

유제품 및 가공식품에서 *Listeria monocytogenes* 검출을 위한 배지법과 신속 검사키트의 유효성 검증

한소리 · 현지연 · 김희연¹ · 박종석² · 허석² · 신호철³ · 서건호*

건국대학교 수의과대학 공중보건학, ¹서울지방식품의약품안전청 시험분석과,
²식품의약품안전청 연구기획조정관, ³건국대학교 수의과대학 수의약리독성학

Evaluation of Conventional Culture Methods and Validation of Immunoassays for Rapid Detection of *Listeria monocytogenes* in Dairy and Processed Foods

So-Ri Han, Ji-Yeon Hyeon, Hee-Yun Kim¹, Jong-Seok Park², Seok Heo², Ho-Chul Shin³, and Kun-Ho Seo*

Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

¹Testing & Analysis Division, Seoul Regional Korea Food & Drug Administration, Seoul 158-050, Korea

²Research Planning Management Office, Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

³Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine, Konkuk University,
Seoul 143-701, Korea

Abstract

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen inducing listeriosis in human. We compared two different culture methods for detection of *L. monocytogenes* and validated two commercial kits, VIDAS[®] and REVEAL[®] for *Listeria*. *L. monocytogenes* was inoculated into various food samples to generate partial positive samples. The inoculated samples were enriched in half-Fraser broth for 48 hr at 30°C. The enriched samples were streaked onto Oxford agar at 24 and 48 hr postincubation followed by biochemical confirmation and concurrently analyzed by using the two commercial kits for comparison. When the enrichment period was extended from 24 to 48 hr, the numbers of positive samples were dramatically increased from 6 to 52 out of 80 samples tested using the culture method. With the commercial kits, the numbers of positive samples were also significantly increased from 10 to 18 and 1 to 18, respectively, when the enrichment period was extended from 48 to 72 hr. There was no statistical difference between the 24 hr culture method and VIDAS[®] or Reveal[®] with 48 hr enrichment. In conclusion, the 24 hr for the culture method was insufficient to detect *L. monocytogenes* in various foods. The commercial kits could be adequate means for presumptive screening of *L. monocytogenes* in food.

Key words : culture method, *Listeria monocytogenes*, enrichment period, rapid detection method

서 론

*Listeria monocytogenes*는 인수공통전염병의 원인체 중 하나로 우유나 치즈 등과 같은 축산식품을 통해 사람에게 감염될 수 있어서 최근 전세계적으로 주목 받고 있는 병원성 식중독균 중 하나이다(Mena *et al.*, 2004). *L. monocytogenes*에 감염되어 리스테리아증(listeriosis)이 발생

하면 치사율은 약 30% 정도로 매우 높다(O' Grady *et al.*, 2008). 특히 면역력이 약한 어린 아이나 면역결핍을 유발하는 질병에 걸린 사람들이 *L. monocytogenes*에 감염되면 사망과 같은 치명적인 결과를 낳을 수 있으며 임신부에서는 유산을 유발할 수 있다(O' Grady *et al.*, 2008).

리스테리아증의 주된 원인은 *L. monocytogenes*에 오염된 식품을 직접 섭취하는 것으로 알려져 있다(Barocci *et al.*, 2008; Midelet-Bourdin *et al.*, 2007). 원재료인 축산물에 존재하기도 하고, 바로 먹을 수 있는 ready-to-eat(RTE) 식품의 가공과정 도중에 오염되어 유통되기도 한다. *L. monocytogenes*는 특정 식품이 아니라 매우 다양한 식품

*Corresponding author : Kun-Ho Seo, Department of Public Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea. Tel: 82-2-450-4121, Fax: 82-2-450-3037, E-mail: bractu3@konkuk.ac.kr

에 오염될 수 있는데, 현재 리스테리아증의 원인으로 알려진 식품만 해도 치즈, 우유 등 유제품, 생 채소, 코울슬로우, 닭고기나 핫도그 등의 가공육제품 등 광범위하다 (Ramaswamy *et al.*, 2007). 또한 안전한 재료를 구입하였더라도 음식을 조리하는 과정에서도 오염될 가능성이 있다 (Oravcová *et al.*, 2008). 특히 축산물과 생 채소 등의 식품을 같이 조리하는 과정에서 교차오염이 발생하여 문제를 일으키는 경우가 많다. *L. monocytogenes*는 다른 병원성 균과는 달리 저온에서도 성장이 가능한 특성을 가지고 있으며 37°C에서 성장한 균보다 4°C에서 성장한 균의 병원성이 더 강한 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 2002; Ramaswamy *et al.*, 2007). 이러한 균의 특성으로 인해 가정에서 안전하다고 생각되는 냉장보관 중인 음식이나 냉장 식품과 저장 식품에서도 *L. monocytogenes*에 의한 식중독이 발생할 수 있다.

특히 RTE 식품을 많이 섭취하는 선진국에서는 *L. monocytogenes*에 의한 식중독 발생 가능성이 굉장히 높으므로 *L. monocytogenes*균의 검출은 식품위생과 공중보건적인 측면에 있어서 중요하다고 할 수 있다.

현재 식품에서 *L. monocytogenes*의 검출 규격은 우리나라뿐만 아니라 미국, 호주 등의 국가에서도 25 g의 식품 샘플에서 불검출을 기준으로 하고 있다 (Kim *et al.*, 2007). 이에 각 나라의 검사기관에서는 천천히 자라는 *L. monocytogenes*의 특성을 고려한 48시간 예비 증균법을 기초로 한 검출법을 사용하고 있다. 현재 국제적으로 통용되는 *L. monocytogenes* 검출법은 USDA-FSIS (US Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service)와 FDA에서 개발된 Bacteriological Analytical Manual (BAM) method이다 (Kim *et al.*, 2006). 이들 검출법과 현재 우리나라 식품공전에 고시되어 있는 *L. monocytogenes* 검출법의 차이점은 예비 증균시간인데, USDA-FSIS와 BAM은 48시간인 반면 식품공전법은 '우유, 유제품, 가공 식품 및 수산물 샘플'의 경우 24시간이다. 그러나 앞서 발표된 연구를 보면, *L. monocytogenes*균은 천천히 자라는 특징을 갖고 있고, 식품에 존재하는 미생물총에 의해 균의 성장이 영향을 받아 병원성인 *L. monocytogenes*보다 더 빨리 자라는 비 병원성 *Listeria spp.*에 의해 균의 성장이 방해되어 적은 농도의 병원성 균이 존재할 때 위 음성 결과가 나올 수 있다고 한다 (Oravcová *et al.*, 2008). 이러한 배지 검출법은 보통 음성의 결과가 나오기까지 최소한 5일의 기간이 필요하며 양성의 경우 7-8일을 필요로 하는 등 시간이 많이 소모되는 단점이 있다 (Barocci *et al.*, 2007). 따라서 신속한 검사를 위하여 미국 Food and Drug Administration (FDA) 등에서는 공인된 방법에 의해 검증된 기술을 사용한 진단키트나 유전자 기법의 사용을 권장하고 있다 (Seo *et al.*, 2006). 현재 널리 쓰이고 있는 병원성균 검출 신속키트는 면역반응 원리를 이용한 것이 많다. 그

로 *L. monocytogenes* 검출을 위한 상용화된 키트 중 단일 항체를 적용하여 면역효소 형광반응 (enzyme-linked fluorescent immunoassay, ELFA)을 이용한 VIDAS® *Listeria monocytogenes* II (LMO2) (BioMérieux, France)와 *Listeria*에 특이적인 항체와 라텍스 입자의 면역반응을 이용한 REVEAL for *Listeria* (Neogen, USA)는 AOAC의 인증을 받은 제품들이다 (<http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html>). 따라서 본 연구에서는 오염되어 있는 정상미생물총의 수가 각각 다른 우유, 혼제연어, 두부, 샐러드와 같은 식품에 존재하는 *L. monocytogenes*를 검출하는데 있어 과연 24시간 증균 배양이 충분한지 검증해보고 이에 덧붙여 국내에서 가장 많이 사용되는 2종류의 신속검출 키트와 배지법을 비교해서 유효성을 평가해보고자 한다.

재료 및 방법

균 배양

*Listeria monocytogenes*는 미국 FDA (MD, USA)에서 분양 받아 실험실에서 보유하고 있던 균주를 사용하였다. 얼려있던 (-70°C) 균주를 녹여 0.6% yeast extract (Neogen, Lansing, MI, USA)가 포함된 tryptic soy agar (TSA, Difco, Franklin Lakes, NJ, USA)인 TSAYE에 도말하여 37°C에서 18시간 동안 배양하였다. 잘 자란 집락을 다시 0.6% yeast extract가 포함된 tryptic soy broth (TSB, Difco)인 TSBYE에서 37°C, 18시간 증균배양 하였다. TSBYE에서 2번 계대 배양한 균액을 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2)에 10배수로 희석하여 TSAYE에 100 µL를 도말하고 37°C에 18시간 배양하여 집락수를 확인하였다. 균수는 위와 같은 방법으로 필요할 때마다 확인하였다.

샘플 준비 및 접종

식품 샘플은 그 동안의 리스테리아증 발생 기록을 참고하였고, 본 연구실에서 확립한 식중독균 시험법 검증방법 가이드라인에 따라 (Seo *et al.*, 2006) 현재 국내에서 소비가 많이 되고 교차오염을 일으킬 빈도가 높은 식품을 선정하였다. 선정된 샘플은 우유(시유), 생식용 두부, 혼제연어, 샐러드이고 이 식품 샘플은 모두 서울시 광진구 소재의 대형마트에서 구입하였다. 접종 전 각 식품에 존재하는 총 세균수를 측정하기 위해 각 식품 샘플 25 g 또는 25 mL에 buffered peptone water (BPW, BioMérieux) 225 mL를 첨가하여 stomacher를 이용하여 30초간 균질화하였다. 균질하게 섞은 후, 100 µL를 취하여 10배수로 희석하였다. 각각 우유, 두부, 혼제 연어는 1, 2번 희석한 배지를, 샐러드는 3, 4, 5번 희석한 배지를 nutrient agar (Difco)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 집락수를 세어 평균 총 세균수를 측정하였다. 통계학적 분석을 위해 총 20개 (25 g/샘플)로 나뉜 식품 샘플 500 g에

준비된 *L. monocytogenes*를 접종하였다. 준비된 균은 각 식품에 원래 존재하는 미생물 군총에 따라 일부 양성-일부 음성 샘플을 얻을 수 있는 접종량이 달라짐을 실험적으로 고려하여 생식용 두부에 43 CFU/500 g와 31 CFU/500 g, 훈제 연어에 27 CFU/500 g, 샐러드에 664 CFU/500 g, 우유에 59 CFU/500 g를 각각 접종하였다. 대조균은 음성과 양성 각각 하나씩 준비하였다. 음성 대조균의 경우에는 식품 25 g에 멸균된 PBS를 100 μ L 접종하고, 양성 대조균에는 식품 25 g에 *L. monocytogenes* 10⁶ CFU/mL를 100 μ L 접종하였다. 모든 샘플은 18-24시간 동안 4°C의 환경에서 보관함으로써 실제 식품 샘플과 유사하도록 안정화 과정을 거쳤다.

예비 증균 과정

접종된 샘플 500 g을 각각 25 g(혹은 25 mL)으로 나누어 20개의 stomach bag에 half-Fraser broth(Difco) 225 mL와 함께 넣은 다음 stomacher를 이용해 30초간 균질하게 섞었다. 이렇게 균질화된 20개의 식품 샘플과 각각 한 개씩 설정한 대조균(양성, 음성)을 30°C의 배양기에서 24시간 배양하였다. 식품 샘플은 총 48시간 배양하였으며 그 동안 24시간, 48시간에 각각 샘플을 채취하여 실험을 진행하였다.

배지법에 의한 *L. monocytogenes* 검출

배지법에 의한 *L. monocytogenes* 검출은 현재 식품 공전법(한국)에 제시되어 있는 두 가지 증균배양법 중 '우유, 유제품, 가공 식품 및 수산물 샘플'에 해당하는 방법으로 샐러드, 훈제 연어, 생식용 두부 및 우유 실험을 실시하였는데 간략히 요약하면 다음과 같다(Fig. 1). 앞서 서술한 대로 총 22개의 샘플을 half-Fraser broth와 30°C의 환경에서 예비 증균 후, 분리배양을 위해 선택배지인 Oxford agar (Neogen)에 접종하였다. 접종된 Oxford agar를 30°C의 배양기에서 48시간 동안 배양하여 *L. monocytogenes*로 의심

되는 검은 색의 집락만을 TSAYE에 접종하였다. 이를 다시 30°C에서 48시간 배양한 후 흰색의 작은 원형 집락을 확인하고 의심되는 단일 집락은 최종확인을 위하여 Microgen™ *Listeria* ID system(Microgen Bioproducts Ltd., Camberley, Surrey, England)을 제조사에서 제공한 설명서의 방법에 따라 시행하였다. 이 모든 과정은 각각의 예비 증균 시간(24, 48시간)에 따라 진행하였다.

신속 검출 키트의 분석

VIDAS® *Listeria monocytogenes* ltest(LMO2) (VIDAS)

VIDAS®는 키트 설명서에 있는 과정에 따라 Fig. 1에 도식되어 있는 대로 시행하였는데 간략히 요약하면 다음과 같다. 앞서 서술한 대로 half-Fraser broth에서 예비 증균을 거친 샘플의 0.1 mL 균액을 10 mL의 Fraser broth(BioMérieux)에 접종하여 30°C에서 24시간을 배양하였다. 총 48시간 배양한 후 추가적으로 24시간을 더 배양하여 48시간 배양샘플과 72시간 배양 샘플을 비교하였다.

VIDAS®를 시행하기 위해 4°C에 보관되어 있던 시약 및 키트를 미리 꺼내어 실온에 놓고 automated VIDAS instrument(BioMérieux)도 미리 켜놓았다. 하나의 샘플에 각각 한 개의 VIDAS "LMO2" strip과 VIDAS "LMO2"SPR® (the solid phase receptacle)을 사용하였다. 샘플을 분석하기 전에 먼저 calibrating을 하고 준비가 다 되었으면 SPR과 strip을 장치에 끼운 다음 각각의 strip에 500 μ L의 배양된 Fraser broth를 넣고 분석을 시작하였다. 결과는 test value로 확인하였으며 0.05 이상의 수치가 나오면 양성으로 판정하였다.

$$\text{Test value} = \frac{\text{Sample RFV}}{\text{Standard RFV}}$$

(RFV; relative fluorescence value)

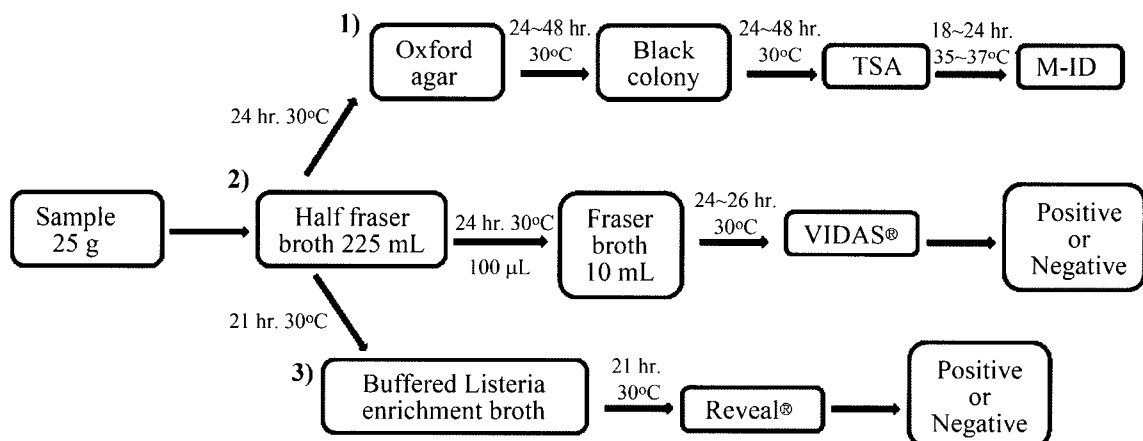


Fig. 1. Flow chart of 3 different detection procedures. 1) Culture methods for *L. monocytogenes* in milk, dairy products, processed food and sea food, 2) VIDAS®, 3) Reveal® for *Listeria*.

REVEAL® for *Listeria* (Reveal)

Reveal®을 이용한 검출은 설명서에 따라 Fig. 1에 도식되어 있는 대로 시행하였는데 이를 간략하게 요약하면 다음과 같다. Reveal® 키트에 포함된 buffered *Listeria* enrichment broth(BLEB) 배지에 멸균 증류수 10 mL를 첨가하여 녹인 다음, 여기에 앞서 예비 증균을 마친 half-Fraser broth 배양액 0.1 mL를 접종하였다. 배지병을 느슨하게 닫아 30°C에서 21시간 배양하였다. 배양 후 상층액 2 mL를 멸균 tube로 옮겨 80°C에서 20분간 가열했다. 테스트 키트는 미리 상온에 꺼내두었다. 가열한 균액은 상온에서 식힌 다음 이물질 없는 상층액으로만 135 µL를 취하여 키트의 주입구에 떨어뜨려 15-20분 후 결과를 판정하였다. 대조선(control line) 외에 test선이 나타나 총 2줄의 선이 생기면 양성으로 판정하였다.

그리고 BLEB에서 24시간을 추가배양하여 앞서 제시된 과정을 다시 한번 시행, 총 48시간 배양결과와 72시간 배양결과를 비교하였다.

통계학적 분석

통계프로그램인 GraphPad Instat(GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA)을 사용하여 95%의 신뢰한계를 갖고 통계학적인 유의차(p 값)를 분석하고 배지법에서는 24시간과 48시간의 예비 증균시간에 따라 양성인 샘플 개수 차이를 비교해 보았다. 신속검출 키트 검증에는 24시간 및 48시간 배지법과 48시간 및 72시간 신속 검출키트를 수행하여 얻은 양성 샘플 수 결과를 바탕으로 두 검출법 간의 양성 결과 수를 비교하였다. 각 검출법간의 배양시간의 변화에 따른 결과도 비교하였다. 아울러 각 방법 간의 통계학적 유의차(p 값)를 비교하였다. p 값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의차가 큰 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

배지법을 이용한 *L. monocytogenes* 검출 예비 증균 시간 비교

배지법에 따른 *L. monocytogenes* 검출에서는 음성과 양

성 대조군의 결과가 각각 음성, 양성으로 나타나 본 실험의 적합성을 입증하였다(결과 미제시). 각 식품에 존재하는 미생물 총 균수는 혼제연어와 두부는 100 CFU/mL 이하, 우유는 67 CFU/mL, 샐러드는 5.12×10^5 CFU/mL로 측정되었다.

본 실험에 사용된 네 가지의 식품 샘플에서 모두 기존 식품공전에 제시된 24시간보다 하루 더 늘린 48시간 배양 시 *L. monocytogenes* 양성 샘플의 수가 눈에 띄게 증가하였다(Table 1). 혼제연어의 경우 24시간 배양했을 때는 양성 검출되지 않았지만 48시간으로 배양 시간을 늘렸을 때는 *L. monocytogenes* 양성 샘플 수가 9개로 증가하였다. 생식용 두부도 24시간에서는 *L. monocytogenes*가 검출되지 않았으나 배양시간을 늘리자 10개의 양성 샘플이 검출되었다. 그 외에 우유에서는 2개에서 17개로, 샐러드에서는 4개에서 16개로 양성 샘플수가 증가한 결과를 얻을 수 있었다(Table 1). 혼제연어, 생식용 두부, 우유, 샐러드 모두 배양시간 간의 결과 차이에 있어서 통계학적인 유의차가 현저한 것으로 나타났다($p < 0.05$).

이 결과를 볼 때 24시간과 48시간의 배양시간 차이가 *L. monocytogenes* 검출에 상당히 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 이는 현재 우리나라 공인방법 중 24시간 예비 증균법은 *L. monocytogenes* 검출에 부적합할 수 있다는 사실로 해석할 수 있다. 이렇게 배양시간에 따라 검출결과가 현저히 달라질 수 있다는 사실은 일선 검사자들이 어떤 방법을 사용하느냐에 따라 식품 안전관리에도 지대한 영향을 미칠 수 있다고 사료된다. 48시간 배양해야 양성 결과를 얻을 수 있는 샘플을 24시간 배양하여 음성으로 판정하면 위 음성 결과를 간과할 수 밖에 없기 때문이다. 따라서 현재 우리나라 식품공전 상의 우유, 유제품, 가공식품, 수산물 샘플에 적용되는 24시간 증균 방법은 천천히 자라는 *L. monocytogenes*균의 특성에 적합하지 않은 방법이다. 또한 FDA, USDA, International Standard Organization (ISO) 등과 같은 다른 선진국의 식품안전 담당 기관의 검출 과정에 예비 증균 시간이 48시간 이상으로 명시되어 있는 것으로 보아 *L. monocytogenes*의 효율적인 검출을 위해서는 48시간 증균이 반드시 필요하다.

Table 1. Comparison of the number of *L. monocytogenes* positive samples when each artificially inoculated food samples was enriched for 24 hours and 48hours followed by culture (KOBAM) methods

Sample (background microflora)	Inoculum level (CFU/500 g)	Enrichment for 24 hr		Enrichment for 48 hr		P value
		positive sample / total sample				
Smoked salmon (<100 CFU/g)	27	0/20	9/20			0.0012 ³⁾
Tofu (<100 CFU/g)	43	0/20	10/20			0.0004 ³⁾
Milk (67 CFU/mL) ¹⁾	59	2/20	17/20			<0.0001 ³⁾
Salads (5.12 ± 10^5 CFU/g) ²⁾	664	4/20	16/20			0.0004 ³⁾

1) S.D.: ± 1.155 .

2) S.D.: ± 4.701 .

3) The statistical difference between the number of positive samples when enriched for 24 hr and 48 hr is significant.

흥미로운 사실은 정상미생물총이 g 또는 mL당 100 이하인 시유, 두부, 훈제연어와 같은 가공식품에서는 20개의 샘플 중 일부만 양성 샘플을 얻기 위한 접종량이 100 CFU/500 g 이하로 매우 적었으나 정상미생물총이 높은(10^5 CFU/mL or g 이상) 샐러드에서는 500 CFU/500 g 이상으로 굉장히 높았다는 것이다(결과 미제시). 따라서 본 연구에 사용된 접종량은 본 실험에 앞서 실행된 예비 실험 및 비가열 식품에 존재하는 세균총을 고려하여 산출하였다. 이러한 사실들을 종합해볼 때 식품의 정상 세균총 수가 식중독세균의 성장에 많은 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 본래 세균총이 많이 존재하는 비가열 식품과 축산물 등의 가공식품을 함께 조리할 경우 식품의 교차 오염 위험이 증가할 수 있다. 따라서 세균총 수가 많은 비가열 식품에서 *L. monocytogenes*를 검출할 경우에 특히 적합한 배양 시간이 중요할 것으로 사료된다.

배지법과 신속 검출 키트의 결과 비교

배지법에서의 결과와 신속 검출 키트의 결과는 Table 2에 있다. 배지법은 식품공전에서 규정된 24시간법과 24시간 추가 배양한 48시간 배양법을 사용하였고 신속검출 키트는 사용법에 따른 48시간법과 24시간 추가 배양한 72시간법을 사용하여 비교하였다. 양성 대조군의 경우 VIDAS®에서 test value가 0.05 이상으로 양성판정이 나왔으며, Reveal®에서는 선명한 두 줄의 라인이 나타났다. 음성 대조군은 VIDAS®에서 test value가 0.00으로 음성이 나왔으며, Reveal®에서는 대조선의 한 라인만 나타났다. 따라서 실험 결과의 신뢰성을 입증하였다.

생식용 두부에서는 배지법에서 24시간 배양 시 0개, 48시간 배양 시 2개의 양성 샘플이 나왔고, VIDAS®와 Reveal®에서 모두 본래 평균과정인 48시간 배양을 실시했을 때 0개의 양성 결과가 나왔고 72시간으로 늘린 경우 2개가 나왔다(Table 2). 이는 접종량이 상대적으로 적었던 (0.062 CFU/g) 관계로 양성 샘플의 수가 다른 실험에서보다 적게 나온 것으로 보인다. 이러한 결과에 비춰봤을 때,

신속키트의 권장 배양시간인 48시간으로는 매우 적은 수준으로 오염된 *L. monocytogenes*의 검출이 충분하지 못하다는 사실을 알 수 있다.

샐러드에서는 배지법을 이용했을 경우 24시간 배양 시 4개, 48시간 배양 시 16개의 *L. monocytogenes* 양성 결과를 얻었고, VIDAS®와 Reveal®에서는 각각 본래 평균과정인 48시간 배양을 실시했을 때 각각 0개, 1개의 양성 결과가 보여주었고 72시간으로 늘린 경우 두 방법 모두 16개의 *L. monocytogenes* 양성 샘플을 얻을 수 있었다(Table 2). 신속검출 키트에서 예비 평균시간을 본래 48시간보다 24시간 늘려 72시간 배양시의 양성 결과 수를 관찰한 결과 평균시간이 증가함에 따라 양성 샘플 수가 각각 10개에서 16개, 1개에서 16개로 증가하는 것을 알 수 있다.

두부에서 배지법의 24시간 배양 결과와 VIDAS®와 Reveal®의 48시간 배양 결과는 양성 샘플 수가 모두 0이었다. 그러나 배지법의 48시간 배양결과 양성 샘플 수가 2개로 나와 배지법이 우수해 보였는데 통계학적 유의차는 없었다($p>0.05$, Table 2). 샐러드에서는 배지법의 24시간 배양결과와 비교했을 때 통계학적 유의차가 없었다. 48시간 배양 샘플에서 배지법과 VIDAS®의 양성 샘플 수 간의 통계학적 유의차가 없었지만, Reveal®과는 통계학적 유의차를 보였다($p<0.05$). 다만 VIDAS®에서는 기존 48시간 배양법과 72시간 배양 시 양성 결과를 비교해 봤을 때 p value가 0.0958로 유의차가 없는 것으로 나타났으나 Reveal®에서는 유의차가 큰 것으로 나타났다($p<0.05$). 두 신속검출 키트를 72시간 배양했을 때는 양성 결과가 각각 16개로 배지법에서 48시간 배양했을 때와 동일한 결과가 나타났다.

이러한 결과를 종합해 볼 때, VIDAS®는 종(species) 수준에서 검출 가능한 방법으로 *L. monocytogenes*를 검출하는 데에 매우 효과적인 것으로 보이고 배지법의 대체방법으로 사용하기에 큰 무리가 없을 것으로 보인다. Reveal® 키트는 추가적인 기계 사용 없이 매우 신속하고 간편하게 검출할 수 있는 장점이 있는 반면, *Listeria* 속(genus) 수

Table 2. Comparison of detection pre-enrichment time related results performed by culture (KOBAM) methods and rapid detection kits

Sample (inoculum level)	Pre-enrichment period (hr)	Culture method		
		VIDAS®	Reveal	
		positive sample/total sample		
Tofu (31 CFU/500 g)	24	0/20	ND ¹⁾	ND ¹⁾
	48	2/20	0/20	0/20
	72	ND ¹⁾	2/20	2/20
Salad (664 CFU/500 g)	24	4/20	ND ¹⁾	ND ¹⁾
	48	16/20	10/20	1/20 ²⁾
	72	ND ¹⁾	16/20	16/20 ³⁾

1) ND: Not detected

2) The statistical difference between KOBAM method (48 hr) and Reveal is considered extremely significant. The p value is < 0.0001 .

3) The statistical difference between enriched for 48 hr and 72 hr in Reveal is considered extremely significant. The p value is < 0.0001 .

준에서 검출하는 방법으로 샘플 내에 본래 *L. monocytogenes*가 아닌 환경 내 다른 세균이 존재하는 경우 Reveal® 키트에서는 위음성이 나올 가능성이 있다. 따라서 *L. monocytogenes*를 집중하지 않은 본래 샘플인 음성 컨트롤이 반드시 함께 분석되어야 하며 예비양성시험(presumptive screening)을 하는 목적으로 사용하는 것이 좋은 활용방안으로 보인다.

앞서 시행된 다른 연구들을 보면, *L. monocytogenes*에 대한 mini-VIDAS LMO와 전통적인 ISO 11290-1방법을 비교한 결과를 볼 수 있다(Vaz-Velho *et al.*, 2000). 자연적으로 오염된 훈제 생선류와 가공환경의 샘플 총 295개 중 mini-VIDAS LMO에서는 양성 8개, 음성 273개, 위양성 11개, 위 음성 3개의 결과가 나왔다. 배지법인 ISO 11290-1로 검출했을 때는 양성 11개, 음성 284개, 위양성과 위음성은 각각 0개였다. 이 결과에서 볼 수 있듯이 VIDAS® 등의 신속검출 키트는 검출 과정이 보다 더 간단하고 신속한 검출이 가능하다는 장점이 있다. 또한 전통적인 배지법을 이용한 검출법보다는 양성 샘플의 수가 줄어들지만 통계학적 유의차는 없다는 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 Beumer(1997)의 연구에서도 확인할 수 있다. *L. monocytogenes*를 검출하는 여러 가지 방법 중 증균배양 과정에 고체배지가 포함된 방법이 검출에 가장 효과적인 결과를 나타냈다(Beumer *et al.*, 1997). 따라서 본 연구의 결과도 증균배양시간을 48시간으로 동일하게 했을 경우 식품공전법과 같은 배지법이 신속검출 키트법보다 통계학적인 유의차는 없지만 많은 양성 샘플 수를 보였으므로 Beumer(1997)의 연구와 일치함을 알 수 있다.

다른 식중독 세균에서의 경우, *Escherichia coli* O157에서 배지법과 신속 검출키트인 Reveal® 키트의 비교에 대한 연구가 보고된 바 있다(Chapman *et al.*, 2003). 접종량 250 CFU/25 g이면 전체 32개의 샘플 중, CT-SMAC배지법에서는 양성 결과가 32개, Reveal® 키트는 30개, 접종량 25 CFU/25 g이면 각각 28과 22개, 접종량 2-3 CFU/25 g이면 각각 25개, 14개로 배지법에서 좀 더 많은 결과를 나타내었다(Chapman *et al.*, 2003). 특히 접종량이 줄어들면서 배지법과 신속검출키트 간의 결과 차이가 더 많이 나는 것을 알 수 있다. 본 실험에서 사용한 접종량은 이보다 훨씬 적은 양으로 같은 시간 동안 증균했을 경우 배지법에서 양성 샘플 수가 많이 나온 것은 선행 연구들과 일치하는 결과라 할 수 있겠다(Beumer *et al.*, 1997; Chapman *et al.*, 2003). 또한 *Salmonella* spp.의 경우 VIDAS®와 Reveal®의 민감도와 특이도를 알아보았을 때 각각 민감도는 96% 이상, 특이도는 100%로 나타났다(Fahey *et al.*, 2006).

결론적으로 본 실험의 결과에 비추어 보면 배지법에서 예비 증균 시간이 24시간일 때는 검출 감도가 낮지만, 다

른 신속 검출 키트나 배양법과 같이 증균 시간을 48시간으로 늘리면 오히려 더 뛰어난 검출 결과를 보이는 것을 알 수 있다. 따라서 앞서 언급한 것처럼 현재 국내공인법에 명시되어 있는 예비 증균 시간을 24시간에서 48시간으로 늘린다면 보다 더 효과적으로 *L. monocytogenes*를 검출할 수 있을 것으로 보인다. 그러나 배지법을 기초로 하는 검출법은 확인에서 동정 과정까지 포함해서 기본적으로 시간이 많이 소요되고, 독소를 생성할 경우에는 살아있는 균에서만 검출이 가능하다는 단점이 있다(Choi *et al.*, 2007). 따라서 신속검출 키트의 사용은 검출 단계가 간단하고 속 혹은 중 수준까지 확신을 가지고 신속하게 양성 및 음성 결과를 판정할 수 있기 때문에 실제 식품검사에서 많이 나오게 되는 음성 샘플을 신속하게 배제하기 위한 presumptive screening에 효과적으로 이용될 것으로 사료된다. 그러나 목표균의 종류와 식품군에 따라서 권장 배양시간이 충분하지 않은 경우가 있기 때문에 신속키트 사용 전에 반드시 검증과정을 거쳐 유효성을 입증한 후 사용해야 한다. 또한 식중독의 예방과 원인체의 신속한 검출을 위하여 앞으로 검출법에 보다 더 효과적으로 적용할 수 있는 예비 증균법 개발에 집중연구가 요구된다.

요 약

*L. monocytogenes*는 최근 전 세계적으로 주목받고 있는 식중독의 원인체 중 하나로서 면역력이 약한 사람에게서 심각한 리스테리아증을 유발한다. 이 때문에 안전한 식품 제공과 공중보건 증진 측면에서 *L. monocytogenes*균을 검출하는 것은 매우 중요하다. 본 연구의 목적은 현재 사용되고 있는 배지법에서 배양시간에 따른 검출능력을 비교해보고, 상용화된 *L. monocytogenes* 신속검출 키트의 유효성을 검증하는 것이다. 다양한 식품 샘플(훈제연어, 생식용 두부, 우유, 샐러드)에 총 20개의 샘플에서 일부분의 양성 결과가 나오도록 *L. monocytogenes*를 접종하였다. 이를 예비 증균과 배지에서 배양을 거쳐 마지막으로 Microgen™ Listeria-ID를 이용하여 균을 확인하였다. 신속 검출 키트인 VIDAS® *Listeria monocytogenes* II(LMO2)와 REVEAL® for *Listeria* 도 시행하여 배지법과 검출능력을 비교하였다. 배지법에서 배양시간을 24시간에서 48시간으로 늘리면 훈제연어는 0개에서 9개, 두부는 0개에서 10개로, 우유는 2개에서 17개로, 샐러드는 4개에서 16개로 모든 식품 샘플에서 양성결과가 눈에 띄게 증가하였다. 따라서 24시간을 채택하고 있는 배지법에서의 예비증균 시간을 48시간으로 늘리는 것이 필요하다 할 수 있겠다. 신속검출키트와 배지법 사이에는 통계학적 유의차가 없는 것으로 나타나 배지법을 시행하기에 앞서 예비양성시험(presumptive screening)으로 활용하기에 알맞다고 사료된다.

감사의 글

본 연구는 경인지방식품의약품안전청의 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사 드립니다. 또한 실험에 도움을 아끼지 않은 이재훈, 천정환, 박정연에게 감사드립니다.

참고문헌

1. Barocci, S., Calza, L., Blasi, G., Briscolini, S., Curtis, M. D., Palombo, B., Cucco, L., Postacchini, M., Sabbatini, M., Graziosi, T., Nardi, S., and Pezzotti, G. (2008) Evaluation of a rapid molecular method for detection of *Listeria monocytogenes* directly from enrichment broth media. *Food Control* **19**, 750-756.
2. Beumer, R. R., te Giffel, M. C., and Rombouts, F. M. (1997) A comparison of rapid methods for the detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. In: Beumer, R. (ed), *Listeria monocytogenes* detection and behaviour in food and in the environment (Thesis Landbouwniversiteit Wageningen), Koninklijke Bibliotheek, Den Haag, Netherlands, pp. 69-86.
3. Chapman, P. A. and Ashton, R. (2003) An evaluation of rapid methods for detecting *Escherichia coli* O157 on beef carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* **87**, 279-285.
4. Choi, J. G., Shim, W. B., Je, J. H., Kim, J. Y., Lee, H. H., Kim, M. G., Ha, S. D., Kim, K. S., Kim, K. Y., Kim, C. H., and Chung, D. H. (2007) Development of immunochromatography for the rapid detection of *Listeria monocytogenes*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **39**, pp. 299-303.
5. Fahey, J. W., Ourisson, P. J., and Degnan, F. H. (2006) Pathogen detection, testing, and control in fresh broccoli sprouts. *Nutr. J.* **21**, 5-13.
6. Kim, S. H., Kim, J. Y., Han, W., Jung, B. Y., Chuong, P. D., Joo, H. J., Ba, H. V., Son, W. G., Jee, Y. H., Yoon, B. S., Lee, Y. S., and Lim, Y. K. (2007) Development and evaluation of an immunochromatographic assay for screening *Listeria* spp. in pork and milk. *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 515-519.
7. Kim, Y. S. and Ha, S. D. (2006) Detection and isolation of foodborne bacteria using conventional culture media. *Safe Food* **1**, 5-15.
8. Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., and Gibbs, P. A. (2004) Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiol.* **21**, 213-216.
9. Midelet-Bourdin, G., Leleu, G., and Malle, P. (2007) Evaluation of the international reference methods NF EN ISO 11290-1 and 11290-2 and an in-house method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from retail seafood products in France. *J Food Prot.* **70**, 891-900.
10. O' Grady, J., Sedano-Balbás, S., Maher, M., Smith, T., and Barry, T. (2008) Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. *Food Microbiol.* **25**, 75-84.
11. Oravcová, K., Trncíková, T., Kuchta, T., and Kacčíková, E. (2008) Limitation in the detection of *Listeria monocytogenes* in food in the presence of competing *Listeria innocua*. *J Appl. Microbiol.* **104**, 429-37.
12. Ramaswamy, V., Cresence, V. M., Rejitha, J. S., Lekshmi, M. U., Dharsana, K. S., Prasad, S. P., and Vijila, H. M. (2007) *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol. Immunol. Infect.* **40**, 4-13.
13. Seo, K. H., Jeong, D. H., Kim, H. Y., and Jeong, D. G. (2006) Guide line and effective validation of rapid kits for food hazardous materials. KFDA 2006 reserch report, <http://rmd.kfda.go.kr/index.jsp>.
14. Vaz-Velho, M., Duarte, G., and Gibbs, P. (2000) Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. *J Microbiol. Methods* **40**, 147-151.
15. <http://www.aoac.org/>
16. 김명숙, 김옥미, 김인구, 이경임, 이선희, 이정갑, 임성미, 정성태, 조좌형 (2002) *식품위생학*. 훈민사, 서울.

(2008.07.15 접수/2008.10.29 수정/2008.11.26 채택)