J. Fd Hyg. Safety 13(4), 425 - 429(1998)

돈육가공 작업환경에서 *Listeria monocytogenes*의 분리와 혈청형 분포조사

홍종해† · 안상철
강원대학교 수의학과

Isolation and Serotyping of *Listeria monocytogenes* in Pork Fabrication Processing Environment

Chong-Hae Hong† and Sang-Chul An
Department of Veterinary Medicine, Kangwon National University, Kangwon 200-701, Korea

ABSTRACT — Three pork fabrication processing were examined for isolation and serotyping of *Listeria monocytogenes*. Three hundred thirty samples were collected from gloves, knife sharpeners, knives, cutting boards, conveyer belts, skinning machines, working room air, pig carcasses, and cut meat. Among the 234 samples taken from processing environment, the isolation rates of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. were 17.5%, 34.2% respectively. Isolation rates of *Listeria monocytogenes* from different specimens during processing were 20.8% in gloves, 21.3% in knife sharpeners, 14.6% in knives, 20.8% in cutting boards, 28.6% in conveyer belts, 16.7% in skinnig machines. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. were not detected in working room air. Isolation rate of *Listeria monocytogenes* 14.6% in pork was increased compared to that of 8.5% in pig carcasses ($p<0.05$). The serovars of 41 isolates from processing environment were 4b 36.6%, 1/2a 24.4%, 4ab 17.0%, 4a 4.9%, 1/2c 2.4%, and 4c 2.4%. The serovars of 4b, 1/2a, 4ab were detected from carcassess and cut meats.

Key words □ *Listeria monocytogenes*, Serovar, Fabrication, Environment

식육은 도축후 냉장 또는 냉동상태로 저장, 운반, 판매되므로 저온성 세균인 *Listeria monocytogenes* 오염은 식육의 안전성을 위협하는 미생물학적 위해요인이다. *Listeria monocytogenes*는 토양, 물, 사료, 분변 등 여러 환경에서 생존하고 있으며 주로 분변오염으로 전파되므로,[1-4] 동물성 식품은 가공과정의 여러 작업환경에서 오염될 기회가 많다.[5-10]

*Listeria monocytogenes*는 1980년대초 캐나다와 미국에서 발생한 listeriosis의 역학조사에서 식품매개질병의 원인균으로 확인되었고, 그후 많은 listeriosis 역학조사에서 여러종류의 식품이 관련된 것으로 보고되었다. 미국에서는 매년 800건 정도의 listeriosis가 발생되어 공중보건학상 중요한 질병으로 다루어지고 있는데, 85%가 식품유래 발생이었으며 그중 50% 정도가 식육과 가금육이 원인식품으로 보고되었다.[11,12]

*Listeria monocytogenes*는 임산부에 감염하여 유산, 사산을, 신생아, 면역손상환자, 노인에게서는 폐렴, 심내막염, 패혈증, 국소농양, 결막염 등을 유발하여 국민건강에 큰 피해를 초래한다.[9,13-15] 사람에서 listeriosis를 일으키는 혈청형은 주로 4b, 1/2a, 1/2b 3가지이며,[9] 이 중에서 식품유래 listeriosis 발생에 가장 빈번히 관련되는 혈청형은 4b로 알려져 있다.[9,16-21] 따라서 *Listeria monocytogenes*의 혈청형 분류는 제조 및 가공공정에서의 안전성 확보 조치와 역학적 조사연구에 따른 예방대책 준비에 중요한 정보를 제공해 준다. 또한 시장개방으로 국내에서 유통되는 수입육류가 증가하고 있으므로, 앞으로 수입육에서 검출되는 *Listeria monocytogenes* 혈청형과의 비교는 오염원 추적에 도움이 되는 자료를 얻을 수 있다.

본 연구는 소비자에게 공급되는 돈육의 최종작업단계인 가공장에서의 *Listeria monocytogenes* 오염실태와 혈청형 분포상황을 분석하여 작업환경에서의 주된 오염원과 돈육을 통한 listeriosis 발생의 잠재성을 파악하고자 수행하였다.

† Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

공시재료

조사대상 육가공장은 1일 20톤 처리규모의 중급작업장 3곳을 선정하였고, 1997년 3월부터 7월까지 작업과정중에 장갑, 칼갈이, 칼, 도마, 돼지도체, 부분육에서 각각 4건씩, 운송벨트와 박피기는 각각 1건씩, 작업실 공기는 2건씩 4회에 걸쳐 시료를 채취하였다. 시료채취는 FSIS Sample Collection Guidelines[12]에 따라 대상체 표면 약 100 cm^2의 면적을 면봉을 이용하여 채취하였고, 작업실 공기는 진공펌프를 이용한 membrane filtration(pore size 0.45 μm) 방법으로 1 ft^3/min으로 5분간 반복 채취하였다. 채취한 시료는 12시간 이내에 실험실로 운반하여 실험하였다.

세균분리와 동정

Listeria spp. 분리는 Lovett,[22] McClain,[23] Lee[21]의 분리방법에 준하여 실시하였다. Swab한 면봉과 공기를 여과한 filtration membrane은 university of vermont medium broth (Difco) 10 m*l*에 접종하여 30°C에서 24시간 증균 후 modified oxford medium(Difco)에 streak하여 37°C에서 24~48시간 배양하였다.

분리균은 Seelinger 등[18]과 Ryser 등[6]의 방법에 준하여 생화학적 시험으로 동정하였다. Modified oxford medium(Difco)에서 중심에 작은 흑색점이 있는 colony를 tryptose phosphate agar(Difco)에 streak하고 37°C에서 24시간 배양후 Gram stain과 CAMP test, catalase test, tumbling motility test, rhamnose, xylose 분해능을 검사한 후, API *Listeria* kit(bioMérieux Co., France)를 사용하여 최종적으로 *Listeria monocytogenes*임을 확인하였다.

혈청형 분류

분리 · 동정된 균은 *Listeria* OI/II, OI, OIV, OV/VI, OVI, OVII, OVIII, OIX antiserum과 HA, HAB, HC, HD antiserum(Seiken Co., Japan)으로 평판응집반응을 실시하여 양성균주의 *Listeria* 혈청형을 분류하였다.[24]

O Antigen 결정—Brain heart infusion agar(Difco)에 배양한 균을 0.2% NaCl용액에 약 10 mg/m*l* 농도로 부유시킨 후 121°C, 30분간 고압멸균한 다음 즉시 냉각후 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 침전물을 0.2% NaCl용액 50 μ*l*에 재부유시켜 항원액으로 사용하였다. *Polyvalent antisera* OI/II, OV/VI을 각각 30 μ*l*씩 깨끗한 슬라이드글라스에 떨어뜨린 후 항원액 1 loop를 혼합하여 슬라이드를 회전시키면서 1분 이내에 응집소견을 보인 것을 양성으로 판정하였다. OI/II antisera에 양성일 경우 같은 방법으로 OI과 OIV antiserum에 응집반응을 실시하였고 OV/VI antisera에 양성인 것은 OVI, OVII, OVIII, OIX antiserum에 각각 응집반응을 실시하였다.

H antigen 결정—검사대상균을 brain heart infusion(Difco) semisolid medium(0.2% agar)에 4회 계대배양후 brain heart infusion broth(Difco) 2 m*l*에 접종하여 30°C에서 하룻밤 배양하였고, 1% formalin 첨가 생리식염수를 2 m*l* 첨가하여 혼합한 후 항원액으로 사용하였다. 시험관에 각각의 HA, HAB, HC, HD antiserum을 60 μ*l*씩 넣고 항원액 500 μ*l*를 가하여 혼합한 후 51°C의 항온수조에 1시간 반응시켜 응집유무를 판정하였다.

결 과

작업환경에서 채취한 시료의 *Listeria monocytogenes*와 기타 *Listeria* spp. 오염율은 각각 17.5%, 34.2%이었다. *Listeria monocytogenes*는 장갑 20.8%, 칼갈이 21.3%, 칼 14.6%, 도마 20.8%, 운송벨트 28.6%, 박피기 16.7%, 그외의 *Listeria* spp.는 장갑 43.8%, 칼갈이 42.6%, 칼 31.3%, 도마 39.6%, 운송벨트 28.6%, 박피기 25.0%의 오염도를 나타내었다. 작업실 공기에서는 *Listeria*균이 검출되지 않았다 (Table 1).

작업장에 반입되는 가공재료인 도체의 오염은 *Listeria monocytogenes* 8.3%, 기타 *Listeria* spp. 31.3%이었고, 가공과정을 거친 포장직전의 최종생산 돈육은 각각 14.6%, 35.4% 수준이었다(Table 2).

작업환경에서 분리한 41건의 *Listeria monocytogenes* 혈청형 분포는 4b 36.6%, 1/2a 24.4%, 4ab 17.0%, 4a 4.9%, 1/2c와 4c는 공히 2.4%로 분류되어, 작업환경을 오염시키는 주된 혈청형은 *Listeria monocytogenes* 4b, 1/2a, 4ab형으로 나타났고, 원료육인 도체와 최종생산 돈육에서도 4b, 1/

Table 1. Contamination of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in samples from pork fabrication processing environment

Source of sample	No. of samples	No. of positive samples (%)	
		Listeria monocytogenes	*Listeria* spp.
Glove	48	10 (20.8)	21 (43.8)
Knife sharpener	47	10 (21.3)	20 (42.6)
Knife	48	7 (14.6)	15 (31.3)
Cutting board	48	10 (20.8)	19 (39.6)
Conveyer belt	7	2 (28.6)	2 (28.6)
Skinning machines	12	2 (16.7)	3 (25.0)
Working room air	24	0 (0.0)	0 (0.0)
TOTAL	234	41 (17.5)	80 (34.2)

Table 2. Contamination of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in samples taken from carcasses before fabrication and pork after fabrication

Source of sample	No. of samples	No. of positive samples (%)	
		Listeria monocytogenes[a]	*Listeria* spp.
Carcass before fabrication	48	4 (8.3)	15 (31.3)
Pork after fabrication	48	7 (14.6)	17(35.4)

[a]Statistically different at $p<0.05$

Table 3. Distribution of *Listeria monocytogenes* serovars isolated in pork fabrication processing plants

Source of sample	Number of isolates	*Listeria monocytogenes* serovars (%)						
		1/2a	1/2c	4a	4ab	4b	4c	Unknown
Processing environment	10	1	1	1	0	5	0	2
Glove Knife sharpener	10	6	0	0	2	2	0	0
Knife	7	2	0	1	2	0	1	1
Cutting board	10	1	0	0	1	6	0	2
Conveyer blet	2	0	0	0	1	1	0	0
Skinning machines	2	0	0	0	1	1	0	0
Working room air	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	41(100.0)	10(24.4)	1(2.4)	2(4.9)	7(17.0)	15(36.6)	1(2.4)	5(12.2)
Carcass	4	1	0	0	0	1	0	2
Cut meat	7	1	0	0	1	3	0	2

2a, 4ab형이 검출되었다(Table 3).

고 찰

본 연구에 포함된 세곳의 작업장은 하루 20톤 규모의 돈육을 처리하는 국내 중급작업장으로 위생관리가 우선순위로 강조되는 작업장은 아니다. *Listeria monocytogenes*나 기타 *Listeria* spp.는 장갑, 칼, 칼갈이, 도마, 운송벨트, 박피기 모두에서 고르게 검출되어 작업장 전반에 대한 위생관리의 문제점이 우선 지적될 수 있다. 작업대나 위생도마 등의 위생적인 재질 선택은 biofilm 제거와 관련되어 중요하지만 더욱 강조되어야할 사항은 작업환경 및 사용도구 및 기구의 세척과 소독을 철저히 하는 것이다.[25-27] 흔히 사용되는 소독제로는 온수, 염소, 유기산 등이 있으며 불침투성 표면에 부착된 *Listeria monocytogenes*에 훨씬 효과적이다.[27] 또한 작업중에 칼이나 칼갈이, 도마 등 식육과 자주 접하는 도구를 열처리하거나 주기적인 열탕수 소독을 시행하여 교차오염의 기회를 줄이는 것이 세균오염을 감소시키는 방법이다.

작업자의 장갑에서 *Listeria monocytogenes* 오염이 높은 것은 일반 목장갑을 착용함으로써 장갑이 세균의 서식처가 되기 때문인데, 목장갑은 수분과 육즙 등의 양분을 잘 흡수하여 세균증식에 좋은 조건이 되므로 작업장내에서 식육을 직접 손으로 접촉하는 공정의 작업자들은 반드시 불침투성의 장갑을 사용하여야 한다.

원료육인 돼지도체의 *Listeria monocytogenes* 오염도는 8.3%이었으나, 작업이 진행된 후 최종육은 14.6%로 증가하였는데($p<0.05$), 이것은 호냉성 세균인 *Listeria monocytogenes*이 냉장조건하에서도 증식하므로 작업이 진행됨에 따라 여러 작업환경으로부터 오염되었음을 시사해 준다. 식육이 오염된 기구 및 도구와 접촉되거나 오염된 면장갑에 의한 교차오염이 발생되고 있음을 알 수 있다. 작업장 공기에서는 *Listeria*균이 분리되지 않아 공기로부터의 오염 가능성은 적은 것으로 나타났으나, 작업실이 포장실과 분리되지 않은 경우는 오염 가능성이 여전히 존재하고 있다.

돈육가공 작업환경에서 분리한 *Listeria monocytogenes*의 혈청형은 4b 36.6%, 1/2a 24.4%, 4ab 17.0%가 대부분이었는데, 이는 이 등[21]이 국내 육류에서 분리한 혈청형 분포와 유사하였고, 유럽, 미국, 캐나다 등지에서 주로 혈청형 1/2a, 4b가 검출되는 양상과 차이가 없었다.[6,8,19,28] 사람에서 발생하는 listeriosis가 대부분 혈청형 4b, 1/2a, 1/2b에 기인되므로,[9] 국내에서도 식육에 의한 listeriosis의 발생 가능성이 존재한다고 할 수 있다.

작업장에서의 *Listeria*균 오염을 줄이려면 작업장 시설의 위생자재 대체, 작업전후의 세척 및 소독, 작업중 칼, 공정중 도구 및 기구의 주기적인 소독, 종업원의 위생의식 제고를 위한 교육강화가 우선적으로 요구된다. 이러한 지적사항들은 근래에 설정된 축산물작업장 위생관리요령이 제대로

지켜진다면 대부분 개선될 수 있다. 그러나 국내 축산물작업장 위생관리요령은 HACCP 제도를 시행중인 미국의 Sanitation Standard Operating Procedures나 캐나다의 Prerequisite Program에 비하면 그 내용이 포괄적이고 빈약하다. 따라서 정부에서는 HACCP 제도 도입에 의한 축산물안전성 강화대책을 준비하고 있다. 그러나 현행 규정조차 현장에서 제대로 지켜지지 않는다면, 더욱 엄격한 공정관리가 요구되는 HACCP 제도의 현장 적용에는 많은 어려움이 예상된다. 업체로서는 우선 축산물작업장 위생관리요령을 준수하여 위생적인 제품을 생산하려는 노력을 기울여야만 앞으로 HACCP 제도 도입에 따른 제반여건 변화에 적응할 수 있을 것이다.

국문요약

하루 처리물량 20톤 규모의 국내 중급 돈육처리장 3군데를 대상으로 장갑, 칼갈이, 칼, 도마, 운송벨트, 박피기, 작업장내 공기, 도체, 부분육의 *Listeria monocytogenes*의 오염실태를 조사하였다. 총 시료수는 330건으로 시료는 작업이 진행되는 동안 면봉으로 대상부위의 표면 100 cm^2를 채취하였으며 검사결과는 다음과 같다. 1. 작업환경 시료 234건중 *Listeria monocytogenes* 17.5%, 기타 *Listeria* spp.는 34.2%의 분리율을 나타내었다. 2. 시료별 *Listeria monocytogenes* 분리율은 장갑 20.8%, 칼갈이 21.3%, 칼 14.6%, 도마 20.8%, 운송벨트 28.6%, 박피기 16.7%이었고, 작업장내 공기에서는 분리되지 않았다. 3. *Listeria monocytogenes* 오염은 원료육인 도체에서 8.5%인 반면 최종생산 돈육에서는 14.6%가 검출되어 작업과정에서 오염이 발생되고 있음을 알 수 있었다 ($p<0.05$). 4. 작업환경에서 분리한 41건의 *Listeria monocytogenes* 혈청형 분포는 4b 36.6%, 1/2a 24.4%, 4ab 17.0%, 4a 4.9%, 1/2c와 4c는 공히 2.4%이었고, 도체 및 최종생산 원료육에서는 4b, 1/2a, 4ab형이 검출되었다.

참고문헌

1. Wei, J. and Seelinger H.P.R.: Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiology,* **30**, 29-32 (1975).
2. Brackett, R.E.: Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Technology*, 162-164 (1988).
3. Donnelly, C.W., Brackett, R.E., Doores, S., Lee, W.H. and Lovett J.: *Listeria. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3th(ed.), Cap. 38, 637-663 (1992).
4. Garcia, E., De, P.M., Rodriguez, J.L., Gaya, D., Medina, M. and Nunez M.: Exogenous Sources of *Listeria contamination* in raw ewe's milk. *J. Food Prot.,* **59**, 950-954 (1996).
5. Johnson, J., Doyle, M.P. and Cassens, R.G.: Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef. *J. Food Prot.,* **49**, 847 (1986).
6. Ryser, E.T. and Marth, E.H.: Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of cheddar cheese. *J. Food Prot.,* **49**, 848 (1986).
7. Buldrini, A., Maini, C. and Sanavio, G.: *Listeria* spp. isolation from dairy and meat food products. *Dairy Science Abstracts,* **52**, 900 (1990).
8. Wong, H.C., Chao, W.L. and Lee, S.J.: Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Tiwan. *Appl. & Environ. Microbiol.,* **56**, 3101-3104 (1990).
9. Farber, J.M. and Peterkin, P.I.: *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews,* **55**, 476-511 (1991).
10. Sammarco, M.L., Ripabelli, G., Ruberto, A., Iannitto, G. and Grasso, G.M.: Prevalence of Salmonellae, Listeriae, Yersiniae in the slaughterhouse environment and on work surfaces, equipment and workers. *J. Food Prot.,* **60**, 367-371 (1997).
11. Rorvik, L.M., Caugant, D.A., Yndestad, M.: Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoke salmon processing plant. *Int. J. Food Microbiol.,* **25**, 19-27 (1995).
12. Berry, M.N.: American Importers & Exporters Meat Products Group, HACCP system. *Federal Register Part II. Department of Agriculture*, FSIS, PCFR Part 304, Pathogen Reduction, *Final Rule,* **61**, 38806-38989 (1996).
13. Gray, M.L.: Epidemiological aspects of listeriosis. *A.J.P. H.,* **53**, 554-563 (1963).
14. Broome, C.V., Ciesielski, C.A., Linnan, M.J. and High-

tower, A.W.: Listeriosis in the united states. *J. Food Prot.*, **49**, 848-850 (1986).
15. Donnelly, C.W., Briggs, E.H. and Baigent, G.J.: Analysis of raw milk for the epidemic serotype of *Listeria monocytogenes* linked to an outbreak of listeriosis in California. *J. Food Prot.*, **49**, 846-847 (1986).
16. Schlech II, W.F.: Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes. Food Technology*, 176-178 (1988).
17. Kathariou, S., Mizumoto, C., Allen, R.D., Fok, A.K. and Benedict, A.A.: Monoclonal antibodies with a high degree of specificity for *Listeria monocytogenes* serotype 4b. *Appl. & Environ. Microbiol.*, **60**, 3548-3552 (1994).
18. Seelinger, H.P.R. and Höhne, K.: Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Method in Microbiology*. Bergen In T., Norris J. R.(ed.), Academic Press London, Chap. 2, 13, 31-49 (1979).
19. Pearson, L.J. and Marth, E.H.: *Listeria monocytogenes*-threat to a safe food supply; A review. *J. Dairy Sci.*, **73**, 912-928 (1990).
20. Jacquet, C., Catimel, B., Brosch, R. and Buchrieser, C.: Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Appl. & Environ. Microbiol.*, **61**, 2242-2246 (1995).
21. 이용우, 김봉수, 이기홍, 김현경: 한국에서 분리된 *Listeria*균속에 대한 세균학적 조사연구. 국립보건원보, **29**, 49-57 (1992).
22. Lovett, J.: Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes. Food Technology*, 172-175, (1988).
23. McClain, D. and Lee, W.H.: Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. *J Assoc Off Anal Chem.*, **77**, 660-664 (1988).
24. Benette, R.W. and Weaver, R.E.: Serodiagnosis of Listeria monocytogenes. FDA Bacteriological Analytical Manual. 8th.(ed). Chap. 11 (1995).
25. Krisinski, E.P., Brown, L.J. and Marchisello, T.J.: Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *J. Food Prot.*, **55**, 246-251 (1991).
26. Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J. and Savoie, L.: Characterization of physicochemical forces involved on adhesion of Listeria monocytogenes to surfaces. *Appl. & Environ. Microbiol.*, **57**, 1969-1973 (1991).
27. Helke, D.M. and Wong, A.C.L.: Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-N rubber. *J. Food Prot.*, **57**, 963-968 (1994).
28. Wang, G. H., Yan, K. T., Feng, X. M. and Chen, S. M.: Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from retail meats in Beijing. *J. Food Prot.*, **55**, 56-58 (1992).