오리 도체에서 등온유전자증폭기법을 이용한 *Salmonella* spp. 신속 고감도 검출 기법 연구

조애리 · 동희진 · 조성범*

서울대학교 수의과대학 공중보건학교실

Rapid and Sensitive Detection of *Salmonella* spp. by Using a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay in Duck Carcass Sample

Ae-Ri Cho, Hee-Jin Dong, and Seongbeom Cho*

College of Veterinary Medicine and Research Institute for Veterinary Science,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract

In this study, a rapid and sensitive detection tool for screening *Salmonella* spp. by using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay targeting the genomic sequence of the *invA* gene was developed. The inclusivity and exclusivity were both at 100% in the analysis, and the limit of detection (LOD) in a pure *S. Enteritidis* culture suspended in saline was 3.2×10^3 CFU/mL at 18.17 min ($R^2 = 0.9446$). The LODs of the LAMP assay in buffered peptone water with *Salmonella* (BPW) and duck carcass swab sample enriched in BPW with *Salmonella* (BPWS) after 0 and 12 h incubation were 3.2×10^3 CFU/mL and 3.2×10^0 CFU/mL, respectively. Comparing the LODs in BPW with those in BPWS, the LAMP assay was less influenced by compounds of duck carcass swab sample than the PCR assay. Sensitivity and specificity of the LAMP assay in 50 duck carcass swab samples enriched in BPW for 6 h were 96% and 84%, respectively, indicating that the LAMP assay is a rapid, simple and sensitive assay, which can be utilized as a potential screening tool of *Salmonella* spp. in duck carcass sample.

Key words: loop-mediated isothermal amplification, *Salmonella* spp., screening, duck

서 론

*Salmonella*는 장내세균과에 속하는 통성혐기성의 그람 음성 간균으로, 균 속의 다양한 혈청형이 사람에서 병원성을 나타내는 주요 식중독 원인체이다. 사람에서의 살모넬라 감염증은 주로 식품 매개 형태로 발생하며 복통, 설사, 발열 등의 임상증상을 보인다. 특히 영·유아, 노인, 면역결핍환자 등에서 임상증상은 중증으로 발전될 수 있으며 드물게 사망까지 이르는 매우 치명적인 결과를 야기할 수 있다. 전 세계적으로 살모넬라에 의한 식중독 사고는 세균성 식중독 사고의 대부분을 차지한다. 미국에서는 *Salmonella*에 의한 식중독 사고가 연간 150만건에 이르며(Steve Yan *et al.*, 2004), 인접 국가인 중국에서는 세균성 식중독 사고의 70-

80%가 *Salmonella*로 인해 발생하는 것으로 보고되고 있다(Yang *et al.*, 2010). 국내 식품의약품안전처 식중독 통계 시스템 자료에 따르면, 2011년 *Salmonella* 식중독은 24건, 환자수 1,065명으로 보고되어 세균성 식중독 사고 중 병원성 대장균에 이어 두 번째로 높은 수준으로 보고되었다. *Salmonella* 식중독을 예방하기 위한 국가적 차원의 노력에도 불구하고 매년 *Salmonella* 식중독 사고는 꾸준히 발생하여 경제적 손실을 일으키고 있는 실정이다.

*Salmonella*는 현재까지 2,500여 종 이상의 다양한 혈청형이 보고되었으며, 그 중 식중독을 일으키는 주요한 혈청형으로 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium (*S. Typhimurium*)과 *Salmonella enterica* serotype Enteritidis (*S. Enteritidis*)가 있다(Yang *et al.*, 2010). 특히 *S. Enteritidis*는 가금류에 흔히 감염되어 오염된 식육 또는 계란을 통해 폭발적인 식중독 사고를 일으키기 때문에 가금류에서의 살모넬라 감염의 예방 및 차단은 공중보건학적으로 매우 중요하다. 그러나 가금류의 경우 대부분 농장에서 밀집사육되고

*Corresponding author: Seongbeom Cho, College of Veterinary Medicine and Research Institute for Veterinary Science, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea. Tel: 82-2-880-1270, Fax: 82-2-880-1233, E-mail: chose@snu.ac.kr

있기 때문에 오히려 *Salmonella* 전파가 용이한 실정이다 (Penha Filho *et al.*, 2009). 또한, 도계과정 중 분변 및 근접 도체에 의한 2차오염 및 교차오염도 *Salmonella*에 의한 식중독 사고의 위험을 더욱 증가시키는 요인이다. 국내 가금류 중 소비량이 가장 높은 계육에서의 *Salmonella* 오염에 대해서는 국내외적으로 많은 연구가 보고되어 있으나, 두 번째로 소비량이 높은 오리육의 *Salmonella* 오염에 대해서는 그 연구가 부족한 실정이다 (Cha *et al.*, 2013). 그러나 2003년부터 2005년간 영국에서 가금육 중 *Salmonella* 오염이 가장 높았던 종류는 오리육(29%)으로, 이는 계육(5%)의 오염수준을 훨씬 상회하는 것으로 오리육에 의한 *Salmonella* 식중독 사고 위험이 높음을 시사한다 (Little *et al.*, 2008). 최근 국내 오리육의 소비량이 점차 증가함을 감안할 때, 오리육에서 *Salmonella* 균체를 빠른 시간 내에 검출하여 *Salmonella* 감염 위험을 최소화하는 것이 *Salmonella*의 전파를 초기에 차단하여 오리 산업은 물론 공중보건학적으로도 경제적·인적 손실을 방지할 수 있는 매우 중요한 전략이라고 할 수 있다.

*Salmonella*균의 검출법으로는 전통적으로 표준배양법이 사용되고 있다. 그러나 이 방법은 균의 특성상 배양 및 분리, 동정까지 최소 3일에서 5일 정도가 소요되는 단점이 있다. 또한 동시에 많은 양의 시료를 처리하는데 집약적인 노동력이 필요하므로 신속하고 정확한 검출을 통한 원인균 조기 스크리닝에 활용하기에는 어려움이 있다.

최근 기존의 표준배양법과 병용하여 유전자 기반의 검출법인 PCR(Polymerase Chain Reaction)법 및 real-time PCR법 등이 여러 분야에 응용되고 있다. 이는 균 특이 유전자를 증폭함으로써 원인균을 검출할 수 있는 기법으로 표준배양법과 비교하였을 때 간단하고 신속하게 결과를 판정할 수 있는 장점이 있다. 그러나 PCR의 경우 증폭산물을 확인하기 위하여 한천 겔 상에서 전기영동 과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있을 뿐만 아니라, 우유 및 식육 등 식품 시료 성분에 의한 유전자 증폭반응의 저해가 우려되기도 한다 (Bickley *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2000; Rossen *et al.*, 1992).

등온유전자증폭(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)법은 기존의 유전자증폭법인 PCR 및 real-time PCR과 유사하나 신속·민감·정확도가 뛰어난 방법으로 최근 여러 분야에 걸쳐 다양하게 응용되고 있다 (Jiang *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013; Techathuvanan *et al.*, 2010; Thekiso *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). 기존의 유전자 증폭 방법들이 온도 구배 조건 하에서 반응이 진행되는 것과 다르게, 이 방법은 등온조건에서 *Bst* DNA polymerase 등을 활용하여 주형 DNA 이중나선 구조의 열 변성 없이 증폭 반응이 진행된다. 또한, 등온 증폭법에 사용되는 6개의 primer (반응에 반드시 필요한 inner primer set 및 outer primer set와 증폭반응을 더욱 가속화시키는 loop primer set

등)는 타깃 유전자 서열의 각기 다른 8개의 부위를 인식하여 유전자 증폭을 진행하므로 여타 방법에 비해 민감도 및 특이도를 향상시킬 수 있다 (Nagamine *et al.*, 2002; Notomi *et al.*, 2000; Tomita *et al.*, 2008). 반응 산물은 특정 유전자가 증폭되면서 생성되는 부산물의 탁도 혹은 형광발현 유무를 통해 육안으로 간단하게 판독할 수 있고 등온에서 반응되기 때문에 현장적용성이 탁월한 장점이 있다 (Tomita *et al.*, 2008). 또한, 1시간 이내로 특정 유전자의 증폭유무를 정확하게 관찰할 수 있어 기존의 유전자 증폭기법들에 비해 신속성이 뛰어나 식중독 사고 발생 시 원인체의 신속, 간단한 검출을 위한 효과적인 기법으로 이용될 수 있다. 한편, 반응액에 증폭산물과 결합할 수 있는 형광 시료를 첨가하면 실시간으로 증폭산물을 관찰하고 간접적으로 정량할 수 있으므로 원인체의 검출뿐만 아니라 정량기법으로도 활용할 수 있는 장점을 지니고 있다.

본 연구에서는 오리도체에서의 신속·정확하고 간단한 *Salmonella* 균체 검출 기법의 개발을 목표로 LAMP의 적용 가능성을 평가하였다. *Salmonella*의 *invA* 유전자를 마커로 primer를 제작하여 inclusivity 및 exclusivity를 평가하였고, 검출한계를 결정하고 정량공식을 유도하여 개발된 LAMP 기법의 검출능 및 정량화 가능성을 평가하였다. 또한, *S. Enteritidis*가 인공접종된 오리도체시료, 순수 *S. Enteritidis* 증균액 및 실제 도압장에서 채취한 오리도체시료의 증균액에 적용하여 각각의 검출능을 PCR과 비교·평가하였다.

재료 및 방법

공시 균주

본 연구에서는 사용한 균주정보는 Table 1에 제시되어 있다. 한국생명자원센터(KCTC)에서 분양받은 *S. Enteritidis* KCTC 23837, *S. Typhimurium* KCTC 12456을 inclusivity 실험 및 양성대조군으로 실험에 이용하였다. 농림수산검역검사본부에서 분양 받은 다양한 혈청형의 *Salmonella* spp. 44주 및 오리도체시료에서 분리한 *Salmonella* spp. 10주는 inclusivity 실험에 이용하였다. *Salmonella* 외의 표준균주 12주는 exclusivity 실험에 이용하였다. Inclusivity는 실험에 이용된 *Salmonella* spp.의 표준균주 및 분리주 중 개발된 LAMP법으로 증폭반응을 보인 비율로 정의하였고, exclusivity는 실험에 이용된 non-*Salmonella* spp.의 표준균주 및 분리주 중 개발된 LAMP법으로 증폭반응이 나타나지 않은 비율로 정의하였다.

Genomic DNA의 추출

시험 균주가 접종된 증균액 상에서의 DNA를 추출하기 위하여 DNeasy Tissue kit (Qiagen, USA)를 제조사의 권장 실험방법에 준하여 사용하였다. 실제 도압장에서 채취한 오리도체시료의 증균액 상에서의 DNA는 InstaGeneTM Matrix

Table 1. List of bacterial strains used in this study

Species	Sources	No. of strain
<i>Salmonella</i> spp. (reference strains)		
serotype Enteritidis KCTC 23837	Deposited by CDC	1
serotype Typhimurium KCTC 12456	Derived from existing strain (US)	1
<i>Salmonella</i> spp. (wild type strains)		
serotype Enteritidis	Chicken (feces, meat and liver)	15
serotype Typhimurium	Pig and Cattle (feces, meat and slaughterhouse)	15
serotype Hadar	Pig	1
serotype Montevideo	Chicken	1
serotype schwarzengrund	Pig	1
serotype Infantis	Chicken	1
serotype Reading	Chicken	1
serotype Newport	Pig	1
serotype Give	Cattle	1
serotype Senftenberg	Chicken	1
serotype Bareilly	Chicken	1
serotype Lagos	Chicken	1
serotype Rissen	Pig	1
serotype Heidelberg	Chicken	1
serotype London	Pig	1
serotype Derby	Pig	1
<i>Salmonella</i> spp.	Duck (carcass swab)	10
Gram-negative bacteria		
<i>E. coli</i> (ATCC 43894, 43890, 19853)	Human feces	3
<i>Campylobacter</i> spp. (ATCC 33291 and 33559)		2
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 29903		1
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	Human feces	1
<i>Cronobacter sakazakii</i> ATCC 29544		1
Gram-positive bacteria		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	Deposited by FDA	1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33586	Vagina of toxin shock syndrome patient (US)	1
<i>Listeria</i> spp. (ATCC 15313 and 33090)		2
Total		68

(Bio-Rad Inc., USA)를 제조사의 권장 실험방법에 준하여 사용하였다. 분리한 DNA는 주형으로서 PCR 및 LAMP 반응에 곧바로 사용할 경우 4°C에 보관하였고, 장기 보관할 경우에는 20 µL씩 분주하여 -20°C에 보관하였다.

invA 유전자 검출을 위한 LAMP Primer 제작

Salmonella 특이적인 LAMP primer 제작을 위하여 다양한 *Salmonella* spp.의 *invA* 유전자 서열(Genebank number U43252, U43272, U43273, M90846, NC016857)을 대상으로 CLUSTAL W (Lasergene® 10.1.1, USA)법을 사용하여 consensus 서열을 확보하였다. 확보한 consensus 서열을 토대로 Primer explorer V4.0 software (<http://primerexplorer.jp>, Fujitsu Ltd., JP)을 사용하여 LAMP primer를 제작하였다. 총 제작된 LAMP primer는 3쌍으로, Inner primer set (FIP, BIP), Outer primer set (F3, B3) 및 Loop primer set (LF, LB)로 구성하였다. 제작된 LAMP primer 서열은 다음과 같다; FIP 5'-ATGATGCCGGCAATGGCGTCAGCCAGCTT

TACGGTTCCT-3', BIP 5'-GATGACCCGCCATGGTATGG ATCCATCACCGATGGTCAGC-3', LF 5'-TTGATAAACT TCATCGCACCGT-3', LB 5'-TTATCCTCCGCGCTGTCTA CTTA-3', F3 5'-GAAGCGTACTGGAAAGGGAA-3', B3 5'-GGGATCTGGGCGACAAGA-3'.

LAMP 및 PCR법의 반응 조건

LAMP 반응액은 *GspSSD* DNA polymerase (OptiGene Ltd., UK)를 이용하여 제조하였다. 총 반응액 20 µL 중 primer의 최종농도는 FIP 및 BIP 0.8 µM, LF 및 LB 0.4 µM, F3 및 B3 0.2 µM으로 설정하였으며 *GspSSD* DNA polymerase 6 U, 주형 DNA는 4 µL 첨가하였다. 음성대조군의 경우에는 Nuclease free 3차 멸균증류수를 주형으로 첨가하였다. 반응액은 Genie® II platform (OptiGene Ltd., UK)을 이용, 60-67°C 사이의 온도에서 최적화 실험을 선행하여 같은 농도에서 검출시간이 가장 빨랐던 65°C에서 30분 동안 증폭을 수행하였다. 증폭결과는 X축의 검출시간(T)과 Y축

의 형광세기(K)의 증폭곡선으로 관찰하였고, 분석 결과 도출되는 annealing temperature값을 기반으로 $85.87 \pm 0.26^\circ\text{C}$ 범위 내의 값을 갖는 시료를 양성으로 판정하였다.

PCR반응은 기존에 보고된 연구의 primer 및 반응 조건을 참고하여 실험하였다(Rahn *et al.*, 1992). 총 25 μL 의 반응용액은 AmpliTaq® Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, UK)을 사용하여 제조하였으며, 1 μL 주형 DNA를 첨가하였다. 음성대조군의 경우 Nuclease free 멸균3차중류수를 주형으로 1 μL 첨가하였다. 반응용액의 증폭은 MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Inc., USA)를 사용하였다.

모든 실험군에서 양성대조군(*S. Enteritidis* KCTC 23837)과 음성대조군(Nuclease free 3차 멸균중류수)을 사용하였다. 표준곡선 및 정량공식을 유도하기 위한 검출한계 실험은 3반복하였으며, 그 외는 2반복 실험하였다.

검출한계 실험을 위한 *Salmonella* 순수 배양액의 준비

Tryptic Soy Agar (TSA, Becton Dickinson, USA)에서 순수 분리된 *S. Enteritidis* KCTC 23837의 1개 집락을 Tryptic Soy Broth (TSB, Becton Dickinson, USA)에 접종하여 37°C 에서 24시간 배양한 후 McFarland scale 2.5에 맞추었다. 멸균생리식염수에 10배씩 단계희석한 후, Plating Count Agar (Becton Dickinson, USA)에 접종하여 37°C 에서 24시간 배양하고 균수를 측정하였다. 단계별 희석된 시료 중의 1 mL은 바로 DNA를 추출하여 검출한계 실험에 사용하였다. 검출한계 실험은 3반복하였으며, 상용로그로 변환된 단계희석 시료의 CFU수준과 그에 해당하는 검출시간의 산포도를 그려 표준곡선 및 정량공식을 유도하였고, 이 때 얻어지는 상관관계계수 (R^2)를 토대로 결과를 최종 평가하였다.

한편, 순수 *Salmonella* 증균액(BPW) 상에서의 검출한계 및 *Salmonella*가 인공접종된 오리도체시료 증균액(BPWS)에서의 검출한계 실험에 사용하고자 단계별 희석된 시료 중의 1 mL은 각기 BPW 혹은 오리도체시료가 접종된 BPW 9 mL에 접종하였다. 접종 후 배양 0시간 및 12시간에 각 시료당 1 mL씩을 취하여 바로 DNA를 추출하거나 -20°C 에서 보관 후 DNA를 추출하여 검출한계 실험에 사용하였다.

인공 접종 실험을 위한 오리도체시료 채취 및 균주 분리 방법

2013년 5월 1회에 걸쳐 서울시 구로구 소재의 대형마트 1곳에서 냉동상태의 오리(지육)를 구입하여 4°C 에서 실험실로 즉시 운송하였다. 50°C 로 설정된 항온수조에서 급격히 해동한 오리 지육을 5 mL의 buffered peptone water(BPW, Becton Dickinson, USA)로 습한 멸균된 거즈를 사용하여 흡부를 3-5회 겹치지 않게 닦아낸 후 25 mL의 BPW에 넣고 세게 진탕하였다. 진탕액 10 mL를 90 mL의 BPW에 접종하여 37°C 에서 24시간 정치배양하였다. BPW 배양액

1 mL를 Tetrathionate broth, Hajna (TTH, Becton Dickinson, USA) 배지 10 mL 중에 접종하여 진탕한 후 37°C 에서 24시간 정치배양하였다. TTH 배양액 10 μL 를 XLT4 한천 배지에 접종하여 37°C 에서 24시간 배양한 후 전형적인 *Salmonella* 집락이 형성되지 않았음을 확인하고, BPW 배양액에서의 LAMP 및 PCR 결과 *invA* 유전자의 증폭산물이 관찰되지 않음을 확인한 후 인공접종 실험의 시료로 사용하였다.

오리도체에서의 *Salmonella* 균주 분리 및 민감도·특이도 실험

2013년 6월 1회에 걸쳐 국내 소재의 도압장 1곳에서 오리도체의 표면시료 100점을 수집하였다. 5 mL의 멸균생리식염수로 습한 멸균된 거즈를 사용하여 도체의 흡부를 3-5회 겹치지 않게 닦아낸 후, 25 mL의 BPW에 넣어 냉장조건에서 실험실로 즉시 운송하였다. 시료를 세게 진탕한 후, 진탕액 10 mL를 37°C 에서 6시간 정치배양하였다. BPW 배양액 1 mL를 TTH 배지 10 mL 중에 접종하여 진탕한 후 37°C 에서 24시간 정치배양하였다. TTH 배양액 10 μL 를 XLT4 한천 배지에 접종하여 37°C 에서 24시간 배양한 후 전형적인 *Salmonella* 집락을 관찰한 후, 양성 추정 집락만을 선택하여 Rambach 한천 배지(Becton Dickinson, USA)에 접종하여 37°C 에서 24시간 배양하였다. 양성 추정 집락은 VITEK 2 compact system (BioMerieux, France)을 사용하여 생화학적 동정을 거쳐 최종적으로 판정하였다.

BPW 배양액 1 mL은 오리도체시료 증균액에서의 민감도 및 특이도 실험을 위하여 -20°C 에서 보관 후 DNA를 추출하였다. *Salmonella* 양성 및 음성 시료 각각 25개씩 총 50개 시료에서 추출한 DNA는 LAMP 및 PCR법을 사용하여 민감도 및 특이도 실험을 수행하였다. 25개 양성 및 음성 시료 중 LAMP 및 PCR로 각각 양성 및 음성으로 판정된 시료수의 비율을 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)에 반영하였다.

결과 및 고찰

LAMP의 inclusivity 및 exclusivity 시험

*Salmonella*의 *invA* 유전자는 상피세포 부착 및 침습에 관련된 필수적인 유전자로, *Salmonella* 고유의 특이 서열을 가지고 있어 다양한 종류의 시료로부터 *Salmonella* 균체 검출에 활용되고 있다(Ferretti *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 1999; Lampel *et al.*, 2000). *invA* 유전자 외에도 *phoP* 유전자 등도 *Salmonella* 검출 연구에 많이 활용되고 있으나, *phoP* 유전자는 대부분의 *Enterobacteriaceae*에 존재하므로 분변 및 환경 샘플에서 비특이 반응에 의해 *Salmonella* 오염 수준이 잘못 예측될 우려가 있다(Zhang *et al.*, 2011). 따라서 본 연구에서는 마커로서 *invA* 유전자를 선정하여 *Salmonella* 특이적인 LAMP primer를 제작하여 inclusivity 및 exclusivity

Fig. 1. The limit of detection and standard curve of the LAMP assay targeting the *invA* gene of *Salmonella* spp. in a pure *S. Enteritidis* culture suspended in saline. (A) The amplification curve indicates time (min) on the X-axis and the amount of fluorescence detected (K) on the Y-axis. Each amplification curve is tagged with an arrow and a corresponding sample serially diluted from 3.2×10^7 to 3.2×10^3 CFU/mL on the graph, (B) The standard curve shows CFU/mL in log scale on the X-axis against time in minutes on the Y-axis. The quantification equation and R^2 value are shown on the graph.

실험을 수행하였다.

총 56개 *Salmonella* 표준균주 및 분리주에 대해 LAMP의 inclusivity 시험을 시행한 결과, 56주에서 모두 양성 of 증폭반응이 관찰되었다. 한편, 총 12개 non-*Salmonella* spp. 표준균주에 대해 exclusivity 시험을 시행한 결과, 12주에서 모두 음성 of 증폭반응이 관찰되어 inclusivity 및 exclusivity는 각각 100%로 판정하였다. 모든 실험군에서 양성대조군과 음성대조군을 사용하였으며 가양성 및 가음성 결과는 관찰되지 않았다. 같은 시료를 PCR법으로 실험한 결과도 이와 같이 관찰되었으므로, 다른 연구들에서 보고된 바와 마찬가지로 *Salmonella* 균을 검출하는데 있어서 *invA* 유전자는 매우 효과적인 것으로 생각된다.

LAMP법의 검출한계

순수 배양된 *Salmonella* 희석액에서 LAMP의 검출한계를 알아보고자 멸균생리식염수상에 단계희석하여 준비한 시료

를 이용하여 실험을 수행한 결과, 3.2×10^7 CFU/mL부터 3.2×10^3 CFU/mL까지 11.08분에서 18.17분 사이에서 순서대로 성공적으로 증폭되었다(Fig. 1A). 총 반응시간 30분이 지난 후 annealing temperature 결과를 토대로 모두 양성 of 증폭산물이 생성되었음을 관찰하였다($85.87 \pm 0.26^\circ\text{C}$). 이를 토대로 LAMP법의 검출한계를 3.2×10^3 CFU/mL로 결정하였으며, 이 때의 검출시간은 평균 18.17 ± 0.80 분이었다. 같은 시료를 PCR로 실험한 결과 검출한계는 3.2×10^5 CFU/mL로 관찰되어 본 연구에서 개발된 LAMP법이 PCR보다 100배 더 민감한 것으로 나타났다. 이 결과는 *fimY* 유전자를 특이 마커로 한 LAMP기법을 순수 배양된 *Salmonella*의 희석액에 적용하였을 때의 검출한계를 $4.8\text{--}6.0 \times 10^3$ CFU/mL으로 보고한 결과와 유사한 것으로 관찰되었고(Tang *et al.*, 2012), *invA* 유전자를 특이 마커로 *Salmonella* 검출 기법을 개발한 연구에서는 LAMP의 검출한계를 10^4 CFU/tube로 보고하여(Zhang *et al.*, 2011), 본 연구에서 개발한 LAMP

기법이 더욱 민감한 것으로 생각된다.

위 결과를 토대로 LAMP의 간접정량화 가능성을 평가하고자 유도된 정량공식은 $y = -1.7667x + 23.734$ 이었고, 이 때의 R^2 값은 0.9446이었다(Fig. 1B). *E. coli*의 시가독소 유전자(*stx*)를 타깃으로 LAMP법을 개발한 연구에서는 R^2 값의 범위를 0.904부터 0.997 사이로 보고하였다(Wang *et al.*, 2012). 이와 비교하였을 때, 본 연구에서 유도한 정량공식은 3.2×10^7 CFU/mL에서 3.2×10^3 CFU/mL 사이의 범위에서 검출시간을 바탕으로 미지의 농도로 존재하는 *Salmonella* 균체를 간접적으로 정량할 수 있음을 알 수 있다.

Salmonella 증균배지상에서의 LAMP법의 검출한계

BPW 배지에서 12시간 배양한 *Salmonella* 증균액(BPW-12) 상에서의 검출한계는 LAMP 및 PCR 모두 시험한 범위 내의 시료(3.2×10^6 CFU/mL부터 3.2×10^0 CFU/mL까지)에서 증폭되었다(Table 2). 한편, BPW배지에서 접종 후 0시간에서의 *Salmonella* 증균액(BPW-0) 상에서의 LAMP와 PCR의 검출한계는 각각 3.2×10^3 CFU/mL 및 3.2×10^5 CFU/mL로 LAMP법이 100배 더 민감한 것으로 관찰되었다.

균종별로 다양한 성분으로 구성된 각 증균배지는 유전자 기반의 균체 검출 기법 연구에 신속성 및 정확도를 검증하기 위하여 유용하게 쓰이고 있다. 그러나 증균액 상에서 균체의 DNA를 추출할 때 *Listeria* 증균배지인 Fraser broth 및 modified *Listeria* enrichment broth (LEB), *Lactobacillus* 증균배지인 MRS broth 및 *Salmonella* 2차 증균배지인 Rappaport broth 등은 PCR 반응을 저해한다는 보고가 있다(Rossen *et al.*, 1992). 다양한 시료의 *Salmonella* 시험법에서 1차 증균배지로 활용되는 BPW의 성분이 유전자 증폭반응에 미치는 영향을 알아보기 위하여 BPW-0와 멸균생리식염수 상에서의 검출한계를 비교한 결과, LAMP 및 PCR에서 3.2×10^3 CFU/mL 및 3.2×10^5 CFU/mL로 일정하여 BPW

배지의 성분은 LAMP 및 PCR반응을 저해하지 않음을 알 수 있었다. 한편, real-time PCR을 응용한 식품 시료 내 원인체 검출 기법 연구에서는 시료에 의한 증폭반응의 저해 유무를 알아보기 위하여 시료에 상관없이 항상 일정하게 증폭되는 internal amplification control (IAC)를 반응용액 중에 첨가하기도 하나(McCabe *et al.*, 2011; Rodriguez *et al.*, 2012a, 2012b), LAMP 기법에서는 해당 연구가 전무한 실정이다. 향후 본 연구에서 개발한 LAMP 기법에 이 점을 보장한다면 시료 및 배지 중에 존재할 수 있는 증폭반응 저해제의 유무를 보다 간단하고 빠르게 판정할 수 있을 것으로 생각된다.

인공접종된 오리도체시료 증균액에서의 LAMP 및 PCR의 검출한계

오리도체시료 증균시료에서의 *Salmonella* 검출한계를 알아보기 위하여 인공접종 실험을 수행하였다. 오리도체시료가 인공적으로 접종된 BPW 배지에 *Salmonella* 균체를 3.2×10^6 CFU/mL부터 3.2×10^0 CFU/mL까지 각각 단계적으로 희석하여 접종 후 0시간(BPWS-0) 및 12시간(BPWS-12) 증균액을 실험에 사용하였다. 12시간 증균 후 LAMP의 검출한계는 3.2×10^0 CFU/mL이었고, PCR의 검출한계는 3.2×10^1 CFU/mL로 LAMP가 10배 더 민감한 것으로 관찰되었다(Table 2). 한편, 접종 후 0시간에서 LAMP의 검출한계는 3.2×10^3 CFU/mL이었고, PCR의 검출한계는 3.2×10^5 CFU/mL로 LAMP가 PCR보다 100배 더 민감한 것으로 관찰되었다.

배양액 종류에 상관없이 12시간 증균액의 LAMP 및 PCR의 검출한계 결과를 비교하면 LAMP의 검출한계는 3.2×10^0 CFU/mL로 일정하였으나 PCR의 검출한계는 오리도체시료가 포함된 증균액에서 감도가 10배 떨어지는 것으로 관찰되었다. 이와 유사하게 PCR은 높은 농도의 지방, 단백질

Table 2. Comparison of the limits of detection of PCR and LAMP methods in 2 types of *Salmonella* cultures

No. of CFU/mL		Buffered Peptone Water (BPW)				Duck carcass swab enriched in BPW (BPWS)			
		0 h (BPW-0)		12 h (BPW-12)		0 h (BPWS-0)		12 h (BPWS-12)	
		PCR	LAMP	PCR	LAMP	PCR	LAMP	PCR	LAMP
3.2×10^6	A	+	+	+	+	A	+	+	+
	B	+	+	+	+	B	+	+	+
3.2×10^5	A	+	+	+	+	A	+	+	+
	B	+	+	+	+	B	+	+	+
3.2×10^4	A	-	+	+	+	A	-	+	+
	B	-	+	+	+	B	-	+	+
3.2×10^3	A	-	+	+	+	A	-	+	+
	B	-	-	+	+	B	-	+	+
3.2×10^2	A	-	-	+	+	A	-	-	+
	B	-	-	+	+	B	-	-	+
3.2×10^1	A	-	-	+	+	A	-	-	+
	B	-	-	+	+	B	-	-	+
3.2×10^0	A	-	-	+	+	A	-	-	+
	B	-	-	+	+	B	-	-	+

질, 염 등의 성분이 포함된 식품을 시료로 사용할 경우 매우 민감하게 반응한다는 보고가 있다(Rossen *et al.*, 1992; Waage *et al.*, 1999). 본 연구에서 개발한 LAMP기법에서는 지방, 단백질 등의 성분이 포함된 오리도체시료에 의한 반응의 저해가 관찰되지 않아 PCR에 비해 시료 내 *Salmonella* 균체 존재 여부를 정확하게 검출할 수 있는 효과적인 방법임을 알 수 있다.

오리도체시료 1차 증균액에서의 LAMP 및 PCR의 민감도 및 특이도 비교

도압장에서 수집한 오리도체시료 1차 증균액(BPW에서 6시간 배양)에서의 LAMP와 PCR의 민감도 및 특이도를 비교하고자 표준배양법으로 확인된 양성 및 음성시료 각각 25개씩 총 50개의 시료를 사용한 결과는 Table 3에 제시되어 있다. LAMP법으로는 25개 양성시료 중 24개(민감도 96%)를 양성으로 판정할 수 있었고, PCR은 13개의 시료를 양성으로 판정하였다(민감도 52%). 이는 표준 배양법과 달리 2차 증균액인 TTH배양액을 사용하지 않고 BPW에서 6시간 배양한 1차 증균액을 사용하였기 때문에, 증균액 중 *Salmonella*가 LAMP의 검출한계 이하로 존재하여 25개 양성시료 중 1개에서 음성으로 판정된 것으로 생각된다. 그러나 PCR법에 비교했을 때 LAMP법은 1차 증균만으로도 시료 내에 적은 농도로 존재하는 *Salmonella* 균체를 효과적으로 검출할 수 있음을 보여준다. 뿐만 아니라 표준배양법으로는 최종 판정까지 5일 가량의 시간이 소요되지만, 본 연구에서 개발한 LAMP법으로는 6시간 동안 배양한 1차 증균만으로도 시료 채취 당일에 신속히 결과를 판정할 수 있기 때문에 검사 시간, 인력 및 비용을 효과적으로 절감할 수 있는 방법이라고 생각된다.

한편, LAMP법으로 25개 음성시료 중 4개(특이도 84%)를 양성으로 판정하였으나 PCR법으로는 0개를 양성으로 판정하였다(특이도 100%). 이는 초기의 오리도체시료에 이미 생장이 정지되었거나 혹은 표준배양법으로는 생장이 복구되지 못할 정도의 손상을 받은 균체가 LAMP의 검출한계 이상 존재하여 양성으로 판정된 것으로 생각된다. DNA는 사균에서도 존재하기 때문에 DNA 기반의 원인체 검출

기법은 생균에만 존재하는 RNA 기반의 기법에 비해서 시료 중에 존재하는 원인체의 정확한 오염 수준을 반영하지 못하는 단점이 있다. 다른 연구에서는 증식이 가능한 살아 있는 균체만을 검출하기 위하여 RNA를 역전사하여 증폭시키는 LAMP법을 이용하기도 했으나(Techathuvanan and D'Souza, 2012), 시료 내 RNA 존재의 불안정성 등을 이유로 생균의 DNA에만 선택적으로 결합하는 물질을 응용하여 검출법을 개발하는 등의 방법을 사용하기도 했다(Chen *et al.*, 2011; Wang and Mustapha, 2010). 향후 상기와 같은 방법을 본 연구에서 개발한 LAMP기법에 응용한다면 더욱 정확도가 향상된 살모넬라 검출 결과를 관찰할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 *Salmonella invA* 유전자를 기반으로 LAMP기법을 개발하여 오리도체시료내의 *Salmonella* 검출능을 평가함으로써 신속 고감도 검출 기법임을 확인하였다. 향후 본 연구에서 개발한 LAMP기법을 도압장 및 농장 수준에서 활용한다면 국내 오리육 및 오리농장에서의 *Salmonella* 발생률을 간단하고 정확하게 파악하여 공중보건학적 기초 자료로 활용할 수 있을 것이며, *Salmonella*에 오염된 축산식품의 조기 스크리닝 시스템으로서 효과적으로 활용될 수 있을 것이다.

요 약

본 연구에서는 *Salmonella invA* 유전자를 마커로 *Salmonella* 특이 LAMP primer를 제작하였고, inclusivity 및 exclusivity 실험 결과는 각각 100%로 관찰되었다. 순수 배양된 *Salmonella* 희석액에서의 검출한계는 18.17분에서 3.2×10^3 CFU/mL ($R^2 = 0.9446$)으로 관찰되어 신속·간단하고 민감도가 높아 *Salmonella* 검출을 위한 방법으로 효과적일 뿐만 아니라 간접적인 정량기법으로서도 활용 가능성을 알 수 있었다. 1차 증균 배지인 BPW에 *S. Enteritidis* 접종 후 0시간 및 12시간 배양 후 LAMP의 검출한계는 각각 3.2×10^3 CFU/mL 및 3.2×10^0 CFU/mL로 관찰되었고, 오리도체시료가 포함된 BPW에 *S. Enteritidis* 접종 후 0시간 및 12시간 증균액에서의 LAMP 검출한계는 각각 3.2×10^3 CFU/mL 및 3.2×10^0 CFU/mL로 관찰되어 PCR과 비교하였을 때 오리도체시료 성분에 의한 영향이 비교적 낮았음을 알 수 있었다. 또한, 실제 도압장에서 채취한 오리도체시료를 BPW에 6시간 배양한 1차 증균액에 개발한 LAMP기법을 적용한 결과, 96%의 민감도 및 84%의 특이도를 보여 오리도체에서의 *Salmonella* 신속 스크리닝 기법으로서 효과적으로 활용될 수 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 서울대학교 신임교수 연구정착금으로 지원되

Table 3. Sensitivity and specificity of 2 different methods for detecting *Salmonella* spp. in 50 duck carcass swab samples enriched in BPW for 6 h

	LAMP	PCR
No. of test positives	24	13
No. of culture positives	25	25
Sensitivity ¹⁾ (%)	96	52
No. of test negatives	21	25
No. of culture negatives	25	25
Specificity ²⁾ (%)	84	100

¹⁾No. of test positives/No. of culture positives $\times$ 100 (%)

²⁾No. of test negatives/No. of culture negatives $\times$ 100 (%)

는 사업의 연구비와 2012년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단(2012012293)의 연구비 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한, *Salmonella* 균주를 분양해주신 농림수산검역검사본부의 정병열 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

- Bickley, J., Short, J. K., McDowell, D. G., and Parkes, H. C. (1996) Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**, 153-158.
- Cha, S. Y., Kang, M., Yoon, R. H., Park, C. K., Moon, O. K., and Jang, H. K. (2013) Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates in Pekin ducks from South Korea. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*
- Chen, S., Wang, F., Beaulieu, J. C., Stein, R. E., and Ge, B. (2011) Rapid detection of viable salmonellae in produce by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 4008-4016.
- Ferretti, R., Mannazzu, I., Coccolin, L., Comi, G., and Clementi, F. (2001) Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 977-978.
- Guo, L., Killefer, J., Kenney, P. B., and Amick-Morris, J. D. (1999) Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to study *Salmonella* ecology in a turkey production environment. *Poult. Sci.* **78**, 24-31.
- Jiang, D., Pu, X., Wu, J., Li, M., and Liu, P. (2013) Rapid, sensitive, and specific detection of *Clostridium tetani* by loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1-6.
- Jiang, T., Liu, J., Deng, Y. Q., Su, J. L., Xu, L. J., Liu, Z. H., Li, X. F., Yu, X. D., Zhu, S. Y., Gao, G. F., Qin, E. D., and Qin, C. F. (2012) Development of RT-LAMP and real-time RT-PCR assays for the rapid detection of the new duck Tembusu-like BYD virus. *Arch. Virol.* **157**, 2273-2280.
- Kim, S., Labbe, R. G., and Ryu, S. (2000) Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1213-1215.
- Lampel, K. A., Orlandi, P. A., and Kornegay, L. (2000) Improved template preparation for PCR-based assays for detection of food-borne bacterial pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4539-4542.
- Little, C. L., Richardson, J. F., Owen, R. J., de Pinna, E., and Threlfall, E. J. (2008) *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003-2005. *Food Microbiol.* **25**, 538-543.
- McCabe, E. M., Burgess, C. M., O'Regan, E., McGuinness, S., Barry, T., Fanning, S., and Duffy, G. (2011) Development and evaluation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the hila gene of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*. *Food Microbiol.* **28**, 447-456.
- Nagamine, K., Hase, T., and Notomi, T. (2002) Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* **16**, 223-229.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28**, E63.
- Penha Filho, R. A., de Paiva, J. B., Arguello, Y. M., da Silva, M. D., Gardin, Y., Resende, F., Berchieri Junior, A. B., and Sesti, L. (2009) Efficacy of several vaccination programmes in commercial layer and broiler breeder hens against experimental challenge with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Avian Pathol.* **38**, 367-375.
- Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Galan, J. E., Ginocchio, C., Curtiss, R., 3rd, and Gyles, C. L. (1992) Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes* **6**, 271-279.
- Rodriguez, A., Cordoba, J. J., Werning, M. L., Andrade, M. J., and Rodriguez, M. (2012a) Duplex real-time PCR method with internal amplification control for quantification of verucosidin producing molds in dry-ripened foods. *Int. J. Food Microbiol.* **153**, 85-91.
- Rodriguez, A., Werning, M. L., Rodriguez, M., Bermudez, E., and Cordoba, J. J. (2012b) Quantitative real-time PCR method with internal amplification control to quantify cyclopiazonic acid producing molds in foods. *Food Microbiol.* **32**, 397-405.
- Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K., and Rasmussen, O. F. (1992) Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.* **17**, 37-45.
- Steve Yan, S., Pendrak, M. L., Abela-Ridder, B., Punderson, J. W., Fedorko, D. P., and Foley, S. L. (2004) An overview of *Salmonella* typing: Public health perspectives. *Clin. Appl. Immunol. Rev.* **4**, 189-204.
- Tang, T., Cheng, A., Wang, M., Li, X., He, Q., Jia, R., Zhu, D., and Chen, X. (2012) Development and clinical verification of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Salmonella* species in suspect infected ducks. *Poult. Sci.* **91**, 979-986.
- Techathuvanan, C. and D'Souza, D. H. (2012) Reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification as a rapid screening/monitoring tool for *Salmonella enterica* detection in liquid whole eggs. *J. Food Sci.* **77**, M200-205.
- Techathuvanan, C., Draughon, F. A., and D'Souza, D. H. (2010) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and sensitive detection of *Salmonella* Typhimurium from pork. *J. Food Sci.* **75**, M165-172.
- Thekisoe, O. M., Rodriguez, C. V., Rivas, F., Coronel-Servian, A. M., Fukumoto, S., Sugimoto, C., Kawazu, S., and Inoue, N. (2010) Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82**, 855-860.
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., and Notomi, T. (2008) Loop-

- mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* **3**, 877-882.
25. Waage, A. S., Vardund, T., Lund, V., and Kapperud, G. (1999) Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1636-1643.
26. Wang, F., Jiang, L., Yang, Q., Prinyawiwatkul, W., and Ge, B. (2012) Rapid and specific detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 in ground beef, beef trim, and produce by loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 2727-2736.
27. Wang, L. and Mustapha, A. (2010) EMA-real-time PCR as a reliable method for detection of viable *Salmonella* in chicken and eggs. *J. Food Sci.* **75**, M134-139.
28. Yang, B., Qu, D., Zhang, X., Shen, J., Cui, S., Shi, Y., Xi, M., Sheng, M., Zhi, S., and Meng, J. (2010) Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *Int. J. Food Microbiol.* **141**, 63-72.
29. Zhang, G., Brown, E. W., and Gonzalez-Escalona, N. (2011) Comparison of real-time PCR, reverse transcriptase real-time PCR, loop-mediated isothermal amplification, and the FDA conventional microbiological method for the detection of *Salmonella* spp. in produce. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 6495-6501.

(Received 2013.6.29/Revised 2013.9.26/Accepted 2013.10.8)