Shigella spp.의 특성 및 검출시험법

Microbiological Characteristics of *Shigella* spp. and its Detection Method from Foods

인예원 · 하수정 · 양승국 · 임구상 · 이경수 · 오세욱*

Ye-Won In · Su-Jeong Ha · Seung Kuk Yang · Gu Sang Yim · Kyung Soo Lee · Se-Wook Oh*

국민대학교 식품영양학과

Dept. of Food and Nutrition, Kookmin University, Seoul 136-702, Korea

서론

장내세균 속 많은 미생물 중 쉬겔라(*Shigella* spp.)는 병원성 균으로 주로 세균성 설사질환을 일으키는 원인균으로 많이 분리되고 있다. 전 세계적으로 해마다 60만명 이상의 사망자가 발생하고 있으며 우리나라에서도 꾸준히 세균성 이질 환자가 발생하고 있는 실정이다(Fig. 1). 많은 사람이 모이는 혼잡한 곳이나 비위생적인 환경에서 매우 빠른 속도로 전파될 수 있으며 식품에서도 교차오염을 통한 발병을 일으킬 수 있다. 또한, 항생제의 광범위한 사용으로 항생제 내성 *Shigella* spp.가 중요한 문제로 부각되고 있다. 이에 본 원고에서는 *Shigella* spp.에 대한 특성과 식품에서 검출법을 중심으로 정리하여 이해를 돕고자 한다.

본론

1. *Shigella* spp.의 특성

쉬겔라(*Shigella* spp.)는 사람의 세균성 이질의 원인균이며 법정 전염병 제 1군에 지정되어 관리되고 있다. 1898년 일본의 Shiga에 의해 처음 분리되었다. *Shigella* spp.은 *Enterobacterceae*과에 속하며 그람음성 간균으로 일반적으로 오염된 식수의 섭취나 오염된 물로 조리한 식품을 섭취하는 경우 감염이 이루어지며 즉석편의식품, 샐러드, 우유, 분쇄육 등 다양한 식품에서 분리가 보고되고 있다. 1~10 organisms의 매우 적은 양의 균으로도 감염을 일으키며 가구 내 2차 발병률이 10~40% 정도로 높은 것으로 알려져 있다. 대장균과 sequence가 97% 이상 일치할 정도로 유사한 점이 매우 많아 구별이 쉽지는 않은 실정이다. *Shigella* spp.

구분	'98	'99	'00	'01	'02	'03	'04	'05	'06	'07	'08
세균성이질	906	1,781	2,462	927	767	1,117	487	317	389	131	209

Fig. 1. Infections caused by *Shigella* spp., reported by Korea National Institute of Health, NIH

* Correspondence to: Se-Wook Oh
Tel: 82-2-910-5778, Cell phone: 82-10-5573-1540
Fax: 82-2-910-5249, E-mail: swoh@kookmin.ac.kr

은 혈청형과 종의 분류가 일치하며 O항원과 당을 이용한 발효 형태에 따라 크게 네가지로 나뉜다.

① *Shigella dysenteriae* (혈청군 A)
- 13 O serotypes, Glucose 분해성, Lactose 비분해성, Mannitol 비분해성

② *Shigella flexneri* (혈청군 B)
- 8 O serotypes, Glucose 분해성, Lactose 비분해성, Mannitol 분해성

③ *Shigella boydii* (혈청군 C)
- 18 O serotypes, Glucose 분해성, Lactose 비분해성, Mannitol 분해성

④ *Shigella sonnei* (혈청군 D)
- Glucose 분해성, Lactose 늦은 분해성, Mannitol 분해성

Shigella spp.는 그람음성, 비운동성, 내생포자 비형성, (0.5~1.0)×(1.0~3.0)㎛의 간균이다. 한천배지에서 잘 발육하고 포도당을 분해하여 산을 생성하지만 B군 6형을 제외하고는 가스를 발생하지 않는다. 아드니트, 이노시트, 살리신을 분해하지 않고, 젖당은 *S. sonnei*가 서서히 분해하는 예를 제외하면 거의 분해하지 않는다. DNA의 GC함량은 50~52mole%, 이 균속은 A~D의 4군 4균종(A군: *S. dysenteriae*, 1~10형, B군: *S. flexneri*, 1~6 및 X, Y의 8형. C군: *S. boydii*, 1~15형, D군: *S. sonnei*, 형별 없음)으로 나누고 있다. Shiga 적리균은 A군 1형에 해당한다. 분류근거로는 A군만이 만니톨을 분해하지 않고, D군만 젖당을 분해할 수 있다는 것, 기타는 항원적 차이(O항원)에 의한다. 또한 B군만은 형항원과 몇 개의 군에 걸치는 군항원을 갖는다. 또한 C군의 어떤 것은 대장균과 공통인 항원을 갖는다. D군은 신선분리의 I상(相)과 R형화된 Ⅱ상으로 나누어지고, I상에서 Ⅱ상으로의 상변이에 따라 항원성도 변한다. D군은 생산하는 콜리신에 의해 21의 콜리신형으로 구별되고, 역학적 조사에 이용된다. 기준종은 *S. dysenteriae*이다. 발육온도는 37℃이며 10~45℃에서도 잘 성장한다. 열에 민감한 편이며, 냉장에 저항력이 있다. 낮은 수분 활성 조건에서 느리게 사멸하는데 이 특징이 건조된 식품과 표면에서 성공적으로 생존할 수 있는 것과 관련 있는 것으로 생각되고 있다. *Shigella* spp. 중 A군 1형만 카탈라아제를 생산하지 않고, 강력한 외독소(Shiga독소)를 생산하여, 이 균속에 의한 이질 중에서 가장 심한 증상을 일으킨다. *Shigella* spp.은 항균제에 대한 내성획득 빈도가 높음으로 균 분리 후 환자의 항생제 감수성 시험이 필수적이다.

2. *Shigella* spp.에 의한 식중독 발생현황

2010년 미국 일리노이주 서브웨이 샌드위치 판매점에서 *Shigella* spp.에 의한 식중독으로 116명이 감염된 것으로 알려져 있으며 2010년 미국 CDC 보고에 의하면 *Salmonella* spp.와 *Campylobacter* spp.에 이어 세 번째로 발병률이 높은 식중독 균이라 하였다. 미국에서는 연간 10,000~20,000명의 환자가 보고되고 있다. 일본에서는 약 500명 정도의 환자가 보고되었다. 선진국에서는 *S. sonnei*가 가장 흔하며, 개발도상국 및 후진국에서는 *S. flexneri*가 가장 흔하다. 우리나라에서 최근 발생 양상으로 보면 여름보다 가을~겨울철에 중점적으로 유행하는 경향을 보이고 있으며 지역별로는 2001년에 서울, 경기도 및 제주도, 2002~2003년은 경상남도, 2004년에 충청북도, 2005년은 전라남도, 2006년에는 대구, 전라남도, 경상남도에서 발생하였으며 2007~2008년에 경기도에서 가장 많은 발생을 보였다. 항생제 내성 균주들도 다수 보고 되어 있는 실정이다.

3. *Shigella* spp. 검출 시험법

1) 국립 보건원에 따른 공인 검출 법

현재 우리나라는 식품의약품안전청에 식품에서 *Shigella* spp. 분리방법이 등재되어 있지 않으며 대부분 미 식품의약국(Food and Drug Administration)에 따라 분리하고 있으며 우리나라 감염성 실험실 진단 지침에 서술된 *Shigella* spp.의 시험법은 다음과 같다. 분변 검체의 경우 증균과정은 선택적으로 GN broth를 사용하며 환자검체의 경우 선택배지에 직접 접종하는 것이 효과적인 것으로 알려져 있다. 식품의 경우 검체 25 g을 225 ml *Shigella*

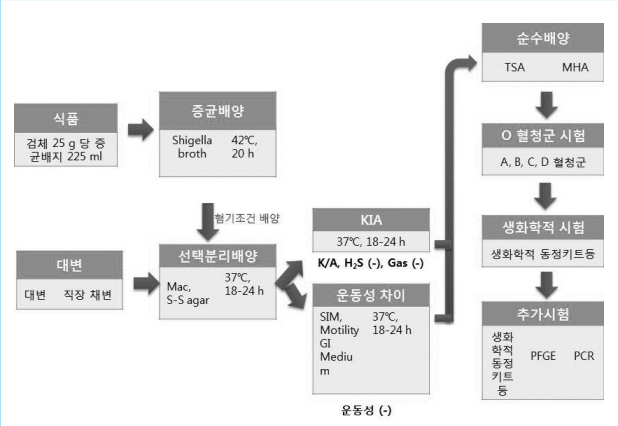

FIg. 2. *Shigella* spp. manual of Korea National Institute of Health, NIH

broth에 novobiocin 3 ㎍/g(*S. sonnei*, novobiocin 0.5 ㎍/g)을 첨가하여 42~44℃의 혐기적 조건에서 22~24시간 증균배양을 거친 후 분리배지로는 선택성이 약한 배지인 MacConkey agar(MAC)와 선택성이 강한 배지인 Salmonella Shigella agar(SSA)나 xylose lysine deoxychlate agar(XLD)를 사용하여 분리한다. lactose를 분해하지 못하기 때문에 MAC과 SSA에서는 무색의 집락을 선발하며 XLD에서는 투명한 분홍색, 적색 집락을 추정균주(presumptive colony)로 선발한다. 분리균주의 확인시험은 KIA 배지에서 H_2S 음성반응을 확인하며 미생물동정용 키트 등을 이용하여 생화학 예비동정 후 *Shigella* spp.와 일치한다고 확인된 것은 O 혈청형시험, pulsed-field gel electrophoresis(PFGE), Polymerase chain reaction(PCR)을 실시한다(Fig. 2).

2) 미국 FDA BAM에 의한 검출법

Bacteriological Analytical Manual(BAM)에 의한 검출법은 Shigella broth을 이용하여 enrichment 한 후 novobiocin을 분리를 목적으로 하는 균에 따라 첨가한다.

<Conventional culture method>

*Shigella sonnei*를 목적으로 할 경우 25 g의 sample에 Shigella broth 225 ml (7.0 ± 0.2 with sterile 1 N NaOH or 1 N HCl)을 novobiocin을 0.5 ㎕/ml /ml와 함께 첨가 한다. 상온에서 10분 방치 후 44℃에서 20시간 배양하고 MacConkey agar에 streaking한 후 37℃에서 20시간 배양하여 추정되는 콜로니를 분리한다. *S. sonnei*를 제외한 *Shigella* spp.에 대해서는 Shigella broth에 novobiocin을 3.0 ㎕/ml 첨가하여 enrichment 하도록 한다.

<DNA hybridization method>

Shigella broth에 novobiocin을 첨가하지 않고 enrichment한 후 수행한다.

이 후 생화학적 검사와 혈청형의 특성 등을 이용하여 추가 동정하여 분리한다.

3) 혈청학적 응집시험

Shigella spp.는 세포벽 항원 물질에 의해 4종류의 O 혈

Table 1. Reactions of *Shigella* and *Escherichia coli* in acetate, citrate, and mucate media[a,b]

Genera and species	Sodium acetate	%+	(%+)	Christensen's citrate	%+	(%+)	Sodium mucate	%+	(%+)
S. dysenteriae	–	0	0	-	0	0	-	0	0
S. flexneri	–	0	0	-	0	0	-	0	0
S. boydii	-	0	0	-	0	0	-	0	0
S. sonnei	-	0	0	-	0	0	D	6.4	(30.3)
E. coli	+or(+)	83.8	(9.7)	D	15.8	(18.4)	+	91.6	(1.4)
Alkalescens-Dispar biotypes		89.6	(4.7)	D	75	(12.5)	D	29.5	(27.9)

[a]+, 90% or more positive in 1 or 2 days; –, 90% or more negative; + or –, majority positive; – or +, majority negative; (+) delayed positive; D, different reactions [+,(+), –]. [b]From ref. 2. Reproduced with permission

청군으로 분류되며 각 항혈청과의 응집시험에 따라 혈청군 A(13종), B(6종), C(18종) 및 D로 세분화 된다. 혈청군 D는 집락의 형태가 smooth형인가 rough 형인가에 따라 phase Ⅰ, Ⅱ로 구분된다. 혈청학적 응집시험은 슬라이드 응집시험법으로 쉽게 판독이 가능하나 진단에 이용되는 균은 영양배지에서 자란 균을 사용하여야 한다. 시판되는 제품이나 국립보건연구원의 진단용 항혈청을 사용할 수 있으나 각각 항형청의 표기가 달라 판정범위를 확인하도록 주의해야 한다.

4) *Shigella* spp. 검출배지

식품에서 *Shigella* spp.를 분리하기 위하여 사용되는 증균배지는 Gram negative(GN) broth, Shigella broth, Selenite cystine(SC) broth가 있다. 이 배지들은 모두 당 발효에 의해 생성되는 산에 의한 영향을 피하기 위하여 적은 양의 당을 포함하고 있거나 가지고 있지 않다. GN broth는 APHA와 Nordic Committee on Food Analysis에서 권고하고 있다. GN broth는 일반적으로 그람 음성의 병원성 미생물 검출에 사용되나 식품으로부터 Shigella spp. 검출 시에도 사용되어 진다. *Shigella* broth는 질병관리본부와 미국 FDA bacteriological analytical manual(BAM), International Standards for Business, Government(ISO), American Public Health Association(APHA)에서 권고하고 있다.

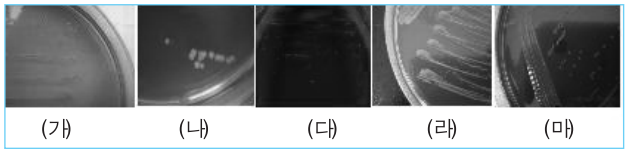

Fig 3. Properties of isolation media for *Shigella* spp.

분리배지로는 낮은 선택성을 갖는다고 알려져 있는 MAC, tergitol-7 agar(T7)가 있으며 중간 정도의 선택성 배지로 알려져 있는 xylose lysine desoxycholate agar (XLD), desoxycholate citrate agar(DCA)가 있으며 높은 선택성을 가지는 배지로는 SSA, hektoen enteric agar(HEA)가 사용되고 있다(Fig. 3). 각 분리배지 모두 *Shigella* spp.의 비락토즈 분해를 기초로 하여 개발 된 배지들이며 H_2S 발효특성을 이용하여 *Salmonella* spp.의 검출과 함께 고안된 배지이다. *Shigella* spp.는 무색의 콜로니 또는 배지와 같은 색의 콜로니를 나타낸다. 또한 개별 분리배지의 경우 분리 효율이 월등하게 높지 않기 때문에 적어도 두 가지 또는 세 가지의 분리배지를 동시에 사용하여야 식품에서 검출 확률을 증가시킬 수 있다는 보고도 있다. 따라서 각 분리배지에 대한 성능비교가 우선적으로 수행되어야 하지만 아직까지 *Shigella* spp. 분리에 사용되는 분리 배지에 대한 성능비교는 매우 제한되어 있다.

5) *Shigella* spp. 특이 유전자에 대한 검출

Polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 전형적 특징을 보이지 않는 경우에 대하여 초기 배양상태에서 *Shigella* spp.의 존재를 판단하는데 사용할 수 있다. 표적 유전자로 plasmid와 염색체 상에 존재하고 있어 안정성을 가진 invasion plasmid antigen H(*ipa*H) gene이 가장 많이 이용되고 있다(Fig. 4). *ipa*H gene은 enteroinvasive *E. coli*(EIEC)에도 특이적인 유전자이므로 같은 PCR반응물을 생성하기 때문에 생화학적 구별을 하거나 EIEC target primer를 이용하여 PCR 해야 한다. 그 밖에 *inv*, *vir*A 유전자 등도 이용되고 있다.

Medium / Low selective medium	Colour medium	Colour *Shigella* colony
(가) MacConkey agar(MAC) / Intermediate selective medium	Red-brown	Translucent, Reddish-brown
(나) Desoxycholate citrate agar(DCA)	Orange-red	Reddish
(다) Xylose lysine desoxycholate agar(XLD) / Highly selective medium	Red	Translucent, reddish
(라) Salmonella-Shigella agar(SSA)	Yellow	Translucent
(마) Hektoen Enteric agar(HEA)	Green opalescent	Greenish blue

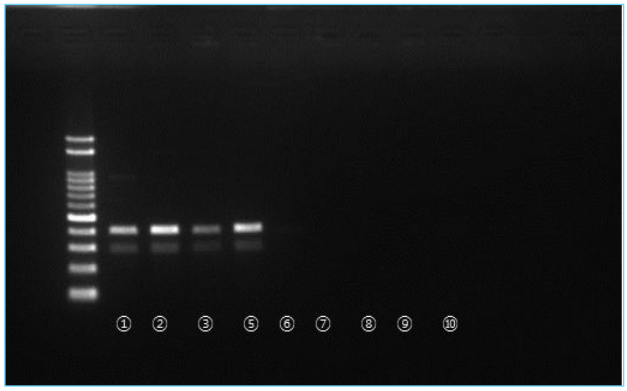

Fig. 4. Result of PCR product for detection of *ipa*H genes ① *S. sonnei*, ②*S. boydii*, ③*S. flexneri*, ④*S. dysenteriae*, ⑤*E. coli* ATCC 21052, ⑥*E. coli* O157:H7 ATCC 43890, ⑦*E. coli* O157:H7 ATCC 43894, ⑧*E. coli* O157:H7 ATCC 43895, ⑨*E. coli* O157:H7 ATCC 43889, ⑩*E. coli* ATCC 25922

최근 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 방법을 이용하여 *ipa*H gene을 표적으로 한 검출법이 보고되고 있다(Fig. 5). 또한, 생화학 및 혈청학적 확인 동정이 어려운 *Shigella* spp.가 다수 분리되고 있다고 보고되고 있으며 혈청응집과 생화학 동정의 결과가 대장균과 뚜렷하게 나타나지 않는 경우들이 대부분이다. 이 경우 유전자에 대한 검출실험 등이 추가로 시행되어야 한다.

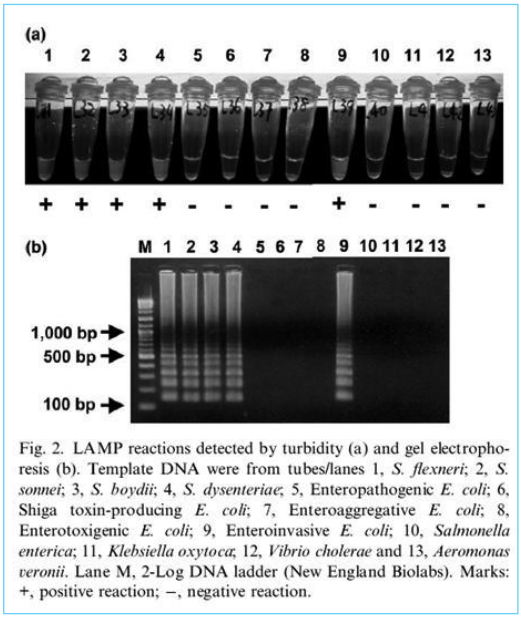

Fig. 2. LAMP reactions detected by turbidity (a) and gel electrophoresis (b). Template DNA were from tubes/lanes 1, *S. flexneri*; 2, *S. sonnei*; 3, *S. boydii*; 4, *S. dysenteriae*; 5, Enteropathogenic *E. coli*; 6, Shiga toxin-producing *E. coli*; 7, Enteroaggregative *E. coli*; 8, Enterotoxigenic *E. coli*; 9, Enteroinvasive *E. coli*; 10, *Salmonella enterica*; 11, *Klebsiella oxytoca*; 12, *Vibrio cholerae* and 13, *Aeromonas veronii*. Lane M, 2-Log DNA ladder (New England Biolabs). Marks: +, positive reaction; –, negative reaction.

Fig. 5. LAMP reactions detected by turbidity (a) and gel electrophoresis (b). Template DNA were from tubes/lanes 1, *S. flexneri* 2, *S. sonnei* 3, *S. boydii* 4, *S. dysenteriae* 5, Enteropathogenic *E. coli* 6, Shiga toxin-producing *E. coli* 7, Enteroaggregative *E. coli* 8, Enterotoxigenic *E. coli* 9, Enteroinvasive *E. coli* 10, *Salmonella enterica* 11, *Klebsiella oxytoca* 12, *Vibrio cholerae* and 13, *Aeromonas veronii*. Lane M, 2-Log DNA ladder (New England Biolabs). Marks: +, positive reaction;

결론

지금까지 세균성 이질의 원인균인 *Shigella* spp.에 대한 특성과 식중독 발생현황 및 검출법 등에 대하여 살펴보았다. 식품에서 유래된 발병이 보고되고 있음에도 불구하고 국내에서 아직까지 식품에서 *Shigella* spp.를 검출 시 공인된 시험법이 없으며 다양한 식품과 환경에 대한 *Shigella* spp. 연구가 부족한 실정이다. 식품에서 *Shigella* spp.에 의한 식중독 발병 위험에 대비하여 적절한 분리배지 및 특정 유전자를 통한 식품에서의 검출법에 대한 확립이 필요할 것으로 생각된다. 또한, 향후 계속적인 모니터링 등의 연구 수행과 함께 잠재적 위해식품에 대하여 노출평가 및 효과적인 위해평가가 수행되어야 할 것이다.

참고 문헌

1. CDC. 2010. *MMWR. Morbidty and mortality weekly report*. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA.
2. CDC. *Shigella Surveillance: Anuual Summary*, 2006. Atlanta Georgia US department of health and human services, November 2008. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA.
3. FDA. 2009. Chapter 06. *Shigella*. *Bacteriological Analytical Manual*. Food and Drug Administration, New Hampshire Ave, USA.
4. ISO. 2004. *Microbiology of food and animal feedingstuffs - Horizontal method for the detection of Shigella spp*. International Standards for Business, Government, Geneva, Switzerland.

5. APHA. 2001. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4th ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA. p 381-385
6. NMKL. *Culture method for isolation of Shigella*. 1995. no. 151. Nordic Committee on Food Analysis, Oslo, Norway.
7. Corry JEL, Curitis GDW, Baird RM. 2003. Chapter 14. Media for the isolation of *Shigella* spp. In *Handbook of Culture Media* for Food Microbiology. Elsevier science B. V., Amsterdam, Netherlands. p 209-214.
8. Yang J, Nie H, Chen L, Zang X, Yang F, Xu X, Jhu Y, Jin Q. 2007. Revisiting the molecular evolutionary history of *Shigella* spp. *J Mol Evol* 64: 71-79.
9. Zhang G, Lample KA. 2010. Comparison of chromogenic biolog rainbow agar *Shigella/Aeromonas* with xylose lysine desoxycholate agar for isolation and detection of *Shigella* spp. from foods. *J Food Prot* 73: 1458-1465.
10. In YW, Ha SJ, Oh SW. 2011. Comparison of selective media for isolation and detection of *Shigella* spp. from foods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1025-1031.
11. Song T, Toma C, N, Iwanaga M. 2005. Sensitive and rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* by a loop-mediated isothermal amplification method. *Microbiol* Letters 243: 259 – 263.