J. Fd Hyg. Safety 18(2), 79–86 (2003)

초등학교 급식 환경에서의 메치실린 내성 황색포도상구균(MRSA)과 *seb* gene의 검색

하광수* · 박선자** · 심원보*** · 정덕화†
*식품의약품안전청, **상대학교 농업생명과학원, ***경상대학교 농과대학 식품공학과

Screening of MRSA (Methicilline Resistant *Staphylococcus Aureus*) and *seb* Gene in Producing Strains Isolated from Food Service Environment of Elementary Schools

Kwang Soo Ha*, Seon Ja Park, Won-Bo Shim***, and Duck-Hwa Chung†**
*Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea
**Institute of agriculture & life sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea
***Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Gyeongnam 660-701, Korea

ABSTRACT – Most of food poisoning is frequently raised from mass catering. Especially, *staphylococcci* takes the large part of pathogenic agents which are related to the hygienic condition. Among total 98 samples, four *staphylococci* were isolated from food service environment such as drinking water (A), hands (D), refrigerator and apron (E) of 5 elementary school (A, B, C, D, E) in Gyeongnam Province. These isolated strains are characterized as 1 MRCNS (Methicilline Resistant Coagulase Negative *Staphylococcus aureus*) and 3 MSCPS (Methicilline Sensitive Coagulase positive *Staphylococcus aureus*). Also, production of enterotoxin B (*seb* gene) were examined by PCR which has known as a big problem because of their temperature resistance. Hence, PCR was performed on isolated 4 *staphylococci*. The all 4 isolated *Staphylococcus aureus* have 477 bp of *seb* gene. Antibiotics susceptibility test was completed on PCR detected strains. All strains were fully resistance to ampicillin and penicillin. The drinking water of A place has resistance to oxacilline, therefore this strain turned out to be MRSA (Methicilline Resistant *Staphylococcus Aureus*).

Key words: MRSA, *seb*, PCR, school food service

초등학교에서의 학교 급식 전면 확대에 따라 '98년부터 거의 모든 초등학교에서 급식이 실시되어 99.2%의 실시율을 보이고 있으며, 중학교 급식 실시율은 현재 30% 수준에 머물고 있으나 이 또한 2002년까지 연차적으로 확대 실시될 예정이다.[1)]

이와 같이 학교급식이 확대되면서 정부는 급식의 예산을 절감하고 재정 자원을 효율적으로 활용하기 위한 목적으로 최소한의 투자로 급식 여건 조성을 하게 되었고, 1992년부터는 일본, 미국 등에서 널리 활용되고 있는 공동 조리 방식의 급식제도(Commissary foodservice system)를 도입하였으며, 1996년부터는 중·고등학교 급식을 보다 빠른 시일 안에 확대하기 위해 학교 내에서 조리하는 것을 원칙으로 하던 기존의 방침을 바꾸어 학교 급식 공급 업자에 의한 외부 급식도 실시 할 수 있도록 학교 급식법을 개정하였다.[1-2)] 그러나 정부가 학교급식을 확대 실시하면서 외양적인 실적에만 치우친 나머지 위생관리에 소홀하거나 식품위생 제도상의 허점을 보완하지 않은 등[2)] 여러 가지 이유로 학교급식에서의 잦은 집단 식중독 사고를 초래하였다.

이러한 이유로, 학교 급식에서의 식중독 발생률은 1996년에 22.2%, 1998년에 30.3%, 1999년에 44.3%, 2000년도에 66%로 계속적으로 증가하고 있는 추세이다.[3)] 학교급식으로 인한 식중독 발생을 병인 물질 중심으로 살펴보면, 1998년도 9건 중 *Staphylococcus* 5건, *Salmonella* 3건, 장염 *Vibrio* 2건, 1999년도 8건 중에서 *Staphylococcus* 3건, *Salmonella* 3건, *E. coli* 및 *Pseudomonas* 1건 등으로 나타난 것으로 보고되어,[4-5)] *Staphylococcus*는 식중독을 야기 시키는 중요한 병원체중의 하나로 알려져 있다.[6-8)] 우리 나라에서의 *Staphylococcus*에 의한 식중독은 *Salmonella*, 장염 *Vibrio* 다음으로 많은 발생 빈도를 나타내고 있다.[9)] 황색포도상구균에 의한 식중독은 균이 증식하는 동안 생산된

†Author to whom correspondence should be addressed.

enterotoxin에 의해 일어나는 것임이 이미 많은 연구를 통하여 입증되었으며, 1 μg 이하의 독소로도 인체에서 식중독이 발생할 수 있다. 이 균이 증식할 때 생산된 내독소(enterotoxin)들은 항원특이성에 따라 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J의 10종으로 구분되며 특히, *enterotoxin* B가 강한 내열성을 가진 것으로 알려져 있다.[10-11)]

본 연구에서는 최근 집단적 환경에서 점차 증가되고 있는 메치실린 저항성 포도상구균(MRSA; Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*)[12)]과 반코마이신 저항성 포도상구균(VRSE; Vancomycin Resistant *Staphylococcus Aureus*), 반코마이신 저항성 장내구균(VRE; Vancomycin-Resistant Enterococci)[13)]같은 종류의 항생제 내성균주를 조사 분석하여 이를 방어하기 위한 식품위생학적 기초를 마련하기위한 연구의 일환으로 서부 경남 지역 초등학교 급식 환경의 식수, 상수도(원수), 조리도구, 배식기구, 주변기기, 조리 종사자 및 조리된 식품에 대한 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)검색을 실시하였다. 아울러 식품에 존재하는 병원균을 신속하게 검색하기 위해 PCR법으로 enterotoxin B 생성균(*seb* gene)을 검출하였으며, 항생제 내성균주 중에서 특히 메치실린 저항성 황색포도상구균(MRSA)의 급식환경내 존재 여부를 조사하여 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

조사대상 선정 및 시료채취

2000. 11. 14부터 2000. 12. 22까지 서부경남지역의 학교 급식소 5곳(A, B, C, D, E)을 선정하여 식수와 상수도(원수), 조리도구 및 배식기구, 주변기구, 조리종사자, 조리된 식품을 대상으로 *S. aureus*에 대한 검색을 하였다. 선정된 급식소의 설비 수준, 배식수 및 특성을 고려하여 1일 급식 인원수가 100명 이하, 500명 이하, 1,000명 이하, 1,300명 이하 그리고 1,500명 이하인 학교등 모두 5개 급식소였다. 조리 종사자는 급식소에서 종사하고 있는 조리 종사자를 대상으로 하였으며 조리된 식품은 당일 급식소로 납품된 재료를 사용하여 조리된 식품을 사용하였다. 시료채취를 위하여, 식수는 학생들에게 공급되는 물을 담고 있는 물통에서 1 L를 채수병에 채취하였으며 상수도는 상수 원수를 채수병에 1 L 채취하여 측정하였다. 조리도구 및 배식기구, 주변기구는 사용 후 세척한 것이나 소독한 것에 대해 측정하였으며, 검체의 형태에 따라 일정 면적을 멸균 면봉으로 채취(swab)하였다. 즉, 도마, 대야, 냉장고, 소쿠리, 소독기 등은 멸균된 핀셋으로 멸균 생리식염수에 적셔진 멸균된 가아제(5 cm × 5 cm)를 사용하여 면적 5곳 약 100 cm^2 면적을 채취하였으며 칼, 수저, 컵, 조리 종사자의 손 등은 채취 가능한 전 면적을 멸균 면봉으로 채취(swab)한 후 미리 준비된 증균 배지인 10% TSB broth 넣은 후 즉시 얼음을 채운 ice box에 담아 실험실로 옮겨 사용하였다. 단, 행주는 1일 사용 후 세제로 세척 건조된 일정 면적(100 cm^2)을 취하여 바로 전처리 하여 실험원액으로 사용하였다. 조리 종사자에 대해서는 작업전 또는 작업중일 경우에는 물로 씻은 후 멸균 면봉으로 채취 하였다. 조리된 식품은 고압증기 멸균된 병에 일정량을 담아 얼음을 채운 ice box에 담고 실험실로 냉장 운반한 후 사용하였다. 시료 채취는 서부경남지역 급식소 5곳에서 총 98개의 시료를 채취하여 미생물 시험법[14)]에 준하여 분석하였다. 본 실험에 사용된 시료는 Table 1과 같다.

Table 1. The kinds and number of samples collected from five food service of elementary schools

Source	Type of Samples	Number of samples
Water	Waterworks	5
	Drinking Water	5
Kitchen utensils	Kitchen knife	5
	Cutting board	5
	Dining nipper	4
	Washbowl	5
	Wicker basket	5
	Dining tray	5
	Spoon & chopsticks	5
	Cup	5
Cookers	Hands	5
	Rubber gloves	5
	Apron	5
Cooked food	Wheat noodles	1
	Kimchi	5
	Pizza	1
	Seasoned rice cake	1
	Panfried food	1
	Small red-bean porridge	2
	Hot dog	1
	Chopped roast chicken	1
	Seasoned bean sprouts	1
Surroundings	Dishcloth	5
	Arrangement table	5
	Disinfector	5
	Refrigerator	5
Total		98

시료의 전처리

S. aureus 분리를 위한 모든 시료는 무균실에서 무균적으로 전처리 하는 것을 원칙으로 하였으며, 식수와 상수도(원

수)는 멸균된 감압 여과 장치를 이용하여 시료 250 mL를 여과지(Advantec MFS, Inc. 0.45 μm)를 사용하여 막 여과하여 증균배지에 접종하였다. 조리도구 및 배식기구 등의 시료는 채취 및 swab하여 넣은 각각의 증균배지를 37°C에서 24시간 진탕하여 증균하였으며 조리된 음식 시료는 멸균된 시약 스푼이나 가위를 이용하여 식품 시료 25 g에 225 mL 증류수와 각각의 선택배지를 첨가한 후 증균 과정을 거쳐 실험에 사용하였다.

*Staphylococcus aureus*의 분리

증균 및 분리배양 – *S. aureus* 균주의 분리를 위해 채취된 시료중 1 mL를 취하여 10% NaCl이 첨가된 TSB 배지 9 mL에 가한 후 37°C에서 24시간 증균 배양하였다. 증균된 균액을 Mannitol salt agar에 획선 배양하여 37°C에서 24시간 배양한 후 황색불투명 집락을 나타내고 주변에 혼탁한 백색환이 있는 집락에 대해 확인 실험을 실시하였다.

확인실험 – Jean(2000)[15]의 방법을 적용하여, 분리 배양된 평판 배지상의 집락을 그람 염색을 실시하였으며, 포도상의 배열을 갖는 그람양성 구균을 확인하였다. *Streptococcus*와의 구분을 위해 catalase test로 양성임을 확인하였고, DNA 분해효소인 DNase를 생성하는지 여부를 실험하였으며, 토끼혈청(BBL™, coagulase plasma) 500 μL에 배양된 균액 50 μL를 접종하여 37°C에서 배양하면서 4시간 동안 30분마다, 그리고 24시간까지 응고 유무를 판정하여 응고 또는 섬유소가 석출된 것은 모두 coagulase 양성 균주로 판정하였다.

*Staphylococcus aureus*에 대한 항생제 내성실험

항생제 내성 실험을 위한 디스크는 BBL사 제품으로 Ampicillin(AN: 10 μg), Amikacin(Am: 30 μg) Bacitracin (B: 10 U), Cefazolin(Cz: 30 μg), Cefuroxime(CXM: 30 μg), Cephalothin(CF: 30 μg), Clindamycin(CC: 2 μg), doxycycline (D: 30 μg), Erythromycin(E: 15 μg), Gentamycin(GM: 120 μg), Kanamycin(K: 30 μg), Neomycin(N: 30 μg), Norfloxacin (NOR: 10 μg), Novobiocin(NB: 30 μg), Penicillin(P: 10 U), Rifampin(RA: 5 μg), Streptomycin(S: 300 μg), Tetracycline (Te: 30 μg) Sulfamethoxazole(SXT: 1.25 μg, 23.75 μg), Vancomycin(Va: 30 μg) 등 24종의 항생제를 사용하였으며 감수성은 National Committee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS)[16]의 기준에 의하여 판정하였다.

항생제 내성 실험은 Bauer[17] 등의 disc diffusion method에 의하여 실험하였다. 접종 균액은 Muller Hinton broth에서 24시간 배양한 균을 멸균 생리식염수로 희석하여 Mac-Farland scale No 0.5 $BaSO_4$ 표준비색관(1.175% $BaCl_2$ 0.5 ml+0.36 N H_2SO_4 99.5 ml: 10^8 CFU/mL에 맞추었다. 평판배지는 Muller Hinton broth를 121°C에서 15분간 멸균한 후 45~50°C로 식히고 직경 90 cm의 페트리 디쉬에 20 mL씩 분주하였다.

접종 균액을 배지 전체에 골고루 도말한 다음 배양기 내에서 10분간 정치시켜 습기를 제거하였다. 항균제 디스크를 20 mm 간격으로 배지 표면에 부착시킨 후 37°C에서 20시간 배양하였으며 NCCLS의 기준에 따라 감수성 여부를 판단하였다.

PCR을 이용한 *Staphylococcus aureus* enterotoxin B 생성 균주의 검색

표준 균주 – 본 실험에 사용된 표준 균주는 enterotoxin *B*를 생성하는 *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 표준 균주를 식품의약품 안전청으로 부터 분양 받아 사용하였다.

Genomic DNA 추출 – 수질, 조리도구 및 주변환경, 식품에서 분리한 *Staphylococcus*속 균들은 10% TSB broth에서 증균 후, Mannitol salt agar에서 자란 colony를 BHI (Brain Heart Infusion)broth에 접종하여 35°C, overnight 배양한 후, genomic DNA 추출을 위해 사용하였다. DNA 정제는 Nowak *et al.*(1995)[17] 등의 방법을 응용하였다. 증균 배양액 1 mL을 13,000 rpm으로 원심 분리한 후 배양액으로부터 얻은 pellet은 190 μl의 2% Triton X-100(in 2 M NaCl solution)에 현탁시켰다. 그리고 capping후 95°C water bath에서 15분 동안 끓인 후, 세포 부유액에 25 μL/mL 농도의 lysostaphin(final conc.)을 10 μL 넣고 35°C에서 30분 반응하였다. 1 μL의 proteinase K(Sigma 20 μL/mL)를 각각의 세포부유액에 첨가하고 37°C water bath에서 15분간 반응한 후, 100 μL의 phenol과 동량의 chloroform : isoamyl-alcohol (24 : 1)을 첨가하여 시료와 혼합하였고, 4°C, 13,000 rpm에서 25분간 원심분리 하였다. 상층액은 새로운 tube에 옮기고, 이 조작을 한번 더 반복하여 단백질이 제거되고 DNA가 함유된 수용액 층을 얻었다. 전체 부피의 10% 량의 7.5 M ammonium acetate(10% 20 μL)와 60% 부피의 isopropanol(60% 120 μL)을 첨가하여 DNA를 침전시켰으며 4°C, 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 DNA pellet을 얻었다. 원심분리 후 회수된 DNA를 500 μL의 70% cold ethanol로 세척하고 20분간 공기 중에 건조시켰다. 이렇게 얻은 DNA pellet은 30 μL의 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해하여 PCR 분석을 위한 template DNA로 사용하였으며, Oligonucleotide primer는 Becker *et al.*(1998)[18]에 의해 고안된 primer를 사용하였다.

PCR 분석 – DNA의 효소적 증폭은 Steven *et al.*(1997)[19]의 방법을 다소 변형하여 사용하였으며, PCR tube(LABCON, North America)와 GENE cycler™(BIO-RAD)을 이용하였

Table 2. The primers sequences and locations in enterotoxin B producing stains (*seb*) of *S. aureus*

Primer	Oligonucleotide (5' to 3')	locations	Size of Product (bp)
seb -1	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	634-653	447
seb -2	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC	1088-1110	

다. Template는 시료로부터 분리된 genomic DNA 2 μL(Ca. 1 pM)와 20 mM Tris-HCL, 100 mM KCI, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% tween 20, 0.5% Nonidet p-40, 50% glycerol을 함유한 PCR 반응 완충 용액으로 구성된다. PCR 반응 용액은 1.5 mM $MgCl_2$, 200 μM deoxynucleotide triphosphate(Takara, Co), 0.5 μM primers 그리고 AmpliTaq DNA polymerase(Takara) 2.5 units을 첨가하고 3차 멸균 증류수를 사용하여 최종 반응용액을 50 μL로 조절후, 50 μL의 mineral oil을 중층하였다. *S. aureus* entertoxin B 생성균주를 동정하기 위한 primer의 염기서열은 Table 2와 같다.

PCR thermal cycler의 반응 조건은 95°C에서 5분간 predenaturation을 실시한 후, 94°C에서 1분간 denaturation, 55°C에서 1 동안 primer annealing, 72°C에서 2분간 extension의 조건으로 35 cycles을 수행하고, final extension을 72°C에서 5분간 실시하였다. PCR에 의한 증폭생성물은 1.2% agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다.

결과 및 고찰

수질에서의 *Staphylococcus aureus*의 검색

수질에서의 *Staphylococcus aureus*(*S. aureus*)의 검색을 위하여 5개 장소의 식수 및 상수원수에 대한 조사 결과 A 장소의 식수에서 *S. aureus*가 검출되었다(Table 3). 여기서 검출된 *S. aureus*는 혈장응고효소(coagulase) 음성(CNS: coagulase negative *Staphylococcus aureus*)균주인 것으로 확인되었다. 실제로 혈장응고 효소를 생성하는(CPS: coagulase positive *Staphylococcus aureus*) 균주가 사람에게서 감염을 자주 일으킨다고 보고되고 있으나 최근에는 CNS 균주 중에서도 몇몇 종류는 기회 감염을 일으키는 병원균으로 알려져 있다.[20] 또한 최근 보고[21]에서 *S. aureus* 뿐만 아니라 *S. aureus* 종에 속하는 다른 여러 균주들이 오염된 식품과 연관된 것으로 추정되는 감염들을 일으키고 있는데, 특히 이들 중 CNS *Staphylococcus intermedius*는 동물을 매개로 하여 상처감염이 있거나 면역기능이 저하된 인체에 침범하여 치명적 감염을 유도한다고 보고하였으며, 이들은 내독소 생성에 대한 잠재적 가능성을 항상 가지고 있으며 오염된 식품 등을 통하여 SFP(Staphylococcal Food Poisoning)의 중요한 원인 내독소로 작용할 수 있는 것으로 추정하였다.

Table 3. Detection of *staphylococcus aureus* in water

Samples	drinking water					waterworks				
Places	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
Gram staining	+	+	+	+	+	*	*	*	*	*
Catalase	+	–	–	–	–	*	*	*	*	*
DNase	+	–	–	–	–	*	*	*	*	*
Coagulase	–	–	–	–	–	*	*	*	*	*

*; no evidence of *staphylococcus aureus*, +; positive reaction, –; negative reaction.

조리도구 및 주변기구 에서의 *Staphylococcus aureus*의 검색

*S. aureus*를 조리도구 및 주변 기구에서 검색한 결과 E 급식소 냉장고에서가 *S. aureus*가 검출되어 저온 보관이 필요하거나, 장기 보관을 요할 때 비교적 오랫동안 식품이나 식품재료를 방치할 경우 이와 같은 감염을 예측할 수 있다. 특히 냉장고의 경우 단체 급식 환경에서 매일 청소하는 공간이지만, 음식물의 반입 반출로 인해 온도 변화가 생기므로 철저한 냉장고 온도 관리와 올바른 세척과 소독이 필요할 것

Table 4. Detection of *staphylococcus aureus* in surroundings

Samples	dishcloth					arrange table					disinfector					refrigerator				
Places	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
G. staining	+	*	*	*	+	*	*	*	*	*	*	*	_	*	*	*	*	*	*	+
Catalase	–	*	*	*	+	*	*	*	*	*	*	*	_	*	*	*	*	*	*	+
DNase	–	*	*	*	–	*	*	*	*	*	*	*	_	*	*	*	*	*	*	+
Coagulase	–	*	*	*	–	*	*	*	*	*	*	*	_	*	*	*	*	*	*	+

*; no evidence of *staphylococcus aureus*, +; positive reaction, –; negative reaction.

으로 보인다. 식품에 존재하는 미생물 중 저온성 세균(phychrotrophic bacteria)의 존재는 식품의 냉장 저장시 식품 부패와 식중독균의 성장에 관련되기 때문에 중요하다.[22] E 장소의 냉장고에서 분리된 균주는 Table 4에서 보는 바와 같이혈장 응고 효소 양성 황색포도상구균(Coagulase Positive *Staphylococcus aureus*; CPS)으로 확인되었다.

특히 모든 *S. aureus* 균주에서 생성되는 혈장응고 효소(coagulase)는 식중독 원인이 되어 사람에게서 감염을 일으키는 주요 원인균에 속한다.[23] 그러므로 본 연구에서 검출된 *S. aureus*는 A 장소의 식수에서는 CNS(coagulase negative *staphylococcus aureus*) 균주였으며, D 장소의 손, E 장소의 냉장고와 고무장갑에서는 coagulase 양성(CPS; coagulase positive *staphylococcus aureus*)균주가 검출되었다. 즉, 본 연구에서는 75%가 CPS 였으며, 25%가 CNS 균주로 나타났다. 1991, IAN[24]는 건강한 양에서 분리한 *staphylococcus* 중 내독소 균주이면서 74%는 coagulase 양성(CPS; coagulase positive *staphylococculs*)이고 22%는 coagulase 음성이었다고 발표한 바 있듯이, 이는 *staphylococcus*에 오염된 식품 중에는 CPS와 CNS가 공존하거나 따로 존재할 수도 있음을 시사한다. 실제로 CPS가 식품 오염으로 인한 주요 특성에 속하지만 CNS 또한 면역력이 약해진 인체 등에서 주요한 기회 감염균으로 작용하는 것으로 알려져 있다.[25]

조리종사자에서의 *Staphylococcus aureus*의 검색

조리에 참여하는 종사자들의 위생상태 및 *S. aureus* 오염 정도를 확인하기 위한 실험에서 D 장소 조리 종사자의 손과 E 장소의 고무장갑에서 혈장 응고 효소 양성 황색포도상구균(Coagulase Positive *Staphylococcus aureus*; CPS)이 확인되었다(Table 5). 한편, Wei(2000) 등[26]은 2000년 5월 6일 고등학교에서 아침 급식 후 발생한 집단 식중독에서 *sea, seb* 등 10개의 균주를 분리하였으며 특히, 이들 중 조리종사자(food handler)의 손에서 2개의 뚜렷한 유전형을 갖는 *S. aureus*가 검출되었고, 이러한 조사로 미루어 *S. aureus*는 음식물 자체와 주위 환경 뿐만 아니라 조리종사자의 개인 위생이 차지하는 비율이 크다는 것을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서 앞치마의 포도상구균 오염은 조리 종사자의 손이나 다른 여러곳으로의 전파경로를 가질 수 있음을 시사한다.

그러나 상수원, 주방 기구, 조리된 음식에서는 *S. aureus*가 전혀 검출되지 않았다. Levin(1996)[26]의 보고에 의하면, 1989년 2월에서 4월까지 미국에서 4건의 *S. aureus*로 인한 식중독이 발생하였으며, 이것은 캔 속에 있는 식용버섯(eating mushrooms canned)을 먹은 사람에게서 모두 발생하였고, 그 외 조리되지 않은 돼지고기, 염장된 육류, 훈제된 햄 등에서도 62.2%의 *Staphylococcus*가 검출되었으며 이들 중 51.1%가 병원성을 가진 *S. aureus*으로 확인되었다[28] (Atanassova, 2001). 따라서 본 연구에서 조사대상이 되었던 조리된 음식뿐만 아니라 조사 영역을 좀 더 확대시켜서 식품의 재료에서부터 철저한 위생관리가 이루어지는지 여부를 평가하는 것도 더 나은 식품위생 관리에 도움이 되리라 생각된다.

항생제 민감성 실험

항생제 내성은 집단 식중독이 발생되었을 때 초기 치료에 결정적 영향을 주게 되므로 분리균주에 대한 항생제 내성 조사가 반드시 필요하다. 그러므로 각 시료에서 분리된 병원성 미생물에 대한 항생제 민감성 실험을 수행하였으며, Table 6과 같은 결과가 나타났다. *S. aureus*가 검출된 A 급식소의 식수, D급식소의 손, E 급식소의 앞치마, 냉장고의 경우는 모두 항생제 Ampicillin과 Penicillin에서 내성을 보였다. 특히, A 급식소의 식수는 Oxacillin에 내성을 가지는 MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) 균주인 것으로 나타났다. 또한 vancomycin에 대한 항생제 민감성 실험에서, 분리된 4개의 *Staphylococcus aureus* 균주 모두 민감성(sensitive)으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 분리된 *S. aureus* 중에서 반코마이신 저항성 황색포도상구균(VRSA; Vancomycin Resistant *Staphylococcus Aureus*)은 없는 것으로 나타났다.

최근 항생제 저항성 균에 대한 논란이 증가되면서 MRSA에 대한 관심이 더욱 커지고 있다. MRSA는 *mec* A 유전

Table 5. Detection of *staphylococcus aureus* in cook employees

Samples	hands					rubber gloves					apron				
places	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
G. staining	*	*	*	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	+
Catalase	*	*	*	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	+
DNase	*	*	*	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	+
Coagulase	*	*	*	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	+

*; no evidence of *staphylococcus aureus*, +; positive reaction.

Table 6. Antimicrobial agent susceptibility test for *Staphylococcus aureus*

Samples	places	AN	AM	B	CZ	FOX	CXM	CF	CC	CL	D	E	GM	K	NA	N	NOR	OX	P	RA	S	TE	SXT	VA
drinking water	A	S	R	I	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S
hands	D	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	I	S
apron	E	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	I	S
refrigerator	E	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	I	S

Adapted in part from NCCLS document M100-S7 (M2-A6), included with Approved Standard M2-A6, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test, 6th ed., with permission.

Abbreviations; R: Resistant, I: Intermediate, S: Susceptible

AN: Amikacin AM: Ampicillin B: Bacitracin CZ: Cefazolin FOX: Cefoxitin CXM: Cefuroxime CF: Cephalothin CC: Clindamycin CL: Colistin D: Doxycycline E: Erythromycin GM: Gentamycin K: Kanamycin NA: Nalidixic acid N: Neomycin NOR: Norfloxacin OX: Oxacillin P: Penicillin RA: Rifampin S: Streptomycin TE: Tetracycline SXT: Sulfamethoxazole VA: Vancomycin

자를 암호화하는 PBP-2'(Penicillin-Binding Protein-2')에 의해 유발되는 것으로, CNS에 존재하는 mec A는 *S. aureus*로 수평 이동된다고 보고되고 있다.[29] 본 연구의 식수(A 장소)에서 분리된 *S. aureus*도 MR(methicillin resistant)이었으며, 또한 이것은 혈장 응고 효소 음성 황색포도상구균(Coagulase Negative *Staphylococcus aureus*; CNS)인 것으로 확인되었다. Atsushi(1994)[30]의 조사에 의하면 1992. 1월 *Staphylococcus* 종들 중에서 *S. aureus*의 분리율이 22%였으며, 분리된 *S. aureus* 중 43%가 MRSA 균주로 나타났다. 이러한 결과는 1년 후 동일한 조사에서 각각 10.6%, 41.4%로 *S. aureus*의 분리율에 비하여 MRSA의 분리율이 점차 높아지는 것으로 나타났다. 실제로 고도의 사망률을 나타내는 패혈증(septicaemia)에 있어서 초기 항생제 치료가 매우 중요하므로 이러한 패혈증을 유발하는 원인균(pathogens)에 관한 연구에서 betalactam계와 MRSA에 대한 저항성이 점차 증가하고 있으며, 분리된 *S. aureus* 중 15%가 oxacillin에 대한 저항성을 갖는 것으로 보고하였다.[31] 또한 최근 집단 소아인구군(community-pediatric population)을 대상으로 한 연구[12]에서 병원 소아과를 방문한 500명의 어린이로부터 MRSA 균의 초기 저장고 역할을 하는 전비강(anterior nares)에서 비강 분비물을 통한 MRSA에 대한 조사를 하였을때 4명의 어린이에게서 oxacillin 저항성 균주가 검출되었으며, 항생제 저항성이 경계선(boardline-resistant isolates)에 있는 균주가 두개인 것으로 나타났다. 이들 중 한 개의 경계선 분리주와 완전한 MRSA 분리주 중의 한개가 PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) 분석에서 매우 밀접한 연관성을 가진 것으로 나타났으며, MRSA가 검출된 어린이들은 특히 병원내 직장을 가진 가족과의 접촉에 의한 검출률이 유의하게 높았다고 보고하였다. 이러한 여러 가지 노출된 문제들로 보아 병원내 환경에서는 항생제 내성 균주가 이미 만연되어 있으며, 뿐만아니라 식품환경이나 일반 주거환경에서도 항생제의 잦은 노출로 인하여 이와 같은 항생제 내성을 갖는 균주가 점차 증가 추세에 있어 이 분야에 대한 체계적, 지속적 연구가 요청되고 있다.

PCR에 의한 *Staphylococcus aureus* enterotoxin B_1 (*seb* gene)의 검색

학교급식소의 수질, 조리도구, 배식기구, 주변기구 및 조리된 식품에서 분리된 *S. aureus*를 대상으로 enterotoxin B 생성(*seb* gene)여부를 PCR법으로 증폭하여 확인하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 A 급식소의 식수, D 급식소의 손, E 급식소의 냉장고와 앞치마에서 분리된 균에서 표준 균주인 ATCC 14458과 같은 위치인 477bp의 뚜렷한 증폭 생성물을 확인할 수 있었다.

Ha(2002)[32]는 목장에서 분리한 96개의 시료에 대한 PCR 분석결과, *seb*(49.2%), MRSA (31.7%), ETA(41.2%), ETB

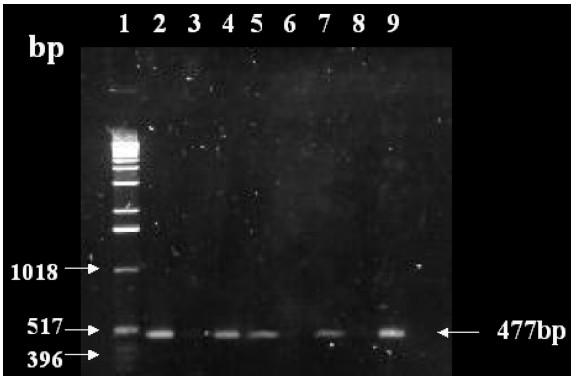

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of PCR amplified products of purified DNA from samples.
Lane 1; DNA molecular marker X, Lane 2; drinking water (A), Lane 3; drinking water (C), Lane 4; hands (D), Lane 5; refrigerator (E), Lane 6; cup (E), Lane 7; apron (E), Lane 8; arrangement table (E), Lane 9; *S. aureus* ATCC 14458.
Parentheses indicate place of sample that collected

(82.5%), TSST-A(15.8%)로 나타났으며, 대부분의 *Staphylococcus*는 2개 내지 4개의 내독소를 함께 가지고 있는 것으로 보고하였다. 따라서 본 연구 결과에 나타났듯이 검출된 모든 포도상 구균이 *seb* gene을 가지고 있으며, 다른 종류의 primer를 함께 사용하였을 때는 한 균주가 여러 개의 gene을 공유할 가능성이 크다는 것을 유추할 수 있다. 따라서 본 연구를 기초로, 향후 예상되는 enterotoxigenic gene들에 대한 MPCR(Multiplex PCR)을 통한 검색과 아울러 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) profile을 통한 균주별, 지역적 유연관계를 조사해 보는 것이 바람직하다고 생각된다.

국문요약

대부분의 식중독은 단체 급식으로부터 발생하는 경우가 많으며, 특히 위생상태와 연관되어 식중독을 야기 시키는 병인 물질 중 포도상 구균은 많은 부분을 차지 하고 있다. 따라서 본 연구에서는 서부경남지역의 5개 초등학교 급식시설에서 총 98개의 샘플 중 A 급식소의 식수, D 급식소의 손, E 급식소의 냉장고와 앞치마에서 4개의 포도상 구균을 분리하였다. 분리된 균주들은 1개의 메티실린 저항성 혈장응고 효소 음성 황색포도상구균(Methicilline Resistant Coagulase Negative *Staphylococcus aureus*; MRCNS)과 3개의 메치실린 민감성 혈장응고효소 양성 황색포도상구균(Methicilline sensitive Coagulase positive *Staphylococcus aureus*; MSCPS)으로 구분되었다. 한편 포도상 구균은 내열성 내독소로서, 이 중 가장 문제가 되는 내독소 B(enterotoxin B)를 검색하기 위한 PCR을 실시한 결과, A 장소의 식수, D 장소의 손, E 장소의 냉장고와 앞치마에서 분리된 균주로부터 477 bp의 생성물을 갖는 *seb* gene을 확인할 수 있었다. 이들 분리된 황색포도상구균에 대한 항생제 민감성 실험에서는 ampicillin과 penicillin에 대하여 전체적으로 저항성을 가졌으며, 특히 A 식수에서 분리된 균주는 옥사실린 저항성(oxacilline resistant)균주로 나타나 MRSA(methicilline resistant *staphylococcus aureus*)균주로 확인되었다.

참고문헌

1. 교육부. '99 학교급식 연수회 자료집. 1999.
2. 이용욱 : 학교급식의 위생 안전성 확보 방안. 전국영양사회 학술대회자료집. 대한영양사회. pp. 23-47 (1997).
3. 이승용, 장영수, 최희진 : 우리나라 HACCP 제도 실시현황 및 추진 전망-단체 급식을 중심으로- 식품산업과 영양, **4**(3), 14-26 (1999).
4. 집단 급식의 위생적인 관리방안. 한국급식위생관리학회 2000년도 추계학술세미나. 서울대학교 보건대학원 407호. pp. 279-292 (2000).
5. Jong-Koo Lee : Food Poisoning and Contamination Related to Institutional Foodservices. *Korean J. Community Nutrition*. **4**(4), 632-639 (1999).
6. Richards, M. S., Rittman, M., Gilbert, T. T., Opal, S. M., DeBuno, B. A., Neill, R. J. and Gemski, P. : Investigation of a staphylococcal food poisoning outbreak in a centralized school lunch program. *Public Health Rep*, **108**(6), 765-71 (1993).
7. 이용욱, 김종규 : 우리나라의 식중독에 관련된 문헌고찰, 한국식품위생학회지, **4**(3), 199-256 (1989).
8. Jong-Gyu Kim : Analysis of problems of food service establishments contributing to food poisoning outbreaks discovered through the epidemiological studies of some outbreaks, *J. Fd Hyg. Safety*, **12**(3), 240-253 (1997).
9. *Staphylococcus aureus*. http://www.hrs.co.kr/new/haccp.htm (2001).
10. ICMSF : Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens, London, Blackie Academic & Professional (1996).
11. Hui, Y. H., Gorham, J. R., Murrell, K. D. and Cliver, D. O. : Foodborne disease handbook vol. 1. disease caused by bacteria, New York, Marcel Dekker, Inc (1994).
12. Nakamura, M. M., Rohling, K. L., Shashaty, M., Lu, H., Tang, Y. W. and Edwards, K. M. : Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus nasal carriage in the community pediatric population. *Pediatr. infect. Dis*, **21**(10), 917-22 (2002).
13. Hori, S. : Hospital infection control measures for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *Nippon Rinsho*, **60**(11), 2144-9 (2002).
14. 식품의약품안전청, 식품공전, 서울, pp. 75-105 (1998).
15. Jean, F.M.: Biochemical tests for identification of Medical Bacteria. 3rd edition, Lippincott Williams & Wilkins, 105-117 (2000).
16. NCCLS : Method for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. 2nd ed., National Committee for Clinical Laboratory Standards, Uillanova (1988).
17. Bauer, L. W. and Kerdy, W. M. J. C : Antibiotic susceptibility

testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clinical Path.*, **36**, 493 (1966).
18. Nowak, A., Burkiewicz, A. and Kur, J. PCR differentiation of seventeen genospecies of Acinetobacter FIEMS Microbiology Letters., **126**, 181-8 (1995).
19. Becker, K., Ricarda Roth and Georg Peters : Rapid and Specific Detection of Toxigenic Staphylococcus aureus: Use of Two Multiplex PCR Enzyme Immunoassays for Amplification and Hybridization of Staphylococcal Enterotoxin Genes, Exfoliative Toxin Genes, and Toxic Shock Syndrome Toxin 1 Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**(9), 2548-2553 (1998).
20. Steven, M., Salisbury, M. D., Linda, M., Sabatini and Carol, A., Spiegel : Identification of Methicillin-Resistant Staphylococci by Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay. *Am. J. Clin. Pathol*, **107**, 368-373 (1997).
21. Becker, K., Keller, B., Chrisrof von Eiff, Michaela Bruck, Gabriele Lubritz, Jerome Etienne and Georg Peters: Enterotoxigenic Potential of Staphylococcus intermedius. *International Journal of Food Microbiology*, **61**(1), 1-10 (2000).
22. 정동관 : 국내식품의 미생물오염 현황 및 안전성 확보 방안 - 병원과 학교 단체급식소의 환경미생물 평가, 한국식품안전성연구회 심포지엄, 63-73 (2000).
23. Lawrence, C., M. Cosseron, O. Mimoz, C. Brun-Buisson, Y. Costa, K. Sammii, J. Duval, and R. Leclercq: Use of the coagulase gene typing method for the detection of carriers of methicilline-resistant *Staphylococcus aureus, J. Antimicrob. Chemother*, **37**, 687-696 (1996).
24. Ian, G. W., James, E. C. and Arthur, G. : Detection of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Dried Skimmed Milk: Use of the Polymerase Chain Reaction for Amplification and Detection of Staphylococcal Enterotoxin Genes *entB* and *entC1* and the Thermonuclease Gen *nuc*, *Applied and Environmental Microbiology*, **57**(6), 1793-1798 (1991).
25. 김양호, 김선희, 김성권, 송계민, 양병선, 최양순, 최혜심, 성치남 공저. 진단임상미생물학, 현문사 (2000).
26. Wei, H. L. and Chiou, C. S. : Molecular subtyping of Staphylococcus aureus from an outbreak associated with a food handler. *Epidemiol Infect.*, **128**(1), 15-20 (2002).
27. Levin, W. C., Bennett, R. W., Choi, Y., Henning, K. J., Rager, J. R., Hendricks, K. A., Hopkins, D. P., Gunn, R. A. and Griffin, P. M. : Staphylococcal food poisoning caused by imported canned mushrooms. **173**(5), 1263-7 (1996).
28. Antanassova, V., Meindl, A. and Ring, C. : Prevalence of Staphylococcus aureus and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham-a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *Int. J. Food Microbiol.,* **15**;68(1-2), 105-13 (2001).
29. Suzuki, E., Hiramatsu, K. and Yokota, T. : Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for mecA gene distribution. *Antimicrob. Agent Chemother.* **36**, 429-453 (1992).
30. Atsushi Ashimoto and Takeshi Hamada: Molecular Epidemiology of *Staphylococcus* spp. Contamination in the Ward Environment: Study on *mecA* and *femA* genes in Methicillin-Resistant Strains. 感染症學雜誌, **69**(1), 15-19 (1994).
31. Rosenthal, E. J. : Epidemiology of septicaemia pathogens. Dtsch Med Wochenschr, **127**(46), 2435-40 (2002).
32. Ha Kwang Soo : Detection and analysis of Toxin Genes of *Staphylococcus* aureus Isolated from Stock Farms. Thesis of Master Science, Gyeongsang National University (2002).