

식중독균을 검출하기 위한
분자생물학적 기술

정 석 찬

(국립수의과학검역원)

식중독균을 검출하기 위한 분자생물학적 기술

정 석 찬
국립수의과학검역원

I. 서 언

식중독은 세계적으로 공중보건학적으로 매우 중요하며, 현재 약 250종 이상이 알려져 있다. 이들 원인체중 축산식품과 관련한 가장 흔한 식중독균의 병원체는 *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter coli/jejuni*, *Listeria monocytogenes*와 *Staphylococcus aureus* 등이 알려져 있다. 식중독에 감염되는 비율은 매년 전세계의 약 5~10%로 추정되며, 이들 식중독의 발생은 매년 증가할 뿐만 아니라 원인체도 다양해지고 있는 실정이다. 살모넬라 식중독은 오래 전부터 문제시되어 왔으나 리스테리아 및 대장균 O157등이 새로운 식중독 원인균으로 알려지고 있다.

거의 모든 식품, 즉 유 및 유가공품, 식육 및 식육가공품, 알 및 알가공품, 어패류, 채소류 등 다양한 식품이 식중독의 원인식품으로 알려져 있으며, 포도상구균과 같이 내열성 독소를 생성하는 균은 가열식품에서도 문제시되고 있다.

이들 식중독 원인균 및 독소의 신속 정확한 검출법은 보건위생당국뿐만 아니라 식품업체에서도 요구되고 있다. 전통적으로 식품에서의 병원성 미생물을 검출하기 위한 방법으로 증균배양, 선택배지 배양 및 생화학적 성상에 의한 최종확인 검사를 실시하고 있으며, 이러한 균분리 및 동정 방법은 수일 또는 수주일이 요구되고 있다. 1980년대 이후에 식품중 신속하고 정확한 미생물 검출을 위하여 면역학적 및 유전학적 방법이 많이 개발되어 왔다. 이러한 검출법으로 EIA kits, DNA probes, PCR techniques 및 automated identification systems 등이 상품화 되고 있다. 여기에서는 현재까지 가장 흔히 사용되고 있는 면역 및 유전학적방법에 의한 식중독균 검출기술에 관하여 소개하고자 한다.

II. 식중독균 검출 방법 비교

1960년대 이래로 식품중 미생물의 검출 및 특성검사를 위한 많은 종류의 검사법이 개발되어 왔다. 이들의 대부분은 직접 미생물을 검출하는 방법보다는 어떤 기질을 이용하여 미생물의 대사활성을 측정하거나 성장반응의 측정, 유전자나 특이 항원 등 세균의 어떤 특정 성분을 검출하거나 이들 방법을 조합한 검사법들이다. 이들 검사법은 전기전도도를 응용하는 Impedance 등의 물

Table 1. Minimum detectable levels of toxins or organisms by physical, chemical, immunological, and molecular methods of analysis

Methods	Toxin or organism	Sensitivity
Physical		
Impedence	Coliforms in meats	10 ³ /g in 6.5h
Flow cytometry	<i>S. typhimurium</i> in milk	10/ml after 6h nonselective
Microcalorimetry	<i>Sta aureus</i>	2 cells in 12~13h
Chemical		
ATP measurement	APC	10 ² /cm ² in 5min
Radiometry	Coliform in water	1~10cells in 10h
Thermostable nuclease	<i>Sta. aureus</i>	10ng/g
Limulus lysate test	G(-) endotoxins	2~6pg/ <i>E coli</i> LPS
Immunological		
Fluorescent antibody	<i>Salmonella</i>	10 ⁶ cells/ml
Radioimmunoassay	Sta. enterotoxin A~E	0.5~1ng/g in food
Immunodiffusion	Enterotoxin (<i>Cl perfringens</i>)	10ng
	(<i>Sta. aureus</i>)	10~100ng/ml
Hemagglutination	Sta. enterotoxin	1.3~4ng/ml
Latex agglutination	<i>E coli</i> LT enterotoxin	32ng/ml
ELISA	Sta. enterotoxin A~E	1ng/g
	<i>Salmonella</i>	10 ⁴ ~10 ⁵ cells/ml
	<i>E. coli</i> O157:H7	1 cell/g(beef)
	Botulinal toxin A	50~100 mouse LD ₅₀
	Aflatoxin B1	1~25pg/assay
Molecular		
PCR	<i>E coli</i>	1cell
	<i>L. monocyogenes</i>	1~10cells
	<i>C. perfringens</i>	1cfu, 2~6h
	<i>Y. enterocolitica</i>	10~30 cfu/g(meat)
	<i>C. bitulinum</i> toxin A~E	10fg(3cells)
DNA probe	<i>Cl. perfringens</i>	10cfu/g in 48h

리적인 방법(Physical), ATP 등을 측정하는 화학적인 방법(Chemical), EIA 등의 면역학적 방법(Immunological), PCR, DNA probe 등 유전학적 방법(Molecular)과 마우스 등 실험동물 또는 Vero 세포 등의 조직세포를 이용하는 생물학적인 방법(Bioassay) 등으로 대별할 수 있다(Table 1 및 2). 식중독균을 검출하기 위한 분자생물학적 기술을 이용한 방법의 개발은 주로 면역학적 및 유전

Table 2. Bioassay methods used to assess the biological activity of various food-borne pathogens and/or their products

Methods	Toxin or organism	Sensitivity/demonstration
Animal assays		
Mouse lethality	<i>L. monocytogenes</i> <i>Cl perfringens</i> A toxin	$10^5 \sim 10^6$ $1.8 \mu\text{g}(\text{LD}_{50})$
Suckling(infant) mouse	<i>E. coli</i> ST (GW/BW)	$>0.083 : \text{P}$
Diarrheagenic activity		
- Rabbit	<i>Y. enterocolitica</i>	2.9×10^8 , ID50%
- mouse	<i>Y. enterocolitica</i>	10 cells
Skin test		
- rabbit	<i>E. coli</i> LT	vascular, erythematol
- guinea pig	<i>Cl. perfringens</i> A toxin <i>Sta. aureus</i> SEB	$0.1 \sim 1.0\text{pg}$
Sereny tests(GP)	<i>Y. enterocolitica</i> heat stable toxin <i>L. monocytogenes</i> EIEC	1.5×10^{10} 10^6 cells
Ligated loop tests		
- rabbit ileal	<i>E. coli</i> LT (18h) <i>E. coli</i> ST (6h) <i>Cl. perfringens</i> A toxin	$1 \mu\text{g}$ $1 \mu\text{g}$ $6.25 \mu\text{g}$
- mouse ileal	<i>Cl. perfringens</i> A toxin	$1.0 \mu\text{g}$
Culture system		
CHO cells	<i>E. coli</i> LT <i>V. cholerae</i> toxin	Biological activity
HeLa cells	<i>E. coli</i> <i>Y. enterocolitica</i>	Invasiveness
Vero cells	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>Cl. perfringens</i> toxin	Cytotoxicity Biological activity
Y-1 adrenal cells	<i>E. coli</i> LT <i>V. cholerae</i> toxin	Biological activity Biological activity
Macrophages	<i>Y. enterocolitica</i>	Phagocytosis
Intestinal cells		
- human, GP	<i>V. parahemolyticus</i> ETEC	Adherence "

학적 방법을 많이 이용하고 있다. 그 이유는 물리 및 화학적인 방법보다 면역 유전학적인 방법이 식중독균을 직접적으로 검출하기가 용이할 뿐만 아니라 민감성과 특이성이 높기 때문이다. 아울

러 균의 최종확인이나 식중독균의 특성이나 그 특소생성을 검사하기 위해서는 생물학적인 방법이 사용되고 있으나 일반 실험실에서 수행하기가 곤란한 경우에 간접적으로 분자생물학적인 방법으로 평가하고 있다.

한편, 식중독균의 특성과 fingerprinting을 위한 방법으로는 serotyping, biotyping, antibiotic resistant pattern, phage typing, multilocus enzyme electrophoresis typing, restriction enzyme analysis, random amplification of polymorphic DNA, Pulsed Field Gel Electrophoresis, Restriction Fragment Length Polymorphism, Ribotyping 등이 사용되고 있으며, 이들 방법은 균주 간의 감별이나 역학적 추적 조사에 유용한 방법으로 알려져 있다.

Ⅲ. 스크리닝 및 최종확인 검사법

1. 스크리닝 (Screening) 검사법

스크리닝 검사법은 가검 시료중 추정 양성시료를 신속히 검출하는 방법으로 음성인 시료는 더 이상 검사할 필요성이 없다. 이 방법은 민감성이 매우 높아야 하며, 가음성반응은 거의 없어야 하지만 매우 낮은 가양성 반응은 허용하고 있다. 스크리닝 방법은 매우 신속해야 하며, 많은 수량을 검사하기 위해서 값이 싸야 한다. 이 검사법은 매우 신속한 방법으로 가능한 빠른 결과를 요구하는 유통기간이 짧은 식품의 경우 식품산업업체 등에서 사용하기에 편리하다. 게다가 스크리닝 방법은 많은 시료를 검사하는 경우에 비용면에서도 매우 효율적이다. 최근 많은 새로운 검출법으로서 EIA, antibody capture, PCR assay 등 방법이 개발되고 있다. 그러나 스크리닝 방법에서 양성으로 판정된 시료는 적절한 최종확인 시험법으로 확인하여야 한다.

□ 병원성 미생물 검출을 위한 스크리닝 검사법의 기준

Performance criteria	Percentage	검출수준
Sensitivity	≥97	≥ 3 pathogenic bacteria/gram
Specificity	≥90	
False negative rate	<2	
False positive rate	<9.6	
Efficiency	94	

2. 최종확인 검사법(Confirmation)

최종 확인 검사법은 양성시료를 최종적으로 확인하는 방법으로 많은 비용이 소요되기 때문에 스크리닝 검사법과는 달리 많은 시료를 검사하기 위해서 사용되지는 않는다. 최종확인 검사법은 비용면이나 민감성은 크게 중요하지 않다. 그러나 대상미생물에 대한 특이성은 매우 중요하다. 즉 가 양성반응(False positives)이 있어서는 아니된다. 분리배양을 위한 증균 및 선택배지가 최종확인 검사에 유용하게 사용된다(Table 3). 한편 최종확인 동정을 위한 생화학적 검사 키트나 시스템은 유용하며, 이들은 일반적으로 동시에 10~20종류 이상의 생화학적 검사를 실시하며, 기존의 방법과 비교할 때 약 90~99%의 정확성을 나타낸다. 이들 시스템은 기존방법에 비하여 효율적이

Table 3. Enrichment and selective medium for culture method

Organism	Enrichment meidum	Selective Medium	Supplement
<i>E. coli</i> O157:H7	mEC(n) mTSB(n)	Sorbitol MacConkey agar	novobiocin vancomycin cefixime pot. tellurite
<i>Salmonella</i> spp.	Selenite systine broth Tetrathionate broth Rappaport-Vassiliadis medium	XLD HE BS	
<i>Listeria</i> spp.	LEB Fraser broth PALCAM broth	Oxford agar LPM agar	acriflavin cychloheximide colistin sulfate cefotetan fosfomycin
<i>Sta aureus</i>	-	Baird Parker agar	
<i>Campylobacter</i> spp.	CEB	Campy. blood free agar Campy cefex agar	vancomycin polymyxin B trimethoprim

며, 사용하기 간편하고 비용면에서도 경제적이다.

IV. 면역학적 검출법

면역학적인 방법은 현재 병원성 미생물 및 독소 검출을 위한 스크리닝 방법으로 가장 널리 사용되고 있으며, 이중 96well plate를 이용한 EIA(Enzyme Immunoassay)방법이 가장 널리 사용된다. EIA방법은 다른 방법에 비해 가격이 싸고, 신속하며, 안전하다는 장점이 있으며, 또한 특별히 숙련된 기술을 필요로 하지 않는 손쉬운 방법이다. 그러나 이 방법의 특이성과 민감성은 반드시 표준방법과 비교 평가되어야 한다.

최근에 항체를 이용하여 항원을 포획(Capture)하기 위한 방법으로 면역포획법(immunocapture)이 개발되고 있으며 일반적으로 *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli* O157:H7 등의 병원체를 포획하기 위하여 특정항체를 membrane, plastic bead or stick에 코팅하는 immuno-chromatography 등의 방법을 이용하고 있다. 이 방법은 민감도를 EIA방법으로 검출할 수 있는 수준까지 증가시키는 문제점이 앞으로 해야할 과제의 하나이다.

현재까지 ELISA법으로 대장균 O157균 등을 검사하는 각종 EIA방법이 개발되어 있고, 이외 최근에는 Immunomagnetic bead를 이용한 검출방법이 민감성이 높은 것으로 알려져 있어 이를 이용한 균분리방법이 유용한 검출법으로 검토되고 있다.

현재 *Salmonella*등을 검출하기 위한 면역학적인 방법으로 Fluorogenic and Colorimetric enzyme immunoassay를 이용하는 방법으로는 TECRA visual immunoassay(Bioenterprises Pty Ltd.), *Salm-*

Table 4. Immunoassays for screening the pathogenic bacteria in foods

Organism	Trade name	Assay	Manufacturer	AOAC official method
<i>E. coli</i> O157:H7	VIP	Immunoprecipitate	Biocontrol systems, Inc.	996.09
	Assurance	EIA	"	996.10
<i>Salmonella</i>	Salmonella Tek	EIA	Organon Teknika Corp.	993.08
	TECRA	EIA	Bioenterprise Pty. Ltd.	989.14
	Assurance	EIA	Biocontrol systems, Inc.	992.11
	VIDAS(SLM)	EIA	BioMerieux Vitek, Inc.	996.08
	Q-Trol	EIA	Dynatech Lab. Inc.	989.15
	1~2 test	Immunodifusion	Biocontrol systems, Inc.	989.13
<i>Listeria</i>	Listeria TEK	EIA	Organon Teknika Corp.	994.03
	TECRA(TLVIA)	EIA	Bioenterprise Pty. Ltd.	995.22
	Assurance	EIA	Biocontrol systems, Inc.	996.14
<i>Sta. aureus</i>	Tecra SET kit	EIA	TECRA diagnostics	993.06
	Aureus test kit (Trisum Corp.)	Latex agglutination	Trisum Corp.	995.12

onella-Tek(Organon Teknika Corp.), *Listeria*-Tek, Tecra-*Listeria* kits, Assurance *Salmonella* EIA kit (Biocontrol systems Inc.), Automated conductance(Mathus system)등이 있으며, 이외에도 Q-Trol *Salmonella* Detection kit (Dynatech Laboratories Inc.) Immunodifusion(Biocontrol 1~2 test), VIDAS(bioMerieux), PCR(polymerase chain reaction)등의 방법이 알려져 있다(Table 4).

1. 효소면역기법(Visual immunoassay)

스크리닝용 *E. coli* O157 키트를 이용한 효소면역기법은 과정은 그림 1과 같다.

2. 면역크로마토그래피 기법(Immunochromatographic method)

1) 원 리

Gold비드에 항체를 부착시켜 항원을 검출하는 방법을 응용한 기법으로서 Immunochromatographic technique에 의한 신속검출방법이다. 시료의 빠른 스크리닝을 위해 고안되었으며 양성일 경우에는 Membrane상에서 육안으로 band를 확인할 수 있어 손쉽게 사용할 수 있다.

Dip-stick kit는 sample pad, conjugate pad, nitrocellulose membrane, absorbent pad, backing card로 구성되어 있으며, Conjugate pad는 *E. coli* O157 antibody가 부착된 colloidal gold가 뿌려져 있다. 따라서 sample pad에 시료를 적하하면 모세관이동현상으로 conjugate pad에 뿌려져 있는 immuno-gold particles이 nitrocellulose membrane으로 이동하며, test line과 control line에 항원항체 반응이 일어난다. Absorbent pad는 여분의 시료액을 빨아들이는 역할을 한다(그림 2).

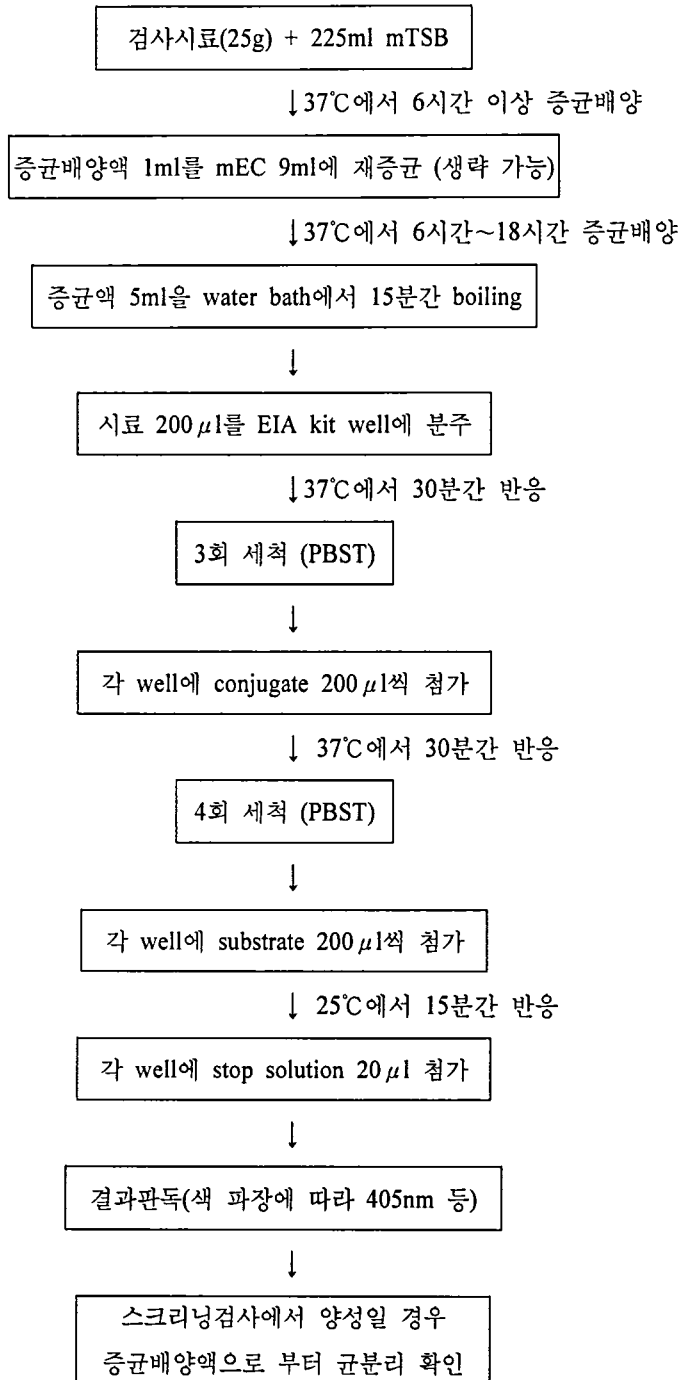


그림 1. 효소면역기법 과정

2) 방 법

검사시료 수만큼의 키트를 구입하고(개봉후 2시간 이내에 사용), 시료를 약 6~18시간동안

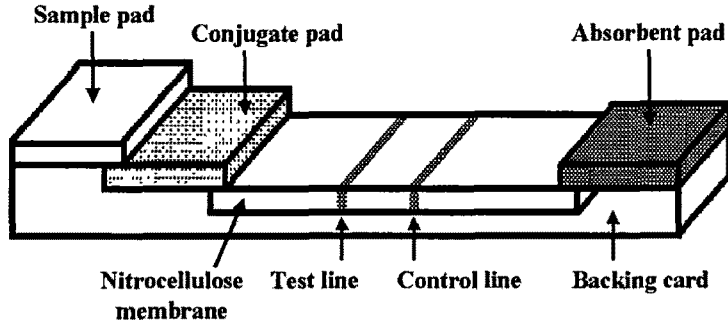


그림 2. 면역크로마토그래피 기법

충분히 증균시킨후 증균배양액 약 100 μ l를 키트의 reaction window에 떨어뜨려 흡인시킨 다음 약 5~10분후에 결과를 육안적으로 판독한다.

3) 판 독

Control area(C)와 test area(T)에 모두 Gold색(pink-purple line)이 형성된 경우에 양성으로 판정하고, Control area(C)에만 Gold색이 형성된 경우는 음성으로 판독한다. Control area(C)에 line이 형성되지 않은 경우는 키트가 잘못된 것으로 판정한다.

4) 특 성

이 기법의 일반적인 검출한계는 약 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ CFU/ml 정도로 낮은 편이나 누구나 손쉽게 그리고 빠른 시간내에 스크리닝할 수 있는 장점이 있다. 키트에 따라서는 민감성 99.9%, 특이성 99.4%등으로 보고되고 있으나 실제적으로는 민감성 및 특이성이 낮은 것으로 알려져 있어 이에 대해서는 스크리닝 검사법을 사용하는 데 충분히 고려되어야 할 것이다.

3. 면역자기분리법(Immunomagnetic separation)

1) Dynabeads란?

자력을 띤 물질인 Dynabeads는 Dynal사(노르웨이)에 의해 특허되어 있으며 이 Beads는 자기물질(Fe_2O_3 , Fe_3O_4)로 구성되어 있어 강력한 자력을 가지고 여러 종류의 분자물질이 부착할 수 있다. 이 Bead의 크기(4.5 μ m 및 2.5 μ m)나 형태(구형)가 일정하여 물리 및 화학적으로 동질성의 특성을 가지며 분자물질이 신속하게 부착(대부분 10분이내 반응)하며, 높은 반복성을 가진다.

2) 면역자기분리법의 특성

시료(고기, 분변 등)에서 병원성 세균을 분리하기 위해서는 선택적인 증균배양을 하더라도 배양액 중에는 여러 종류의 세균이 혼합되어 있어 분리하고자 하는 병원성 세균의 수가 적을 경우에 기존의 분리방법으로는 순수분리하기 매우 어려움이 있다. 병원성 미생물의 분리를 위한 민감

도를 증가시키기 위해서는 혼합되어 있는 다른 여러 종류의 미생물을 제거하고 순수한 병원성 미생물만을 분리하는 기법이 필요하다.

대장균 O157를 예를 들면 철(Fe)성분이 있는 Dynabeads에 대장균 O157특이항체를 코팅한 검출키트는 증균배양액중의 대장균 O157균과 반응하고 자석을 이용하여 다른 미생물들은 쉽게 제거할 수가 있다. 이 bead와 결합한 항원(대장균 O157균)은 순수하고 살아 있으며, 또한 변형되지 않으므로 배지에 배양하게 되면 기존의 균분리방법보다 순수분리하기가 매우 쉽다.

3) 시험방법

대장균 O157 키트를 예로서 설명하면 다음과 같다.

(1) 증균배양

채취한 시료액 25 ml(g)를 mEC broth(novobiocin 20 µg/ml) 또는 mTSB배지(novobiocin(20 µg/ml), 또는 EEB(Cefixime 0.05 µg/ml, Cefsulodin 10 µg/ml, Vancomycin 8 µg/ml) 225 ml에 37°C 또는 42°C에서 6시간~24시간 증균배양한다. 균 검출효율을 증진시키기 위하여 동일한 배지를 사용하여 2회 연속 증균배양을 실시할 수 있다.

(2) 원심 및 여과

증균배양액 1ml를 원심튜브에 옮겨 약 1,000rpm에서 2분간 원심하여 시료 부유액을 제거하고 상청액을 여과지(10~25 µm)를 이용하여 불순물을 제거한다.

(3) IMS키트 반응

여과액 1ml에 IMS 비드(대장균 O157항체가 코팅된 면역자기비드: Dynal사)를 20 µl 첨가하여 실온에서 10분~30분간 반응시킨다.

(4) 세척

비드와 반응한 액을 자석을 이용하여 부착시키고 나머지 액을 피펫으로 제거한다. 세척액(PB-ST20) 1 ml로 부유하여 5분간 2회~3회 세척한다.

(5) 균분리 및 동정

비드와 반응한 세척액을 Cefixime (0.05 µg/ml) 및 Potassium tellurite(2.5 µg/ml)가 첨가된 Mac-Conkey sorbitol agar 또는 Fluorocult *E. coli* O157 medium에 직접 접종하거나 또는 적절히 희석 ($10^2 \sim 10^3$)한 다음 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 다음 표준분리배양법과 동일하게 동정한다.

V. 유전학적 검출법

1. Gene Probes

유전자 Probe를 이용한 검출법은 최근 약 10년 동안에 *Salmonella*와 같은 병원체의 검출을 위

Table 5. Gene probes used to detect pathogenic bacteria in foods

Bacteria	Trade name	Assay format	Target	AOAC official method
<i>E. coli</i>	-	Isotopic	LT	984.34
	-	"	enterotoxigenic	986.34
<i>Salmonella</i> spp.	GENE-TRAK	Colorimetric		-
	GENE-TRAK	Isotopic	rRNA	987.10
	"	Colorimetric	rRNA	990.13
<i>Listeria</i> spp.	GENE-TRAK	Colorimetric	rRNA	993.09
<i>Sta. aureus</i>	GENE-TRAK	Colorimetric		-

한 방법으로 개발되어져 왔다. 유전자 probes를 이용한 검출법은 특이성은 매우 높으나 면역학적 인 방법에 비하여 고도의 기술과 복잡한 단점이 있고, 또한 많은 가검물을 처리하기에는 불가능 하며, 많은 시료를 스크리닝하는 데 소요되는 노동력을 고려할 때 많은 경제적 비용이 소요된다. 또한 유전자 Probe법은 검사하기 전에 선택 증균과정을 동일하게 요구하기 때문에 다른 방법에 비하여 신속한 방법이라 할 수 없다.

E. coli O157:H7을 포함하여 모든 verotoxin-산생 *E. coli*를 특이적으로 탐지할 수 있는 유전자 probe 방법이 유용한 것으로 알려져 있고, 또한 *E. coli* (O157:H7)가 전형적으로 보유하고 있는 60MDa plasmid로부터 DNA probe를 개발한 바 있다. 이 Probe는 *E. coli* O157:H7 분리주의 약 99%가 결합한다. 그리고 리스테리아균을 신속히 검출하는 유전학적 방법으로는 Nucleic acid hybridization assay법을 이용한 nonradioactive DNA probe kits, 살모넬라균의 검출을 위한 DNA hybridization(Gene-Trak) 등이 있다(Table 5).

2. PCR

PCR 기술은 식품검사 실험실에서 사용할 수 있는 정확하고 신속한 방법으로 제시되어 왔다. 이 기법은 매우 특이적이고 최종확인을 위한 방법으로 적절한 것으로 알려져 있다. 그러나 산업 체에서의 많은 시료를 처리하는 신속 스크리닝 검사법으로는 적절하지 않다. 비록 PCR방법이 우수할지라도 때로는 대상 미생물을 증균하는 과정이 필요하며, 이런면에서는 면역학적 검출방법 보다는 신속한 수단은 아니다. 이 기법은 식품중에 1개 이상의 미생물이 존재할 경우에 검출할 수 있는 방법이지만 숙련된 기술이 필요하며, 시료에 교차오염이 없는 매우 높은 수준의 실험환경을 요구하고 있다. 또한 이 방법은 살아있는 미생물과 죽어있는 미생물을 구분할 수 없는 단점이 있다.

PCR 응용한 기법으로 Multiplex PCR법을 이용하여 EHEC (Enterohaemorrhagic *E. coli*)를 검출하는 것이 유용한 것으로 보고되어 있다. 이 PCR방법은 1회의 PCR 수행으로 여러 가지 유전자를 동시에 검출하기 때문에 모든 EHEC균을 검출할 수 있을 뿐만 아니라 균의 특성별로 감별할 수 있는 방법이다. 즉 이 방법은 한종류의 균내 여러 가지 다른 특신이나 병원성 인자를 동시에 검출할 수 있다(Table 6).

Table 6. PCR primers for detection of pathogenic bacteria in foods

균종	Primer	염기서열('5 to '3)	증폭유전자 크기(bp)	Tm(°C)
<i>E. coli</i> O157:H7	<i>uidA</i>	GCGAAACTGTGGAATTGGG TGATGCTCCATCACTCCTG	250	64
	<i>slt I</i>	CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG CACCAGACAATGTAACCGCTG	348	64
	<i>slt II</i>	ATCCTATTCGCCGGAGTTTACG GCGTCATCGTATACACAGGAGC	587	64
	<i>eaeA</i>	CAGGTCGTCGTGTCTGCTAAA TCAGCGTGGTTGGATCAACCT	1,087	64
	<i>hlyA</i>	GTAGGGAAGCGAACAGAG AAGCTCCGTGTGCCGAA	361	
<i>E. coli</i> (Toxin)	ST	CAGACTATCAGTCAGAGGTTG TTCATACTGATTGCGCA	383	55
	STI	TTAATAGCACCCGGTACAAGCAGG CTTGACTCTTCAAAGAGAAAATTAC	140	
	STIa	GATTACAACAAAGTTCACAGCAGT ATTACATTAGAGACTAAAAAGTGTGAT	103	
	STIb	GATTACAACAAAGTTCACAGCAGT ATCACACTAGAATCAAAAAATGTAAC	103	
	LT(1)	TAGTCAGTCAACTGAATCAC ATAACATCCAGCACAGGCAGG	163	50
	LT(2)	GAGACCGGTATTACAGAAATC GAGGTGCATGATGAATCCAG	117	
	LTIIa(p)	TCTCTATATGCACACGGAGC CCATACTGATTGCCGCAAT	322	
	LTIIb(h)	TCTCTATGTGCATACGGAGC CCATACTGATTGCCGCAAT	322	
	SLT-I	CAGTTAATGTGGTGGCGAAG CTGCTAATAGTTCTGCGCATC	895	
	SLT-II	CTTCGGTATCCTATTCCCGG GGATGCATCTCTGGTCATTG	479	
<i>E. coli</i>	<i>malB</i>	GACCTCGGTTTAGTTCACAGA CACACGCTGACGCTGACCA	585	
Coliform	<i>lacZ</i>	ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC GGTTTATGCAGCAACGAGACGTCA	326	50
	<i>lamB</i>	CTGATCGAATGGCTGCCAGGCTCC CAACCAGACGATAGTTATCACGCA	309	
	<i>uidA</i> (1)	AAAACGGCAAGAAAAAGCAG ACGCGTGGTACAGTCTTGCG	147	
	<i>uidA</i> (2)	TATGGAATTCGCCGATTTT TGTTTGCTCCCTGCTGCGG	166	
<i>Campylobacter</i>	16S rRNA	GGCTGATCTACGATTACTAGCGAT GCGCATTAGATACCCTAGTAGTCC	390	52

Table 6. continued

군종	Primer	염기서열(5' to 3')	증폭유전자 크기(bp)	Tm(°C)
<i>Salmonella</i> genus	NK	CAGTGGTGTTCATATCATTGCC GTAAGAAGGTGCTTATACATCTGC	284	55
	<i>invA</i>	TATCGCCACGTTTCGGGCAA TCGCACCGTCAAAGGAACC	275	50
	<i>invA</i>	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284	
	replicon	TTATTAGGATCGCGCCAGGC AAAGAATAACCGTTGTTCAC	163	
	<i>agfA</i>	TCCGGCCCCGGACTCAACG CAGCGCGGCGTTATACCG	261	
<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>spvA</i>	GCAGACATTATCAGTCTTCAGG TCAGGTTCTGTGCCATTGTCAA	351	64
<i>Salmonella</i> group A,D	<i>rfbS</i>	TCACGACTTACATCCTAC CTGCTATATCAGCACAAAC	721	50
<i>Salmonella</i> group B	<i>rfbJ</i> (B1)	GCGATGACCTTTTTGAAAG TAACCGTTTCAGTAGTTC	903	55
	<i>rfbJ</i> (B2)	AGAATATGTAATTGTGACG TAACCGTTTCAGTAGTTC	882	50
<i>Salmonella</i> group C1	<i>rfbM</i>	CAGGAAAATGATTACACCAAT TAATTACGACCATACTTATCTG	1,422	57
<i>Salmonella</i> group C2	<i>rfbJ</i> (C2)	ATGCTTGATGTGAATAAG CTAATCGAGTCAAGAAAAG	820	50
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>ima</i>	AACAAGTCTAACTGTAAAC ACTATAGTCAGCTACAATTG	257	55
	<i>mal</i>	CAGGCTCATTTCACTATGACG TGCTTCTTATTCGCCCCATCTC	1,117	55
	<i>hyl</i>	CGGAGGTTCCGCAAAAGATG CCTCCAGAGTGATCGATGTT	234	50
	<i>iap</i>	CAAACGTCTAACACAGCTACT GCACTTGAATTGCTGTTATTG	360~460	
<i>Listeria</i> spp.	16SrRNA	CTCCATAAAGGTGACCCT CAGCMGCCGCGGTAATWC	938	
<i>Sta. aureus</i>	enterotoxin A	TTGGAAACGGTTAAAAACGAA GAACCTTCCCATCAAAAACA	121	50
	enterotoxin B	TCGCATCAAACGACAAAACG GCAGGTA CTATAAGTGCC	477	55
	enterotoxin C	GACATAAAAGCTAGGAATTT AAATCGGATTAACATTATCC	257	50
	enterotoxin D	CTAGTTTGGTAATATCTCCT TAATGCTATATCTTATAGGG	318	50
	enterotoxin E	TAGATAAAGTTAAAACAAGC TAACCTACCGTGGACCCTTC	169	55
	TSST	ATGGCAGCATCAGCTTGATA TTTCCAATAACCACCCGTTT	350	55

3. 기타 검사법

살모넬라를 검출하기 위한 간접적인 여러 가지 방법이 AOAC에 의해 공인되어 있다. 그 AOAC 공인방법으로는 Hydrophobic grid membrane filter(ISO-GRID), 또한 분리균에 대한 생화학적 검사 kit로는 GNI card를 이용한 Vitek system(bioMerieux), API 20E(bioMerieux), enterotube II(Roche Diagnostics system), Enterobacteriaceae II set(Becton Dickinson Microbiology

Table 7. Biochemical identification kits and systems for identifying foodborne pathogens

Trade name	Microorganism	Assay	Manufacturer	AOAC official method
API-20E	<i>Salmonella</i>	Biochemical method	BioMerieux Vitek, Inc.	99 8.24
Enterotube II	"	"	Hoffmann-LaRoche, Inc.	"
Enterobac. II	"	"	Becton Dickinson microbiology systems	"
Micro ID	Enteric bacteria	Biochemical method	Organon Teknika Corp.	98 9.12
Vitek-GNI	"	"	BioMerieux Vitek, Inc.	99 1.13
Malthus	<i>Salmonella</i>	Conductance	Malthus instruments Ltd.	99 1.38
Micro-ID	<i>Listeria</i>	Biochemical method	Organon Teknika Corp.	99 2.18
Vitek GPI	"	"	BioMerieux Vitek, Inc.	99 2.19
Quantum II		"	Abbott Diagnostic	-
MIS		Fatty acid profile	Microbial ID, Inc.	-

Table 8. Other methods for detection of pathogenic bacteria and toxin

Bacteria	Trade name	Assay format	Target	AOAC official method
<i>E. coli</i>	-	Fluorogenic	Glucuronidase	98 8.19
	-	Invasiveness of HeLa cell	Enterotoxigenic	98 2.36
	-	Y-1 adrenal cell and suckling mouse assay	LT/ST	98 4.35
	Petrifilm(3M)	Plate count		99 1.14
	ColiComplete (Biocontrol)	Substrate supporting Disc		99 2.30
	ISO-GRID (QA life sci.)	HGMF		98 3.25
<i>Sta aureus</i>	-	Microslide gel double diffusion test	Enterotoxin	97 6.31
<i>Salmonella</i>	-	FA		97 5.54
	ISO-GRID (QA life sci.)	HGMF		91 1.12

system), Micro-ID등이 유용하게 사용되고 있다(Table 7, 8).

라텍스응집반응 키트는 분리된 균의 확인을 위해 사용되는 가장 흔히 사용되는 방법중의 하나이다. 이러한 키트에서 사용하는 항체는 EIA 스크리닝 키트의 항체보다는 특이성이 낮을지라도 교차반응이나 가양성반응의 위험을 최소화한 것이며, 비교적 사용하기는 편리하지만 특이성은 유전학적인 방법보다는 낮다.

VI. 결 론

식품내에서 병원체나 다른 미생물 오염의 신속한 검출은 소비자의 안전성 확보를 위하여 매우 중요하다. 식중독균의 확인을 위한 기존의 방법은 많은 종류의 생화학적인 검사를 수행하는 균분리 배양법을 사용하고 있다. 최근 분자생물학적기술의 발달로 기존의 방법에 비하여 보다 빠르고, 편리하고, 민감하며, 특이적인 방법들이 개발되고 있다. 식품이나 환경시료 중에서 병원체나 특신의 검출을 위한 보다 적절한 방법을 선택하는데 있어서 그 사용방법의 비용, 품질, 반복성, 속도와 평가를 고려하여야 한다.

일반적으로 immunoassays가 식품이나 환경시료에서의 정기적인 스크리닝 검사를 위해서 비용 및 효율성 면에서 가장 적절한 방법으로 알려져 있다. 병원성과 비병원성 종류를 신속히 감별하고 특이성이 높은 방법으로는 multiplex PCR법이 유용한 것으로 평가된다. 그러나 스크리닝 검사법들의 가양성반응율이 약 3~10%로 나타날 수 있기 때문에 스크리닝검사법에 의해 나타난 양성시료는 반드시 표준 분리 배양법에 의해 최종 확인되어야 한다.

식중독을 효율적으로 예방하기 위하여 병원성 미생물에 대한 위생지침서가 확립되어야 하고 또한 HACCP 시스템이 식품생산 전반에 적용되어야 한다.

VII. 참고문헌

1. Food and Drug Administration, 1996, Bacteriological Analytical Manual, 16th ed., AOAC international.
2. Marshall, R.T. Standard methods for the examination of dairy products. American public health association, Port City Press, Baltimore. 1993.
3. Beran, G. W. Steele, J. H., 1994, Handbook of Zoonoses : *E. coli* O157:H7 as a food borne pathogen, 2nd ed., CRC press, pp 331-341.
4. O'Brien, A.D. and Holmes, R.K. 1987. Shiga and Shiga-like toxins, Microbiol. Reviews, 51: 206-220.
5. Karmali, M.A., 1989, Infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Reviews, 2:15-38.
6. Advisory Committee on the Microbiological Safety on Food. 1995. Report on Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. pp. 1-148.
7. United States Department of Agriculture, 1995, National Forum on Animal Production Food

Safety, pp 1-180.

8. WHO, 1997, Prevention and control of Enterohemorrhagic *E. coli*(EHEC) infections. pp. 1-42.
9. FSIS, 1996, Pathogen reduction ; Hazard Anaysis and Critical Control Point(HACCP) systems; final rule.
10. Jones, D.D. and Bej, A.K. PCR technology current innovation : Detection of foodborne microbial pathogens using polymerase chain reaction methods. CRC press, p 341-365, 1994.
11. James M.J. 1996, Modern Food Microbiology, CIP press, p195-268.