

상추와 원유에서 분리한 황색 포도상구균의 유전형 및 표현형 특징

정혜진 · 조준일 · 박성희 · 하상도 · 이규호¹ · 김철호² · 송은섭³
정덕화⁴ · 김민곤⁵ · 김광엽⁶ · 김근성*

중앙대학교 식품공학과, ¹한국외국어대학교 환경학과, ²동국대학교 한의과대학 생화학교실,
³인하대학교 의과대학 산부인과학교실, ⁴경상대학교 식품공학과, ⁵생명공학연구원, ⁶충북대학교 식품공학과

Genotypic and Phenotypic Characteristics of *Staphylococcus aureus* Isolates from Lettuces and Raw Milk

Hye-Jin Jung, Joon-Il Cho, Sung-Hee Park, Sang-Do Ha, Kyu-Ho Lee¹,
Cheol-Ho Kim², Eun-Seop Song³, Duck Hwa Chung⁴, Min-Gon Kim⁵,
Kwang-Yup Kim⁶, and Keun-Sung Kim*

Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

¹Department of Environmental Science, Hankuk University of Foreign Studies

²Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

³Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Inha University

⁴Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University

⁵Laboratory of Integrative Biotechnology, Korea research Institute of Bioscience and Biotechnology

⁶Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University

To characterize genotypic and phenotypic traits of *Staphylococcus aureus* isolates (n = 86) from lettuces and raw milk, major virulence-associated genes and antibiotic susceptibility were detected using PCR-based methods and disk diffusion method, respectively. All isolates possessed coagulase gene and showed five polymorphism types [500 bp (2.4%), 580 bp (17.4%), 660 bp (61.6%), 740 bp (17.4%), and 820 bp (1.2%)] due to variable numbers of tandem repeats present within the gene. Two or three different loci of hemolysin gene family were dominant in isolates, 47 of which (55%) possessed combination of *hla/hld/hlg-2* genes as the most prevalent types. Among enterotoxin-encoding genes, *sea* was detected from 32 isolates (37%), *sed* from 1 isolate (1%), and *sea* and *sed* genes were co-detected from 4 isolates (5%), whereas *seb*, *sec*, and *tsst-1* genes were not detected. All isolates were susceptible to ciprofloxacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, oxacillin, and vancomycin, 85 isolates (99%) to penicillin G, 54 isolates (63%) to chloramphenicol, 51 isolates (59%) to erythromycin, and 7 isolates (8%) to clindamycin. Among resistant isolates, seven displayed multiantibiotic-resistance against two different antibiotics.

Key words: *Staphylococcus aureus*, coagulase, hemolysin, enterotoxin, antimicrobial susceptibility.

서론

*Staphylococcus aureus*는 공기, 토양 등에 널리 분포하며, 특히 단백질, 탄수화물이 많은 식품에 오염될 가능성이 매우 높고, 식품으로의 오염경로도 매우 다양하여 식중독의 원인균으로 식품 위생상 중요하게 다루어지고 있다. 또한 최근에 세계 각국에서 *S. aureus*에 의한 식중독 발생 빈도가 높아지고 있고 우리나라의 경우, 2003년도 국내 식중독 발생 통계에 따르면 *S.*

*aureus*에 의한 식중독은 9.62%로 장염비브리오, *Salmonella* spp.에 이어 세 번째로 많이 발생하는 식중독을 야기하는 원인균으로 알려져 있다(1-5).

*S. aureus*는 숙주의 면역작용을 방해하며 병원성 포도상구균 동정의 중요한 지표가 되는 내열성의 extracellular enzyme인 coagulase와 exotoxin인 hemolysin(용혈독소), 식중독의 원인이 되는 enterotoxin(장관독소), 그리고 toxic shock syndrome을 일으키는 toxic shock syndrome toxin 1(TSST-1, 단백독소)등 다양한 독성인자를 생산하는 것으로 알려져 있다(3,6).

이들 독성인자 중 staphylococcal enterotoxin은 *S. aureus*가 식품 내에서 증식하는 과정동안 생산된 것으로 *Clostridium botulinum* 식중독과 마찬가지로 enterotoxin을 섭취함으로써 발생되는 대표적인 독소형 식중독 유발물질이고(7,8), 1µg 이하의 독소로도 인체내에서 식중독을 발생시킬 수 있다. *S. aureus*가 증

*Corresponding author: Keun-Sung Kim, Department of Food Science and Technology, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University, 72-1, Ansung-si, Gyunggi 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-3032
Fax: 82-31-675-4853
E-mail: keunsung@post.cau.ac.kr

식할 때 생산된 enterotoxin들은 항원특이성에 따라 A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, G, H, I, J의 11종으로 구분되며, *S. aureus*은 이들 독소형중 한 가지 또는 두 가지형 이상의 독소를 생산하는 것으로 알려져 있다. 주로 A형이나 D형에 의한 식중독 사례가 많은 것으로 보고되고 있고, 또한 enterotoxin B는 이들 중 가장 강한 내열성을 가진 것으로 알려져 있다(9,10).

또한, *S. aureus*는 의료분야에서 항생제 내성 증가로 인하여 더욱 크게 문제시되고 있다. 수십년 전부터 황색 포도상구균에 의한 감염증 치료를 위해 수많은 항생물질이 개발되어 왔으나, 상용 항생제에 대한 노출이 빈번해짐에 따라 이들 균의 대부분이 여러 종류의 항균제에 대한 감수성을 상실하여 내성 혹은 높은 저항성을 지니게 되었다. 특히 1960년대부터 임상에서 methicillin-resistant *S. aureus*(MRSA)의 분리가 보고되기 시작하면서 현재까지 전체 *S. aureus* 중에서 MRSA의 분리빈도는 점점 높아지고 있는 실정이다(11,12). 그리고 주로 임상에서만 검출되었던 MRSA가 식품에서 분리되었다는 보고(13)로 미루어 보아 식품 취급자 및 소비자에게 MRSA에 대한 감염 발생 위험이 높아지고 있을 것으로 예상되며 MRSA 이외에 어떤 항생제에도 저해되지 않는 vancomycin-resistant *S. aureus*(VRSA)의 출현으로 그 심각성은 점차 커지고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는, 첫째 우유 및 상추등의 식품을 소비한 후 *S. aureus*에 의하여 식중독이 발생하였던 사례가 보고된(14) 경우가 있으므로 잠재적인 식중독 유발세균으로서 상추와 원유로부터 *S. aureus*를 분리하였다. 둘째 분리한 *S. aureus* 균주를 대상으로 이 균의 병원성과 관계가 깊은 것으로 알려진 coagulase와 hemolysin, enterotoxin, TSST-1(toxic shock syndrome toxin) 유전자를 PCR 방법을 이용하여 확인하였다. 그리고 마지막으로 이들 균주의 항생제 내성 정도를 살펴보고자 vancomycin을 비롯한 8종의 항생제에 대한 감수성 검사를 실시하여 *S. aureus* 분리균주의 생물학적 특성을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

Staphylococcus aureus 분리 및 확인

2003년 7월과 9월, 경기도 안성의 하나로 마트와 서울 가락동 농산물 시장에서 구입한 상추와 안성 소재 목장의 젖소로부터 착유된 원유를 각각 25 g 혹은 25 mL씩 무균적으로 취하여 225 mL의 0.1% phosphate buffer에 넣고 stomacher(Casta Brava, Spain)를 이용하여 2분간 균질화 시킨 후 상층액 중 1 mL을 brain heart infusion(BHI, Difco Laboratories, MI, USA) broth에 접종하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액 1 mL을 다시 10% sodium chloride가 함유된 tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories, MI, USA)에 접종하여 37°C에서 24시간 증균 배양하였다. 증균된 균액을 Baird Parker plate(BPP, Difco Laboratories, MI, USA)에 희석 배양하여 37°C에서 24시간 배양한 후 검정 집락과 clear zone이 나타난 집락에 대해 확인 실험을 실시하였다.

*S. aureus*의 확인 실험은 위와 같이 분리 배양된 평판 배지 상의 집락에 대하여 다음과 같이 실시하였다. 표현형을 확인하는 방법으로 gram staining, catalase test, gelatinase production, egg-yolk reaction, mannitol과 glucose fermenting test 그리고 Maduux와 Koehne(15)의 방법에 따른 API-Ident System(API Staph, Bio-merieux, France)을 실시하였다. 또한 유전형을 확인하는 방법으로 *S. aureus*가 가지는 *femA* 유전자(16), *nucA* 유전자(17) 그리고 *S. aureus*만 선택적인 *Sa442* 유전자(18)를 검출

하는 PCR을 수행하였고, methicillin-resistant *S. aureus*(MRSA) 인지 여부를 판정하기 위해 *mecA* 유전자(19)를 검출하는 PCR도 병행하여 실시하였다.

PCR을 이용한 coagulase, hemolysin, enterotoxin 유전자 검출

표준균주: 본 실험에 staphylococcal enterotoxin type별로 4종의 *S. aureus* 표준균주들이 사용되었으며, SEA로는 KN556, SEB로는 H288a, SEC로는 ATCC 19095, 그리고 SED로 1634/93이 각각 사용되었다.

Total DNA 추출: *S. aureus* 분리 균주를 Luria-Bertani(LB) broth 2 mL에 접종한 후 37°C에서 180 rpm으로 진탕 배양하였다. 증균 배양액을 ELISA reader(Molecular Devices, CA, USA)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 O.D. 값을 0.5가 되게 조정한 후 각각 1 mL씩 취하여 15,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 배양액으로부터 상층액을 버리고 얻은 pellet을 4% Chelex 100(Bio-Rad Laboratories, CA, USA) 400 μ L를 넣고 골고루 현탁시켰다. 그리고 현탁액을 95°C water bath에서 15분간 끓인 후 다시 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액을 새로운 시험관으로 옮기고 이를 PCR 분석을 위한 template DNA로 사용하였다.

PCR 분석 및 확인: PCR 반응 혼합액은 5 μ L의 10 \times reaction Buffer(최종 농도-400 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0), 5 μ L의 dNTP, 1 U의 *Taq* DNA polymerase (Bioneer, Daejeon, Korea), 25 pmol 각 primer 1 μ L 및 DNA template 20 μ L의 혼합액에 증류수를 최종 50 μ L가 되도록 첨가하여 PTC-100(MJ Research, Inc., MA, USA)에서 증폭시켰다. 본 실험에 사용한 primers는 Table 1에 나타내었으며, PCR 산물은 1.5% agarose(1 \times TAE) gel에서 120V로 1시간 전기영동하고 ethidium bromide(5 μ g/mL)로 염색한 후 transilluminator로 확인하였다. 산물의 크기는 100 bp Plus DNA Ladder(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 측정하였다.

Coagulase 유전자 검출: Hookey 등(20)에 의해 고안된 coagulase 유전자 검출용 primer를 사용하였고, 이 때 사용한 PCR의 시간과 온도 조건은 다음과 같다. 94°C에서 4분간 가열한 후, denaturation은 94°C에서 1분, annealing은 55°C에서 1분, 그리고 extension은 72°C 1분으로 30 cycle 반복하였고, 마지막에 72°C에서 10분간 더 반응시켰다.

Hemolysin 유전자 검출: Jarraud 등(21)이 고안한 α -hemolysin (*hla*), β -hemolysin (*hlyB*), γ -hemolysin (*hlyG-2*), δ -hemolysin (*hlyD*) 유전자를 검출할 수 있는 PCR을 하여 hemolysin type을 결정하였다. Hemolysin 유전자 검출을 위한 PCR 조건은 95°C에서 pre-denaturation을 5분한 후 denaturation을 94°C에서 1분, annealing을 55°C에서 1분 및 extension을 72°C에서 1분으로 30 cycle 반복하였으며 72°C에서 최종 extension을 10분하고 정지하였다.

Staphylococcal enterotoxin 유전자 검출: Staphylococcal enterotoxin을 A-D형으로 구분할 수 있는 Rosec 등(22)이 고안한 primers를 가지고 PCR을 실시하였고, PCR 조건은 다음과 같다. 94°C에서 pre-denaturation 3분한 뒤 94°C denaturation 30

Table 1. Sequences of the primers used in this study and sizes of their amplicons

Genes	Primer names	Primer sequences	Amplicon sizes (bp)	References
<i>femA</i>	femA-1	5'-CTTACTTACTGGCTGTACCTG	686	16
	femA-2	5'-ATGTCGCTTGTATGTGC		
<i>nucA</i>	nucA-1	5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT	280	17
	nucA-2	5'-AGCCAAGCCTTCACGAATAAAGC		
<i>Sa442</i>	Sa442-1	5'-AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	108	18
	Sa442-2	5'-CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA		
<i>mecA</i>	mec1	5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533	19
	mec2	5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTC		
<i>coa</i>	coa-1	5'-ATAGAGATGCTGGTACAGG	size polymorphisms	20
	coa-2	5'-GCTTCCGATTGTTTCGATGC		
<i>hla</i>	hla-1	5'-CTGATTACTATCCAAGAAATTTCGATTG	209	
	hla-2	5'-CTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		
<i>hlb</i>	hla-1	5'-GTGCACTTACTGACAATAGTGC	309	
	hla-2-2	5'-GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT		
<i>hld</i>	hld-1	5'-AAGAATTTTTATCTTAATTAAGGAAGGAGTG	111	21
	hld-2	5'-TTAGTGAATTTGTTCACTGTGTCGA		
<i>hlg-2</i>	mphlg-1	5'-GACATAGAGTCCATAATGCATTYGT	390	
	mphlg-2	5'-ATAGTCATTAGGATTAGGTTTCACAAAG		
<i>seu</i>	SE-f	5'-TGTATGTATGGAGGTGTAAC	-	
<i>sea</i>	sea-r	5'-ATTAACCGAAGGTTCTGT	270	22
<i>seb</i>	seb-r	5'-ATAGTGACGAGTTAGGTA	165	
<i>sec</i>	sec-r	5'-AATTGTGTTTTCTTTTATTTTCATAA	102	
<i>sed</i>	sed-r	5'-TTCGGGAAAATCACCCCTAA	306	
<i>tsst-1</i>	tst-1	5'-ATCGTAAGCCCTTTGTTG	578	23
	tst-2	5'-GTGGATCCGTCATTCATTG		

초, 40°C annealing 30초 및 72°C extension 1분을 30 cycle 반복하였으며 마지막에 72°C에서 extension을 2분하고 정지하였다.

Toxin shock syndrome toxin 1 (tsst-1) 유전자 검출: Moore 등(23)이 고안한 primer를 사용하여 PCR을 실시하였고, PCR 조건은 94°C에서 pre-denaturation 3분한 뒤 94°C denaturation 30초, 40°C annealing 30초 및 72°C extension 1분을 30 cycle 반복하였으며 72°C에서 최종 extension을 2분하고 정지하였다.

항생제 감수성 검사

Bauer 등(24)의 disc diffusion method에 의하여 항생제 8종에 대하여 감수성 시험을 실시하였다. 분리 균주를 Muller-Hinton broth(MHB, Difco Laboratories, MI, USA)에 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양액을 ELISA reader(Molecular Devices, CA, USA)로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 O.D. 값을 0.5로 희석하여 조정후 15분 이내에 멸균된 면봉을 이용하여 4 mm 두께로 준비한 Muller-Hinton Agar(MHA, Difco Laboratories, MI, USA) plate에 균일하게 도말하였다. 도말 후 5분간 평판배지를 건조시킨 다음 멸균된 핀셋으로 각각의 항생제 감수성 검사용 디스크(Fluka, MO, USA)를 20 mm 이상 거리를 유지하면서 평판배지 위에 고정시켰다. Disk가 고정된 평판배지를 37°C 배양기에서 24시간 배양한 후 생육 저지환의 직경을 측정하였다. 생육 저지환 직경에 따른 결과는 National Committee for Clinical Laboratory Standardization(NCCLS)에 준하여 감수성 여부를 판독하였다(25).

결과 및 고찰

S. aureus 분리 및 확인

일반적으로 *S. aureus*는 gram staining과 catalase test에 양성이고 gelatin을 액화하여 성장할 수 있고 egg-yolk에 의해 생육이 저해되지 않으며 혐기적 조건에서 glucose와 mannitol을 이용하여 잘 성장하는 것으로 알려져 있다. 원유와 상추에서 선택배지를 이용하여 각각 분리한 124개와 100개의 분리균주에 대하여 전통적인 방법에 의해 *S. aureus* 확인 실험을 한 결과는 Table 2에서와 같이 Gram staining은 142균주(63.4%)에서 양성반응을 보였고, catalase test는 90균주(40.2%), gelatinase 생산은 131균주(58.5%), Egg-Yolk reaction을 실시했을때 잘 성장하는 균주는 208균주(92.9%), 그리고 glucose와 mannitol을 발효하여 성장가능한 균주는 162균주(72.3%)였다. 그러나 이상에서 말한 6종류의 *S. aureus* 확인 방법은 실험과정의 노동집약적이며, 종 수준의 분리에서는 분자생물학적 방법이나 PCR을 이용한 방법에 비하여 정확성이 낮으므로 원유와 상추에서 분리한 분리균주를 대상으로 *S. aureus*가 가지는 *femA*(16), *nucA*(17), *mecA* 유전자(19) 그리고 *S. aureus*만 선택적인 *Sa442* 유전자(18)를 이용한 PCR을 실시하였다. 그 결과 *S. aureus*의 target 유전자중 *Sa442*의 경우 86균주(38.4%)에서 확인되었고, *femA* 역시 86균주(38.4%)에서 확인되었으며, *nucA*는 144균주(64.3%)에서 확인되었다. 본 실험에서는 *Sa442*, *femA*, *nucA* 유전자가 모두 확인되면 *S. aureus*로 선별하였는데 총 86균주(38.4%)가 *S. aureus*임이 확인되었다. 그러나 MRSA가 가지는 *mecA* 유전

Table 2. Numbers of bacterial isolates from lettuces and raw milk showing various phenotypic and genotypic characteristics

Typing methods	No. of isolates (%)		
	Lettuces	Raw milk	Total
Selective media	100(100.0)	124(100.0)	224(100.0)
Gram staining	63(63.0)	79(63.7)	142(63.4)
Catalase test	39(39.0)	51(41.1)	90(40.2)
Gelatinase production	59(59.0)	72(58.1)	131(58.5)
Egg-Yolk reaction	88(88.0)	120(96.8)	208(92.9)
glucose and mannitol fermentation	73(73.0)	89(71.8)	162(72.3)
API-kit	37(37.0)	49(39.5)	86(38.4)
<i>nucA</i> gene	85(85.0)	59(47.6)	144(64.3)
<i>Sa442</i> gene	37(37.0)	49(39.5)	86(38.4)
<i>femA</i> gene	37(37.0)	49(39.5)	86(38.4)
<i>mecA</i> gene	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

Table 3. Results of PCR detections on *coa* gene of *S. aureus* isolates from lettuces and raw milk

Amplicon sizes	No. of <i>S. aureus</i> isolates (%)		
	Lettuces (n=37)	Raw milk (n=49)	Total (n=86)
500 bp	1 (2.7)	1 (2.0)	2 (2.4)
580 bp	0	15 (30.6)	15 (17.4)
660 bp	36 (97.3)	17 (34.7)	53 (61.6)
740 bp	0	15 (30.6)	15 (17.4)
820 bp	0	1 (2.0)	1 (1.2)
Total	37 (100.0)	49 (100.0)	86 (100.0)

자를 검출하는 PCR에서는 어떤 균주에서도 대상 유전자가 검출되지 않아 본 실험에서 상추와 원유로부터 분리한 *S. aureus* 균주는 모두 MSSA인 것으로 판명되었다. 또한 전통적 방법과 PCR 방법에서 일치된 결과를 보인 86개의 분리균주에 대해서 API staph kit를 이용하여 *S. aureus*임을 확인한 결과, 각각의 모든 균주가 *S. aureus* ($P = 97.8\%$)임을 확인되었다. 결과적으로 본 연구에서는 원유로부터 49개 균주(39.5%)와 상추로부터 37개 균주(37.0%)를 *S. aureus*로 동정하였으며, 이들의 평균 분리 빈도는 38.4%이었다. 이는 Kang 등(2)이 혼합생유로부터 얻은 24.6%보다 높은 분리빈도이다.

Coagulase 유전자 검출

Coagulase는 내열성의 extracellular enzyme으로서 병원성 포도상구균 동정의 중요한 지표가 되며 숙주의 면역작용을 방해하여 독성인자로 작용한다. 이렇듯 staphylococci를 동정하는데 가장 유용한 방법인 coagulase test에는 슬라이드법과 시험관법이 있다. 그러나 슬라이드법은 위양성 또는 음성결과를 초래할 수도 있으며, 시험관법은 약한 양성 반응을 나타낼 수도 있고, 반응시간도 오래 걸리는 단점이 있다. 그러므로 보다 정확하고 빠른 시간내에 판독할 수 있는 coagulase 유전자를 검색하는 PCR법이 고안되었으며, 본 실험에서는 Hookey 등(19)이 고안한 coagulase 유전자 검출용 PCR primer를 가지고 coagulase test를 수행하였다.

coa(coagulase) 유전자는 81 bp short tandem repeat sequence를 가지고 있으며 균주마다 반복되는 횟수가 다양하여 결과적으로 amplicon size가 균주마다 다양하게 나타난다(26). 이러한 현상은 또한 최근에 Scherrer 등(27)이 염소와 양의 원유로부터 분리한 *S. aureus*의 *coa* 유전자에 대한 amplicon size가 500 bp

(2.7%), 580 bp(15.4%), 660 bp(32.4%), 740 bp(23.2%) 및 820 bp (23.5%)로 다양하게 검출되었다고 보고한데서 확인할 수 있다. 본 실험에서 상추와 원유로부터 분리한 86개의 *S. aureus* 분리 균주를 가지고 *coa* 유전자 검출 test를 실시한 결과에 의하면 Table 3에서와 같이 모든 분리균주에서 *coa* 유전자에 양성반응을 나타내었다. 그리고 또한 PCR 산물의 amplicon size는 500 bp(2.4%), 580 bp(17.4%), 660 bp(61.6%), 740 bp(17.4%) 및 820 bp(1.2%)로 다섯 종류가 검출되었다.

Hemolysin 유전자 검출

*S. aureus*가 가지고 있는 독소 물질중에 exotoxin인 hemolysin (용혈독소)이 있다. *S. aureus*의 hemolysin type은 5%의 sheep blood가 함유된 blood agar plate(BAP)에서 적혈구를 용해하는 성질에 따라 3그룹으로 분류되는데 α -hemolysin은 불완전한 용혈을 보여주어 용혈대가 좁고 β -hemolysin은 완전한 용혈을 보여주어 clear hemolysis zone을 형성하고 γ -hemolysin은 용혈성이 없어서 용혈대가 보이지 않는다. 그러나 이러한 3그룹으로의 분류기준은 판정이 불확실한 집락이 많아서 분류시 많은 문제점을 야기한다. 이러한 단점을 보완하고자 표현형에 의존하지 않고 PCR을 이용하여 hemolysin 유전자를 검출하는 방법이 최근 많이 사용되어지고 있다. 본 실험에서 86개의 *S. aureus* 분리균주에 대한 hemolysin 유전자 검출 여부를 조사한 결과는 Table 4와 같이 모든 균주에서 hemolysin 유전자가 검출되었다. 또한 원유로부터 분리한 4개의 균주(*hld* 유전자 보유균주)를 제외한 모든 분리균주는 hemolysin에 대하여 2종 이상 다른 종류의 multiple gene을 소유하였고, 그 중 47개 균주(54.7%)가 *hla/hld/hlg-2* 유전자를 모두 소유한 균주로서 가장 많은 분포를 나타내었다. 이는 Kang 등(15)이 원유에서 분리한 *S. aureus* 분

Table 4. Results of PCR detections on *hla*, *hnb*, *hld*, and *hlg-2* genes of *S. aureus* isolates from lettuces and raw milk

Hemolysin genes	No. of positive <i>S. aureus</i> isolates (%)		
	Lettuces (n=37)	Raw milk (n=49)	Total (n=86)
<i>hld</i>	0	4(8.2)	4 (4.7)
<i>hla</i> and <i>d</i>	17 (45.9)	14 (28.6)	31 (36.0)
<i>hld</i> and <i>g-2</i>	1 (2.7)	0	1 (1.2)
<i>hla</i> , <i>d</i> and <i>g-2</i>	19 (51.4)	28 (57.1)	47 (54.7)
<i>hnb</i> , <i>d</i> and <i>g-2</i>	0	3 (6.1)	3 (3.5)
Total	37 (100.0)	49 (100.0)	86 (100.0)

Table 5. Results of PCR detections on *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, and *tsst-1* genes of *S. aureus* isolates from lettuces and raw milk

Enterotoxin genes	No. of positive <i>S. aureus</i> isolates (%)		
	Lettuces (n=37)	Raw milk (n=49)	Total (n=86)
<i>sea</i>	11 (29.7)	21 (42.9)	32 (37.2)
<i>seb</i>	0	0	0
<i>sec</i>	0	0	0
<i>sed</i>	0	1 (2.0)	1 (1.1)
<i>sea</i> and <i>sed</i>	0	4 (8.2)	4 (4.6)
<i>tsst-1</i>	0	0	0
Total	11 (29.7)	26 (53.1)	37 (43.0)

리균주 중 multiple hemolysin gene 소유균주가 55.6%였다는 보고와 Salasia 등(28)이 인도네시아의 central Java지방의 원유에서 분리한 *S. aureus* 분리균주 중 multiple hemolysin gene 소유균주가 27.8%로 분리균주 중 가장 높은 분리비율을 나타내었다고 보고한 결과와 유사하였다.

Enterotoxin, TSST-1 유전자 검출

Staphylococcal enterotoxin은 사람에게 gastroenteric syndrome을 일으키거나 toxic shock을 일으킬 수 있는 extracellular protein이다. *S. aureus*가 증식할 때 생산된 enterotoxin은 항원특이성에 따라 SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SEC₃, SED, SEE, SEG, SEH, SEI 및 SEJ의 11가지 항원형이 보고되어 있으며, SEF(또는 TSST-1)는 1형형이 보고되어 있다. 또한 최근에 Orwin 등(29)은 superantigenicity, pyrogenicity, enterotoxin의 치사효과를 증가시키며 토끼에서 치사효과를 가지는 SEK를 분리하였다고 보고하였다.

Staphylococcal enterotoxin은 *in vivo* 또는 *in vitro*에서 생물학적 활성에 의해 검출될 수 있으므로 실험실 내에서 간단하게 latex agglutination에 의한 검출 방법이 일반적으로 널리 이용되어 왔다. 그러나 post-genome 시대인 요즘에는 위에서 보고된 staphylococcal enterotoxin 유전자의 염기서열이 규명되어 그들을 이용한 PCR방법들이 활발히 연구되어 대체방법으로 이용되고 있다.

본 연구를 위하여 상추와 원유로부터 분리한 *S. aureus*를 PCR 방법을 이용하여 staphylococcal enterotoxin 유전자를 검색한 결과, Table 5에서와 같이 86개의 *S. aureus* 분리균주 중 37균주(43.0%)가 enterotoxin 유전자를 소유하였다. 유전형별로 보면 *sea* 유전자가 32균주(37.2%)로서 우점형으로 나타났으며, *sed* 유전자가 1균주(1.1%), *sea*와 *sed* 유전자가 모두 검출된 분리균주는 4균주(4.6%)였다. 이는 Lim 등(30)이 보고한 원유로부터 분리한 *S. aureus* 균주들 중 *sea* 유전자를 소유한 균주가 19.3%로 가장 높게 나타났다는 결과와 일치하였다. 또한 어떤 분리

균주로부터 특정한 enterotoxin 유전자가 검출되면 그 균주 내에서 그 유전자로부터 해당되는 enterotoxin이 발현되는 것으로 알려져 있으므로(31), PCR을 통하여 얻은 본 실험의 결과는 일반적으로 식품에서 분리된 균주중 enterotoxin type A가 많이 검출된다고 보고한 기존의 실험결과들과 일치한다고 할 수 있다. Casman 등(32)은 미국산 냉동식품과 원유에서 분리한 황색 포도상구균으로 독소 생산 실험을 한 결과 enterotoxin type A와 다른 type의 혼합형이 50% 이상을 차지하고 양젖에서는 enterotoxin type A와 D가 전체의 35%를 차지하였으며, 특히 축산제품과 식육제품일 경우 96%가 enterotoxin type A와 다른 type의 혼합형이라고 보고하였다. 또, Sokari 등(33)은 나이지리아 식육제품에서 enterotoxin type A, B, D 및 C의 비율이 각각 57%, 15%, 6% 및 5%라고 보고하였고 우리나라의 경우도 김밥에서 분리한 *S. aureus* 균주에 대해 enterotoxin을 시험한 결과에 의하면 enterotoxin type A가 42.5%로 가장 높게 나타나 본 실험에서 *sea* 유전자가 높은 빈도로 검출된 결과와 일치하였다(5).

한편, 본 실험에서는 *seb*와 *sec* 및 *tsst-1* 유전자는 검출되지 않았는데, 이는 식육제품에서 *sec* 및 *sed* 유전자가 많이 검출된다는 다음의 보고와는 상이하였다. Hazariwala 등(34)의 가금류 유래 *S. aureus* 분리균주에 대하여 enterotoxin 유전자 검출 시험을 한 결과에 의하면 *sea*, *seb*, *sec* 및 *sed* 유전자가 각각 12.2%, 2.4%, 22%와 24.4%로 각각 검출되어 *sec* 및 *sed* 유전자의 검출 빈도가 높았다. 더욱이 Salasia 등(28)은 독일의 Hesse 지방 원유에서 분리한 *S. aureus* 균주들은 *sec*와 *sed* 유전자를 각각 57.9%와 15.8%씩 보유하고 있다고 보고하였다. 또한 Sharma 등(35)에 의하여 양젖으로부터 분리된 *S. aureus* 분리균주에서는 *sea* 유전자가 3.0%, *sec* 유전자는 61.2% 그리고 *sea*와 *sec* 유전자가 9.0%씩 각각 검출되었고, 가금류에서 분리된 *S. aureus* 분리균주에서는 *sed* 유전자가 50.0% 검출되었다고 보고하였다. 한편 Klotz 등(36)은 임상에서 분리한 *S. aureus* 분리균주에서도 *sea*, *seb*, *sec* 및 *sed* 유전자의 검출 비율이 12.9%,

Table 6. Results of antibiotic susceptibility tests on *S. aureus* isolates from lettuces and raw milk

Antibiotics	Sources	No. of isolates (%)		
		susceptible	intermediate	resistant
Chloramphenicol	Lettuce (n=37)	23 (62.0)	13 (35.0)	1 (3.0)
	Raw milk (n=49)	31 (63.0)	15 (31.0)	3 (6.0)
	Subtotal	54 (62.8)	28 (32.6)	4 (4.7)
Ciprofloxacin	Lettuce (n=37)	37 (100.0)	0	0
	Raw milk (n=49)	49 (100.0)	0	0
	Subtotal	86 (100.0)	0	0
Clindamycin	Lettuce (n=37)	3 (8.0)	2 (5.0)	32 (87.0)
	Raw milk (n=49)	4 (8.0)	6 (12.0)	39 (80.0)
	Subtotal	7 (8.1)	8 (9.3)	71 (82.6)
Erythromycin	Lettuce (n=37)	23 (62.0)	12 (32.0)	2 (6.0)
	Raw milk (n=49)	28 (57.0)	11 (22.0)	10 (21.0)
	Subtotal	51 (59.3)	23 (26.7)	12 (14.0)
Oxacillin	Lettuce (n=37)	37 (100.0)	0	0
	Raw milk (n=49)	49 (100.0)	0	0
	Subtotal	86 (100.0)	0	0
Penicillin G	Lettuce (n=37)	37 (100.0)	0	0
	Raw milk (n=49)	48 (98.0)	0	1 (2.0)
	Subtotal	85 (98.8)	0	1 (1.2)
Trimethoprim+ sulfamethoxazole	Lettuce (n=37)	37 (100.0)	0	0
	Raw milk (n=49)	49 (100.0)	0	0
	Subtotal	86 (100.0)	0	0
Vancomycin	Lettuce (n=37)	37 (100.0)	0	0
	Raw milk (n=49)	49 (100.0)	0	0
	Subtotal	86 (100.0)	0	0

9.7%, 21.5% 그리고 14.0%로 나타나 *sec*와 *sed* 유전자의 검출 빈도가 상대적으로 높다고 보고하였다.

결론적으로 본 논문에서 상추와 원유로부터 분리한 *S. aureus* 분리균주의 enterotoxin 유전자 검출 실험에서 *sea* 유전자가 가장 높은 빈도로 검출된 결과는 Lim 등(30)의 결과와 일치되었으나, 가금류와 생유 유래균 그리고 임상에서 분리한 *S. aureus* 분리균주에서 *sec*와 *sed* 유전자가 주로 검출되었다는 Hazariwala 등(34), Salasia 등(28), Sharma 등(35) 그리고 Klotz 등(36)의 보고와는 상이하였다. 그러나 식품에서 분리된 균주들의 경우 대부분 enterotoxin type A를 주로 생성한다는 여러 다른 보고(5,32,33)들도 있다. 그러므로 어떤 종류의 enterotoxin type을 생성하는 *S. aureus*가 어떤 식품별로 주로 오염되는지에 대한 조사가 좀 더 활발히 이루어져야 할 것으로 생각된다.

항생제 감수성 시험

*S. aureus*는 β -lactamase를 생산하므로 β -lactamase에 의하여 불활성화되는 항생제에 대한 내성이 매우 높으며 이는 β -lactamase 생산에 관여하는 내성 plasmid(R-plasmid)의 획득에 의해 주로 발생된다. 이러한 β -lactamase 생산 *S. aureus*의 효과적인 치료를 위하여 이 효소에 분해되지 않는 methicillin 등의 다양한 항생제가 개발되어 penicillin 내성균주의 치료에 사용되었으나 현재는 methicillin을 포함한 다양한 항생제에 대한 내성균주의 출현으로 *S. aureus* 감염증 치료에 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다. 또한 Jones 등(13)은 주로 임상에서만 검출되었던 MRSA가 바비큐된 돼지고기와 coleslaw에서 분리되었

다고 보고한 것으로 미루어 보아 식품 취급자 및 소비자에게 MRSA에 대한 감염발생 위험이 높아지고 있을 것으로 예상되어, 현 분리균주의 내성 정도를 파악하고자 항생제 감수성 실험을 하였다.

원유와 상추에서 분리한 *S. aureus* 86개 균주의 chloramphenicol, ciprofloxacin, penicillin G, oxacillin, erythromycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, vancomycin 및 clindamycin 등 8종의 항생제에 대한 감수성 시험을 실시한 결과에 의하면 Table 6과 같이 모든 균주가 ciprofloxacin, oxacillin, vancomycin 및 trimethoprim/sulfamethoxazole에 대해 감수성을 나타내었고 penicillin G(98.8%)에 대한 높은 감수성을 보였으나 chloramphenicol(63%), erythromycin(59%)에 대한 감수성은 낮았다. 특히 chloramphenicol과 erythromycin에 대한 중간 정도의 내성을 나타낸 균주는 각각 32.6%와 26.7%이었다. Chloramphenicol, clindamycin, erythromycin 및 penicillin G에 대하여는 각각 4.7%, 82.6%, 14.0% 및 1.2%의 균주가 내성을 가지고 있었고, 시험한 *S. aureus* 86균주 중에서 81균주(94.2%)는 적어도 한 항생물질에 대하여 내성을 나타내었다. 2가지 항생물질에 대하여 내성을 나타낸 균주는 7균주(8.1%)로 이들 중 4균주(4.7%)는 chloramphenicol과 clindamycin에 내성이었으며, 3주(3.5%)는 clindamycin과 erythromycin에 대하여 내성을 나타내었으나 3가지 이상의 항생물질에 내성을 보이는 균주는 나타나지 않았다. 이는 Speller 등(37)이 영국과 웨일즈에서 분리한 포도상구균의 methicillin 내성은 1989-1991년까지는 1.5%이었으나 1995년에는 13.2%로 급격히 증가하였으며, 동시에 erythromycin, clindamy-

cin, ciprofloxacin, gentamicin, trimethoprim, rifampicin에 대한 내성이 증가하였다고 보고한 것과 Baiocchi 등(38)이 oxacillin 내성이 1980년대 39%에서 1990년대 69%로 증가하였으며, ciprofloxacin, clindamycin, rifampicin에 대한 내성이 증가하였다고 보고한 내용과 유사한 결과이다.

또한, 분리된 *S. aureus*중에서 MRSA인지 아닌지 여부를 판정하기 위해 *mecA* 유전자를 이용한 PCR을 실시한 결과 모든 균주가 methicillin-susceptible *S. aureus*(MSSA)로 밝혀졌고, 항생제 실험 결과 전 균주가 vancomycin과 oxacillin에 감수성을 나타내어 아직까지 식품에서 VRSA나 MRSA의 검출 빈도가 매우 낮은 것으로 사료된다. 그러나, Ha 등(9)의 논문에서 초등학교 급식소의 식수, 조리 종사자의 손, 앞치마, 냉장고 등에서 분리한 *S. aureus* 균주는 모두 항생제 ampicillin과 penicillin에 내성을 보였고, 특히 급식소의 식수로부터 분리한 *S. aureus* 균주의 일부는 oxacillin에 내성을 가지는 MRSA 균주인 것으로 나타났다는 보고로 알 수 있듯이 항생제의 잦은 노출로 인하여 임상에서뿐만 아니라 식품환경이나 일반 주거환경에서도 점차 항생제 내성을 갖는 균주의 출현이 증가 추세에 있어 이 분야에 대한 체계적이고 지속적인 연구가 요청되고 있다.

요 약

*S. aureus*는 자연계에 널리 상재해 있으며 우리 나라의 경우 *Salmonella* spp.에 의한 식중독 다음으로 많이 발생하는 식중독의 원인균으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 상추와 원유로부터 분리한 *S. aureus*(n=86)의 표현형 및 유전형 특징을 파악할 목적으로 coagulase, hemolysin, enterotoxin 및 toxic shock syndrome toxin 1 등에 대한 유전자를 대상으로 PCR 방법을 이용하여 typing하였으며, 또한 8가지 항생제에 대하여 항생제 감수성 시험을 수행하여 그들 분리균주들의 항생제 내성 정도를 결정하였다. 상추와 원유로부터 분리한 *S. aureus* 균주는 모두 coagulase 유전자를 보유하고 있었고, 또한 PCR 산물의 amplicon size는 500 bp(2.4%), 580 bp(17.4%), 660 bp(61.6%), 740 bp(17.4%) 및 820 bp(1.2%)로 다섯 종류가 검출되었다. Hemolysin 유전자의 경우는 원유로부터 분리한 4개의 *hld* 유전자 보유균주를 제외하고 모든 분리균주에서 multiple hemolysin gene을 보유하였으며, 그 중 47개 균주(54.7%)가 *hla/hld/hlg-2* 유전자를 모두 소유한 균주로서 가장 많은 분포를 나타내었다. 한편, enterotoxin 유전자를 소유한 *S. aureus* 분리균주는 37 균주(43.0%)로서 그 중 32균주(37.2%)에서 *sea* 유전자가 검출되었고, 1균주(1.1%)에서 *sed* 유전자, 그리고 4균주(4.6%)에서 *sea*와 *sed* 유전자가 모두 검출되었으나, *seb*, *sec* 혹은 *tsst-1* 유전자는 검출되지 않았다. 그리고 항생제 감수성 시험 결과에서는 모든 균주가 ciprofloxacin, oxacillin, vancomycin 그리고 trimethoprim/sulfamethoxazole에 대하여 감수성을 나타내었고 penicillin G(98.8%)는 높은 감수성을 보였으나 chloramphenicol (63%)과 erythromycin(59%)은 감수성이 낮았고, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin 및 penicillin G에 대하여는 각각 4.7%, 82.6%, 14.0% 및 1.2%의 균주가 내성을 가지고 있었다. 또한 항생제 다제내성 양상을 살펴본 결과에 의하면 사용된 8 종류의 항생물질들 중 2가지 항생물질에 대하여 내성을 나타낸 균주는 7개(8.1%)이고, 3종 이상의 항생물질에 대하여 다제내성을 보이는 균주는 나타나지 않았다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.(03-PJ1-PG1-CH11-0003).

문 헌

1. Chung GS, Tak RB. Effects of pH, temperature and food additives on staphylococcal growth and enterotoxin production. Korean J. Vet. Publ. Hlth. 17: 13-38 (1993)
2. Kang HJ, Choe HG, Son WG. Incidence and characterization of coagulase-positive *Staphylococcus aureus* in bulk milk from dairy farms. Korean J. Vet. Publ. Hlth. 14: 9-13 (1990)
3. Kim SG, Lee YS, Lee TJ, Lee TY, Kim HS. Identification and antimicrobial susceptibility aspects of pathogenic *Staphylococcus aureus*. J. Korean Soc. Microbiol. 28: 251-259 (1993)
4. Lee HM, Lee GY, Yoon EK, Kim HJ, Kang YS, Lee DH, Park JS, Lee SH, Woo GJ, Kang SH, Yang JS, Yang KH. Computation of maximum edible time using monitoring Data of *Staphylococcus aureus* in kimbap and food micromodel. J. Food Hyg. Safety 19: 49-54 (2004)
5. Kang YS, Yoon SK, Jwa SH, Lee DH, Woo GJ, Park YS, Kim CM. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in Kimbap. J. Food Hyg. Safety 17: 31-35 (2002)
6. Yoon HS, Lee HH, Kim SY. Studies of coagulase production and isolation of R-plasmid from *Staphylococcus aureus*. J. Korean Soc. Microbiol. 22: 251-259 (1993)
7. Atanassova V, Meindl A, Ring C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxin in raw pork and uncooked smoked ham-a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. Int. J. Food Microbiol. 68: 105-113 (2001)
8. Kim DH, Kwon KR, Lee KH, Ju YR, Oh KS, Kark HS. Study on staphylococcal enterotoxin. Report of NIH Korea 25: 297-307 (1988)
9. Ha KS, Park SJ, Shim WB, Chung DH. Screening of MRSA (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) and *seb* Gene in producing strains isolated from food service environmental of elementary schools. J. Food Hyg. Safety 18: 79-86 (2003)
10. Park SG, Hwang YO, Jung JH, Lee KM. Biological characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from food-borne patients in seoul. J. Food Hyg. Safety 16: 159-167 (2001)
11. Hussain Z, Stoakes L, Garrow S, Longo S, Fitzgerald V, Lannigan R. Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative, coagulase-Negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. J. Clin. Microbiol. 38: 2051-2054 (2000)
12. Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B, Lehn N. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. J. Clin. Microbiol. 38: 2429-2433 (2000)
13. Jones TF, Kellum ME, Porter SS, Bell M, Schaffner W. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Emerg. Infect. Dis. 8: 82-4 (2002)
14. Bergdoll MS. Foodborne infections and intoxication. 2nd ed. Bryan FL. Academic Press, NY, USA (1979)
15. Maddux RL, Koehne G. Identification of *Staphylococcus hyicus* with the API Staph. J. Clin. Microbiol. 15: 984-986 (1982)
16. Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, Gala GL. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol. 33: 2864-2867 (1995)
17. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nucA* gene. J. Clin. Microbiol. 30: 1654-1660 (1992)
18. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid iden-

- tification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 36: 618-623 (1998)
19. Barski P, Piechowicz L, Galinski J, Kur J. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. Mol. Cell. Probes 10: 471-475 (1996)
 20. Hookey JV, Richardson JF, Cookson BD. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. J. Clin. Microbiol. 36: 1083-1089 (1998)
 21. Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. Infect. Immun. 70: 631-641 (2002)
 22. Rosec JP, Giguad O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. Int. J. Food Microbiol. 77: 61-70 (2002)
 23. Moore PCL, Lindsay JA. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. J. Clin. Microbiol. 39: 2760-2767 (2001)
 24. Bauer AW, Kerdy WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Path. 45: 493-496 (1966)
 25. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 6th ed. M7-A6. NCCLS, Wayne, PA, USA (2003)
 26. Goh S, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. Molecular typing of *S. aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. J. Clin. Microbiol. 30: 1642-1645 (1992)
 27. Scherrer D, Corti S, Muehlherr JE, Zweifel C, Stephan R. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* in bulk-tank milk samples of goats and sheep. Vet. Microbiol. 101: 101-107 (2004)
 28. Salasia SI, Khusnan Z, Lammler C, Zschock M. Comparative studies on pheno- and genotypic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis in central Java in Indonesia and Hesse in Germany. J. Vet. Sci. 5: 103-109 (2004)
 29. Orwin PM, Leung DY, Donahue HL, Novick RP, Schlievert PM. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. Infect. Immun. 69: 360-366 (2001)
 30. Lim SK, Joo YS, Moon JS, Lee AR, Nam HM, Wee SH, Koh HB. Molecular typing of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Korea. J. Vet. Med. Sci. 66: 581-584 (2004)
 31. Olsen JE, Aabo S, Hill W, Notermans S, Wernars K, Granum PE, Popovic T, Rasmussen HN, Olsvik O. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. Int. J. Food Microbiol. 28: 1-78 (1995)
 32. Casman EP, Bennett RW, Dorsey AE, Issa JA. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. J. Bacteriol. 94: 1875-1882 (1967)
 33. Sokari TG, Anozie SO. Occurrence of enterotoxin producing strains of *Staphylococcus aureus* in meat and related samples from traditional markets in Nigeria. J. Food Prot. 53: 1069-1070 (1990)
 34. Hazariwala A, Sanders Q, Hudson CR, Hofacre C, Thayer SG. Distribution of staphylococcal enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from poultry and human invasive staphylococcal disease. Avian Dis. 46: 132-136 (2002)
 35. Sharma NK, Rees CE, Dodd CE. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1347-53 (2000)
 36. Klotz M, Opper S, Heeg K, Zimmermann S. Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A to D by real-time fluorescence PCR assay. J. Clin. Microbiol. 41: 4683-4687 (2003)
 37. Speller DC, Johnson AP, James D, Marpes RR, Chalett A, George RC. Resistance to methicillin and other antibiotics in isolates of *Staphylococcus aureus* from blood and cerebrospinal fluid, England and Wales, 1989-95. Lancet 359: 323-325 (1997)
 38. Baiocchi P, Galie M, Santini C, Czarfagna P, Cassone M, Tarasi D, Venditti M. *In vitro* susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from blood to currently used antistaphylococcal drugs. J. Chemother. 10: 25-28 (1998)

(2004년 12월 2일 접수; 2005년 2월 1일 채택)