

국내 다양한 식품에서 분리한 황색포도상구균의 오염도 및 병원성 인자의 특징

조용선* · 이주영 · 이명기¹ · 신동빈 · 김동호² · 박기문³

한국식품연구원 식품분석센터, ¹한국식품연구원 발효기능연구단, ²서원대학교 보은대추산업육성사업단, ³성균관대학교 생명공학과 식품생명공학부

Prevalence and Characterization of *Staphylococcus aureus* Pathogenic Factors Isolated from Various Foods in Korea

Yong-sun Cho*, Joo-young Lee, Myung-Ki Lee¹, Dong-Bin Shin, Dong-Ho Kim², and Ki-Moon Park³

Food Analysis Center, Korea Food Research Institute

¹Fermentation and Functionality Research Group, Korea Food Research Institute

²Boeun Jujube Industry Support Center, Seowon University

³Food Science and Biotechnology, School of Life Science and Biotechnology, Sungkyunkwan University

Abstract *Staphylococcus aureus*, a major human pathogen, produces a wide array of toxins, which causes various types of disease symptoms. Prevalence of *S. aureus* in various foods collected during 2006-2008 in Korea was investigated. *S. aureus* was isolated from 275 of 5,186 (5.3%) food samples collected from hyper-markets in Korea. Seasonal temperature affected the prevalence of *S. aureus* in various foods with high isolation rate during the summer. Most of the enterotoxigenic strains produced enterotoxin A only or enterotoxin A in combination with another toxin. A total of 54.5% of the tested strains contained either one or more enterotoxin genes and 3.6% possessed a *tst* gene. This study offers basic information for securing the stability of food during storage and circulation, and provides an epidemiological tool to study the cause, origin and temporal spread of *S. aureus* food poisoning.

Key words: food, *Staphylococcus aureus*, prevalence, enterotoxin

서 론

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)은 자연 환경에 대한 저항성이 강하기 때문에 자연계에 광범위하게 분포하고 있으며 사람이나 동물의 화농성 병소에 존재할 뿐만 아니라 건강한 사람과 동물의 피부 등에도 상재하고 있어 식품과 인체에 오염될 가능성이 매우 높다. 황색포도상구균 식중독의 발생은 원인균으로부터의 오염, 오염된 식품에서의 원인균의 증식 및 enterotoxin 생산의 3단계를 거친다. 식중독 발생의 원인 식품은 다양하며 우리나라에서는 김밥, 도시락 등 전분질을 주재료 하는 곡류와 그 가공품에 주로 분포되어 있으며, 육류와 어패류에 의해서도 많이 발생하고 있다. 황색포도상구균이 생성하는 병원성 인자 중 장독소(enterotoxin)는 16가지(A, B, C1, C2, C3, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O)가 확인된 상태이며 현재 18 종류가 알려져 있다(1-6). 그러나 새로운 장독소와 식중독 발생의 관계는 현재까지 완전하게 알려져 있지 않다. 황색포도상구균 중 SEA, SEB, SEC, SED 및 SEE에 의한 식중독이 95%를 차지하며 5%만이 새로운 장독소에 의한 것이라고 알려져 있다(7,8). 장독소 SEA, SEE는

temperate(용원성) bacteriophage와 유전적 연관성을 지니며 염기 서열이 81% 일치함을 보인다. SEA는 대수증식기의 중간 단계부터 생성되며 세계적으로 가장 빈번하게 식중독과 연관되는 독소이다(9). 장독소 SEB의 유전자는 염색체와 연관되어 있다. 장독소 SEC 유전자는 *Streptococcus*가 생산하는 pyogenic 독소와 유사한 구조와 면역학적 특징을 지니는 것으로 알려져 있다. 특히 장독소 SEC형의 경우 C1, C2, 및 C3 형이 존재하는데 구조적, 면역학적으로 약간의 차이를 나타낸다. 장독소 SED는 penicillin 내성 유전자를 보유하는 plasmid의 start codon에서 266 base upstream에 위치한다고 보고되어 있다(10,11). 장독소를 생산하는 황색포도상구균은 이들 독소형 중 한 가지 또는 두 가지형 이상의 독소를 생산하는 것으로 알려져 있고 독소형과 관계없이 모두 식중독을 일으킬 수 있으나, 주로 SEA형이나 SED형에 의한 식중독 사례가 많은 것으로 보고되어 있다(12). 황색포도상구균은 비교적 열에 강한 세균이지만 80°C에서 30분간 가열하면 사멸한다. 그러나 황색포도상구균에 의해 생성된 독소는 열에 매우 강하여 끓여도 파괴되지 않고, 건조, 냉장, 냉동, 상온 등 대부분의 유통조건에서 안정하기 때문에 황색포도상구균에 의해 식품이 오염되었을 때는 식중독 위험에 높게 노출되어 있다. 최근 환경의 변화와 외식 산업의 발달로 식중독이 증가하고 그 종류도 다양해지고 있으며 우리나라 식중독 발생 중에 황색포도상구균에 의한 식중독은 최근 몇 년 간 가장 중요한 발생 원인이 되고 있다. 따라서 시중에서 판매되고 있는 초밥, 김밥, 식육 제품, 크립이 함유된 빵, 케이크류, 냉면에서 황색포도상구균의 분포를 확인하였으며 이 중 높은 검출율을 보인 식품에 대해서는 정량

*Corresponding author: Yong-Sun Cho, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9242
Fax: 82-31-780-9280
E-mail: yscho@kfri.re.kr
Received May 2, 2011; revised June 28, 2011;
accepted June 28, 2011

분석을 하였다. 우리나라에서 황색포도상구균에 의한 식중독 노출사고가 높음에도 불구하고 황색포도상구균의 장독소들에 대한 지속적인 연구가 미비한 실정이다. 따라서 독소형 식중독인 황색포도상구균의 장독소 특성을 조사 하였으며 이들 장독소의 유전자형을 파악하고 우점형을 결정하여 식중독 원인이 되는 국내 식품의 유통, 조리, 보관 시 안전성을 확보하는 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

표준균주

본 실험에 사용한 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538은 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul, Korea)에서 분양받아 표준 균주로 사용하였다. *S. aureus* ATCC 13565(SEA), ATCC 14458(SEB), ATCC 23235(SED), ATCC 27664(SEE)는 한국미생물보존센터에서 분양받았으며 *S. aureus* ATCC 19095(SEC)는 American type culture collection(ATCC, Baltimore, MD, USA)에서 분양 받아서 사용하였다. 검역원에서 분양받은 *S. aureus* FRI 913은 장독소 *sea*, *sec*, *see*, *sel* *sek*를 생성한다. NRS 110은 장독소 *seg*, *sei*, *sej* 를 *S. aureus* NRS 111은 *tst* 독소를, *S. aureus* NRS 113은 장독소 *seg*, *seh*, *sei*를 생성한다. NRS 110, 111, 113은 국립 보건원에서 분양 받아서 사용하였다.

시료

2006년부터 2008년까지 대형유통매장에서 판매되고 있는 초밥 2159건, 김밥 1197건, 크림이 포함된 빵이나 케이크 685건, 가열처리가 된 식육 제품 744건, 냉면 401건의 총 5,186건의 식품 시료를 사용하여 황색포도상구균을 정성 분리하였으며 여기서 분리된 균주를 시험 대상으로 사용하였다. 2008년부터 2010년까지 초밥 1312건, 김밥 135건, 냉면 366건의 총 1,813건의 시료에 대해서는 정량 시험을 하였다. 모든 시료는 냉장 상태로 운송하여 4시간 이내에 실험을 하였다.

황색포도상구균의 정성 분석

시료 25 g을 225 mL 10% NaCl이 첨가된 tryptic soy broth (Merck, Darmstadt, Germany)를 넣고 stomacher(Interscience, Saint Noaw, France)에서 균질화하여 37°C에서 24시간 증균 배양 하였다. 증균 배양액은 Baird parker agar(Merck)를 이용하여 37°C에서 24시간 회전 배양 후 lecithin을 분해하여 convex colony 주위에 약 2-5 mm의 불투명한 백색환의 검정색을 띤 집락을 선택 하였다. coagulase activity를 확인하기 위해 baird parker RPF agar(bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)를 이용하여 37°C에서 24시간 회전 배양 후에 coagulase가 생성된 회색빛을 띠는 검정색의 불투명한 환을 형성한 집락을 선별하였다. 선별된 집락은 그람염색, 용혈능을 확인하고 VITEK 2(Biomeriux, France)를 이용해 생화학 반응을 확인 동정하였다.

황색포도상구균의 정량 분석

시료 25 g에 225 mL 멸균 인산 완충 용액을 넣고 stomacher (Interscience)에서 균질화 한 후 이 용액을 1/40, 1/400 하여 TEMPO STA card(bioMerieux)에 채운 후 37°C에서 24시간 배양한 후 TEMPO Reader(bioMerieux)로 결과값(CFU/g)을 산출하였다.

RPLA(Reversed Passive Latex Agglutination)를 이용한 황색포도상구균의 독소 검사

정성 시험으로 분리한 균주를 tryptic soy broth(Difco, Detroit, MI, USA)에서 35°C, 24시간 배양 후, 3,000×g에서 20분간 원심 분리 후 상등액을 시험용액으로 하여 microplate에 시험 용액을 희석하여 SET-RPLA(Denka Seiken, Tokyo, Japan)의 감작 latex와 대조 latex 25 µL를 각각 첨가하여 10분간 잘 교반하고, 15-20°C에서 18-20시간 방치 후 latex의 침강상을 육안으로 관찰하여 결과를 판정하였다.

PCR을 이용한 황색포도상구균의 독소 검사

정성 시험으로 동정 확인한 균주를 nutrient agar(Merck)를 이용하여 37°C에서 18-24시간 배양 후 genomic DNA extraction kit(RBC, Taipei, Taiwan)를 사용하여 주형 DNA를 분리 사용하였다. PCR에 사용한 primer는 황색포도상구균의 식중독 유발 병원성 독소인 장독소 유전자 *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*와 *seg*, *seh*, *sei*, *sej* 그리고 *tst*로 구성하여 각 장독소 유전자와 특이적으로 결합하는 primer를 사용하였으며 16S rRNA는 internal positive primer로서 사용하였다(Bioneer, Daejeon, Korea). Oligonucleotide primer

Table 1. Staphylococcal toxin-specific primer sequences used for multiplex PCR of staphylococcal toxin genes (*sea/see*, *seb-sed*, *seg-sej*, *tst/16S rRNA*)

Toxin gene	Oligonucleotide sequence	Size (bp)	Reference
SA-U	Universal forward primer TGTATGTATGGAGGTGTAAC	-	13
<i>sea</i>	Reverse primer for <i>sea</i> ATTAACCGAAGGTTCTGT	270	13
<i>see</i>	Reverse primer for <i>see</i> GCCAAAGCTGTCTGAG	213	13
<i>seb</i>	TCGCATCAAACCTGACAAACG GCAGGTACTCTATAAGTGCCTGC	477	14
<i>sec</i>	CTCAAGAACTAGACATAAAAAGCTAGG TCAAATCGGATTAACATTATCC	271	14
<i>sed</i>	CTAGTTTGGTAATATCTCCTTTAAACG TTAATACTATATCTTATAGGGTAAACATC	318	14
<i>seg</i>	CGTCTCCACCTGTTGAAGG CCAAGTGATTGTCTATTGTCCG	327	15
<i>seh</i>	CAACTGCTGATTAGCTCAG GTCGAATGAGTAACTCTCTAGG	360	15
<i>sei</i>	CAACTCGAATTTTCAACAGGTAC CAGGCAGTCCATCTCTCTG	465	15
<i>sej</i>	CATCAGAACTGTGTTCGGCTAG CTGAATTTTACCATCAAAGGTAC	142	15
<i>tst</i>	AAGCCCTTTGTTGCTTGCG ATCGAACTTTGGCCCAIACCTT	445	15
16S rRNA	GTAGGTGGCAAGCGTTATCC CGCACATCAGCGTCAG	228	14

의 sequence는 Table 1과 같다(13,14,15). Multiplex PCR 반응액은 1 U Taq DNA polymerase, 250 μ M dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂(Bioneer)에 25-50 pmol primer, 주형 DNA 3 μ L를 첨가하여 총 반응액을 20 μ L로 하였다. DNA 증폭은 tgradient(Biometra, Goettingen, Germany) PCR을 이용하였으며 각 primer는 장독소 *sea/see*, *seb-sed*, *seg-sej*, *tst/16S* rRNA 4가지로 나누어 사용하였다. 반응 조건은 95°C 1분간 denaturation, 55°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 1분간 extension하는 것을 1 cycle로 하여 35 cycle을 반응 시키고 72°C에서 5분간 반응을 연장하였다. 반응이 끝난 후에는 4°C에서 보관하였다. 증폭된 DNA는 1.5% Seakem agarose(Takara, Kyoto, Japan) gel에서 100 V 25분간 전기영동 한 후 ethidium bromide (1 μ g/mL)로 15분 염색 한 후 20분 탈색한 후 UV로 확인하였다. DNA ladder는 100 bp(Bioneer)를 사용하였다.

분자형별 방법간의 유용성 비교

분리주들의 PCR 방법으로 분석한 황색포도상구균의 분자형별 분석 방법의 유용성을 비교하기 위해 typeability와 DI(Discrimination index) 값을 구하였다. Hunter와 Gaston(16,17,18)에 의하면 DI 값이 1.0이면 발생 집단내의 모든 분리주들을 구별할 수 있는 분석법이며, DI 값이 0이면 모든 분리주들이 같은 유형을 가지는 것으로 해석된다.

Typeability는 typing이 가능한 균주수를 전체 검사한 균주수로 나누었다.

$$T=Nt/N \quad (Nt: \text{typing이 가능한 균주수 } N: \text{전체 균주수})$$

변별력을 비교하기 위해 Hunter와 Gaston(16,17,18)의 공식을 참조하여 DI 값을 구하였다.

$$DI=1-1/N(N-1) \times \sum nj(nj-1)$$

(N: 검사를 시행한 균주수, nj: j 번째 형에 속하는 균주들의 수)

분석 및 통계처리

SPSS version 12.0(SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 비연속변수에 대해서는 χ^2 -계급으로 유의확률 $p < 0.05$ 신뢰도 구간으로 통계학적 유의성을 해석하였으며 피어슨 상관관계 분석을 이용해서 상관계수 0.05 수준에서 황색포도상구균의 독소 유전자 간의 유의성을 판정하였다.

결과 및 고찰

국내 식품에서의 황색포도상구균의 분리

2006년부터 2008년까지 대형유통매장에서 판매되고 있는 초밥 2,159건, 김밥 1,197건, 크림이 포함된 빵이나 케이크 685건, 가열처리가 된 식육 제품 744건, 냉면 401건의 총 5,186건의 식품 시료를 사용하여 황색포도상구균을 분리 실험 한 결과 2006년 4.9%, 2007년 5.5%, 2008년 5.4%로 전체 분리율은 5.3%로 매년 비슷한 수치의 분리율을 보였으며(Table 2), 가열 과정이 들어간 식육 제품이 다른 식품보다는 낮은 분리율(1.7%)을 보였으나 가열 과정을 거쳤어도 황색포도상구균이 완전히 사멸하지 않고 남아 있음을 알 수 있었다. 특히 냉면에서는 8.7%로 가장 높은 분리율을 보였다(Table 3). 냉면은 가열된 식품을 식혀서 섭취 직전에 바로 혼합해 먹기 때문에 분리율이 높은 것은 냉면 섭취로 인해 식중독 유발이 쉽게 일어날 수 있다는 것을 알 수 있다. 즉

Table 2. Number and percentage of food samples contaminated with *Staphylococcus aureus* from foods collected during 2006-2008

Year	No. of samples	No. of samples positive for <i>S. aureus</i>	Detection rate (%)
2006	1638	80	4.9
2007	2183	121	5.5
2008	1365	74	5.4
Total	5186	275	5.3

Table 3. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in various foods isolated from 2006 to 2008 in Korea

Source	No. of samples	No. of samples positive for <i>S. aureus</i>	Detection rate (%)
Sushi	2159	142	6.6
Kimbab	1197	50	4.2
Cream cake	685	35	5.1
Ice-noodle	401	35	8.7
Hot meat	744	13	1.7
Total	5186	275	5.3

석 섭취 식품인 김밥에서는 4.2%, 초밥 6.6%로 Kim 등(19) 보다는 낮은 수치였으나 김밥보다 초밥에서 황색포도상구균의 분리율이 높은 것은 일치하였다. 또한 Kang 등(20)의 김밥에서의 황색포도상구균의 분리율인 34.1% 보다 낮은 분리율이었으나 대형유통매장과 비슷한 판매 환경을 유지하고 있는 편의점에서는 12.2%의 분리율로 비슷한 수치를 보였다. 대형유통매장에서의 초밥의 제조는 사람의 손이 아니라 자동화 기계에서 생산되기 때문에 비교적 분리율이 낮은 것으로 사료된다. 초밥은 6.6%의 분리율로 Cho 등(21)의 5.0%와 유사하게 검출되었다. 판매 환경에 따라 김밥과 초밥의 분리율의 차이가 나타나는 것은 즉석섭취 식품에서 유통과정 및 판매과정이 식품 오염의 매우 중요한 원인이라고 사료된다. 일반적으로 즉석 섭취 식품이 대형 유통 매장이나 편의점 등에서는 냉장 유통을 유지하고 있으나 일반 판매점에서는 상온에서 유통을 하고 있으므로 황색포도상구균에 의한 식중독을 예방하기 위해서는 반드시 냉장을 유지하는 유통 판매과정이 필요하며 소비자도 식품을 구매하고바로 섭취를 하거나 섭취하기 전까지는 냉장 유통을 유지하고 있어야 한다고 사료된다. 또한 황색포도상구균 및 식중독 예방을 위한 홍보가 꾸준하게 되고 있음에도 매년 높은 수치를 보이며 그 분리율도 비슷한 것으로 보아 황색포도상구균에 대한 꾸준한 관리가 필요하며 근본적으로는 황색포도상구균에 의한 오염원을 찾아 제어해서 사전에 황색포도상구균에 대한 오염을 방지하는 것이 필요하다고 사료된다.

국내 식품에서 황색포도상구균의 오염도 분석

2008년부터 2010년까지 초밥 1312건, 김밥 135건, 냉면 366건 등 총 1,813건의 시료에 대해서는 정량 시험을 하여 오염률을 확인한 결과 냉면 5.5%, 초밥 2.2%, 김밥 0.7%였으며 초밥에서 기준치(100 CFU/g) 이하의 검출률은 기준치 이상의 검출률은 김밥 1.5%, 냉면 0.8%, 초밥 0.5%였다(Table 4). 평균 균량은 냉면 7,682 CFU/g, 초밥 152 CFU/g, 김밥 133 CFU/g이었다. 이는 Kim 등(19)의 즉석섭취 식품에서 검출된 총 29개 중 19개가

Table 4. Average cell population of *Staphylococcus aureus* from various foods in Korea

population (CFU/g)	Source		
	Kimbab (%)	Sushi	Ice-noodle
negative	132 (97.8)	1277 (97.3)	343 (93.7)
less than 100	1 (0.7)	29 (2.2)	20 (5.5)
100 over-less than 1,000	2 (1.5)	5 (0.4)	1 (0.3)
1,000 over	0 (0)	1 (0.1)	2 (0.5)
Total	135	1312	366

100 CFU/g 정량 기준을 넘었으며, 검출된 값의 분포는 200-5,500 CFU/g이었고, 평균적으로 600 CFU/g의 결과 보다 즉석 식품에서는 낮은 수치를 나타내고 Kang 등(20)의 판매 형태별로 수거한 김밥 214건에 대한 평균 균량이 623 CFU/g 보다도 낮은 수치를 보였다. 이는 즉석섭취식품이 유통 단계의 식품 보관 방법에 따라서 황색포도상구균에 대한 오염도가 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다. 특히 냉면의 경우는 법적 기준치 이상의 균수가 많지는 않았으나 평균 균량이 7,682 CFU/g으로 오염된 식품일 경우 매우 높은 균량으로 오염되었음을 알 수 있었다. 따라서 냉면은 만들어서 바로 섭취를 하는 식품이므로 작업자는 개인위생 및 작업 환경 위생을 특히 고려해야 할 것으로 사료된다. 초밥이나 김밥의 경우는 기준이 정량 수치로 법적 기준이 완화되었으나 이미 초기에 오염되었을 경우 냉장 유통을 하였다라도 소비자가 구매를 해서 냉장을 유지하는 유통 과정을 거치지 않고 식품을 섭취 시 까지 시간이 경과되기 때문에 초기 오염에 대한 철저한 관리가 요구되어진다. 또한 소비자는 냉장 유통으로 판매되고 있는 김밥, 초밥 등의 식품은 최대한 빠른 시간 내에 섭취를 하여야 하고 가능하면 운반, 보관 하는데 냉장을 유지시켜줄 필요가 있다고 사료된다.

계절별 식품 중에 황색포도상구균 오염도 분석

2006년 1월부터 2008년 10월 사이에 수집한 초밥, 김밥, 크림이 포함된 빵이나 케이크, 가열 처리가 된 식육 제품에 대하여 1월에 433건, 2월에 457건, 3월에 494건, 4월에 495건, 5월에 532건, 6월에 493건, 7월에 327건, 8월에 394건, 9월에 410건, 10월에 357건, 11월에 409건, 12월에 385건 등 총 5,186건을 분석한 결과 8월(평균 기온 25.4°C)에 가장 높은 8.4%를 보였고 1년 중 여름철인 8월, 9월에 높은 분리율을 보였다. 하지만 기온이 낮아지는 12월(평균 기온 0.2°C)에 다시 분리율이 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1). 이는 Oh 등(22)의 2003년 및 2004년에 8월 달에 황색포도상구균의 분리율이 높은 것과 일치하였다. 비교적 외부 기온의 영향을 받지 않는 대형유통매장에서도 여름철에 가장 높은 분리율을 보이는 것으로 보여 황색포도상구균의 오염은 온도의 영향을 받는 것으로 사료된다. 특히 12월에 높은 분리율을 보인 것은 난방 등으로 실내 온도가 다시 높아지고 위생 관리에 대한 주의가 느슨해지기 때문으로 분리율이 다시 높아지는 것을 알 수 있었다. 이런 결과를 종합해 볼 때 황색포도상구균의 오염은 온도와 밀접한 관계가 있는 것을 알 수 있고, 여름철뿐만 아니라 겨울철에도 식품 위생 관리를 철저히 하여야 한다고 사료된다. 특히 위생에 관리가 소홀해지는 겨울철에는 주의가 요구된다. 또한 소비자는 즉석 섭취 등의 완전 조리된 식품을 구매하고 냉장 상태로 보관을 하거나 가능하면 바로 섭취 하도록 하는 것이 안전한 소비를 할 수 있으며 식중독 예방을 할 수 있는 방법이라고 사료된다.

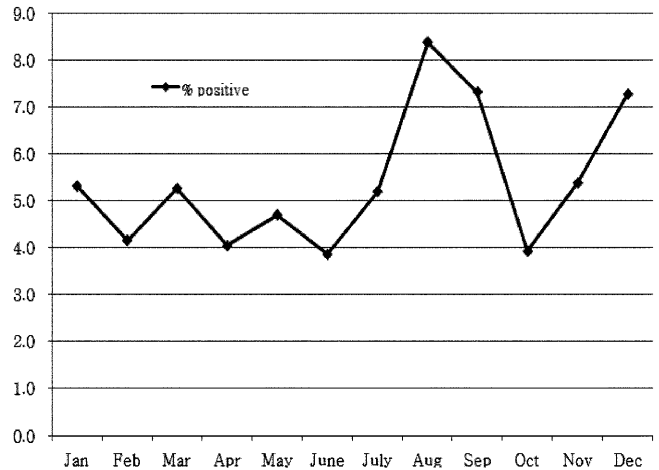


Fig. 1. Monthly variations of *Staphylococcus aureus* in foods collected during 2006-2008.

분리한 황색포도상구균의 장독소 phenotype 유형 분석

분리균 275주를 대상으로 reversed passive latex agglutination (RPLA) toxin detection kit를 사용하여 장독소 생성을 확인한 결과 총 76주(27.6%)에서 장독소가 분리되었다. 다양한 식품에서 분리한 황색포도상구균 중 장독소를 분비한 균주는 초밥에서 42주(29.6%), 김밥에서 14주(28.0%), 크림이 포함된 빵이나 케이크에서는 8주(22.9%), 냉면에서 9주(25.7%), 가열식육에서는 3주(23.1%)에서 장독소가 확인되었다. 식품 종류별로는 분리된 황색포도상구균에서의 장독소 생성 비율은 차이가 없는 것으로 보였다. 생성된 장독소의 유형을 분석한 결과 장독소 A형이 75주(97.7%)로 우점형이며 장독소 A만 생성된 경우는 66주(86.8%)이고 장독소 SEA와 SEC가 동시에 생성된 경우는 6주(7.9%)로 나타났다. 그 밖에 SEA와 SEB가 동시에 생성된 경우 2주(2.6%), SEA와 SED가 동시에 생성된 경우는 1주(1.3%)이며 SED가 생성된 균주가 1주(1.3%)로 나타났다(Table 5). Oh 등(22)의 한국에서의 2003년에서 2004년까지 초밥, 김밥, 빵, 식육제품에서 분리한 황색포도상구균의 장독소 생성률 보다 낮은 수치였으나 SEA 생성 균주가 우점형인 것은 일치하였다. 식중독 환자에서 분리한 황색포도상구균의 장독소형은 주로 SEA가 90% 이상을 이루고 있으므로 식품에서 분리한 황색포도상구균에서의 SEA에 분리율이 높은 것은 식품 오염이 주로 작업자에 의한 것으로 사료된다(23,24,25). 그러나 황색포도상구균에 의한 식중독은 식품의 소비하는 습관에 의해 지역별, 나라별 차이가 있으며(26) 한국에서 주로 섭취되는 식품은 특성상 황색포도상구균에 대한 오염이 매우 높은 편이다. 따라서 황색포도상구균에 의한 식중독의 방지를 위해 오염원을 파악하는 연구가 꾸준히 진행되어야 할 필요성이 있다고 판단되었다.

분리한 황색포도상구균의 장독소 genotype 유형 분석

식품에서 분리한 황색포도상구균의 식품에서의 독소 유전자 검출 결과 분리된 황색포도상구균에 전체 275주 중에 150주(54.5%)가 독소 유전자를 보유하고 있고 sea 유전자와 seg 유전자가 전체 분리된 275균주 중 77주(28.0%)이며 sei 유전자는 75주(27.3%), seh 유전자는 29주(10.5%) 순으로 검출되었다(Table 6). seb, sej 유전자는 초밥과 냉면에서만 검출되었고 sea, see, seg, seh, sei 유전자는 모든 검체에서 검출되었다. 특히 확인된 균주 중 toxic shock syndrome toxin(TSST-1) 유전자는 전체 검출된 균주 중에

Table 5. Distribution of enterotoxin phenotype for *Staphylococcus aureus* isolated from various food samples

Source	No. of positive samples	Phenotype of enterotoxin				
		SEA	SEA+SEB	SEA+SEC	SEA+SED	SED
Sushi	42	36	2	4		
Kimbab	14	13		1		
Cake	8	6		1		1
Ice-noodle	9	8			1	
Hot meat	3	3				
Total	76	66	2	6	1	1

Table 6. Distribution of enterotoxin genotype for *Staphylococcus aureus* isolated from various food samples

Source	Genotype of enterotoxin (%)									
	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>see</i>	<i>seg</i>	<i>seh</i>	<i>sei</i>	<i>sej</i>	<i>tst</i>
Sushi	31.0	1.4	4.2	12.7	5.6	25.4	10.6	25.4	4.9	2.8
Kimbab	28.0	0.0	12.0	2.0	8.0	42.0	12.0	40.0	0.0	8.0
Cake	17.1	0.0	5.7	0.0	2.9	28.6	8.6	28.6	0.0	2.9
Ice-noodle	25.7	2.9	0.0	0.0	2.9	22.9	11.4	20.0	2.9	0.0
Hot meat	30.8	0.0	0.0	7.7	7.7	15.4	7.7	15.4	0.0	7.7
Total	28.0	1.1	5.1	7.3	5.5	28.0	10.5	27.3	2.9	3.6

10주(3.6%)가 검출되었다. 검출된 식품은 김밥 4주(8.0%)와 가열 식육 제품 1주(7.7%), 초밥 4주(2.8%)로 김밥과 가열식육 제품의 경우는 다른 제품에 비해 소비자가 식품을 구매 하고 냉장 보관 이 소홀해 지기 쉬운 제품이므로 황색포도상구균 증식이 쉽게 일 어날 수 있고 이로 인해 식중독이 유발했을 때 고열과 쇼크 및 몸매 여러 가지 장애에 기능을 일으키는 등의 심각한 문제를 일으킬 수 있다. 따라서 이들 식품의 유통과정 및 섭취까지 황색포도상구균에 대한 오염을 예방하여야 하며 올바른 식품 보관 방법을 제시하여야 하고 식품을 구매 했을 때 바로 소비할 수 있도록 소비자의 인식 제고를 통해서 식중독을 사전에 예방하여야 한다.

식품별 독소 유전자 유형은 초밥에서 *sea*의 독소 유전자가 44 주(31.0%)로 가장 검출되었으며 *seg* 36주(25.4%), *sei* 36주(25.4%) 검출되었으며 특히 초밥에서는 10가지의 모든 독소 유전자가 검출되었다. 초밥은 다른 식품에 비해 재료가 간단하지만 다양한 독소 유전자를 가진 황색포도상구균이 검출되므로 여러 경로로 초밥의 오염 경로를 추측 해 볼 수 있고, 초밥은 특히 판매부터 유통까지 철저한 식품 안전 관리가 요구되어진다. 김밥에서는 *seg* 21주(42.0%)와 *sei* 20주 (40%)로 다른 식품에 비해서 높게 나왔다. *seg*와 *sei* toxin gene은 항상 결합되어 있다고 알려져 있어(27) 본 결과와 유사하였다. 또한 *seg*와 *sei*는 human staphylococcal toxin shock syndrome과 staphylococcal scarlet fever의 원인이 될 수 있다(28). 만일 김밥을 섭취한 후 열(성홍열)이 발생하면 황색포도상구균의 *seg*와 *sei*에 독소에 의한 발병임을 추측할 수 있다. 다른 식품들 보다 특히 김밥으로 인한 황색포도상구균 식중독 발생은 고열을 발생 할 수 있는 발병 특징이 있음을 알 수 있었다.

Cha 등(26)에 의하면 한국 식중독 환자에서 분리된 황색포도상구균은 주요 독소는 *sea*가 91.9%를 차지하고 있고 *sea*와 *seh* 유전자가 우점형이라고 보고되었다. 이러한 결과로 역학적인 관계를 비교해 보면 식품에서 황색포도상구균의 오염은 식중독 발생과 직접적으로 연관성이 있다고 사료된다. 따라서 식중독 예방을 위해 식품에서 황색포도상구균의 식품 원재료 등에 의한 오염의 사전 예방 및 오염된 제품의 제어 과정을 통해 황색포도상

구균에 의한 철저한 위생 관리가 요구되어진다.

분리된 황색포도상구균 중에서 독소 유전자 중 5종류의 유전자를 보유하고 있는 균주는 3주(2.0%)이며 4종류의 유전자를 보유하고 있는 균주는 17주(11.3%), 3종류의 유전자를 보유하고 있는 균주는 31주(20.7%)로 2가지 이상 유전자를 보유하고 있는 균주가 70%로 확인되었다. 이러한 결과로 식품에서 검출된 황색포도상구균은 다양한 유전자를 보유하고 있는 것으로 사료된다. 특히 *seg*와 *sei* 유전자를 동시에 가지고 있는 균주가 34주(12.4%)이며 *sea* 유전자를 가지고 있는 균주는 21주(7.6%)였다. 이는 Seo 등(1)이 보고한 결과와 같은 것으로 한국에서 분리된 황색포도상구균은 주로 *sea* 유전자를 보유하고 있으며 *seg*나 *sei*, *seh* 유전자를 가지고 있음을 알 수 있다. *sea*, *seh* 유전자를 가지고 있는 균주 10주(3.6%), *sed* 유전자를 가지고 있거나, *sea*, *seg*, *sei* 3가지 독소 유전자를 가지고 있는 균주, *sea*, *sec*, *sei* 3가지 독소 유전자를 가지고 있는 균주는 각 8주(2.9%)이며, *sea*와 *sec*와 *seh* 유전자를 가지고 있는 균주, *sea*, *seg*, *sei*, *tst*의 4가지 독소 유전자를 가지고 있는 균주는 각 5주(1.8%)였다. 피어슨 상관관계 분석을 통한 독소별 유의성을 검증한 결과 *sea* 독소는 *sec*, *seh*, *sei*, *tst*와 유의성($p < 0.05$)이 있었으며 *seg* 독소는 *sei*, *sej*, *tst*와 유의성($p < 0.05$)이 있었다. *tst* 독소는 *sea*, *seg*, *sei*로 유의성($p < 0.05$)을 보였다. *seh*, *see*는 $p > 0.05$ 로 독소간에 유의성이 없었다. 이러한 결과는 Chen 등(27)에 의하면 *sea*는 다른 독소 유전자와 공존하는 경우가 많으며 대부분 *seg*, *seh*, *sei*가 결합되어 있는 것과 유사한 결과를 확인 할 수 있었다. 또한 Omoe 등(7)에 의하면 황색포도상구균 식중독 발생은 *sea*, *seg*, *seh* 와 *sei*가 주로 검출되거나 또는 다른 독소들과 결합한 형태로 검출되었으나 *seg*와 *sei* 독소는 식중독을 일으키기까지 충분한 양의 독소가 발현되지 않고 *sea*에 의한 독소 생성은 여러 가지 인자들(pH, 수분, 온도 등)에 영향을 받으며 새로운 독소의 독소 생성량에 따른 식중독 발생에 대한 연구가 미흡하기 때문에 *seg*, *sei*, *seh*의 독소가 식중독 발생에 직접적인 영향을 미친다고 결론 내리기는 어렵다고 서술하고 있다. 따라서 황색포도상구균에서 주로 검출되는 *seg*나 *sei*, *seh* 등의 새로운 독소들에 대한 독소 발현, 식중독 발생과의 관

Table 7. Distribution of enterotoxin genotype for *Staphylococcus aureus* isolated from various food samples

Source	No. of positive samples	Genotype of enterotoxin								
		<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>sec</i>	<i>sed</i>	<i>sea+seb</i>	<i>sea+sec</i>	<i>sea+sed</i>	<i>sea+seb+sed</i>	<i>sea+sec+sed</i>
Sushi	55	31		1	10	1	4	6	1	1
Kimbab	16	9		1	1		5			
Cake	7	5		1			1			
Ice-noodle	10	9	1							
Hot meat	4	3						1		
Total	92	57	1	3	11	1	10	6	1	1

계에 대한 연구가 필요하며 기존 연구되어진 *sea* 독소와의 관계에 대한 연구도 병행되어야 한다. 또한 한국형 식품에서 주로 분리되는 황색포도상구균에 특징에 대한 꾸준한 연구를 통해 식중독 발생시 역학 조사 자료로 활용 할 수 있다고 사료된다.

황색포도상구균의 표현형(phenotype)과 유전형(genotype) 비교

장독소 A, B, C, D는 SET-RPLA 시험과 PCR법으로 검출한 독소의 표현형과 유전형을 비교한 결과 유전형 독소 유전자를 보유한 경우가 92주인 반면에 표현형 유전자는 76주로 유전자를 가지고 있는 균주 중에 83.5% 정도가 독소를 생성한다고 예측되어진다(Table 5, 7). 특히 SED 독소는 *sed* 유전자를 보유하고 있는 20 균주 중에서는 독소가 생성되지 않았으나 *sed* 유전자를 보유하고 있는 많은 2주에서 독소가 생성되었다. 두 방법에 대해 유의성을 검증한 결과 장독소 A, B, C는 유의수준 $p < 0.05$ 로 두 실험 간의 유의성이 있었으나, 장독소 D는 $p > 0.05$ 이상으로 두 실험 간의 유의성이 없었다. 이는 장독소 D는 *sed* 유전자를 보유하고 있어도 독소 생성이 잘 되지 않는다고 추측되어지며 다른 독소들은 유전자를 가지고 있는 경우 독소 발현이 잘 되는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과로 장독소 유전자를 보유하고 있어도 독소 발현이 모두 되지 않으므로 황색포도상구균에 대한 장독소를 확인 시에는 표현형과 유전형을 확인해야 할 필요성이 있다고 사료된다.

현재 시판되는 황색포도상구균에 대한 표현형 확인은 장독소 A, B, C, D, *tst*만 검출이 가능하므로 다른 새로운 장독소의 표현형을 확인 할 수 없다. 그러나 한국에서 분리되는 황색포도상구균에서 새로운 독소 유전자의 검출이 높으므로 새로운 독소에 대한 면역학적 방법의 개발로 표현형을 확인 할 수 있는 방법이 필요하며 나가서는 새로운 독소 유전자와 표현형과의 연구를 통해 독소의 발현에 관한 연구가 필요하고 기존 알려져 있는 독소와 새로운 독소와의 연관성, 발현 등의 연구를 통해서 한국형 황색포도상구균에 의한 식중독을 효과적으로 치료 할 수 있는 방법을 제시할 필요성이 있다. 그러므로 현재까지는 새로운 독소에 대해서는 PCR을 이용해 유전형을 검출을 해야 한다.

분자형별 방법 간의 유용성 비교

분자 유형간의 typeability는 0.55(150/275)며, Hunter와 Gaston (16,17,18)에 의하면 Simpson's index of diversity(SID)에 의한 discriminative ability $DI=0.976$ 로 DI 값이 1.0이면 발생 집단내의 모든 분리주들을 구별할 수 있는 분석법이며 $DI=0$ 은 모든 분리주들이 같은 유형을 가지는 것으로 해석된다. 이 공식에 참조하여 DI 값이 0.9 이상으로 PCR법에 의한 독소 유전자로 분리주 구별은 신뢰할 수 있었다.

요 약

우리나라 식중독 발생 중에 중요한 원인이 되고 있는 황색포도상구균에 대해 초밥, 김밥, 식육 제품, 크립이 포함된 빵, 케이크 류, 냉면의 다양한 식품 종류에서 평균적으로 매년 5.3% 분리를 보였으며 가열 과정을 거친 식품에서도 황색포도상구균이 완전히 사멸하지 않고 남아 있음을 알 수 있었다. 또한 유통 과정 및 판매과정이 식품 오염의 매우 중요한 원인이 되므로 냉장을 유지하는 유통 판매과정이 필요하며 소비자도 식품을 구매하고는 바로 섭취를 하거나 섭취하기 전까지는 냉장 유통을 유지하여야 한다. 황색포도상구균의 한국 식품위생법 기준치 100 cfu/g 이상으로 검출된 시료는 김밥이 1.5%, 냉면이 1.5%, 초밥이 0.5%이고 평균 균수는 냉면이 7,682 cfu/g로 가장 높았다. 초기에 균에 의해 오염된 식품은 냉장 유통 과정을 거치지 않는다면 오염균이 급격하게 증식되어 식중독을 유발할 가능성이 매우 높으므로 초기 오염에 대한 철저한 관리가 요구되어진다. 황색포도상구균은 온도에 영향을 받으며 계절별로 여름철에 황색포도상구균의 오염이 높았으나 상대적으로 관리가 소홀해지는 겨울철에도 주의를 요한다. 식품에서 황색포도상구균은 장독소 SEA가 표현형, 유전형 우점형 이었으며 총 150주 (33.1%)에서 장독소 유전자가 검출되었으며 *sea=sei, seh* 순으로 검출되었다. 식품별로는 독소 유전자 유형이 다양하게 검출되었으며 특히 *tst* 유전자가 10주(3.6%) 검출되었다. SED 독소는 표현형과 유전형이 일치 하지 않았다($p > 0.05$). 새로운 독소들에 대한 PCR 법에 의한 독소 유전자 검출로 분리주를 구별은 신뢰할 수 있었다. 최종적으로 우리나라 식품에서 분리된 황색포도상구균의 특징을 연구를 통해서 향후 식중독 발생 예방 방지를 위해서 사용할 수 있는 기초 자료를 제공하고자 하였다.

문 헌

1. Seo YH, Jang JH, Moon KD. Occurrence and characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from minimally processed vegetables and sprouts in Korea. Food Sci. Biotechnol. 19: 313-319 (2010)
2. Jarraud S, Peyrat MA, Lim A, Tristan A, Bes M, Mougel C, Etienne J, Vandenesch F, Bonneville M, Lina L. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. J. Immunol. 166: 669-677 (2001)
3. Munson SH, Tremaine MT, Betley MJ, Welch RA. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun. 66: 3337-3348 (1998)
4. Orwin PM, Leung DYM, Donahue HL, Novick RP, Schlievert

- PM. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.* 69: 360-366 (2001)
5. Ren K, Bannan JD, Pancholi V, Cheung AL, Robbins JC, Fischetti VA, Zabriskie JB. Characterization and biological properties of a new staphylococcal exotoxin. *J. Exp. Med.* 180: 1675-1683 (1994)
 6. Su YC, Wong ACL. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1438-1443 (1995)
 7. Omoe K, Ishikawa M, Shimoda Y, Hu DL, Ueda S, Shinagawa K. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J. Clin. Microbiol.* 40: 857-862 (2002)
 8. Kwona NH, Kima SH, Parka KT, Baea WK, Kima JY, Lima JY, Ahnb JS. Application of extended single-reaction multiplex polymerase chain reaction for toxin typing of *Staphylococcus aureus* isolates in South Korea. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 137-145 (2004)
 9. Krouantona A, Hennekinnea JA, Letertrea C, Petita L, Chesneaub O, Brisaboisa A, De Buysera ML. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 369-375 (2007)
 10. Choi YS. The characterization of *Staphylococcus aureus* pathogenic factors isolated from Korea the cloning and expression of toxic gene. PhD thesis, Sungshin Women's University, Seoul, Korea (2002)
 11. Balabana N, Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.* 61: 1-10 (2000)
 12. Jung HJ, Cho JI, Ha SD, Lee KH, Kim CH, Song ES, Chung DH, Kim MG, Kim KY, Kim KS. Genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from lettuces and raw milk. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 134-141 (2005)
 13. Sharma NK, Rees CED, Dodd CER. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1347-1353 (2000)
 14. Monday SR, Bohach GA. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37: 3411-3414 (1999)
 15. Johnson WM, Tyler SD, Ewan EP, Ashton FE, Pollard DR, Rozee KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29: 426-430 (1991)
 16. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2465-2466 (1988)
 17. Grundmann H, Hori S, Tanner G. Determining Confidence Intervals When Measuring Genetic Diversity and the Discriminatory Abilities of Typing Methods for Microorganisms. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4190 - 4192 (2001)
 18. Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1903-1905 (1990)
 19. Kim HK, Lee HT, Kim JH, Lee SS. Analysis of Microbiological contamination in ready-to-eat foods. *J. Fd. Hyg. Safety* 23: 285-290 (2008)
 20. Kang YS, Yoon SK, Jwa SH, Lee DH, Woo GJ, Kim CM, Park YS. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in kimbap. *J. Fd. Hyg. Safety* 17: 3135 (2002)
 21. Cho SK, Moon BY, Park JH. Microbial contamination analysis to assess the safety of marketplace sushi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 334-338 (2009)
 22. Oh SK, Lee NR, Cho YS, Shin DB, Choi SY, Koo MS. Occurrence of toxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat food in Korea. *J. Food Prot.* 70: 1153-1158 (2007)
 23. Yoon SK, Kang YS, Sohn MG, Kim CM, Park JY. Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail ready-to-eat Korean kimbab rolls. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 621-625 (2007)
 24. Wei HL, Chiou CS. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. *Epidemiol. Infect.* 128: 15-20 (2002)
 25. KFDA. Report of 2009 Establishment of a risk profile for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Korea Food and Drug Administration, Cheongwon, Korea (2009)
 26. Cha JO, Lee JK, Jung YH, Yoo JI, Park YK, Kim BS, Lee YS. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea. *J. Appl. Microbiol.* 101: 864-871 (2006)
 27. Chen TR, Chiou CS, Tsen HY. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 189-197 (2004)
 28. Jarrud S, Cozon G, Vandenesch F, Bes M, Etienne J, Lina G. Involvement of enterotoxins G and I in staphylococcal toxic shock syndrome and staphylococcal scarlet fever. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2446-2449 (1999)