

Detection of Enterotoxins in *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Specimens and Kimbap Using Multiplex PCR

Jong-Bae Kim[†], Hong Kim, Hyun-Seok Jin, Young-Sam Kim, Keun-Sung Kim¹, Yun-Sook Kang², Jong-Seok Park², Dong-Ha Lee², Gun-Jo Woo² and Chang-Min Kim²

Department of Biomedical Laboratory Sciences, College of Health Sciences, Yonsei University, Wonju, 220-710,
Department of Food Science and Technology¹, College of Industrial Sciences, Chung-Ang University, Ansong, 456-756,
Department of Food Evaluation², Korea Food and Drug Administration, Seoul, 122-704, Republic of Korea

Many *Staphylococcus aureus* strains produce enterotoxins causing food poisoning. Staphylococcal enterotoxins are classified by serological criteria into five major groups - subtype A to E. It is difficult, time-consuming, and expensive to detect staphylococcal enterotoxins in the clinical laboratory. In this study, we tried to detect the enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens and Kimbap - rice rolled in a sheet of laver - using multiplex PCR technique. A total of 77 strains of *Staphylococcus aureus* from clinical specimens and 78 strains from Kimbap were isolated. Among clinical isolates of *S. aureus*, 60 strains (78.0%) were identified as producing enterotoxins. A total of 55 strains (91.6%) in the 60 staphylococcal enterotoxin producing strains were enterotoxin subtype C. In case of Kimbap, 43 (55.1%) strains were detected to produce enterotoxins and 39 (90.6%) enterotoxin producing strains were subtype A.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, Enterotoxin, Multiplex PCR, Kimbap

서 론

*Staphylococcus aureus*는 오래 전부터 인류에게 잘 알려진 세균으로서 그람 양성균의 구균으로 염색을 하면 포도송이 같은 불규칙한 배열을 하는 세균이다. 이 세균의 감염은 아주 흔하며 다른 그람 양성 세균들과 같이 부작소, 용해소와 장독소 등 병인적 요소를 생산함으로써 가장 흔한 피부 감염에서부터 심하면 생명에 위협을 초래할 수 있는 질병들인 폐렴, 골수염, 심내막염, 뇌수막염이나 패혈증 등을 일으킨다¹⁾. 이 중 장독소에 의한 식중독은 이미 오래 전부터 보고되어 왔고, 최근 식생활 패턴이 변하면서 식중독에 의한 환자가 늘어감에 따라 이에 대한 대책이 시급한 실정이다. 실제로 *S. aureus*는 현재 우리나라 및 미국에서 발생하는 식중독을 일으키는 가장 중요한 세 가지 원인 세균 중 하나이다²⁾.

포도상 구균이 생성하는 장독소는 식중독을 유발하는 병원성 인자로서 혈청학적인 분류에 따라서 A에서 E까지 다섯 가지 그룹으로 분류한다. 이 중 type C는 minor epitope에 따라서 다시 C1, C2와 C3로 분류한다^{3-6,16)}. 면역학적으로 각 type

간의 유사도를 보면 type A, D와 E가 매우 유사하고, type B와 C1이 유사한 것으로 알려져 있다¹²⁾. 임상 검체의 종류에 따른 검출 양상을 살펴보면 type C는 소나 양 혹은 염소에서 분리한 세균에서 주로 검출되고⁹⁾, 음식물에서 분리한 세균에서는 주로 장독소 type A가 많이 검출된다고 보고하고 있다²²⁾.

식품이나 임상 검체에서 전통적인 미생물 배양 방법에 의해서 장독소를 분리하고 동정하기 위해서는 일반적인 배지와는 다른 Baird-Parker 등¹⁾이나 Schleifer와 Kramer 등¹⁹⁾이 제시한 특수하게 제작된 감별 배지를 이용해서만 가능하다. 하지만 이 방법은 균주를 완전하게 분리 동정하는데 약 6일이 소요되므로 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다.

한편 자연 감염시 증식한 포도상 구균과 인공배지에서 배양한 경우 장독소의 생성능이 변화할 수 있어서⁸⁾ 만약 서로 다른 배지에서 배양한다면, 이는 실험실에서 장독소의 유무를 검사하는 동안 잘못된 판단을 일으키게 하는 요소로 작용할 수 있다고 한다.

전통적인 미생물 배양법 외에도 ELISA¹¹⁾, immunodiffusion¹³⁾이나 agglutination 등의 면역학적인 측정법을 이용하여 환자의 검체나 오염된 음식물에서 다섯 가지의 장독소를 분류할 수 있다²¹⁾. 그러나 이 방법들은 주로 독소의 양에 의존하고, 음식물의 성분이나 protein A가 방해제로 작용하기 때문에, 특히

*논문 접수: 2001년 3월 29일

수정재접수: 2001년 5월 2일

†별책 요청 저자: 김종배

Table 1. The sequence of PCR primers²⁾ used for the detection of enterotoxin subtype genes

Primer	Oligonucleotide sequence (5' → 3')	Size (bp)
SEA-3	CCT TTg gAA ACg gTT AAA ACg	127
SEA-4	TCT gAA CCT TCC CAT CAA AAA C	
SEB-1	TCg CAT CAA ACT gAC AAA Cg	477
SEB-4	gCA ggT ACT CTA TAA gTg CCT gC	
SEC-3	CTC AAg AAC TAg ACA TAA AAg CTA gg	271
SEC-4	TCA AAA TCg gAT TAA CAT TAT CC	
SED-3	CTA gTT Tgg TAA TAT CTC CTT TAA ACg	319
SED-4	TTA ATg CTA TAT CTT ATA ggg TAA ACA TC	
SEE-3	CAg TAC CTA TAg ATA AAg TTA AAA CAA gC	178
SEE-2	TAA CTT ACC gTg gAC CCT TC	

Table 2. Comparison of enterotoxin subtypes in *S. aureus* isolated from clinical specimens and Kimbap by multiplex PCR

Types of enterotoxins	No. (%) of <i>S. aureus</i> isolated from		Total
	Clinical specimens	Kimbap	
A	-	39 (90.6%)	39 (25.1%)
B	1 (1.7%)	2 (4.7%)	3 (2.0%)
C	55 (91.6%)	-	55 (35.5%)
D	1 (1.7%)	2 (4.7%)	3 (2.0%)
E	3 (5.0%)	-	3 (2.0%)
None	17 (22.0%)	35 (44.9%)	52 (33.4%)
Total	77 (100%)	78 (100%)	155 (100%)

독소의 양이 지나치게 적을 경우 검출하기가 까다로운 단점이 있다^{8,23)}.

Polymerase chain reaction (PCR)¹⁷⁾은 적은 비용으로 목적 DNA를 검출할 수 있는 장점이 있다. 그리고 장독소의 생산량 및 동정하고자 하는 세균이 어느 조건에서 배양되었는지에 관계없이 장독소를 발현하는 유전자만을 검출하는데 목표를 두기 때문에 위에서 제시한 여러 가지 제한 조건들을 훌륭하게 극복할 수 있다. 또한 어떠한 상태의 검체라도 아주 적은 수의 세균이 있어도 빠른 시간 내에 검출할 수 있다²⁰⁾.

포도상 구균의 장독소를 발현하는 유전자에 대한 연구는 활발하게 진행되고 있다^{7,10)}. 장독소 subtype B와 C의 경우는 chromosome상에, subtype A는 bacteriophage vector상에, 그리고 subtype D는 plasmid상에 위치해 있다. Subtype A와 E는 염기서열의 상동성이 84% 이상으로 매우 유사하다고 알려져 있다. Subtype E인 경우 phage상에서 나타난 것이 아니라 subtype A와 유사한 염기서열을 가진 defective converting pha-

ge와 연관된 유전자로 의심하고 있다⁷⁾.

본 연구에서는 임상 검체와 식품 중 김밥에서 분리 동정한 *S. aureus*에 대하여 장독소의 subtype을 다중 중합효소 연쇄반응 기법을 이용하여 조사하고, 검체에 따라서 subtype이 어떠한 양상을 나타내는지 비교하여 전통적인 미생물 배양 방법과 면역학적인 검사 방법의 한계를 극복하기 위한 방법을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 장독소 생성 *S. aureus* 표준 균주

본 실험에 사용한 표준 *S. aureus* 균주 중 장독소 subtype A 표준 균주는 American Type Culture Collection (ATCC) 13565, subtype B는 ATCC 14458, subtype C에는 ATCC 19095, 그리고 subtype E인 경우는 ATCC 27664 균주를 ATCC에서 직접 분양받아서 사용하였다. 한편 *S. aureus* 장독소 subtype D를 생성하는 1634/93 균주는 Dr. Karsten Becker (Münster University, Münster, Germany)로부터 분양받았다.

2. 임상 검체와 식품에서 *S. aureus* 분리 및 동정

1998년 9월부터 10월까지 4주 동안 강원도 원주시 소재 종합병원 (W 병원)의 임상병리과 미생물 실험실에서 입원 및 외래 환자의 검체로부터 전통적인 방식에 따라 분리 동정한 77 주(株)의 *S. aureus*와 2000년 1월부터 10월까지 식품의약품안전청에서 연구사업의 일환으로 수집된 김밥 검체로부터 분리 동정한 78 주(株)의 *S. aureus*를 본 실험에 이용하였다.

3. Oligonucleotide primers의 제작 및 다중 중합효소 연쇄반응

본 실험에서 사용한 장독소 검출용 PCR의 oligonucleotide

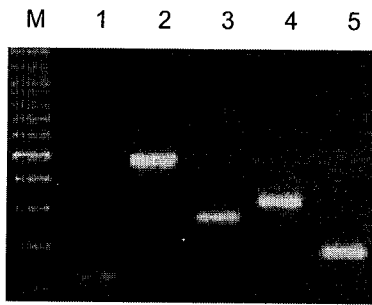


Fig. 1. Agarose gel electrophoretic patterns of multiplex PCR amplification of staphylococcal enterotoxin genes. Lane M, DNA molecular size standards marker (100 bp DNA ladder); Lane 1, enterotoxin type A of *S. aureus* ATCC 13565; Lane 2, enterotoxin type B of *S. aureus* ATCC 14458; Lane 3, enterotoxin type C of *S. aureus* ATCC 19095; Lane 4, enterotoxin type D of *S. aureus* 1634/93; Lane 5, enterotoxin type E of *S. aureus* ATCC 27664.

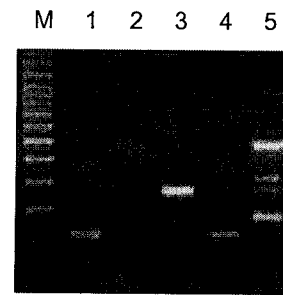


Fig. 2. Multiplex PCR amplification of enterotoxin genes in *S. aureus* isolated from clinical specimens and Kimbap. Lane M, DNA molecular size standards marker (100 bp DNA ladder); Lane 1, enterotoxin type A from Kimbap; Lane 2, enterotoxin type B from Kimbap; Lane 3, enterotoxin type C from clinical isolate; Lane 4, enterotoxin type A from clinical isolate; Lane 5, DNA mixture of reference strains from enterotoxin type A to E.

primers는 Becker 등²⁾이 제작한 primer sets를 이용하였다 (Table 1). 다중 중합효소 연쇄반응은 각각의 표준 균주와 검체에서 전통적인 boiling lysis 방법¹⁸⁾으로 추출한 시료 DNA 2.5 µl에 dATP, dGTP, dTTP, dCTP를 각각 2.5 mM이 되도록 혼합한 dNTP를 2 µl 넣은 후, 10X buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl) 2.5 µl, 25 mM MgCl₂ 3 µl, *Taq* DNA polymerase 0.25 U를 첨가하고 primer set (20 pmol/µl)를 각각 0.5 pmol이 되도록 넣은 후, 최종 반응하는 양이 25 µl가 되도록 멸균 증류수를 첨가하여 thermal cycler (Hybrid Ltd., Middlesex, U.K.)에서 표적 DNA의 증폭을 시도하였다. 이때 사용한 다중 중합효소 연쇄반응의 시간과 온도 조건으로는 94°C에서 2분간 최초 denaturation 이후, 94°C에서 1분 동안 denaturation, 55°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 2분 동안 extension하는 과정을 30회 반복하였으며, 마지막 extension은 72°C에서 15분간 지속하여 유지함으로써 완전한 extension이 이루어지도록 하였다.

다중 중합효소 연쇄반응이 끝난 후 생성된 DNA 증폭산물은 0.5 µg/ml의 ethidium bromide를 첨가한 2% agarose gel에 전기영동하여 ultraviolet trans-illuminator로 각각의 DNA band를 비교 관찰하였다.

결 과

1. 표준 균주의 다중 중합효소 연쇄반응

Dr. Karsten Becker와 ATCC로부터 분양받은 표준 균주의 장독소 생성 여부를 확인하기 위해서 이들 균주로부터 추출한 DNA를 대상으로 다중 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 이 결과 127 bp (staphylococcal enterotoxin A, SEA), 477 bp (staphylococcal enterotoxin B, SEB), 271 bp (staphylococcal enterotoxin C, SEC), 319 bp (staphylococcal enterotoxin D, SED), 178 bp (staphylococcal enterotoxin E, SEE)의 multiplex PCR 증폭 DNA 생성물

을 각 장독소 별로 모두 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

2. 임상 검체와 식품에서 분리한 *S. aureus*의 다중 중합효소 연쇄반응

임상 검체와 식품에서 분리 동정한 *S. aureus*를 표준 균주에서와 동일한 조건에서 다중 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 이 결과 임상 검체에서 분리한 총 77 주(株)의 *S. aureus* 분리 균주 중 60 주(株)에서, 그리고 식품에서 분리한 총 78 주(株)의 분리 균주 중에서는 43 주(株)가 장독소를 생성하는 것으로 확인되었다 (Fig. 2).

한편 장독소 생성능이 확인된 분리 균주의 장독소 유전자 별 subtype을 조사하였다. 이 결과 임상 검체에서 분리한 *S. aureus* 균주 중 subtype C가 55 주(株)로 가장 많았고, 이외에도 subtype B와 D에서 각각 1 주(株)와 E에서 3 주(株)가 검출되었다. 식품에서는 총 43 주(株)의 장독소 생성 균주 중 subtype A가 39 주(株)로 가장 많이 검출되었고, 이외에도 subtype B와 D에서 각각 2 주(株)씩이 검출되었다 (Table 2).

고 찰

미생물 배양 및 동정에 오랜 시간을 필요로 하는 생화학적 방법을 이용한 분리 동정 과정을 생략하고, 국내에서 점차로 그 중요성이 커지고 있는 식중독 원인 세균인 *S. aureus*의 장독소를 신속하고 정확하게 검출하기 위한 다중 중합효소 연쇄반응 방법을 확립하였다. 그리고 이 방법을 이용하여 임상 검체와 식품에서 분리한 *S. aureus*를 대상으로 A에서 E까지의 subtype을 유전자 수준에서 장독소 생성 여부를 조사하였다.

본 연구에서 포도상 구균의 장독소 유전자 검출에는 Becker 등²⁾이 제작한 primer sets를 사용하였다. Multiplex PCR을 실시한 결과 표준 균주에서 추출한 각각의 DNA에서 127 bp에서

477 bp까지의 PCR 증폭산물을 확인할 수 있었고, 이것은 Becker 등²⁾이 보고한 결과와 일치하여 본 연구에서 이용 가능한 것으로 확인하였다.

Multiplex PCR을 이용하여 임상 검체와 식품에서 분리 동정한 *S. aureus*의 장독소 생성 여부를 확인하였다. 그 결과 임상 검체에서 분리한 균주 총 77 주(株) 중 장독소를 생성하는 균주는 60 주(株) (78.0%)였고, 이 중 subtype C가 55 주(株) (91.6%)로 가장 많았고, 그 외에도 subtype B와 D (1.6%), E가 (5.0%)가 적은 비율로 검출되었다. 이 결과는 Hirooka 등⁹⁾이 장독소 subtype C가 주로 질병에 걸린 소, 양 혹은 염소에서 발견된다는 보고와 일치하는 것으로 나타났다. 하지만 Becker 등²⁾은 50 주(株)의 분리 세균 중 11 주(株) (22.0%)에서 장독소를 검출하였고, 이 중 가장 많은 6 주(株) (54.5%)를 subtype A로 검출하여 본 연구의 결과와 다소 차이가 있는 것으로 나타났다.

한편 식품 중 김밥에서 분리 동정한 *S. aureus*를 대상으로 장독소 생성 여부를 확인한 결과 총 78 주(株) 중 43 주(株) (55.1%)가 장독소를 생성하는 것으로 확인되었고, 이 중 subtype A가 39 주(株) (90.6%)로 가장 높은 비율을 차지하였으며, subtype B (4.6%)와 D (4.6%)가 적은 비율로 검출되었다. 식품에서 장독소의 생성 여부를 PCR 기법으로 확인한 Tsen 등²²⁾의 보고에 의하면 돼지나 닭 혹은 생선에서 subtype A (68.0%)가 가장 많이 검출되었고, D (4.0%)와 E (4.0%)를 적은 비율로 검출되어 본 연구와 비교해 볼 때 다소 낮은 검출률을 보이는 것으로 나타났다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 multiplex PCR 방법을 사용하면 임상이나 식품 검체에서 *S. aureus*의 장독소를 신속하게 검출할 수 있으며, 또한 검출감도도 매우 높은 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 보건복지부 보건의료기술 연구개발사업 (관리번호: HMP-99-F-06-0001, 식품 중 각종 위해요인의 위해성 평가와 관리방안 수립에 관한 연구)의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며 이에 감사하는 바입니다.

참 고 문 헌

- 1) Baird-Parker AC (1962): An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive Staphylococci. *J Appl Bacteriol*, **25**: 12-19.
- 2) Becker K, Roth R and Peters G (1998): Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol*, **36**(9): 2548-2553.
- 3) Bergdoll MS, Borja CR and Avena RM (1965): Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C. *J Bacteriol*, **90**: 1481-1485.
- 4) Bergdoll MS, Borja CR, Robbins RN and Weiss KF (1971): Identification of enterotoxin E. *Infect Immun*, **4**: 593-595.
- 5) Bergdoll MS, Surgalla MJ and Dack GM (1959): Staphylococcal enterotoxin: identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. *J Immuno*, **83**: 334-338.
- 6) Casman EP, Bennett RW, Dorsey E and Issa JA (1967): Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *Biochemistry*, **94**: 1875-1882.
- 7) Couch FL, Soltis MT and Betley MJ (1988): Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol*, **170**: 2954-2960.
- 8) Gomez-Lucia E, Goyache J, Orden JA, Blanco JL, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Dominguez L and Suarez G (1989): Production of enterotoxin A by supposedly nonenterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Appl Environ Microbiol*, **55**: 1447-1451.
- 9) Hirooka EY, Muller EE, Freitas JC, Vicente E, Yoshimoto Y and Bergdoll MS (1988): Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *Int J Food Microbiol*, **7**: 185-191.
- 10) Iandolo JJ (1989): Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Annu Rev Microbiol*, **43**: 375-402.
- 11) Jordens JZ, Duckworth GJ and Williams RJ (1989): Production of virulence factors by epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro. *J Med Microbiol*, **30**: 245-252.
- 12) Marrack P and Kappler J (1990): The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, **248**: 705-711.
- 13) Meyer RF and Palmieri MJ (1980): Single radial immunodiffusion method for screening staphylococcal isolates for enterotoxin. *Appl Environ Microbiol*, **40**: 1080-1085.
- 14) Niskanen A (1977): Staphylococcal enterotoxins and food poisoning. Production, properties and detection of enterotoxins. Publication 19. Technical Research Centre of Finland, Helsinki.
- 15) Pak SI and Han HR (1999): A comparison of RPLA and PCR for detection of enterotoxins in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated in dogs. *Korean J Vet Res*, **39**(4): 806-810.
- 16) Reiser RF, Robbins RN, Noletto AL, Khoe GP and Bergdoll MS (1984): Identification, purification, and some physicoche-

- mical properties of staphylococcal enterotoxin C₃. *Infect Immun*, **45**: 625-630.
- 17) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988): Primer-directed enzymic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491.
- 18) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989): *Molecular Cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 19) Schleifer KH and Kramer E (1980): Selective medium for isolating staphylococci. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg 1 Orig C*, **1**: 270-280.
- 20) Steffan RJ and Atlas RM (1988): DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol*, **54**: 2185-2191.
- 21) Thompson NE, Razdan M, Kuntzmann G, Aschenbach JM, Eveson ML and Bergdoll MS (1986): Detection of staphylococcal enterotoxins by enzyme-linked immunosorbent assays and radioimmunoassays: comparison of monoclonal and polyclonal antibody systems. *Appl Environ Microbiol*, **51**: 885-890.
- 22) Tsen HY and Chen TR (1992): Use of the polymerase chain reaction for specific detection of type A, D and E enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl Microbiol Biotech*, **30**: 124-129.
- 23) Windemann H, Luthy J and Maurer M (1989): ELISA with enzyme amplification for sensitive detection of staphylococcal enterotoxin in foods. *Int J Food Microbiol*, **8**: 25-34.
-