J. Fd Hyg. Safety 18(3), 118–124 (2003)

면역크로마토그래피를 이용한 *E. coli* O157: H7 신속검출 키트의 유효성 평가

곽효선† · 이동하 · 문희숙 · 박종석 · 우건조 · 김창민
식품의약품안전청 식품미생물과

Evaluation of the Efficiency of *E. coli* O157: H7 Rapid Detection Kit using Immunochromatography

Hyo-Sun Kwak†, Dong-Ha Lee, Hee-Sook Moon, Jong-Seok Park, Gun-Jo Woo and Chang-Min Kim
Division of Food Microbiology and GMO, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

ABSTRACT – For the rapid detection of various pathogenic microorganisms from food samples, various kinds of kits have been developed and commercially available in the markets. With the advantages of speed, accuracy and easiness, the market of these kits has gradually increased for the QC and QA field of food company as well as testing facilities or laboratories. In this study, the characteristics such as the detection limit and the sensitivity of immunochromatographic type of rapid detection kit (Donga Co, Korea, D-kit) for *E. coli* O157:H7 developed by monoclonal antibody were examined and also the possibility of application of the kit to food samples was evaluated. The reference kits used for comparison study were Reveal *E. coli* O157:H7 (Neogen Co., USA, R-kit) and VIP EHEC kit (Biocontrol Inc., USA, V-kit) occupying major market share. In the detection limit test with the *E. coli* O157:H7 reference, both R-kit and D-kit showed a distinct positive reaction in 10^4/m*l* and weak positive reaction in 10^3/m*l*, whereas V-kit showed a same reaction in 105/m*l*. Also, it was identified that the culture treated with heat showed more sensitivity than no heat treated culture. The sensitivity test was conducted against 22 isolates of *E. coli* O157:H7, 7 strains of non-O157:H7 verotoxin-producing *E. coli*, 40 strains of *E. coli* with different O and H antigen type, and 38 strains of non-*E. coli* Enterobacteriaceae, and all of the test strains except three were showed exactly the same reaction against three kinds of the tested kits. All the three kinds of kits showed a positive reaction against *E. coli* O157:H19, *E. coli* O148:H18 and Salmonella galinarium. We suppose that there might be a similarity in serological property between these three strains and O157:H7. From the test results, it can be concluded that there is (was) no difference between the D-kit developed in this study and R-kit or V-kit based on the detection limit and sensitivity.

Key words: *E. coli* O157:H7, immunochromatography, sensitivity, specificity

E. coli O157:H7은 1982년 집단식중독의 원인균으로 확인된 이래 미국, 일본, 유럽 등 세계 각지에서 지속적으로 발생이 보고되고 있다. 이 균은 소고기, 돼지고기 등 식육과 사과쥬스, 요구르트, 마요네즈, 비살균우유 등 다양한 식품을 매개로 하며, 또한 물을 통하여 사람에게 감염을 일으키고 사람에서 사람으로의 전이가 가능하여[1] 우리나라와 일본에서는 법정전염병으로 분류하고 있다. 이 균에 감염될 경우 출혈성대장염, 용혈성요독증후군, 혈전성혈소판감소증 등을 일으키고 심할 경우 사망하게 된다.[2-4]

가축, 특히 소가 이 균의 주요 보균동물로 알려져 있으며,[5] 사람에 대한 잠복기는 3-8일 정도로 긴 편이지만 10-100개의 균량으로도 감염이 일어나기 때문에 감염자로부터 신속·정확하게 감염균을 파악하는 것이 신속한 치료뿐 아니라 다른 사람에게 질병이 확산되는 것을 방지할 수 있는 방법이다. 또한 위해가능성이 높은 식품을 중심으로 모니터링을 지속적으로 실시함으로써 식중독 발생을 사전에 예방하는 것도 중요하다.

현재 미국을 비롯한 일본, 호주 등에서는 *E. coli* O157:H7 예방과 관리를 위해 신속진단기술을 개발하여 자국에서 널리 사용하고 있는 한편 이러한 진단키트 제품을 전 세계로 수출하고 있다. *E. coli* O157:H7을 검출하기 위하여는 여러가지 원리가 사용될 수 있다. *E. coli* O157:H7의 생화학적 특성인 sorbitol 비분해능과 β-glucuronidase 활성이 없는 점 등을 이용하여 확인하는 전형적인 방법,[6] *E. coli* O157:H7 균주가 생산하는 verotoxin 또는 기타 표지자의 유전자를 PCR이나 Real-Time PCR을 이용하여 확인하는 방

†Author to whom correspondence should be addressed.

법,[7-10] verotoxin에 대한 항체 또는 *E. coli* O157:H7 항원에 대한 항체를 이용한 면역분석 검사법[11-14] 등이 있다. 이 중 대량검체를 신속하고 간편하게 검사할 수 있는 방법은 효소면역 분석법에 의한 검사방법으로서 효소면역 기술을 이용한 ELISA, Dipstick을 이용한 방법 및 면역크로마토그래피법을 이용한 신속검사 키트와 장비 등이 개발·시판되고 있다.[15-19]

현재까지 국내에서의 *E. coli* O157:H7 진단키트 사용은 전량 수입되는 고가의 외국제품에 의존하고 있는 실정이다. 이에 1998년부터 한국과학재단 G7과제로 면역학적인 방법에 의한 *E. coli* O157:H7 신속 검출키트 개발 연구사업이 진행되었고, 개발된 키트(D-kit)는 유효성 평가작업을 거쳐 현재 시판되고 있다. 이를 개발·시판함으로써 수입 대체 경제효과 뿐만 아니라, *E. coli* O157:H7에 대한 높은 특이성으로 인해 진단의 정확성을 더욱 높일 수 있을 것으로 기대된다. 이에 본 논문에서는 연구개발 과정에서 실시되었던 유효성 평가작업과 관련하여 검출감도와 특이성 평가 및 식품에 대한 적용가능성을 검증하고자 하였다.

재료 및 방법

시험균주

E. coli O157:H7 ATCC 35150, ATCC 43888, ATCC 43890, ATCC 23514, ATCC 43894를 국립보건원으로부터 분양 받아 검출감도 확인시험에 사용하였다. 특이성 확인을 위하여 미국 Pennsylvania State University와 Cornell University로부터 *E. coli* O157:H7 22주 및 verotoxin 생성주인 *E. coli* O20:H-, *E. coli* O157:H19, *E. coli* O55:H-, *E. coli* O111:H-, *E. coli* O114:H32, *E. coli* O119:H27 및 *E. coli* O26:H46을 각각 분양 받았다. *E. coli* 분리주는 식품분리주로서 혈청형 O1, O2, O5, O6, O7, O8, O16, O18, O20, O25, O26, O29, O38, O44, O55, O63, O74, O78, O81, O86a, O114, O115, O125, O146, O148, O158, O159, O161, O162, O164, O172 등 40주를 사용하였다.[20] 기타 장내세균은 *Serratia entomophila*, *Vibrio mimicus*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella planticola*, *Escherichia* sp, *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Providencia stuartii*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogenes*, *Shigella flexneri*, *Serratia odorifera*, *Enterobacter pyrinus*, *Kluoyvera cryocroescens*, *Alcaligenes faecalis*, *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas oleovorans*, *Proteus mirabilis*, *Tatumella ptyseos*, *Salmonella choleraesuis*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Ewingella americana*, *Enterobacter leraicum*, *Acetobacter aceti*, *Pantoea ananatis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Erwinia tracheiphila*, *Erwinia carotovora*, *Pantoea citrea*, *Flavobacterium lutescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas methanolica*, *Salmonella gallinarium*을 한국생명공학연구소로부터 분양 받아 사용하였다. 각 시험균주는 Brain Heart Infusion Agar (BHI, Difco)에 접종하여 35°C에서 하룻밤 배양 후 실험에 사용하였다.

검출감도 확인시험

개발 kit의 검출 감도를 확인하기 위하여 *E. coli* O157:H7 표준균주인 ATCC 35150, ATCC 43888, ATCC 43890, ATCC 23514, ATCC 43894를 시험균주로 하였다. 본 연구의 유효성 평가 대상 키트인 D-kit는 면역크로마토그라피법을 이용하여 개발·생산한 *E. coli* O157:H7 검출키트로 동아제약에서 생산하고 있다. 이 키트의 유효성 평가를 위해 동일한 원리로 개발?시판되고 있으며 *E. coli* O157을 간이검색하기 위하여 가장 많이 이용되고 있는 VIP EHEC Kit(V-kit) 및 Reveal *E. coli* O157:H7 Kit(R-kit)와 그 결과를 비교·분석하였다. VIP EHEC는 AOAC Official Method(996.09)로 대장균 O157:H7을 검출하기 위해 최초로 승인 받은 방법으로 Biocontrol Systems사(미국)에서 생산되고 있고, Reveal *E. coli* O157:H7 test system은 Neogen사(미국)에서 시판되고 있다.

5종의 시험균주를 BHI agar(Difco) 평판배지에서 하룻밤 배양한 후, 각각 1 loop를 취하여 BHI broth(Difco)에 접종하고 진탕수조에서 5~6시간 동안 37°C, 150 rpm으로 배양하였다. 이 배양액을 BHI agar에 접종하여 37°C에서 18~20시간 배양한 후, 균 농도를 일정하게 조절하기 위하여 생리식염수로 O.D.값을 조절(ΔAbs 620 nm : O.D 0.2, 허용오차 ±0.02)하였다. 균 농도를 1×10^3/ml, 1×10^4/ml, 1×10^5/ml, 1×10^6/ml로 조절한 후 각 균액을 R-kit, V-kit 및 D-kit에 각각 적용하였다. 또한 가열균에서의 유효성을 확인하기 위하여 균액을 100°C에서 10분간 가열 후 각 키트에 100 μl씩 적용하였으며, 모든 실험은 5반복으로 실시하였다. 각 균액은 Plate Count agar(Difco) 평판배지에 100 μl를 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 접종균수를 측정하였다.

특이성 확인시험

E. coli 혈청형 O157:H7을 포함한 verotoxin-producing *E. coli*, 식품분리 *E. coli* 및 기타 장내세균을 사용하여 키트의 특이성을 확인하였다. 시험균은 BHI Agar에 접종하여 37°C에서 18~20시간 배양한 후, 배양균 1 loop를 생리식염수에

부유시켜 균 농도를 1×10^6/m*l*으로 조절하여 100°C에서 10분간 가열 후 3종의 키트에 각각 100 μ*l*씩 적용하였다. 이를 3회 반복 실험을 실시하였다.

결 과

검출감도 시험

E. coli O157:H7 표준균주 ATCC 35150, 43888, 43890, 43894, 23150을 시험균주로하여 D-kit에 대한 검출감도를 확인하였으며, 시판 R-kit 및 V-kit와 결과를 비교 검토하였다. 시험균주는 가열한 것과 가열하지 않은 것을 비교 시험하였는데 Table 1과 같이 배양액을 가열하지 않은 경우는 균 농도가 1×10^6/m*l*에서 양성으로 확인되는 반면, 가열하였을 경우는 1×10^4/m*l*에서도 양성으로 확인되었고, 1×10^3/m*l*에서는 약한 양성 반응을 보여 배양액을 가열하였을 경우 검출감도가 좋은 것으로 확인되었다. 3종의 검출 kit에 대한 비교 실험결과에 따르면, R-kit는 1×10^4/m*l* 농도에서 양성반응을 보였으나, V-kit는 1×10^5/m*l* 농도에서는 약한 반응을 보였고 1×10^6/m*l*의 농도에서는 뚜렷한 양성 반응을 보였다. 반면, D-kit는 Fig. 1에서 보는바와 같이 균 농도 m*l*당 1×10^4-1×10^9 범위에서 명확한 양성반응이 확인되었고, 시료에 따라

Table 1. Sensitivity of *E. coli* O157:H7 rapid detection kit against *E. coli* O157:H7 reference strains

E. coli O157:H7	Cell Count (/m*l*)	Non-Heating			Heating		
		R-kit	V-kit	D-kit	R-kit	V-kit	D-kit
ATCC 35150	1×10^6	±	±	+	+	+	+
	1×10^5	−	−	−	+	±	+
	1×10^4	−	−	−	±	−	+
	1×10^3	−	−	−	±	−	±
ATCC 43888	1×10^6	±	±	+	+	+	+
	1×10^5	−	−	−	+	−	+
	1×10^4	−	−	−	±	−	±
	1×10^3	−	−	−	±	−	±
ATCC 43890	1×10^6	±	±	+	+	+	+
	1×10^5	−	−	−	+	±	+
	1×10^4	−	−	−	±	−	+
	1×10^3	−	−	−	±	−	±
ATCC 23150	1×10^6	±	±	+	+	+	+
	1×10^5	−	−	−	+	±	+
	1×10^4	−	−	−	±	−	+
	1×10^3	−	−	−	±	−	±
ATCC 43896	1×10^6	±	±	+	+	+	+
	1×10^5	−	−	−	+	+	+
	1×10^4	−	−	−	±	−	+
	1×10^3	−	−	−	±	−	±

−: negative reaction, ±: weak positive reaction, +: positive reaction

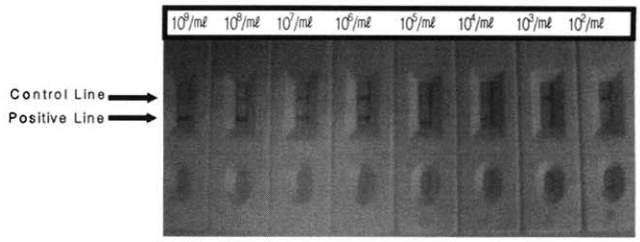

Fig. 1. Detection limit of D-kit with *E. coli* O157:H7 reference strain. Concentration more than 10^4/m*l* showed a positive reaction. The upper line indicates color indicator (control line) and lower line means antigen-antibody reaction (antigens are present in the sample). So, two red line indicates positive result and one red line indicates negative result.

1×10^3/m*l*에서도 확인되는 사례가 있어 다른 키트에 비해 검출감도가 좋은 것으로 확인되었다. 아래 적색선은 시료에 항체가 존재하여 항원-항체 반응이 일어난 것을 의미하며 위의 적색선은 대조선을 의미한다. 따라서 두 개의 적색선이 확인될 경우 양성으로 판정하고 윗부분의 적색선만이 확인될 경우 음성으로 결과를 판정한다. Table 1에서의 결과 판정은 반응을 나타내지 않을 경우 −, 육안으로 관찰시 양성이 명확하지 않을 경우 ±, 양성으로 판정될 경우 +로 표기하였다.

특이성 확인시험

***E. coli* O157:H7에 대한 특이성 확인시험** − 미국 Pennsylvania State University의 *E. coli* Reference Center에서 분양 받은 *E. coli* O157:H7 10주와 미국 Cornell University에서 분양 받은 소 분변 분리주 12주 및 verotoxin 생성주를 대상으로 *E. coli* O157:H7에 대한 특이성을 확인하였다. 검출감도 확인시험에서 배양액을 100°C에서 10분간 가열할 경우 감도가 좋은 것으로 확인됨에 따라 본 시험에서도 배양액을 가열 후 사용하였다. 22주의 O157:H7 시험균주에 대하여 R-kit, V-kit 및 D-kit는 모두 강한 양성반응을 보였으나, *E. coli* O157:H19를 제외한 verotoxin을 생성 *E. coli*에서는 음성 반응을 보였다. 이는 시판 중인 R- 및 V-kit 뿐 아니라 유효성 평가 대상인 D-kit도 *E. coli* O157:H7에 대해서 강한 특이성을 보여주는 결과이다(Table 2). 결과 판정은 반응을 나타내지 않을 경우 −, 육안으로 관찰시 양성이 명확하지 않을 경우 ±, 양성으로 판정될 경우 +로 표기하였다.

Non-O157 *E. coli*에 대한 특이성 확인시험 − 혈청형 O157:H7을 제외한 식품분리 *E. coli* 40주를 대상으로 키트에 대한 비특이반응을 확인하였다. 혈청형 O1, O2, O5, O6, O7, O8, O16, O18, O20, O25, O26, O29, O38,

Table 2. Specificity of *E. coli* O157:H7 rapid detection kit against *E. coli* O157:H7 isolates

Species	Specificity		
	R-kit	V-kit	D-kit
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	±	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O157:H7	+	+	+
E. coli O20:H-	−	−	−
E. coli O157:H19	+	+	+
E. coli O55:H-	−	−	−
E. coli O111:H-	−	−	−
E. coli O114:H32	−	−	−
E. coli O119:H27	−	−	−
E. coli O26:H46	−	−	−

−: negative reaction, ±: weak positive reaction, +: positive reaction

O44, O55, O63, O74, O78, O81, O86a, O114, O115, O125, O146, O148, O158, O159, O161, O162, O164, O172 *E. coli* 각 배양액을 R-kit, V-kit 및 D-kit에 각각 적용하였다. 실험결과 혈청형 O148:H18 *E. coli*을 제외한 모든 분리주는 R-kit, V-kit 및 D-kit에서 음성으로 확인되었다. 혈청형 O148:H18 *E. coli* 분리주에서는 3가지 키트에서 모두 양성의 결과를 보였다(Table 3).

Non-*E. coli* Enterobacteriaceae에 대한 특이성 확인시험 − *E. coli*를 제외한 장내세균 38종을 대상으로 3가지 시험 키트에 대한 비특이반응을 시험하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 non-*E. coli* Enterobacteriaceae 37종은 3가지 kit에 대해 모두 음성반응을 보였으나 *S. gallinarium*은 위양성반응을 보이는 것으로 확인되었다.

Table 3. Sensitivity of *E. coli* O157:H7 rapid detection kit against non-O157:H7 *E. coli* isolates.

Species	O serogroup	H antigen	R-kit	V-kit	D-kit
E. coli	74	1	−	−	−
E. coli	55	NM	−	−	−
E. coli	146	UT	−	−	−
E. coli	78	6	−	−	−
E. coli	81	NM	−	−	−
E. coli	20	NM	−	−	−
E. coli	81	NM	−	−	−
E. coli	18	5	−	−	−
E. coli	172	NM	−	−	−
E. coli	1	7	−	−	−
E. coli	18	33	−	−	−
E. coli	161	11	−	−	−
E. coli	25	4	−	−	−
E. coli	5	21	−	−	−
E. coli	125	UT	−	−	−
E. coli	44	45	−	−	−
E. coli	16	NM	−	−	−
E. coli	44	NM	−	−	−
E. coli	6	NM	−	−	−
E. coli	162	NM	−	−	−
E. coli	158	6	−	−	−
E. coli	55	NM	−	−	−
E. coli	18	NM	−	−	−
E. coli	7	4	−	−	−
E. coli	29	12	−	−	−
E. coli	2	NM	−	−	−
E. coli	86a	AGG	−	−	−
E. coli	6	12	−	−	−
E. coli	63	NM	−	−	−
E. coli	38	26	−	−	−
E. coli	UT	NM	−	−	−
E. coli	115	40	−	−	−
E. coli	55	26	−	−	−
E. coli	26	4	−	−	−
E. coli	159	UT	−	−	−
E. coli	114	NM	−	−	−
E. coli	148	18	+	+	+
E. coli	164	UT	−	−	−
E. coli	8	NM	−	−	−
E. coli	5	NM	−	−	−

−: negative reaction, +: positive reaction, NM: non motile, AGG: agglutination, UT: untyphable

고 찰

본 논문의 유효성 평가 대상인 D-kit 및 V-kit와 R-kit는 면역크로마토그래피 원리를 이용하여 개발된 것으로서 O157

Table 4. Sensitivity of *E. coli* O157:H7 rapid detection kit against non-*E. coli* Enterobacteriaceae

Species	R-kit	V-kit	D-kit
Serratia entomophila	-	-	-
Vibrio mimicus	–	–	–
Citrobacter freundii	–	–	–
Salmonella typhimurium	–	–	–
Klebsiella planticola	–	–	–
Escherichia sp	–	–	–
Pseudomonas putida	–	–	–
Serratia marcescens	–	–	–
Klebsiella oxytoca	–	–	–
Providencia stuartii	–	–	–
Shigella sonnei	–	–	–
Enterobacter aerogenes	–	–	–
Shigella flexneri	–	–	–
Serratia odorifera	–	–	–
Enterobacter pyrinus	–	–	–
Kluoyvera cryocroescens	–	–	–
Alcaligenes faecalis	–	–	–
Aeromonas hydrophila	–	–	–
Acinetobacter baumannii	–	–	–
Pseudomonas oleovorans	–	–	–
Proteus mirabilis	–	–	–
Tatumella ptyseos	–	–	–
Salmonella choleraesuis	–	–	–
Agrobacterium rhizogenes	–	–	–
Ewingella americana	–	–	–
Enterobacter leraicum	–	–	–
Acetobacter aceti	–	–	–
Pantoea ananatis	–	–	–
Vibrio parahaemolyticus	–	–	–
Erwinia tracheiphila	–	–	–
Erwinia carotovora	–	–	–
Escherichia sp	–	–	
Pantoea citrea	–	–	–
Flavobacterium lutescens	–	–	–
Pseudomonas fluorescens	–	–	–
Klebsiella aerogenes	–	–	–
Pseudomonas methanolica	–	–	–
Salmonella gallunarium	+	+	+

–: negative reaction, +: positive reaction

항원에 대한 항체와 금입자 접합체(colloidal gold conjugate)를 이용하여 *E. coli* O157:H7을 검출하는 방식이 사용되었다.[12] 검체인 증균배양액을 검체흡수패드에 떨어뜨리면 먼저 금입자-항O157 항체 접합체가 흡착되어 있는 패드를 통과하게 되고, 검체와 접합체는 모세작용에 의해 스트립 막을 따라 이동하면서 항O157 항체가 흡착된 시험선 지역을 지나게 된다. 검체내에 O157 항원이 존재하면 금입자-항체 접합체와 반응하여 복합체를 이루게 되고, 이것이 시험선 지역의 항체와 반응하여 시험선 지역 및 대조선에 적색선이 나타나게 된다. 반면, 검체내에 O157 항원이 존재하지 않으면 시험선 지역의 적색선은 확인되지 않고 대조선만이 확인된다. 대조선 지역에서의 적색선의 존재는 검사의 유효성을 확인하는 것으로서 대조선이 나타나지 않으면 이 분석은 무효로 처리하여 재시험 대상으로 하였다. 면역크로마토그래피에 의한 *E. coli* O157:H7 검출은 식품시료의 경우 24시간 증균배양 후 바로 적용할 수 있고, 임상검체의 경우는 증균 또는 그대로 키트에 적용할 수 있어 신속하게 존재 여부를 판정할 수 있는 장점이 확인되었다.

현재 사용되는 병원성 *E. coli* O157:H7 진단방법은 크게 3가지로 분류할 수 있다. 각각의 진단방법에는 균주의 생화학적, 유전학적, 면역학적 특성을 검사하는 원리를 이용하며, 분석하고자 하는 목적에 따라 검사법을 선택할 수 있고 방법마다 특징적인 장단점이 존재한다. 생화학적 방법은 초기에 개발된 방법으로서 *E. coli* O157:H7이 sorbitol을 이용하지 못하는 특성과 β-glucuronidase 활성이 없다는 생화학적 특성을 이용하여 확인하는 방법이다.[6] 유전학적 방법은 PCR을 이용하여 균주의 특정 DNA 서열을 증폭하여 진단하는 방법이며,[7-10] 면역학적 방법은 항체를 이용하여 균주의 특이항원을 측정하여 검사하는 면역분석검사법이다.[11-14] 이들 중 정확하고 빠른 시간내에 많은 검체를 검사할 수 있는 진단방법으로는 항체를 이용한 효소면역측정법이 주로 사용되고 있다. 이 방법은 민감도가 우수하며, 다른 *E. coli*와 교차반응성이 적어 비교적 높은 특이성을 보인다. 이들 제품의 형태는 ELISA 키트 또는 면역크로마토그래피법의 신속검사키트 등으로 개발되어 사용되고 있는데 균주가 분비하는 verotoxin에 대한 항체를 사용하거나 O157:H7 균주만의 특이항원에 대한 항체를 사용하는 방법이 많이 이용되고 있다. 이때 사용되는 항체의 성능에 따라 진단 키트의 민감도와 특이도가 결정되어 우수한 항체원료를 사용한 키트일수록 시료내에 적은수의 균이 존재하더라도 정확히 검출할 수 있으며, 타 장내세균 등과의 교차반응이 발생하지 않게 된다.

E. coli O157 등 식중독균을 검출하기 위하여는 DNA 검출법 및 단백질 검출법이 사용되고 있으나, PCR법은 최종 확인시험으로 많이 사용되는 반면 단백질 검출법은 신속 간이 검색법으로 많이 사용되고 있다. 시판되고 있는 신속 검출 키트로는 Difco EZ Coli Rapid Detection System,[19] Petrifilm Test kit-HEC system(3M Health Care, St, Paul, MN, USA),[19] BAX(Qualicon, Wilmington, Del),[23] VIDSA™ *E. coli* O15716-18), *E. coli* O157 Visual Immunoassay (Tecra Diagnostics),[15] VIP,[17] EHEC TEK ELISA system (Organon Teknika, Durham, NC, USA), Micro-Screen™

E. coli O157:H7 Kit(Neogen Corporation, Lansing, MI, USA)[21] 등이 있다. 그러나, 이들은 전량 외국에서 수입되고 있으며 국산시약개발 연구는 미진한 실정이므로 키트 수입으로 인한 외화손실을 줄이고 좀더 효율성을 갖는 키트를 개발하고자 공동연구로 도출된 본 연구 결과에 의미를 부여하였다.

Immunoassay 방법에 의한 신속 검사 키트의 경우 일반적으로 감도는 10^5 cfu/m*l*에서 10^6 cfu/m*l*로 추정되며,[15] *E. coli* O157:H7(EHEC) visual immunoprecipitate assay(VIP)의 경우 false negative 비율이 1.0%로 알려져 있다.[17] 본 실험에서 비교분석을 위하여 사용한 VIP EHEC와 Reveal *E. coli* O157:H7은 미국 농림부에서도 간이검색법으로 사용하고 있는 방법으로서 쉽게 사용할 수 있으며 장비나 교육이 요구되지 않는 좋은 시험법으로 평가하고 있다.[24] Dipstick Immunoassay에 의한 *E. coli* O157:H7 검출시험에서 10^5-10^{++6}/m*l*에서는 명확히 양성반응을 보였으나, 103/m*l*에서는 약한 양성 반응을 보였다는 실험 결과에 따라22), 본 실험에서 감도 확인시험시 103/m*l*을 최소 농도로 디자인하였다. 특히, R-kit 및 D-kit가 V-kit에 비하여 감도가 좋은 것을 확인할 수 있었다. D-kit 뿐 아니라 사용한 두 종의 키트에서도 혈청형 O157:H7 이외의 다른 *E. coli* 및 장내세균과도 3주를 제외하고는 모든 시험균에서 교차반응은 확인되지 않아 특이성도 좋은 것으로 판명되었다. 그러나, 3종의 시험 키트에서 *E. coli* O157:H19, *E. coli* O148:H18 및 Salmonella gallinarium에 대하여 위양성 결과를 보여 혈청형 O157과 이들 위양성 반응을 보인 혈청형 사이에는 유사한 혈청학적 특성이 존재하여 일어나는 결과인 것으로 추정되었다.

본 실험 결과로, 국내에서 개발된 D-kit는 검출감도가 좋고 특이성이 우수하여 식품 시료뿐 아니라 임상분리주에 대하여도 *E. coli* O157:H7의 신속간이 검사 kit로 활용이 가능한 것으로 판명되었으며, 또한 외국제품과 비교시 기술 및 가격 경쟁력을 갖추고 있는 것으로 생각된다.

감사의 말씀

이 논문은 한국과학재단 G7 선도기술 개발사업인 '병원성 대장균 O157:H7 진단시약 개발과제의 연구비지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사하는 바입니다.

국문요약

식품으로부터 다양한 병원 미생물을 신속 검출하기 위하여 다양한 검출 원리를 이용한 키트들이 개발?시판되고 있다. 검사키트는 신속, 정확하고 간단하게 사용할 수 있으므로 검사기관이나 실험실 뿐 아니라 식품회사에서 QC 또는 QA를 수행하기 위하여 사용이 증가되고 있는 추세이다. 이에 본 연구에서는 *E. coli* O157:H7의 단클론항체를 이용하여 면역크로마토그래피법에 의해 개발한 *E. coli* O157:H7 검출 키트(Donga Co, Korea, D-kit)에 대한 검출감도 및 특이성을 확인하고 식품 시료에 적용 가능성을 평가하였다. 면역크로마토그래피법에 의하여 개발?시판되고 있는 Reveal *E. coli* O157:H7 kit (Neogen Co., USA. R-kit)와 VIP EHEC kit(Biocontrol Inc., USA. V-kit)를 비교 키트로 사용하였다. *E. coli* O157:H7 표준균주를 사용하여 실시한 검출감도 확인시험 결과 R-kit 및 D-kit는 104/m*l*의 농도에서 양성으로 확인되었고 10^3/m*l*에서도 약한 양성 반응을 보였으나, V-kit는 10^5/m*l* 농도로 검출감도가 낮았다. 또한, 배양액을 가열하여 kit에 적용하는 것이 가열하지 않은 경우보다 검출감도를 높일 수 있었다. *E. coli* O157:H7 분리 22주, verotoxin 생성 *E. coli* 7주 *E. coli* 분리주 40주 및 38종의 장내세균에 대한 특이성 시험 결과 세 가지 키트 모두에서 동일한 결과를 보였는데, 시험균주 107주 중 3주를 제외한 모든 균에서 음성의 결과를 보여 특이성을 확인하였다. 세 키트에 위양성 반응을 보인 것은 *E. coli* O157:H19, *E. coli* O148:H18 및 *Salmonella gallinarium*으로 이들 혈청형과 O157:H7 사이에는 유사한 혈청학적 특성이 존재하는 것으로 추정되었다. 이상의 실험결과로 D-kit는 *E. coli* O157:H7을 검출하는데 감도 및 특이성 면에서 기존 키트인 R-kit 및 V-kit와 같이 유용한 것으로 확인되었다.

참고문헌

1. Doyle, M.P.: *Escherichia coli* and its significance in foods, *Intern. J. Food Microbiol.* **12**, 289-302 (1991).
2. Rocchi, G, and Capozzi, M: Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection, *Recent Pro. Med.*, **90**, 613-618

(1999).
3. Pebody, R.G., Furtado, C., Rojas, A., McCarthy, N., Nylen, G., Ruutu, P., Leino, T., Chalmers, R., de Jong, B., Donnelly, M., Fisher, I., Gilham, C., Graverson, L., Cheasty, T., Willshaw, G., Navarro, M., Salmon, R., Leinikki, P., Wall, P., and Bartlett, C.: An international outbreak of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network, *Epidemol. Infect*, **123**, 217-223 (1999).
4. Novello, A.: Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 and Campylobacter among attendees of the Washington County Fair-New York, *NMWR*, **48**, 803-805 (1999).
5. Chapman, P.A., Wright, DJ.. Wells, J.G., Potter, M.E., Hedberg, K., and Wachsmuth, I.K.: Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of hemolytic-uremic syndrome, Lancet **2**, 1043 (1986).
6. Hitchins, A.D., Peng, P., Watkins, W.D., Rippey, S.R. and Chandler, L.A.: *Escherichia coli* and the colifirm bacteria. In Bacteriological Analytical Manual, 8th Ed. AOAC International, MD USA, pp. 4.1-4.29 (1995).
7. Sharma, V.K., Dean-Nystrom, E.A., and Casey, T.A.: Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxigenic *E. coli*, *Molecular and Cellular Probes* **13**, 291-302 (1999).
8. 곽효선, 차진, 강길진, 김훈, 박선희, 김창민: 국내 유통식품에서 분리된 verotoxin 생성 *Escherichia coli*의 특성, *한국식품위생안전성학회지* **15**, 241-247 (2000).
9. Fortin, N.Y., Mulchandani, A., and Chen, W.: Use of Real-Time Polymerase Chain Reaction and Molecular Beacons for the Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Analytical Biochemistry*, **289**, 281-288 (2001).
10. Feng, P. and Monday S.R.: Multiplex PCR for detection of trait and virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes, *Molecular and Cellular Probes*, **14**, 333-337 (2000).
11. Park, S., and Durst, R.A.: Immunoliposome Sandwich Assay for the Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Analytical Biochemistry*, **280**, 151-158 (2000).
12. Choi, M.J., Kim, S.Y., Choi, J., and Paeng, I.R.: Labeling Digoxin Antibody with Colloidal Gold and Ferrocene for Its Use in a Membrane Immunostrip and Immunosensor, *Microchemical Journal*, **63**, 92-99 (1999).
13. Chapman, P.A, and Siddons C.A: Evaluation of a commercial enzyme immunoassay (EHEC-Tek) for detecting *Escherichia coli* O157 in beef and beef products, *Food Microbiology*, **13**, 175-182 (1996).
14. Nagy, B., Whipp, S.C., Imberechts, H., Bertschinger, H.U., Dean-Nystrom, E.A., Casey T.A., and Salajka, E.: Biological relationship between F18ab and F18ac fimbriae of enterotoxigenic and verotoxigenic Escherichia coli from weaned pigs with oedema disease or diarrhoea, *Microbial Pathogenesis*. **22**, 1-11 (1997).
15. Chapman, P.A., Cerdan Malo, A.T., Siddons, C.A. and Harkin, M: Use of commercial enzyme immunoassay and immunomagnetic seperation systems for detecting *Escherichia coli* O157 in bovine fecal samples, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(7), 2549-2553 (1997).
16. Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Ray-Gueniot, S., Boutrand-Loei, S., Meyrand, A. and Richard, Y.: Evaluation of the VIDAS methodology for detection of *Escherichia coli* O157 in food samples, *J. Food Protection*, **61**(7), 917-920 (1998).
17. Feldsine, P.T., Forgey, R.L., Falbo-Nelson, M.T. and Brunelle, S.L.: *Escherichia coli* O157:H7 visual immunoprecipitate assay: a comparative validation study, *J. AOAC International* **80**(1), 43-48 (1997).
18. Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Ray-Gueniot, S., Boutrand-Loei, S., Meyrand, A. and Richard, Y.: Detection of *Escherichia coli* O157 in french food samples using an immunomagnetic seperation method and the VIDASTM *E. coli* O157, *Letters Appl. Microbiol.* **25**, 442-446 (1997).
19. Woody, J-M., Stevenson, J.A., Wilson, R.A. and Knabel, S.J.: Comparison of the Difco EZ Coli rapid detection system and petrifilm test kit-HEC for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh and frozen groung beef, *J. Food Protection* **61**(1) 110-112 (1998).
20. Kwak, H.S. and Lee, C.S.: Characterization of the serotyping and the plasmid profile of *E. coli* isolated from foods and clinical specimens. *Korean J. Biol. Sci.* **3**, 399-405 (1999).
21. Blais, B.W., Booth, R.A., Phillippe, L.M., and Yamazaki, H.: Effect of temperature and agitation on enrichment of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using modified EC broth with novobiocin, *Intern. J. Food Microbiol.* **36**, 221-225 (1997).
22. Kim, M.S. and Doyle, M.P.: Dipstick immunoassay to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef, Appl. Environ. Microbiol. 58(5), 1764-1767 (1992).
23. Johnson, J.L., Brooke, C.L. and Fritschel, S.J.: Comparison of the BAX for screening/*E. coli* O157:H7 method with conventional methods for detection of extremely low levels of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(11), 4390-4395 (1998).
24. Giese J.: Microbial testing of produce. *Food Technology.* **57**(2), 70-73 (2003).