

식품에서 분리한 황색포도상구균의 항생제 내성 특징 및 균막 형성

이주영, 왕해진, 신동빈, 조용선*
한국식품연구원 식품분석센터

Received : August 30, 2012 / Revised : October 5, 2012 / Accepted : November 13, 2012

Antibiotic Resistance and Bacterial Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Various Foods. Lee, Joo-young, Hae-Jin Wang, Dong-Bin Shin, and Yong-Sun Cho*. Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, Gyeonggi-do 463-746, Korea

Staphylococcus aureus is a major human pathogen that produces a wide array of toxins, leading to a number of adverse symptoms. We examined 275 strains of *Staphylococcus aureus* isolated from various foods between 2006 and 2008 for antimicrobial susceptibility. At least 259 (94.2%) of the tested strains showed antibiotic resistant properties, and 106 (40.7%) of them showed multiple antibiotic resistance. Eleven of the tested strains were resistant to oxacillin and *mec A*-positive. Moreover, oxacillin-resistant strains were significantly more likely to be multi-drug resistant ($p < 0.01$). Of the 275 isolates tested, 24.4% were noted as being positive for slime production and 30.5% were positive for biofilm assay. Antibiotic resistance was not associated with a significantly higher prevalence of biofilm formation. Twenty strains were classified using the DiversiLab system. Most of the strains could be classified into 2 clusters and 4 unique types. All 10 *mec A*-positive strains (cluster I) were grouped together into the same sub-cluster. Cluster II (6 strains) was not found to be resistant to oxacillin in this study. Although the prevalence of methicillin-resistant *S. aureus* in food is currently low, the risk of its transmission through the food chain cannot be disregarded.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance, biofilm, MRSA

서론

최근 몇 년간 우리나라 식중독 발생 중 황색포도상구균은 중요한 발생 원인이 되고 있다[8]. 미생물을 억제하는 항생제는 사람과 동물의 질병 치료와 예방에 사용되고 있다. 그러나 식용 가축 등의 식품 생산량 증가 등을 목적으로 항생제의 오남용으로 생긴 내성균이 식품 생산 과정, 제조 공정 등의 여러 단계를 거치면서 사람과 달리 식품 유통망을 타고 짧은 시간에 전국적으로 전파 될 수 있으며, 전파된 항생제 내성균은 사람에게 전이되어 상재균화 될 수도 있으며 또 다른 공급원이 될 수 있다[9]. 근래 들어 황색포도상구균은 의료분야에서 항생제 오·남용 따른 methicillin에 내성을 보이는 MRSA(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)와 VRSA(vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*) 출현으로 빠르게 증가하고 있어 심각성이 점차 커지고 있는 실정이다. 최근에는 병원뿐 아니라 지역사회에서

MRSA가 광범위하게 노출되어 있고 식품과 관련된 MRSA에 대한 오염이 미국이나 네덜란드 등에서 보고되어 있다[22].

병원성 세균의 항생제에 대한 내성에 중요한 역할을 하는 것 중에 균막(biofilm)이 있다. 균막은 세균이 고체 표면에 부착하여 다당류 또는 단백질로 둘러싸여 있는 형태이다. 균막이 완전히 형성되면 고체 표면에 강하게 부착되어 있어 제거가 어렵고, 생체 내에서는 만성 염증의 원인이 된다. 또한 표면으로부터 지속적으로 미생물을 방출하기 때문에 유해 미생물의 저장소(reservoir)와 같은 역할을 한다. 균막은 부유 생활(planktonic life)을 할 때에 비해 가혹한 환경, 항생제, 면역세포의 공격 등에 대해 강한 저항력을 가지기 때문에 멸균, 소독, 치료가 매우 어렵다[18]. 항생제 내성을 갖는 세균이 균막을 형성한 경우에 항생제가 균막에 작용하여 효과를 보이기도 전에 이미 획득하고 있는 항생제 내성을 이용하여 해당 항생제의 활성을 무력화시키기 때문에 균막 형성의 유무는 중요한 항생제 내성 감염 기전으로 작용할 수 있다. 균막을 형성한 황색포도상구균은 여러 종류의 항균제에 대해 실험실내에서 배양된 세균(planktonic bacteria)보다 10~1,000배 이상 높은 내성을 보인다[3]. 그러므로 균막이 형성된 세균에 의해 식품 재료 및 작업 환경이 오염된 경

*Corresponding author

Tel: +82-31-780-9242, Fax: +82-31-780-9280
E-mail: yscho@kfri.re.kr

우 항생제 및 항균제의 활성이 떨어지기 때문에 세균을 제거하기가 매우 어렵고 이로 인해 위생적인 문제를 야기할 수 있다. 또한 균막이 형성된 균에 의해 식중독이 발생할 경우 항생제에 의한 치료가 어렵다. 병원 감염이나 식용 가축에서 분리한 황색포도상구균의 항생제 내성이나 균막에 대한 연구는 활발하나 즉석 섭취 식품이나 가열조리 식품에서 분리한 황색포도상구균의 균막에 관한 연구가 부족한 실정이다.

최근에는 역학분야에서 항생제 내성을 지닌 병원성 세균간의 유연관계를 확인하여 원인적 연관성 추적에 중점을 두고 있다. 유연관계를 확인하기 위해서 다양한 방법이 사용되거나 실험 방법이 어렵고 결과 해석에 어려운 단점이 있다. 그러나 rep-PCR법을 이용한 DiversiLab은 최종 결과를 얻는데 소요되는 시간이 4시간 이내로 매우 짧으며 자동화된 결과의 분석으로 실험자간의 오차가 적고 데이터를 저장 분석하기가 용이하며 높은 재현성을 가지고 있다[1].

본 연구는 조리과정 없이 바로 섭취하는 식품에서 분리한 황색포도상구균의 항생제 내성을 연구하고 그 결과를 토대로 MRSA 의심 균주에 대한 확인을 하였으며, 다제 내성 균주에 대한 분자 유형별 상관관계 분석하여 황색포도상구균의 특성을 파악하고자 하였다. 또한 분리된 황색포도상구균의 균막 형성과 항생제 내성과의 상관관계를 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

2006년부터 2008년까지 대형유통매장에서 판매되고 있는 초밥, 김밥, 크림이 포함된 빵이나 케이크, 가열 식육 제품, 냉면의 총 5,186건의 시료에서 분리한 황색포도상구균 275주를 대상 균주로 하였다(Table 1). 분리균은 VITEK 2 Compact(Biomeriux, Marcy l' Etoile, France)로 확인 동정하였다.

항생제 감수성 검사

분리된 황색포도상구균 균주에 대해서 Nutrient agar

(Merck, Darmstadt, Germany)에서 37°C 24시간 배양 후 0.45% sodium chloride inhalation 용액 3 ml에 0.6 MacFaland로 탁도를 맞춘 후 시험 균액 280 µl를 새로 준비된 0.45% sodium chloride inhalation 용액 3 ml에 혼합하여 균의 탁도를 조절하였다. 탁도를 맞춘 시험 균액은 AST-P601 card(biomeriux, France)에 채운 후 VITEK 2(biomeriux, France)를 사용하여 항생제 감수성 검사를 하였다. 검사 결과는 Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI 2011)에 따라 판정하였다. 각 항생제 별 농도는 benzyl penicillin(P) 0.125, 0.25, 1(µg/ml), cefoxitin screen(OXSF) 6(µg/ml), ciprofloxacin(CIP) 1, 2, 4(µg/ml), clindamycin(CM) 0.5, 1, 2(µg/ml), erythromycin(E) 0.25, 0.5, 2(µg/ml), fusidic Acid (FA) 0.5, 1, 4(µg/ml), gentamicin(GM) 8, 16, 64(µg/ml), habekacin(HAB) 8, 32, 64(µg/ml), inducible clindamycin resistance(ICR), CM 0.5, CM/E 0.25/0.5(µg/ml), linezolid (LNZ) 0.5, 1, 2(µg/ml), mupirocin(MUP) 2, 4(µg/ml), nitrofurantoin(FT) 16, 32, 64(µg/ml), oxacillin(OX) 0.5, 1, 2(µg/ml), quinupristin/dalfopristin(QDA) 0.25, 0.5, 2(µg/ml), rifampicin(RA) 0.25, 0.5, 2(µg/ml), teicoplanin(TEC) 1, 4, 8, 16(µg/ml), telithromycin(TEL) 0.125, 0.5, 2(µg/ml), tetracycline (TE) 0.5, 1, 2(µg/ml), trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT) 2/38, 8/152, 16/304(µg/ml), trigecycline(TGC) 0.25, 0.5, 1(µg/ml), vancomycin(VA) 1, 2, 4, 8, 16(µg/ml)이며 항생제 내성을 위한 표준 균주로는 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213을 사용하였다 [15].

Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*(MRSA)의 유전자 검출

Oxacillin에 내성을 지니고 MIC(Minimum Inhibition Concentration)가 4 µg/ml 이상(CLSI 2011)인 11개의 분리주에 대해 genomic DNA extraction kit(RBC, Taipei, Taiwan)를 사용하여 주형 DNA를 분리 사용하였다. 사용한 primer는 *mec A* 유전자를 확인하고자 제작하였다[17]. Oligonucleotide sequence는 *mec A1* GTAGAAATGACT-GAACGTCCGATAA와 *mec A2* CCAATTCACATTG-TTTCGGTCTAATCTAA이다. 중합효소 연쇄 반응을 위한 반응액은 1U Taq DNA polymerase, 250 µM의 각각의 dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ (Bioneer, Daejeon, Korea)에 20 pmol primer, 주형 DNA 3 µl를 첨가하여 총 반응액 20 µl로 하였고, DNA 증폭은 T gradient(Biometra, Goettingen, Germany) PCR을 이용하였다. PCR 반응 조건은 94°C 5분간 초기반응, 94°C에서 30초 denaturation, 64°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 45초간 extension하는 것을 1 cycle로 하여 10 cycles 반응 시키

Table 1. Distribution of *Staphylococcus aureus* isolated from various foods.

Source	No. of samples positive for <i>S. aureus</i>		
	2006	2007	2008
Sushi	35	71	36
Kim bab	23	15	12
Cream cake	9	13	13
Ice-noodle	9	15	11
Hot meat	4	7	2

고, 조건을 바꿔 94°C에서 45초 denaturation, 50°C에서 45초간 annealing, 72°C에서 1분간 extension을 1 cycle로 25 cycles 반복하여 총 PCR을 35 cycles 반응시켰다. 마지막으로 72°C에서 10분 연장하고 PCR을 종결하였다. 증폭된 DNA의 확인은 2.0% Seakem agarose(Dakara, Kyoto, Japan) gel에서 100 V 25분간 전기영동한 후 ethidium bromide (1 µg/ml)로 염색한 후 UV로 310 bp를 확인하여 *mec A* 유전자를 확인하였다.

Automated Repetitive Sequence Based PCR(Rep-PCR)을 이용한 분자 유형별 판독

Repetitive Sequence Based PCR(Rep-PCR) 반응: 분리된 균주를 ultra clean TM microbial DNA isolation kit(MO Bio Laboratories Inc, USA)를 사용하여 DNA를 추출하여 25~50 ng/µg으로 농도를 조절해서 사용하였다. 추출한 DNA를 이용한 rep-PCR은 DiversiLab *staphylococcus* kit(Bacterial Barcord, USA)를 이용해서 master mix 반응액을 만들었다. 반응액 조성은 rep-PCR MM1 18.0 µl, geneAmp 10X PCR buffer 2.5 µl, primer Mix 2.0 µl, ampliAmp DNA Polymerase 0.5 µl를 전체 23.0 µl로 만든 후 template DNA를 2 µl 가한 후 rep-PCR 반응을 시켰다. 반응은 T gradient(Biometra, Germany) PCR 기기를 이용하였으며 반응 조건은 초기 denaturation으로 94°C에서 2분간 반응 시킨 후 94°C 30초간 denaturation, 45°C에서 30초 annealing, 70°C에서 1분 30초간 extension하는 것을 1 cycle로 하여 35 cycles을 반응 시키고 70°C에서 3분간 반응시켰다.

Agilent Bioanalyzer를 이용한 DNA lab chip의 결과 판독

DNA lab chip에 ladder와 marker가 혼합된 gel-dye mix를 9 µl 주입하고 starting syringe를 이용해서 DNA lab chip에 고정을 시켰다. 고정 후에 각 well에 5 µl의 marker를 넣고 rep-PCR을 산물을 1 µl 주입한 후 1분 동안 vortex를 이용하여 잘 혼합한 후 agilent bioanalyzer(Agilent, USA)를 이용하여 결과를 판독하였다. PCR 산물은 150~5,000 bp 사이에서 해석하였다.

결과 해석

결과는 DiversiLab Analysis Tool for Typing Reports 24529를 이용하여 판독하였다[25].

균막(Biofilm) 형성 시험

Congo Red agar(CRA) Method를 이용한 Slime assay: 식품에서 분리한 275균주를 tryptic soy agar(Difco, Detroit, MI, USA)에 sucrose(Daejung, Gyronggi-do, Korea) 50 g/

L, congo red(Sigma, USA) 0.8 g/L를 넣고 121°C 15분 멸균한 뒤 사용하였으며 CRA 배지에서 37°C 24시간 배양 후에 실온에서 48시간 방치 후 검붉은 색의 점액층 집락을 양성으로 판정하였고 분홍색인 집락은 음성으로 판정하였다 [4, 6].

Plate를 이용한 균막(Biofilm) assay: 식품에서 분리한 275균주를 tryptic soy broth(Difco, USA)에 37°C에서 24시간 배양한 균주를 0.25% glucose(Daejung, Korea)가 포함된 tryptic soy broth로 1/40으로 희석하여 이를 96 well flat-bottom polystyrene microculture plates에 200 µl 넣고 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후에 200 µl PBS로 3회 세척 후에 실온에서 건조시킨 후 1% crystal violet(Sigma-Aldrich, St Low's, MO, USA)으로 15분간 염색하였다. 염색 후에 증류수로 3회 세척한 후 200 µl의 PBS로 채운 뒤 570 nm에서 multi detection microplate reader(BioTek, Vermont, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였으며 blank의 값을 제외 수치가 0.15 이상일 때 균막 형성으로 보았다. 각각의 균주는 3회 반복 실험을 해서 평균값을 선택하였다[23].

분석 및 통계처리

SPSS version 12.0(SPSS inc, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 비연속변수에 대해서는 χ^2 -검정으로 유의확률 $p < 0.05$ 신뢰도 구간으로 통계학적 유의성을 해석하였으며 $p < 0.1$ (경계역)인 경우는 유의한 차이를 인정하였다.

결과 및 고찰

황색포도상구균의 항생제 내성 연구

2006년부터 2008년 사이에 분리한 황색포도상구균의 항생제에 대한 내성률(resistant)을 Table 2에 나타내었다. 식품에서 분리한 황색포도상구균 275균주 중에서 259균주가 하나 이상의 항생제 대해 내성을 보였으며 이는 전체 균주 중 94.2%로 Rhee[19]의 90.9%보다는 높은 수치였다. 2006년 분리된 80균주에 대한 내성률은 benzyl penicillin(P)에 대한 내성률이 90.0%로 가장 높았고 fusidic Acid(FA) 17.5%, tetracycline(TE) 13.8%, gentamicin(GM) 7.5%, trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT) 6.3%, erythromycin(E) 3.8%, clindamycin(CM) 2.5%, ciprofloxacin(CIP) 1.3%였고 mupirocin(MUP)은 intermediate로 5.0%의 내성률을 보였다. 2007년 분리된 121균주에 대한 내성률은 benzyl penicillin(P)의 내성은 90.9%, fusidic acid(FA) 12.4%, gentamicin(GM) 8.3%, oxacillin(OX) 7.4%, erythromycin(E) 5.8%, tetracycline(TE) 1.7%로 항생제 내성을 보였다. 2008년 분리된 74균주에 대한 내성률은 benzyl penicillin(P)의 내성은 95.9%, fusidic acid(FA) 13.5%, gentamicin(GM) 8.1%, clindamycin(CM)

Table 2. Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from various foods from 2006 to 2008.

Antimicrobial agents ^a	Antibiotic resistance(%)		
	2006 (N=80)	2007 (N=121)	2008 (N=74)
P	72 (90.0)	110 (90.9)	71 (95.9)
CIP	1 (1.3)	- (0.0)	- (0.0)
CM	2 (2.5)	- (0.0)	5 (6.8)
E	3 (3.8)	7 (5.8)	4 (5.4)
FA	14 (17.5)	15 (12.4)	10 (13.5)
GM	6 (7.5)	10 (8.3)	6 (8.1)
HAB	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)
LNZ	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)
MUP	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)
FT	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)
OX	- (0.0)	9 (7.4)	2 (2.7)
QDA	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)
RA	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)
TEC	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)
TEL	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)
TE	11 (13.8)	2 (1.7)	4 (5.4)
SXT	5 (6.3)	- (0.0)	- (0.0)
TGC	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)
VA	- (0.0)	- (0.0)	- (0.0)

^aAbbreviations; Benzyl penicillin (P), Ciprofloxacin (CIP), Clindamycin (CM), Erythromycin (E), Fusidic Acid (FA), Gentamicin (GM), Habekacin (HAB), Linezolid (LNZ), Mupirocin (MUP), Nitrofurantoin (FT), Oxacillin (OX), Quinupristin/Dalfopristin (QDA), Rifampicin (RA), Teicoplanin (TEC), Telithromycin (TEL), Tetracycline (TE), Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT), Trigecline (TGC), Vancomycin (VA)

6.8%, erythromycin(E) 5.4%, tetracycline(TE) 5.4%, oxacillin (OX) 2.7%를 나타냈다.

2006년부터 2008년까지의 전체 분리균주의 항생제 내성은 결과는 Table 3과 같다. Benzyl penicillin(P)이 92.0%로 가장 높은 내성률을 보였으며 fusidic acid(FA) 14.2%, gentamicin(GM) 8.0%, tetracycline(TE) 6.2%, erythromycin (E) 5.1%, oxacillin(OX) 4.0%, clindamycin(CM) 2.5%, trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT) 1.8%, ciprofloxacin(CIP) 0.4%이며 중간내성(intermediate)은 fusidic acid(FA) 13.8%, erythromycin(E) 3.6%, clindamycin(CM) 1.5%, mupirocin (MUP) 1.5%, gentamicin(GM) 1.1%를 나타냈다. 실험에 사용된 나머지 항생제에 대해서는 100% 감수성(susceptible)을 나타냈다. 국내 유통식품에서 분리한 황색포도상구균의 주요 항생제 내성 실태는[7] 김밥에서 benzyl penicillin(P)에 대한 내성률이 100.0%, gentamicin(GM)이 0.0%로 본 실험

Table 3. Antibiotic resistance (%) of *Staphylococcus aureus* isolated various foods from 2006 during 2008.

Antimicrobial agents ^a	Susceptibility (2006-2008)		
	Susceptible (%)	Intermediate (%)	Resistant (%)
P	8.0	0.0	92.0
CIP	99.6	0.0	0.4
CM	96.0	1.5	2.5
E	91.3	3.6	5.1
FA	72.0	13.8	14.2
GM	90.9	1.1	8.0
HAB	100	0.0	0.0
LNZ	100	0.0	0.0
MUP	98.5	1.5	0.0
FT	100	0.0	0.0
OX	96.0	0.0	4.0
QDA	100	0.0	0.0
RA	100	0.0	0.0
TEC	100	0.0	0.0
TEL	100	0.0	0.0
TE	93.8	0.0	6.2
SXT	98.2	0.0	1.8
TGC	100	0.0	0.0
VA	100	0.0	0.0

^aAbbreviations as in Table 2

은 benzyl penicillin(P)의 내성이 김밥 88.8% gentamicin (GM) 8.0%로 gentamicin에서 약간 높은 항생제 내성을 나타냈다. 즉석섭취 식품은 특별한 조리 과정을 거치지 않고 섭취를 하며, 제조 과정에서 사람에 의해 황색포도상구균이 오염 될 가능성이 높고 이로 인해 지역 사회까지 항생제 내성균이 확대 될 우려가 있다[9].

2006년에서 2008년 동안의 항생제 내성 패턴을 보면 2006년에는 ciprofloxacin(CIP)과 trimethoprim/sulfamethoxazole(SXT)에서 항생제 내성이 있는 균주가 분리되어 2007년~2008년과는 다른 항생제 내성 양상을 보였다(Table 2). Benzyl penicillin(P)의 항생제 내성률은 90% 이상으로 Hwang 등[5]의 유통 축산물에서 분리한 황색포도상구균의 페니실린 내성률 80%보다 높은 수준으로 가공 조리된 식품에서 분리된 황색포도상구균에서의 페니실린 항생제 내성이 심각한 수준으로 생각된다. 특히 2006년의 mupirocin (MUP)의 intermediate인 균의 검출(5.0%)과 2007년과 2008년에 oxacillin(OX)에 대한 내성을 가진 균의 검출은 MRSA(Mechicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) 내성 균주로 유추되었다(Table 2).

식품별로 분리한 황색포도상구균의 항생제 내성은 19가지 시험한 항생제 중 초밥은 P, OX, GM, CM, TE, FA, MUP, SXT에 내성이 있었으며 김밥은 P, OX, GM, CIP, E, TE, FA, SXT의 8가지 종류의 항생제에서 내성을 나타냈다. MRSA의 내성과 관련 있는 oxacillin이나 mupirocin에 내성이 있는 균주는 초밥, 김밥, 냉면에서 검출되었다. 특히 MRSA 균주가 검출된 초밥과 김밥은 주로 작업자의 손을 많이 거치는 식품이며, Wei 등[24]에 의하면 황색포도상구균 식중독은 주로 작업자에 의해 발병한다고 하였다. 그러므로 황색포도상구균에 의해 식품이 오염되지 않도록 작업자가 개인위생을 철저히 하여 식중독을 예방하여야 하며 항생제 내성과 황색포도상구균의 관계에 대한 지속적인 연구를 통해 항생제 내성을 감소시킬 수 있는 방안을 모색할 필요성이 있다.

황색포도상구균의 다제 내성 유형

식품에서 분리한 황색포도상구균의 다제 내성의 유형은 시험에 사용된 19가지 항생제에 대해 내성을 보인 균주 중에 6균주(2.3%)에서 5가지 항생제에서 내성을 보였으며 4가지 항생제에 내성을 보인 균은 3균주(1.2%), 3가지 항생제에 내성을 보인 균은 27균주(10.4%), 2가지 항생제에 내성을 보인 균은 70균주(26.9%)이며 전체 균주 중 3개 이상의 항생제에 내성을 보인 균은 36균주(13.8%)며 2가지 이상 항생제에 다제 내성을 보인 균은 106균주(40.7%)로 나타났다. oxacillin이나 mupirocin에 내성을 가진 균주는 다제 내성을 보였다. Park 등[16]에 의하면 methicillin 내성 균주의 경우는 다른 항생제에도 내성률이 함께 증가하는 경향을 보인다고 하였다.

Benzyl penicillin과 fusidic acid에 내성을 가진 균은 43균주(16.5%)로 가장 높은 검출률을 나타내었다(Table 4). 식품에서 검출된 황색포도상구균이 이미 다제 내성을 획득했으며 다제 내성균에 의해 식중독이 발생하였을 때는 진단과 치료의 어려움이 예상된다. 또한 지역 감염이나 병원 내 2차 감염의 원인균으로 전이 될 가능성이 있다. 그러므로 황색포도상구균으로부터의 오염에 의한 식품의 안전성 확보가 필요하며 식품에서 분리된 항생제 내성 황색포도상구균과 지역사회나 병원에서 분리된 황색포도상구균의 항생제 내성에 대한 비교, 분석 연구를 통해서 오염 경로의 파악 및 오염원의 사전 차단이 필요하다고 생각된다.

Oxacillin 내성 균주에 대한 mec A 유전자 확인

Oxacillin(OX)에 대한 내성을 가진 균 중 MRSA로 유추되는 11균주에 대해서 PCR을 이용해 mec A 유전자를 확인한 결과 11균주에서 유전자가 검출되었다. Kim 등[4]에 의하면 oxacillin(OX) 내성 균주에 mec A 유전자가 모두 양성으로

Table 4. Patterns of multidrug-resistance to of *Staphylococcus aureus* isolated from food samples from 2006 to 2008.

No. of antimicrobial agents	Resistant patterns					No. of isolates	Total (%)
5	P	OX	GM	E	FA	1	6 (2.3)
	P	GM	E	TE	FA	1	
	P	TE	FA	MUP	SXT	4	
4	P	OX	E	FA		1	3 (1.2)
	P	OX	GM	E		2	
3	P	OX	E			4	27 (10.4)
	P	GM	FA			15	
	P	GM	E			1	
	P	E	FA			6	
	CIP	E	TE			1	
2	P	OX				3	70 (26.9)
	P	GM				4	
	P	TE				11	
	P	SXT				1	
	P	FA				43	
	P	E				7	
1	GM	FA				1	154 (59.2)
	P					149	
	FA					5	

검출된 것과 동일한 결과를 얻었다. 이들 균주는 cefoxitin screen에서 모두 양성을 나타냈으며 penicillin에 내성이 있으며 seg 유전자를 모두 가지고 있었다(data not shown). 특히 2가지 이상 항생제에 다제 내성이 있었다. Oxacillin 내성과 다제 내성과는 $p < 0.01$ 이하로 유의성이 매우 높았다.

Lim 등[14]에 의하면 MRSA에 의한 오염은 사람이나 작업 표면, 주방도구 등으로도 확산되고 Kwon 등[12]에 의하면 지역사회 일반인 손에서 MRSA의 분리률이 18.1%였고 항생제에 많이 노출되어 있을수록 높은 분리률을 나타낸다고 보고하였다. 또한 Lee 등[13]에 의하면 한국과 일본에서 주로 발생하는 식중독은 식품을 손으로 다루는 과정에서 주로 발생한다고 하였다. 그러므로 김밥, 초밥 등의 즉석 섭취 식품에서 MRSA에 의한 노출 빈도가 높으며 오염된 식품은 여러 가지 경로로 확산 될 우려가 있다. 만일 MRSA에 의해 식중독이 발생하였을 때는 치료 등의 여러 가지 심각성을 야기할 우려가 있다. 그러므로 정확한 오염원 추적을 통해서 황색포도상구균에 의한 식품의 오염을 사전에 방지해야 하며 황색포도상구균의 항생제 내성에 대한 심각성을 인지하고 이에 대한 확산을 방지하여야 한다.

Automated Repetitive-Sequence-Based PCR(DiversiLab)에 의한 다제 내성균에 대한 유형별 패턴 비교

4가지 이상 항생제에서 다제 내성이 있거나 oxacillin에 내성이 있는 20균주에 대해서 automated Repetitive-Sequence-Based PCR(DiversiLab)을 이용하여 균주의 유형별 패턴을 비교하였다(Table 5). 비교 균주는 2006년 6균주, 2007년 9균주, 2008년 5균주를 사용하였다. DiversiLab에 의한 유전학적 상동성을 비교한 결과 DiversiLab analysis tool for typing reports 24529에 의해 90% 이상의 상동성으로 6 Cluster로 구분되었다(Fig. 1). Cluster I은 kfri 15, kfri 17, kfri 14, kfri 8, kfri 10, kfri 19, kfri 20, kfri 11, kfri 12, kfri 9(10균주)로 99% 이상의 유전자 상동성을 가지고 있으며 Cluster II는 kfri 1, kfri 2, kfri 3, kfri 4, kfri 5, kfri 6(6균주)으로 99% 이상의 유전자 상동성을 가지고 있으며 Unique type I~Unique type IV(kfri 7, kfri 13, kfri 16, kfri 18)은 각 하나의 균주로 분리되었다. 특히 Cluster I은 oxacillin 내성이 있는 균주거나 *mec A* 유전자를 포함하고 있는 균주이고 Cluster II는 oxacillin 내성이 없는 균주이며 2006년에 분리된 균주였다. 특히 Cluster I에 포함되어 있는 kfri 17은 항생제 시험에서는 oxacillin에 내성이 없었으나 *mec A* 유전자를 보유하고 있었다. Unique type I로 구분되는 kfri 7균주는 oxacillin 내성을 가지고 있으나 Cluster I과는 다른 패턴을 가지고 있었다. 그러나 전체적인 유사도는 90% 이상으로 유사한 오염원에서 분리된 균주라 추측된다. Unique type II로 구분되는 kfri 13은 분리된 균주 중에서 가장 높은 다제 내성을 지니고 있는 균주였다. Unique type III와 Unique type IV는 같은 항생제내성 패턴을 지녔으나 다른 시료에서 분리되었다.

기존 연구에서 유전학적 상동성 연구는 식중독이 발생 지역학 조사를 위해 임상 균주와 식재료에 분리된 균주에 대해 단편적인 조사 목적으로 사용하거나 MRSA와 같이 특정 항생제에 내성이 있는 균주들에 대한 연구를 하거나, 병원에서 감염되는 균주에 대한 연구는 활발히 진행되고 있다. 그러므로 다년간 시중 유통 중인 식품에서 분리한 황색포도상구균에 대한 독소 유전자, 항생제 내성 등에 따른 유전학적 상동성 분류에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 최근에 개발된 DiversiLab을 이용한 유전자 상동성 분석 profile에 대한 연구가 많이 되고 있으며, DiversiLab을 이용한 분석은 PFGE(pulsed field gel electrophoresis)에 비해 intra-, interlaboratory 간의 재현성이 매우 높은[20, 21, 25] 장점이 있다. 그러나 고가의 분석 비용으로 인해서 많은 profile을 보유하고 있지 않다는 단점이 있다. 따라서 향후 DiversiLab을 통한 식품에서 분리된 황색포도상구균에 대한 유전자 상동성에 대한 많은 profile을 수집하여서 오염원의 추적과 분리된 균의 독소 및 항생제 내성 등의 생화학

Table 5. Characterization by DiversiLab of *Staphylococcus aureus*.

Test strain		Resistant patterns				Source	Year
kfri 1	P	TE	FA	MUP	SXT	Sushi	2006
kfri 2	P	TE	FA	MUP	SXT	Sushi	2006
kfri 3	P	TE	FA	MUP	SXT	Sushi	2006
kfri 4	P	TE	FA	MUP	SXT	Sushi	2006
kfri 5	P	GM	ICR ^a	E		Kim bab	2006
kfri 6	P	GM	E	TE	FA	Ice-noodle	2006
kfri 7	OXSFB ^b	P	OX			Sushi	2007
kfri 8	OXSFB ^b	P	OX	E		Sushi	2007
kfri 9	OXSFB ^b	P	OX	E		Sushi	2007
kfri 10	OXSFB ^b	P	OX	E		Sushi	2007
kfri 11	OXSFB ^b	P	OX			Kim bab	2007
kfri 12	OXSFB ^b	P	OX			Ice-noodle	2007
kfri 13	OXSFB ^b	P	OX	GM	ICR E FA	Ice-noodle	2007
kfri 14	OXSFB ^b	P	OX	GM	ICR E	Kim bab	2007
kfri 15	OXSFB ^b	P	OX	E		Sushi	2007
kfri 16	P	ICR	E	FA		Sushi	2008
kfri 17	P	ICR	E	FA		Sushi	2008
kfri 18	P	ICR	E	FA		Cream cake	2008
kfri 19	OXSFB ^b	P	OX	ICR	E FA	Sushi	2008
kfri 20	OXSFB ^b	P	OX	GM	ICR E	Sushi	2008

^aAbbreviations; Inducible Clindamycin Resistance (ICR)
^bAbbreviations; Cefoxitin Screen (OXSFB).

적 특징과의 연관성에 대한 연구를 통해 식중독을 미연에 방지할 수 있는 연구가 필요하다고 생각된다.

황색포도상구균에 의한 균막 (Biofilm) 형성

식품균별 congo red agar에 의한 slime production assay로 균막 형성에 대한 양성 결과 균막 양성균주는 275균주 중 67균주로 24.4%였으며 크림이 포함된 빵이나 케이크에서 분리한 균주에서 34.3%로 가장 많은 균막 형성 균주를 검출하였다. Biofilm assay로 균막 양성인 균주는 30.5%이며 초밥에서 분리한 균주가 34.5%로 가장 많이 형성 되었다. (Table 6) 항생제 내성과 균막 형성률과의 상관관계를 분석해 보면 slime 형성 균주는 fusidic acid(FA), mupirocin(MUP)의 단일 항생제의 내성과 통계적 의미를 확인 할 수 있었고 ($p < 0.05$) tetracycline(TE)에서 유의한 차이($p < 0.1$)가 인정되었다. Biofilm assay에 의한 균막 형성은 mupirocin(MUP)과 oxacillin(OX)에서 유의한 차이($p < 0.1$)가 인정되었다. 그러나, 다른 단일 항생제 내성과 다제 내성균의 수에 있어서 균막형성은 상관 관계가 없었다(Table 7). Kwon 등[11]은 다제 내성 항생제의 수가 많을수록 균막 형성을 잘 하는

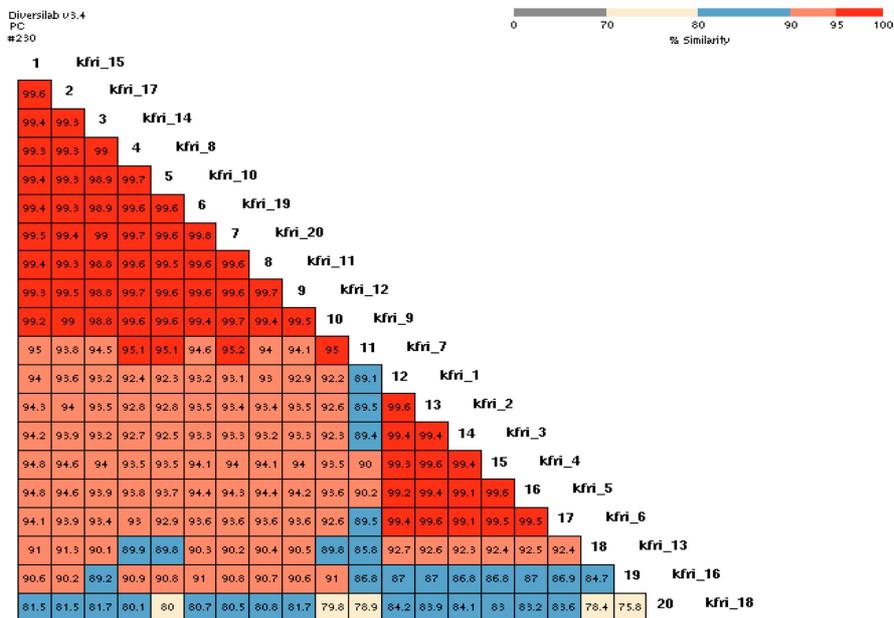
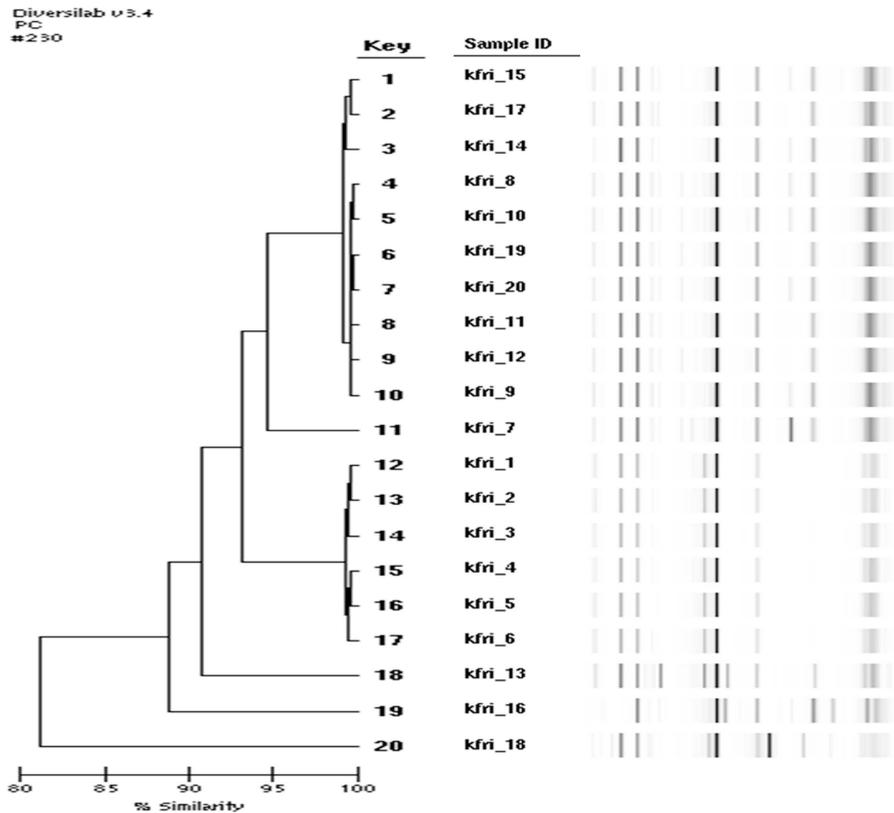


Fig. 1. Rep-PCR generated dendrogram for the 20 *Staphylococcus aureus* isolates form 2006-2008. An SI cutoff 95% was used for interpretation of relatedness as depicted by the vertical line.

것을 확인한 연구와는 다른 결과를 나타냈다. 이는 Kwon 등 [11]은 임상 균주에서 30가지 항생제에 대한 다제 내성률을

비교하였고 임상 균주는 식품 균주 보다 항생제 내성률이 높기 때문에 이와 같은 결과가 나왔으리라 생각된다(Table 8).

Table 6. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* from various foods.

Source	Slime production assay (%)	Biofilm assay (%)
Sushi	39 (27.5)	49 (34.5)
Kim bob	11 (22.0)	10 (20.0)
Cream cake	12 (34.3)	12 (34.3)
Ice-noodle	4 (11.4)	9 (25.7)
cooked meat	1 (7.7)	4 (30.8)
Total	67 (24.4%)	84 (30.5%)

Table 7. Correlation between antimicrobial agents and slime production.

Antimicrobial agents	Slime production assay (%)		Biofilm assay (%)	
	Resistant	Significance	Resistant	Significance
P	63/253 (24.9)	NS	76/253 (30.0)	NS
CIP	0/1(0)	NS3	0/1 (0)	NS
CM	3/11 (27.3)	NS	4/11 (36.4)	NS
E	6/24 (25.0)	NS	5/24 (20.8)	NS
FA	33/77 (42.9)	$p < 0.05$	28/77 (36.4)	NS
GM	7/25 (28.0)	NS	10/25 (40.0)	NS
HAB	0/0 (0)	NS	0/0 (0)	NS
LNZ	0/0 (0)	NS	0/0 (0)	NS
MUP	4/4 (100)	$p < 0.05$	4/4 (100)	$p < 0.1$
FT	0/0 (0)	NS	0/0 (0)	NS
OX	1/11 (9.1)	NS	0/11 (0)	$p < 0.1$
QDA	0/0 (0)	NS	0/0 (0)	NS
RA	0/0 (0)	NS	0/0 (0)	NS
TEC	0/0 (0)	NS	0/0 (0)	NS
TEL	0/0 (0)	NS	0/0 (0)	NS
TE	7/17 (41.2)	$p < 0.1$	8/17 (47.1)	NS
SXT	4/5 (80.0)	NS	4/5 (80.0)	NS
TGC	0/0 (0)	NS	0/0 (0)	NS
VA	0/0 (0)	NS	0/0 (0)	NS

^bNS: not significant

균막은 식품 재료나 작업 환경에 부착된 세균이 완전히 제거되지 않았을 경우 형성되고 균막이 형성된 균은 생물학적 전이가 일어나게 된다. 이렇게 전이가 일어나면 항생제나 항균제에 내성이 지닌 균주가 생성된다. 균막을 형성한 균주가 식품이나 작업 환경 등에 존재하게 되면 항균제에 내성이 생겨서 식품의 보존성이 떨어지게 되며 최종적으로 식품의 위생적인 문제를 야기하게 된다[2, 6, 10]. 또한 항생제 내성을

Table 8. Frequency of biofilm formation according to the number of antimicrobial agents.

No. of antimicrobial agents	Slime production assay (%)	Biofilm assay (%)
0	3 (20.0%)	6 (40.0%)
1	26 (17.0%)	43 (28.1%)
2	23 (37.1%)	18 (29.0%)
3	10 (37.0%)	11 (40.7%)
>4	5 (27.8%)	6 (33.3%)
Total	67 (24.4%)	84 (30.5%)

지닌 균주가 균막을 형성하여 질병을 일으킨다면 치료가 어려워질 수 있다. 그러므로 식품 환경 및 식품에서 분리된 균주에 대한 균막 형성과의 상관 관계에 대한 연구 및 균막이 형성된 균주에 대한 효과적인 제어 방법에 대한 연구 및 식품을 취급하는 환경에서 황색포도상구균의 균막 형성을 억제하기 위해 균막 형성 과정이나 조건, 메카니즘 등의 연구가 필요하다고 생각된다.

요약

2006년부터 2008년까지 다양한 식품에서 분리한 황색포도상구균 275균주에서 하나 이상의 항생제에 내성을 보인 균주는 259주(94.2%)이며 benzyl penicillin(P)이 92.0%로 가장 높은 내성률을 보였다. 106(40.7%) 균주가 2가지 이상의 항생제에 대하여 내성을 나타냈으며 3가지 이상 항생제에 내성을 보인 균도 36주(13.8%)였다. Vancomycin에 대해서는 내성을 보인 균주는 없었다.

식품별로는 초밥과 김밥에서 검출된 균주는 8종류의 항생제에 각각 내성을 나타냈으며 MRSA 균주는 11주(전체 275주)가 4% 검출되었다. Oxacillin 내성균은 다제 내성 균주였다. Automated repetitive sequences based PCR microbial typing system(DiversiLab)으로 oxacillin 내성이 있거나 다제 내성인 20주에 대해 유형을 분석한 결과 DiversiLab Analysis Tool for Typing Reports 24529에 의해 90% 이상의 상동성은 2개의 Cluster와 4개의 unique type으로 구분되었다.

Congo red agar에 의한 slime production assay로 균막 형성에 대한 양성 결과 균막 형성 양성은 275균주 중 67균주로 24.4%, biofilm assay로 균막 양성인 균주는 30.5%이며 초밥에서 분리한 균주가 34.5%로 가장 많이 형성되었다.

항생제 내성과 균막 형성율과의 상관관계를 분석해 보면 slime 형성 균주는 fusidic acid(FA), mupirocin(MUP)의 단일 항생제의 내성과 통계적 의미를 확인할 수 있었다($p < 0.05$). 다제 내성균의 수와 균막 형성은 상관 관계가 없었다.

References

- Chery, K. S., J. I. Pounder, S. R. Page, B. J. Schaecher, and G. L. Woods. 2005. Clinical Evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 1187-1192.
- Chmielewski, R. A. N. and J. F. Frank. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2**: 22-32.
- Cho, K. J., S. Jin, J. H. Cui, T. R. Yoon, and P. Y. Ryu. 2008. Effects of biofilm formation on the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol. Virol.* **38**: 197-205.
- Freeman, D. J., F. R. Falkiner, and C. T. Keane. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* **42**: 872-874.
- Hwang, I. G., H. S. Kwak, and S. H. Yoon. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as a foodborne biological hazard. *J. Food Hyg. Safety* **50**: 26-36.
- Johannes, K. M., A. H. Matthiab, R. Hologer, and M. Dietrich. 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med. Microbiol. Immunol.* **191**: 101-106.
- KFDA. 2009. Report of 2009 Establishment of a risk profile for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Korea Food and Drug Administration, Cheongwon, Korea.
- KFDA. 2010. Statistical yearbook. Food - borne disease outbreaks, Korea Food and Drug Administration, Cheongwon, Korea.
- Kim, J. S., H. S. Kim, W. Song, H. C. Cho, K. M. Lee, and E. C. Kim. 2004. Antimicrobial resistance profiles of *Staphylococcus aureus* isolated in 13 Korea hospitals. *Korean J. Lab. Med.* **24**: 223-229.
- Kumar, C. G. and S. K. Anand. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry. *Int. J. Food Microbiol.* **42**: 9-27.
- Kwon, A.S., G. C. Park, S. Y. Ryu, D. H. Lim, D. Y. Lim, C. H. Choi, Y. K. Park, and Y. Lim. 2008. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **32**: 68-72.
- Kwon, Y. I., T. W. Kim, H. Y. Kim, Y. H. Chang, H. S. Kwak, and G. J. Woo. 2007. Monitoring of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from medical environment in Korea. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 158-162.
- Lee, W. C., T. Sakai, M. J. Lee, M. Hamakawa, S. M. Lee, and I. M. Lee. 1996. An epidemiological study of food poisoning in Korea and Japan. *Int. J. Food Microbiol.* **29**: 141-148.
- Lim, S. K., H. M. Nam, H. J. Park, H. S. Lee, M. J. Choi, S. C. Jung, J. Y. Lee, Y. C. Kim, S. W. Song, and S. H. Wee. 2010. Prevalence and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw meat in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 775-778.
- Marco, L., B. Cinzia, G. B. Maria, F. Maria, Z. Jessica, and F. Roberta. 2002. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 1681-1686.
- Park J. I. and N. L. Lee. 1998. Comparison of susceptibility test and meca detection for determination of methicillin resistance in *Staphylococcus epidermidis*. *Korean J. Clin. Pathol.* **18**: 391-395.
- Pérez-Roth, E., F. C. Martýn, J. Villar, and S. M. Álvarez. 2001. Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 4037-4041.
- Philip, S. S. and J. W. Costerton. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *J. Lancet.* **358**: 135-138.
- Rhee, C. H. and G. J. Woo. 2010. Emergence and characterization of foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. *J. Food Prot.* **73**: 2285-2290.
- Ross, T. L., W. G. Merz, M. Farkosh, and K. C. Carroll. 2005. Comparison of an automated repetitive sequence-based PCR microbial typing system to pulsed-field gel electrophoresis for analysis of outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 5642-5647.
- Shutt, C.K., J. I. Pounder, S. R. Page, B. J. Schaecher, and G. L. Woods. 2005. Clinical evaluation of the diversilab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 1187-1192.
- Timothy, F. J., M. E. Kellum, S. S. Porter, M. Bell, and W. Schaffner. 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Emerg. Infect. Dis.* **8**: 82-84.
- Vasudevan, P., K. M. N. Manoj, T. Annamalai, and K. S. Venkitanarayanan. 2003. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Vet. Microbiol.* **92**: 179-185.
- Wei, H. L. and C. S. Chiou. 2002. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. *Epidemiol. Infect.* **128**: 15-20.
- Witta, R., V. Kanhaib, and W. B. Leeuwena. 2009. Comparison of the DiversiLab™ system, pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing for the characterization of epidemic reference MRSA strains. *J. Microbiol. Methods* **77**: 130-133.