pISSN 1229-1153 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 30, No. 3, pp. 242~248 (2015)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2015.30.3.242

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

보육시설 유아 사용 칫솔의 식중독 미생물 분포 및 독소 유전자

김종승[1] · 김중범*
순천대학교 식품공학과, [1]계명대학교 공중보건학과

Prevalence and Toxin Genes of Food-Borne Pathogens Isolated from Toothbrush in Child Care Center

Jong-Seung Kim[1] and Jung-Beom Kim*
Department of Food Science and Technology, SunChon National University
[1]Department of Public Health, KeiMyung University
(Received July 2, 2015/Revised August 5, 2015/Accepted August 18, 2015)

ABSTRACT - This study was performed to investigate the microbiological contamination on toothbrushes, toothbrush caps, and tooth cleaning cups in the child care centers and to evaluate the toxin genes, toxin production ability and antibiotic resistance of food-borne pathogens. The average number of total aerobic bacteria and fungi were 5.3 log CFU and 3.2 log CFU. Coliform bacteria were detected in 41 (54.7%) of 75 toothbrushes, 13 (44.8%) of 29 toothbrush caps, and 29 (44.6%) of 65 tooth cleaning cups. *Salmonella* spp. was not detected in all of samples but *Bacillus cereus* was isolated from 1 (1.3%) of 75 toothbrushes and 2 (3.1%) of 65 tooth cleaning cups. *Staphylococcus aureus* was detected in 1 (1.5%) of 65 tooth cleaning cups. The *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblC*, *hblD*, *hblA* and *entFM* toxin genes were possessed in *B. cereus* isolated from toothbrush which also produce NHE and HBL enterotoxins. *S. aureus* was resistant to ampicillin and penicillin, while *B. cereus* was resistant to β-lactam antibiotics. These results indicated that the sanitary conditions of toothbrushes and tooth cleaning cups in the child care centers should be improved promptly. The UV sterilization after drying and then storage in dried condition is required to improve the sanitary condition of toothbrushes and tooth cleaning cups in the child care center.

Key words: child care center, microbiological contamination, toxin gene, toothbrush

우리나라는 교육비 증가와 육아에 대한 부담으로 젊은 세대에서 출산 기피현상이 나타나고 있으며 이로 인해 세계적으로 가장 낮은 출산율을 기록하는 등 저출산 현상이 고착화되고 있다. 이러한 저출산 현상을 극복하고자 국가에서는 일과 가정이 양립할 수 있도록 국가와 가정이 보육을 함께 책임지는 저출산 고령화 기본계획을 수립하고 보육 및 출산장려 정책을 실시해오고 있다[1,2]. 이러한 노력의 결과로 어린이집 등 보육시설은 2002년 22,147개소에서 2014년 43,742개소로 2배, 보육 영유아수는 800,991명에서 1,496,671명으로 1.9배 증가하였다[3]. 어린이집 등 보육시설은 종일제 학급 운영과 단체급식 제공 등 유아전문 교육기관으로 자리매김하고 있으며 손 및 개인위생 확보를 위한 손 씻기 및 양치 교육을 지속적으로 실시하고 있다[4].

양치는 칫솔을 이용하여 구강 내 세균과 음식물 잔사를 제거하는 물리적 방법 중 하나로서 구강건강 등 개인위생 확보를 위해 가장 중요하고 기본적인 방법[5]으로 알려져 있으나 양치 후 칫솔을 충분히 세척하지 않거나 젖은 상태로 보관하게 되면 구강 내 상존하는 세균 및 공기 중 낙하세균 등에 의해 칫솔이 오염되고, 미생물에 오염된 칫솔을 통해 질병이 발생한다고 보고[6-8]되고 있다. 따라서 어린이집에서 상대습도가 높은 화장실에 칫솔을 보관하거나 양치 후 젖은 상태로 칫솔을 보관하는 등 칫솔 및 양치컵에 대한 위생관리가 불완전하면 면역력이 취약한 어린이집 유아들에게 식중독을 유발할 가능성이 상존한다 하겠다. 그러나 현재까지의 연구 동향을 살펴보면 20대 청년층 사용 칫솔의 총균수 조사[7]와 가정용 칫솔의 세균학적 오염도 조사결과 세균수가 6 log CFU에서 9 log CFU로 보고[6]되고, 칫솔을 교환주기는 2~3개월로 나타났으며[9], 보

*Correspondence to: Jung-Beom Kim, Department of Food Science and Technology, SunChon National University, 255 Jungang-ro, Suncheon, Jeonnam 540-950, Korea
Tel: 82-61-750-3259, Fax: 82-61-750-3208
E-mail: okjbkim@sunchon.ac.kr

관 장소에 따른 칫솔의 미생물 오염도 조사결과 상대습도가 높은 곳의 미생물오염도가 높게 나타났고[10], 칫솔사용개수와 오염도 비교분석결과 칫솔 사용개수가 많을수록 오염도가 낮게 나타났다는 보고[11] 등 가정 및 성인사용 칫솔의 일반세균수 조사에 국한되어 보고되었을 뿐 면역력이 취약한 어린이집 유아들이 사용하는 칫솔 및 양치 컵에 관한 식중독 미생물 오염도에 관한 연구는 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 어린이집 유아들이 사용하는 칫솔 및 양치 컵의 미생물 오염도와 식중독 미생물의 독소 유전자 및 독소 생산능력을 분석하여 칫솔에 의해 면역력이 취약한 유아들에게 발생할 수 있는 식중독을 사전 예방하고자 하였다.

Materials and Methods

연구대상 및 시료채취

경기도 내 어린이집 9곳에서 어린이가 식사 후 양치에 사용하는 칫솔 75개, 칫솔걸이 29개, 양치 컵 65개를 실험대상으로 하였다. 미생물 오염도 실험을 위하여 칫솔은 칫솔모 부분을 saline 10 mL에 넣어 때때로 흔들어주며 10분간 방치한 후 시험용액으로 하였고, 칫솔걸이와 양치 컵은 내면을 멸균 면봉으로 swab하여 saline 10 mL에 넣어 균질화한 후 시험용액으로 사용하였다.

미생물 오염도 측정

일반세균수, 대장균군수 및 진균수는 식품공전[12]에 따라 측정하였으며 평판 당 30~300개의 집락을 형성한 평판을 선택하여 계수할 수 있도록 10단계 희석된 각각의 시험용액과 희석액을 멸균 Petri dish 6매에 각각 1 mL씩 분주하였다. 일반세균수는 Standard Plate Count agar (Oxoid, Basingstoke, England)를 Petri dish 2매에 무균적으로 분주한 후 35ºC에서 48시간 배양하였고, 대장균군수는 Desoxycholate Lactose agar (Oxoid)를 Petri dish 2매에 무균적으로 분주한 후 35ºC에서 24시간 배양하여 계수 하였다. 진균수는 Potato Dextrose agar (PDA; Difco, Detroit, MI, USA)를 Petri dish 2매에 무균적으로 분주한 후 25ºC에서 5일간 배양하여 계수하였다.

식중독 미생물 오염도 측정

Bacillus cereus, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. 3종의 식중독 미생물은 식품공전[12]에 따라 실험하였으며 *B. cereus*는 시험용액 100 μL를 mannitol-egg york-polymycin agar (MYP; Oxied)에 도말하여 35ºC에서 24시간 배양한 후 lechitinase 활성을 나타내어 혼탁한 환을 갖는 분홍색 집락을 선별 Blood agar (Komed, Seoul, Korea)에 도말하여 35ºC에서 24시간 배양하였다. 배양결과 β-hemolysis를 나타내는 균주에 대하여 API 50CHB와 API 20E test kit (bioMerieux, Marcyl'Etoile, France)를 이용하여 생화학시험을 실시하였고, 결과는 API 50CHB version 4.0[13]를 이용하여 동정하였다.

*S. aureus*는 시험용액 100 μL를 난황이 첨가된 Baird-Parker agar (BPA; Oxoid)에 도말하여 35ºC에서 24시간 배양한 후 혼탁한 백색환을 나타내는 검은색 집락을 선별하여 BA (Komed)에 도말하여 35ºC에서 24시간 배양하였다. 배양결과 β-heamolysis를 나타내는 균주에 대하여 API Staph test kit (bioMerieux)를 이용하여 생화학시험을 실시하였고 API Staph version 4.1[13]를 이용하여 *S. aureus*를 동정하였다.

Salmonella spp.는 시험용액 100 μL를 MacConkey agar (Oxoid)에 도말하여 35ºC에서 24시간 배양한 후 무색 집락을 선별하여 BA (Komed)에 도말하여 35ºC에서 24시간 배양하였다. 배양된 집락을 API 20E test kit (bioMerieux)를 이용하여 *Salmonella* spp.를 동정하였다.

독소 유전자 및 독소 생산능 확인실험

분리 동정된 *B. cereus*와 *S. aureus* 식중균의 독소 유전자 함유 여부를 확인하기 위해 각각 균주를 Tryptic Soy Broth (TSB; Oxoid)에 도말하여 김 등[14]의 보고와 동일하게 유전자를 추출한 후 Spectrophotometer (BioPhotometer; Eppendrof, Hamburg, Germany)를 이용 DNA 농도가 1 μg/mL가 되도록 멸균증류수로 희석하였다[15]. *B. cereus* 독소 유전자 확인 실험에 사용된 primer sequences는 Table 1 나타내었으며[14,15] Polymerase Chain Reaction (PCR) 조건은 initial denaturation 95ºC, 300 seconds, denaturation 95ºC, 60 seconds, extension 72ºC, 120 seconds, final extension 72ºC, 300 seconds의 조건으로 35 cycle을 반복하였으며 각각의 annealing 온도는 *nheA*, *hblA* 56ºC, *nheB*, *nheC* 54ºC, *hblC*, *hblD*, *ces* 58ºC, *entFM* 60ºC, *cytK* 48ºC로 실험하였다. *S. aureus* 독소 유전자는 PowerChek™ *S. aureus* toxin ID PCR Kit (Kogenbiotech, Seoul, Korea)를 이용 제조사의 방법에 따라 실험하였으며 Eppendrop thermal cycler (Mastercycler Gradient S)를 이용 PCR 반응을 실시하였다. 독소 유전자 확인을 위해 PCR product를 Dyne Loading STAR (DyneBio, Seoul, Korea)와 혼합하여 1% agarose gel에 loading한 후 UV transilluminator (Gel Doc 2000; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용 각각의 밴드를 확인하였다[15]. *B. cereus* 14579와 F4810/72 및 *S. aureus* ATCC 25922를 대조균주로 사용하였다.

분리 동정된 *B. cereus*와 *S. aureus* 식중균의 독소 생산능을 확인하기 위해 각각 균주를 TSB (Oxoid)에 접종하여 35ºC에서 24시간 배양한 후 3000 × g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 실험에 사용하였다. *B. cereus*의 heamolysin BL enterotoxin (HBL)은 *B. cereus* enterotoxin-reversed

Table 1. Primer sequences for the detection of *Bacillus cereus* toxin genes

Amplification target	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
hblA	AAGCAATGGAATACAATGGG AGAATCTAAATCATGCCACTGC	1,154
hblC	GATACTCAATGTGGCAACTGC TTGAGACTGCTCGTCTAGTTG	740
hblD	ACCGGTAACACTATTCATGC GAGTCCATATGCTTAGATGC	829
nheA	GTTAGGATCACAATCACCGC ACGAATGTAATTTGAGTCGC	755
nheB	TTTAGTAGTGGATCTGTACGC TTAATGTTCGTTAATCCTGC	743
nheC	TGGATTCCAAGATGTAACG ATTACGACTTCTGCTTGTGC	683
entFM	AAAGAAATTAATGGACAAACTCAAACTCA GTATGTAGCTGGGCCTGTACGT	596
cytK	GTAACTTTCATTGATGATCC GAATACTAAATAATTGGTTTCC	505
ces	GGTGACACATTATCATATAAGGTG GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA	1,271

Table 2. Microbiological evaluation of toothbrush, toothbrush cap, and tooth cleaning cup in child care center

Samples	Total aerobic bacteria		Coliform bacteria		Fungi	
	Mean[1)]	Range	Mean	Range	Mean	Range
Toothbrush (n = 75)	6.7	ND[2)] ~ 8.0	2.0	ND ~ 3.5	4.6	ND ~ 5.8
Toothbrush cap (n = 29)	4.4	ND ~ 6.2	1.6	ND ~ 2.9	2.0	ND ~ 3.3
Tooth cleaning cup (n = 65)	3.4	1.3 ~ 4.6	1.6	ND ~ 2.7	2.4	ND ~ 3.7
Total (n = 169)	5.3	ND ~ 8.0	1.8	ND ~ 3.5	3.2	ND ~ 5.8

[1)] Unit: log CFU/ toothbrush head, inside of toothbrush cap, or inside of tooth cleaning cup.
[2)] ND: Not detected (detection limit: < 1.0 log CFU).

passive latex agglutination kit (BCET-RPLA; Oxoid)를 사용하였고, non-heamolytic enterotoxin (NHE)은 *Bacillus* diarrheal enterotoxin visual immunoassay kit (BDE-VIA; Tecra international pty Ltd., Reading, U.K.)를 사용하였다. *S. aureus*의 enterotoxin 생성능은 *Staphylococcus aureus* enterotoxin-reversed passive latex agglutination kit (SET-RPLA; Denka Seiken, Tokyo, Japan)를 사용 하였으며 각각의 kit는 제조사가 권장하는 방법에 따라 실험하였다.

항생제 감수성 실험

*B. cereus*와 *S. aureus* 식중독균의 항생제 감수성 실험은 Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) Guideline[16)]의 디스크 확산법에 따라 실험하였으며 사용된 항생제 디스크는 Oxoid의 ampicillin (10 μg), cefepime (30 μg), cefotetan (30 μg), ciprofloxacin (5 μg), chloramphenicol (30 μg), clindamycin (2 μg), erythromycin (15 μg), gentamicin (10 μg), imipenem (10 μg), oxacillin (1 μg), penicillin (10 U), rifampin (5 μg), tetracycline (30 μg), trimethoprim/sulfamethoxazole (1.255 μg / 23.75 μg), vancomycin (30 μg)으로 실험하였다. *B. cereus* 식중독균은 각각 항생제에 대한 감수성기준이 설정되어 있지 않아 *S. aureus* 식중독균의 항생제 감수성기준을 적용 판단하였으며 *S. aureus* ATCC 25923을 대조균주로 사용하였다.

Results and Discussion

어린이집 유아 사용 칫솔, 칫솔걸이, 양치 컵의 미생물 오염도

어린이집 유아들이 식사 후 구강 청결을 위해 사용하는 칫솔, 칫솔걸이, 양치 컵의 미생물 오염도를 분석하고자 일반세균수, 대장균군수 및 진균수를 실험하였으며 그 결

과는 Table 2에 나타내었다. 일반세균수는 불검출에서 8.0 log CFU 범위에 평균 5.3 log CFU 검출되었고 칫솔은 평균 6.7 log CFU 검출되어 가장 높은 오염도를 나타내었다. 위생지표미생물로 사용되고 있는 대장균군은 칫솔 75건 중 41건 (54.7%), 칫솔걸이 29건 중 13건 (44.8%), 양치 컵 65건 중 29건 (44.6%)에서 검출되어 일반세균수와 동일하게 칫솔의 오염도가 가장 높게 나타났다. 진균수는 불검출에서 5.8 log CFU 범위에 평균 3.2 log CFU 검출되었고 칫솔이 평균 4.6 log CFU 검출되어 진균수 오염도가 가장 높게 나타났다.

어린이집 유아 사용 칫솔 및 양치 컵의 일반세균수 오염도가 평균 6.7 log CFU와 3.4 log CFU로 나타난 것은 Caudry와 Llitorinos가 보고[17]한 성인 칫솔 중 일반세균수 오염도가 평균 3.6 log CFU와 칫솔 중 세균수는 8 log/CFU까지 매우 다양했다는 Leahy-Glimartin의 보고[18]와 유사하거나 높은 오염도를 나타냈다. 또한 식품제조용 기구 및 설비 표면의 일반세균수는 2.7 log CFU/100 cm^2 미만이어야 만족할 만한 수준이라는 Harrigan과 McCance의 보고[19]와 비교할 때 구강과 직접 접촉하는 칫솔과 양치 컵의 일반세균수 오염도는 우려할 만한 수준으로 칫솔과 양치 컵에 대한 즉각적인 위생조치가 필요한 것으로 판단되었다. 칫솔, 양치 컵 등에 대한 진균수 연구결과가 전무하여 직접적인 비교는 곤란하였으나 칫솔의 진균수 평균 오염도가 4.6 log CFU를 나타낸 것은 어린이집 유아들이 직접 사용하는 수건 평균 4.3 log CFU/100 cm^2, 수저 평균 2.4 log CFU, 수저집 평균 3.8 log CFU의 진균이 검출되었다는 보고[1,20]에 비하여 높은 오염도를 나타낸 것으로 병인성 대사산물을 생산하는 진균의 특성[21]과 면역력이 완전하게 형성되지 않은 어린이들을 신체적 특성을 고려할 때 상당한 주의가 필요한 것으로 판단된다.

식품위생 지표 미생물인 대장균군이 칫솔의 54.7%, 칫솔걸이의 44.8%, 양치 컵의 44.6%에서 검출된 것은 사용중인 수건에서 100% 검출되었다는 보고[20]에 비해 낮은 결과였으나 어린이 손의 대장균군 검출율이 14.3%이고[13] 초등학생의 손은 4.5%였다는 보고[22]와 식품제조용 기구 및 설비 표면의 대장균군수는 1.0 log CFU/100 cm^2 미만이어야 만족할 만한 수준이라는 Harrigan과 McCance의 보고[19]와 비교할 때 매우 높은 오염도를 나타내었다. 이러한 결과는 대부분의 칫솔과 양치 컵이 양치 후 젖은 상태로 화장실에 보관되거나 젖은 상태로 자외선 살균고에서 살균되는 등 부적절한 보관가 살균방법이 주요 원인으로 분석되었으며 즉각적인 위생개선이 필요한 것으로 판단되었다.

어린이집 유아 사용 칫솔, 칫솔걸이, 양치 컵의 식중독 미생물 오염도

어린이집 유아들이 식사 후 구강 청결을 위해 사용하는 칫솔, 칫솔걸이, 양치 컵의 식중독 미생물 오염도를 분석하고자 *B. cereus*, *S. aureus* 및 *Salmonella* spp.를 실험한 결과 실험에 사용된 모든 시료에서 *Salmonella* spp.는 검출되지 않았으나, *B. cereus*는 칫솔 75건 중 1건 (1.3%), 양치 컵 65건 중 2건 (3.1%)에서 검출되었고 *S. aureus*는 양치 컵 65건 중 1건 (1.5%)에서 검출되어 *S. aureus* 보다 *B. cereus*가 높은 검출율을 나타내었다. 칫솔, 양치 컵에 대한 식중독 미생물 오염도에 대한 국내 연구결과는 매우 미약하여 직접적인 비교가 곤란하나 어린이 손의 *S. aureus* 오염도를 조사한 결과 25.7%, *B. cereus* 오염도를 조사한 결과 45.7%의 검출율을 나타내었으며[13] 서울과 광주지역 학생 손의 *S. aureus* 오염도를 조사한 결과 11.7%에서 29.4%의 검출율을 나타내었고 *B. cereus* 오염도는 7.2%를 나타내었다는 보고[22]와 어린이집 유아 사용 수건의 경우 *S. aureus*는 22.7%, *B. cereus*는 50.0% 검출되었다는 보고[20]에 비해 매우 낮은 결과로서 어린이집 유아 사용 칫솔과 양치 컵의 경우 손, 수건 등에 비해 식중독 미생물로부터 안전하다고 판단할 수 있으나 칫솔과 양치 컵은 구강과 직접 접촉하는 위생용품으로서 부적절한 관리로 인한 식중독 위험성은 상존한다고 할 수 있겠다. 따라서 교차오염에 의한 식중독 발생을 예방하기 위하여 칫솔 및 양치 컵의 건조 보관 및 건조 후 자외선 살균고를 이용한 살균이 필요한 것으로 판단되었다.

식중독 미생물의 독소 유전자 및 생산능

*B. cereus*와 *S. aureus* 식중독 미생물의 직접적인 식중독 유발 위험성을 분석하고자 독소 유전자와 독소 생산능을 실험한 결과 *S. aureus* 식중독균의 16종 독소 유전자와 (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *sek*, *sel*, *sem*, *sen*, *seo*, *sep*, *seq*) 4종 독소단백질 (enterotoxin A, B, C, D) 모두 불검출 되었다. 이러한 결과로 보아 어린이집 유아들이 사용하는 양치 컵에 오염된 *S. aureus*에 의한 식중독 발생 위험성을 낮게 판단할 수 있으나 *Salmonella* spp., pathogenic *Escherichia coli* 등과 함께 미래 집단 식중독의 주요 원인 미생물로 예측되는 *S. aureus*에[23] 의한 식중독 발생을 예방하기 위하여 양치 컵에 대한 지속적인 위생관리가 필요한 것으로 판단된다.

*B. cereus*는 설사형과 구토형 식중독을 동시에 일으키며 *nheABC*, *hblCDA*, *entFM*, *cytK* 등의 설사형 독소 유전자와 *ces* 구토형 독소 유전자가 주요 독소 유전자로 보고[24]되고 있다. 칫솔과 양치 컵에서 분리된 *B. cereus*의 독소 유전자와 독소 생산능은 Table 3에 나타내었다. 칫솔에서 분리된 *B. cereus*의 경우 설사독소 유전자인 *cytK*와 구토독소 유전자인 *ces*를 제외하고 *nheA* 등 7종의 설사독소 유전자가 검출되었으며 양치 컵에서 분리된 *B. cereus* 2균주는 모두 *cytK*와 *ces* 유전자를 보유하지 않고 *nheA*, *nheB*, *nheC*, *entFM* 설사독소 유전자만 보유하였다. 이러한 결과는 국내 식품과 의료 환경에서 분리된 *B. cereus*의

Table 3. Toxin genes profiles and enterotoxin production of *Bacillus cereus* isolated from toothbrush, toothbrush cap, and tooth cleaning cup in child care center

Isolates	Toxin gene									Enterotoxin	
	nheA	*nheB*	*nheC*	*hblA*	*hblC*	*hblD*	*entFM*	*cytK*	*ces*	NHE[1)]	HBL[2)]
Toothbrush-12	+[3)]	+	+	+	+	+	+	-[4)]	-	+	+
Tooth cleaning cup-35	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Tooth cleaning cup-36	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-

[1)]*Bacillus cereus* non-heamolytic enterotoxin (NHE) was detected using *Bacillus* diarrheal enterotoxin visual immunoassay (BDE-VIA) kit.
[2)]*Bacillus cereus* heamolysin BL enterotoxin (HBL) was detected using *Bacillus cereus* enterotoxin reversed passive latex agglutination (BCET-RPLA) kit.
[3)]+: Detected.
[4)]-: Not detected.

Table 4. Antibiotic resistance of *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* isolated from toothbrush, toothbrush cap, and tooth cleaning cup in child care center

Antimicrobial agent	*Bacillus cereus*			*Staphylococcus aureus*
	Toothbrush-12	Tooth cleaning cup-35	Tooth cleaning cup-36	Tooth cleaning cup-24
Ampicillin (10 μg)	R	R	R	R
Gentamicin (10 μg)	S	S	S	S
Cefepime (30 μg)	R	R	R	S
Cefotetan (30 μg)	I	S	S	S
Ciprofloxacin(5 μg)	S	S	S	S
Imipenem (10 μg)	S	S	S	S
Trimethoprim / sulfamethoxazole (1.255 μg / 23.75 μg)	S	S	S	S
Chloramphenicol (30 μg)	S	S	S	S
Tetracycline (30 μg)	S	S	S	S
Oxacillin (1 μg)	R	R	R	S
Penicillin (10 U)	R	R	R	R
Rifampin (5 μg)	R	R	R	S
Erythromycin (15 μg)	I	S	S	S
Clindamycin (2 μg)	I	I	I	S
Vancomycin (30 μg)	S	S	S	S

[1)]R: Resistance.
[2)]S: Susceptibility.
[3)]I: Intermediate.

경우 *nheABC*, *hblCDA* 설사독소 유전자가 주요 독소 유전자였다는 보고[25)]에 비해 *hblCDA* 설사독소 유전자가 낮은 검출율을 나타내었다. 그러나 설사유전자 중 *entFM*이 65.8%의 검출율을 나타내었다는 보고[25)]에 비해 본 실험에서 분리된 *B. cereus* 3주 모두에서 검출되어 양치 컵에 오염된 *B. cereus*에 의한 식중독 위험성은 상존하는 것으로 판단되었다. *B. cereus*의 장독소는 *hblA*, *hblC* 및 *hblD* 유전자로부터 생산되는 HBL, *nheA*, *nheB* 및 *nheC* 유전자로부터 생산되는 NHE가 가장 대표적인 설사독소로 각각 3가지 구성요소가 모두 있어야 식중독을 일으킨다고 보고[26,27)]되고 있다. 칫솔에서 분리된 *B. cereus*의 경우 HBL, NHE 설사독소를 생산하였고 양치 컵에서 분리된 *B. cereus* 2균주는 모두 NHE 설사독소만을 생산하였다. 이러한 결과는 대부분의 어린이집 유아 사용수건 등 국내 분리 *B. cereus* 식중독균주가 HBL과 NHE 설사독소 중 한 가지 이상의 독소를 생산한다는 보고[20)]와 일치하는 결과이며 어린이 손에서 분리된 *B. cereus* 설사독소 실험결과 HBL 설사독소는 50.0%, NHE 설사독소는 43.8% 검출되었다는 보고[13)]와 유사한 결과로서 어린이집 유아들이 사용하는 칫솔과 양치 컵에 오염된 *B. cereus*에 의한 식중독 위험성이 상존하는 것으로 판단되었다. 따라서 면역력이 취약한 어린이집 유아가 사용하는 칫솔 및 양치 컵을 건조한 후 자외선 살균고 등을 이용 살균하여 상대습도가 낮은 건조한 곳에 보관하여야 할 것으로 판단되었다.

식중독 미생물의 항생제 감수성

*B. cereus*와 *S. aureus*의 항생제 감수성 실험결과는 Table 4에 나타내었다. *B. cereus*의 경우 gentamycin, ciprofloxacin, imipenem, trimethoprim/ sulfamethoxazole, chloramphenicol, tetracycline, vancomycin에 감수성을 나타내었으며, ampicillin, cefepime, oxacillin, penicillin, rifampin 등 β-lactam계 항생제에 내성을 나타내어 *B. cereus*가 β-lactam계 항생제에 내성을 나타낸다는 보고[28]와 일치하는 실험결과를 나타내었다. *S. aureus*의 항생제 내성 실험결과 ampicillin과 penicillin에만 내성을 나타내었고 실험에 사용된 항생제에는 모두 감수성을 나타내었다. 이러한 결과는 병원과 환경에서 분리된 *S. aureus*의 93.6%가 항생제 다제내성을 나타낸다는 보고[29]에 비해 매우 낮은 항생제 내성결과이며 2002년 미국에서 최초 분리된[30] 후 감염환자가 세계적으로 발생하고 있는 vancomycin 내성 *S. aureus*는 검출되지 않아 어린이집 유아 사용 양치 컵에서 분리된 *S. aureus*는 vancomycin에 대해서는 안전한 것으로 판단되었다.

국문요약

어린이집 유아들이 사용하는 칫솔 및 양치 컵의 미생물 오염도와 분리된 식중독 미생물의 독소 유전자 및 독소 생산능력을 분석하여 칫솔과 양치 컵에 의해 발생할 수 있는 식중독을 예방하고자 칫솔 75개, 칫솔걸이 29개, 양치 컵 65개를 실험하였다. 일반세균수는 평균 5.3 log CFU 검출되었고 칫솔은 평균 6.7 log CFU 검출되어 가장 높은 오염도를 나타내었다. 대장균군은 칫솔 75건 중 41건 (54.7%), 칫솔걸이 29건 중 13건 (44.8%), 양치 컵 65건 중 29건 (44.6%)에서 검출되었으며 진균수는 평균 3.2 log CFU 검출되었고 칫솔이 평균 4.6 log CFU 검출되어 칫솔의 대장균군, 진균 오염도가 가장 높게 나타났다. *Salmonella* spp.는 모든 시료에서 검출되지 않았으나 *B. cereus*는 칫솔 75건 중 1건 (1.3%), 양치 컵 65건 중 2건 (3.1%)에서 검출되었고 *S. aureus*는 양치 컵 65건 중 1건 (1.5%)에서 검출되었다. 칫솔에서 분리된 *B. cereus*의 경우 *nheA*, *nheB*, *nheC*, *hblC, hblD, hblA, entFM* 등 7종의 설사독소 유전자가 검출되었고 양치 컵에서 분리된 *B. cereus* 2균주는 *nheA*, *nheB*, *nheC*, *entFM* 설사독소 유전자만 검출되었다. 칫솔에서 분리된 *B. cereus*의 경우 HBL, NHE 설사독소를 생산하였고 양치 컵에서 분리된 *B. cereus* 2균주는 모두 NHE 설사독소만을 생산하였다. *B. cereus*는 β-lactam계 항생제에 내성을 나타내었고 *S. aureus*는 ampicillin과 penicillin에만 내성을 나타내었다. 이러한 결과는 대부분의 칫솔과 양치 컵이 양치 후 젖은 상태로 화장실에 보관되거나 젖은 상태로 자외선 살균고에서 살균되는 등 부적절한 보관가 살균방법이 주요 원인으로 분석되었다. 따라서 면역력이 취약한 어린이집 유아가 사용하는 칫솔 및 양치 컵을 건조한 후 자외선 살균고 등을 이용 살균하여 상대습도가 낮은 건조한 곳에 보관하여야 할 것으로 판단되었다.

References

1. Kim J.B., Park Y.B., Kim K.C., Kim D.H., Kang S.H., Lim Y.S., Park P.H., Yoon M.H., Lee J.B.: Evaluation and reduction of microbiological hazards of spoon and spoon case carried by nursery school children. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **40**, 116-122 (2011).
2. Lee Y.M.: The different view point of child education center food service program between the parents and the teachers. *Korean J. Comm. Nutr.*, **10**, 654-667 (2005).
3. Central Childcare Information Center: Statistics on Child Care Service. Available at: http://central.childcare.go.kr. Retrieved date: 2015 June 31.
4. Jang M.L., Kim Y.B.: A study of the actual conditions of kindergarten meals program. *J. Korean Soc. Early Childhood Education*, **23**, 261-284 (2003).
5. Kang H.K., Kim K.K.: Periodontology. 3rd ed. Komoonsa, Seoul, Korea, pp. 101-104 (2007).
6. Jeong Y.K., Seong Y.R., Cho K.S., Seong H.K. Kim J.B.: Bacteriological contamination of home toothbrushes and hygiene improvement. *J. Korean Acad. Dent. Health*, **16**, 15-17 (1992).
7. Kozai K., Iwai T., Miura K.: Residual contamination of toothbrushes by microorganisms. *ASDC J. Dent. Child*, **56**, 201-204 (1989).
8. Harris N.O., Garcia-Godoy F.: Primary preventive dentisty. 5th ed. Appleton and Lange, Stanford, pp. 7-15 (1999).
9. An S.H., Seong J.H., Kim D.K.: The measurement of toothbrush contamination. *J. Korean Acad. Dent. Health*, **20**, 121-135 (1996).
10. Karibasappa G.N., Nagesh L., Sujatha B.K.: Assessment of microbial contamination of toothbrush head: an in vitro study. *Indian J. Dent. Res.*, **22**, 2-5 (2011).
11. Lee M.O.,: Bacteriological contamination of toothbrushes by dental plaque acidogenicity and related behaviors to toothbrush use. *J Korean Acad. Dent. Hygie. Edu.*, **4**, 255-263 (2004).
12. Ministration of Food and Drug Safety. Food Code of Korea. Available at: http://fse.foodnara.go.kr/residue/RS/jsp/menu_02_01_01.jsp. Retrieved date: 2015 August 11.
13. Kim J.B., Hur E.S., Kang S.H., Kim D.H., Do Y.S., Park P.H., Park Y.B., Yoon M.H., Lee J.B.: Prevalence of microbiological hazard on nursery school children's hands and effect of hand washing education. *J. Fd. Hyg. safety*, **27**, 30-36 (2012).
14. Kim J.B., Kim J.M., Park Y.B., Han J.A., Lee S.H., Kwak H.S., Hwang I.G., Yoon M.H., Lee J.B., Oh D.H.: Evaluation of Various PCR Assays for Detection of Emetic-Toxin-Producing *Bacillus cereus*. *J. Microbiol. Biotechnol*. **20**, 1107-1113 (2010).
15. Kim J.B., Kim J.M., Kim C.H., Seo K.S., Park Y.B., Choi

N.J., Oh D.H.: Emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean isolates contain genes encoding diarrheal-related enterotoxins. *Int. J. Food. Microbiol*., **144**, 182-186 (2010).
16. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institutes. Wayne, Pennsylvania, CLSI document M100-S23 (2013).
17. Caudry S.D., Klitorinos A.: Contaminated toothbrushes and their disinfection. *J. Can. Dent. Assoc.*, **61**, 511-516 (1995).
18. Leahy-Glimartin A.A., Verran J.: Investication into the microbial contamination of toothbrushes. *Microbios*, **85**, 231-238 (1996).
19. Harrigan W.F., McCance M.E.: The examination of food processing plant. In Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology. Academic Press, London, UK. pp. 231-236 (1976).
20. Kim J.B., Kim N.Y., Kang S.H., Do Y.S., Eom M.N., Yoon M.H., Lee J.B.: Prevalence and toxin characteristics of microorganism on hand towels using for chilfren in child care center. *J. Fd. Hyg. safety*, **28**, 128-145 (2013).
21. Kim N.Y., Kim Y.R., Kim M.K., Cho D.W., Kim J.S.: Isolation and characterization of airborne bacteria and fungi in indoor environment of elementary school. *Korean J. Microb*., **43**, 193-200 (2007).
22. Chung J.K., Kim M.J., Kee Y.H., Choi M.H., Seo J.J., Kim S.H., Park J.T., Kim M.G., Kim E.S.: Prevalence of food poisoning bacteria on hands in various age groups. *J. Fd. Hyg. safety*, **23**, 40-50 (2008).
23. Jo S.H., Kim C.I., Ha S.D.: Outbreak pattern forecasting of food-borne disease in group food services in Korea. *J. Fd. Hyg. Safety*, **24**, 19-26 (2009).
24. Kim J.B., Jeong H.R., Park Y.B., Kim J.M., Oh D.H.: Food poisoning associated with emetic-type of *Bacillus cereus* in Korea. *Foodborne Pathog. Dis*., **7**, 555-563 (2010).
25. Kim J.B., Kim J.M., Cho S.H., Oh H.S., Choi N.J., Oh D.H.: Toxin genes profiles and toxin production ability of *Bacillus cereus* isolated from clinical and food samples. *J. Food Sci.*, **76**, T25-29 (2011).
26. Schoeni J.L., Wong A.C.L.: Heterogeneity observed in the components of haemolysin BL, an enterotoxin produced by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol*., **53**, 159-167 (1999).
27. Kim J.B., Park J.S., Kim M.S., Hong S.C., Park J.H., Oh D.H.: Genetic diversity of emetic toxin producing *Bacillus cereus* Korean strains. *Int. J. Food Microbiol.*, **150**, 66-72 (2011).
28. Weber T, Marahiel M.A.: Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure*, **9**, R3-R9 (2001).
29. Dinges M.M., Orwin P.M., Schli evert P.M.: Exotoxins of S*taphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. rev.*, **13**, 16-34 (2000).
30. Woodford N., Waner M., Aucken H.M.: Vamcomycin resistance among epidemic strains of methicillinresistance *Staphylococcus aureus* in England and wales. *J Antimicrob. chemother.*, **45**, 258-259 (2000).