

Non-O157 장출혈성대장균 검출을 위한 증균배지 및 선택배지 성능 평가

이다연 · 김희언 · 서동원 · 조용선*
한국식품연구원 식품분석센터

Evaluation of enrichment broth and selective media for the detection of non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Da Yeon Lee, Hee-eon Kim, Dong Won Seo, and Yong Sun Cho*
Food Analysis Center, Korea Food Research Institute

Abstract In this study, specific and rapid enrichment and growth conditions for the most important, classic non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroups were assessed. Three enrichment broth types, namely, EC medium with MUG broth, BRILA broth, and mTSB broth with novobiocin, were compared to identify the optimum enrichment broth for EHEC isolation. Four kinds of selective media, namely, ENDO agar, Chromocult agar, TBX agar, and CHROMagar™ STEC medium, were compared to identify the optimum one for non-O157 EHEC isolation. The results suggested that incubation in EC medium with MUG broth at 42°C for 20 h is optimum for the enrichment of non-O157 EHEC. TBX agar was identified to have the highest specificity among the tested media. Consequently, a combination of complementary selective media according to serotype must be considered for comprehensive isolation of specific EHEC.

Keywords: enterohemorrhagic *Escherichia coli*, enrichment broth, selective media, evaluation

서 론

Verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC)는 장 점막에 부착 후 verotoxin (Stx)의 강력한 세포 독소를 생산하는 것이 특징이며 이 질균(*Shigella dysenteriae*)이 생성하는 독소와 거의 같거나 밀접한 관련이 있다고 하여 Shigatoxin이라고도 한다. Verotoxin은 Stx1, Stx2 두 가지 형으로 분류되며 두 독소를 모두 생산하는 균과 어느 한쪽만 생산하는 균이 있고, 두 독소는 모세혈관을 손상시켜 용혈성 빈혈을 일으키는 생화학적 특성과 작용 기작은 비슷하나 Stx2가 더 위험하다고 알려져 있다(1-3).

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)은 VTEC의 하위 group으로 사람에게 출혈성 대장염(Hemorrhagic colitis, HC)과 급성 신장장애 등을 일으키는 용혈성 요독증후군(Haemolytic uraemic syndrome, HUS) 등의 임상증상을 나타내는 균으로(2,4,5) 1983년 미국에서 햄버거로 인한 집단 식중독 발병의 원인으로 *E. coli* O157:H7이 처음 보고된 후(6), EHEC로 인한 식중독의 발병이 계속 증가하고 있다. EHEC의 감염식품은 완전히 익지 않은 고기나 샐러드, 멸균되지 않은 우유 등으로 확인되었으며 특징은 내산성으로 pH 2-4에서 생존이 가능하며, 균 자체는 70°C 정도 온도에서 2분이면 사멸한다(2,7). 아직까지 이 균에 유효한 백신은 없으며, 잠복기는 2-8일이다. 유아의 경우에는 환자의 약 10% 정

도까지 합병증을 일으키는데, 그 중 2-7% 정도는 사망하는 것으로 알려져 있으며, 고령자의 경우 용혈성 요독증후군으로 인한 사망률이 50%에 달한다(7). 인체 최소 감염량이 매우 낮아 1.0 log CFU/g 미만의 적은 균량에 의해서도 발병(8,9)하며 전염성이 높고 식중독에 의해 집단발병 할 수 있어 국내에서는 법정 전염병 제1군으로 지정하고 있다(7).

EHEC는 현재 400개 이상의 혈청형이 존재하나 모두가 HUS를 유발하는 것은 아니다. 인체에서 임상증상을 일으키는 경우는 *E. coli* O157이 가장 많으며 non-O157 EHEC 혈청형으로는 O26, O91, O103, O111, O121, O145등이 알려져 있다(10-13). 과거에는 EHEC에 의한 식중독 발생은 *E. coli* O157:H7에 의한 것이 대부분이었기 때문에 검출법 또한 *E. coli* O157에 국한되어 있었다. 그러나 최근 non-O157 EHEC에 의한 식중독의 보고가 증가하고 있어 non-O157 EHEC의 검출법에 대한 연구의 중요성이 커지게 되었다(3,9,14-16).

국외의 경우 미국에서 발생하는 장출혈성대장균 식중독 중 60%는 non-O157 EHEC에 의한 것이며(7), 2011년에는 유럽에서 채소류에 오염된 *E. coli* O104:H4에 의한 식중독으로 3,200여명의 환자가 발생한 적이 있다(5,9). 국내의 경우 주로 *E. coli* O26, O111, O145에 의한 non-O157 EHEC 감염이 보고되었고(17), 2004년 초등학교생 68명이 학교급식에 의해 *E. coli* O91에 의한 식중독에 집단 감염된 적이 있으며(10), 2006년 오염된 햄버거 패티 섭취에 의한 것으로 추측되는 *E. coli* O104:H4에 의한 HUS 발병사례가 보고되었다(18).

그러나 non-O157 EHEC에 의한 감염 빈도가 국외에 비해 낮는데 이것은 이들 혈청형에 대한 감염증이 실제로 적을 수도 있지만 non-O157 EHEC의 검출법이 확립되지 않아 그 동안 많은 사례를 검출하지 못하여 나타난 결과일 가능성도 예상된다(6,10).

*Corresponding author: Yong Sun Cho, Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, Seongnam 13539, Korea
Tel: +82-31-780-9242
Fax: +82-31-780-9280;
E-mail: yscho@kfri.re.kr
Received May 9, 2016; revised June 22, 2016;
accepted June 24, 2016

또한 EHEC는 식품에 소량 존재하기 때문에 증식과정에서 background 미생물과의 경쟁에서 밀려 증식하지 못하여 검출되지 않았을 가능성도 있다(13).

따라서 본 연구는 기존에 나와있는 *E. coli* 배지를 선별하여 non-O157 EHEC의 혈청형별 증균 및 선택배지에서의 분리 조건을 비교 분석하고 결과를 토대로 최적의 검출 방법을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

표준 균주

본 실험에 사용한 균주는 국가병원체 자원 은행(National Culture Collection for Pathogens, NCCP), American type culture collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양은 표준균주 15종, 분리주 3종으로 tryptic soy agar (TSA; Merck Co., Darmstadt, Germany)에서 37°C, 24시간 배양 하여 활성화 시킨 후 시험 분석하였다. *Escherichia coli* (ATCC 25922), *E. coli* O111 (ATCC 43887), *E. coli* O121 (ATCC BAA 2190), *E. coli* O145:H34 (ATCC BAA 2216), *E. coli* O157 (ATCC4 3894), *E. coli* (Stx1, NCCP 13720), *E. coli* (Stx2, NCCP 13721), *E. coli* O26:K6, *E. coli* O91, *E. coli* O103 (isolated strain), *Shigella sonnei* (ATCC 9290), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Typhi (ATCC 19430), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Pseudomonas* spp. (ATCC1 3261), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610) 총 18종의 균주를 사용하였다.

증균배지 성능 및 배양 조건 비교

시험구로 사용한 균주는 *E. coli* 3종, EHEC 혈청형별 7종을 분석하였으며 대조구로는 *E. coli*와 유사한 특성을 가진 그람 음성 균 8종을 선택하여 증균배지에 EC medium with 4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), Brilliant-green bile lactose broth (Merck Co.), modified tryptic soy broth with novobiocin (Merck Co.) 3종을 선택하여 증균배지 10 mL에 각 균을 0.5 McFarland로 희석하여 동일량 접종하고 접종하고 42, 44.5°C에서 배양하며 20, 24, 48시간 별 생육 여부를 확인하였다. 결과처리는 비생장(no growth)는 0, 생장

(growth) *E. coli*는 1, 억제생장(growth inhibition; *E. coli* 외의 균 생육)는 -1으로 3반복 실험 실시 후 나온 값의 합으로 증균배지 검출율을 계산하였다.

선택배지 성능 비교

혈청형별 선택배지의 성능 비교를 위해 *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *En. aerogenes*, *E. coli*와 혈청형 균주 총 5종의 균을 100 CFU/g이 되도록 시험액 제조 후 ENDO agar (Merck Co.), Chromocult agar (Merck Co.), TBX agar (Merck Co.), CHROMagar™ Shiga toxin-producing *E. coli* medium (CHROMagar, Paris, France) 각 4종의 선택배지에 3장씩, 한 배지당 시험액을 250 μL씩 분주하고 도말 하였다. 시험구로 7종의 EHEC 혈청형 및 verotoxin 유전자를 가지고 있는 병원성 대장균 2종을 사용하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 생성되는 특징적인 집락의 형태를 관찰하여 전형적인 양성 5개 집락, 음성 5개 집락을 추정 균주로 분리하였다. 분리한 집락 10개에 대하여 각 혈청형 확인을 위한 PCR을 수행하고 양성(True Positive), 위양성(False positive), 위음성(False Negative), 음성(True Negative)을 판정하였다. 결과는 아래 산출식을 이용하여 민감성(sensitivity), 특이성(specificity), 효율성(efficiency)으로 계산하였다.

$$\% \text{ Sensitivity} = \frac{\text{True positive}}{\text{True positive} + \text{False negative}} \times 100$$

$$\% \text{ Specificity} = \frac{\text{True negative}}{\text{True negative} + \text{False positive}} \times 100$$

$$\% \text{ Efficiency} = \frac{\text{True positives} + \text{True negatives}}{\text{Total}} \times 100$$

PCR을 이용한 대장균의 혈청학적 검사

대장균의 혈청학적 검사를 위해 O26, O157, O145, O111, O121, O103, O91의 혈청형에 대해 *rfb* (o-specific polysaccharide), *wzx* (o-unit flippase), *wbsD* (aminotransferase)의 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 사용하였다(Table 1)(19,20). PCR 반응액은 1 U Taq polymerase, 250 μM 각 dNTPs, 10 mM Tris-

Table 1. Oligonucleotide primer used various *E. coli* serogroups

Pathogen	Target gene (bp)	Primer (5'-3')	Reference
O26	<i>wzx</i> (152)	GCG CTG CAA TTG CTT ATG TA TTT CCC CGC AAT TTA TTC AG	Angela <i>et al.</i> (2011)
O157	<i>rfbE</i> (259)	CGG ACA TCC ATG TGA TAT GG TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC	Angela <i>et al.</i> (2011)
O145	<i>wzx</i> (374)	TGC TCG ACT TTT ACC ATC AAC AAC CAA CAC CAT ACA CCT TGT CTT	Zachary <i>et al.</i> (2012)
O111	<i>rfb</i> (406)	TAG AGA AAT TAT CAA GTT AGT TCC ATA GTT ATG AAC ATC TTG TTT AGC	Angela <i>et al.</i> (2011)
O121	<i>wzx</i> (587)	TCA TTA GCG GTA GCG AAA GG TTC TGC ATC ACC AGT CCA GA	Zachary <i>et al.</i> (2012)
O103	<i>wzx</i> (1,117)	TTC ATC ACA AGT TTC ACA AG CGT AAT CAC CTT GAT TTT CT	Angela <i>et al.</i> (2011)
O91	<i>wbsD</i> (940)	GAT GAA TCA ACC TTA TCG AG CTG CTT ATG TAT AGG AAT TGG	Angela <i>et al.</i> (2011)

HCl, 30 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂가 포함된 reaction buffer (AccuPower PCR Pre mix, Bioneer, Daejeon, Korea)에 10 pmol의 primer에 순수 분리된 단일 집락을 template로 총 반응액을 20 µL로 하였다. PCR 반응 조건은 pre-denaturation 94°C 5분 후, 35 cycle의 94°C 30초, 55°C 75초, 68°C 75초로 반응하였고 최종 extension은 68°C 7분 반응 시켰다. 증폭된 DNA는 2% agarose gel (Takara, Kyoto, Japan)을 100 V로 30분간 전기영동 후 ethidium bromide (1 µg/mL)에 염색하여 UV transilluminator로 확인하였다.

결과 및 고찰

증균배지 성능 및 배양 조건 비교

증균배지 성능 및 배양 조건의 비교 결과는 Table 2에 나타나 있다. *E. coli* 및 EHEC 혈청형 7종과 verotoxin 유전자를 가지고 있는 병원성 대장균 2종에 대해 growth *E. coli* 값이 클수록 검출율이 높다고 판단 하였다. 증균배지 3종을 대상으로 검출율을 비교, 분석한 결과 EC-MUG 배지는 42°C에서 24시간 이상 배양 시 30, BRILA 배지는 42°C에서 20시간 이상 배양 시 30으로 가장 높았고, mTSB 배지는 48시간 이상 배양하여도 28로 다른 배지에 비해 낮았다. 기존 *E. coli* 검출방법으로 알려진 44.5°C에서 24시간 배양하는 것보다 42°C에서 배양하는 것이 검출율이 높았다.

EHEC를 제외한 그람 음성균 8종에 대한 growth inhibition가 높을 수록 배지 검출율이 높다고 판단할 수 있는데, EC-MUG 배지 42°C에서 20시간 배양했을 때와 EC-MUG 배지 44.5°C에서 20, 24, 48시간 배양했을 때 그람 음성균 8종 모두 증균되지 않았다. 따라서 growth inhibition는 EC-MUG가 가장 좋다는 것을 알 수 있었다. 그러나 EC-MUG 배지에서 42°C에서 48시간 배양

시 -7, BRILA 배지와 mTSB 배지는 42°C에서 48시간 배양 시 -15로 배지효율이 가장 낮아 위 조건에서의 48시간 배양은 지양해야 한다고 생각된다.

증균배지를 사용하는 이유는 목적하는 균주를 잘 자라게 해서 분리하기 위함이다. 만일 식품이 한 종류의 균에 오염되어 있을 경우는 균주의 증식만 높이면 되지만 일반적인 식품은 다양한 균주에 오염되어 있다. 따라서 다양한 균에 오염되어 있을 때는 목적하는 균만 선별적으로 자라게 하기 위해서 다른 균들의 생장을 제어할 필요가 있다. 또한 배지에는 일정량의 영양분만 존재하기 때문에 미생물이 혼합되어 있을 경우 서로 경쟁하여 우점을 형성한 미생물만이 증식하게 된다. 따라서 모든 균이 잘 자라는 배지를 사용할 경우 경쟁을 통해 EHEC의 생육을 저해할 가능성이 있기에 특이성이 있는 증균배지를 선택하는 것이 background 미생물에 의한 위양성 발생 가능성을 최소화시키는 방법이라 생각된다.

위 연구 결과 목적하는 EHEC 균주의 증균배지 별 검출율은 EC-MUG 증균배지가 EHEC에 대해서 가장 높은 검출율이 확인된 반면 *E. coli*를 제외한 그람 음성균에 대해서는 가장 낮은 검출율을 나타내었다. 미농무성 또한 background 미생물이 많은 경우 EHEC는 42°C 배양을 권장하고 있으므로 따라서 가장 최적의 배지는 EC-MUG 증균배지로 42°C에서 24시간 배양하면 EHEC의 효율적인 증균이 이루어질 수 있을 것이라 생각된다.

선택배지 성능 비교

CHROMagar™ STEC는 시가독소 생성 대장균의 검출을 위한 발색배지로서 대표적인 시가독소생성 대장균 혈청형은 자주색, 그 외 대장균군은 무색, 과란색 집락을 형성한다(21). CHROMagar™

Table 2. Results of growth enrichment broth

Enrichment	EC-MUG						BRILA						mTSB								
	42°C		44.5°C		42°C		44.5°C		42°C		44.5°C										
Incubation temperature	20	24	48	20	24	48	20	24	48	20	24	48	20	24	48	20	24	48			
Incubation time (h)	20	24	48	20	24	48	20	24	48	20	24	48	20	24	48	20	24	48			
Control <i>E. coli</i>	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	3	1	2	2
serotype	<i>E. coli</i> O26	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3	2	2	3		
	<i>E. coli</i> O91	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2		
	<i>E. coli</i> O103	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
	<i>E. coli</i> O111	3	3	3	2	2	2	3	3	3	0	0	0	3	3	3	2	2	2		
	<i>E. coli</i> O121	3	3	3	2	3	3	3	3	3	1	2	2	3	3	3	0	2	2		
	<i>E. coli</i> O145	2	3	3	2	2	3	3	3	3	1	2	2	3	3	3	2	2	3		
	<i>E. coli</i> O157	0	3	3	0	0	0	3	3	3	0	0	0	2	2	2	0	0	0		
toxin	<i>E. coli</i> (Stx1)	3	3	3	0	0	0	3	3	3	0	1	2	2	2	2	0	0	0		
	<i>E. coli</i> (Stx2)	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		
etc.	<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	-2	-3	-3	0	0	-1	-2	-2	-2	0	0	0		
	<i>Salmonella enteritidis</i>	0	-1	-1	0	0	0	-2	-2	-2	0	0	0	-1	-1	-2	0	0	-1		
	<i>Salmonella typhi</i>	0	0	-1	0	0	0	-2	-2	-3	0	0	0	-3	-3	-3	-2	-2	-2		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	-2	0	0	0	0	0	-2	0	0	0	-1	-2	-3	0	0	-1		
	<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0		
	<i>Pseudomonas spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	-1	-2	0	0	0	-1	-2	-2	0	0	0	-1	-1	-2	-1	-1	-2		
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	0	0	-1	0	0	0	0	-1	-3	-1	-1	-1	-1	-2	-2	0	0	0		
<i>E. coli</i> growth	26	30	30	18	21	22	30	30	30	15	19	20	26	27	28	15	18	20			
Growth inhibition	0	-2	-7	0	0	0	-7	-10	-15	-1	-1	-2	-9	-11	-15	-3	-3	-6			
Total	26	28	23	18	21	22	23	20	15	14	18	18	17	16	13	12	15	14			

Table 3. Evaluation of CHROMagar™ STEC medium

Strain	STEC Agar									Detection Avg.
	O26	O91	O103	O111	O121	O145	Stx1	Stx2	O157	
True positive	5/5	-	-	-	-	5/5	-	5/5	5/5	
True negative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
False positive	0/5	-	-	-	-	0/5	-	0/5	0/5	
False negative	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Sensitivity (%)	100	0	0	0	0	100	0	100	100	44
Specificity (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Efficiency (%)	50	0	0	0	0	50	0	50	50	22
Ave.	50	0	0	0	0	50	0	50	50	22

*- : Positive colony and Negative colony are no growth

Table 4. Evaluation of ENDO Agar medium

Strain	ENDO Agar									Detection Avg.
	O26	O91	O103	O111	O121	O145	Stx1	Stx2	O157	
True positive	3/5	3/5	5/5	4/5	0/5	4/5	3/5	1/5	4/5	
True negative	5/5	5/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	4/5	5/5	
False positive	2/5	2/5	0/5	1/5	5/5	1/5	2/5	4/5	1/5	
False negative	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	1/5	0/5	
Sensitivity (%)	100	100	100	100	0	100	100	50	100	81
Specificity (%)	71	71	100	83	0	83	71	50	83	68
Efficiency (%)	80	80	100	90	0	90	80	50	90	73
Ave.	84	84	100	91	0	87	84	50	91	74

STEC에서 *E. coli* O26, *E. coli* O145, *E. coli* O157, *E. coli* (Stx2)을 분주한 배지에 음성 의심 집락은 자라지 않았고 양성 의심 집락만 자랐으며 양성 의심 집락을 PCR 확인 시 모두 양성 균주로 확인되었으므로 민감성이 100%로 굉장히 높았으나 recovery가 다른 배지에 비해 현저하게 낮아 CHROMagar™ STEC에서 EHEC의 생육은 좋지 않았다. 식품 중에 존재하는 EHEC의 균량은 굉장히 적기 때문에 충분히 증균이 되지 않은 배양배지에서 EHEC를 분리하는 선택배지로 사용하는 것은 지양해야 한다고 생각된다. 또한 그 외 5종의 혈청형이나 독소를 가진 균은 CHROMagar™ STEC에서 양성 의심 집락, 음성 의심 집락이 전혀 생육하지 않았기 때문에 *E. coli* O26, *E. coli* O145, *E. coli* O157, *E. coli* (Stx2)을 목적으로 한 경우에만 사용해야 할 것으로 생각된다(Table 3). ENDO agar는 대장균/군 검출을 위한 배지로서 유당을 발효하는 균은 녹색의 금속성 광택을 가진 집락을 형성, 유당을 비발효하는 균은 무색의 집락을 형성한다(22). 9종의 균 중 *E. coli* O103이 100%의 가장 높은 검출율을 보였다. 반면, *E. coli* O121은 대장균의 전형적 집락인 녹색의 금속성 광택이 아닌 자주색의 대장균군의 양상이 나타났다. 이 실험에서는 미지의 균주일 경우를 전제로 하였기에 다른 혈청형 균들과 동일하게 녹색 금속성 광택을 보이는 집락을 양성으로 판단하였다. 그로 인해 선택한 집락 모두 위양성, 위음성이 되어 검출율이 0%를 보였다. 따라서 non-O157 EHEC 검출 시험시 ENDO agar를 사용하였을 때는 대장균군 및 대장균 양상의 집락을 모두 시험해 보아야 한다. 식품에 오염이 되어있을 경우에도 ENDO agar에서 *E. coli* O121은 검출이 불가능한 것으로 판단되었다(Table 4).

Chromocult agar는 대장균/군 검출을 위한 배지로 salmon-gal에 의해 β -D-glucuronidase가 분해되어 대장균군은 자주색, 대장균은 보라색 혹은 파란색을 띄는 집락을 형성한다(23). *E. coli* O103,

E. coli O111이 100%의 검출율을 보였으나, *E. coli* O157은 위양성과 위음성이 많이 나타나 검출율이 9%로 가장 낮았다(Table 5).

TBX agar는 X-glucuronide기질을 첨가한 발색배지로 β -glucuronidase enzyme활성에 의해 대장균을 검출하는 원리로 *E. coli*는 녹색, *E. coli* O157은 하얀색, 그 외 대장균군은 하얀색 혹은 녹-베이지색 집락을 형성한다(21). TBX agar는 ENDO agar, Chromocult agar와 마찬가지로 *E. coli* O103이 검출율 100%로 가장 높았으며, 50%의 가장 낮은 검출율을 보인 *E. coli* O91을 제외한 8종의 균은 위양성이 나타나지 않아 4종의 배지 중 가장 높은 민감성을 나타내었다. 특이성과 효율성 또한 다른 배지에 비해 높아 4종의 선택배지 중 80%의 최고 검출율을 보였다(Table 6). 본 연구의 목적은 기존에 분리법이 확립되어있는 *E. coli* O157:H7을 분리하는 것보다는 non-O157 EHEC의 다양한 혈청형을 효과적으로 분리할 수 있는 배지의 비교가 목적이었는데, *E. coli* O157을 제외한 non-O157 EHEC에 가장 효과적인 배지를 확인결과 TBX agar가 검출율 80.5%로 가장 높았다(Table 7).

최적 선택배지는 민감성, 특이성, 효율성의 평균이 높을수록 검출율이 높다고 판단할 수 있다. 그러나 실험결과 검출율이 가장 높은 배지도 단독으로 사용했을 경우 다양한 EHEC 혈청형 균을 검출 하기는 어렵다고 생각된다. 개별 분리배지의 경우 분리 효율이 월등하게 높지 않기 때문에 적어도 두 가지 또는 세 가지의 분리배지를 동시에 사용하여야 식품에서 검출 확률을 증가시킬 수 있다는 보고가 있으므로(24) EHEC를 효과적으로 검출하고자 할 경우 TBX agar와 보완이 가능한 그 외의 배지를 사용하여 효과적인 검출이 가능할 것으로 생각된다. 또한, 각 배지가 혈청형에 따른 분리효율이 다르므로 목적하는 혈청형이 있다면 본 연구에서의 결과를 참조하여 가장 적합한 배지를 선택해야 할 것으로 보인다.

Table 5. Evaluation of Chromocult Agar medium

Strain	Chromocult Agar									Detection Avg.
	O26	O91	O103	O111	O121	O145	Stx1	Stx2	O157	
True positive	4/5	3/5	5/5	5/5	2/5	3/5	0/5	3/5	0/5	
True negative	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	1/5	
False positive	1/5	2/5	0/5	0/5	3/5	2/5	5/5	2/5	5/5	
False negative	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	4/5	
Sensitivity (%)	100	100	100	100	100	75	0	100	0	75
Specificity (%)	83	71	100	100	62	66	50	71	16	69
Efficiency (%)	90	80	100	100	70	70	50	80	10	72
Ave.	91	84	100	100	77	70	33	84	9	72

Table 6. Evaluation of TBX Agar medium

Strain	TBX Agar									Detection Avg.
	O26	O91	O103	O111	O121	O145	Stx1	Stx2	O157	
True positive	2/5	2/5	5/5	4/5	4/5	3/5	1/5	3/5	1/5	
True negative	5/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	
False positive	3/5	3/5	0/5	1/5	1/5	2/5	4/5	2/5	4/5	
False negative	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	
Sensitivity (%)	100	50	100	100	100	100	100	100	100	94
Specificity (%)	62	50	100	83	83	71	55	71	55	70
Efficiency (%)	70	50	100	90	90	80	60	80	60	76
Ave.	77	50	100	91	87	84	72	84	72	80

Table 7. Comparison of non-O157 EHEC selective Agar medium

Non-O157	ENDO Agar	Chromocult Agar	TBX Agar	STEC Agar
Sensitivity (%)	78.6	84.4	92.9	37.5
Specificity (%)	66.1	75.4	71.9	0.0
Efficiency (%)	71.3	80.0	77.5	18.8
Ave.	72.3	79.9	80.5	18.8

향후 non-O157 EHEC의 다양한 혈청형에 적용 될 수 있는 효율적인 배지의 개발이 필요하며 배지의 개발 시 적절한 기질을 사용하여 검출하고자 하는 세균의 생육도 고려해야 할 필요성이 있다고 생각된다.

요 약

본 연구는 non-O157 EHEC의 혈청형별 증균 및 선택배지에서 분리 조건 및 비교 시험을 하여 최적의 검출 방법을 제시하고자 하였다. EC medium with MUG broth, BRILA broth, mTSB broth with novobiocin 3종의 증균배지 성능 및 배양 조건의 비교 결과 EC-MUG 증균배지를 42°C에서 24시간 배양하면 EHEC의 효율적인 증균이 이루어질 수 있을 것이라 생각된다. ENDO agar, Chromocult agar, TBX agar, CHROMagar™ STEC medium 4종의 선택배지에 가장 효과적인 배지를 확인결과 TBX agar가 검출율이 가장 높았으나 1종의 배지를 사용했을 경우 다양한 EHEC 혈청형 균를 검출 하기는 어렵다고 생각된다. 그러므로 EHEC를 효과적으로 검출하고자 할 경우 TBX agar와 보완이 가능한 그 외의 배지를 사용하여야 효과적인 검출이 가능할 것으로 생각된다. 또한, 각 배지가 혈청형에 따른 분리효율이 다

르므로 본 연구 결과를 참조하여 가장 적합한 배지를 선택 해야 할 것으로 보인다. 향후 non-O157 EHEC의 적절한 기질을 사용하여 다양한 혈청형을 모두 검출 할 수 있는 효율적인 배지의 개발이 필요하다고 생각된다.

References

1. Koo MS, Kim HJ. Shiga toxin producing *Escherichia coli* and foodborne disease. *Safe Food* 6: 23-28 (2011)
2. Rey J, Sánchez S, Blanco JE, de Mendoza JH, de Mendoza MH, García A, Gil C, Tejero N, Rubio R, Alonso JM. Prevalence, serotypes and virulence genes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 107: 212-217 (2006)
3. Kim HY, Kim EJ, Park YC, Cho JI, Lee JO. Prevalence and characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) isolated from ground beefs distributed in Gyeong-in region. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 773-778 (2006)
4. Karmali MA, Petric M, Steele BT, Lim C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 321: 619-620 (1983)
5. Gill A, Martinez-Perez A, McIlwham S, Blais B. Development of a method for the detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in Food. *J. Food Protect.* 75: 827-837 (2012)
6. Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* Serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681-685 (1983)
7. Centers for Disease Control and Prevention. National Enteric Disease Surveillance: STEC Surveillance Overview. Available from: <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/pdfs/national-stec-surveillance-overview-508c.pdf>. Accessed July. 28, 2016.
8. Woteki CE, Kineman BD. Challenges and approaches to reducing foodborne illness. *Annu. Rev. Nutr.* 23: 315-344 (2003)
9. Tzschoppe M, Martin A, Beutin L. A rapid procedure for the

- detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104: H4 strain from ready-to-eat vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 152: 19-30 (2012)
10. Park S, Kim SH, Seo JJ, Kee HY, Kim MJ, Seo KW, Lee DH, Choi YH, Lim DJ, Hur YJ, Cho SH, Lee BK. An outbreak of inapparent non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Korean J. Med.* 70: 495-504 (2006)
 11. Ojeda A, Prado V, Martínez J, Arellano C, Borczyk A, Johnson W, Lior H, Levine MM. Sorbitol-negative phenotype among enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains of different serotypes and from different sources. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2199-2201 (1995)
 12. Pradel N, Livrelli V, de Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheutz F, Sirot J, Joly B, Forestier C. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1023-1031 (2000)
 13. Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K. Characterization of shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1099-1108 (2004)
 14. Ludwig K, Bitzan M, Zimmermann S, Kloth M, Ruder H, Muller-Wiefel DE. Immune response to non-O157 vero toxin-producing *Escherichia coli* in patients with hemolytic uremic syndrome. *J. Infect. Dis.* 174: 1028-1039 (1996)
 15. Kleanthous H, Smith HR, Scotland SM, Gross RJ, Rowe B, Taylor CM, Milford DV. Haemolytic uraemic syndromes in the British isles, 1985-8: Association with verocytotoxin producing *Escherichia coli*. Part 2: Microbiological aspects. *Arch. Dis. Child.* 65: 722-727 (1990)
 16. Rüssmann H, Kothe E, Schmidt H, Franke S, Harmsen D, Caprioli A, Karch H. Genotyping of shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. *J. Med. Microbiol.* 42: 404-410 (1995)
 17. Jeon BW, Jeong JM, Won GY, Park H, Eo SK, Kang HY, Hur J, Lee JH. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O26 and O111 from cattle in Korea. *Int. J. Food Microbiol.* 110: 123-126 (2006)
 18. Bae WK, Lee YK, Cho MS, Ma SK, Kim SW, Kim NH, Choi KC. A case of hemolytic uremic syndrome caused by *Escherichia coli* O104:H4. *Yonsei Med. J.* 47: 437-439 (2006)
 19. Valadez AM, Debroy C, Dudley E, Cutter CN. Multiplex PCR detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O157, O103, O91, O113, O145, O111, and O26 experimentally inoculated in beef carcass swabs, beef trim, and ground Beef. *J. Food Protect.* 74: 228-239 (2011)
 20. Paddock Z, Shi X, Bai J, Nagaraja TG. Applicability of a multiplex PCR to detect O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 serogroups of *Escherichia coli* in cattle feces. *Vet. Microbiol.* 156: 381-388 (2012)
 21. Verhaegen B, de Reu K, Heyndrickx M, de Zutter L. Comparison of six chromogenic Agar media for the isolation of a broad variety of Non-O157 shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serogroups. *Int. J. Environ. Res. public health* 12: 6965-6978 (2015)
 22. Kozub-Witkowski E, Krause G, Frankel G, Kramer D, Appel B, Beutin L. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. *J. Appl. Microbiol.* 104: 403-410 (2008)
 23. González RD, Tamagnini LM, Olmos PD, de Sousa GB. Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. *Food Microbiol.* 20: 601-604 (2003)
 24. Uyttendaele M, Bagamboula CF, de Smet E, van Wilder S, Debevere J. Evaluation of culture media for enrichment and isolation of *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Int. J. Food Microbiol.* 70: 255-265 (2001)