J. Fd Hyg. Safety 12(1), 78 - 82(1997)

도체표면의 분변오염과 Verotoxin 생성 *Escherichia coli* O157:H7 분리에 관한 연구

고주언 · 홍종해†
강원대학교 수의학과

Isolation of Verocytotoxin Producing *Escherichia coli* O157:H7 Due to Fecal Contamination on Carcass Surfaces

Joo-Un Ko, Chong-Hae Hong†
Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University

ABSTRACT — Surface swab samples from beef (188), pork (240) and chicken (95) carcasses were collected from slaughterhouse in Kangwon and Kyunggi areas from March through July 1996. The samples were examined on the level of *E. coli* biotype I relevant to fecal contamination due to unsanitary processing control and the existence of verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC). *E. coli* biotype I were confirmed from 38.8% of beef, 40.0% of pork, and 69.5% of chicken carcasses. Little variation was noted among three sampling points; rump, flank and neck of beef, ham, belly and jowls of pork. *E. coli* O157:H7 was only confirmed from 2 of 188 beef carcasses. *E. coli* O157 were isolated from 6.4% of beef, 2.5% of pork, and 1.1% of chicken carcasses among *E. coli* biotype I. All the isolated *E. coli* O157 showed positive for vero cell cytotoxicity test. Isolation rate of *E. coli* O157 in summer was higher than in spring. In case of pork and chicken carcasses, *E. coli* O157 was isolated in summer only.

Key words □ slaughterhouse, *E. coli* biotype I, VTEC, *E. coli* O157:H7

서 론

*E. coli*는 사람과 온혈동물 장관의 정상세균총이지만 병원성이 있는 균주가 있어 설사증상의 원인이 된다. *E. coli* O157:H7에 의해 산생된 독소는 Vero cell에 대해 세포독성 효과를 나타내어 이 독소를 verotoxin이라고 부르며,[1] 이미 생성된 독소는 열에 안정하므로 인체의 피해를 줄이기 위해서는 오염예방이 가장 중요하다.

Verocytotoxin-producing *E. coli*(VTEC)는 사람에서 출혈성 대장염과 출혈성 요독증 증후군의 원인체이다.[2,3] Verotoxin을 생성하는 *E. coli*는 43종 이상의 혈청형이 알려져 있으며, verotoxin으로 인한 환자로부터 분리되는 균의 절반 이상이 *E. coli* O157:H7인 것으로 알려져 있다.[4]

E. coli O157:H7은 1982년 미국의 Michigan과 Oregon주에서 최초로 사람에서의 병원체로 보고된 이후 발병조사의 촛점이 되어왔다.[5,6] 이들 발생의 대부분이 덜 조리된 쇠고기와 멸균되지 않은 우유의 섭취와 관련이 있으며,[7,8] 염소소독을 하지 않은 지방 간이상수도, 사과쥬스, 채소, 샐러드 등의 섭취로도 발생하는 것으로 알려져 있다.[9] 우리나라에서는 1994년에 식중독 환자로부터 *E. coli* O157을 분리하여 보고한 바 있다.[10]

VTEC는 여러 동물 특히 소의 장내에 넓게 분포되어 있으며, 시판되는 돼지고기, 닭고기, 양고기 등에서도 *E. coli* O157:H7이 검출되어 다른 동물도 *E. coli* O157:H7의 매개체 역할을 할 수 있는 것으로 보고되고 있다.[4] 따라서 육회나 생간 등을 날 것으로 먹는 식습관과 주요 소비층이 어린이들인 fast food와 냉동식품의 확대 보급으로, 우리나라에도 이 균으로 인한 발병 가능성이 충분히 잠재되어 있다.

본 실험은 소, 돼지, 닭의 도축 도계 공정중 비위생적인 작업이 원인이 되는 도체중의 분변오염 *E. coli*를 확인하고, 그 중 *E. coli* O157:H7의 존재와 verotoxin 생성 여부를 규명하여, 국내산 도체의 오염실태를 파악하고자 하였다.

† Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

재 료

1996년 3월부터 7월까지 강원도와 경기도 지역의 도축장 3곳과 도계장 2곳을 대상으로 작업이 완료된 후 12시간 이내에 소 188건, 돼지 240건, 닭 95건의 도체표면 시료를 채취하였다.

시료채취 방법

소와 돼지는 미근부, 복부, 경부를 각각의 멸균된 면봉(BBL)으로 10×10 cm의 크기를 swab하였고, 닭은 도체 전 부위를 멸균된 면봉으로 고르게 swab하였다.

표준균주

대조용 균주로는 경상대학교 수의과대학에서 분양받은 *E. coli* O157:H7 #670을 사용하였다.

분변오염 *E. coli*의 동정

FDA의 Bacteriological Analytical Manual[11]과 APHA의 Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods[12]의 방법에 따라 swab한 면봉을 MacConkey Agar(Difco)에 직접도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후 밝은 핑크색의 전형적인 집락을 1~3개 선택하여 순수배양하였다. 순수배양한 각각의 집락을 Triple Sugar Iron Agar(Difco)에 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양하여 acid slant, acid butt에 가스를 생성한 집락을 얻었다. 얻어진 집락의 분변오염 여부는 IMViC test를 실시하여 biotype I(++--)을 확인하였다.

혈청학적 검사

E. coli biotype I으로 확인된 균주를 대상으로 혈청학적 검사를 실시하였다.

O항원의 혈청학적 시험을 위한 항원은 Veal Infusion Agar(Difco)에 배양한 *E. coli*를 0.85% 생리식염수에 부유시켜 100°C에서 60분간 가열한 후 0.85% 생리 식염수를 사용하여 McFarland Standard No. 3의 농도로 맞추고 formalin(최종 농도 0.5%)으로 처리하여 준비하였다.

준비된 O157 항원에 대한 항혈청(Difco)을 1:20에서 1:1, 280까지 희석한 후 준비된 항원을 더하여 48~50°C에서 18~20시간 배양하고 응집반응여부를 판단하였다.

H항원의 혈청학적 시험은 시험균을 Motility GI Medium(Difco)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하고 이 과정을 5회 반복한 후 Veal Infusion Broth(Difco)에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 그 후 0.3% formalin으로 고정후 0.85% 생리식염수를 사용하여 McFarland Standard No. 3의 농도로 맞추었다. H7 항원에 대한 항혈청(Difco)을 1:250, 1:500, 1:1,000, 1:2,000으로 희석한 후 준비된 항원을 더하고 50°C에서 1시간 배양하여 응집반응여부를 관찰하였고, 반응이 일어나지 않은 경우 12시간까지 배양하면서 결과를 관찰하였다.

세포독성 검사

세포독성 검사는 Karmali 등[4]과 Gentry 등[14]의 방법에 따라 실험하였다.

Verotoxin 준비—항원형 O157로 확인된 *E. coli* biotype I 균주를 20 m*l* Tryptic Soy Broth(Difco)에 접종하여 37°C에서 20~24시간 진탕하여 배양한 후, 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 0.45 μm membrane filter(Millipore)로 여과한 후 4°C에 저장하며 실험에 사용하였다.

Vero cell 준비—Vero cell은 국립수의과학연구소(안양)에서 분양받아 10% fetal bovine serum(Gibco-BRL)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco-BRL)으로 5% CO_2, 37°C의 조건에서 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

25 cm^2 세포배양용 flask에서 배양된 세포를 수확하기 위해서 배지를 제거한 후, 0.025% trypsin-EDTA(Gibco-BRL) 3 m*l*를 넣어 바닥에 부착되어 있는 세포를 탈락시켰다. 동량의 DMEM배지를 넣어 trypsin의 활성을 떨어뜨린 다음 세포가 들어 있는 용액을 centrifuge tube로 옮겨 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 상층액을 제거한 후, 3% fetal bovine serum이 들어 있는 DMEM 배지 2~3 m*l*을 넣어 세포를 부유시킨 다음에 hemocytometer를 이용하여 세포수를 확인하였다. 세포수를 1.4×10^4/m*l*이 되도록 DMEM배지로 희석한 후, 96 well tissue culture plate(flat bottom)의 각 well당 100 μ*l*씩 넣어 단층세포가 형성될 때까지 1~2일간 5% CO_2, 37°C의 조건에서 배양하였다.

세포독성 검사—여과한 여액을 2배 단계 희석하여 100 μ*l*를 96 well tissue culture plate에 단층 배양한 Vero cell에 접종하였으며, 경상대학교에서 분양받은 *E. coli* O157:H7 #670을 양성 대조군으로 하고 여과한 여액을 더하지 않은 것을 음성 대조군으로 하였다. 접종한 plate는 37°C, 5% CO_2 조건으로 3일간 배양하면서 매일 세포변성 효과를 도립현미경(Olympus)으로 관찰하였다. 세포변성 효과를 확인하기 위하여 배양 3일 후에 배양 상층액을 버리고 2% formalin이 첨가된 0.067 M phosphate buffered saline(2% formalin-PBS, pH 7.2)으로 1분간 세포를 고정시킨 후, 0.13% crystal violet(5% ethanol-2% formalin-PBS)으로 20분간 염

색하여 관찰하였다.

결 과

소 188건, 돼지 240건, 닭 95건의 도체표면에 오염된 *E. coli* biotype I은 IMViC test 결과 Table 1과 같이 닭 69.5%(66건), 돼지 40.0%(96건), 소 38.8%(73건) 순이었고, 소 6.4%(12건), 돼지 2.5%(6건), 닭 1.1%(1건)에서 *E. coli* O157이 확인되었다.

소와 돼지도체의 부위별 *E. coli* biotype I의 오염도는 Table 2와 같으며 부위별 유의한 차이는 없었다.

봄과 여름의 계절변화에 따른 *E. coli* biotype I 오염도 변화는 Table 3과 같다. 소 도체표면은 봄 38.8%, 여름 38.9%로 유사하게 나타났으나, *E. coli* O157의 검출률은 봄 3.8%, 여름8.3%로 여름에 더 높았다(P=0.038). Biotype I으로 확인된 *E. coli*중에서의 *E. coli* O157 검출률도 봄 9.7%, 여름 21.4%로 여름이 더 높게 나타났다(P<0.015). 돼지 도체표면의 *E. coli* biotype I 오염은 봄이 47.5%로 여름 35.0%보다 높게 나타났으나(P<0.031), *E. coli* O157으로 확인된 6건 모두 여름에 검출되었다. 닭에 대한 *E. coli* biotype I의 분포는 봄 94.3%, 여름 55.0%로 봄에 높은 분리율을 보였다(P<0.0001). 그러나 *E. coli* O157은 여름에만 1건이 검출되었다.

소, 돼지, 닭의 도체표면에서 분리된 *E. coli* O157의 H7 항혈청 검사결과는 Table 4와 같이 소에서만 2건이 *E. coli* O157:H7으로 판정되었고 돼지와 닭에서는 검출되지 않았다. 분리된 *E. coli* O157 19균주에 대한 세포독성 실험 결과는 19균주 모두 Vero cell에 대한 세포독성 효과를 나타내었다.

Table 1. Isolation rates of *E. coli* biotype I and *E. coli* O157 on beef, pork and chicken carcass surfaces

Carcass	No. of sample	*E. coli* biotype I (%)	*E. coli* O157 positive (%)
Beef	188	73 (38.8)	12 (6.4)
Pork	240	96 (40.0)	6 (2.5)
Chicken	95	66 (69.5)	1 (1.1)

Table 2. Isolation rates of *E. coli* biotype I and *E. coli* O157 on beef, pork and chicken carcass surfaces by sampling point

Carcass	No. of sample	*E. coli* biotype I (%)	*E. coli* O157 positive (%)
Beef			
Rump	47	18 (38.3)	3 (6.4)
Flank	47	20 (42.6)	1 (2.1)
Neck	47	21 (44.7)	2 (4.3)
Pork			
Ham	60	26 (43.3)	4 (6.7)
Belly	60	25 (41.7)	1 (1.7)
Jowls	60	29 (48.3)	0

고 찰

대상 도축장의 분변오염(biotype I) 수준인 소 38.8%, 돼지 40.0%는 미국의 식육위생 현황조사자료[14]의 소 8.2 15.8%, 돼지 31.0%와 비교해 볼 때 더 높아, 가축에 유래하는 장내세균의 식육을 통한 전파를 예방하기 위해서는 작업과정에서의 엄격한 위생관리가 요구되었다.

E. coli O157 양성률은 소 6.4%, 돼지 2.5%, 닭 1.1%로 권[15] 등이 서울, 부산, 광주 등 전국 대도시 정육점에서 쇠고기 140건을 조사한 결과 0.7%보다 높은 분리율을 나타냈다. 이러한 차이점은 본 연구에서는 도축이 끝난 12시간 이내의 냉장상태 도체를 대상으로 하였고, 권 등은 유통 및 판매시 냉동된 식육을 대상으로 하여 냉동으로 인한 영향

Table 3. Seasonal chages of *E. coli* biotype I and *E. coli* O157 positive in beef, pork, and chicken carcasses

Carcass	Season	*E. coli* biotype I (%)	*E. coli* O157 positive (%)	*E. coli* O157 positive/*E. coli* biotype I (%)
Beef	Spring (N=80)	31 (38.8)	3 (3.8)	3/31 (9.7)
	Summer (N=108)	42 (38.9)	9 (8.3)	9/42 (21.4)
Pork	Spring (N=40)	19 (47.5)	0	0
	Summer (N=200)	77 (35.0)	6 (3.0)	6/77 (7.8)
Chicken	Spring (N=35)	33 (94.3)	0	0
	Summer (N=60)	33 (55.0)	1 (1.7)	1/33 (3.0)

Table 4. Positive Vero cell effects of *E. coli* O157 isolated from beef, pork and chicken carcasses

Carcass	No. of sample	*E. coli* O157 positive (%)	*E. coli* O157: H7 positive (%)	Verotoxin positive (%)
Beef	188	12 (6.4)	2 (1.1)	12 (100.0)
Pork	240	6 (2.5)	0	6 (100.0)
Chicken	95	1 (1.1)	0	1 (100.0)

인 것으로 판단할 수 있었다.

소와 돼지는 작업장에서 도체를 현수하여 작업을 하므로 미근부, 복부, 경부 순으로 세균오염이 증가될 것으로 예상하였으나 차이가 없었다. 따라서 앞으로 도체에 대한 오염미생물 monitoring시에는 복부와 경부의 각각 10×10 cm를 같은 swab 기구로 혼합채취하는 것이 시료수도 줄일 수 있으며, 또한 미근부 채취시 사다리를 이용해야 하는 불편을 감소시킬 수 있는 것으로 사료되었다.

본 연구의 *E. coli* O157 오염은 모두 여름에만 검출되거나 여름철에 검출률이 높았는데, 이것은 Karmali 등[3]과 Chapman 등[16]이 VTEC에 의한 용혈성 요독증 증후군의 발생이 여름철에 가장 많다는 보고와 미국의 Pai[2]가 수행한 2년간의 역학조사에서 VTEC 감염에 의한 설사환자가 6월에서 9월에 주로 많이 발생한다는 보고와 유사한 양상을 보였다. 여름철 온도는 도축처리과정에서 오염된 *E. coli*가 verotoxin을 생성하기 좋은 조건이 되므로 실제 질병발생이 여름에 집중되는 것임을 짐작할 수 있었다. 현재 대부분의 국내 도축장과 도계장은 여름철 냉방시설이 미비하거나 작업장이 외부와 차단되지 않아, 외부 온도의 영향을 받으므로 특히 여름철 세균증식의 좋은 환경이 되고 있다.

본 실험에서 도계장의 경우 여름이 봄보다 *E. coli*의 검출률이 낮게 나타난 이유는, 대상 작업장이 여름철이 되면서 도계공정에 사용되는 세척수에 소독제를 첨가한 영향인 것으로 판단되어, 자체 폐수처리시설의 정상 가동에 영향이 없는 범위내에서는 인체에 무해한 소독제를 냉각수에 투입하는 것이 도체표면의 오염미생물을 감소시키는 유효한 방법임을 확인할 수 있었다.

검출된 *E. coli* O157 19균주 모두 verocytotoxicity를 나타내었는데, Chapman 등[17]이 소 분변에 대해 E. coli O157을 검사한 결과, 검출된 *E. coli* O157으로 확인된 84건중 78건(93%)이 verocytotoxicity를 나타내었다는 보고와 유사하였다. 국내에서도 차 등[18]이 소와 돼지의 분변재료에서 분리한 *E. coli* O157을 Vero cell에 접종한 결과 모든 균주가 verocytotoxicity를 나타내었다는 보고와도 일치하였다.

본 연구는 도축 도계공정의 비위생적인 작업으로 인한 장내세균 오염으로 도체표면에 *E. coli* O157 오염이 존재함을 확인하여, 도축 도계 공정상의 위생적 처리가 매우 중요함을 재인식할 수 있었다. 또한 검출된 *E. coli* O157은 모두 verotoxin을 생성하고 있어, 그 이후의 단계에서 위생적인 취급을 하더라도 verotoxin으로 인한 위해성이 여전히 존재함을 알 수 있었다.

따라서 도축 도계장의 위생관리와 위생적 작업방법의 강화로 도축과정에서의 분변오염 예방으로 *E. coli*에 의한 verotoxin이 생성되지 않도록 하는 것이, 식육으로 인한 인체의 피해를 줄이는 결정적인 사항임을 확인할 수 있었다.

국문요약

국내 축산물작업장에서 처리되는 소, 돼지, 닭 도체표면의 분변오염 실태와 *E. coli* O157:H7의 오염도를 파악하고자, 1996년 3월부터 7월까지 강원도와 경기도 지역의 도축 도계장에서 소 188건, 돼지 240건, 닭 95건의 시료에 대해 *E. coli* biotype I 오염도와 *E. coli* O157:H7의 verotoxin 생성여부를 확인하였다. 소 38.8%, 돼지 40.0%, 닭 69.5%에서 *E. coli* biotype I이 확인되었고, 소와 돼지의 경우 시료채취 부위별 검출률에서 유의한 차이가 없었다. *E. coli* biotype I으로 확인된 *E. coli* 중에서 소 6.4%, 돼지 2.5%, 닭 1.1%에서 *E. coli* O157이 분리되었다. 분리된 *E. coli* O157 19균주 모두 verotoxin을 생성하였다. *E. coli* O157 오염의 계절적 변화에서 소는 여름에 분리율이 높았고, 돼지와 닭은 여름에만 분리되었다. *E. coli* O157:H7는 소에서만 2건이 확인되었다.

참고문헌

1. Konowalchuk, J., Speirs, J. I., Stavric, S.: Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **18**, 775-779 (1977).
2. Pai, C. H.: Epidemiology of sporadic diarrhea due to verocytotoxinproducing Escherichia coli; a two-year prospective study. *J. Infect. Dis.*, **157**, 1054-1057 (1988).
3. Karmali, M. A.: Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**, 15-38 (1989).
4. Hardas, U. D., Jalgaonkar, S. V., Kulkarni, V. K.: Cytotoxic effect of culture filtrate of enteropathogenic *Ecsherichia coli* from diarrheoa in children on Vero cell culture. *Indian J. Med. Res.*, **76**, 86-88 (1982).
5. Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., Hebert, R. J. *et al*: Hemor-

rhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* Serotype. *N. Engl. J. Med.*, **308**, 681-685 (1983).
6. Wells, J. G., Davis, B. R., Wachsmuth, K., Riley, L. W., Remis, R. S. Sokolow, R., Morris, G. K.: Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.*, **18**, 512-520 (1983).
7. Weeranta, R. D., Dolye, M. P.: Detection and production of verotoxin 1 of *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2951-2955 (1991).
8. Doyle, M. P., Schoeni, J. L.: Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2394-2396 (1987).
9. Bryant, H. E., Athar, M. A., Pai, C. H.: Risk factors for *Escherichia coli* O157:H7 infection in an urban community. *J. Infec. Dis.*, **160**, 858-864 (1989).
10. 국립보건원: 감염병발생정보, **5**, 2-3 (1994).
11. FDA: *Bacteriological Analytical Manual*. 8th ed., Gaithersburg, (1995).
12. APHA: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3rd ed., Washington, (1992).
13. Gentry, M. K., Dalrymple, J. M.: Quantitative microtiter cytotoxicity assay for *Shigella toxin*. *J. Clin. Microbiol.*, **12**, 361-366 (1980).
14. Cross, H. R.: 미국의 식육위생 현황과 HACCP제도. 제1회 식육의 안전성 확보와 HACCP제도에 관한 학술 세미나, 9-46 (1996).
15. 권경란, 김소희, 장영미, 곽효선, 백선영, 최병희, 김형일, 권영미: 식육중 *Escherichia coli* O157의 분리 및 균의 특성조사에 관한 연구. 국립보건원보, **32**, 529-534 (1995).
16. Chapman, P. A., Wright, D. J., Norman, P.: Verotoxin-producing *Escherichia coli* infections in Sheffield; cattle as a possible source. *Epidem. Inf.*, **102**, 439-445 (1989).
17. Chapman, P. A., Siddons, C. A., Wright, D. J., Norman, P., Fox, J., Crick, E.: Cattle as a possible source of vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol, Infect.*, **111**, 439-447 (1993).
18. 차인호, 김용환: 동물분변에서 *Escherichia coli* O157:H7의 분리 및 이들 균이 생산하는 verotoxin-2의 생물화학적 특성(I. 소와 돼지의 분변에서 *E. coli* O157:H7의 분리 및 verotoxin-2 생산에 관여하는 파아지의 분리에 관하여), 대한수의학회지, **36**, 371-378 (1996).