

장티푸스균 신속진단을 위한 multiplex PCR 진단법 확립

이덕용 · 민정은 · 이예스더 · 김성훈 · 오희복 · 박미선

질병관리본부 장내세균과

Further Evaluation of Multiplex PCR for Rapid Detection of *Salmonella* Typhi

Typhoid fever is a class I legally designated communicable disease in Korea; and it remains as an important public health problem in many developing countries. It takes at least 3-5 days to detect and identify *Salmonella* Typhi (*S. Typhi*) by classical diagnostic method. For this reason, multiplex PCR (mPCR) was evaluated in detecting and identifying *S. Typhi*. In this study, forty-three bacterial strains, which consisted of 42 *Salmonella enterica* serovars and one *Citrobacter freundii*, were used to evaluate the promptness of mPCR in detecting and identifying *S. Typhi*. mPCR was performed with four genes which were known for representing *Salmonella* spp and/or *S. Typhi*: *invA*, *fliC-d*, *viaB* and *prt*. *invA* and *prt* gene was amplified in all strains and *viaB* gene was in only *S. Typhi*. *fliC-d* gene was amplified in three serovars: *S. Typhi*, *S. Schwarzengrund* and *S. Livingstone*. After specificity test, mPCR was modified as triplex PCR with three genes (*invA*, *fliC-d*, and *viaB*) and the sensitivity test was performed against *S. Typhi*-inoculated stool samples. mPCR was able to detect *S. Typhi* cell suspension of 1×10^5 cfu/mL. We found that modified multiplex PCR was useful to detect *S. Typhi* from stool samples within 24h whereas it takes 3-5 days to detect by classic diagnosis method.

Key Words: *Salmonella* Typhi, Multiplex PCR, *invA*, *fliC-d*, *viaB*

장티푸스는 *Salmonella* Typhi (*S. Typhi*)에 의해 유발되는 발열성 질환으로 우리나라에서는 제1군 법정전염병중 하나로 지정되어 있다. 1970년대 말 이후 장티푸스 환자는 급격히 감소하여 최근에는 매년 200여명의 환자만이 보고 되고 있다[1]. 아직도 연간 천 6백 6십만건 이상의 발생보고가 있는 개발도상국들과는 달리, 국내에서는 환자 수가 많지 않아 공중보건학적인 중요성은 작아지고 있지만 수인성 질환으로서 집단 발생의 가능성은 언제나 내재되어 있는 질병이기도 하다.

장티푸스에 대한 진단은 환자 또는 접촉자의 분변, 혈액, 또는 소변으로부터 원인체인 *S. Typhi*를 분리 동정하는 것으로서 약 3-5일이 소요된다. 장티푸스 진단의 효율성을 위해 혈청학적인 진단법을 사용하기도 하나 최종적인 진단을 위해서는 원인체의 분리 및 확인 동정이 반드시 필요하다. 또한 장티푸스는 전염력이 높아 제1군 법정전염병으로 지정되어 있어 환자뿐만 아니라 접촉자와 접촉의 기회가 있는 환자의 가족까지 감염 여부를 검사해야 하며, 환자의 경우 격리되어 치료를 받아야 하는 질환으로 좀 더 신속하고, 정확한 진단이 필요하다.

장티푸스를 정확하고 빠르게 진단하기 위한 분자유전학적인 진단법들이 많이 개발

Deog-Yong Lee, Jung-Eun Min, Esther Lee, Sung Hun Kim, Hee-Bok Oh, and Mi-Sun Park

Division of Enteric Bacterial Infections, Center for Infectious Diseases, Korea Centers for Disease Control and Prevention, Seoul, Korea

Copyright © 2010 by The Korean Society of Infectious Diseases | Korean Society for Chemotherapy

Submitted: 15 April, 2010

Revised: June 21, 2010

Accepted: July 27, 2010

Correspondence to Mi-Sun Park

Division of Enteric Bacterial Infections, Center for Infectious Diseases, KCDC, 194 Tongil-ro, Eunpyeong-gu, Seoul 122-701, Korea

Tel: +82-2-380-2981, Fax: +82-2-352-4767

E-mail: pmsun63@korea.kr

www.icjournal.org

되었으나 일선 실험실에서 진단을 목적으로 사용하기에는 복잡하고 번거로운 시험법과 결과가 많았다[2-8]. 간편하고 신속한 진단을 위해 Kumar 등[9]이 발표한 multiplex PCR (mPCR) 기법에 대해 특이도와 민감도를 측정 후 분변을 시료로 하여 장티푸스 원인균 진단을 위한 진단법으로서의 활용성을 평가 함으로써 분자역학적 진단법으로서의 유용성을 확인하고자 하였다.

본 실험에서는 급성설사질환 실험실 감시사업(EnterNet-Korea)과 공중보건망을 통해 국내에서 분리된 살모넬라균주와 *Citrobacter freundii*, 그리고 장내세균과에 보관중인 표준균주를 실험에 사용하였다. 표준 균주로는 *S. Typhi* (ATCC 9992), *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *S. Enteritidis* (ATCC 13076), *S. London* (ATCC 8389), *S. Choleraesuis* (ATCC 6958), *S. Braenderup* (ATCC-BAA664), *S. Virchow* (ATCC 8390), *S. Senftenberg* (ATCC 8400) 등 총 8개의 균주를 사용하였고, 임상 분리주로는 *S. Typhi* 5주를 포함하여 국내에서 분리율이 높은 혈청형들, 즉 *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi B*, *S. Infantis*, *S. Othmarschen*, *S. London*, *S. Hillingdon*, *S. Braenderup*, *S. Virchow*, *S. Schwarzengrund*, *S. Montevideo*, *S. Weltevreden*, *S. Senftenberg* 각 2주와 Vi 항원을 발현하는 것으로 알려진 *Citrobacter freundii*를 대조균주로 하여 총 43주를 시험에 사용하였다. 각 균주에 대한 동정 및 혈청형은 질병관리본부 장내세균과에서 최종적으로 확인하였으며, 선택배지인 MacConkey Agar (BD, Cockeysville, MD, USA)와 영양배지인 TSA (Tryptic soy agar, BD) 배지에서 계대 배양하여 시험에 사용하였다.

mPCR조건은 Kumar 등[9]이 발표한 문헌을 바탕으로 조건을 확립하였다. Primer는 *invA* (Accession No. U43273), *viaB* (Accession No. D14156), *fliC-d* (Accession No. L21912) 그리고 *prt* (Accession No. M29682) 유전자에 대하여 제작하였다(Table 1). PCR은 변성(denaturation) 94°C/30초, 풀림(annealing) 57°C-63°C/90초, 연장(extension) 72°C/2분의 조건하에서 30회 진행하였고, PCR산물은 1.5% agarose gel상에서 100V의 조건으로 30분을 전기영동 한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. 대표 시험균주로는 *S. Typhi* (ATCC 9992)를 사용하였고, TSB (Tryptic Soy Broth, BD, Cockeysville, MD, USA)에서 37°C의 조건으로 진탕 배양한 후 가열법[10]을 이용하여 유전자를 추출한 후 주형 DNA로 사용하였다.

mPCR의 교차반응은 국내에서 분리율이 높은 혈청형들과 장티푸스균을 대상으로 검사하였다. 시험에 사용된 43개 균주(15종의 혈청

형)들은 국내 살모넬라 분리율의 95% 이상을 차지하고, Widal test와 같은 혈청 검사 중에 위양성을 유발할 수 있는 *S. Enteritidis*와 같은 D 그룹의 혈청형들을 포함하였다. 또한 장티푸스와 같이 Vi-항원을 발현하는 유전자를 가지고 있는 것으로 알려진 *Citrobacter freundii* 1주를 대조균으로 사용하였다. 문헌상의 조건에 따라 PCR을 수행하였을 경우 대상 유전자 모두 정상적으로 증폭되었으나 일부 명확치 않은 PCR 결과를 얻었다. Annealing temperature를 63°C로 조정하였을 경우 명확한 PCR 밴드를 확인할 수 있었으며, 43개 균주에서 *invA* 유전자는 *Citrobacter freundii*를 제외한 42개 종류의 모든 살모넬라 균주에서 확인할 수 있었고, *fliC-d* 유전자의 경우 문헌에서와 같이 *S. Typhi*를 포함하여 *S. Schwarzengrund*와 *S. Livingstone*에서만 확인 되었다. *viaB* 유전자는 *S. Typhi*에서만 확인되었고 *Citrobacter freundii*를 포함한 다른 살모넬라 혈청형에서는 확인되지 않았다. *prt* 유전자는 살모넬라균과 *Citrobacter freundii*에서 모두 확인 되었다(Table 2).

이번 연구에 사용된 유전자중 *invA* 유전자는 살모넬라균속 특이 유전자로서 모든 살모넬라균에서 공통적으로 확인이 되는 유전자이다[9]. *viaB* 유전자는 캡슐 항원인 Vi-항원 발현과 관련된 유전자로서 살모넬라균 중에서는 *S. Paratyphi C*와 *S. Dublin*과 함께 세 종류의 혈청형에서만 발현하는 것으로 알려져 있으나 *S. Paratyphi C*와 *S. Dublin*은 국내에서는 분리 보고된 예가 없다[1]. 간혹 *Citrobacter freundii*와 같은 일부 장내세균에서 Vi-협막 항원을 발현하는 경우가 있으나, 편모 발현에 관여하는 *fliC-d* 유전자와의 조합을 통해 보완할 수 있을 것으로 보인다. *S. Typhi*와 함께 *fliC-d* 유전자를 가지고 있는 것으로 확인된 혈청형은 *S. Livingstone*과 *S. Schwarzengrund*로서 두 혈청형은 Vi-항원 유전자(*viaB*)를 갖고 있지 않다. *prt* 유전자는 *rffB* 유전자의 일부 분으로 살모넬라균 중에서는 *S. Typhi*와 *S. Strasbourg*, *S. Paratyphi A* 그리고 *S. Enteritidis*에서만 확인이 된 것으로 보고되었으나[9], 실험 결과 모든 살모넬라균에서 공통적으로 확인 되었고, 대조 균주로 사용한 *Citrobacter freundii*에서도 유전자의 증폭이 확인이 되어 mPCR 구성에서는 배제하는 것이 적당할 것으로 보인다(Table 2). 살모넬라균속 특이 유전자인 *invA* 유전자의 증폭은 살모넬라균의 여부 및 시료 내 살모넬라균의 존재를 확인 하는 지표로 사용될 수 있으므로 별도의 대조 유전자는 필요하지 않을 것으로 보인다.

교차반응 검사를 통해 확인된 세 유전자(*invA*, *viaB*, *fliC-d*)를 바탕으로 triplex PCR을 구성하였다. 교차 반응에 대한 재확인과 분변 시료 내 살모넬라균의 탐지 여부를 확인하기 위한 특이도 검사를 위

Table 1. Oligonucleotide Sequence of Target Primers Used in This Study

Primer	Primer sequence 5' to 3'	Target gene	Amplicon size (bp)	Position of primers	GenBank (Accession No.)
InvAF	CGAGCAGCCGCTTAGTATTGAG	<i>invA</i>	881	78-999	U43273
InvAR	CCATCAAATTAGCGGAGGCTTC			1858-1837	
ViaBF	CACGCACCATCATTTACCG	<i>viaB</i>	738	165-184	D14156
ViaBR	AACAGGCTGTAGCGATTTAGG			902-882	
DhF	GCTTAATGRCCAAGATGCCTAC	<i>fliC-d</i>	587	516-537	L21912
DhR	GAGCAACGCCAGTACCATCTG			1102-1082	
PrtF	CGTTTGGGTTCTTGATCACG	<i>prt</i>	369	383-404	M29682
PrtR	CTATAATGGCGGCGGAGTTC			751-730	

Table 2. Amplification of target genes by multiplex PCR used in this study

Serovars	Management No.	InvA	ViaB	Dh	Prt
1	ATCC 9992	+	+	+	+
2	07-25	+	+	+	+
3	07-420	+	+	+	+
4	07-1408	+	+	+	+
5	07-1300	+	+	+	+
6	07-5400	+	+	+	+
7	ATCC 14028	+	-	-	+
8	07-823	+	-	-	+
9	07-3208	+	-	-	+
10	ATCC 13076	+	-	-	+
11	07-1409	+	-	-	+
12	07-1284	+	-	-	+
13	07-419	+	-	-	+
14	07-1293	+	-	-	+
15	07-2481	+	-	-	+
16	07-4716	+	-	-	+
17	07-1076	+	-	-	+
18	07-4644	+	-	-	+
19	07-1211	+	-	-	+
20	07-1395	+	-	-	+
21	ATCC 8389	+	-	-	+
22	07-825	+	-	-	+
23	07-2620	+	-	-	+
24	ATCC 6958	+	-	-	+
25	07-941	+	-	-	+
26	07-2291	+	-	-	+
27	ATCC-BAA664	+	-	-	+
28	07-6191	+	-	-	+
29	07-5213	+	-	-	+
30	ATCC 8390	+	-	-	+
31	07-2510	+	-	-	+
32	07-3927	+	-	-	+
33	06-2071	+	-	+	+
34	06-5198	+	-	+	+
35	07-2293	+	-	-	+
36	07-3121	+	-	-	+
37	07-1444	+	-	-	+
38	07-2464	+	-	-	+
39	ATCC 8400	+	-	-	+
40	07-1376	+	-	-	+
41	07-1377	+	-	-	+
42	04-1604	+	-	+	+
43	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	+

해 국내에서 분리율이 높은 8개 혈청형을 대상으로 실험을 수행하였다. 실험에 사용된 대상 균주로는 *S. Enteritidis* (ATCC 13076), *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *S. Typhi* (ATCC 9992), *S. Braenderup* (BAA-664), *S. London* (ATCC 8389), *S. Paratyphi A* (분리주), *S. Infantis* (분리주), *S. Montevideo* (분리주)이며 분변은 장티푸스 또는 살모넬라증의 감염 경험이 없는 건강한 사람의 분변을 채취하여 살모넬라균을 접종함으로써 시험조건을 조성하였다. 분변은 동일 양의 PBS와 희석하여 액체의 상태로 준비하였으며, 각 살모넬라균은 TSB에

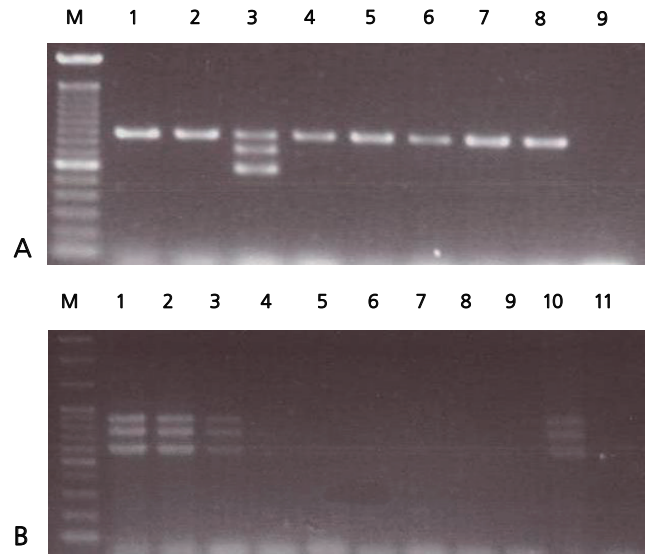


Figure 1. The specificity and sensitivity of modified multiplex PCR to detect *S. Typhi*. (A) Specificity of multiplex PCR. *invA* gene was amplified all *Salmonella* serovars but *viaB* and *fliC-d* was only *S. Typhi* by modified multiplex PCR. All *Salmonella* serovar was inoculated into human feces, concentration of 10^8 cfu/mL. M, 100 bp DNA ladder; Lane 1, *S. Enteritidis*; Lane 2, *S. Typhimurium*; Lane 3, *S. Typhi*; Lane 4, *S. Braenderup*; Lane 5, *S. London*; Lane 6, *S. Paratyphi A*; Lane 7, *S. Infantis*; Lane 8, *S. Montevideo*; Lane 9, Negative control (distilled water). (B) Sensitivity of multiplex PCR. Modified multiplex PCR was able to detect 10^5 cfu/mL of *S. Typhi*, which contained human feces. M, 100bp DNA ladder; Lane 1, 10^7 cfu/mL; Lane 2, 10^6 cfu/mL; Lane 3, 10^5 cfu/mL; Lane 4, 10^4 cfu/mL; Lane 5, 10^3 cfu/mL; Lane 6, 10^2 cfu/mL; Lane 7, 10^1 cfu/mL; Lane 8, 10^0 cfu/mL; Lane 9, 0 cfu/mL; Lane 10, Positive control; Lane 11, Negative control (distilled water).

각각 접종한 후 37°C 에서 18시간 배양하였다. 배양된 살모넬라균은 총 균수가 10^8 cfu/mL가 되도록 준비된 분변 1 mL에 희석한 후, 37°C 의 조건에서 1시간 배양하여 균의 활성도를 높였다. 희석액은 끓는 물에 10분간 넣었다가 얼음 속에서 식힌 후 13,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액만 수거하여 주형 DNA로 사용하였다.

또한 triplex PCR의 민감도를 알아보기 위하여 장티푸스균을 단계 희석하여 PCR을 수행하였다. *S. Typhi* (ATCC 9992)를 TSB에서 18시간 진탕 배양하고 배양액의 균수를 10^9 cfu/mL의 조건으로 조정하고 PBS (Phosphate Buffered Saline)를 이용하여 10단계로 희석하였다. 분변은 동일 양의 PBS와 희석하여 액체의 상태로 만들어 10개의 용기에 $900\ \mu\text{L}$ 씩 나누어 분주한 후 준비된 균액을 $100\ \mu\text{L}$ 씩 접종하여 9:1 (분변:균액)의 비율이 되도록 하였다. 접종한 분변은 4.5 mL의 TSB에 $500\ \mu\text{L}$ 씩 접종하여 최종적으로 100배 희석이 되도록 하였다. TSB에 접종한 균주는 37°C 의 조건에서 1시간 배양하여 균의 활성도를 높인 후 가열법으로 DNA를 추출하여 PCR검사를 수행하였다.

분변에 접종한 8종류의 살모넬라 혈청형에서 모두 속특이 유전자인 *invA*가 증폭되었고, 음성대조군에서는 유전자의 증폭을 확인할 수 없었다. 장티푸스 특이 유전자로 사용된 *fliC-d* 유전자와 *viaB* 유전자는 *S. Typhi*에서만 확인되어 triplex PCR로 변형한 mPCR이 정상적으로 장티푸스 및 살모넬라균을 감지할 수 있으며, 장티푸스 균에 대한 특이도가 있음을 확인할 수 있었다. 또한 장관내에 존재하는 다른 장내세균

에 의한 간섭현상은 확인이 되지 않았다(Fig. 1A). 분변을 단계 희석하여 접종한 *S. Typhi*는 10^5 cfu/mL 단위에서까지 탐지할 수 있는 민감도를 보여주었다(Fig. 1B). 이는 기존에 보고된 다른 문헌의 실험과 비교하여 유사하거나 상대적으로 낮은 감도이지만[10, 11] 염(salt)을 제거하거나 보조제 등의 사용 없이 증균액에서 바로 유전자를 채취하여 실험에 사용하였다는 점을 감안한다면 mPCR의 감도는 더 높아질 것으로 보인다. 또한 시료의 준비과정에서 증균 과정을 통해 균수를 충분히 확보한다면 임상적인 활용도는 더 높아질 것으로 보인다.

장티푸스의 진단을 위하여 Kumar 등[9]이 발표한 문헌을 바탕으로 mPCR진단법에 대한 조건을 확립하여 본 결과 annealing temperature를 63°C로 조정하였을 경우에 가장 충실한 실험 결과를 얻을 수 있었으며, 대상 유전자인 *invA*, *viaB* 그리고 *fliC-d* 유전자만으로도 충분히 진단이 가능하였다. 본 연구를 통해 *invA*, *viaB* 그리고 *fliC-d* 유전자를 이용한 mPCR의 민감도와 특이도를 확인하였고, 국내에서 분리되는 주요 살모넬라균을 분변에 접종 후 mPCR을 수행함으로써 교차반응과 검출 감도를 확인하였다. 시험법을 일부 변형한 triplex PCR법으로 임상적 활용도가 입증되었고, 일선 검사 기관에서 장티푸스 진단을 위한 분자유전학적 진단법으로 충분히 이용할 가치가 있을 것으로 사료된다. 그러나 mPCR법이 분변 내 장티푸스균을 진단할 수 있을 만큼의 민감도와 특이도를 가지고 있지만, 항생제 사용 등으로 인하여 유전자를 확인하였으나 균체를 검출하지 못하는 경우가 발생할 수 있으므로 시료는 증균된 균액을 사용하는 것이 좋을 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 토착화질환 퇴치사업의 일환인 장티푸스보균자 찾기 사업의 일환으로 수행하였으며, 연구를 위해 많은 조언을 해주신 이복권(前)장내세균과장님께 감사를 드립니다.

참고문헌

1. KCDC. Infectious Disease Web Statics, Surveillance data of Typhoid fever in Korea. Available at: <http://stat.cdc.go.kr>.
2. Lim BK, Thong KL. Application of PCR-based serogrouping of selected *Salmonella* serotypes in Malaysia. J Infect Dev Ctries 2009;3:420-8.
3. Hatta M, Smits HL. Detection of *Salmonella typhi* by nested polymerase chain reaction in blood, urine, and stool samples. Am J Trop Med Hyg 2007;76:139-43.
4. Prakash P, Mishra OP, Singh AK, Gulati AK, Nath G. Evaluation of nested PCR in diagnosis of typhoid fever. J Clin Microbiol 2005;43:431-2.
5. Lin CL, Chiu CH, Chu C, Huang YC, Lin TY, Ou JT. A multiplex polymerase chain reaction method for rapid identification of *Citrobacter freundii* and *Salmonella* species, including *Salmonella Typhi*. J Microbiol Immunol Infect 2007;40:222-6.
6. Levy H, Diallo S, Tennant SM, Livio S, Sow SO, Tapia M, Fields PI, Mikoleit M, Tamboura B, Kotloff KL, Lagos R, Nataro JP, Galen JE, Levine MM. PCR method to identify *Salmonella enterica* serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among *Salmonella* isolates from the blood of patients with clinical enteric fever. J Clin Microbiol 2008;46:1861-6.
7. Park SH, Kim HJ, Cho WH, Kim JH, Oh MH, Kim SH, Lee BK, Ricke SC, Kim HY. Identification of *Salmonella enterica* sub-species I, *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis and Typhi using multiplex PCR. FEMS Microbiol Lett 2009;301:137-46.
8. Octavia S, Lan R. Single-nucleotide-polymorphism typing and genetic relationships of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolates. J Clin Microbiol 2007;45:3795-801.
9. Kumar S, Balakrishna K, Batra HV. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*) by selective amplification of *invA*, *viaB*, *fliC-d* and *prt* genes by polymerase chain reaction in mutiplex format. Lett Appl Microbiol 2006;42:149-54.
10. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001;1.43-1.50.
11. Teh CS, Chua KH, Puthucheary SD, Thong KL. Further evaluation of a multiplex PCR for differentiation of *Salmonella* paratyphi A from other salmonellae. Jpn J Infect Dis 2008;61:313-4.

Accessed 10 February 2010.