

병원성 대장균 감염증의 특성 및 예방대책

정 병 열

수의과학연구소 세균과 연구사

1 병원성 대장균

병원성 대장균은 독소, 부착인자의 생산 능력, 임상증상 등을 기초로 하여 장관 병원성 대장균(EPEC), 장관독소원성 대장균(ETEC), 장관침입성 대장균(EIEC), 장관출혈성 대장균(EHEC) 등 4가지 주요균으로 분류한다.

우리나라에서는 가장 흔히 발생하는 대장균성 식중독은 장관독소원성 대장균이며, 최근 미국이나 일본에서 문제시되고 있는 장관출혈성 대장균 식중독의 주요 원인 혈청형은 E. coli O₁₅₇:H₇이며, 이외에도 O₂₆:H₇, O₁₁₁:H₈ 등이 알려져 있다.

대장균 O₁₅₇:H₇은 하나 또는 2가지의 s-higalike toxin(SLT)을 산생하는 것으로 알려져 있다.

사람유래의 균주들은 SLT-I과 SLT-II를 산생하며, 특히 SLT-II만을 산생하는 균주들이 많고 단지 SLT-I만을 산생하는 균주는 거의 없는 것으로 알려져 있다.

2 역학

가. 발생

SLT를 산생하는 E. coli는 사람에게 강한 병원성을 나타내는 병원체로서 1982년 미국에서 E. coli O₁₅₇:H₇에 의한 식중독

이 보고되면서 최근 증가되고 있다.

E. coli O₁₅₇:H₇의 사람에 대한 감염은 전세계적으로 광범위하며 북미, 유럽, 아프리카, 동아시아, 호주 등 다수의 국가에서 보고되었고, 북미, 아르헨티나, 영국에서 호발하고 있다.

1982-1987사이에 미국과 캐나다에서 E. coli O₁₅₇:H₇에 의하여 396명의 환자를 포함하여 20여건의 발생이 있었다.

E. coli O₁₅₇:H₇ 감염 환자의 15 - 36% (미국) 및 39%(영국)가 출혈성 설사를 일으켰다.

일본의 경우 1991년부터 1995년사이에 465건의 감염 예가 보고되었고, 최근 1996년 6월부터 8월까지 10,000여명의 환자가 발생하여 10명이 사망한 것으로 알려졌다.

용혈성 빈혈과 용혈성 요독증후군을 나타내는 계층은 5세이하의 어린이와 면역이 저하된 사람이나 노인의 경우가 대부분인 반면, 동물에서는 이러한 증상이 없다. 대부분의 식중독 발생 예는 더운 여름기간인 7 - 9월에 가장 많았다.

나. 감염원

사람에서 병원성 대장균 O₁₅₇의 발생 대부분은 같은 쇠고기(ground beef)를 먹고 유발되었으며, 몇몇 감염은 생유,

수영장 물, 마요네즈, 사과쥬스, 야채 등에 의해서도 발생되었다. 균분리는 주로 송아지, 치녀소 또는 젖소, 특히 어린 동물이나 비육우에서 분리된다. 감염된 송아지는 간혹 경미한 설사를 나타낼 수도 있지만 대부분의 경우에서 임상증상을 나타내지 않는다. 또한 *E. coli* O₁₅₇:H₇은 가금류에도 감염할 수 있으며, 예컨대 닭의 분변이나 칠면조 등에서 균이 확인되기도 하지만, 사람의 병원성 대장균 O₁₅₇감염은 주로 같은 쇠고기를 섭취한 후 유발되었기 때문에 도축과정 및 처리과정의 오염이 문제시된다.

3 독소의 유전적 특성 및 작용기전

*E. coli*의 SLT에 관한 초기연구는 EPEC에 주로 초점이 맞추어졌다. 일부 EPEC는 독소를 산생하는데 이는 HeLa cell에 세포독성이 있고 토끼 항독소에 중화되는 독소이다. 1982년 SLT에 특이적인 항체가 개발되었고, Vero cell에 치명적인 독소이기 때문에 Verotoxin(VT)이라고 명명되기도 한다.

1983년에는 ETEC도 또한 SLT를 산생하는 것으로 보고되었고 이후 2종류의 verotoxin이 보고되어 각각 VT1, VT2 또는 SLT-I, SLT-II로 불려진다.

EPEC 및 EHEC에서 SLT-I operon의 구조 및 발현 모델이 개발되었다.

독소중 A subunit는 A1, A2 등 다시 2부분으로 구성되어 있다.

A1의 아미오말단은 효소활성능을 가지고 있으며, A2의 카복실말단은 B subunit와 함께 A1에 연결되어 있다.

B subunit의 기능은 SLT가 당지질 수용체에 결합하도록 해준다.

Globotriosylceramid(Gb3)는 SLT-I과 SLT-II에 대한 수용체로서 사람신장 피질에 풍부하다.

SLT-I의 A, B subunit의 분자량을 염기서열에 근거하여 계측하면 각각 33, 135Da과 7,187Da이고 *E. coli* O₁₅₇:H₇로부터 정제된 SLT-I의 A, B subunit는 각각 35,000Da, 10,700Da이다. 최근 SLT-II변이주가 확인되고 있으며, 이 변이대장균은 SLT-II_v (SLT-II_vp)를 산생하며, 돼지 부종병에 관여하는 것으로 알려지고 있다.

SLT-I과 SLT-II는 면역학적으로 상이한데도 불구하고 생물화적인 성질은 유사하다.

즉 이들은 60S ribosomal subunit에 tRNA의 aminoacyl binding에 관여하는 longation factor I(EF-I)를 억제함으로써 단백질 합성을 막는다. 장관 세포에 부착하는 능력은 *E. coli* O₁₅₇:H₇의 병원성 발취에 있어서 중요한 요소이며, *E. coli* O₁₅₇:H₇은 장벽세포를 침투하지는 못하고 다만 장벽세포에 부착하여 SLT 등을 산생하여 장용모세포를 박리시켜 출혈과 설사를 유발한다.

4 동물감염

E. coli O₁₅₇:H₇의 정확한 보균동물은 알려져 있지 않으나, 다른 대장균 감염증과는 달리 동물에서는 거의 자연 발생보고가 없다. 포유중 토끼, 2주령 기니픽, 3주령 쥐, 어린 원숭이에 *E. coli* O₁₅₇:H₇을 인공접종한 후 비혈액성설사 (nonbloody diarrhea)를 유발한 경우가 있으며, 신생자돈 구강으로 10¹¹개를 접종하여 식욕결핍, lethargy (기면;嗜眠), 수양성 설사를 유발시켰다. 그러나 토끼, 어린돼지, 실험동물의 인공감염 예에서는 사람에게서 나타나는 용혈성 요독증후군 및 출혈성 결장염의 증상은 나타나지 않았다. SLT를 위내로 주입한 토끼에서의 병변은 *E. coli* O₁₅₇:H₇에 의한 병변과 유사하며 crypts의 세포분열 활

성, 주로 중위와 원위 결장의 고유층과 상피에 호중구의 침윤을 특징으로 한다. 이러한 E. coli O₁₅₇:H₇은 결장의 장표면과 관련 유입파조직에 나타나 세포내나 다른 조직의 내부에서는 나타나지 않는다. 실험적으로 감염시킨 새끼돼지는 맹장과 결장의 미세용모세포의 소멸과 상피세포의 비틀림, 회장상피세포의 미란을 동반한 완전괴사나 상피세포변성 등 다양한 병변을 보인다. 무균돼지(Gnotobiotic piglets)는 SLT-II에 따른 뇌병변이 부종병 돼지에서와 유사하게 나타난다. E. coli O₁₅₇:H₇을 실험용 쥐에 주사하면 결장과 신장에 병변을 나타내고, 신장의 병변은 박피된 신세뇨관의 축적과 근위곡세뇨관 세포의 비정상 공포형성으로 나타난다.

5 인체감염

가. 전파

E. coli O₁₅₇:H₇ 감염은 오염된 축산물 섭취 뿐만 아니라 사람과 사람사이 및 물 등의 환경으로부터 전파가 가능하다. 주된 전파 경로는 불완전하게 조리된 갈은 쇠고기의 섭취이며, 멸균되지 않은 우유가 유아에서 출혈성 대장염을 일으켰다는 보고가 있다.

미국에서 출혈성 대장염의 발생의 몇몇 예는 E. coli O₁₅₇:H₇에 오염된 물에 의해 유발되었으며, 다른 E. coli와 마찬가지로 E. coli O₁₅₇:H₇도 소 분변에 오염된 물(목장, 도축장, 하수)에서 발견되기도 한다.

나. 임상형

사람에서의 병원성은 출혈성대장염, 용혈성 요독 증후군, 혈전성 혈소판 감소성 자반병 등 3가지 병형으로 분류된다.

1 출혈성 대장염(Hemorrhagic Colitis :HC)

E. coli O₁₅₇:H₇에 의해 발생하는 출혈성

대장염은 복벽경련, 혈변, 장점막 부종으로 특징지어지는 독소에 의한 감염이다. 그러나, 다른 세균성 식중독과는 달리 발열은 거의 없다. 증상은 24시간이내에 수양성 설사로 시작하고 혈액성 설사가 2 - 4일동안 지속되고, 보통 2 - 9일후에 임상증상은 사라진다.

2 용혈성 요독 증후군

(Hemorrhagic Uremic Syndrome: HUS)

HUS는 주로 유아나 면역이 저하된 사람, 종종 여자에게서 일어나는 E. coli O₁₅₇:H₇의 중증의 합병증이다.

출혈성 대장염 후에 신장에 독소가 침투하여 급성의 신장 장애를 일으킨다.

이는 미세혈관의 출혈로 인한 빈혈과 합병작용으로 혈소판 감소증이 일어난다. 일반적으로 환자는 심각한 상태가 되고, 투석이 필요하다. 신장내피세포는 SLT에 의해 상처를 받아 신장과 다른 장기에서 미세혈소판의 응집이 나타난다.

3 혈전성 혈소판 감소성 자반병

(Thrombotic Thrombocytopenic Purpura:TTP)

성인 환자에서의 합병증은 중추신경계통을 포함하는 TTP이다. 증상은 미세혈관 출혈성 빈혈, 혈소판 감소증, 열, 신경이상 등이 나타난다. 뇌에서 혈액응고가 나타나고, 종종 사망에 이른다.

증상의 발현동안에 trimethoprim-sulfamethoxazole 이나 gentamicin 으로 치료했을 때는 더욱 위험할 수 있다. 이들 항생제는 verotoxin 산생 대장균은 죽이나, 독소를 불활화시키지 않고 오히려 유리시키기 때문이다.

4 기타 감염

급성 유아 사망 증후군(Sudden Infant Death Syndrome : SIDS)으로 죽은 46명의 유아에 대한 연구에서 SLT를 생산하는 대장균은 모든 임상예에서 존재

하였으나, 건강한 24명의 유아는 SLT를 생산하는 대장균이 존재하지 않았다. 이 결과는 SLT생산 E. coli는 SIDS의 원인중 하나임을 시사해 준다.

또한 E. coli O₁₅₇:H₇ 감염후의 흔치 않은 복합증으로 출혈성 방광염, 귀두염, 경련증 등이 나타날 수 있다.

6 진단

E. coli O₁₅₇:H₇는 sorbitol을 분해시키지 않기 때문에 MacConkey sorbitol agar를 이용하여 분리한다.

E. coli O₁₅₇:H₇는 다른 대장균과는 다르게 β-D -glucuronidase 활성을 띠지 않으므로 MUG 시험도 유용한 방법이다. 아울러 E. coli O₁₅₇:H₇은 44.5℃에서 자라지 않으며, 일반 대장균과 차이점 중의 하나인 enterohemolysin을 산생하는 특성이 있다.

가. 혈청학적 진단

E. coli는 균체항원(O, 171종), pilli항원(K, 80종), 편모항원(H, 56종) 등이 서로 복잡하게 연관되어 약 9000여종 이상이 알려져 있어서 혈청학적인 분석이 수월하지는 않다. 시험균은 반드시 멸균생리식염수로 smoothness에 대해 실험하여야한다. 즉 저장되었던 일부균들은 rough상태일 수 있으므로 혈청학적인 시험은 반드시 smooth colony로 시험하여야 한다.

혈청학적 검사시 반드시 양성 및 음성 대조균주로 비교실험해야 하며, 위양성 반응은 O₁₅₇ 항혈청과 교차응집반응을 일으키는 Salmonella group N(O30), Citrobacter freundii, Yersinia enterocolitica O9, Escherichia hermanii에서도 일어날 수 있다.

1) O₁₅₇ 혈청형 동정

가) Veal infusion agar에 균을 접종

하여 37℃, 18시간 배양한다.

나) 멸균생리식염수로 집균하여 균질부 유액으로 만든다.

다) 이것을 끓는물에 1시간 처리한다. (특히 균액이 균질현탁액이어야 하며 끓인 후 응집이 있으면 시험에 사용할 수 없다.)

라) 식힌 후 멸균생리식염수를 사용하여 MacFarland No. 3에 탁도를 맞춘다.

마) formalin을 최종농도 0.5% (v/v) 되게 첨가한다.

바) 항혈청을 멸균생리식염수로 1:1 희석한다.

사) 시험관을 8개 준비하여 1번 시험관에는 멸균생리식염수를 0.9ml 분주하고 2-8번 시험관까지는 0.5ml을 분주한다.

아) 희석된 O₁₅₇ 항혈청을 1번 시험관에 0.1ml 분주하여 완전히 혼합한 후 0.5ml을 2번 시험관에 넣고, 이를 또 3, 4, 5, 6, 7번 시험관에 계속 단계희석한다. 단 7번 시험관에서는 혼합 후 0.5ml을 버리고, 8번 시험관에는 항혈청을 넣지 않아 음성대조균으로 사용한다. 따라서 항혈청의 희석배수는 X20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280이 된다.

자) 8개의 시험관에 마)에서 준비된 항원을 각각 0.5ml씩 분주한다. 최종 희석농도는 X40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2560이 된다.

차) 50℃ 항온수조에 20시간 반응시킨 후 응집유무를 읽는다.

카) 응집의 정도를 보고 판정 기록한다.
++++: 100%, +++: 75%, ++: 50%, +: 25%, ±: 25%이하, -: 응집 무

타) 판정: ++이상 응집되었거나 1:320 이상에서 응집되었을 때 양성으로 판정

한다.

2) H₇ 혈청형 동정

가) Motility GI 배지에 최소한 수 회 계대배양하여 운동성을 부여한다.

(야외 분리균은 편모가 적으므로 반드시 GI 배지에 계대하여 H 항원을 충분히 발현시킨다.)

나) Veal infusion broth에 접종하여 37°C에서 일야배양한다.

다) Veal infusion broth에 formalin을 0.3%되게 첨가한 후 MacFaland No. 3에 탁도를 맞춘다.

라) 0.85% 생리식염수로 항혈청을 1:500으로 희석한다.

마) 희석된 항혈청을 0.5ml 시험관에 분주한다.

바) 다)에서 준비된 항원을 0.5ml 접종하여 섞는다. (항혈청의 최종 희석농도 1:1,000이 된다.)

사) 50°C 항온수조에 1시간 방치한 후 응집유무를 읽는다.

아) 응집의 정도를 보고 판정 기록한다.
++++: 100%, +++: 75%, ++: 50%,
+: 25%, ±: 25%이하, -: 응집 무

자) 판정: ++이상된 것을 양성으로 한다.

나. 독소 검출

세포독성시험으로 분변과 세균배양의 여과물에서 독소유무를 알 수 있다.

SLT는 Vero cells을 죽이기 때문에, 세포배양을 이용한 검출은 진단법으로 유용하다. 분변 및 배양액중 SLT검출을 위한 ELISA도 개발되어 있다.

E. coli O₁₅₇:H₇균주의 독소검출은 verocytotoxin tissue culture assay 및 immunoblot방법으로도 검출할 수 있다.

1) 독소 준비

균을 trypticase soy broth 20ml에 접종하여 37°C에서 20 - 24시간 진탕 배양하고, 배양액을 7,000 X g에서 30분간 원심침전시켜 상청액을 0.45um membrane를 이용하여 여과한 후 4°C에 보존한다. 여과액을 2배 또는 5배단계 희석하여 검사에 사용한다.

2) Vero cell 준비

Vero 및 Hela 세포는 5% fetal bovine serum(FBS), gentamicin(50ug/ml)이 들어있는 MEM 배지에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 배양, 계대하면서 실험에 이용한다. 25cm² 세포 배양용 flask에 배양된 Vero 및 Hela 세포를 수확하기 위하여 배지를 제거한 후, 1% trypsin-EDTA 2ml을 넣어 바닥에 부착되어 있는 세포를 탈락시킨다. 동량의 EMEM(Eagle's minimum essential medium) 배지를 넣어 trypsin의 활성을 떨어뜨린 다음, 세포가 들어있는 용액을 시험관으로 옮겨 500 X g로 5분간 원심하여 세포를 침전시킨다.

상청액을 제거한 후, 2% FBS가 들어있는 EMEM 배지 2-3 ml을 넣어 세포를 재부유시킨 다음, hemocytometer를 이용하여 세포수를 확인한다. 세포수 ml당 50,000개가 되도록 2% FBS가 들어있는 EMEM 배지로 희석한 후, 96 well tissue culture plate(flatbottom)의 각 well당 100ul씩 넣는다.

3) 검사방법 및 판정

FBS가 들어있지 않은 EMEM 배지를 각 well 당 80ul씩 넣은 후 즉시 균 여과액을 각 well 당 20ul씩 넣어 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한다. 한편으로는 monolayer가 형성된 Vero 및 Hela 세포에 여과액을 접종한다. Vero 및 Hela세포에 대한 cytotoxicity 검사는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서

3일간 배양하면서 매일 세포변성효과 (CPE)를 관찰한다. 배양 3일후 세포를 50% 사멸시키는 최종 희석배수를 endpoint로 하여 cytotoxicity의 정도를 결정한다.

다. 유전자 검출

E. coli O₁₅₇:H₇을 포함하여 모든 verotoxin 산생 E. coli를 특이적으로 탐지할 수 있는 유전자 probe 방법이 유용한 것으로 알려져 있다.

SLT-I과 SLT-II 특이유전자 probe를 phage DNA로부터, E. coli O₁₅₇:H₇가 전형적으로 보유하고 있는, 60MDa plasmid로부터 DNA probe를 개발한 바 있다. 또한 중합효소연쇄반응(PCR)은 E. coli의 verotoxin 유전자를 검출하는데 빠르고, 특이하고 민감한 방법으로 알려져 있다.

1) genomic DNA 분리각 사용

균주의 genomic DNA 분리는 CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)-DNA precipitation방법에 의해 실시한다. 즉, 균을 LB broth 5ml에 접종하여 하룻밤 동안 진탕배양한 후, 배양액 1.5ml을 취하여 균체를 원심침전시키고 배지성분을 제거한다.

침전균체에 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH 8.0) 567 μ l를 가하여 재부유한 다음, 10% SDS 30 μ l와 proteinase K(20mg/ml in DW) 3 μ l를 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 처리로 세포막을 파괴한다. 세포성분, LPS 및 단백질 성분을 제거하기 위하여 5M NaCl용액을 100 μ l, CTAB/NaCl용액(10% CTAB in 0.7M NaCl) 80 μ l를 가하여 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응한 다음, 동량의 chloroform :isoamylalcohol(24:1) 및 phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1)를 가하고 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 단백질 성분을 완전히

제거한다.

순수한 DNA를 함유하는 상청액은 새로운 tube로 옮겨 0.6배량의 isopropanol을 가하여 DNA를 침전한다. DNA 침전물은 70% ethanol로 세척후 건조시킨 다음 RNase 용액(20 μ g/ml)으로 부유시킨 후 DNA calculator (Pharmacia LKB)에서 DNA농도를 측정하여 사용한다.

2) Plasmid DNA 추출

E. coli O₁₅₇:H₇의 60MDa의 plasmid 추출은 alkaline lysis 방법에 준한다. 즉 대장균을 LB배지에 37 $^{\circ}$ C, 18시간 진탕배양한 후 원심침전시킨다. 균체를 Solution I (50mM glucose, 25mM Tris-Cl (pH 8.0), 10mM EDTA) 200 μ l로 부유시키고 실온에서 30분간 작용시킨 후, Solution II (0.2N NaOH, 1% SDS) 400 μ l를 가하여 혼합하고 얼음에서 5분간 작용시킨다.

3M Sodium acetate용액 (pH 5.2) 300 μ l를 가하여 혼합하여 얼음에서 1시간 반응시킨 후 12,000 \times g에서 5분간 원심침전시킨다. 상청액을 새 tube에 옮기고 isopropanol 750 μ l를 가한 후 -20 $^{\circ}$ C에서 10분간 정치한 다음, 12,000g에서 20분간 원심침전시켰으며 상청액을 제거한 후 0.1M ammonium acetate (pH 6.0)를 100 μ l가하여 침전물을 용해한 다음, absolute ethanol 300 μ l를 가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 30분이상 정치시킨다. 12,000 \times g에서 20분간 원심침전하여 상청액 제거 후, 침전 DNA를 70% ethanol로 2회 세척한다. 진공농축 원심분리기에 plasmid DNA를 건조시킨 후 TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 40 μ l로 부유시켜 plasmid로 사용한다.

3) Oligonucleotide primer제조

병원성 대장균의 검출을 위해 이미 보고

된 염기서열 정보를 통해 oligonucleotide primer의 위치를 결정하여 DNA 인공합성기 (Applied Biosystems, model 392)를 이용하여 합성 제조한다. 합성한 oligonucleotide는 55°C에서 1시간 처리후 진공하에 건조시킨 후 증류수 500 μ l에 부유시켜 DNACalculator (Pharmacia, LKB)에서 흡광도를 측정하고 합성 DNA양을 산정하여 사용한다.

4) PCR Assay

PCR에서의 denature, annealing, extension의 조건을 결정하고자 각기 다른 온도와 시간으로 예비실험을 실시한다. PCR은 50mM KCl, 10mM Tris, 1.5mM MgCl₂, 100nM primers (forward 및 reverse), 200 μ M deoxynucleotide triphosphates, Taq DNA polymerase 2.5 units와 실험에 사용된 대장균 또는 그 외의 장내세균의 template DNA 100ng 이 함유된 reaction mixture 100 μ l를 denaturation은 94°C/1분, annealing은 58°C/1분 30초, 그리고 extension은 72°C/2분 30초의 조건으로 DNA Gene ATAQ controller (Pharmacia LKB) 내에서 30회 반복하여 증폭수행시켰으며, 최종 extension은 7분을 실시한다. 이와같은 DNA 증폭이 끝난 후, 각 sample 10 μ l를 ethidium bromide가 함유된 1.0% agarose gel에 loading한 후, 0.5 \times TBE buffer(45mM Tris-borate, 1mM EDTA (pH 8.0))를 이용하여 100V, 1시간 동안 전기영동을 실시한 후, 자외선 조사에 target 유전자 증폭여부를 확인 및 사진촬영한다.

라. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

- 1) 2ml의 Lauryls broth에 균을 접종하여 35°C, 정치, 일야배양한다.
- 2) 사용한 broth로 영점을 잡은 뒤 일야 증균액과 사용하지 않은 broth를 섞어

가면서 560nm에서 OD값이 0.3(또는 50% tr-ansmittance)이 되도록 탁도를 조정한다.

3) OD값을 맞춘 뒤 이 eppendorf tube에 1ml 취해서 14,000g, 3분 원심한 후 상층액을 vacuum pump로 완전히 제거한다.

4) 균체를 250ul의 EET buffer(100mM EDTA, 10mM EGTA, 10mM Tris pH 8.0)으로 vortex mixing하여 완전히 부유시킨다.

5) 350ul의 1.6% chromosomal grade agarose를 EET로 준비하고 4)에서 준비한 시료와 완전히 혼합하여 agarose plug molds에 기포가 형성되지 않도록 붓고 4°C, 30분 방치하여 굳힌다.

6) 1ml의 EET-LS(200ug/ml lysozyme, 0.05% N-laurylsarcosine sodium)을 분주한 50ml 시험관에 agarose plugs를 이쑤시게 같은 것을 사용하여 용액에 잠기도록 한후 30°C 온수조에서 일야배양한다.

7) gel이 깨지지 않도록 조심히 step 6의 EET-LS를 완전히 제거하고 1ml의 EET-SP (1mg/ml protenase K, 1.0% Lauryl sulfate sodium)을 첨가하여 gel이 buffer에 완전히 잠기도록 하여 50°C 수조에서 일야 배양한다.

8) step 7의 EET-SP를 완전히 제거하고 멸균한 TE buffer 40ml에 30분간 담금을 4번 반복하여 plugs를 세척한다.

9) step 8의 plug를 1/3정도 잘라서 eppendorf tube에 옮기고 나머지는 2ml의 TE buffer에 넣어서 4°C에 보관하면 1년은 안정하다.

10) eppendorf tube에 옮긴 plug는 100ul 1 \times React 2 buffer를 분주하여 10분간 방치한다.

11) step 10의 buffer를 버린 다음 1.5ul (30unit) XbaI이 첨가된 신선한 1×React 2 buffer를 분주한 후 37℃ 수조에 일야 소화시킨다.

12) step 11의 buffer를 제거한 후 0.5ml의 0.5× TBE buffer를 분주해서 10분동안 plug를 담가둔다.

13) 0.5× TBE buffer를 전기영동조에 붓고 14℃를 유지시킨다.

14) Sealing용으로 1%의 lowmelting point agarose gel을 0.5× TBE로 준비한다.

15) Gel cast를 준비하여 1% agarose-TBE gel 100ml을 붓고 굳힌 후 comb을 빼낸다.

16) Step 11의 plug를 튜브에서 꺼내어 종이위에 올려 물기를 제거한 뒤 well에 조심스럽게 삽입하고 양끝은 marker를 적당히 잘라 삽입하고 준비한 low-melting point agarose gel로 sealing한다.

17) CHEF-DR11 PFGE apparatus에 gel을 얹고 6volts/cm, 20시간, ramping time 5~50초로 조정하여 전기영동을 실시한다.

18) 전기영동후 1ug/ml ethidium bromide용액 200ml로 실온에서 10분간 gel을 염색하고 멸균증류수로 10~30분간 세척한 후 촬영한다.

< Reagents >

1. Tris stock (1M, pH 8.0):실온보관, 1년 유효

2. EDTA stock(0.5M):EDTA, disodium dihydrate (FW=372.2) 186.1g, DW 900ml 20g의 NaOH를 첨가하면

EDTA가 잘 녹는다.

최종량을 1l 가 되도록하고 실온에서 1년 유효.

3. EGTA stock (0.1M):EGTA(MW=380.4) 38g, DW 900ml적당량의 NaOH를 넣어 녹인 뒤 최종량을 1l 가 되도록하고 실온에서 1년 유효.

4. EET (100mM EDTA, 10mMEGTA, 10mM Tris, pH8.0) : 실온에서 6개월 유효.

5. TE(10mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA) : 실온에서 1개월 유효.

6. EET-SP(EET, 1% SDS, 1mg/ml Proteinase K)EET 100ml, SDS(Lauryl sulfate, sodium) 1g, Proteinase K 100mg Proteinase K는 50~60℃에서 서서히 stirring하면서 녹이고 -20℃에서 보관하면 1년 유효.

7. EET-LS (EET, 200ug/ml lysozyme, 0.05% Sarkosyl) EET 100ml, Lysozyme (1mg/ml) 0.02g, N-Laurylsarcosine, sodium 0.05g N-Laurylsarcosine, sodium을 1ml의 H₂O에 녹이고 나서 EET를 넣고 lysozyme을 첨가시켰다.

-20℃에서 보관하면 1년은 유효.

Lysozyme은 잦은 동결과 해동으로 그 활성을 잃으므로 소량 분주해서 사용)

8. Ethidium bromide staining solution Ethidium bromide (10mg/ml) 50ul, 0.5×TBE buffer 500ml

※ Ethidium bromide는 발암성 시약이므로 반드시 장갑을 끼고 실험할 것! 2회까지 사용하고 폐기물로 버릴 것. 빛을 차단하고 실온에 보관하면 1년은 유효하다.

7 예방대책

우리나라에서는 대장균 O₁₅₇:H₇에 의한 식중독은 아직까지는 문제되지 않고 있으나 소의 간, 천엽, 육회 등 날고기를 즐겨먹는 식습관으로 식중독 발생이 우려되며, 식습관의 서구화 및 유통 음식물의 위생관리 수준 등을 고려할 때 E. coli O₁₅₇:H₇균에 의한 집단발생 가능성이 있어 설사환자 관리시 주의를 요한다.

사람에서의 예방은 쇠고기(간, 천엽, 골 등) 생식을 금지토록 홍보를 강화하고, 2차감염 예방을 위한 환경 위생관리를 철저히 해야한다.

식품에서 E. coli O₁₅₇:H₇의 방제에 가장 중요한 조치는 식품의 섭취전에 가열조리와 가공과정의 위생적인 처리이다.

E. coli O₁₅₇:H₇에 의한 감염을 막기 위해서는 유아나 면역이 약화된 사람은 절대로 원유나 날고기, 덜익힌 고기를 먹어서는 안된다.

물은 대장균균수와 E. coli의 유무를 정기적으로 관리함으로써 음수위생을 확고히 해야한다.

가축에서는 도축시 식육의 분변 오염에 대한 철저한 도축장 위생관리 및 지도를 실시하고, 목장에서의 질병관리 및 착유 위생 관리를 철저히 해야 하며, 물 등의 환경위생에 대해서도 관심을 가져야 할 것이다.

소와 다른 동물에 대한 감염예방은 감염되는 방법이 명확하지 않아 어려운 실정이나 동물의 E. coli O₁₅₇:H₇ 감염의 가장 중요한 예방법은 음수관리를 위생적으로 하는 것이다. 대장균은 분변에 오염된 물에 의해 전파되는 것으로 알려져 있고, 농장, 도살장, 도시 하수에 E. coli가 많이 오염될 수 있으므로 오염된 음수의 접촉을 막아야 한다.

농장동물의 음수는 100ml sample당 대장균이 검출되어서는 안되며, 대장균

오염을 제거하기 위한 처리 방법은 사료를 가열하거나 pel-leting하며, 물은 염소처리한다.

아울러 동물검역소에서는 수입육에 대한 대장균 O₁₅₇:H₇검사를 실시하여 국내 유입을 사전에 방지해야 한다.

또한 국내 유통 식육 및 동물에서의 분포상황을 파악하고, 식육중 식중독 주요 원인 세균인 병원성 대장균 O₁₅₇:H₇, 살모넬라 등 위생기준 및 식육 생산 단계별 미생물 오염 지도기준 설정을 설정하여 사람의 사전방지 대책을 마련해야 할 것이다.

세계각국은 식품매개에 의한 식중독 발병 위험을 줄이고 안전한 식육 생산 공급을 위한 농장에서부터 소비자까지 모든 단계를 모니터링하는 위해분석 및 주요관리점(HACCP)제도를 도입하고 있다. 따라서 우리나라에서도 식중독 발생의 근원적 예방을 위해서는 축산물 생산 단계부터 소비자까지 전과정의 위해분석 및 주요관리점제도를 조기 도입 및 적용이 필수적이라 할 수 있다.

대한수의사회 회원명부 발간

우리회에서는 1986년 이후
12년만에 '1998 회원명부'를
발간하였습니다.

회원 여러분에게는
이미 각 지부를 통하여
발송하였고 필요하신
업체나 개인은
사무처 (02-392-2526)로
연락하시면 약간의 찬조금을
받고 발송해 드리겠습니다.