

도축돈에서 분리된 살모넬라의 혈청형 및 유전형

최원중, 정지현¹, 원호근², 강정무³, 한태욱^{3*}

강원도가축위생시험소동부지소, 서울특별시 보건환경연구원¹, 중앙백신연구소²,
강원대학교 수의학부대학³
(접수 2008. 1. 16, 게재승인 2008. 1. 28)

Serotypes and genotypes of *Salmonella* isolates from slaughtered pigs

Won-Zong Choi, Ji-Hun Jung¹, Ho-Keun Won², Zheng-Wu Kang³,
Tae-Wook Hahn^{3*}

Gangwondo Veterinary Service Laboratory, Gangneung, 210-180; ¹Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Environment, Seoul 137-734;
²Choongang Vaccine Laboratory, Daejeon 305-348; ³School of Veterinary Medicine, Kangwon National University Chuncheon, 200-701, South Korea
(Received 16 January 2008, accepted in revised from 12 January 2008)

Abstract

Salmonella infections cause the disease in pigs but also some zoonotic Salmonella serotypes can be transmitted to human through swine products, resulting in food poisoning. The objective of this study was to investigate the bacteriological prevalence and detection of *invA* gene using Salmonella specific polymerase chain reaction (PCR), the epidemiological characteristics related to Salmonella strains cultured from pig samples in Gangwon areas using serotyping, random amplified polymorphic DNA (RAPD) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) methods. During the period of November 2001 through April 2002, 1,174 ileocecal lymph node were collected from the slaughtered pigs raised in 38 farms located in Gangwon province. The samples were submerged in boiling water and macerated in saline and lymph node homogenates were inoculated into Tetra-

* Corresponding author

Phone : +82-33-250-8671 Fax : +82-33-244-2367
E-mail : twhahn@kangwon.ac.kr

thionate broth with iodine (TTB, Difco, 0.5% iodine was added) for enrichment growth. Then additional tests were performed using several mediums, and suspects were identified by API 20E kit (BioMérieux) and PCR. Of total 1,174 samples from 38 farms, 44 (3.7%) were isolated as *Salmonella spp* from 13 farms (34.2%). Of 44 isolates, 31 were in Yangyang region, followed by 9 in Goseong, 2 in both Gangneung and Sokcho. However, there was no difference in regional isolation frequency. All isolates have a 521bp amplified product in *Salmonella* specific PCR with primer *invA* which encodes in proteins for invasion of epithelial cells. Of 44 recovered serotypes, 23 (52.3%) were *S* Eingedi, 10 (22.7%) *S* Schwarzengrund, 9 (20.5%) *S* Typhimurium, and 2 (4.5%) *S* Mbandaka. In RAPD analysis, there appeared to be unique bands distinguishing each serotype, although similarities exist between the different serotypes. Four serotypes of 44 *Salmonella* isolates appeared to fall into 14 different RAPD types. In PFGE analysis, 9 *S* Typhimurium were tested with *Xba*I enzyme and *Spe*I enzyme. The combination of results obtained with two enzymes subdivided the 9 *S* Typhimurium into 4 PFGE types.

Key words: *Salmonella*, Prevalence, Serotyping, RAPD, PFGE

서 론

돼지의 살모넬라 감염증은 혈청형 *S* Cholerae-suis와 *S* Typhisuis에 의한 급성 열성 패혈 증 및 *S* Typhimurium과 다른 혈청형의 살 모넬라균에 의한 급만성 위장염으로 인해 폐 사율이 높고 잠복감염이 많아 양돈 산업에 많은 경제적인 피해를 미치고 있다¹⁾. 뿐만 아니라, 살모넬라균에 오염된 가축의 식육 및 그 가공품 등은 사람에게 식중독을 일으키기 때문에 살모넬라균의 역학상황은 양돈 산업의 경제적 피해와 사람의 식중독을 줄이기 위한 공중위생학적인 측면에서 여러 나라에서 중대한 관심을 가지고 연구 하고 있다^{1~3)}.

양돈장에 살모넬라균이 전파되면 양돈장의 여러 환경 즉 사료, 물, 사육시설 등에 균이 오염되고 이 균들은 다른 돼지들을 전염 시 킨다⁴⁾. 특히 살모넬라균의 전파에는 준입상 형 돼지가 중요하게 작용한다고 알려져 있다. 살모넬라균의 배출은 밀사, 장거리 수송, 타 질병과의 혼합감염, 사료의 부족 등과 같은 스트레스 상황에서 더욱 증가되는데, 특히 도

축장 출하시 장거리 운송이나 부적절한 계류 등으로 인해 스트레스를 받은 살모넬라균에 감염된 돼지는 균의 배출을 증가시켜 주위 환경에 살모넬라균을 오염시키며 이로 인해 돼 지 도체 및 돼지고기 가공품 등은 살모넬라 균에 의한 오염 가능성이 더욱 커지게 된다. 여러 연구에서도 도축과정에서 살모넬라균 에 오염된 돼지 도체나 가공품의 오염원이 농장에서 살모넬라균에 걸린 돼지에서 기인 한다고 보고되고 있다^{2,5)}.

국내 연구에서 도축돈에서 채취한 7,995샘 플에서 234개(2.9%)의 살모넬라균이 검출되 었으며 주요 혈청형은 *S* Derby, *S* Infant, *S* Enteritidis, *S* Typhimurium 등이고 7농장 을 검사하였는데 그중 3농장에는 2~3개의 혈청형이 분리되었다⁶⁾. 다른 연구보고에서는 도축돈의 살모넬라균에 대한 검출빈도는 2.9 ~23.1%이고 대부분의 혈청형은 *S* Derby, *S* Typhimurium이었다. 보통 농장은 한 종류의 살모넬라균 혈청형에 감염되어 있었으나 일 부 농장에서는 2~3개의 혈청형이 감염된 것 으로 나타났다⁷⁾.

돼지 식육 및 가공품에 의한 살모넬라균 식중독을 예방하기 위한 연구를 위해 균의 분리·동정, 발생빈도, 돼지사육 어느 단계에 많이 전파가 이루어지는지, 혈청형 및 유전형 등 많은 기본적인 역학 자료들이 요구되고 있다. 이러한 역학 자료를 얻기 위해 여러 가지 방법들이 사용되고 있다.

살모넬라균의 분리·동정에 많은 시간이 필요하며 여러 가지 배지선택 등 어려움이 있어 이러한 문제점을 해결하는 연구가 활발히 진행되고 있고, 그 중 한 가지 방법으로 살모넬라균이 세균을 침입을 가능하게 하는 여러 병원성 관련 유전자 중 하나인 *invA* gene을 검출할 수 있는 PCR primer를 사용하여 빠르고 신뢰할 만하게 살모넬라균을 검출할 수 있다고 보고되었다⁸⁾.

기존에 살모넬라균을 typing하는 방법으로 serotyping, phage typing 과 plasmid profiling 등이 있다. 혈청형은 somatic 또는 cell wall (O) antigen 과 flagella (H) antigen의 다양성에 따라 Kauffman-White serological scheme에 의해 현재까지 약 2,500종이 보고되었으며 O-antigen의 혈청형에 따라 A, B, C, D등의 group으로 구분한다⁹⁾. Plasmid typing은 *S Typhimurium* DT104등의 분석에 매우 유용하다^{10,11)}. 최근에는 혈청형 내의 수준으로 역학조사가 가능한 molecular typing 방법이 연구자들에게 많은 관심의 대상이 되고 있으며 restriction fragment length polymorphism(RFLP), ribotyping, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), random amplified polymorphic DNA(RAPD) 등이 있다^{12~15)}.

Molecular typing 방법은 살모넬라균의 역학적 사항을 조사하는데도 매우 효과적이다^{16,17)}. 그러나 어떤 특정한 한 가지 실험방법만으로는 살모넬라균의 역학적 연구를 위한 방법으로는 부족한데 이는 살모넬라균이 어떤 혈청형이냐에 따라 구분력이 좋은 molecular typing의 선택이 필요하고 한 가지 molecular typing 방법 보다 여러 가지 방법을 같이 사용할 경우 더 좋은 연구결과를 얻을 수 있기

때문이다¹⁸⁾.

RAPD는 생물학 등에서 많이 사용하는 방법으로 단일의 arbitrarily random primer를 이용하여 PCR 방법을 통해 template DNA로부터 genetic fingerprint를 얻고 이를 분석하여 역학사항을 추정한다. 이 방법의 장점은 target organism의 DNA 염기서열이 필요하지 않으며 저렴하고 신속하게 살모넬라균을 혈청형내의 수준으로 감별이 가능한 것이다¹⁵⁾. 단점으로는 재현성이 타 방법에 비해 낮고, 분리된 균의 DNA polymorphism을 검출 할 수 있는 적합한 primer를 찾아야 하는 것 등 이다. 그럼에도 불구하고 universal rice primer(URP primer)는 비교적 높은 annealing temperature로 PCR을 실시하고 적은 수의 primer 만으로도 구분력이 좋은 결과를 얻을 수 있다고 보고되었다¹⁹⁾.

PFGE는 macro-restriction 분석방법 중 하나로, 사용하는 enzyme은 template DNA에서 6~8 base sequences를 인식하여 10~800kb products를 약 5~20개 band로 나타낸다. Band의 수가 적어 template DNA의 분석을 쉽게 할 수 있으나 단점으로 DNA fragment가 25kb 이상으로 전기영동시 전기장의 방향을 바꾸어 주는 등의 장치와, 세균 등에서 DNA 추출시 shearing 방지를 위한 특별한 방법이 필요하다. 그럼에도 불구하고 이 방법은 재현성과 구분력이 매우 우수하여 많은 실험에서 사용하고 있다^{20,21)}.

여러 나라에서 살모넬라균에 의한 식중독을 예방하기 위하여 상기 기술한 방법들을 이용한 역학조사 연구가 많이 보고되고 있다. 우리나라에서도 일부 지역에서는 연구가 이루어졌지만 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 강원도 영동지역에서 사육되고 도축된 돼지에서 살모넬라균의 분리, 혈청형조사, *invA* gene의 유무조사, molecular typing 방법으로 URP-6 primer를 이용한 RAPD분석, macro-restriction 효소를 이용한 PFGE 분석을 실시하여 분리된 살모넬라균들의 역학적 특성을 조사 하였다.

재료 및 방법

샘플채취

2001년 11월에서 2002년 4월 동안 강원도지역에서 약 5개월간 사육되고 도축장에 출하된 돼지의 장간막림프절 1,174개를 살모넬라균 분리를 위한 샘플로 사용하였다. 장간막림프절은 장에서 림프절을 포함한 주위 지방조직과 함께 채취하고 4℃를 유지하면서 실험실로 옮기고 당일 혹은 그 다음날 분리를 위한 검사를 실시하였다. 배지 접종에 앞서 샘플은 끓는 물에 약 30초간 넣어 표면의 오염을 최소화하면서 림프절과 주위 지방을 분리하였다. 그 후 림프절 3g 과 멸균생리 식염수 2ml 를 멸균된 50ml tube에 넣고 electric homogenizer를 이용하여 잘게 분쇄 균질화 하였다.

세균의 분리동정

3g의 분쇄 균질화된 림프절이 들어있는 50 ml tube에 증균배지 Tetrathionate broth (TTB, Difco, 0.5% iodine첨가)를 15ml첨가하고 42℃에서 48시간 배양하였다. 그 후 같은 샘플 일정량을 Brilliant green agar (BGA, Difco)와 Salmonella-Shigella agar (SSA, Difco)에 동시에 접종하고 37℃에서 24시간 배양하였다. BGA에서 붉은색이고 SSA에서 투명한 살모넬라균 의심 집락을 Urea agar(Difco)에 접종하고 37℃에서 24시간 배양하였다. Urea 분해 음성인 집락을 Rambach agar(CHROMagar)에 접종하고 37℃에서 24시간 배양하였다. 살모넬라균으로 의심되는 붉은색 집락에 대해 최종적으로 API kit (BioMérieux)로 검사하고 살모넬라균으로 동정하였다. 이 균들은 Luria-Bertain (LB, Difco) agar에 24시간 배양하여 12.5% glycerol이 함유된 Nutrient broth (Difco)로 수확한 다음 -70℃에 보관하였고, LB agar에

계대하여 4℃에 보관하면서 사용하였다

Serotyping

Salmonella-O와 H antisera(Difco)를 이용하여 평판응집반응을 실시하였다. 균체표면 항원(O antigen)의 동정은 고형배지에서 여러 개의 colony를 채취하여 평판응집반응으로 검사하였다. 그리고 편모항원(H antigen)의 검사는 시험관 시험법(Tube-test)으로 먼저 Phase I 항원을 검사하고, Craigie tube method를 이용하여 Phase-changing을 하여 Phase II 항원 검사를 하였으며 이 방법에 의해 Phase II 항원이 유도된 균주는 Phase II 양성 항혈청을 이용하여 시험관 시험법으로 검사하였다. 검사 후 최종적인 serotyping은 Kauffmann-White scheme에 따라 구분하였다⁹⁾.

Chromosomal DNA의 준비

분리된 살모넬라균은 Selenite cysteine broth(SC, Difco)로 37℃에서 24시간 배양하였다. 1.5ml SC broth는 micro-centrifuge tube에 옮기고 실온에서 12,000×g로 2분간 원심분리하였다. 상층액은 제거하고 G-spine TM genomic DNA extraction kit (iNtRoN Biotechnology)를 이용하여 펠렛에서 chromosomal DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 실험 전 까지 -20℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

Salmonella-specific PCR

Salmonella specific PCR에 사용된 primer는 S Typhimurium에서 유래된 *invA* gene을 검출할 수 있는 primer를 사용하였다⁸⁾. 염기서열은 5'-ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT-3', 5'-AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT-3'이며 Bioneer Korea사에서 제조하여 사용하였다.

PCR mixture의 구성은 10×PCR buffer (Promega), 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 20pM primer pairs, 1U Taq DNA polymerase Promega), 5μl의 template DNA 에 3차 증류수를 첨가하여 최종량이 50μl가 되게 하였다. 증폭은 thermal cycler (PTC-100, MJ Research)를 이용하여 실시하였다. PCR cycle은 94℃에서 5분간 denaturation시킨 뒤 본 반응으로 94℃에서 1분간 denaturation, 56℃에서 30초 annealing, 72℃에서 2분간 polymerization을 35회 반복한 후 마지막으로 72℃에서 5분간 polymerization을 실시하였다. PCR 산물은 0.5μg/ml의 ethidium bromide가 희석된 Tris-borate-EDTA (TBE)로 염색하고 agarose 에서 100 V로 2시간 전기영동하고 UV trans- illuminator (SeouLin Bio- Science)를 이용하여 band를 관찰하였다²¹⁾.

RAPD

RAPD PCR은 URP-6 primer (Seolin Scientific)를 이용하여 *Salmonella* sub-species간의 DNA를 fingerprint하였다. 이 primer는 높은 재현성과 DNA polymorphism의 구분성을 보여주었다¹⁹⁾. PCR 반응은 3.0μl 1×PCR buffer, 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 200uM dNTPs, 20pM primer, 2.5 unit의 Taq plus polymerase (Bionics)와 2.0ng의 genomic DNA를 template로 사용하여 최종량이 30μl가 되게 하였다. 증폭은 thermal cycler(PTC-100)를 이용하여 실시하였다. RAPD PCR cycle은 94℃에서 4분 denaturation시킨 뒤 94℃에서 1분간 denaturation, 55℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 2분간 polymerization을 35회 반복한 후 마지막으로 72℃에서 7분간 polymerization을 실시하였다. PCR 산물은 0.5μg/ml의 ethidium bromide가 희석된 Tris-염색하고 agarose에서 100V로 2시간 동안 전기영동을 하고 UV transilluminator (SeouLin Bioscience)

를 이용하여 band를 관찰하였다.

PFGE

Agarose plug의 준비를 위해 미국 Center for Disease Control(CDC)에서 사용하는 pulse net system 실험법으로 실시하였다^{20,21)}. 살모넬라균을 LB 배지에 접종한 후 18~24시간 배양하고 탁도는 1.5ml의 cell suspension buffer(100 mM Tris, 100 mM EDTA pH 7.5)에 균을 넣어 colorimeter(BioMérieux)를 사용하여 20%의 투명도로 현탁하였다. 그 후 proteinase K(20mg/ml) 10μl를 넣어 잘 섞고 균 현탁액과 proteinase K가 들어있는 tube에 1.2% agarose (Seakem Gold agarose)를 섞은 후, plug mold(Bio-Rad)에 넣고 4℃에서 5분간 굳혔다. 굳은 plug를 꺼내어 ES buffer(0.5 M EDTA, pH 9.0 ; 1% sodium-lauroyl-sarcosine) 1.5ml와 20 mg/ml proteinase K 40μl (20mg/ml)가 담긴 2 ml microcentrifuge tube에 옮기고 55℃ 진탕 항온수조에서 45분~1시간 처리한 후 plug를 번호가 표시된 screen caps (Bio-Rad)에 각 검체별로 넣고 55℃ 진탕 항온수조에서 plug를 세척하였고, 이 때 55℃로 미리 데워진 멸균 증류수로 15분간 1회, 55℃로 데워진 plug wash TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7.5)를 넣어 30분 동안 4회 세척하였다. 세척 후의 plug는 TE buffer 1.5 ml 에 옮겨 4℃에서 보관하였다. 4℃에 보관된 plug를 razor blade를 사용하여 1mm 두께로 자른 후 1mm 두께의 plug 절편이 들어있는 1.5 ml microcentrifuge tube에 제한효소용 완충액, 제한효소(*Xba*I 또는 *Spe*I, Promega), bovine serum albumin(BSA)을 넣고 37℃에서 3시간동안 처리하였다. 처리가 완료된 tube는 반응액을 제거하고, TE buffer 500μl를 첨가 하였다. PFGE 분석을 위해서 *S Typhimurium*의 DNA 전기영동은 contour clamped homogeneous field(CHEF) DRII electrophoresis system

(Bio-Rad) 방식을 사용하였으며, 소화처리 과정이 완료된 plug는 0.5×TBE buffer로 제조한 1% agarose gel에 적재하고 나머지 빈 공간은 역시 동일한 1.0 % agarose gel로서 밀봉하였다. 전기영동 조건으로 0.5×TBE buffer를 사용하였으며, buffer의 온도는 14℃로 유지하였고, 6V/cm에서 pulse time은 2초에서 40초의 범위로 설정하고 16시간동안 전기영동을 시행하였다. Size maker로는

PFGE용 lamda DNA ladder marker (Bio-Rad)를 사용하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동 완료 후 gel은 0.5µg/ml ethidium bromide 염색용액에 넣어 30분간 염색을 하고 염색이 끝나면 증류수를 이용하여 30분 이상, 2회씩 탈색을 시켜주고 UV 장치를 이용하여 DNA band를 확인하고 폴라로이드 사진 촬영을 하였다. PFGE의 pattern 분석은 기존에 보고된 방법으로 실시하였다^{7,20)}.

Table 1. Numbers of farms and samples which *Salmonella* were isolated from iliocecal lymph nodes of finishing pigs

Area	No of farms		No of pigs	
	Tested	Isolated (%)	Tested	Isolated (%)
Yangyang	20	6 (30.0)	831	31 (3.7)
Goseong	13	4 (30.7)	176	9 (5.1)
Sockcho	3	2 (66.7)	51	2 (3.9)
Gangneung	2	1 (50.0)	116	2 (1.7)
Total	38	13 (34.2)	1,174	44 (3.7)

Table 2. Prevalence and distribution of *Salmonella* serotyping in positive farms

Farm	No of samples		Serotypes			
	Tested	Positive	S Eingedi	S Scharzengrund	S Typhimurium	S Mbandaka
F1	33	4			4	
F2	50	16	16			
F3	73	1		1		
F4	60	2	1		1	
F5	30	1		1		
F6	80	7		5		2
F7	58	1			1	
F8	5	1			1	
F9	21	4	4			
F10	50	3		3		
F11	6	1	1			
F12	30	1			1	
F13	27	2	1		1	
Total	523	44	23 (52.3%)	10 (22.7%)	9 (20.5%)	2 (4.5%)

결 과

Prevalence and serotyping

38개 농장에서 사육되어 도축장에 출하된 돼지 1,174두 검사결과 13개 농장(34.2%) 44두(3.7%)의 돼지에서 살모넬라균이 분리되었다(Table 1). 지역적으로는 강릉시 2농장 116두 검사에서 1농장 2두가, 속초시 3농장 51두 검사에서 2농장 2두가, 고성군 13농장 176두 검사에서 4농장 9두가, 양양군 20농장 831두 검사에서 6농장 31두에서 살모넬라균이 분리되었다. 살모넬라균이 분리된 13개 농장 중 10개 농장(77%)은 1개의 혈청형만 분리되었고 3개 농장(23%)에서는 2개의 혈청형이 분리되었다. 44건의 살모넬라균에 대한 혈청형을 분석한 결과 *S* Eingedi가 23주(52.3%) *S* Schwarzengrund가 10주(22.7

%) *S* Typhimurium이 9주(20.5%) *S* Mbandaka 2주(4.5%)가 분리되었다(Table 2).

Salmonella specific PCR

분리주, 양성 대조균 및 음성 대조균을 대상으로 *invA* gene을 검출할 수 있는 primer를 이용하여 *Salmonella*-specific PCR을 실시하였다. 44개의 살모넬라 분리주와 양성대조에서 모두 521bp DNA fragment 증폭산물이 관찰되어 혈청형에 관계없이 모든 분리주는 *invA* gene을 지니고 있는 것으로 확인되었다(결과생략).

분리한 살모넬라균을 URP-6 primer를 이용하여 RAPD분석한 결과 각각의 serotype 별로 특이한 band가 있었고 또한 서로 유사한 band도 발견되었다. 4개 혈청형은 모두 650bp 크기의 band가 공통적으로 검출되었다.

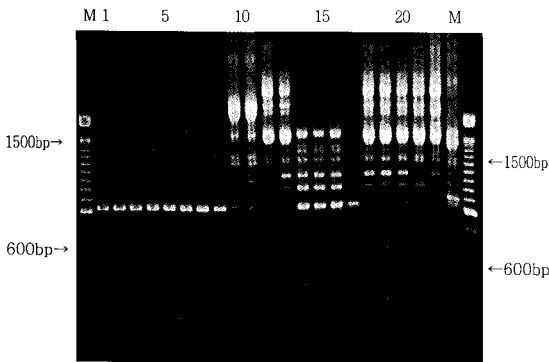


Fig 1. RAPD fingerprint of different *Salmonella* serogroup B with URP-6 primer.

Lanes M, 100bp DNA maker ; 1 - 10, *S* Schwarzengrund isolates ; 11 - 19, *S* Typhimurium isolates; 20, *S* Typhimurium (ATCC 14028); 21, *S* Choleraesuis (ATCC13312); 22, *Escherichia coli* (KTCC13076), The markers in the left and right indicate the size of bands.

Serogroup B에 속하는 *S* Schwarzengrund, *S* Typhimurium은 2,000bp 크기의 band가 공통적으로 검출되었다 (Fig 1). Serogroup C에 속하는 *S* Eingedi, *S* Mbandaka는 400bp 크기의 band가 공통적으로 검출되었다 (Fig 2). 23주의 *S* Eingedi는 3개의 다른 RAPD type

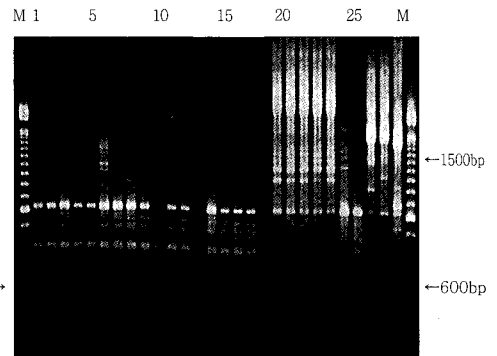


Fig 2. RAPD fingerprints of different *Salmonella* serogroup C with URP-6 primer.

Lanes M, 100bp DNA size maker; 1 - 23, *S* Eingedi isolates; 24 - 25, *S* Mbandaka isolates; 26, *S* Typhimurium (ATCC14028); 27, *S* Choleraesuis(ATCC13312), The markers in the left and right indicate the size of bands.

으로 구분되었으며 4에서 8개의 band가 9주의 *S* Typhimurium은 7종류의 다른 RAPD형으로 구분되었고, 7~8개의 band가 존재하였다. 2주의 *S* Mbandaka는 동일한 하나의 RAPD형으로 구분되었으며 약 9개의 band가 존재하였다.

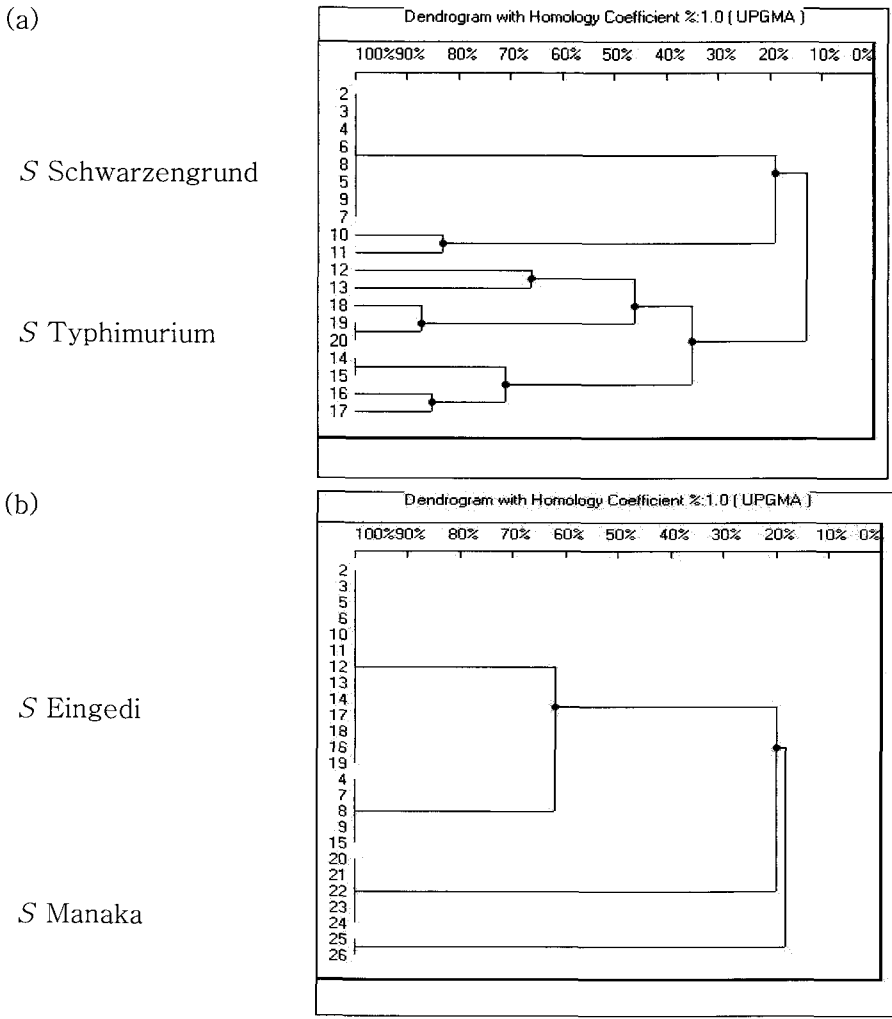


Fig 3. Phylogenetic tree of *Salmonella* serogroup B(a) and serogroup C(b) with URP-6 primer. Clustering was done with the unweighted pair group arithmetic averages(UPGA) algorithm and confirmed by bootstrap analysis.

URP-6 primer를 이용하여 얻어진 DNA fingerprint로부터 unweighted pair group arithmetic averages(UPGMA) program을 이용하여 clustering을 실시하였다. 구성된 dendrogram은 bootstrap 분석으로 신뢰성을 확인하였다(Fig 3). 또한 얻어진 RAPD type을 serotyping과 비교하면 (Table 3) 한 농장에서 분리된 동일한 혈청형일 지라도 3내지 4개의 RAPD type으로 분류되는 것으로 확인되었다.

RAPD

RAPD 분석시 적합한 PCR primer의 선택

이 재현성과 구분력에 매우 중요하다. 재현성을 위해 RAPD 분석을 2회 실시하였으며 2회의 분석결과가 모두 동일하게 나타났다.

*S. Typhimurium*에 대한 PFGE분석

여러 연구를 통해 돼지에서 사람에게 전파된다고 알려진 serotyping중의 하나인 *S. Typhimurium*에 대하여 PFGE를 실시하였다. 본 연구에서 분리된 총 9개의 *S. Typhimurium*에 대하여 *XbaI* 제한효소와 *SpeI* 제한효소 2개로 처리한 결과, *XbaI* 제한효소는 48~600 kbp의 범위에서 13~14개의 band를 형

성하였고 4가지의 pattern으로 구분할 수 있었으며 (Fig 4), *SpeI* 제한효소는 48~485 kbp의 범위에서 *XbaI* 제한효소로 처리했을 때보다 많은 18~19개의 band를 형성하였으며 3개의 pattern으로 구분할 수 있었다 (Fig 5). 동일한 PFGE 조건하에서 *XbaI*이 *SpeI*보다 더 많은 수의 pattern을 보였다. *XbaI*과 *SpeI* 2개의 제한효소로 처리한 결과를 종합하면 9주의 *S Typhimurium*은 4개의 PFGE type으로 구분할 수 있었다 (Table 4).

PFGE type I에 4농장에서 분리된 4주, PFGE type II에 1농장에서 분리된 1주, PFGE type III에 1농장에서 분리된 1주, PFGE type IV에 1농장에서 분리된 3주였다. PFGE type I은 강릉시, 속초시, 고성군 3개 지역에서 공통적으로 검출되었고 PFGE type II, III, IV는 양양군 1개 지역에서만 검출되었다. F1 농장에서 분리된 4주의 *S Typhimurium*은 PFGE type III과 IV 두 type으로 구분되었다.

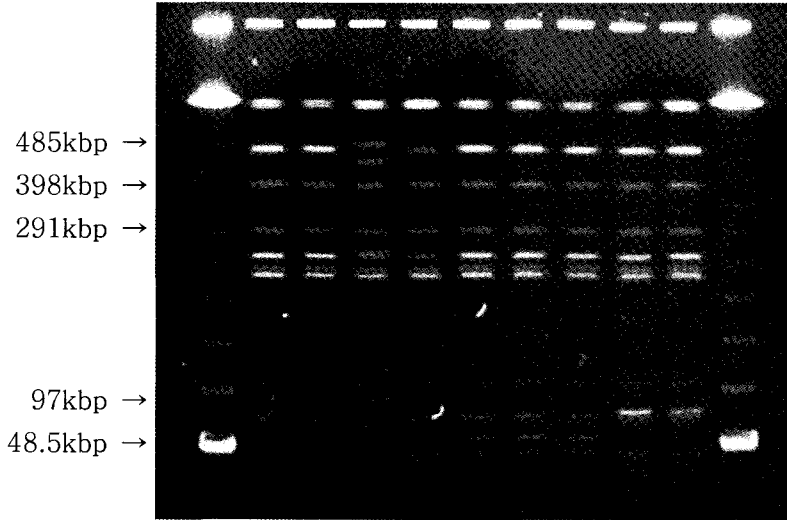
Table 3. RAPD types of *Salmonella* isolates from different areas

Farm	No of positive	Serotypes	RAPD type	Area
F1	4	<i>S Typhimurium</i>	5, 8, 9	Yangyang
F2	16	<i>S Eingedi</i>	11, 12, 13	Yangyang
F3	1	<i>S Schwarzengrund</i>	1	Yangyang
F4	2	<i>S Eingedi, S Typhimurium</i>	13, 4	Yangyang
F5	1	<i>S Schwarzengrund</i>	1	Yangyang
F6	7	<i>S Schwarzengrund, S Mbandaka</i>	1, 14	Yangyang
F7	1	<i>S Typhimurium</i>	7	Goseong
F8	1	<i>S Typhimurium</i>	7	Goseong
F9	4	<i>S Eingedi</i>	11	Goseong
F10	3	<i>S Schwarzengrund</i>	1, 2, 3	Goseong
F11	1	<i>S Eingedi</i>	11	Sockcho
F12	1	<i>S Typhimurium</i>	10	Sockcho
F13	2	<i>S Eingedi, S Typhimurium</i>	11, 6	Gangneung

Table 4. PFGE types of *S Typhimurium* isolated from different areas

Lane No	PFGE Pattern		PFGE type	Isolate No	Farm	Area
	<i>XbaI</i>	<i>SpeI</i>				
1	Xa	Sa	I	36	F8	Goseong
2	Xa	Sa	I	37	F7	Goseong
3	Xb	Sa2	II	12	F4	Yangyang
4	Xa2	Sa	III	27	F1	Yangyang
5	Xa1	Sa1	IV	28	F1	Yangyang
6	Xa1	Sa1	IV	29	F1	Yangyang
7	Xa1	Sa1	IV	30	F1	Yangyang
8	Xa	Sa	I	32	F12	Sockcho
9	Xa	Sa	I	34	F13	Gangneung

(a) Sample No	36	37	25	27	28	29	30	32	34	
PFGE pattern	M	Xa	Xa	Xb	Xa2	Xa1	Xa1	Xa1	Xa	Xa
Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	



(b) Sample No	36	37	25	27	28	29	30	32	34	
PFGE pattern	M	Xa	Xa	Xb	Xa2	Xa1	Xa1	Xa1	Xa	Xa
Lane :	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

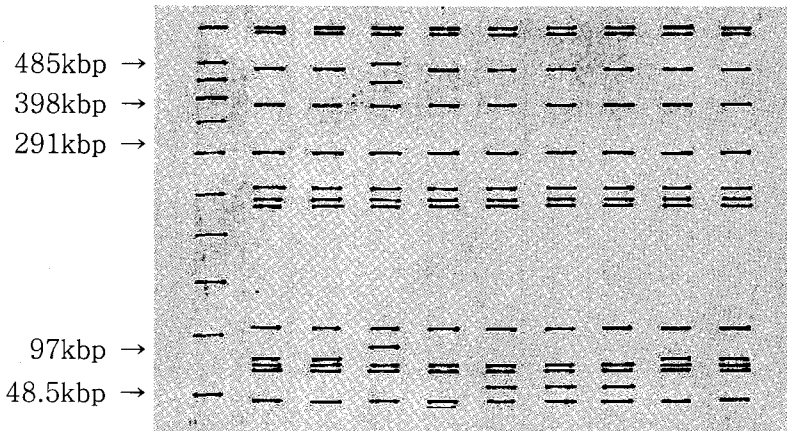


Fig 4. PFGE patterns of *S Typhimurium* isolates digested with XbaI. (a) band pattern in gel (b) band pattern drawn in paper. Lane M, λ Hind III PFGE DNA marker; 1 - 9, *S Typhimurium* isolates. Sample No, PFGE pattern are described over lane No. The numbers in left indicate size of bands.

고 찰

식육 등을 통해 사람에게 식중독을 일으킬 수 있는 살모넬라균은 여러 식중독 세균 중 가장 큰 원인 중 하나이며 보통 오염된 닭고기, 돼지고기, 소고기 등의 순서로 식중독을

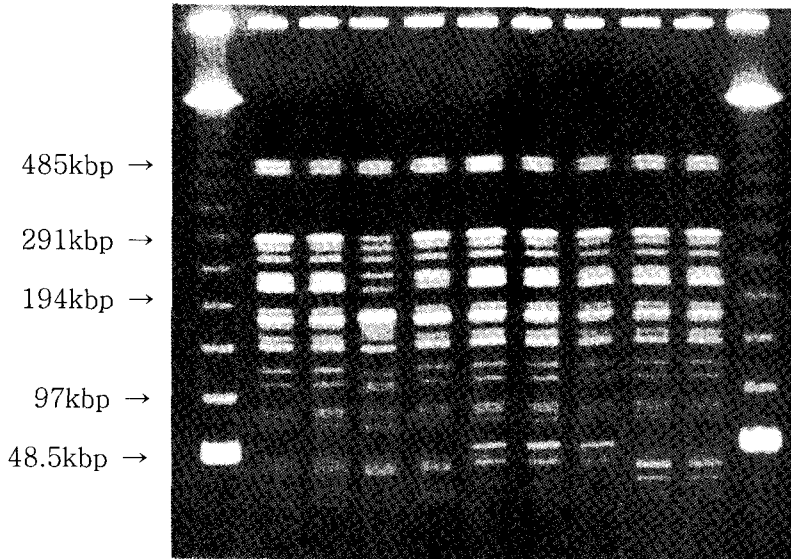
많이 일으켜 전 세계적으로 공중위생상 측면에서 많은 연구가 되고 있다. 연구에 있어 우선 살모넬라균을 오염된 샘플로부터 검출하여야 하며 검출된 살모넬라균은 혈청형, molecular typing 등 여러 가지 방법을 통하여 구분하여 역학적 자료로 활용한다. 이와 관련하여 최근의 연구들은 샘플로부터 유전학적인

방법 등을 이용하여 더욱 빠르게 살모넬라균을 분리 동정하며 동정된 균을 molecular typing을 통하여 더욱 자세하게 구분하는 연구가 많이 진행 중에 있다. 이들 방법을 사용하여 더욱 정밀한 오염원, 전파경로 등과 같은 살모넬라균에 대한 방역 대책을 마련할 수 있다. 이번 연구는 최근 연구의 흐름과 같은 유전학적인 방법들을 이용하여 강원도 지

역에서 사육후 도축된 돼지에 대한 살모넬라균의 분리 동정, 혈청형 및 molecular typing을 실시한 역학조사에 관한 것이며 연구 결과에 대한 고찰은 다음과 같다.

샘플에서 살모넬라 분리동정시 여러 가지 방법들이 많이 연구되고 있다. 살모넬라속균의 배양에 의한 검출법은 증균과정 등을 거쳐 선택배지에 도말하여 의심되는 집락에 대해

(a) Sample No	36	37	25	27	28	29	30	32	34		
PFGE Pattern	M	Sa	Sa	Sa2	Sa	Sa1	Sa1	Sa1	Sa	Sa	M
Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9		



(b) Sample No	36	37	25	27	28	29	30	32	34	
PFGE Pattern	Sa	Sa	Sa2	Sa	Sa1	Sa1	Sa1	Sa	Sa	M
Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

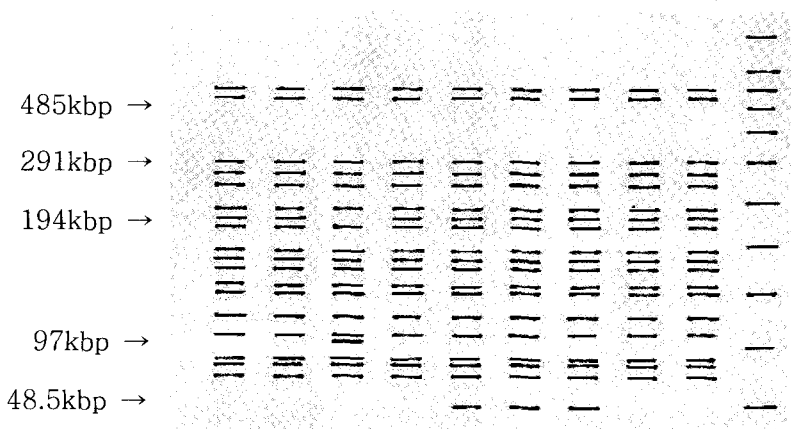


Fig 5. PFGE patterns of *S Typhimurium* isolates digested with *SpeI*. (a) band pattern in gel (b) band pattern drawn in paper. Lane M, λ Hind III PFGE DNA marker; 1 - 9, *S Typhimurium* isolates. Sample No, PFGE Pattern are described over lane No. The numbers in left indicate size of bands.

생화학적 성상을 확인하여야 하는데 최소한 2~3일은 소요된다. 이러한 단점을 보완하고자 PCR방법으로 살모넬라균을 검색 할 때 특징적인 DNA 염기서열만을 증폭하여 여러 샘플에 매우 적은 량의 살모넬라균이 있어도 검색할 수 있다고 보고되었다.

본 연구에서는 장간막 림프절에서 살모넬라균을 분리 동정하여 *invA* gene을 이용한 *Salmonella*-specific PCR을 실시한 결과 분리된 44개의 살모넬라균은 모두 521bp의 특이적 band를 관찰할 수 있었다^{8,22,23}). 따라서 살모넬라의 혈청형에 관계없이 상피세포를 침입하는데 필요한 단백질을 생성할 수 있는 유전자가 암호화 된 *invA* gene을 본 연구에서 동정된 살모넬라균이 모두 가지고 있었다.

도축돼지에서 분리한 살모넬라균의 검출률이 돼지 농장에서의 살모넬라균에 대한 감염율을 정확하게 예측할 수는 없지만 이 자료를 바탕으로 농장에 대한 살모넬라균의 감염 상황을 일정부분 추정 할 수 있다. Table 2는 살모넬라균이 분리된 농장과 분리된 살모넬라균의 혈청형의 분포를 표시한 것이다. 가장 높은 분리율을 나타낸 농장은 양양에 위치한 F2농장으로서 50주 검사시 16주의 *S* Eingedi 가 검출되어 32%의 분리율을 보였다. 특이할 점은 총 분리된 23주의 *S* Eingedi 중 16주가 동일한 농장에서 분리되어 69.5%를 차지하고 있다. F2농장의 경우 살모넬라 검출율이 매우 낮은 F3농장과 비슷한 지역, 비슷한 환경, 비슷한 소독을 실시하고 있는 농장이었다. 특별히 다른 점은 F2농장의 경우 사육두수가 약 600두인 반면에 F3농장의 경우 1200두수이고 모돈의 구입처가 다르다는 점이다. F2농장의 경우 외부에서 자돈의 입식이 전혀 없고 자체에서 생산한 자돈을 출하한다는 점을 볼 때 살모넬라에 감염된 모돈을 통해 지속적으로 자돈에 확대 감염될 수 있음을 추정할 수 있다. 따라서 외부의 추가 입식이 없이 자체적으로 생산하기 때문에 *S* Eingedi의 검출율이 높게 나타났다고 사료된다. 동일한 농장에서 분리된 *S* Eingedi 의 RAPD type

차이가 있는 것은 농장내 지속적인 순환 감염을 통해 살모넬라균의 항생제 저항성의 획득 또는 변이 등을 통해 수종의 유전형으로 분화되었다고 사료된다.

농장과 도축장에서 살모넬라균의 분리율에 차이가 있는 것은 농장에서 돼지가 도축장으로 도착하는 과정에서 트럭이나 도축장의 오염된 계류장 등과 같은 시설에서 전파가 이루어질 수 있기 때문이다. 도축장 도축돼지에서 살모넬라균을 분리한 연구 결과를 살펴보면 한국에서 살모넬라균 분리율은 0.14%~23.1%이었고 미국 및 네덜란드 등의 외국에서는 22~50%의 분리율이 보고되었다^{6,7,24}). 이번 연구에서 살모넬라균 분리율은 3.7%로 이전의 연구 보다 낮은 분리율을 나타냈지만 연구 방법이나 여러 가지 조건이 다르므로 단순하게 수치만으로는 비교하기 어렵다. 국내에서 많이 분리되는 혈청형은 *S* Typhimurium, *S* Derby, *S* Schwarzengrund, *S* Enteritidis 등이며 외국의 조사에서는 *S* Typhimurium, *S* Derby, *S* Brandenburg, *S* Anatum, *S* Livingstone 순으로 많이 분리되었다고 보고되었다^{6,7,24}).

본 연구에서는 *S* Eingedi가 23주, *S* Schwarzengrund가 10주, *S* Typhimurium이 9주, *S* Mbandaka가 2주 분리 되었는데 이는 기존의 연구와 유사한 결과로 볼 수 있다. 다만 *S* Eingedi가 다소 많이 분리된 것과 *S* Enteritidis 가 전혀 분리되지 않은 것은 지역적인 특징이라 추정된다. 10개 농장에서는 1개 혈청형의 살모넬라균만 나왔지만 Table 2에서와 같이 3개의 농장에서는 2개 혈청형의 살모넬라균이 검출되었는데 이 3개 농장은 2곳의 다른 오염원에 의해 농장이 오염 된 것으로 추정할 수 있다.

지역별로 양양군이 4개, 고성군이 3개, 속초시가 2개, 강릉시가 2개의 살모넬라 혈청형이 분리되었는데 이는 특정 지역이 많이 오염된 것이 아니라 많은 샘플과 농가를 검사한 지역에서 많은 혈청형이 분리된 경우이거나, 양양군 지역에서 돼지의 이동이 연구에서 검사한 다른 지역보다 빈번하여 여러 개

의 혈청형이 나온 것으로 추정된다. 사람의 식중독과 관련하여 한국에서는 *S* Enteritidis와 *S* Typhimurium이 사람에서 식중독을 일으키는 대표적인 혈청형인데, 이번 연구에서 *S* Enteritidis는 분리되지 않았지만 *S* Typhimurium은 분리되었다.

Molecular typing은 혈청형을 더욱 세분 할 수 있었다. 적합한 primer를 찾기 위하여 많은 실험이 필요하지만 이전의 연구에서 살모넬라균에 대해 좋은 구분력을 보여준 URP-6 primer를 이용하여 44주 4개 혈청형의 살모넬라균을 RAPD로 typing한 결과 14개 RAPD type으로 구분 할 수 있었다. 이 방법은 동일 혈청형을 더욱 세분화 할 수 있었으며 이는 역학적으로 더욱 정밀하게 조사할 수 있게 하여준다. 10주의 *S* Schwarzengrund은 3개 RAPD type으로, 9주의 *S* Typhimurium은 7개의 RAPD type으로, 23주의 *S* Eingedi는 3개의 RAPD type으로 2주의 *S* Mbandaka는 1개의 RAPD type으로 구분되었다 (Table 3). 본 연구에서 RAPD를 이용한 molecular typing의 경우 신속하고 경제적이며, 재현성과 구분력이 좋은 방법으로 나타났다. 그러나 일부 균주에서는 band가 희미하여 구분하는데 약간의 어려움 등이 있기 때문에 적합한 RAPD primer를 찾는 등 더욱 심도 있는 연구가 필요하다^{18,25,26}.

돼지에서 사람에게로 주로 전파한다고 알려진 *S* Typhimurium에 대한 PFGE typing 결과, 6개 농장 9주에 대해 4개의 PFGE type으로 구분 할 수 있었다. Table 4 중 농장 1에서 분리된 동일한 *S* Typhimurium은 두 가지 PFGE type III과 IV로 구분되었는데 이는 농장내의 돈군이 2개의 다른 오염원에 의한 것으로 추정할 수 있었다. 또한 지역별로는 양양군의 PFGE type이 다른 3개 지역과 전혀 다른 PFGE type을 보였는데 이는 양양군 지역이 타 지역과 다른 *S* Typhimurium 오염원에 의해 전파되었다고 추정할 수 있다 (Table 4). 연구에서 PFGE molecular typing은 비록 까다롭고 고가의 장비가 필요하

나 재현성이 높았으며 신뢰할만하게 *S* Typhimurium을 typing할 수 있었다^{27,28}.

살모넬라균에 오염된 농장의 경우 항생제 투여를 통해 치료하는 것이 일반적이나 살모넬라균의 항생제 내성이 증가함에 따라 투약 효과가 감소하고 있으며 세포내 기생세균이라 항생제 투약에 대한 효과가 우수한 편은 아니다. 살모넬라증의 예방방법으로는 사육밀도, 환경개선을 통한 돈군내의 스트레스 감소, 무분별한 돈군의 반입금지, 사료내 유기산 제제, probiotics 또는 항생제의 첨가, 백신접종 등을 들 수 있다¹. 한 농장에서 2종 이상의 PFGE type, 또는 RAPD type이 검출되는 것은 무분별한 돈군의 반입이 가장 큰 원인으로 추정할 수 있겠다. 상기에 언급된 양양의 경우 다른 지역과의 돼지거래가 활발한 곳으로 알려져 있다. 따라서 다양한 PFGE type을 보인다는 것은 여러 곳에서 감염된 돼지를 구입한 것으로 판단된다.

RAPD와 PFGE는 농장내 감염된 살모넬라균의 유전형 분석을 통해 감염원 추적이 가능하며 이를 통해 방역대책을 수립하는 중요한 자료를 제공한다. 추후 전국적인 조사를 통해 살모넬라균, 특히 *S* Typhimurium의 유전형 분석을 통해 농장내의 오염상황을 분석하고 이에 대한 방역 대책을 수립하는데 중요한 단서가 되리라고 본다.

결 론

강원도 지역에서 사육하고 도축된 38개 농장 돼지 1,174두를 대상으로 살모넬라균 분리율, 혈청형분석, *invA* gene검사, RAPD분석, PFGE분석 결과 다음과 같다.

1. 38개농장 1,174두의 검사결과 13개농장 (34.2%) 44두(3.7%)의 돼지에서 살모넬라균이 분리되었다. 지역적으로는 강릉시 2농장 116두 검사에서 1농장에서 2주 (*S* Eingedi, *S* Typhimurium), 속초시 3농장 51두 검사에서 2농장 2주(*S* Eingedi, *S* Typhimurium),

고성군 13농장 176두 검사에서 4농장 9주(*S* Eingedi, *S* Typhimurium, *S* Schwarzengrund), 양양군 20농장 831두 검사에서 6농장 31주 (*S* Eingedi, *S* Typhimurium, *S* Schwarzengrund, *S* Mbandaka)의 살모넬라균이 분리되었다. 살모넬라균이 분리된 13개 농장 중 10개 농장(77%)은 1종류의 살모넬라균만 분리되었고 3개 농장(23%)에서는 2종류의 살모넬라균이 분리되었다.

2. 분리된 44주의 살모넬라균 혈청형은 *S* Eingedi 23주 (52.3%), *S* Schwarzengrund 10주(22.7%), *S* Typhimurium 9주(20.5%), *S* Mbandaka 2주(4.5%)였다.

3. *InvA* primer를 이용하여 *Salmonella*-specific PCR을 실시한 결과 44주의 살모넬라균에서 모두 521bp 크기의 DNA fragment가 관찰되었다.

4. URP-6 primer를 이용하여 RAPD를 실시한 결과 44주 4개의 혈청형은 14개 RAPD type으로 구분되었다. 23주 *S* Eingedi는 3개 type으로, 10주 *S* Schwarzengrund는 3개 type으로, 9주 *S* Typhimurium은 7개 type으로, 2주 *S* Mbandaka는 1개 type으로 구분되었다.

5. *Xba*I 와 *Spe*I 2개의 제한효소를 이용하여 *S* Typhimurium 9주에 대해 PFGE로 검사한 결과 4개의 PFGE type으로 구분되었다. 양양군의 *S* Typhimurium 5주는 강릉시, 속초시, 고성군의 *S* Typhimurium 3주와 전혀 다른 PFGE type으로 구분되었다.

사사의 글

본 연구는 2005년도 강원대학교 학술연구 조성비로 연구하였고 강원대학교 동물의학종합연구소 지원에 의해 수행되었음.

참고문헌

1. Schwartz KJ. 1999. Salmonellosis. In: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL.

Taylor DJ (eds.). *Diseases of Swine*. 8 eds. Iowa State University Press, Ames : 535-551.

2. Baggesen DL, Wegener HC, Bager F, et al. 1996. Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. *Prev Vet Med* 26 : 201 - 213.

3. Gautom RK. 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. *J Clin Microbiol* 35 : 2977-2980.

4. Letellier A, Messier S, Parè J, et al. 1999. Distribution of *Salmonella* in swine herds in Québec. *Vet Microbiol* 67 : 299-306.

5. Chau PY, Shortridge KF, Huang CT. 1977. *Salmonella* in pig carcasses for human consumption in Hong Kong: A study on the mode of contamination. *J Hyg Camb* 78 : 253-260.

6. 최원필, 이희석, 여상건 등. 1989. 양돈장에 있어서 *Salmonella* 감염증의 역학적 연구. *대한수의학회지* 26 : 49-59.

7. 정병열, 이우원, 이희수 등. 2001. Prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs in Korea, 제4차 국제살모넬라 및 기타 식중독균 심포지움. 독일 Leipzig : 202-204.

8. Guo L, Killefer J, Kenny PB, et al. 1999. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to study *Salmonella* ecology in a turkey production environment. *Poult Sci* 78 : 24-31.

9. Ewing W. 1986. *Identification of Enterobacteriaceae*. 4eds. Elsevier Science Publishing Co New York : 17.

10. Christensen JP, Olsen JE, Hansen

- HC, et al. 1992. Characterization of *Salmonella enterica* serovar gallinarum biovars gallinarum and pullorum by plasmid profiling and biochemical analysis. *Avian Pathol* 21 : 461-470.
11. Gulig PA, Curtis R 3rd. 1987. Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 55 : 2891-2901.
12. Calva E, Ordonez LG, Fernandez-Mora M, et al. 1997. Distinctive IS-200 Insertion between gyrA and rcsC genes in *Salmonella typhi*. *J Clin Microbiol* 35 : 3048-3053.
13. Lagatolla C, Dolzani L, Tonin E, et al. 1996. PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. *J Clin Microbiol* 34 : 2440-2443.
14. Li J, Nelson K, McWhorter AC, et al. 1994. Recombinational basis of serovar diversity in *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 91 : 2552-2556.
15. Lin AW, Usera MA, Barrett TJ, et al. 1996. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J Clin Microbiol* 34 : 870-876.
16. Shangkuan YH, Lin HC. 1998. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella typhi* and other *Salmonella* species. *J Appl Microbiol* 85 : 693-702.
17. Soto SM, Guerra B, Gonzales-Hevia MA, et al. 1999. Potential of Three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. *Appl Environ Microbiol* 65 : 4830-4836.
18. Olsen JE, Brown DJ, Skov MN, et al. 1993. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis: Applications in investigations of Salmonellosis among livestock. *Vet Q* 15 : 125-135.
19. Kang HW, Cho YG, Go SJ, et al. 1997. Development of URP primer universally applicable in PCR DNA fingerprints of various organisms from repetitive sequence of rice. *Korean patent* 97 : 169-181.
20. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33 : 2233-2239.
21. Threlfall EJ, Hall ML, Rowe B. 1986. *Salmonella* gold-coast from outbreaks of food-poisoning in the British Isles can be differentiated by plasmid profiles. *J Hyg (Lond)* 97 : 115-122.
22. 박두희, 김원용, 김철중 등. 1994. Polymerase chain reaction에 의한 *Salmonella* 속균의 검출. *대한수의학회지* 34 : 115-125.
23. 정석찬, 정병열, 전용수 등. 1997. 식품관련 유해미생물의 특성. *대한수의공중보건학회지* 21 : 2-10.
24. Kauffmann F. 1971. On the classification and nomenclature of the genus *Salmonella*. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* 79 : 421-422.
25. Hilton AC, Banks JG, Penn CW. 1996. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: Strain differentiation and characterization of amplified sequences. *J Appl Bacteriol* 81 : 575-584.
26. Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are use-

- ful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18 : 6531-6535.
27. Dodson SV, Maurer JJ, Holt PS, et al. 1999. Temporal changes in the population genetics of *Salmonella pullorum*. *Avian Dis* 43 : 685-695.
28. Struelens MJ. 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin Microbiol Infect* 2 : 2-11.