

도축우의 장내용물에서 *Listeria*속균의 분포도 조사

임현숙, 서동균¹

대구광역시 보건환경연구원
(접수 2004. 11. 21, 게재승인 2005. 3. 25.)

Prevalence of *Listeria* spp in intestinal contents of slaughtered cattle

Hyun-Sook Lim, Dong-Kyun Suh¹

Daegu metropolitan Health & Environment Research Institute, Daegu, 706-090, Korea
(Received 21 November 2004, accepted in revised from 25 March, 2005)

Abstract

We surveyed the distribution of *Listeria* spp in intestinal contents of slaughtered cattle from Daegu between March and October 2003. Fourteen *Listeria* spp were isolated from a total of 100 samples. Two samples contained only *L innocua* and other six samples contained both *L monocytogenes* and *L innocua*. Of the 99 samples positive to esculin reaction in Fraser broth, *Listeria* spp were isolated only from 8% of the samples. Three selective plating medium were examined for detection of *Listeria* species including Enhanced hemolysis agar, Oxford agar and Palcam agar. It was found that Enhanced hemolysis agar was more effective than Oxford agar and Palcam agar, and that *L monocytogenes* needed 48 hour growth to give positive reaction.

Key word : *Listeria monocytogenes*, *L innocua*, Prevalence, Enhanced hemolysis agar (EHA)

서 론

*Listeria*속균은 직경 0.4~0.6 μ m의 통성 혐기성 그람 양성 간균으로 *L monocytogenes*, *L innocua*, *L seeligeri*, *L welshi*

meri, *L ivanovii*, *L grayi*, *L murrayi* 등 7종이 있으며, 이 중 *L monocytogenes*는 동물에서 유산과 선회병을 야기하고, 임산부, 신생아, 노인, 면역 저하자에게 유산, 뇌수막

¹Corresponding author

Phone : +82-53-760-1311, Fax : +82-53-760-1302
E-mail : dksuh123@hanmail.net

염, 패혈증 등을 유발하는 인수공통전염병원체이다^{1~4)}. 1926년 Murray 등에 의해 처음 발견되었고, 1929년 Gill과 Nyfeldt가 사람과 동물에 대한 감염을 보고한 이래 식품 유래 식중독의 주요 병원성 인자로 인식되어 왔으며, 북아메리카와 유럽 등지에서 이 균에 오염된 식품으로 인한 집단 식중독 발병이 보고되었다⁵⁾. 국내에서는 1972년 전신성 낭창 환자 혈액에서 처음 분리되었고, 임상적으로 신생아와 환자 등에서 분리 동정된 예가 있다⁶⁾. *Listeria* spp의 혈청형은 Paterson에 의해 type 1에서 type 4로 분류된 후, 16 subtypes를 포함한 7 혈청형으로 분류되어져 있으며, 1960년 이전까지는 type 1/2와 4b가 유럽과 미국 등지에서 많이 분리되었으나 최근에는 지역적 분포가 다양하고, 특히 식품에서는 type 1/2가 많이 분리되고 있는 실정이다⁷⁾.

*L. monocytogenes*는 토양, 물 등 자연환경에 널리 존재할 뿐만 아니라, 냉장상태에서도 발육이 가능해 냉장식품의 보급이 확대됨에 따라 *Listeria*에 대한 관심이 점차 증대되고 있다^{8,9)}. 본 원인체에 의한 리스테리아증은 식품을 통한 유행이 주된 감염경로이며 식육 및 식육가공품, 야채, 유가공품 등이 사람에서의 발생에 깊이 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 따라서 식육이나 가공육에서 *Listeria* 등의 병원균 오염문제는 현재 국·내외를 막론하고 커다란 관심사로서 이들 병원균의 오염원을 추적하고 그 오염이나 증식 억제 대책을 마련하는 일은 식품의 안전성 확보 차원에서 매우 중요한 과제이며, 국내에서도 식육, 계육 및 작업장 환경 등에서 *L. monocytogenes*를 분리 보고한 바 있다¹¹⁾. 이러한 리스테리아증의 증가는 식육의 소비성향이 높아졌고, 생식을 많이 하는 추세 등 사회 식생활 풍습의 변화에 따라 *Listeria*균의 감염기회가 높아졌기 때문으로 볼 수 있으며, 주로 산업화된 국가에서 본 질병의 발생이 많은 반면 아프리카 등 저 개발 국가에서는 낮은 발생율을 보인다¹²⁾.

이 질병을 예방하기 위하여 다양한 식품을 대상으로 원인균을 검색할 필요성이 대두되며, 식품의 오염원인을 제공하는 다양한 환경에 관한 분포도 조사가 선행되어야 한다. 본 실험에서는 도축우의 장 내용물에서 *L. monocytogenes*를 포함한 *Listeria*속균에 대해 3종의 선택배지에 따른 시간대별 증균 상태 및 분리율을 비교 조사하였다.

재료 및 방법

공시재료

본 실험에 사용된 재료는 2003년 3월부터 10월까지 대구지역 도축장에서 도축우의 장 내용물 100건을 대상으로 *Listeria*속균의 분리를 실시하였다.

*Listeria*속균의 분리방법

*Listeria*속균의 증균 배양은 USDA법¹³⁾의 변법을 사용하였다. 즉, 멸균 면봉으로 장내용물을 swab하여 9ml Fraser broth (Difco)에 접종하였다. 아울러 증균 배양 매 24시간마다 3일간 증균 배양액을 *Listeria* 선택배지인 Palcam agar (PAL, Difco), Oxford agar (OX, Difco) 및 Enhanced hemolysis agar (EHA, Difco)에 접종, 37°C에 48시간 배양하여 *Listeria* 유사집락을 택하여 Tryptic soy agar (TSA, Difco)에 순수배양 후 *Listeria*속균을 동정하였다¹⁴⁾. EHA의 제조법은 Blood agar base (Difco) 40g과 MUG (Sigma) 50mg을 증기 멸균하여 50°C로 식힌 후 lithium chloride 5g을 증류수에 녹여 멸균한 용액을 첨가하고, Palcam supplement (Merck)와 sphingomyelinase (Sigma)를 넣은 후에 마지막으로 면양혈액 50ml를 첨가하여 배지를 제조하였다.

생화학적 성상시험

*Listeria*속균을 동정하기 위하여 Gram염색성, catalase시험, oxidase시험, 면양혈액배지 상의 용혈성, esculin hydrolysis, rhamnose, xylose, mannitol 등에 대한 발효시험을 실시하였다

결 과

대구지역 도축우 100건의 장내용물에서 분리한 *Listeria*속균의 분포도는 Table 1에서와 같이 *L innocua* 8주, *L monocytogenes* 6주가 분리되었으며, 분리된 *L monocytogenes* 6주는 모두 *L innocua*와 동일 시료에서 분리되었다. 도축우의 장내용물에서 분리된 *Listeria*속균의 생화학적 성상 시험 결과는 Table 2와 같다. 8주의 *L innocua*는 모두 catalase 및 esculin hydrolysis 양성을 나타냈으며, 면양 혈액배지 상에서 β -hemolysis 및 oxidase 100% 음성을 나타내었다. 또한 당 발효시험에서 mannitol, xylose는 모두 분해하지 못했으며, rhamnose는 5주가 분해하였다. 한편, 6주의 *L monocytogenes*는 모두 catalase, esculin 및 면양 혈액배지 상에서 β -hemolysis 양성, oxidase 음성을 나타내었다. 당 발효시험에서 mannitol, xylose는 모두 분해하지 못했으며, rhamnose는 6주 모두가 분해하였다.

Table 1. Distribution of *Listeria* spp isolated from the intestinal contents of slaughtered cattle

Strains	No. (%) of isolates
<i>L monocytogenes</i>	6 (6)
<i>L innocua</i>	8 (8)
Other <i>Listeria</i> spp	0 (0)
Total	14 (14)

Fraser broth에서 *Listeria*속균 배양 시 발생하는 esculin 양성반응과 *Listeria*속균 검출율과 상관관계를 조사한 결과, esculin 분해한 시료 99건 중 *Listeria* spp가 검출된 시료는 총 8건으로 esculin 양성 대비 *Listeria* spp 분리율은 8% (8/99)로 나타났다 (Table 3).

Table 2. Biochemical characteristics of 14 *Listeria* spp isolated in this study

Biochemical properties	No.(%) of isolates	
	<i>L innocua</i> (n=8)	<i>L monocytogenes</i> (n=6)
Catalase	8 (100)	6 (100)
Oxidase	0 (0)	0 (0)
Esculin hydrolysis	8 (100)	6 (100)
β -hemolysis on sheep blood agar	0 (0)	6 (100)
Mannitol	0 (0)	0 (0)
Rhamnose	5 (63)	6 (100)
Xylose	0 (0)	0 (0)

Table 3. Relationship between esculin reaction in Fraser broth and frequency of *Listeria* spp isolated

Esculin reaction	No. of sample(s)	
	Tested	<i>Listeria</i> spp isolated
Positive	99	8
Negative	1	0
Total	100	8

Table 4. Comparison of 3 selective media for detection of *Listeria* spp with different enrichment time

Media *	Isolates	Enrichment time (day)		
		1	2	3
PAL	<i>L monocytogenes</i> only	0	0	0
	<i>L innocua</i> only	6	6	6
	<i>L monocytogenes</i> + <i>L innocua</i>	0	0	0
OX	<i>L monocytogenes</i> only	0	0	0
	<i>L innocua</i> only	4	6	6
	<i>L monocytogenes</i> + <i>L innocua</i>	2	2	2
EHA	<i>L monocytogenes</i> only	0	0	0
	<i>L innocua</i> only	2	2	2
	<i>L monocytogenes</i> + <i>L innocua</i>	2	6	6

* PAL: PALCAM agar, OX: Oxford agar, EHA: Enhanced hemolysis agar

3종의 선택배지를 이용한 *Listeria*속균의 분리율은 Table 4와 같이, Palcam agar에서는 6시료에서 배양시간에 상관없이 *L innocua*만 분리되었다. Oxford agar에서는 Palcam agar에서 24시간 배양시 *L innocua*가 분리된 시료에서 *L monocytogenes*도 동시에 분리되었고, 48시간 이상 배양시 2시료에서 *L innocua* 2주가 추가로 분리되었다. Enhanced hemolysis agar에서는 24시간 배양시 Palcam agar 및 Oxford agar에서 *L innocua*만 분리된 시료에서 *L monocytogenes*, *L innocua* 2주가 동시에 분리되었고, 48시간 이상 배양시 Enhanced hemolysis agar는 *L innocua*만 분리된 시료에서 *L monocytogenes*와 *L innocua*가 추가로 분리되었다.

고 찰

*L monocytogenes*는 양배추, 상치 등의 채소류를 비롯하여 아이스크림, 소시지 등의 가공식품과 우유, 돈육 및 계육 등의 원료식품을 포함한 매우 다양한 종류의 식품에서 분리된다. Skovgaard와 Morgan¹⁵⁾은 소 분

변 75건 중 52%에서 *L monocytogenes*를 분리하였으며, 이 중 다른 *Listeria*속균과 혼합 오염된 경우가 12건이었음을 보고하였다. Weber와 Potel¹⁶⁾은 *L monocytogenes*를 소 분변에서 33.8%, 돼지 분변에서 5.9%, 닭 분변에서 8% 분리하였으며, *L innocua*는 소 분변에서 36.9%, 돼지 분변에서 5.9%, 닭 분변에서 15% 분리하였다. Iida 등¹⁷⁾은 소 분변에서 1.9%, 돼지 분변에서 0.6%의 *L monocytogenes*를 분리하였고, 닭 분변에서 분리되지 않았음을 보고하였다. Genigeorgis¹⁸⁾는 닭 분변에서, Oni 등¹⁹⁾은 소 분변에서 *L monocytogenes*가 전혀 분리되지 않았음을 보고하였다. 한편 국내에서 강 등²⁰⁾이 원유, 우유, 계육, 소 및 닭의 분변에서 *Listeria*속균의 분리율을 조사하였는데, 소 분변에서는 전혀 분리되지 않았고, 닭 분변에서는 1.4%의 분리율을 보고하였다.

본 실험에서는 대구지역 도축우의 장 내용물에서 *Listeria*속균의 오염도 조사를 실시한 결과, *L innocua*와 *L monocytogenes*가 각각 8% 및 6% 분리되었으며, 그 외 *Listeria* 속균들은 분리되지 않아 국외 연구자의 분리율 보다는 낮았으며 국내 분리율 보다는 다소 높았다. 또한 분리된 *Listeria*속

균의 생화학검사 결과 *L. innocua* 8주와 *L. monocytogenes* 6주 모두 Dolye 및 Schoeni²¹⁾과 Lovett 등²²⁾의 분리기준과 일치하였다. Fraser broth 상에 *Listeria*속균이 없는데도 흑변하는 이유는 esculin을 분해하는 *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yeast* 및 *Pseudomonas aeruginosa* 등과 같은 세균이 존재시 흑변하는 경우가 생기는데, Fraser 등²³⁾도 평균 39~53%의 false-positive가 발생한다고 보고하였다.

Lovett 등²⁴⁾은 *Listeria* 분리시 비가열 식품에서는 USDA법이 효과적이며, 가열 식품에서는 FDA법이 효과적이라고 보고하였는데, 본 실험은 변형된 USDA법을 사용하였고, 3일간 배양하면서 매 24시간마다 선택 배지에 접종하여 조사하였다. 24시간 배양시 *L. innocua*만 분리되었던 시료에서 48시간 이상 배양시 *L. monocytogenes*와 *L. innocua* 혼합오염 사례가 2시료에서 나타났다. 분리된 *L. monocytogenes* 6시료 중 66.7%가 48시간 이상 배양에서 분리되어 *L. monocytogenes*를 분리하기 위해서는 48이상 배양이 필요할 것으로 사료되며, 이는 Walker 등²⁵⁾, Warburton 등²⁶⁾과 Warburton 등²⁷⁾의 결과와 일치하였다.

Listeria 선택배지인 Palcam agar, Oxford agar는 모두 esculin 양성반응을 나타내는 균주를 선택하여 검사하는 방법으로 *Listeria* 속균간의 혼합 오염시 esculin 양성반응만으로 선택배지 상에서 균을 선택하여 *L. monocytogenes*를 검출한다는 것은 매우 어려운 일이다. 이와는 달리 Enhanced hemolysis agar에서 *Listeria*속균은 UV light (366 nm)상에서 형광을 발하고, 용혈성을 나타내는 *Listeria*속균은 용혈을 형성하므로, *L. monocytogenes*를 분리하는데 효과적이었다. Gunasinghe 등²⁸⁾은 Palcam agar가 Oxford agar보다 *Listeria* 속균을 검출하는데 더 효과적이라고 보고했는데, 본 실험에서 Palcam agar는 Oxford agar에서 분리된 *L. monocytogenes* 2주를 분리하지 못해 분리율이 Oxford agar보다 낮아 Gunasinghe 등의

결과와 일치되지 않았다. 그러나 Oxford agar 역시 *L. monocytogenes*와 *L. innocua*의 혼합 오염시 *L. monocytogenes*는 2주만 분리하여 *L. monocytogenes*를 분리하는 데에는 한계가 있었다. 이에 반해 Enhanced hemolysis agar는 Palcam supplement와 LiCl로 다른 세균의 성장을 억제시키고, *Listeria*속균이 MUG와 특이적으로 반응하여 형광을 발해 일차적으로 *Listeria*속균을 감별하고 혈액배지 상에서 용혈성을 확인하므로 용혈성 *Listeria*속균을 분리하는데 효과적이었다.

결 론

2003년 3월부터 10월까지 대구지역 도축장에서 채취한 도축우의 장내용물 100건에 대한 *Listeria*속균의 분포도 조사는 다음과 같다.

1. 도축우의 장내용물에서 *Listeria*속균은 *L. innocua* 8주, *L. monocytogenes* 6주로 총 14주 분리되었으며, 분리된 *L. monocytogenes* 6주는 모두 *L. innocua*와 동일 시료에서 분리되었다. Fraser broth에서 *Listeria*속균 배양 시 발생하는 esculin 양성반응과 *Listeria*속균 검출율과 상관관계는, esculin 분해한 시료 99건 중 *Listeria* spp가 검출된 시료는 총 8건으로 esculin 양성 대비 *Listeria* spp 분리율은 8% 이었다.
2. *Listeria* 선택배지인 Palcam agar, Oxford agar 및 Enhanced hemolysis agar의 *Listeria* 선택성시험에서 *Listeria*속균의 분리에는 각 배지가 비슷한 선택능을 가졌으나, *L. innocua*와 *L. monocytogenes*가 동시 오염된 시료에서는 용혈능을 알아볼 수 있는 Enhanced hemolysis agar가 Oxford agar 와 Palcam agar보다 효과적이었다.
3. *Listeria*속균 중 병원성 균종인 *L. monocytogenes*는 분리 균주 6주 중 4주가 48시간 배양 시에 분리된 것으로 보아 증균 배양 시간은 48시간이 적절하였다.

참 고 문 헌

1. Jones D, Seelinger HPR. 1987. International Committee on Systemic Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of *Listeria*, *Brochothrix*, and *Erysipelothrix*. *Int J Syst Bacteriol* 37 : 176-184.
2. Gray ML, Killinger AH. 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev* 30 : 309-382.
3. Ortel S. 1989. *Listeria meningitis* and septicaemia in immunocompromised patients. *Acta Microbiol Hung* 36 : 153-157.
4. Gellin BG, Broome CV. 1989. Listeriosis. *J Am Med Assoc* 261 : 1313-1320.
5. Farber JM, Peterkin PI. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 55 : 476-511.
6. 송필준, 주정혜, 민정식 등. 1973. *Listeria monocytogenes*에 의한 신생아 감염증 4예. *경희의대 논문집* 7 : 127-138.
7. Schonberg A, Teufel P, Weis E. 1999. Serovars of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from pathogens. *Act Microbiol Hung* 36 : 249-253.
8. Welshimer HJ. 1960. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *J Bacteriol* 80 : 316-320.
9. Weis J, Seeliger HPR. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol* 30 : 29-32.
10. Charpentier E, Gerbaud G, Jacquet C. 1992. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. *J Infect Dis* 172 : 277-281.
11. 허정호, 손성기, 이주홍 등. 1997. 도축처리 단계별 도체 및 환경재료에서 *Listeria monocytogenes*의 분리. *한국가축위생학회지* 20(1) : 69-78.
12. Rocourt J. 1991. Human listeriosis-1989. WHO/HPP/FOS/91. 3. WHO, Geneva.
13. McClain D, Lee WH. 1988. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. *JAOAC* 71 : 660-664.
14. Beumer RR, Giffel MC. 1992. The isolation of *Listeria monocytogenes* from food and environmental samples using enhanced *haemolysis* agar. *Book of Abstracts Isopol XI* : 23-24.
15. Skovgaard N, Morgan CA. 1988. Detection of *Listeria* spp in feces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *Int J Food Microbiol* 6 : 229-242.
16. Weber A, Potel J. 1995. Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 198(2) : 117~123.
17. Iida T, Kanzaki M, Maruyama T, et al. 1991. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in intestinal contents of healthy animals in Japan. *J Vet Med Sci* 53(5) : 873-875.
18. Genigeorgis CA. 1989. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. *J Food Prot* 52 : 618-624.
19. Oni OO, Stafford H, Gregg PJ. 1989. Prevalence and some characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from cattle and milk in Kaduna State, Nigeria, Israel. *J Vet Med* 45 : 12-16.
20. 강호조, 손원근, 강광식 등. 1991. 동물유래 생식품, 사료 및 동물 분변중 *Listeria monocytogenes*의 분포와 분리균의 특성에 관한 연구. *수의공중보건학회지* 15(3) : 231-237.

21. Dolye MP, Schoeni JL. 1997. Comparison of procedures for isolating *Listeria monocytogenes* in soft, surface-ripened cheese. *J Food Prot* 50(1) : 4-6.
22. Lovett J, Francis DW, Hunt JM. 1987. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. *J Food Prot* 50 : 188-192.
23. Fraser JA, Sperber WH, Henderson E. 1988. Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. *J Food Prot* 51 : 762-765.
24. Lovett J, Francis DW. 1991. Quantitative comparison of two enrichment methods for isolating *Listeria monocytogenes* from seafoods. *J Food Prot* 54(1) : 7-11.
25. Walker SJ, Archer P, Appleyard J. 1990. Comparison of the *Listeria*-Tek ELISA kit with cultural procedures for the detection of *Listeria* species in foods. *Food Microbiol* 7 : 335-342.
26. Warburton DW, Farber JM, Archer P. 1991. A Canadian comparative study of modified versions of the "FDA" and "USDA" methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 54(9) : 669-676.
27. Warburton DW, Farber JM, Archer P. 1992. Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol* 9 : 127-145.
28. Gunasinghe CPG, Henderson C, Rutter MA. 1994. Comparative study of two plating media (Palcam and Oxford) for detection of *Listeria* species in a range of meat products following a variety of enrichment procedures. *Lett Appl Microbiol* 18 : 156-158.