

식육유래의 *Staphylococcus aureus*으로부터 산생되는 staphylococcal superantigens의 유전자형 분석

윤장원 · 정석찬* · 양수진 · 정병열* · 서근석 · 김소현 · 박용호

서울대학교 수의과대학 미생물학교실
농림부 국립수의과학검역원*
(1998년 9월 11일 접수)

Gene typing of staphylococcal superantigens produced by *Staphylococcus aureus* isolates from meat

Jang-won Yoon, Suk-chan Jung*, Soo-jin Yang, Byong-youel Jung*, Keon-suk Seo,
So-hyun Kim, Yong-ho Park

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University
National Veterinary Research and Quarantine Services*

(Received Sep 11, 1998)

Abstract : Using the previous established multiplex PCR (mPCR), the presence of six kinds of staphylococcal superantigen (SAg) genes was investigated for nineteen *Staphylococcus aureus* isolates from the commercialized meat sources. As a result, only one isolate from pork among 19 *S aureus* isolates (5.3%) was confirmed as a potential SAg producer and harbored *sec* gene. The results in this study suggest that meat may not be major contagion of staphylococcal food poisoning (SFP) in Korea and that staphylococcal enterotoxin type C may be associated with the disease. Also, the mPCR method in this study can be a useful genotypic method which can overcome the typical disadvantages of conventional antibody-based methods due to antigenic homology, and further survey on food-borne *S aureus* isolates can provide the important epidemiological data for SFP in Korea.

Key words : staphylococcal enterotoxins, Toxic shock syndrome toxin-1, Multiplex PCR, meat.

본 연구는 서울대학교 수의과대학 부설 수의과학연구소 연구비 지원에 의해 수행되었음.

Address reprint requests to Dr. Yong-ho Park, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, Kyunggi 441-744, Republic of Korea.

서 론

Staphylococcus aureus (*S. aureus*)는 환경에 널리 존재하며, 사람에서 광범위한 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 특히 이 균종에 의해서 산생되는 장독소는 사람에게서 구토, 설사 및 장염 등을 일으키는 주된 식중독 원인체의 하나일 뿐 아니라 심각한 경우 독성 쇼크성 증후군을 일으켜 치사에 이르게 할 수 있음이 보고되어 있다¹⁻³. 비록 이들 장독소가 식중독을 일으키는 병원성 기전에 대하여 명백하게 밝혀져 있지 않았지만 다수의 보고에 따르면 이들 독소 혹은 독소를 산생하는 *S. aureus*에 의하여 오염된 식품을 섭취하였을 때 문제를 일으킨다고 하였다⁴. 한편 독성 쇼크성 증후군 독소는 급성 쇼크성 증후군을 유발하여 치사를 일으킬 수 있는 *S. aureus* 유래의 세포의 독소의 일종으로 장독소와 달리 식중독에 관여하지는 않지만 tampon을 매개로 감염이 보고되어 있다^{5,6}.

또한 *S. aureus* 유래의 장독소와 독성쇼크성증후군 독소는 superantigen(SAg)으로서 독특한 생물학적 활성을 지니고 있다. 즉, 비정상적인 항원처리과정을 통하여 비특이적 방식으로 정상 항원보다 약 수천배 이상의 T 림프구를 자극할 수 있어 IFN- γ , IL-1, TNF 등과 같은 cytokine들의 과잉 유리 및 숙주의 면역계를 억제하고, 염증성 질병의 만성화를 유도할 수 있다⁷⁻⁹.

지금까지 알려진 *S. aureus* 유래의 장독소는 각각의 항원적 상이성에 의하여 A-E형, G형, H형 그리고 I형의 8종의 혈청형이 존재하며, 이중 C형은 다시 C₁, C₂, C₃ 등 3가지 이상의 아형으로 나뉘어진다¹⁰⁻¹². 하지만 이들 독소들에 대한 염기서열분석은 상호간에 높은 상동성을 지니고 있음을 보여주었고^{2,13}, 이러한 상동성은 각 독소형을 검출하거나 감별하는데 많은 어려움을 주고 있다. 이들 독소를 검출하기 위한 방법은 혈청학적 방법과 유전학적 방법으로 크게 나눌 수 있다. 하지만 혈청학적 방법의 경우 충분한 양의 항원과 anti-toxin antibody의 요구 및 교차반응의 형성 등과 같은 전형적인 단점이 존재하며, 기존의 유전학적 방법 역시 특이성과 모든 독소형을 검출하기 위하여 반복된 수행을 해야하는 등의 단점이 있었다. 최근 이러한 단점을 극복할 수 있는 multiplex PCR (mPCR)기법이 개발되었고, *S. aureus* 유래의 장독소와 독성 쇼크성 증후군 독소를 특이적으로 검출할

수 있었다¹⁴.

식품중에 오염된 *S. aureus*로부터 산생되는 이들 독소에 대한 조사는 이미 외국에서 다수의 보고가 있었으나¹⁵⁻¹⁷, 국내의 경우 강 등¹⁸에 의하여 집합유에서 장독소 A형~D형에 대하여 제한적으로 조사된 적이 있을 뿐 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구는 최근 개발된 mPCR 기법을 이용하여 1996년 10월부터 1997년 1월까지 시중에서 무작위로 구입한 소고기, 돼지고기 그리고 닭고기로부터 분리한 19주의 *S. aureus*에 대하여 장독소 및 독성 쇼크성 증후군 독소의 유전자를 검출함으로써 이들 독소의 분포율을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주 : 장독소를 산생하는 공시균주는 서울대학교 수의과대학 미생물학교실에서 보관중인 *S. aureus* FRI 913(장독소 A형, C형, E형 그리고 독성 쇼크성 증후군 독소의 복합 산생주), *S. aureus* MNHOCH(장독소 B형 산생주), *S. aureus* FRI 472(장독소 D형 산생주) 그리고 장독소를 산생하지 않는 *S. aureus* RN4220을 각각 mPCR을 위한 양성 및 음성 대조균으로 사용하였다.

본 연구를 위하여 1996년 10월부터 1997년 1월까지 시중에서 무작위로 구입한 소고기, 돼지고기 그리고 닭고기로부터 분리하여 국립수의과학검역원에서 보관중이던 47주의 *S. aureus* 추정 균주로부터 균 동정을 실시하여 SAg의 유전자형 분석을 위해 사용하였다.

균 분리 및 동정 : 식육의 처리는 미국 AOAC의 표준 방법을 사용하였다¹⁹. 먼저 식육을 균질화하기 위하여 식육 25g을 무균적으로 정량하여 멸균된 stomacher bag에 넣은 후 buffered peptone water 225ml을 첨가하여 stomacher (IUL Instrument, Spain)에서 고속으로 2분동안 처리하였다. 10% NaCl과 1% sodium pyruvate가 함유된 TSB(PSTBS) 9ml에 균질액 1ml을 첨가한 후 37℃에서 48±2시간 배양하고, 배양액을 50% egg yolk가 함유된 Baird-parker 배지(Lab M, London)에 접종하였다. 2일간 배양한 후 lipase와 lecithinase 활성에 의한 특유의 분해상을 보이는 검은 색 균락을 선별하고, 선별된 균락은 Bergey's Manual에 묘사된 대로 그람염색, catalase test, coagulase test, 1% mannitol fermentation test 그리고 DNase test 등의 생화학 검사를 실시하여 동정하였다. 최종적으로 Gram Positive Identification Card를 이용하여 Vitek system(Vitek systems,

Inc., Hazelwood, Mo.)에서 확인하였다.

DNA의 분리 : mPCR에 사용될 DNA는 lysostaphin 처리를 통하여 준비되었다. 즉, 균을 brain heart infusion broth (Difco)에 접종하여 37℃에서 일야 배양한 후 배양액 1.5ml을 취하여 12,000rpm에서 3분간 원심하여 집균하였다. 획득한 pellet을 500µl의 TE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 부유시킨 후 50단위의 lysostaphin(Sigma)과 100µg의 protease X IV(Sigma)를 첨가하여 37℃에서 1.5시간동안 처리하였다. 이후 동량의 phenol-chloroform-isoamylalcohol(25 : 24 : 1)를 첨가하여 부드럽게 혼합한 후 12,000rpm에서 10분동안 원심하였다. 원심후 추출된 DNA가 함유된 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮기고, 순수한 DNA를 획득하기 위하여 동일한 과정을 1~2회 반복하였다. 여기에 동량의 isopropanol을 첨가하여 -70℃에서 30분동안 반응시켜 추출된 DNA를 침전시킨 후 침전된 DNA는 12,000rpm에서 10분동안 원심하여 수집하였다. 잔류하는 salt를 제거하기 위하여 70% ethanol을 가지고 2회 세척한 후 진공건조한 pellet을 1µg/ml의 RNase가 함유된 DW를 50µl 가량 첨가하고 37℃에서 1시간동안 처리하였다. 분리한 DNA는 spectrophotometer(Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.)를 이용하여 260nm에서의 흡광도를 측정함으로써 정량한 후, 이후 실험을 위하여 -20℃에서 보관하며 사용하였다.

Multiplex PCR (mPCR) : *S aureus*에 의하여 산생되

는 staphylococcal SAGs의 독소형 분석을 위하여 저자 등¹⁴에 의하여 이미 개발된 mPCR 기법을 이용하였다. Table 1은 mPCR에 사용된 primer의 oligonucleotide sequence를 보여주고 있다.

모든 mPCR은 GeneAmp PCR system 2400(The Perkin Elmer Corp., Norwalk, CT)에서 수행되었고, 반응액은 2.5µl의 10×PCR reaction buffer(Mg-free; Promega), 400µM deoxynucleoside triphosphate mixture, 3mM MgCl₂ 그리고 7.5% dimethyl sulfoxide를 첨가한 후 50 pmol primer mixture, 100ng의 Template DNA를 넣고 최종용량이 24µl가 되도록 DW를 첨가한다. Primer mixture는 각 primer의 annealing temperature를 토대로 *sea/sec/sed*와 *seb/see/tst*의 두가지 조합으로 구성되었다. 이후 95℃에서 5분동안 hot start한 후 1.5 unit/µl *Taq* DNA polymerase(promega)를 넣고, 95℃ 1분(denaturation), 56℃ 2분(*sea/sec/sed*) 혹은 50℃ 2분(*seb/see/tst*) (annealing), 72℃ 1분(extension)을 1회 반응으로 하여 30회 반복하고, 72℃ 5분동안 최종 extension을 수행하였다. 증폭된 산물을 확인하기 위하여 5µl의 각 mPCR 산물을 ethidium bromide(Sigma)가 첨가된 1.5% agarose gel에 loading한 후 120볼트에서 1.5시간 전기영동한 후 UV transilluminator에서 확인하였다.

결과 및 고찰

Table 1. The oligonucleotide sequence of primers used in this study

Primer	5'→3' sequences	Location	Size(bp)
<i>sea</i>	SEA-1	TTGGAAACGGTTAAAACGAA	490-509
	SEA-2	GAACCTTCCCATCAAAAACA	591-610
<i>seb</i>	SEB-1	TCGCATCAAAGTACAAAGG	634-653
	SEB-2	GCAGGTACTCTATAAGTGCC	1091-1110
<i>secl</i>	SEC-1	GACATAAAAGCTAGGAATTT	676-695
	SEC-2	AAATCGGATTAACATTATCC	913-932
<i>sed</i>	SED-1	CTAGTTTGGTAATATCTCCT	354-373
	SED-2	TAATGCTATATCTTATAGGG	652-671
<i>see</i>	SEE-1	TAGATAAAGTTAAAACAAGC	491-510
	SEE-2	TAACCTTACCGTGGACCCTTC	640-659
<i>tst</i>	TSST-1	ATGGCTATATACATTCAATT	251-270
	TSST-2	TTTCCAATAACCACCCGTTT	581-600

식육은 많은 병원성 혹은 독소원성 세균의 매개체 역할을 할 수 있으며 특히 *S aureus* 와 같이 소비되기 전에 식육내에서 성장하여 독소를 산생할 수 있는 병원체에게 있어서 더욱 중요한 감염의 수단일 수 있다²⁰. 최근 사람에서 문제시 되는 식중독 원인균중 *S aureus* 가 산생하는 장독소는 주요한 원인물질의 하나로 인식되어 왔다.

최근까지 다양한 식품유래의 *S aureus* 에 의해 산생되는 장독소 및 독성 쇼크성 증후군 독소의 독소형 분석이 시도되었다¹⁵⁻¹⁷. 이러한 독소형 분석의 결과는 지리학적 분포 및 숙주동물의 biotype에 따라 다른 양상을 보여주었다. 예컨대 1997년 프랑스의 *Rosec et al*¹⁵은 시판되고 있는 식품류를 조사한 결과, 생유로 만든 치즈가 주된 오염원이었으며 총 230주의 *S aureus* 분리주중 30.5%가 하나 이상의 장독소를 산생하였고 장독소 C형이 가장 우세한 독소형임을 보고하였다. 또한 1994년 브라질의 *Ayulo et al*¹⁶은 생선류 및 해산물로부터 분리한 109개의 분리주중 9주만이 장독소를 산생하였으며, 이중 SEA가 가장 우세한 독소형이라고 보고하였다. 유사하게 1991년 자이레의 *Mathieu et al*¹⁷은 52개의 *S aureus* 분리주중 25%인 13주가 장독소를 산생하였으며, SEA가 가장 우세한 독소형이라고 하였다.

한편 국내에서는 1990년 강 등¹⁸에 의하여 생유로부터 분리한 133개의 *S aureus* 분리주중 88%가 하나 이상의 장독소를 산생하였으며, 이중 SEC가 가장 우세한 독소형임을 보고하였다. 하지만 식육유래의 *S aureus* 로부터 산생되는 장독소의 독소형을 조사한 보고는 아직까지 없었다. 따라서 본 연구에서는 시판되고 있는 식육으로부터 분리·동정한 19개의 *S aureus* 분리주로부터 산생되는 6종의 SAg 독소의 유전자를 검출함으로써 잠재적인 독소형 분석을 시도하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 독소유전자형 분석결과는 19주중 돼지고기 유래의 1주(5.3%)만이 잠재적인 독소산생주였으며, *sec* 유전자를 가지고 있음을 보여주었다.

Table 2. Prevalence of superantigen genes from 19 *S aureus* isolates from meat

	No. of <i>S aureus</i> (%)	SAg genes detected	Source
Non-entoxigenic	18(94.7)	-	소, 돼지, 닭고기
Enterotoxigenic	1(5.3)	<i>sec</i>	돼지고기

본 연구의 결과는 기존의 강 등¹⁸에 의해 보고된 장독소원성 *S aureus* 의 분리율과 현저한 차이를 보여주었다. 이러한 차이는 가검시료 및 독소형 분석방법의 차이에 의한 것으로 추정된다. 즉, 강 등¹⁸은 생유 유래의 분리주중 coagulase-양성 *S aureus* 만을 선별한 후 항체 토대의 기법(RPLA)을 이용한 반면, 본 연구에서는 식육 유래의 *S aureus* 분리주가 보유하고 있는 독소 유전자를 검출하였다. 일반적으로 항체검출을 토대로 한 기법은 유전자 검출기법에 비하여 민감도와 특이도에서 낮으므로 이러한 높은 비율이 가양성 반응에 기인한 것으로 사료된다.

최근까지 다수의 보고에 의하면 포도상구균성 식중독에서 SEA에 의한 식중독이 가장 흔한 것으로 알려져 있지만⁴ 본 연구에서는 *sea* 유전자를 검출할 수 없었다. 이는 국내에서 발생하는 포도상구균 식중독에서 식육이 주된 전염원이 아니며, 식육유래 식중독의 발생이 SEA

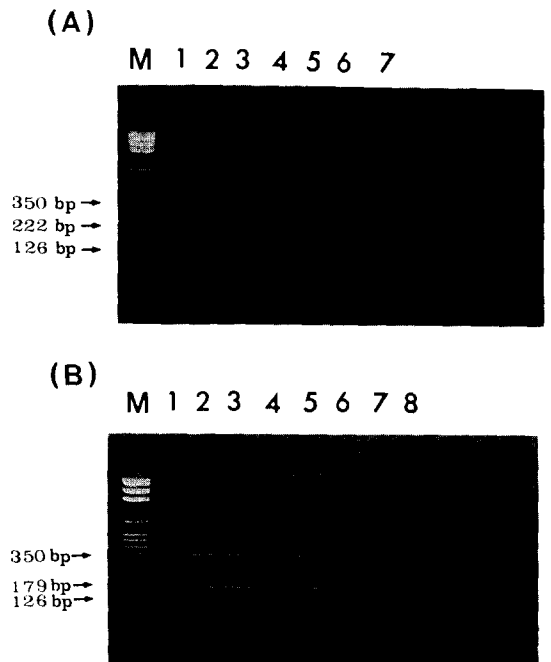


Fig 1. Detection limit of mPCR after *S aureus* Fri 913 was artificially inoculated with each 10-fold serial dilutes in beef homogenate and cultured in PSTBS broth for 18hrs at 37°C. All the mPCR product were visualized on UV transilluminator after 1.5% agarose gel electrohoresis at 120V. (A) *sea/sec/sed* 의 primer mixture를 이용한 mPCR, (B) *seb/see/tst* 의 primer mixture를 이용한 mPCR. Lane M: pGEM DNA Marker, Lane 1 to Lane 7: 1.5 × 10⁹ cfu/ml (A & B), Lane 8: Negative control without template DNA (B).

보다는 SEC에 기인될 가능성이 있음을 암시한다. 본 연구에서의 결과는 국내 분석된 시료의 크기가 작기 때문에 식육유래의 포도상구균성 식중독에서 SEC의 관련성 및 주 전염원을 단정하기 어렵다. 하지만 본 연구에서 이용된 mPCR 기법은 잠재적인 superantigen의 존재를 쉽고 빠르게 검출해낼 수 있는 유용한 방법일 것으로 사료된다. Figure 1은 mPCR 기법이 가검식육의 균질액을 PSTSB에서 18시간 배양한 후 직접 식육에 적용될 수 있음을 암시한다. 따라서 본 연구에서 사용된 mPCR 기법을 이용하여 더 많은 시료에 대한 분석은 국내 포도상구균성 식중독에서 역학적 현상을 연구하는데 중요한 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

1996년 10월부터 1997년 1월까지 시중에서 무작위로 구입한 소고기, 돼지고기 그리고 닭고기에서 분리·동정한 19개의 *S aureus* 분리주에 대하여 mPCR 기법을 이용하여 6종의 SAg 독소 유전자의 검출을 통한 독소형 분석을 시도하였다. 분석결과 19주중 돼지고기 유래의 1개(5.3%)의 분리주만이 잠재적인 독소산생주로 확인되었으며, sec 독소유전자를 보유하고 있었다. 이러한 결과로부터 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 국내 포도상구균성 식중독에서 식육은 주된 전염원이 아니며, SEA 보다는 SEC가 관련된 독소일 것으로 추정된다.
2. 본 연구에서 사용된 mPCR 기법을 이용하여 *S aureus* 유래의 장독소 및 독성 쇼크성 증후군 독소를 신속 정확하게 검출할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Gyles CL, Thoen CO. *Staphylococcus aureus*. In Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 2nd edition, Iowa State University Press, 1993.
2. Marrack P, Kappler J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, 248:705-711, 1983.
3. Johnson HM, Russell JK, Pontzer CH. Superantigens in human disease. *Scientific American*, 92-101, 1992.
4. Park CE, Akhtar M, Rayman MK. Nonspecific reaction of a commercial enzyme-linked immunosorbent

- assay kit(TECRA) for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl Environ Microbiol*, 58(8): 2509-2512, 1992.
5. Bergdoll MS, Schlievert PM. Toxic shock syndrome toxin. *Lancet*, 2:691, 1984.
6. Garbe PL, Arko RJ, Reingold AL, et al. Staphylococcus aureus isolates from patients with non-menstrual toxic shock syndrome: evidence for additional toxins. *J Am Med Assoc*. 253:2583-2542, 1985
7. Bohach GA, Ferens W, Deobald C, et al. Interaction of staphylococcal enterotoxins with immune cells and their role in animal disease. 한국수의공중보건학회, 20(4):337-348, 1996.
8. Murray DL, Ohlendorf DH, Schlievert PM. Staphylococcal and Streptococcal superantigens: their role in human diseases. *ASM News*, 61(5):229-2358, 1995.
9. Davis WC, Ferens W, Bohach GA, et al. Role of staphylococcal enterotoxin C in the pathogenesis of mastitis. 한국수의공중보건학회, 20(4):299-3099, 1996.
10. Su Yi-Cheng, Lee Wong A.C. Identification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl Environ Microbiol*, 61(4):1438-1443, 1995.
11. Marr JC, Lyon JD, Roberson JR, et al. Characterization of novel type C staphylococcal enterotoxins: Biological and evolutionary implications. *Infect Immun*, 61(10):4254-4262, 1993.
12. Munson SH, Tremaine MT, Betley MJ, et al. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect & Immun*, 66(7):3337-3348, 1998.
13. Hovde CJ, Hackett SP, Bohach, GA. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene: sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxin. *Mol Gen Genet*, 220:329-333, 1990.
14. Yoon JW, Park YH, Jung SC, et al. Toxin-typing of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, E, and TSST-1 from mastitic milk using multiplex PCR. 92nd ADSA Annual Meeting, p171, 1997.
15. Rosec JP, Guiraud JP, Dalet C, et al. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int J Food Microbiol*, 35(3):213-221, 1997.

16. Ayulo AM, Machado RA, Scussel VM. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *Int J Food Microbiol*, 24(1-2):171-178, 1994.
 17. Mathieu AM, Isigidi BK, Devriese LA, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. strains isolated from bovine meat in Zaire. *Int J Food Microbiol*, 14(2):119-125, 1991.
 18. 강호조, 최홍근, 손원근. 생유유래 *Staphylococcus aureus* 의 coagulase형과 enterotoxin 산생. 한국수의공중보건학회, 14(1):15-19, 1990.
 19. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual(Chapter 1). AOAC International, 1995.
 20. Foster EM. Foodborne hazards of microbial origin. *Fed Proc*, 37(12):2577-2581, 1978.
-