J. Fd Hyg. Safety
Vol. 23, No. 3, pp. 248~256 (2008)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

축산물유래 *Listeria monocytogenes*의 virulence marker 및 gene 조사

이철현 · 송현호[2] · 김미령[2] · 강호조[1] · 손원근[2]*
국립수의과학검역원, [1]경상대학교 동물의학연구소, [2]제주대학교 수의과대학

Exploration of Virulence Markers and Genes of *Listeria monocytogenes* Isolated from Animal Products

Chul-hyeon Yi, Hyeon-ho Song[2], Mi-ryung Kim[2], Ho-jo Kang[1], and Won-geun Son[2]*
National Veterinary Research and Quarantine Service, Anyang 430-824, Korea
[1]College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Chinju, 620-900, Korea
[2]College of Veterinary Medicine, Cheju National University, Jeju, 690-756, Korea
(Received May 20, 2008/Revised August 19, 2008/Accepted September 4, 2008)

ABSTRACT – To investigate the epidemiological characteristics of 68 *Listeria monocytogenes* isolates, including 11 reference strains and 57 isolates from imported US beef, domestic meats (beef, pork, chicken meat), raw milk, and milk plants. *L. monocytogenes* was to evaluate the production of virulence proteins, such as hemolysin (LLO) and lecithinase (LCP), the adsorption of Congo red (CRA), and to detect virulence genes using the polymerase chain reaction (PCR). In the study of virulence protein production, 68(100%), 62(91.2%), and 54(79.4%) of the 68 *L. monocytogenes* strains were positive for LLO production, the LCP test, and the CRA test, respectively, while strains of other species, such as *L. innocua*, *L. gray*, *L. murrayi*, and *L. welshimeri*, were not. There were no significant differences between *L. monocytogenes* serotypes and the ability to produce LLO or LCP. *L. monocytogenesstrains* had very high hemolytic titers (2 to 16 fold), while the other Listeria species, other than L. ivanovii and *L. seeligeri*, did not. The hemolysin activities of *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, and *L. seeligeri* usually exceeded 1.0 HU/mg, while those of other *Listeria* spp. were less than 0.04 HU/mg. In the PCR assay, all of the L. monocytogenes strains contained the *hly*A, *plc*A, *plc*B, *inl*A, and *inl*B virulence genes and produced a product of the expected size. In the PCR of the *act*A gene, the expected 385-bp product was seen in 39(57.4%) *L. monocytogenesstrains*, while an unexpected 268-bp product was seen in 29(42.6%) strains. Most *L. monocytogenes* strains isolated from Hanwoo beef produced the 385-bp *act*A gene product, while strains of imported US beef usually produced the 268-bp actA gene product. By contrast, no virulence gene products were amplified in the other Listeria spp.

Key words: Listeria monocytogenes, animal products, virulence marker, virulence gene

*Listeria monocytogenes*는 Gram 양성의 세포내기생성 간균이며 사람과 동물에 감염하여 리스테리아증을 일으킨다[11]. 이 세균은 1983년 북아메리카와 유럽에서 식품을 매개로 한 리스테리아증이 확인됨으로서 공중보건 상 중요한 병원체로 부각되었다[34]. *L. monocytogenes*는 자연계에 널리 분포하여 식육[1,11], 닭고기[1,13], 우유[1,22], 채소[18], 어패류[10] 등의 식품에서 흔히 분리된다. 이 세균은 뇌수막염, 패혈증 및 자궁내감염 등을 주증으로 하는 리스테리아증을 일으키며[7], 주로 steroid 또는 세포독성약제 투약자, AIDS, 당뇨병환자 및 알코올 중독자 등 면역결핍자에서 발생한다[6]. *Listeria* 속에는 *L. monocytogenes, L. innocua, L. welshimeri, L. seeligeri, L. ivanovii, L. grayi* 및 *L. murrayi*, 7균종이 있으며 *L. grayi* 와 *L. murrayi*를 동일종으로 분류하여 6종으로 나누기도 한다. 이들 중 사람과 동물에 병원성을 나타내는 주요 균종은 *L. monocytogenes*이다. PHLS (Public Health Laboratory Service)에 의하면 영국에서 1995~2002년 사이에 수집된 3,000명 이상의 리스테리아증 감염환자로부터 분리된 균주는 모두 *L. monocytogenes*이었으며, 많은 발생보고에서 분리균은 혈청학적으로 serotype 4b, 1/2a 및 1/2b가 대부분을 점하고 있다[24,36]. *L. ivanovii*와 *L. seeligei*도 세포내 침입 및 감염 특성을 나타내지만, 다른 *Listeria* 균종은 병원성이 없다[12,37]. 따라서 조직배양된 포

*Correspondence to: Won-geun Son, College of Veterinary Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea
Tel: 064-754-3373, Fax: 064-756-3354
E-mail: wonson@cheju.ac.kr

유동물세포를 이용하여 리스테리아속 균종의 감염력 및 독력을 파악함으로써 병원성과 관련한 특징을 분석할 수 있다[39].

리스테리아증의 감염원과 감염경로에 대한 역학적 연구를 위해서는 원인균을 분리 동정하여 그 생물학적 특성을 조사해야할 필요가 있으며[2], 또한 질병의 근원과 질병발생과의 관계를 밝히는 역학적 연구에는 병원체에 대한 보다 변별력이 높은 typing시스템이 요구된다. 이를 위해서 현재까지 biotyping, serotyping, genotyping 및 virulence factor 검출법 등에 관한 많은 연구가 수행되어 왔다[19,28]. 병원성과 관련된 virulence marker로서는 hemolysin (LLO)생산성[6], lecithinase production (LCP)[17], congo red adsorption (CRA)[25], serotype 및 기니픽 결막염형성 등의 방법이 알려져 있다[35]. 근래에는 분리균주를 PCR증폭하여 virulence gene의 존재를 확인하는 유전자검사법이 많이 이용되고 있다[4]. PCR 분석에 의한 polymorphism의 동정에는 *iap*; invasion associated protein[8], *inl*A 및 *inl*B; internalin[9], *act*A; actin polymerization protein[40], *hly*A[29], *plc*A; phosphatidylinositol-specific phospholipase C 및 *plc*B; phosphatidyl choline-specific phospholipase C[27]와 같은 virulence gene을 이용하는 방법이 보편화되고 있다.

강 등[1]에 의하면 국내에서도 식육, 닭고기, 원유, 유가공장, 오수, 동물사료 및 동물체표 등에서 원인균이 흔히 분리되며, 혈청학적으로 serotype 4b, 1/2a 및 1/2b가 대부분을 점하고 있다. 또한 국내에서 뇌막염 환자로부터 이 원인세균이 분리되었다는 보고는 있지만 식품매개를 통한 리스테리아증이 발생하였다는 보고는 없다. 이와 같은 국내에서의 리스테리아증 발생 가능성을 감안할 때 각종 식품에서 분리된 *L. monocytogenes*의 유래별 phenotype 및 genotype의 특성을 조사하여 병원성과 관련된 특성을 파악하고 리스테리아증 발생과의 관계를 검토하는 일은 매우 중요하다[2].

본 연구에서는 국내에서 분리된 축산물 유래 *L. monocytogenes*의 virulence marker로서 LLO, LCP, CRA, hemolysin activity 및 혈청형을 조사하는 한편 PCR을 이용하여 virulence gene (*inl*A, *inl*B, *act*A, *hly*A, *plc*A 및 *plc*B)을 분석하였다.

재료 및 방법

공시균주

시험에 사용한 균주는 본 실험실에서 분리 동정한 국내산 쇠고기, 돼지고기, 닭고기, 원유, 유가공장 및 미국산 수입쇠고기유래의 *L. monocytogenes* 57균주와 캐나다 보건후생성에서 분양받은 *L. monocytogenes* 11균주, 그리고 다른 *Listeria* spp.로서 *L. innocua* 및 *L. grayi* 각 2주, *L. seeligeri*, *L. murrayi*, *L. welshimeri* 및 *L. ivanovii* 각 1균주로서 총 76균주였다(Table 1). 이들 균주는 15% grycerol을 함유하는 tryptic soy broth (TSB, Difco)에 부유하여 −70°C deep freezer에서 보존하였으며, 실험에 사용하기 전에 tryptic soy agar (TSA, Difco)에 3회 이상 계대배양하여 사용하였다.

Serotyping

공시한 *L. monoctogenes*의 serotype 분류는 Denka Seiken (Tokyo, Japan)에서 제조된 *Listeria* O antisera (I/II, I, IV, V/VI, VI, VII, VIII, IX)와 Listeria H antisera (A, AB, C, D)를 사용하여 Seeliger와 Hohne의 방법[34]에 따라 평판 및 시험관내 응집반응을 실시하였다.

Lecithinase production(LCP)

LCP시험은 Nunes 와 Hofer의 방법[25]에 따라 시험균주를 tryptic phosphate broth(TPB, Difico)에 배양(37°C, 24h)하여 활성을 높인 다음 5% egg york를 함유한 TSA (TSA-EY)배지 표면에 spot 접종하고 37°C 에서 24~48시간 배양한 후 집락주위에 불투명대(opaque zone)를 형성하는 균주를 양성으로 판정하였다.

Congo red adsorption (CRA)

CRA시험은 Nunes와 Hofer의 방법[26]을 참고하여 0.015%의 congo red dye (Sigma, USA)를 함유한 TSA 평판에 균주를 접종하고 37°C 에서 48시간 배양하여 불그스레한 집락(reddish colony)을 형성하는 균주를 양성으로 간주하였다.

Hemolysin (LLO)

Hemolysin activity는 Sampathkumar 등[30]과 Asao 등[5]의 방법을 참고로 하여 측정하였다. 분리균주를 TPB에 접종하여 37°C 에서 24시간 배양하고 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 사용하여 측정하였다. 시료 1 ml를 0.02 M cystein-HCl (pH 5.5)와 0.9% NaCl가 함유된 0.01 M Tris-HCl buffer로 배수희석하고 면양 RBC를 최종 농도가 1%(v/v)가 되게 첨가하여 37°C 에서 1시간 배양하였다. 다음 800×g에서 10분간 원심분리하고 상층액을 spectrophotometer 540 nm에서 측정하였다. Hemolysin unit (HU)는 용혈을 나타낸 최고의 희석배수로 측정하였고, minimun hemolytic unit (MHU)는 증류수로 혈구가 완전 파괴되어 나타낸 용혈가의 50%에 해당하는 최고 희석배수로 나타내었다.

세균의 DNA 추출

DNA 분리는 Marshall 등의 방법[22]을 참고하였다. 각 균주를 10 ml의 brain heart infusion (BHI) broth에 접종하여 18시간 진탕배양(37°C, 200 rpm)한 후 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 균체를 침전시켰다. 배지성분을 제거한 후 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 같은 방법으로 2회 원심세척 하였다. 이 균체에 sodium

dodecyl sulfate (SDS)와 proteinase K를 최종농도가 0.5%가 되게 각각 100 μg/ml 씩 가하고 39°C에서 1시간 처리하여 세포막을 파괴하였다. 다음 5 M NaCl 100 μl과 0.7 M NaCl를 함유한 10% hexadecyltrimethyl ammonium bromid (CTAB) 용액 80 μl를 가하여 세포파편과 polysaccharide 및 단백질 등을 선택적으로 침전시키고 65°C에서 10분간 가온처리 하였다. 그다음 phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1)과 chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1)를 가하여 남은 단백질 성분을 제거하고 cold isopropanol로 DNA를 분리하여 침전시킨 후 냉각하였다.

PCR분석

*L. monocytogenes*에서 *inl*A, *inl*B, *act*A, *hly*A, *plc*A 및 *plc*B gene의 존재를 검사하기 위하여 사용한 primer는 Table 2와 같다.

PCR은 Acu-power PCR premixer (Bioneer Co.)를 이용하였다. *inl*A와 *inl*B, 그리고 *plc*A와 *plc*B의 검출을 위해서는 각각 one-tube에서 multiplex PCR을 실시하였으며, actA와 hlyA의 검출을 위해서는 각각 따로 PCR을 수행하였다. PCR premixer에 1 μl의 *Listeria* template DNA, 1 μl 씩의 각 primer (25 pM)와 멸균한 3차 증류수를 첨가하여 최종 20 μl가 되도록 하였다. 대조시험관에는 primer가 없는 template DNA 또는 template DNA가 없는 primer를 가하여 PCR분석시료로 사용하였다. PCR분석은 Bubert 등의 방법[8]에 따라 Thermocycler (GeneAmp PCR systerm 9700, ABS., USA)로 시료 DNA를 증폭하였다. 증폭횟수는 총 35 cycle로 하였으며, 매 cycle 당 94°C에서 1분간 denaturation, 60°C에서 2분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension 순으로 반응시켰다. 다음 PCR products 3 μl를 즉시 1.5% agarose gel로 전기영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 target DNA의 증폭 여부를 확인하였다.

통계분석

통계처리는 SAS (statistical analysis software)[31] 프로그

Table 1. *Listeria* strains used in study

Serial no.	Species	Reference/Isolates	Serotype	Source	Origin
1	*L. monocytogenes*	Scott A	4b	NK	Canada
2	*L. monocytogenes*	#410	1/2a	NK	Canada
3	*L. monocytogenes*	#503	1/2b	NK	Canada
4	*L. monocytogenes*	#12	1/2c	NK	Canada
5	*L. monocytogenes*	ATCC 19113	3a	human	Denmark
6	*L. monocytogenes*		3b	NK	USA
7	*L. monocytogenes*	ATCC 19117	4d	sheep	USA
8	*L. monocytogenes*	ATCC 19118	4e	chicken	England
9	*L. monocytogenes*	EGD	1/2a	patient	Canada
10	*L. monocytogenes*	BDF 415	3c	patient	Canada
11	*L. monocytogenes*	R		NK	Canada
12	*L. innocua*	#1103		NK	Canada
13	*L. innocua*	ATCC 33090		cow brain	USA
14	*L. seeligeri*	LA 15		NK	Canada
15	*L. grayi*	#29		NK	Canada
16	*L. grayi*	ATCC 19120		rabbit feces	Denmark
17	*L. murrayi*	ATCC 25401		corn	Canada
18	*L. welshimeri*	ATCC 35897		plant	Canada
19	*L. ivanovii*	ATCC 19119		sheep	Bulgaria
20-28	*L. monocytogenes*	isolates	1/2a, 4b	beef	Korea 1997
29-36	*L. monocytogenes*	isolates	1/2a, 3b, 4b	pork	Korea 1997
37-46	*L. monocytogenes*	isolates	1/2b, 3b, 4b, 1/2c	chicken	Korea 1997
47-53	*L. monocytogenes*	isolates	1/2b, 4b	raw milk	Korea 2001
54-63	*L. monocytogenes*	isolates	4c, 1/2b, 1/2c	milk plant	Korea 2001
64-76	*L. monocytogenes*	isolates	4b, 3b, 1/2b	imported beef	Korea 1997-2000

NK; not known

램에서 카이스퀘어 검증으로 virulence marker와 serotype 간의 유의성을 측정하였다($p < 0.05$).

결 과

Virulence marker 조사

공시된 *L. monocytogenes*와 *Listeria* spp.에 대하여 virulence marker 양성률을 조사하고 serotype에 대한 상관관계를 검토한 결과는 Table 3과 같다. Hemolysin (LLO) 생산시험에서 *L. monocytogenes* 68균주는 모두 양성을 나타내었으나 *L. seeligeri*와 *L. ivanovii*의 두 균주를 제외한 다른 *Listeria* spp. (*L. innocua, L. gray, L. murrayi, L. welchimeri*)는 음성이었다. Lecithinase production (LCP) 의 양성률은 *L. monocytogenes*의 경우 94.1% (68균주 중 64균주)이었고, 다른 *Listeria* spp.는 33.3%이었다. 또한 Congo red adsorption (CRA)이 확인된 균주는 *L. monocytogenes*의 경우 77.9%(68균주 중 64균주)이었고, *Listeria* spp.는 9균주 중 1주이었다. Serotype에 따른 virulence marker간의 양성률에 대한 상관관계를 조사한 결과 LLO와 LCP간에는 통계적으로 유의적인 차이가 없었고, CRA는 LLO와 LCP에 비하여 낮게 나타났으며($p < 0.05$), serotype 1/2b와 4b간에는 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

Hemolysin activity

Listeria spp.가 생산한 균체외 단백질의 면양적혈구에 대한 hemolytic titer와 hemolysin activity를 측정한 결과는 Table 4와 같다. Hemolytic titer (Minimum hemolysin unit, MHU)는 *L. monocytogenes*의 경우 2배 희석배수에서 16배에 이르기까지 다양한 반응을 나타내었으며, *L. seeligeri*와 *L. ivanovii*의 두 균주를 제외한 다른 *Listeria* spp.는 원액에서도 용혈성을 나타내지 않았다. Hemolysin activity (HU/mg DW)를 측정한 바 *L. monocytogenes* 66균주(97%)와 *L. seeligeri* 및 *L. ivanovii*에서는 1.0 HU/mg 이상의 용혈성을 나타내었으나, 다른 *Listeria* spp.는 모두 0.04 HU/mg 이하였다.

Virulence gene의 PCR분석

*L. monocytogenes*에 대한 virulence gene의 특성을 조사할 목적으로 6종의 primer를 사용하여 PCR분석한 결과 Table 5에서와 같이 모든 분리균주에서는 예상한 크기의

Table 2. Primer pairs used for amplification of virulence genes in *Listeria monocytogenes* isolates

Primer	Sequence(5'-3')	Size of gene (bp)	Location in gene	Product size (bp)	GenBank Accession No.	References
*inl*A	F CCT AGC AGG TCT AAC CGC AC R TCT CTA ATT TGG TTA TGC CC	2403	936-1190	255	AZ012346	Vines and-swarninathan, 1998
*inl*B	F AAA GCA CGA TTT CAT GGG AG R ACA TAG CCT TGT TTG GTC GG	1893	922-1067	146	AJ012346	Ericsson et al., 2000
*act*A	F GAC GAA AAT CCC GAA GTG AA R CTA GCG AAG GTG CTG TTT CC	1815	691-958	268	AF103807	Jaradat et al., 2002
*hly*A	F CGG AGG TTC CGC AAA AGA TG R CCT CCA GAG TCA TCG ATG TT	1590	1044-1277	234	M24199	Mengaud et al., 1989 Furrer et al.,1991
*plc*A	F CGA GCA AAA CAG CAA CGA TA R CCG CGG ACA TCA TTT AAT GT	954	447-575	129	X54618	Leimeister-wachter et al., 1991
*plc*B	F GGG AAA TTT GAC ACT GCG TT R ATT TTC GGG TAG TCC GCT TT	870	463-723	261	M82881	Vasquez-Boland et al., 1992

Table 3. Correlation between virulence markers of *L. monocytogenes* strains by serotype

Serotype	No. of strains tested	Virulence markers		
		LLO[a](+) No. (%)	LCP[a](+) No. (%)	CRA[a](+) No. (%)
1/2b	29	29[b](100)	28[b](96.6)	22(75.9)
4b	15	15[c](100)	12[c](80.0)	9(60.0)
3b	5	5	5	5
4c	4	4	4	4
1/2a	2	2	2	2
1/2c	1	1	1	1
UT	1	1	1	1
Reference	11	11(100)	11(100)	9(81.8)
Total	68	68(100)	64(94.1)	53(77.9)

[a] LLO, hemolysin; LCP, lecithinase; CRA, congo red adsorption; UT, untyped.
[b,c] Same letters indicate no statistically significant difference.

Table 4. Hemolytic titers and hemolysin activities of *Listeria monocytogenes* cultured in tryptose phosphate broth

	Serotype	No. of stains tested	Hemolytic titers (MHU)				Hemolysin Hu/mg DW			
			UD 2	4	8	16	> 0.1	0.1~1.0	1.0~1.5	1.5 <
L. monocytogenes	1/2b	29	1	1	17	10		2	22	5
L. monocytogenes	4b	15	1	2	9	3		4	9	2
L. monocytogenes	3b	5			4	1		1	3	1
L. monocytogenes	4c	4			1	3			3	1
L. monocytogenes	1/2a	2		2					2	
L. monocytogenes	1/2c	1				1			1	
L. monocytogenes	UT	1		1					1	
L. innocua		2	2				2			
L. seeligeri		1		1					1	
L. grayi		2	1	1			2			
L. murrayi		1	1				1			
L. welshimeri		1	1				1			
L. ivanovii		1				1			1	

MHU, Minimum Hemolytic Units; UD, Undiluted no hemolysis; UT, untyped.

Table 5. Genotypic characterization of virulent genes in *Listeria* spp. reference strains

Species	Strains	Serotype	PCR (bp)					
			*hly*A	*plc*A	*plc*B	*inl*A	*inl*B	*act*A
L. monocytogenes	#3 scottA	4b	220	129	260	255	150	385
L. monocytogenes	#410	1/2a	220	129	260	255	150	385
L. monocytogenes	#503	1/2b	220	129	260	255	150	268
L. monocytogenes	#12	1/2c	220	129	260	255	150	385
L. monocytogenes	ATCC 19113	3a	220	129	260	255	150	385
L. monocytogenes	-	3b	220	129	260	255	150	268
L. monocytogenes	ATCC 19117	4d	220	129	260	255	150	385
L. monocytogenes	ATCC 19118	4e	220	129	260	255	150	268
L. monocytogenes	EGD	1/2a	220	129	260	255	150	385
L. monocytogenes	BDF 415	3c	220	129	260	255	150	385
L. monocytogenes	R		220	129	260	255	150	385
L. innocua	#1103		-	-	-	-	-	-
L. innocua	ATCC 33090		-	-	-	-	-	-
L. seeligeri	LA 15		-	-	-	-	-	-
L. grayi	#29		-	-	-	-	-	-
L. grayi	ATCC 19120		-	-	-	-	-	-
L. marrayi	ATCC 25401		-	-	-	-	-	-
L. welshimeri	ATCC 55897		-	-	-	-	-	-
L. ivanovii	ATCC 19119		-	-	-	-	-	-

*hly*A, *plc*A, *plc*B, *inl*A, *inl*B 및 *act*A gene에 대한 증폭산물을 확인할 수 있었다. actA gene은 385 bp와 268 bp 크기의 2종류의 fragment가 검출되었으며, 다른 Listeria spp.는 어떠한 증폭산물도 보이지 않았다(Figure 1). 분리균에 대한 *act*A산물의 크기에 따른 분포상태를 조사한 바 Table 6과 같이 분리균주 57주 중 39균주(57.4%)가 큰 size (385 bp)이었고, 29균주(42.6%)는 작은 size (268 bp)이었다. 균주 유래별 size 분포에서 국내산 쇠고기(77.8%), 유가공장(80.0%) 및 닭고기(60.0%)는 큰 size의 것이 많은데 반하여 미국산 수입쇠고기에서는 작은 size가 76.9%로서 많았으며, 돼지고기 및 원유유래균주는 서로 비슷한 분포를 나타내었다.

고 찰

*Listeria monocytogenes*의 독력은 마우스 및 세포배양시험에서 균종에 따라 독성이 다른 것으로 알려져 있다[14]. 그러나 대부분의 리스테리아증 발생에서 분리균의 유래, type의 특성 및 독력 수준간의 상관관계는 명확히 밝혀지지는 않았다. 최근 연구에 의하면 식품유래균주와 임상유

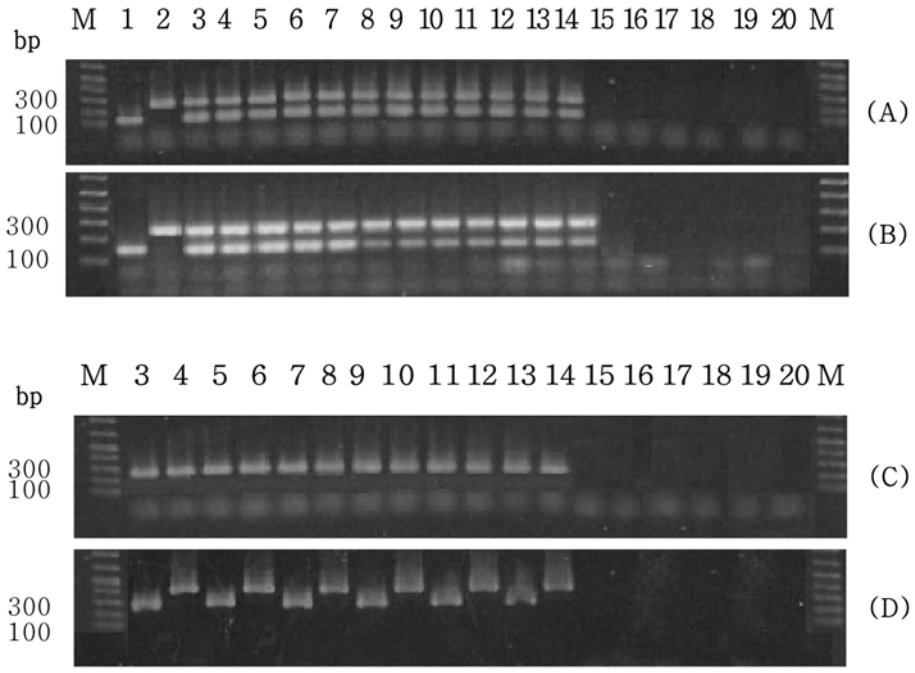

Fig. 1. Random amplification of virulence genes with four different primers; *plc*A and B (A), *inl*A and B (B), and *hly*A (C) and *act*A (D). The lanes 1 and 2 are respectivery single *plc*A and B, PCR products control of *L. monocytogenes* ATCC 19113. The others lanes- showing single(C and D) or double (A and B) PCR products- from left to right are 100bp DNA ladde (M), *L. monocytogenes* [ATCC 19128 (3), ATCC 19113 (4), #11 (5), #B32 (6), #C44 (7), #C76 (8), #P8 (9), #P9 (10), #M7 (11), #M6 (12), #MP501 (13), and #MP401 (14)], *L. innocua* ATCC 33090 (15), *L. seeligeri* LA15 (16), *L. grayi* ATCC 19120 (17), *L. murrayi* ATCC 25401 (18), *L. welshimeri* ATCC 35897 (19), and *L. ivanovii* ATCC 19119 (20).

Table 6. Variation of *act*A gene PCR products in size

Source	Origins	No. of strains tested	No of PCR products in size (bp)	
			385(%)	268(%)
Reference strains	-	11	8(72.7)	3(27.3)
Beef(imported)	USA	13	3(23.1)	10(76.9)
Beef	Korea	9	7(77.8)	2(22.2)
Chicken	Korea	10	6(60.0)	4(40.0)
Pork	Korea	8	4(50.0)	4(50.0)
Raw milk	Korea	7	3(42.9)	4(57.1)
Milk plant	Korea	10	8(80.0)	2(20.0)
Total		68	39(57.4)	29(42.6)

래균주의 독력이 통계적으로 유의한 차이를 나타내며, 임상유래균주의 치사량이 약간 낮은 것으로 보고 되어있다[25]. 더욱이 *L. monocytogenes*의 serotype 가운데 4b, 1/2a 및 1/2b가 사람 및 동물의 리스테리아증 발생의 90% 이상을 점하고 있는 사실로서 입증 된다[11]. 리스테리아증과 관련된 serotype 중 4b는 세계적인 발생건수의 50% 이상을 차지하고 있으나 식품유래 균주의 항원 그룹은 1/2(1/2a, 1/2b 및 1/2c)가 주축을 이루고 있다[11]. 이와 같은 결과는 serotype 4b 균주가 serotype 1/2 균주에 비하여 포유동물 숙주세포에 대하여 적응성이 더 크다는 것을 암시하는 것으로 해석할 수 있다

본 연구에서는 축산물에서 유래한 *L. monocytogenes*의 역학적 특성을 파악할 목적으로 병원성과 관련된 virulence marker의 발현정도와 virulence gene의 보유 여부를 PCR로 조사한 결과 LLO생산성은 분리균주의 유래에 관계없이 *L. monocytogenes*와 *L. seeligeri* 및 *L. ivanovii*는 양성을 나타낸데 반하여 *L. innocua, L. grayi, L. murrayi* 및 *L. welshimeri*는 음성이었다(Table 3). 이는 Silva 등[35] 이 브라질의 치즈유래균에서 보고한 결과와 일치된다. *L. monocytogenes*의 hemolysin은 cholesterol-dependent pore-forming toxin (CDTX)군에 속하는 SLO (Streptolysin O) 관련 cytolysin이라는 것이 입증되면서 listeriolysin O (LLO)

라 불려졌고[15], 뒤이어 *L. ivanovii*의 CDTX용혈소인 ivanolysin O (ILO)가 밝혀졌으며[38], 비병원성인 *L. seeligeri*가 생산하는 hemolysin은 LLO관련 CDTX로 부르고 있다[16]. 일반적으로 혈액한천배지에서 β-hemolysis를 일으키는 *Listeria* spp.는 대부분 병원성균이고, 비용혈성균주는 비병원성균주로 간주되고 왔다[33]. 따라서 국내에서 분리되고 있는 식품유래 *L. monocytogenes*는 거의 대부분의 균주가 병원성이 있는 것으로 볼 수 있다. *Listeria* spp. 중에서 *L. ivanovii*와 *L. seeligeri*가 용혈성을 나타낸 것은 전자의 경우 CDTX용혈소인 ivanolysin O (ILO)를 가지고 있고[38], 후자는 비병원성균이나 LLO-관련 CDTX를 생성하기 때문으로 여겨진다[16].

본 시험에서 lecithinase 생산성시험 결과 94.1%에 해당하는 균주가 양성반응을 보인 것은 Silva 등[35]이 치즈유래균에서 보고한 82.6%와 Nunes와 Hofer[26]가 병원성과 관련된 *Listeria* 속균에서 보고한 88.6%에 비하여 약간 높은 수준이었다.

또한 CRA의 양성률은 77.9%로서 Silva 등[35]이 보고한 70.5%에 비하여 약간 높은 빈도를 나타내었다. LLO생산성과 LCP간에는 통계적으로 유의성있는 차이가 인정되지 않았으며($p < 0.05$), CRA의 양성률은 LLO 또는 LCP와 비교할 때 비교적 낮은 빈도를 나타내었다. 이들과 관련하여 serotype 1/2b와 4b간에도 유의적인 차이가 인정되지 않았다(Table 3). 이상과 같은 결과를 통해서 볼 때 리스테리아증의 산발적 발생이나 식품유래균에 대한 역학적 연구에서 분리균의 LLO생성시험은 균의 병원성 여부를 간주하는데 매우 신뢰성이 높은 virulence marker인 것으로 사료된다.

*L. monocytogenes*의 병인론에서 internalin (*inl*A 및 *inl*B), hemolysin (*hly*A), phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC), phosphatidylcholine-specific phospholipase C (PC-PLC, *plc*B) 및 actin polymerization protein (*act*A)과 같은 다양한 독성인자가 중요시 되고 있다.9,29,40) 따라서 분리균을 PCR증폭하여 virulence gene (*inl*A, *inl*B, *act*A, *hly*A, *plc*A 및 *plc*B)의 존재를 확인함으로서 잠재적인 병원성을 파악할 수 있다[4]. 본 시험에서 *Listeria* spp. 76균주에 대한 virulence gene을 PCR 분석한 결과 모든 *L. monocytogenes*균주는 각기 예상한 크기의 *hly*, *plc*A, *plc*B, *inl*A 및 *inl*B gene을 가지고 있었다. 또한 *act*A gene은 385 bp와 268 bp 크기의 2종류로 나타났으며, 다른 *Listeria* spp.는 어떠한 증폭산물도 보이지 않았다 (Table 5 및 6, Figure 1). 이는 Jardat 등[20]이 감염환자 및 식육유래균에서 보고한 성적과 유사하다. 그러나 virulence marker 조사에서 *L. ivanovii*와 *L. seeligeri*의 두 균주는 면양적혈구를 용혈 시키고 LCP 혹은 CRA시험에서 양성반응을 보인데도 불구하고 virulence gene에 대한 어떠한 증폭산물도 나타내지 않았다. 이와 같은 이유는 *Listeria* 속의 두 균주의 경우 *L. monocytogenes*와 다른 특이의 용혈소를 가지고 있으며, 이들 유전자는 동질성이 낮고, 또한 사용한 primer가 *L. monocytogenes*의 hemolysin만을 증폭할 수 있는 특이성을 가지고 있는데서 비롯된 것으로 추측된다. 따라서 이들 *Listeria* spp.는 *L. monocytogenes*와 동일한 virulence gene을 보유하고 있지 않는 것으로 추측할 수 있다. 또한 *L. monocytogenes* 3 균주는 *plc*A, *plc*B gene의 PCR product가 검출되었지만 LCP 시험에서는 음성으로 나타났는데 이는 어떠한 원인으로 gene이 발현되지 않았든지 아니면 발현정도가 너무 미약해 본 실험에서 검출할 수 없었던 경우라고 생각된다.

*Act*A는 병원성 *Listeria*의 세포내 운동에 관여하는 단백질이며, 병원성 *Listeria*가 감염된 세포질 내에서 이동, 전파하는 데는 물론, 인접하고 있는 세포내로 침입하는데도 관여 한다[3]. 본 시험에서 분리균주의 57%가 385 bp의 *act*A gene 산물을 생산하였고, 43%는 268 bp 산물을 생산하여 reference균주(72.7%)나 미국에서 수입한 쇠고기에서 유래한 균주의 23.1%와는 차이가 있었다. 또한 국내 분리균주의 경우 한우고기, 닭고기 및 유가공장에서 큰 size의 산물을 생산한 균주가 많은데 반하여 미국산 수입 쇠고기 유래균주에서는 작은 size것이 많았다. 특히 미국산 수입쇠고기에서 작은 size의 산물이 많았던 것은 Jaradat 등[20]이 미국의 감염환자 및 식육유래균주에서 70%가 268 bp이고 30%가 385 bp이었다고 보고한 결과와 거의 일치하였다. 국내 각종 축산물에서 유래한 모든 *L. monocytogenes* 균주는 분리균의 유래에 관계없이 6종의 primer에 대한 virulence gene을 보유하고 있어 병원성균주로 잠정 인정할 수 있었다. 또한 *act*A gene의 size분포에서 국내산 쇠고기와 미국산 수입쇠고기 간에 큰 차이를 보인 것은 흥미 있는 결과이며, 이것은 국내에서 리스테리아증이 발생할 때 원인균의 유래를 밝히는데 매우 유용한 단서가 될 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 축산물 유래 *L. monocytogenes*에 대한 역학적 연구로서 분리균의 hemolysin (LLO)및 lecithinase (LCP)생산성, Congo red dye (CRA)흡수성 및 hemolysin activity를 조사하는 한편 *inl*A, *inl*B, *act*A, *hly*A, *plc*A 및 *plc*B의 virulence gene을 PCR 법으로 분석하였다.

LLO, LCP 및 CRA의 양성률은 *L. monocytogenes*의 경우 68균주 중 각각 100%, 94.1% 및 77.9%이었고, *L. ivanovii*와 *L. seeligeri*를 제외한 다른 *Listeria* spp. (*L. innocua, L. gray, L. murrayi, L. welchimeri*)는 음성이었다. LLO와 LCP간에는 통계적인 유의성은 없었으나 CRA는 약간 낮게 나타났으며 ($p < 0.05$), serotype 1/2b 및 4b 간에도 유의성이 인정되지 않았다. 면양적혈구에 대한 용혈

성 (MHU)에서 *L. monocytogenes*의 경우 2배에서 16배까지 다양한 반응을 보였으나 *L. ivanovii*와 *L. seeligeri*를 제외한 다른 *Listeria* spp.는 음성이었다. hemolysin activity (HU)는 *L. monocytogenes*의 경우 대부분의 균주가 1.0 HU/mg 이상이었으나 다른 *Listeria* spp.는 대부분 0.04 HU/mg 이하였다. PCR증폭하여 virulence gene을 분석한 결과 모든 *L. monocytogenes*는 각기 예상한 크기의 PCR 증폭산물이 검출되어 *hly*A, *plc*A, *plc*B, *inl*A 및 *inl*B gene을 보유하고 있음이 확인되었으나 다른 *Listeria* spp.는 어떠한 증폭산물도 보이지 않았다. 또한 *act*A gene에 대한 증폭산물은 385 bp와 268 bp 크기의 2종류로 각각 57.4%와 42.6%의 분포를 나타내었다. *act*A gene의 size 분포에서 국내산 쇠고기, 닭고기, 유가공장에서는 큰 size가 많았는데 반하여 미국산 수입쇠고기에서는 작은 size가 많은 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 강호조, 손원근, 강광식: 동물유래 생식품, 사료 및 분변중 *Listeria monocytogenes*의 분포와 분리균의 특성에 관한 연구 1. 원유, 우육, 계육 및 동물분변에서 *Listeria monocytogenes*의 분포, 한국수의공중보건학회지, **17**, 131-137 (1991).
2. Allerberger, F. and Fritschel, S.J.: Use of automated ribotyping of Austrian *Listeria monocytogenes* isolated to support epidemiological typing. J. Microbiol. Methods., **35**, 237-244 (1999).
3. Alvarez-Domonguez, C., Vazquez-Boland, J.A., Carrasco-Marth, E., Lopez-Mato, P. and Leyva-Cobion, F.: Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the *Listerial* surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. Infect. Immun., **65**, 78-88 (1997).
4. Amoril, J.G. and Bhunia, A.K.: Immunological and cytopathogenic properties of *Listeria monocytogenes* isolated from naturally contaminated meats. J. Food Safety., **19**, 195-207 (1999).
5. Asao, T., Kinoshita, Y., Kozaki, S., Uemura, T. and Sakaguchi, G.: Purification and some properties of Aeromonas hydrophilia hemolysin. Infect. Immun., **46**, 122-127 (1984)
6. Barclay, R., Threlfall, D.R. and Leighton, I.: Haemolysis and extracellular enzymes of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*, Med. Microbiol., **30**, 111-118 (1989).
7. Bortolussi, R. and Schlech, W.F.: Listeriosis. *In Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 4th Ed. (Remington, J.S. and klein, O. eds.) Saunders, Philadelphia, pp. 1055-1073 (1995).
8. Bubert, A., Hein, I., Rauch, M., Lehner, A., Yoon, B., Goebel, W. and Wagner, M.: Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol,. **65**, 4688-4692 (1999).
9. Ericsson. H., Stalhandske, P., Danielsson-Tham, M.L., Bannerman, E., Bille, J., Jacquet, C., Rocourt, J. and Tham, W.: Division of *Listeria monocytogenes* serovar 4b strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 3872-3874 (1995).
10. Farber, J.M. and Daley, E.: Presence and growth of *Liateria monocytogenes* in naturally-contaminated meats. International J. Food Microbiol., **22**, 33-42 (1994).
11. Farber, J.M. and Peterkin, P.I.: *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen, Microbiol. Rev., **55**, 752-811 (1991).
12. Farber, J.M. and Speirs, J.I.: Potential use of continuous cell lines to distinguishbetween pathogenic and nonpathogenic *Listeria* spp. J. Clin. Microbiol., **25**, 1463-1466 (1987).
13. Fletcher, D. L., Baltey, J.S., and Cox, N.A.: Recovery and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* from broiler chickens in the southeastern United States. J. Food Protect., **52**, 148-150 (1989).
14. Francis, M. S. and C. J. Thomas.: The *Listeria monocytogenes* gene ctpA encodes a putative P-type ATPase involved in copper transport. Mol. Gen. Genet., **253**, 484-491 (1997).
15. Geoffroy, C., Gaillard, J.L., Alouf, J.E. and Berche, P.: Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. Infect. immun., **55**, 1641-1646 (1987).
16. Geoffroy, C., Gaillard, J.L., Alouf, J.E., and Berche, P.: Production of thiol-dependent haemolysins by *Listeria monocytogenes* and related species. J. Gen. Microbiol., **135**, 481-487 (1989).
17. Goldfine, H.: The functions of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC), and the brosd range phospholipase C (PC-PLC) in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *In Proceedings of the XII International Symposium on problems of Listeriosis*, Perth. Western Australia pp. 204-205 (1995).
18. Heisick, J.E., Wagner, D.E., and Nierman, M. L.: *Listeria* spp. found on fresh market produce. Appl. Environ. Microbiol., **55**, 1925-1927 (1989).
19. Jacquet, C., Thierry, D., Veit, P., Guesdon, J.L. and Rocourt, J.: Evaluation of an rDNA *Listeria probe for Listeria monocytogenes* typing. APMIS., **107**, 624-630 (1999).
20. Jaradat, Z.W., Schutze, G.E. and Bhunia, A.K.: Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. Int. J. food Microbiol., **76**, 1-10 (2002).
21. Liewen, M.B., and Plautz, M.W.: Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. J. Food Prot., **51**, 840-841 (1988).
22. Marshall, S., Clark, C.G., Wang, G., Mulvey, M., Kelly, M.T. and Johnson, W.M.: Comparison of molecular methods for typing *Vibrio parahaemolyticus*. J. Clin. Microbiol., 37, 2437-2478 (1999).
23. McLauchlin, J. and Jones, D.: Erysipelothrix and *Listeria*. In *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9th Ed (Borriello, S.P. and Duerden. B.I. eds) Systematic Bacteriology, vol. 2. Update 1. CD Rom London, Amold. (1999).

24. Newton, L., Hall, S.M., Pelerin, M. and McLauchlin, J.: Listeriosis survillance 1991. PHLS Commun. Dis. Rep., **2**, 142-144 (1992).
25. Norrung, B. and J. K. Andersen.: Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol., **30**, 228-232 (2000).
26. Nunes, Z.G. and Hofer, E. Evaluation of phenotypic markers associated with pathogenicity in the genus *Listeria*. Rev. Inst. Med. Trop., **30**, 293-299 (1994).
27. Portnoy, D.A., Chakraborty, T., Goebel, W. and Cossart, P.: Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. Infect. Immun., **60**, 1263-1267 (1992).
28. Proctor, M.E., Brosch, R., Mellen, J.W., Garrett, L.A., Kasper, C.W. and Luchansky, J.B.: Use of pulsed-field gel electrophoresis to link sporadic cases of invasive listeriosis with recalled chocolate milk. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 3177-3179 (1995).
29. Rasmussen, O.F., Beck, T., Olsen, J.E., Dons, L. and Rossen, L.: *Listeria monocytogenes* isolates can be classified into two major types according to the sequence of the listeriolysin gene. Infect. Immun., **59**, 3945-3951 (1991).
30. Sampathkumar, B., Xavier, I.J., Yu, L.S.L. and Khachatourians, G.G.: Production of listerilysin O by *Listeria monocytogenes* (Scott A) under heat-shock conditions. Int. J. Food Microbiol., **48**, 131-137 (1999).
31. SAS.: The SAS system for window. Stastical Analysis System Institute Inc. Carg. NC, (1998).
32. Schlech, W.F., Lavigne, P.M. and Bortolussi, R.A.: Epidemic listeriosis; evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med., **308**, 203-206 (1983).
33. Seeliger, H.P.R., Schrettenjbrunner, A., Pongratz, G. and Hof, H.: Special position of strongly hemolytic strains of genus *Listeria*. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Erste Abt. Orig. Reihe A Med. Mikrobiol. Parasitol., 252, 176-190 (1982).
34. Seeliger, H.P.R. and Hohne, K.: Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. Methoda Microbiol., **13**, 31-49 (1979).
35. Silva, M.C.D., Destro, M.T., Hofer, E. and Tibana, A.: Characterization and evaluation of some virulence markers of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Brazilian cheeses using molecular, biochemical and serotyping techniques. Int. J. Food Microbiol., **63**, 275-280 (2001).
36. Smerdon, W.J., Jones, R., McLauchlin, J. and Reacher, M.: Surveillance of listeriosis in England and Wales 1995-1999. Commun. Dis. Public Health., **4**, 188-193 (2001).
37. Van Langendonck, N., Bottreau, E., Bailly, S., Tabouret, M., Marly, J., Pardon, P. and Velge, P.: Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. J. Appl. Microbiol., 85, 337-346 (1998).
38. Vazquez-Boland, J.A., Dominguez, L., Rodriguez-Ferri, E.F., and Suarez, G.: Purification and characterization of two *Listeria ivanovii* cytolysin, a sphingmyelinas C and a thiol-activated toxin (ivanolysin O). Infect. Immun., **57**, 3928-3935 (1989).
39. Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J. and Kreft, J.: *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev., **14**, 584-640 (2001).
40. Wiedmann, M., J.L., Bruce, C., Keating, A.E, Johnson, P.L., McDonough, and Batt, C.A.: Ribotypes and virulence gene polymorphism suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lincages with differences in pathogenic potential. Infect. Immun., **65**, 2707-2716 (1997).