

비빔밥에서 분리한 대장균의 오염도 조사 및 특성 연구

이다연 · 이주영 · 왕해진 · 신동빈 · 조용선*
한국식품연구원 식품분석센터

Prevalence and Classification of *Escherichia coli* Isolated from *bibimbap* in Korea

Da-Yeon Lee, Joo-Young Lee, Hae-Jin Wang, Dong-Bin Shin, and Yong-Sun Cho*
Food Analysis Center, Korea Food Research Institute

Abstract Pathogenic *Escherichia coli* is recognized as an important cause of diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome worldwide. This study was conducted to investigate the prevalence *E. coli* contamination in the Korean traditional food *bibimbap*. *E. coli* were isolated from 84 of 1142 (7.3%) *bibimbap* investigated from 2005 to 2011. Antibiotic resistance profiling demonstrated that 6 of the 84 isolates (7.2%) showed multiple drug resistance. Fifteen virulence genes specific for pathogenic *E. coli* such as Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), and enteroaggregative *E. coli* (EAEC) were examined by multiplex PCR for mixed bacterial cultures derived from *bibimbap* samples. The EPEC virulence gene (*ent*) was detected in 5 strains (5.9%), while ETEC, EAEC, and EIEC were not detected. STEC serotypes O103 (1.2%), O91 (1.2%), and O128 (6.0%) were found, but other serogroups such as O26, O157, O145, O111 and O121 were not detected. Automated Repetitive-Sequence-Based PCR analysis showed different patterns.

Keywords: *bibimbap*, *Escherichia coli*, antibiotic resistance, virulence gene, genetic diversity

서 론

비빔밥은 대표적인 한국의 전통 음식으로 당근, 버섯, 계절별 나물, 고기, 계란, 고추장 등을 넣고 조리된 밥과 함께 섞어서 먹는 음식이다. 비빔밥은 지역과 재료에 따라 구분되며 각 지역마다 특색이 있으며 비빔밥에 날달걀 노른자, 육회, 젓갈 등이 올려지기도 한다. 이러한 다양한 재료를 개인적인 취향에 따라 선택해서 먹을 수 있기 때문에 비빔밥은 한국인들 뿐 아니라 외국인들도 선호하는 대중적인 식품 중에 하나이기도 하다(1). 비빔밥을 만드는 과정은 다양한 재료를 각각의 특성에 맞게 조리한 후 다시 혼합해서 섭취하는 식품으로 각각의 재료 준비부터 완성까지 여러 단계를 거치기 때문에 시간이 많이 걸린다. 그래서 음식점에서는 비빔밥을 고객에게 빠르게 제공하기 위해 들어가는 여러 가지 재료들을 미리 조리해 놓고 주문이 들어오면 재료들을 바로 혼합하여 비빔밥을 완성시킨다.

그러므로 비빔밥에 사용될 재료들은 미리 조리해 놓기 때문에 위생적으로 조리되지 않았을 때는 재료의 보관 상태에 따라서 미생물 증식의 위험이 있다. 또한 여러 재료를 섞기 때문에 비위생적인 조건의 재료가 있다면 혼합하는 과정에서 다른 재료까지 오염될 가능성이 매우 높다. 비빔밥의 재료 중에서는 가열 조리 과

정을 거치지 않는 재료들도 있기 때문에 원재료가 오염되어 있는 경우에 위생적인 전처리 과정이 이루어지지 않거나, 조리 과정 시 불충분한 가열로 미생물의 사멸이 충분히 이루어 지지 않으면 여러 재료를 다루는 과정 중에 교차 오염이 발생할 수 있고 섭취까지 재료의 보관 등 여러 단계에서 비빔밥은 식중독을 발생시킬 가능성이 높은 식품이다(2). 또한 과일 및 채소와 같은 신선 농산물은 수확 후 소비되는 과정의 여러 단계에서 병원성 미생물을 포함한 다양한 미생물에 오염될 수 있다고 알려져 있다(3). 특히 병원성 미생물은 과일과 채소를 씻는 과정에서도 완전히 제거되지 않아 식중독 사고에 관여되는 것으로 알려져 있다(4). 그러므로 원재료의 위생적인 세척이 필요하며 또한 다양한 종류의 재료를 사용해서 만드는 복합적인 식품이 식중독에 노출되었을 때 원인을 파악하기 어려운 식품 중에 하나이기도 하다. Sin 등(5)에 의하면 요리 재료로 야채, 간장, 닭고기 등의 재료를 사용하는 식품은 세균에 의해 오염되거나 부패에 쉽게 노출되어 있다고 하였다.

대장균(*Escherichia coli*)은 사람이나 동물의 장관 내 분포되어 있는 정상 세균총으로 자연계에서도 널리 분포되어 있으며 대부분의 대장균은 병원성이 없는 것으로 알려져 있으나 일부의 특이 혈청형 대장균은 유아에게 설사를 일으킬 뿐 아니라 성인에게도 급성 위장염을 일으키는 것으로 알려져 있다(6). 이러한 대장균을 병원성 대장균이라 하며 병원성 대장균 식중독은 사람에게서 병원성을 나타내는 각종 외래성 대장균이 오염된 식품을 섭취함으로써 일어난다. 병원성 대장균은 형태와 생화학적 성상은 비병원성 대장균(non-pathogenic *E. coli*)와 비슷하며 somatic (O) 항원, capsular (K) 항원, flagella (H) 항원 등 세가지 종류의 항원에 의하여 분류되며 항원을 소유하고 있으며, 그 차이에 따라 현재까지 O 항원은 180종, K 항원은 100여종, H 항원은 56여종으

*Corresponding author: Yong-Sun Cho, Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, Sungnam, Gyunggi 712-749, Korea
Tel: 82-31-780-9242
Fax: 82-31-780-9280
E-mail: yscho@kfri.re.kr
Received August 20, 2014; revised November 20, 2014;
accepted November 26, 2014

로 알려져 있다(7). 대장균의 병원성은 임상적인 증상, 독성 인자 등의 특성에 따라 장관독소성대장균(enterotoxigenic, ETEC), 장관병원성대장균(enteropathogenic, EPEC), 장관출혈성대장균(enterohemorrhagic, EHEC), 장관침입성대장균(enteroinvasive, EIEC), 장관흡착성대장균(enteroaggregative, EAEC), 장관분산형 대장균(diffusely adherent, DAEC) 등으로 분류된다. 이 중에서 가장 문제가 되는 장관출혈성 대장균(EHEC)은 사람에게 출혈성 대장염(HC)과 급성 신장장애 등을 일으키는 용혈성 요독증후군(HUS) 등을 유발한다(8-10). 최근에는 독일에서 채소류에 오염된 대장균의 변종 미생물에 의한 식중독이 발생한 적이 있다(11). 비빔밥의 특성상 다양한 채소류를 재료로 조리하므로 준비한 재료에 대한 위생적인 관리가 충분하지 않으면 이와 같은 대장균에 의하여 식중독이 발생할 가능성이 높을 수 있다. 세균에 의한 감염 치료는 대부분 화학치료제인 항생제에 의존하고 있다. 그러나 항생제의 과다 사용으로 세균들이 다양한 경로를 통해 항생제와 접하는 기회가 많아지게 되어서 항생제 내성균의 출현이라는 필연적인 결과를 가져왔다(12). 현대사회는 외식 산업의 발달 및 소비의 증대로 인해 식품에 오염된 내성 세균의 전파가 빠르게 진행될 수 있는 가능성이 증가하고 있으므로 식품에서 분리된 세균의 항생제 감수성 조사 및 오염원을 찾기 위한 연구가 필요하다.

본 연구에서는 한국의 전통적인 복합식품인 비빔밥에서 대장균 검출을 조사하였으며 분리한 대장균의 항생제 감수성 시험 및 병원성 유전자, 혈청형을 파악하고 그 유전자와 대장균의 연관성을 파악하여 대장균의 특성을 통해 비빔밥의 안전성을 확보하는데 필요한 식품위생학적 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

2005년부터 2011년까지 국내 편의 음식점에서 판매되고 있는 1,142건의 비빔밥에서 대장균을 정성 분석하였으며, 여기서 분리된 대장균을 시험 균주로 사용하였다. 모든 분석 시료는 완전 제품 포장상태로 냉장으로 운송하여 4시간 이내에 실험을 하였다.

대장균의 정성 분석

각 비빔밥 시료 25 g에 225 mL의 멸균 인산완충용액을 가한 후 stomacher (Seward, London, UK)로 260 rpm에서 2분 동안 균질화 한 후 시험 원액으로 사용하였다. 시험 원액은 EC-mug (Merck, Darmstadt, Germany) 증균 배지에 1 mL씩 3 tube에 넣은 후 44.5°C에서 48시간 배양 후에 가스 및 형광색을 띠는 배양액을 endo agar (Merck)와 chromocult agar (Merck)에 도말 및 분리하여 전형적인 대장균 집락을 선택하여 식품공전 방법에 따라 Vitek 2 (BioMerieux, Marcy L'Etoile, France)를 이용하여 생화학 시험을 하였다.

표준 균주

본 실험에 사용한 표준 균주는 국가병원체 자원 은행 및 American type culture collection (ATCC)에서 분양 받아서 TSA (Merck)에서 37°C 18시간 배양하여 활성화 시킨 후 사용하였다.

항생제 감수성 검사

분리된 대장균 균주를 nutrient agar (Merck)에서 37°C 24시간 배양 후 Vitek 2 (BioMerieux)를 사용하여 기기 시험 방법에 따라 항생제 감수성 검사를 하였다. 검사 결과는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2011)에 따라 판정하였다. 본 연

구에 사용된 항생제는 ampicillin (AM), amoxicillin/clavulanic acid (AMC), piperacillin/Tazobactam (TZP), cefazolin (CZ), cefoxitin (FOX), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), aztreonam (ATM), etapenem (ETP), imipenem (IPM), amikacin (AN), gentamicin (GM), ciprofloxacin (CIP), tigecycline (TGC), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), ESBL confirm이며 항생제 내성을 위한 표준 균주로는 *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)와 *Staphylococcus aureus* (ATCC 292139)를 사용하였다.

대장균의 병원성 유전자 확인

생화학 동정을 한 대장균을 nutrient agar (Merck)에서 37°C 18시간 배양 활성화 시킨 후 PCR을 하였다. 사용한 primer는 1) *uidA*, *invE*, *escV*, *aggR*, *stx1*, 2) *eaeA*, *elt*, *ipaH*, *stx2*, *estIb*, 그리고 3) *pic*, *EHEC-hly*, *ent*, *astA*으로 각각 나누어서 multiplex PCR 반응시켰으며, *uid A*와 16S rRNA를 internal positive primer로 사용하였으며 primer sequence는 Table 1과 같다. Multiplex PCR 반응액은 1 U Taq polymerase, 250 μM 각 dNTPs, 2 mM MgCl₂가 포함된 reaction buffer (AccuPower multiplex PCR Premix, Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 2-10 pmol의 각 primer에 순수 분리된 단일 colony를 template 하여 총 반응액 20 μL로 하였다. PCR반응 조건은 pre-denaturation 98°C 30초 후, 35 cycles의 98°C 30초, 63°C 60초, 72°C 90초 반응시켰으며 최종적으로 extension 72°C에서 10분 증폭시켰다. 증폭된 DNA는 2% Seakem agarose gel (Takara, Kyoto, Japan)로 100 V 25분 전기영동 후 염색하여 확인하였다.

PCR 이용한 대장균의 혈청학적 검사

대장균의 혈청학적 검사를 위해 O26, O157, O145, O111, O121, O103, O91, O128의 혈청형에 대해 *rfb* (o-specific polysaccharide), *wzx* (o-unit flippase), *wbsD* (aminotransferase)의 유전자에 특이적으로 결합하는 primer를 사용하였다(Table 2). PCR 반응액은 1 U Taq polymerase, 250 μM 각 dNTPs, 10 mM Tris-HCl, 30 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂가 포함된 reaction buffer (AccuPower PCR Premix)에 10 pmol의 primer에 순수 분리된 단일 colony를 template로 총 반응액을 20 μL로 하였다. PCR 반응 조건은 pre-denaturation 94°C 5분 후, 35 cycle의 94°C 30초, 55°C 75초, 68°C 75초로 반응하였고 최종 extension은 68°C 7분 반응시켰다. 증폭된 DNA는 위와 같이 전기영동 후 염색하여 확인하였다.

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

분리된 균주를 ultra clean TM microbial DNA isolation kit (MO Bio Laboratories Inc, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 DNA를 추출하여 25-50 ng/μL로 농도를 조절해서 사용하였다. 추출한 DNA를 이용한 rep-PCR은 DiversiLab *E. coli* kit (Bacterial BarCodes Inc, Houston, TX, USA)를 이용해서 master mix 반응액을 만들었다. 반응액 조성은 rep-PCR MM1 18.0 L, gene-Amp 10X PCR buffer 2.5 L, primer Mix 2.0 L, ampliAq DNA Polymerase 0.5 L를 각각 첨가하여 전체 23.0 L로 만든 후 template DNA를 2 L 가한 후 rep-PCR 반응을 시켰다. 반응은 Tgradient (Biometra, Goettingen, Germany) PCR 기기를 이용하였으며 반응 조건은 pre-denaturation으로 94°C에서 2분간 반응시킨 후 94°C 30초간 denaturation, 45°C에서 30초간 annealing, 70°C에서 1분 30초간 extension하는 것을 1 cycle로 하여 35 cycle을 반응시키고 70°C에서 3분간 최종 extension 반응시켰다.

Table 1. Oligonucleotide primer used for detection of the virulence genes

Pathogen group	Target gene	Primer	bp
STEC, EPEC	<i>eaeA</i>	eae-F: TCAATGCAGTTCGGTATCAGTT eae-R: GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG	482
	<i>escV</i>	MP3-escV-F: ATTCTGGCTCTCTTCTTTATGGCTG MP3-escV-R: CGTCCCCTTTTACAAACTTCATCGC	544
	<i>ent</i>	ent-F: TGGGCTAAAAGAAGACACACTG ent-R: CAAGCATCCTGATTATCTCACC	629
EHEC	<i>EHEC-hly</i>	hlyEHEC-F: TTCTGGGAAACAGTGACGCACATA hlyEHEC-R: TCACCGATCTTCTCATCCAATG	688
	<i>stx1</i>	MP4-stx1A-F: CGATGTTACGGTTTGTACTGTGACAGC MP4-stx1A-R: AATGCCACGCTTCCCAGAATTG	244
	<i>stx2</i>	MP3-stx2A-F: GTTTTGACCATCTTCGTCTGATTATTGAG MP3-stx2A-R: AGCGTAAGGCTTCTGCTGTGAC	324
EIEC	<i>ipaH</i>	ipaH-F: GAAAACCTCCTGGTCCATCAGG ipaH-R: GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	437
	<i>invE</i>	MP2-invE-F: CGATAGATGGCGAGAAATTATATCCCG MP2-invE-R: CGATCAAGAATCCCTAACAGAAGAATCAC	766
EAEC	<i>aggR</i>	MP2-aggR-F: ACGCAGAGTTGCCTGATAAAG MP2-aggR-R: AATACAGAATCGTCAGCATCAGC	400
	<i>pic</i>	MP2-pic-F: AGCCGTTTCCGCAGAAGCC MP2-pic-R: AAATGTCAGTGAACCGACGATTGG	1111
	<i>astA</i>	MP2-astA-F: TGCCATCAACACAGTATATCCG MP2-astA-R: ACGGCTTTGTAGTCCTTCCAT	102
ETEC	<i>elt</i>	MP2-LT-F: GAACAGGAGTCTTTCGCTTAGGTG MP2-LT-R: CTTTCAATGGCTTTTTTTGGGAGTC	655
	<i>estIb</i>	MP2-STI-F: TGICTTTTTACCTTTCGCTC MP2-STI-R: CGGTACAAGCAGGATTACAACAC	171
16S rRNA	<i>uidA</i>	MP2-uidA-F: ATGCCAGTCCAGCGTTTTTTCG MP2-uidA-R: AAAGTGTGGGTCAATAATCAGGAAGTG	1487

Table 2. Oligonucleotide primer used for various *E. coli* serogroups

Pathogen	Target gene (bp)	Primer (5'-3')	Reference
O26	<i>wzx</i> (241)	GCG CTG CAA TTG CTT ATG TA TTT CCC CGC AAT TTA TTC AG	Zachary et al. (2012)
O157	<i>rfbE</i> (259)	CGG ACA TCC ATG TGA TAT GG TTG CCT ATG TAC AGC TAA TCC	Angela et al. (2011)
O145	<i>wzx</i> (374)	TGC TCG ACT TTA CCA TCA AC AAC CAA CAC CAT ACA CCT TGT CTT	Angela et al. (2011)
O111	<i>rfb</i> (451)	TAG AGA AAT TAT CAA GTT AGT TCC ATA GTT ATG AAC ATC TTG TTT AGC	Zachary et al. (2012)
O121	<i>wzx</i> (587)	TCA TTA GCG GTA GCG AAA GG TTC TGC ATC ACC AGT CCA GA	Zachary et al. (2012)
O103	<i>wzx</i> (716)	TTCATCACAAGTTTACAAG CGTAATCACCTTGATTTTCT	Zachary et al. (2012)
O91	<i>wbsD</i> (940)	GATGAATCAACCTTATCGAG CTGCTTATGTATAGGAATTGG	Zachary et al. (2012)
O128	<i>wzx</i> (1,353)	TCT TGC TTA TAG CCA GAA TT AAT AAA CCG ACA CCG AAA	Yayue et al. (2006)

Agilent Bioanalyzer를 이용한 DNA lab chip의 결과 판독

DNA lab chip에 ladder와 marker가 혼합된 gel-dye mix를 9 μ L 주입하고 starting syringe를 이용해서 DNA lab chip에 고정

시켰다. 고정 후에 각 well에 5 μ L의 marker를 넣고 rep-PCR 산물을 1 μ L 주입한 후 1분 동안 vortex를 이용하여 잘 혼합 한 후 Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)

를 이용하여 결과를 판독하였다. PCR 산물은 150에서 5,000 bp 사이에서 해석하였다. 결과는 DiversiLab Analysis Tool for Typing Reports 24529를 이용하여 판독하였다.

결과 및 고찰

비빔밥에서의 대장균 정성 분석

2005년부터 2011년까지 1,142건의 비빔밥검체를 Vitek II GN card를 이용하여 분석한 결과 총 84개(7.4%)의 검체로부터 대장균이 분리되었으며 연도별 검출율은 2011년에 가장 높았으며 최소 5.1%부터 최대 14.6%까지 검출되었다(Table 3). 유 등(11)의 결과에 의하면 집객업소 등에서 제공되는 조리된 음식검체 중 2.9%의 검체로부터 대장균이 검출되었으며 서울 시내에서 유통되는 식품과 식품접객업소의 조리 식품 검체에서는 대장균의 검출률이 3.8%로 나타났다. Choi 등(13)에 의하면 유통중인 깻잎, 상추 등의 채소류에서 대장균의 검출 빈도가 33-55%로 매우 높은 것으로 보고되었다. 비빔밥은 다양한 채소류가 원재료로 사용되기 때문에 집객업소에서 제공되는 상대적으로 채소류 함량이 낮은 조리 식품보다는 대장균의 오염율이 높은 것으로 생각되며, 비빔밥의 대장균 오염은 채소류 등의 원재료로부터 기인될 수 있다고 생각된다. 특히 본 연구를 통하여 비빔밥의 대장균 오염율이 높았던 2011년도의 식품의약품안전처의 원인 세균별 식중독 발생률 보고에 의하면 *E. coli* (277 cases) *Salmonella* (240 cases), *Vibrio* (185 cases)의 순으로 보고 되어서 대장균에 의한 식중독 발생 빈도수가 가장 높은 것으로 보고 되었다. 그러므로 비빔밥은 다양한 재료가 함유된 복합적인 조리 식품이므로 원재료의 위생적인 전처리가 반드시 필요하며 재료의 충분한 가열을 통해 위해 미생물을 사멸시켜야 한다. 또한 조리되어 보관된 식품은 보관 온도를 지키고 교차오염을 방지해야 식중독을 사전에 예방 할 수 있다고 생각된다. 또한 지속적인 관리를 통해 식중독 발생을 방지할 필요성이 있다.

대장균의 항생제 내성 및 다제 내성 분석

비빔밥에서 2005년부터 2011년까지 분리한 대장균 84 균주에 대한 항생제 내성을 분석한 결과는 Table 4와 같다. 항생제 감수성 시험 결과는 시험 균주의 86.9%인 73 균주는 항생제에 대한 내성을 보이지 않았다. 항생제 내성 균주는 ampicillin (AM) 10.7%, amoxicillin/clavulanic acid (AMC) 4.8%, cefazolin (CZ) cefoxitin (FOX) trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT) 3.6% 순으로 11 균주에서 나타났다.

항생제 다제 내성은 84 균주 중 6 균주(7.2%)에서 다제 내성을 보유하고 있었으며, 이러한 결과를 통하여 대장균의 항생제에

Table 3. Prevalence of *E. coli* in bibimbap from 2006 to 2011

Year	No. of samples	Contaminated samples with <i>E. coli</i>	
		No.	%
2005	86	7	8.1
2006	193	13	6.7
2007	194	14	7.2
2008	212	12	5.7
2009	195	10	5.1
2010	180	16	8.9
2011	82	12	14.6
Total	1142	84	7.4

Table 4. Antimicrobial sensitivity/resistance pattern of *E. coli* isolates from bibimbap

Antimicrobial agent	No. of isolates from bibimbap (n=84)		
	sensitive	intermediate	resistant
Ampicillin (AM)	75 (89.3)	2 (2.4)	7 (10.7)
Amoxicillin/Clavulanic acid (AMC)	80 (95.2)	1 (1.2)	3 (4.8)
Piperacillin/Tazobactam (TZP)	84 (100)	0	0
Cefazolin (CZ)	81 (96.4)	0	3 (3.6)
Cefoxitin (FOX)	81 (96.4)	0	3 (3.6)
Cefotaxime (CTX)	84 (100)	0	0
Ceftazidime (CAZ)	84 (100)	0	0
Cefepime (FEP)	84 (100)	0	0
Aztreonam (ATM)	84 (100)	0	0
Eetapenem (ETP)	84 (100)	0	0
Imipenem (IPM)	84 (100)	0	0
Amikacin (AN)	84 (100)	0	0
Gentamicin (GM)	84 (100)	0	0
Ciprofloxacin (CIP)	82 (97.6)	0	2 (2.4)
Tigecycline (TGC)	84 (100)	0	0
Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT)	81 (96.4)	0	3 (3.6)

Table 5. Multiple drug resistance of *E. coli* isolates bibimbap

No. of drugs	Resistant patterns			No. of resistant strains	Total (%)
3	AMC ^a	TZP	FOX	3	4 (4.8)
	AMC	CIP	SXT	1	
2	AMC	SXT		1	2 (2.4)
	AMC	TZP		1	
1	AMC			3	5(6.0)
	CIP			1	
	SXT			1	
0				73	73 (86.9)

^aAbbreviations; Amoxicillin/Clavulanic (AMC), Piperacillin/Tazobactam (TZP), Cefoxitin (FOX), Ciprofloxacin (CIP), Trimethoprim/Sulfamethoxazole (SXT)

대한 내성이 비교적 높지 않음을 알 수 있었다. Yoo 등(12)의 연구에 의하면 국내 유통 식품에서 조리된 식품에서 분리된 대장균의 항생제 내성에 대한 연구 결과에 의하면 대부분이 ampicillin 과 amoxicillin/clavulanic acid에 대하여 대부분 내성을 나타내었다. 대장균은 주로 육회에서 분리되었다. 그러나 내성 항생제의 종류는 AM 36%, AMC 32%로 비빔밥에서 분리된 대장균보다 높은 항생제 내성을 보였다(12). 다른 연구에 의하면 유통되는 쇠고기 중의 항생제 내성은 쇠고기에서 대장균의 분리율이 9.8% 이고 항생제 내성률은 AM 35.5%, AMC 2.9% CZ 47.1%이었다(14). 따라서 본 연구의 결과 항생제의 내성률은 두 결과보다는 낮았으나 내성을 나타내는 항생제의 종류는 동일하여 식육에서 분리된 대장균이 항생제에 대하여 내성이 높을 가능성이 있다. 그러나 비빔밥에서 분리한 대장균은 식육, 야채, 작업 환경 등 여러 경로의 오염원 및 교차 오염으로 인하여 오염될 가능성이 높기 때문에 항생제 내성률이 식육에서 분리된 대장균에 비해 낮은 것으로 유추 된다. 비빔밥의 경우는 오염원의 경로가 다양하므로 철저한 위생적인 관리가 필요하며, 비빔밥 유래 대장균의

Table 6. Detection of pathogenic *E. coli* samples of bibimbap according to primer

Pathogen		No. of sample	No. (%) of contaminated samples
Target			
STEC, EPEC	<i>eaeA</i>	84	0
	<i>escv</i>	84	0
	<i>ent</i>	84	5(5.9%)
Typical EPEC	<i>bfpB</i>	84	0
STEC	<i>EHEC-hly</i>	84	0
	<i>stx1</i>	84	0
	<i>stx2</i>	84	0
EIEC	<i>ipaH</i>	84	0
	<i>invE</i>	84	0
EAEC	<i>aggR</i>	84	0
	<i>pic</i>	84	0
	<i>astA</i>	84	0
ETEC	<i>elt</i>	84	0
	<i>estIa</i>	84	0
	<i>estIb</i>	84	0
<i>E. coli</i>	<i>uidA</i>	84	70(83.3%)

항생제 내성에 대한 연구는 복합 조리 식품 등 다양한 재료에서 분리된 대장균에 대한 특성연구에 기초가 될 수 있다.

대장균의 병원성 유전자 분리율 및 혈청학적 특성

비빔밥에서 분리한 대장균의 병원성 대장균의 종류를 병원성 유전자의 특성 multiplex PCR을 이용하여 16종의 유전자에 대해서 분석한 결과 5 균주(5.9%)에서 STEC/EPEC 형으로 의심되는 *ent* 유전자를 보유한 대장균이 분리되었으며, EIEC, EAEC, ETEC 형은 검출되지 않았다. 대장균 *uid A* 유전자는 70 균주(83.3%)에서 분리되었다(Table 6). 이러한 결과는 비빔밥에서 대장균의 분리율이 유 등(12)의 완전 조리된 식품에서의 2.9% 보다 매우 높았으며 5 균주에서 EHEC의 독소와 연관되어 있는 enterotoxin 유전자인 *ent*는 *Shigella* ShET-2와 매우 유사하므로 위해성이 높다(15). 또한 조리 식품의 경우는 별도의 조리 과정 없이 소비자가 바로 섭취하고 비빔밥의 경우는 원재료가 다양하고 만드는 과정이 복잡하므로 교차 오염이 발생할 가능성이 높은 복합 완전 조리 식품이므로 위생적인 조리과정을 통한 관리가 필요하다고 생각된다.

분리한 5 균주를 PCR을 이용해 STEC 중 식중독 유발 가능성이 높은 8종류(16)의 혈청형에 대한 검출을 한 결과 *ent* 유전자를 보유하고 있으면서 혈청형이 구분되는 대장균은 없었다. 그러나 병원성 유전자를 보유하고 있지는 않지만 O103, O91 혈청형 유전자를 가지고 있는 대장균은 각 1 균주(1.2%), O128 유전자를 보유하고 있는 대장균은 5 균주(6.0%)가 분리되었다. 그러나 EHEC에 속하는 혈청형이지만 분리한 균주에서 verotoxin 유전자는 검출 되지 않았다.

다른 종류의 혈청형을 가진 대장균은 식육이나 유제품 생산 과정에서 공중 보건학적으로 중요하지만 많은 STEC의 병원성 대장균에 속하는 혈청형 균주 중에는 시가 독소를 생산하지 않거나 *stx* 유전자를 보유하고 있지 않다고 보고되어 있어 비빔밥에서 분리한 균주 중에 EHEC에 속하는 혈청형 균주에서 독소 유전자가 분리되지 않는 본 시험의 결과와 유사하였다(17). 동일한 O 혈청형 균주는 독소 유전자를 가지고 있는 것과 유전자가 없

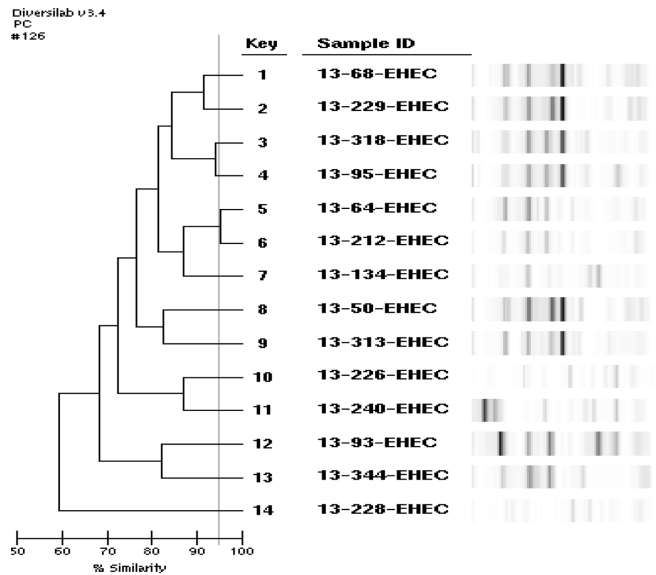


Fig. 1. Rep-PCR generated dendrogram for the *E. coli* isolates from bibimbap. An SI cutoff 95% was used for interpretation of relatedness as depicted by the vertical line.

는 균주가 동시에 공존하고 있음을 알 수 있다고 보고 되어 있고 혈청형으로 병원성 유전자를 구분하는 것은 균주의 특성에 따라 차이가 많이 나므로(17) 향후 이에 대한 상관 관계에 대한 연구가 필요하다고 생각된다. 또한 식품에서 분리한 대장균에 대한 병원성 대장균에 대한 분석법은 전통적인 배지법 등을 통해서 알 수 없으므로 정확한 병원성 대장균 분석을 위해서는 PCR을 통한 유전자 검사 및 혈청형을 통한 시험 방법을 병행하여서 병원성에 대한 연구가 진행되어야 한다고 생각된다.

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

항생제에 내성(7 균주)이 있거나 혈청형 구분이 된 대장균(7 균주)에 대해서 automated Repetitive-Sequence-Based PCR (rep-PCR)를 이용하여 대장균에 대한 유전학적 상동성을 시험한 결과 시험 균주 간의 상동성이 매우 낮아서 분리한 대장균은 다양한 특성을 지니고 있음을 알 수 있다(Fig. 1). 이는 식품에서 위생학적인 관점에서 분리한 대장균은 다양한 오염원에서 분리 됨을 유추 할 수 있다. 기존 연구에서 조리 이전 단계에서 원재료에 분리한 대장균에 대한 병원성 대장균 특성 및 항생제 내성 등에 관한 연구가 활발하나 완전 조리 식품에서 분리한 대장균에 대한 분류의 시험 결과는 미흡한 실정이다. 최근에는 기후의 변화 등의 다양한 환경적인 요소에 의해 신종 및 변종 미생물이 증가하고 있으며, 자동화된 rep PCR을 이용한 유전자 상동성 분석은 intra-, inter-laboratory 간의 재현성이 pulsed field gel electrophoresis (PFGE)에 비해 매우 높은장점이 있어 미생물의 profile 연구가 많이 진행되고 있다(18-20). 향후 원재료 및 완전조리 식품에서 분리한 대장균에 대한 유전자 상동성에 대한 많은 profile 을 수집하여 병원성 대장균에 대한 특성 조사를 통해 오염원의 추적과 분리한 균의 생화학적 특성과의 연관성을 확인하는 것에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

비빔밥에서 분리한 대장균의 병원성 노출 빈도는 낮았으나 대장균은 위생 지표 세균이며, 비빔밥은 다양한 재료를 사용하며 제조 과정이 복잡하기 때문에 오염 가능성이 매우 높은 식품이

다. 따라서 원재료의 전처리, 조리가 완료된 재료 보관, 조리과정 (작업자, 작업장의 상태) 등의 각 단계별 오염원에 대한 명확한 추적적으로, 정확한 위생관리를 통해 소비자가 안심하고 섭취 할 수 있는 비빔밥을 제공하여야 한다.

요 약

본 연구에서는 한국의 전통적인 식품인 비빔밥에서 2005년에서 2011년에 분리한 대장균에 대한 특성을 연구하였다. 전체 1,142건의 비빔밥에서 84 균주(7.4%)의 대장균이 분리되었다. 분리한 균주의 항생제 내성 분석 및 다제 내성 패턴은 ampicillin의 내성이 가장 높았으며 6 균주(7.2%)에서는 다제 내성을 보였다. 분리한 균주의 병원성 유전자 13종의 유무를 확인한 결과 5 균주(5.9%)에서 *ent* 유전자를 보유하여 STEC/EPEC 형의 대장균으로 분류되었다. 그러나 EIEC, EAEC, ETEC 형은 검출되지 않았다. 병원성 유전자가 검출되지 않은 대장균에 대한 혈청형은 O103 (1.2%), O91 (1.2%), O128 (6.0%)으로 확인되었고 O26, O157, O145, O111, O121 혈청형은 없었다. 동일한 O 혈청형 균주는 독소 유전자를 가지고 있는 것과 없는 것이 동시에 있다고 보고되어 있고 혈청형으로 병원성 유전자를 구분하는 것은 균주의 특성에 따라 차이가 많이 나므로 향후 연구가 필요하다. 위해 요소가 있는 균주에 대해서 유전적 상동성을 시험한 결과 균주의 상동성이 낮아서 서로 다른 오염원에서 분리 되었음을 유추할 수 있었다. 비빔밥은 다양한 재료를 사용하며 제조 과정이 복잡하기 때문에 대장균에 의한 오염의 가능성이 매우 높은 식품이다. 그러므로 원재료부터 완성까지 위생적으로 철저하게 조리해야 하며 교차 오염 방지 및 관리를 통해 안심하고 섭취할 수 있도록 해야 한다.

References

- Park JN, Song BS, Kim JH, Choi JI, Sung NY, Han IJ, Lee JW. Sterilization of ready to cook *bibimbap* by combined treatment with gamma irradiation for space food. *Radiat. Phys. Chem.* 81: 1125-1127 (2012)
- Kye SH. Hazard analysis and critical control points of one-dish meal prepared at Korean restaurants: *naeng-myeun* (Cold noodles) and *bi-bim bab* (Mixed rice). *Korean J. Food Culture* 10: 167-174 (1995)
- Kang TM, Cho SK, Park JY, Song KB, Chung MS, Park JH. Analysis of microbial contamination of sprouts and fresh cut salads in a market. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 490-494 (2011)
- Beuchat LR. *Listria monocytogenes* incidence on vegetables. *Food Control* 7: 223-228 (1996)
- Sin HA, Lee YJ, Lee JY, Paik HD. Microbiological investigation of ready to cook pork *bulgogi* on Korean markets. *Korean J. Food Sci. An.* 32: 441-447 (2012)
- Song SW, Jung SC, Kim SI, Jung ME, Kim KH, Lee JY, Lim SK, Lee YJ, Cho NI, Park JM, Park YH. Surveillance of antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from slaughterhouse in Korea 2003. 1. Antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolated from carcasses in slaughterhouse. *Korean J. Vet. Res.* 28: 215-221 (2004)
- Koo MS, Kim HJ. Shiga toxin producing *Escherichia coli* and foodborne disease. *Safe Food* 6: 23-28 (2011)
- Bischiff C, Luthy J, Altwegg M, Baggi F. Rapid detection of diarrheagenic *E. coli* by real time PCR. *J. Microbiol. Meth.* 61: 335-341 (2005)
- Asseta K, Outi M, Taru L, Anja S, Alfred ST, Nicolas B, Kaisa H. Diarrheagenic *Escherichia coli* detected by 16-plex PCR in raw meat and beef intestines sold at local market in Ouagadougou Burkina Faso. *Int. J. Food. Microbiol.* 153: 154-158 (2012)
- Rey J, Sanchez S, Blanco JE, Mendoza JH, Mendoza MH, Garcia A, Gil C, Tejero N, Rubio R, Alonso JM. Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int. J. Food. Microbiol.* 107: 212-217 (2006)
- Alexander G, Amalia MP, Sarah M, Burton B. Development of a method for the detection of verotoxin producing *Escherichia coli* in Food. *J. Food Prot.* 75: 827-837 (2012)
- Yoo YA, Kim MS, Kim KS, Park SH, Jung SK. Antimicrobial resistance and implicated genes of *E. coli* isolated from commercial and cooked foods in Seoul. *J. Fd. Hyg. Safety* 25: 220-225 (2010)
- Choi JW, Park SY, Yeon JH, Lee MJ, Chung DH, Lee KH, Kim MG, Lee DH, Kim KS, Ha SD. Microbial contamination levels of fresh vegetable distributed in markets. *J. Fd. Hyg. Safety* 20: 43-47 (2005)
- Kim HT, Jung KT, Lee DS, Lee KW. Study on antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from domestic beef on sale (2). *Korean J. Vet. Serv.* 32: 93-102 (2009)
- Joerg J, Sylke W, Leonid R, Jürgen E, Claudia L, Petra K, Peter S, Helmut T, Lothar HW. Description of a 111-kb pathogenicity island (PAI) encoding various virulence features in the enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strain RW1374 (O103:H2) and detection of a similar PAI in other EHEC strains of serotype O103:H2. *Int. J. Med. Microbiol.* 294: 417-425 (2005)
- Lin A, Sultan O, Lau H. K, Wong E, Hartman G, Lauzon C. R. O serogroup specific real time PCR assay for detection and identification of nine clinically relevant non-O157 STECs. *Food Microbiol.* 28: 478-483 (2011)
- Sylvie P, Françoise D, Joel G, Patrick F. Screening food raw materials for the presence of the world's most frequent clinical cases of Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* O26, O103, O111, O145 and O157. *Int. J. Food. Microbiol.* 113: 284-288 (2007).
- Ross TL, Merz WG, Farkosh M, Carroll KC. 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 (2005)
- Shutt CK, Pounder JI, Page SR, Schaecher BJ, Woods GL. 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 (2005)
- Witta R, Kanhaib V, Leeuwena WB. Comparison of the diversilab™ system, pulsed-field gel electrophoresis and multi-locus sequence typing for the characterization of epidemic reference MRSA strains. *J. Microbiol. Meth.* 77: 130-133 (2009)