Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 33, No. 3, 207–214 (2005)

Methicillin 내성 *S. aureus* 임상분리균주의 Coagulase와 주요 독소 유전자의 PCR 검출

정혜진 · 조준일 · 송은섭[1] · 김진주[2] · 김근성*
중앙대학교 식품공학과, [1]인하대학교 의과대학 산부인과학교실,
[2]인하대학교 의과대학 진단검사의학과

PCR Detection of Virulence Genes Encoding Coagulase and Other Toxins among Clinical Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates. Jung, Hye-Jin, Joon-Il Cho, Eun-Seop Song[1], Jin-Ju Kim[2], and Keun-Sung Kim*. *Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung 456-756, Korea, [1]Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Inha University, Incheon 400-712, Korea, [2]Department of Laboratory Medicine, College of Medicine, Inha University, Incheon 400-712, Korea* – To characterize the genotypic traits of clinical methicillin-resistant *Staphylococus aureus* (MRSA) isolates (n=49), major virulence-associated genes were detected by using PCR-based methods. All the MRSA isolates possessed coagulase gene and showed four polymorphism types [500bp (6%), 580bp (27%), 660bp (65%) and 740bp (2%)] due to variable numbers of tandem repeats present within the gene. The four or five different loci of hemolysin gene family were dominant in the MRSA isolates, 25 of which(51%) possessed a combination of *hla / hlb / hld / hlg / hlg-2* genes as the most prevalent type. The prevalence of enterotoxin genes was varied among the MRSA isolates. *sea* and *seb* genes were detected from all the MRSA isolates. But *sei, tsst-1, seg, sec*, and *seh* genes were detected from 31 (63%), 16 (33%), 14 (29%), 8 (16%), and 5 (10%) isolates, respectively. *sed* and *sej* genes were detected from 1 (2%) isolate, respectively. *see, eta*, and *etb* genes were not detected at all. *sea / seb* genes were co-detected from 11 (23%) isolates, *sea / seb / sei* genes from 9 (19%) isolates, and *sea / seb / seg / sei / tsst-1* genes from 5 (10%) isolates. Other genes were co-detected with below 10% frequencies.

Key words: MRSA(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), coagulase, hemolysin, staphylococcal enterotoxin, exfoliative toxin

*Staphylococcus aureus*는 자연계에 널리 분포하고 있으며 보통 사람들의 피부에 상재하는 균주로서 실생활과 매우 밀접한 관계가 있다. 임상적으로는 화농성 감염과 치명적인 패혈증을 유발하고, enterotoxin을 분비하며, 다양한 식품재료에서 검출되는 등 식중독 발생 사고에서 많은 비율을 차지하고 있다. 이러한 *S. aureus*의 감염증 치료를 위하여 여러 항미생물제가 고안되었으며[2, 7, 12], 1960년 초반부터 methicillin이 주요 치료제로 사용되었다. 이러한 항생제의 빈번한 사용과 노출로 인하여 임상에서 분리되는 *S. aureus* 중에서 methicillin을 비롯한 여러 항생제에 대하여 내성 혹은 매우 높은 수준의 저항성을 지니는 내성균주가 분리되기 시작하였다.

미국에서 보고되는 포도상구균의 10-50%가 methicillin 내성 *S. aureus*(MRSA)라 하며, 프랑스의 경우도 30-40%가 MRSA로 유럽에서도 높은 비율로 methicillin에 대하여 내성을 보이고 있다[5]. 우리나라에서는 1970년대 임상 검체에서 분리된 포도상구균의 10% 미만이 MRSA였으나, 1980년대에는 약 40-50%로 증가하였으며, 그 후 MRSA의 분리비율이 계속 증가하여 최근 보고에서는 60-80% 정도 되는 것으로 보고되었다[10, 12]. 그리고 최근에는 주로 임상에서만 검출되었던 MRSA가 식품에서 분리되었다는 보고[14]로 미루어 보아 식품 취급자 및 소비자에게 MRSA에 대한 감염 발생 위험이 높아지고 있을 것으로 예상되며 MRSA뿐만아니라 현존하는 어떤 항생제에도 내성을 갖는 vancomycin 내성 *S. aureus*(VRSA)의 출현으로 그 심각성은 점차 커지고 있는 실정이다.

*S. aureus*는 다양한 독성 인자들을 생산하며, 주로 숙주세포의 침투에 관여하는 세포밖 효소들과 독소들이다. 이와 같은 독성인자들 중 세포밖 효소로서 숙주의 면역작용을 방해하며 병원성 *S. aureus* 동정의 중요한 지표가 되는 내열성의 coagulase가 있고, 독소들로는 exotoxin인 hemolysin(용혈독소), 식중독의 원인이 되는 staphylococcal enterotoxin(장관

*Corresponding author
Tel: 82-31-670-3032, Fax: 82-31-675-4853
E-mail: keunsung@post.cau.ac.kr

독소), 그리고 toxic shock syndrome을 일으키는 toxic shock syndrome toxin-1(TSST-1, 단백독소), 백혈구를 파괴하는 백혈구 독소인 leukocidin, 피부박탈효소인 exfoliative toxin A와 B(ETA와 ETB)등이 있다.

특히 이들 독성인자들 중 staphylococcal enterotoxin은 *S. aureus*가 식품 내에서 증식하는 과정중에 생성되며, 1 μg 이하의 양으로도 인체내에 섭취되면 식중독을 야기시킬 수 있다. 또한 이들 enterotoxin은 항원특이성에 따라 SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEF (또는 TSST-1), SEG, SEH, SEI 및 SEJ 등의 항원형이 보고되어 있다. 또한 최근에 Orwin 등[26]과 Letertre 등[19]은 SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SET 그리고 SEU가 분리되었다고 보고하였다.

현재까지 *S. aureus*의 특성에 관한 연구는 임상 혹은 식품에서 분리한 methicillin 감수성 *S. aureus*(MSSA) 분리균주를 주로 대상으로 하여 행하여져 왔다. 하지만 항생제의 빈번한 사용과 노출로 인하여 임상이나 지역사회 등 다양한 경로에서 MRSA 분리비율이 점차 증가하는 추세이다. 따라서 본 연구에서는 일반적으로 특정한 질환과 특정한 발병 인자사이에는 연관성이 있으므로 임상에서 분리한 MRSA 균주를 대상으로 이 균주의 병원성과 관계가 깊은 것으로 알려진 coagulase와 hemolysin, staphylococcal enterotoxin, TSST-1, leukocidin, ETA와 ETB 유전자들의 분포 정도 및 유전적 다양성을 PCR 방법을 이용하여 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

MRSA의 분리 및 확인

2004년 12월과 2005년 1월, 인천 소재 대학병원 미생물검사실에서 각기 다른 환자들로부터 분리한 균주를 대상으로 mannitol salt agar, DNase test 및 coagulase test를 실시하여 양성반응을 보인 100개의 *S. aureus* 분리균주를 분양받았다. 분양받은 *S. aureus*를 대상으로 하여, *nucA* 유전자[6] 및 *S. aureus*만 선택적인 *Sa442* 유전자[20]를 검출하는 PCR을 수행하였다. 그리고 확인된 *S. aureus* 중 MRSA를 선별하기 위하여 *femA* 유전자[34]와 *mecA* 유전자[2]를 검출하는 PCR도 병행하여 실시하였다.

Total DNA 추출

S. aureus 분리 균주를 Luria-Bertani(LB) broth 2 ml에 접종한 후 37°C에서 180 rpm으로 진탕 배양하였다. 중균 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 μl를 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 μl의 10 × reaction Buffer(최종 농도 - 400 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris-HCl, pH 9.0), 5 μl의 dNTP, 1 U의 Taq DNA polymerase (Bioneer, Daejeon, Korea), 25 pmol 각 primer 1 μl 및 DNA template 20 μl의 혼합액에 증류수를 최종 50 μl가 되도록 첨가하여 PTC-100(MJ Research, Inc., MA, USA)에서 증폭시켰다. PCR 산물은 1.5% agarose(1× TAE) gel에서 120 V로 1시간 전기영동하고 ethidium bromide(5 μg/ml)로 염색한 후 transilluminator로 확인하였다. 산물의 크기는 100 bp Plus DNA Ladder(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 측정하였다.

Coagulase 유전자 검출

Hookey 등[11]에 의해 고안된 coagulase 유전자 검출용 primer를 사용하였고, 이 때 사용한 PCR의 시간과 온도 조건은 다음과 같다. 94°C에서 4분간 가열한 후, denaturation는 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[13]이 고안한 α-hemolysin (*hla*), β-hemolysin (*hlb*), γ-hemolysin (*hlg-2*), δ-hemolysin (*hld*) 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 1분을 30 cycle 반복하였으며 72°C에서 최종 extension을 10분하고 정지하였다.

Staphylococcal enterotoxin 유전자 검출

Staphylococcal enterotoxin을 A-E형으로 구분할 수 있는 Sharma 등[33]이 고안한 primers를 가지고 PCR을 실시하였고, PCR 조건은 다음과 같다. 94°C에서 pre-denaturation 3분한 뒤 94°C denaturation 30초, 40°C annealing 30초 및 72°C extension 1분을 30 cycle 반복하였으며 마지막에 72°C에서 extension을 2분하고 정지하였다. 또한 staphylococcal enterotoxin을 G-J형은 Rosec 등[30]이 고안한 primers를 가지고 PCR을 실시하였고, PCR 조건은 94°C에서 pre-denaturation을 3분한 후 denaturation을 94°C에서 30초, annealing을 60°C에서 30초 및 extension을 72°C에서 30초를 30 cycle 반복하였으며 72°C에서 최종 extension을 7분하고 정지하였다.

TSST-1, leukocidin 및 ETA와 ETB 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.

결과 및 고찰

MRSA 분리 및 확인

최근에 인천 소재 대학병원 미생물검사실에서 각기 다른 환자들로부터 mannitol salt agar 양성, DNase 양성, coagulase 양성 등의 *S. aureus*만이 갖는 독특한 표현형 특

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

Genes	Primer names	Primer sequences	Amplicon sizes(bp)	References
femA	femA-1	5'-CTTACTTACTGGCTGTACCTG	686	34
	femA-2	5'-ATGTCGCTTGTTATGTGC		
nucA	nucA-1	5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT	280	6
	nucA-2	5'-AGCCAAGCCTTCACGAACTAAAGC		
Sa442	Sa442-1	5'-AATCTTTGTCGGTACACGATATTCTTCACG	108	20
	Sa442-2	5'-CGTAATGAGATTTCAGTAGATAATACAACA		
mecA	mec1	5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	533	2
	mec2	5°«-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC		
coa	coa-1	5'-ATAGAGATGCTGGTACAGG	size polymorphisms	11
	coa-2	5'-GCTTCCGATTGTTCGATGC		
hla	hla-1	5'-CTGATTACTATCCAAGAAATTCGATTG	209	13
	hla-2	5'-CTTTCCAGCCTACTTTTTTATCAGT		
hlb	hlb-1	5'-GTGCACTTACTGACAATAGTGC	309	
	hlb-2-2	5'-GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT		
hld	hld-1	5'-AAGAATTTTTATCTTAATTAAGGAAGGAGTG	111	
	hld-2	5'-TTAGTGAATTTGTTCACTGTGTCGA		
hlg	mphlg-1	5'-GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA	535	
	mphlg-2	5'-CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG		
hlg-2	mphlg2-1	5'-GACATAGAGTCCATAATGCATTYGT	390	
	mphlg2-2	5'-ATAGTCATTAGGATTAGGTTTCACAAAG		
seu	SE-f	5'-TGTATGTATGGAGGTGTAAC	-	33
sea	sea-r	5'-ATTAACCGAAGGTTCTGT	270	
seb	seb-r	5'-ATAGTGACGAGTTAGGTA	165	
sec	sec-r	5'-AATTGTGTTTCTTTTATTTTCATAA	102	
sed	sed-r	5'-TTCGGGAAAATCACCCTTAA	306	
see	see-r	5'-GCCAAAGCTGTCTGAG	213	
seg	ESG-1	5'-ACGTCTCCACCTGTTCAAGG	400	30
	ESG-2	5'-TGAGCCAGTGTCTTGCTTTG		
seh	ESH-1	5'-TCACATCATATGCGAAAGCAG	357	
	ESH-2	5'-TAGCACCAATCACCCTTTCC		
sei	ESI-1	5'-TGGAACAGGACAAGCTGAAA	467	
	ESI-2	5'-TAAAGTGGCCCCTCCATACA		
sej	ESJ-1	5'-CAGCGATAGCAAAAATGAAACA	426	
	ESJ-2	5'-TCTAGCGGAACAACAGTTCTGA		
tsst-1	tst-1	5'-ATCGTAAGCCCTTTGTTG	578	23
	tst-2	5'-GTGGATCCGTCATTCATTG		
lukE	lukE-1	5'-GACTGATTGCACCTTTAGC	953	
	lukE-2	5'-GCAATTGATGAGGCAACTGATG		
eta	eta-1	5'-GTAGGAGCTAGTGCATTTG	721	
	eta-2	5'-GCTCTCTATCAAGATGAGAC		
etb	etb-1	5'-CCTTACCTGTGATTCCTTTTG	719	
	etb-2	5'-ATCAACCGAATAGAGTGAAC		

징을 이용하여 분리된 100개의 *S. aureus* 균주를 분양받았다. 분양받은 *S. aureus*를 대상으로 하여, *S. aureus*에 특이적으로 존재하며 staphylococcal thermostable nuclease을 암호화하는 *nucA* 유전자[6] 및 *S. aureus*만 선택적인 *Sa442* 유전자[20]를 검출하는 PCR을 수행하였다. 또한 PCR을 통해 재확인된 *S. aureus* 중 MRSA를 선별하기 위하여 *femA* 유전자[34]와 *mecA* 유전자[2]를 검출하는 PCR도 병행하여 실시하였다. *mecA* 유전자는 methicillin을 포함한 penicillin 계열의 항생제에 내성을 나타내는 주요 원인 단백질인 penicillin binding proteins(PBP2a)을 암호화하는 유전자로 methicillin에 저항성이 없는 MSSA(methicillin-sensitive *S. aureus*)의 경우에는 *mecA* 유전자가 존재하지 않는다. 그러므로 PCR에 의해 *mecA* 유전자의 존재 유무를 확인하여 MRSA 여부를 확인할 수 있었다. 그리고 *femA* 유전자는 *mecA* 유전자와 함께 methicillin 저항성을 발현하는데 필수적인 유전자로서 일반적으로 PBP2a 생성에는 영향을 미치지 않으면서, *S. aureus*의 세포벽 구성 성분의 조성에 관여하며 항생제 감수성에 영향을 주어 methicillin 내성에 관여하는 것으로 알려져 있다[4]. 따라서, 본 연구 결과에 의하면 *Sa442*의 경우 모든 100개의 분리균주(100%)에서 확인되었고, *nucA* 역시 모든 분리균주에서 확인되어 100개의 분리균주가 모두 표현형 및 유전형에 의하여 *S. aureus*로 확인되었다. 또한 MRSA가 보유한 *mecA* 유전자를 검출하는 PCR을 수행한 결과에 의하면 49개 균주(49%)에서 대상 유전자가 검출되었다. 이는 최근 MRSA 분리율이 60-80%에 이른다는 최근 보고[10, 12]보다는 낮은 비율을 보이고 있으나, 과거 1970년대 10% 미만의 분리율과 1980년대 약 40-50%의 분리율보다는 증가한 수치로 우리나라에서 methicillin을 비롯한 항생제에 대하여 내성을 갖는 *S. aureus*가 계속 증가되고 있음을 알 수 있다. 또한 *femA* 유전자는 MRSA 49개 균주를 포함한 71개 균주(71%)에서 검출되었다.

Coagulase 유전자 검출

Staphylococcal coagulase는 내열성의 extracellular enzyme으로서 *S. aureus*를 선택적으로 동정하는데 사용되고 있다. Coagulase를 위한 *coa* 유전자는 3'-말단에 81bp short tandem repeat sequence를 가지고 있으며 균주마다 반복되는 횟수가 다양하여 결과적으로 amplicon size가 균주마다 다양하게 나타난다. Goh 등[9]은 *coa* 유전자가 하나 이상의 allelic form을 갖는다고 보고하였고, 또 다른 많은 연구에서 *S. aureus*의 *coa* 유전자가 8 tandem repeats[16], 5 tandem repeats[18] 및 4-8 tandem repeats[28]등 다양한 tandem repeats을 갖는다고 보고되었다.

본 실험에서는 Hookey 등[11]이 고안한 *coa* 유전자 검출용 PCR primer를 사용하여 *coa* 유전자 보유 유무를 확인하기 위하여 PCR 반응을 수행하였다. 임상에서 분리한 49개의 MRSA 균주를 대상으로 *coa* 유전자 보유 유무를 확인한 결과에 의하면 Table 2에서와 같이 모든 분리균주가 *coa* 유전자를 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 그리고 또한 PCR 산물의 amplicon size는 500bp(6%), 580bp(27%), 660bp(65%) 및 740bp(2%)로 네종류가 검출되었다. 이는 Scherrer 등[32]이 염소와 양의 원유로부터 분리한 *S. aureus* 분리균주에서 *coa* 유전자의 amplicon size가 500bp(2.7%), 580bp(15.4%), 660bp(32.4%), 740bp(23.2%) 및 820bp(23.5%)로 검출되었다는 보고와 Katsuda 등[17]이 유방염 걸린 소의 우유로부터 분리한 *S. aureus* 분리균주에서 *coa* 유전자가 420bp(1%), 580bp(63%), 660bp(7.0%), 740bp(3%) 및 820bp(26%)로 다양하게 검출되었다는 보고 등에서와 같이 최근에 3-9 tandem repeats을 갖는 균주가 지배적이라는 보고와 일치하는 결과이다[28].

Table 2. Results of PCR detections on *coa* gene of clinical methicillin-resistant *S. aureus* isolates.

Amplicon sizes(bp)	No. of MRSA isolates(n=49)
500	3 (6[1])
580	13(27)
660	32 (65)
740	1 (2)
Total	49 (100)

[1] % of MRSA isolates.

Hemolysin, leukocidin 유전자 검출

*S. aureus*는 4종류의 hemolysin들(α-, β-, γ- 및 δ-hemolysin)과 leukocidin을 포함한 5개의 다양한 막 손상을 유발하는 독소를 생산한다. α-hemolysin은 구멍을 형성할수 있는 용혈독소로 포유동물의 세포에 다양한 형태의 막손상을 유발한다. 또한 혈소판과 백혈구에 작용하여 염증반응을 일으키고 cytokine의 방출을 유도한다. β-hemolysin은 Mg^{2+}에 의존적인 sphingomyelinase C로 적혈구 막의 외부 인지질층을 구성하는 주요 인지질인 sphingomyelin을 분해한다. γ-hemolysin locus는 *S. aureus* 균주에 약 99%정도 존재한다. 그리고 γ-hemolysin locus는 두개의 class S component들인 HlgA와 HlgC 그리고 하나의 class F component인 HlgB 등 3종류의 단백질을 발현한다. 이 때 γ-hemolysin locus는 두개의 기능적 단백질 쌍인 HlgA + HlgB와 HlgC + HlgB로 발현되며, γ-hemolysin locus를 가진 *S. aureus*를 토끼 눈의 초자양액(vitreous humor)에 주사했을때 강한 proinflammatory 효과를 나타내었다. 또한 γ-hemolysin은 TSS(toxic shock syndrome) 균주에서 자주 발견되는 hemolysin으로 TSST-1과 함께 TSS의 병원성에 중요한 역할을 할 것이라는 의문이 제기되고 있다. 또한 leukocidin은 특이적으로 백혈구 세포 파괴를 일으키는 staphylococcal exotoxin으로 많은 종에서 적혈구 세포 파괴 효과가 확인되

지 않아 staphylococcal hemolysin과 구별된다[24].

본 연구를 통하여 임상에서 분리한 49개의 MRSA 균주를 대상으로 4종류의 hemolysin(α-, β-, γ-, 및 δ-hemolysin)의 유전자 검출 여부를 조사한 결과는 Table 3에서와 같이 모든 균주에서 검출되었다. 또한 1개의 분리균주(*hld* 유전자 보유균주)를 제외한 48개의 분리균주(98%)는 hemolysin에 대하여 2종 이상 다른 종류의 multiple gene들을 소유하였고, 그 중 25개 분리균주(51%)가 *hla / hlb / hld / hlg / hlg-2* 유전자를 모두 소유한 균주로서 가장 높은 분포를 나타내었다. 그러므로 본 연구실에서 상추와 원유로부터 분리한 *S. aureus*를 대상으로 hemolysin 관련 유전자 검출 여부를 조사한 보고[15]에서 *hla / hld / hlg-2* 유전자 보유균주가 55%로 가장 높은 분포를 나타내었고, 또한 Salasia 등[31]이 인도네시아의 central Java지방의 원유에서 분리한 *S. aureus* 분리균주 중 *hla / hld* 유전자 보유균주가 37%로 가장 높은 분포를 나타내었다는 보고에서와 같이 임상분리균주에서도 복합적인 hemolysin 유전자를 보유한 균주가 단일 hemolysin 유전자를 보유한 균주보다 높은 분리 비율로 검출되었다. 한편 본 연구를 통하여 임상에서 분리한 49개의 MRSA 균주를 대상으로 leukocidin 유전자 검출여부를 조사한 결과에 의하면 leukocidin 유전자는 어느 분리균주에서도 검출되지 않았다.

Staphylococcal enterotoxin, TSST-1 및 ETA와 ETB 유전자 검출

*S. aureus*는 staphylococcal enterotoxin, TSST-1을 비롯한 exfoliative toxin들을 생산하여 포도구균성 식중독(staphylococcal food poisoning, SFP), 독소성 쇼크 증후군(toxic shock syndrome, TSS) 및 포도구균성 열상 피부 증후군(staphylococcal scalded skin syndrome, SSSS)의 원인이 된다[3].

Table 3. Results of PCR detections on *hla, hlb, hld, hlg* and *hlg-2* genes of clinical methicillin-resistant *S. aureus* isolates.

Hemolysin genes	No. of positive MRSA isolates(n=49)
hld	1 (2[1])
hla and *d*	1 (2)
hla, d and *g*	1 (2)
hla, d and *g-2*	1 (2)
hld, g and *g-2*	1 (2)
hla, b, d and *g*	4 (8)
hla, d, g and *g-2*	14 (29)
hlb, d, g and *g-2*	1 (2)
hla, b, d, g and *g-2*	25 (51)
Total	49 (100)

[1] % of positive MRSA isolates.

Staphylococcal enterotoxin들은 생물학적 특징과 구조적인 유사성 때문에 pyrogenic toxin superantigen family의 일원으로 간주되고 있다. Staphylococcal enterotoxin들은 지금까지 항원형에 따라 SEA-SEE로 구분되었으나, 최근에 새로운 staphylococcal enterotoxin들(SEG-R, SET 및 SEU)이 보고되었다. 그러나 이와 같은 새로운 staphylococcal enterotoxin들과 식중독 발생 및 질병 발생과의 관계는 아직 명확하게 보고되지 않았다. Staphylococcal enterotoxin들은 in vivo 또는 in vitro에서 생물학적 활성에 의해 검출될 수 있으므로 실험실내에서 간단하게 SEA-D형 및 TSST-1 독소를 직접 검출하도록 설계되어진 RPLA(Reversed Passive Latex Agglutination) assay에 의한 검출 방법이 지금까지 일반적으로 널리 이용되어 왔으나, 최근에 영국에서 보고된 식중독 발생현황에서 SEA-D형에 의한 식중독보다는 다른 staphylococcal enterotoxin들에 의한 식중독 발생비율이 높았던 사례[21]로 미루어 보아 새로운 staphylococcal enterotoxin들과 식중독 발생과의 관계를 명확히 할 필요성이 있다.

따라서 본 연구에서는 임상으로부터 분리한 MRSA 균주를 대상으로 *sea-sej* 유전자, *tsst-1* 유전자 및 *eta*와 *etb* 유전자를 분자생물학적 기술인 PCR 기술을 이용하여 검색하였다. 그 결과 Table 4에서와 같이 49개의 모든 MRSA 분리균주가 2종류 이상 다른 종류의 enterotoxin 유전자들을 보유한 것으로 나타났다. 유전형별로 보면 *sea* 유전자와 *seb* 유전자가 모든 49개 분리균주(100%)에서 검출되었으며, *sec* 유전자가 8균주(16%), *sed* 유전자가 1균주(2%), seg 유전자가 14균주(29%), *seh* 균주는 5균주(10%), *sei* 균주는 31균주(63%), *sej* 균주는 1균주(2%)에서 각각 검출되었고, 그리고 *tsst-1* 유전자는 16균주(33%)에서 검출되었다. 그러나 *see* 유전자 및 *eta*와 *etb* 유전자는 어떠한 분리균주(0%)에서도 검출되지 않았다. 그리고 49개의 모든 MRSA 분리균주가 2종류 이상의 enterotoxin 유전자를 보유하였으며, *sea*와 *seb* 유전자 조합이 11개 균주(23%)로 가장 우점형으로 나타났으며, *sea*와 *seb* 및 *sei* 유전자 조합은 9개 균주(19%), 그리고 *sea, seb, seg, sei* 및 *tsst-1* 유전자 조합은 5개 균주(10%)로부터 각각 검출되었다. 한편 본 연구를 통하여 분리된 모든 49개 MRSA 분리균주에 대한 staphylococcal enterotoxin 유전자의 분리율은 100%로 나타났다. 이는 Becker 등[3]이 임상에서 분리한 *S. aureus* 균주를 대상으로 수행한 연구에서 staphylococcal enterotoxin 유전자 분리율이 49%로 보고되었고, Omoe 등[25]은 식중독 환자, 건강한 사람, 유방염 걸린 소 및 원유 등을 대상으로 수행한 실험에서 staphylococcal enterotoxin 유전자 분리율이 각각 93%, 72%, 71% 및 53%로 보고하였으며, 이들이 보고한 분리율보다는 본 연구를 통하여 얻은 분리율이 높은 것으로 나타났다. 현재 임상뿐만 아니라 지역사회에서도 MRSA의 분리가 점차 증가되고 있지만, 아직까지 MRSA를 대상으로

Table 4. Distribution of enterotoxin types among clinical methicillin-resistant *S. aureus* isolates.

Enterotoxin Types										No. of positive MRSA isolates
sea	*seb*	*sec*	*sed*	*see*	*seg*	*seh*	*sei*	*sej*	*tsst-1*	
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	11 (23[1])
+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	2 (4)
+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	1 (2)
+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	4 (8)
+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	9 (19)
+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	3 (6)
+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	1 (2)
+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	3 (6)
+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	1 (2)
+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	1 (2)
+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	3 (6)
+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	5 (10)
+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	2 (4)
+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	2 (4)
+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	1 (2)
49 (100)	49 (100)	8 (16)	1 (2)	0 (0)	14 (29)	5 (10)	31 (63)	1 (2)	16 (33)	49 (100)

[1] % of positive MRSA isolates.

staphylococcal enterotoxin들을 조사한 연구가 전무하므로, 이에 관한 연구가 좀 더 활발히 이루어져야 할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서는 *sec* 유전자를 보유한 균주의 경우 sec와 sei 유전자 조합 또는 *sec*, *seg* 및 *sei* 유전자 조합등의 결과를 보여 SEC, SEG 및 SEI 사이의 연관성이 있다는 Katsuda 등[17]의 보고와 일치하는 결과를 나타내었다.

TSST는 초기에 생물학적 및 물리학적 성상이 다른 staphylococcal enterotoxin과 유사하여 SEF라고 명명되었지만, 이후에 원숭이에게 투여하여도 구토를 일으키지 않아 이 독소를 TSST-1으로 다시 명명하였다. 몇몇 연구자들로부터 유방염 걸린 소의 원유로부터 분리한 *S. aureus*의 경우 SEC와 TSST-1의 생성과 관련하여 서로 밀접한 연관성이 있을 수 있다고 보고되었으나[1, 17, 31], 임상으로부터 분리한 MRSA 균주를 대상으로한 본 연구에서는 16개의 *tsst-1* 유전자 보유균주중 11균주가 *sec* 유전자를 보유하지 않아서 그들의 연구 결과와는 상이하였다.

사람에게서 분리한 *S. aureus*중 일부가 생산하는 exfoliative toxin은 신생아나 어린이에게 SSSS를 유발하는 주요 원인독소이다. 혈청학적으로 이 독소는 두가지 유형인 ETA와 ETB로 분류되며, ETA를 암호화하는 *eta* 유전자는 일반적으로 *S. aureus*의 염색체상에 존재하는 반면 ETB를 암호화하는 *etb* 유전자는 plasmid상에 존재한다[8]. 본 연구를 통하여 *eta*와 *etb* 유전자를 보유한 균주는 검출되지 않았는데(data not shown), 이는 Salasia 등[31]이 인도네시아의 central Java지방과 독일의 Hesse 지방 원유에서 분리한 *S. aureus* 균주들을 대상으로 *eta*와 *etb* 유전자를 검출한 연구결과와 일치하는 결과이다. 일반적으로 임상에서 분리한 *S. aureus*에서 ETA와 ETB가 단독으로 각각 또는 모두 검출되는 비율은 5 % 정도이고, 이 독소의 발현은 지역적인 영향을 받는 것으로 알려져 있다. *S. aureus*중 일부가 생산하는 exfoliative toxin은 북아메리카, 유럽 및 아프리카 지역에서는 90%가 ETA를 생성하는 반면에 일본의 경우 주로 ETB를 생산하는 균주가 검출되었다[29]. 또한 최근에는 MRSA에 의한 포도구균성 열상 피부 증후군 발생에 대한 보고가 증가되고 있으며, 국내의 경우 MRSA로 입원한 환자들 중 포도구균성 열상 피부 증후군 발생비율이 1970년대에는 10% 미만이었으나 1980년대에는 40%, 1990년대에는 50%를 넘어선 이후, 2000년 현재 약 67%정도로 보고되고 있다[27]. 그리고 외래환자를 대상으로 한 연구에서도 17%의 높은 비율을 차지하여[27], MRSA 균주의 ETA 및 ETB 생산에 대한 조사가 좀 더 활발히 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구를 통하여 얻어진 임상에서 분리한 MRSA 분리균주의 staphylococcal enterotoxin, TSST-1 및 ETA와 ETB 유전자 검출 결과에 의하면 staphylococcal enterotoxin 유전자가 모든 분리균주(n=49)에서 검출되어 100 %의 분리율을 나타냈으며, *sec* 유전자를 보유한 균주는 *sec*와 *sei* 유전자의 조합 또는 *sec, seg* 및 *sei* 유전자 조합등의 결과를 나타내었다. 그리고 16개의 *tsst-1* 유전자 보유균주 중 5균주만이 *sec* 유전자를 보유하였다. 또한 본 연구를 통하여 *eta*와 *etb* 유전자를 보유한 균주는 검출되지 않았다. 지금까지 주로 임상에서만 검출되었던 MRSA가 최근에 식품에서도 분리되었다는 보고[14]로 미루어 보아 이제 임상에서 뿐만 아니라 식품 취급자 및 소비자에게 MRSA에 대한 감염발생 위험이 높아질 것으로 예상된다. 그러므로 MRSA의 생리적 특징에 대하여 더욱 활발한 연구를 하여 감염 발생율을 저하시키고 감염발생시의 신속한 대처를 할 수 있는 기반을 조성하여야 한다(Table 4).

본 연구로부터 확인된 특정시기의 특정지역으로부터 분리된 *S. aureus* 임상분리 균주중 MRSA의 분포비율(49%)은 이와 유사한 연구를 통하여 지금까지 확인되거나 혹은 향후에 확인될 분포비율들과 시간적 혹은 지리적 비교를 통하여 어떤 특정지역 혹은 어떤 특정시기의 *S. aureus*의 methicillin을 비롯한 항생제에 대한 노출정도의 변화를 파악하여 *S. aureus*의 항생제 내성의 최소화를 위한 효율적인 대책을 수립하거나 혹은 *S. aureus*로 인한 식중독이나 질병의 효율적인 예방 및 치료 방법을 확립하는데 필요한 기초자료로 이용될 수 있을 것이다. 또한 본 연구를 통하여 국내에서는 최초로 국내에서 분리된 MRSA 임상분리 균주들의 coagulase를 비롯한 *S. aureus* pyrogenic toxin superantigen family에 속하는 toxin들을 발현하는데 필요한 유전자들의 분포를

체계적으로 파악하였다. 이와 같은 병원성 유발에 직접적으로 관여하는 toxin을 발현하는 유전자들의 분포정도를 파악함으로서 *S. aureus*의 잠재적 병원성을 정확히 파악하여 그에 대한 예방 및 치료 대책을 효율적으로 확립하고자 본 연구가 수행되었다.

요 약

본 연구에서는 임상에서 분리한 MRSA 균주(n=49)를 대상으로 이 균의 병원성과 관계가 있는 것으로 알려진 유전자들을 선정하여 PCR 방법을 이용하여 이들 유전자들의 보유 유무를 결정하였다. 이들 MRSA 균주는 모두 *coa* 유전자를 보유하고 있었고, 또한 이들 유전자는 500bp(6%), 580bp(27%), 660bp(65%) 및 740bp(2%)로 4가지 종류의 polymorphism이 검출되었다. Hemolysin 유전자의 경우 4-5종 이상 다른 locus들을 보유하였고, 그 중 25개 균주(51%)가 *hla / hlb / hld / hlg / hlg-2* 유전자를 모두 보유하였으며, 가장 많은 분포를 나타내었다. 한편, MRSA 균주는 다양한 enterotoxin 유전자의 조합을 보였으며, *sea*와 *seb* 유전자의 경우 모든 49개 균주에서 보유하고 있었다. 그러나 *sei* 유전자는 31균주(63%), *tsst-1* 유전자는 16균주(33%), *seg* 유전자는 14균주(29%), *sec* 유전자는 8균주(16%), *seh* 유전자는 5균주(10%), *sed* 유전자와 *sej* 유전자는 1균주(2%)에서 각각 검출되었다. 그러나 *see* 유전자 및 *eta*와 *etb* 유전자는 어떤 분리균주에서도 검출되지 않았다. 또한 *sea /seb* 유전자 조합이 11개 균주(23%)로부터, *sea / seb / sei* 유전자 조합은 9개 균주(19%)로부터, *sea / seb / seg / sei / tsst-1* 유전자 조합은 5개 균주(10%)로부터 각각 검출되었다. 그리고 다른 유전자의 조합은 10% 이하로 검출되었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 건강기능제품개발사업의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다(01515-FS00-0501-0025).

REFERENCES

1. Akineden, O., C. Annemuller, A. A. Hassan, C. Lammler, W. Wolter, and M. Zschock. 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**: 959-964.
2. Barski, P., L. Piechowicz, J. Galinski, and J. Kur. 1996. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. *Mol. Cell. Probes.* **10**: 471-475.
3. Becker, K., A. W. Friedrich, G. Lubritz, M. Weilert, G. Peters, and C. von Eiff. 2003. Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 1434-1439.
4. Berger-Bachi, B., A. Strassle, J. E. Gustafson, and F. H. Kayser. 1992. Mapping and characterization of multiple chromosomal factors involved in methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 1367-1373.
5. Bertrand, X., M. Thouverez, and D. Talon. 2000. Antibiotic susceptibility and genotypic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in eastern France. *J. Hosp. Infect.* **46**: 280-287.
6. Brakstad, O. G., K. Aasbakk, and J. A. Maeland. 1992. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nucA* gene. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 1654-1660.
7. Chamers, H. F. 1997. Methicillin resistance in *staphylococci*: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 781-791.
8. Endo, Y., T. Yamada, K. Matsunaga, Y. Hayakawa, T. Kaidoh, and S. Takeuchi. 2003. Phage conversion of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis. *Vet. Microbiol.* **96**: 81-90.
9. Goh, S. H., S. K. Byrne, J. L. Zhang, and A. W. Chow. 1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 1642-1645.
10. Ha, D. J., Y. C. Kim, and Y. J. Kim. 2003. Management of infection for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at an orthopaedic surgery department. *J. Kor. Orthop. Assoc.* **38**: 34-38.
11. Hookey, J. V., J. F. Richardson, and B. D. Cookson. 1998. 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.
12. Hussain, Z., L. Stoakes, S. Garrow, S. Longo, V. Fitzgerald, and R. Lannigan. 2000. Rapid detection of *mec*A-positive and *mec*A-negative coagulase-negative *staphylococci* by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol.* **38**: 2051-2054.
13. Jarraud, S., Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, and Vandenesch F. 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic backgroud, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect. Immun.* **70**: 631-641.
14. Jones, T. F., M. E. Kellum, S. S. Porter, M. Bell, and W. Schaffner. 2002. An outbreak ofcommunity-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg. Infect. Dis.* **8**: 82-84.
15. Jung, H. J., J. I. Cho, S. H. Park, S. D. Ha, K. H. Lee, C. H. Kim, E. S. Song, D. H. Chung, M. G. Kim, K. Y. Kim, and K. S. Kim. 2005. Genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from lettuces and raw milk. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**: 134-141.

16. Kaida, S., T. Miyata, Y. Yoshizawa, S. Kawabata, T. Morita, H. Igarashi, and S. Iwanaga. 1987. Nucleotide sequence of the staphylocoagulase gene: its unique COOH-terminal 8 tandem repeats. *J. Biochem.* **102**: 1177-1186.
17. Katsuda, K., E. Hata, H. Kobayashi, M. Kohmoto, K. Kawashima, H. Tsunemitsu, and M. Eguchi M. 2005. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitic milk on the basis of toxin genes and coagulase gene polymorphisms. *Vet. Microbiol.* **105**: 301-305.
18. Lange, C., M. Cardoso, D. Senczek, and S. Schwarz. 1999. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet. Microbiol.* **67**: 127-41.
19. Letertre, C., S. Perelle, F. Dilasser, and P. Fach. 2003. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* **95**: 38-43.
20. Martineau, F., F. J. Picard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron. 1998. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 618-623.
21. McLauchlin, J., G. L. Narayanan, V. Mithani, and G. O'Neill. 2000. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *J. Food Prot.* **63**: 479-488.
22. Moon, J. Y., E. J. Lee, and Y. B. Kim. 2004. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. *J. Bact. Virol.* **34**: 91-10.
23. Moore, P. C. L., and J. A, Lindsay. 2001. Genetic variation among hospital isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 2760-2767.
24. Nilsson, I. M., O. Hartford, T. Foster, and A. Tarkowski. 1999. Alpha-toxin and gamma-toxin jointly promote *Staphylococcus aureus* virulence in murine septic arthritis. *Infect. Immun.* **67**: 1045-1049.
25. Omoe, K., M. Ishikawa, Y. Shimoda, D. L. Hu, S. Ueda, and K. Shinagawa. 2002. 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.
26. Orwin, P. M., D. Y. Leung, H. L. Donahue, R. P. Novick, and P. M Schlievert. 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect. Immun.* **69**: 360-366.
27. Park, J. W. D. K. Hwang, and H. J. Yu. 2002. Staphylococcal scalded skin syndrome, review of 20 cases. *Kor. J. Dermatol.* **40**: 1051-1057.
28. Phonimdaeng, P., M. O'Reilly, P. Nowlan, A. J. Bramley, and T. J. Foster. 1990. The coagulase of *Staphylococcus aureus* 8325-4. Sequence analysis and virulence of site-specific coagulase-deficient mutants. *Mol. Microbiol.* **4**: 393-404.
29. Plano, L. R. 2004. *Staphylococcus aureus* exfoliative toxins: how they cause disease. *J. Invest. Dermatol.* **122**: 1070-1077.
30. Rosec, J. P., and O. Giguad. 2002. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. *Int. J. Food Microbiol.* **77**: 61-70.
31. Salasia, S. I., Z. Khusnan, C. Lammler, and M. Zschock. 2004. 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.
32. Scherrer, D., S. Corti, J. E. Muehlherr, C. Zweifel, and R. Stephan. 2004. Phenotypic and genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* in bulk-tank milk damples of goats and sheep. *Vet. Microbiol.* **101**: 101-107.
33. Sharma, N. K., C. E. Rees, and C. E. Dodd. 2000. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1347-1353.
34. Vannuffel, P., J. Gigi, H. Ezzedine, B. Vandercam, M. Delmee, G. Wauters, and G. L. Gala. 1995. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2864-2867.

(Received Jun. 7, 2005/Accepted Aug. 11, 2005)