국민의 나라
정의로운
대한민국

국민의 더 건강한
내일을 위한 정부혁신
보다 나은 식약처

장관출혈성대장균

청렴 韓 세상

대구지방식품의약품안전청 유해물질분석과

보건연구사 서상철



- 순 서 -

1. 병원성대장균
2. 장출혈성대장균
3. 시험방법

병원성대장균

Pathogenic E. coli

병원성대장균

1. 병원성대장균이란

- 대장균의 일종
- 장내세균과, Gram(-), Bacili, Catalase(+), Oxidase(-), Lactose 분해(산, 가스발생)
- 대장균의 혈청학적 분류
  - 항원에 따라 'O (체세포항원),' H (편모항원]',‘K (협막항원)'



병원성대장균

발병특성, 생성독소의 종류에 따른 분류

가. 장관출혈성대장균 EHEC(Enterohaemorrhagic *E. Coli*)

나. 장관독소형대장균 ETEC(EnteroToxigenic *E. Coli*)

다. 장관침입성대장균 EIEC(Enteroinvasive *E. Coli*)

라. 장관병원성대장균 EPEC(Enteropthogenic *E. Coli*)

마. 장관흡착성대장균 EAEC(Enteroaggregative *E. Coli*)



병원성대장균

특 성	병 원 성 대 장 균				
	ETEC	EPEC	EIEC	EAEC	EHEC
톡신(toxin)	이열성 및 내열성 톡신 (LT/ST)	베로톡신 (Verocytotoxin)	-	-	시가톡신 (Shigatoxin)
장관침입성	-	-	+	-	-
설 사	수양성	수양성 및 혈액성	점액 및 혈액성	수양성	수양성 및 심한 혈액성
열	낮음	+	+	-	-
용혈성 요독증	-	-	-	-	+
주요감염장관	소 장	소 장	대 장	소 장	대 장
주요 혈청형	O6:H16, O8:H9 O11:H27 O20:H- O25:H42등 29종이상	O20:H26 O26:H- O55:H6 O86:H27 O111:H2 등 37종 이상	O28:H- O124:H30 O136:H- O143:H- O159:H-등 12종 이상	O3 : H2 O15 : H18 O44 : H18 O86 : NM O104:H4 등 9종 이상	O4:H- O26:H11 O91:H19 O111:H- **O157:H7** 등 26종 이상
감염량	많은량(10,000,000)	적은량(100,000)	많은량(1,000,000)	많은량	**적은량(약 20~700)**

장출혈성대장균

장출혈성대장균

영역

전체 | 제목 | 기자명

유형

전체 | 동영상
포토 | 지면기사
보도자료

언론사

선택 | 직접입력

- 전체선택
- 일간지
- 방송/통신
- 경제/IT
- 인터넷신문
- 스포츠/연예
- 지역지
- 매거진
- 전문지/기타

언론사 전체보기 | 적용

접기

전체 초기화

옵션유지 | 켜짐 | 꺼짐

검색결과 공유



장출혈성 대장균 "독일 유기농 '새싹' 가능성 커" SBS TV | 2011.06.06 (월) 오전 8:21

<앵커> 유럽을 덮친 **장출혈성 대장균** 감염의 주범으로 이번에는 **독일** 북부에서 재배된 유기농 새싹이 지목됐습니다. 사망자는 모두 22명으로 늘었습니다. 파리에서 이주상 특파원입니다. <기자> **독일** 북부 니더작센 주...

네이버에서 보기 | 관련기사 보기 | 이 언론사 내 검색

독일에서 확산 중인 **장출혈성대장균**감염증(EHEC)은 '슈퍼박테리아' 내지는 ... 정책브리핑 | 2011.06.01 (수) 오후 3:15

질병관리본부(본부장 이종구)는 5월 현재 **독일** , 스웨덴 등 유럽 일부 지역에서 유행하고 있는 '**장출혈성대장균**감염증' 및 그 합병증인 '용혈성요독증후군'으로 인한 사망자 발생 관련, 이는 '슈퍼 박테리아...

네이버에서 보기 | 관련기사 보기 | 이 언론사 내 검색



독일 "**장출혈성대장균** 출처 못밝혀" 연합뉴스 | 2011.06.01 (수) 오후 5:32

(EPA=연합뉴스) 스페인, 피해 관련 **독일**에 '조치' 경고 **독일** 정부는 1일 치명적인 **장출혈성 대장균**(EHEC)의 출처를 아직 밝혀내지 못했다고 밝혔다. 일제 아이그너 **독일** 농업,소비자부 장관은 공영 ARD 방송과...

네이버에서 보기 | 관련기사 보기 | 이 언론사 내 검색



"혈변 혈뇨 땐 **장출혈성대장균** 의심하라" 노컷뉴스 | 2011.06.06 (월) 오전 10:07

그 합병증이 이번에 **독일**에서 유행하는 **장출혈성대장균**하고 동일한 형입니다. 용혈성 요독성 증후군을 일으킨다, 그래서 어떻게 보면 우리가 과거부터 알고 있었던 질병인데요. 이번에 새롭게 부각이 된 것은 과거에는...

네이버에서 보기 | 관련기사 보기 | 이 언론사 내 검색

14명 사망한 '**장출혈성대장균**감염증' 예방 강화 뉴시스 | 2011.06.06 (월) 오전 6:55

= 전북 군산시는 최근 **독일**에서 **장출혈성대장균**감염증으로 14명 사망, 276명의 환자가 발생하였다는 발표에 따라 예방활동에 나섰다. 6일 군산시보건소는 "**장출혈성대장균**감염증 환자발생 국가는 **독일**을 비롯 스웨덴...

네이버에서 보기 | 관련기사 보기 | 이 언론사 내 검색

장출혈성 대장균 주범은 **독일** 새싹 헤럴드생생뉴스 | 2011.06.06 (월) 오후 1:31

유럽을 공포로 몰아넣은 **장출혈성 대장균**(EHEC) 질환의 주범으로 **독일** 부북에서 재배된 새싹들이 지목됐다. 5일 **독일** 북부 니더작센 주 농업부의 게르트 린더만 장관은 기자회견에서 환자들을 대상으로 역학조사를 벌인...

네이버에서 보기 | 관련기사 보기 | 이 언론사 내 검색

장출혈성대장균

- 증상: 이질성 설사, 출혈성대장염, 용혈성요독증후군, 혈전성혈소판감소증 등

- 유래 : 1982년 미국에서 햄버거로 인한 식중독이 발생되면서 알려지기 시작

- 종류 : O157:H7이 대표적인 혈청형이며 O26, O111, O104, O113 등도 포함

- 감염부위 : 대장

- 독소 : 시가톡신(베로톡신)을 생성하여 세포내 단백질 합성을 저해하고 세포괴사

- 감염원 : 소분뇨퇴비, 완전히 조리되지 않은 쇠고기, 생채소, 원유, 소독하지 않은 물, 감염된 호수에서 수영, 사람에서 사람으로 전파가 가능함(감염)

“장출혈성대장균
2급 법정감염병!”



제 2급 법정감염병

- 결핵, A,E형 간염, 세균성이질,
  장티푸스, 콜레라, 홍역, 한센병 등

시험방법

시험방법

	구분	시험방법
1	증균	검체 25g(25mL)을 취하여 225mL mTSB(배지74)를 가한 후 35~37℃에서 24시간 증균 배양 (Novobiocin 첨가)
3	분리	장출혈성 대장균의 분리를 위해 TC-SMAC배지(배지66)와 BCIG한천배지 (배지73)에 각각 접종하여 35~37℃, 18~24hr 배양 (Cefixime tellulite)
2	신속 검사	배양액 (1~2ml)에서 베로독소 유전자 확인시험을 우선 실시. 유전자가 확인된 검체는 반드시 순수 분리하여 분리된 균의 베로독소 유전자 보유 유무를 재확인.
4	확인	TC-SMAC배지 : Sorbitol을 분해하지 않은 무색집락 5개 / BCIG한천배지 : 청록색 집락 5개 ↓ 보통한천배지에 옮겨 35~37℃, 18~24hr 배양 (집락이 5개 이하일 경우 모든 집락 배양) ↓ 배양 후 집락에 대해 베로독소 유전자 PCR 확인 시험을 수행한 후 베로독소 양성집락을 대상으로 그람 음성간균을 확인하고 생화학시험을 실시하여 대장균으로 확인된 경우, 장출혈성 대장균으로 판정한다. (VITEK)
5	유전자 확인	PCR법에 따라 베로독소 유전자 확인 실험을 실시
6	결과 확인	최종산물의 반응액 5㎕를 취하여 2.0% Agarose로 100V에서 25분간 전기영동하고 EtBr(1ug/mL)로 염색한 후 UV를 이용하여 반응생성물을 확인. 이때, DNA 크기를 알 수 있도록 100bp Ladder를 동시에 전기영동. 판정 : VT1 유전자는 150bp, VT2 유전자는 584bp에서 반응생성물을 확인

시험방법

증균 배양액(25g 검체 /225ml mTSB

증균 배양액 1mL 중 DNA 추출

PCR(stx1, stx2)

양성

음성(종료)

분리배양(CT-SMAC, BCIG)

CT-SMAC
무색집락(0157:H7)

BCIG
청록색(non 0157)

시험방법

전형적 집락 DNA 추출 및 PCR(stx1, stx2)

PCR 양성균주 생화학적 확인시험 및 동정

PCR(stx1, stx2)

양성

음성(종료)

장출혈성 대장균 양성

PCR

Polymerase Chain Reaction
(DNA 중합 연쇄반응)



Veriti™ Thermal Cycler

시험방법

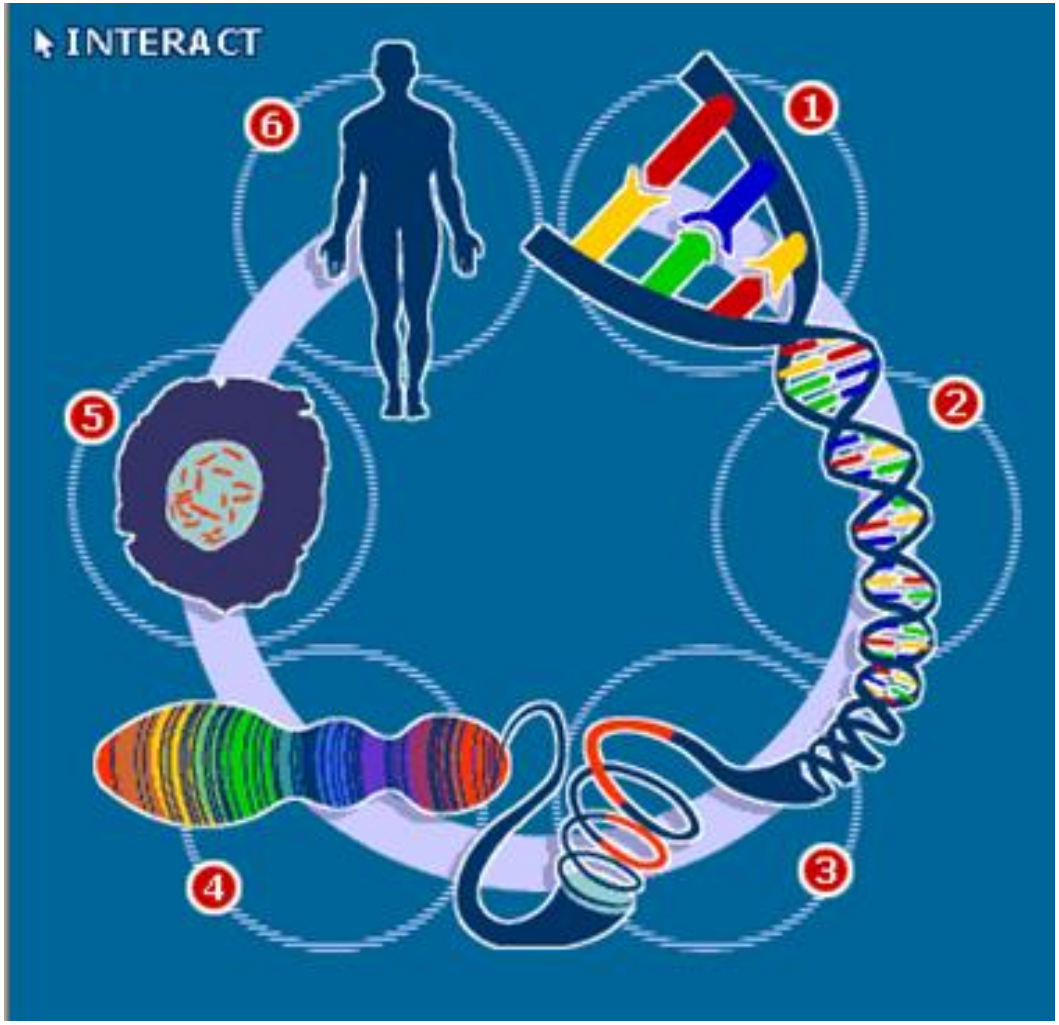
Veriti™ Thermal Cycler

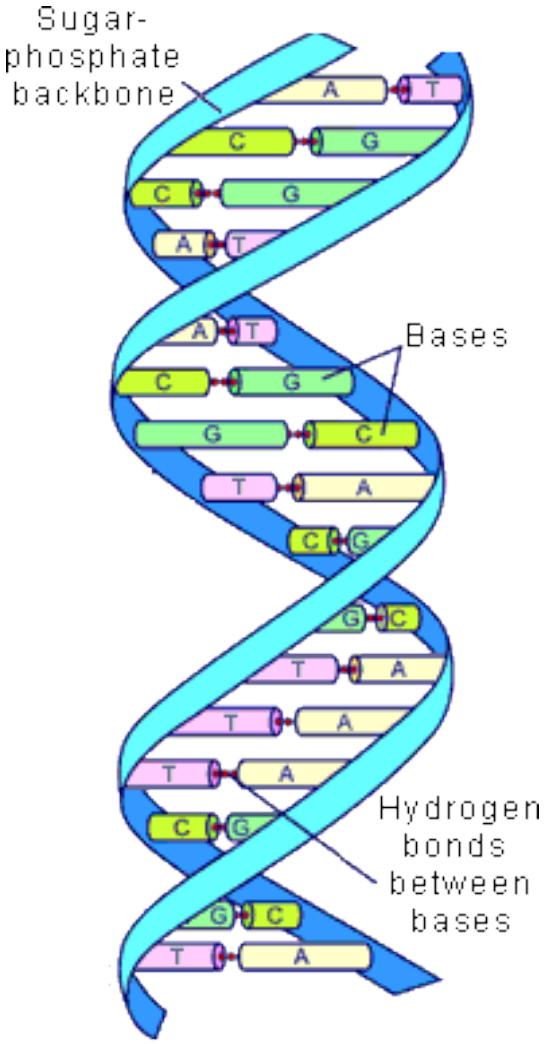


PCR

- 미량 DNA로부터 Target하는 유전자의 단편만을 증폭시키는 기술
- DNA의 열변성, primer의 annealing, DNA polymerase에 의한 신장(합성) 반응을 1 cycle,
- 이것을 반복하여 단시간에 목적 유전자의 단편을 100만 배까지 증폭

시험방법



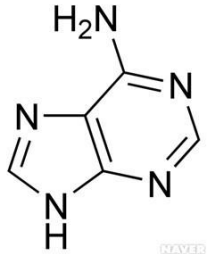


이중나선형

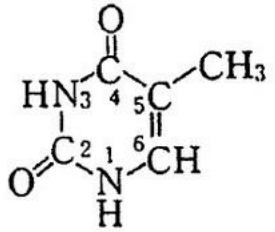
염기서열 : 특정한 염기의 쌍이 일정한 순서로 연결

시험방법

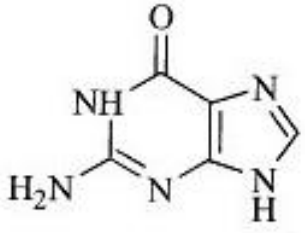




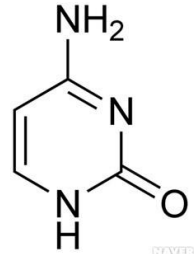
A: Adenine



T: Thymine

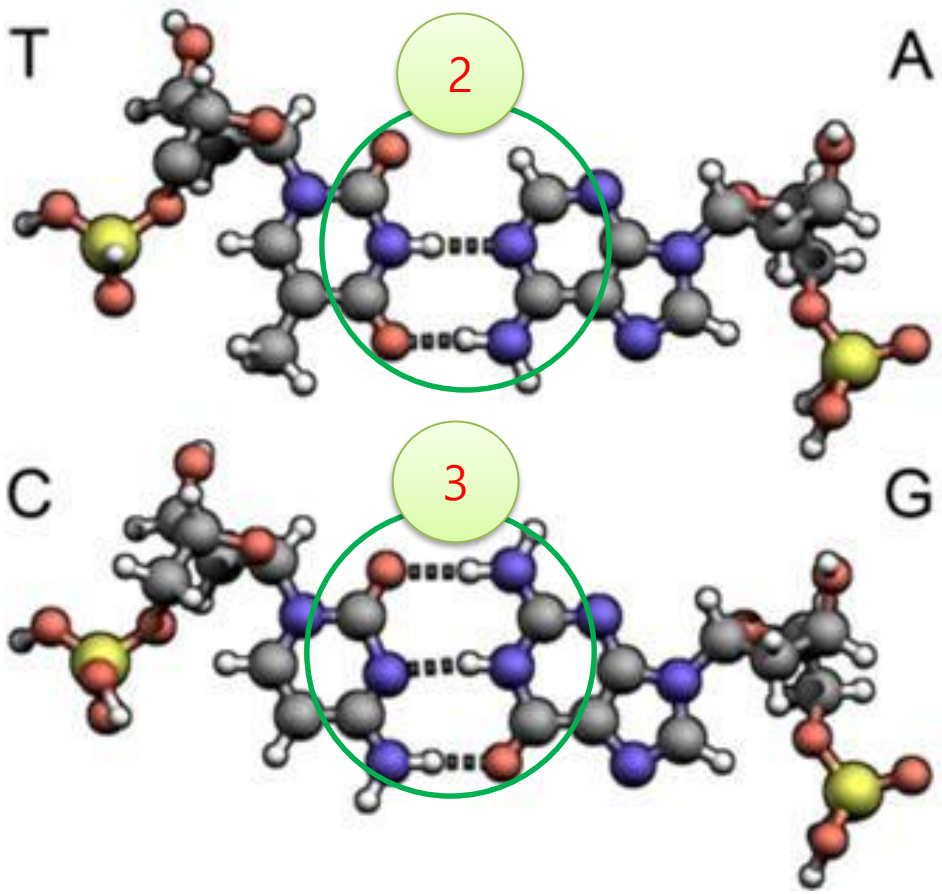


G: Guanine



C: Cytosine

염기의 결합



시험방법

- 10x PCR buffer
  - 완충용액으로서 급격한 pH 변화방지(10x = 10 농도)
  - 조성 : 100 mM Tris-Cl, pH 8.3, 500 mM KCl, 15~20 mM MgCl2, 0.01% gelatin 또는 bovine serum albumin(BSA)

- $MgCl_2$: Co-enzyme

- dNTPs(d**A**TP, d**C**TP, d**G**TP, d**T**TP) : 유전자를 합성하는 재료

- Template DNA : 선택하여 증폭하고자 하는 Target DNA 단편(Sample DNA)

- Primer : 증폭할 부분의 **시작점**을 잡는 oligonucleotide로 한 쌍(**F**orward, **R**everse)이 필요

- Taq polymerase : 열에 특별히 강한 유전자 합성효소

  * Taq는 온천에서 서식하는 "*Thermus aquaticus*"라는 균주에서 따온 이름

시험방법

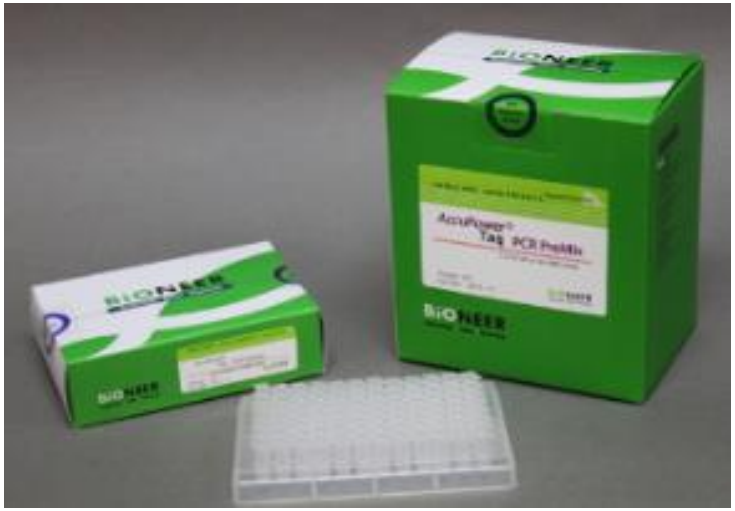
신속검사 – Verotoxin 유전자 검사

유전자	Primer 염기서열(5'→3')	Size
stx1	(F) ATA AAT CGC CAT TCG TTG ACT AC (R) AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC	180bp
stx2	(F) GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC (R) TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G	255bp

☞ 식품의 기준 및 규격 개정 2015-78호/시행일 : 2016.01.01

시험방법

성분	최종농도	Stock용액 농도	1회 용량
완충액	1×	10×	2.5μL
MgCl2	1.2 mM	12 mM	2.5μL
dNTPs	0.2 mM	2.5 mM	2μL
stx1 프라이머(F)	50 pmol/tube	50 pmol/μL	0.5μL
stx1 프라이머(R)	50 pmol/tube	50 pmol/μL	0.5μL
stx2 프라이머(F)	50 pmol/tube	50 pmol/μL	0.5μL
stx2 프라이머(R)	50 pmol/tube	50 pmol/μL	0.5μL
주형 DNA	25 ~ 50 ng 또는 10 μL	-	5μL
Taq	2.5 U/tube	5 U/μL	0.25μL
증류수	-	-	11.75μL
총량	-	-	25μL

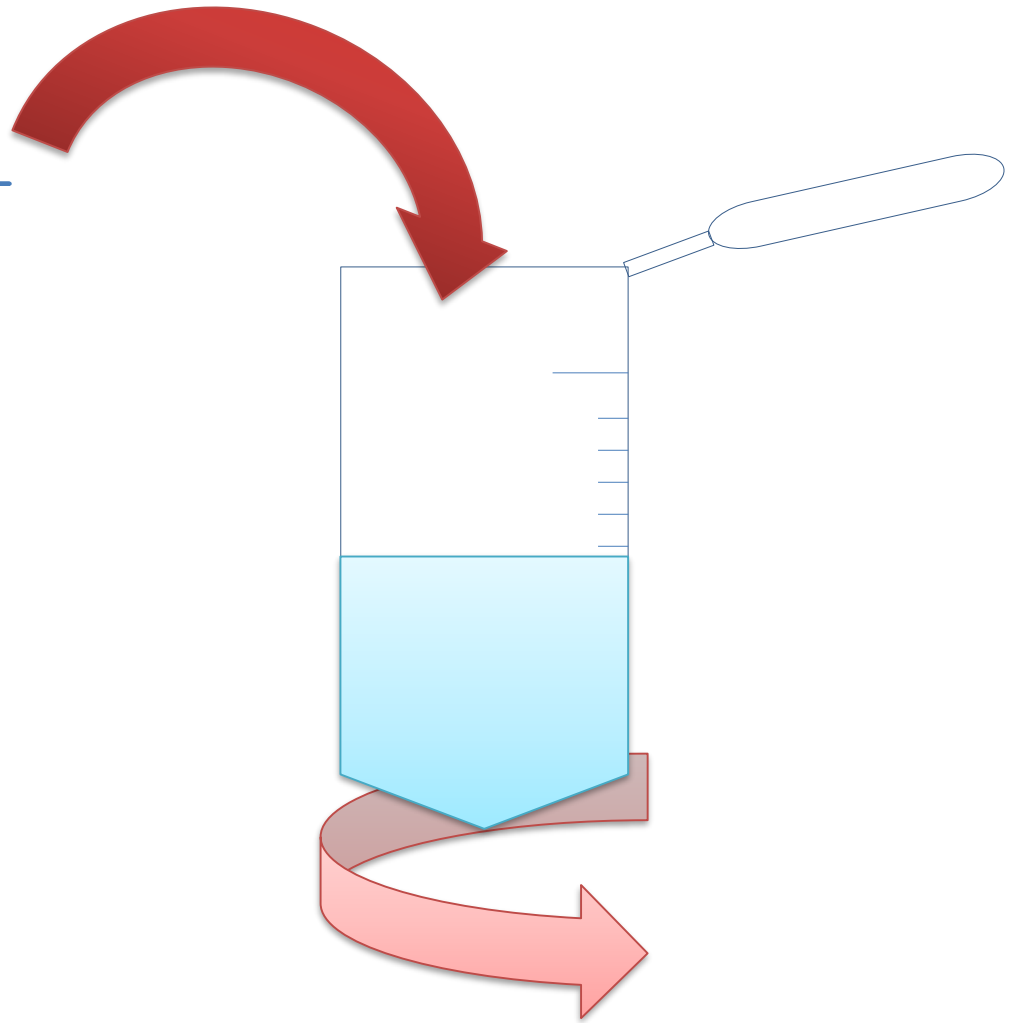

BIONEER
BIONEER
BIONEER

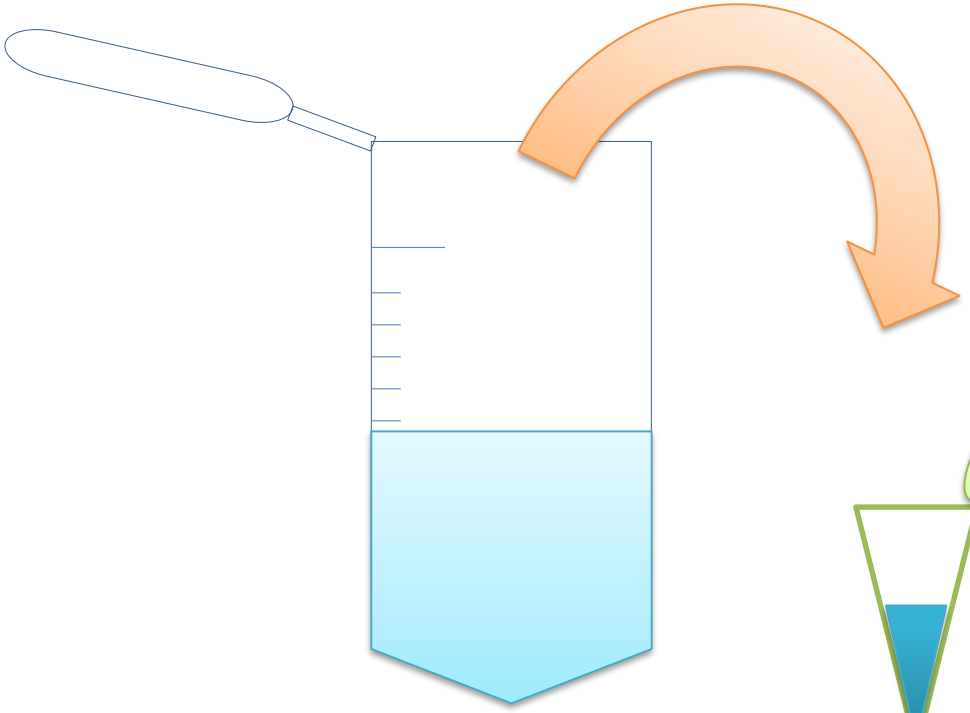

applied biosystems
N8080155
Store at: -30 °C to -10 °C
AmpliTaq® DNA Polymerase
5,000 units with Buffer I
Qty: 5,000 units
Lot# 1234567
For Research Use Only
Oct2012
Read SDS
USA
24-hour Medical or Spill
Emergency Response (Chemtrec)
North America +1 866 536 0631
Other +1 301 431 8585
applied biosystems



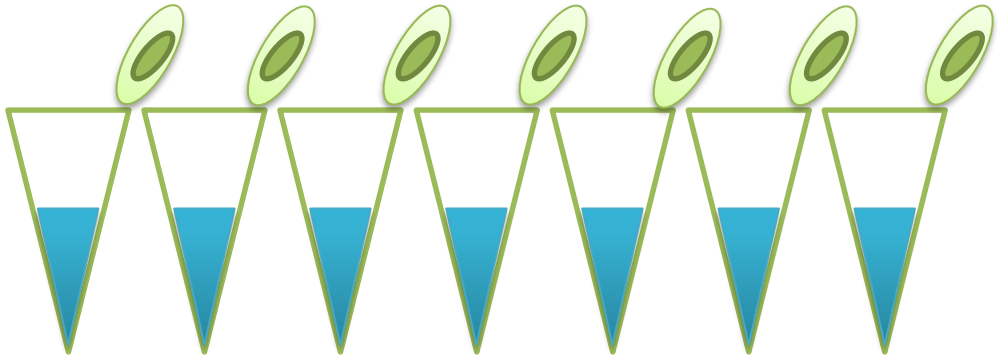
PCR Master Mix

- 10X PCR buffer
- dNTPs
- MgCl+
- Taq-Polymerase
- Primer(F,R)
- DW





각 Tube에 20ul씩 분주



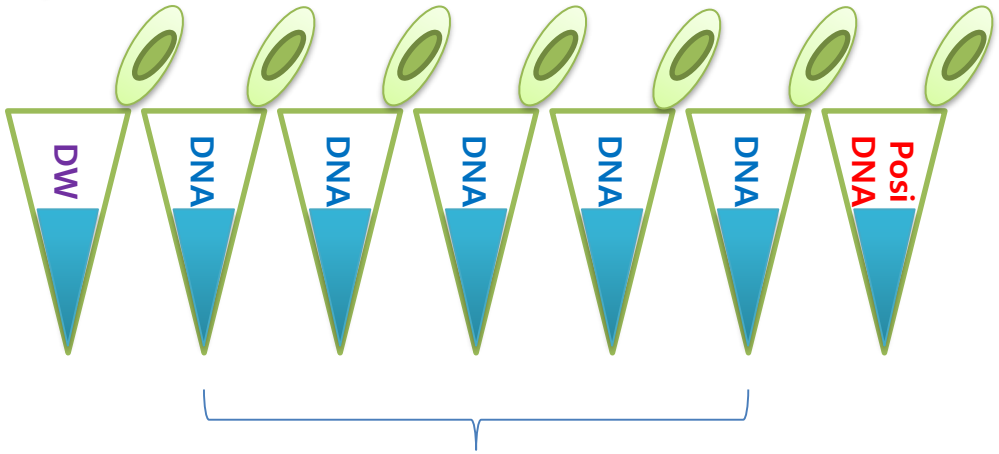
200ul PCR strap tube

D W

Template DNA

Positive DNA

각 Tube에 5ul씩 분주

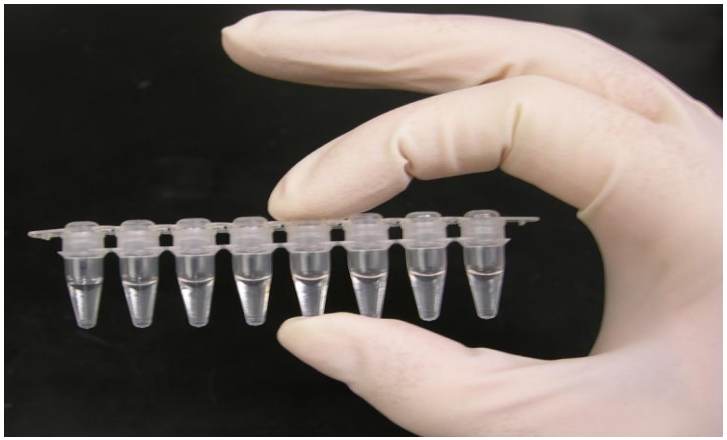


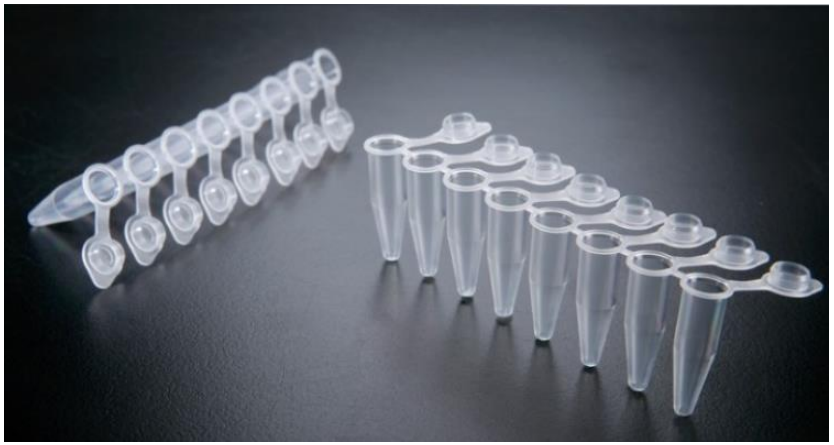
NC
Negative control

Sample(1 - 5)

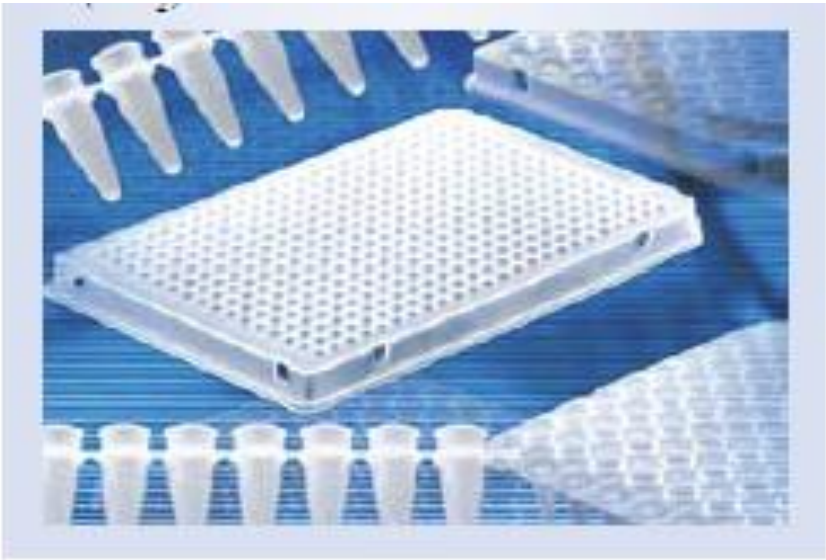
PC
Positive Control

시험방법









시험방법

반응 단계	구분	온도	시간	반응회수
1	변성(denaturation)	95℃	60초	10회
	결합(annealing)	65℃	120초	
	신장(extension)	72℃	90초	
2	변성(denaturation)	95℃	60초	5회
	결합(annealing)	64℃→60℃ (1℃/회 감소)	120초	
	신장(extension)	72℃	90초	
3	변성(denaturation)	95℃	60초	10회
	결합(annealing)	60℃	120초	
	신장(extension)	72℃	90초	
4	변성(denaturation)	95℃	60초	10회
	결합(annealing)	60℃	120초	
	신장(extension)	72℃	150초	
5	보존(store)	4℃	-	-

Denaturation

Double strand DNA(ds DNA)를 single strand DNA(ssDNA)로 분리시키는 단계

- Condition : 94°C, 5min
- 높은 온도일수록 ssDNA 로 잘 이행되지만 Taq DNA polymerase도 온도가 아주 높은 상태에서는 활성이 낮아질 수 있으므로 보통 94°C로 합니다. 첫 cycle에서는 확실한 변성을 위하여 약 5분간 지속시킵니다.

Annealing

증폭하고자 하는 위치에 Primer를 결합시키는 단계

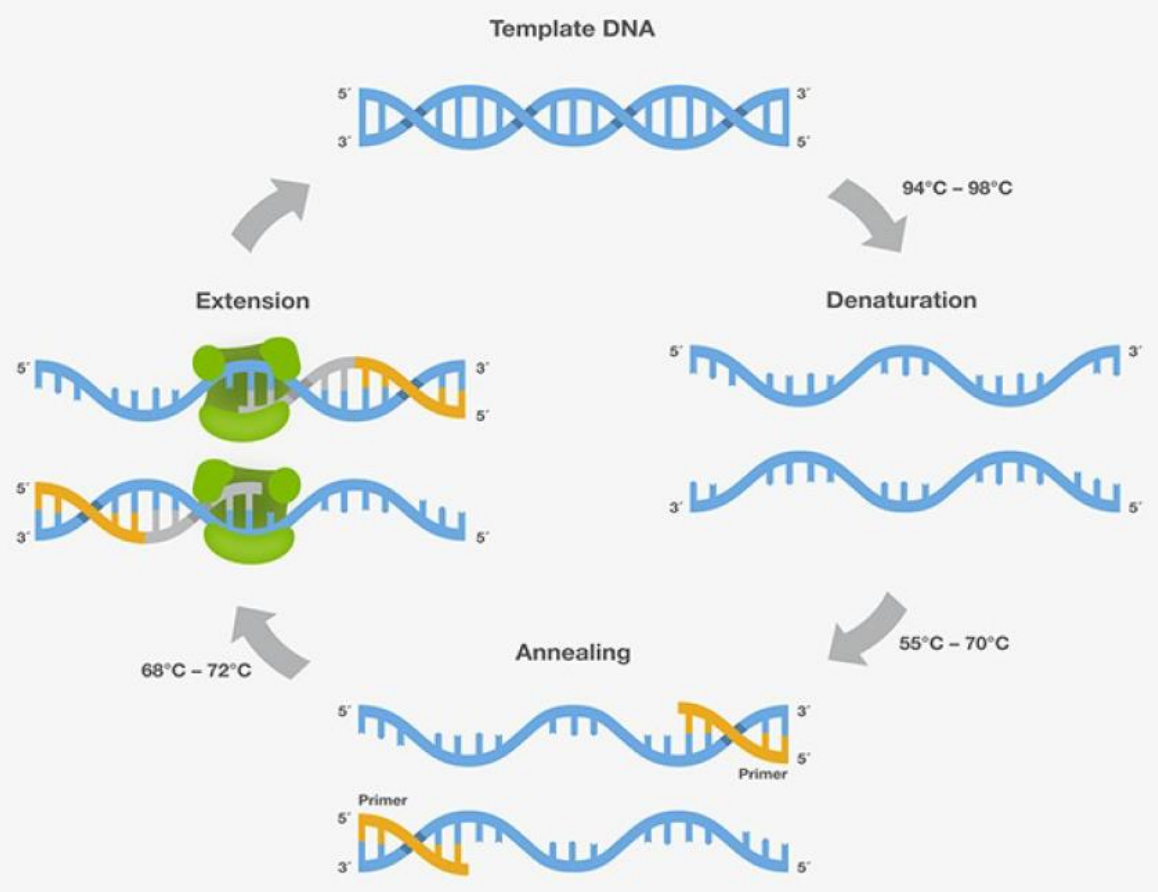
- Condition : 50°C - 65°C

Amplification, (Extension)

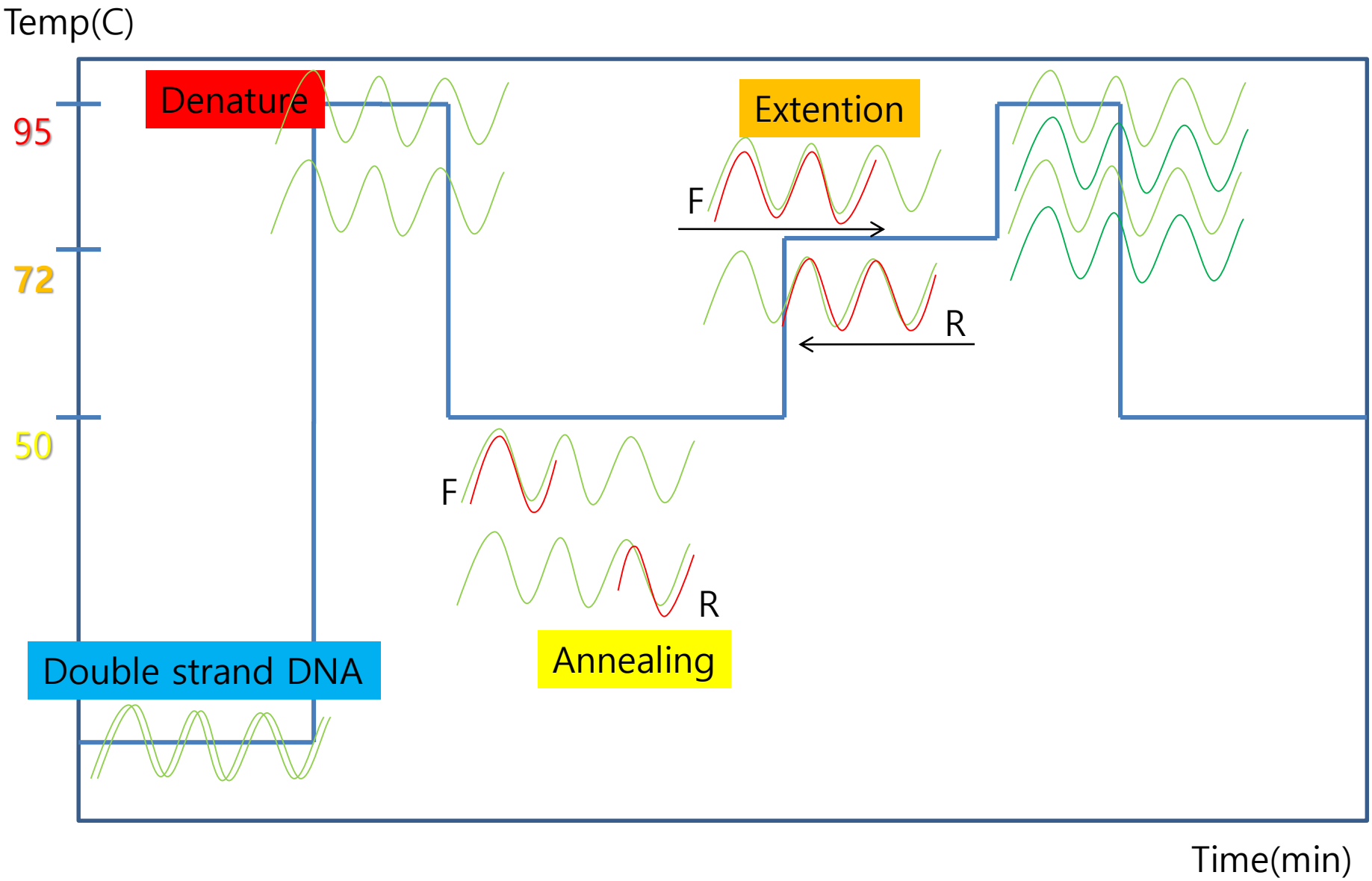
상보된 염기를 붙여가면서 DNA의 합성, 연장하는 단계

- Condition : 70°C - 74°C
- 원하는 PCR 산물의 크기가 크거나 반응요소의 농도가 낮을 때에는 시간을 연장시킬 수도 있습니다.
- Taq DNA polymerase는 보통 1분에 2,000-4,000 nucleotides를 합성할 수 있으므로 원하는 PCR 산물의 크기 1 kb마다 1분 정도의 시간이 적절.
- 마지막 cycle 에는 약 10분 정도 시간을 충분히 주는 것이 좋겠습니다.

시험방법


Template DNA
5′
3′
3′
5′
94°C – 98°C
Denaturation
5′
3′
3′
5′
55°C – 70°C
Annealing
5′
3′
Primer
Primer
5′
3′
5′
68°C – 72°C
Extension
5′
3′
5′
5′
3′
5′

시험방법


Temp(C)
95
72
50
Denature
Extention
F
R
F
R
Annealing
Double strand DNA
Time(min)

전기영동

Electrophoresis



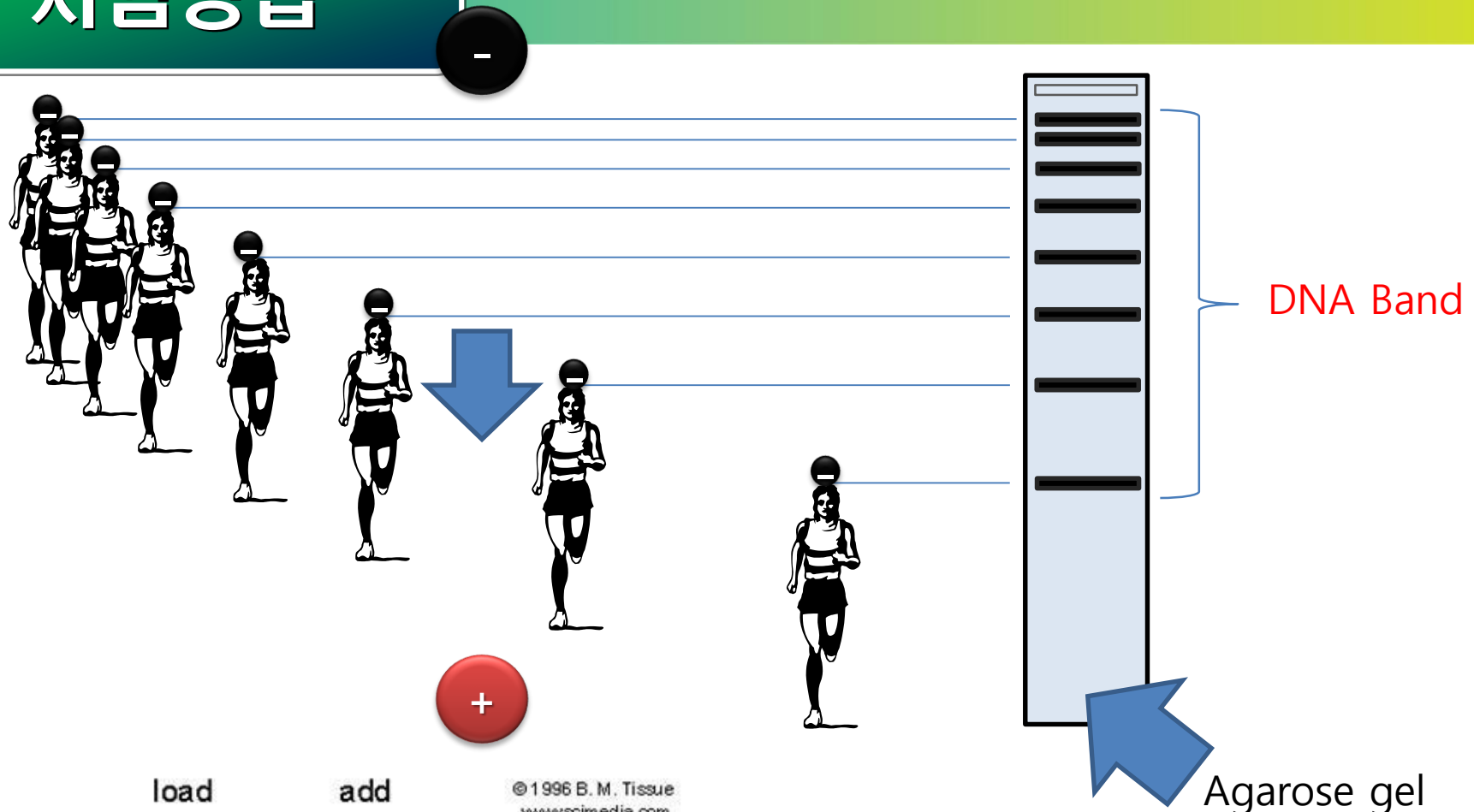
시험방법

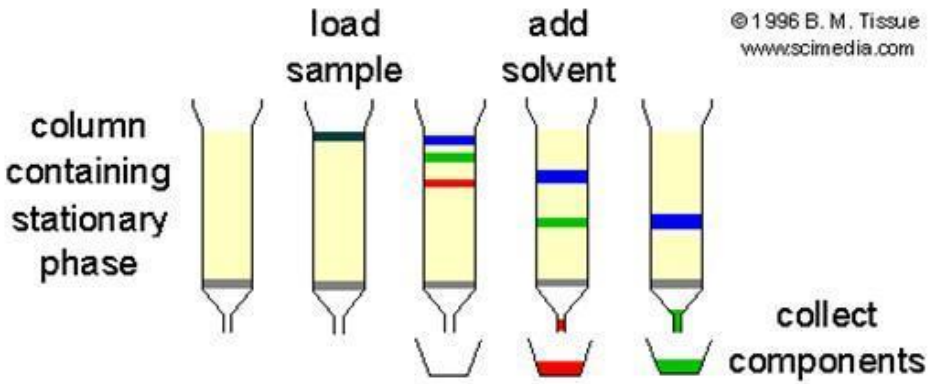
PCR로 Target DNA를 증폭하였다면, 전기영동을 통해 증폭산물을 확인하는 과정이 남아있습니다.

(-)전하를 띄는 DNA는 전기를 걸어주면 (-)극에서 (+)극 쪽으로 이동하게 됩니다. 이 때, 덩치가 크고 무거운 DNA와 짧고 가벼운 DNA의 이동속도의 차에 따라 분리되는 원리로 이해할 수 있겠습니다.

이는, 같은 사람이 50kg, 30kg, 20kg, 15kg, 10kg, 5kg, 1kg의 짐을 지고 100m를 뛸 경우 시간의 차이가 나는 것과 같은 원리와 같다고 볼 수 있겠죠?

시험방법


-
+
DNA Band
Agarose gel

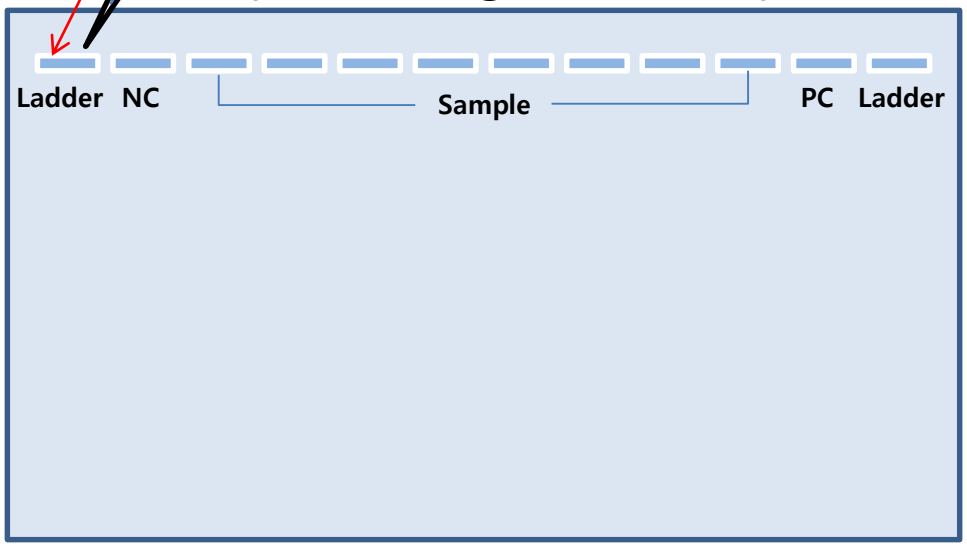

load sample
add solvent
©1996 B. M. Tissue
www.scimedia.com
column containing stationary phase
collect components

시험방법

1. PCR Product 3~4μL 취하여 Loading Dye 1~2uL와 혼합
2. 2.0% SeaKEM LE agarose에 5uL Loading
3. 100V에서 35~40분간 전기영동. 이때, DNA 크기를 알 수 있도록
   Size Marker(100bp Ladder)를 동시에 전기영동합니다.
4. SYBR GOLD 등으로 Gel을 염색(10분), 탈색(10분) 후 UV상에서 확인합니다.
5. stx1 유전자는 180bp, stx2 유전자는 255bp크기의 밴드가 확인되어야합니다.
6. stx1 또는 stx2 유전자가 확인된 것은 장출혈성대장균 검출로 판정합니다.

시험방법

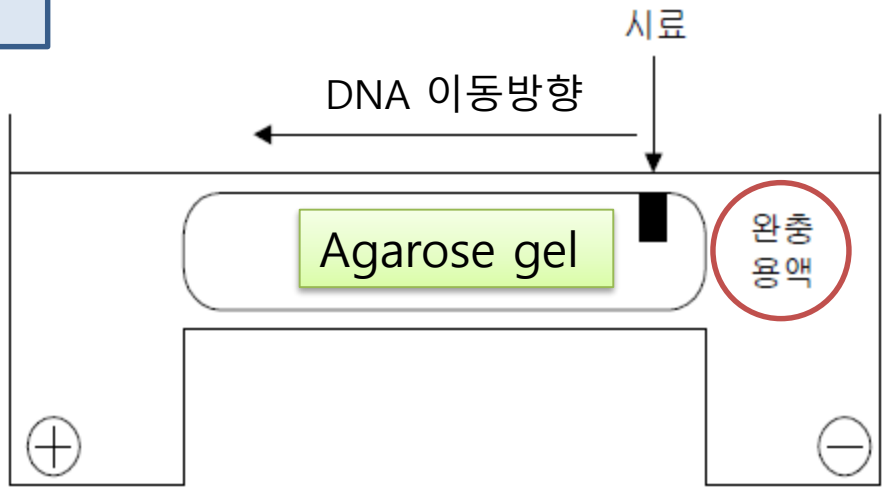
Sample Loading 3~5ul(Sample 3~4+Loading Dye 1~2 ul)





PCR Product

NC : Negative control
PC : Positive control

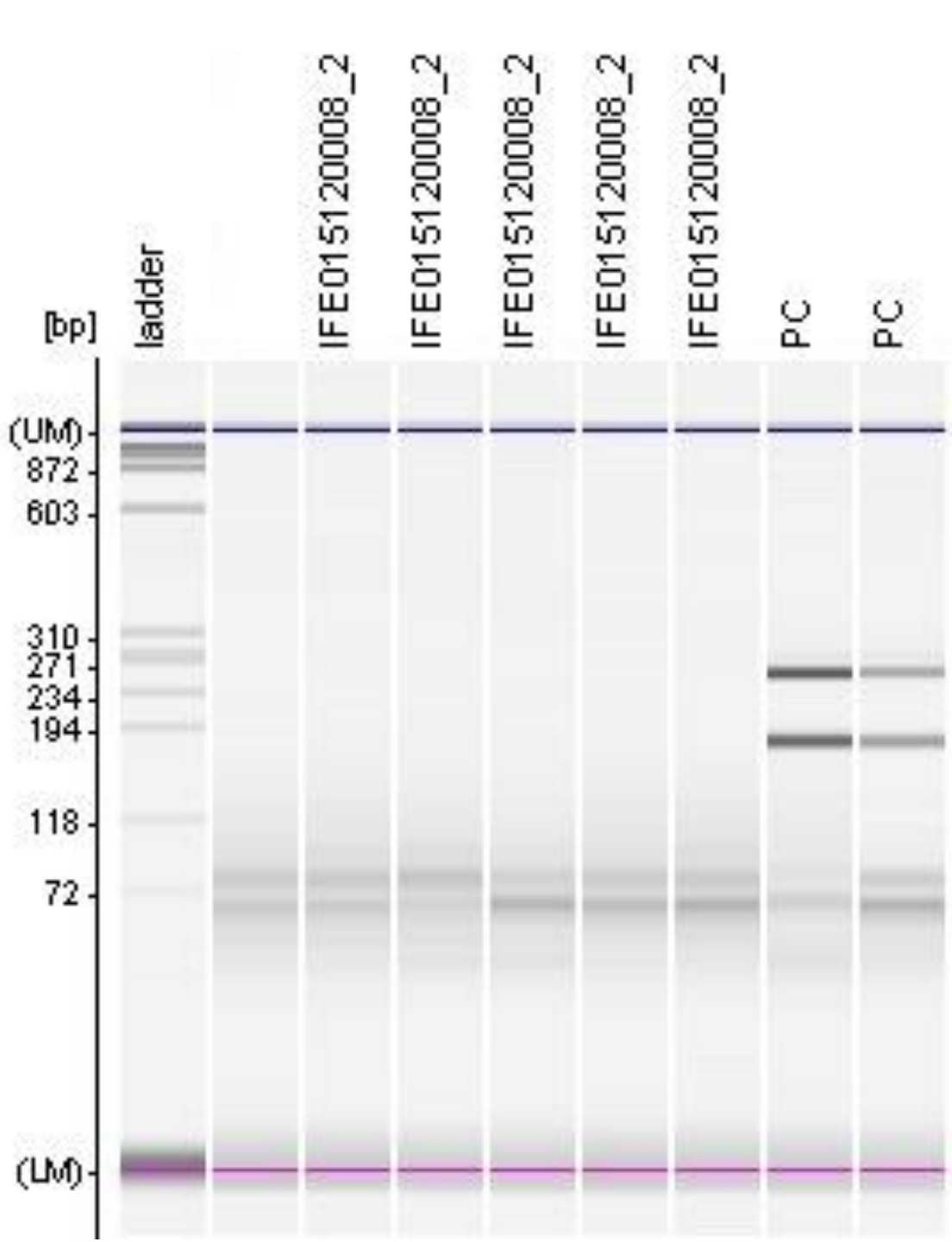


Agarose gel을 이용한 핵산의 전기영동

시험방법



MultiNa_SHIMADZU



Real Time-PCR

Real Time Polymerase Chain Reaction
(실시간 DNA 중합 연쇄반응)



시험방법

샘플 유전자 추출
(Template DNA)

Real Time PCR

Data 해석
(양/음성 판정)

- 증균배양액 1-2ml 10분간 끓임
- 원심분리 후 상등액 50ul 준비

분리배양
(의심집락 선별)

Real Time PCR

Data 해석
(양/음성 판정)

- CT-SMAC
- BCIG

시험방법

Real-time PCR 프라이머 염기서열

Target gene	염기서열(5'→3')		size (bp)
stx1	Forward	TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG	131
	Reverse	CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC	
	Probe	FAM-CTG GAT GAT CTC AGT GGG CGT TCT TAT GTA A-TAMRA	
stx2	Forward	TTT GTY ACT GTS ACA GCW GAA GCY TTA CG	128
	Reverse	CCC CAG TTC ARW GTR AGR TCM ACR TC	
	Probe	VIC-TCG TCA GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC-TAMRA	

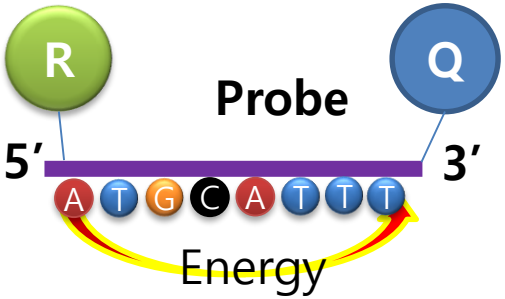
시험방법

Real-time PCR 반응액 조제

성분	최종농도	Stock용액 농도	1회 용량
Master Mix	1x	2x	10 µL
프라이머 (F)	1 µM	10 pmol/µL	2 µL
프라이머 (R)	1 µM	10 pmol/µL	2 µL
stx1 프로브 (P)	400 nM	20 pmol/µL	0.4 µL
stx2 프로브 (P)	100 nM	5 pmol/µL	0.4 µL
주형 DNA	–	–	2 µL
증류수	–	–	3.2 µL
총량	–	–	20 µL

Real Time PCR의 원리
-Taqman Probe 방식

Taqman Probe



R : Reporter(수용자)

Q : Quencher(소광자)

Reporter : 통상 'FAM, VIC, TAMRA' type 중 하나

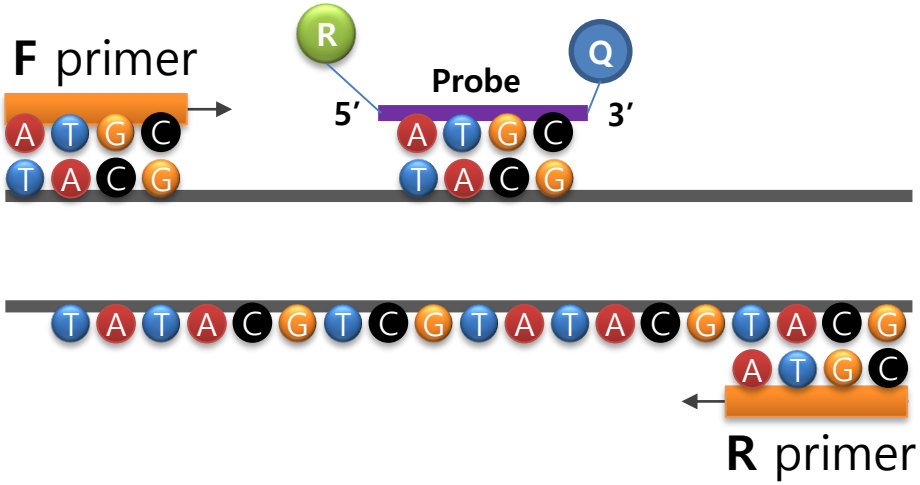
Taqman Probe

Taqman probe

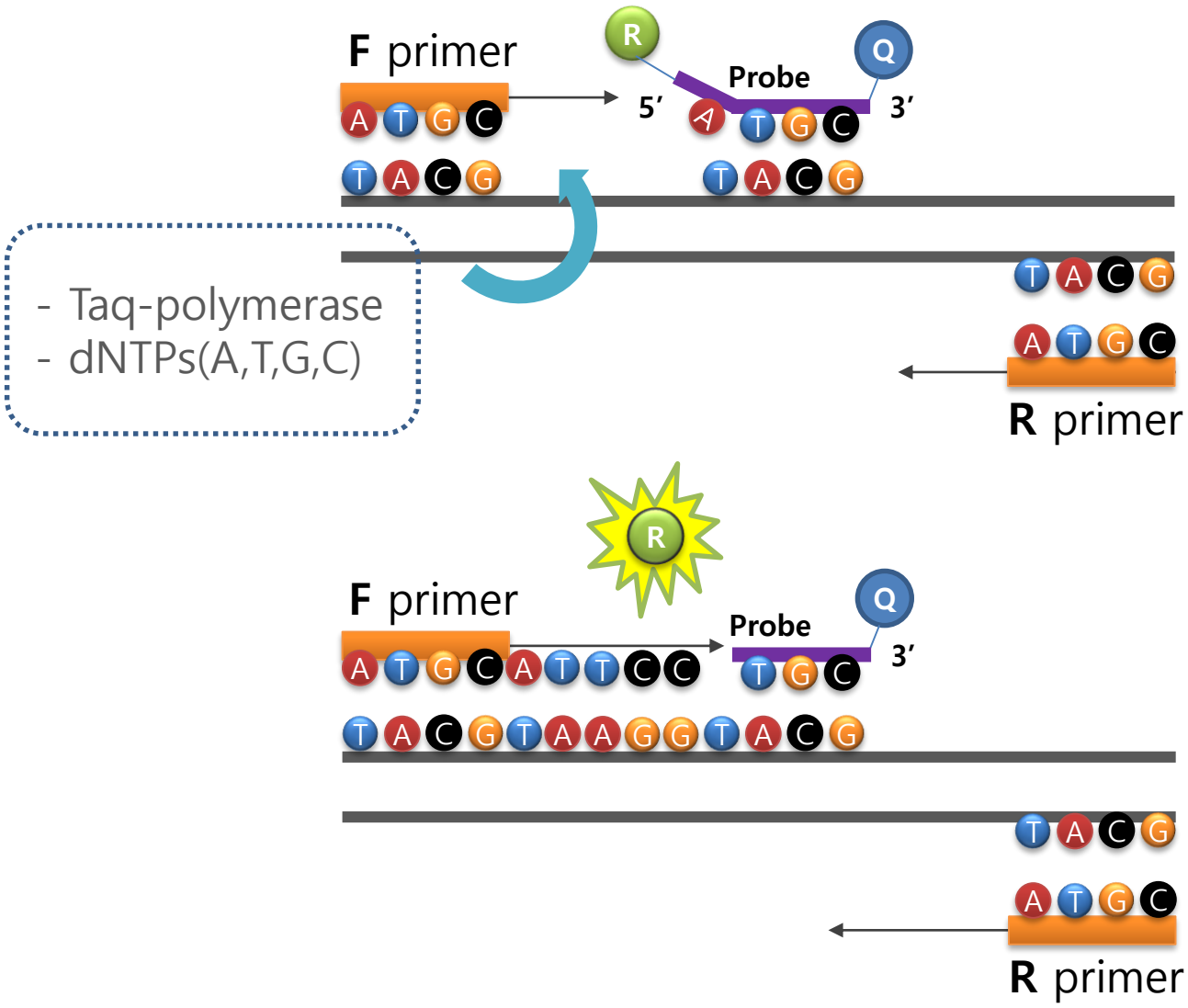
- Primer와 유사한 oligonucleotide형태이나 양 끝에 형광물질(reporter)와 소광자(quencher)가 결합되어 있습니다
- Taqman probe 방식의 Real Time PCR 실험 시 Primer(F, R)와 probe 총 3 가지의 target에 특이적인 oligonucleotide를 사용하게 됩니다
- 평소에 형광 Reporter는 quencher때문에 형광을 발하지 않습니다

Taqman Probe

Annealing Step



Taqman Probe

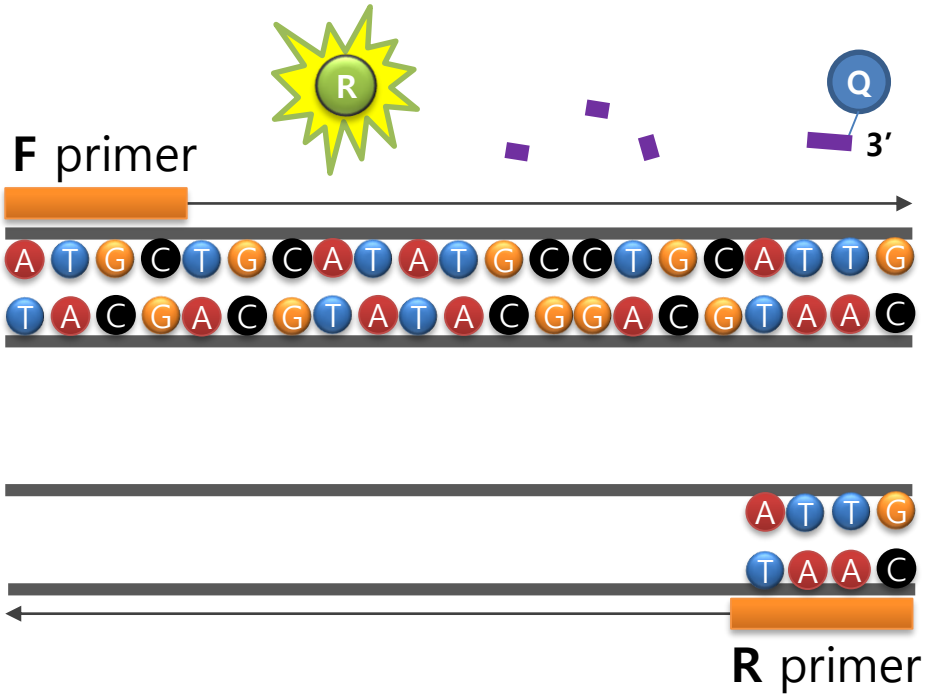


Extension Step

Taqman Probe

Extension Step

1 cycle



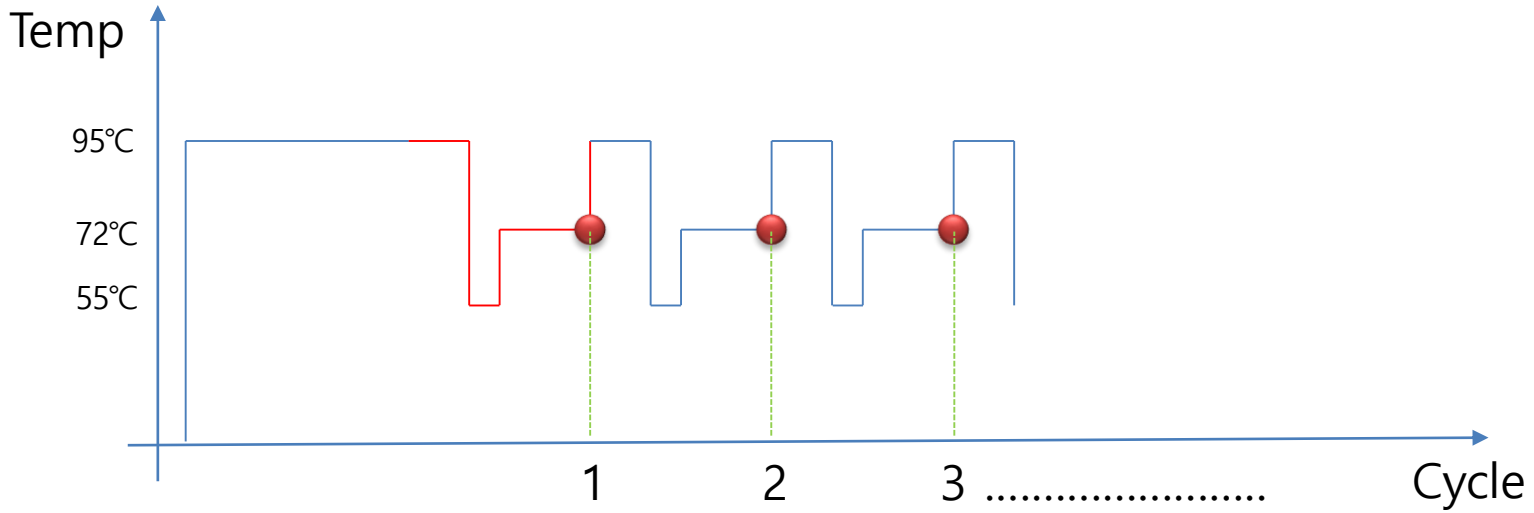
Taqman Probe

- Primer와 probe가 template DNA의 정해진 위치에 붙은 후 Taq-polymerase가 DNA를 합성하기 시작합니다
- Taq DNA polymerase는 5′→3′ 핵산말단분해효소 활성을 가지고 있기 때문에 중간에 DNA 합성을 하다가 probe를 만나게 되면 probe의 reporter와 quencher가 서로 떨어지게 되면서 형광을 발현
- DNA 합성 **1cycle이 끝날 때 마다 발광하는 형광 값을 읽어** 증폭되는 형광 증가량을 실시간으로 확인할 수 있게 됩니다

Taqman Probe

Real-time PCR 반응조건

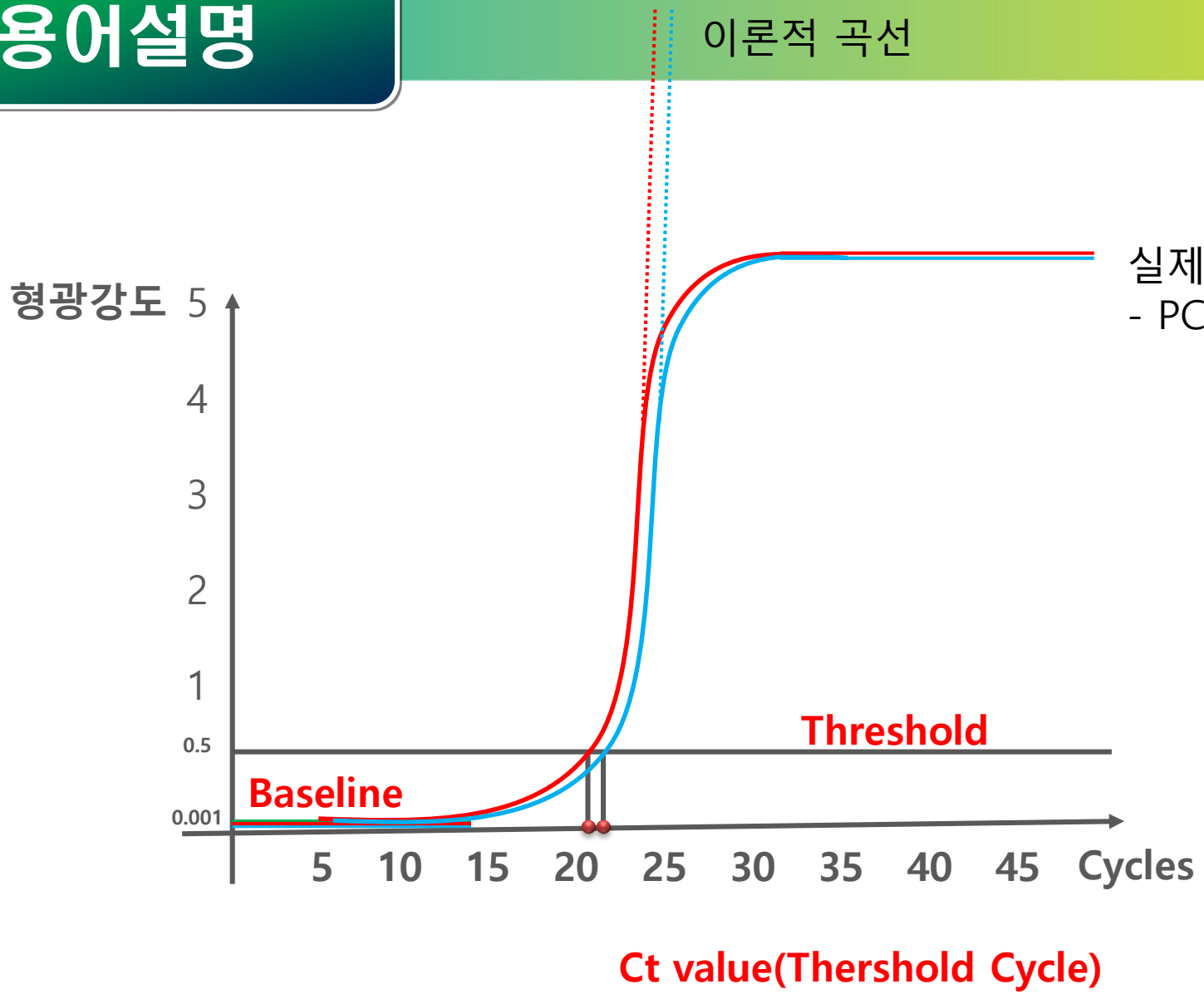
구분	온도	시간	반응회수
초기변성(initial denaturation)	95℃	10분	-
변성(denaturation)	95℃	10초	40
결합(annealing)	55℃	5초	
신장(extension)	72℃	15초	



용어설명

Real Time Polymerase Chain Reaction
(실시간 DNA 중합 연쇄반응)

용어설명


이론적 곡선
실제 곡선 : S자
- PCR 재료고갈
형광강도
5
4
3
2
1
0.5
0.001
Threshold
Baseline
5
10
15
20
25
30
35
40
45
Cycles
Ct value(Thershold Cycle)

용어설명

Baseline

- Baseline은 PCR 반응 초기 cycle의 Noise(전기노이즈)Signal을 의미합니다
- PCR 그래프 상에서 초기 cycle에서는 일정하지 않은 형태의 선이 보이고 어느 정도의 cycle이 지나면 폭발적인 증폭 곡선이 나타나기 시작하는데 0 에서 이 지점의 cycle 사이를 Baseline이라 합니다
- Baseline 은 일반적으로 3- 15 cycle정도에 나타나는 형광 신호이며 정확한 Ct 값을 결정하기 때문에 설정에 주의가 필요합니다

용어설명

Threshold : 역치값

- Threshold 는 증폭 되어 유의적인 값을 나타내는 Signal의 수준을 의미합니다. 즉 노이즈가 아닌, 형광의세기가 유의적인 것으로 인지할 수 있는 지점으로 이해할 수 있습니다.
- 일반적인 Real-time PCR 장비들은 Baseline 의 표준편차에서 10 배 정도 되는 신호의 수준을 threshold로 설정하도록 되어 있습니다
- 다만, 필요에 따라 자유롭게 설정은 가능합니다(약 0.2 또는 0.4수준)

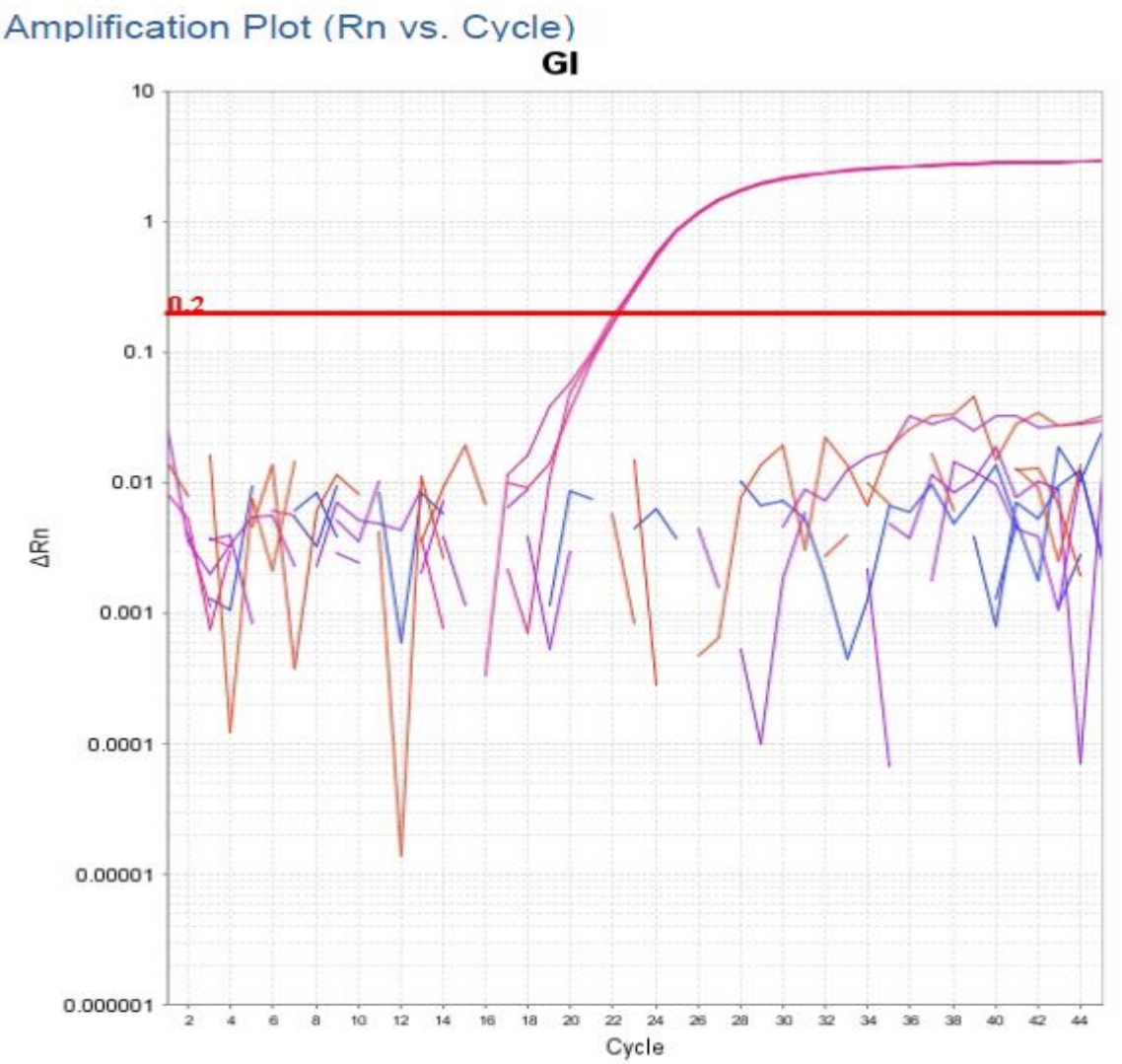
용어설명

Ct value (threshold cycle)

- Ct값은 threshold와 증폭 곡선이 만나는 지점의 cycle 수입니다
- Target 유전자의 검출 여부를 판단하는 기준점을 의미합니다
- 통상 Ct 값 20~36이내에서 존재하는 증폭곡선에 한해 검출로 판단합니다.

데이터 해석 연습

1. Baseline은 어디까지?
2. Threshold 값은?
3. Ct 값은 얼마?





보호
- 비밀보장, 신변보호, 불이익조치 금지, 책임감면

보상
- 내부 공익신고자에게 최대 20억원의 보상금 지급
- 공익에 기여한 경우 최대 2억원의 포상금 지급
- 구조금(치료비, 이사비, 소송비용 등) 지원

상담
- 국번없이 110 또는 1398

신고
- 홈페이지 1398.acrc.go.kr
- 부패 · 공익신고 앱
- 우편(서울시 서대문구 통일로 87)

신고대상 : 5개 분야, 279개 법률 위반행위

건강	안전	환경	소비자 이익	공정경쟁
불량식품제조 · 판매 무면허 의료행위	부실시공 소방시설 미설치	폐수 무단방류 폐기물 불법 매립	개인정보 무단 유출 허위 · 과장광고	기업 간 담합 불법 산업기술 유출

국민권익위원회



국민의 더 건강한
내일을 위한 정부혁신

보다 나은 식약처