

# HACCP 식품 안전 위해 병원미생물

---

본고는 지난 3월 10일 수의과학연구소에서  
HACCP 제도를 농장에 쉽게 적용시킨다는 취지 아래  
“HACCP 적용 병원 미생물 검출 최근 연구 동향”이란  
주제로 세미나를 개최함에 따라  
이날 박용호(서울대 수의과대)교수가 발표한 “HACCP  
식품 안전 위해 병원 미생물” 내용을 발췌·게재한 것이다.  
-편집자주-

---

## I. 서 언

세계무역기구(WTO)의 출범과 함께 각 국가들은 인체 건강에 밀접한 관련이 있는 축산 식품의 안전성 확보에 따른 국제적 유통은 물론 국내의 위생적 유통에 커다란 관심과 노력을 기울이고 있다. 이와 같은 안전하고 위생적인 축산식품 생산·공급 노력은, 영국을 비롯한 EC 국가들에 의하여 식품 안전기준의 문서화와 이의 법제화(Legislation)하였으며, 미국 및 이웃 일본에서도 모든 식품 생산업체에 이와 같은 안전기준을 의무적으로 마련토록 하는 기틀을 발표하였다.

이러한 식품생산 공정 전반에 대한 위해 여부 및 안전성을 객관적으로 확인하는 HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)제도에 기본을 두고 안전 축산물 생산을 이루어 나가고 있다.

안전 축산물 생산의 국제적인 추세에 따라 국내에서도 축산물 생산의 안전성 확보에 대한 객관적인 보증제도 마련이 시급하게 되었고, HACCP제도의 원초적인 개념 이해보다는, 과연 이를 어떻게 현장에서 적용하는가에 대한 실제적인 접근이 요구된다 하겠다.

특히, 병원성 미생물에 의한 식품오염은 가장 심각한 문제로 대두되고 있어, 주요 원

인균에 대한 정확한 진단 및 특성을 이해함이 매우 중요한 과제라 하겠다.

축산 식품과 관련된 주요 병원체는 약 25종이며, 세계적으로 축산물에서 기인될 수 있는 가장 빈번한 병원체로서는 *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* 및 드물게는 *Mycobacterium paratuberculosis* 등이 있다.

병원성대장균(O157:H7)에 의한 식중독은 1982년 미국에서 처음 보고된 후 세계적으로 문제시 되고 있다. 또한 일본에서는 1996년 6월부터 9월까지 10,000여명의 환자가 발생하여 10여명이 사망한 것으로 알려졌다. 또한 살모넬라 식중독도 세계적으로 문제시 되고 있으며, 특히 우리나라에서 가장 많이 발생하고 있으며, 아울러 리스테리아 식중독이 최근 문제시되고 있어 식품에 의한 식중독의 예방은 매우 중요한 관심사가 되고 있다. 또한, 포도상구균이 분비하는 독소에 의한 식품 오염 및 질병발생은 여전히 심각한 문제이며, 이를 방지코자 유전자 조작기법을 이용한 예방기술개발이 진행되고 있으며, 마이코박테리움에 의한 원유 및 식품오염도 새로운 문제로 대두되고 있다.

### 1. 대장균

병원성 대장균은 독신, 부착인자의 생산능력, 임상증상 등을 기초로 하여 장관병원성 대장균(Enteropathogenic *E. coli* ; EPEC), 장관독소원성대장균(Enterotoxigenic *E. coli* ETEC) 장관

침입성 대장균(Enteroinvasive *E. coli* ; ETEC), 장관출혈성 대장균(Enterohemorrhagic *E. coli* ; EHEC)등 4가지 주요균으로 분류한다.

표1. 식중독 원인 병원성 대장균의 특성

특 성	병 원 성 대 장 균			
	ETEC	EPEC	EIEC	EHEC
독 신 (toxin)	이열성 및 내열성 독신 (LT/ST)	베로독신 (Verocytotoxin)	-	베로독신 (Verocytotoxin)
장관침입성	-	-	+	-
설 사	수양성	수양성 및 혈액성	정맥 및 혈액성	수양성 및 심한 혈액성
열	낮 음	+	+	-
주요감염장관	소 장	소 장	대 장	대 장
주요 혈청형	O6:H16, O8:H9등	O26:H11, O55:H6등	O124:H7, O143:NM등	O157:H7, O26:H11등
감 염 량 (Infective dose)	많은량	많은량	적은량	적은량

우리 나라에서는 가장 흔히 발생하는 대장균 성 식중독은 장관 독소원성 대장균이며, 최근 미국이나 일본에서 문제시 되고 있는 장관 출혈성 대장균 식중독의 주요 원인 혈청형은 *E. coli* O157:H7이며, 이외에도 O26:H7, O111:H8 등이 알려져 있다.

모든 야외 분리 대장균 O157:H7은 하나 또는 2가지의 shiga-like toxin(SLT)을 산생하는 것으로 알려져 있다. 사람 유래의 균주들은 SLT-I 과 SLT-II를 산생하며 특히 SLT-III만을 산생하는 균주들이 많고 단지 SLT-I만을 산생하는 균주가 거의 없는 것으로 알려져 있다.

#### 가. *E. coli* O157:H7 분리법의 개괄도

시료를 증균배지 modified EC broth(novobio-cin 첨가)에 배양 (37°C, 24시간) → MacConkey sorbitol agar 및 Fluorocult *E. coli* O157 medium에 배양 (37°C, 24시간) → MacConkey sor-

bitol agar에서 무색, Fluorocult에서 녹색을 보이는 집락을 TSI에 접종하여 배양 (37°C, 24시간) → TSI에서 A/A(노란색/노란색)를 형성균을 대상으로 *E. coli*인지를 검사, *E. coli*와 *E. hermannii*는 IMViC test의 성적이 동일하므로 반드시 KCN test와 cellobiose분해능 등을 검사함 → 전형적인 *E. coli*의 성상균들은 대장균 O157 및 H7 항혈청으로 평판 및 시험관 응집 반응 실시.

## 2. 살모넬라

살모넬라균은 사람, 동물에 감염되며 또한 환경에도 흔히 존재할 수 있는 병원균으로서 식중독에 관련되는 주요 혈청형은 *Salmonella typhimurium* 및 *S. enteritidis* 등이다. 유럽 및 미국등에서 1984년이후 살모넬라에 의한 식중독의 발생빈도가 증가하기 시작하였고, 1988년 이후로 전세계적으로 *Salmonella enteritidis*에 의한 식중독의 폭발적인 발생으로 살모넬라식중독에 대한 관심이 크게 고조되어 왔다.

### 가. 균분리 및 동정

#### 1) 증균 배양

일반적으로 식품중 살모넬라균은 음성이어야 하므로 증균배양 과정을 거치는 것이 살모넬라균의 검출율을 높일 수 있다. 식품 25g 또는 10g을 멸균용기에 담아 증균배지(selenite cystine broth 또는 tetrathionate broth)를 첨가하여 35°C에서 24±2시간 배양한다.

#### 2) 분리 배양

배양액을 brilliant green agar, salmonella shigella agar, bismuth sulfate agar, xylose lysine desoxycholate(XLD), 또는 hektoen enteric agar에서 접종하여 35°C에서 24±2시간 배양한다. 살모넬라균으로 의심되는 집락은 다음과 같다.

Brilliant green agar <무색 집락>, Salmonella shigella agar <무색(간혹 검은색)>, Bismuth sulfate agar <검은색(갈색)>, Xylose lysine desoxycholate(XLD) <푸른색(간혹 검은색)>, Hektoen enteric agar <핑크색(중앙 검은색)> 의심스러운 집락 2개 이상을 TSI(Triple sugar agar)에 streaking하고 stabbing하여 35°C에서 24±2시간 배양한다.

TSI에서 alkaline(red) slant는 lactose나 sucrose를 발효시키지 못했다는 것을 의미하며, acid butts는 dextrose fermentation을 의미한다. 이러한 균에 대해 urease, lysine, dulcitol, decarboxylase, KCN, malonate, indole, MR-VP test, simmons citrate 등의 생화학 검사를 실시하여 동정한다.

표2. Salmonella균의 생화학적 특성

구 분	특 성
TSI	Alkaline(red) / Acid(yellow)
H <sub>2</sub> S	+
Methyl red test	+
Voges-Proskauer test	-
Simmons citrate	+
Urease	-
Lysine decarboxylase	+
Phenol red dulcitol broth	+
KCN broth	-
Malonate broth	-
Indole test	-
Polyvalent flagellar test	+
Polyvalent somatic test	+
Phenol red lactose broth	-
Phenol red sucrose broth	-

**나. 혈청형 동정**

*Salmonella*균의 혈청형동정은 somatic(O) antisera와 flagella(H) antisera와의 각각의 응집 여부로써 분류된다.

*Salmonella*로 의심되는 균은 먼저 *Salmonella* O Poly antisera A. B. C. D. E. F. G 등을 사용하여 슬라이드상에서 혈청학적 검사를 한다. 1분 이내 응집을 보아 Poly group를 결정하고 Factor antisera로 검사한다. H 항혈청은 tube agglutination technique에 의해 검사하여 최종 혈청형을 동정한다.



제품의 품질시험, 성분시험 및 미생물 시험을 하는 모습

**다. 신속검출기법**

살모넬라를 검출하기 위한 간접적인 여러 가지 방법이 AOAC에 의해 공인되어 있다. 그 방법으로는 Hydrophobic grid membrane filter, DNA hybridization, Fluorogenic and Colorimetric enzyme immunoassay, Immunodiffusion, automated conductance, PCR(polymerase chain reaction) 등이 알려져 있다.

**3. 리스테리아**

*Listeria monocytogenes*에 의한 식중독은 세계적으로 증가하고 있는 추세이며, 특히 유럽에서 많이 발생하고 있고, 국가별 인구 백만명당 발병율은 미국이 1985년에 7.0명, 캐나다는

1988년 2.3명, 프랑스는 14.7명이 발생하고 있다. 원인 식품은 주로 치즈, 우유 등과 관련된 낙농제품과 아이스크림, 생선, 육류 등 다양하다.

이 병원균은 자연계에 널리 존재하며 사람에게 감염된 경우 괴사와 화농형성 및 육아종을 형성케하여 병변을 일으켜 신체 각 부위 어떤 곳이나 독특한 병변을 일으킬 수 있고, 비교적 급성 경과를 보인 후 치사율이 높게 나타나므로 특별한 관심을 가져야 한다.

**가. 균 분리 동정**

**1) 증균 배양**

Enrichment broth(EB)에 시료를 접종시켜 30 ± 1°C에서 48 ± 2시간 동안 증균 배양한다.

**2) 선택배양**

분리선택배지(Oxford medium(OXA) 또는

Lithium chloride-phenylethanol-moxalactam (LPM) medium)에 증균 배양균을 접종시켜 37 ±1℃에서 48±2시간 배양 후 집락모양으로 *Listeria* spp.로 추정되는 균을 검사한다. OXA 배지에서 dark brown or black haloe로 둘러싸인 집락이 *Listeria*로 추정된다.

선택된 집락 최소 5개를 TSAYE(Trypticase soy agar with 0.6% yeast extract)배지에 streak하여 30±1℃온도에서 24±2시간 동안 배양한다. 충분한 세기의 white light를 이용해 배지를 45도 각도로 조사하여 Henry illumination system으로 검사할 경우 *Listeria* spp.는 blue-gray color를 나타낸다.

유사한 집락에 대해서는 다음의 염색성, catalase, 용혈성, CAMP test 등의 특성을 검사하여 최종 확인한다.

**나. 혈청학적 동정**

생화학적으로 확인된 *Listeria monocytogenes*의 혈청형 동정은 H factor(A, C, D 등) 및 O factor(1, 1/2, 2, 3, 4, 5 등)혈청을 이용하여 시험관 응집반응으로 검사한다.

표3. *Listeria*균의 일반적 특성

구 분	특 성
형태	작은 간상구형(포자형성치 못함)
그람염색	양성
크기	0.4-0.5×0.5-2µm
산소 요구성	호기성
생장온도 범위	1.0~45℃
생장 pH 범위	pH 6.0~9.0
Oxidase	음성
Catalase	양성
운동성	20~25℃에서 양성(주변편모)

표4. *Listeria monocytogenes*균 구분

균종	용혈성 (beta)	Nitrate reduction	당분해능			병원성 (마우스)
			man- nitol	rham- nose	xylo- se	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+	-	+
<i>L. ivanovii</i>	+	-	-	-	+	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	V	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	V	+	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	-	-	+	-
<i>L. grayi</i>	-	-	+	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	-	+	+	V	-	-

**다. 신속검출기법**

리스테리아균을 신속히 검출하는 방법으로는 균을 신속히 동정하는 Vitek system, Micro-ID 등과 Nucleic acid hybridization assay법을 이용한 nonradioactive DNA probe kits, Immunoassay기법을 이용한 *Listeria*-Tek, Tecra-*Listeria* kits, 이외 PCR(polymerase chain reaction)기법 등이 알려져 있다.

**4. Staphylococcus aureus**

*Staphylococcus aureus*는 식욕이나 생선, 유가공품 및 조리된 야채 등에서 흔히 문제가 되는 공중보건학적으로 중요한 식중독 원인균중 하나이다. 특히, 최근들어 미국을 비롯하여, 프랑스, 일본 등지에서 우유와 열처리 없이 만들어진 치즈, 혹은 캔류의 섭취로 인한 감염사례가 증가하고 있는 추세이다. 소수의 존재는 문제가 되지 않지만 식품 g당 106 CFU이상이 존재하거나, enterotoxin 100~200ng수준에서 2~6시간후 구토, 복통, 설사 등을 유발한다. 특히, 열에 저항성이 강하여 처리과정중의 오염이 문제시 되므로 이에 대한 대책이 요구된다.

가. 균 분리 동정

1) 증균 배양

시료를 Brain Heart Infusin broth에 접종하여 35±2℃에서 18~24시간 동안 증균 배양한다.

2) 선택 배양

10% NaCl과 1% Sodium pyruvate가 함유된 Trypticase Soy Agar(PTSBS) 또는 enrichment broth에 Potassium tellurite 0.5 g/l 나 polymyxin을 첨가하여 35±2℃에서 18~24시간 배양한후 Baird Paker medium에 도말하여 동일한 조건하에서 배양을 실시하고 검은색 colony를 가지는 3~5의 colony를 혈액배지에 도말, 배양하여 β-hemolysis를 확인한 후, Gram staining, catalase test, coagulase test를 실시하여 확인된 colony에 대하여 mannitol fermentation과 thermostable DNase test를 실시하여 동정한다.

표5. *S.aureus*, *S.epidermidis*, *micrococci*의 전형적인 특징

특성	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>Micrococci</i>
Catalase 활동	+	-	-
Coagulase 생성	+	-	-
Thermonuclease 생성	+	-	-
Lysostaphin 감수성	+	+	-
Glucose 이용	+	+	-
Mannitol	+	-	-

표6. *S.aureus*균의 일반적 특성

구분	특성
형태	포도상 구균
그람염색	양성
Catalase	양성
Coagulase	양성
Mannitol(only acid)	양성
Thermostable nuclease	양성
Pigment	양성
β-hemolysin	양성
Acetoin 생성	양성
Lysostaphin(100ug)	Susceptible
Novobiocin	Susceptible
Bacitracin	Resistant

나. 혈청학적 동정

혈청학적으로 SEA, SEB, SECI, SEC2 SEC3, SED, SEE, SEH, TSST-1의 9가지로 나뉘어지며, 각각에 대한 표준 균주를 토끼에 면역시켜서 얻은 항혈청을 이용하여 microslide gel double diffusion test로 확인하며, 제한적이지만 monovalent capture antibody를 이용한 Swiss ball kit 등이 있다.

다. 신속검출기법

Bacto coagulase plasma(Difco) 0.5ml을 2~4개의 colony와 섞어서 37℃에서 배양하여 4~24시간까지 응집여부를 관찰하는 free-co-agulase tube test, 사람의 fibrinogen이 함유된 agar plate를 이용하여 clumping factor를 검출해내는 bound coagulase agar test, Staphaureux & Staphaureux Plus kit(Murex Diagnostics), RIDASCREEN kit, reversed passive latex agglutination test(RPLA), polyvalent antibody를 이용한 TECRA의 ELISA kit나 VIDAS

SET ket 등이 상품화되어 있으며, 검출한계를 높여주는 radioimmunoassay(RIA), DNA hybridization, PCR기법 등이 이용된다.

### 5. Campylobacter

Campylobacter는 사람과 동물에서 중요한 병원균으로, C. jejuni와 C. coli가 사람의 설사와 위장염에 가장 흔한 원인균이다. 특히 C. jejuni는 1992년 영국에서 급성 세균성 위장염의 주요 원인균중 하나였으며, 미국에서 분리된 Campylobacter속 균중에서 99%이상을 차지하고 있다. 산발적이기는 하지만 덜익힌 고기나 멸균되지 않은 우유의 섭취, 그리고 물을 매개로 한 감염의 발생이 보고된 바 있으며 가축이나 야생동물, 조류, 어원동물 등이 장내 정상세균총으로 여러 환경에서 발생할 수 있어 문제시 될 수 있는 질병이다.

#### 가. 균 분리 동정

##### 1) 증균 배양

Campylobacter enrichment broth란 Doley's broth에 시료를 접종하여 42°C, 미호기 조건(5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 85% N<sub>2</sub>)하에서 18시간 증균 배양한다.

##### 2) 선택 배양

Charcol-cefazole-sodium deoxycholate agar (CCDA, Oxoid)란 Skirrow selective medium (OXoid), 혹은 Campy-BAP(Butzler agar plate)에서 동일한 미호기조건으로 배양한 후, 작고 점액성의 불규칙한 변연부를 가지는 회색

colony를 3~5개정도 선발하여 7% defibrinated sheep blood agar에 도말하여 동일한 미호기 조건으로 배양한 후, 비용혈성이며 불규칙한 변연부를 가지는 colony에 대하여 Gram staining, catalase, oxidase 생성여부, 현미경하에서 운동성검사를 실시한후, TSI, SIM 배지에 접종하고 Hippurate Muller Hinton agar에 도말하여 가수분해능을 확인하고, 추가적으로 nalidixic acid (30µg)와 cephalothin(30µg)에 대하여 약제감수성 검사를 실시한다.

**표7. Campylobacter균의 일반적 특성**

구 분	특 성
형태	만곡형 혹은 나선형
그람염색	음성
25°C 발육능	음성
42°C 발육능	양성
Nirate 환원	양성
Hippurate가수분해능	양성
Oxidase	양성
Catalase	양성
H <sub>2</sub> S, TSI	음성
운동성	양성(81%)
Glucose 발효능	음성
1% glycine 성장능	양성
Cephalothin	Resistance
Nalidixic acid	Susceptible

#### 나. 혈청학적 동정

세계보건기구(WHO)에서 분양받은 Lior의 표준균주를 토끼에 면역시켜 얻은 항혈청을 이용하여 평판응집반응으로 혈청형을 분리하거나, 좀더 정확한 방법으로 thermostable somatic O antigen을 이용한 passive hemagglutination assay가 있다.

#### 다. 신속검출기법

Flagellin gene을 기초로한 PCR 기법과 DNA hybridization, PFGE(pulse field gel electrophoresis), RFLP 등의 방법이 있다.

## 6. Mycobacterium paratuberculosis

*Mycobacterium paratuberculosis*는 사람의 Crohn's disease(Infected bowel disease)와 동물의 Johne's Disease의 원인균으로 알려져 있으며 특히 오염된 우유나 ground beef, 분변으로부터 오염된 음수의 섭취 등으로 인하여 혈액성 설사와 복통, 출혈로 인한 빈혈증을 일으킬 수 있어 식품 중에서 문제시 될 수 있는 병원균이다. 특히, *Mycobacterium bovis*와 *Coxiella burnetti*보다 더 높은 열 저항성을 가지며, HTST(72°C/15s) 혹은 LTLT(63.5°C/30min.) 처리된 우유에서도 생존할 수 있다. 농부나 수의사에 의한 직접 접촉이나 소 등의 분변, ground beef 오염된 물 등이 주된 전파원이다.

### 가. 균 분리 동정

소의 림프절, 유선, 자궁, 우유, 분변으로부터 채취한 시료를 선택배지인 Herrold's egg yolk medium containing mycobactin J(HEYM) 혹은 BACTEC with mycobactin J과 mycobactin J가 함유되지 않은 배지에 함께 접종하여 37°C에서 8주간 배양한 후, 육안관찰시기, 균의 모양, mycobactin J의 의존성, 항산성염색상 등에 의하여 동정하며, 특히 mycobactin J 의존성이 가장 중요하다.

### 나. 혈청학적 방법

보체 결합반응, Agar gel immunodiffusion

assay, IFN- $\gamma$  assay 등이 개발되어 사용되고 있으며 효소면역측정법이 우균검사법으로 유용하며, 최근에 개발된 IFN- $\gamma$  assay는 진단효율을 검정받고 있다.

### 다. 신속검출기법

IS900의 5' 부위에 있는 400bp 크기의 단일 band를 증폭하여 확인하는 PCR 기법이 있다.

## II. 결 론

세계무역기구(WTO) 출범과 개방화시대에 따라 국내 유통 식육 및 동물에서의 식중독 주요 원인균의 정확한 분포상황을 파악하고, 식육중 식중독 주요 원인 세균인 병원성대장균(O157:H7), 살모넬라 등 위생기준 및 식육 생산 단계별 미생물 오염 지도 기준을 설정하여 사람의 사전방지 대책을 마련해야 할 것이다.

아울러 우리나라에서 식품중 식중독 원인균을 검사하는 정확한 표준방법을 확립해야 할 것이며, 아울러 각종 미생물 검사 키트나 장비에 대한 검정도 검토되어야 할 것으로 생각된다.

세계각국은 식품매개에 의한 식중독 발병 위험을 줄이고 안전한 식육 생산 공급을 위한 농장에서부터 소비자까지 모든 단계를 모니터링하는 위해분석 및 주요 관리점(HACCP) 제도를 도입하고 있다. 따라서 우리나라에서도 식중독 발생의 근원적 예방을 위해서는 축산물 생산단계부터 소비자까지 전과정의 위해분석 및 주요관리점제도를 조기 도입 적용이 시급히 요청된다 하겠다. **양계**