황색포도상 구균 분리배지의 원리 및 특성

Principles and Characteristics of isolation media for *Staphylococcus aureus*

오민희, 김윤지, 구민선, 오세욱*

Min-Hee Oh, Yun-Ji Kim, Minseon Koo and Se-Wook Oh*

한국식품연구원 안전성연구단

Food Safety Research Division, Korea Food Research Institute, Gyeonggi-do 463-746, Korea

서론

황색포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)은 사람과 동물의 화농성질환의 원인균이며 *Salmonella*와 같이 계절에 관계없이 발병한다. *S. aureus*은 *Micrococcaceae* 과에 속하며 현미경으로 보면 포도송이와 같이 연속된 균덩어리를 형성하여 포도상구균이라고 하였다. 이 균은 일반적으로 저항력이 강하여 사람이나 동물의 건강한 피부, 비강, 구강, 쓰레기, 하수, 분변 등 자연계에 널리 분포되어 있기 때문에 식품을 오염시킬 기회가 많다. 포도상 구균은 coagulase 생산능력, mannitol 분해성, 세포벽의 구성 물질, novobiocin의 감수성에 따라 다음의 세 가지로 나뉜다.

① 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*): coagulase 양성, mannitol 분해성, ribitol 양성, Protein A 양성, novobiocin 감수성

② 표피포도상구균(*Staphylococcus epidermidis*): coagulase 음성, mannitol 비분해성, glycerol 양성, novobiocin 감수성

③ 부생성포도상구균(*Staphylococcus saprophyticus*): coagulase 음성, mannitol 비분해성, ribitol 양성, novobiocin 내성

*S. aureus*는 병원성 포도상구균이라고 불리며, 화농성 질환의 원인균일 뿐만 아니라 식중독의 원인균이기도 한다. 표피포도상구균과 부생성포도상구균은 최근 기회감염의 원인균으로서 가끔 분리되고 있으나 건강한 피부에도 상재하며, 일반적으로는 비병원성이고 식중독을 일으키지 않는다. 표피포도상구균은 영유아에서 화농발생 원인균으로 작용한다.

*S. aureus*는 전형적인 원형균으로 불규칙적인 포도송이 모양의 배열을 형성하는 Gram 양성의 직경 0.8~1.0 μm인 통성혐기성 구균이다. 운동성과 편모가 없고 포자를 형성하지 않으며 때로는 외층에 협막 모양의 점액층을 갖는 인체 병원성 균이다. 발육최적온도는 35~38℃이며 색소는 20℃에서 가장 잘 만들며, 특히 식중독의 원인이 되는 enterotoxin의

Corresponding author : Oh Se-Wook
Food Safety Research Division, Korea Food Research Institute, 516 Baekhyun-dong, Sungnam-Si, Gyeonggi-do 463-746, Korea
Tel: 031-780-9299
Fax: 031-709-9876
E-mail : swoh@kfri.re.kr

생산은 발육최적온도인 35~38℃에서 가장 잘 만들어진다. 이 균은 80℃에서 10분 가열로 죽지만 균체가 생성한 enterotoxin은 내열성이 대단히 크다. 내염성이 있어 식염 10% 농도에서도 충분히 자라며, 15%에서도 증식한다.

보통한천배지에서 1~2 mm 크기의 우유 빛 광택이 있는 집락을 형성하며 색소 생성은 변화가 심해 백색에서 황금색에 이르기까지 배양조건에 따라 다양하다. Blood agar에서의 집락은 보통한천배지에서 보다 크고 β-용혈성이 있는 것과 없는 것이 있다. 내염성이 있어 Mannitol salt agar에서도 잘 자라며 mannitol을 분해하여 황색으로 발육하며 Potassium tellurite agar에서는 tellurite를 환원하여 흑색집락으로 발육된다. 또한 과당과 젖당 등을 발효하여 젖산을 형성하지만 가스 생성능은 없다. Coagulase 양성, DNase 생성능이 있다. 건조, 열(50℃, 30분) 및 식염(3~7%)에는 저항성을 나타내며 효소인 lysostaphin에는 감수성이 있다. 특히, 내성이 강한 균으로 penicillin, methicillin, gentamycin, erythromycin 등의 여러 가지 항생물질에 대해 내성이 있으며, β-lactame 계열의 항생물질과 tetracyclines, erythromycin, aminoglycosides 등에 대한 내성은 plasmid에 의해 생산되는 여러 가지 효소에 의해 생성된다.

*S. aureus*는 1880년 Pasteur가 화농부위에서 처음 발견하여 화농성질환의 원인균으로 알려졌고, 포도상구균식중독은 1884년 Vaughn에 의해 cheddar cheese(체다치즈)를 원인식품으로 하는 식중독으로 최초로 보고되었다. 1914년 Barder는 필리핀에서 발생한 급성위장염이 유방염에 걸린 젖소가 생산한 우유에 의한 것임을 보고하였고, 최초로 *S. aureus*를 분리하였다. 또한 Barder는 임상실험을 통해 급성위장염을 일으킨 식중독의 원인이 *S. aureus* 감염에 의한 것이 아니라 균이 증식하면서 생성시킨 독성물질에 의한다는 것을 최초로 보고하였다.

1930년 Dack 등은 식중독에서 분리한 *S. aureus* 배양액 중에서 구토를 일으키는 독소의 존재를 증명하였으며 독소의 명칭을 장독소(enterotoxin)라 하였다. 같은 해에 Jordan도 치즈에서 분리한 *S. aureus*를 우유로 배양하고 그 우유를 임상실험자에게 마시게 하여 똑같은 식중독 증상이 일어나는 것을 확인함으로써 Dack나 Jardan의 연구성과에서 포도상구균 식중독은 enterotoxin에 의해 일어나는 것이 입증되었다.

구균에 의한 식중독이 주목을 받게 된 것은 2차 세계대전 이후 특히 1955년에 초등학교 급식 탈지분유에 의한 환자수 1,900명 이상이 되는 대규모 식중독 사건의 발생으로 이 사례에 의한 포도상구균 식중독은 1955년부터 1988년에 이르기까지 약 30년간 장염비브리오 식중독에 이어 두 번째로 많은 발생수를 나타내었으나, 1989년부터 살모넬라 식중독에 이어 세 번째로 발생하고 있다.

우리나라의 경우, 살모넬라, 장염비브리오와 더불어 발생빈도가 높다. 1977년 서울에서 5,575명의 환자를 낸 학교급식 빵 식중독 사건도 *S. aureus*이 원인이었다. 최근 몇 년 동안의 황색포도상구균 식중독의 발생빈도를 보면 2001년 10건에 환자 363명, 2002년 8건에 환자 370명, 2003년 13건에 808명의 환자가 발생하였다고 보고되었다.

원인식품은 아주 다양하며 식물성 식품 특히 전분질을 많이 함유하는 식품이 많은 것이 *Salmonella* 식중독과 다른 점이다. 유럽과 미국에서는 우유와 그 가공품인 버터, 치즈, 크림 등을 비롯하여 육제품, 알제품 등 단백성 식품이 주가 되어 있고 우리나라와 일본에서는 김밥, 떡, 도시락, 빵 등의 곡류와 그 가공식품이 가장 많지만 그 밖에도 어패류와 그 가공품, 두부 등도 중요하다. 그러나 소금농도가 특히 높은 염장식품에서는 거의 증식하지 못하고 또 생육에서는 오히려 다른 오염세균의 영향을 받아서 enterotoxin의 생산이 억제되기 때문에 식중독의 원인이 되는 일이 드물다.

이 식중독의 발생은 극단적인 계절의 편향성은 없지만 봄철부터 가을철까지 고르게 발생하며, 여름철에 다소 많이 발생하는 편이다. 연중 발생하는 요인으로는 *S. aureus*이 환경(온도, 습도)에 직접 좌우되지 않고 사람이나 동물에 상재하고 있다는 점, 식품 제조, 취급 중에 사람의 손가락이나 타액에 의하여 식품이 오염되기 쉽다는 점을 고려할 수 있다. 또한 최근 난방시설이 잘 되었기 때문에 겨울철이라도 식중독이 발생하기 쉽다.

본론

1. 식품공전에 따른 공인검출법

〈정성시험법〉

식품공전에 서술된 *S. aureus*의 시험법은 다음과 같다. 증균 배양을 거친 후 분리배지로는 난황첨가 만니톨 식염한천배지(Mannitol salt agar)를 사용하여 mannitol 분해에 의한 황색불투명 집락 형성 및 난황반응 양성에 의한 혼탁한 백색환이 있는 균주를 추정균주(presumptive colony)로 선발한다. 분리 균주의 확인시험은 그람양성 구균을 확인하며 포도상의 배열이 확인된 것은 coagulase 시험을 실시한다. 토끼혈청(신선혈청은 5%, 건조혈청의 용액은 10%)을 가한 생리식염수를 멸균한 시험관에 0.5~1 ㎖씩 무균적으로 분주하고 여기에 분리배지상의 집락에서 직접 또는 보통한천배지에서 순수 배양시킨 균 1 백금이를 접종하여 37℃

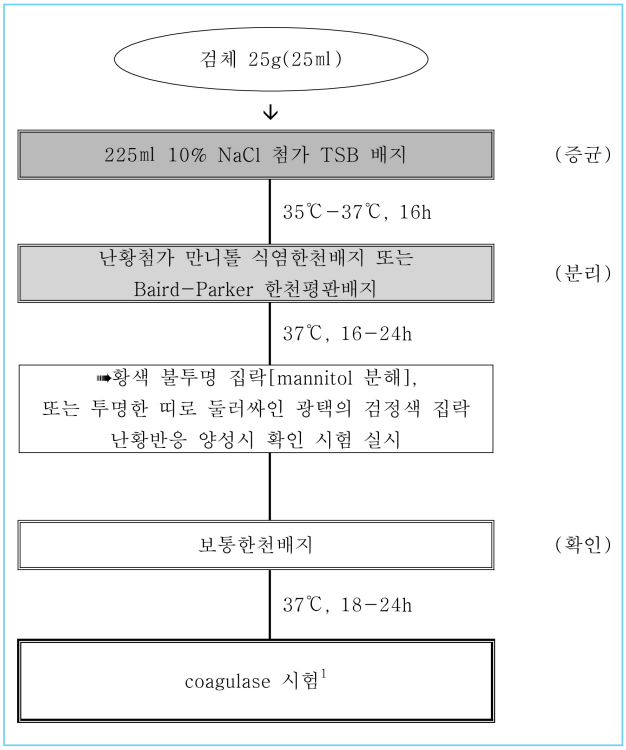

그림 1. Staphylococcus aureus 검출방법(식품공전)

에서 배양한다. 배양 후 3, 6, 24시간의 각 시간에 응고의 유무를 판정하여 어느 시간 후에도 응고 또는 섬유소(fibrin)가 석출된 것은 모두 coagulase 양성으로 하며 이상과 같이 확인된 것은 *S. aureus* 양성으로 판정한다. 시험에 있어서는 coagulase 양성균 및 균주 접종의 음성 대조균을 둔다. 2008년 3월 식품의 기준 및 규격 개정고시를 통하여 Baird-Parker 한천평판배지가 *S. aureus* 분리배지로 등재되어 현재 *S. aureus* 분리배지는 만니톨 식염한천배지와 Baird-Parker 한천평판배지 2종이 공인배지로 되어 있다.

〈정량시험법〉

식품의약품안전청고시 제 2008-15호 「식품의 기준 및 규격」 일부개정고시에서 *S. aureus*에 대한 정량시험법이 고시되었다. 실험법은 증균 과정 없이 멸균 인산 완충 희석액으로 10배 희석하여 균질화한 후 Baird-Parker 한천평판배지 3장에 0.3 ㎖, 0.4 ㎖, 0.3 ㎖씩 총 접종액이 1 ㎖이 되게 도말한 후 35℃에서 45~48시간 배양한 다음 투명한 띠로 둘러싸인 광택의 검정색 집락을 계수한다. 계수한 평판에서 5개 이상의 전형적인 집락을 선별하여 보통한천배지에 접종하고 37℃에서 18~24시간 배양한 후 *S. aureus* 정성시험법의 확인시험을 실시한다.

2. 미국 FDA BAM에 의한 검출법

〈Direct Plate Count Method〉

Bacteriological Analytical Manual(BAM)에 의한 검출법은 g당 100 cells 이상의 *S. aureus*가 존재할 경우 direct plate count method를 사용한다. Baird-Parker agar를 분리배지로 사용하며 3 plates를 이용하여 1 ㎖의 시료를 분산하여 접종한다. 즉, 0.3 ㎖, 0.3 ㎖과 0.4 ㎖로 나누어서 시료액을 분주한다. 특징적인 *S. aureus*를 나타내는 colony가 20~200개 존재하는 plate를 선발하여 계수한다.

S. aureus 확인을 위해서 coagulase test를 실시하며 이외에도 catalase test, glucose 혐기배양 가능여부, mannitol 혐기배양 가능여부, Lysostaphin

Table 1. Typical characteristics of *S. aureus, S. epidermisdis*, and micrococci

Characteristic	S. aureus	S. epidermidis	Micrococci
Catalase activity	+	+	+
Coagulase production	+	-	-
Thermonuclease production	+	-	-
Lysostaphin sensitivity	+	+	-
Anaerobic utilization of glucose	+	+	-
Anaerobic utilization of mannitol	+	-	-

a +, Most (90% or more) strains are positive; -, most (90% or more) stains are negative

sensitivity와 thermostable nuclease production을 조사한다(표 1).

〈Most Probable Number Method for Staphylococcus spp〉

경쟁균(competing species)이 많거나 *S. aureus*가 적은 수로 존재할 경우 최확수법 사용이 권고되고 있다. 10% NaCl과 1% sodium pyruvate를 첨가한 3개의 TSB를 이용한다. 순차적으로 희석한 시료액을 이용하여 처리구를 구성하며 가장 희석이 많이 된 경우 negative endpoint로 한다. 35℃에서 48±2시간 배양한 후 배양액을 Baird-Parker medium에 strecking 하여 특징적인 colony를 선발하여 적어도 1개의 presumptive colony를 BHI broth에 옮긴 후 확인실험을 실시한다. 결과는 최확수법 계산법에 따라 한다.

3. 식품에서의 기준 규격

황색포도상 구균은 음성으로 기준 규격이 있었으나 식품의약품안전청고시 제 2008-15호「식품의 기준 및 규격」일부개정고시에서 즉석섭취, 편의식품류의 기준이 1g 당 100 cfu 이하로 개정고시 되었다. 따라서 *S. aureus*는 Bacillus cereus에 이어 2번째로 정량기준이 도입된 식중독균이 되었다. 그러나 S. aureus의 정량시험법은 증균 과정 없이 희석액을 선택배지인 Baird-Parker 배지에 직접 분주하는 방법이기 때문에 sub-lethally injured cell은 pigment와 다양한 성장저해물질에 의해 사멸할 가능성이 높아 검출되지 않을 수 있으며 healthy cell 만 검출될 수 있기 때문에 측정균수가 감소할 가능성이 높다고 할 수 있다.

4. Coagulase test

Coagulase test는 식품공전에서도 *S. aureus*의 확인시험 방법으로 고시되어 있다. 만니톨 식염한천배지와 Baird-Parker 한천평판배지에서 분리된 균을 대상으로 보통한천배지에 옮겨 배양한 후 그람염색을 실시하여 포도상 배열을 갖는 그람양성균을 확인한 후 coagulase test를 실시한다. 실험 결과 응고되거나 섬유(fibrin)가 석출된 것을 모두 coagulase 양성으로 하고 이를 *S. aureus*로 판정하기 때문에 coagulase test의 정확성이 *S. aureus*를 판정하는 가장 중요한 기준이 될 수 있다.

Coagulase를 생산하는 미생물은 주변에 존재하는 plasma를 응고시켜 host immune system에 의한 phagocytosis를 방지할 수 있는 방어체계로 사용한다. 시료를 0.5 ㎖의 rabbit plasma에 첨가하여 37℃에서 반응시키며 보통 1~4시간 진행한다.

*S. aureus*는 포도상구균 중 임상검체에서 가장 흔히 분리되는 중요한 병원성 포도상구균이므로 신속하고 정확한 동정은 환자의 치료방침을 결정하는데 도움을 준다. 다행히도 *S. aureus*는 coagulase 시험으로 다른 포도상구균과 감별할 수 있기 때문에 동정이 비교적 쉽다. *Staphylococci* 중에서 coagulase에 양성인 균종은 *S. aureus* 이외에도 *S. intermedius, S. delphini, S. hyicus, S. schleiferi subsp. coagulans, S, aureus subsp. anaerobius*의 5가지 균종이 있으나 *S. intermedius, S. delphini*와 *S. hyicus*는 주로 동물의 감염균이고 *S. schleiferi subsp. coagulans*와 *S, aureus subsp. anaerobius*는 임상검체에서 분리되는 일이 거의 없기 때문에 식품에서 분리한 균일 경우 coagulase 시험에서 양성이면 *S. aureus*일 가능성이 대부분이다.

Coagulase는 *S. aureus*에 존재하는 내열성의 효소로서

*S. aureus*와 *S. aureus* 이외의 포도상구균을 감별하는데 사용된다. Coagulase는 세포벽에 결합되어 있는 bound coagulase와 세포 밖으로 유리되는 free coagulase의 두 가지 형태가 있으며 bound coagulase(clumping factor)는 혈장내의 fibrinogen과 작용하여 세균 응집(clumping)을 유발한다. Coagulase 시험은 전통적인 방법으로 clumping factor를 검출하는 슬라이드법과 free coagulase를 검출하는 시험관법이 있고 상품화된 방법으로는 protein A나 clumping factor를 검출하는 latex agglutination test등이 있다. 슬라이드법과 시험관법의 일치율은 대략 96% 정도로 알려져 있으나 *S. schleiferi subsp. coagulans*와 *S. lugdunensis*는 clumping factor를 생성할 수 있기 때문에 표준방법은 전통적 시험관 법이다. 전통적 슬라이드법은 간단하고 빠른 장점이 있는 반면 10~15%까지 위음성이 있으므로 음성 결과를 보이면 시험관 법으로 확인해야 하고 시험관법은 시험술식을 정확히 지키면 정확한 결과를 얻을 수 있지만 시간이 오래 걸리고 술식이 번거로운 단점이 있으며 이 방법 또한 2~5%의 위음성이 있기 때문에 보통 DNase와 6.5% mannitol salt 시험을 병행하여 시험한다. 더욱이 methicillin 내성 *S. aureus*는 slide 법과 시험관법 모두 음성 반응을 보일 수 있기 때문에 검사방법의 선택에 주의가 요구된다. 특히 clumping factor를 검출하는 슬라이드 법은 MRSA에서 25%까지 위음성 결과를 초래할 수 있다는 보고가 있으며 정확한 원인은 규명되지는 않았으나 세포벽 구조의 변형으로 clumping factor 또는 protein A의 양과 결합력 등의 감소로 추측하고 있다. 최근의 상품화된 latex 응집법은 동정 정확도를 높이기 위하여 latex 입자에 staphylococcal capsular type 5와 8 항원에 대한 monoclonal 항체를 추가하거나(Slidex Staph-kit; BioMerieux Vitek) 또는 polyclonal 항체를 추가하여 부착한 Staphaurex kit(Murex Diagnostics; Abbott와 합병)가 개발되어 사용되고 있다.

(1) 슬라이드 법

(가) 간접법

시험할 집락을 증류수에 진하게 풀은 후 autoagglutination과 혼동되지 않도록 vortex등을 이용하여 균질화 시킨다. Citrate 또는 EDTA 토끼 혈장(Bacto rabbit plasma EDTA; Difco) 한 방울 첨가한다. 10초 내에 응집이 있는지를 관찰한다. 너무 섞으며 응집물이 작아진다.

(나) 직접법

- 토끼 혈장 한 방울과 시험할 집락 4~5개를 슬라이드에서 섞은 후 5~10초 후에 응집을 관찰한다.
- Hemagglutination 슬라이드법 : BBL, bioMerieux
- Latex agglutination test : I-M, Carr Scarborough Microbiologicals, Wellcome Diagnostics

(다) 정도관리

- 양성 : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- 음성 : *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990

(라) 주의사항

- 슬라이드법에서의 양성은 autoagglutination 시험에서 음성인 포도구균에 대해서만 의의가 있다. Autoagglutination 양성인 균주는 protein A 또는 시험관 coagulase 법 등으로 확인해야 한다. NaCl 농도가 높은 배지에서 증식된 집락으로 시험하지 않는다.

(2) 시험관법

Free coagulase는 혈장내의 prothrombin에 작용하여 thrombinlike product를 생성한 후 fibrinogen과 반응하여 fibrin clot을 생성한다.

(가) 검사법

시험할 집락을 0.5 ㎖의 토끼 혈장(citrate 또는 EDTA)을 담은 시험관(13 x 100 mm)에 접종한다. 35~37℃에서 24시간까지 배양한다. 배양 4시간 후에 가볍게 시험관을 흔들

어 풀어지지 않는 gel이나 clot이 형성되었는지를 관찰한다. 4시간째에 응고가 없으면 배양 24시간째에 다시 관찰한다. 배양 4시간 후에는 실온에 배양하여 streptokinase에 의한 clot의 용해를 피한다.

(나) 정도관리

- 양성 : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- 음성 : Staphylococcus epidermidis ATCC 14990

(다) 주의사항

*S. aureus*와 citrate를 이용하는 세균이 혼합된 배양에서 citrated plasma를 사용할 경우에는 위양성 결과가 나타날 수 있다. *S. aureus*가 시험관을 관찰하기도 전에 과량의 streptokinase를 생성하면 위음성 결과를 초래할 수 있다.

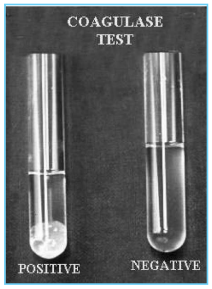

그림 2. Coagulase test(tube 방법)

5. *S. aureus* 분리 배지

가. *Staphylcoccus aureus* 공인배지

최근 HACCP, GAP 등의 위생관리시스템을 유지하기 위하여 가장 필요로 되는 것이 식중독 미생물에 대한 검출 및 제어라고 할 수 있어 병원성 세균 검출에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 특히, Polymerase Chain Reaction(PCR)을 이용한 분자생물학적 방법이 활발히 개발되고 있으며 ELISA 등의 방법이 개발되고 있으며 바이오센서 등의 방법도 활발히 개발되고 있어 검출속도 및 정확도가 향상되고 있다고 할 수 있다. 이에 비하여 생화학적 특성을 이용한 전통적인 배지에 대한 연구는 점차적으로 축소되고 있지만 현재까지 국제적으로 식품의 미생물 기준을 규정하는 정해진 분석방법이며 국제표준기구(AOAC, ISO, CEN, AFNOR) 등에서도 표준시험방법(Gold standard)로 되어 있다. 식중독미생물의 분리실험은 일반적으로 증균(Enrichment), 선택분리(Selective detection) 및 확인(Confirmation)으로 구성되어 있다. 이 중 선택분리 과정이 가장 중요한 과정이라고 할 수 있다. 다양한 분리배지가 개발되고 있으며 국제표준기구(AOAC. AFNOR)에 의해 공인 받기도 한다.

표 2에는 황색포도상 구균의 분리배지로 국제연구기관에서 권고하고 있거나 국제기관에 의해 승인된 배지의 목록이다. 우리나라 식품공전에서는 난황이 첨가된 Mannitol salt agar와 Baird-Parker agar가 승인되어있다. 우리나라와 동일하게 ISO에서도 Egg yolk tellurite emulsion이 첨가된 Baird-Parker agar를 사용하고 있다. 이 배지는 미국 FDA와 AOAC에서도 동일하게 사용되고 있어 가장 보편적으로 사용되고 있는 배지라고 할 수 있다. 미국 FDA에서는 이외에도 Vogel johnson agar와 Bismuth sulphite agar, XLD agar, HE agar를 사용하고 있다. 이밖에도 chromogenic agar로서 CHROMagar staph aureus와 Rapid' Staph(Biorad)가 사용되고 있다.

표 2. *Staphylococcus aureus* 분리배지

Approved or used by	Enrichment broth	Isolation media
KFDA	10% NaCl TSB broth	난황첨가 Mannitol salt agar Baird-Parker agar
ISO	Giolitti-Cantoni broth	Baird-Parker agar + Egg yolk tellurite emulsion
FDA/ BAM	TSB w/ 10% NaCl + 1% Sodium pyruvate Tetrathionate broth Selenite cystine broth RV broth	Baird-Parker agar + Egg yolk tellurite emulsion Vogel johnson agar, Bismuth sulphite agar, XLD agar, Hektoen agar
AOAC	TSB + supple.	Baird-Parker agar + Egg yolk tellurite emulsion Petrifilm staph express count plate BBL CHROMagar staph aureus
AFNOR		Baird-Parker agar
Chromgenic agar or other		3M Petrifilm™ Express *S. aureus* Count, CHRO Magar staph aureus Biorad, RAPID'Staph

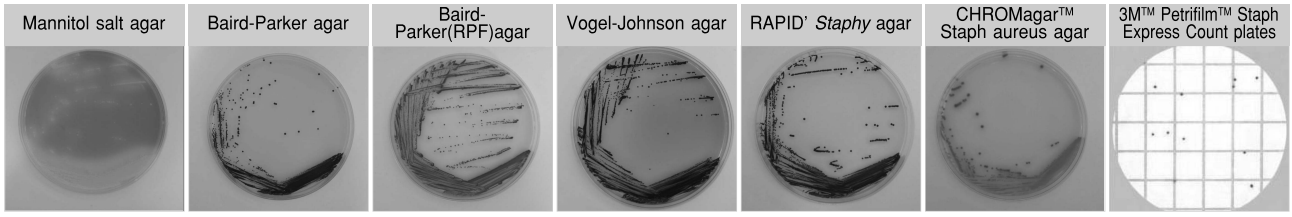

그림 3. Staphylococcus aureus 분리배지에서의 특징적인 colony 모양

나. 식품공전에 등재된 배지의 특성

S. aureus 분리배지로는 우리나라 식품공전에는 Mannitol salt agar가 등재되어 있으며 2008년 3월 개정고시를 통하여 Baird-Parker agar도 공인배지로 등재되었다. 식품공전에 등재되지는 않았지만 식품공전에 등재된 Baird-Parker agar를 기본으로 하여 ready-made 형태로 편리성을 증진시킨 배지를 3M에서 제조하여 판매하고 있다.

Mannitol salt agar는 7.5%의 높은 염도를 가지며 탄소원으로 mannitol을 사용하고 있다. Salt에 내성을 가지는 *S. aureus*의 특성을 이용한 배지조성으로서 indicator dye로는 phenol red를 첨가하였다. Supplement로는 5% egg yolk emulsion을 첨가한다. *S. aureus*가 생산하는 lipase 활성에 의해 colony 주위에 노란색의 불투명한 환을 형성한다.

Baird-Parker agar는 egg yolk에 혼합되어 있는 tellurite를 환원시켜 grey-black 색깔의 광택이 있는 colony를 형성하고 이 colony 주위에 proteolysis에 의해 clear zone이 형성된다. 전체의 배지는 불투명한 편이다. Baird-Parker agar를 개선하여 egg yolk emulsion을 RPF supplement(Bovine fibrinogen+Rabbit plasma+Trypsin inhibitor)로 대체한 배지가 판매되고 있다. Fibrinogen을 첨가하여 proteolysis를 측정할 수 있으며 이외에 *S. aureus*의 대표적인 특성인 coagulase를 생산하는 성질을 rabbit plasma를 이용하여 측정하는 원리를 가지고 있어 선택성(specificity)이 개선되었다고 할 수 있다. 첨가된 fibrinogen의 분해를 방지하기 위하여 trypsin inhibitor를 첨가하였으며 tellurite도 첨가하여 grey-black shiny colony를 생성한다. 전체적으로 배지는 투명하며 grey-black shiny colony 주위에 coagulase에 의한 뿌연 환이 형성된다(표 3).

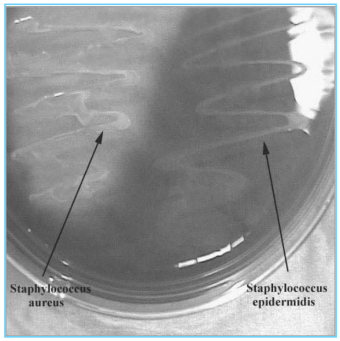

그림 4. Mannitol salt agar에서의 coagulase positive*(S. aureus)*와 coagulase negative*(S. epidermidis)*의 특징적인 colony 모양

3M™ Petrifilm™ Staph Express Count Plates는 근본적으로 Baird-Parker agar 조성을 기본으로 하고 있어 US BAM의 three-plate Baird-Parker agar와 single tube-coagulase method를 한 개의 plate에 동시에 구현한 특성이 있다. 확인실험을 위하여 deoxyribonuclease(DNase) reaction을 측정하기 위해 toluidine blue-O를 첨가한 Staph Express Disk를 사용하고 있다.

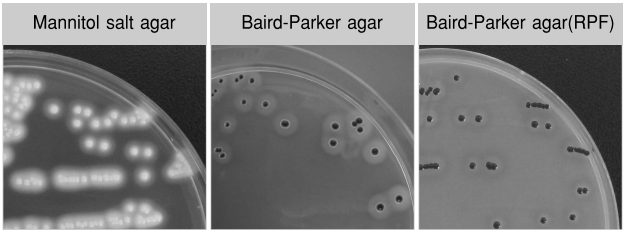

그림 5. 식품공전 등재 배지의 특징적인 colony 모양

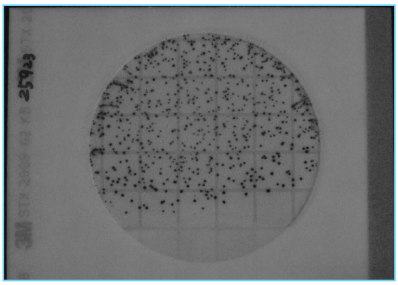

그림 6. 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count Plates에서의 특징적인 colony 모양

Table 3. Staphylococcus aureus 분리배지의 조성 및 원리

	Mannitol salt agar	Baird-Parker Base	Baird-Parker Base(RPF)
Formula	'Lab-Lemco' powder: 1.0g, Peptone: 10.0g, Mannitol: 10.0g, Sodium chloride: 75.0g, Phenol red: 0.025g, Agar: 15.0g	Tryptone: 10.0g, Lab-Lemco' powder: 5.0g, Yeast extract: 1.0g, Sodium pyruvate: 10.0g, Glycine: 12.0g, Lithium chloride: 5.0g, Agar: 20.0g	Pancreatic digest of casein: 10.0g, Meat Extract: 5.0g, Sodium pyruvate: 10.0g, Yeast extract: 1.0g, Glycine: 12.0g, Lithium chloride: 5.0g, Agar: 20.0g
Supplement	5% Egg yolk Emulsion	5% Egg yolk Tellurite Emulsion	RPF Bovine fibrinogen Rabbit plasma Trypsin inhibitor Potassium tellurite
Description	- High salt 농도 및 mannitol 발효에 의해 egg yolk emulsion이 cleared - 이후, Lipase에 의해 yellow opague zone 형성	- tellurite를 환원시켜 grey-black shiny colonies를 형성함 - Colonies 주위에 proteolysis에 의한 clear zone 형성	- Egg yolk emulsion이 RPF로 대체되었음 - Rabbit plasma로 coagulase activity 측정 - Trypsin은 fibrinolysis를 방지

결론

S. aureus 분리용 배지로 식품공전에 등재된 배지는 Mannitol salt agar와 Baird-Parker agar가 있다. Mannitol salt agar는 7.5%의 식염을 첨가하여 salt stress를 가하고 mannitol 발효 여부를 측정함으로서 *S. aureus*를 검출하는 원리이며 Baird-Parker agar의 경우 tellurite를 환원시켜 검정색의 colony를 형성하며 proteolysis에 의해 clear zone을 형성하는 것이 원리이다. RPF(Bovine fibrinogen+Rabbit plasma+Trypsin inhibitor)를 첨가한 Baird-Parker agar는 *S. aureus*의 confirmation에 활용되는 coagulase test를 배지에 도입한 시스템으로 presumptive colony를 선발함과 동시에 confirmation 까지 할 수 있는 dual function을 가진다고 할 수 있다. Mannitol salt agar와 Baird-Parker agar는 presumptive colony를 선발하는데 사용되기 때문에 확인실험시 별도의 coagulase test가 필요하다. 3M에서 판매되고 있는 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count plates의 경우 배지조성은 Baird-Parker agar를 기본으로 하고 있으며 DNase activity를 이용하여 추가적인 confirmation이 가능하도록 되어 있다. 3M petrifilm의 경우 시료 접종량이 1 ㎖에 상당하므로 식품공전법과 같이 별도의 3개의 plate를 사용하지 않고 한 개의 film에서 *S. aureus* 균수 계수가 가능하여 데이터 산출이 용이하고 일반 배지 제조에 필요한 살균작업이 필요 없는 ready-made 형태로 판매되기 때문에 편리성이 증진되었다고 할 수 있다.

감사의 글

이 연구는 2007년도 식약청 연구비 지원(식중독균 시험법 개선연구)으로 연구되었습니다.

참고 문헌

1. 식품공전 미생물 실험법
2. Food-borne pathogens, Handbook, 진성유니텍
3. US FDA BAM Manual, 2003

4. Bad Bug book US FDA
5. http://cpl.yonsei.ac.kr/micro/textbook/text20co.htm
6. Oxoid, Food-borne pathogen, Monograph Number 6, *Staphylococcus aureus*.
7. K. H. Schleifer and U. Fischer. Description of a New Species of the Genus *Staphylococcus: Staphylococcus carnosus*. International Journal of Systematic Bacteriology. 153-156. 1982
8. B. O. Silva, D. Z. caraviello, A. C. Rodrigues, and P. L. Ruegg. Evaluation of Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples. J. Dairy Sci. 3000-3008. 2005
9. G. Mauriello, A. Casaburi, G. Blaiotta, F. Villani. Isolation and technological properties of coagulase negative *staphylococci* from fermented sausages of Southern Italy. Meat Science. 149-158. 2004
10. B. K. Isigidi, L. A. Devriese, T. H. Croegaert & Van Hoof. A highly selective two-stage isolation method for the enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods. Journal of Applied Bacteriology. 379-384. 1989
11. A. C. Baird-Parker. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive *staphylocci*. Journal of Applied Bacteriology. 25. 12-18. 1962
12. 식품의약품안전청 고시 제 2008-15호. 식품의 기준 및 규격 개정 고시