pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 29, No. 4, pp. 278~284 (2014)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2014.29.4.278

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

# Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA)를 이용한 들깻잎 중 *Staphylococcus aureus*의 오염원분석

김세리[1#] · 심원보[2#] · 한누리[1] · 정덕화[3*]
[1]농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 유해생물팀, [2]광주과학기술원, [3]경상대학교 응용생명과학부

# Analysis of Contamination Sources of *Staphylococcus aureus* Related to Perilla Leaves Using Multi-Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA)

Se-Ri Kim[1#], Won-Bo Shim[2#], Noo Ri Han[1], and Duck-Hwa Chung[3*]
[1]*Microbial Safety Team, Department of Crop Life Safety, NAAS, RDA*
[2]*School of Physics and Chemistry, Gwangju Institute of Science and Technology*
[3]*Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University*
(Received July 21, 2014/Revised August 18, 2014/Accepted October 8, 2014)

**ABSTRACT** - To investigate the prevalence of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) during production of perilla leaves, a total of 261 samples, including water, soil, surroundings of cultivation and packing, workers, and perilla leaves, was examined.. To trace the contamination sources of *S. aureus* related to perilla leaves, MLVA (Multi-Locous Variable number of tandem repeat Analysis), which is a very efficient method to discriminate strains with minimum molecular biology equipment was applied to *S. aureus* isolated from perilla leaves farms. *S. aureus* was isolated in perilla leaves from 9 of 38 farms at 0-2.92 log CFU/g. *S. aureus* was also found in working environment, including packing vinyl, worker clothes, irrigation water and hands. The patterns of MLVA of isolates from perilla leaves matched with those of isolates from packing table, irrigation water, packing vinyl, and hands. The isolates were successfully examined and determined by MLVA, thus elucidating *S. aureus* source and spread.

**Key words :** perilla leaves, *S. aureus*, MLVA (Multi-Locous Variable number of tandem repeat Analysis)

신선 채소는 인간에게 비타민, 미량원소 및 섬유소를 공급하는 중요한 농산물이다. 특히 엽채류는 표면적이 넓고 생산 과정 중 주변 환경과 접촉 빈도가 높아 유해미생물에 오염되기 쉬우며 최근에 농산물 유래의 식중독발생이 국내외적으로 보고되고 있다[1-4]. 미국의 경우 1996년부터 2008년까지 농산물과 관련된 식중독이 82건 발생하였으며 그 중 엽채소와 관련된 사고는 28건 이었다[2]. 엽채류에 의한 식중독사고의 예로는 2006년에 *Escherichia coli* O157:H7 (*E. coli* O157:H7)에 오염된 시금치가 원인이 되어 발생한 식중독 사고를 들 수 있으며 이 사고로 205명 이상의 환자가 발생하였고 3명이 사망하였다[3]. 그 외에도 영국에서 발생한 *Salmonella* Thompson에 오염된 상추로 인한 식중독과 덴마크에서 발생한 *Salmonella* Anatum에 의해 오염된 바질에 의한 식중독 등이 있다[4]. 식중독 원인균으로는 *Salmonella* spp., *Eschrichia coli* O157:H7, *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* 등이 있다[5]. 그 중 *S. aureus*는 Reina 등[6]의 연구에서 나타난 바와 같이 *Salmonella* spp.와 더불어 채소류에 부착력이 강하여 세척으로 제거하기 어렵다. 이 세균은 공기, 토양 등의 자연계에 광범위하게 분포하고 있고 건강한 사람과 동물의 피부 등에도 존재하고 있어 식품에 쉽게 오염되기 때문에 식품 위생상 중요하게 다루어지고 있다[7].

*S. aureus*에 의한 식중독은 균이 식품에서 증식하면서 생성된 독소를 섭취함으로서 발생하는 독소형 식중독이다. 자연에는 여러 종류의 *S. aureus*가 있으나 내독소(entero-

#The first two authors contributed equally to this study
*Correspondence to: Duck Hwa Chung, Division of Applied Life Science Gyeongsang National University, Jinju, Gyeongnam 660-701, Korea
Tel: 82-55-772-1903, Fax: 82-55-757-5485
E-mail: dhchung@gnu.ac.kr

toxin)를 생산하는 균종은 *S. aureus*에 한정된다[8]. 장독소(enterotoxin)는 분자량이 약 26,000~35.000 Da인 단일 폴리펩티드이며, 면역학적으로 서로 다른 18가지, 즉 enterotoxin A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, U형이 있다[9]. 주로 A형이나 D형에 의한 식중독 사례가 많은 것으로 보고되고 있으며 독소 중 B가 열에 가장 안정한 것으로 알려져 있다[10]. 또한 *S. aureus*가 분비하는 내독소는 물과 식염수에 녹는 특성이 있으며 독소들은 대부분이 chymotrypsin, renin, papain 같은 소화 효소에도 안정하기 때문에 음식물 섭취 후 소화기관에서도 그들의 활성이 그대로 유지되어 식품위생상 중요한 병원성 미생물이다[11,12].

이들 미생물을 관리하기 위해서는 우선 오염원을 찾고 오염원으로부터 오염되는 것을 사전에 차단하는 것이 중요하다. 오염원을 구명하고 전파경로를 역학적으로 구명하는 방법으로는 고전적인 분류방법인 biochemical typing, serotyping, antibiogram typing 등이 있으며 이들 방법은 표현형을 이용한 방법으로 균주들이 나타내는 표현형을 통해 간접적으로 균들의 연관성을 판단한다. 이런 결과들은 종종 환경적 인자들에 의해서 많은 영향을 받기에 표현형으로 판단된 유사성이 유전자 typing 방법들의 결과와 항상 일치하지 않는다. 따라서 병원균 균종의 genotype 결정은 특성 규명에 중요한 기준이 된다. 1980년대 이후 DNA 수준의 유전학적 분류기법을 이용한 분자 역학적 연구가 활발히 진행되고 있다[13,14]. 최근 미생물의 유전형에 의한 분류방법으로 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Multilocous Variable number of tandem repeat Analysis (MLVA) 등이 있다.

PFGE는 균주들을 분별하는 최고의 방법으로서 염색체 DNA를 제한효소로 절단하여 나오는 20~800 kb 산물의 크기를 이용해 미생물의 genotype을 분석한다[15]. 그러나 이 방법은 일반적인 agarose 전기영동기를 이용할 수 없으며, 전체 genome을 이용한 이 방법은 기술적 제한 등 단점이 있다[15]. RAPD는 한 가지 primer로 무작위로 증폭되는 DNA 조각들의 유형을 분석하는 방법으로 가장 신속하고 저렴한 비용으로 polymorphism 분석할 수 있고 높은 순도의 DNA를 요구하지 않으며 많은 시료를 한꺼번에 처리할 수 있는 장점이 있다. 그러나 재현성이 떨어진다는 것이 이 기술의 단점이다[16]. 긴 분석시간과 별도의 장비를 요구하는 PFGE와 재현성이 떨어지는 RAPD의 단점을 보완하는 새로운 genotyping법이 바로 MLVA다.

MLVA는 동일한 locus에서 반복되는 염기서열들의 반복수가 종마다 다르다는 것을 이용하여 종을 구별하는 것으로, 동일 primer를 이용하여 단순 PCR을 통해 쉽게 진행될 수 있다는 장점이 있다[17,18]. *S. aureus* 중 variable number tandem repeat (VNTR)을 포함하고 있는 유전자는 *clfA*, *clfB*, *coa*, *spa*, *ssp*, *sdr* 등을 들 수 있으며 *ssp*는 9bp, *clfA*, *clB*, *sdr*는 18bp, *spa*는 24bp, *coa*는 81bp의 반복서열을 가지고 있다[18]. 최초로 *S. aureus*에 대한 MLVA system 구축은 Sabat[18] 등에 의해서 이루어졌다. 당시 *clfA*, *clfB*, *sdr*, *ssp*, *spa*를 target으로 MLVA를 수행한 결과 PFGE로 typing하여 strain clustering 한 결과와 일치한 것으로 보아 MLVA로 신속하게 typing할 수 있음을 증명해 보였다[18].

따라서 본 연구에서는 국내에서 생식 채소로 널리 이용되고 있으며 별도의 수확 후 처리 과정이 필요하여 타 쌈채소 보다 미생물 오염 가능성이 많은 들깻잎을 대상으로 MLVA를 이용하여 *S. aureus* 오염원을 구명하고자 하였다. 본 연구의 결과는 들깻잎의 미생물 안전성을 확보하는 위생관리 실천기술 개발의 기초자료로 활용하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 장소 선정 및 시료 채취

본 연구에서는 2009년에 들깻잎 주생산지인 밀양지역 38농가에서 들깻잎을 수집하여 *S. aureus*를 분리하였다. 이후 *S. aureus*가 검출된 5농장을 선정하여 들깻잎이 접촉 가능한 토양, 관개용수, 작업자, 수확 후 환경 (수확용기, 작업대, 분무기속 물, 포장지) 및 들깻잎 (수확직후, 완제품)에서 *S. aureus*를 분리하였다(Fig. 1). 들깻잎 중 *S. aureus*의 오염원을 추적하고자 분리된 *S. aureus*로 MLVA를 실시하였다.

들깻잎의 *S. aureus*오염도 조사를 위한 시료채취는 수확·포장과정을 거쳐 박스에 담긴 들깻잎을 시료채취용 팩에 담아와 본 연구에 사용하였다. 또한 들깻잎의 생산 환경에서 *S. aureus*분포를 조사하기 위한 시료 채취 과정은 다음과 같다. 토양의 경우 하우스 내의 토양을 약 100 g씩 시료채취용 팩에 채취하였다. 들깻잎에 사용되는 관개용수는 분수 호스내의 물을 채취하였다. 또한 들깻잎 포장 작업 시에는 들깻잎의 시들음 방지를 위해서 사용하는 물은 분무기에 담긴 물로 약 500 mL 정도를 1 L 채수병에 채취하였다. 들깻잎 농장의 수확용기와 작업도구는 사용 중인 것을 채취하였고 포장 비닐은 사용 전의 것을 대상으로 하였다. 작업자의 복장은 농장에서 일하는 작업자의 상의를 대상으로 하였으며 수확용기, 작업도구 및 작업자 복

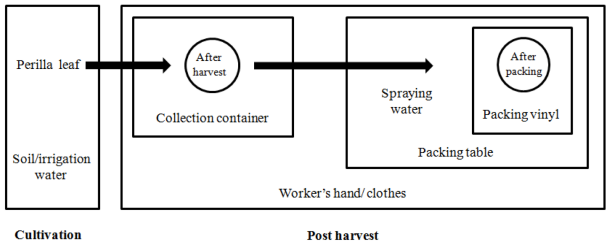


**Fig. 1.** Flow diagram of cultivation and post harvest process of perilla leaf.

**Table 1.** Samples for trace of contamination source of *S. aureus* from 5 perilla leaves farms

| Sources | Unit of sample | No. of samples |
|---|---|---|
| Soil | 100 g | 15 |
| Irrigation water | 1 L | 12 |
| Collection container | 100 $cm^2$ | 15 |
| Packing table | 100 $cm^2$ | 15 |
| Water in spray | 500 ml | 15 |
| Packing vinyl | 100 $cm^2$ | 15 |
| Hands | 1 hand | 15 |
| Clothes | 100 $cm^2$ | 15 |
| Perilla leaves (Green house) | 36 leaves | 15 |
| Perilla leaves (Packed) | 36 leaves | 15 |

장은 10 cm × 10 cm 크기의 면적대를 사용하여 100 $cm^2$의 면적을 면봉으로 문질러 채취하였다. 또한 작업자의 손은 0.85% 생리식염수 50 mL을 멸균 팩에 붓고 손을 넣어 30초간 씻어서 손에 있는 미생물을 채취하는 glove juice법으로 하였다[19]. 들깻잎은 수확 전 하우스에 심겨진 들깻잎과 수확·포장이 끝나 박스에 담긴 들깻잎을 대상으로 채취하였으며 채취량은 수확전의 것은 36장 수확후의 것은 3개 묶음 (1묶음 = 12장)을 멸균된 시료채취용 팩에 채취하였으며 이렇게 채취된 모든 시료는 얼음을 채운 아이스박스에 담고 실험실로 냉장 운반한 후 사용하였다(Table 1).

### *S. aureus*분리 및 동정

수집된 시료에서 *S. aureus* 31균주 (재배환경: 관개용수 1주, 수확 후 환경: 포장대 3주, 포장용기 1주, 작업자: 작업자 복장 1주, 작업자 손 3주, 들깻잎 22주)를 분리하였으며 분리, 동정법은 다음과 같다. *S. aureus*는 정량과 정성 검사를 실시하였으며 정량검사의 경우 위생지표세균을 위해 전처리된 검액을 단계희석 한 후 각 희석농도에 대하여 250 μL씩 Baird-Parker agar 4 plate에 접종한 후 37ºC, 48시간 배양한 후 전형적인 형태를 나타내는 집락을 계수하였다. 계수한 평판에서 5개 이상의 전형적인 집락을 선발하여 NA배지에 접종하고 37ºC에서 24시간 배양한 후 PCR kit (Power check PCR kit, Kogen, Korea)와 VITEK (VITEK-2 compact, Biomerieux, France)으로 확인 동정하였다. 최종균수는 *S. aureus*의 수치는 전형적인 집락을 보이는 균주 × 양성균주수/5주의 test균주 × 희석배수로 계산하였다.

또한 정성 검사는 들깻잎 25 g을 225 mL의 10% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth (Difco Lab., Detroit, MI, USA)에 넣고 2분간 stomacher에서 균질한 후 37ºC 16시간 전배양하고 배양액을 Baird-Parker agar (Difco Lab., Detroit, MI, USA)에 37ºC, 24~48시간 획선 배양한 후 검

**Table 2.** Primers used to determine the origin of *S. aureus* by MLVA

| Genes | Primers | Oligonucleotides (5' to 3') |
|---|---|---|
| *clfA* | clfA-F | 5'-GAT TCT GAC CCA GGT TCA GA |
| | clfA-R | 5'-CTG TAT CTG GTA ATG GTT CTT T |
| *clfB* | clfB-F | 5'-ATG GTG ATT CAG CAG TAA ATC C |
| | clfB-R | 5'-CAT TAT TTG GTG GTG TAA CTC TT |
| *sdr* | sdr-F | 5'-GTA ACA ATT ACG GAT CAT GAT G |
| | sdr-R | 5'-TAC CTG TTT CTG GTA ATG CTT T |
| *spa* | spa-F | 5'-AGC ACC AAA AGA GGA AGA CAA |
| | spa-R | 5'-GTT TAA CGA CAT GTA CTC CGT |
| *ssp* | ssp-F | 5'-ATC MAT TTY GCM AAY GAT GAC CA |
| | ssp-R | 5'-TTG TCT GAA TTA TTG TTA TCG CC |

고 lecithinase 작용으로 집락주위에 밝은 환(clear zone)이 나타나는 단일 집락을 취하여 확인실험에 사용하였다. 확인실험은 정량검사와 동일하게 PCR kit (Kogen, Korea)와 VITEK (Biomerieux, France)을 사용하였고 대조군으로 *S. aureus* 표준 균주 ATCC 25923을 사용하였다[20].

### MLVA를 활용한 오염원 조사

MLVA를 위한 DNA는 Intron사의 DNA추출 kit를 사용하여 추출하였다. *S. aureus*를 한 백금이 취하여 Luria-Bertani (LB, Oxoid, England) broth 5 mL에 접종한 후 37ºC에서 180 rpm 16시간 진탕 배양하였다. 배양액 1 mL를 취하여 13,000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 배양액으로부터 얻은 pellet은 pre-buffer 50 μL와 lysozyme 3 μL를 첨가한 뒤 37ºC 20분간 반응시켰다. 이후 G-buffer를 250 μL를 넣고 65ºC에서 15분간 반응시킨 후 binding buffer 250 μL를 넣고 slow voltexing을 하고 칼럼에 로딩한 후 13000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 칼럼에 결합한 DNA의 세척을 위하여 washing buffer 1을 500 μL 넣고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하고 이어 washing buffer 2를 1과 동량 넣고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 최종 elution buffer 100 μL를 넣고 13000 rpm 1분간 원심분리하여 이를 MLVA를 위한 template DNA로 사용하였다.

실험에 사용된 primer는 Sabat[18] 등이 개발한 primer를 이용하였고 다섯 종류의 유전자에 대한 primers 염기서열은 Table 2에 나타난 바와 같으며 각각의 primer는 Bioneer사 (Cheongwon, Chungbuk, Korea)에서 합성하였다. PCR 반응 용액은 Intron사의 PCR pre-mix를 사용하였다. pre-mix에는 reaction buffer, *Taq* polymerase가 함유되어 있어 10 pM primer와, 5 μL의 DNA를 첨가하고 3차 멸균 증류수를 사용하여 최종 반응용액을 20 μL로 조절하였다. 또한 PCR thermal cycler의 반응 조건은 94ºC에서 5분간 predenaturation을 실시한 후 94ºC에서 30초간 denaturation, 55ºC에서 30초간 각각 primer annealing, 72ºC에서 30초간

extension의 조건으로 30cycle을 수행하고 final extension을 72ºC에서 7분간 실시하였다. PCR에 의한 증폭생성물은 2.0% agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다.

전기영동 후 밴드의 위치를 측정하고 이것을 기본으로 PowerMarker software (ver.3.25)[21]을 이용하여 UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) tree를 작성하고 grouping하였다.

## 결과 및 고찰

### *S. cereus*의 오염분포

38농가에서 들깻잎을 수집하여 *S. aureus*를 조사한 결과, 9농가에서 *S. aureus*가 검출되었다. 검출수준은 0~2.92 $\log_{10}$ CFU/g이었으며 검출빈도는 7.9% (9/114)였고 2곳의 농가에서 *S. aureus*가 2.00 $\log_{10}$ CFU/g 이상으로 검출되었다(data not shown). 이는 Kim[22] 등이 수행한 즉석섭취 야채 샐러드의 미생물 오염조사에서 총 120건 중 4건(3%)보다는 높은 빈도를 보였고 Jung[23] 등이 수행한 비가열 섭취 채소류의 미생물 오염도 조사결과, 들깻잎 10.0%, 치커리 22.2%, 배추 17.6%, 상추 12.0%에서 *S. aureus*가 검출되었다고 보고하고 있어 이 보다는 조금 낮은 수준이었다. 또한 워싱턴 D. C.에 위치한 market에서 sprout, 셀러리, cauliflower, 브로커리를 대상으로 병원성 미생물을 분석한 결과 상추 10점에서 1점에서 *S. aureus*이 검출되었다고 보고된 바 있다[24]. 이 처럼 *S. aureus*는 엽채류에서 빈번히 검출되고 있음을 알 수 있다. 들깻잎에서 *S. aureus*가 검출된 농가 9농가 중 5농가를 선정하여 들깻잎 생산 환경에서 *S. aureus*를 조사한 결과, 5 농가 중 3 농가의 생산 환경에서 *S. aureus*가 검출되었다. 검출시료는 A 농가의 포장대, D 농가의 포장비닐과 작업자 손, E 농가의 관개용수와 복장이었고 검출 수준은 0.33 ± 0.58~1.31 ± 1.30 $\log_{10}$ CFU/100cm$^2$ 이었다(data not shown). Kim[25] 등이 수행한 토마토 농장에서 *S. aureus*를 검색한 결과 총 120점 중 14점의 시료에서 *S. aureus*가 검출되었고 검출된 시료는 토양, 관개용수, 작업자의 복장, 손, 장갑, 토마토였다. 이는 본 연구결과와 유사한 경향이다. 또한 Park[26] 등은 4종의 농산물 생산 환경에서 *S. aureus*의 검출한 결과, 4종의 농산물 재배지에서 작업자 개인위생과 관련된 손, 장갑, 옷, 시료에서만 검출되었다고 보고하였으며 이는 개인위생의 중요성을 시사하는 결과라 할 수 있다.

따라서 *S. aureus*의 오염을 최소화하기 위하여 작업자를 대상으로 한 주기적인 위생교육과 작업 전 후로 손을 씻고 장갑의 착용이 필수적이다. 또한 수확 후 처리 작업이 끝난 후에는 반드시 작업장 내의 청소, 소독을 통하여 *S. aureus*를 비롯한 유해세균에 들깻잎이 오염되는 것을 예방해야 한다.

### MLVA를 이용한 유해미생물 오염경로 분석

본 연구는 9농가의 들깻잎에서 분리된 *S. aureus*로 MLVA를 수행하였다. 대상유전자는 *spa, sdr*, *clfA*, *clfB*, *ssp*였고 이들 유전자는 house keeping gene으로 생존에 있어 꼭 필요한 유전자들이라고 할 수 있다[18]. *clfA*와 *clfB*는 clump factor A와 B를 coding하는 유전자로 응집에 관여하는 유전자로 18bp의 반복서열을 포함하고 있다. *clfA*에서는 반복서열이 포함된 수에 따라 나타나는 길이 차이에 따라서 22균주가 5개의 allele로 구분하였으며 *clfB*는 8개의 allele로 구별할 수 있었다(Fig. 2, Fig. 3). *sdr*은 sdr protein을

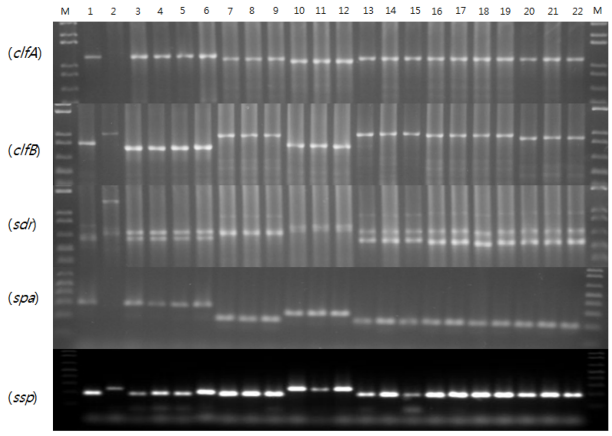


**Fig. 2.** MLVA patterns found in *S. aureus* isolated from perilla leaves. M: marker, 1: Farm1-1, 2: Farm2-1, 3: Farm3-1, 4: Farm3-2, 5: Farm3-3, 6: Farm3-4, 7: Farm4-1, 8: Farm4-2, 9: Farm4-3, 10: Farm5-1, 11: Farm-5-2, 12: Farm-5-3, 13: Farm-6-1, 14: Farm-6-2, 15: Farm-6-3, 16: Farm-7-1, 17: Farm-7-2, 18: Farm-7-3, 19: Farm-7-4, 20: Farm-8-1, 21: Farm-8-2, 22: Farm-9-1 : Strain number.

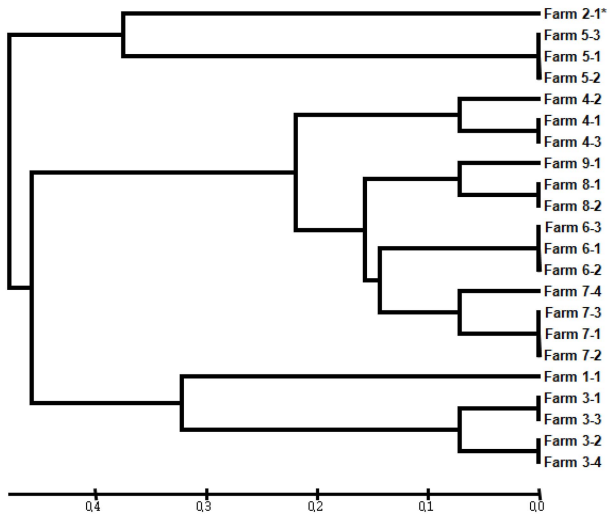


**Fig. 3.** Genetic relationships based on MLVA typing among *S. aureus* from perilla leaves : Strain number.

coding하는 유전자로 18 bp의 반복서열을 포함하고 있으며 관찰되는 allele수는 7개였다. *spa*는 staphylococcal protein A를 coding 하는 유전자로 IgG의 Fc region에 부착하여 숙주의 방어기작을 방해하는 데 관여한다. 이 유전자는 24bp의 반복서열을 포함하고 있으며 22주에서 발견되는 allele의 수는 6개였다. 또한 *ssp*는 $V_8$ serine protease를 coding하는 유전자로 9bp의 가장 짧은 반복 서열을 가지고 있으며 이 유전자로는 6개의 allele로 구분되었다. 5개의 유전자 중 *clfB*유전자를 사용하였을 때 농가별로 서로 다른 패턴을 보여 오염원을 추적하는데 유용한 마커로 사용될 수 있을 것으로 보인다. 따라서 5개의 유전자를 활용하여 9농가에서 분리된 *S. aureus*를 대상으로 MLVA를 수행하였을 때 분리된 균주의 유전자 패턴이 농가별로 서로 다른 패턴을 보였으며 같은 농가에서 분리한 균주들 간에는 유전자 패턴이 동일하여 농가간 구별이 가능하였다. Kim[27] 등의 연구결과에 의하면 *Brucella canis*를 대상으로 MLVA를 실시한 결과 32개의 유전형으로 세분되었고 PFGE를 실시한 결과 2개의 유전형으로 분류된 연구결과와 비교하였을 때 PFGE보다 MLVA가 감별력이 높다고 보고하여 MLVA는 균주들 간의 구별하는데 적용 가능한 방법으로 판단된다.

9농가의 들깻잎에서 분리된 *S. aureus*를 대상으로 MLVA를 수행했을 때 농가에 따라 균주들 간에 구별이 가능하여 들깻잎의 오염원을 분석하는데 적용해 보았다. 들깻잎의 오염원을 추적하기 위하여 *S. aureus*가 분리된 농가 중 5농가를 대상으로 들깻잎과 직접 접촉하는 시료에서 *S. aureus*를 분리하였다. 5농가 중 3농가의 작업환경 및 작업자 손에서 *S. aureus*가 검출되었다. 앞서 들깻잎에서 분리된 균주 7주와 생산환경에서 분리된 균주 9주로 MLVA를 수행하였다(Fig. 4, Fig. 5). *clfA*에서는 반복서열이 포함된 수에 따라 나타나는 길이 차이에 따라서 4개의 allele로 구분하였으며 *clfB*는 5개의 allele로 구별할 수 있었다. *sdr*을 대상으로 MLVA을 수행했을 때 관찰되는 allele수는 5개였다. *spa* 유전자를 대상으로 MLVA를 수행하였을 때 16주에서 발견되는 allele의 수는 4개 였다. 또한 *ssp*는 9bp의 가장 짧은 반복 서열을 가지고 있어 반복서열의 길이가 짧은 만큼 많은 변이가 일어나 allele의 수가 많을 것으로 예상하였으나 2개의 allele로 밖에 구분되지 않았다. 5개의 마커로 MLVA를 패턴을 조합한 결과 A농가의 포장대에서 분리된 균주의 패턴은 A농가 들깻잎에서 분리된 *S. aureus*의 MLVA 패턴과 동일하였으며 D농가의 작업자 손, 포장비닐에서 분리된 균주와 들깻잎에서 분리된 균주가 동일한 패턴을 보였다. 또한 E농가의 경우는 관개용수에서 분리된 균주와 들깻잎에서 분리된 균주의 패턴이 동일하여 들깻잎의 오염은 이들 시료와 연관되어 있을 것으로 추정된다.

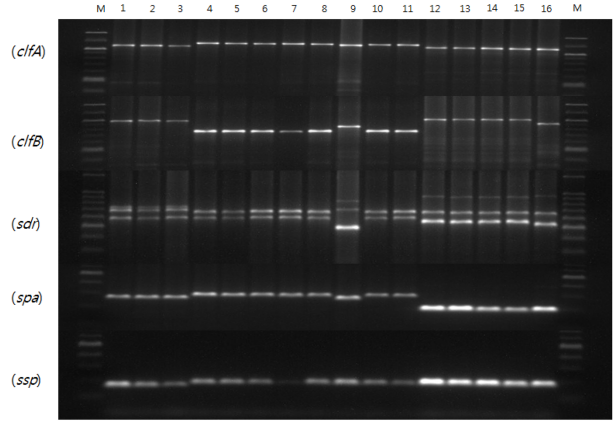


**Fig. 4.** MLVA patterns found in *S. aureus* isolated from perilla leaves and perilla cultivation area. M: marker, 1: A*-packing table, 2: A-packing table, 3: A-perilla leaves, 4: D*-perilla leaves, 5: D-perilla leaves, 6: D-perilla leaves, 7: D-perilla leaves, 8: D-packing vinyl, 9: D-hands, 10: D-hands, 11: D-hands, 12: E*-perilla leaves, 13: E-perilla leaves, 14: E-perilla leaves, 15: E-irrigation water, 16: E-clothes. *A, D, E : perilla leaves farm.

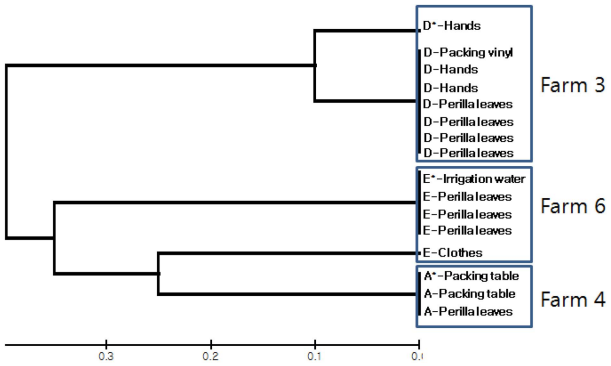


**Fig. 5.** Genetic relationships based on MLVA typing among *S. aureus* from perilla leaves and perilla cultivation area. *A, D, E : perilla leaves farm.

Gilbert[28] 등은 수행한 MLVA로 75곳의 농장에서 분리한 *S. aureus*로 농장수준까지 구별이 가능하였으며 농장에 있는 착유기의 바이오필름으로부터 분리된 균주와 벌크우유로부터 분리된 균주를 유사한 MLVA 프로파일로 확인할 수 있었다. Reskova[29] 등은 슬로바키아의 육류 또는 치즈 중소 공장에서 얻은 98의 샘플로부터 256개의 *S. aureus*를 분리 하여 MLVA를 적용한 결과 31개의 profile type을 얻었고 이를 통해 공장 안에서의 여러 공간 (생산라인, 저장실, 포장실 등)의 *S. aureus*의 오염공간을 추적하는데 가능하였다. 또한 Callon[30] 등이 수행한 원유와 치즈를 대상으로 *S. aureus*를 분리하고 MLVA를 적용한 결과 원유로 만든 치즈는 같은 패턴을 갖는 것으로 나타나 원유의 오염은 치즈의 오염으로 이어지는 것을 확인한 사례를 통하여 MLVA를 이용한 유전자 typing은 농산물이나 식품 중 유해미생물의 오염원을 신속하고 경제적으로 구명하는데 활용할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 본 연구의 결과로

미루어 볼 때 미생물에 오염된 들깻잎 생산환경 (포장대, 포장비닐, 작업자 손, 관개용수)은 들깻잎의 미생물 안전성에 직접적인 영향을 끼치는 것을 알 수 있다. 따라서 안전한 들깻잎을 생산하기 위해서는 수원(水原)의 안전성확보, 작업자의 손씻기 등 개인위생관리, 작업 후 수확후 처리시설 청소 등이 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

본 연구는 들깻잎과 들깻잎 생산 환경을 대상으로 *S. aureus*를 분리하고 MLVA를 이용해 분리된 *S. aureus*의 오염경로를 분석하였다. 그 결과, 들깻잎에서 *S. aureus*의 검출빈도는 7.9% (9/114)였고 검출수준은 0~2.92 $\log_{10}$CFU/g였으며 2곳의 농가에서 *S. aureus*가 2.00 $\log_{10}$CFU/g 이상으로 검출되었다. *S. aureus*가 분리된 5농가를 대상으로 들깻잎과 직접 접촉하는 시료에서 *S. aureus*를 분리하였으며 5 농가 중 3농가의 작업환경 (농가의 포장대, 포장비닐, 작업자 손, 복장 등)에서 *S. aureus*가 검출되었다. 들깻잎과 생산 환경에서 분리된 *S. aureus*를 대상으로 MLVA를 수행했을 때 포장대, 작업자의 손, 포장비닐 및 관개용수에서 분리된 균주와 들깻잎에서 분리된 *S. aureus*가 동일한 패턴을 보여 들깻잎의 오염은 이들 시료와 연관되어 있을 것으로 추정된다. 따라서 MLVA를 이용한 유전자 typing은 농산물이나 식품 중 *S. aureus*의 오염원을 신속하고 경제적으로 구명하는데 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업인 농식품 중 유해미생물 안전관리기반기술 개발 (과제번호 : PJ009533)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 참고문헌

1. Choi J.W., Park S.Y., Yeon J.H., Lee M.J., Chung D.H., Lee K.H., Kim M.G., Lee D.H., Kim K.S., Ha S.D.: Microbial contamination levels of fresh vegetables distributed in markets. *Korean J. Fd. Hyg. Safety*, **20**, 43-47 (2005).
2. FDA: Guidance for Industry: Guide to Minimize Microbial Food Safety Hazards of Leafy Greens; Draft Guidance Available from: http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/ProduceandPlanProducts/ucm174200.htm Accessed January **15**, 2010 (2009).
3. CDC: Update on Multi-State Outbreak of *E.coli*O157:H7 Infections From Fresh Spinach, October 6, 2006. Available from http://www.cdc.gov/ecoli/2006/september/updates/100606.htm Accessed Febrary **20**, 2010 (2006).
4. Patel, J., Sharma, M.: Differences in attachment of *Salmonella enteric* serovars to cabbage and lettuce leaves. *Int. J. Food Microbiol.*, **139**, 41-47 (2010).
5. Burnett S.L., Beuchat L.R.: Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices and difficulties in decontamination. J. *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 104-110 (2001).
6. Reina L.D., Fleming H.P., Breidt F.J.R.: Bacterial contamination of cucumber fruit through adhesion. *J. Food Prot.*, **65**, 1881-1887 (2002).
7. Suk S.U., Park S.C.: Staphylococcal infections. *J. Infection.*, **17**, 115-122 (1985).
8. Jang D.S., Sin D.H., Chung D.H., Kim C.M., Lee I.S.: Food hygienic. Jeongmungak Co., Seoul, Korea. pp. 71-111 (2002).
9. Chen T.R., Hsiao M.H., Chiou C.S., Tsen H.Y.: Development and use of PCR primers for the investigation of $C_1$, $C_2$ and $C_3$ enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. *Int. J. Food Microbiol.*, **71**, 63-70 (2001).
10. Lee E.J.: The effect of temperature and time on the multiplication of *Staphylococcus* in foods. *Korean Journal of Public Health*, **9**, 381-387 (1992).
11. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M.: Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.*, **13**, 16-34 (2000).
12. Loir Y.L., Baron F., Gautier M.: *Staphylococcus aureu*s and food poisoning. *Genet. Mol. Res.*, **2**, 63-76 (2003).
13. Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., Spratt, B. G : The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, **36**, 618-623 (2002).
14. Park Y.B., Kim J.B., Shin S.W., Kim J.C., Cho S.H., Lee B.K., Ahn J.H., Kim J.M., Oh D.H.: Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea. *J. Food Prot.*, **72(3)**, 612-617 (2009).
15. Schmitz F. J., Steiert M., Tichy H. V., Hofmann B., Verhoef J., Heinz H. P., Kohrer K. and Jones M. E.: Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from dusseldorf by six genotypic methods. *J. Med. Microbiol.*, **47**, 341-351 (1998).
16. Weller T.M..: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* typing methods: which should be the international standard? *J Hosp Infect.*, **44(3)**, 160-72 (2000).
17. Belkum A. V.: Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). *FEMS Immunol Med Microbio.*, **49**, 22-27 (2007).
18. Sabat A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W., Filippek R., Kosowska K., Hryniewiewicz W., Travis J., Potempa J.: New methods for typing *Staphylococcus aureus* strains: Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 1801-1804 (2003).
19. US Food and Drug Administration.: Guidelines for effectiveness testing of surgical hand scrub (glove juice test). Fed. Regist., **43**: 1242-1243 (1978).
20. KFDA. Korean Food code. Korea Food and Drug Adminis-

tration, Seoul, Korea. pp.75-105 (2002).
21. Liu K., Muse S.V.: PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, **21**, 2128-2129 (2005).
22. Kim J.S., Bang O.K., Chang H.C.: Examination of microbiological contamination of ready-to-eat vegetable salad. *J. Fd Hyg, Safety*, **19**, 60-65 (2004).
23. Jung S.H., Hur M.J., Ju J.H., Kim K.A., Oh S.S., Go J.M., Kim Y.H., Im J.S.: Microbiological evaluation of raw vegetables. *J. Fd Hyg, Safety.* **21,** 250-257 (2006).
24. Thunberg R.L., Tran T.T., Bennett R.W., Matthews R.N., Belay N.: Microbial evaluation of selected fresh produces obtained at retail markets. *J. Food Prot.*, **65**, 677-682 (2002).
25. Kim J.S., Lee J.H., Kim J.H., Choi J.M., Kim S.R., Ha S.D., Kim K.S., Lee K.H., Kim M.G., Kim K.Y., Kim C.H., Chung D.H.: Characteristics of enterotoxigenic genes and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from Tomato Farms in Western Gyeongnam. *Korean J. Food Sci Technol.*, **38**, 295-303 (2006).
26. Park S.H., Kim J.S., Kim K.Y., Chung D.H., Sim W.B.: Identification of toxin gene and antibiotic resistance of *staphylococcus aureus* isolated from agricultural product cultivation environments. *J. Environ Health Sci.*, **39**, 465-473 (2013).
27. Kim S.K., Sohn J.H., Jang Y.S., Kin S.Y.: MLVA typing of *Brucella canis* isolated from dogs in Gyeongbuk province, Korea. *Korean J Vet Serv.*, **35(4)**, 275-281 (2012).
28. Gilbert F.B., Fromageau A., Gelineau L., Poutrel B.: Differentiation of bovine *Staphylococcus aureus* isolates by use of polymorphic tandem repeat typing. *Veterinary microbiology.* **117**, 297-303 (2006).
29. Rešková, Z., Korenová, J. Kuchta, T.: Effective application of multiple locus variable number of tandem repeats analysis to tracing *Staphylococcus aureus* in food-processing environment. *Letters in Applied Microbiology*, **58**, 376-383 (2013).
30. Callon C., Gilbert F. B., Cremoux R. D., Montel M. C.: Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control*, **19**, 143-150 (2008).