2259
E-mail: ybkim@pusan.ac.kr