

도계장 도계의 *Campylobacter* 균 오염에 관한 연구

나호명¹, 고바라다, 박성도, 김용환

광주광역시 보건환경연구원 가축위생연구부

(접수 2006. 11. 28, 게재승인 2007. 3. 5.)

Studies on *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* contamination on broiler carcasses in slaughterhouse

Ho-Myung Na¹, Barada Koh, Seong-Do Park, Yong-Hwan Kim

Department of Veterinary Research, Gwangju City Institute of Health and Environment, Gwangju, 500-210, Korea

(Received 28 November 2006, accepted in revised form 5 March 2007)

Abstract

The present study was carried out to investigate the incidence of *Campylobacter* spp. from the chicken carcasses in slaughterhouse. A total of 9 strains were primarily isolated from enrichment culture and selective culture of the sample with candle and microaerophilic chamber method. Nine of Gram-negative, catalase-positive and oxidase-positive strains were further isolated by the determination of biochemical characteristics and finally identified as *Campylobacter jejuni* with HIP 400F and HIP 1134R primers. Therefore, this PCR method proved to be useful as a routine diagnostic test for the *Campylobacter* detection and confirmation of *C. jejuni* and *C. coli* in naturally contaminated poultry samples.

Key words : *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, PCR, Broiler, Slaughterhouse

¹Corresponding author

Phone : +82-11-608-6409, Fax : +82-62-571-0496

E-mail : felixn@hanmail.net

서 론

*Campylobacter*균은 1913년 McFadyean과 Stockman에 의하여 처음으로 발견되었으며¹⁾, Gram 음성의 운동성을 가진 다형대성의 미호기성 간균으로서 다양한 동물들, 특히 조류의 장관내에서 발견되었다²⁾.

가금의 30-100%가 장관에 장내세균총으로 *C jejuni*를 보균하고 있다고 보고되어 있으며³⁾, 오염된 식품의 섭취로 인해 사람에서 *C jejuni*에 의해 질병을 일으키기 위해서는 세균수가 최소한 500개 정도면 가능하다고 알려지고 있다⁴⁾. *C jejuni*와 *C coli*는 사람의 급성세균성 장염의 원인균으로 알려졌으며, 특히 *C jejuni*는 Skirrow⁵⁾에 의해서 미국과 영국에서는 본 균에 의한 전염성 장염의 발생률 빈도가 *Salmonella*균과 병원성 대장균에 기인된 것과 유사하였으며, *Shigella*균에 의한 발생보다는 높은 것으로 보고되었다. 이와 같이 *Campylobacter*균은 공중보건상 중요한 병원체로 부각되고 있다⁶⁻⁸⁾.

*C jejuni*의 보균율 및 감염률은 선진국에서보다 후진국 그리고 소아 및 유약동물에서 더 높고, 그 분리빈도는 가금, 설치류 및 포유류 순으로 높았다^{9,10)}. 특히 조리되지 않은 계육의 손질과 소비에 의해서 사람의 장염 및 식중독의 주요한 감염원이 되며, 주로 오염된 식육 및 음료수의 섭취, 감염동물과의 접촉에 의해서 감염되는 것으로 알려져 있다^{11,12)}. 일부 도계들은 도계장에서 *C jejuni*에 오염된다¹³⁾. 그래서 도계장 위생을 향상시키기 위한 많은 노력들이 이루어져 왔지만, 닭의 내장 내용물로부터 *C jejuni*가 계육에 오염되지 않도록 하는 것은 매우 어려운 일이다¹⁴⁾.

식품생산에 있어서 미생물학적 품질관리

가 소비자들에게 감염의 위험성을 최소화시키기 위해서 적용되어 왔다. 그러나 식품에서 *C jejuni*의 검출을 위해 전통적이고 표준화된 분석법이 공인된 배지를 사용하여 병원체 미생물의 증균배양과 의심집락을 분리하는데 적용되고 있다¹⁵⁾. 이 분석법은 결과를 얻을 수 있을 때까지 여러 날이 소요되며, 특히 자연적으로 오염된 시료들에서 *Campylobacter*균의 일반적인 검출은 최소한 4일이상이 요구되는데 이것은 이 균의 느린 성장속도와 까다로운 배양절차 때문이다¹⁶⁾. 종의 수준까지 *Campylobacter*균을 동정하기 위해서는 몇 가지 생화학적 시험들이 적용되어야 하기 때문에 또 다른 기간이 더 요구된다¹⁷⁾. 이러한 방법들은 신속한 검사가 요구되고 있는 식품생산과 식품에 대한 미생물학적 품질관리체계에 있어서 단점들이 되고 있다.

PCR 증폭에 의한 분자생물학적 방법이 식품에서 표적 미생물들의 검출을 위한 신뢰성 있는 방법이라 하겠다. PCR에 근거한 검출방법의 주요 장점들은 신속성, 특이성 그리고 민감성이다. 식품과 같은 복합적인 시료에 존재하는 위해물질들에 대한 감수성이 다양하지 못한 것이 PCR에 근거한 검출법의 단점중의 하나이다. 따라서 식품에 있어서 PCR 적용은 PCR 저해제의 영향들을 극복하기 위한 효과적인 방법들이 요구되고 있다¹⁸⁾. 최근 식품¹⁹⁾, 물²⁰⁾ 그리고 임상²¹⁾ 시료들에서 *Campylobacter*균 검출을 위해 수많은 PCR법이 증균배양을 통해 민감도를 향상시키기 위한 방법으로 보고되었다. *Campylobacter*균을 검출하기 위한 일반적인 방법들은 까다롭고 많은 노력과 시간이 소요되기 때문에 PCR법 역시 증균시간이 요구된다.

최근 산발적으로 국내외적으로 *Campylo-*

*bacter*군에 의한 집단식중독이 발생하고 있는 추세이고 미국질병센터의 자료에 의하면 미국에서 유통되고 있는 닭고기의 70-90%가 *Campylobacter*군에 의해 오염되었다는 보고가 있으며 국내에서도 2003년에 215명의 집단 식중독 환자가 발생되었다. 따라서 본 실험의 목적은 도계장에 출하된 닭의 분변과 도축된 닭의 시료에서 PCR법의 적용에 의한 *C jejuni* 검출을 실시하여 향후 집단식중독의 역학조사에 이용하고자 한다.

재료 및 방법

공시재료

닭 분변에 *Campylobacter*의 존재여부를 확인하기 위해 광주광역시에 소재한 도계장에 출하된 육계로부터 닭 분변 80건을 멸균된 시료컵에 채취하여 ice box에 넣어 신속히 이동하여 본 실험에 사용하였다. 채취된 닭 분변은 멸균된 면봉을 이용하여 Tryptic soy broth 3 ml에 분변 1g을 첨가하여 5-18시간 37℃에서 250 rpm으로 진탕배양하여 PCR 실험에 사용하였다.

도계장에 출하되어 도축되는 일련의 도계 과정을 거쳐 포장되기 직전의 도체 20건을 채취하여 멸균된 비닐봉지에 500 ml의 1% peptone water를 멸균 비닐봉지에 담아 도체를 세척하고 그 세척액을 증균시료로 사용하였다.

*Campylobacter*의 증균 및 분리

*Campylobacter*의 균분리를 위해 재래적인 방법인 candle jar method와 microaerophilic chamber (Bug box, Ruskin Tech, Co UK)를 병행하여 식품공전법에 준하여 비교 실험하였다. *Campylobacter*를 분리하기 위해

항생제 혼합액 (Hunt Supplement A, Oxoid)이 첨가된 Hunt broth (Oxoid) 100 ml에 닭 세척액 25 ml를 첨가하고, stomacher로 균질화하였다. 35 ℃에서 4-5시간 동안 미호기적으로 1차 증균하였다. 1차 증균 후 cefoperazone (FBP supplement, Oxoid) 0.4 ml를 첨가하고 42 ℃에서 24-48시간 미호기적으로 2차 증균하였다. 2차 증균시에는 rifampicin 용액 (0.125 g/100 ml 0.4 ml를 첨가하여 배양하였다. 증균배양액을 Modified Camy blood free 한천배지 (Oxoid)에 접종하여 42℃에서 24-48시간 미호기적으로 암소에서 배양하였다.

*Campylobacter*의 생화학적 특성분석

Modified Camy blood free 한천배지 (Oxoid)상에서 원형 또는 불규칙한 형태로서 반투명한 흰색 또는 투명한 집락을 취하여, 위상차 현미경으로 검경하거나 또는 대비 염색하여 지그재그 모양을 관찰하였다. 이때 대비염색은 10 ml 식염수에 2방울의 crystal violet을 혼합한 용액을 이용하였다. 현미경상으로 확인된 균에 대하여 Gram 염색, catalase test, oxidase test를 실시하였다. 결과가 Gram (-), catalase (+), oxidase (+)인 분리균을 대상으로 H₂S 생성시험, nitrate 환원시험, 운동성시험, 25℃ 및 42℃에서의 발육시험 등의 생화학적 검사를 실시하여 1차적으로 *Campylobacter* spp를 분리하였다. 이렇게 선택배지로부터 분리된 균들은 PCR을 실시하여 동정하였다.

DNA 추출

RapiGEN[®]사 (Korea)의 사용방법에 따라서 닭 분변과 배양된 세균으로부터 DNA를 추출하였다. 채취된 닭분변의 상층액과 세균 배양액 1 ml를 microcentrifuge tube에 옮긴

후 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상층액은 버리고 펠렛은 멸균증류수 500 μ l 로 현탁시켜 다시 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상층액을 버리고 DNA 추출액 100 μ l 를 첨가하고 vortex 하여 완전히 균체를 현탁시켰다. 현탁액을 100°C에서 10분간 가열하여 세포를 완전히 파쇄하고 실온까지 식힌 후 가볍게 vortexing 후에 13,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 PCR 반응에 사용하였다.

Primer제작 및 반응조건

본 실험에 사용된 primer 염기서열과 PCR 조건은 Table 1과 같다.

*Campylobacter*로 의심되는 세균집락을 동정하기 위해 각각 primer HIP400F와 HIP1134R 그리고 primer CC18F와 CC519R 을 사용하여 *C jejuni*와 *C coli*로 구분하였다. PCR 반응 조건은 template DNA 2 μ l, 각 10 pmol/ μ l primer 1 μ l, ExPrime Taq Premix (GENET BIO, Korea) 10 μ l 를 첨가하고 멸균증류수로 총 20 μ l 로 조정하였다.

Table 1. Oligonucleotide primers and PCR programmes used in this study

Primer pair	Target gene	Primer sequence (amplicon size)	Annealing temperature (references)
HIP400F HIP1134R	<i>hipO</i>	5'-GAAGAGGGTTTGGGTGGTG-3' 5'-AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG-3' (Amplicon: 735bp) ²²⁾	60°C ²²⁾
CC18F CC519R	Putative aspartokinase gene and flanking ORF	5'-GGTATAATTTCTACAAAGCGAG-3' 5'-ATAAAAGACTATCGTGTG-3' (Amplicon: 500bp) ²³⁾	60°C ²²⁾
RapiGEN [®]	Unknown	Unknown Amplicon : 257bp	63°C

증폭은 PCR thermocycler (PTC-200, MJ Research, USA)를 사용하여 PCR은 95 °C에서 5분간 수행한 후 94 °C/20초, 60 °C/30초 그리고 72 °C/30초간 3단계로 40 cycles 수행하고, post elongation을 72 °C에서 5분간 DNA 합성을 실시하였다.

한편 닭 분변을 채취한 면봉에서 추출된 DNA을 이용하여 *C jejuni*의 존재여부를 확인하기 위해서 RapiGEN[®]사 (Korea)의 PCR kit을 사용하였다. PCR 반응 조건은 제조사의 지시에 따라 실시하였다.

증폭된 PCR 산물은 20-80 mM Tris-acetate-EDTA(TAE) 완충용액과 DNA 염색을 위한 ethidium bromide (0.5 μ g

/ml)가 함유된 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 최종산물을 UV transilluminator와 AlphaEase[™] 5.5 software (Alpha Innotech Co, CA, USA) 를 이용하여 확인 분석하였다.

결과 및 고찰

도계장에 출하된 닭분변 80건을 RapiGEN[®]사의 PCR kit를 이용하여 *Campylobacter* 을 검출한 결과 모두 음성이었다.

그러나 도계장의 출하 최종과정에서 수집한 20건의 도계에서 미호기성 배양을 통해

9건의 *Campylobacter* 균을 분리할 수 있었다 (Table 2).

Table 2. Isolation of *Campylobacter* spp from chicken and feces

Animals	Kind	No of Samples	<i>C jejuni</i>	<i>C coli</i>	Total
			Isolates(%)	Isolates(%)	Isolates(%)
Chicken	Feces	80	-	-	-
	Wash water	20	9(45.0)	-	-

또한 분리된 9균주에 대한 생화학적 특성은 1차균주에서 Gram 염색을 실시하여 15개의 Gram (-) 균주를 선택했다. 이어서 catalase test를 실시하여 catalase (+) 균주를 분리하고 이렇게 분리된 균주로부터 다시 oxidase (+) 균주를 선발하였다. 이렇게 하여 재분리된 9개의 Gram (-), catalase (+), oxidase (+), hippurate 분해 양성, 황화수소 비생성, nalidixic acid 감수성, 25°C에서 비

생육, 42°C에서 생육하는 것 생화학시험결과를 얻게 되었다.

분리된 9건의 *Campylobacter* 균으로부터 DNA을 추출하여 *C jejuni*만이 보유한 *hipO* 유전자 primer와 *C coli* 를 확인하기 위한 CC18F와 CC519R primer로 PCR을 실시한 결과 모두 735 bp만이 증폭되어 *C jejuni*로 확인되었다 (Fig 1).

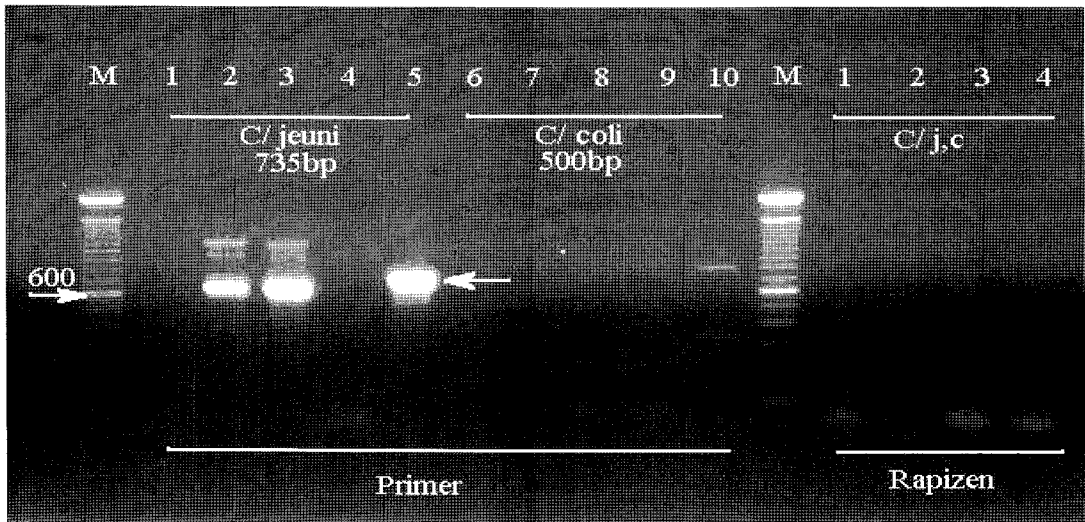


Fig 1. Agarose gel electrophoresis showing identification of selective bacteria isolated from Modified Camy blood free Agar

대부분의 식중독 발생건에서, 날고기와 부적절하게 취급된 날고기가 감염의 주요한 원인으로 밝혀졌다. 그래서 본 연구도 도계장에서 최종단계의 가공된 도계를 수집하여

Campylobacter 균의 오염에 대한 연구를 실시하였다. 이 연구에서 최종단계의 도계로부터 *C jejuni*가 발견되었는데 이것은 도계장에서 기계적인 처리과정중에 장내용물 또는

분변에 도계가 오염될 수 있음을 시사하고 있다.

도계장에서 장내용물이 도계에 존재하는 *C jejuni*의 주요한 전파원이라는 사실이 여러 연구들에서 보고되어 졌다²³⁾. Rivotal 등²⁴⁾에 의하면 장내용물에 분리되어진 동일한 유전자형의 *C. jejuni*가 다음 도계 계군에서 분리되어 졌는데 이것은 교차오염이 다음 계군에서 발생되었음을 시사하고 있다. 그러나 이들의 연구에서, 여러 가지 유전자형의 *C jejuni*가 다음 계군의 도계로부터 분리되어 졌고, 이들 유전자형의 일부는 전 단계의 가공된 계군의 분변 시료에서는 분리되지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 도계과정의 마지막 단계에서 *C jejuni* 부재 계군의 도계 오염의 주요한 원인은 아직까지 분명하지 않다. 본 연구 결과에서도 보듯 도계과정의 마지막 단계에서의 *Campylobacter* 식중독을 발생시킬 수 있는 위험성은 존재하지만 계군별의 교차오염에 대한 조사는 본 연구에서 이루어지지 않아 앞으로 좀 더 계군별의 교차오염 조사연구가 필요할 것으로 판단된다.

소매점에서 채취한 생계육에서 *Campylobacter* 검출률은 Mateo 등²⁵⁾의 실험결과에서 *C jejuni*는 약 75%이며, *C coli*는 약 41.2%였으며, 2001년 경기도지역의 집단급식에 공급된 생계육 75건으로부터 증균배양과 PCR법을 통해서 16건(21.3%)을 분리·동정하였다²⁶⁾. 본 연구에서, 도축 최종단계의 도계 시료 20건을 증균배양을 하여 균분리한 결과 *Campylobacter*균 9건이 *C jejuni*로 확인되어 검출률이 45%로 다른 연구자들의 결과와 큰 차이를 보이지 않았다. 결론적으로 PCR 방법을 통해서 오염된 계육 시료로부터 *Campylobacter*균의 오염을 신속하게 확인할 수 있었으며, 도계장에서 생산된

생계육 뿐만 아니라 소매점으로부터 구입된 생계육으로부터 식중독균이 검출됨에 따라 계육의 생고기 섭취를 지양하고 도계의 위생적인 취급과 닭고기의 보다 철저한 위생관리가 요구된다고 할 수 있다.

결 론

2005년 1월부터 12월까지 광주지역의 도계장에 출하된 닭분변 80건과 도계과정을 거쳐 최종단계에 도달하여 포장되기 전의 닭고기 20건을 채취하여 세균배양과 PCR방법을 통하여 *Campylobacter* 균의 검출률을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 닭분변 80건에 대하여 PCR kit 로 검사한 결과 *Campylobacter* 균이 분리되지 않았다.
2. 최종 도계단계의 닭고기 20건에 대한 일반적인 미호기성 세균배양방법과 DNA 검출방법을 통해 9건의 *Campylobacter* 균이 분리되었다.
3. 분리된 9건의 *Campylobacter* 균은 PCR 방법을 통해서 *hip O gene* 이 증폭되어 모두 *C jejuni* 로 동정되었다.
4. 분리된 9건의 *Campylobacter* 균에 대한 생화학적검사 결과 Gram(-), catalase(+), oxidase(+), hippurate 분해 양성, 황화수소 비생성, nalidixic acid 감수성, 25℃에서 비생육, 42℃에서 발육으로 *C jejuni* 임이 확인되었다.

참고문헌

1. Mcfadyean J, Stockman S. 1913. Report of the departmental committee

- appointed by the board of agriculture and fisheries to enquire into epizootic abortion. *Appendix D Ger majesty's Stationary Office Landon* 1:156.
2. Doyle MP. 1994. The emergence of new agents of foodborne disease in the 1980s. *Food Res Int* 27:219.
 3. Schoeni JL, Doyle MP. 1992. Reduction of *Campylobacter jejuni* colonization of chicks by cecum-colonizing bacteria producing anti-*C. jejuni* metabolites. *Appl Environ Microbiol* 58(2): 664-670.
 4. Lamoureux M, MacKay A, Messier S, et al. 1997. Detection of *Campylobacter jejuni* in food and poultry viscera using immunomagnetic separation and microtitre hybridization. *J Appl - M Microbiol* 83(5): 641-651.
 5. Skirrow MB. 1977. Campylobacter enteritis: a "new" disease. *Br Med J* 2(6078): 9-11.
 6. Blaser MJ, Reller LB. 1981. Campylobacter enteritis. *N Engl J Med* 305(24): 1444-1452.
 7. Dale B. 1977. *Campylobacter* enteritis. *Br Med J* 2(6082): 318.
 8. Butzler JP. 1984. *Campylobacter infection in man and animals*. CRC press Inc Boca Raton Florida: 1-244.
 9. Mosenthal AC, Mones RL, Bokkenheuser VD. 1981. *Campylobacter fetus jejuni* enteritis; in New York City. *N Y State J Med* 81(3): 321-323.
 10. Itoh T. 1981. Epidemiology *Campylobacter enteritis*. *Modern Media* 27: 312-323.
 11. Friedman CR, Neimann J, Wegener HC, et al. 2000. *Campylobacter*, second ed., American Society for Microbiology, Washington DC: 121-138.
 12. Frost JA. 2001. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 30: 85S-95S.
 13. Wedderkopp A, Rattenborg E, Madsen M. 2000. National surveillance of *Campylobacter* in broilers at slaughter in Denmark in 1998. *Avian Dis* 44: 993-999.
 14. Ono K, Yamamoto K. 1999. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *Int J Food Microbiol* 47(3): 211-219.
 15. Corry JE, Post DE, Colin P, et al. 1995. Culture media for the isolation of campylobacters. *Int J Food Microbiol* 26(1): 43-76.
 16. Engberg J, On SL, Harrington CS, et al. 2000. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for Campylobacters. *J Clin Microbiol* 38(7): 2798-2799.
 17. On SL. 1996. Identification methods for *Campylobacters*, *helicobacters*, and related organisms. *Clin Microbiol Rev* 9(3): 405-422.
 18. Denis M, Refregier-Petton J, Laisney MJ, et al. 2001. *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and

- identification of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli*. *J Appl Microbiol* 91(2) : 255-267.
19. Wang H, Farber JM, Malik N, et al. 1999. Improved PCR detection of *Campylobacter jejuni* from chicken rinses by a simple sample preparation procedure. *Int J Food Microbiol* 52(1-2): 39-45.
20. Waage AS, Vardund T, Lund V, et al. 1999. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Appl Environ Microbiol* 65(4): 1636-1643.
21. Maher M, Finnegan C, Collins E, et al. 2003. Evaluation of culture methods and a DNA probe-based PCR assay for detection of *Campylobacter* species in clinical specimens of feces. *J Clin Microbiol* 41(7): 2980-2986.
22. Burnett TA, A Hornitzky M, Kuhnert P, et al. 2002. Speciating *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from poultry and humans using six PCR-based assays. *FEMS Microbiol Lett* 216(2) : 201-209.
23. Berndtson E, Tivemo M, Engvall A. 1992. Distribution and numbers of *Campylobacter* in newly slaughtered broiler chickens and hens. *Int J Food Microbiol*. 15(1-2) : 45-50.
24. Rivoal K, Denis M, Salvat G, et al. 1999. Molecular characterization of the diversity of *Campylobacter* spp. isolates collected from a poultry slaughterhouse: analysis of cross-contamination. *Lett Appl Microbiol* 29(6) : 370-374.
25. Mateo E, Carcamo J, Urquijo M, et al. 2005. Evaluation of a PCR assay for the detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail poultry products. *Res Microbiol* 156(4): 568-574.
26. 박종현. 2001. 집단 급식용 생계육에서 *Campylobacter* 의 분리 및 동정. 한국식품안전성학회지 16(4):258-263.