

RAPD를 이용한 돈육 가공장의 *Listeria* 오염양상 분석

하승열 · 최원상¹ · 박경진² · 홍종해*

강원대학교 수의학과

¹동국대학교 분자생물학과

²한국보건산업진흥원

(게재승인: 2005년 8월 17일)

Contamination patterns of *Listeria* spp. in pork processing plants using random amplified polymorphic DNA

Sung-Yeol Ha, Weon-Sang Choi¹, Gyung-Jin Bahk², Chong-Hae Hong*

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea

¹Department of Biotechnology, College of Natural Science, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea

²HACCP Team, Korea Health Industry Development Institute, Seoul 156-050, Korea

(Accepted: August 17, 2005)

Abstract : This study was carried out to understand the contamination patterns of *Listeria* in pork processing plants. A total of 402 samples were collected from carcass, pork during processing, surfaces of equipment and environment, and 238 isolates of *Listeria* species were identified. *L. innocua* was found in 64.7% of the isolates, *L. monocytogenes* in 33.2%, and *L. welshimeri* in 2.1%. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis performed to investigate the origin and routes of *Listeria* contamination, showed 21 composite types of *L. monocytogenes* and 26 composite types of *L. innocua*. It was confirmed that *Listeria* contamination begins with contaminated incoming carcass and ever-present contaminants in the processing environments. The persistence and dissemination of the same strain of *L. monocytogenes* and *L. innocua* throughout the processing line revealed that the sanitation standard operating procedure should be implemented to minimize the risk of colonization in the workplace. Molecular subtyping of *L. innocua* allowed us to tracing the possibility of cross-contamination during processing.

Key words : Pork processing plant, *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, RAPD

서 론

돈육가공장은 공정과정에 가열처리단계가 없는 작업장으로 특히 위생적인 작업관리가 요구된다. 작업환경이 오염되면 오염된 미생물은 작업환경 내에 상존하면서 오염원으로 작용할 우려가 높다. 왜냐하면 돈육 가공 작업은 실내온도 15°C 이내의 환경에서 작업이 이루어 지지만 [1], *Listeria*와 같은 저온성 세균의 증식이 가능하기 때문이다.

*Listeria*는 가축, 토양, 오수, 어패류, 사료, 분변 등 다

양한 환경조건에서 생존이 가능하며 [14, 20], 저온에서도 증식이 가능하고 [27, 37], biofilm을 형성하여 물체 표면에 용이하게 부착하며 악조건에서도 생존 가능하다 [12, 35]. 따라서 *Listeria*는 저온에서 작업이 이루어지는 축산물가공장 등에서 주요 오염미생물로 작용할 가능성이 높다. 특히 *L. monocytogenes*에 오염된 야채, 낙농제품, 우유, 육가공제품, 식육 등은 사람의 listeriosis를 유발하며 [17, 32], 임산부, 신생아, 노인, 면역결핍환자 등에서 치명율이 매우 높은 것으로 보고되어 [28], 식품위생 관리의 주요 대상 미생물로 그 중요성이 인식되고 있다.

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원으로 수행되었음.

*Corresponding author: Chong Hae Hong

Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Chunchon 200-701, Korea
[Tel: +82-33-250-8658, Fax: +82-33-244-2367, E-mail: hongch@kangwon.ac.kr]

따라서 작업환경에서 미생물 오염이 검출되면 오염원을 규명하고 제거하는 것이 근본적인 관리방법이다. 오염원 규명을 위해서는 오염의 출처를 추적해야 하는데, 작업환경의 오염발생 가능 지점에서 조사대상 미생물을 검출하여 특성을 분석하고 분류하는 작업이 필요하다.

분자유전학적 기법에 의한 세균분류는 동일 혈청군내에서의 이질성 확인을 가능하게 하여 오염양상 분석에도 활용되고 있는데, *Listeria* 균 typing에 활용되는 기법으로는 pulse-field gel electrophoresis(PFGE), ribotyping, random amplified polymorphic DNA(RAPD), single-stranded conformation polymorphism(SSCP), restriction enzyme analysis, PCR-based hybridization 등이 있다 [25, 29, 30]. 이 중에서 PFGE가 국내외에서 다소 성공적으로 활용되고 있으나, 이를 위해서는 손상되지 않은 온전한 상태의 DNA 정제가 필요하고 고가의 장비를 사용해야 하는 점에서 많은 시료를 다루는 현장이나 routine typing에는 부적절하다 [19]. 반면 RAPD 기법은 전통적인 PCR에 비해 무작위로 배열된 짧은 primer를 이용하여 genomic DNA를 증폭함으로써 DNA polymorphism을 찾아내는 방법으로 [39], 많은 시료처리가 용이하고 소량의 DNA로도 확인 가능하며 DNA sequence에 대한 정보가 필요 없다는 장점이 있다. 비록 실험실간의 pattern 재현성면에서는 다소 문제가 있는 것으로 보고되고 있으나, 분리력에서 PFGE에 필적하여 여러 곳에서 성공적으로 활용되고 있다 [10, 21, 23, 27]. 특히 RAPD 방법은 장비가 저렴하여 소규모 실험실에서도 사용 목적에 따라서 충분히 활용할 가치가 있다 [15].

본 연구에서는 돈육 가공장의 원료도체 입고에서부터 최종육 포장까지 공정상에서 원료도체, 부위별로 처리된 돈육, 최종육, 작업시설 및 장비, 작업환경에서 *Listeria*를 검출하고 RAPD 방법으로 분석하여 오염의 분포와 경로에 대한 특징을 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

시료채취

중부지역 소세 중형(600마리 처리/일, 작업장 A) 및 소형(200마리 처리/일, 작업장 B)의 HACCP 비지정 돈육 가공장 2곳을 선정하여 2003년 11월부터 2004년 6월까지 각각 4회 방문하여 시료를 채취하였다. 원료도체, 시설 및 장비(발골기, 박피기, 작업대, 벨트, 칼, 칼같이, 먼장갑), 환경(벽, 바닥) 시료는 30 ml의 buffered peptone water(BPW; Oxoid, UK)에 적신 5×5 cm² gauze로 각 시료부위를 swab하여 무균적으로 채취하였다. 돈육시료는 작업공정상에서 발골육부분육, 최종육을 각각 25 g씩 채취하였다. 시료는 4°C를 유지하며 8시간 내에

실험실로 운반하였고, BPW 225 ml를 혼합한 후 stomacher 400(Seward, UK)으로 2분간 균질화하여 실험에 사용하였다.

Listeria 분리 및 동정

Listeria 분리 및 동정은 미국 FDA 방법에 준하여 다음과 같이 실시하였다. BPW로 균질화시킨 시료 1 ml를 *Listeria* enrichment broth(LEB; Difco, USA) 9 ml에 접종한 후 30°C 48시간 배양하였다. 배양액을 선택배지인 Oxford agar(OXA; Oxoid, UK)와 PALCAM agar(Merck, Germany)에 희석 도말하여 35°C에서 48시간 배양한 후 집락 모양이 진한 갈색 또는 검은색 환으로 둘러싸여 있는 집락을 각 선택배지에서 선발하여 tryptic soy agar(TSA; Difco, USA)에서 35°C 24시간 배양하였다. 분리균은 blood agar(Komed, Korea)에서 β-hemolysis를 판별하고 Gram 양성 단간균을 선택하여 catalase test, motility test 후 API-*Listeria* kit(bioMérieux, France)로 동정하였다.

분리균의 혈청형 동정

L. monocytogenes 분리 균주를 TSA(Difco, USA)에 접종하고 35°C에서 24시간 배양한 후 배양된 균을 fluorescent antibody buffer(FA buffer; Difco, USA)에 부유하여 McFarland No. 3로 균액의 농도를 조절하였고, 80~100°C에서 1시간 동안 가열하였다. 가열한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 다음 남아있는 buffer로 재부유시켜 항원으로 사용하였다. 항혈청(poly, type 1, type 4; Difco, USA)을 0.8% 멸균생리식염수로 1:20 희석한 후 동량의 항원과 slide agglutination test를 실시하여 75% 이상 응집반응을 보이는 것을 양성으로 판정하였다.

DNA 분리 정제

Listeria 균체로부터 DNA를 분리하기 위해 guanidine thiocyanate/phenol/ chloroform method를 사용하였다 [13]. *Listeria* 배양액 0.5 ml에 solution D(4 M guanidine thiocyanate, 0.025 M sodium citrate, 0.5% sarcosyl) 0.25 ml 과 phenol-chloroform(1:1) 0.5 ml을 첨가하여 약 1시간 정도 tumbling시키고 원심 분리하여 수용액 층을 회수한 후 DNA를 isopropanol로 침전시켰다. 얻어진 pellet을 70% ethanol로 세척한 후 건조시켜 증류수에 녹인 다음 PCR에 사용하였다.

RAPD-PCR 조건

RAPD를 위한 random primer는 임 등(2003)의 primer 재현성과 분리력 비교실험에서 가장 분별력이 좋았던 10-mer의 DG 122 primer(5'-AGCCAGGTCA-3')와 DG

107 primer(5'-CCCGTCAGCA-3')를 사용하였다.

각각의 PCR반응액에는 10 mM Tris-HCl(pH 8.3) 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 2.5 units Taq DNA polymerase, 100 pmol primer와 DNA template가 함유되도록 하되 총 부피는 50 μl가 되도록 하였다. 각 시료는 thermocycler (Perkin-Elmer, USA)에서 증폭 cycle을 시작하기 전에 94°C에서 5분간 DNA를 변성시킨 후 cycle로 진입하게 하였으며 45 cycle을 종료한 후 72°C에서 7분간 연장반응 시킨 후 반응을 종료하였다. 각 cycle은 94°C에서 1분간 denaturation, 35°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension을 실시하였다. 증폭된 PCR 산물은 loading buffer(30% glycerol, 0.25% bromophenol blue)와 혼합후 10 mg/ml ethidium bromide을 첨가한 2.0% agarose gel을 TAE buffer상에서 전기영동을 실시한 후 UV transilluminator를 사용하여 두 primer별로 분류하고 종합하여 판단하였다.

결 과

돈육 가공장에서 *Listeria* spp.의 분리율

전체 402건의 시료중 238건(59.2%)의 *Listeria* spp.가 검출되었으며, *L. innocua* 154건(64.7%), *L. monocytogenes* 79건(33.2%), *L. welshmeri* 5건(2.1%) 순이었다(Table 1).

A작업장에서 검출된 111건의 *Listeria* spp. 분포는 *L. monocytogenes* 55건(49.5%), *L. innocua* 51건(45.9%), *L. welshmeri* 5건(4.5%)이었고, 분리율은 환경 65.0%, 최종육 62.5%, 시설 및 장비 54.8%, 가공육 36.7%, 원료도체 9.1%순이었다. 원료도체의 2건 모두 *L. monocytogenes*이었고, 장비에서는 *L. monocytogenes*가 33건으로 가장 많이 분리되었고, 환경시료에서는 *L. innocua*가 17건으로 분리율이 높았다. 최종육에서는 *L. monocytogenes* 8건, *L. innocua* 7건이 분리되었다. B작업장에서는 127건의 *Listeria* spp.가 분리되었는데, *L. innocua*가 103건(81.1%)으로 가장 많이 검출되었고, *L. monocytogenes*는 24건(18.9%)이었다. 분리율은 시설 및 장비에서 가장 높아 73건(83.0%)이었고 그 중 *L. innocua*가 66건이었다. 작업장내 모든 시료에서 *L. monocytogenes* 보다 *L. innocua* 분리율이 매우 높았다.

혈청형별 *Listeria monocytogenes*의 분포

분리된 79건의 *L. monocytogenes*의 혈청형 분포를 보면 serotype 1이 93.7%, serotype 4는 6.3%이었다. 원료도체, 가공육, 환경에서는 모두 serotype 1이었고, 최종육에서는 serotype 1이 81.2%, serotype 4가 18.8%였으며, 시설 및 장비에서 serotype 1은 95.0%, serotype 4가 5.0%로 나타났다(Table 2).

Table 1. Distribution of *Listeria* spp. isolated during processing from two pork processing plants

Plant	Sampling point	No. of samples	No. of isolates (%)	<i>Listeria</i> spp.		
				LM	LI	LW
A	Carcass	22	2 (9.1)	2	0	0
	Processing meat*	30	11 (36.7)	4	5	2
	Equipment [†]	104	57 (54.8)	33	22	2
	Environment [‡]	40	26 (65.0)	8	17	1
	Final meat	24	15 (62.5)	8	7	0
	Subtotal	220	111 (46.8)	55	51	5
B	Carcass	22	10 (50.5)	4	6	0
	Processing meat*	24	9 (37.5)	0	9	0
	Equipment [†]	88	73 (83.0)	7	66	0
	Environment [‡]	32	24 (75.0)	9	15	0
	Final meat	16	11 (68.8)	4	7	0
	Subtotal	182	127 (69.9)	24	103	0
Total	402	238 (59.2)	79 (100.0)	154 (33.2)	5 (64.7)	5 (2.1)

LM: *L. monocytogenes*, LI: *L. innocua*, LW: *L. welshimeri*..

* deboned meat, dressed meat, [†] boning machine, skinning machine, working table, conveyor belt, knife, sharpener, glove, [‡] floor, wall.

Table 2. Serotypes of *L. monocytogenes* isolated from two pork processing plants

Sampling point	Total		Plant A		Plant B	
	Serotype 1	Serotype 4	Serotype 1	Serotype 4	Serotype 1	Serotype 4
Carcass	6/6(100.0) [§]	0	2/2(100.0)	0	4/4(100.0)	0
Processing meat*	4/4(100.0)	0	4/4(100.0)	0	0	0
Equipment [†]	38/40(95.0)	2/40(5.0)	33/33(100.0)	0	5/7(71.4)	2/7(28.6)
Environment [‡]	17/17(100.0)	0	8/8(100.0)	0	9/9(100.0)	0
Final meat	13/16(81.2)	3/16(18.8)	8/8(100.0)	0	1/4(25.0)	3/4(75.0)
Total	74/79(93.7)	5/79(6.3)	55/55(100.0)	0	19/24(79.2)	5/24(20.8)

* deboned meat, dressed meat, [†] boning machine, skinning machine, working table, conveyor belt, knife, sharpener, glove, [‡] floor, wall. [§] Number of samples positive/number of samples tested (%).

A작업장에서는 serotype 1만이 분리되었고, B작업장에서는 serotype 1은 79.2%, serotype 4는 20.8% 분리되었다. Serotype 4는 B작업장의 시설 및 장비와 최종육에서만 분리되었다.

*Listeria monocytogenes*의 RAPD typing

Primer DG 122, DG 107을 사용하여 총 79건의 *L. monocytogenes* strain을 분석한 결과 21개의 RAPD composite type이 관찰되었다(Table 3). Type Lm1에

는 가장 많은 50개의 분리주가 속했으며, *L. monocytogenes* 중에서 유일하게 두 작업장에 공통적으로 존재하였다. Lm11, Lm12에는 3개의 분리주, 나머지 type에는 1~2개씩의 분리주가 포함되었다.

작업장별로 보면, A작업장에서는 55건의 *L. monocytogenes*에서 10개의 RAPD composite type이 관찰되었다. Composite type Lm1에는 42개의 분리주가 속했으며 나머지 type에는 각각 1~2개씩의 분리주가 분류

Table 3. RAPD types of *L. monocytogenes* isolated from several sampling points in pork processing plants

Plant	No. of isolates	Primers		Composite type	Serotype	Sampling point				
		DG107	DG122			Carcass	Processing meat	Equipment	Environment	Final meat
A	55	1	1	Lm1 (42)	1	2	4	25	4	7
		2	2	Lm2 (2)	1	-	-	2	-	-
		2	3	Lm3 (2)	1	-	-	2	1	-
		1	4	Lm4 (2)	1	-	-	3	-	-
		3	4	Lm5 (2)	1	-	-	2	1	-
		4	5	Lm6 (1)	1	-	-	2	-	-
		2	6	Lm7 (1)	1	-	-	-	1	-
		2	7	Lm8 (1)	1	-	-	-	1	-
		1	8	Lm9 (1)	1	-	-	-	-	1
		1	9	Lm10 (1)	1	-	-	1	-	-
B	24	1	1	Lm1 (8)	1	-	-	2	6	-
		2	10	Lm11 (3)	1	1	-	-	2	-
		5	11	Lm12 (3)	4	-	-	1	-	2
		3	1	Lm13 (2)	1	-	-	1	-	1
		2	12	Lm14 (1)	1	1	-	-	-	-
		4	12	Lm15 (1)	1	1	-	-	-	-
		2	5	Lm16 (1)	1	-	-	1	-	-
		6	13	Lm17 (1)	1	1	-	-	-	-
		5	14	Lm18 (1)	4	-	-	-	-	1
		7	14	Lm19 (1)	4	-	-	1	-	-
		1	15	Lm20 (1)	1	-	-	-	1	-
8	16	Lm21 (1)	1	-	-	1	-	-		

(): Number of isolates.

Table 4. RAPD types of *L. innocua* isolated from several sampling points in pork processing plants

Plant	No. of isolates	Primers		Composite type	Sampling point				
		DG107	DG122		Carcass	Processing meat	Equipment	Environment	Final meat
A	51	9	17	Li1 (20)	-	2	7	8	3
		10	18	Li2 (6)	-	-	3	3	-
		9	19	Li3 (6)	-	-	4	1	1
		9	20	Li4 (5)	-	1	3	-	1
		10	21	Li5 (3)	-	-	1	-	2
		9	22	Li6 (3)	-	1	1	1	-
		10	22	Li7 (2)	-	-	-	2	-
		10	17	Li8 (2)	-	-	1	1	-
		10	19	Li9 (2)	-	-	2	-	-
		11	21	Li10 (1)	-	-	-	1	-
		12	18	Li11 (1)	-	1	-	-	-
B	103	10	22	Li7 (76)	6	7	50	7	6
		13	22	Li12 (3)	-	-	2	1	-
		10	23	Li13 (3)	-	1	2	-	-
		10	21	Li5 (2)	-	-	2	-	-
		14	22	Li14 (2)	-	-	1	1	-
		15	24	Li15 (2)	-	-	-	2	-
		16	25	Li16 (2)	-	-	2	-	-
		17	25	Li17 (2)	-	-	2	-	-
		10	17	Li8 (1)	-	-	-	-	1
		10	19	Li9 (1)	-	-	-	1	-
		18	21	Li18 (1)	-	-	-	1	-
		14	20	Li19 (1)	-	-	1	-	-
		19	20	Li20 (1)	-	-	1	-	-
		20	20	Li21 (1)	-	-	1	-	-
		15	22	Li22 (1)	-	-	-	1	-
		19	22	Li23 (1)	-	-	-	1	-
21	17	Li24 (1)	-	1	-	-	-		
10	26	Li25 (1)	-	-	1	-	-		
22	27	Li26 (1)	-	-	1	-	-		

(): Number of isolates.

되었다. B작업장에서는 24건의 *L. monocytogenes*에서 12개의 composite type이 나타났다. Type Lm1에는 8개의 분리주가 속했으며, Lm11, Lm12에는 3개의 분리주가, 나머지 type에는 각각 1~2개씩의 분리주가 관찰되었다.

***Listeria innocua*의 RAPD typing**

전체 154건의 *L. innocua*를 분석한 결과 26개의 RAPD composite type이 관찰되었고, Composite type Li7은 76개의 분리주로 가장 많았다(Table 4). A작업장에서는 51건의 *L. innocua*에서 11개의 composite type이 관찰되었으며, Li1에는 20개의 분리주가 속하여 가장 많았고, Li2,

Li3에 6개, Li4에 5개, Li5, Li6에 3개였고, 나머지 type에는 각각 1~2개씩의 분리주가 포함되었다. B작업장에서는 103건의 *L. innocua*에서 19 type이 관찰되었고, Li7에 76개의 분리주, Li12, Li13에는 3개의 분리주가, 나머지 type에는 1~2개씩의 분리주가 관찰되었다. Li5, Li7, Li8, Li9는 두 작업장에서 나타나는 공통적인 균주로 확인되었다.

고 찰

살균처리 공정이 없는 포장육 작업장을 오염시킨 *Listeria* 균은 15°C의 작업환경 조건에서 지속적인 생존

과 증식이 가능하다. 동일한 genotype의 *L. monocytogenes*가 포장육 작업장에서 지속적으로 검출되며 [34], 4°C 이하에서 보관중인 식육에서도 3주 이상 생존하는 것으로 알려져 있기 때문에 [16], 세척과 소독은 작업장 안전관리의 핵심적인 관리사항이다.

A작업장의 *Listeria* spp. 분리율은 원료육 9.1%, 가공육 36.7%, 최종육 62.5% 수준이었고, B작업장은 각각 45.5%, 37.5%, 68.8%로 나타나, 두 작업장간의 오염수준에 차이는 있지만 공정이 진행되면서 최종육에서 오염이 증가하는 공통점이 있다. 이는 공정과정에 살균처리단계가 없어 작업장에 오염균이 유입되면 교차오염으로 인하여 오염이 확산되기 때문인 것으로 판단된다. 이러한 결과는 안 등 [3], 허 등 [7]이 보고한 최종단계에서의 오염 증가와 일치하며, Rorvik 등 [33], Fenlon 등 [18]이 작업장 세척과 소독에도 불구하고 *Listeria*균이 공정과정의 시설 및 작업도구에 지속적으로 생존하여 오염을 유발한다는 보고와도 관련된다고 하겠다. 포장육 작업장에서의 오염균 유입은 도체, 종업원, 작업용 운송수단 등 매개체가 다양하므로 완전차단은 현실적으로 어렵다. 따라서 작업장내의 교차오염 발생을 감소시킬 수 있는 방법개발이 요구되는데, 일부 HACCP 작업장에서는 작업중에 종업원의 손(장갑), 칼, 칼갈이, 도마에 대해서, 수시로 알코올 스프레이를 하도록 조치하고 있지만 그 효과와 작업의 효율성에 대한 검증이 필요하다.

작업장 시설 및 장비와 작업환경에서의 *Listeria* 분리가 54.8~83.0%로 높은 근본적인 이유는 작업전·후의 세척과 소독이 지침서대로 엄격히 지켜지지 않거나 세척과 소독을 하여도 여전히 오염균이 존재할 여지가 많은 시설 및 장비의 구조적인 문제와 관련된다. *Listeria*는 스테인리스, 플라스틱, 울통불통한 표면, 마멸에 의한 손상부위, 고무에 잘 부착할 수 있는 생태학적, 생리적 특성을 가지고 있으므로 [11], 밧골 작업대, 칼, 칼갈이, 면장갑에 부착하여 생존할 가능성이 높은 특성을 갖고 있기 때문이다. 특히 박피기와 벨트에는 돈육조각이나 기름때가 남아 *Listeria*가 존재할 가능성이 높는데, 이러한 시설은 구조적으로 세척과 소독이 용이하지 않아 잔류유기물이 효과적으로 제거되지 못하므로 계속 오염원으로 작용할 우려가 높다. 바닥과 벽에서 검출되는 *Listeria*는 작업장내에 상존하는 균으로 판단되는데, 이는 세척과 소독작업이 철저히 수행되지 못한 결과로 보여진다.

이와 같이 시설장비 및 작업환경에 대한 세척과 소독은 최종생산 돈육의 오염수준에 직접적인 영향을 미칠 수밖에 없다. 또한 오염수준이 낮더라도 냉장유통과정에서 보관기간이 길어질수록 저온성 세균은 증식이 가능하므로 국민 식생활에 위협을 초래할 가능성도 배제

할 수 없다. 따라서 오염수준과 포장방식을 고려한 유통기간 설정 등의 관리가 필요한 것으로 판단된다.

본 실험에서 최종 포장육 40건의 시료중 12건(30.0%)에서 *L. monocytogenes*가 검출되어 높은 오염수준을 나타냈으며, 여전히 유통과정중에서 오염 및 증식의 위험이 상존하고 있다. 그럼에도 불구하고 국내 식중독 발생 통계에 *Listeria* 식중독이 보고 되지 않는 것은 식중독 발생시 역학조사에서 원인균 분리의 대상에 포함되지 않기 때문이거나 [2], 또한 미국의 경우와 같이 *Campylobacter*, *Salmonella* 균에 의한 식중독에 비해서 발생률이 매우 낮기 때문인 것으로 사료된다. 반면 발생된 listeriosis는 치명률이 salmonellosis 수준으로 높은 것으로 보고되어, 근래들어 위생관리의 주요 대상으로 비중있게 다루어지고 있다 [38].

본 실험에서 분리된 *L. monocytogenes*의 혈청형은 93.7%가 serotype 1으로, 국내 다른 연구자들의 혈청형 조사결과와 유사하였다 [3, 4]. 사람 listeriosis의 90% 이상이 4b, 1/2a, 1/2b 세가지 혈청형에 의한 것이며 이 중 4b에 의한 발생이 많은 것으로 조사되었으며, 혈청형 1/2a, 1/2b이 속하는 serotype 1은 주로 식육에서 발견되고 있다 [26, 36], 따라서 serotype 1이 주로 검출되는 국내 축산물작업장에는 listeriosis를 유발하는 혈청형 1/2a, 1/2b의 상존 가능성이 있으므로 작업장 위생관리 강화의 필요성이 인정된다고 하겠다.

RAPD typing은 임의 배열로 이루어진 단일 primer를 이용하여 PCR 증폭을 시켜 genetic DNA polymorphism을 검출하는 기법으로, 재현성은 다소 떨어지나 장비가 저렴하고 분리력이 좋으며 많은 시료를 빠른 시간 내에 처리할 수 있어 오염원 추적이나 역학조사 등 현장에서 폭넓은 사용이 기대된다 [9, 10, 21, 23, 31]. 이에 본 실험에서는 임 등 [5, 6]이 수행한 primer간의 분별력 실험 및 ERIC fingerprinting과 ribotyping과의 비교실험에서 높은 분별력을 인정받은 DG 122와 DG 107 두 개의 primer를 사용하였고, 그 결과 분리된 79주의 *L. monocytogenes*에서 21개의 composite type을 관찰할 수 있었다.

A작업장의 경우 *L. monocytogenes* composite type Lm1이 42주(76.4%)로 가장 많아 주 오염균이었으며, 입고된 원료도체, 가공중의 돈육, 최종육, 시설 및 장비, 환경 등에서 관찰되는바 원료도체의 오염으로 작업장에 유입되어 공정과정에서 오염을 확산키는 것으로 확인할 수 있었다. Lm2~Lm10에 해당하는 genotype은 각각 1~2주만이 검출되었고 대부분 장비와 환경에서 발견되는바 이미 다양한 경로로 작업장에 유입되어 상존하는 균으로 해석되었다. *L. innocua* 오염은 composite type Li1이 20주(39.2%)로 가장 많았으나 오염은 원료도체에 유래하지 않았다. Li2~Li11에 해당되는 다양한 genotype이 검출되

는 것으로 보아 본 작업장의 작업공정 및 환경의 상재균으로 추정되지만 정확한 오염원이 규명되지는 못하였다.

B작업장의 경우는 *L. innocua* composite type Li7이 주요 오염균이었으며, 원료도체로부터 작업공정, 환경, 최종육까지 지속적으로 오염시키는 것으로 나타났다. Li12-Li26에 이르는 다양한 genotype이 발견되는 것은 B작업장은 원료도체를 여러 도축장으로부터 공급받기 때문에 오염원이 다양하게 나타나는 것으로 해석되었다. Lm1은 A작업장과 같이 *L. monocytogenes*의 주요 오염균주였으나, 원료도체에서는 검출되지 않았다. B작업장은 종합축산물가공장내에 위치하지 않는 가공업체로 A작업장과 달리 원료도체를 차량으로 운송하므로 도체 운반과정에서 오염 발생 가능성이 높았고, 실제 관찰한 바에 의하면 차량에서 옮겨져 작업장의 현수장치에 매다는 과정에 도체의 경부가 바닥에 닿는 경우가 있었고, 작업자의 오염된 손으로 도체가 다루어지므로 항상 오염이 발생하는 것으로 파악되었다.

Listeria 균은 배양과정에서 비병원성인 *L. innocua*가 *L. monocytogenes*보다 더 우세하게 성장하므로, 작업장 시설 및 장비와 환경에서의 *L. innocua* 분리율은 *L. monocytogenes*보다 더 높거나 같은 시료에서 동시에 검출되기도 한다 [8, 22, 24]. 따라서 *L. innocua*는 비병원성균이지만 돈육 가공장내 *Listeria* 균 오염원 추적에 매우 유용한 지표균임을 확인할 수 있었다. 최종육을 지속적으로 오염시키는 균주 Lm1, Li1, Li7은 실험대상 작업장의 작업공정과 환경에서 지속적으로 검출되는바, 다른 육가공장이나 최종돈육에서도 공통적으로 존재할 가능성이 높은 균주로 판단되었다.

이상의 결과를 종합해 보면 최종 포장육의 오염발생은 두 가지 경로로 나타난다. A작업장의 Lm1과 B작업장의 Li7 경우 원료도체의 오염균이 작업공정을 거쳐 그대로 오염시키고 있었고, A작업장의 Li1는 작업공정에 상존하는 오염균이 작업과정에 교차오염으로 발생하는 것으로 파악되었다. 또한 최종육의 오염원 분석을 위해서는 *L. monocytogenes*만으로는 미흡하였고 *L. innocua*를 지표균으로 병행하여 활용하는 것이 더 좋은 결과를 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다.

결 론

돈육가공장의 원료도체 입고에서부터 포장육 가공까지의 과정에서 원료도체, 가공육, 최종육, 작업장 시설 및 장비, 환경에서 *Listeria* 균을 분리하고 RAPD 방법으로 분석하여, 작업장내 *Listeria* 오염의 특징적인 양상을 파악하였다. 시료 402건에서 *Listeria* 분리율은 59.2%이었으며, *Listeria innocua* 64.7%, *L. monocytogenes*

33.2%, *L. welshimeri* 2.1% 순이었다. *L. monocytogenes*의 혈청형은 93.7%가 type 1이었다. 작업장별 오염수준에 차이는 있으나 공정이 진행되면서 최종육의 오염이 증가한다는 공통점을 보이는데, 이는 돈육가공장은 공정과정에 살균처리단계가 없어 작업중 교차오염으로 인하여 오염이 확산되기 때문인 것으로 파악되었다.

분리된 79건의 *L. monocytogenes*는 21개의 genotype으로 154건의 *L. innocua*는 26개의 genotype으로 분류되었다. 최종 포장육의 오염은 두 가지 경로로 나타나는데, 원료도체로 오염균이 유입되어서 공정과정에 오염이 전달되는 경우와 작업장내에 상존하는 오염균이 교차오염을 유발하는 것으로 파악되었다. 따라서 작업장내의 교차오염 발생을 감소시키기 위해서는 작업전·후의 세척과 소독이 매우 중요한 관리사항이며, 또한 작업중 종업원의 손(장갑), 칼, 칼갈이, 도마에 대한 효과적인 소독이 필요하였다. 작업장의 오염원 분석을 위해서는 *L. monocytogenes*만으로는 미흡하였고 *L. innocua*를 지표균으로 병행하여 활용하는 것이 오염원 특성 파악에 더 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. 농림부·국립수의과학검역원. 축산물가공장 위해요소 중점관리기준(HACCP) 적용매뉴얼. p. 5-1, 2001. 12.
2. 식품의약품안전청. 2005 식중독예방사업계획: 식중독 발생동향분석. pp. 2-3. 2005.
3. 안상철, 홍종해. 돈육가공 작업환경에서 *Listeria monocytogenes*의 분리와 혈청형 분포조사. 한국식품위생학회지 1998, **13**, 425-429.
4. 이철현, 손원근, 강호조. 가축사육장 및 작업장 폐수로부터 *Listeria monocytogenes*의 분리 및 분리균의 약제내성. 한국수의공중보건학회지 2000, **24**, 9-15.
5. 임형근, 홍종해, 박경진, 최원상. *Listeria* spp.의 RAPD typing을 위한 Primer의 분리력 비교. 한국식품위생안전성학회지 2003, **18**, 67-72.
6. 임형근, 홍종해, 박경진, 최원상. 리스테리아균의 특성분석을 위한 Molecular Typing 방법의 상호보완. 생명과학회지 2003, **13**, 699-704.
7. 허정호, 손성기, 이주홍, 임삼규, 구정현, 박영호, 조명희, 손원근, 강호조. 도축처리 단계별 도체 및 환경재료에서 *Listeria monocytogenes*의 분리. 한국가축위생학회지 1997, **20**, 69-78.
8. Aguado V, Vitas AI, García-Jalón I. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a vegetable processing plant by RAPD and REA. Int J Food Microbiol 2004, **90**, 341-347.
9. Boerlin P, Bannerman E, Ischer F, Rocourt J, Bille J. Typing *Listeria monocytogenes*: a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5

- other methods. Res Microbiol 1995, **146**, 35-49.
10. **Byun SK, Jung SC, Yoo HS.** Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. Int J Food Microbiol 2001, **69**, 227-235.
 11. **Chasseignaux E, Gerault P, Toquin MT, Salvat G, Colin P, Ermel G.** Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. FEMS Microbiol Lett 2002, **210**, 271-275.
 12. **Chavant P, Martinie B, Meylheuc T, BellonFontaine MN, Hebraud M.** *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. Appl Environ Microbiol. 2002, **68**, 728-737.
 13. **Choi WS, Hong CH.** Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk using competitive PCR. International J. Food Microbiol 2003, **84**, 79-85.
 14. **Donnelly CW, Brackett RE, Doores S, Lee WH, Lovett J.** Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd ed, pp. 637-663, American Public Health Association. Washington DC, 1992.
 15. **Faber JM, Addison CJ.** RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. J Appl Bacteriol 1994, **66**, 242-250.
 16. **Farber JM, Daley E.** Presence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally-contaminated meats. Int J Food Microbiol 1994, **22**, 33-42.
 17. **Farber JM, Peterkin PI.** *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol Rev 1991, **55**, 476-511.
 18. **Fenlon DR, Wilson J, Donachie W.** The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. J Appl Bacteriol 1996, **81**, 641-650.
 19. **Franciosa G, Pourshaban M, Gianfranceschi M, Aureli P.** Genetic typing of human and food isolates of *Listeria monocytogenes* from episodes of listeriosis. Eur J Epidemiol 1998, **14**, 205-210.
 20. **Garcia E, Rodriguez JL, Gaya D, Medina M, Nunez M.** Exogenous sources of *Listeria* contamination in raw ewe's milk. J Food Prot 1996, **59**, 950-954.
 21. **Giovannacci I, Ragimbeau C, Queguiner S, Salvat G, Vendevre JL, Carlier V, Ermel G.** *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants; use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. Int J Food Microbiol 1999, **53**, 127-140.
 22. **Gravani R.** Incidence and control of *Listeria* in food-processing facilities. In : Ryser ET, Marth EH (eds.), *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, 2nd ed, pp. 657-709. Marcel Dekker. New York, 1999.
 23. **Gravesen A, Jacobsen T, Moller PL, Hansen F, Larsen AG, Knochel S.** Genotyping of *Listeria monocytogenes* comparison of RAPD, ITS, and PFGE. Int J Food Microbiol 2000, **57**, 43-51.
 24. **Greenwood MH, Roberts D, Burden P.** The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales. Int J Food Microbiol 1991, **12**, 197-206.
 25. **Jaradat ZW, Schutze GE, Bhunia AK.** Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. Int J Food Microbiol 2002, **76**, 1-10.
 26. **Jay JM.** Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. Food Control. 1996, **7**, 209-214.
 27. **Junttila JR, Niemela SI, Hirn J.** Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. J Appl Bacteriol 1988, **65**, 321-327.
 28. **Kennedy M, Vugia D, Fiorentino T, Farley M, Smith K, Smith O, Cieslak P, Griffin P, the EIP FoodNet Working Group.** FoodNet 1996 to 1998: Data on deaths and invasive illness demonstrate the severity of *Salmonella* and *Listeria*. 2nd International Conference on Emerging Infectious Diseases. Atlanta, GA, 2000.
 29. **Lehner A, Loncarevic S, Wagner M, Kreike J, Brandl E.** A rapid differentiation of *Listeria monocytogenes* by use of PCR-SSCP in the listeriolysin O (*hlyA*) locus. J Microbiol Methods 1999, **34**, 165-171.
 30. **Manzano M, Cocolin L, Cantoni C, Comi G.** A rapid method for the identification and partial serotyping of *Listeria monocytogenes* in food by PCR and restriction enzyme analysis. Int J Food Microbiology 1998, **42**, 207-212.
 31. **Martinez L, Rorvik LM, Brox V, Lassen J, Seppola M, Gram L, Fønnesbech-Vogel B.** Genetic variability among isolates of *Listeria monocytogenes* from food products, clinical samples and processing environments, estimated by RAPD typing. Int J Food Microbiol 2003, **84**, 285-297.
 32. **Rocourt J, Jacquet C, Réilly A.** Epidemiology of

- human listeriosis and seafoods. Int J Food Microbiol 2000, **62**, 197-209.
33. **Rorvik LM, Aase B, Alvestad T, Caugant DA.** Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in seafoods and seafood-processing plants. Appl Environ Microbiol 2000, **66**, 4779-4784.
34. **Senczek. D, Stephan. R, Untermann. F.** Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) typing of *Listeria* strains isolated from a meat processing plant over a 2-year period. Int J Food Microbiol. 2000, **62**, 155-159.
35. **Sommer P, Martin-Rouas C, Mettler E.** Influence of the adherent population level on biofilm population, structure and resistance to chlorination. Int J Food Microbiol 1999, **16**, 503-515.
36. **Swaminathan B, Rocourt J, Bille J.** Manual of Clinical Microbiology, 6th ed. pp. 342-343, American Society for Microbiology, Washington DC, 1995.
37. **Walker SJ, Stringer MF.** Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. J Appl Bacteriol 1987, **63**, R20.
38. **Walls I.** Present status and future prospect of MRA application in USA. Quantitative Microbial Risk Assessment of Foodborne Pathogens for Scientific Food Safety Management, pp. 45-67. Seoul, Korea, 2005.
39. **Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 1990, **18**, 6531-6535.