

경인지역에 유통되는 분쇄육 중 장출혈성대장균의 분포 조사 및 특성 연구

김희연* · 김은정¹ · 박용춘 · 조준일 · 이종옥¹

경인지방식품의약품안전청 시험분석센터, ¹식품본부

Prevalence and Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Isolated from Ground Beefs Distributed in Gyeong-In Region

Hee-Yun Kim*, Eun-Jeong Kim¹, Yong-Chjun Park, Joon-Il Cho, and Jong-Ok Lee¹

Testing Analysis Center, Gyeongin Regional Food and Drug Administration

¹Food Headquarters, Korea Food and Drug Administration

Abstract The objective of this study was to evaluate three verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) detection kits to detect the presence of VT genes: Duopath Verocytotoxin (GLISA) developed by MERCK, ProsPect Shiga Toxin *E. coli* (STEC) Microplate Assay (ELISA) developed by Remel, and a polymerase chain reaction method. Our laboratory verified artificially inoculated samples. All three methods could detect very low numbers of VTEC, but VT-PCR had the best sensitivity for VTEC detection. From April through September 2005, 257 ground-beefs from supermarkets and traditional markets were examined for the presence of VTEC by polymerase chain reaction immediately after purchase and total viable counts (TVC) were determined. Using the 3-tube most probable number (MPN) technique, the *E. coli* cell concentrations were determined. VTEC was isolated from 30 of 257 ground-beefs. A variety of serogroups was found, including 10 strains belonging to the virulence type EHEC, but major serogroups such as O157, O26 and O111 were not found.

Key words: EHEC, PCR, ELISA, GLISA, prevalence

서 론

대장균(*E. coli*)은 동물 장관내에 주로 서식하는 통성혐기성균으로 갓 태어난 신생동물의 위장관내에서 서식하고 숙주의 공생 관계를 유지하거나 질병을 유발한다(1). *E. coli*는 숙주의 면역 방어기전이 저하되거나 위장관 계통의 방어장벽이 손상을 입었을 경우 장 점막에서 대량 증식하고 감염을 유발하여 설사, 패혈증, 요로감염증 등을 야기한다. 이와 같은 병인기전은 *E. coli* 균주의 병원성과 밀접한 관계가 있다(2). 병원성 대장균은 O:H serogroup, 독소와 부착인자의 생산능력, enterocytes에 대한 작용 및 임상적 증상이나 증후 등을 기초로 하여 enteropathogenic *E. coli*(EPEC), enterotoxigenic *E. coli*(ETEC), enteroinvasive *E. coli*(EIEC) 및 enterohemorrhagic *E. coli*(EHEC)의 4가지 주요군으로 분류한다(3). Verocytotoxin은 병원성 대장균에 의하여 생산되는 cytotoxin으로서 *Shigella dysenteriae*가 생산하는 Shiga toxin과 구조 및 기능이 유사하여 Shiga-like toxin(SLT)이라고도 하며 1977년 Konowalchuk 등에 의하여 verocytotoxin이라고 명명되었다(4). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*(VTEC)는 설사병의 중요한 원인체로 작용하며, 사람에게 출혈성 결장염(hemorrhagic colitis) 및 급

성 신장장애, 혈소판 감소증, 소혈관성 빈혈 등을 증상으로 하는 가칭 용혈성 뇨독증후군(hemolytic uremic syndrome)등을 유발하여 많은 문제가 되고 있다(5).

장출혈성대장균은 VTEC의 하위그룹으로, 출혈성대장염이나 용혈성 뇨독증후군을 일으키고, 장 상피세포에 부착하여 상처 등을 유발하는 등의 임상증상을 나타내는 균을 의미한다. 장출혈성대장균의 가장 대표적인 혈청형은 O157:H7로서 EHEC의 검출방법은 혈청형 O157:H7에 국한되어 있는 경우가 많다(6,7). 하지만, 계속 새로운 혈청형을 가진 EHEC에 의한 발병이 확인되고 있으며, WHO는 O157 이외에 EHEC의 주요 혈청형으로 O26, O111, O103 및 O145등을 보고하였다(8).

따라서 본 연구에서 verocytotoxin-producing *E. coli*(VTEC)을 예방적 차원에서 잠재적인 장출혈성대장균으로 간주하고, 배로독소 생산능력에 초점을 맞춘 rapid screening method를 검토하여 최적의 조건을 확인하고 최적의 방법을 이용하여 발생빈도가 높은 분쇄육(소)에서 장출혈성대장균 분포도를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 분석기기

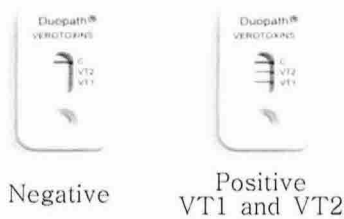
분포조사를 위한 시료로 2005년 5월부터 9월까지 인천 및 경기 남부일대에서 유통 중인 분쇄육 257건을 수입육 및 국내산 구분하여 구입·사용하였다. 증균 배지로 mEC broth(with novobiocin, Merck)를 사용하였으며 상용화된 신속검출 kit로 GLISA (Duopath, Merck), ELISA(ProsPect Shiga Toxin *E. coli*(STEC) Microplate Assay, Remel)를 사용하였으며 PCR방법의 primer는

*Corresponding author: Hee-yun Kim, Testing Analysis Center, Gyeongin Regional Food and Drug Administration, 120 Juan 1-dong, Nam ku, InCheon 402-835, Korea
Tel: 82-32-442-4620
Fax: 82-32-442-4622
E-mail: pmheekim@kfda.go.kr
Received June 26, 2006; accepted November 22, 2006

Table 1. *E. coli* strains used in this study

Test strain	Sero type	Toxin type (acc. Info)
ATCC 43888	O157:H7	negative
ATCC 43889	O157:H7	vtx2
ATCC 43890	O157:H7	vtx1
ATCC 43894	O157:H7	vtx1 & vtx2
Isolated strain #1	OUT*	vtx1 & vtx2
Isolated strain #2	O157:H7	vtx1 & vtx2
Isolated strain #3	O27	vtx2

*: O serotype untypable

**Fig. 1. Results with GLISA (Doupath verotoxin).**

Bioneer(주)에서 합성 주문제작하여 사용하였다. Template 제조를 위해 Qiagen사의 DNeasy Tissue Kit를 사용하였다. Deep freezer (Thermo, Forma Scientific, US723), Centrifuger(ependorf 5417R, DE), Microplate Reader(Stat Fax 3200, USA), API20E(bioMerieux, France) 및 VITEK(VITEK32, bioMerieux, France)를 사용하였다.

신속 검출방법(Rapid Screening Methods)의 평가

먼저 표준균주 및 분리균주의 순수배양액(pure culture)을 이용하여 VTEC screening 방법을 검토하였으며 사용한 균주는 Table 1과 같다. 균주는 Microbank System(Cryo care, Key Scientific Co.)을 이용하여 -80°C에서 동결보관 되었으며, BHI broth와 nutrient agar에서 37°C, 18시간 활성화시킨 후 실험에 사용되었다.

GLISA(Gold Labelled Immuno Sorbent Assay) 방법의 경우 Merck사에서 제공하는 프로토콜 일부를 변경하여 수행하였다. 표준균주 colony를 CAYE-Broth with Carbadox(Merck, Germany) 2 mL에 접종하여 41.5°C에서 6시간 배양한 액을 test zone에 150 µL에 떨어뜨리고 20분 경과 후 결과를 관찰하였다(Fig. 1). PCR 방법은 표준균주 colony를 멸균수 200 µL로 현탁 후 100°C에서 15분간 boiling하고 그 액을 원심분리(23,897 × g, 15 min)한 후 상등액을 template로 사용하였으며 buffer(×10) (MgCl₂ 5 µL 포함), dNTP mix 4 µL, primer (mk1 + mk2) 0.5 µL, Taq-polymerase 0.5 µL, template 10 µL 및 멸균증류수 30 µL를 가하여 PCR을 수행하였으며 2.2% agarose gel을 이용하여 전기영동하였다. 실험에

사용한 primers(Bioneer)와 PCR 조건들은 Table 2에 요약하였다.

ELISA는 mEC broth에서 24시간 배양한 액 0.2 mL와 희석액(Remel사 제공) 0.4 mL를 혼합하여 제공되어지는 프로토콜에 따라 Microtiter Plate Spectrophotometer 450 nm/630 nm(Reference)에서 흡광도 측정하여 결과를 판정하였다.

표준균주를 인위적으로 오염시킨 식육검체를 이용하여 각 screening 방법의 분석조건을 검토하였다(12). 분쇄된 정육(ground beef)을 멸균된 유리그릇에 모두 담고 멸균피펫 등으로 균질화를 시킨 후 멸균 bag에 담아 -20°C에 냉동 보관하여 사용하였으며 *Escherichia coli* 표준균주 ATCC 43889, ATCC 43890 및 ATCC 43894를 각각 BHI-Broth에 35°C, 24시간 배양한 후 단계적으로 희석하여 접종액으로 사용하였다. 각 접종액의 균량은 PCA 및 Desoxycholate Agar를 이용하여 pouring 방법으로 측정하였으며 접종액 1 mL 씩을 멸균피펫을 이용하여 25 g의 검체에 잘 스며들도록 접종하였다. 대조군으로서, 비 접종시료의 세균수와 대장균(군)수를 측정하였다.

접종시료와 대조군시료 25 g을 mEC broth 225 mL 가한 것을 41.5°C에서 증균 조건을 달리하여 각 분석방법을 검토하였다.

GLISA 방법은 세가지 방법(① 6시간 증균액 1 mL를 4 mL CAYE broth(with carbadox)에 접종후 18시간 배양액 ② 18시간 증균액 1 mL를 4 mL CAYE broth(with carbadox)에 접종하여 6시간 배양한 후, 최종 증균액 180 µL와 polymyxin(50,000 IU/mL) 20 µL을 혼합하여, 35°C 30분 배양액 ③ 18시간 증균액 180 µL와 polymyxin(50,000 IU/mL) 20 µL을 혼합 후 35°C, 30분 배양액)으로 배양한 액을 Duopath의 test zone에 150 µL에 떨어뜨려 20분 경과 후 결과를 관찰하였다.

PCR은 mEC broth에서 18시간 증균 후 boiling 방법 및 Qiagen Kit를 사용하여 template를 각각 제조하여 수행하였다.

ELISA 방법은 접종시료와 대조군 시료의 6시간 증균 후, 증균액 1 mL를 4 mL mEC broth plus Carbadox에 접종하여 18시간 배양한 것과 18시간 증균 후, 증균액 180 µL와 polymyxin(50,000 IU/ml) 20 µL을 혼합하여, 35°C에서 30분간 배양하는 방법을 수행하며 각각의 배양액 0.2 mL와 희석액(Remel사 제공) 0.4 mL를 혼합하여 제공되는 프로토콜에 따라 Microtiter Plate Spectrophotometer 450 nm/630 nm(Reference)에서 흡광도를 측정하여 결과를 비교 관찰하였다.

신속검출방법의 검출한계

표준균주의 BHI broth 증균액을 혼합한 후 희석배수를 달리하여 접종량을 조절하면서 방법별 검출한계 및 sensitivity를 확인하였다. 일련의 과정으로 확인된 각 방법의 최적 증균 조건을 사용하여 수행하였으며 접종하지 않은 시료 또한 대조군으로서 같은 방법으로 수행하였다.

VTEC확인을 위하여 접종시료의 mEC broth 1 mL를 원심 분리(106 × g, 3 min)하여, 상등액을 버리고 1 mL PBS에 부유시킨 후

Table 2. Primers and PCR conditions used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	PCR products	PCR conditions
mk1	TTT ACG ATA GAC TTC TCG AC	227 bp	94°C, 5 min 94°C, 1 min 44°C, 1 min 72°C, 1.5 min
mk2	CAC ATA TAA ATT ATT TCG CTC	224 bp	44°C, 2min, 72°C, 10min 4°C for holding

EMB-Agar에서 35°C 24시간 배양 후 *E. coli*의 전형적인 집락 최소 5개를 취하여 PCR로 베로독소 생산여부를 재확인하였으며 Vitek 및 API를 통하여 *E. coli*로 확정하였다.

분쇄육에서의 장출혈성 대장균 분포조사

국내 · 수입산, 대형마트 · 재래식 시장, 구입월별을 분리하여 분쇄육 257건을 구입 사용하였으며 검토한 3가지의 신속검출방법 중 가장 sensitivity가 높게 나타난 방법을 사용하여 VTEC의 분포조사를 실시하였다. 1차 screening으로 VTEC가 확인된 시료에 대해 EMB-Agar에서 집락을 분리하고 VITEK 및 API를 이용하여 *E. coli* 여부를 확인하였다. *E. coli*로 확정된 분리주에 대하여 *E. coli* serotyping kit(VT-1742, LREC, Spain)를 이용하여 serotype을 확인하여 잠재적인 장출혈성대장균의 병원성 인자유무 살펴보았다.

결과 및 고찰

균주의 순수배양(pure culture)을 이용한 평가

표준균주 및 분리균주 배양액을 이용하여 GLISA 방법을 검토한 결과 표준균주의 경우 독소 typing 정보에 부합된 결과가 나왔으나 분리균주 #3는 독소 type 정보에 따르면 vtx2를 생성하였으나 GLISA로 확인해 본 결과 독소형 vtx1&2에서 모두 양성의 결과가 나타났다. PCR을 이용한 방법은 *Escherichia coli* ATCC43888 (vtx⁻)를 제외한 6균주(vtx⁺)에서 200~300 bp사이에서 뚜렷한 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 2). ELISA방법의 경우 O.D.(optical density) 값이 0.1이상이면 양성으로, 0.07이하이면 음성으로 판정하였으며 negative control과 *Escherichia coli* ATCC 43888은 음성으로, positive control 과 나머지 균주들은 양성으로 나타났다. 분리균주 #3의 경우 세가지 방법 모두에서 vtx1&2 를 생성하는 균주로 확인이 되었으며 순수배양액으로 확인한 세 가지 방법 모두 VTEC 검색에 효과적이었다.

표준균주를 인위적으로 오염시킨 식육검체를 이용한 평가

대조군으로 비접종 식육의 오염도를 확인결과 세균수 5.2×10^5 CFU/g, 대장균군 3.7×10^3 CFU/g 및 대장균 <10 CFU/g으로 나타났다. 대장균의 경우 정량분석은 불가능했으나, EC에서 가스 발생 및 indole test에서 양성의 결과를 나타내었다. 표준균주

(*Escherichia coli* ATCC 43889, 43890, 43894)를 혼합 · 배양한 액, 접종 균량이 각각 50 CFU/25 g, 6 CFU/25 g인 시료를 사용하였다. 비접종 대조군 시료(control)은 세가지 방법에서 모두 음성으로 확인되었다. 접종시료에 대하여 GLISA를 이용하여 검토해 본 결과, 제조사에서 권장하는 mEC broth에서 41.5°C, 6시간 증균하고, CAYE broth(with carbadox)에서 18시간 2차 증균하는 방법은 식육의 검체에 접종 균량이 <10 CFU/25 g인 경우 판독이 어려웠으며 반복실험 결과 위(false)음성의 결과가 나타났다. mEC broth에서 18시간 증균하고, CAYE broth(with carbadox)에서 6시간 증균한 것과 2차증균 없이 바로 polymyxin 처리하는 방법에서는 큰 차이가 나타나지 않았다. 따라서 식육검체의 경우, 비용과 시간적 측면을 고려하여 mEC broth에서 18시간 배양한 증균액에 polymyxin을 처리한 후 35°C에서 30분 배양하는 방법을 배양조건으로 선택하였다.

Boiling과 Qiagen kit를 이용한 template 제조 전처리를 검토한 PCR 방법은 접종시료 A와 B의 PCR 결과 두 가지 전처리 방법에서 200-300 bp 사이 뚜렷한 밴드가 확인되었다. Qiagen kit의 비용을 고려하여 PCR방법의 template 제조는 mEC broth에서 41.5°C 18시간 증균 후 증균액의 boiling 방법으로 결정하였다.

mEC broth에서 41.5°C에서 6시간 증균 후 Carbadox에 처리하는 방법과 18시간 증균 한 후 polymyxin 처리하는 증균 방법을 비교 검토한 ELISA 의 O.D 판독 결과 접종 균량이 <10 CFU/25 g인 식육검체를 이용하였을 때 판독을 위한 배양액의 O.D.값의 뚜렷한 차이를 나타났다. Carbadox를 처리하는 방법에서 위 음성의 결과를 보였다. 따라서 위 음성을 피하기 위해서 식육에서는 18시간 증균 한 후 polymyxin 처리하는 증균 방법을 선택하였으며 일련의 과정을 통해 얻어낸 방법별 최적의 증균조건은 Fig. 3에 도식화 하였다.

신속검출방법의 검출한계

표준균주와 분리균주의 단일배양액 및 표준균주(*Escherichia coli* ATCC 43889, 43890, 43894)의 혼합배양액을 식육검체에 접종 후, 일련의 과정을 통해 얻어낸 최적의 증균조건을 이용하여 각 방법의 검출한계를 확인하였다. 대조군(비접종) 시료에서의 VTEC 존재유무를 확인하기 위하여 오염도 조사를 실시하였다. 식육의 총 세균수 5.0×10^5 CFU/g, 대장균군 2.9×10^3 CFU/g, 대장균 15 MPN 100 mL으로 확인되었으며, VTEC은 검출되지 않았다.

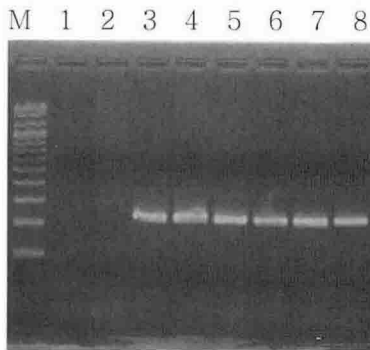


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products. Lane M: 100 bp DNA ladder, Lane 1: Negative Control, Lane 2: *Escherichia coli* ATCC 43888, Lane 3: *Escherichia coli* ATCC 43889, Lane 4: *Escherichia coli* ATCC 43890, Lane 5: *Escherichia coli* ATCC 43894, Lane 6: Isolated strain #1, Lane 7: Isolated strain #2, Lane 8: Isolated strain #3.

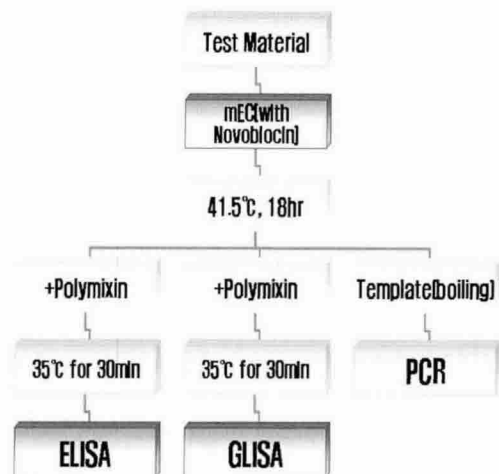


Fig. 3. Outline of procedures used for analysis.

Table 3. Determination of detection limit in 3 VTEC-detection methods

Sample	Strain	Inoculum level	PCR	ELISA	GLISA
1	Mix*	55 cfu/25 g	+	+	+
2	Mix	6 cfu/25 g	+	+	+
3	Mix	3 cfu/25 g	(+)	-	-
4	Mix	0.3 cfu/25 g	-	-	-
5	Mix	0.15 cfu/25 g	(+)	-	-
6	Mix	0.03 cfu/25 g	-	-	-
7	Isolated strain #1	3 cfu/25 g	+	-	-
8	Isolated strain #2	3 cfu/25 g	-	-	-
9	Isolated strain #3	3 cfu/25 g	(+)	-	-
10	<i>Escherichia coli</i> ATCC 43888	8 cfu/25 g	-	-	-
11	<i>Escherichia coli</i> ATCC 43889	0.2 cfu/25 g	-	-	-
12	<i>Escherichia coli</i> ATCC 43890	0.3 cfu/25 g	-	-	-
13	<i>Escherichia coli</i> ATCC 43894	0.3 cfu/25 g	-	-	-
Control	Viable total cell	5.0×10^5 cfu/g	-	-	-
	Coliform	2.9×10^3 cfu/g			
	<i>E. coli</i>	15 MPN/100 mL			

*: ATCC 43889, 43890, 43894

표준균주 혼합액의 접종 균량이 6 CFU/25 g인 시료를 PCR, ELISA 및 GLISA 각 방법으로 검출한계를 확인한 결과 세 가지 방법에서 모두 양성을 나타내었다. VTEC 접종 균량이 3 CFU/25 g인 경우, PCR에서만 약한 양성을 나타냈고, ELISA와 GLISA에서는 음성의 결과를 나타내었다. VTEC 접종 균량 <1 CFU/25 g에서는 세 가지 방법에서는 모두 음성의 결과를 나타내었다. 분리균주의 경우, 균주에 따라 검출한계에도 차이가 나타나는 것을 알 수 있었다. Sample 7(분리균주 #1 접종)의 경우, 접종 균량 3 CFU/25 g이었을 때 PCR을 이용했을 때만 양성의 결과를 얻었으나, Sample 8(분리균주 #2 접종)의 경우, 같은 접종 균량이었지만 모든 방법에서 VTEC 음성으로 나타났다(Table 3). 따라서 접종량의 제조를 다시 수행하여 일련의 실험을 다시 반복하였으며 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 표준균주 배양액의 mix(*Escherichia coli* ATCC 43889, 43890, 43894)의 접종균량이 5 CFU/25 g 일 때 PCR, ELISA 및 GLISA에서 양성의 결과를 확인할 수 있었으며 EMB-agar에서도 녹색금속성광택의 집락을 확인할 수 있었다. 그러나 접종 균량이 0.5 CFU/25 g 일때는 PCR, ELISA 및

GLISA 모두에서 양성의 결과를 확인할 수 없었으나 EMB-agar에서 녹색금속성광택이 확인되었다. Sample 9(분리균주 #3 접종)의 경우 접종 균량이 3 CFU/25 g일때 PCR 방법으로만 양성의 결과를 확인할 수 있었는데 EMB agar에서 녹색금속성 광택이 확인되지 않아 위 양성 결과에 대한 확인실험이 요구되어졌다(Table 4). 위와 같은 실험의 반복으로 식육에 대한 VTEC 검출방법으로 PCR이 가장 적합한 것으로 나타났다. 그러나 Katherine 등(12)의 보고에 의하면 식육에 대한 VTEC 검출방법을 ELISA 방법의 sensitivity가 가장 높게 나타났다. 또한 식육을 제외한 사과즙, 우유 등 다른 식품에 대한 VTEC 검출방법은 PCR을 이용한 방법의 sensitivity가 높게 나타났다. GLISA 방법과 원리가 같은 LFIA 방법에 대해서는 속도, 간편성 및 다량 동시분석 기능이라는 장점이 있으나 VTEC 검출의 sensitivity 개선이 요구되어진다고 보고하고 있다.

따라서 본 논문의 분쇄육에서의 장출혈성대장균 분포조사를 수행하기 위한 방법으로 PCR방법을 사용하기로 결정하였다.

Table 4. Determination of detection limit in 3 VTEC-detection methods

Sample	Strain	Inoculum level	PCR	ELISA	GLISA
1	Mix*	5 cfu/25 g	+	+	+
2	Mix	1 cfu/25 g	+	+	+
3	Mix	0.5 cfu/25 g	-	-	-
4	ATCC 43889	4 cfu/25 g	+	+	+
5	ATCC 43890	3 cfu/25 g	+	+	+
6	ATCC 43894	4 cfu/25 g	+	+	+
7	Isolated strain #1	1 cfu/25 g	-	-	-
8	Isolated strain #2	2 cfu/25 g	+	(+)	-
9	Isolated strain #3	3 cfu/25 g	+	-	-
Control	Viable total cell	5.4×10^5 cfu/g	-	-	-
	Coliform	4.5×10^3 cfu/g			
	<i>E. coli</i>	43 MPN/100 mL			

*: ATCC 43889, 43890, 43894

Table 5. Sampling information of ground beefs used in this Study

Time (Month)	Sampling place	Frequency
May	Supermarkets	9
	Traditional markets	20
June	Supermarkets	9
	Traditional markets	56
July	Supermarkets	6
	Traditional markets	66
Aug.	Supermarkets	8
	Traditional markets	58
Sep.	Supermarkets	5
	Traditional markets	20
Total		257

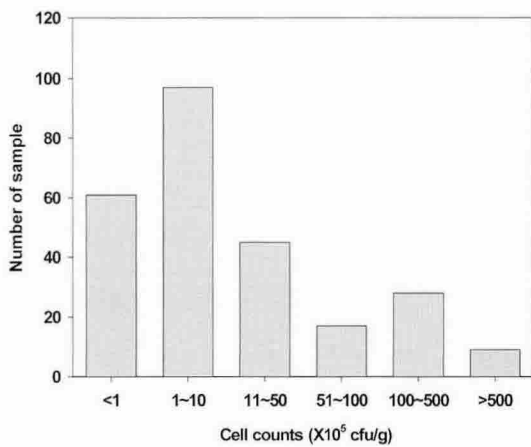


Fig. 4. Distribution of viable total cell counts of ground beefs (cfu/g).

분쇄육에서의 장출혈성 대장균 분포조사

2005년 5월부터 9월까지 인천 및 경기 남부일대의 대형마트에서 37건, 재래식시장에서 220건, 국내산정육 169건 및 수입산 정육 88건을 구입하여 사용하였으며 월별 시료의 구입현황은 Table 5와 같다.

구입한 시료들의 세균수와 대장균량을 조사하여 시료의 오염도를 확인하였다. Petrifilm을 사용하여 세균수를 측정하였으며 MPN 방법으로 대장균량을 확인하였다. 세균수가 5×10^7 CFU/g 이상 측정되어 오염도가 높게 나타난 것이 9건이며 이 중 8건은 TNTC(too numerous to counting)으로 조사되었으며, 61건이 10^5 CFU/g이하로 확인되었다. 97건이 10^5 - 10^6 CFU/g으로 확인되었으며, 28건은 10^7 - 5×10^7 CFU/g의 세균수가 확인되었다(Fig. 4). 대장균의 경우 $>10^4$ MPN/g 으로 나타난 시료가 91건, <10 MPN/g으로 나타난 시료는 45건으로 확인되었다(Fig. 5). 대부분 재래시장에서 구입한 시료의 오염도가 높게 나타났으며 취급자의 위생상태와 밀접한 관련이 있음을 알 수 있었다.

오염도 조사와 동시에 식육을 mEC broth에서 배양시켜 PCR를 이용한VTEC의 분포조사를 실시하였다. 이 중 22건의 시료에서 200-300 bp 사이의 뚜렷한 밴드가 확인되었다. 22건 중 EMB-Agar, Vitek 및 API 로 14건, 30주의 *E. coli*를 확정 분리하였으며 5.4%의 분리율을 보였다.

분리된 균주의 특성을 살펴보면 5월에 구입한 29건의 검체 중

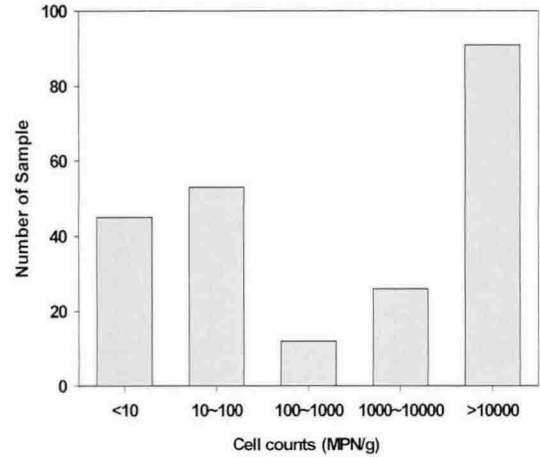


Fig. 5. Distributions of *E. coli* counts of ground beefs by MPN method.

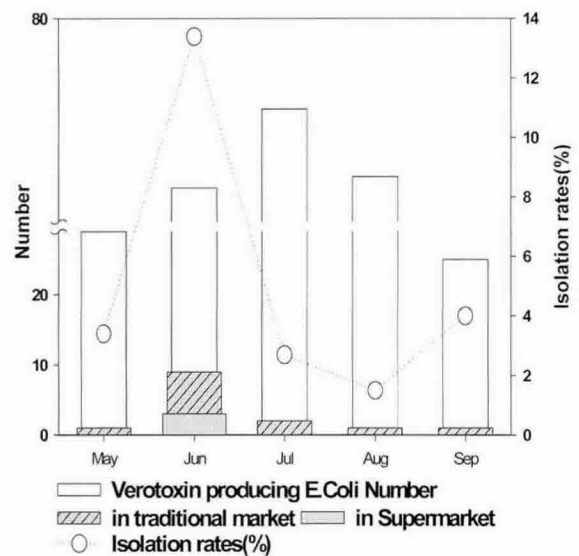


Fig. 6. Prevalence and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in ground beefs.

재래시장에서 구입한 20건의 시료에서 1주의 VTEC가 분리되어 3.4%의 분리율을 보였다. 67건을 구입한 6월에는 9건에서 확인되어 13.4%의 분리율을 보였으며, 이중 대형마트의 3건, 재래시장에서 6건에서 20주의 VTEC를 분리했다.

7월에는 72건을 구입·조사하였으며 재래시장 66건 중 2건의 양성결과를 확인하였으며 2.7%의 분리율을 보였으며 4주의 VTEC를 분리하였다. 66건을 확인한 8월에는 1건을 확인하였으며 2주의 VTEC를 분리하였으며 9월에는 25건의 시료를 확인해 본 결과 재래시장에서 1건이 확인되어 4%의 분리율을 보였으며 3주의 VTEC를 분리하였다(Fig. 6). 총 14건 중 수입산이 10건, 20주가 분리되었으며 국내산 분쇄육은 4건에서 VTEC가 10주 분리되었으며 6월에 3건, 8월에 1건이 확인되었다.

분리된 VTEC 30주에 대하여 잠재적인 장출혈성대장균 여부를 판단하기 위해 serotyping을 실시하였으며 그 결과를 Table 6에 나타내었다. 분리된 30주중 16주는 O serotyping이 불가능했으며 O5 type 8주 그 외에 O15, O108, O46, O110 및 O103 type이 각각 확인되었다. 그 중 O5, O103, O46 type 이 장출혈성대장균

Table 6. Characterization of VTEC isolates from ground beefs

No	Origin	Serogroups	Virulence group
1	MTI017	O108	-
2	MTI033	OUT	-
3	MTI038	O15	ETEC
4	MTH049	OUT	-
5	MSI059	OUT	-
6	MTI061	O11	ETEC
7	MTI065	OUT	-
8	MTI067	O5	EHEC
		O5	EHEC
		O5	EHEC
9	MSH072	OUT	-
		O103	EHEC
		OUT	-
10	MSH073	OUT	-
		OUT	-
		OUT	-
11	MTI094	O46	EHEC
		OUT	-
12	MTI158	O69	-
		OUT	-
13	MTH187	O110	ETEC
		O110	ETEC
		O5	EHEC
14	MTI242	O5	EHEC
		O5	EHEC
		30 isolates/ 14 samples	

으로 분류(13)되며 10주가 분리확인 되었다. 그러나 본 연구에서는 발생빈도가 높은 것으로 보고(8)된 O26, O111, O157 혈청형 등은 발견되지 않았으나 식육의 취급자 및 소비자에 대한 위생 교육의 필요성이 요구되어지며 앞으로 대상 시료의 다양화 및 오염인자 분석으로 장출혈성대장균의 발생빈도에 영향을 미치는 위험요소에 관한 추가적인 연구가 요구되어 진다.

결 론

베로독소를 생산하는 대장균(VTEC)을 잠재적인 장출혈성대장균으로 간주하고, 베로독소 생산능력에 초점을 맞춘 신속검사법 중 GLISA, PCR 그리고 ELISA 시험법을 이용하여 분쇄육에 존재하는 장출혈성대장균을 확인하였다. 또한 순수배양(pure culture)된 균주와 표준균주를 인위적으로 오염시킨 식육검체를 이용하

여 VTEC를 가장 효과적으로 검출할 수 있는 신속검사법을 확인하였다.

비교된 GLISA, PCR 그리고 ELISA 검사법들 중 PCR 방법을 이용하였을 때 그 감도(sensitivity)가 가장 높게 나타났고, PCR 방법을 이용하여 경인지역에 유통 중인 분쇄육 257건에 대하여 베로독소 생성 대장균(VTEC)을 확인하였다. 257건의 분쇄육중 14건에서 베로독소 생성 대장균(VTEC)을 확인할 수 있었고 30주를 분리하였다. 14건의 분쇄육에서 분리된 30주의 월별 분포를 보면 5월에는 총 29건 중 1건, 6월에는 총 67건 중 9건이, 7월에는 72건 중 2건, 8월 66건 중 1건 및 9월에는 25건 중 1건에서 각각 분리되었다. 분리된 균주에 대하여 serotyping을 실시해 본 결과 병원성대장균으로 문제되고 있는 장출혈성대장균(EHEC)의 전형적인 혈청형인 O26, O111, O157은 확인되지 않았다.

문 헌

- Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11:142-201 (1998)
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature 2:123-140 (2004)
- Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology 5th ed, American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA. pp. 367-370 (1991)
- Konowalchuk J, Dickie N, Starvic S, Speirs JL. Comparative studies of five heat-labile toxic products of *Escherichia coli*. Infect Immun. 22: 644-648 (1978)
- Pai CH, Gordon R, Sims HV, Bryan LE. Sporadic causes of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7: clinical, epidemiologic and bacteriologic features. Ann. Intern. Med. 101: 738-742 (1984)
- Korea Food and Drug Administration. The General method. In: Food Code. KFSA, Seoul, Korea (2005)
- International Standards Organization (ISO). Method BS EN ISO 16654: 2001. Geneva, Switzerland (2001)
- WHO. Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC). Report of a WHO Scientific Working Group Meeting. June 23-26, Berlin, Germany, World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response, WHO/CSR/APH/98.8 (1998)
- Park CH, Kim HJ, Hixon DL, Rubert. Evaluation of the Duopath Verotoxin test for detection of shiga toxin in cultures of human stools. J. Clin. Microbiol. 41: 2650-2653 (2003)
- Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 27: 2751-2757 (1989)
- Gavin PJ, Peterson LR, Pasquariello AC, Blackburn J, Hamming MG, Kuo KJ, Thomson RB. Evaluation of performance and potential clinical impact of ProSpecT shiga toxin *Escherichia coli* microplate assay for detection of shiga toxin-producing *E. coli* in stool samples. J. Clin. Microbiol. 42: 1652-1656 (2004)
- Katherine LC, Emiline MM, Alistair WAM, Clare FA, Gary MW, Michael WP, Aart VA, Renata MCA, Jan HW, Christopher LB, David RAW, Frederick JB. Validation of three rapid screening methods for detection of Verotoxin-Producing *Escherichia coli* in foods. J. AOAC Int. 87: 68-77 (2004)
- Jay JM. Modern Food Microbiology. 6th ed. APAC, Singapore. p. 532 (2000)