

오리 농장에서 분리한 *Salmonella*속 균에서 *invA* 및 *spvC* gene의 검출

조 재 근*

대구광역시 보건환경연구원

(접수 2010. 11. 26, 게재승인 2010. 12. 30)

Detection of *invA* and *spvC* in *Salmonella* spp. isolated from duck farms

Jae-Keun Cho*

Metropolitan Health & Environmental Research Institute, Daegu 706-732, Korea

(Received 26 November 2010, accepted in revised form 30 December 2010)

Abstract

Poultry and poultry products have been implicated as a major source of *Salmonella* infection in human, and infection due to *Salmonella* serotypes continue to be a major health problem. The presence of two virulence genes, *invA* and *spvC*, in 34 *Salmonella* isolates obtained from duck farms was investigated. All isolates contained the *invA* gene, and *spvC* gene was found in 20 (58.8%) of 34 *Salmonella* isolates : *S. Typhimurium* (n=8), *S. Fyris* (n=5), *S. Enteritidis* (n=3), *S. Typhimurium* var. copenhagen (n=1), *S. Haardt* (n=1) and *S. Mbandaka* (n=1). This study showed the presence of the *spvC* gene was widely distributed in between different *Salmonella enterica* isolates.

Key words : Duck, *Salmonella*, *invA*, *spvC*

서 론

*Salmonella*속 균은 사람을 포함한 포유동물에 감염되어 패혈증, 설사, 폐렴 등을 야기시키는 인수공통전염병의 병원체이다(Thorns, 2000). *Salmonella* 감염증은 주로 동물 유래 오염된 음식물의 섭취를 통하여 사람에게 감염되며(Borland, 1975; Gomez 등, 1997), 국내를 비롯하여 세계 여러 나라에서 식중독 원인 세균 중 가장 높은 비율을 차지하고 있다.

최근까지 2,500여 종 이상의 *Salmonella* 혈청형이 알려져 있으며, 이들 혈청형의 대부분은 상피세포의 침습성에 관계하는 virulence gene인 *invA* gene을 보유하

고 있다(Chiu와 Ou, 1996; Jeníková 등, 2000). 또한 *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis*, *S. dublin*, *S. Gallinarum* and *S. Pullorum* 같은 혈청형은 *spvC* gene을 전달하는 독립 plasmid를 가지고 있으며, 이들 plasmid의 크기는 혈청형에 따라 50-94kb 범위로 다양하다(Gulig와 Curtiss, 1987; Jones 등, 1982; Guiney 등, 1995; Kawahara 등, 1988).

최근 PCR 기법은 임상 가검물에서 병원성 세균의 검출뿐만 아니라 *Salmonella*속 균에서 장점막 침습성에 관련된 *invA* gene와 *Salmonella*속 균의 성장을 증가시키고 숙주 면역체계와 상호작용하는 *spvC* gene의 검출을 위해 매우 유용하게 사용되어지고 있다(Finlay와 Falkow, 1989; Swamy 등, 1996; Oliveira, 2002).

현재까지 국내에서 분리한 *Salmonella*속 균에서 *invA*

*Corresponding author: Jae-Keun Cho, Tel. +82-53-760-1303, Fax. +82-53-760-13025, E-mail. thinking@daegu.go.kr

와 *spvC* gene의 보유현황에 대한 조사는 드물다. 따라서 본 연구는 대구, 경북지역 오리농장에서 사육중인 오리의 분변으로 부터 분리한 *Salmonella*속 균에서 *invA* 및 *spvC* gene의 분포를 알아보기 위해 실시하였다.

재료 및 방법

공시균주

*Salmonella*속 균에서 *invA*와 *spvC* gene의 검출을 위해 대구 경북지역 오리농장에서 사육하고 있는 오리의 분변에서 분리하여 본 실험실에 보관중인 *Salmonella* 야외 분리주 34주를 사용하였다. 이들 공시균의 혈청형은 다음과 같다. *S. Typhimurium*(8주), *S. Fyris*(6주), *S. Haardt*(4주), *S. Agona*(3주), *S. Enteritidis* (3주), *S. Mbandaka* (2주), *S. Typhimurium* var. *copenhagen* (1주), *S. Bredeney* (1주), *S. Indiana* (1주), *S. Schwabach* (1주), *S. London* (1주) 및 untyped *Salmonella* (3주).

DNA 추출

공시균을 Brain Heart Infusion 평판배지(Difco, USA)에 도말한 다음 37°C에서 18~24시간 배양한 후 한 개의 집락을 선택하여 500µl 멸균증류수에 부유시켰다. 균 부유액은 95°C에서 10분간 boiling한 후, 13,000rpm에서 5분간 원심분리 한 다음 상층액은 PCR을 위한 재료로 사용하였다.

invA 및 *spvC* gene의 검출

유전자 검출을 위한 각각의 primers는(주)바이오니아(Korea)에 의뢰하여 합성 제작하였다(Table 1). PCR 반응을 위해 AccuPower® PCR premix kit (Bioneer)를 사용하였으며, 각각의 primer 1µl와 template DNA 2µl를 넣은 후 멸균된 증류수를 첨가하여 최종 반응량이 20µl가 되게 하였으며, Tprofessional Thermal Cycler (Biometra, Germany)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응 조건은 94°C에서 1분간 초기 denaturation시

킨 후, 94°C에서 30초 denaturation, 56°C에서 30초 annealing, 72°C에서 2분간 extension 과정을 30회 반복하였으며, 최종 산물은 72°C에서 10분간 extension하였다. 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 100V로 30분간 전기영동을 실시한 후 자외선을 조사하여 특이 밴드의 유무를 확인 관찰하였다.

결 과

오리 농장의 분변에서 분리한 *Salmonella* 34주에 대하여 PCR에 의한 *invA* 및 *spvC* gene의 보유현황을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 공시균 모두가 *invA* gene에 특이적인 primer에 의해 244bp의 증폭산물이 확인되었으며, 동시에 34주중 20주(58.8%)는 *spvC* gene에 특이적인 primer에 의해 571bp의 증폭산물이 확인되었다(Fig. 1).

한편 이들 *spvC* gene을 보유한 공시균은 *S. Typhimurium* 8주, *S. Typhimurium* var. *copenhagen* 1주, *S. Enteritidis* 3주, *S. Fyris* 5주, *S. Haardt* 2주 및 *S. Mbandaka* 1

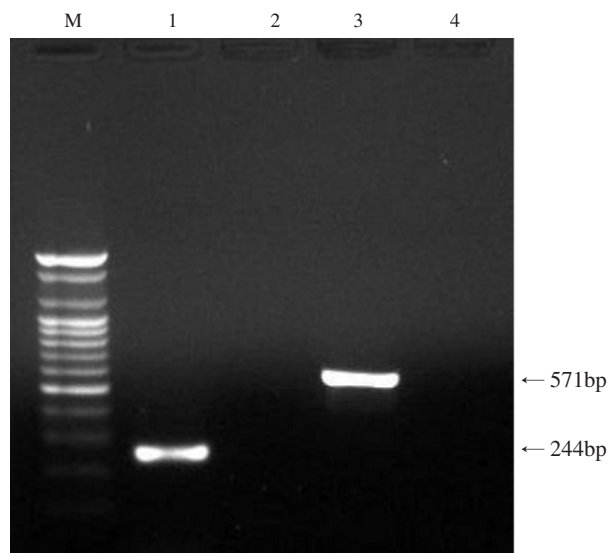


Fig. 1. PCR products of the *invA* and *spvC* gene. Lane M, 100bp ladder; lane 2, *invA* gene; lane 4, *spvC* gene; lanes 3 and 5, *E. coli*.

Table 1. Sequences of the primers used to detect of *invA* and *spvC* genes

Primer name	Gene	Primer sequence	Size (bp)	Reference
INVA-F	<i>invA</i>	5'-ACAGTGCTCGTTTACGACCTGAAT-3'	244	Chiu and Ou (1996)
INVA-R	<i>invA</i>	5'-AGACGACTGGTACTGATCGATAAT-3'		
SPVC-F	<i>spvC</i>	5'-ACTCCTTGACAAACCAATGCGGA-3'	571	
SPVC-R	<i>spvC</i>	5'-TGTCTCTGCATTTCGCCACCATCA-3'		

Table 2. The presence of *invA* and *spvC* genes of 34 *Salmonella* isolates

Serotypes	No. of strain	No (%). of strains with	
		<i>invA</i>	<i>spvC</i>
<i>S. Fyris</i>	6	6 (100)	5 (83.3)
<i>S. Typhimurium</i> var. copenhagen	1	1 (100)	1 (100)
<i>S. Typhimurium</i>	8	8 (100)	8 (100)
<i>S. Bredeney</i>	1	1 (100)	0 (0.0)
<i>S. Agona</i>	4	4 (100)	0 (0.0)
<i>S. Schwabach</i>	1	1 (100)	0 (0.0)
<i>S. Mbandaka</i>	2	2 (100)	1 (50.0)
<i>S. London</i>	1	1 (100)	0 (0.0)
<i>S. Haardt</i>	4	4 (100)	2 (50.0)
<i>S. Enteritidis</i>	3	3 (100)	3 (100)
<i>S. London</i>	1	1 (100)	0 (0.0)
Untyped	3	3 (100)	0 (0.0)
Total	34	34 (100)	20 (58.8)

주 이었고, *S. Fyris* 1주, *S. Haardt* 2주, *S. Mbandaka* 1주, *S. Agona* 3주, *S. Bredeney* 1주, *S. Indiana* 1주, *S. Schwabach* 1주, *S. London* 1주 및 untyped *Salmonella* 3주에서는 *spvC* gene이 발견되지 않았다(Table 2).

고 찰

*Salmonella*속 균은 자연계에 널리 분포되어 있으면서 여러 동물에 감염하여 장염과 패혈증 등의 질병을 일으킬 뿐 아니라 환경이나 오염된 식품을 통하여 식중독을 일으키므로 공중보건학적으로 매우 중요시 되고 있다(van Duijkeren, 2002). PCR기법은 *Salmonella* 같은 식중독 원인체의 검출과 동정을 위해 신속하고 믿을 수 있는 방법이다. 더욱이 많은 임상시료에서 상피세포를 침입하는 단백질을 생성할 수 있는 유전자가 암호화된 *invA* gene을 이용한 PCR법은 *Salmonella*의 동정을 위해 널리 사용되어지고 있다(Chiu와 Ou, 1996; Jeníková 등, 2000; Oliveira, 2002; Salehi 등, 2005; 이 등, 2007).

이번 조사에서 *Salmonella*속 균은 혈청형에 관계없이 공시한 전주가 *invA* gene을 보유하고 있어 대부분 *Salmonella*속 균은 *invA* gene을 보유하고 있다는 이전 연구자들의 결과(Swamy 등, 1996; Abouzeed 등, 2000; Hudson 등, 2000; 이 등, 2009)와 일치하였다. 한편 non-*Salmonella*속 균은 *invA* gene을 보유하고 있지 않은 것으로 알려져 있다(Chiu와 Ou, 1996; Jeníková 등, 2000). 최근까지 *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Chol-*

eraesuis, *S. Dulbin*, *S. Gallinarum-Pullorum*, *S. Abortusovis* 및 *S. Sendai* 등 7종의 *Salmonella* 혈청형이 *spvC* gene을 전달하는 독력 plasmid를 보유하고 있는 것으로 알려져 있다(Guiney 등, 1995; Chiu와 Ou, 1996). 이들 혈청형 중 가금류에 숙주 특이성이 있는 *S. Gallinarum-Pullorum*을 제외한 다른 혈청형은 사람에게서 장염의 원인체로 작용하고 있다. 반면 *spvC* gene을 보유하고 있는 균주라 할지라도 직접적으로 세균의 독력과는 관련이 없으며(Swamy 등, 1996) 이들 인자가 제대로 발현하기 위해서는 환경, 스트레스 등 기타의 발병 요인이 작용하여야 되는 것으로 생각된다. 금번 조사에서 공시균의 58.8%가 *spvC* gene을 보유하고 있었으며 이들 *spvC* gene의 보유율을 혈청형별로 볼 때, *S. Typhimurium*은 공시균 모두가 *spvC* gene을 보유하고 있어 Abouzeed 등(2000)이 캐나다의 사람과 소에서 분리된 *S. Typhimurium*은 전주가 *spvC* gene을 보유하고 있다고 보고하여 본 조사의 결과와 일치하였고, Bolton 등(1999)은 88%, Khan 등(2000)은 97%의 성적을 보고하여 유사한 결과를 얻었으나, 국내에서 정 등(2003)이 전남지역의 도축돈에서 28.9% 및 이 등(2009)이 부산지역 도축장에서 도축된 소와 돼지에서 24.6%만이 *spvC* gene을 보유하고 있다는 성적과는 상당한 차이가 있었다. 이는 같은 혈청형이라 할지라도 분리균의 유래에 따라 *spvC* gene의 보유율은 다소 차이가 있음을 알 수 있었다. 따라서 다양한 동물 유래에서 분리한 *S. Typhimurium*에서 *spvC* gene의 보유 실태에 대해 더 많은 조사가 수행되어야 할 것으로 생각된다. 또한 *S. Enteritidis*의 경우, 금번 조사에서 비록 시험 균주 수는 적었지만 공시균 모두가 *spvC* gene을 보유하고 있어 이전 연구자들의 결과와 일치하였다(Abouzeed 등, 2000; Kwag 등, 2008; 이 등, 2009). 이와 같이 *spvC* gene은 분리균의 유래와는 관계없이 *S. Typhimurium*과 *S. Enteritidis* 사이에서 널리 분포하고 있음을 알 수 있었다. 한편 Abouzeed 등(2000)은 소와 사람에서 분리한 *Salmonella* 혈청형 중 *S. Typhimurium* 및 *S. Enteritidis* 이외에 *S. Infantis*와 *S. Heidelberg*에서도 *spvC* gene을 보유하고 있다고 보고를 하였고, 이번 조사에서도 *S. Typhimurium* var. copenhagen, *S. Fyris*, *S. Haardt* 및 *S. Mbandaka*에서 *spvC* gene이 검출되어 *spvC* gene은 *Salmonella*속 균 사이에서 널리 분포함을 알 수 있었다. 한편으로 다른 *Salmonella* 혈청형과 비교하여 볼때 *S. Typhimurium*과 *S. Enteritidis*에서 *spvC* gene의 높은 보유율을 보이는 것에 대하여는

더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

이번 조사의 결과 오리에서 분리한 *Salmonella*에서 독력과 관련이 있는 *spvC* gene의 존재는 다양한 혈청형에서 볼 수 있었으며, *spvC* gene이 사람의 병원성 유전인자로 그 중요성이 높게 평가되고 있는 점을 고려해 볼 때(Guiney 등, 1995) 다양한 종류의 가축에서 분리한 *Salmonella*속 균에서 이들 유전자에 대한 더 많은 조사가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

대구, 경북지역에서 사육중인 오리의 분변에서 분리한 *Salmonella* 34주에 대하여 PCR에 의한 *invA*와 *spvC* gene의 보유현황을 조사한 결과, *invA* gene은 모든 공시균에서 발견되었고, *spvC* gene은 공시균의 58.8%가 보유하고 있었다. *spvC* gene을 보유한 공시균은 *S. Typhimurium* 8주, *S. Typhimurium* var. *copenhagen* 1주, *S. Enteritidis* 3주, *S. Fyris* 5주, *S. Haardt* 2주 및 *S. Mbandaka* 1주 등 이었다.

참 고 문 헌

- 이호원, 홍종해, 정병열. 2007. 닭 도체에서 분리한 *Salmonella* spp.의 특성 분석. 한국가축위생학회지. 30(3): 339-351.
- 이우원, 정병열, 이강록, 이동수, 김용환. 2009. 소와 돼지유래 다제내성 *Salmonella*속 균의 분자유전학적 특성. 한국가축위생학회지 32(1): 61-76.
- 정대영, 박종태, 고흥범. 2003. 전남지역 도축돈에서 분리한 *Salmonella* Typhimurium의 병원성에 관한 연구. 한국가축위생학회지 26(1): 39-50.
- Abouzeed YM, Hariharan H, Poppe C, Kibenge FS. 2000. Characterization of *Salmonella* isolates from beef cattle, broiler chickens and human sources on Prince Edward Island. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 23(4): 253-266.
- Bolton LF, Kelley LC, Lee MD, Fedorka-Cray PJ, Maurer JJ. 1999. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. *J Clin Microbiol* 37(5): 1348-1351.
- Borland ED. 1975. *Salmonella* infection in poultry. *Vet Rec* 97(21): 406-408.
- Chiu CH, Ou JT. 1996. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. *J Clin Microbiol* 34(10): 2619-2622.
- van Duijkeren 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.
- Finlay BB, Falkow S. 1989. *Salmonella* as an intracellular parasite. *Mol Microbiol* 3: 1833-1841.
- Gomez TM, Motarjemi Y, Miyagawa S, Käferstein FK, Stöhr K. 1997. Foodborne salmonellosis. *World Health Stat Q*. 50(1-2): 81-89.
- Guiney DG, Fang FC, Krause M, Libby S, Buchmeier NA, Fierer J. 1995. Biology and clinical significance of virulence plasmids in *Salmonella* serovars. *Clin Infect Dis* 21: S146-S151.
- Gulig PA, Curtiss R. 3rd. 1987. Plasmid-associated virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 55(12): 2891-2901.
- Hudson CR, Quist C, Lee MD, Keyes K, Dodson SV, Morales C, Sanchez S, White DG, Maurer JJ. 2000. Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in Southeastern United States. *J Clin Microbiol* 38(5): 1860-1865.
- Jeníková G, Pazlarová J, Demnerová K. 2000. Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *Int Microbiol* 3(4): 225-229.
- Jones GW, Rabert DK, Svinarich DM, Whitfield HJ. 1982. Association of adhesive, invasive, and virulent phenotypes of *Salmonella typhimurium* with autonomous 60-megadalton plasmids. *Infect Immun* 38(2): 476-486.
- Kawahara K, Haraguchi Y, Tsuchimoto M, Terakado N, Danbara H. 1988. Evidence of correlation between 50-kilobase plasmid of *Salmonella choleraesuis* and its virulence. *Microb Pathog* 4(2): 155-163.
- Khan AA, Nawaz MS, Khan SA, Cerniglia CE. 2000. Detection of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett* 182(2): 355-360.
- Kwag SI, Bae DH, Cho JK, Lee HS, Ku BG, Kim BH, Cho GJ, Lee YJ. 2008. Characteristics of persistent *Salmonella* Enteritidis strains in two integrated broiler chicken operations of Korea. *J Vet Med Sci* 70(10): 1031-1035.
- Oliveira SD, Santos LR, Schuch DM, Silva AB, Salle CT, Canal CW. 2002. Detection and identification of salmonellas from poultry by PCR. *Vet Microbiol* 87(1): 25-35.
- Thorns CJ. 2000. Bacterial food-borne zoonoses. *Rev Sci Tech* 19(1): 226-239.
- Salehi TZ, M. Mahzounieh M, Saeedzadeh A. 2005. Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. *Int J Poult Sci* 4(8): 557-559.
- Swamy SC, Barnhart HM, Lee MD, Dreesen DW. 1996. Virulence determinants *invA* and *spvC* in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources. *Appl Environ Microbiol* 62(10): 3768-3771.